

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-524050

(P2006-524050A)

(43) 公表日 平成18年10月26日(2006. 10. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B O 3 O
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15 Z C C	4 B O 1 8
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 3 2
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 5 O
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 119 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-507400 (P2006-507400)	(71) 出願人	503089489
(86) (22) 出願日	平成16年3月18日 (2004. 3. 18)		ダイヴァーサ コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成17年11月18日 (2005. 11. 18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/008541		1 2 1 サン ディエゴ ディレクターズ
(87) 国際公開番号	W02004/085615		プレイス 4 9 5 5
(87) 国際公開日	平成16年10月7日 (2004. 10. 7)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	60/456, 972		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成15年3月20日 (2003. 3. 20)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 グルコシダーゼ、それをコードする核酸、並びにその製造および使用方法

(57) 【要約】

本発明は、グルコシダーゼ活性（ α -グルコシダーゼ活性を含む）を有するポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド、並びにこれらポリヌクレオチド及びポリペプチドを製造及び使用する方法を目的とする。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、デンプンの糖への加水分解（例えばデンプンのグルコースへの変換）を触媒するアルファ-グルコシダーゼとして用いられる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、アルファ-(1,4)及びアルファ-(1,6)グルコース結合の両方の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドはマルト-オリゴ糖及び液化デンプンの両方の加水分解を触媒することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号:1と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600若しくは1700残基の領域にわたって、又は配列番号:1の完全長にわたって、少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:3と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200若しくは1250残基の領域にわたって、又は配列番号:3の完全長にわたって、少なくとも55%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:5と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800残基の領域にわたって、又は配列番号:5の完全長にわたって、少なくとも65%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:7と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300残基の領域にわたって、又は配列番号:7の完全長にわたって、少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:9と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600残基の領域にわたって、又は配列番号:9の完全長にわたって、少なくとも60%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:11と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700残基の領域にわたって、又は配列番号:11の完全長にわたって、少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:13と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1350残基の領域にわたって、又は配列番号:13の完全長にわたって、少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:15と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600残基の領域にわたって、又は配列番号:15の完全長にわたって、少なくとも60%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:17と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1350残基の領域にわたって、又は配列番号:17の完全長にわたって、少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:19と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1650残基の領域にわたって、又は配列番号:19の完全長にわたって、少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:21と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400残基の領域にわたって、又は配列番号:21の完全長にわたって、少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列；または、

配列番号:23と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1650残基の領域にわたって、又は配列番号:23の完全長にわたって、少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列、

10

20

30

40

50

を含む単離又は組換え核酸であって、グルコシダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される、前記単離又は組換え核酸。

【請求項2】

以下の核酸配列を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸：

配列番号:1と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600若しくは1700残基の領域にわたって、又は配列番号:1の完全長にわたって、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

10

配列番号:3と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200若しくは1250残基の領域にわたって、又は配列番号:3の完全長にわたって、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:5と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800残基の領域にわたって、又は配列番号:5の完全長にわたって、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

20

配列番号:7と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300残基の領域にわたって、又は配列番号:7の完全長にわたって、少なくとも96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:9と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600残基の領域にわたって、又は配列番号:9の完全長にわたって、少なくとも65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

30

配列番号:11と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700残基の領域にわたって、又は配列番号:11の完全長にわたって、少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

40

配列番号:13と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1350残基の領域にわたって、又は配列番号:13の完全長にわたって、少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:15と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600残基の領域にわたって、又は配列番号:15の完全長にわたって、少なくとも65%、66%、67

50

%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:17と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1350残基の領域にわたって、又は配列番号:17の完全長にわたって、少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

10

配列番号:19と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1650残基の領域にわたって、又は配列番号:19の完全長にわたって、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；

配列番号:21と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400残基の領域にわたって、又は配列番号:21の完全長にわたって、少なくとも96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列；または、

配列番号:23と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1650残基の領域にわたって、又は配列番号:23の完全長にわたって、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列。

20

【請求項3】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21または配列番号:23に記載の配列を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項4】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24に記載の配列を含むポリペプチドをコードする、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

30

【請求項5】

配列比較アルゴリズムがBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、フィルタリング設定がblastall -p blastp -d "nr pataa" -F Fに設定され、他の全てのオプションが規定値に設定される、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項6】

グルコシダーゼ活性が α -グルコシダーゼ活性を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項7】

グルコシダーゼ活性が、アルファ-(1,4)グルコース結合、アルファ-(1,6)グルコース結合、アルファ-(1,2)グルコース結合、アルファ-(1,3)グルコース結合、又はそれらの組合せの加水分解を触媒する活性を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

40

【請求項8】

グルコシダーゼ活性が、アルファ-(1,4)グルコース結合及びアルファ-(1,6)グルコース結合の加水分解を触媒する活性を含む、請求項7に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項9】

グルコシダーゼ活性が、デンプン中のグルコシド結合を加水分解してマルトデキストリンの生成を触媒する活性を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項10】

50

グルコシダーゼ活性が、マルト-オリゴ糖及び液化デンプンの両者の加水分解を触媒する活性を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項11】

α -グルコシダーゼ活性が、1,4-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性又は1,6-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性を含む、請求項6に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項12】

グルコシダーゼ活性がエキソグルコシダーゼ活性を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項13】

α -グルコシダーゼ活性が、デンプン中のグルコシド結合を加水分解する活性を含む、請求項6に記載の単離又は組換え核酸。 10

【請求項14】

グルコシダーゼ活性が、デンプンの α -D-グルコース残基への加水分解を触媒する活性を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項15】

グルコシダーゼ活性が、デンプンの還元末端又は非還元末端からグルコース残基を切断する活性を含む、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項16】

グルコシダーゼ活性が熱安定性である、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項17】

ポリペプチドが、約37℃から約95℃の温度範囲を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。 20

【請求項18】

ポリペプチドが、約55℃から約85℃、約70℃から約95℃、又は約90℃から約95℃の温度範囲を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項19】

グルコシダーゼ活性が耐熱性である、請求項1に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項20】

ポリペプチドが、約37℃から約95℃の範囲の温度に暴露された後でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項19に記載の単離又は組換え核酸。 30

【請求項21】

ポリペプチドが、約55℃から約85℃又は約90℃から約95℃の範囲の温度に暴露された後でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項20に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項22】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21若しくは配列番号:23に記載の配列又はそれらの部分配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする単離または組換え核酸。 40

【請求項23】

長さが少なくとも約50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000若しくはそれより多い残基であるか、又は遺伝子若しくは転写物の完全長である、請求項23に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項24】

ストリンジェントな条件が、0.2XのSSC中で約65℃の温度にて約15分間の洗浄を含む洗浄工程を含む、請求項22に記載の単離又は組換え核酸。

【請求項25】

グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブであって、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番 50

号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21又は配列番号:23を含む配列の少なくとも10の連続する塩基を含み、結合又はハイブリダイゼーションによって前記核酸を同定する、前記核酸プローブ。

【請求項 26】

少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、約60から100又は約50から150の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む、請求項25に記載の核酸プローブ。

【請求項 27】

グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブであって、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21若しくは配列番号:23、又は請求項1若しくは2に記載の配列を含む配列の少なくとも約10の連続する残基を含む、前記核酸プローブ。 10

【請求項 28】

少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、約60から100又は約50から150の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む、請求項27に記載の核酸プローブ。

【請求項 29】

グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー配列対であって、請求項1若しくは22に記載の配列又はその部分配列を含む核酸を増幅させることができる、前記増幅プライマー配列対。 20

【請求項 30】

増幅プライマー配列対の各メンバーが、前記配列の少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む、請求項29に記載の増幅プライマー対。

【請求項 31】

グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法であって、請求項1若しくは22に記載の核酸配列又はその部分配列を増幅させることができる増幅プライマー配列対によって鋳型核酸を増幅することを含む、前記核酸を増幅する方法。

【請求項 32】

請求項1又は22に記載の配列を含む核酸を含む発現カセット。 30

【請求項 33】

請求項1又は22に記載の配列を含む核酸を含むベクター。

【請求項 34】

請求項1又は22に記載の配列を含む核酸を含むクローニングビヒクルであって、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含む、前記クローニングビヒクル。

【請求項 35】

ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルスベクターを含む、請求項34に記載のクローニングビヒクル。

【請求項 36】

細菌の人工染色体 (BAC)、プラスミド、バクテリオファージP1-由来ベクター (PAC)、酵母人工染色体 (YAC) または哺乳動物人工染色体 (MAC) を含む、請求項34に記載のクローニングビヒクル。 40

【請求項 37】

請求項1又は22に記載の配列を含む核酸を含む形質転換細胞。

【請求項 38】

請求項32に記載の発現カセットを含む形質転換細胞。

【請求項 39】

細胞が、細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は植物細胞である、請求項37又は38に記載の形質転換細胞。 50

【請求項 40】

請求項1又は22に記載の配列を含む非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 41】

動物がマウスである、請求項40に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 42】

請求項1又は22に記載の配列を含むトランスジェニック植物。

【請求項 43】

前記植物が、トウモロコシ、ソルガム、ジャガイモ、トマト、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、イネ、オオムギ、牧草又はタバコである、請求項42に記載のトランスジェニック植物。

10

【請求項 44】

請求項1又は22に記載の配列を含むトランスジェニック種子。

【請求項 45】

前記種子が、トウモロコシ、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、ヤシ、ヒマワリ、ゴマ、イネ、オオムギ、落花生又はタバコの種子である、請求項44に記載のトランスジェニック種子。

【請求項 46】

請求項1若しくは22に記載の配列又はその部分配列と相補的であるか又は前記とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 47】

長さが約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、又は約60から100塩基である、請求項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 48】

細胞内のグルコシダーゼメッセージの翻訳を阻害する方法であって、請求項1又は22に記載の配列と相補的であるか又は前記とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを前記細胞に投与するかまたは前記細胞で発現させることを含む、前記グルコシダーゼメッセージの翻訳を阻害する方法。

【請求項 49】

請求項1又は22に記載の配列の部分配列を含む二本鎖の阻害性RNA (RNAi) 分子。

30

【請求項 50】

長さが約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30又はそれより長い二重鎖ヌクレオチドである、請求項49に記載の二本鎖の阻害性RNA (RNAi) 分子。

【請求項 51】

二本鎖の阻害性RNA (RNAi) を細胞に投与するか又は細胞内で発現させることを含む、細胞内のグルコシダーゼの発現を阻害する方法であって、前記RNAが請求項1又は22に記載の配列の部分配列を含む、前記グルコシダーゼの発現を阻害する方法。

【請求項 52】

以下の (a) 又は (b) を含む単離又は組換えポリペプチド：

(a) 配列番号:2と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、若しくは550残基の領域にわたって、又は配列番号:2の完全長にわたって少なくとも約80%の配列同一性を有する配列、

配列番号:4と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400残基の領域にわたって、又は配列番号:4の完全長にわたって少なくとも約55%の配列同一性を有する配列、

配列番号:6と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、若しくは600残基の領域にわたって、又は配列番号:6の完全長にわたって少なくとも約65%の配列同一性を有する配列、

配列番号:8と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600

40

50

、650、700、若しくは750残基の領域にわたって、又は配列番号:8の完全長にわたって少なくとも約95%の配列同一性を有する配列、

配列番号:10と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、若しくは500残基の領域にわたって、又は配列番号:10の完全長にわたって少なくとも約60%の配列同一性を有する配列、

配列番号:12と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、若しくは550残基の領域にわたって、又は配列番号:12の完全長にわたって少なくとも約50%の配列同一性を有する配列、

配列番号:14と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、若しくは450残基の領域にわたって、又は配列番号:14の完全長にわたって少なくとも約50%の配列同一性を有する配列、 10

配列番号:16と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、若しくは500残基の領域にわたって、又は配列番号:16の完全長にわたって少なくとも約60%の配列同一性を有する配列、

配列番号:18と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、若しくは1350残基の領域にわたって、又は配列番号:18の完全長にわたって少なくとも約50%の配列同一性を有する配列、

配列番号:20と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、若しくは1650残基の領域にわたって、又は配列番号:20の完全長にわたって少なくとも約80%の配列同一性を有する配列、 20

配列番号:22と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、若しくは1400残基の領域にわたって、又は配列番号:22の完全長にわたって少なくとも約95%の配列同一性を有する配列、または、

配列番号:24と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、若しくは1650残基の領域にわたって、又は配列番号:24の完全長にわたって少なくとも約80%の配列同一性を有する配列であって、 30

前記配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される、前記配列；又は

(b) 以下の(i)又は(ii)の配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド：

(i) 配列番号:1と少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む核酸配列、配列番号:3と少なくとも55%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:5と少なくとも65%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:7と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:9と少なくとも60%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:11と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:13と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:15と少なくとも60%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:17と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:19と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:21と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列、または、配列番号:23と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列であって、前記配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される、前記核酸配列；又は(ii) 配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23に記載の配列を含む核酸又はその部分配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸の配列。 40

【請求項53】

以下を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド：

配列番号:2と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、若しくは5 50

50残基の領域にわたって、又は配列番号:2の完全長にわたって少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99%の配列同一性を有する配列；

配列番号:4と少なくとも約100、150、200、250、300、350、若しくは400残基の領域にわたって、又は配列番号:4の完全長にわたって少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列；

配列番号:6と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、若しくは600残基の領域にわたって、又は配列番号:6の完全長にわたって少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列； 10

配列番号:8と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、若しくは750残基の領域にわたって、又は配列番号:8の完全長にわたって少なくとも96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列；

配列番号:10と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、若しくは500残基の領域にわたって、又は配列番号:10の完全長にわたって少なくとも65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列； 20

配列番号:12と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、若しくは550残基の領域にわたって、又は配列番号:12の完全長にわたって少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列；

配列番号:14と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、若しくは450残基の領域にわたって、又は配列番号:14の完全長にわたって少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列； 30

配列番号:16と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、若しくは500残基の領域にわたって、又は配列番号:16の完全長にわたって少なくとも65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列；

配列番号:18と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、若しくは450残基の領域にわたって、又は配列番号:18の完全長にわたって少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列； 40

配列番号:20と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、若しくは550残基の領域にわたって、又は配列番号:20の完全長にわたって少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列；

配列番号:22と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、若しくは450残基の領域にわたって、又は配列番号:22の完全長にわたって少なくとも96%、97%、98%又は9 50

9%の配列同一性を有する配列；または、

配列番号:24と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、若しくは550残基の領域にわたって、又は配列番号:24の完全長にわたって少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列。

【請求項54】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、又は配列番号:24に記載のアミノ酸配列を含む、請求項96に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項55】

グルコシダーゼ活性を有する、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項56】

グルコシダーゼ活性が α -グルコシダーゼ活性を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項57】

グルコシダーゼ活性が、アルファ-(1,4)グルコース結合、アルファ-(1,6)グルコース結合、アルファ-(1,2)グルコース結合、アルファ-(1,3)グルコース結合、又はそれらの組合せの加水分解を触媒する活性を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項58】

グルコシダーゼ活性が、アルファ-(1,4)グルコース結合及びアルファ-(1,6)グルコース結合の加水分解を触媒する活性を含む、請求項57に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項59】

グルコシダーゼ活性が、デンプン中のグルコシド結合を加水分解してマルトデキストリンの生成を触媒する活性を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項60】

グルコシダーゼ活性が、マルト-オリゴ糖及び液化デンプンの両者の加水分解を触媒することを含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項61】

α -グルコシダーゼ活性が、1,4-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性又は1,6-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性を含む、請求項55に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項62】

グルコシダーゼ活性がエキソグルコシダーゼ活性を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項63】

グルコシダーゼ活性が、デンプン中のグルコシド結合を加水分解する活性を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項64】

グルコシダーゼ活性が、デンプンの α -D-グルコース残基への加水分解を触媒する活性を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項65】

グルコシダーゼ活性が、デンプンの還元末端又は非還元末端からグルコース残基を切断する活性を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項66】

グルコシダーゼ活性が熱安定性である、請求項55に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項67】

ポリペプチドが、約37℃から約95℃の温度範囲を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維

10

20

30

40

50

持する、請求項66に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項68】

ポリペプチドが、約55℃から約85℃、約70℃から約95℃、又は約90℃から約95℃の温度範囲を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項66に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項69】

グルコシダーゼ活性が耐熱性である、請求項55に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項70】

約37℃から約95℃の範囲の温度に暴露された後でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項69に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項71】

約55℃から約85℃又は約90℃から約95℃の範囲の温度に暴露された後でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項69に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項72】

請求項52に記載のポリペプチドを含み、シグナル配列を欠く単離又は組換えポリペプチド。

【請求項73】

請求項52に記載のポリペプチドを含み、さらに異種シグナル配列を有する単離又は組換えポリペプチド。

【請求項74】

グルコシダーゼ活性が、37℃において、タンパク質1ミリグラムにつき約100から約1000ユニット、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約750ユニット、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニット、又はタンパク質1ミリグラムにつき約750から約1000ユニットの範囲の比活性を含む、請求項69に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項75】

耐熱性が、上昇温度に加熱した後で前記グルコシダーゼの37℃における比活性の少なくとも半分を維持することを含む、請求項70に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項76】

耐熱性が、上昇した温度まで加熱した後で、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニットの範囲の37℃の比活性を維持することを含む、請求項70に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項77】

少なくとも1つのグリコシル化部位を含む、請求項52に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項78】

グリコシル化がN-結合グリコシル化である、請求項77に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項79】

P. パストリス (pastoris) またはS. ポンベ (pombe) で発現されるとグリコシル化される、請求項78に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項80】

約pH6.5、pH6.0、pH5.5、pH5.0、pH4.5又はpH4.0を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項55に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項81】

約pH8.0、pH8.5、pH9、pH9.5、pH10、又はpH10.5を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持する、請求項55に記載の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項82】

液体、固体又はゲルを含む、請求項52に記載のポリペプチドを含むタンパク質調製物。

【請求項83】

請求項52に記載のポリペプチド及び第二のドメインを含むヘテロダイマー。

10

20

30

40

50

【請求項 84】

第二のドメインがポリペプチドであり、ヘテロダイマーが融合タンパク質である、請求項83に記載のヘテロダイマー。

【請求項 85】

第二のドメインがエピトープ又はタグである、請求項84に記載のヘテロダイマー。

【請求項 86】

請求項52に記載のポリペプチドを含むホモダイマー。

【請求項 87】

固定化ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが請求項52に記載の配列又はその部分配列を含む、前記固定化ポリペプチド。

10

【請求項 88】

細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレイまたはキャピラリー管に固定化された、請求項87に記載の固定化ポリペプチド。

【請求項 89】

請求項52に記載の固定化ポリペプチドを含むアレイ。

【請求項 90】

固定化された請求項1又は22に記載の核酸を含むアレイ。

【請求項 91】

請求項52に記載のポリペプチドと特異的に結合する単離または組換え抗体。

20

【請求項 92】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項91に記載の単離又は組換え抗体。

【請求項 93】

請求項52に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体を含むハイブリドーマ。

【請求項 94】

請求項52に記載のポリペプチド又はその部分配列を含む動物用栄養補助食品。

【請求項 95】

前記ポリペプチドがグリコシル化されている、請求項94に記載の栄養補助食品。

【請求項 96】

請求項52に記載のポリペプチドを含む食用酵素デリバリーマトリックス。

30

【請求項 97】

デリバリーマトリックスがベレットを構成している、請求項96に記載の食用酵素デリバリーマトリックス。

【請求項 98】

ポリペプチドがグリコシル化されている、請求項96に記載の食用酵素デリバリーマトリックス。

【請求項 99】

ポリペプチドが耐熱性又熱安定性グルコシダーゼ活性を有する、請求項96に記載の食用酵素デリバリーマトリックス。

40

【請求項 100】

以下の工程を含むグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する方法：

(a) 請求項91に記載の抗体を提供する工程；

(b) ポリペプチドを含むサンプルを提供する工程；および、

(c) 工程 (a) の抗体と工程 (b) のサンプルを前記抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合する条件下で接触させ、それによってグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する工程。

【請求項 101】

非ヒト動物に液性免疫応答を生じさせるために十分な量で請求項1又は22に記載の核酸

50

又はその部分配列を投与し、それによって抗グルコシダーゼ抗体を製造することを含む、抗グルコシダーゼ抗体を製造する方法。

【請求項 102】

非ヒト動物に液性免疫応答を生じさせるために十分な量で請求項52に記載のポリペプチド又はその部分配列を投与し、それによって抗グルコシダーゼ抗体を製造することを含む、抗グルコシダーゼ抗体を製造する方法。

【請求項 103】

以下の工程を含む組換えポリペプチドを製造する方法：（a）プロモーターに機能的に連結された核酸を提供する工程であって、前記核酸が請求項1又は22に記載の配列を含む核酸である、前記工程；および、（b）ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程（a）の核酸を発現させ、それによって組換えポリペプチドを製造する工程。 10

【請求項 104】

さらに、工程（a）の核酸で宿主細胞を形質転換し、続いて工程（a）の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組換えポリペプチドを製造する工程を含む、請求項103に記載の方法。

【請求項 105】

（a）請求項55に記載のポリペプチドを提供する工程；
（b）グルコシダーゼ基質を提供する工程；および、
（c）前記ポリペプチドを工程（b）の基質と接触させ、基質の量の減少又は反応生成物の量の増加を検出する工程、 20
を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法であって、前記基質の量が減少又は前記反応生成物の量が増加すればグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドが検出されたとする、前記方法。

【請求項 106】

基質がデンプンである、請求項105に記載の方法。

【請求項 107】

（a）請求項55に記載のポリペプチドを提供する工程；
（b）試験基質を提供する工程；および、
（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の試験基質と接触させ、基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出する工程、 30
を含むグルコシダーゼ基質を同定する方法であって、基質量が減少または反応生成物量が増加すれば前記試験基質をグルコシダーゼ基質として同定する、前記方法。

【請求項 108】

以下の工程を含む、試験化合物がポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する方法：

（a）核酸または前記核酸を含むベクターを前記核酸のポリペプチドへの翻訳を許容する条件下で発現させる工程であって、前記核酸が請求項1又は22に記載の配列を有する核酸である、前記工程；
（b）試験化合物を提供する工程；
（c）前記ポリペプチドを前記試験化合物と接触させる工程；および、 40
（d）工程（b）の試験化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程。

【請求項 109】

以下の工程を含む、試験化合物がポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する方法：

（a）請求項52に記載の配列を有するポリペプチドを提供する工程；
（b）試験化合物を提供する工程；
（c）前記ポリペプチドを前記試験化合物と接触させる工程；および、
（d）工程（b）の試験化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程。 50

【請求項 1 1 0】

(a) 請求項55に記載のポリペプチドを提供する工程；
(b) 試験化合物を提供する工程；
(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の試験化合物と接触させてグルコシダーゼの活性を測定する工程、

を含むグルコシダーゼ活性の調節物質を同定する方法であって、前記試験化合物の非存在下におけるグルコシダーゼ活性と比較して前記試験化合物の存在下で測定されたグルコシダーゼ活性が変化すれば、前記試験化合物をグルコシダーゼ活性を調節する物質として同定する、前記方法。

【請求項 1 1 1】

グルコシダーゼ活性が、グルコシダーゼ基質を提供すること、および、基質量の減少若しくは反応生成物量の増加、又は基質量の増加若しくは反応生成物量の減少を検出することによって測定される、請求項110に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

試験化合物非存在下における基質量又は反応生成物量と比較して前記試験化合物存在下における基質量が減少または反応生成物量が増加したならば、前記試験化合物をグルコシダーゼ活性の活性化物質として同定する、請求項111に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

試験化合物非存在下における基質又は反応生成物量と比較して前記試験化合物存在下における基質量が増加または反応生成物量が減少したならば、前記試験化合物をグルコシダーゼの阻害物質として同定する、請求項111に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

プロセッサおよびデータ保存装置を含むコンピュータシステムであって、前記データ保存装置にはポリペプチド配列又は核酸配列が保存されており、前記ポリペプチド配列が請求項52に記載の配列、請求項1若しくは請求項22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記コンピュータシステム。

【請求項 1 1 5】

さらに、配列比較アルゴリズム、及び少なくとも1つの参照配列が保存された保存装置を含む、請求項114に記載のコンピュータシステム。

【請求項 1 1 6】

配列比較アルゴリズムが多型性を表示するコンピュータプログラムを含む、請求項115に記載のコンピュータシステム。

【請求項 1 1 7】

配列内の1つまたは2つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーをさらに含む、請求項114に記載のコンピュータシステム。

【請求項 1 1 8】

ポリペプチド配列又は核酸配列が保存されているコンピュータ読み出し可能媒体であって、前記ポリペプチド配列が、請求項52に記載のポリペプチド；請求項1又は請求項22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む配列である、前記コンピュータ読み出し可能媒体。

【請求項 1 1 9】

以下の工程を含む配列内の特徴を同定する方法：(a) 配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定するコンピュータプログラムを用いて配列を読み取る工程であって、前記配列はポリペプチド配列又は核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列が請求項52に記載のポリペプチドまたは請求項1又は請求項22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む配列である、前記工程；および、(b) 前記コンピュータプログラムにより前記配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定する前記工程。

【請求項 1 2 0】

以下の工程を含む第一の配列を第二の配列と比較する方法：(a) 配列を比較するコンピュータプログラムを用いて第一の配列および第二の配列を読み取る工程であって、前記

10

20

30

40

50

第一の配列はポリペプチド配列又は核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列が、請求項52に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは請求項22に記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含む配列である、前記工程；および、(b) 前記第一の配列と前記第二の配列間の相違を前記コンピュータプログラムにより決定する工程。

【請求項121】

第一の配列と前記第二の配列間の相違を決定する工程がさらに多型性を同定する工程を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項122】

配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定するアイデンティファイヤーをさらに含む、請求項120に記載の方法。

【請求項123】

コンピュータプログラムを用いて第一の配列を読み取り、さらに前記配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定することを含む、請求項122に記載の方法。

【請求項124】

以下の工程を含む、環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する方法：

(a) 請求項29に記載の増幅プライマー配列対を提供する工程；

(b) 環境サンプルから核酸を単離するか、又は前記サンプル内の核酸がハイブリダイゼーションのために前記増幅プライマー対に接近できるように前記環境サンプルを処理する工程；および、

(c) 工程(b)の核酸を工程(a)の増幅プライマー対と一緒にして前記環境サンプルの核酸を増幅し、それによって環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する工程。

【請求項125】

増幅プライマー配列対の各メンバーが、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23に記載の配列又はその部分配列の少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む、請求項124に記載の方法。

【請求項126】

以下の工程を含む、環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する方法：

(a) 請求項1若しくは22に記載の配列又はその部分配列を含むポリヌクレオチドプローブを提供する工程；

(b) 環境サンプルから核酸を単離するか、又は前記サンプル内の核酸がハイブリダイゼーションのために工程(a)のポリヌクレオチドに接近できるように前記環境サンプルを処理する工程；

(c) 工程(b)の単離された核酸又は処理された環境サンプルを工程(a)のポリヌクレオチドプローブと一緒にする工程；および、

(d) 工程(a)のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離し、それによって環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する工程。

【請求項127】

環境サンプルが、水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプルまたは生物学的サンプルを構成する請求項124に記載の方法。

【請求項128】

生物学的サンプルが、細菌細胞、原生動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞又は哺乳動物細胞に由来する、請求項127に記載の方法。

【請求項129】

以下の工程を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の変種を作製する方法：

10

20

30

40

50

(a) 請求項1又は 22に記載の配列を含む鋳型核酸を提供する工程；および、

(b) 前記鋳型配列内の1つ又は2つ以上のヌクレオチドを改変、欠失又は付加させて前記鋳型核酸の変種を作製する工程。

【請求項 1 3 0】

さらに、変種核酸を発現させて変種グルコシダーゼポリペプチドを作製することを含む、請求項129に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

改変、付加又は欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンプリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、
10 遺伝子再アッセンプリ、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセンプリ（SLR）およびそれらの組合せを含む方法によって導入される、請求項129に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

改変、付加または欠失が、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-
20 選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成およびそれらの組合せを含む方法によって導入される、請求項129に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

鋳型核酸によってコードされるポリペプチドの活性または安定性とは変異した若しくは異なる活性または変異した若しくは異なる安定性を有するグルコシダーゼが得られるまで
25 反復される、請求項129に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

変種グルコシダーゼ変種が耐熱性であり、上昇した温度に暴露された後である程度の活性を維持する、請求項133に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

変種グルコシダーゼポリペプチドが、鋳型核酸によってコードされるグルコシダーゼと比較してグリコシル化が増加している、請求項133に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

変種グルコシダーゼポリペプチドは高温下でグルコシダーゼ活性を有するが、鋳型核酸によってコードされるグルコシダーゼは前記高温下で活性をもたない、請求項133に記載
30 の方法。

【請求項 1 3 7】

鋳型核酸のコドン使用頻度とは異なるコドン使用頻度を示すグルコシダーゼコード配列が得られるまで繰り返し反復される、請求項129に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

鋳型核酸のメッセージ発現レベルまたは安定性レベルより高いまたは低い発現レベル若しくは安定性レベルを有するグルコシダーゼ遺伝子が得られるまで繰り返し反復される、
40 請求項129に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、請求項1又は 22に記載の配列を含む核酸を提供する工程；および、

(b) 工程（a）の核酸の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンに
置換し、それによって前記核酸を改変して宿主細胞内での前記の発現を増加させる工程、

を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを改変して宿主細胞における前記核酸の発現を高める方法であって、前記優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先コドン
50 または前記低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示され

るコドンである、前記方法。

【請求項140】

以下の工程を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更する方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、請求項1又は22に記載の配列を含む核酸を提供する工程；および、

(b) 工程(a)の核酸のコドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする異なるコドンで置換し、それによってグルコシダーゼをコードする核酸内のコドンを変更する工程。

【請求項141】

(a) 請求項1又は22に記載の配列を含む、グルコシダーゼポリペプチドをコードする本発明の核酸を提供する工程；および、

(b) 工程(a)の核酸内の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンで置換し、それによって前記核酸を変更して宿主細胞における前記核酸の発現を高める工程、

を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞における前記核酸の発現を高める方法であって、前記優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである、前記工程。

【請求項142】

(a) グルコシダーゼペプチドをコードする、請求項1又は22に記載の配列を含む核酸を提供する工程；および、

(b) 工程(a)の核酸内の少なくとも1つの好ましいコドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする非優先コドンまたは低優先コドンで置換し、それによって前記核酸を変更して宿主細胞におけるその発現を低下させる工程を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞における前記核酸の発現を低下させる方法であって、前記優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度提示されるコドンである、前記方法。

【請求項143】

宿主細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞または哺乳動物細胞である、請求項141又は142に記載の方法。

【請求項144】

以下の工程を含む、複数の変更グルコシダーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する方法であって、前記変更活性部位又は基質結合部位が、第一の活性部位又は第一の基質結合部位をコードする配列を含む第一の核酸に由来する、前記ライブラリーの作製方法：

(a) 第一の活性部位又は第一の基質結合部位をコードする第一の核酸を提供する工程であって、前記第一の核酸配列は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23に記載の配列又はその部分配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、さらに前記核酸はグルコシダーゼ活性部位またはグルコシダーゼ基質結合部位をコードする核酸である、前記工程；

(b) 第一の核酸内の複数の標的コドンで天然に存在するアミノ酸変種をコードする変異導入オリゴヌクレオチドの組を提供する工程；

(c) 前記変異導入オリゴヌクレオチドの組を用いて、変異を導入された各アミノ酸コドンにおいて一連のアミノ酸変種をコードする、活性部位コード変種核酸の組又は基質結合部位コード変種核酸の組を生成し、それによって複数の変更されたグルコシダーゼ活性

10

20

30

40

50

部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する工程。

【請求項 1 4 5】

最適化定方向進化システム、遺伝子部位飽和変異導入 (GSSM)、又は合成連結再アッセンブリ (SLR) を含む方法によって工程 (a) の第一の核酸に変異導入することを含む、請求項144に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入 (GSSM)、合成連結再アッセンブリ (SLR) 及びそれらの組合せを含む方法によって工程 (a) の第一の核酸に変異導入することを含む、請求項144に記載の方法。

10

【請求項 1 4 7】

組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成及びそれらの組合せを含む方法によって工程 (a) の第一の核酸または変種に変異導入することを含む請求項144に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

20

以下の工程を含む小分子を製造する方法：

(a) 小分子を合成または改変することができる複数の生合成酵素を提供する工程であって、前記酵素の1つが請求項 1 又は22に記載の配列を含む核酸によってコードされるグルコシダーゼ酵素を含む、前記工程；

(b) 工程 (a) の酵素の少なくとも1つに対する基質を提供する工程；および、

(c) 複数の生物触媒反応を促進する条件下で工程 (b) の基質を前記酵素と反応させて一連の生物触媒反応により小分子を生成する工程。

【請求項 1 4 9】

以下の工程を含む小分子を改変する方法：

(a) グルコシダーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素が請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドを含む、前記工程；

30

(b) 小分子を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のグルコシダーゼ酵素によって触媒される酵素反応が促進される条件下で前記酵素を工程 (b) の小分子と反応させ、それによってグルコシダーゼ酵素反応により小分子を改変する工程。

【請求項 1 5 0】

工程 (a) の酵素に対する複数の小分子基質を含み、それによってグルコシダーゼ酵素により触媒される少なくとも1つの酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含む、請求項149に記載の方法。

40

【請求項 1 5 1】

酵素による複数の生物触媒反応を促進する条件下で複数の追加酵素を含み、前記複数の酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製する、請求項149に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

さらに、所望の活性を示す特定の小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために前記ライブラリーを試験する工程を含む、請求項151に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

ライブラリーの試験工程がさらに、所望の活性をもつ特定の改変小分子の有無について改変小分子の一部を試験することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の前記

50

一部分を生成するために用いられた生物触媒反応の1つ以外の全てを系統的に排除し、所望の活性をもつ特定の改変小分子を生成する少なくとも1つの特異的な生物触媒反応を同定する工程を含む、請求項152に記載の方法。

【請求項154】

以下の工程を含む、グルコシダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法：

(a) グルコシダーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素が請求項55に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、前記工程；および、

(b) 工程(a)の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、グルコシダーゼ活性について残余の配列を試験し、それによってグルコシダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程。 10

【請求項155】

グルコシダーゼ活性が、グルコシダーゼ基質を提供すること、および、前記基質の量の減少又は反応生成物の量の増加を検出することによって測定される、請求項154に記載の方法。

【請求項156】

以下の工程を含む、リアルタイム代謝フラックス分析による新規または改変された表現型の全細胞操作のための方法：

(a) 細胞の遺伝的構成を改変することによって改変細胞を作製する工程であって、前記遺伝的構成が請求項1又は22に記載の配列を含む核酸を細胞に導入することによって改変される、前記工程； 20

(b) 前記改変細胞を培養して複数の改変細胞を作製する工程；

(c) 工程(b)の細胞培養物をリアルタイムでモニターすることによって前記細胞の少なくとも1つの代謝パラメーターを測定する工程；および、

(d) 工程(c)のデータを分析して、前記測定パラメーターが類似の条件下で未改変細胞での対応する測定値と異なるか否かを決定し、それによって細胞の操作された表現型をリアルタイム代謝フラックス分析により同定する工程。

【請求項157】

細胞の遺伝的構成が、細胞内の配列の欠失もしくは改変又は遺伝子発現のノックアウトを含む方法によって改変される、請求項155に記載の方法。 30

【請求項158】

さらに、新規に操作された表現型を含む細胞を選別することを含む、請求項157に記載の方法。

【請求項159】

さらに、選別された細胞を培養し、それによって新規に操作された表現型を含む新規な細胞株を作製することを含む、請求項158に記載の方法。

【請求項160】

以下の工程を含むデンプンを加水分解する方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが請求項55に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程； 40

(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と前記ポリペプチドがデンプンを加水分解する条件下で接触させる工程。

【請求項161】

組成物が、 α -1,4グルコシド結合又は α -1,6-グルコシド結合を含む、請求項160に記載の方法。

【請求項162】

以下の工程を含む、組成物からデンプンを液化又はデンプンを除去する方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペ 50

プチドが請求項55に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；

(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と前記ポリペプチドがデンプンを除去又は液化する条件下で接触させる工程。

【請求項163】

グルコシダーゼポリペプチドをグリコシル化し、それによって前記グルコシダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高める工程を含む、グルコシダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高める方法であって、前記ポリペプチドが請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドの連続する少なくとも30のアミノ酸を含むポリペプチドである、前記方法。

10

【請求項164】

グルコシダーゼの比活性が、約37℃を超える温度から約95℃の範囲の温度で熱安定性または耐熱性である、請求項163に記載の方法。

【請求項165】

請求項1又は22に記載の配列を有する核酸配列を含むベクターを発現させることを含む、細胞において組換えグルコシダーゼポリペプチドを過剰発現させる方法であって、前記過剰発現が、高活性プロモーターの使用、ニシストロンベクターの使用によって、または前記ベクターの遺伝子増幅によって達成される、前記組換えグルコシダーゼポリペプチドを過剰発現させる方法。

20

【請求項166】

請求項52に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含む洗剤組成物であって、前記ポリペプチドがグルコシダーゼ活性を含む、前記洗剤組成物。

【請求項167】

グルコシダーゼが、非表面活性グルコシダーゼ又は表面活性グルコシダーゼである、請求項166に記載の製剤組成物。

【請求項168】

グルコシダーゼが、非水性液体組成物、注型成形固体、顆粒形態、粒状形態、圧縮錠剤形態、ゲル、ペースト又はシロップ形態として処方される、請求項166に記載の洗剤組成物。

30

【請求項169】

以下の工程を含む対象物の洗浄方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを含む組成物を提供する工程であって、前記ポリペプチドが請求項55に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；

(b) 対象物を提供する工程；および、

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の対象物と前記組成物が前記対象物を洗浄することができる条件下で接触させる工程。

【請求項170】

40

以下の工程を含む、動物による消費に先立って飼料又は食品中のデンプンを加水分解する方法：

(a) デンプンを含む飼料原料を提供する工程であって、前記デンプンがグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドによって加水分解することができ、前記ポリペプチドは請求項55に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；

(b) 工程(a)のポリペプチドを前記飼料又は食品に、デンプンを加水分解して処理食品又は飼料を製造するために十分な時間、十分な量で添加し、それによって動物による消費の前に食品又は飼料中のデンプンを加水分解する工程。

【請求項171】

50

食品又は飼料がコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類又はジャガイモを含む請求項170に記載の方法。

【請求項 1 7 2】

請求項52に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む飼料又は食品。

【請求項 1 7 3】

デンプン、及び、請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含む組成物。

【請求項 1 7 4】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む繊維。

【請求項 1 7 5】

以下の工程を含む繊維物を脱サイズする方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが、請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含むポリペプチドである、前記工程；

(b) 繊維物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の繊維物と前記グルコシダーゼが前記繊維物を脱サイズすることができる条件下で接触させる工程。

【請求項 1 7 6】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む紙又は紙製品又は紙パルプ。

【請求項 1 7 7】

以下の工程を含む紙又は繊維を脱インクする方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが、請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含むポリペプチドである、前記工程；

(b) 紙又は繊維を含む組成物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と前記ポリペプチドが前記紙又は繊維を脱インクすることができる条件下で接触させる工程。

【請求項 1 7 8】

以下の工程を含むリグノセルロース繊維の処理方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；

(b) リグノセルロース繊維を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の繊維と、前記ポリペプチドが前記繊維を処理してそれによって前記繊維の特性を改善することができる条件下で接触させる工程。

【請求項 1 7 9】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、高マルトース又は高グルコース液若しくはシロップ。

【請求項 1 8 0】

以下の工程を含む、高マルトース又は高グルコースシロップを製造する方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；

(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、

(c) 前記工程 (a) のポリペプチドが前記工程 (b) の組成物を加水分解することができる条件下で工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と接触させ、それによって高マルトース又は高グルコースシロップを生成する工程。

10

20

30

40

50

【請求項 181】

デンプンが、コメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類、ジャガイモ又はサツマイモに由来する請求項180に記載の方法。

【請求項 182】

以下の工程を含むデンプン含有産出流体の流れを改善する方法：

(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；

(b) デンプンを含む産出流体を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の産出流体と前記グルコシダーゼが前記産出流体中のデンプンを加水分解することができる条件下で接触させ、それによって前記産出流体の密度を低下させて前記産出流体の流れを改善する工程。 10

【請求項 183】

産出流体が地下層に由来する、請求項182に記載の方法。

【請求項 184】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むアンチステリング組成物。

【請求項 185】

以下の工程を含む焼成製品の老化を防ぐ方法：

(a) 請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程； 20

(b) デンプンを含む、焼成に用いられる組成物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と、前記ポリペプチドが焼成に用いられる組成物中のデンプンを加水分解することができる条件下で一緒にし、それによって焼成製品の老化を防ぐ工程。

【請求項 186】

焼成製品がパン又はパン製品である、請求項185に記載の方法。

【請求項 187】

以下の工程を含む醸造又はアルコール製造においてグルコシダーゼを使用する方法：

(a) 請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程； 30

(b) デンプン又は多糖類を含む、醸造又はアルコール製造に用いられる組成物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と、前記ポリペプチドが醸造又はアルコール製造で用いられる組成物中のデンプン又は多糖類を加水分解することができる条件下で一緒にする工程。

【請求項 188】

デンプン又は多糖類を含む組成物がビールである、請求項187に記載の方法。

【請求項 189】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むアルコール飲料。 40

【請求項 190】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むビール。

【請求項 191】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 192】

核酸が植物プロモーターに機能的に連結されている、請求項32に記載の発現カセット。

【請求項 193】

さらに植物発現ベクターを含む、請求項192に記載の発現カセット。

【請求項194】

植物発現ベクターが植物ウイルスを含む、請求項193に記載の発現カセット。

【請求項195】

植物プロモーターが、ジャガイモのプロモーター、イネのプロモーター、トウモロコシのプロモーター、コムギ又はオオムギのプロモーターを含む、請求項192に記載の発現カセット。

【請求項196】

プロモーターがアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のT-DNAに由来するプロモーターを含む、請求項192に記載の発現カセット。

10

【請求項197】

プロモーターが構成的プロモーターである、請求項192に記載の発現カセット。

【請求項198】

構成的プロモーターがCaMV35Sである、請求項197に記載の発現カセット。

【請求項199】

プロモーターが誘導性プロモーターである、請求項192に記載の発現カセット。

【請求項200】

組織特異的プロモーターが、種子特異的、葉特異的、根特異的、茎特異的又は離脱-誘導プロモーターである、請求項199に記載の発現カセット。

【請求項201】

20

植物細胞がジャガイモ、イネ、トウモロコシ、コムギ、タバコ又はオオムギの細胞である、請求項39に記載の形質転換細胞。

【請求項202】

以下の工程を含むトランスジェニック植物の製造方法：

(a) 請求項1又は22に記載の配列を含む異種核酸配列を細胞に導入し、それによって形質転換植物細胞を作製する工程；

(b) 前記形質転換細胞からトランスジェニック植物を作出する工程。

【請求項203】

工程(a)がさらに、植物細胞プロトプラストのエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションにより前記異種核酸配列を導入することを含む、請求項202に記載の方法。

30

【請求項204】

工程(a)がさらに、DNA粒子ボンバードメントによって植物組織に直接前記異種核酸配列を導入することを含む、請求項202に記載の方法。

【請求項205】

工程(a)がさらに、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 宿主を用いて植物細胞DNAに異種核酸配列を導入することを含む、請求項202に記載の方法。

【請求項206】

以下の工程を含む植物細胞において異種核酸配列を発現させる方法：

40

(a) プロモーターに機能的に連結された異種核酸配列で前記植物細胞を形質転換する工程であって、前記異種核酸配列が請求項1又は22に記載の配列を含む、前記工程；

(b) 前記異種核酸配列が前記植物細胞で発現する条件下で前記植物を生長させる工程。

【請求項207】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22又は配列番号:24の残基1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、又は1から33に記載の配列からなる単離又は組換えシグナル配列。

50

【請求項 208】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22又は配列番号:24の残基1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、又は1から33に記載の配列を含む単離又は組換えシグナル配列。

【請求項 209】

請求項207に記載のシグナル配列を含む第一のドメイン及び少なくとも1つの第二のドメインを含むキメラタンパク質。

【請求項 210】

融合タンパク質である、請求項209に記載のキメラタンパク質。

【請求項 211】

第二のドメインが酵素を含む、請求項209に記載のキメラタンパク質。

【請求項 212】

酵素がグルコシダーゼである、請求項211に記載のキメラタンパク質。

【請求項 213】

請求項207に記載の配列を有するシグナルペプチド（SP）を含む少なくとも1つの第一のドメイン、及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも1つの第二のドメインを含むキメラペプチドであって、前記異種ポリペプチド又はペプチドは前記シグナルペプチド（SP）と天然には結合していないものである、前記キメラペプチド。

【請求項 214】

異種ポリペプチド又はペプチドがグルコシダーゼではない、請求項213に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 215】

異種ポリペプチド又はペプチドが、前記シグナルペプチド（SP）又は触媒ドメイン（CD）のアミノ末端、カルボキシ末端又は両端にある、請求項213に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 216】

キメラポリペプチドをコードする単離又は組換え核酸であって、前記キメラポリペプチドが、請求項213に記載の配列を有するシグナルペプチド（SP）を含む少なくとも1つの第一のドメイン、及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも1つの第二のドメインを含み、前記異種ポリペプチド又はペプチドは前記シグナルペプチド（SP）と天然には結合していないものである、前記単離又は組換え核酸。

【請求項 217】

請求項55に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは22に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む口腔手入れ用品。

【請求項 218】

前記口腔手入れ用品が、歯磨きペースト、歯磨きクリーム、ゲル又は歯磨き粉、オドンティック、口内洗浄液、歯磨き前又は歯磨き後の洗浄製剤、チューインガム、ロゼンジ又はキャンデーを含む、請求項217に記載の口腔手入れ用品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は分子および細胞生物学並びに生化学に関する。ある特徴では、本発明はグルコシダーゼ活性（アルファ-グルコシダーゼ活性を含む）を有するポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びに前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドを製造及び使用する方法を目的とする。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、アルファ-グルコシダーゼとしてデンプンの糖への加水分解を触媒するために、例えば液化デンプンをグルコースに変換するために用いられる。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

デンプンは人間の食事ではしばしば見出される複雑な炭水化物である。デンプンの構造は、 α -1,4及び α -1,6グルコース結合によって連結されたグルコースポリマーである。グルコシダーゼは、デンプンから糖への加水分解を触媒することができる酵素である。

アルファ-グルコシダーゼはデンプンから糖への加水分解を触媒する酵素である。アルファ-グルコシダーゼは、デンプン内部の末端非還元1,4又は1,6結合 α -グルコース残基を加水分解して、 α -D-グルコースを遊離させることができる。アルファ-1,2及びアルファ-1,3結合は通常はるかに低速で切断される。加水分解速度は、基質サイズの増加とともにかなり低下する。 α -グルコシダーゼはマルト-オリゴ糖を効果的に加水分解することができるが、一方、それらはデンプンを含む高分子量基質を加水分解することができないと報告されている。したがって、マルトオリゴ糖及び液化デンプンの両方を加水分解することができるアルファ-グルコシダーゼの開発が希求されている。

アルファ-グルコシダーゼは、デンプン加工の液化及び糖化段階で、湿式トウモロコシ製粉で、洗剤マトリックス中の洗浄剤として、デンプンの脱サイズのために繊維工業で、焼成での利用で、飲料工業で、油田での掘削処理で、リサイクル紙のインキングで、さらに動物飼料で工業的に用いることができる。アルファ-グルコシダーゼはまた、織物の脱サイズで、醸造処理で、紙パルプ工業でのデンプンの改変で及び他の処理法においても有用である。

【発明の開示】

【0003】

発明の概要

本発明は、本発明の核酸、例えば、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23に記載の配列を有する例示的な核酸及びその部分配列と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950、2000、2050、2100、2200、2250、2300、2350、2400、2450、2500又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む単離または組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルコシダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される。本発明の例示的な核酸には、配列番号:1；配列番号:3；配列番号:5；配列番号:7；配列番号:9；配列番号:11；配列番号:13；配列番号:15；配列番号:17；配列番号:19；配列番号:21；配列番号:23に記載の核酸配列を含む単離若しくは組換え核酸、及びその部分配列、例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれより多い残基、又は遺伝子若しくは転写物の完全長に及ぶものが含まれる。

本発明の例示的な核酸にはまた、配列番号:2；配列番号:4；配列番号:6；配列番号:8；配列番号:10；配列番号:12；配列番号:14；配列番号:16；配列番号:18；配列番号:20；配列番号:22；配列番号:24に記載の配列を有するポリペプチドをコードする単離又は組換え核酸、並びにその部分配列及びその変種が含まれる。ある特徴では前記ポリペプチドはグルコシダーゼ活性を有する。

【0004】

10

20

30

40

50

ある特徴では、本発明はまた、混合培養に由来するという点において共通の新規性を有するグルコシダーゼコード核酸を提供する。本発明は、本発明の核酸を含む、混合培養から単離されたグルコシダーゼコード核酸を提供する。ある特徴では、本発明は、混合培養から単離されたグルコシダーゼコード核酸を提供し、前記核酸は、配列番号:1;配列番号:3;配列番号:5;配列番号:7;配列番号:9;配列番号:11;配列番号:13;配列番号:15;配列番号:17;配列番号:19;配列番号:21;配列番号:23に記載の核酸配列、及びその部分配列、例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれより多い残基、又は遺伝子若しくは転写物の完全長に及ぶものを含む。 10

ある特徴では、本発明はまた、環境性供給源（例えば混合環境供給源）に由来するという点で共通の新規性を有するグルコシダーゼコード核酸を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明の核酸配列を含む、環境性供給源（例えば混合環境供給源）から単離されたグルコシダーゼコード核酸を提供する。ある特徴では、本発明は、環境性供給源（例えば混合環境供給源）から単離されたグルコシダーゼコード核酸を提供し、前記核酸は、配列番号:1;配列番号:3;配列番号:5;配列番号:7;配列番号:9;配列番号:11;配列番号:13;配列番号:15;配列番号:17;配列番号:19;配列番号:21;配列番号:23に記載の核酸配列、及びその部分配列、例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれより多い残基、又は遺伝子若しくは転写物の完全長に及ぶものを含む。 20

本発明は、配列番号:1、配列番号:19又は配列番号:23と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い配列同一性を有する核酸配列を含む単離または組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルコシダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される。 30

【0005】

本発明は、配列番号:3と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1250又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い配列同一性を有する核酸配列を含む単離または組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルコシダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される。 40

本発明は、配列番号:5と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い配列同一性を有する核酸配列 50

を含む単離又は組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルコシダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される。

本発明は、配列番号:7又は配列番号:21と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルコシダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される。

10

【0006】

本発明は、配列番号:9又は配列番号:15と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルコシダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される。

20

ある特徴では、本発明は、前記グルコシダーゼ活性がグルコシド結合の加水分解を含む、単離又は組換え核酸を提供する。ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性は、アルファ-グルコシダーゼ活性、例えば1,4-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性又は1,6-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性を含む。ある特徴では、本発明のポリペプチドはアルファ-(1,4)及びアルファ-(1,6)-グルコース結合の両結合の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、マルト-オリゴ糖及び液化デンプンの両者の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドはまた、多糖類（例えばデンプン）のアルファ-(1,2)及び／又はアルファ-(1,3)結合の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドはアルファ-(1,4)、アルファ-(1,6)、アルファ-(1,2)及び／又はアルファ-(1,3)グルコース結合又はその組合せの加水分解を触媒することができる。

30

ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性はエキソグルコシダーゼ又はエキソアミラーゼ活性を含む。前記グリコシド結合は α -1,4グリコシド結合及び／又は α -1,6-グリコシド結合を含むことができる。ある特徴では、グルコシダーゼ活性はデンプンのグルコシド結合の加水分解活性を含むことができる。ある特徴では、グルコシダーゼ活性はさらに、デンプンのグルコシド結合を加水分解してマルトデキストリンを生成する活性を含む。また別の特徴では、 α -グルコシダーゼ活性は、デンプンの非還元末端からマルトースユニットを切断する活性を含む。ある特徴では、本発明のポリペプチドは α -グルコシダーゼとして用いられ、デンプンの糖への加水分解、例えば液化デンプンのグルコースへの変換を触媒することができる。

40

ある特徴では、配列比較アルゴリズムはBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、ここでフィルタリング設定はblastall -p blastp -d "nr pataa" -F Fに設定され、他の全てのオプションは規定値に設定される。

ある特徴では、前記単離または組換え核酸は、熱安定性のグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記ポリペプチドは、約37°Cから約95°C；約55°Cから約85°C；約70°Cから約95°C；又は約90°Cから約95°Cの温度範囲を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持することができる。

別の特徴では、前記単離または組換え核酸は、耐熱性のグルコシダーゼ活性を有するポ

50

リペプチドをコードする。前記ポリペプチドは、37℃より高く約95℃までの範囲の温度又は55℃より高く約85℃までの範囲のいずれかの温度に暴露した後でグルコシダーゼ活性を維持することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、pH4.5、pH5、pH5.5又はそれより高いpHで90℃より高く約95℃までの範囲の温度に暴露した後でグルコシダーゼ活性を維持することができる。

【0007】

本発明は、配列番号:1；配列番号:3；配列番号:5；配列番号:9；配列番号:11；配列番号:13；配列番号:15；配列番号:17；配列番号:19；配列番号:21；配列番号:23に記載の配列、又はそのフラグメント若しくは部分配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む単離または組換え核酸を提供する。ある特徴では、前記核酸はグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記核酸は、長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500又はそれより多い残基であるか、又は完全長の遺伝子若しくは転写物である。ある特徴では、前記ストリンジェントな条件には、0.2XのSSC中で約65℃の温度で約15分の洗浄を含む洗浄工程が含まれる。

本発明の別の特徴は、例えばプローブとして用いることができる単離又は組換え核酸であり、それらは、本発明の核酸配列、前記と実質的に同一の配列、及び前記と相補的な配列の少なくとも10の連続する塩基を含む。あるいは、本発明のプローブは、本発明の核酸で示される配列の少なくとも約5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、150、又は約10から50、約20から60、約30から70の連続する塩基を含むことができる。

本発明は、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブを提供し、ここで前記プローブは、本発明の配列又はそのフラグメント若しくは部分配列を含む配列の少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれより多くの連続する塩基を含み、ここで前記プローブは結合又はハイブリダイゼーションによって前記核酸を同定する。前記プローブは、本発明の配列又はそのフラグメント若しくは部分配列を含む配列の少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、又は約60から100の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。本発明は、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブを提供し、ここで前記プローブは、本発明の配列の少なくとも約10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれより大きい塩基配列を含む核酸を含む。前記プローブは、本発明の核酸配列又はその部分配列の少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、又は約60から100の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

本発明は、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅させる増幅プライマー配列対を提供し、ここで前記プライマー対は、本発明の配列又はそのフラグメント若しくは部分配列を含む核酸を増幅させることができる。前記増幅プライマー配列対の1つまたは各メンバーは、前記配列の少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【0008】

本発明は、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸配列又はそのフラグメント若しくは部分配列を増幅させることができる増幅プライマー配列対による鋳型核酸の増幅を含む。

本発明は、本発明の核酸配列又はその部分配列を含む発現カセットを提供する。ある特徴では、発現カセットは、プロモーターに機能的に連結された前記核酸を含むことができる。前記プロモーターはウイルスプロモーター、細菌プロモーター、哺乳動物プロモーター

10

20

30

40

50

ー又は植物プロモーターであり得る。ある特徴では、前記植物プロモーターは、ジャガイモ、イネ、トウモロコシ、コムギ、タバコまたはオオムギのプロモーターであり得る。前記プロモーターは構成的プロモーターであり得る。前記構成的プロモーターはCaMV35Sを含むことができる。別の特徴では、前記プロモーターは誘導性プロモーターであり得る。ある特徴では、前記プロモーターは組織特異的プロモーターまたは環境によって調節されるプロモーターまたは生育に応じて調節されるプロモーターであり得る。したがって、前記プロモーターは例えば種子特異的、葉特異的、根特異的、茎特異的または器官離脱-誘導プロモーターであり得る。ある特徴では、前記発現カセットはさらに植物または植物ウイルス発現ベクターを含むことができる。

本発明は、本発明の発現カセット(例えばベクター)または本発明の核酸を含むクローニングベヒクルを提供する。前記クローニングベヒクルはウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体であり得る。前記ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターを含むことができる。前記クローニングベヒクルは細菌人工染色体(BAC)、プラスミド、バクテリオファージP1-由来ベクター(PAC)、酵母人工染色体(YAC)または哺乳動物人工染色体(MAC)を含むことができる。

本発明は、本発明の核酸又は本発明の発現カセット(例えばベクター)、又は本発明のクローニングベヒクルを含む形質転換細胞を提供する。ある特徴では、前記形質転換細胞は、細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は植物細胞であり得る。ある特徴では、前記植物細胞はジャガイモ、コムギ、イネ、トウモロコシ、タバコまたは

10

20

【0009】

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現カセット(例えばベクター)を含む非ヒトトランスジェニック動物を提供する。ある特徴では、前記動物はマウスである。

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現カセット(例えばベクター)を含むトランスジェニック植物を提供する。前記トランスジェニック植物はトウモロコシ、ジャガイモ、トマト、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、イネ、オオムギまたはタバコであり得る。

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現カセット(例えばベクター)を含むトランスジェニック種子を提供する。前記トランスジェニック種子はトウモロコシ、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、ヤシ核、ヒマワリ、ゴマ、落花生またはタバコの種子であり得る

30

。本発明は、本発明の核酸に相補的であるか、又は本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明は、細胞内のグルコシダーゼメッセージの翻訳を阻害する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸に相補的であるか、又は本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを前記細胞に投与するか、または前記細胞で発現させることを含む。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、又は約60から100、約70から110、又は約80から120塩基であり得る。

本発明は、細胞内のグルコシダーゼ(例えばアルファ-グルコシダーゼ)メッセージの翻訳を阻害する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸に相補的であるか、又は本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に投与するか、または細胞で発現させることを含む。本発明は、本発明の配列の部分配列を含む二本鎖の阻害性RNA(RNAi)分子を提供する。ある特徴では、前記RNAiは、長さが約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25またはそれより長い二重鎖ヌクレオチドである。本発明は細胞内のグルコシダーゼの発現を阻害する方法を提供し、前記方法は、二本鎖の阻害性RNA(RNAi)を前記細胞に投与するか、又は前記細胞で発現させることを含み、ここで前記RNAは本発明の配列の部分配列を含む。

40

【0010】

50

本発明は、本発明の例示的なポリペプチドまたはペプチドと少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750又はそれより多い残基の領域にわたって、又は前記ポリペプチドの完全長にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な(100%)配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又は組換えポリペプチドを提供し、前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される。本発明の例示的なポリペプチド又はペプチド配列には、配列番号:2；配列番号:4；配列番号:6；配列番号:10；配列番号:12；配列番号:14；配列番号:16；配列番号:18；配列番号:20；配列番号:22；配列番号:24、並びにその部分配列及びその変種、例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750若しくはそれより多い残基、又は完全長に及ぶポリペプチド（例えば酵素）が含まれる。本発明の例示的なポリペプチドまたはペプチド配列には本発明の核酸によってコードされる配列が含まれる。本発明の例示的なポリペプチドまたはペプチド配列には、本発明の抗体が特異的に結合するポリペプチド又はペプチドが含まれる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは少なくとも1つのグルコシダーゼ活性、例えばアルファグルコシダーゼ活性を有する。

10

20

【0011】

本発明は以下の（a）又は（b）を含む単離又は組換えポリペプチドを提供する：（a）配列番号:2と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、560若しくは569残基の領域にわたって、又は配列番号:2の完全長にわたって少なくとも80%の配列同一性を有する配列；配列番号:4と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、410、420若しくは430残基の領域にわたって、又は配列番号:4の完全長にわたって少なくとも55%の配列同一性を有する配列；配列番号:6と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、560、570、580若しくは590残基の領域にわたって、又は配列番号:6の完全長にわたって少なくとも65%の配列同一性を有する配列；配列番号:8と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、710、720若しくは728残基の領域にわたって、又は配列番号:8の完全長にわたって少なくとも95%の配列同一性を有する配列；配列番号:10と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、520、530若しくは536残基の領域にわたって、又は配列番号:10の完全長にわたって少なくとも60%の配列同一性を有する配列；配列番号:12と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、560若しくは570残基の領域にわたって、又は配列番号:12の完全長にわたって少なくとも50%の配列同一性を有する配列；配列番号:14と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、460若しくは463残基の領域にわたって、又は配列番号:14の完全長にわたって少なくとも50%の配列同一性を有する配列；配列番号:16と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、525、540若しくは543残基の領域にわたって、又は配列番号:16の完全長にわたって少なくとも60%の配列同一性を有する配列；配列番号:18と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、460、470若しくは473

30

40

50

残基の領域にわたって、又は配列番号:18の完全長にわたって少なくとも50%の配列同一性を有する配列；配列番号:20と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550若しくは560残基の領域にわたって、又は配列番号:20の完全長にわたって少なくとも80%の配列同一性を有する配列；配列番号:22と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450若しくは480残基の領域にわたって、又は配列番号:22の完全長にわたって少なくとも95%の配列同一性を有する配列；配列番号:24と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550若しくは560残基の領域にわたって、又は配列番号:24の完全長にわたって少なくとも80%の配列同一性を有する配列（ここで前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される）；又は（b）以下の（i）又は（ii）の本発明の核酸によってコードされるポリペプチド；（i）例えば配列番号:1と少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む核酸配列、配列番号:3と少なくとも55%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:5と少なくとも65%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:7と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:9と少なくとも60%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:11と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:13と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:15と少なくとも60%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:17と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:19と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:21と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列、配列番号:23と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列（ここで前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される）、又は（ii）本発明の核酸、例えば配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23に記載の配列又はその部分配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸。

【0012】

また別の特徴では、前記ポリペプチドは、配列番号:2と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550残基の領域にわたって、又は配列番号:2の完全長にわたって少なくとも85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:4と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400残基の領域にわたって、又は配列番号:4の完全長にわたって少なくとも60%、65%、70%、80%、85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:6と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600残基の領域にわたって、又は配列番号:6の完全長にわたって少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:8と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750残基の領域にわたって、又は配列番号:8の完全長にわたって少なくとも96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:10と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500残基の領域にわたって、又は配列番号:10の完全長にわたって少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:12と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550残基の領域にわたって、又は配列番号:12の完全長にわたって少なくとも55%の配列同一性を有する配列；配列番号:14と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450残基の領域にわたって、又は配列番号:14の完全長にわたって少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:16と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500残基の領域にわたって、又は配列番号:16の完全長にわたって少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:18と少なくとも約100、150、200、250、300、350、4

00、450残基の領域にわたって、又は配列番号:18の完全長にわたって少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:20と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550残基の領域にわたって、又は配列番号:20の完全長にわたって少なくとも85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:22と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450残基の領域にわたって、又は配列番号:22の完全長にわたって少なくとも96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列；配列番号:24と少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550残基の領域にわたって、又は配列番号:24の完全長にわたって少なくとも85%、90%、95%、98%若しくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0013】

ある特徴では、前記ポリペプチドは、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24に示されるアミノ酸配列を含む。

ある特徴では、前記ポリペプチドはグルコシダーゼ活性を有する。ある特徴では、前記ポリペプチド α -グルコシダーゼ活性、例えば1,4- α -D-グルカンヒドロラーゼ活性又は1,6- α -D-グルカンヒドロラーゼ活性を含む。ある特徴では、本発明のポリペプチドはアルファ-(1,4)及びアルファ-(1,6)-グルコース結合の両結合の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、マルト-オリゴ糖及び液化デンプンの両方の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドはまた、多糖類（例えばデンプン）のアルファ-(1,2)及び／又はアルファ-(1,3)結合の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、アルファ-(1,4)、アルファ-(1,6)、アルファ-(1,2)及び／又はアルファ-(1,3)グルコース結合又はその組合せの加水分解を触媒することができる。

20

ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性はエキソグルコシダーゼ又はエキソアミラーゼ活性を含む。前記グリコシド結合は α -1,4グリコシド結合及び／又は α -1,6-グリコシド結合を含むことができる。ある特徴では、グルコシダーゼ活性はデンプンのグリコシド結合の加水分解を含むことができる。ある特徴では、グルコシダーゼ活性はさらに、デンプンのグリコシド結合を加水分解してマルトデキストリンを生成することを含む。また別の特徴では、 α -グルコシダーゼ活性は、デンプンの非還元末端からマルトースユニットを切断することを含む。ある特徴では、本発明のポリペプチドは α -グルコシダーゼとして用いられ、デンプンの糖への加水分解、例えば液化デンプンのグルコースへの変換を触媒することができる。

30

ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性は熱安定性である。前記ポリペプチドは、約37℃から約95℃、約55℃から約85℃、約70℃から約95℃、又は約90℃から約95℃の温度範囲を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持することができる。別の特徴では前記グルコシダーゼ活性は耐熱性であろう。前記ポリペプチドは、約37℃より高く約95℃までの範囲の温度、または55℃より高く約85℃までの範囲の温度に暴露した後でグルコシダーゼ活性を維持することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、pH4.5で約90℃より高く約95℃までの範囲の温度に暴露した後でグルコシダーゼ活性を維持することができる。

40

【0014】

本発明は、本発明のポリペプチドの残基1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から28、1から30、1から31、1から32、1から33、1から34、1から35、1から36、1から37、1から38、1から39若しくは1から40に記載の配列又はそれより長いアミノ酸残基からなるか、又は前記を含む単離又は組換えシグナル配列を提供する。ある特徴では、本発明は、配列番号:2（配列番号:1によってコードされる）の残基1から24を有するペプチドを含むシグナル配列、又は配列番号:4（配列番号:3によってコードされる）の残基1から21からなるシグナル配列を提供する。ある特徴では、前記単離又は組換えポリペプチドは、異種シグナル配列（例えば異種グルコシダーゼ又は非グルコシダーゼシグナル配列、又は本来の供

50

給源であった前記ポリペプチドとは異なる酵素に結合している本発明のシグナル配列)を含む本発明のポリペプチドを含むことができる。ある特徴において本単離又は組換えポリペプチドはシグナル配列を欠く本発明のポリペプチドを含み得る。

ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列を含む第一のドメイン及び少なくとも第二のドメインを含むキメラタンパク質を提供する。前記タンパク質は融合タンパク質であり得る。前記第二のドメインは酵素を含むことができる。前記酵素はグルコシダーゼ(例えば本発明のグルコシダーゼ又は別のグルコシダーゼ)であり得る。

ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性は、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約100から約1000ユニットの範囲の比活性を含む。別の特徴では、前記グルコシダーゼ活性はタンパク質1ミリグラムにつき約500から約750ユニットの比活性を含む。あるいは、前記グルコシダーゼ活性は、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニットの範囲の比活性を含む。ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性は、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約750から約1000ユニットの範囲の比活性を含む。また別の特徴では、前記耐熱性は、上昇温度に加熱した後で37℃において前記グルコシダーゼ比活性の少なくとも半分が維持されることを含む。あるいは、前記耐熱性は、上昇温度に加熱した後で、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニットの範囲の比活性が維持されることを含む。

10

【0015】

本発明は、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む本発明の単離または組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、グリコシル化はN-結合グリコシル化であり得る。ある特徴では、前記ポリペプチドは、P. パストリス (pastoris) またはS. ポンベ (pombe) で発現されるとグリコシル化され得る。

20

ある特徴では、前記ポリペプチドは、約pH6.5、pH6、pH5.5、pH5、pH4.5又はpH4を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持することができる。別の特徴では、前記ポリペプチドは、約pH7、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9、pH9.5、pH10、pH10.5又はpH11を含む条件下でグルコシダーゼ活性を維持することができる。

本発明は本発明のポリペプチドを含むタンパク質調製物を提供し、ここで前記タンパク質調製物は液体、固体又はゲルを含む。

本発明は、本発明のポリペプチド及び第二のドメインを含むヘテロダイマーを提供する。ある特徴では、前記第二のドメインはポリペプチドであり、前記ヘテロダイマーは融合タンパク質であり得る。ある特徴では、前記第二のドメインはエピトープ又はタグであり得る。ある特徴では、本発明は、本発明のポリペプチドを含むホモダイマーを提供する。

30

本発明はグルコシダーゼ活性を有する固定化ポリペプチドを提供し、ここで、前記ポリペプチドは、本発明のポリペプチド、本発明の核酸によってコードされるポリペプチド、又は本発明のポリペプチド及び第二のドメインを含むポリペプチドを含む。ある特徴では、前記ポリペプチドは細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレイまたはキャピラリー管に固定化することができる。

【0016】

本発明は、固定化された本発明の核酸を含むアレイを提供する。本発明は本発明の抗体を含むアレイを提供する。

40

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドと特異的に結合する単離または組換え抗体を提供する。前記抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。本発明は、本発明の抗体、例えば本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドと特異的に結合する抗体を含むハイブリドーマを提供する。

本発明は、本発明のポリペプチド(例えば本発明の核酸によってコードされるポリペプチド)を含む栄養補助食品又は動物用飼料若しくは食品を提供する。ある特徴において、栄養補助食品、飼料または食品中の本ポリペプチドはグリコシル化されていてもよい。本発明は、本発明のポリペプチド(例えば本発明の核酸によってコードされるポリペプチド

50

）を含む食用酵素デリバリーマトリックスを提供する。ある特徴では、前記デリバリーマトリックスはペレットを構成する。ある特徴では前記ポリペプチドはグリコシル化され得る。ある特徴では前記グルコシダーゼ活性は耐熱性である。別の特徴では、前記グルコシダーゼ活性は熱安定性である。

【0017】

本発明は、以下の工程を含むグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する方法を提供する：（a）本発明の抗体を提供する工程；（b）ポリペプチドを含むサンプルを提供する工程；（c）工程（a）の抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合する条件下で前記抗体と工程（b）のサンプルを接触させ、それによってグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する工程。

10

本発明は、以下の工程を含む抗グルコシダーゼ抗体を製造する方法を提供する：ヒト以外の動物に液性免疫応答を生じさせるために十分な量で本発明の核酸または本発明のポリペプチドまたはその部分配列を投与し、それによって抗グルコシダーゼ抗体を製造する工程。本発明は、非ヒト動物に免疫応答を生じさせるために十分な量で本発明の核酸または本発明のポリペプチドまたはその部分配列を投与することを含む抗グルコシダーゼ免疫を生じさせる方法を提供する。

本発明は以下の工程を含む組換えポリペプチドを製造する方法を提供する：（a）プロモーターに機能的に連結された本発明の核酸を提供する工程；（b）ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程（a）の核酸を発現させ、それによって組換えポリペプチドを製造する工程。ある特徴では、前記方法はさらに、宿主細胞を工程（a）の核酸で形質転換し、続いて工程（a）の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組換えポリペプチドを製造することを含み得る。

20

本発明は、以下の工程を含むグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法を提供する：（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；（b）グルコシダーゼ基質を提供する工程；および、（c）工程（a）のポリペプチド又はそのフラグメント又は変種を工程（b）の基質と接触させ、基質の量の減少又は反応生成物の量の増加を検出し、基質量の減少又は反応生成物量の増加を指標としてグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを検出する工程。ある特徴では、前記基質はデンプン、例えば液化デンプンであろう。

本発明は、（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；（b）試験基質を提供する工程；および、（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の試験基質と接触させ、基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出する工程を含む、グルコシダーゼ基質を同定する方法であって、前記基質量が減少または前記反応生成物量が増加すれば前記試験基質をグルコシダーゼ基質として同定する、前記方法を提供する。

30

【0018】

本発明は、試験化合物がポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）核酸または核酸を含むベクターを前記核酸のポリペプチドへの翻訳を許容する条件下で発現させるか（前記核酸は本発明の核酸を含む）、又は本発明のポリペプチドを提供する工程；（b）試験化合物を提供する工程；（c）前記ポリペプチドを前記試験化合物と接触させる工程；および、（d）工程（b）の試験化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程。

40

本発明は、（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；（b）試験化合物を提供する工程；（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の試験化合物と接触させてグルコシダーゼの活性を測定する工程を含む、グルコシダーゼ活性の調節物質を同定する方法であって、前記試験化合物の非存在下のグルコシダーゼ活性と比較して試験化合物の存在下で測定されたグルコシダーゼ活性が変化したならば、前記試験化合物はグルコシダーゼ活性を調節する物質であるとして同定する、前記方法を提供する。ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性は、グルコシダーゼ基質を提供し、基質量の減少若しくは反応生成物量の増加、又は基質量の増加若しくは反応

50

生成物量の減少を検出することによって測定することができる。試験化合物非存在下における基質量または反応生成物量と比較して試験化合物存在下において基質量が減少または反応生成物量が増加すれば、試験化合物をグルコシダーゼの活性化物質と同定する。試験化合物非存在下における基質または反応生成物量と比較して試験化合物存在下において基質量が増加または反応生成物量が減少すれば試験化合物をグルコシダーゼの阻害物質と同定する。

【0019】

本発明は、プロセッサおよびデータ保存装置を含むコンピュータシステムを提供し、前記データ保存装置には本発明のポリペプチド配列（例えば本発明の核酸によってコードされるポリペプチド）又は本発明の核酸配列が保存されている。ある特徴では、前記コンピュータシステムはさらに配列比較アルゴリズム、及び少なくとも1つの参照配列が保存された保存装置を含むことができる。別の特徴では、前記配列比較アルゴリズムは多型性を表示するコンピュータプログラムを含む。ある特徴では、前記コンピュータシステムはさらに、前記配列における1つまたは2つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーを含むことができる。本発明はコンピュータ読み出し可能媒体を提供し、前記媒体には、本発明のポリペプチド配列または本発明の核酸配列が保存されている。本発明は、以下の工程を含む配列の特徴を同定する方法を提供する：（a）配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定するコンピュータプログラムを用いて配列を読み取る工程（前記配列は本発明のポリペプチド配列又は本発明の核酸配列を含む）；および、（b）前記コンピュータプログラムにより前記配列の1つ又は2つ以上の特徴を同定する工程。本発明は、以下の工程を含む第一の配列と第二の配列を比較する方法を提供する：（a）配列を比較するコンピュータプログラムを用いて第一の配列および第二の配列を読み取る工程（前記第一の配列は本発明のポリペプチド配列または本発明の核酸配列を含む）；および、（b）第一の配列と第二の配列間の相違を前記コンピュータプログラムにより決定する工程。第一の配列と第二の配列間の相違を決定する工程はさらに多型性を同定する工程を含むことができる。ある特徴では、前記方法はさらに、配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーを含むであろう。別の特徴では、前記方法は、コンピュータプログラムを用いて第一の配列を読み取り、さらに前記配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定することを含むであろう。

【0020】

本発明は、以下の工程を含む、環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する方法を提供する：（a）グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するために増幅プライマー配列を提供する工程（前記プライマー対は本発明の核酸を増幅することができる）；（b）前記環境サンプルから核酸を単離するか、または前記サンプル内の核酸がハイブリダイゼーションのために前記増幅プライマー対に接近できるように前記環境サンプルを処理する工程；および、（c）工程（b）の核酸を工程（a）の増幅プライマー対と一緒にして前記環境サンプルの核酸を増幅し、それによって環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する工程。前記増幅プライマー配列対の一つまたは各メンバーは、本発明の配列の少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

本発明は、以下の工程を含む環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する方法を提供する：（a）本発明の核酸配列またはその部分配列を含むポリヌクレオチドプローブを提供する工程；（b）前記環境サンプルから核酸を単離するか、または前記サンプル内の核酸がハイブリダイゼーションのために工程（a）のポリヌクレオチドに接近できるように前記環境サンプルを処理する工程；（c）工程（b）の単離された核酸または処理された環境サンプルを工程（a）のポリヌクレオチドプローブと一緒にし；さらに（d）工程（a）のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離し、それによって環境サンプルからグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する工程。前記環境サンプル

は水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプルまたは生物学的サンプルを含むことができる。ある特徴では、前記生物学的サンプルは、細菌細胞、原生動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞または哺乳動物細胞に由来し得る。

【0021】

本発明は、以下の工程を含むグルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の変種を作製する方法を提供する：(a) 本発明の核酸を含む鋳型核酸を提供する工程；(b) 前記鋳型配列内の1つ又は2つ以上のヌクレオチドの改変、欠失若しくは付加、又は前記の組合せを実施して前記鋳型核酸の変種を作製する工程。

ある特徴では、前記方法はさらに、変種核酸を発現させて変種グルコシダーゼポリペプチドを生成することを含むであろう。前記改変、付加または欠失は、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、*in vivo*変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入(GSSM)、合成連結再アッセンブリ(SLR)又はそれらの組合せを含む方法により導入することができる。また別の特徴では、前記改変、付加または欠失は、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成、又はそれらの組合せによって導入することができる。

【0022】

ある特徴では、前記方法は、鋳型核酸によってコードされるポリペプチドの活性または安定性とは変異した若しくは異なる活性または変異した若しくは異なる安定性を有するグルコシダーゼが得られるまで反復することができる。ある特徴では、前記変種グルコシダーゼ変種は耐熱性であり、上昇温度に暴露された後ある程度の活性を維持する。また別の特徴では、前記変種グルコシダーゼポリペプチドは、鋳型核酸によってコードされるグルコシダーゼと比較して高度にグリコシル化されている。あるいは、前記変種グルコシダーゼポリペプチドは高温下でグルコシダーゼ活性を有するが、鋳型核酸によってコードされるグルコシダーゼは高温下で活性をもたない。ある特徴では、前記方法は、鋳型核酸のコードン使用頻度とは変異したコードン使用頻度を示すグルコシダーゼコード配列が得られるまで反復することができる。前記方法は、別の特徴では、鋳型核酸のメッセージ発現レベルまたは安定性レベルより高いまたは低いメッセージ発現レベルまたは安定性レベルを有するグルコシダーゼ遺伝子が得られるまで前記方法を反復することができる。

本発明は、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコードンを改変して宿主細胞におけるその発現を高める方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする本発明の核酸を提供する工程；および、(b) 工程(a)の核酸の非優先コードンまたは低優先コードンを同定し、前記コードンを置換されるコードンと同じアミノ酸をコードする優先コードンまたは中立的に使用されるコードンに置換し、それによって核酸を改変して宿主細胞における前記の発現を増加させる工程(前記優先コードンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコードンであり、前記非優先コードンまたは前記低優先コードンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示されるコードンである)。

本発明は、以下の工程を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコードンを改変する方法を提供する：(a) 本発明の核酸を提供する工程；および、(b) 工程(a)の核酸のコードンを同定し、前記コードンを置換されるコードンと同じアミノ酸をコードする異なるコードンで置換し、それによってグルコシダーゼをコードする核酸内のコードンを改変する工程。

【0023】

本発明は、以下の工程を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコードンを改変して宿主細胞でその発現を高める方法を提供する：(a) グルコシ

10

20

30

40

50

ダーゼポリペプチドをコードする本発明の核酸を提供する工程；および、(b) 工程 (a) の核酸内の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンで置換し（優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである）、それによって前記核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を高める工程。

本発明は、以下の工程を含む、グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを改変して宿主細胞でその発現を低下させる方法を提供する：(a) 本発明の核酸を提供する工程；さらに (b) 工程 (a) の核酸内の少なくとも1つの好ましいコドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする非優先コドンまたは低優先コドンで置換し（前記優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度提示されるコドンである）、それによって前記核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を低下させる工程。ある特徴では、前記宿主細胞は細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞または哺乳動物細胞であり得る。

10

【0024】

本発明は、複数の改変グルコシダーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する方法を提供する（前記改変活性部位または基質結合部位は、第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする配列を含む第一の核酸に由来する）。前記方法は以下の工程を含む：(a) 第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする第一の核酸を提供する工程（前記第一の核酸配列は本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、前記核酸はグルコシダーゼ活性部位またはグルコシダーゼ基質結合部位をコードする）；(b) 前記第一の核酸内の複数の標的コドンにおいて天然に存在するアミノ酸変種をコードする一組の変異導入オリゴヌクレオチドを提供する工程；(c) 前記一組の変異導入オリゴヌクレオチドを用いて、変異導入アミノ酸コドンの各々一連のアミノ酸変種をコードする一組の活性部位コード変種または基質結合部位コード変種核酸を生成し、それによって複数の改変グルコシダーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する工程。ある特徴では、前記方法は、最適化定方向進化システム、遺伝子部位飽和変異導入 (GSSM)、または合成連結再アッセンブリ (SLR)、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入 (GSSM)、合成連結再アッセンブリ (SLR) またはそれらの組合せを含む方法によって、工程 (a) の第一の核酸に変異導入することを含む。別の特徴では、前記方法は、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成およびそれらの組合せを含む方法によって、工程 (a) の第一の核酸または変種に変異導入することを含む。

20

30

40

【0025】

本発明は、以下の工程を含む小分子の製造方法を提供する：(a) 小分子を合成または改変することができる複数の生合成酵素を提供する工程（前記酵素の1つは本発明の核酸によってコードされるグルコシダーゼ酵素を含む）；(b) 工程 (a) の酵素の少なくとも1つに対する基質を提供する工程；および (c) 複数の生物触媒反応を促進する条件下で工程 (b) の基質を前記酵素と反応させて一連の生物触媒反応により小分子を生成する工程。本発明は、以下の工程を含む小分子の改変方法を提供する：(a) グルコシダーゼ酵素を提供する工程（前記酵素は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチド、またはそれらの部分配列を含む）；(b) 小分子を提供する工程；

50

および、(c) 前記グルコシダーゼ酵素によって触媒される酵素反応が促進される条件下で工程(a)の酵素を工程(b)の小分子と反応させ、それによってグルコシダーゼ酵素反応により小分子を改変する工程。ある特徴では、前記方法は、工程(a)の酵素に対する複数の小分子基質を提供し、それによってグルコシダーゼ酵素により触媒される少なくとも1つの酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含むことができる。ある特徴では、前記方法は、前記酵素による複数の生物触媒反応を促進する条件下で複数の酵素を追加して、複数の酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含むことができる。別の特徴では、前記方法はさらに、所望の活性を示す特定の小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために前記ライブラリーを試験する工程を含むことができる。前記ライブラリーの試験工程はさらに、所望の活性をもつ特定の改変小分子の有無について改変小分子の一部分を試験することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の前記一部分を生成するために用いられた生物触媒反応の1つ以外の全てを系統的に排除し、所望の活性をもつ特定の改変小分子を生成する少なくとも1つの特異的な生物触媒反応を同定する工程を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0026】

本発明は、以下の工程を含むグルコシダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法を提供する：(a) グルコシダーゼ酵素を提供する工程（前記酵素は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む）；および(b) 工程(a)の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、グルコシダーゼ活性について残余の配列を試験し、それによってグルコシダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程。ある特徴では、グルコシダーゼ活性は、グルコシダーゼ基質を提供すること、および、前記基質の量の減少または生成産物の量の増加を検出することによって測定される。

本発明は、リアルタイム代謝フラックス分析によって新規または改変表現型の全細胞操作のための方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a) 細胞の遺伝的構成を改変することによって改変細胞を作製する工程（前記遺伝的構成は本発明の核酸を細胞に導入することによって改変される）；(b) 前記改変細胞を培養して複数の改変細胞を生成する工程；(c) 工程(b)の細胞培養物をリアルタイムでモニターすることによって前記細胞の少なくとも1つの代謝パラメーターを測定する工程；および、(d) 工程(c)のデータを分析して、前記測定パラメーターが類似の条件下で未改変細胞における対応する測定値と異なるか否かを決定し、それによって細胞の操作された表現型をリアルタイム代謝フラックス分析により同定する工程。ある特徴では、細胞の遺伝的構成は、細胞内の遺伝子の配列の欠失もしくは改変または遺伝子発現のノックアウトを含む方法によって改変することができる。ある特徴では、前記方法はさらに、新規に操作された表現型を含む細胞の選別を含むことができる。別の特徴では、前記方法は、選別された細胞を培養し、それによって新規に操作された表現型を含む新規な細胞株を作製することを含むことができる。

本発明は以下の工程を含むデンプンを加水分解する方法を提供する：(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と前記ポリペプチドがデンプンを加水分解する条件下で接触させる工程。ある特徴では、前記組成物は α -1,4グルコシド結合又は α -1,6-グルコシド結合を含むデンプンを含む。ある特徴では、前記グルコシダーゼ活性は α -グルコシダーゼ活性である。ある特徴では、前記 α -グルコシダーゼ活性はデンプン又は他の多糖類の内部結合を加水分解する。

本発明は以下の工程を含む、組成物からデンプンを液化又はデンプンを除去する方法を提供する：(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と前記ポリペプチドがデンプンを除去又は液化する条件下で接触させる工程。

本発明は、グルコシダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高める方法を提供す

る。前記方法は、グルコシダーゼポリペプチドをグリコシル化し（前記ポリペプチドは本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドの連続する少なくとも30のアミノ酸を含む）、それによって前記グルコシダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高めることを含む。ある特徴では、前記グルコシダーゼの比活性は約37℃以上から約95℃の範囲の温度で熱安定性または耐熱性であろう。

【0027】

本発明は、細胞で組換えグルコシダーゼポリペプチドを過剰発現させる方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸または本発明の核酸配列（前記配列の同一性は配列比較アルゴリズムによる分析または目視精査によって決定される）を含むベクターを発現させることを含み、ここで前記過剰発現は、高活性プロモーターの使用、ニシストロンベクターの使用によって、または前記ベクターの遺伝子増幅によって達成される。 10

本発明は、本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含む洗剤組成物を提供し、ここで前記ポリペプチドはグルコシダーゼ活性を含む。ある特徴では、前記グルコシダーゼは非表面活性グルコシダーゼであろう。また別の特徴では、前記グルコシダーゼは表面活性グルコシダーゼであろう。

本発明は以下の工程を含む対象物の洗浄方法を提供する：（a）グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを含む組成物を提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；（b）対象物を提供する工程；および、（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の対象物と前記組成物が前記対象物を洗浄することができる条件下で接触させる工程。 20

本発明は、（例えば飼料又は食品中の）デンプンを動物による消費に先立って加水分解する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）デンプンを含む組成物（例えば飼料）を提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；（b）工程（a）のポリペプチドを前記組成物（例えば飼料又は食品）に、デンプンを加水分解させるために十分な時間、十分な量で添加し、それによってデンプンを加水分解する工程。ある特徴では、前記食品又は飼料はコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類又はジャガイモを含み得る。

本発明は以下の工程を含む織物を脱サイズする方法を提供する：（a）グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；（b）織物を提供する工程；および、（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の織物と前記グルコシダーゼが前記織物を脱サイズすることができる条件下で接触させる工程。 30

本発明は以下の工程を含む紙又は繊維を脱インクする方法を提供する：（a）グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；（b）紙又は繊維を含む組成物を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と前記ポリペプチドが前記紙又は繊維を脱インクすることができる条件下で接触させる工程。 40

本発明は以下の工程を含むリグノセルロース繊維を処理する方法を提供する：（a）グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；（b）リグノセルロース繊維を提供する工程；および、（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の繊維と前記ポリペプチドが前記繊維を処理してそれによって前記繊維の特性を改善することができる条件下で接触させる工程。

【0028】

本発明は以下の工程を含む高マルトース又は高グルコースシロップを製造する方法を提供する：（a）グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記 50

ポリペプチドが本発明の酵素を含むポリペプチドである、前記工程；(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記組成物を液化し、それによって可溶性デンプン水解物を生成し、さらに前記可溶性デンプン水解物を糖化することができる条件下で接触させ、それによってシロップを生成する工程。ある特徴では、前記デンプンはコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類、ジャガイモ又はサツマイモに由来し得る。

本発明は以下の工程を含むデンプン含有産出流体(production fluid)の流れを改善する方法を提供する：(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) 産出流体を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の産出流体と前記グルコシダーゼが前記産出流体中のデンプンを加水分解することができる条件下で接触させ、それによって前記産出流体の密度を低下させて前記産出流体の流れを改善する工程。ある特徴では、前記産出流体は地下層由来であり得る。

本発明は、本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含む抗老化(アンチステーリング)組成物(anti-staling composition)を提供する。本発明は、以下の工程を含む焼成製品の老化(ステーリング；staling)を防ぐ方法を提供する：(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) 焼成に用いられるデンプンを含む組成物を提供する工程；および(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが焼成に用いられる組成物中のデンプンを加水分解することができる条件下で一緒にし、それによって焼成製品の老化を防ぐ工程。本発明は、以下の工程を含む醸造又はアルコール製造でグルコシダーゼを使用する方法を提供する：(a) グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) デンプンを含み、醸造又はアルコール製造に用いられる組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが醸造又はアルコール製造で用いられる組成物中のデンプンを加水分解することができる条件下で一緒にする工程。ある特徴では、デンプンを含む前記組成物はビールであり得る。

【0029】

本発明は以下の工程を含むトランスジェニック植物の製造方法を提供する：(a) 異種核酸配列を細胞に導入し(前記異種核酸配列は本発明の核酸配列を含む)、それによって形質転換植物細胞を作製する工程；および(b) 前記形質転換細胞からトランスジェニック植物を作出する工程。ある特徴では、工程(a)はさらに、植物細胞プロトプラストのエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションにより前記異種核酸配列を導入することを含み得る。別の特徴では、工程(a)はさらに、DNA粒子爆撃によって植物組織に直接前記異種核酸配列を導入することを含み得る。あるいは、工程(a)はさらに、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)宿主を用いて植物細胞DNAに前記異種核酸配列を導入することを含み得る。ある特徴では、前記植物細胞はジャガイモ、トウモロコシ、イネ、コムギ、タバコまたはオオムギ細胞であり得る。

本発明は、以下の工程を含む、植物細胞において異種核酸配列を発現させる方法を提供する：(a) プロモーターに機能的に連結された異種核酸配列で前記植物細胞を形質転換する工程(前記異種核酸配列は本発明の核酸を含む)；(b) 前記異種核酸配列が前記植物細胞において発現する条件下で前記植物を生長させる工程。

本発明はまた、本発明のグルコシダーゼを前記生地にパンの老化を遅らせるために有効な量で添加することを含む、生地又は前記生地から製造される焼成製品を製造する方法を提供する。本発明はまた前記グルコシダーゼ及び前記グルコシダーゼとともに粉を含むブレミックスを提供する。最後に本発明は前記グルコシダーゼを含む焼成用酵素添加物を提供する。本発明のグルコシダーゼの使用によって、例えばパンの肉質部(クラム)が堅くなるのが遅いこと、パンの肉質部の弾力性の保持、薄切りし易さの改善(例えばパンの肉質部の減少、粘着性のないパン肉質部)、美味しさ若しくは風味の改善により測定される

ような抗老化効果の改善が提供される。

本発明はまた、本発明のポリペプチド又は本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。前記医薬組成物は任意の態様で、例えば固形物若しくは液体、錠剤、ピル、スプレー、インプラント、散剤、ローションなどとして製剤化することができる。本発明はまた、本発明のポリペプチド又は本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む口腔手入れ用品を提供する。前記口腔手入れ用品は、歯磨きペースト、歯磨きクリーム、ゲル又は歯磨き粉、オドンティック、口内洗浄液、歯磨き前又は歯磨き後の洗浄剤、チューインガム、ロゼンジ又はキャンデーを含むことができる。

本発明の1つまたは2つ以上の実施態様の詳細は添付の図面および下記の説明で示される。本発明のその他の特徴、目的および利点はこれらの記載および図面から、さらに特許請求の範囲から明らかになる。

本明細書に引用した全ての刊行物、特許、特許出願、GenBank配列およびATCC寄託物は引用により本明細書に取り込まれるものとする。

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は、グルコシダーゼ酵素、前記酵素をコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドおよびポリペプチドの製造及び使用方法を提供する。本発明は、グルコシダーゼ活性を有する新規なポリペプチド、前記をコードする核酸、及び前記と結合する抗体を目的とする。本発明のポリペプチドは多様な診断薬、治療薬及び工業的状況で用いることができる。

ある特徴では、本発明は、グルコシダーゼ活性（アルファ-グルコシダーゼ活性を含む）を有するポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにこれらポリヌクレオチド及びポリペプチドを製造及び使用方法を提供する。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、デンプンの糖への加水分解を触媒するため、例えば液化デンプンをグルコースへ変換するためにアルファ-グルコシダーゼとして用いられる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、アルファ-(1,4)及びアルファ-(1,6)グルコース結合の両方の加水分解を触媒することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、マルト-オリゴ糖及び液化デンプンの両方の加水分解を触媒することができる。

本発明のポリペプチドは、任意の食品、飼料、又は食品若しくは飼料補助物質として用いることができる。本発明のポリペプチドは、例えば洗剤の添加物として、食品の加工のために、又は逆反応を利用する化学合成のために用いることができる。本発明のポリペプチドは、デンプン液化で、又はデンプン加工の任意の局面で、湿式トウモロコシ製粉で、アルコール製造で、洗剤マトリックス中の洗浄剤として、繊維工業におけるデンプンの脱サイズ又は任意の繊維物処理で、焼成への応用で、飲料工業で、油田の掘削処理で、再生紙の脱インクで、又は食品若しくは動物飼料で（例えば前記への添加物として）、又は食品、飲料若しくは動物飼料の処理で用いることができる。本発明のポリペプチドは、医薬組成物、栄養補助物質、化粧品、歯の手入れ用品などで用いることができる。

【0031】

定義

本明細書で用いられるように、グルコシダーゼ活性には、グルコシダーゼ活性の任意の形態又は変種（アルファ-グルコシダーゼ活性を含む）が含まれる。グルコシダーゼ活性には、デンプンの糖への加水分解の触媒、例えば液化デンプンのグルコースへの変換が含まれる。グルコシダーゼ活性には、アルファ-(1,4)及び／又はアルファ-(1,6)グルコース結合の両方の加水分解の触媒が含まれる。グルコシダーゼ活性には、マルト-オリゴ糖及び液化デンプンの加水分解の触媒が含まれる。グルコシダーゼ活性には、多糖類（例えばデンプン）中のアルファ-1,2及び／又はアルファ-1,3結合の加水分解の触媒が含まれる。グルコシダーゼ活性には、デンプンの還元又は非還元末端からグルコース残基を切断することが含まれる。グルコシダーゼ活性には、アルファ-(1,4)及び／又はアルファ-(1,6)グルコース結合の両方の加水分解の触媒が含まれる。グルコシダーゼ活性には、イソマルターゼ、マルトース、メチル-アルファ-D-グルコピラノシド及び／又はp-ニトロフェノール

-アルファ-D-グルコピラノシドの加水分解の触媒が含まれる。ある特徴では、グルコシダーゼ活性にはベータ-グルコシダーゼ活性が含まれる。グルコシダーゼ活性は、ベータ-グルコシダーゼ活性を有しセルロース分解活性をもち、例えばグルコース、セロビオース、セロオリゴ糖などを生成することを含むことができる。

本発明はまた“グルコシダーゼ変種”を含み、この変種は“前駆体グルコシダーゼ”のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸配列を含むことができる。前記前駆体グルコシダーゼには天然に存在するグルコシダーゼ及び／又は組換えグルコシダーゼが含まれる。前記グルコシダーゼ変種のアミノ酸配列は、前駆体アミノ酸配列の1つ又は2つ以上のアミノ酸の置換、欠失又は挿入によって前駆体グルコシダーゼアミノ酸配列に“由来”するであろう。そのような改変は、前駆体グルコシダーゼ酵素それ自体の操作でなく、むしろ前駆体グルコシダーゼのアミノ酸配列をコードする“前駆体DNA配列”の改変であろう。前駆体DNA配列のそのような操作のための適切な方法には当業者に公知の方法とともに本明細書で開示される方法が含まれる。

10

【0032】

“抗体”という用語には、1つの免疫グロブリン遺伝子もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントから誘導されたか、前記にならって作製されたか、または前記によって実質的にコードされたペプチドまたはポリペプチドであって、抗原またはエピトープに特異的に結合することができるものが含まれる。例えば以下を参照されたい：Fundamental Immunology, Third Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993) ; Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273 ; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97。抗体という用語は、抗原に結合する能力を保持する抗原結合部分、すなわち“抗原結合部位”（例えばフラグメント、部分配列、相補性決定領域（CDR））を含み、（i）Fabフラグメント（VL、VH、CLおよびCH1ドメインから成る一価のフラグメント）；（ii）F(ab')₂フラグメント（ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント）；（iii）VHおよびCH1ドメインから成るFdフラグメント；（iv）抗体の1つの腕のVLおよびVHドメインから成るFvフラグメント；（v）dAbフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）（VHドメインから成る）；および（vi）単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。単鎖抗体もまた関連する場合には“抗体”という用語に含まれる。

20

本明細書で用いられる“アレイ”または“マイクロアレイ”または“バイオチップ”または“チップ”という用語は複数の標的要素であって、各標的要素は、基質表面の一定面積上に固定化された一定量の1つまたは2つ以上のポリペプチドもしくは核酸を含む（更なる詳細は下記に記載される）。

30

【0033】

本明細書で用いられるように、“コンピュータ”、“コンピュータプログラム”および“プロセッサ”はこれらのもっとも広い一般的な意味で用いられ、下記で詳細に述べるような装置の全てが含まれる。具体的なポリペプチドまたはタンパク質の“コード配列”または前記を“コードする配列”は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、ポリペプチドまたはタンパク質に転写および翻訳される核酸配列である。

本明細書で用いられる“発現カセット”という用語は、構造遺伝子（タンパク質コード配列、例えば本発明のグルコシダーゼ）の発現に対して、それらの配列と適合する宿主内で影響を与えることのできるヌクレオチド配列を指す。発現カセットは、ポリペプチドコード配列（および場合によって他の配列、例えば転写終了シグナル）と機能可能に連結された少なくとも1つのプロモーターを含む。発現の実施に必要なまたは有用なさらに別の因子（例えばエンハンサー）もまた用いることができる。したがって、発現カセットはまた、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、任意の形態の組換え“裸のDNA”ベクターなどを含む。

40

本明細書で用いられる“機能的に連結される”とは、2つまたは3つ以上の核酸（例えばDNA）セグメント間における機能的関係を指す。典型的には、前記用語は、転写される配列に対する転写調節配列の機能的関係を指す。例えば、プロモーターが適切な宿主細胞ま

50

たは他の発現系でコード配列（例えば本発明の核酸）の転写を刺激または調節する場合、前記プロモーターは前記コード配列と機能可能に連結されている。一般的には、転写される配列と機能可能に連結されているプロモーター転写調節配列は、前記転写される配列と物理的に連続している。すなわち、それらはcis-作動性である。しかしながら、いくつかの転写調節配列、例えばエンハンサーは、それらが転写を強化しようとするコード配列と物理的に連続していること、または前記と接近して配置されることを必ずしも必要としない。

“ベクター”は、細胞に感染、トランスフェクト、一過性もしくは永久的に形質導入することができる核酸を含む。ベクターは、裸の核酸またはタンパク質もしくは脂質と複合体を形成した核酸でもよいことは理解されよう。ベクターは場合によってウイルスまたは細菌の核酸および／またはタンパク質および／または膜（例えば細胞膜、ウイルスの脂質エンベロープなど）を含む。ベクターには、DNAフラグメントが結合し複製できるようになったレプリコン（例えばRNAレプリコン、バクテリオファージ）が含まれるが、ただし前記に限定されない。したがって、ベクターには、自律的自己複製性環状もしくは直鎖状DNAまたはRNA（例えばプラスミド、ウイルスなど、例えば米国特許出願第5,217,879号参照）が含まれ（ただし前記に限定されない）、さらに発現および非発現プラスミドが含まれる。組換え微生物または培養細胞が“発現ベクター”の宿主として記載されている場合は、このベクターには染色体外環状および直鎖状DNA並びに宿主染色体に取り込まれたDNAの両方が含まれる。ベクターが宿主細胞により維持されるべき場合は、前記ベクターは自律性構造物として有糸分裂時に細胞によって安定的に複製されても、または宿主のゲノム内に取り込まれていてもよい。

10

20

【0034】

本明細書で用いられる“プロモーター”という用語には、細胞（例えば植物細胞）内でコード配列の転写を駆動させることができる全ての配列が含まれる。したがって、本発明の構築物で用いられるプロモーターには、遺伝子の転写のタイミングおよび／または速度の調節または調整に関与するcis-作動性転写制御エレメントおよび調節配列が含まれる。例えば、プロモーターは、cis-作動性転写制御エレメント（エンハンサー、プロモーター、転写ターミネータ、複製起点、染色体組み込み配列、5'および3'非翻訳領域またはイントロン配列が含まれ、転写調節に必要である）であろう。前記のcis-作動性配列は、典型的にはタンパク質または他の生物学的分子と相互作用して転写を実行する（転写のON、OFFの切り替え、調節または調整など）。“構成的”プロモーターは、大部分の環境条件下および生育または細胞分化の状態で持続的に発現を駆動するプロモーターである。“誘導性”または“調節可能”プロモーターは環境条件または生育条件の影響下で本発明の核酸の発現を誘導する。例えば誘導性プロモーターによって転写に影響を与えることができる環境条件の例には、嫌気的条件、上昇温度、乾燥または光の存在が含まれる。

30

“組織特異的”プロモーターは、例えば植物または動物の特定の細胞または組織または器官でのみ活性を有する転写制御エレメントである。組織特異的調節は、ある組織に特異的なタンパク質をコードする遺伝子の発現を担保するある種の固有の因子によって達成できる。そのような因子は哺乳動物および植物に存在し、特定の組織を発達させることが知られている。

40

“植物”という用語には植物体全体、植物の部分（例えば葉、茎、花、根など）、植物のプロトプラスト、種子および植物細胞並びに前記の子孫が含まれる。本発明の方法で用いることができる植物クラスは、一般的には、形質転換技術を施しやすい高等植物クラスと同様に広く、裸子植物と同様に被子植物（単子葉および双子葉植物）が含まれる。前記には多様な倍数性レベルを有する植物（倍数体、二倍体、半数体および半接合状態を含む）が含まれる。本明細書で用いられる“トランスジェニック植物”には、異種核酸配列（例えば本発明の核酸および種々の組換え構築物、例えば発現カセット）が挿入された植物または植物細胞が含まれる。

“プラスミド”は、市販もしくは無制限に公開されているか、または公表された方法にしたがって入手可能なプラスミドから構築することができる。本明細書に記載されている

50

プラスミドと同等なプラスミドは当技術分野で公知であり、当業者には明らかであろう。

“遺伝子”という用語には、転写生成物（順次翻訳されたポリペプチド鎖を生じるか、または遺伝子の転写、再生または安定性を調節する）の生成に必要なDNAのセグメントを含む核酸配列が含まれる。遺伝子はコード領域に先行または後続する領域、例えばリーダーおよびトレイラー、プロモーターおよびエンハンサー並びに（適用がある場合には）個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含むことができる。

【0035】

“核酸”または“核酸配列”という語句にはオリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドが含まれ、前記のいずれかのフラグメント、ゲノム由来もしくはは合成起源のDNAまたはRNA（例えばmRNA、rRNA、tRNA、iRNA）（これらは一本鎖でも二本鎖でもよく、センスまたはアンチセンス鎖を表していてもよい）、ペプチド核酸（PNA）または任意のDNA様もしくはRNA様物質、天然もしくはは合成起源のリボヌクレオプロテイン（iRNAを含む）（例えば二本鎖iRNA、例えばiRNP）が含まれる。前記用語は、天然のヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸（すなわちオリゴヌクレオチド）を包含する。前記用語はまた合成骨格をもつ核酸様構造物を包含する（例えば以下を参照されたい：Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156）。

“アミノ酸”または“アミノ酸配列”にはオリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列、またはこれらのいずれかのフラグメント、部分またはサブユニット、並びに天然に存在する分子および合成分子が含まれる。“ポリペプチド”および“タンパク質”という用語には、ペプチド結合または改変ペプチド結合によって互いに結合したアミノ酸、すなわちペプチドイソステアールが含まれ、20個の遺伝子によってコードされるアミノ酸以外の改変アミノ酸を含むことができる。“ポリペプチド”という用語にはまたペプチドおよびポリペプチドフラグメント、モチーフなども含まれる。前記用語はまたグリコシル化ポリペプチドを含む。本発明のペプチドおよびポリペプチドにはまた、下記でさらに詳細に記載されるように全ての“模倣体”および“ペプチド模倣体”が含まれる。

【0036】

“単離”という用語は、その本来の環境（物質が天然に存在する場合はその天然の環境）から取り出された物質を含む。例えば、生きている動物に存在する天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然の系と一緒に存在する物質のいくつかまたは全てから分離されている前記ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されている。そのようなポリヌクレオチドはベクターの部分であってもよいし、および／またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であってもよく、それでもなおそのようなベクターまたは組成物は前記の天然の環境の一部ではないという点で、それらのポリヌクレオチドは単離されたものである。本明細書で用いられるように、単離物質または組成物はまた“精製”された組成物であってもよく、すなわち、完全な純粋性は要求されず、むしろ相対的な定義として意図されている。ライブラリーから得られる個々の核酸は電気泳動による均質度まで通常的に精製することができる。また別の特徴では、本発明は、ライブラリーまたは他の環境中のゲノムDNAもしくは他の配列から少なくとも1、2、3、4、5またはそれより大きい桁数まで精製された核酸を提供する。

本明細書において、“組換え”という用語には、その天然の環境では隣接していない“骨格”核酸に隣接する核酸が含まれるであろう。ある特徴では、核酸は、“骨格分子”核酸集団において核酸挿入物の数の5%またはそれ以上の数を占める。本発明の“骨格分子”には、関心のある核酸挿入物を維持または操作するために用いられる核酸、例えば発現ベクター、自己複製核酸、ウイルス、組み込み核酸、および他のベクターまたは核酸が含まれる。ある特徴では、組換え骨格分子集団において濃縮された核酸は、核酸挿入物の数の10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%又はそれ以上を占める。“組換え”ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術によって製造されたポリペプチドまたはタンパク質、例えば所望のポリペプチドまたはタンパク質

をコードする外因性DNA構築物によって形質転換された細胞から製造されたものを指す。
“合成”ポリペプチドまたはタンパク質は、下記でさらに詳細に記載されるように化学的
合成によって調製されたものである。

【0037】

プロモーター配列は、下記でさらに考察されるように、前記プロモーターで転写を開始
するRNAポリメラーゼがコード配列のmRNAへの転写を開始する場合には“機能可能に連結
”されているであろう。

“オリゴヌクレオチド”には、一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは2本の相補的な
ポリデオキシヌクレオチド鎖が含まれ、化学的に合成することができる。そのような合成
オリゴヌクレオチドは5'リン酸をもたず、したがってキナーゼの存在下でATPによりリン
酸を付加されなければ別のオリゴヌクレオチドに連結されないであろう。合成オリゴヌク
レオチドは脱リン酸化されていないフラグメントに連結することができる。

2つの核酸またはポリペプチドの関係で“実質的に同一”という語句は、公知のいずれ
かの配列比較アルゴリズム（下記で詳細に考察される）を用いるかまたは目視精査により
最大一致のための比較およびアラインメントを実施したとき、例えば少なくとも約50%、
51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64
%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%
、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、
91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上のヌクレオチド
またはアミノ酸残基（配列）同一性を有する2つまたは3つ以上の配列を称し得る。また別
の特徴では、本発明は、本発明の例示的な配列と、少なくとも約10、20、30、40、50、10
0、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、90
0、950、1000若しくはそれ以上の残基にわたって、または前記核酸もしくはポリペプチド
の約50残基からその完全長の範囲の領域にわたって実質的な配列同一性を有する核酸およ
びポリペプチド配列を提供する。本発明の核酸配列は、ポリペプチドコード領域の全長に
わたって実質的に同一であり得る。本発明のポリペプチド配列は、ポリペプチド（例えば
本発明の酵素）の全長にわたって実質的に同一であり得る。

【0038】

“実質的に同一”なアミノ酸配列にはまた、1つまたは2つ以上の保存的もしくは非保存
的アミノ酸置換、欠失または挿入（特にそのような置換が分子の活性をもたない部位で生
じ、前記ポリペプチドがその機能的特性を本質的に維持していることを条件として）によ
って参照配列と異なる配列が含まれ得る。保存的アミノ酸置換は、例えばあるアミノ酸を
同じクラスの別のアミノ酸で置換する（例えば疎水性アミノ酸（例えばイソロイシン、バ
リン、ロイシンまたはメチオニン）で別の疎水性アミノ酸を置換、または極性アミノ酸で
別のアミノ酸を置換、例えばアルギニンでリジンを置換、グルタミン酸でアスパラギン酸
を置換、またはグルタミンでアスパラギンを置換）。1つまたは2つ以上のアミノ酸を例え
ばグルコシダーゼから欠失させて、その生物学的活性を顕著に変更することなく、前記ポ
リペプチドの構造を改変させることができる。例えば、グルコシダーゼ活性に必要なでない
アミノ末端またはカルボキシル末端アミノ酸を除去することができる。

“ハイブリダイゼーション”は、核酸の鎖が相補的な鎖と塩基対形成によって結合する
過程を含む。ハイブリダイゼーション反応は鋭敏で選択性があり、低い濃度でしか存在し
ないサンプルにおいてさえ関心のある特定の配列を同定することができる。ストリンジェ
ントな条件は、例えば前ハイブリダイゼーション溶液またはハイブリダイゼーション溶液
中の塩もしくはホルムアミドの濃度によって、またはハイブリダイゼーション温度によっ
て規定することができ、当業界でよく知られている。例えば、ストリンジェンシーは、下
記で詳細に記載されるように、塩濃度の減少、ホルムアミド濃度の増加、またはハイブリ
ダイゼーション温度の上昇、ハイブリダイゼーション時間の変更によって高めることがで
きる。また別の特徴では、本発明の核酸は、本明細書に示す種々の（例えば高度、中等度
および低度の）ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするその能力によって定義さ
れる。

10

20

30

40

50

【0039】

“変種”には、1つまたは2つ以上の塩基対、コドン、イントロン、エクソンまたはアミノ酸残基において改変され、しかもなお本発明のグルコシダーゼの生物学的活性を維持する本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドが含まれる。変種は、例えばエラー誘発PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、GSSM（商標）およびそれらの任意の組合せを含む手段のいずれかによっても作製することができる。例えば、野生型グルコシダーゼとは異なるpHまたは温度で活性を有する変種グルコシダーゼを作製する技術は本明細書に含まれている。

10

“飽和変異導入”または“GSSM(商標)”という用語には、下記に詳細に記載されているように、縮退オリゴヌクレオチドプライマーを用いて点変異をポリヌクレオチドに導入する方法が含まれる。

“最適化定方向進化システム”または“最適化定方向進化”という用語には、関連する核酸配列（例えば関連する遺伝子）のフラグメントを再アッセンブリする方法が含まれ、下記で詳細に説明される。

“合成連結再アッセンブリ”または“SLR”という用語には、非確率論的様式でオリゴヌクレオチドフラグメントを連結する方法が含まれ、下記で詳細に説明される。

【0040】

核酸の作製および操作

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸（発現カセット、例えば発現ベクターを含む）を提供する。本発明はまた、本発明の核酸を用いて新規なグルコシダーゼ配列を発見する方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸を用いてグルコシダーゼ遺伝子、転写物及びポリペプチドの発現を阻害する方法を含む。さらにまた、例えば合成連結再アッセンブリ、最適化定方向進化系及び／又は飽和変異導入によって本発明の核酸を改変する方法が提供される。

20

本発明の核酸は、例えばcDNAライブラリーのクローニング及び発現、PCRなどによるメッセージ又はゲノムDNAの増幅によって作製、単離及び／又は操作することができる。本明細書に開示されるように、本発明の方法の実施では、相同遺伝子は鋳型核酸の操作によって改変することができる。本発明は、当業界で公知の任意の方法若しくは手順又は装置（学術文献又は特許文献に詳しく記載されている）と併用して実施することができる。

30

【0041】

一般的技術：本発明の実施に用いられる核酸は、RNA、iRNA、アンチセンス核酸、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルス又は前記のハイブリッドのいずれであっても、種々の供給源から単離、遺伝的に操作、増幅、及び／又は組換えにより発現／作製することができる。これらの核酸から作製された組換えポリペプチドは個々に単離またはクローニングし、所望の活性について試験することができる。任意の組換え発現系（細菌、哺乳動物、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含む）を用いることができる。

あるいは、これら核酸は周知の化学的合成技術によってin vitroで合成することができる。前記技術は例えば以下に記載されている：Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661 ; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; US Patent No. 4,458,066。

40

核酸操作のための技術、例えばサブクローニング、プローブの標識（例えばクレノーポリメラーゼ、ニックトランスレーション、増幅を用いるランダムプライマー標識）、配列決定、ハイブリダイゼーションなどは学術文献および特許文献に詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい：Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laborato

50

ry Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acids Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)。

【0042】

本発明の方法の実施に用いられる核酸を入手および操作するために有用なまた別の手段は、ゲノムサンプルからのクローニング、および所望の場合には、例えばゲノムクローンもしくはcDNAクローンから単離または増幅した挿入物のスクリーニングおよび再クローニングである。本発明の方法で用いられる核酸の供給源には、哺乳動物人工染色体 (MAC) (例えば米国特許5,721,118号、同6,025,155号を参照されたい)、ヒト人工染色体 (Rose nfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BA 10 C)、P1人工染色体 (Woon (1998) Genomics 50:306-316)、P1誘導ベクター (PAC) (Ker n (1997) Biotechniques 23:120-124)、コスミド、組換えウイルス、ファージまたはプラスミドに含まれるゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーが含まれる。

ある特徴では、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、翻訳されたポリペプチドまたはそのフラグメントの分泌を誘導することができるリーダー配列とともに適切な局面でアッセンブリされる。

本発明は融合タンパク質およびそれらをコードする核酸を提供する。本発明のポリペプチドは異種ペプチドまたはポリペプチド、例えば所望の特性 (例えば安定性増強または精製の簡便化) を付与するN-末端識別ペプチドと融合させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドはまた、より強い免疫原性をもつペプチドを製造するため、組換え 20 により合成されたペプチドをより容易に単離するため、抗体および抗体発現B細胞を同定および単離するため、その他の同様な目的のために、前記に結合した1つまたは2つ以上の追加のドメインを有する融合タンパク質として合成および発現させることができる。検出および精製を容易にするドメインには、例えば金属キレートペプチド (例えばポリヒスチジン鎖およびヒスチジン-トリプトファンモジュール (固定化金属上での精製を可能にする)、プロテインAドメイン (固定化免疫グロブリン上での精製を可能にする)、およびF LAGS伸長/アフィニティー精製系 (Immune Corp, Seattle WA) で利用されるドメインが含まれる。精製ドメインおよびモチーフ構成ペプチドまたはポリペプチド間の切断可能リンカー配列 (例えばXa因子またはエンテロキナーゼ (Invitrogen, San Diego CA)) の挿入は精製を容易にする。例えば、発現ベクターは、6つのヒスチジン残基とそれに続くチオ 30 レドキシン及びエンテロキナーゼ切断部位に連結されたエピトープコード核酸配列を含むことができる (例えば以下を参照されたい: Williams (1995) Biochemistry 34:1787-1797; Dobeli (1998) Protein Expr. Purif. 12:404-414)。前記ヒスチジン残基は検出および精製を容易にし、一方、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質の残りの部分からエピトープを精製するための手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクターおよび融合タンパク質の利用に関する技術は学術文献および特許文献に詳しく記載されている (例えば以下を参照されたい: Kroll (1993) DNA Cell. Biol., 12:441-53)。

【0043】

転写および翻訳制御配列: 本発明は、RNA合成/発現を誘導または調節するために発現 (例えば転写または翻訳) 制御配列 (例えばプロモーターまたはエンハンサー) に機能的 40 に連結された本発明の核酸 (例えばDNA) 配列を提供する。前記発現制御配列は発現ベクター内に存在するであろう。例示的な細菌プロモーターにはlacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPR、PLおよびtrpが含まれる。例示的な真核細胞プロモーターにはCMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルスのLTRおよびマウスのメタロチオネインIが含まれる。

細菌でのポリペプチド発現に適したプロモーターには、大腸菌のlacまたはtrpプロモーター、lacIプロモーター、lacZプロモーター、T3プロモーター、T7プロモーター、gptプロモーター、ラムダPRプロモーター、ラムダPLプロモーター、糖分解酵素 (例えば3-ホスホグセレートキナーゼ (PGK)) をコードするオペロン由来のプロモーターおよび酸性ホスファターゼプロモーターが含まれる。真核細胞プロモーターには、CMV前初期プロモ 50

ター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、熱ショックプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、レトロウイルスのLTRおよびマウスのメタロチオネインIプロモーターが含まれる。原核細胞または真核細胞またはそれらのウイルスで遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーターもまた用いることができる。

【0044】

組織特異的植物プロモーター：本発明は、組織特異的態様で発現させることができる、例えば組織特異的態様で本発明のグルコシダーゼを発現させることができる発現カセットを提供する。本発明はまた、本発明のグルコシダーゼを組織特異的態様で発現する植物または種子を提供する。前記組織特異性は、種子特異的、茎特異的、葉特異的、根特異的、果実特異的などであり得る。

10

ある特徴では、構成的プロモーター（例えばCaMV35Sプロモーター）を植物若しくは種子の特定の部分又は植物全体における発現に用いることができる。例えば、過剰発現のためには、植物のいくつかの組織または全ての組織（例えば再生植物）で核酸の発現を指令する植物プロモーターフラグメントを用いることができる。そのようなプロモーターは、本明細書では“構成的”プロモーターと称され、ほとんどの環境条件下および生育または細胞分化状態で活性を示す。構成的プロモーターの例には、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35S転写開始領域、アグロバクテリア・ツメファシエンズ（*Agrobacterium tumefaciens*）のT-DNA由来1'-または2'-プロモーター、および当業者に公知の種々の植物遺伝子のその他の転写開始領域が含まれる。そのような遺伝子には、例えばアラビドプシス（*Arabidopsis*）のACT11（Huang (1996) Plant Mol. Biol. 33:125-139）；アラビドプシスのCat3（GenBank No. U43147、Zhong (1996) Mol. Gen. Genet. 251:196-203）；ブラシカ・ナプス（*Brassica napus*）のステアロイル-アシルキャリアタンパク質デサチュラーゼをコードする遺伝子（GenBank No. X74782、Solomon (1994) Plant Physiol. 104:1167-1176）；トウモロコシのGPc1（GenBank No. X15596、Martinez (1989) J. Mol. Biol. 208:551-565）；トウモロコシのGpc2（GenBank No. U45855、Manjunath (1997) Plant Mol. Biol. 33:97-112）；米国特許4,962,028号、同5,633,440号に記載された植物プロモーターが含まれる。

20

本発明は、ウイルス由来の組織特異的または構成的プロモーターを用いる。これらには、例えばトバモウイルスのサブゲノムプロモーター（Kumagai (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1679-1683）；イネのツングロ杆状ウイルス（RTBV）（感染したイネの師部細胞でのみ複製し、強力な師部特異的レポーター遺伝子発現を駆動するプロモーターを有する）；キャッサバ葉脈モザイクウイルス（CVMV）プロモーター（維管束エレメント、葉の葉肉細胞および根の先端でもっとも強い活性を有する）（Verdaguer (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-1139）。

30

あるいは、植物プロモーターは、特定の組織、器官または細胞タイプでグルコシダーゼ発現核酸の発現を指令するか（すなわち組織特異的プロモーター）、又はそうでなければより厳密な環境もしくは生育制御下に置くか、または誘導性プロモーターの制御下に置くことができる。転写に影響を与えることができる環境条件の例には、嫌気性条件、上昇温度、光の存在、化学物質／ホルモンの噴霧が含まれる。例えば、本発明は、トウモロコシの乾燥誘導プロモーター（Busk (1997) 上掲書）；ジャガイモの低温、乾燥および高塩誘導プロモーター（Kirch (1997) Plant Mol. Biol. 33:897-909）を取り込んでいる。

40

【0045】

組織特異的プロモーターは、その組織内の一定の時間枠内の生育段階内でのみ転写を促進することができる。例えば以下を参照されたい：Blazquez (1998) Plant Cell 10:791-800（アラビドプシスのLEAFY遺伝子のプロモーターの特性を明らかにする）。さらにまた例えば以下を参照されたい：Cardon (1997) Plant J 12:367-377（*A.サリアナ*（*thaliana*）の花の分裂組織同一性遺伝子AP1のプロモーター領域中の保存配列モチーフを認識する転写因子SPL3について記載している）；およびMandel (1995) Plant Molecular Biology, vol 29, pp995-1004（分裂組織プロモーターeIF4について記載している）。特定の組織のライフサイクルの全体を通して活性を有する組織特異的プロモーターを用いることがで

50

きる。ある特徴では、本発明の核酸は、主としてワタの繊維細胞でのみ活性を示すプロモーターに機能的に連結される。ある特徴では、本発明の核酸は、例えば上掲書（Rinehart (1996)）に記載されたように、主としてワタの繊維細胞の伸張期間に活性を示すプロモーターに機能的に連結される。核酸は、ワタの繊維細胞で優先的に発現されるようにFb12A遺伝子プロモーターに機能的に連結することができる（上掲書）。さらに以下を参照されたい：John (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5769-5773；John et al., US Patent No. 5,608,148, 5,602,321（ワタの繊維特異的プロモーターおよびトランスジェニックな綿植物を構築する方法が記載されている）。根特異的プロモーターもまた本発明の核酸の発現に用いられる。根特異的プロモーターの例には、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターが含まれる（DeLisle (1990) Int. Rev. Cytol. 123:39-60）。本発明の核酸の発現に用いることができる他のプロモーターには、例えば胚珠特異的、胚特異的、内胚葉特異的、珠皮特異的、種子外皮特異的プロモーター、またはこれらのいくつかの組合せ；葉特異的プロモーター（例えば以下を参照されたい：Busk (1997) Plant J. 11:1285-1295、前記にはトウモロコシの葉特異的プロモーターが記載されている）；アグロバクテリウム・リゾゲネス（*Agrobacterium rhizogenes*）のORF13プロモーター（根で高い活性を示す（上掲書（Hansen, 1997）を参照されたい））；トウモロコシの花粉特異的プロモーター（例えば以下を参照されたい：Guerrero (1990) Mol. Gen. Gnet. 224:161-168）；果実成熟時、葉の（前記より低頻度で花の）老化および離脱時に活性を示すトマトのプロモーター（例えば以下を参照されたい：Blume (1997) Plant J. 12:731-746）；ジャガイモのSK2遺伝子のめしべ特異的プロモーター（例えば以下を参照されたい：Flicker (1997) Plant Mol. Biol. 35:425-431）；エンドウマメのBlec4遺伝子（トランスジェニックアルファルファの栄養および生殖茎頂の表皮組織で活性を示し、活発に生長しているシュートまたは繊維の表皮層で外来遺伝子を発現するために有用である）；珠皮特異的BEL1遺伝子（例えば以下を参照されたい：Reiser (1995) Cell 83:735-742, GenBank No. U39944）；および／または米国特許第5,589,583号（Klee）（分裂組織および／または急速に分裂している細胞で高レベルの転写を付与することができる植物プロモーターについて記載）のプロモーターが含まれる。

【0046】

あるいは、植物ホルモン（例えばオーキシン）の暴露に際して誘導することができる植物プロモーターが本発明の核酸を発現させるために用いられる。例えば、本発明は以下を用いることができる：ダイズ（*Glycine max* L.）のオーキシン応答エレメントE1プロモーターフラグメント（AuxRE）（Liu (1997) Plant Physiol. 115:397-407）；オーキシン応答性アラビドプシスGST6プロモーター（サリチル酸および過酸化水素にも反応性である）（Chen (1996) Plant J. 10:955-966）；タバコのオーキシン誘導性parCプロモーター（Sakai (1996) 37:906-913）；植物ビオチン応答エレメント（Streit (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:933-937）；およびストレスホルモンアブシジン酸に反応するプロモーター（Sheen (1996) 274:1900-1902）。

本発明の核酸はまた、植物に適用可能な化学的試薬（例えば除草剤または抗生物質）の暴露に際して誘導することができる植物プロモーターに機能的に連結することもできる。例えば、トウモロコシのIn2-2プロモーター（ベンゼンスルホンアミド除草剤の毒性緩和剤によって活性化される）を用いることができる（De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577）。種々の除草剤の毒性緩和剤の適用によって、根、排水組織、茎頂分裂組織での発現を含む別個の遺伝子発現パターンが誘導される。コード配列は、例えばテトラサイクリン誘導プロモーター（例えばアヴェナ・サティヴァL.（エンバク）のアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子（Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473）を含むタバコのトランスジェニック植物で開示されたとおり）、またはサリチル酸応答エレメント（Strange (1997) Plant J. 11:1315-1324）の制御下に置くことができる。化学的に（例えばホルモンまたは殺虫剤によって）誘導されるプロモーター（すなわち野外でトランスジェニック植物に適用することができる化学物質に対し応答するプロモーター）を用いて、本発明のポリペプチドの発現を植物の生育の特定の段階で誘導することができる。したがって、

本発明はまた、その宿主域が標的植物種（例えば、トウモロコシ、イネ、オオムギ、コムギ、s ジャガイモまたはその他の穀物類）に限定される、作物の任意の生育段階で誘導可能な本発明のポリペプチドをコードする誘導性遺伝子を含むトランスジェニック植物を提供する。

【0047】

当業者には、組織特異的植物プロモーターは標的組織以外の組織で機能可能に連結された配列の発現を駆動することができることは理解されよう。このように、組織特異的プロモーターは、標的組織または細胞タイプで優先的に発現を駆動させることができるが、他の組織でもまた同様にある程度の発現を誘導することができる。

本発明の核酸はまた、化学的試薬に暴露されたときに誘導される植物プロモーターに機能可能に連結することができる。そのような試薬には、例えば除草剤、合成オーキシンまたは抗生物質が含まれる。これらはトランスジェニック植物に適用、例えば噴霧することができる。本発明のグルコシダーゼ生成核酸の誘導性発現によって、栽培者は最適グルコシダーゼ発現および／または活性を有する植物を選別することができる。植物の部分の生育はしたがって制御可能である。このようにして、本発明は、植物および植物の部分の収穫を促進する手段を提供する。例えば、種々の実施態様では、トウモロコシのIn2-2プロモーター（ベンゼンスルホンアミド除草剤の毒性緩和剤によって活性化される）が用いられる（De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577）。種々の除草剤の毒性緩和剤の適用によって、根、排水組織、茎頂分裂組織での発現を含む別個の遺伝子発現パターンが誘導される。本発明のコード配列は、例えばテトラサイクリン誘導性プロモーター（例えばアヴェーナ・サティヴァL.（エンバク）のアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子（Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473）を含むタバコのトランスジェニック植物で開示されたとおり）、またはサリチル酸応答エレメント（Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324）の制御下にある。

適切なポリペプチド発現が所望される場合には、コード領域の3'末端のポリアデニル化領域を含めるべきである。ポリアデニル化領域は、天然の遺伝子、種々の他の植物遺伝子に由来するものでも、またはアグロバクテリウムのT-DNAの遺伝子に由来するものでよい。

【0048】

発現ベクターおよびクローニングベヒクル：本発明は、本発明の核酸、例えば本発明のグルコシダーゼをコードする配列を含む発現ベクターおよびクローニングベヒクルを提供する。本発明の発現ベクターおよびクローニングベヒクルは、ウイルス粒子、バキュロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、細菌人工染色体、ウイルスDNA（例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびSV40の誘導體）、P1系人工染色体、酵母プラスミド、酵母人工染色体、および関心のある特定宿主（例えばバチルス、アスペルギルスおよび酵母）に特異的な他の任意のベクターが含まれる。本発明のベクターには染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列が含まれる。多くの適切なベクターが当業者に知られており、市場で入手できる。例示的なベクターには以下が含まれる：細菌系：pQEベクター（Qiagen）、pBluescriptプラスミド、pNHベクター、ラムダ-ZAPベクター（Stratagene）、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T（Pharmacia）；真核細胞系：pXT1、pSG5（Stratagene）、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40（Pharmacia）。しかしながら、他の任意のプラスミドまたは他のベクターもまた、それらが宿主内で複製可能でさらに生存可能である限り用いることができる。低コピー数または高コピー数ベクターを本発明に関して用いることができる。

発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写終了因子を含むことができる。発現を増幅させるために、ベクターはまた適切な配列を含むことができる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、必要な任意のリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列および5'フランキング非翻訳配列を含むことができる。いくつかの特徴では、SV40スプライシングおよびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いて、必要な非転写遺伝子エレメントを

10

20

30

40

50

提供することができる。ある特徴では、発現ベクターは1つまたは2つ以上の選別可能なマーカー遺伝子を含み、前記ベクターを含む宿主細胞の選別を可能にする。そのような選別可能マーカーには、真核細胞培養に対してはジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子またはネオマイシン耐性を付与する遺伝子、細菌細胞(たとえば*B.セレウス* (*B.sereus*)、大腸菌)ではテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性を付与する遺伝子、及び*S.セレビシアエ* (*S. cerevisiae*) のTRP1遺伝子が含まれる。プロモーター領域は、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ (CAT) ベクターまたは選別可能なマーカーを有する他のベクターを用いて、所望される任意の遺伝子から選抜できる。

【0049】

真核細胞中でポリペプチドまたはそのフラグメントを発現させるためのベクターはまた 10
発現レベルを高めるためにエンハンサーを含むことができる。エンハンサーはDNAのcis-
作動性エレメントであり、通常は長さが約10から約300bpであってプロモーターに作用し
てその転写を高める。その例には、複製起点の後期側100bpから270bpにあるSV40エンハ
ンサー、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にある
ポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。

核酸配列は多様な方法によってベクターに挿入することができる。一般的には、前記配
列は、適切な制限エンドヌクレアーゼによる挿入物およびベクターの消化に続いてベクタ
ー内の所望の位置に連結される。あるいは、挿入物とベクターの両方の平滑末端を連結す
ることもできる。多様なクローニング技術が当業界で公知であり、例えばAusubel and Sa
mbrookに記載されている。そのような技術および他の技術は当業者の技術範囲内であろう 20
。

ベクターはプラスミド、ウイルス粒子またはファージの形態を有し得る。他のベクター
には染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列、SV40の誘導體、細菌プラスミド、フ
ァージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAの組合せに由
来するベクター、ウイルスDNA、例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、お
よび仮性狂犬病ウイルスが含まれる。原核細胞および真核細胞宿主で利用できる多様なク
ローニングベクターおよび発現ベクターは例えばSambrookによって記載されている。

使用できる具体的な細菌ベクターには、以下の周知のクローニングベクターの遺伝的要
素を含む市販のプラスミドが含まれる：pBR322 (ATCC37017)、pKK223-3 (Pharmacia Fin
e Chemicals, Uppsala, Sweden)、GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA)、pQE70 30
、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pD10、psiX174Bluescript I IKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、p
NH46A (Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)、pK
K232-8およびpCM7。具体的な真核細胞ベクターには、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Strat
agene)、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (Pharmacia) が含まれる。しかしながら他のベ
クターのいずれも宿主細胞内で複製可能で生存可能である限り使用することができる。

【0050】

本発明の核酸は、発現カセット、ベクターまたはウイルスで発現させることができ、さ
らに一過性または安定的に植物細胞および種子で発現させることができる。ある例示的な
一過性発現系はエピソーム発現系、例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) のウイ
ルスRNA (スーパーコイルDNAを含むエピソームミニ染色体の転写によって核内で生成され 40
る) を用いる (例えば以下を参照されたい：Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
87:1633-1637)。あるいは、コード配列 (すなわち本発明の完全な配列または部分配列)
を植物宿主細胞ゲノムに挿入して宿主染色体DNAの一体化部分を形成することができる。
センスまたはアンチセンス転写物を前記のようにして発現させることができる。本発明の
核酸由来の配列 (例えばプロモーターまたはコード配列) を含むベクターは植物細胞また
は種子に選別可能な表現型を付与するマーカー遺伝子を含むことができる。例えば、殺菌
物質耐性、特に抗生物質耐性 (例えばカナマイシン、G418、ブレオマイシン、ヒグロマイ
シンに対する耐性)、または除草剤耐性 (例えばクロロスルフロンまたはバスタに対する
耐性) をコードすることができる。

植物で核酸およびタンパク質を発現することができる発現ベクターは当業界において周 50

知で、例えばアグロバクテリウム種、ジャガイモのウイルスX（例えば以下を参照されたい：Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3648）、タバコモザイクウイルス（例えば以下を参照されたい：Casper (1996) Gene 173:69-73）、トマトのブッシースタントウイルス（例えば以下を参照されたい：Hillman (1989) Virology 169:42-50）、タバコのエッチウイルス（例えば以下を参照されたい：Dolja (1997) Microbiol. Immunol. 37:471-476）、ビーンゴールデンモザイクウイルス（例えば、Morinaga(1993) Microbiol Immunol. 37:471-476を参照されたい）、カリフラワーモザイクウイルス（例えば以下を参照されたい：Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:1094-1101）、トウモロコシAc/Ds転移因子（例えば以下を参照されたい：Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194）、およびトウモロコシサプレッサー-ミューテータ（Spm）転移因子（例えば以下を参照されたい：Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725）、並びにこれらの誘導体が含まれよう。

ある特徴では、発現ベクターは、2つの生物で（例えば、発現のために哺乳動物細胞または昆虫細胞で、クローニングおよび増幅のために原核細胞で）維持され得るように2種の複製系を含むことができる。さらにまた、組込型発現ベクターについては、発現ベクターは宿主細胞ゲノムと相同な少なくとも1つの配列を含むことができる。この発現ベクターは、前記発現構築物にフランキングする2つの相同な配列を含む。組み込みベクターは、ベクター内に含まれる適切な相同配列を選択することによって固有の遺伝子座に誘導することができる。組込型ベクターのための構築物は当業界で周知である。

本発明の発現ベクターはまた選別可能なマーカー遺伝子を含み、形質転換された細菌株の選別を可能にすることができる。前記遺伝子は、例えば細菌を薬剤（例えばアンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、ネオマイシンおよびテトラサイクリン）に耐性にする遺伝子である。選別可能なマーカーにはまた、生合成遺伝子、例えばヒスチジン、トリプトファンおよびロイシン生合成経路の遺伝子が含まれる。

【0051】

宿主細胞および形質転換細胞：本発明はまた、本発明の核酸配列、例えば本発明のグルコシダーゼをコードする配列、または本発明のベクターを含む形質転換細胞を提供する。宿主細胞は、当業者に周知の任意の宿主細胞であって、原核細胞、真核細胞、例えば細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞が含まれ得る。例示的な細菌細胞には、大腸菌、B.セレウス(B.cereus)、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis)、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium)、並びに、バチルス属、ストレプトミセス属、およびスタフィロコッカス属の種々の種が含まれる。例示的な昆虫細胞には、ドロソフィラS2およびスポドプテラSf9が含まれる。宿主細胞は、酵母、例えばサッカロミセス種（サッカロミセス・セレビシアエを含む）、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 及びクルイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、ハンセヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha)、アスペルギルス・ニゲル (Aspergillus niger) であり得る。例示的な動物細胞にはCHO、COSまたはボウズ・メラノーマまたは任意のマウスおよびヒト細胞株が含まれる。適切な宿主を選択することは当業者の技術範囲内である。多様な高等植物種を形質転換する技術は周知で、技術文献および学術文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477；米国特許5,750,870号。

ベクターは、多様な任意の技術を用いて宿主細胞に導入することができる。前記技術には、形質転換、トランスフェクション、形質導入、ウイルス感染、遺伝子銃またはTi仲介遺伝子伝達が含まれる。具体的な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン仲介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる (L. Davis, M. Digner, I. Battey, Basic Methods in Molecular Biology, (1986))。

【0052】

ある特徴では、本発明の核酸またはベクターはスクリーニングのために細胞に導入される。したがって前記核酸はその後の核酸の発現に適した態様で細胞に導入される。導入方

法は、主として標的細胞タイプによって決定される。例示的な方法にはCaPO₄沈殿、リボソーム融合、リポフェクション（例えばLIPOFECTIN（商標））、エレクトロポレーション、ウイルス感染などが含まれる。候補核酸は宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれるか（例えばレトロウイルス導入による）、または細胞質に一過性もしくは安定的に存在することができる（すなわち慣例的なプラスミドを使用し、標準的な調節配列、選別マーカールなどを利用する）。多くの医薬的に重要なスクリーニングではヒトまたはモデル動物細胞の標的が必要なので、そのような標的にトランスフェクトすることができるレトロウイルスが好ましい。

適切な場合には、操作された宿主細胞は、プロモーターの活性化に適切に改変した通常の栄養培地で培養し、形質転換体を選別するか、または本発明の遺伝子を増幅することができる。適切な宿主株を形質転換し、さらに適切な細胞密度に前記宿主株を増殖させた後、選択したプロモーターを適切な手段（例えば温度シフトまたは化学的誘導）によって誘導し、さらに追加の期間培養して所望のポリペプチドまたはそのフラグメントを産生させることができる。

細胞を遠心分離によって採集し、物理的または化学的手段により破壊し、得られた粗抽出物を更なる精製のために維持することができる。タンパク質の発現に用いた微生物細胞は任意の一般的な方法によって破壊することができる。そのような方法には、凍結融解の繰り返し、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用が含まれる。そのような方法は当業者には周知である。発現されたポリペプチドまたはそのフラグメントは、組換え細胞培養から以下を含む方法によって回収および精製することができる：硫酸またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用によるクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー。タンパク質の再折りたたみ工程は、ポリペプチドの立体構造の完成に際して必要に応じて用いることができる。所望の場合には、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を最終精製工程に用いることができる。

【0053】

種々の哺乳動物細胞培養系もまた組換えタンパク質の発現に用いることができる。哺乳動物発現系の例には、サル腎線維芽細胞のCOS-7株および、共存可能ベクターからタンパク質を発現させることができる他の細胞株、例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株が含まれる。

宿主細胞内の構築物を通常の態様で用い、組換え配列によってコードされる遺伝子生成物を産生させることができる。組換え生産方法で用いる宿主細胞に依存して、ベクターを含む宿主細胞により産生されるポリペプチドはグリコシル化されることも、またグリコシル化されないこともある。本発明のポリペプチドはまた最初のメチオニン残基を含んでいることも含まないこともある。

無細胞翻訳系もまた本発明のポリペプチドの製造に利用することができる。無細胞翻訳系は、前記ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含むDNA構築物から転写されたmRNAを用いることができる。いくつかの特徴では、前記DNA構築物は、in vitro転写反応実施前に直鎖化することができる。続いて適切な無細胞翻訳抽出物（例えばウサギ網状赤血球抽出物）とともに前記転写mRNAをインキュベートし、所望のポリペプチドまたはそのフラグメントを生成する。

発現ベクターは1つまたは2つ以上の選別可能な遺伝子を含み、形質転換された宿主細胞の選別用表現型特性（真核細胞の場合にはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、大腸菌では例えばテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性）を提供することができる。

【0054】

核酸の増幅：本発明の実施では、本発明の核酸および本発明のポリペプチドをコードする核酸または本発明の改変核酸は増幅によって複製することができる。増幅はまた本発明の核酸のクローニングまたは改変にも用いることができる。したがって、本発明は、本発

10

20

30

40

50

明の核酸を増幅するための増幅プライマー配列対を提供する。当業者は、これら配列の任意の部分またはその完全長のための増幅プライマー配列対を設計することができる。

増幅反応はまたサンプル中の核酸の量（例えば細胞サンプル中のメッセージの量）の定量、核酸の標識（例えば前記核酸をアレイまたはプロットに適用する）、前記核酸の検出、またはサンプル中の特定の核酸量の定量に用いることができる。本発明のある特徴では、細胞またはcDNAライブラリーから単離したメッセージが増幅される。

【0055】

当業者は適切なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択および設計することができる。増幅方法はまた当業界で周知であり、例えば以下が含まれる：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば以下を参照されたい：PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, ed. Innis, Academic Press, NY (1990); PCR Strategies (1995) ed. Innis, Academic Press, Inc., NY）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば以下を参照されたい：Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117）、転写増幅（例えば以下を参照されたい：Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173）、およびセルフサステイン配列複製（例えば以下を参照されたい：Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874）、Qベータレプリカーゼ増幅アッセイ（例えば以下を参照されたい：Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271）、自動Q-ベータレプリカーゼ増幅アッセイ（例えば以下を参照されたい：Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271）および他のRNAポリメラーゼ仲介技術（例えば以下を参照されたい：NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario）。さらにまた以下を参照されたい：Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; US Patent Nos. 4,683,195および4,683,202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564。

【0056】

配列同一性の程度の決定

本発明は、本発明の例示的な核酸と少なくとも約50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550またはそれより多い残基領域にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な（100%）配列同一性を有する配列を含む核酸を提供する。本発明は、本発明の例示的なポリペプチドと少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な（100%）配列同一性を有する配列を含むポリペプチドを提供する。配列同一性（相同性）の程度は、任意のコンピュータプログラムおよび付属のパラメーター（本明細書に記載されたもの、例えばBLAST2.2.2またはFASTA ver. 3.0t78を含む）を規定値パラメーターとともに用いて決定することができる。

相同な配列にはまたRNA配列が含まれる（RNA配列では前記核酸配列のチミンはウリジンに置換されている）。相同な配列は本明細書に記載されている方法のいずれかを用いて入手できるが、またシーケンシングエラーの修正から得ることができる。本明細書に示される核酸配列は、伝統的な一文字様式（例えば以下を参照されたい：Lubert Stryer, Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York）または配列内のヌクレオチドの実体を記録する他の任意の様式で表現することができることは理解されよう。

本発明のこの特徴では本明細書で同定した種々の配列比較アルゴリズムが用いられる。タンパク質および／または核酸配列の同一性（相同性）は、当業界で公知の多様な配列比較アルゴリズムおよびプログラムのいずれかを用いて評価することができる。そのような

アルゴリズムおよびプログラムには、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALWが含まれるが、ただしこれらに限定されない (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993)。

相同性または同一性は配列分析ソフト (例えばジネティクスコンピュータグループ (University of Wisconsin Bitechology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705) の配列分析ソフトウェアパッケージ) を用いて測定できる。そのようなソフトは、種々の欠失、置換および他の改変に対して相同性の程度を決めることによって類似の配列を見つける。2つまたは3つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関して“相同性”および“同一性”という用語は、比較ウィンドウまたは指定の領域上で、任意の数の配列比較アルゴリズムを使用するかまたは手動アラインメントおよび目視精査による測定にしたがって最大一致を求めて比較およびアラインメントを実施したとき、同じであるかまたは特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチドが同じである2つまたは3つ以上の配列を指す。配列比較の場合、一方の配列は参照配列 (例えば本発明の配列) として機能し、前記に対してテスト配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いるとき、テスト配列および参照配列はコンピュータに入力され、部分配列同等物が必要な場合に指定され、さらに配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。規定値プログラムパラメーターを用いることができるが、また別のパラメーターを指定することもできる。続いて配列比較アルゴリズムは、前記のプログラムパラメーターを基に参照配列に対するテスト配列のパーセント配列同一性を計算する。

【0057】

本明細書で用いられる“比較ウィンドウ”は、任意数の連続残基セグメントに対する参照を含む。例えば本発明の別の特徴では、本発明の例示的なポリペプチドまたは核酸配列の20から完全長の間のいずれかの範囲の連続残基が、同じ数の連続した箇所の参照配列と前記2つの配列を最適にアラインメントした後で比較される。参照配列が本発明の例示的なポリペプチドまたは核酸配列と必要な配列同一性を有するならば、例えば50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い配列同一性を本発明の配列に対して有するならば、前記配列は本発明の範囲に包含される。また別の実施態様では、約20から600、約50から200、および約100から150の範囲の部分配列が、同じ数の連続した箇所の参照配列と前記2つの配列を最適にアラインメントした後で比較される。

【0058】

配列比較のアラインメントを実施する方法は当業界では周知である。配列比較の最適アラインメントは、例えばSmith & Watermanの局所相同性アルゴリズム (Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)) によって、Needleman & Wunschの相同性アラインメントアルゴリズム (J. Mol. Biol. 48:443 (1970)) によって、Pearson & Lipmanの類似性検索方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)) によって、前記アルゴリズムのコンピュータによる実施によって (GAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、または手動アラインメントと目視精査によって実施できる。相同性または同一性決定のための他のアルゴリズムには、BLASTプログラム (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information) の他に、ALIGN、AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences)、AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment)、ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool)、BANDS、BESTSCOR、BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node)、BLIMPS (BLOCKS IMPROVED SEARCHER)、FASTA、Interval & Points、BMB、CLUSTALV、CLUSTALW、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Wa

termanアルゴリズム、DARWIN、ラスベガスアルゴリズム、FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool)、フレームアライン、フレームサーチ、DYNAMIC、FILTER、FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package)、GAP (Global Alignment Program)、GENAL、GIBBS、GenQuest、ISSC (Sensitive Sequence Comparison)、LALIGN (Local Sequence Alignment)、LCP (Local Content Program)、MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench)、MAP (Multiple Alignment Program)、MBLKP、MBLKN、PIMA (Pattern-Induced Multi-Sequence Alignment)、SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) およびWHAT-IFが含まれる。前記のようなアラインメントプログラムはまたゲノムデータベースのスクリーニングに用いられ、実質的に同一の配列をもつポリヌクレオチド配列を同定することができる。多数のゲノムデータベースが利用可能で、例えばヒトゲノムの実質的部分がヒトゲノム配列決定プロジェクト (Gibbs, 1995) の一部分として利用可能である。いくつかのゲノムの配列、例えばM. ジェニタリウム (genitalium) (Fraser et al., 1995)、M. ジャナスキイー (jannaschii) (Bult et al., 1996)、H. インフルエンザ (Fleischmann et al. 1995)、大腸菌 (Blattner et al. 1997)、酵母 (S. cerevisiae) (Mewes et al. 1997) およびD.メラノガスター (melanogaster) (Adams et al., 2000) の配列が決定された。顕著な進展がモデル生物 (例えばマウス、C. エレガンス およびアラビドプシス種 (Arabidopsis sp)) のゲノム配列決定で達成された。いくつかの機能的情報の注釈をもつゲノム情報を含むデータベースが種々の機関で維持されており、インターネットでアクセスすることができる。

10

20

【0059】

BLAST、BLAST2.0およびBLAST2.2.2アルゴリズムもまた本発明の実施に用いられる。前記アルゴリズムは例えば以下に記載されている: Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410。BLAST分析を実施するソフトは、National Center for Biotechnology Informationから公開されている。このアルゴリズムは、問い合わせ配列内の長さがWの短いワードを同定することによって高スコアをもつ配列対 (HSP) をまず初めに同定することを必要とする。前記は、データベース配列中の同じ長さを持つワードとアラインメントを実施したとき、一致するかまたはいくらかの正の値をもつ閾値スコアTの条件を満たす。Tは近傍ワードスコア閾値と称される (Altschul (1990) 上掲書)。これらの最初の近傍ワードヒットはそれらを含むより長いHSPを見つけるための検索開始のシードとして機能する。前記ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加する限り各配列の両方向に沿って伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列についてはパラメーターM (一致残基対のための褒賞スコア、常に >0) を用いて計算される。アミノ酸配列の場合、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアが計算される。各方向のワードヒットの伸長は以下の場合に停止する: 累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ下降したとき; 累積スコアが、1つまたは2つ以上の負のスコアを与える残基アラインメントの累積のために0またはそれ以下になったとき; またはどちらかの配列の末端に達したとき。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは前記アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、規定値として11のワード長、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、3のワード長および10の期待値 (E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、 $M=5$ 、 $N=-4$ および両鎖の比較を用いる。BLASTアルゴリズムはまた2つの配列間の類似性の統計的分析を実施する (例えば以下を参照されたい: Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性測定の1つは最小合計確率 ($P(N)$) であり、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然によって生じる確率を示す。例えば、テスト核酸と参照核酸の比較で最小合計確率が約0.2未満、好ましくは約0.01未満、もっとも好ましくは約0.001未満であるならば、前記核酸は参照配列と類似であると考えられる。ある特徴では、タンパク質および核酸配列相同性はベーシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール (Basic Local Alignment Search Tool, “BLAST”) 30 40 50

を用いて評価される。例えば、5つの特別なBLASTプログラムを用いて以下のタスクを実施することができる：(1) BLASTPおよびBLAST3はアミノ酸の問い合わせ配列をタンパク質配列データベースと比較する；(2) BLASTNはヌクレオチドの問い合わせ配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；(3) BLASTXは問い合わせヌクレオチド配列（その両方の鎖）の仮想的な6つのフレームの翻訳生成物をタンパク質配列データベースと比較する；(4) TBLASTNは問い合わせタンパク質配列（両方の鎖）を全ての6つの読み枠で翻訳されるヌクレオチド配列データベースと比較する；さらに(5) TBLASTXはヌクレオチド問い合わせ配列の6つの読み枠翻訳物をヌクレオチド配列データベースの6つの読み枠翻訳物と比較する。BLASTプログラムは類似のセグメントを同定することによって相同な配列を同定する。前記セグメントは本明細書では問い合わせアミノ酸または核酸配列とテスト配列間の“高スコアセグメントペア”と称され、好ましくはタンパク質または核酸配列データベースから得られる。高スコアセグメントペアは好ましくは、スコアリングマトリックス（その多くは当業界で公知である）によって同定される（すなわちアラインメントが実施される）。好ましくは、使用されるスコアリングマトリックスはBLOSUM62マトリックスである（Gonnet et al., Science 256:1443-1445 (1992); Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61 (1993)）。好ましさは劣るが、PAMまたはPAM250もまた用いることができる（例えば以下を参照されたい：Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation）。

10

20

【0060】

本発明のある特徴では、核酸が本発明の範囲内のものであるために必要な配列同一性を有するか否かを決定するためにNCBI BLAST 2.2.2プログラムが用いられる。規定値オプションはblastpである。BLAST 2.2.2プログラムには約38の設定オプションがある。本発明のこの例示的な特徴では、全ての規定値がフィルタリング設定規定値を除いて用いられる（すなわち全てのパラメータはフィルタリング（OFFに設定される）を除いて規定値に設定される）。フィルタリングは規定値の代わりに“-FF”設定が用いられ、これはフィルタリングを無効にする。規定値のフィルタリングはしばしば、配列の長さが短いためKarlin-Altschulバイオレーションを生じる。

本発明のこの例示的な特徴で用いられる規定値には以下が含まれる：

“低複雑度用フィルター：ON

ワードサイズ：3

マトリックス：Blosom62

ギャップコスト：エグジスタンス：11

エクステンション：1”

30

他の規定値は以下のとおりである：低複雑度用フィルターはOFF、タンパク質のためのワードサイズは3、BLOSUM62マトリックス、ギャップ存在のペナルティーは-11、およびギャップ伸長のペナルティーは-1。

例示的なNCBI BLAST2.2.2プログラム設定は下記の実施例1に示されている。“-W”オプションの規定値は0であることに留意されたい。これは、設定されなければワードサイズの規定値はタンパク質で3、ヌクレオチドで11であることを意味する。

40

【0061】

コンピュータシステムおよびコンピュータプログラム製品

配列同一性、構造的相同性、モチーフなどをコンピュータシステムで決定および同定するために、コンピュータによって読み取りさらにアクセスすることができる任意の媒体上に本発明の配列を保存、記録し、さらに操作することができる。したがって、本発明は、本発明の核酸およびポリペプチド配列を記録または保存させたコンピュータ、コンピュータシステム、コンピュータ読み出し可能媒体、コンピュータプログラム製品などを提供する。本明細書で用いられる“記録”および“保存”という用語はコンピュータ媒体に情報を保存するプロセスを指す。当業者は、コンピュータ読み出し可能媒体に情報を記録するための任意の公知の方法を容易に利用して、本発明の1つまたは2つ以上の核酸および／ま

50

たはポリペプチド配列を含む製品を製造することができる。

本発明のまた別の特徴は、本発明の少なくとも1つの核酸および／またはポリペプチド配列が記録されているコンピュータ読み出し可能媒体である。コンピュータ読み出し可能媒体には、磁気により読み出し可能な媒体、光学的に読み出し可能な媒体、電子的に読み出し可能な媒体および磁気/光学媒体が含まれる。例えば前記コンピュータ読み出し可能媒体はハードディスク、フロッピー（登録商標）ディスク、磁気テープ、CD-ROM、多用途デジタルディスク（DVD）、ランダムアクセスメモリー（RAM）、または読み出し専用メモリー（ROM）の他、当業者に公知の他のタイプの媒体であろう。

【0062】

本発明の特徴には、システム（例えばインターネット使用システム）、特にコンピュータシステムが含まれる。このシステムは本明細書に記載されている配列および配列情報を保存し、これを操作する。コンピュータシステム（100）の一例が図1の組み立て分解図に示されている。本明細書で用いられる“コンピュータシステム”は、本発明のヌクレオチドまたはポリペプチド配列の分析に用いられるハードウェア構成部分、ソフトウェア構成部分およびデータ保存構成部分を指す。コンピュータシステム（100）は、配列データを処理し、これにアクセスし、さらに前記を操作するプロセッサを含むことができる。プロセッサ（105）は周知のタイプの中央演算ユニットのいずれか、例えばインテル社（Intel Corporation）のペンティアムIIIまたはサン（Sun）、モトローラ（Motorola）、コンパック（Compaq）、AMD又はインターナショナル・ビジネス・マシーン（IBM）の類似のプロセッサであり得る。コンピュータシステム（100）は汎用システムであり、プロセッサ（105）および1つまたは2つ以上のデータ保存のための内部データ保存構成部分（110）、および前記データ保存構成部分に保存されたデータを検索するための1つまたは2つ以上のデータ検索装置を含む。従来の利用可能なコンピュータシステムのいずれも適切であることは当業者には理解されよう。

【0063】

ある特徴では、コンピュータシステム（100）は、バス（メインメモリー（115）（好ましくはRAMとして提供されている）に連結されている）に連結されたプロセッサ（105）、および1つまたは2つ以上の内部データ保存装置（110）（例えばハードドライブおよび／またはそれにデータが記録される他のコンピュータ読み出し可能媒体）を含む。コンピュータシステム（100）はさらに、内部データ保存装置（110）のデータを読み取るための1つまたは2つ以上のデータ検索装置（118）を含む。データ検索装置（118）は、例えばフロッピー（登録商標）ディスクドライブ、コンパクトディスクドライブ、磁気テープドライブ、または遠隔データ保存システムに連結することができる（例えばインターネットを介して）モデムであろう。いくつかの実施態様では、内部データ保存装置（110）は取り外し可能なコンピュータ読み出し可能媒体、例えばフロッピー（登録商標）ディスク、コンパクトディスク、磁気テープなどで、制御ロジックおよび／またはそれに記録されたデータを含んでいる。コンピュータシステム（100）は便利には、データ検索装置にいったん挿入されたデータ保存構成部分から前記制御ロジックおよび／またはデータを読み出すための適切なソフトを含むか、または前記ソフトによってプログラムされる。コンピュータシステム（100）は、コンピュータのユーザーに出力結果を表示するために用いられるディスプレイ（120）を含む。コンピュータシステム（100）は他のコンピュータシステム（125a-c）とネットワークまたは広域ネットワークで連結され、コンピュータシステム（100）への中央アクセスを提供することができることは留意されるべきであろう。本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列にアクセスし前記を処理するためのソフトは実行時にはメインメモリー（115）に存在するであろう。いくつかの特徴では、コンピュータシステム（100）はさらに本発明の核酸配列を比較するための配列比較アルゴリズムを含むことができる。前記アルゴリズムおよび配列はコンピュータ読み出し可能媒体に保存することができる。“配列比較アルゴリズム”は、データ保存手段内に保存されている他のヌクレオチド配列および／または化合物とヌクレオチド配列を比較するためにコンピュータシステム（100）に（端末または遠隔端末から）提供される1つまたは2つ以上のプログラ

ムを指す。例えば、配列比較アルゴリズムは、コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている本発明のヌクレオチド配列をコンピュータ読み出し可能媒体に保存されている参照配列と比較し、相同性または構造モチーフを決定することができる。

【0064】

上記のアルゴリズムとともに用いられるパラメーターは、配列の長さおよび調べられる相同性の程度に応じて適用することができる。いくつかの特徴では、前記パラメーターは、ユーザーの指示がない場合に前記アルゴリズムによって用いられる規定値パラメーターであろう。図2は、新規なヌクレオチドまたはタンパク質配列を配列データベースと比較して、新規な配列とデータベースの配列との間の相同性レベルを決定するためのプロセス (200) の1つの特徴を示すフローチャートである。前記データベースの配列は、コンピュータシステム (100) 内に保存された個人的データベースでも、公的データベース (例えばインターネットを介して利用可能なGENBANK) でもよい。プロセス (200) は開始状態 (201) で始まり、続いて、比較されるべき新規な配列がコンピュータシステム (100) 内のメモリーに保存される状態 (202) に移行する。上記で考察したように、前記メモリーは任意のタイプのメモリー (RAMまたは内部保存装置を含む) であり得る。続いてプロセス (200) は状態 (204) に移行し、ここで配列データベースが分析および比較のために開かれる。続いてプロセス (200) は、データベースに保存されている第一の配列がコンピュータのメモリーに読み出される状態 (206) に移行する。続いて比較が状態 (210) で実施され、第一の配列が第二の配列と同じであるか否かが決定される。この工程は、新規な配列とデータベースの第一の配列との間の正確な比較の実施に限定されないことに留意することが重要である。2つのヌクレオチド配列またはタンパク質配列を (たとえそれらが同一ではなくても) 比較する周知の方法を当業者は心得ている。例えばギャップを1つの配列に導入してこれら2つのテスト配列間の相同性レベルを高めることができる。比較時にギャップまたは他の特徴を配列に導入するか否かを制御するパラメーターは通常はコンピュータシステムのユーザーによって入力される。いったん2つの配列の比較が状態 (210) で実施されたら、決定の状態 (210) で前記2つの配列が同じか否かの決定が下される。もちろんのこと、“同じ”という用語は完全に同一である配列に限定されない。ユーザーによって入力された相同性パラメーター内にある配列は、プロセス (200) で“同じ”と示され、プロセス (200) は状態 (214) に移行する (前記状態でデータベース由来の配列の名称がユーザーに表示される)。前記状態はディスプレイされた名称の配列が入力した相同性の特徴を満たすことをユーザーに知らせる。保存配列の名称がいったんユーザーに表示されたら、プロセス (200) は、それ以上の配列がデータベースに存在するか否かの決定が下される決定状態 (218) に移行する。それ以上データベースに配列が存在しない場合には、プロセス (200) は終了状態 (220) で終了する。しかしながらデータベースにさらに配列が存在する場合は、プロセス (200) は状態 (224) に移行し、前記状態でポインターは、データベースの次の配列に移動し前記新たな配列と比較することができる。このようにして、新たな配列はアラインメントを実施されデータベースの各配列と比較される。配列が相同でないという決定が決定状態 (212) で下された場合、プロセス (200) は直ちに決定状態 (218) に移行し、データベース内に比較されるべき他の配列が存在するか否かが決定されることは留意されよう。したがって、本発明のある特徴は、プロセッサー、本発明の核酸配列および比較を実施するための配列コンペアラールが保存されているデータ保存装置を含むコンピュータシステムである。前記配列コンペアラールは、比較される配列間の相同性レベルを示すかまたは構造モチーフを同定することができる。前記はまたこれらの核酸コードまたはポリペプチドコードと比較される配列内の構造モチーフを同定することができる。図3は、2つの配列が相同であるか否かを決定するコンピュータシステムのプロセス (250) のある実施態様を示すフローチャートである。プロセス (250) は開始状態 (252) で開始し、続いて比較されるべき第一の配列がメモリーに保存される状態 (254) に移行する。続いて比較されるべき第二の配列が状態 (256) でメモリーに保存される。続いてプロセス (250) は状態 (260) に移行し、前記状態 (260) で第一の配列中の第一の記号が読み取られ、続いて状態 (262) に移行し、前記状態 (262) で第二の配列の

第一の記号が読み取られる。前記配列がヌクレオチド配列の場合、前記記号は通常はA、T、C、GまたはUのいずれかであることは理解されよう。前記配列がタンパク質配列の場合は、前記記号は一文字のアミノ酸コードであり、それによって第一および第二の配列は容易に比較することができる、続いて2つの記号が同じものであるか否かの決定が決定状態(264)で下される。それらが同じものである場合、プロセス(250)は状態(268)に移行し、前記状態(268)で第一および第二の配列の次の記号が読み取られる。続いて、前記次の記号が同じものであるか否かの決定が下される。それらが同じものである場合には、プロセス(250)は2つの記号が同じでなくなるまでこのループを繰り返す。次の2つの記号が同じでないという決定が下された場合、プロセス(250)は決定状態(274)に移行して、いずれかの配列に読み取られるべき記号がそれ以上存在するか否かが決定される。読み取られるべき記号がそれ以上存在しない場合は、プロセス(250)は状態(276)に移行し、第一および第二の配列間の相同性レベルがユーザーに表示される。相同性レベルは、第一の配列内の記号の総数のうち同じであった配列間の記号の割合を計算することによって決定される。したがって、第二の配列の各記号と最初の100ヌクレオチド配列内の各記号のアラインメントが達成された場合、相同性レベルは100%であろう。

【0065】

あるいは、コンピュータプログラムは本発明の配列と参照配列とを比較して、配列が1つまたは2つ以上の位置で異なるか否かを決定することができる。前記プログラムは、参照配列または本発明の配列にいずれかの配列に対して、挿入、欠失または置換されたヌクレオチドまたはアミノ酸残基の長さまたはそれらが何であることを記録することができる。前記コンピュータプログラムは、本発明の配列に対して参照配列が一ヌクレオチド多型性(SNP)を含むか否か、または本発明の配列が公知の配列のSNPを含むか否かを決定するプログラムであろう。したがって、いくつかの特徴では、前記コンピュータプログラムはSNPを同定するプログラムである。前記方法は上記に述べたコンピュータシステムによって実施することができ、前記方法は図3に示されている。前記方法は、コンピュータプログラムを使用することにより本発明の配列および参照配列を読み取り、コンピュータプログラムにより相違を同定することによって実施することができる。

【0066】

他の特徴では、前記コンピュータ使用システムは、本発明の核酸またはポリペプチド内の特徴を同定するアイデンティファイヤーを含む。“アイデンティファイヤー”は、核酸配列内のある種の特徴を同定する1つまたは2つ以上のプログラムを指す。例えば、アイデンティファイヤーは核酸配列内のオープンリーディングフレーム(ORF)を同定するプログラムを含むことができる。図4は、配列内の1つの特徴の存在を検出するためのアイデンティファイヤープロセス(300)のある特徴を示す流れ作業図である。プロセス(300)は開始状態(302)で開始し、続いて状態(304)に移行し、前記状態(304)で特徴についてチェックされるべき第一の配列がコンピュータシステム(100)のメモリー(115)に保存される。プロセス(300)は続いて状態(306)に移行し、前記状態(306)で配列の特徴のデータベースが開かれる。そのようなデータベースは各特徴の属性リストを前記特徴の名称とともに含むであろう。例えば、特徴の名称は“開始コドン”であり、その属性は“ATG”であろう。別の例では、特徴の名称は“TAATAAボックス”であり、特徴の属性は“TAATAA”であろう。そのようなデータベースの例は、ウィスコンシン大学のGenetics Computer Groupによって作製されている。あるいは、前記特徴は構造的なポリペプチドモチーフ例えばアルファヘリックス、ベータシートまたは機能的ポリペプチドモチーフ、例えば酵素活性部位、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフまたは当業者に公知の他のモチーフであろう。特徴のデータベースが状態(306)で開かれると直ちにプロセス(300)は状態(308)に移行し、前記状態(308)で第一の特徴がデータベースから読み取られる。続いて第一の特徴の属性と第一の配列との比較が状態(310)で実施される。続いて、前記特徴の属性が第一の配列内で見出されるか否かの決定が決定状態(316)で下される。前記属性が見出された場合、プロセス(300)は状態(318)に移行し、前記状態(318)で見出された特徴の名称がユーザーに表示される。続いてプロセス(300)は決定状態

(320)に移行し、前記状態(320)でそれ以上の特徴がデータベースに存在するか否かの決定が下される。特徴がそれ以上存在しない場合は、プロセス(300)は終了状態(324)で終了する。しかしながら、それ以上の特徴がデータベースに存在する場合、プロセス(300)は状態(326)で次の配列特徴を読み取り、状態(310)に戻り、前記状態で次の特徴の属性が第一の配列に対して比較される。第一の配列で前記特徴の属性が決定状態(316)で見出されない場合、プロセス(300)は直接決定状態(320)に移行し、特徴がそれ以上データベースに存在するか否かを決定する。したがって、ある特徴では、本発明はオープンリーディングフレーム(ORF)を同定するコンピュータプログラムを提供する。

【0067】

本発明のポリペプチドまたは核酸配列を、種々のデータプロセッサプログラムで多様な様式で保存し操作することができる。例えば配列は、当業者に周知の多様なデータベースプログラム(例えばDB2、SYBASEまたはORACLE)でワードプロセッシングファイル(例えばマイクロソフトワードまたはワードパーフェクト)のテキストとしてまたはアスキーファイルとして保存することができる。さらに、多くのコンピュータプログラムおよびデータベースを配列比較アルゴリズム、アイデンティファイヤー、または本発明の核酸配列と比較すべき参照ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の供給源として用いることができる。本発明の実施に用いられるプログラムおよびデータベースには以下が含まれる(ただしこれらに限定されない): MacPattern (EMBL)、DiscoveryBase (Molecular Applications Group)、GeneMine (Molecular Applications Group)、Look (Molecular Applications Group)、MacLook (Molecular Applications Group)、BLASTおよびBLAST2 (NCBI)、BLASTNおよびBLASTX (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403, 1990)、FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444, 1988)、FASTDB (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990)、Catalyst (Molecular Simulations Inc.)、Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.)、Cerius2.DBAccess (Molecular Simulations Inc.)、HypoGen (Molecular Simulations Inc.)、Insight II (Molecular Simulations Inc.)、Discover (Molecular Simulations Inc.)、CHARMM (Molecular Simulations Inc.)、Felix (Molecular Simulations Inc.)、DelPhi (Molecular Simulations Inc.)、QuanteMN (Molecular Simulations Inc.)、Homology (Molecular Simulations Inc.)、Modeler (Molecular Simulations Inc.)、ISIS (Molecular Simulations Inc.)、Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.)、WebLab (Molecular Simulations Inc.)、WebLab Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.)、Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.)、SeqFold (Molecular Simulations Inc.)、MDL Available Chemicals Directoryデータベース、MDL Drug Data Reportデータベース、Comprehensive Medical Chemistryデータベース、Derwent's World Drug Indexデータベース、BioByteMasterFileデータベース、Genbankデータベース。本発明の開示により他の多くのプログラムおよびデータベースも当業者には明白であろう。

上記のプログラムを用いて検出することができるモチーフには、ロイシンジッパー、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ、グリコシル化部位、ユビキチン化部位、アルファヘリックス、ベータシート、コードされたタンパク質の分泌を誘導するシグナルペプチドをコードするシグナル配列、転写調節に関与する配列(例えばホメオボックス)、酸性ストレッチ、酵素活性部位、基質結合部位および酵素切断部位その他をコードする配列が含まれる。

【0068】

核酸のハイブリダイゼーション

本発明は、本発明の例示的な配列又は本発明のポリペプチドをコードする核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離または組換え核酸を提供する。前記ストリンジェントな条件は、高度にストリンジェントな条件、中等度にストリンジェントな条件、低度にストリンジェントな条件であり、本明細書に記載されている高ストリンジェンシー条件および低ストリンジェンシー条件を含む。ある特徴では、下記に考察されるように、ある核酸が本発明の範囲内のものであるか否かを決定する条件を示すのは洗浄条件のス

トリンジェンシーである。

また別の実施態様では、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される本発明の核酸は、本発明の核酸の約5残基から完全長の間であろう。例えばそれらは、長さが少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれ以上の残基であり得る。完全長より短い核酸もまた含まれる。これらの核酸は、例えばハイブリダイゼーションプローブ、標識プローブ、PCRオリゴヌクレオチドプローブ、iRNA、アンチセンス、または抗体結合ペプチド（エピトープ）、モチーフ、活性部位などをコードする配列として有用である。

ある特徴では、本発明の核酸は、約37℃から42℃で約50%のホルムアミドの条件を含む高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。ある特徴では、本発明の核酸は、約30℃から35℃で約35%から25%のホルムアミドの条件を含む低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。

【0069】

あるいは、本発明の核酸は、42℃の約50%ホルムアミド、5XのSSPE、0.3% SDSおよび反復配列ブロック核酸（例えばcot-1またはサケ精子DNA（例えば200n/mLのせん断変性サケ精子DNA））の条件を含む高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。ある特徴では、本発明の核酸は、35℃の低温で約35%のホルムアミドを含む低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。

ハイブリダイゼーションの後、フィルターは6XのSSC、0.5% SDSにより50℃で洗浄することができる。前記の条件は、25%を超えるホルムアミドで“中等度”の条件、25%より低いホルムアミドで“低度”の条件と考えられる。“中等度にストリンジェントな”ハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、上記のハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施されるときである。“低度にストリンジェントな”ハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、上記のハイブリダイゼーションが10%のホルムアミドで実施されるときである。

ストリンジェンシーの個々のレベルに対応する温度範囲は関心のある核酸のプリン対ピリミジンの比を計算し、したがって温度を調節することによってさらに狭めることができる。本発明の核酸はまた文献（AusubelおよびSambrook）に示される高度、中等度および低度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするその能力によっても定義される。上記の範囲および条件のヴァリエーションは当業界で周知である。ハイブリダイゼーション条件は下記でさらに考察される。

【0070】

上記の方法は、プローブ配列に対して相同性が低い核酸を同定するために改変することができる。例えば、検出可能なプローブに対して相同性が低い核酸を得るために、ストリンジェンシーが低い条件を用いることができる。例えば、約1MのNa⁺濃度を有する緩衝液中でハイブリダイゼーション温度を68℃から42℃まで5℃ずつ下げることができる。ハイブリダイゼーション後に、フィルターをハイブリダイゼーション温度で2XのSSC、0.5% SDSで洗浄することができる。前記の条件は、50℃より上で“中等度”の条件、50℃未満で“低度”の条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが55℃で実施される場合である。“低ストリンジェンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが45℃で実施される場合である。

あるいは、ハイブリダイゼーションはホルムアミドを含む緩衝液（例えば6XのSSC）で42℃の温度で実施することができる。この事例では、ハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミドの濃度は50%から0%まで5%ずつ減少させて、プローブとの相同性が低いクローンを同定することができる。ハイブリダイゼーション後に、フィルターを6XのSSC、0.5% SDSで50℃で洗浄することができる。前記の条件は、25%より上のホルムアミドで“中

等度”の条件、25%未満のホルムアミドで“低度”の条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施される場合である。“低ストリンジエンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが10%のホルムアミドで実施される場合である。

しかしながら、ハイブリダイゼーションの様式の選択は決定的なものではなく、ある核酸が本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する条件を示すのは洗浄条件のストリンジエンシーである。本発明に包含される核酸を同定するために用いられる洗浄条件には例えば以下が含まれる：約0.02Mの塩濃度でpH7、少なくとも約50℃または約55℃から約60℃；または約0.15Mの塩濃度のNaClで72℃で約15分；または約0.2XのSSCの塩濃度で少なくとも約50℃または約55℃から約60℃の温度で約15から20分；またはハイブリダイゼーション複合体が、0.1%のSDSを含む約2XのSSCの塩濃度を有する溶液で室温で15分2回室温で洗浄し、続いて0.1%のSDSを含む約0.1XのSSCで68℃で15分2回室温で洗浄する；または前記と同等な条件。SSC緩衝液および同等な条件に関してはSambrook, TijssenおよびAusubelの著書を参照されたい。

これらの方法は本発明の核酸の単離に用いることができる。

【0071】

オリゴヌクレオチドプローブおよびその使用方法

本発明はまた、例えばグルコシダーゼ活性をもつポリペプチドをコードする核酸もしくはそのフラグメントを同定するか、またはグルコシダーゼ遺伝子を同定するために用いることができる核酸プローブを提供する。ある特徴では、前記プローブは、本発明の核酸の少なくとも10の連続する塩基を含む。あるいは、本発明のプローブは、本発明の核酸で示される配列の少なくとも約5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150または約10から50、約20から60、約30から70の連続する塩基であり得る。前記プローブは、結合および／またはハイブリダイゼーションによって核酸を同定する。前記プローブは、例えばキャピラリーアレイを含む本発明のアレイ（下記の考察を参照されたい）で用いることができる。本発明のプローブはまた他の核酸またはポリペプチドの単離に用いることができる。

本発明のプローブを用いて、生物学的サンプル（例えば土壌サンプル）が、本発明の核酸を有する生物または前記核酸が得られた生物を含むか否かを決定することができる。そのような方法では、前記核酸が単離された生物を潜在的に保有する生物学的サンプルを入手し、前記サンプルから核酸を得る。前記プローブがサンプル中に存在する相補的配列のいずれかと特異的にハイブリダイズすることができる条件下で、前記核酸を前記プローブと接触させる。必要な場合には、相補性配列を含まないコントロール配列とともに相補性配列を含むことが判明しているサンプルの相補性配列と前記プローブを接触させることによって、前記プローブが特異的にハイブリダイズすることができる条件を決定することができる。ハイブリダイゼーション条件（例えばハイブリダイゼーション緩衝液の塩濃度、ハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミド濃度またはハイブリダイゼーションの温度）を変化させて、前記プローブが相補性核酸と特異的にハイブリダイズすることができる条件を同定することができる（個々のハイブリダイゼーション条件に関しては考察を参照されたい）。

【0072】

前記核酸が単離された生物をサンプルが含む場合、プローブの特異的なハイブリダイゼーションが検出される。ハイブリダイゼーションは、プローブを検出可能な薬剤（例えば放射性同位元素、蛍光染料、または検出可能な生成物の形成を触媒することができる酵素）で標識することによって検出できる。標識プローブを用いてサンプル中の相補性核酸の存在を検出する多くの方法が当業者にはよく知られている。前記方法にはサザンブロット、ノーザンブロット、コロニーハイブリダイゼーション法およびドットブロットが含まれる。前記方法の各々の手順は文献（AusubelおよびSambrook）に示されている。

あるいは、2つ以上のプローブ（そのうちの少なくとも1つは核酸サンプルに存在する任

10

20

30

40

50

意の相補性配列と特異的にハイブリダイズすることができる)を増幅反応で用いて、サンプルが本発明の核酸配列を含む生物(例えば前記核酸が単離された生物)を含むか否かを決定することができる。ある特徴では、前記プローブはオリゴヌクレオチドを含む。ある特徴では、前記増幅反応はPCR反応を含むことができる。PCRプロトコルは文献(AusubelおよびSambrook)に記載されている(増幅反応に関しては考察を参照されたい)。そのような方法では、サンプル中の核酸をプローブと接触させ、増幅反応を実施し、さらに生成された増幅生成物のいずれかを検出する。増幅生成物は、反応生成物のゲル電気泳動を実施し、前記ゲルをインターカレーション試薬(例えば臭化エチジウム)で染色することによって検出することができる。あるいは1つまたは2つ以上のプローブを放射性同位元素で標識し、ゲル電気泳動の後で放射性増幅生成物の存在を検出してもよい。

10

【0073】

本発明の核酸配列の3'または5'末端近くの配列に由来するプローブもまた染色体ウォーキング法で用いて、さらに別の、例えばゲノム配列を含むクローンを同定することができる。そのような方法は、関心のあるさらに別のタンパク質をコードする遺伝子の宿主生物からの単離を可能にする。

ある特徴では、本発明の核酸配列をプローブとして用いて関連核酸が同定および単離される。いくつかの特徴では、そのようにして同定された関連核酸は、本発明の核酸が最初に単離された生物以外の生物に由来するcDNAまたはゲノムDNAであろう。そのような方法では、核酸サンプルを、プローブが特異的に関連配列とハイブリダイズすることができる条件下で前記プローブと接触させる。続いて、関連生物に由来する核酸とプローブのハイブリダイゼーションが上記に記載した方法のいずれかをを用いて検出される。

20

核酸ハイブリダイゼーション反応では、特定のストリンジェンシーレベルを達成するために用いられる条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質にしたがって変動するであろう。例えば、核酸のハイブリダイズ領域の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成(例えばGC対AT含有量)および核酸タイプ(例えばRNA対DNA)は、ハイブリダイゼーション条件の選択に考慮することができる。さらに考慮されることは、核酸の1つが例えばフィルターに固定されているか否かである。ハイブリダイゼーションは、低ストリンジェンシー、中等度ストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシーの条件下で実施することができる。核酸のハイブリダイゼーションの例として、固定変性核酸を含むポリマーメンブレンを最初に45°Cで30分、以下からなる溶液(0.9MのNaCl、50mMのNaH₂PO₄(pH7.0)、5.0mMのNa₂EDTA、0.5% SDS、10Xのデンハルト溶液および0.5mg/mLのポリリボアデニル酸)中でプレハイブリダイズさせる。約2X10⁷cpm(比活性4-9X10⁸cpm/μg)の³²P末端標識オリゴヌクレオチドプローブを続いて溶液に添加する。12-16時間インキュベーションした後で、前記メンブレンを0.5%のSDSを含む1XのSET(150mMのNaCl、20mMトリス塩酸塩(pH7.8)、1mMのNa₂EDTA)中で30分室温(RT)で洗浄し、続いて新しい1XのSET中で30分、オリゴヌクレオチドプローブのためのT_m-10°Cで洗浄する。続いて、ハイブリダイゼーションシグナルを検出するためにメンブレンでオートラジオグラフィフィルムを感光させる。

30

【0074】

核酸、例えばcDNAまたはゲノムDNA(検出プローブとハイブリダイズする)の同定に用いられるハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変動させることによって、プローブと相同性レベルが異なる核酸を同定し、これを単離することができる。ストリンジェンシーは、プローブの融解温度より低い種々の温度でハイブリダイゼーションを実施することによって変動させることができる。融解温度(T_m)は、(所定のイオン強度およびpHの下で)標的配列の50%が完全に相補性のプローブとハイブリダイズする温度である。非常にストリンジェントな条件は、個々のプローブのT_mに等しいかまたはそれより約5°C低くなるように選択される。プローブの融解温度は以下の等式を用いて計算できる。長さが14から70ヌクレオチドのプローブの場合、融解温度(T_m)は下記式を用いて計算される： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log[Na^+]) + 0.41 (G+C \text{ の割合}) - (600/N)$ 、式中Nはプローブの長さである。ハイブリダイゼーションがホルムアミド含有溶液中で実施される場合、融解温度は以下の等式を用いて計算できる： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log[Na^+]) + 0.41 (G+C \text{ の割合})$

40

50

）－（0.63%ホルムアミド）－（600/N）、式中Nはプローブの長さである。プレハイブリダイゼーションは、6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5% SDS、100 μ gの変性フラグメント化サケ精子DNA、または6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5% SDS、100 μ gの変性フラグメント化サケ精子DNA、50%ホルムアミド中で実施することができる。SSCおよびデンハルト試薬ならびに他の溶液のための組成は例えば上掲書（Sambrook）に挙げられている。

【0075】

ハイブリダイゼーションは、検出プローブを上記に挙げたプレハイブリダイゼーション溶液に添加することによって実施される。プローブが二本鎖DNAを含む場合、ハイブリダイゼーション溶液に添加する前にそれを変性させる。前記プローブが、それと相補的または相同な配列を含むcDNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズできるように十分な時間前記ハイブリダイゼーション溶液とフィルターを接触させる。長さが200ヌクレオチドを超えるプローブの場合、ハイブリダイゼーションは T_m より15–25℃下で実施できる。より短いプローブの場合（例えばオリゴヌクレオチドプローブ）、ハイブリダイゼーションは T_m より5–10℃下で実施できる。ある特徴では、6XのSSC中でのハイブリダイゼーションが約68℃で実施される。ある特徴では、50%ホルムアミド含有溶液中でハイブリダイゼーションが約42℃で実施される。前述のハイブリダイゼーションの全ては高ストリンジェンシー条件下であると考えられよう。

ハイブリダイゼーションの後で、フィルターを洗浄して非特異的に結合した一切の検出プローブを除去する。フィルターの洗浄に用いられるストリンジェンシーは、ハイブリダイズされる核酸の性質、ハイブリダイズされる核酸の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えばGC対AT含量）および核酸のタイプ（例えばRNAであるかDNAであるか）にしたがって変動し得る。だんだんと高くなるストリンジェンシー洗浄条件の例は以下のとおりである：2XのSSC、0.1% SDS、室温で15分（低ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5% SDS、室温で30分（中等度ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5% SDS、ハイブリダイゼーションの温度から68℃の間で15から30分（高ストリンジェンシー）；0.15MのNaCl、72℃で15分（非常に高いストリンジェンシー）。最後の低ストリンジェンシー洗浄は、0.1XのSSCで室温で実施することができる。上記の例は、フィルター洗浄に用いることができる条件セットの単なる例示である。当業者には種々のストリンジェンシーのために多くの洗浄レシピが存在することは理解されよう。

【0076】

プローブにハイブリダイズした核酸はオートラジオグラフィーまたは他の一般的な技術によって同定できる。上記の方法は、プローブ配列と相同性レベルが低い核酸を同定するために改変することができる。例えば、検出プローブと相同性が低い核酸を得るためには、より低いストリンジェンシー条件を用いることができる。例えばハイブリダイゼーション温度は、 Na^+ 濃度が約1Mのハイブリダイゼーション緩衝液で68℃から42℃まで5℃ずつ下げることができる。ハイブリダイゼーションの後で、フィルターはハイブリダイゼーション温度で2XのSSC、0.5% SDSで洗浄することができる。これらの条件は、50℃より上で“中等度”の条件、50℃より下で“低ストリンジェンシー”条件と考えられる。“中等度”ハイブリダイゼーション条件の例は、上記ハイブリダイゼーションが55℃で実施されるときである。“低ストリンジェンシー”ハイブリダイゼーション条件の例は、上記のハイブリダイゼーションが45℃で実施されるときである。

あるいは、ハイブリダイゼーションは、緩衝液（例えばホルムアミド含有6XのSSC）中で42℃の温度で実施できる。この事例では、ハイブリダイゼーション緩衝液中のホルムアミドの濃度は、プローブと相同性レベルの低いクローンを同定するために50%から0%まで5%ずつ減少させることができる。ハイブリダイゼーションの後で、フィルターを6XのSSC、0.5%のSDSで50℃にて洗浄することができる。これらの条件は、25%より高いホルムアミドで“中等度”の条件、25%より低いホルムアミドで“低”ストリンジェンシー条件と考えられる。“中等度”ハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施されるときである。“低ストリンジェンシー”ハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーション

が10%のホルムアミドで実施されるときである。

【0077】

本発明のこれらプローブおよび方法を用いて、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000またはそれより多くの連続する塩基を含む本発明の核酸配列と少なくとも約99%、98%、97%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、又は少なくとも50%の相同性を有する配列、及び前記と相補的な配列をもつ核酸を単離することができる。相同性は、本明細書で考察したようなアラインメントアルゴリズムを用いて測定できる。例えば、相同なポリヌクレオチドは、本明細書に記載されたコード配列の1つの天然に存在する対立遺伝子座変種のコード配列を有するであろう。そのような対立遺伝子座変種は、本発明の核酸と比較したとき1つまたは2つ以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有するであろう。

さらにまた、本発明のプローブおよび方法を用いて、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸を含む本発明のポリペプチドと、配列アラインメントアルゴリズムを用いて決定したとき、少なくとも約99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、又は少なくとも50%の配列同一性（相同性）を有するポリペプチドをコードする核酸を単離することができる（前記配列アラインメントアルゴリズムは、例えばFASTAバージョン3.0t78アルゴリズム（規定値を用いる）またはBLAST2.2.2プログラム（本明細書に示される例示的な設定を用いる）である）。

【0078】

グルコシダーゼの発現阻害

本発明は、本発明の核酸と相補的な核酸（例えばアンチセンス配列）を提供する。アンチセンス配列は、グルコシダーゼコード遺伝子の輸送、スプライシングまたは転写を阻害することができる。前記阻害は、ゲノムDNAまたはメッセンジャーRNAを標的とすることにより達成することができる。標的とされた核酸の転写または機能は、例えばハイブリダイゼーションおよび／または切断によって阻害することができる。本発明によって提供される特に有用な阻害物質セットには、グルコシダーゼ遺伝子またはメッセンジャーに結合する（いずれの事例でもグルコシダーゼの生成もしくは機能を防止または抑制する）ことができるオリゴヌクレオチドが含まれる。前記の結合は配列特異的ハイブリダイゼーションによるであろう。別の有用な阻害物質の種類にはグルコシダーゼメッセージの不活化または切断をもたらすオリゴヌクレオチドが含まれる。前記オリゴヌクレオチドはそのような切断を惹起する酵素活性を有することができる（例えばリボザイム）。オリゴヌクレオチドは化学的に改変するか、または相補性核酸を切断することができる酵素もしくは組成物と結合させることができる。種々の前記のようなオリゴヌクレオチドの多数を含むプールを所望の活性を有するものについてスクリーニングすることができる。

グルコシダーゼ発現阻害は多様な工業的用途を有し得る。例えば、グルコシダーゼ発現の阻害は腐敗を抑制又は防止することができる。腐敗は、多糖類、脂質又はポリペプチド（例えば構造的な多糖類）が酵素によって分解されるときに発生する。これは果実又は野菜の変質又は腐敗をもたらす。ある特徴では、グルコシダーゼの発現及び／又は活性を阻害する本発明の組成物（例えば抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム及びRNAi）を使用して腐敗が抑制又は防止される。したがって、ある特徴では、本発明は、腐敗の抑制又は防止のため又は別の目的のために、植物又は植物製品（例えば果実、種子、根、葉など）に本発明の抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム及びRNAiを適用することを含む方法及び組成物を提供する。これらの組成物はまた、植物（例えばトランスジェニック植物）又は別の生物（例えば本発明のグルコシダーゼ遺伝子で形質転換された細菌又は他の微生物）によって発現させることもできる。

【0079】

アンチセンスオリゴヌクレオチド：本発明は、グルコシダーゼメッセージと結合することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する方法は学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬を用いてそのようなグルコシダーゼオリゴヌクレオチドを設計することができる。例えば、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングするためのジーンウォーキング／RNAマッピングプロトコルは当業界で周知である。例えば以下を参照されたい：Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183。この文献はRNAマッピングアッセイを記載し、前記アッセイは標準的な分子技術を基にし、強力なアンチセンス配列選別のための簡単に信頼できる方法を提供する。さらにまた以下を参照されたい：Smith (2000) *Eur. J. Phar. Sci.* 11:191-198。

10

天然に存在する核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いられる。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の長さであり得る。例えば、また別の特徴では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは約5から100、約10から80、約15から60、約18から40である。最適な長さは日常的なスクリーニングによって決定できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の濃度で存在してよい。最適濃度は日常的なスクリーニングによって決定できる。この潜在的課題に用いることができる広範囲の合成された天然に存在しないヌクレオチドおよび核酸類似体が知られている。例えば、非イオン性骨格（例えばN-(2-アミノエチル)グリシンユニット）を含むペプチド核酸（PNA）を用いることができる。ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた用いることができる（それらは以下に記載されている：W097/03211；W096/39154；Mata (1997) *Toxicol. App. Pharmacol.* 144:189-197；*Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996)）。本発明によって提供される合成DNA骨格類似体をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドにはまた、上記で述べたようにホスホロ-ジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-N-カルバメートおよびモルホリノカルバメート核酸が含まれる。

20

コンビナトリアル化学的方法を用いて膨大な数のオリゴヌクレオチドを生成することができる。前記オリゴヌクレオチドは、任意の標的（例えば本発明のセンスおよびアンチセンスグルコシダーゼ配列）に対し適切な結合親和性および特異性を有する特定のオリゴヌクレオチドについて迅速にスクリーニングすることができる（例えば以下を参照されたい：Gold (1995) *J. Biol. Chem.* 270:13581-13584）。

30

【0080】

阻害性リボザイム：本発明は、グルコシダーゼメッセージと結合することができるリボザイムを提供する。これらのリボザイムは、例えばmRNAを標的にすることによりグルコシダーゼ活性を阻害することができる。リボザイムを設計し、ターゲティングのためにグルコシダーゼ特異的アンチセンス配列を選別する方法は学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬を用いてそのようなリボザイムを設計することができる。リボザイムは、標的RNAを切断するRNAの酵素部分に接近して保持されているリボザイムの標的RNA結合部分を介して標的RNAと結合することによって機能する。したがって、リボザイムは、相補性塩基対形成により標的RNAを認識し、これと結合する。正確な部位にいったん結合したら、リボザイムは酵素として機能し標的RNAを切断し、これを不活化する。切断がコード配列内で発生すれば、そのような態様での標的RNAの切断は、コードされるタンパク質の合成を指令するその能力を破壊するであろう。リボザイムがそのRNA標的と結合し、これを切断した後、リボザイムは前記RNAから遊離し、新たな標的と繰り返し結合および切断することができる。

40

いくつかの環境下では、リボザイムの酵素的性質は他の技術、例えばアンチセンス技術（アンチセンス技術では、核酸分子は核酸標的に単に結合してその転写、翻訳または別の分子との結合を妨げるだけである）に比べて有利であろう。なぜならば、治療達成に必要なリボザイムの有効濃度はアンチセンスオリゴヌクレオチドのそれよりも低いからである。この潜在的な利点はリボザイムの酵素として機能する能力の結果である。したがって、ただ1つのリボザイム分子が多くの標的RNA分子を切断することができる。さらにまた、リ

50

ボザイムは典型的には特異性が高い阻害剤であり、阻害の特異性は塩基対形成による結合メカニズムだけでなく、リボザイムが結合するRNAの発現を前記リボザイム分子が阻害するメカニズムにも依存している。すなわち、阻害はRNA標的の切断によって生じ、したがって特異性は非標的RNAの切断速度に対する標的RNAの切断速度の比と定義される。この切断メカニズムは塩基対形成に關与する要因に加えて更に種々の要因に依存する。したがって、リボザイム作用の特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド結合の特異性よりも高いであろう。

【0081】

本発明のリボザイム、例えば酵素リボザイムRNA分子は、ハンマーヘッドモチーフ、ヘアピンモチーフ、肝炎デルタウイルスモチーフ、グループIイントロンモチーフおよび／またはRNAガイド配列と結合したRNaseP様RNAモチーフとして生成することができる。ハンマーヘッドモチーフの例はRossi (Aids Research and Human Retroviruses 8:183 (1992)) によって、ヘアピンモチーフの例はHampel (Biochemistry 28:4929 (1989)およびNuc. Acids Res. 18:299 (1992)) によって、肝炎デルタウイルスモチーフの例はPerrotta (Biochemistry 31:16 (1992)) によって、RNasePモチーフの例はGuerrier-Takada (Cell 35:849 (1983)) によって、さらにグループIイントロンの例はCech (US Pat. No. 4,987,071) によって記載されている。前記の特定のモチーフの記載はそれらに限定することを意図したものではない。当業者は、本発明のリボザイム、たとえば酵素RNA分子は、標的遺伝子のRNA領域の1つまたは2つ以上と相補的な固有の基質結合部位を有することができることを理解していよう。本発明のリボザイムは、基質結合部位内またはその周辺に前記リボザイム分子にRNA切断活性を付与するヌクレオチド配列を有するであろう。

【0082】

RNA干渉 (RNAi) : ある特徴では本発明は、本発明のグルコシダーゼ配列を含むRNA阻害分子、いわゆる“RNAi”分子を提供する。RNAi分子は二本鎖RNA (dsRNA) 分子を含む。RNAiはグルコシダーゼ遺伝子の発現を阻害することができる。ある特徴では、RNAiは、長さが約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25またはそれ以上の二重鎖ヌクレオチドである。本発明はいずれの特定の作用メカニズムにも限定されないが、RNAiは細胞内に入り、類似または同一の配列を有する一本鎖RNA (ssRNA) (内因性mRNAを含む) の分解を引き起こす。細胞が二本鎖RNA (dsRNA) に暴露されるとき、相同な遺伝子に由来するmRNAは、RNA干渉 (RNAi) と称される過程によって選択的に分解される。RNAiの背後にある可能な基本的メカニズムは、特定の遺伝子配列と一致する二本鎖RNA (dsRNA) の短い破片 (短小干渉性RNAと称される) への分解である。前記短小干渉性RNAは、その配列と一致するmRNAの分解の引き金となる。ある特徴では、本発明の前記RNAiは遺伝子サイレンシング療法で用いられる (例えば以下を参照されたい: Shuey (2002) Drug Discov. Today 7:1040-1046)。ある特徴では、本発明は、本発明のRNAiを用いて選択的にRNAを分解する方法を提供する。前記方法はin vitro、ex vivoまたはin vivoで実施することができる。ある特徴では、本発明のRNAi分子を用いて細胞、器官または動物の機能低下変異を作出することができる。選択的にRNAを分解するためにRNAi分子を製造および使用する方法は当業界では周知である。例えば以下を参照されたい: 米国特許第6,506,559号、第6,511,824号、第6,515,109号および第6,489,127号。

【0083】

核酸の改変

本発明は、本発明の核酸 (例えばグルコシダーゼをコードする核酸) の変種を生成する方法を提供する。本方法は鋳型核酸によってコードされたアミラーゼのそれとは変異したもしくは異なる活性または変異したもしくは異なる安定性をもつアミラーゼ酵素を生成するために反復または多様な組合せでを使用することができる。本方法はまた、例えば遺伝子／メッセージ発現、メッセージ翻訳またはメッセージ安定性における変種を生成するために反復または多様な組合せで用いることができる。別の特徴では、細胞の遺伝的構成は、例えば相同遺伝子のex vivo改変とそれに続く前記遺伝子の細胞への再挿入により改変される。

本発明の核酸は任意の手段、例えばランダムもしくは確率的な方法、または非確率論的方法、または“定方向進化”方法によって改変できる（例えば米国特許6,361,974号を参照されたい）。遺伝子のランダム変異導入の方法は当業界で周知である（例えば以下を参照されたい：US Pat. No. 5,830,696）。例えば変異原を用いて遺伝子をランダムに変異させることができる。変異原には、例えば紫外線またはガンマ線照射、または化学的変異原、例えばマイトマイシン、亜硝酸、光活性化ソラレンが含まれ、単独または併用して組換えによって修復されやすいDNA破壊を誘導する。他の化学的変異原には、例えば、重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはギ酸が含まれる。その他の変異原は、ヌクレオチド前駆体の類似物質、例えばニトロソグアニジン、5-ブロモウラシル、2-アミノプリンまたはアクリジンである。これらの薬剤はPCR反応にヌクレオチド前駆体の代わりに添加され、それによって前記配列を変異させることができる。インターカレーション薬剤（例えばプロフラビン、アクリフラビン、キナクリンなど）もまた用いることができる。

【0084】

分子生物学の任意の技術、例えばランダムPCR変異導入（例えば以下を参照されたい：Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471）またはコンビナトリアルマルチカセット変異導入（combinatorial multiple cassette mutagenesis）（例えば以下を参照されたい：Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196）を用いることができる。あるいは、核酸（例えば遺伝子）をランダムにまたは“確率論的に”フラグメント化した後で再アッセムブリングすることもできる（例えば以下を参照されたい：米国特許第6,291,242号；同6,287,862号；同6,287,861号；同5,955,358号；同5,830,721号；同5,824,514号；同5,811,238号；同5,605,793号）。また別の特徴では、改変、付加または欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセムブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセムブリ、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセムブリ（SLR）、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNAによる変異導入、ウラシル含有鋳型による変異導入、ギャップ含有二重鎖による変異導入、ポイントミスマッチ修復による変異導入、修復欠損宿主株による変異導入、化学的変異導入、放射源による変異導入、欠失による変異導入、制限-選別変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマーの生成および／またはこれらの組合せ並びに他の方法によって導入される。

【0085】

以下の文献は、本発明の方法に取り入れることができる多様な反復組換え手順および／または方法を記載している：Stemmer (1999) "Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties", Tumor Targeting 4:1-4; Ness (1999) Nature Biotechnology 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling", Nature Biotechnology 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding", Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling", Nature Biotechnology 17:259-264; Cramer (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution", Nature 391:288-291; Cramer (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling", Nature Biotechnology 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines", Current Opinion in Biotechnology 8:724-733; Cramer et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling", Nature Medicine 2:100-103; Cramer et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using

DNA shuffling", *Nature Biotechnology* 14:315-319; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp.447-457; Cramer and Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" *Gene*, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" *Science* 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" *Nature* 370:389-391; および Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

【 0 0 8 6 】

多様性を生成する変異導入方法には例えば以下が含まれる：部位特異的変異導入 (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method" *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; および Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); ウラシル含有鋳型を用いる変異導入 (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; および Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); オリゴヌクレオチド誘導変異導入 (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; および Zoller & Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350); ホスホロチオエート改変DNA変異導入 (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; および Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); ギャップをもつ二重鎖DNAを用いる変異導入 (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12: 1007-1014).

ds Res. 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) Methods in Enzymol. "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" Nucl. Acids Res. 16: 7207; および Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999)。

【0087】

本発明を実施するために用いることができるさらに別の方法には以下が含まれる：点ミスマッチ修復(Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" Cell 38:879-887)、修復欠損宿主株を用いる変異導入(Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; and Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" Methods in Enzymol. 154: 382-403)、欠失変異導入(Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" Nucl. Acids Res. 14: 5115), restriction-selection and restriction-selection and restriction-purification (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423)、全遺伝子合成による変異導入(Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" Science 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) "Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" Gene 34:315-323; および Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316)、二本鎖開裂修復(Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" Current Opinion in Biotechnology 4:450-455. "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181)。上記の方法の多くに関する更なる詳細は "Enzymology" (Volume 154) で見出すことができる。この文献にはまた種々の変異導入方法に関する問題を解決するための有用な管理に関する記述がある。

【0088】

本発明の実施に用いることができる方法は例えば以下に記載されている：U.S. Pat. No. 5,605,793 (Stemmer, Feb. 25, 1997, "Methods for In Vitro Recombination") ; U.S. Pat. No. 5,811,238 (Stemmer et al., Sep. 22, 1998, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination") ; U.S. Pat. No. 5,830,721 (Stemmer et al., Nov. 3, 1998, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; U.S. Pat. No. 5,834,252 (Stemmer, et al., Nov. 10, 1998, "End-Complementary Polymerase Reaction") ; U.S. Pat. No. 5,837,458 (Minshull, et al., Nov. 17, 1998, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering") ; WO 95/22625 (Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; WO 96/33207 (Stemmer and Lipschutz, "End Complementary Polymerase Chain Reaction") ; WO 97/20078 (Stemmer and Cramer, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination") ; WO 97/35966 (Minshull and Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering") ; WO 99/41402 (Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors") ; WO 99/41383 (Punnonen et al. "Antigen Library Immunization") ; WO 99/41369 (Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering") ; WO 99/41368 (Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulat

ory Properties of Genetic Vaccines") ; EP 752008 (Stemmer and Cramer, "DNA Mutation by Random Fragmentation and Reassembly") ; EP 0932670 (Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination") ; WO 99/23107 (Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling") ; WO 99/21979 (Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors") ; WO 98/31837 (del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination") ; WO 98/27230 (Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering") ; WO 98/27230 (Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection") ; WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries" ; WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences" ; WO 98/42832 (Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers") ; WO 99/29902 (Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences") ; WO 98/41653 (Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library") ; WO 98/41622 (Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling") ; および WO 98/42727 (Pati and Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination")

【0089】

本発明の実施に用いることができる方法（種々の多様性を生成する方法に関する詳細を提供する）は例えば以下に記載されている：“SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES” (Patten et al., 1999年9月28日出願、U.S. Ser. No. 09/407,800) ; “EVOLUTION OF WHOLE CELL AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION” (del Cardayre et al., 米国特許6,379,964号) ; “OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION” (Cramer et al., 米国特許6,319,714号 ; 6,368,861号 ; 6,376,246号 ; 6,423,542号 ; 6,426,224号 および PCT/US00/01203 ; “USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING” (Welch et al., 米国特許6,436,675号) ; “METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS” (Selifonov et al., 2000年1月18日出願、PCT/US00/01202) および、例えば “METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS” (Selifonov et al., 2000年7月18日出願、U.S. Ser. No. 09/618,579) ; “METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS” (Selifonov and Stemmer, 2000年1月18日出願 PCT/US00/01138) ; および “SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION” (Affholter, 2000年9月6日出願、U.S. Ser. No. 09/656,549) ; および 米国特許6,177,263号 ; 同6,153,410号。

非確率論的、または“定方向進化”方法（例えば“飽和変異導入”（GSSM）、合成連結再アッセムブリ（SLR）または前記の組合せを含む）を用いて本発明の核酸を改変し、新規なまたは変異した特性（例えば強酸または強アルカリ条件下、高温または低温条件下などの活性）を有するグルコシダーゼが生成される。改変された核酸によってコードされるポリペプチドは、タンパク分解活性または他の活性について試験する前に活性についてスクリーニングすることができる。任意の試験様式またはプロトコルを、例えばキャピラリーアレイ台を利用して用いることができる。例えば米国特許第6,361,974号、同6,280,926号、同5,939,250号を参照されたい。

【0090】

飽和変異導入（またはGSSM（商標））：ある特徴では、ポリヌクレオチド（例えば本発明のグルコシダーゼまたは抗体）に点変異を導入し、子孫ポリペプチドの組を生成するために縮退N,N,G/T配列を含むコドンプライマーが使用される。前記子孫ポリペプチドの組では、例えば改変の標的となる酵素活性部位またはリガンド結合部位の各アミノ酸の位置で単一のアミノ酸置換の全てが出現する。これらのオリゴヌクレオチドは、連続する第一の相同配列、縮退N,N,G/T配列および場合によって第二の相同な配列を含むことができる。

そのようなオリゴヌクレオチドを使用することによって得られる下流の子孫翻訳生成物には、N,N,G/T配列の縮退は20の全てのアミノ酸のためのコドンを含むので前記ポリペプチドに沿って各アミノ酸の位置で可能な全てのアミノ酸変化が含まれる。ある特徴では、1つのそのような縮退オリゴヌクレオチド（例えば1つに縮退N,N,G/Tカセットを含む）が、親のポリヌクレオチド鋳型中の本来のコドンの各々を全範囲のコドン置換に付すために用いられる。また別の特徴では、親のポリヌクレオチド鋳型中の少なくとも2つの本来のコドン全範囲のコドン置換に付すために少なくとも2つの縮退カセットが（同じヌクレオチドまたは別個のヌクレオチドで）用いられる。例えば2つ以上のN,N,G/T配列を1つのオリゴヌクレオチド内に含ませ、2つ以上の部位でアミノ酸置換を導入することができる。この複数のN,N,G/T配列は連続していてもよいし、または1つもしくは2つ以上のさらに別のヌクレオチド配列によって分離されてあってもよい。別の特徴では、付加および欠失の導入に役立つオリゴヌクレオチドは単独またはN,N,G/T配列を含むコドンとともに用いて、アミノ酸付加、欠失および／または置換の任意の組合せまたは並べ換えが導入される。

10

【0091】

ある特徴では、2つまたは3つ以上の連続するアミノ酸位の同時変異は、連続するN,N,G/Tトリプレット（すなわち縮退（N,N,G/T）_n配列）を含むオリゴヌクレオチドを用いて実施される。別の特徴では、N,N,G/T配列よりも縮退度の小さい縮退カセットが用いられる。例えば、いくつかの事例では、ただ1つのN（Nは前記トリプレットの第一、第二または第三番目の位置に存在できる）を含む縮退トリプレット配列を（オリゴヌクレオチドで）用いることができる。任意の組合せおよび順列を含む他のいずれの塩基もトリプレットの残りの2つの位置において用いることができる。あるいはいくつかの事例で縮退N,N,N,トリプレット配列を（例えばオリゴヌクレオチドで）用いることができる。

20

ある特徴では、縮退トリプレット（例えばN,N,G/Tトリプレット）の使用によって、ポリペプチドのそれぞれ全てのアミノ酸の位置について天然アミノ酸の全範囲の（合計20アミノ酸）系統的で容易な生成が可能になる（別の特徴では、前記方法はまた、各アミノ酸残基、コドン、位置の可能な全ての置換よりも少ない置換の生成も含む）。例えば、100アミノ酸のポリペプチドの場合、2000個の別個の種（すなわち各位置につき20個の可能なアミノ酸X100個のアミノ酸位置）が生成される。縮退N,N,G/Tトリプレットを含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドセットを使用することによって、32個の個々の配列が20個の可能な天然のアミノ酸を全てコードすることができる。したがって、親のポリヌクレオチド配列が少なくとも1つの前記のようなオリゴヌクレオチドを用いて飽和変異導入に付される反応容器では、20個の別個のポリペプチドをコードする32個のそれぞれ別個の子孫ポリヌクレオチドが生成される。対照的に、部位特異的変異導入では非縮退オリゴヌクレオチドを使用したとき、各反応容器につきただ1つの子孫ポリペプチド生成物が生じるだけである。場合によって非縮退オリゴヌクレオチドを開示の縮退プライマーとともに用いることができる。例えば、非縮退オリゴヌクレオチドを用いて対象のポリヌクレオチドで特定の点変異を生成することができる。これは、特定のサイレント点変異、対応するアミノ酸変化をもたらす点変異、並びに終止コドンおよびポリペプチドフラグメントの対応する発現を生じさせる点変異を生成する1つの手段を提供する。

30

40

【0092】

ある特徴では、各飽和変異導入反応容器は、親のポリヌクレオチドで変異を導入されるコドンの位置に一致する特定の1つのアミノ酸位置において20個全ての天然アミノ酸が提示されるように、少なくとも20の子孫ポリペプチド（例えばグルコシダーゼ）分子をコードするポリヌクレオチドを含む（他の特徴では20個未満の天然の組合せが用いられる）。各飽和変異導入反応容器から生成される32倍の縮退子孫ポリペプチドをクローン増幅に付し（例えば適切な宿主（例えば大腸菌宿主）に例えば発現ベクターを用いてクローニングする）、さらに発現スクリーニングに付すことができる。スクリーニングにより好ましい特性の変化を提示させることによって個々の子孫ポリペプチドが同定されたとき（例えば親のポリペプチドと比較したときアルカリ性または酸性条件下でタンパク分解活性が増加

50

する)、前記子孫ポリペプチドを配列決定し、その中に含まれる対応する好ましいアミノ酸置換を同定することができる。

ある特徴では、本明細書に開示したように、親のポリペプチドのそれぞれ全てのアミノ酸位置を飽和変異導入を用いて変異を導入するとき、好ましいアミノ酸変化が2つ以上のアミノ酸位置において同定できることがある。これら好ましいアミノ酸置換の全てまたは一部分の組合せを含む1つまたは2つ以上の新規な子孫分子を生成することができる。例えば、2つの具体的な好ましいアミノ酸変化が、ポリペプチドの3つのアミノ酸位置の各々で同定されるならば、前記の変更は各位置および3つの位置で3つの可能性を含む(最初のアミノ酸から変化のないものおよび2つの好ましい変化をもつそれぞれのもの)。したがって、 $3 \times 3 \times 3$ 、または合計27の可能性が存在し、これらは以前に調べられた7つ-6つの単一点変異(すなわち3つの位置の各々で2つ)およびいずれの位置においても変化のないものを含む。

10

別の特徴では、位置飽和変異導入をまた別の確率的または非確率論的手段と一緒に用いて配列を変化させることができる。前記別的手段は、例えば合成連結再アッセムブリ(下記参照)、シャッフリング、キメラ化、組換えおよび他の変異導入方法および変異誘発剤である。本発明は任意の突然変異導入方法の使用を提供する。前記には反復態様で用いられる飽和変異導入が含まれる。

【0093】

合成連結再アッセムブリ(SLR)：本発明は、“合成連結再アッセムブリ”、または簡潔に“SLR”、“定方向進化プロセス”と称される、新規なまたは変異した特性を有するポリペプチド(例えば本発明のグルコシダーゼまたは抗体)を生成する非確率論的遺伝子改変系を提供する。SLRは、オリゴヌクレオチドフラグメントを非確率論的に一緒に連結する方法である。この方法は、核酸構築ブロックがランダムにシャッフル、連結、またはキメラ化されるのではなく、非確率論的にアッセムブリングされるという点で確率的オリゴヌクレオチドシャッフリングとは異なる。例えば以下を参照されたい：米国特許出願(US SN) 09/332,835 (“Synthetic Ligation Reassembly in Directed Evolution”) (1999年6月14日出願)。ある特徴では、SLRは以下の工程を含む：(a) 鋳型ポリヌクレオチドを提供する工程(前記鋳型ポリヌクレオチドは相同な遺伝子をコードする配列を含む)；(b) 複数の構築ブロックポリヌクレオチドを提供する工程(前記構築ブロックポリヌクレオチドは鋳型ポリヌクレオチドとあらかじめ定められた配列で交差再アッセムブリングを生じるように考案され、構築ブロックポリヌクレオチドは前記相同な遺伝子の変種である配列および前記変種配列とフランキングする前記鋳型ポリヌクレオチドと相同な配列を含む)；(c) 前記構築ブロックポリヌクレオチドが前記鋳型ポリヌクレオチドと交差再アッセムブリングして相同な遺伝子配列変種を含むポリヌクレオチドを生成できるように、構築ブロックポリヌクレオチドを鋳型ポリヌクレオチドと一緒にする工程。

20

30

SLRは、再配列を実施されるポリヌクレオチド間に高レベルの相同性が存在することを必要としない。したがって、本方法は、 10^{100} を超える種々のキメラを含む子孫分子のライブラリー(またはセット)を非確率論的に作製するために用いることができる。SLRを用いて 10^{100} を超える種々の子孫キメラを含むライブラリーの作製に用いることができる。したがって、本発明の特徴は、設計に従って選択された全体的なアッセムブリの順番にしたがって完成されたキメラ核酸分子セットを製造する非確率論的方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：互いに適合する連結可能な有用な末端を有する複数の特別な核酸構築ブロックを設計に従って作製する工程、および、設計した全体的なアッセムブリの順番が達成されるように前記核酸構築ブロックをアッセムブリングする工程。

40

【0094】

アッセムブリングされる互いに適合する核酸構築ブロックの末端は、これらが前記構築ブロックをあらかじめ定めた順序で結合させることができるならば、このタイプの指定されたアッセムブリに対して“利用可能”であると考えられる。したがって、前記核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセムブリの順番は、連結させることができる末端の設計によって特定される。2つ以上のアッセムブリ工程が用いられる場合、核酸構築ブロッ

50

クが結合される全体的アッセンブリの順番は、前記アッセンブリ工程の一連の順番によって特定される。ある特徴では、アニールされた構築片が酵素（例えばリガーゼ（例えばT4 DNAリガーゼ））で処理され、前記構築片の共有結合が達成される。

ある特徴では、オリゴヌクレオチド構築ブロックの設計は、祖先核酸配列鋳型セットを分析することによって得られる（祖先核酸配列は完成したキメラポリヌクレオチドの子孫セットを製造する基礎として機能する）。したがって、これら親のオリゴヌクレオチド鋳型は、変異（例えばシャッフリングまたはキメラ化）を導入しようとする核酸構築ブロックの設計に役立つ配列情報源として機能する。この方法のある特徴では、複数の親核酸鋳型の配列でアラインメントを実施して1つまたは2つ以上の境界点を選択される。前記境界点は相同領域に位置し、1つまたは2つ以上のヌクレオチドを含むことができる。これらの境界点は好ましくは少なくとも2つの祖先鋳型によって共有される。それによって前記境界点は、親ポリヌクレオチドの再編成のために作製されるオリゴヌクレオチド構築ブロックの境界線を引くために用いることができる。祖先分子中で同定され選別される境界点は、完成キメラ子孫分子のアッセンブリにおける潜在的キメラ形成点として機能する。境界点は、少なくとも2つの親ポリヌクレオチド配列によって共有される相同領域（少なくとも1つの相同なヌクレオチド塩基を含む）であり得る。あるいは、境界点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも半分によって共有される相同領域であるか、または親ポリヌクレオチド配列の少なくとも2/3によって共有される相同領域であり得る。さらに好ましくは、有用な境界点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも3/4によって共有される相同領域であるか、または境界点は親ポリヌクレオチド配列のほぼ全てによって共有され得る。ある特徴では、境界点は、親ポリヌクレオチド配列の全部によって共有される相同領域である。

ある特徴では、連結再アッセンブリ工程は、子孫キメラポリヌクレオチドの網羅的ライブラリーを作製するために網羅的に実施される。換言すれば、全ての可能な順番で組み合わされた核酸構築ブロックが、完成キメラ核酸分子セットに提示される。同時に、別の実施態様では、各組合せにおけるアッセンブリの順番（すなわち完成したキメラ核酸の各々の配列の5'から3'方向における各構築ブロックのアッセンブリの順番）は上記に記載したように意図的（または非確率論的）である。本発明の非確率論的な性質のために、望ましくない副生成物の可能性は極めて低くなる。

【0095】

別の特徴では、前記連結再アッセンブリ方法は系統的に実施される。例えば、前記方法は、系統的に区画化された子孫分子のライブラリーを作製するために実施され、前記区画化ライブラリーは、系統的に（例えば1つずつ）スクリーニングすることができる区画を有する。換言すれば、本発明は、連続工程によるアッセンブリ反応の選択的および慎重な使用と併せて特定の核酸構築ブロックを選択的および慎重に使用することによって、特定の子孫生成物セットがいくつかの反応容器の各々で生成される仕組みの達成を提供する。前記によって系統的な調査およびスクリーニング方法の実施が可能になる。したがって、これらの方法は、潜在的に膨大な数の子孫分子をより小さなグループで系統的に調査することを可能にする。特に祖先分子間で低レベルの相同性しか存在しないときに、高度に柔軟性を有し、しかも網羅的で系統的な態様でのキメラ化の実施を可能にするその能力のために、これらの方法は膨大な数の子孫分子を含むライブラリー（またはセット）の生成を提供する。本発明の連結再アッセンブリの非確率論的な性質のために、生成される子孫分子は好ましくは、設計に従って選択された全体的なアッセンブリの順番を有する完成されたキメラ核酸分子のライブラリーを含む。飽和変異導入および最適化された定方向進化方法もまた種々の子孫分子種の生成に用いることができる。本発明は、境界点、核酸構築ブロックのサイズおよび数並びに結合の設計の選択に関して選択と制御の自由を提供することは理解されよう。さらにまた、分子間相同性の要求は、本発明を実施し易くするために大きく緩和されることもまた理解されよう。実際、境界点はほとんどまたはまったく分子間相同性がない領域でも選択できる。例えば、コドンの揺らぎのために（すなわちコドンの縮退のために）、対応する祖先鋳型で本来コードされるアミノ酸を変更することなく

核酸中にヌクレオチド置換を導入することができる。あるいは、コドンを変更して本来のアミノ酸のコードを変更してもよい。本発明は、分子間相同性を有する境界点の出現傾向を高めるために、したがって構築ブロック間で達成される結合数を高めるために（生成される子孫キメラ分子数の増加を可能にする）、前記のような置換の核酸構築ブロックへの導入を提供する。

また別の特徴では、構築ブロックが作製される工程の合成的な性質によって、*in vitro* 方過程（例えば変異導入により）または *in vivo* 過程（例えば宿主生物の遺伝子スプライシング能を利用することにより）で場合によって後で除去することが可能なヌクレオチド（例えば1つまたは2つ以上のヌクレオチドで、例えばコドンまたはイントロンまたは調節配列であろう）を設計または導入することが可能になる。多くの事例で、利用可能な境界点を創出できるという潜在的な利点に加えて多くの他の理由からこれらヌクレオチドの導入はまた望ましいであろうということは理解されよう。

ある特徴では、核酸構築ブロックを用いてイントロンを導入することができる。したがって、機能的なイントロンが本明細書に記載された方法にしたがって製造された人工遺伝子に導入される。前記人工的に導入されたイントロンは、天然に存在するイントロンが遺伝子スプライシングで機能を発揮する態様とほぼ同じように遺伝子スプライシングのために宿主細胞で機能することができる。

【0096】

最適化定方向進化系：本発明は、新規なまたは変異した特性をもつポリペプチド、例えば本発明のグルコシダーゼまたは抗体を生成するために、“最適化定方向進化系”と称される非確率論的遺伝子改変系を提供する。最適化定方向進化は、組換えによる核酸の定方向分子進化を可能にする、還元的再組合せ（*reductive reassortment*）、組換えおよび選別の反復サイクルを用いることを意図する。最適化定方向進化は進化したキメラ配列の大集団の作出を可能にし、前記作出集団には予め定められた数の交差事象を含む配列がきわめて豊富に存在する。

交差事象は、一方の親の変種から別の親の変種へ配列のシフトが生じるキメラ配列内の点である。そのような点は通常は2つの親に由来するオリゴヌクレオチドが一緒に連結されて単一の配列を形成する結合部に存在する。本方法は、最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象を豊富に含むことができるようにオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にする。これによって、予め定められた数の交差事象を含むキメラ変種の選択に対してより大きな制御が提供される。

さらにまた、本方法は、他の系と比較して膨大な量の可能なタンパク質変種スペースの探索のための簡便な手段を提供する。以前には、反応中に例えば 10^{13} 個のキメラ分子が生成された場合、そのような膨大な数の変種の特定の活性についてテストすることは極めて困難であろう。さらにまた、子孫集団の顕著な部分が、特定の活性のレベルが増加している可能性が少ないタンパク質を生じる非常に大きな数の交差事象を含むであろう。この方法を用いることによって、キメラ分子集団は特定の数の交差事象を含む変種を豊富に含むことができる。したがって、反応中になお 10^{13} 個のキメラ分子が生成されても、更なる分析のために選別される分子の各々は、例えば3つの交差事象だけを含む可能性が高くなる。生成された子孫集団が予め定めた数の交差事象を持つように偏らせることができるので、キメラ分子間の機能的変種に対する境界線が減少する。これによって、最初の親のポリヌクレオチドに由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の属性に影響を及ぼすために必要かを計算するときにより操作しやすい数の変数が提供される。

【0097】

キメラ子孫ポリヌクレオチドを作製する1つの方法は、それぞれの親の配列のフラグメントまたは部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することである。各オリゴヌクレオチドは好ましくは固有の重複領域を含み、その結果、前記オリゴヌクレオチドと一緒に混合することによって、各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順番でアッセンブリングされた新規な変種が生成される。更なる情報は、例えばUSSN09/332,835；米国特許6,361,974号で見出すことができよう。

10

20

30

40

50

各親変種について生成されるオリゴヌクレオチドの数は、最終的に作製されるキメラ分子で生じる交差の総数と関係がある。例えば、3つの親のヌクレオチド配列変種が提供され、連結反応を経て高温でより高い活性をもつキメラ変種を見つけることができるであろう。1つの例として、50個のオリゴヌクレオチド配列を含むセットを各親変種のそれぞれの部分に対応して作製することができる。したがって、連結アッセムブリ工程の間に、キメラ配列の各々の中に50個までの交差事象が存在することができよう。生成されたキメラポリヌクレオチドの各々が交互に各親変種由来のオリゴヌクレオチドを含む確率は非常に低い。各オリゴヌクレオチドフラグメントが連結反応で同じモル濃度で存在するならば、いくつかの位置で同じ親に由来するオリゴヌクレオチドが互いに並んで連結され、したがって交差事象を生じない可能性がある。各親に由来する各オリゴヌクレオチドの濃度がこの例のいずれの連結工程でも一定に保たれるならば、同じ親変種に由来するオリゴヌクレオチドがキメラ配列内で連結され、交差を生じないチャンスは1/3（3つの親と仮定した）である。

【0098】

したがって、親変種セットの数、各変種に対応するオリゴヌクレオチドの数、および連結反応の各工程における各変種の濃度が与えられたならば、確率濃度関数（probability density function (PDF)）を決定して連結反応の各工程で生じる可能性がある交差事象をもつ集団を予測することができる。PDFの決定の根拠となる統計学および数学は以下に記載される。これらの方法を用いることによって、前記の確率濃度関数を決定することができ、したがって個々の連結反応から生じる予め定めた数の交差事象のためにキメラ子孫集団の濃度を高めることができる。さらにまた、交差事象の標的数は予め定めることができ、続いて、予め定めた交差事象数に集中する確率濃度関数をもたらし連結反応の各工程における各親オリゴヌクレオチドの発出量を算出するために前記系をプログラミングすることができる。これらの方法は、組換えによりポリペプチドをコードする核酸の定方向分子進化を可能にする還元的再組合せ、組換えおよび選別の反復サイクルを用いることを意図する。前記の系は進化したキメラ配列の大集団の作製を可能にし、前記作製された集団は、予め定めた数の交差事象を含む配列が顕著に濃縮されている。交差事象は、一方の親変種からもう一方の親変種へ配列のシフトが生じるキメラ配列中の点である。そのような点は通常は2つの親に由来するオリゴヌクレオチドが一緒に連結されて単一の配列を形成する結合部に存在する。前記方法は、最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象に富むことができるようにオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にする。これによって、予め定めた数の交差事象を含むキメラ変種の選択に対してより大きな制御が提供される。

さらにまた、これらの方法は、他の系と比較して膨大な量の可能なタンパク質変種空間の探索のための簡便な手段を提供する。本明細書に記載した方法を用いることによって、特定の数の交差事象を含む変種についてキメラ分子集団を濃縮することができる。したがって、反応中になお 10^{13} 個のキメラ分子が生成されても、更なる分析のために選別される分子の各々は、例えば3つの交差事象だけを含む可能性が高くなる。生成された子孫集団が予め定めた数の交差事象を持つように偏らせることができるので、キメラ分子間の機能的変種に対する境界線が減少する。これによって、最初の親のポリヌクレオチドに由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の属性に影響を及ぼすために必要かを計算するときにより操作しやすい数の変数が提供される。

ある特徴では、前記方法は、それぞれの親の配列のフラグメントまたは部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することによってキメラ子孫ポリヌクレオチド配列を生成する。各オリゴヌクレオチドを一緒に混合することによって各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順番でアッセムブリされた新規な変種が生じるように、各オリゴヌクレオチドは好ましくは固有のオーバーラップ領域を含む。USSN09/332,835をまた参照されたい。

【0099】

交差事象の決定：本発明の特徴は、所望の交差事象の確立濃度関数（PDF）、再アッセン

10

20

30

40

50

ブリングされる親遺伝子の数および再アッセムブリでのフラグメント数を入力としての受け取るシステムおよびソフトを含む。このプログラムの出力は、再アッセムブリングされた遺伝子を製造するためのレシピを決定するために用いることができる“フラグメントPDF”およびこれら遺伝子の見積もった交差PDFである。本明細書に記載されるプロセッシングは好ましくは、MATLAB（商標）（The Mathworks, Natick, Massachusetts）、プログラミング言語およびテクニカルコンピューティングのための発展環境で実施される。

【0100】

反復工程：本発明の実施に際して、これらの工程は何度も繰り返すことができる。例えば、変異したまたは新規なグルコシダーゼ表現型をもたらすある核酸（または所定の核酸）は同定、再単離、再改変され、さらに活性について再試験される。この工程は、所望の表現型が生成されるまで何度も繰り返すことができる。例えば、完全な生化学的同化作用または異化作用経路（例えばデンプン加水分解活性を含む）を細胞内に高度な操作により生成することができる。

同様に、特定のオリゴヌクレオチドが所望の属性（例えば新規なグルコシダーゼ表現型）について全く影響を与えないと決定されたならば、除去される配列を含むより大きな親オリゴヌクレオチドを合成することによって前記オリゴヌクレオチドは変数として除去することができる。配列をより大きな配列内に取り込むことによって一切の交差事象が防止されるので、子孫ポリヌクレオチド中にはこの配列の変型はもはや全く存在しないであろう。どのオリゴヌクレオチドが所望の属性と最も関係があり、どのオリゴヌクレオチドが無関係であるかを決定するこの反復実施は、特定の属性または活性を提供する可能性があるタンパク質の全てについてより効率的な探索を可能にする。

【0101】

in vivoシャッフリング：分子のin vivoシャッフリングは、本発明のポリペプチド（例えば抗体、グルコシダーゼなど）の変種を提供する本発明の方法で使用される。in vivoシャッフリングは、マルチマーを再結合させる細胞の天然の特性を利用して実施することができる。in vivo組換えは分子の多様性をもたらす主要な天然の経路を提供してきたが、一方遺伝子組み換えは以下を含む比較的複雑な過程のままである：1) 相同性の認識；2) 鎖の切断、鎖の侵襲、および組換え交差の生成をもたらす代謝工程；および最後に3) 別個の再結合分子へのキアズマの分離。キアズマの形成は相同配列の認識を必要とする。

ある特徴では、本発明は、少なくとも第一のポリヌクレオチド（本発明のグルコシダーゼ）および第二のポリヌクレオチド（例えば酵素、例えば本発明のグルコシダーゼ若しくは任意の他のグルコシダーゼ、又はタグ若しくはエピトープ）からハイブリッドポリヌクレオチドを製造する方法を提供する。本発明を用いてハイブリッドポリヌクレオチドを製造することができる。これは、部分的な配列相同性を少なくとも1つの領域で共有する少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび第二のポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入することによって達成される。部分的な配列相同性領域は、ハイブリッドポリヌクレオチドを生成する配列認識を生じる過程を促進する。本明細書で用いられる“ハイブリッドポリヌクレオチド”という用語は、本発明の方法によりもたらされ、少なくとも2つの原型ポリヌクレオチド配列由来の配列を含む任意のヌクレオチド配列である。そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、DNA分子間の配列統合を促進する分子間組換え事象により生じる。さらにまた、そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、連続工程の繰り返すによりDNA分子内のヌクレオチド配列を改変させる分子内還元的再組合せ法により生成することができる。

【0102】

配列変種の作製：本発明はまた、本発明の核酸（例えばグルコシダーゼ）配列の変種を作製する方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸およびポリペプチドを用いてグルコシダーゼを単離するさらに別の方法を提供する。ある特徴では、本発明は本発明のグルコシダーゼコード配列（例えば遺伝子、cDNAまたはメッセージ）の変種を提供する。前記変種は、任意の手段（例えばランダムもしくは確率的方法、または非確率論的もしくは上記に記載した“定方向進化”方法を含む）によって変異させることができる。

前記単離変種は天然に存在するものでもよい。変種はまたin vitroで生成することもできる。変種は遺伝子工学技術、例えば部位特異的変異導入、化学的ランダム変異導入、エキソヌクレアーゼIII欠失手順および標準的クローニング技術を用いて生成することができる。あるいは、そのような変種、フラグメント、類似体または誘導体は化学的合成または改変方法を用いて生成することができる。変種を作製する他の方法もまた当業者にはよく知られていよう。前記には、天然の単離物から得られた核酸配列を改変して、それらの工業的価値または実験室利用を高める特徴をもつポリペプチドをコードする核酸を生成する方法が含まれる。そのような方法では、天然の単離物から得られた配列に対して1つまたは2つ以上のヌクレオチドの相違を有する多数の変種配列が生成され、特徴が決定される。これらのヌクレオチド相違は、天然の単離物の核酸によってコードされるポリペプチドに対してアミノ酸変化をもたらすことができる。 10

【0103】

例えば、変種は変異性PCRを用いて作製することができる。変異性PCRでは、PCRは、DNAポリメラーゼの複写信頼性が低く、高率の点変異がPCR全長にわたって得られるような条件下で実施される。変異性PCRは例えば以下に記載されている：D.W. Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989); R.C. Caldwell & G.F. Joyce, PCR Methods Applic. 2:28-33 (1992)。簡単に記せば、前記の方法では、変異を導入される核酸は、PCRプライマー、反応緩衝液、MgCl₂、MnCl₂、Taqポリメラーゼおよび適切な濃度のdNTPと混合され、PCR生成物の全長にわたって高率の点変異が達成される。例えば、前記反応は、20fmoleの突然変異を導入されるべき核酸、30pmoleの各PCRプライマー、反応緩衝液（50mMのKCL、10mMのトリス（pH8.3）および0.01%のゼラチンを含む）、7mMのMgCl₂、0.5mMのMnCl₂、5単位のTaqポリメラーゼ、0.2mMのdGTP、0.2mMのdATP、1mMのdCTPおよび1mMのdTTPを用いて実施される。PCRでは、94°C1分、45°C1分および72°C1分の30サイクルが実施される。しかしながら、これらのパラメーターは適宜変動させることができることは理解されよう。変異核酸は適切なベクターでクローニングされ、前記変異核酸によってコードされたポリペプチドの活性が評価される。 20

変種はまた、任意のクローニングされた関心のあるDNAで位置特異的変異を生じるオリゴヌクレオチド特異的変異導入を用いて生成することができる。オリゴヌクレオチド変異導入は例えば以下に記載されている：Reidhaar-Olson (1988) Science 241:53-57。簡単に記せば、前記の方法では、クローン化DNAに導入されるべき1つまたは2つ以上の変異をもつ複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが合成され、変異を導入される前記クローン化DNAに挿入される。変異を導入されたDNAを含むクローンを回収し、それらがコードするポリペプチドの活性を評価する。 30

【0104】

変種を生成するまた別の方法はアッセンブリPCRである。アッセンブリPCRでは、小さなDNAフラグメント混合物からPCR生成物をアッセンブリングすることが必要である。多数の様々なPCR反応が同じバイアル中で生じ、1つの反応の生成物が別の反応の生成物をプライミングする。アッセンブリPCRは例えば米国特許第5,965,408号に記載されている。

変種を生成するまた別の方法はセクシュアルPCR変異導入である。セクシュアルPCR変異導入では、配列相同性によるDNA分子のランダムなフラグメント化とそれに続くPCR反応におけるプライマーの伸長による交差の固定の結果として、強制された相同組換えが、別個であるが相関性を有するDNA配列をもつDNA分子間でin vitroで生じる。セクシュアルPCR変異導入は例えば以下に記載されている：Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751。簡単に記せば、前記の方法では、組換えられるべき複数の核酸をDNaseで消化して平均サイズが50-200ヌクレオチドのフラグメントを生成する。所望の平均サイズをもつフラグメントを精製し、PCR混合物に再懸濁する。PCRは、前記核酸フラグメント間の組換えが促進される条件下で実施される。PCRは、例えば以下によって実施できる：前記精製フラグメントを10-30ng/μLの濃度で溶液（0.2Mの各dNTP、2.2mMのMgCl₂、50mMのKCl、10mMのトリス塩酸（pH9.0）および0.1%トリトンX-100）に再懸濁する。100μLの反応混合物につき2.5単位のTaqポリメラーゼを添加し、PCRを以下の方式を用いて実施 40 50

する：94℃60秒、94℃30秒、50－55℃30秒、72℃30秒（30－45回）および72℃で5分。しかしながら前記パラメーターは適宜変動させることができることは理解されよう。いくつかの特徴では、オリゴヌクレオチドをPCR反応に含ませることができる。他の特徴では、DNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントをPCR反応の最初のセットで用い、Taqポリメラーゼをその後のPCR反応セットで用いることができる。組換え配列を単離し、それらがコードするポリペプチドの活性を評価する。

【0105】

変種はまたin vivo変異導入によって生成することができる。いくつかの特徴では、細菌株（例えば大腸菌株）で関心のある配列を増殖させることによって、関心のある配列中でランダム変異が生成される。前記大腸菌株はDNA修復経路の1つまたは2つ以上に変異を含む。そのような“ミューテーター”株は野生型の親よりも高いランダム変異率を有する。これらの株の1つでDNAを増殖させることによって、最終的にはDNA内部にランダム変異が生成されるであろう。in vivo変異導入に使用するために適したミューテーター株は例えばPCT公開広報W091/16427に記載されている。

10

変種はまたカセット変異導入を用いて生成することができる。カセット変異導入では、二本鎖DNA分子の小さな領域が、天然の配列とは異なる合成オリゴヌクレオチド“カセット”で置き換えられる。前記オリゴヌクレオチドはしばしば完全におよび／または部分的に任意抽出された天然の配列を含む。

再帰的アンサンブル変異導入もまた変種の生成に用いることができる。再帰的アンサンブル変異導入は、表現型が関連性をもつ変異体の多様化集団（そのメンバーはアミノ酸配列が異なる）を生成するために開発されたタンパク質工学（タンパク質変異導入）のためのアルゴリズムである。前記方法はフィードバックメカニズムを用いて、コンビナトリアルカセット変異導入（combinatorial cassette mutagenesis）の連続一巡工程を制御する。再帰的アンサンブル変異導入は例えば以下に記載されている：Arkin (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815。

20

【0106】

いくつかの特徴では、変種はエクスポネンシャルアンサンブル変異導入を用いて生成される。エクスポネンシャルアンサンブル変異導入は、高い割合の固有で機能的な変異体を含む総当り組合せライブラリーを生成する方法である。前記変異導入では、残基の小グループが並行して任意抽出され、機能的タンパク質を生じるアミノ酸がそれぞれ変更された位置で同定される。エクスポネンシャルアンサンブル変異導入は例えば以下に記載されている：Delagrave (1993) Biotechnology Res. 11:1548-1552。ランダムな変異導入および部位特異的変異導入は例えば以下に記載されている：Arnold (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455。

30

いくつかの特徴では変種はシャッフリング手順によって生成される。前記では、別個のポリペプチドをコードする複数の核酸の部分が融合され、例えば米国特許第5,965,408号、同第5,939,250号に記載されたようなキメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列が生成される（上記の考察もまた参照されたい）。

本発明はまた本発明のポリペプチド（例えばグルコシダーゼ）の変種を提供する。前記変種では、（例えば本発明の例示的なポリペプチドの）1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（例えば保存アミノ酸残基）で置換されている配列を含み、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされるものでも、そうでないものでもよい。保存的置換は、ポリペプチド内のあるアミノ酸が同様な特徴を持つ別のアミノ酸によって置換されるものである。したがって、本発明のポリペプチドは本発明の配列（例えば本発明の例示的なポリペプチド）の保存的置換を有するポリペプチドを含む。前記置換は以下の置換を含む（ただしこれらに限定されない）：脂肪族アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）の別の脂肪族アミノ酸による置換；セリンのスレオニンによる置換またはその逆；酸性残基（例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸）の別の酸性残基による置換；アミド基をもつ残基（例えばアスパラギンおよびグルタミン）の別のアミド基をもつ残基による置換；塩基性残基（例えばリジンお

40

50

よびアルギニン)の別の塩基性残基による交換;および芳香族残基(例えばフェニルアラニン、チロシン)の別の芳香族残基による置換。他の変種は、本発明のポリペプチドの1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が置換基を含む変種である。

【0107】

本発明に包含される他の変種は、本発明のポリペプチドが別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させる化合物(例えばポリエチレングリコール)と結合しているものである。

本発明に包含されるさらに別の変種は、さらに別のアミノ酸が本発明のポリペプチドに融合されているものである。前記別のアミノ酸は例えばリーダー配列、分泌配列、プロテ

10

イン配列または前記ポリペプチドの精製、濃縮または安定化を促進する配列である。いくつかの特徴では、本発明のポリペプチドの変種、フラグメント、誘導体および類似体は、例示的なポリペプチドと同じ生物学的機能または活性、例えば本明細書に記載されたようなグルコシダーゼ活性を保持している。他の特徴では、変種、フラグメント、誘導体または類似体は、そのプロテイン部分の切断によって前記変種、フラグメント、誘導体または類似体が活性化されて活性なポリペプチド生成することができるようにプロ

【0108】

宿主細胞における高レベルのタンパク質発現を達成するためのコドンの最適化

本発明は、コドン使用頻度を改変するためにグルコシダーゼコード核酸を改変する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、グルコシダーゼをコードする核酸のコドンを改変して宿主におけるその発現を増加または減少させる方法を提供する。本発明はまた、宿主細胞におけるその発現を高めるために改変されたグルコシダーゼをコードする核酸、そのように改変されたグルコシダーゼおよび前記改変グルコシダーゼ酵素を製造する方法を提供する。前記方法は、“非優先”または“低優先”コドンをグルコシダーゼコード核酸中で同定し、さらにこれら非優先もしくは低優先コドンの1つまたは2つ以上を、前記コドンと同じアミノ酸をコードする“優先コドン”で置き換え、核酸内の少なくとも1つの非優先または低優先コドンが同じアミノ酸をコードする好ましいコドンによって置き換えられてあることを含む。優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度に提示されるコドンであり、非優先または低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度に提示されるコドンである。

20

30

本発明の核酸、発現カセットおよびベクターの発現のための宿主細胞には細菌、酵母、真菌、植物細胞および哺乳動物細胞が含まれる。したがって、本発明はこれら全ての細胞でコドン使用頻度を最適化する方法、コドン改変核酸およびコドン改変核酸によって生成されるポリペプチドを提供する。例示的な宿主細胞には、グラム陰性細菌(例えば大腸菌);グラム陽性細菌(例えば任意のストレプトミセス又はバチルス(例えば*B. cereus*)、ラクトバチルス・ガッセリ(*Lactobacillus gasseri*)、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・クレモリス(*Lactococcus cremoris*)、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)が含まれる。例示的な宿主細胞はまた真核生物、例えば種々の酵母、例えばサッカロミセス種(サッカロミセス・セレビシアエを含む)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)及びクルイベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、ハンセンラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、アスペルギルス・ニゲル、並びに哺乳動物細胞および細胞株、並びに昆虫細胞および細胞株を含む。したがって、本発明はまた前記生物および種での発現のために最適化された核酸およびポリペプチドを含む。

40

【0109】

例えば、細菌細胞から単離されたグルコシダーゼをコードする核酸のコドンは、前記グルコシダーゼが由来した細菌とは異なる細菌細胞、酵母、真菌、植物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞で前記核酸が最適に発現できるように改変される。コドンを最適化する方法は当業界において周知で、例えば以下を参照されたい:US Pat. No. 5,795,737; Baca (2000) Int. J. Parasitol. 30:113-118; Hale (1998) Protein Expr. Purif. 12:185-18

50

8; Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253. さらにまた以下を参照されたい：Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253 (マウス系におけるコドンの最適化を記載)；Outchkourov (2002) Protein Expr. Purif. 24:18-24 (酵母におけるコドンの最適化を記載)；Feng (2000) Biochemistry 39:15339-15409 (大腸菌におけるコドンの最適化を記載)；Humphreys (2000) Protein Expr. Purif. 20:252-264 (大腸菌における分泌に影響するコドン使用頻度の最適化を記載)。

【0110】

非ヒトトランスジェニック動物

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド（例えばグルコシダーゼ）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトされたもしくは形質転換された細胞を含むヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。本発明はまた、前記非ヒトトランスジェニック動物の作製方法および使用方法を提供する。 10

前記トランスジェニック非ヒト動物は、例えば本発明の核酸を含むヤギ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、乳牛、ラットおよびマウスであり得る。これらの動物は、例えばグルコシダーゼ活性を調べる *in vivo* モデルとして、またはグルコシダーゼ活性を変化させる薬剤を *in vivo* でスクリーニングするモデルとして用いることができる。非ヒトトランスジェニック動物で発現されるべきポリペプチドのコード配列は、構成的であるように、または組織特異的、生育特異的もしくは誘導性調節因子の制御下にあるように設計することができる。非ヒトトランスジェニック動物は当業界で公知の任意の方法を用いて設計および生成することができる。例えば以下を参照されたい：US Patent No. 6,211,428; 6,187,992; 6,156,952; 6,118,044; 6,111,166; 6,107,541; 5,959,171; 5,922,854; 5,892,070; 5,880,327; 5,891,698; 5,639,940; 5,573,933; 5,387,742; 5,087,571 (形質転換細胞および卵並びにトランスジェニックマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタおよびウシの作製および使用について記載されている)。さらにまた例えば以下を参照されたい：Pollock (1999) J. Immunol. Methods 231:147-157 (トランスジェニック乳牛のミルク中の組換えタンパク質の製造について記載)；Baguisi (1999) Nat. Biotechnol. 17:456-461 (トランスジェニックヤギの作製を示す)。米国特許第6,211,428号は、DNA配列を含む核酸構築物をその脳で発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物の作製および使用について記載している。米国特許第5,387,742号は、クローン化組換えまたは合成DNA配列の受精マウス卵への注入、前記注入卵の偽妊娠雌への移植および、アルツハイマー病関連タンパク質をその細胞が発現するトランスジェニックマウスの妊娠期間満了までの発生について記載している。米国特許第6,187,992号は、そのゲノムがアミロイド前駆体 (APP) をコードする遺伝子の破壊を含むトランスジェニックマウスの作製および使用を記載している。 20 30

“ノックアウト動物”もまた本発明の方法の実施に用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明のトランスジェニックまたは改変動物は“ノックアウト動物”、例えば内因性遺伝子（例えばグルコシダーゼコード遺伝子又はその相同体）を発現しないように操作された“ノックアウトマウス”又は他の動物若しくは細胞を含む（前記内因性遺伝子は、本発明のグルコシダーゼを発現する遺伝子若しくはその相同体、又は本発明のグルコシダーゼを含む融合タンパク質を発現する遺伝子で置き換えられている）。 40

【0111】

トランスジェニック植物および種子

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド（例えばグルコシダーゼ、例えばアルファグルコシダーゼ）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトもしくは形質転換された細胞を含むトランスジェニック植物および種子を提供する。本発明はまた、本発明の核酸および／またはポリペプチド（例えばグルコシダーゼ、例えばアルファグルコシダーゼ）を含む植物生成物、例えば種子、葉、抽出物などを提供する。前記トランスジェニック植物は双子葉植物または単子葉植物であろう。本発明はまた前記トランスジェニック植物および種子の製造方法および使用方法を提供する。本発明のポリペプチドを発現するトランスジェニック植物または植物細胞は当業界で公知の任意の方法にしたがって構築できる。例えば米国特許第6,309,872号を参照されたい。 50

本発明の核酸および発現構築物は任意の手段によって植物細胞に導入できる。例えば、核酸または発現構築物は所望の植物宿主のゲノムに導入することができるが、また前記核酸または発現構築物はエピソームであってもよい。所望の植物のゲノム中への導入は、宿主のグルコシダーゼの産生が内因性の転写または翻訳制御エレメントによって調節できるようなものであろう。本発明はまた、相同組換えによる遺伝子配列の挿入によって内因性遺伝子の発現が破壊された“ノックアウト植物”を提供する。“ノックアウト”植物を作製する手段は当業界で周知であり、例えば以下を参照されたい：Strepp (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4368-4373; Miao (1995) Plant J. 7:359-365。下記のトランスジェニック植物についての考察を参照されたい。

【0112】

本発明の核酸を用いて、所望の属性を本質的に任意の植物（例えば澱粉生成植物、例えばジャガイモ、コムギ、イネ、オオムギなど）に付与することができる。本発明の核酸を用いて植物の代謝経路を操作し、宿主の α -グルコシダーゼ発現を最適化または変化させることができる。本発明の核酸は植物のデンプン/糖変換率を変化させることができる。また別に、本発明の α -グルコシダーゼをトランスジェニック植物の製造に用いて、天然に産生することができない化合物を前記植物によって製造することができる。これによって製造コストを下げるか、または新規な生成物を生成することができる。

ある特徴では、トランスジェニック植物製造の第一の工程は、植物細胞での発現のための発現構築物を作製することを含む。これらの技術は当業界では公知である。これらにはプロモーターの選別およびクローニング、リボソームのmRNAへの効率的な結合を促進するためのコード配列および適切な遺伝子ターミネーター配列の選別が含まれる。例示的な構成的プロモーターの1つはカリフラワーモザイクウイルスに由来するCaMV35Sであり、これは一般的な植物で高度な発現をもたらす。他のプロモーターはより特異的であり、植物の内部環境または外部環境の合図に反応する。例示的な光誘導性プロモーターは、主要な葉緑素a/b結合タンパク質をコードするcab遺伝子に由来するプロモーターである。

ある特徴では、核酸は改変されて植物細胞でのより強い発現が達成される。例えば、本発明の配列は植物で認められるA-Tヌクレオチド対の割合と比較して高いA-Tヌクレオチド対をもつ可能性が高い（植物のいくつかはG-Cヌクレオチド対を好む）。従って、コード配列内のA-Tヌクレオチドを、アミノ酸配列を顕著に変化させることなくG-Cヌクレオチドに置換して、植物細胞における遺伝子生成物の産生を高めることができる。

【0113】

選別可能なマーカー遺伝子を遺伝子構築物に付加し、トランスジーンを組み込むことに成功した植物細胞または組織を同定することができる。これは、植物細胞での遺伝子の取り込みおよび発現の達成が稀な事象であり、標的組織または細胞のわずかな割合で生じるだけであるので必要であろう。選別可能なマーカー遺伝子は、通常は植物にとって有毒である物質（例えば抗生物質または除草剤）に対して耐性を提供するタンパク質をコードする。前記適切な抗生物質または除草剤を含む培地で増殖させたとき、選別可能なマーカー遺伝子を組み込んだ植物細胞だけが生存するであろう。他の挿入遺伝子の場合のように、マーカー遺伝子もまた適切な機能のためにプロモーターおよびターミネーター配列を必要とする。

【0114】

ある特徴では、トランスジェニック植物または種子の作製は、本発明の配列および場合によってマーカー遺伝子の標的発現構築物（例えばプラスミド）への取り込みをプロモーターおよびターミネーター配列の適切な配置とともに含む。これは、適切な方法により改変遺伝子を前記植物に移すことを必要とするであろう。例えば、構築物は植物細胞のゲノムDNAに、例えば植物細胞のプロトプラストの電穿孔およびマイクロインジェクションのような技術を用いて直接導入することができる。または、構築物は弾道的方法（例えばDNA粒子ボンバードメント）を用いて植物組織に直接導入することもできる。例えば以下を参照されたい：Christou (1997) Plant Mol. Biol. 35:197-203; Pawlowski (1996) Mol. Biotechnol. 6:17-30; Klein (1987) Nature 327:70-73; Takumi (199

10

20

30

40

50

7) Genes Genet. Syst. 72:63-69 (トランスジーンのコムギへの導入のための粒子ボンバードメントの使用を考察する) ; およびAdam (1997) (上掲書) (YACの植物細胞への導入のための粒子ボンバードメントの使用について記載)。例えばRinehart (1997) (上掲書) は粒子ボンバードメントを用いてトランスジェニックな綿植物を生成した。粒子を加速する装置は米国特許第5,015,580号に記載されており、さらにBioRad (Biolistics) PDS-2000粒子加速装置が市販されている。さらに以下もまた参照されたい: 米国特許第5,608,148号 (John) ; および米国特許第5,681,730号 (Ellis) (裸子植物の粒子仲介形質転換を記載している)。

【0115】

ある特徴では、プロトプラストを固定し、核酸 (例えば発現構築物) を注入することができる。プロトプラストから植物を再生させることは穀類では容易ではないが、マメ類では体細胞の胚形成を用いてプロトプラスト由来カルスから植物の再生が可能である。器官を形成した組織を遺伝子銃技術を用いて裸のDNAで形質転換することができる。この場合、DNAはタンゲステンの微小発射体上に被覆され、細胞のサイズの1/100に発射される。前記発射体はDNAを細胞および細胞内小器官の奥深くに運ぶ。続いて形質転換組織を再生のために誘導する (通常は体細胞胚形成による)。この技術はいくつかの穀類種 (トウモロコシおよびイネを含む) で成功した。

核酸、例えば発現構築物は組換えウイルスを用いて植物細胞に導入することもできる。植物細胞はウイルスベクター、例えばタバコモザイクウイルス由来ベクターを用いて形質転換することができる (Rouwendal (1997) Plant Mol. Biol. 33:989-999)。以下を参照されたい: "Use of viral replicons for the expression of genes in plants", Mol. Biotechnol. 5:209-221。

【0116】

あるいは、核酸 (例えば発現構築物) を適切なT-DNAフランキング領域と結合させて、一般的なアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 宿主ベクターに導入することができる。アグロバクテリウム・ツメファシエンスのビルレンス機能は、細胞が前記細菌に感染したとき植物細胞DNAに前記構築物および隣接するマーカーの挿入を誘導するであろう。アグロバクテリウム・ツメファシエンス仲介形質転換技術 (バイナリーベクターの無毒化および使用を含む) は学術文献に詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい: Horsch (1984) Science 233:496-498; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803; Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995)。アグロバクテリウム・ツメファシエンスの細胞中のDNAは細菌の染色体および、Ti (腫瘍誘導; tumor-inducing) プラスミドとして知られている別の構造物中に含まれている。Tiプラスミドは、T-DNA (約20kbの長さ) と称される一続きのDNA (感染過程で植物細胞に移される) および一連のvir (virulence、ビルレンス) 遺伝子 (関連過程を誘導する) を含む。アグロバクテリウム・ツメファシエンスは創傷からのみ植物に感染する。植物の根または茎が傷を受けたとき、植物はある種の化学的シグナルを発し、それに応答してアグロバクテリウム・ツメファシエンスのvir遺伝子は活性化され、TiプラスミドのT-DNAの植物染色体への移転に必要な一連の事象を誘導する。続いてT-DNAは創傷から植物細胞に進入する。1つの推測は、T-DNAは、植物DNAが複製または転写されるまで待機し、続いて自身を裸の植物DNAに挿入するということである。アグロバクテリウム・ツメファシエンスをトランスジーンベクターとして使用するために、T-DNAの腫瘍誘導部分を除去し、一方T-DNAボーダー領域およびvir遺伝子は維持する必要がある。続いてトランスジーンをT-DNAボーダー領域間に挿入する (前記領域でトランスジーンは植物細胞に移され、植物染色体に組み込まれる)。

本発明は、本発明の核酸を用いる単子葉植物 (重要な穀類を含む) の形質転換を提供する (Hiei (1997) Plant Mol. Biol. 35:205-218)。さらにまた、例えば以下を参照されたい: Horsch (1984) Science 233:496; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803; Thykjaer (1997) 上掲書; Park (1996) Plant Mol. Biol. 32:1135-1148 (ゲノムDNAへのT-DNAの組み込みについて考察する)。さらにまた以下を参照されたい: 米国特許

第5,712,135号 (D'Halluin) (穀類または他の単子葉植物の細胞内で機能を有する遺伝子を含むDNAの安定な組み込みのための方法を開示する)。

【0117】

ある特徴では、第三の工程は、取り込まれた標的遺伝子を次の世代に伝達することができる植物体の選別および再生を含むことができる。そのような再生技術は、組織培養の増殖培地での一定の表現型の操作を必要とし、典型的には所望のヌクレオチド配列と一緒に導入された有毒物質および／または除草剤マーカーを必要とする。培養プロトプラストから植物を再生することについては以下に記載されている：Evans et al., *Protoplast Isolation and Culture*, Handbook of Plant Cell Culture, pp.124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; Binding, *Regeneration of Plants*, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985。再生はまた植物カルス、外植片、器官またはその部分からも得ることができる。そのような再生技術は一般的には以下に記載されている：Klee (1987) *Ann. Rev. of Phys.* 38:467-486。トランスジェニック組織（例えば未熟胚）から植物体を得るために、前記胚を栄養およびホルモンを含む一連の培養液中で環境制御条件下（組織培養として公知の方法）で増殖させることができる。いったん植物体が生成され種子が生じたら、子孫の評価が開始される。

発現カセットがトランスジェニック植物に安定的に取り込まれた後、前記カセットは有性交配によって他の植物に導入することができる。交配される種に応じて、多くの標準的育種技術のいずれも用いることができる。本発明の核酸のトランスジェニック発現は表現型の変化を生じるので、本発明の組換え核酸を含む植物を第二の植物と有性交配して最終生成物を得ることができる。したがって、本発明の種子は、本発明の2つのトランスジェニック植物間の交配、または本発明の植物と他の植物間の交配から誘導することができる。所望の効果（例えば本発明のポリペプチドを発現させて開花の態様が変化した植物を作製する）は、両方の親植物が本発明のポリペプチド（例えばグルコシダーゼ、例えば α -グルコシダーゼ）を発現するときに強化される。所望の効果は将来の植物世代に標準的な繁殖手段によって伝えることができる。

【0118】

本発明の核酸およびポリペプチドは任意の植物または種子で発現又は挿入される。本発明のトランスジェニック植物は双子葉植物でも単子葉植物でもよい。本発明のトランスジェニック単子葉植物の例は、牧草、例えばメドーグラス (meadow grass (ブルグラス、Poa))、飼料用草類、例えばフェスチュカ (festuca)、ロリウム (lolium)、テンペレートグラス、例えばアグロスチス (Agrostis) および穀類、例えばコムギ、エンバク、ライムギ、オオムギ、コメ、ソルガムおよびトウモロコシ (コーン) である。本発明のトランスジェニック双子葉植物の例は、タバコ、豆類 (例えばルピナス)、ジャガイモ、サトウダイコン、エンドウマメ、インゲンマメおよびダイズ、並びに十字架植物 (Brassicaceae科)、例えばカリフラワー、ナタネ、および近縁のモデル植物のシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) である。したがって、本発明のトランスジェニック植物および種子には以下を含む広範囲の植物が含まれる (ただしこれらに限定されない)：アナカルジウム (Anacardium)、アラキス (Arachis)、アスパラガス、アトロパ (Atropa)、アベナ (Avena)、ブラシッカ (Brassica)、シトラス、シトラルス (Citrullus)、カプシカム (Capsicum)、カルサムス (Carthamus)、ココス (Cocos)、コフエア (Coffea)、ククミス (Cucumis)、ククルビタ (Cucurbita)、ダウクス (Daucus)、エレイス (Elaris)、フラガリア (Fragaria)、グリシン (Glycine)、ゴッシピウム (Gossypium)、ヘリアンサス (Helianthus)、ヘテロカリス (Heterocallis)、ホルデウム (Hordeum)、ヒオシアムス (Hyoscyamus)、ラクツカ (Lactuca)、リヌム (Linum)、ロリウム (Lolium)、ルピナス、リコペルシコン (Lycopersicon)、マルス (Malus)、マニホット (Manihot)、マジョラナ (Majorana)、メディカゴ (Medicago)、ニコチアナ、オレア (Olea)、オリザ (Oryza)、パニエウム (Panieum)、パニセツム (Panisetum)、ペルセア (Persea)、ファセオルス (Phaseolus)、ピスタキア (Pistachia)、ピスム (Pisum)、ピルス (Pyrus)、プルヌス (Prunus)、ラファヌス (Raphanus)、リシヌス (Ricinus)、セカ

レ (Secale)、セネシオ (Senecio)、シナピス (Sinapis)、ソラナム (Solanum)、ソルガム (Sorghum)、テオブロムス (Theobromus)、トリゴネラ (Trigonella)、トリチウム (Triticum)、ビシア (Vicia)、ビチス (Vitis)、ビグナ (Vigna)、およびゼア (Zea)。

また別の実施態様では、本発明の核酸は、繊維細胞を含む植物 (綿、シルクコットンツリー (Kapok, Ceiba pentandra)、ヤナギ (desert willow)、クレオソートブッシュ、ウィンターファット、バルサ、カラムシ、ケナフ、アサ、ロゼレ (roselle)、ジュート、サイザル (sisal abaca) およびアマを含む) で発現される。また別の実施態様では、本発明のトランスジェニック植物はゴシピウム (Gossypium) 属のメンバー (一切のゴシピウム種のメンバー、例えば G. アルボレウム (arboreum); G. ヘルバセウム (herbaceum) 10); G. バルバデンス (barbadense); G. ヒルスタム (hirsutum) を含む) であり得る。

本発明はまた、大量の本発明のポリペプチド (例えばグルコシダーゼ、例えばアルファ-グルコシダーゼ) を製造するために用いることができるトランスジェニック植物を提供する。例えば以下を参照されたい: Palmgren (1997) Trends Genet. 13:348; Chong (1997) Transgenic Res. 6:289-296 (オーキシン誘導性二方向性マンノピンシンターゼ (mas1', 2') プロモーターを用い、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ仲介リーフディスク形質転換法により母乳タンパク質のベータカゼインのトランスジェニックなジャガイモによる生産を記載)。

公知の方法を用いて、当業者は、形質導入植物でトランスジーン mRNA またはタンパク質の増減を検出することによって本発明の植物をスクリーニングすることができる。mRNA 20の検出および定量手段は当業界で周知である。

【0119】

ポリペプチドおよびペプチド

ある特徴では、本発明は、本発明の例示的な配列、例えば配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24並びにその部分配列及びその変種と配列同一性 (例えば少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは 30はそれより高いか、又は完全な (100%) 配列同一性) を有する単離または組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、前記ポリペプチドは、グルコシダーゼ活性、例えばアルファグルコシダーゼ活性又はグルコグルコシダーゼ活性を有する。

前記同一性はポリペプチドの完全長に及ぶことができる。又は前記同一性は、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700又はそれより多い残基の領域にわたることができる。本発明のポリペプチドはまた例示的なポリペプチドの完全長よりも短くてもよい。また別の特徴では、本発明は、約5から完全長の範囲のサイズのポリペプチド (例えば酵素、例えばグルコシダーゼ) を提供する。例示的なサイズは、本発明の例示的なグルコシダーゼの、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45 40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700又はそれより多くの残基、例えば本発明の例示的なグルコシダーゼの連続する残基である。本発明のペプチドは、例えば標識プローブ、抗原、トレラゲン、モチーフ、グルコシダーゼ活性部位として有用であり得る。

本発明のポリペプチドおよびペプチドは、天然の供給源から単離することも、合成または組換えによって生成することもできる。ペプチドおよびタンパク質は組換えによって in vivo または in vitro で発現させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、当業界で公知の任意の方法を用いて製造および単離できる。本発明のポリペプチドおよびペプチドはまた、当業界で周知の化学的方法を用いてその全体または部分を合成してもよい。例えば以下を参照されたい: Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 50

215-223; Horn (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; A.K. Banga, Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. 例えば、ペプチド合成は、種々の固相技術を用いて実施してもよい（例えば以下を参照されたい：Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289:3-13）。さらにこれらは、例えばABI431Aペプチド合成装置（Perkin Elmer）を用い製造元の提供する指示にしたがって自動合成することもできる。

【0120】

本発明のペプチドおよびポリペプチドはまたグリコシル化することもできる。グリコシル化は翻訳後に化学的にまたは細胞の生合成メカニズムによって実施できる。後者の場合、公知のグリコシル化モチーフの使用が含まれる（このモチーフは配列にとって天然のものでよく、またペプチドとして付加するか配列をコードする核酸に付加することもできる）。グリコシル化はO-結合またはN-結合であり得る。ある特徴では、グリコシル化宿主は酵母細胞、例えばピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、サッカロミセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）である。ある特徴では、本発明のタンパク質のN-結合グリコシル化部位の1つ又は2つ以上が、例えば変異導入を介して（前記部位がもはやN-結合グリコシル化部位と認識されず、前記部位でもはやグリコシル化が生じないように）改変され、異なる特性（例えば耐熱性、種々の程度に高められた活性など）を有するポリペプチドが生成される。例えば、ある特徴では、前記グリコシル化コンセンサス配列（NXS/T）内のセリン又はスレオニン残基の変異導入によって、例えばこれらヌクレオチドコドンを変換して別の残基、例えばバリン又はイソロイシンをセリン又はスレオニンの代わりに前記の位置に生成させることによって、1つ又は2つ以上のN-結合グリコシル化部位が破壊される。

【0121】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは（上記で定義されたように）、全ての“模倣体”および“ペプチド模倣体”形を含む。“模倣体”および“ペプチド模倣体”という用語は、実質的に本発明のポリペプチドと同じ構造および／または機能的特徴を有する合成化学物質を指す。前記模倣体は完全に合成された非天然アミノ酸類似体で構成されているか、または部分的に天然のペプチドアミノ酸および部分的に非天然のアミノ酸類似体のキメラ分子である。前記模倣体はまた任意の量の天然アミノ酸の保存的置換を含むことができるが、ただしそのような置換が前記模倣体の構造および／または活性を実質的に変化させない限りである。保存的変種である本発明のポリペプチドに関しては、日常的な実験によって模倣体が発明の範囲内に包含されるものであるか否か、すなわちその構造および／または機能が実質的に改変されていないかどうかが決定的であろう。したがって、ある特徴では、模倣体組成物がグルコシダーゼ活性をもつならばそれらは本発明の範囲内に包含される。

本発明のポリペプチド模倣体組成物は任意の組合せの非天然成分を含むことができる。また別の特徴では、本発明の模倣体組成物は以下の3つの構造基の1つまたは全てを含む：
a) 天然のアミド結合（“ペプチド結合”）以外の残基結合基；
b) 天然に存在するアミノ酸残基の代わりに非天然残基；
c) 二次構造模倣を誘導する（すなわち二次構造、例えばベータターン、ガンマターン、ベータシート、アルファヘリックス構造を誘導または安定化させる）残基。例えば本発明のポリペプチドは、その残基の全てまたはいくつかは天然のペプチド結合以外の化学的手段によって結合されるとき模倣体と特徴付けることができる。個々のペプチド模倣体残基は、ペプチド結合、他の化学的結合、またはカップリング手段、例えばグルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、二官能基性マレイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）またはN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）によって結合される。通常のアミド結合（“ペプチド結合”）の代用となることができる結合基には例えば以下が含まれる：ケトメチレン（例えば-C(=O)-NH-の代わりに-C(=O)-CH₂-）、アミノメチレン（CH₂-NH）、エチレン、オレフィン（CH=CH）、エーテル（CH₂-O）、チオエーテル（CH₂-S）、テトラゾール（CN₄）、チアゾール、

レトロアミド、チオアミドまたはエステル（例えば以下を参照されたい：Spatola (1983) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol.7, pp267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcell Dekker, NY）。

【0122】

本発明のポリペプチドはまた、天然に存在するアミノ酸残基の代わりに全てまたはいくつかの非天然の残基が含まれることによって模倣体と特徴付けられる。非天然残基は学術文献および特許文献に詳しく記載されている。天然のアミノ酸残基の模倣体として有用な例示的な非天然組成物のいくつかおよび基準は以下で述べる。芳香族アミノ酸の模倣体は、例えば以下によって置き換えることによって生成することができる：D-またはL-ナフチルアラニン；D-またはL-フェニルグリシン；D-またはL-2チエネイルアラニン；D-またはL-1、-2,3-、または4-ピレネイルアラニン；D-またはL-3チエネイルアラニン；D-またはL-(2-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(3-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(2-ピラジニル)-アラニン；D-またはL-(4-イソプロピル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルアラニン；D-p-フルオロ-フェニルアラニン；D-またはL-p-ビフェニルフェニルアラニン；D-またはL-p-メトキシ-ビフェニルフェニルアラニン；D-またはL-2-インドール(アルキル)アラニン；およびD-またはL-アルキルアラニン（前記アルキルはメチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、iso-ブチル、sec-イソチル、iso-ペンチルまたは非酸性アミノ酸で置換できるがまた置換されてなくてもよい）。非天然アミノ酸の芳香環には、例えばチアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、ベンゾイミダゾリル、ナフチル、フラニル、ピロリルおよびピリジル芳香環が含まれる。

酸性アミノ酸の模倣体は、例えば陰性荷電を維持している非カルボキシレートアミノ酸、（ホスホノ）アラニン、硫酸スレオニンによって置換することにより生成できる。カルボキシル側鎖基（例えばアスパルチルまたはグルタミル）はまた、カルボジイミド（ $R'-N-C-N-R'$ ）、例えば1-シクロヘキシル-3(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3(4-アゾニア-4,4-ジメソールペンチル)カルボジイミドとの反応によって選択的に改変することができる。アスパルチルまたはグルタミルもまた、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換することができる。塩基性アミノ酸の模倣体は、（リジンおよびアルギニンの他に）アミノ酸オルニチン、シトルリン又は（グアニジノ）-酢酸または(グアニジノ)アルキル-酢酸（アルキルは上記で定義されたとおり）による置換によって生成することができる。ニトリル誘導体（例えばCOOHの代わりにCN-部分を含む）でアスパラギンまたはグルタミンを置換することができる。アスパラギニルおよびグルタミニル残基は、対応するアスパルチルまたはグルタミル残基に脱アミノ化することができる。アルギニン残基模倣体は、アルギニルを例えば1つまたは2つ以上の通常の試薬（例えばフェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロ-ヘキサジオンまたはニンヒドリンを含む）と、好ましくはアルカリ性条件下で反応させることによって生成することができる。チロシン残基模倣体はチロシルを例えば芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンと反応させることによって生成することができる。N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いてO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成することができる。システイン残基模倣体は、システイニル残基を例えばアルファ-ハロアセテート（例えば2-クロロ酢酸またはクロロアセトアミド）および対応するアミンと反応させてカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生成することによって達成できる。システイン残基模倣体はまた、システイン残基を例えばブロモ-トリフルオロアセトン、アルファ-ブロモ-ベータ-(5-イミドゾイル)プロピオン酸；クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド；メチル2-ピリジルジスルフィド；p-クロロ水銀ベンゾエート；2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール；またはクロロ-7-ニトロベンゾ-オキサ-1,3-ジアゾールと反応させることによって生成することができる。リジン模倣体は、リジニルをコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させることによって（さらにアミノ末端残基を変化させることによって）生成することができる。リジンおよび他のアルファ-アミノ

含有残基模倣体はまた、イミドエステル、例えばメチルピコリンイミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロボロハイドライド、トリニトロ-ベンゼンスルホン酸、0-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオンとの反応、およびグキオキシレートとのトランスアミダーゼ触媒反応によって生成することができる。メチオニンの模倣体は、例えばメチオニンスルホキシドとの反応によって生成することができる。プロリンの模倣体には、例えばピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、3-または4-ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、3-または4-メチルプロリンまたは3,3-ジメチルプロリンが含まれる。ヒスチジン残基模倣体はヒスチジンを例えばジエチルプロカーボネートまたはパラ-プロモフェナシルプロミドと反応させることによって生成することができる。他の模倣体には、例えばプロリンおよびリジンのヒドロキシ化；セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシ基のリン酸化；リジン、アルギニンおよびヒスチジンのアルファ-アミノ基のメチル化；N-末端アミンのアセチル化；主鎖アミド残基のメチル化またはN-メチルアミノ酸による置換；またはC-末端カルボキシ基のアミド化によって生成することができるものが含まれる。

10

【0123】

本発明のポリペプチドの残基、例えばアミノ酸はまた反対のキラリティーをもつアミノ酸（またはペプチド模倣体残基）によって置換することができる。したがって、L型構造で天然に存在するいずれのアミノ酸（前記化学物質の構造に応じてRまたはSとも呼ぶことができる）も、同じ化学構造型であるが反対のキラリティーのアミノ酸またはペプチド模倣体（D-アミノ酸と称されるが、またR-またはS-型とも称される）で置換することができる。

20

本発明はまた本発明のポリペプチドを、天然の過程（例えば翻訳後プロセッシング、例えばリン酸化、アセチル化など）または化学的改変技術のどちらかによって改変する方法、および生成された改変ポリペプチドを提供する。改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端を含むポリペプチド内のいずれの場所でも生じることができる。あるポリペプチドで同じタイプの改変が同じ程度または種々の程度でいくつかの部位で存在することができることは理解されよう。さらにまた与えられたポリペプチドが多くタイプの改変を含むこともできる。改変には以下が含まれる：アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合による付加、ヘム成分の共有結合による付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合による付加、脂質または脂質誘導体の共有結合による付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合による付加、架橋環形成、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシ化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシ化、ヨード化、メチル化、ミリストリエーション、酸化、PEG化、タンパク分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、およびタンパク質へのトランスファーRNA仲介アミノ酸付加、例えばアルギニル化。例えば以下を参照されたい：T.E. Creighton, Proteins-Structure and Molecular Properties 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983)。

30

40

【0124】

固相ペプチド化学合成法もまた本発明のポリペプチドまたはフラグメントの合成に用いることができる。前記の方法は1960年代初頭より当業界で公知であり（R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963；さらにまた以下を参照されたい：J.M. Stewart and J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp.11-12）、さらに最近は市販の実験室ペプチド設計および合成キット（Cambridge Research Biochemicals）として用いられている。そのような市販の実験室キットは一般的にはH.M. Geysenら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998 (1984)）の教示を利用し、多数の“ロッド”または“ピン”（これらは全て一枚のプレートにつながっている）の先端でペプチドを合成させる。前記のような系を利用するときは、ロッドまた

50

はピンを含むプレートはさかさまにされ、対応するウェルまたはレザーバーの第二のプレートに挿入される。前記ウェルまたはレザーバーは適切なアミノ酸をピンまたはロッドの先端に結合または固着させるために溶液を含んでいる。そのような工程（すなわちロッドまたはピンの先端をさかさまにして適切な溶液に挿入する工程）を繰り返すことによって、アミノ酸は所望のペプチドに構築される。さらにまた、多数のFMOCペプチド合成系が利用可能である。例えば、ポリペプチドまたはフラグメントのアッセムブリーはアプライドバイオシステムズ社のモデル431A（商標）自動ペプチド合成装置を用いて固相上で実施できる。前記のような装置は、直接合成または一連のフラグメント（前記フラグメントは他の公知の技術を用いて結合させることができる）の合成によって本発明のペプチドの容易な入手を提供する。

10

本発明は、新規なグルコシダーゼ（例えばアルファグルコシダーゼ）（本発明の例示的な酵素を含む）、前記をコードする核酸、前記と結合する抗体、並びに前記を製造及び使用する方法を提供する。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、本明細書に開示するようにグルコシダーゼ活性（例えばデンプンを糖に加水分解する能力）を有する。ある特徴では、本発明のポリペプチドはアルファグルコシダーゼ活性を有する。また別の特徴では、本発明のグルコシダーゼは、本明細書に開示した例示的なグルコシダーゼの活性から改変された活性を有する。

本発明は、グルコシダーゼ活性（例えばグルコシド結合の加水分解を触媒する能力を含む）を有するペプチド及びポリペプチド（抗体を含む）を提供する。前記グルコシダーゼ活性は、アルファ-グルコシダーゼ活性、例えば1,4-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性又は1,6-アルファ-D-グルカンヒドロラーゼ活性を含む。本発明のポリペプチドはアルファ-(1,4)及びアルファ-(1,6)-グルコース結合の両結合の加水分解を触媒することができる。本発明のポリペプチドは、マルト-オリゴ糖及び液化デンプンの両者の加水分解を触媒することができる。本発明のポリペプチドはまた、多糖類（例えばデンプン）のアルファ-(1,2)及び／又はアルファ-(1,3)結合の加水分解を触媒することができる。本発明のポリペプチドはアルファ-(1,4)、アルファ-(1,6)、アルファ-(1,2)及び／又はアルファ-(1,3)グルコース結合又はその組合せの加水分解を触媒することができる。

20

【0125】

グルコシダーゼ酵素：

本発明は、新規なグルコシダーゼ、それらをコードする核酸、それらと結合する抗体、前記酵素の抗原部位（エピトープ）及び活性部位（“触媒ドメイン”）、シグナル配列、プレプロドメインなどを表すペプチド、並びにこれらを製造及び使用する方法を提供する。これらのペプチドの配列の決定は日常的なスクリーニング手順によって実施できる。ある特徴では、本発明のペプチドは耐熱性、又は高温若しくは低温耐性グルコシダーゼ活性を有する。また別の特徴では、本発明のホスホリパーゼは、本明細書に記載した例示的なグルコシダーゼの活性から改変された活性を有する。本発明にはシグナル配列を含むグルコシダーゼ及びシグナル配列を含まないグルコシダーゼ、並びにシグナル配列自体が含まれる。本発明にはまた、固定化されたグルコシダーゼ、抗グルコシダーゼ抗体及びそれらのフラグメントが含まれる。本発明には、本発明のグルコシダーゼを含むヘテロ複合体、例えば融合タンパク質、ヘテロダイマーなどが含まれる。

30

40

本発明の酵素は高度に選択性を有する触媒であり得る。ある特徴では、それらは立体選択性、部位選択性及び化学的選択性を示す反応を触媒する。ある特徴では、本発明の酵素は融通性が大きい。ある特徴では、それらは有機溶媒中で機能し、極端なpH（例えば高pH及び低pH）、極端な温度（例えば高温及び低温）、極端な塩濃度（例えば高塩濃度及び低塩濃度）で作用し、さらに本発明の酵素の天然の生理学的基質と構造的に無関係である化合物の反応を触媒することができる。本発明の酵素は、広範囲の天然及び非天然基質と反応するように設計することができ、したがって実質的に任意の有機指標化合物の改変も可能にする。本発明の酵素はまた高度に鏡像選択性及び部位選択性であるように設計することができる。これら酵素により示される高度な官能基特異性によって、新規な活性化合物を生じる連続的合成で各反応を追跡することができるであろう。本発明の酵素はまた、そ

50

これらの天然の生理学的な機能とは無関係の多様な多くの反応を触媒するように設計することができる。

【0126】

ある特徴では、本発明のグルコシダーゼ（例えばアルファグルコシダーゼ）は、デンプンの内部多糖類結合（例えば α -1,4-及び α -1,6-グルコシド結合）を加水分解してより低分子量のマルトデキストリンを生成する。ある特徴では、前記加水分解は主としてランダムである。したがって、本発明は、より低分子量のマルトデキストリンを生成する方法を提供する。

本発明のグルコシダーゼは研究室及び工業的設定で用いることができ、デンプン又は任意のマルトデキストリン含有化合物を多様な目的のために加水分解することができる。これらグルコシダーゼを単独で用いて、特異的な加水分解を生じさせるか、又は他のグルコシダーゼと混合して広スペクトルの活性を有する“カクテル”を提供してもよい。例示的な使用には、生物学的サンプル、食品、動物の飼料、医薬サンプル又は工業サンプルからデンプン又は任意のマルトデキストリン含有化合物の除去又は部分的若しくは完全な加水分解が含まれる。

例えば、本発明のグルコシダーゼは洗濯用洗剤として処方して、デンプンを含む汚れの除去を促進することができる。本発明のグルコシダーゼを洗剤マトリックス中の洗浄剤として用いることができる（下記の工業的応用を参照されたい）。本発明のグルコシダーゼは、デンプン加工の初期段階（液化）で、湿式トウモロコシ製粉で、デンプンの脱サイズのために繊維工業で、焼成での利用で、飲料工業で、油田での掘削処理で、リサイクル紙のインキングで、さらに動物飼料で用いることができる。

本発明のグルコシダーゼは種々の条件、例えば極端なpH及び／又は温度、酸化剤などの下でグルコシダーゼ活性を有することができる。本発明は、種々の触媒効率及び安定性（例えば温度、酸化剤及び洗浄条件の変化に対する）を有するまた別のグルコシダーゼ調製物に至る方法を提供する。ある特徴では、グルコシダーゼ変種は、部位特異的変異導入及び／又はランダム変異導入の技術を用いて作製することができる。ある特徴では、誘導進化を用いて、また別の特異性及び安定性を有する極めて多様なグルコシダーゼ変種を作製することができる。

本発明のタンパク質はまた、グルコシダーゼ調節物質（例えばグルコシダーゼ活性の活性化物質又は阻害物質）を同定する研究用試薬としても有用である。簡単に記せば、試験サンプル（化合物、ブロス、抽出物など）をグルコシダーゼアッセイに添加し、それらの基質切断阻害活性が測定される。このようにして同定された阻害物質を工業及び研究で用いて、望ましくないタンパク質分解を低下又は防止することができる。グルコシダーゼに関しては、阻害物質を混合してその活性スペクトルを広げることができる。

【0127】

本発明はまた、本発明の核酸、ポリペプチド及び抗体を用いて新規なグルコシダーゼを発見する方法を提供する。ある特徴では、ラムダファージライブラリーをグルコシダーゼの発現を基準にしてスクリーニングしグルコシダーゼを見つける。ある特徴では、本発明はラムダファージをスクリーニングに用いて、毒性クロンの検出、基質への接近の改善、宿主操作の要求の減少、ライブラリーの集団切り出しにより生じる一切の偏向の可能性の回避、及び低クロン密度でのより速い増殖を可能にする。ラムダファージライブラリーのスクリーニングは液相でも固相でも可能である。ある特徴では、本発明は液相でのスクリーニングを提供する。これによってアッセイ条件におけるより大きな融通性、更なる基質の融通性、弱いクロンに対する感度の強化、及び固相スクリーニングを超える自動化の容易さが提供される。

本発明は、本発明のタンパク質及び核酸並びにロボットによる自動化を用いるスクリーニング方法を提供し、高レベルの正確さ及び再現性を担保しながら、短時間（例えば1日当たり）に何千もの生物触媒反応及びスクリーニングアッセイを実施することを可能にする（下記のアレイの考察を参照されたい）。結果として、誘導化合物ライブラリーを数週間の作業で作製することができる。分子（小分子を含む）の改変についての更なる教示は

PCT/US94/09174を参照されたい。

本発明には、天然に存在しないカルボニルヒドロラーゼ変種（例えばグルコシダーゼ変種）であるグルコシダーゼ酵素が含まれる。前記変種は、そのアミノ酸配列が由来する前駆体カルボニルヒドロラーゼと比較したとき、別個のタンパク分解活性、安定性、基質特異性、pHプロフィル及び／又は性能特性を有する。特に、そのようなグルコシダーゼ変種は天然には見出されないアミノ酸配列を有し、前記配列は、異なるアミノ酸配列を有する前駆体グルコシダーゼの複数のアミノ酸残基を置換することに由来する。前駆体グルコシダーゼは天然に存在するグルコシダーゼ又は組換えグルコシダーゼであろう。有用なグルコシダーゼ変種は、指定されたアミノ酸残基の位置で天然に存在する任意のL-アミノ酸の置換を包含する。

10

本発明は、固定化されたグルコシダーゼ、抗グルコシダーゼ抗体、及びそのフラグメントを含む。本発明は、例えば本発明のドミナントネガティブ変異体又は抗グルコシダーゼ抗体を用いてグルコシダーゼ活性を阻害する方法を提供する。本発明は、本発明のグルコシダーゼを含むヘテロ複合体（例えば融合タンパク質、ヘテロダイマーなど）を含む。

【0128】

グルコシダーゼシグナル配列：

本発明は、シグナル配列を含む又はシグナル配列を含まない本発明のポリペプチド（例えばグルコシダーゼ）、及びシグナル配列それ自体を提供する。前記シグナル配列には本発明のシグナル配列、例えば配列番号:2（配列番号:1によってコードされる）の残基1から24、配列番号:4（配列番号:3によってコードされる）の1から21、又は本発明の配列を含む若しくは本発明の配列からなる他のシグナル配列が含まれる。本発明にはまた本発明のシグナル配列を含むポリペプチド（例えば融合タンパク質）が含まれる。本発明のシグナル配列を含むポリペプチドは、本発明のグルコシダーゼ若しくは別のグルコシダーゼ、又は別の酵素又は他のポリペプチドであり得る。

20

本発明のグルコシダーゼシグナル配列は単離されたペプチドであってもよいが、また別のグルコシダーゼ又は非グルコシダーゼに結合した（例えば融合タンパク質として）配列であってもよい。ある特徴では、本発明は本発明のグルコシダーゼシグナル配列を含むポリペプチドを提供する。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼシグナルペプチドを含むポリペプチドは、本発明のグルコシダーゼにとって異種である配列を含む（例えば本発明のグルコシダーゼシグナル配列及び別のグルコシダーゼ又は非グルコシダーゼタンパク質由来の配列を含む融合タンパク質）。ある特徴では、本発明は、異種シグナル配列（例えば酵母シグナル配列を含む配列）を含む本発明のグルコシダーゼを提供する。例えば、本発明のグルコシダーゼはベクター（例えばpPICシリーズベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA））内に異種シグナル配列を含む。

30

【0129】

ある特徴では、本発明のシグナル配列は、新規なグルコシダーゼポリペプチドを同定した後で同定される。タンパク質がソーティングされ、それらの適切な細胞内の配置場所に輸送される経路はしばしばタンパク質標的化経路と称される。これら全ての標的化系においてもっとも重要な成分の1つは、シグナル配列と称される、新たに合成されたポリペプチドのアミノ末端の短いアミノ酸配列である。このシグナル配列はタンパク質をその適切な細胞内の配置場所に向かわせ、さらに輸送中に又は前記タンパク質がその最終目的地に到達したときに除去される。ほとんどのリソゾームタンパク質、膜タンパク質又は分泌タンパク質は小胞体管腔内への移送のために前記タンパク質の目印となるアミノ末端シグナル配列を有する。このグループのタンパク質について100を超えるシグナル配列が既に決定されている。前記シグナル配列は長さが変動し、1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、1から33、1から34、1から35、1から36、1から37、1から38、1から39若しくは1から40、又はそれより多いアミノ酸残基であり得る。シグナル配列の種々の識別方法は当業者には公知である。例えばある特徴では、新規なグルコシダーゼシグナルペプチドはシグナルP（SignalP）と称される方法によって同定される

40

50

。シグナルPは神経結合ネットワークを使用し、シグナルペプチドおよびそれらの切断部位の両方を認識する (Nielsen et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". Protein Engineering, 10(1):1-6 (1997))。

いくつかの特徴では、本発明のグルコシダーゼはシグナル配列を持たなくてもよいことは理解されよう。ある特徴では、本発明は、シグナル配列 (例えば本発明のシグナル配列) の全てまたは一部分を欠く本発明のグルコシダーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、シグナル配列 (例えば本発明のシグナル配列) の全てまたは部分を欠く本発明のグルコシダーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるグルコシダーゼに由来するシグナル配列をコードする核酸が別のグルコシダーゼの核酸配列に機能的に連結された核酸を提供し、また場合によって非グルコシダーゼタンパク質のシグナル配列が望ましいかも知れない。 10

【0130】

グルコシダーゼプレプロドメイン、触媒 (活性部位) ドメイン及びシグナル配列:

上記で考察したようなシグナル配列 (例えばシグナルペプチド (SP)) の他に、本発明は、プレプロドメイン及び触媒ドメイン (CD) を提供する。本発明のSP、プレプロドメイン及び/又はCDは単離又は組換えペプチドであっても、又は例えばキメラタンパク質の異種ドメインのような融合タンパク質の一部であってもよい。本発明は、これら触媒ドメイン (CD) (例えば活性部位)、プレプロドメイン及びシグナル配列 (SP、例えば本発明のポリペプチドのアミノ末端残基を含む/からなる配列を有するペプチド) をコードする核酸を提供する。 20

本発明のホスホリパーゼシグナル配列 (SP)、触媒ドメイン及び/又はプレプロ配列は単離ペプチドであっても、又は別のグルコシダーゼ若しくは非グルコシダーゼポリペプチドと (例えば融合 (キメラ) タンパク質として) 結合した配列であってもよい。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼシグナル配列SP及び/又はプレプロを含むポリペプチドは本発明のグルコシダーゼに対して異種の配列を含む (例えば、本発明のSP及び/又はプレプロ並びに別のグルコシダーゼ又は非グルコシダーゼタンパク質由来の配列を含む融合タンパク質)。ある特徴では、本発明は、異種CD、SP及び/又はプレプロ配列を有する本発明のグルコシダーゼ (例えば酵母のシグナル配列を有する配列) を提供する。本発明のグルコシダーゼは、異種CD、SP及び/又はプレプロをベクター (例えばpPICシリーズベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA)) 中に含むことができる。 30

【0131】

いくつかの特徴では、本発明のグルコシダーゼは、SP及び/又はプレプロ配列及び/又は触媒ドメイン (CD) を持たなくてもよい。ある特徴では、本発明は、SP、CD及び/又はプレプロドメインの全てまたは一部分を欠くグルコシダーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるグルコシダーゼに由来するシグナル配列 (SP)、CD及び/又はプレプロをコードする核酸が別のグルコシダーゼの核酸配列に機能的に連結された核酸を提供し、また場合によって非グルコシダーゼタンパク質のシグナル配列 (SP)、CD及び/又はプレプロドメインが望ましいかも知れない。

本発明はまた、本発明のシグナル配列 (SP)、プレプロドメインおよび/または触媒ドメイン (CD) および異種の配列を含む単離または組換えポリペプチドを提供する。前記異種配列は、SP、プレプロドメイン及び/又はCDと (例えばグルコシダーゼと) 天然には結合していない配列である。SP、プレプロドメインおよび/またはCDが天然には結合していない配列は、SP、プレプロドメインおよび/またはCDのアミノ末端、カルボキシ末端、及び/又はSP及び/又はCDの両方の末端に存在し得る。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列 (SP)、プレプロドメイン及び/又は触媒ドメイン (CD) を含むポリペプチドを含む (または前記から成る) 単離または組換えポリペプチドを提供するが、ただし前記ポリペプチドはそれが天然に結合しているいずれの配列 (例えばホスホリパーゼ配列) とも結合していないことを条件とする。同様にある特徴では、本発明は、これらのポリペプチドをコードする単離または組換え核酸を提供する。したがって、ある特徴では、本発 40 50

明の単離または組換え核酸は、本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメイン及び／又は触媒ドメイン（CD）および異種配列（すなわち本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメインおよび／または触媒ドメイン（CD）と天然には結合していない配列）のコード配列を含む。前記異種配列は、SP、プレプロドメイン及び／又はCDコード配列の3'末端、5'末端及び／又はその両末端に存在することができる。

【0132】

本発明のポリペプチドは活性型又は不活性型のグルコシダーゼを含む。例えば、本発明のポリペプチドは、“成熟”前又はプレプロ配列のプロセッシング前（例えばプロタンパク質変換酵素のようなプロタンパク質プロセッシング酵素によって“活性な”成熟タンパク質が生成される前）のプロタンパク質を含む。本発明のポリペプチドは他の原因、例えば翻訳後プロセッシング事象（例えばエンド-又はエキソ-ペプチダーゼ又はプロテイナーゼ作用）、リン酸化事象、アミド化、グリコシル化又は硫酸化、ダイマー化事象などにより活性化される前の、不活性であるグルコシダーゼを含む。“プレプロ”ドメイン配列、CD及びシグナル配列を同定する方法はこの分野でよく知られている。例えば以下を参照されたい：Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136。例えば、プレプロ配列を同定するために、前記タンパク質を細胞外間隙から精製し、さらに前記のN-末端配列を決定しプロセッシングを受けていない形態と比較する。

本発明のポリペプチドは全ての活性な形態を含み、これらには本発明の酵素の活性な部分配列、例えば触媒ドメイン（CD）又は活性部位が含まれる。ある特徴では、本発明は下記に示される触媒ドメイン又は活性部位を提供する。ある特徴では、本発明は、例えばPfamのようなデータベースを使用することにより予測される活性部位を含む、又は前記活性部位から成るペプチド又はポリペプチドを提供する。Pfamは、多数の一般的なタンパク質ファミリー又は等価物に及ぶ、マルチ配列アラインメント及び隠蔽マルコフモデルの大きな集合体である（Pfamタンパク質ファミリーデータベース；A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Ewinger, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, & E.L.L. Sonnhammer, Nucleic Acids Research, 30(1):276-280, 2002）。

【0133】

本発明は、本発明の酵素のN-末端又はC-末端部分配列（例えばシグナル配列、プレプロ配列）と他のポリペプチド、活性を有するタンパク質又はタンパク質フラグメントとの融合を提供する。本発明の酵素（例えばグルコシダーゼ）の作製はまた、前記酵素を不活性な融合タンパク質として発現させ、前記融合タンパク質を後でタンパク分解切断事象（内因性又は外因性プロテアーゼ活性（例えばトリプシン）のどちらかを用いる）によって活性化させて、これによって融合パートナーと成熟酵素（例えばグルコシダーゼ）を分離することによって行ってもよい。ある特徴では、本発明の融合タンパク質は、以下の要素を含有する単一のオープンリーディングフレームをコードするハイブリッドヌクレオチド構築物から発現される：前記融合タンパク質のためのヌクレオチド配列、リンカー配列（2つの可撓性の低いタンパク質ドメインを結合させる可撓性アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と定義される）、プロテアーゼ切断認識部位及び成熟酵素配列（例えば本発明の任意の酵素、例えばグルコシダーゼ）。また別の特徴では、前記融合タンパク質は、ベクテートリアーゼ配列、キシラナーゼ配列、ホスファチジン酸ホスファターゼ配列又は別の配列、例えば対象の宿主系で以前に過剰発現することが示された配列を含むことができる。例えば上記で考察されたように、任意の宿主系（例えば大腸菌またはピキア・パストリス）を用いることができる。キメラヌクレオチド構築物におけるヌクレオチド配列の配置は、各構築物を用いて達成されるタンパク質の発現レベルを基準にして決定することができる。ある特徴では、ヌクレオチド構築物の5'末端から始まって前記構築物の3'プライム末端まで、ヌクレオチド配列は以下のようにアセンブリングされる：シグナル配列／融合タンパク質／リンカー配列／プロテアーゼ切断認識部位／成熟酵素（例えば本発明の酵素、例えばグルコシダーゼ）、又はシグナル配列／プロ配列／成熟酵素／リンカー配列／融合タンパク質。不活性な融合タンパク質としての酵素（例えば本発明の酵素、例えばグルコシダーゼ）の発現は、前記酵素の配列の全体的な発現を改善する可能性、又は活

性酵素の過剰発現に付随する潜在的な毒性を減少させる可能性、及び／又は使用前の酵素の保存期間を延長させる可能性がある（なぜならば、酵素は、融合タンパク質（例えばペクテトリアーゼが前記酵素（例えばグルコシダーゼ）から分離されるまで不活性であろうから）。

【0134】

ハイブリッドグルコシダーゼおよびペプチドライブラリー

ある特徴では、本発明は、本発明の配列を含むハイブリッドグルコシダーゼおよび融合タンパク質（ペプチドライブラリーを含む）を提供する。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的（例えばグルコシダーゼ基質、レセプター、酵素）のペプチド調節物質（例えば活性化物質または阻害物質）を単離することができる。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的に正式な結合パートナー、例えばリガンド、例えばサイトカイン、ホルモンなどを同定することができる。

10

ある特徴では、本発明の融合タンパク質（例えばペプチド部分）は構造的に安定化され（直鎖状ペプチドと比較して）、標的に対してより高い結合親和性を可能にする。本発明は、本発明のグルコシダーゼと他のペプチド（既知の、およびランダムペプチドを含む）の融合を提供する。それらは、グルコシダーゼの構造が顕著には乱されない態様で、さらに前記ペプチドが代謝的にまたは構造的構成的に安定化されるような態様で融合させることができる。これによって、細胞内でのその存在および量を容易にモニターできるペプチドライブラリーの作製が可能になる。

本発明のアミノ酸配列変種は、前記変種の予め定めた性質、天然に存在する形態（例えばグルコシダーゼ配列の対立遺伝子変動または種間変動）とそれらを区別する特徴によって特徴付けられる。ある特徴では、本発明の変種は、天然に存在する類似体と同じ定性的生物学的活性を示す。あるいは、前記変種は改変された特徴を有するものについて選別することができる。ある特徴では、アミノ酸配列の変化を導入する部位または領域が予め決定されるが、変異それ自体は予め決定される必要はない。例えば、ある部位における変種の成果を最適にするために、ランダム変異導入を標的コドンまたは領域で実施し、発現されたグルコシダーゼ変種を所望の活性の最適な組合せについてスクリーニングすることができる。既知の配列を有するDNAの予め定めた部位に置換変異を導入する技術は周知であり、例えばM13プライマー変異導入およびPCR変異導入が含まれる。変異体のスクリーニングはタンパク分解活性のアッセイを用いて実施できる。また別の特徴では、アミノ酸置換は単一残基であり得る。挿入は約1から20アミノ酸の規模であり得る。ただしはるかに大きな挿入も実施することができる。欠失は約1から約20、30、40、50、60、70残基またはそれを超える範囲でもよい。最適な特性を有する最終的な誘導体を得るために、置換、欠失、挿入または前記の任意の組合せを用いることができる。一般的には、これらの変更は数アミノ酸に対して実施し、分子の改変を最小限に止める。しかしながら、ある種の環境ではもっと大きな変更も容認される。

20

30

【0135】

本発明は、そのポリペプチド骨格構造、二次または三次構造（例えばアルファ-ヘリックスまたはベータ-シート構造）が改変されたグルコシダーゼを提供する。ある特徴では、電荷または疎水性が改変されている。ある特徴では、側鎖の嵩が改変されている。保存性が低い置換を選択することによって、機能または免疫学的同一性に本質的な変更がもたらされる。例えば、以下に対してより顕著な影響を与える置換を実施することができる：改変領域のポリペプチド骨格構造（例えばアルファ-ヘリックスまたはベータ-シート構造）；分子の荷電または疎水性部分（活性部位に存在していてもよい）；または側鎖。本発明は、本発明のポリペプチドに以下のような置換を提供する：（a）疎水性残基（例えばセリルまたはスレオニル）で親水性残基（例えばロイシル、イソロイシル、バリルまたはアラニル）を置換する（または前者を後者で置換する）；（b）システインまたはプロリンで他の任意の残基を置換する（または前者を後者で置換する）；（c）陽性荷電側鎖をもつ残基（例えばリジル、アルギニルまたはヒスチジル）で陰性荷電残基（例えばグルタミンまたはアスパルチル）を置換する（または前者を後者で置換する）；または（d）嵩

40

50

の大きな側鎖（例えばフェニルアラニン）で側鎖をもたない残基（例えばグリシン）を置換する（または前者を後者で置換する）。前記変種は同じ定性的生物学的活性（例えばグルコシダーゼ活性）を示し得るが、変種を選別してグルコシダーゼの性状を必要とされるように改変することができる。

【0136】

ある特徴では、本発明のグルコシダーゼは、エピトープもしくは精製タグ、シグナル配列または他の融合配列などを含む。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼは任意のペプチドと融合させて、融合ポリペプチドを形成させることができる。本明細書では“融合”または“機能可能に連結”とは、任意のペプチドおよびグルコシダーゼが、前記グルコシダーゼ構造の安定性の破壊を最小限に止める（例えばグルコシダーゼ活性を維持する）こ

10

とができる態様で一緒に結合されることを意味する。融合ポリペプチド（または融合ポリペプチドをコードする核酸）はさらに別の成分（複数のループに存在する複数のペプチドを含む）も同様に含むことができる。

ある特徴では、ペプチドおよびそれらをコードする核酸はランダム化される。ランダム化は完全なランダム化であっても、またはランダム化が、例えばヌクレオチド／残基頻度において全体的にもしくは位置毎に偏っていてもよい。“ランダム化された”とは各核酸およびペプチドがそれぞれ本質的に任意のヌクレオチドおよびアミノ酸からなることを意味する。ある特徴では、ペプチドを生じる核酸は化学的に合成することができ、したがって、任意の位置に任意のヌクレオチドを取り込むことができる。したがって、核酸が発現されペプチドを生成するとき、任意の位置に任意のアミノ酸残基が取り込まれているであ

20

【0137】

スクリーニングの方法論および“オンライン”モニター装置

30

本発明の方法の実施に際して、多様な装置および方法論を本発明のポリペプチドおよび核酸と併せて用いて、例えばグルコシダーゼ活性についてポリペプチドのスクリーニング、グルコシダーゼ活性の潜在的調節物質（例えば活性化物質または阻害物質）としての化合物のスクリーニング、本発明のポリペプチドと結合する抗体について、本発明の核酸とハイブリダイズする核酸について、本発明のポリペプチドを発現する細胞のスクリーニングなどに用いることができる。

【0138】

キャピラリーアレイ：キャピラリーアレイ、例えばGIGAMATRIX（商標）（Diversa Corporation, San Diego, CA）を本発明の方法で用いることができる。本発明の核酸又はポリペプチドは、アレイ（キャピラリーアレイを含む）に固定又は適用することができる。アレイを用いて組成物（例えば小分子、抗体、核酸など）のライブラリーを本発明の核酸又はポリペプチドとの結合能力又は前記の活性の調節能力についてスクリーニング又はモニターすることができる。キャピラリーアレイはサンプル保持およびスクリーニングのためのまた別のシステムを提供する。例えば、サンプルスクリーニング装置は複数のキャピラリーを含み、前記キャピラリーは、隣接するキャピラリーのアレイを形成し、ここで各キャピラリーはサンプル保持のために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を構成する。前記装置はさらに、アレイ内の隣接するキャピラリーの間に配置された間隙物質及び前記間隙物質内に形成された1つ又は2つ以上の参照用インディシアを含む。サンプルスクリーニング用キャピラリー（キャピラリーアレイに結合できるように調製されている）は、サンプルを保持するために管腔を仕切る第一の壁、及びサンプル励起のために提供される励起エネ

40

50

ルギーの濾過のためのフィルター物質で形成された第二の壁を含むことができる。

【0139】

ポリペプチド又は核酸（例えばリガンド）は、キャピラリーアレイのキャピラリーの少なくとも一部分の第一の成分に導入される。キャピラリーアレイの各キャピラリーは、前記第一の成分を保持するために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を含むことができる。気泡をキャピラリーの第一の成分の後ろに導入することができる。第二の成分をキャピラリーに導入することができ、この場合第二の成分は前記気泡によって第一の成分と分離される。関心のあるサンプルは検出可能な粒子で標識された第一の液体としてキャピラリーアレイのキャピラリーに導入することができる。ここでキャピラリーアレイの各キャピラリーは、第一の液体及び検出可能な粒子を保持するために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を含み、さらに前記少なくとも1つの壁は、前記少なくとも1つの壁に前記検出可能な粒子を結合させるために結合物質で被覆される。前記方法はさらに、キャピラリーチューブから第一の液体を除去する工程（ここで前記結合した検出可能粒子はキャピラリー内に保持される）、及び第二の液体をキャピラリーチューブに導入する工程を含む。

キャピラリーアレイは、管腔を仕切る少なくとも1つの外壁を含む複数の個々のキャピラリーを含むことができる。前記キャピラリーの外壁は1つ又は2つ以上と一緒に融合させた壁であり得る。同様に、前記の壁は、円筒形、四角形、六角形または、前記壁が液体又はサンプルの保持のための管腔を形成することができるかぎり他の任意の幾何学形である管腔を仕切るすることができる。前記キャピラリーアレイのキャピラリーは接近して一緒に保持され平面構造を形成することができる。キャピラリーは、溶融（その場合はキャピラリーは例えばガラスで製造される）、接着剤による接着、縛るかまたは隣同士を留め金で固定することによって一緒に束ねることができる。キャピラリーアレイは、任意の数の個々のキャピラリー、例えば100から4,000,000本の範囲のキャピラリーで形成できる。キャピラリーアレイは、約100,000本またはそれ以上の個々のキャピラリーと一緒に結合させたマイクロタイタープレートを形成することができる。

【0140】

アレイまたは“バイオチップ”：本発明の核酸またはポリペプチドはアレイに固定化または塗布することができる。アレイを用いて、（例えば小分子、抗体、核酸などの）組成物ライブラリーを、本発明の核酸またはポリペプチドと結合するその能力または前記の活性を調節するその能力についてスクリーニングまたはモニターすることができる。例えば本発明のある特徴では、モニターされるパラメーターはグルコシダーゼ遺伝子転写物の発現である。細胞の1つもしくは2つ以上または全ての転写物は、細胞の転写物を含むサンプルのハイブリダイゼーションによって測定することができ、又細胞の代表的な核酸若しくは細胞の転写物と相補的な核酸はアレイ若しくは“バイオチップ”上に固定化された核酸とのハイブリダイゼーションによって測定することができる。マイクロチップ上の核酸“アレイ”を用いることによって、細胞の転写物のいくつかまたは全てを同時に定量することができる。あるいは、ゲノム核酸を含むアレイはまた、本発明の方法によって新規に操作された株の遺伝子型の決定に用いることができる。“ポリペプチドアレイ”はまた、複数のタンパク質の同時定量に用いることができる。本発明は公知の任意の“アレイ”（“マイクロアレイ”または“核酸アレイ”または“ポリペプチドアレイ”または“抗体アレイ”または“バイオチップ”またはその変型とも称される）を用いて実施することができる。アレイは一般的には複数の“スポット”または“標的エレメント”である。各標的エレメントは一定量の1つまたは2つ以上の生物学的分子、例えばオリゴヌクレオチドを含み、それらはサンプル分子（例えばmRNA転写物）と特異的に結合させるため基質表面の一定領域に固定されている。

【0141】

本発明の方法の実施に際して、任意の公知のアレイおよび／またはアレイの製造および使用方法の全体もしくは部分またはその変型を取り入れることができる。それらは例えば以下に記載されているようなものである：米国特許第6,277,628号；第6,277,489号；第6,261,776号；第6,258,606号；第6,054,270号；第6,048,695号；第6,045,996号；第6,022,9

10

20

30

40

50

63号；第6,013,440号；第5,965,452号；第5,959,098号；第5,856,174号；第5,830,645号；第5,770,456号；第5,632,957号；第5,556,752号；第5,143,854号；第5,807,522号；第5,800,992号；第5,744,305号；第5,700,637号；第5,556,752号；第5,434,049号。さらにまた例えば以下を参照されたい：W099/5173；W099/09217；W097/46313；W096/17958。さらにまた例えば以下を参照されたい：Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174；Schumme r (1997) Biotechniques 23:1087-1092；Kern (1997) Biotechniques 23:120-124；Solin as-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407；Bowtell (1999) Nature Ge netis Supp. 21:25-32。さらにまた以下を参照されたい：米国特許出願公開広報第200100 18642号；同第20010019827号；同第20010016322号；同第20010014449号；同第2001001444 8号；同第20010012537号；同第20010008765号。

10

【0142】

抗体および抗体使用スクリーニング方法

本発明は、本発明のグルコシダーゼと特異的に結合する単離または組換え抗体を提供する。これらの抗体を用いて、本発明のグルコシダーゼまたは関連するポリペプチドを単離、同定または定量することができる。これらの抗体を用いて本発明の範囲内に包含される他のポリペプチドまたは他の関連するグルコシダーゼを単離することができる。これらの抗体はグルコシダーゼの活性部位と結合するように設計することができる。したがって、本発明は、本発明の抗体を用いてグルコシダーゼを阻害する方法を提供する。

前記抗体は、免疫沈澱、染色、イムノアフィニティークラムなどで用いることができる。所望の場合は、特異的な抗原をコードする核酸配列を、免疫とそれに続くポリペプチドまたは核酸の単離、増幅またはクローニングおよびポリペプチドの本発明のアレイ上への固定によって作製することができる。あるいは、本発明の方法を用いて、改変されるべき細胞により産生される抗体の構造を改変することができる。例えば抗体の親和性を強化または低下させることができる。さらにまた、抗体を製造または改変する能力は本発明の方法により細胞を操作して付与した表現型であり得る。

20

【0143】

免疫、抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）の製造および単離の方法は当業者には公知で、さらに学術文献および特許文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：Coligan, Current Protocols in Immunology, Wiley/Greene, NY (1991)；Stites (e ds.) Basic and Clinical Immunology (7th ed.) Lang Medical Publications, Los Alto s, CA ("Stites")；Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2nd ed.) Academic Press, New York, NY (1986)；Kohler (1975) Nature 256:495；Harlow (198 8) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York。抗体はまた、動物を用いる従来の *in vivo* 方法以外でも、*in vitro* で例えば組換え抗体結合部位発現ファージディスプレイライブラリーを用いて作製することができる。例えば以下を参照されたい：Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70；Katz (1997) Ann u. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45。

30

ポリペプチドまたはペプチドを用いて、前記ポリペプチド（例えば本発明のグルコシダーゼ）と特異的に結合する抗体を作製することができる。得られた抗体は前記ポリペプチドを単離または精製するためにイムノアフィニティークロマトグラフィー方法で用いることも前記ポリペプチドが生物学的サンプルに存在するか否かを決定するために用いることもできる。そのような方法では、タンパク質調製物（例えば抽出物）または生物学的サンプルを本発明のポリペプチドの1つと特異的に結合することができる抗体と接触させる。

40

イムノアフィニティー手順では、前記抗体を固相（例えばビーズまたは他のカラムマトリックス）に付着させる。抗体が本発明のポリペプチドの1つと特異的に結合する条件下で、前記タンパク質調製物を前記抗体と接触させる。洗浄して非特異的に結合したタンパク質を除去した後、特異的に結合したポリペプチドを溶出させる。

【0144】

生物学的サンプル中のタンパク質が前記抗体と結合できるということは、当業者に周知の多様な方法を用いて決定できる。例えば、結合は抗体を検出可能な標識（例えば蛍光物

50

質、酵素標識または放射性同位元素）で標識することによって決定できる。あるいは、抗体とサンプルとの結合は、前記のような検出可能な標識をその上に保持する二次抗体を用いて検出してもよい。具体的なアッセイにはELISAアッセイ、サンドイッチアッセイ、放射能免疫アッセイおよびウェスタンブロットが含まれる。

本発明のポリペプチドに対して作製されるポリクローナル抗体は、動物に前記ポリペプチドを直接注射することによって、または非ヒト動物に前記ポリペプチドを投与することによって得ることができる。そのようにして得られた抗体は前記ポリペプチド自体と結合するであろう。このようにして、ポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえも完全な天然のポリペプチドと結合することができる抗体の作製に用いることができる。続いて前記のような抗体を用いて、前記ポリペプチドを発現している細胞から前記ポリペプチドを単離することができる。

10

モノクローナル抗体の調製の場合、連続的な細胞株培養によって生成される抗体を提供するいずれの技術も用いることができる。その例にはハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術およびEBV-ハイブリドーマ技術が含まれる（例えば以下を参照されたい：Cole (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）。

単鎖抗体の生成のために記載された技術（例えば米国特許第4,946,778号を参照されたい）を利用して、本発明のポリペプチドに対する単鎖抗体を生成することができる。あるいは、遺伝子導入マウスを用いて、これらポリペプチドまたはそのフラグメントに対するヒト化抗体を発現させることができる。

20

本発明のポリペプチドに対して作製された抗体を他の生物およびサンプル由来の類似のポリペプチド（例えばグルコシダーゼ）のスクリーニングに用いることができる。そのような技術では、前記生物由来のポリペプチドを抗体と接触させ、さらに前記抗体と特異的に結合するポリペプチドが検出される。上記に記載したいずれの方法も抗体結合の検出に用いることができる。

【0145】

キット

本発明は、前記構成物（例えば本発明の核酸、発現カセット、ベクター、細胞、トランスジェニック種子または植物もしくは植物部分、ポリペプチド（例えばグルコシダーゼ）および／または抗体）を含むキットを提供する。前記キットはまた、本明細書に記載されたような本発明の方法論および工業的使用を教示する指示資料を含むことができる。

30

【0146】

代謝パラメーターの測定

本発明の方法は、細胞の遺伝的構成を改変することによって、新規な表現型（例えば新規なまたは改変されたグルコシダーゼ活性）を持つ新規な細胞株を開発するために、全細胞進化または全細胞操作を提供する。前記遺伝的構成は、本発明の核酸を細胞に導入することによって改変することができる。新規な表現型を検出するために、改変細胞の少なくとも1つの代謝パラメータが“リアルタイム”または“オンライン”の時間枠でモニターされる。ある特徴では、複数の細胞（例えば細胞培養）が“リアルタイム”または“オンライン”でモニターされる。ある特徴では、複数の代謝パラメータが“リアルタイム”または“オンライン”でモニターされる。代謝パラメータは本発明のグルコシダーゼを用いてモニターできる。

40

代謝フラックス分析（MFA）は公知の生化学的フレームワークを基にしている。線形独立な代謝マトリックスを、細胞内代謝物に対する質量保存の法則および擬似定常状態仮説（pseudo-steady state hypothesis, PSSH）に基づいて構築する。本発明の方法の実施に際して、以下を含む代謝ネットワークが確立される：

- －全ての経路の基質、生成物および中間代謝物の実体；
- －前記経路の代謝物を変換する全ての化学反応の実体、前記経路の反応の化学量論；
- －前記反応を触媒する全ての酵素の実体、前記酵素反応のカイネティクス；
- －経路の構成要素間の調節的相互作用、例えばアロステリック相互作用、酵素-酵素相

50

互作用など；

－酵素の細胞内区画局在性または前記酵素の分子レベルを超えるその他の機構；および
－代謝物、酵素またはエフェクター分子の何らかの濃度勾配またはそれらの移動に対する拡散障壁の存在。

ある株について前記代謝ネットワークがいったん確立されたら、マトリックス表記による数学的表現を導入し、オンライン代謝物データが利用可能ならば細胞内代謝フラックスを概算することができる。代謝表現型は細胞内の全体的な代謝ネットワークの変化に依存する。代謝表現型は、環境条件、遺伝的調節、生育状態および遺伝子型などに対応する経路の利用頻度変化に左右される。本発明の方法のある特徴では、オンラインMFA計算の後で、細胞の動的態様、細胞の表現型および他の特性が経路の利用頻度を精査することによって分析される。例えば、酵母の発酵時にグルコースの供給が増加し、酸素が減少する場合、呼吸経路の利用は低下および／または停止し、発酵経路の利用が優先的になるであろう。細胞培養の生理的状态の制御は前記経路分析の後で可能になるであろう。本発明の方法は、基質供給、温度、誘導物質などをどのように変化させるか、細胞の生理的条件を制御して所望の方向にどのように誘導するかを決定することによって発酵の操作方法の決定に役立つことができる。本発明の方法の実施に際して、MFAの結果はまた、代謝の操作または遺伝子シャッフリングなどのために実験およびプロトコル設計のために転写物データおよびタンパク質データと比較することができる。

10

本発明の実施では、任意の改変表現型または新規な表現型（細胞の新規なまたは改善された性状を含む）を付与及び検出することができる。代謝または増殖のいずれの特徴もモニターすることができる。

20

【0147】

mRNA転写物発現のモニタリング：本発明のある特徴では、操作された表現型は、細胞内でのmRNA転写物（例えばグルコシダーゼメッセージ）の発現の増加もしくは減少、または新規転写物（例えばグルコシダーゼ）の生成を含む。この発現増加または低下は、本発明のグルコシダーゼの存在について試験するか、またはグルコシダーゼ活性のアッセイによって追跡することができる。mRNA転写物（またはメッセージ）はまた、当業界で公知の任意の方法（ノザンプロット、定量的増幅反応、アレイへのハイブリダイゼーションなどなどを含む）によって検出および定量することができる。定量的増幅反応は、例えば定量的PCR（例えば定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（またはRT-PCR）を含む）；定量的リアルタイムRT-PCR（または“リアルタイムカイネティックRT-PCR”）を含む（例えば以下を参照されたい：Kreuzer (2000) Br. J. Haematol. 114:313-318; Xia (2001) Transplantation 72:907-914）。

30

本発明のある特徴では、操作される表現型は相同遺伝子の発現をロックアウトすることによって生成される。前記遺伝子のコード配列または1つもしくは2つ以上の転写制御エレメント（例えばプロモーターまたはエンハンサー）をロックアウトすることができる。したがって転写物の発現は完全に除去されるか、または単に減少させることができる。

本発明のある特徴では、操作される表現型は相同遺伝子の発現の増加を含む。これは、負の制御エレメント（cis-またはtrans-で作用する転写調節エレメントを含む）のロックアウト、または正の制御エレメントの突然変異導入によって実施できる。細胞の1つもしくは2つ以上または全ての転写物を、細胞の転写物を含むサンプルのハイブリダイゼーションによって測定することができ、また細胞の代表的核酸もしくは細胞の転写物と相補的な核酸をアレイ上に固定化された核酸とのハイブリダイゼーションによって測定することができる。

40

【0148】

ポリペプチド、ペプチドおよびアミノ酸の発現のモニタリング：本発明のある特徴では、操作される表現型は、細胞内でのポリペプチド（例えばグルコシダーゼ）の発現の増加もしくは低下、または新規なポリペプチドの生成を含む。前記の発現増加または低下は、存在するグルコシダーゼ量の決定またはグルコシダーゼ活性のアッセイによって追跡することができる。ポリペプチド、ペプチドおよびアミノ酸はまた、当業界で公知の任意の方

50

法（例えば核磁気共鳴（NMR）、分光光度法、ラジオグラフィー（タンパク質放射標識）、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高拡散クロマトグラフィー、多様な免疫学的方法、例えば免疫沈澱、免疫拡散、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、ゲル電気泳動（例えばSDS-PAGE）、抗体による染色、蛍光活性化細胞分類装置（FACS）、熱分解質量分析法、フーリエ変換赤外線分光分析、ラマン分光分析、GC-MS、並びにLC-エレクトロスプレーおよびcap-LC-タンデム-エレクトロスプレー質量分析などを含む）によって検出および定量することができる。新規な生物活性はまた、米国特許第6,057,103号に記載された方法またはその変法を用いてスクリーニングできる。さらにまた以下で詳細に考察されるように、細胞のポリペプチドの1つまたは2つ以上、またはその全てをタンパク質アレイを用いて測定することができる。

10

【0149】

本発明の酵素の工業的及び医学的使用

本発明は、本発明のグルコシダーゼ及び他のポリペプチド（例えば抗体）のための多くの工業的使用及び医学的応用を提供する。例えば、本発明はデンプンの液化のための酵素及び方法を提供する。液化デンプンをグルコースに変換する工程で使用される多くのグルコアミラーゼは α (1,6)結合を加水分解することができない。この欠陥のためにほぼ5%の糖がパンノース及びイソマルトースとして残留する。しかしながら、ある特徴では、本発明の酵素、例えば配列番号:8（配列番号:7によってコードされる）、配列番号:10（配列番号:9によってコードされる）、配列番号:12（配列番号:11によってコードされる）及び配列番号:20（配列番号:19によってコードされる）はデンプンをグルコースに変換し、グルコース製造を最大に増加させることができる（液化デンプンのグルコースへの変換を含む）。ある特徴では、本発明は、 α (1,6)結合の加水分解並びにパンノース及びイソメラ

20

洗剤組成物：本発明は、1つまたは2つ以上の本発明のポリペプチドを含む洗剤組成物、並びに前記組成物の製造および使用方法を提供する。本発明は、洗剤組成物を製造および使用する方法の全てを取り込んでいる。例えば、米国特許6,413,928号、同6,399,561号、同6,365,561号、同6,380,147号を参照されたい。前記洗剤組成物は、一要素及び二要素水溶液組成物、非水溶液組成物形態、注型成形固体形態、顆粒形態、粒状形態、圧縮錠剤形態、ゲルおよび／またはペーストおよびスラリー形態であり得る。本発明はまた、甚だしい食べ物の汚れ、食べ物の残渣および他のわずかな食物組成物の薄層を前記洗剤組成物を用いて迅速に除去することができる方法を提供する。本発明のグルコシダーゼは、デンプン多糖類の触媒的加水分解によりデンプン性の汚れの除去を促進することができる。本発明のグルコシダーゼは、皿洗浄洗剤、織物の洗濯洗剤として用いることができる。

30

【0150】

実際の活性酵素含有量は、前記洗剤溶液が所望の酵素活性を有すると仮定して、洗剤組成物の製造方法によって左右され重要ではない。ある特徴では、最終溶液に存在するグルコシダーゼの量は、製剤組成物1gにつき約0.001mgから0.5mgの範囲である。本発明の方法および組成物で使用するために選択される具体的な酵素は、最終的な利用条件（製品の物理的形態、使用pH、使用温度、並びに分解および改変されるべき汚れのタイプを含む）によって左右される。酵素は、与えられた使用条件のいずれに対しても最適の活性および安定性を提供するように選択することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、約4から約12の範囲のpH、約20°Cから約95°Cの範囲の温度で活性を有する。本発明の洗剤は、陽イオン性、半極性非イオン性または双性イオン性界面活性剤または前記の混合物を含むことができる。

40

本発明のグルコシダーゼは粉末または液体洗剤として処方できる（約0.01から約5質量%（好ましくは0.1から0.5質量%）のレベルで4.0から12.0のpHを有する）。前記洗剤組成物はまた他の酵素、例えば既知のプロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、またはエンドグリコシダーゼをビルダー及び安定化剤とともに含むことができる。通常の洗浄組成物への本発明のグルコシダーゼの添加は特別な使用制限をもたらさない。換言すれば、pHが上

50

記の範囲内であり、温度が指定された酵素の変性温度以下である限り、前記洗剤に適した任意の温度およびpHがまた本発明の組成物に適切である。さらにまた、本発明のポリペプチドは洗剤を含まない洗浄組成物で、単独でも又はビルダー及び安定化剤と一緒に用いることができる。

本発明は、硬質表面を洗浄する洗剤組成物、布地を洗浄する洗剤組成物、皿洗浄組成物、口内洗浄組成物、歯磨き組成物、およびコンタクトレンズ洗浄溶液を含む洗浄組成物を提供する。

【0151】

ある特徴では、本発明は、洗浄のために十分な条件下で対象物を本発明のポリペプチドと接触させることを含む対象物の洗浄方法を提供する。本発明のポリペプチドは、洗剤添加物として含有させることができる。本発明の洗剤組成物は、本発明のポリペプチドを含む例えば手洗い用又は機械による洗濯洗剤組成物として処方することができる。汚れの付着した布地の前処理に適切な洗濯添加剤は本発明のポリペプチドを含むことができる。布地の柔軟化組成物は本発明のポリペプチドを含むことができる。あるいは、本発明のポリペプチドは、一般的な家事用硬質表面洗浄作業で使用される洗剤組成物として処方することができる。また別の特徴では、本発明の洗剤添加物および洗剤組成物は、1つまたは2つ以上の他の酵素、例えばプロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、別のグルコシダーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、例えばラクターゼ及び／又はペルオキシダーゼを含むことができる。本発明の酵素の特性は、選択した洗剤に適合するように選択され（すなわち、最適pH、他の酵素および非酵素成分に対する適合性など）、さらに酵素は有効量で存在する。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼ酵素を用いて布地から悪臭を有する物質が除去される。種々の洗剤組成物及び本発明の実施で用いることができる前記の製造方法は、例えば米国特許6,333,301号、同6,329,333号、同6,326,341号、同6,297,038号、同6,309,871号、同6,204,232号、同6,197,070号、同5,856,164号に記載されている。

【0152】

織物(fabric)の処理：本発明は、本発明の1つまたは2つ以上のポリペプチドを用いて織物を処理する方法を提供する。本発明のポリペプチドは任意の織物処理方法で用いることができる。前記方法は当業界では周知で、例えば米国特許6,077,316号を参照されたい。例えば、ある特徴では、織物の感触および外観は、織物を本発明の溶液中のグルコシダーゼと接触させることを含む方法によって改善される。ある特徴では、織物は加圧下で前記溶液で処理される。

ある特徴では、本発明の酵素は、布地を織っている間若しくは織った後で、または脱サイズ工程中に、又は1つ若しくは2つ以上のまた別の織物加工工程中に適用される。布地が織られている間、糸は強い機械的緊張に暴露される。織機で布を織る前に、縦糸はしばしば糊付け澱粉または澱粉誘導体で被覆され、その引張り強度が高められ破損が防止される。本発明の酵素は前記の糊付け澱粉または澱粉誘導体の除去に用いることができる。布地を織り上げた後、繊維を脱サイズ工程で処理することができる。前記工程の後に1つまたは2つ以上のまた別の織物加工工程が続く。脱サイズは“糊”を布地から除去する作業である。機織り後に、前記糊コーティングは更なる織物加工の前に除去され、均質で耐洗浄性が得られたことを担保しなければならない。本発明は、本発明の酵素の作用による“糊”の酵素による加水分解を含む脱サイズ方法を提供する。

【0153】

本発明の酵素を洗剤添加物として（例えば水性組成物中で）用いて、織物（綿含有織物を含む）を脱サイズすることができる。本発明はインジゴ染色デニム織物および衣料にストーンウォッシュ（stonewashed）の外観を生じる方法を提供する。衣服の製造のために、布地を切断して衣服または衣料に縫製することができる。これら衣類は前記処理の前または後で完成される。特にデニムのジーンズ製造の場合、種々の酵素仕上げ方法が開発されている。デニムの衣料の仕上げは酵素による脱サイズ工程から始まり、その間衣料はアミロース分解酵素作用に付されて、柔軟さが織物に提供され、さらに綿をその後の酵素仕

上げ工程に馴染みやすくさせる。本発明は、本発明のグルコシダーゼを用いてデニムの衣料を仕上げる方法（例えば“バイオストーニング工程”）、酵素による脱サイズおよび布地に柔軟さを提供する方法を提供する。本発明は、脱サイズおよび／または仕上げ工程でデニム衣料を迅速に柔軟化する方法を提供する。

【0154】

食品及び食品加工：本発明の酵素は食品加工工業において多数の用途を有する。本発明のグルコシダーゼはデンプンからフルクトースへの加工処理で用いられる。デンプンからフルクトースへの加工処理は以下の4つの工程からなる：顆粒デンプンの液化、前記液化デンプンのデキストロースへの糖化、精製及びフルクトースへの異性化。

本発明は本発明の酵素を用いるデンプンの液化方法を提供する。デンプンポリマー顆粒の濃縮懸濁液は鎖の長さがより短い低粘性の可溶性デキストリン溶液に変換される。この工程は、標準的な装置を用いる簡便な処理、及びグルコース又は 10^3 の他の糖への効率的な変換に有用である。ある特徴では、顆粒デンプンは、温度を約72℃を超える温度に上昇させることによって顆粒をゼラチン化して液化される。前記加熱処理は瞬時に可溶性デンプン顆粒を破壊し、水溶性デンプン溶液を生成する。続いて前記可溶性デンプン溶液を本発明のグルコシダーゼにより液化することができる。したがって、本発明は、本発明のグルコシダーゼを用いる酵素によるデンプン液化処理を提供する。

例示的な酵素液化処理は、顆粒デンプンスラリーのpHを6.0から6.5の間に調整し、さらに水酸化カルシウム、水酸化ナトリウム又は炭酸ナトリウムの添加を必要とする。ある特徴では、水酸化カルシウムが添加される。これによりカルシウムイオンが提供され、本発明のグルコシダーゼが不活化に対して安定化される。ある特徴では、グルコシダーゼの添加に際して、懸濁液はポンプで蒸気噴出流中を通され、瞬間的に温度が80℃-115℃に上昇する。ある特徴では、デンプンは直ちにゼラチン化され、さらにグルコシダーゼの存在により、 α -1,4-グルコシド結合がランダムに加水分解されて脱重合し液体となる。前記液体は容易にポンプで押し出すことができる。

本発明のまた別の処理は、少なくとも1つの本発明のポリペプチドを用いるデンプンバイオプロセッシングプロトコルを含む。ある特徴では、本発明のバイオプロセッシングプロトコルは液化及び糖化の2つの工程を含む。ある特徴では、液化中にデンプン顆粒は、約105℃から110℃で約5分間、約pH5.8から6.5の水溶液中でゼラチン化される。液化後に、糖化のためにpHを約4.2から5.0に調節し、温度を約55℃から60℃に下げて24から72時間処理される。

【0155】

ある特徴において、本発明は、本発明のグルコシダーゼを用いる種々の酵素的デンプン液化処理方法を提供する。本発明の液化処理のある特徴では、グルコシダーゼはデンプン懸濁液に添加され、前記懸濁液は約80℃から100℃の間の温度で維持され、部分的にデンプン顆粒が加水分解される。ある特徴では、前記部分的に加水分解されたデンプン懸濁液は約105℃を越える温度でポンプによって噴出流中を通され、残留する顆粒構造のいずれも完全にゼラチン化される。ある特徴では、前記ゼラチン化デンプンを冷却した後、第二のグルコシダーゼ添加が実施されデンプンはさらに加水分解される。ある特徴では、デンプンの加工手順は、デンプンの液化のためにデンプンスラリーのpHをpH5.8に調節することを含む。ある特徴では、デンプンの加工手順は、糖化工程のためにデンプン液化後にスラリーのpHを約4.2から4.5に低下させることを含む。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼを用いる本発明のデンプン加工手順はpHを調節することなく液化及び糖化することを含む。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼを用いる本発明のデンプンのバイオプロセッシングプロトコル（例えば液化及び／又は糖化工程）は、比較的高温下で、例えば約50℃、又は約55℃、又は約60℃、又は約65℃、又は約70℃、又は約80℃、又は約85℃、又は約90℃、又は約95℃、又は約100℃で実施される。また別の特徴では、本発明のグルコシダーゼを用いる本発明のデンプン加工手順はpHを調節することなく液化及び糖化することを含む。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼを用いる本発明のデンプンのバイオプロセッシングプロトコルは、標準的な工業的方法と比べて、比較的高い基質濃度及び／又は

可溶性、低い粘度、高い反応速度、短い実施時間、低コストの酵素精製及び／又は長い触媒半減期を利用して実施される。

【0156】

本発明は、本発明のグルコシダーゼを用いる酵素による乾式製粉処理法を提供する。乾式製粉では、全粒をすり潰し水と一緒にする。胚芽は場合によって浮遊選別又は同等な技術で除去する。得られた混合物（デンプン、繊維、タンパク質及び穀粒中の他の成分を含む）をグルコシダーゼを用いて液化する。ある特徴では、酵素による液化は上記で述べたデンプンの液化処理よりも低い温度で実施される。ある特徴では、ゼラチン化の後、デンプン溶液はDEが10 - 20に達するまでグルコシダーゼの存在下で温度を上昇させて維持される。ある特徴では、この時間は約1 - 3時間である。デキストロース当量（DE）とは、全還元糖の濃度測定のための工業標準であり、乾燥質量基準でD-グルコースとして計算される。加水分解されていない顆粒デンプンはDEが実質的に0であり、一方D-グルコースのDEは100と定義される。

10

本発明は、本発明の酵素を用いる湿式製粉処理法、例えばトウモロコシの湿式製粉を提供する。トウモロコシの湿式製粉は、トウモロコシ油、グルテンミール、グルテン飼料及びデンプンを製造する方法である。したがって、本発明は、本発明の酵素を用いるトウモロコシ油、グルテンミール、グルテン飼料及びデンプンを製造する方法を提供する。ある特徴では、本発明のアルカリ性グルコシダーゼがデンプンの液化で使用される。ある特徴では、グルコグルコシダーゼが糖化に用いられ、グルコースが製造される。

ある特徴では、トウモロコシ（種子外皮（繊維）、デンプン、デンプン及びグルコースの組合せ、並びに内胚（inner germ）からなる穀粒）を4工程処理に付し、前記処理法はデンプンの製造をもたらす。ある特徴では、トウモロコシを浸漬し、胚芽を除去し、繊維を除去し、さらにグルテンを分離する。浸漬処理では可溶化物が除去される。可溶化物の除去後に残留する生成物から胚芽が除去され、トウモロコシ油およびオイルケーキが生成され、浸漬工程から得られた可溶化物に添加される。残余の生成物から繊維を除去し、前記繊維固形物は前記オイルケーキ/可溶化物の混合物に添加される。この繊維固形物、オイルケーキ及び可溶化物の混合物はグルテン飼料を形成する。脱繊維後、残余の生成物をグルテン分離に付す。この分離によってグルテンミール及びデンプンが得られる。続いて本発明のポリペプチドを用い、前記デンプンを液化及び糖化に付してグルコースを製造する。

20

30

【0157】

本発明は、本発明のグルコシダーゼを用いる抗老化（アンチステーリング）処理法（anti-staling process）、例えば焼成製品（例えばパン）の抗老化処理法を提供する。本発明は、本発明のグルコシダーゼを用いて、（例えば焼成製品の）肉質部の堅さが増すのを遅らせ、さらに肉質部の弾力性が低下するのを遅らせる方法を提供する。焼成製品（例えばパン）の老化はパン製品の製造時と消費時との間の時間が経過するにつれ重大さを増していく。老化（ステーリング；staling）という用語は、オープンから出した後の、消費者にとっての望ましくないパン製品の特性の変化を指すために用いられる。前記変化は、例えば肉質部の堅さの増加、肉質部の弾力性の低下、及びパン外皮の変化（咀嚼し難い堅さになる）である。パンの肉質部の堅さはさらに保存中に不快とみなされるレベルにまで増加する。本発明のグルコシダーゼは、例えば米国特許6,197,352号；2,615,810号及び3,026,205号；Silberstein (1964) Baker's Digest 38:66-72に記載されているようにパンの老化を遅らせるために用いられる。

40

ある特徴では、本発明の酵素は、焼成製品の老化（ステーリング）を遅らせ、一方デンプンを分枝デキストリンに加水分解させないために用いられる。分枝デキストリンは、 α -グルコシダーゼの加水分解作用によって生成されるデキストリンの分枝鎖（ α -グルコシダーゼによってさらに分解されない）を切断することによって形成される。これによって、製造されたパンにおいて粘着性のある肉質部が生じ得る。したがって、本発明は、エキソグルコシダーゼ活性を含む本発明の酵素を焼成製品の製造に使用される小麦粉又は生地

50

提供する。本発明のエキシグルコシダーゼは、グルコグルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ（ β -構造のマルトースを遊離させる）及び／又は麦芽糖生成グルコシダーゼ活性を有し得る。

本発明はまた、パンの老化を遅らせるために有効な量で本発明のグルコシダーゼを前記生地添加到することを含む、生地又は生地から製造される焼成製品の製造方法を提供する。本発明はまた、グルコシダーゼを含む生地、及びグルコシダーゼと一緒に小麦粉を含むプレミックスを提供する。最後に本発明は、ベーキング用酵素添加物（前記グルコシダーゼを含む）を提供する。

本発明はまた、高品質のトウモロコシ繊維ゴム製造のための高収量処理法を提供し、前記方法は、トウモロコシ繊維を本発明の酵素で処理し、続いて過酸化水素で処理して粉碎トウモロコシ繊維の抽出物を得る工程を含む。例えば米国特許6,147,206号を参照されたい。 10

【0158】

動物の飼料及び添加物：本発明は、本発明のグルコシダーゼ酵素を用いて動物の飼料及び添加物を処理する方法を提供する。本発明は、本発明のグルコシダーゼを含む動物の飼料及び添加物を提供する。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼ酵素を用いて動物の飼料及び添加物を処理することによって、動物の飼料又は添加物中のデンプンの利用性を高めることができる。これによって、消化が簡単で吸収が容易な糖を遊離させることができる。

本発明のグルコシダーゼを使用することによって、動物又は鳥類の消化能力を高めることができる。本発明のグルコシダーゼを使用することによって、より良好な成長及び能力のために適切な栄養補給物の利用性が担保される。ある特徴では、本発明の酵素は動物の飼料添加物として添加することができる。別の特徴では、動物飼料を動物が消費するに先立ってグルコシダーゼで処理することができる。また別の特徴では、グルコシダーゼは、トランスジェニックな飼料作物（例えばトランスジェニック植物、種子など）、例えばトウモロコシで前記酵素を直接発現させることによって供給することができる。上記で述べたように、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物部分および植物細胞を提供する。ある特徴では、前記核酸は、グルコシダーゼが回収可能な量で産生されるように発現される。グルコシダーゼはいずれの植物または植物部分からも回収することができる。あるいは、組換えポリペプチドを含む植物または植物部分は、食物または飼料の質を改善するために、例えば栄養価、賞味性および流動特性を改善するために、または栄養阻害因子を破壊するために用いることができる。 20 30

【0159】

紙又はパルプの処理：本発明の酵素は紙若しくはパルプの処理、又は紙の脱インクで用いることができる。例えばある特徴では、本発明は本発明のグルコシダーゼを用いる紙の処理方法を提供する。ある特徴では、本発明の酵素を用いて紙の中のデンプンを改変し、それによってデンプンを液化型にすることができる。また別の特徴では、再生コピー用紙の紙成分が、化学的及び酵素的脱インク処理される。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼはセルラーゼと併用して用いることができる。紙は以下の3つの工程によって処理することができる：1）本発明の酵素の存在下での分解；2）脱インク物質及び本発明の酵素による分解；及び／又は3）本発明の酵素に浸漬した後での分解。グルコシダーゼで処理したりサイクル紙は、単にセルラーゼだけで処理された紙と比較してトナー粒子が除去されているために白さが増すであろう。本発明はいずれの特定の理論にも拘束されないが、本発明のグルコシダーゼの効果は、パルプ懸濁液中の界面活性剤としてのその働きによるものである。 40

本発明は、本発明の1つまたは2つ以上のポリペプチドを用いる紙および紙パルプの処理方法を提供する。本発明のポリペプチドは任意の紙処理またはパルプ処理方法で用いることができる。前記方法は当業界で周知であり、例えば米国特許6,241,849号、同6,066,233号、同5,582,681号を参照されたい。例えばある特徴では、本発明は、染料を含む印刷された紙の脱インクおよび脱色のための方法を提供する。前記方法は、印刷された紙をパル 50

ブ化してパルプスラリーを得て、本発明の酵素（他の酵素もまた添加することができる）の存在下でインクを前記パルプスラリーから除去することを含む。別の特徴では、本発明は、パルプ（例えば二次繊維から製造されたパルプ）のろ水度を高める方法を提供し、前記方法は、本発明の酵素を含む酵素混合物（他の酵素、例えばペクチナーゼもまた含むことができる）をパルプに添加し、酵素処理パルプを生成する反応を惹起させる条件下で処理することによって実施される。前記酵素処理パルプのろ水度は、白さが低下することなく二次繊維パルプの最初のろ水度より高められる。

【0160】

再パルプ化：リグノセルロース素材の処理：本発明はまたリグノセルロース繊維の処理方法を提供する。前記方法では、繊維はその特性の改善に有効な量の本発明のポリペプチドにより処理される。本発明のグルコシダーゼはまた、デンプン補強反古紙及び厚紙からリグノセルロース素材（例えばパルプ、紙及び厚紙）を製造するとき、特に再パルプ化が7を超えるpHで実施され、さらにグルコシダーゼが前記廃棄材料の分解を補強デンプンの分解により促進できる場合に用いることができる。本発明のグルコシダーゼは、デンプン被覆印刷紙から製紙用パルプを製造する方法において有用である。前記方法は例えばW095/14807に開示されたように実施することができる。

例示的な方法は、紙を分解してパルプを製造し、前記分解前、分解中又は分解後にデンプン分解酵素で処理し、さらに分解処理及び酵素処理後にインク粒子をパルプから分離する工程を含む。例えば米国特許6,309,871号及び前記文献中に引用された他の米国特許を参照されたい。したがって、本発明は、リサイクル紙を酵素によって脱インクする方法を含み、この場合、前記ポリペプチドは繊維表面の効果的な脱インクに有効な量で適用される。

【0161】

廃棄物処理：本発明の酵素は多様な他の工業的用途、例えば廃棄物処理で用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明は、本発明の酵素を用いる固形廃棄物消化方法を提供する。前記方法は、かなり未処理の固形廃棄物の大きさ及び体積を減少させることを含むであろう。固形廃棄物は、制御温度で酵素溶液（本発明の酵素を含む）の存在下で酵素消化方法により処理することができる。これによって添加微生物がもたらす相当な細菌発酵無しに反応が生じる。前記固形廃棄物は液化廃棄物及びいくらかの残留固形廃棄物に変換される。生じた液化廃棄物は前記いくらかの残留固形廃棄物から分離することができる。例えば米国特許5,709,796号を参照されたい。

口腔手入れ製品：本発明は、本発明のグルコシダーゼを含む口腔手入れ製品を提供する。例示的な口内手入れ製品には、練り歯磨き、歯磨きクリーム、ゲルまたは歯磨き粉、オドンティクス、口内洗浄液、歯磨き前または歯磨き後の洗浄剤、チューインガム、ロゼンジまたはキャンデーが含まれる。例えば米国特許6,264,925号を参照されたい。

【0162】

醸造および発酵：本発明は、本発明のグルコシダーゼを含むビール醸造（例えば発酵）方法を提供する。ある例示的な方法では、デンプン含有原料を分解し処理してモルトを形成する。本発明のグルコシダーゼは発酵処理の任意の時点で用いられる。例えば、本発明のグルコシダーゼはオオムギモルトの加工時に用いることができる。ビール醸造の主要な原料はオオムギモルトである。これは三段階処理法であり得る。第一に、オオムギの穀粒を浸漬して水分含有量を、例えば約40%程度に増加させる。第二に、前記穀粒を酵素合成がジベレリンの制御下で刺激される3から6日間、15から25℃でインキュベートすることによって発芽させることができる。この期間中にグルコシダーゼレベルは顕著に増加する。ある特徴では、本発明のグルコシダーゼは前記方法のこの段階（または他の任意の段階）で添加される。グルコシダーゼの作用は発酵可能な還元糖の増加をもたらす。これはジアスターゼ能力（DP）として表すことができ、DPは12℃、5日間でおおよそ80から190に上昇し得る。

本発明のグルコシダーゼは、例えば米国特許5,762,991号、同5,536,650号、同5,405,624号、同5,021,246号、同4,788,066号に記載されたように、任意のビール製造方法で用い

10

20

30

40

50

ることができる。

【0163】

他の工業的利用：本発明はまた、地下層から生じる産出流体流を増加させる方法を提供する。このことは、産出作業中に形成され、完成した井孔を取り巻く地下層内で見出される粘稠なデンプンを含む有害な流体を除去することによって達成される。この方法は、産出流体を井孔から流出させ、前記地下層から生じる産出流体流を予想される流速未満に低下させ、水性液および本発明のポリペプチドと一緒に混合することによって酵素処理物を調合し、前記酵素処理物を前記井孔内の所望の場所にポンプで送り込み、前記酵素処理物で粘稠なデンプンを含む有害流体を分解させそれによって地層から井戸表面までの前記の液を除去することを含み、ここで前記酵素処理物はデンプン含有液中の α -グルコシド結合の攻撃に有効である。

10

要約すれば、本発明は、液体（液化）デンプン及び顆粒デンプンを加水分解する酵素及び方法を提供する。そのようなデンプンは任意の供給源、例えばトウモロコシ、コムギ、ミロ、モロコシ、ライムギ又は加熱乾燥コムギから得ることができる。本発明は、液化に有用な任意の穀粒デンプン源、例えば液化に適したデンプンを生じることが知られている任意の他の穀粒又は野菜源に応用される。本発明の方法は、任意の天然の材料（例えばコメ、発芽米、トウモロコシ、オオムギ、ミロ、コムギ、豆類及びサツマイモ）由来のデンプンを液化することを含む。前記液化方法は実質的にデンプンを加水分解してシロップを生成することができる。液化の温度範囲は、デンプンの液化に有効であることが知られている任意の液化温度である。例えば、デンプンの温度は、約80℃から約115℃、約100℃から約110℃、及び約105℃から約108℃であり得る。

20

本発明は以下の実施例を参照しながらさらに詳細に記述されるであろう。しかしながら本発明はそのような実施例に限定されないことは理解されよう。

【0164】

実施例1：デンプン液化のための例示的な方法及び測定結果

以下の実施例では、例示的なグルコシダーゼ（例えば本発明の α -グルコシダーゼ）を用いるデンプン液化及び糖化のための例示的な方法を述べる。

配列番号:8（配列番号:9によってコードされる）に記載の配列を有する α -グルコシダーゼを、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）の濃縮ライブラリーから基質としてX-結合 α -グルコピラノシドを用いて活性依存スクリーニングによって同定した。配列番号:8に記載の配列を有する本発明で初めて同定されたポリペプチドはアルファ-グルコシダーゼであり、液化されたデンプン及びマルト-オリゴ糖の両方を高効率で加水分解することができる。配列番号:8に記載の配列を有するポリペプチドは5.0という低いpHで液化デンプン及びマルト-オリゴ糖の両方を加水分解することができることもまた示された。さらにまた、配列番号:8に記載の配列を有するポリペプチドは、75℃の高い温度で加水分解活性を維持することが示された。これらの研究によって、配列番号:8に記載の配列を有するポリペプチドはデンプンの加工（糖化工程を含む）で用いることができることが示された。

30

配列番号:8に記載の配列を有するポリペプチドを用いた実験では、このポリペプチドがpH7.5、37℃で液化デンプン及びマルトテトラオースに対して活性を有することが示された。アリコットを1時間間隔で取り出し、TLCプレートにスポットした。図5及び図6に示したように（図でGはグルコース、Mはマルトース、Tはマルトテトラオースである）、両TLCアッセイのデータは、液化デンプン及びマルトテトラオースの両基質が、配列番号:8に記載の配列を有するポリペプチドの存在下で加水分解されることを示した。これによって、前記酵素をデンプン液化に用いてグルコース生成を最大にできることが示された。図7は、種々のpH（pH4.5、5.0及び5.5）における液化デンプンに対する配列番号:8の配列を有するポリペプチドの活性を示すTLCの図である。図8は、pH5.5で種々の温度（35℃、45℃、55℃、65℃、75℃、85℃）における液化デンプンに対する配列番号:8の配列を有するポリペプチドの活性を示すTLCの図である。

40

配列番号:8に記載の配列を有するポリペプチドは、728残基タンパク質をコードするORF

50

内に2187塩基対を有する。このタンパク質は、配列番号:8のアミノ酸残基357と364の間にグリコシルヒドロラーゼモチーフ“GIWNDMNE”を有する。前記グリコシルヒドロラーゼモチーフはグリコシルヒドロラーゼファミリー31のシグナチャーモチーフであり、363位のアスパラギンが予想される活性部位である。

また別の例示的手順では、55℃において100mMの PO_4 (pH6.5)、1% (w/w) 液化デンプンDE12を含む条件を使用した(詳細な手順は下記を参照されたい)。活性の確認のためにTLCアッセイ及びHPLCアッセイの両方を行った。両アッセイのデータは、クローンが活性を有するか否かを示すだけで、これらのアッセイでは定量はできず、すなわち、これらのアッセイではクローンがグルコアミラーゼとしてどのくらい活性であるかは示されない。

【0165】

液化デンプンの糖化方法 (pH6.5) :

— 液化したデンプンのpHを糖化が実施されるpHに調整する。この実験では、100mMの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 中でデンプンを液化し、糖化の前にpHを6.5に調製することができるように100mMのリン酸ナトリウム塩を添加した。

— 風袋を差し引いたビンに5グラムの液化デンプンサンプルを計り入れる。

— 100グラムの液化デンプン当たり、0.04% (w/w) のオプチデキス (Optidex) L-400 (商標) 又は約400mLの1 - 10希釈のオプチデキスL-400ストックを用いる。

— 1 - 10希釈のオプチデキスL-400ストック400mLに含まれるオプチデキスL-400 (商標) の量 (ミリグラム) を計算する。次にオプチデキスL-400 (商標) と同じ濃度の酵素を提供するために必要な溶解物の体積を計算する。

— デンプンサンプルの液化のために酵素を添加し、所望の温度 (50℃) でインキュベートする。18時間後にDEを決定し、HPLC分析のためのサンプルを調製する。

DEの決定: ネオキュプロインアッセイ: 100mLのサンプルを2.0mLのネオキュプロイン溶液A (40g/Lの炭酸ナトリウム、16g/Lのグリシン、0.45g/Lの硫酸銅) に添加した。これに2.0mLのネオキュプロイン溶液B (1.2g/Lのネオキュプロインヒドロクロリド (Sigma N-1626)) を添加した。管を混合し、沸騰水浴中で12分加熱し、冷却し、DI水で10mLの容積に希釈し、分光光度計を用いて450nmでODを読みとる。同時に実施した0.2mg/mLのグルコース標準物の反応からサンプル中のグルコース当量を外挿により得た。

HPLC分析: 炭水化物糖化プロファイルは、HPLC (シルバー形のBio-Rad Aminex HPX-87Aカラム、80℃) を用いて屈折率検出によって測定した。移動相はろ過ミリポア水とし、流速0.7mL/分で用いた。

糖化サンプルは酸性DI水 (200mLのDI水に6MのHClを5滴) で1 - 10に希釈し、続いて0.45mmの円筒フィルターでろ過した。注入体積は20μLである。

TLC: 反応生成物を1時間ごとに取り出し、TLCプレートにスポットし、乾燥させた。続いて前記プレートを水: イソプロパノール (10: 90) で展開し、ヴァニリン染色又はCAM染色で可視化し、続いて加熱して還元可能糖を提示させた。活性が観察される場合は、液化デンプンは部分的にグルコースに加水分解された。

【0166】

本発明の多数の実施態様を述べてきたが、本発明の範囲から逸脱することなく種々に改変を実施できることは理解されよう。したがって、その他の実施態様も請求の範囲内に包含される。

種々の図面中の同じ参照記号は同じ成分を示している。

【図面の簡単な説明】

【0167】

【図1】 コンピュータシステムのブロック図である。

【図2】 新規なヌクレオチド又はタンパク質配列とデータベースの配列を比較し、前記新規配列とデータベース配列との間の相同性を決定する方法の1つの特徴を示す流れ図である。

【図3】 2つの配列が相同であるか否かを決定するためのコンピュータ処理の1つの特徴

10

20

30

40

50

を示す流れ図である。

【図4】配列中に特徴が存在するか否かを検出するためのアイデンティファイヤープロセス300の1つの特徴を示す流れ図である。

【図5】実施例1で詳細に記述したように、配列番号:8に示す配列を有するポリペプチドの液化デンプン及びマルトテトラオースに対する種々の時点における活性を示すTLCの図解である。

【図6】実施例1で詳細に記述したように、配列番号:8に示す配列を有するポリペプチドの液化デンプンに対する種々のpHでの種々の時点における活性を示すTLCの図解である。

【図7】実施例1で詳細に記述したように、配列番号:8に示す配列を有するポリペプチドの液化デンプンに対する種々のpHにおける活性を示すTLCの図解である。

【図8】実施例1で詳細に記述したように、配列番号:8に示す配列を有するポリペプチドの液化デンプンに対する種々の温度における活性を示すTLCの図解である。

10

【図1】

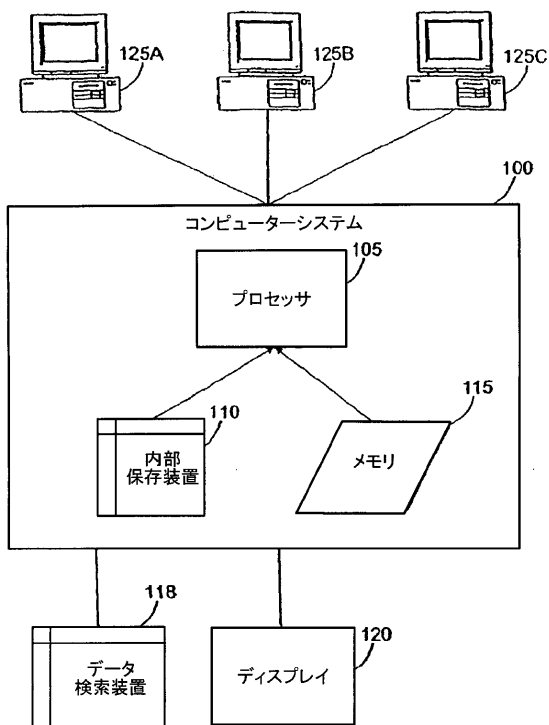


FIGURE 1

【図2】

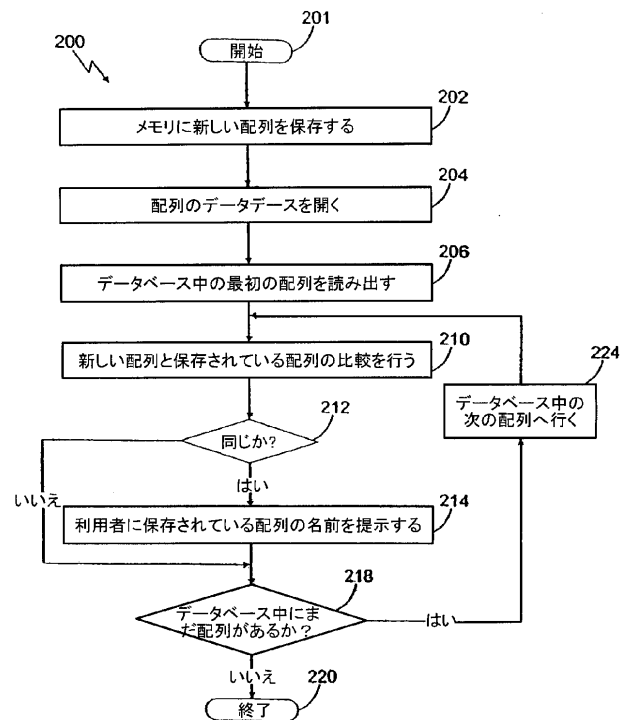


FIGURE 2

【図 3】

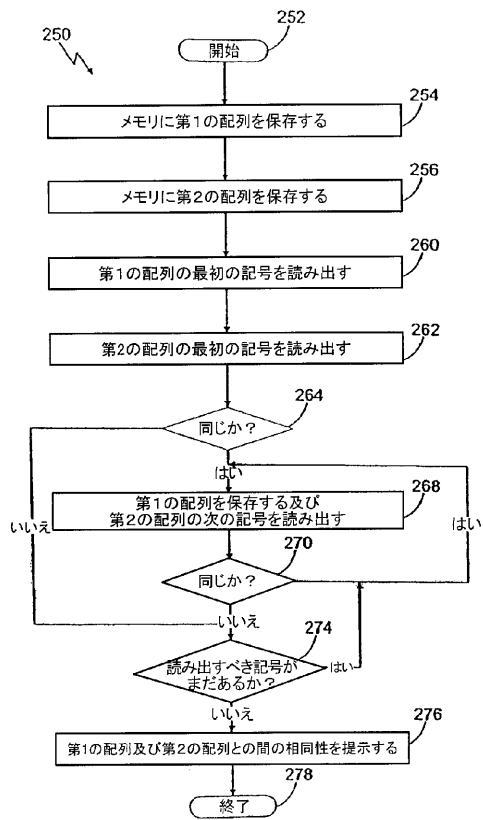


FIGURE 3

【図 4】

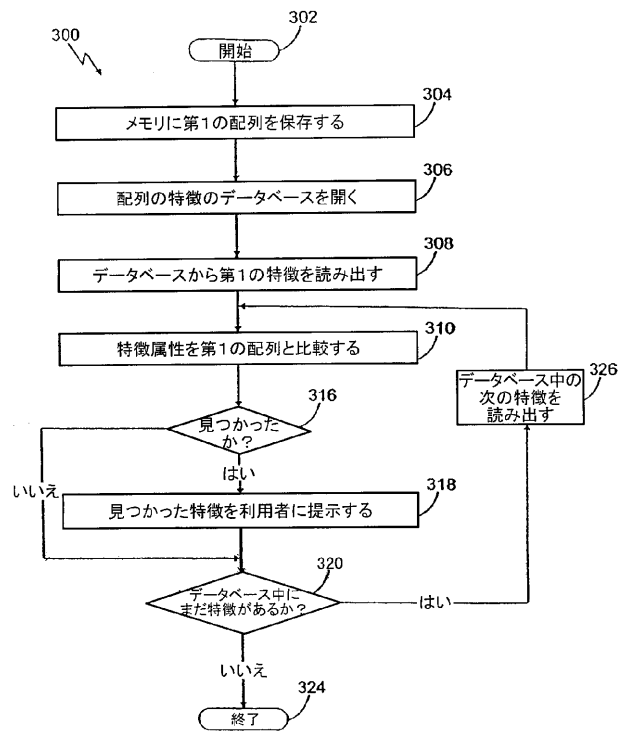


FIGURE 4

【図 5】

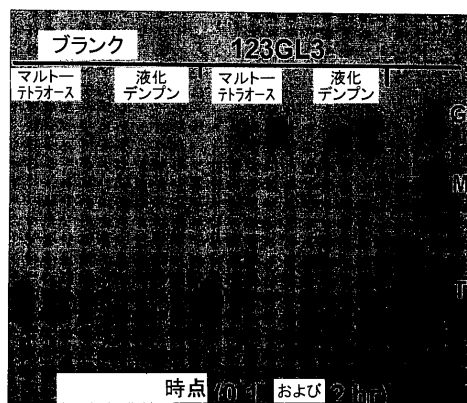


FIGURE 5

【図 6】

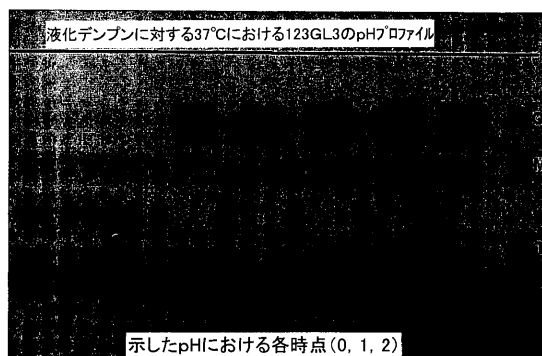


FIGURE 6

【図 7】

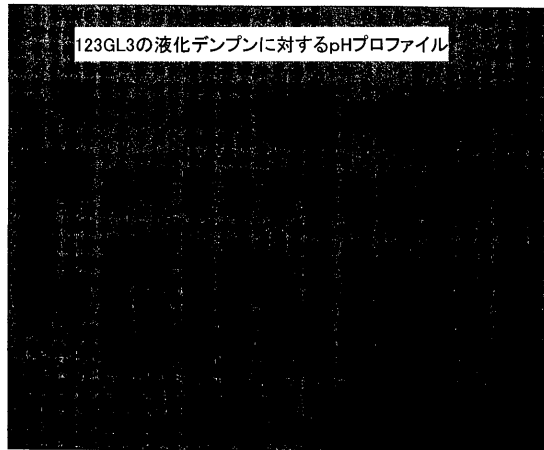


FIGURE 7

【図 8】

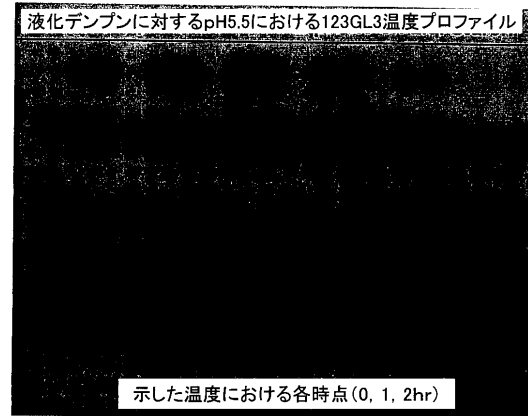


FIGURE 8

【配列表】

2006524050000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/08541																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12P 21/06; C12N 9/00, 9/24, 1/20, 15/00; C11D 3/50; C07K 16/00; C07H 21/04 US CL : 435/69.1, 183, 200, 252.3, 287.2, 320.1; 510/114, 392; 530/387.1, 830; 536/23.2; 712/1, 90 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 183, 200, 252.3, 287.2, 320.1; 510/114, 392; 530/387.1, 830; 536/23.2; 712/1, 90 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X ---</td> <td rowspan="2">US 6,355,467 (KELLY et al.) 12 March 2002 (12.03.2002) see entire document.</td> <td>52-71, 74-82, 99, 103-128, 207-208</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218</td> </tr> <tr> <td>X ---</td> <td rowspan="2">ROLFSMEIER et al. Purification and characterization of a maltase from extremely thermophilic crenarchaeote S.solfataricus. J. Bacteriol., 1995, Vol. 177, No.2, pages 482-485.</td> <td>52-71, 74-82, 99, 103-128, 207-208</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218</td> </tr> <tr> <td>X ---</td> <td rowspan="2">LEGIN E et al. production of thermostable amylolytic enzymes by T.hydrothermalis. Biotechnol. Lett., April 1998, Vol.20, No.4, pages 363-367. see entire document.</td> <td>52-71, 74-82, 99, 103-106, 107-128, 207-208</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X ---	US 6,355,467 (KELLY et al.) 12 March 2002 (12.03.2002) see entire document.	52-71, 74-82, 99, 103-128, 207-208	Y	72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218	X ---	ROLFSMEIER et al. Purification and characterization of a maltase from extremely thermophilic crenarchaeote S.solfataricus. J. Bacteriol., 1995, Vol. 177, No.2, pages 482-485.	52-71, 74-82, 99, 103-128, 207-208	Y	72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218	X ---	LEGIN E et al. production of thermostable amylolytic enzymes by T.hydrothermalis. Biotechnol. Lett., April 1998, Vol.20, No.4, pages 363-367. see entire document.	52-71, 74-82, 99, 103-106, 107-128, 207-208	Y	72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X ---	US 6,355,467 (KELLY et al.) 12 March 2002 (12.03.2002) see entire document.	52-71, 74-82, 99, 103-128, 207-208																		
Y		72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218																		
X ---	ROLFSMEIER et al. Purification and characterization of a maltase from extremely thermophilic crenarchaeote S.solfataricus. J. Bacteriol., 1995, Vol. 177, No.2, pages 482-485.	52-71, 74-82, 99, 103-128, 207-208																		
Y		72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218																		
X ---	LEGIN E et al. production of thermostable amylolytic enzymes by T.hydrothermalis. Biotechnol. Lett., April 1998, Vol.20, No.4, pages 363-367. see entire document.	52-71, 74-82, 99, 103-106, 107-128, 207-208																		
Y		72-73, 83-98, 100-102, 154-191, 209-218																		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>* Special categories of cited documents:</th> <th>"T"</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			* Special categories of cited documents:	"T"	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed							
* Special categories of cited documents:	"T"																			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																			
"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 09 February 2005 (09.02.2005)		Date of mailing of the international search report 17 MAR 2005																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Manjunath N. Rao, Ph.D. Telephone No. 571-272-1600																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/08541

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	KLINGEBERG M et al. Production of novel pullulanases at high concentrations by two newly isolated thermophilic clostridia. FEMS Microbiol. Lett., May 1990, Vol. 57, No.1-2, pages 145-52.	52-71, 74-82, 99, 103-106, 107-128, 207-208 ----- 72-73, 83-98, 100- 102, 154-191, 209- 218
X --- Y	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) Accession No.AE011901, deSILVA ACR et al., 29 May 2002.	1-2, 5-15, 23-39, 47- 48 ----- 49-51, 129-153, 193- 206

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/08541

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-218, SEQ ID NO:1 and 2 only

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/08541

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:1 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:2, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group II, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:3 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:4, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group III, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:5 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:6, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group IV, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:7 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:8, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group V, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:9 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:10, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group VI, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:11 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:12, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/08541

Group VII, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:13 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:14, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group VIII, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:15 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:16, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group IX, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:17 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:18, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group X, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:19 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:20, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group XI, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:21 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:22, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

Group XII, claims 1-218, drawn to an isolated polynucleotide with SEQ ID NO:23 encoding a polypeptide with SEQ ID NO:24, vectors, host cells, antisense DNA, RNA, method of using the polynucleotides and polypeptide, a transgenic animal, a transgenic plant/seed, a computer system and media comprising said polynucleotide or polypeptide, a method of making a small using the polypeptide, a method for whole cell engineering using the polynucleotide /polypeptide, an antibody that interacts with the above polypeptide and methods of generating the same, an isolated signal sequence comprising 1-32 amino acids of the polypeptide.

The inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:1 and 2 which groups II-XII do not have.

Group II is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:3 and 4 which groups I and III-XII do not have.

Group III is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:5 and 6 which groups I-II and IV-XII do not have.

Group IV is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO: 7 and 8 which groups I-III and V-XII do not have.

Group V is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:9 and 10 which groups I-IV and VI-XII do not have.

Group VI is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:11 and 12 which groups I-V and VII-XII do not have.

Group VII is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:13 and 14 which groups I-VI and VIII-XII do not have.

Group VIII is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:15 and 16 which groups I-VII and IX-XII do not have.

Group IX is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:17 and 18 which groups I-VIII and X-XII do not have.

Group X is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:19 and 20 which groups I-IX and XI-XII do not have.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/08541

Group XI is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:21 and 22 which groups I-X and XII do not have.

Group XII is drawn to polynucleotide encoding a polypeptide having the special technical feature of SEQ ID NO:23 and 24 which groups I-XI do not have.

Furthermore, The ISA considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I) comprises the first-recited product, a

polynucleotide encoding a polypeptide, a vector, a host cell, a method for producing and several methods of using polypeptide.

Furthermore the ISA considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CAPLUS, BIOSIS, SCISEARCH, BIOTECHABS, BIOTECHDS, DGENE, PASCAL, CABA, LIFESCI, USPTO-
WEST, BIOTECHNO, GENBANK, AGRICOLA, EMBASE, MEDLINE, ESBIOBASE, FSTA,

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/24	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	C	4 B 0 6 3	
A 0 1 H	5/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/24		4 B 0 6 4	
A 0 1 H	1/00	(2006.01)	A 0 1 H	5/00	A	4 B 0 6 5	
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 H	1/00	A	4 C 0 8 3	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 0 1 K	67/027		4 C 0 8 4	
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 H 0 0 3	
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	C 0 7 K	16/40		4 H 0 4 5	
C 1 2 Q	1/40	(2006.01)	C 1 2 Q	1/34			
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/40			
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A		
C 1 2 P	19/20	(2006.01)	C 1 2 P	21/08			
C 4 0 B	50/06	(2006.01)	C 1 2 P	19/20			
A 2 3 L	1/305	(2006.01)	C 4 0 B	50/06			
C 1 2 C	7/04	(2006.01)	A 2 3 L	1/305			
A 2 1 D	2/26	(2006.01)	C 1 2 C	7/04			
A 2 1 D	13/00	(2006.01)	A 2 1 D	2/26			
C 1 1 D	3/386	(2006.01)	A 2 1 D	13/00			
C 1 1 D	17/08	(2006.01)	C 1 1 D	3/386			
C 1 1 D	17/06	(2006.01)	C 1 1 D	17/08			
A 6 1 K	38/46	(2006.01)	C 1 1 D	17/06			
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 K	37/54			
A 6 1 K	8/66	(2006.01)	A 6 1 P	3/02			
A 6 1 Q	11/00	(2006.01)	A 6 1 K	8/66			
			A 6 1 Q	11/00			

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

- (72)発明者 グレイ ケヴィン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 1 サン ディエゴ エレオノア コート 1 2 1
1 9
- (72)発明者 ガレット ジェイムズ ビー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 6 4 ポウエイ シカモア ツリー レーン 1 3 6
0 5
- (72)発明者 アボーシャディー ナーラ エム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 5 7 オーシャンサイド レキシントン サークル
4 4 2
- (72)発明者 ノールズ リャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 9 1 5 チュラ ヴィスタ タマリスク グローヴ ド
ライヴ 1 3 4 2
- (72)発明者 オドノヒュー アイリーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 0 9 サン ディエゴ ミズーリ ストリート 1 1
3 6

(72)発明者 ウォーターズ エリザベス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サン ディエゴ ポルト デ パルマ 4 0 2
O # 4 0

F ターム(参考) 2B030 AA02 AA03 AB04 AD08 CA17

4B018 MD90 ME02 MF14

4B024 AA01 AA03 AA05 AA08 BA12 CA02 CA09 CA11 DA01 EA01
FA02 HA12

4B032 DB01 DK21 DL08

4B050 CC03 CC05 DD02 GG04 LL01 LL02 LL04 LL05

4B063 QQ35 QQ67 QR15 QR43 QR55 QR57 QS28 QS32 QX02

4B064 AF01 AG27 CA19 CA21 CA32 CB07 CC24 DA01 DA10 DA16
DA19

4B065 AA89X AB01 AC02 AC14 BA02 CA31 CA41 CA43 CA44 CA54
CA57

4C083 AD471 CC41

4C084 AA01 BA02 BA22 NA15 ZC211

4H003 BA01 BA09 BA12 DA01 DA05 DA17 EC01 FA47

4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 DA86 EA50 FA71