

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5804331号  
(P5804331)

(45) 発行日 平成27年11月4日 (2015. 11. 4)

(24) 登録日 平成27年9月11日 (2015. 9. 11)

|                           |                       |
|---------------------------|-----------------------|
| (51) Int. Cl.             | F I                   |
| C 1 2 N 15/09 (2006. 01)  | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| C 1 2 N 1/15 (2006. 01)   | C 1 2 N 1/15          |
| C 1 2 N 1/19 (2006. 01)   | C 1 2 N 1/19          |
| C 1 2 N 1/21 (2006. 01)   | C 1 2 N 1/21          |
| C 1 2 N 5/10 (2006. 01)   | C 1 2 N 5/00 1 O 1    |
| 請求項の数 25 (全 163 頁) 最終頁に続く |                       |

|              |                              |           |                     |
|--------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2013-141460 (P2013-141460) | (73) 特許権者 | 503259381           |
| (22) 出願日     | 平成25年7月5日 (2013. 7. 5)       |           | ビービー・コーポレーション・ノース・ア |
| (62) 分割の表示   | 特願2010-251550 (P2010-251550) |           | メリカ・インコーポレーテッド      |
| 原出願日         | 平成16年7月2日 (2004. 7. 2)       |           | アメリカ合衆国テキサス州77079,  |
| (65) 公開番号    | 特開2014-27928 (P2014-27928A)  |           | ヒューストン, ウェストレイク・パーク |
| (43) 公開日     | 平成26年2月13日 (2014. 2. 13)     | (74) 代理人  | 100086771           |
| 審査請求日        | 平成25年7月8日 (2013. 7. 8)       |           | 弁理士 西島 孝喜           |
| (31) 優先権主張番号 | 60/484, 725                  | (74) 代理人  | 100088694           |
| (32) 優先日     | 平成15年7月2日 (2003. 7. 2)       |           | 弁理士 弟子丸 健           |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      | (74) 代理人  | 100094569           |
|              |                              |           | 弁理士 田中 伸一郎          |
|              |                              | (74) 代理人  | 100084663           |
|              |                              |           | 弁理士 箱田 篤            |
|              |                              | 最終頁に続く    |                     |

(54) 【発明の名称】 グルカナーゼ、それらをコードする核酸並びにそれらを製造及び使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号:221と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む単離、合成または組換え核酸であって、少なくとも1つのグルカナーゼ活性を有するポリペプチドまたは配列番号:222の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む、前記単離、合成または組換え核酸。

【請求項 2】

請求項 1 記載の核酸を含む発現カセットまたはベクター。

【請求項 3】

(a) 請求項 1 記載の核酸を含むクローニングベヒクルであって、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、前記クローニングベヒクル；

(b) 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またはアデノ随伴ウイルスベクターを含む、(a) に記載のクローニングベヒクル；または、

(c) 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、(a) のクローニングベヒクル。

【請求項 4】

(a) 請求項 1 記載の核酸を含む核酸を含む形質転換細胞；

(b) 請求項 2 記載の発現カセットまたはベクターを含む形質転換細胞；または、

10

20

(c) 細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または植物細胞である、(a) または (b) の形質転換細胞。

【請求項 5】

配列番号:222と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を有する、単離、合成、または組換えポリペプチドであって、グルカナーゼ活性を有する、または、請求項1記載の核酸によってコードされるアミノ酸配列を有する、前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドの酵素的に活性な断片。

【請求項 6】

請求項5記載のポリペプチドを含むタンパク質調製物であって、液体、固体又はゲルを含む、前記タンパク質調製物。

【請求項 7】

(a) 請求項5記載のポリペプチドの配列を含む、固定化ポリペプチド；または、

(b) 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5記載のポリペプチドの配列を含む、固定化ポリペプチド。

【請求項 8】

請求項5記載のポリペプチドの配列を含む、固定化ポリペプチドを含むアレイ。

【請求項 9】

(A) 以下の工程を含む、グルカナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、請求項1記載の核酸の変種を作製する方法：

(A) (a) 請求項1記載の核酸を提供する工程；および、

(b) 前記鋳型の配列内の1つまたは2つ以上のヌクレオチドの改変、欠失若しくは付加、また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；

(B) さらに変種核酸を発現させて変種グルカナーゼポリペプチドを生成することを含む、(A) の方法；

(C) 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)、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によって導入される、(A) または (B) の方法；

(D) 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カナーゼが得られるまで反復される、(A)、(B) または (C) の方法；

(E) 変種グルカナーゼポリペプチドが耐熱性であり、上昇温度に暴露された後ある程度の活性を維持する、(A)、(B)、(C) または (D) の方法；

(F) 変種グルカナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼと比較してグリコシル化が増加している、(A)、(B)、(C) または (D) の方法；

(G) 変種グルカナーゼポリペプチドは高温下でグルカナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは高温下で活性をもたない、(A)、(B)、(C) または (D) の方法；

(H) 鋳型核酸のコドン使用頻度とは変異したコドン使用頻度を示すグルカナーゼコード配列が得られるまで反復される、(A)、(B)、(C) または (D) の方法；または、

(I) 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カナーゼ遺伝子が得られるまで反復される、(A)、(B)、(C) または (D) の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 0】

(A) 以下の工程を含む、グルカン含有組成物を加水分解、分解又は破壊する方法：

(a) 請求項 5 記載のポリペプチドを提供する工程；

(b) グルカンを含む組成物を提供する工程；および、

(c) 前記グルカナーゼが前記グルカン含有組成物を加水分解、分解または破壊する条件下で工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と接触させる工程；または、

(B) 組成物が、植物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または動物細胞を含む、(A) の方法。

## 【請求項 1 1】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む生地またはパン製品。

10

## 【請求項 1 2】

生地のコンディショニングに十分な条件下で生地またはパン製品を請求項 5 記載の少なくとも 1 つのポリペプチドと接触させることを含む、生地をコンディショニングする方法。

## 【請求項 1 3】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む飲料。

## 【請求項 1 4】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む食品、飼料または栄養性サプリメント。

## 【請求項 1 5】

(A) 以下の工程を含む、非ヒト動物の食物中で栄養性サプリメントとしてグルカナーゼを利用する方法：

20

請求項 5 記載のポリペプチドを含む栄養性サプリメントを調製する工程；および、

前記栄養性サプリメントを非ヒト動物に与え、前記非ヒト動物が摂取する飼料または食品中に含まれるキシランの利用を増進させる工程；

(B) 非ヒト動物が反芻動物または単胃動物である、(A) の方法；

(C) グルカナーゼが、細菌、酵母、昆虫、真菌および非ヒト動物からなる群から選択される生物においてグルカナーゼをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって調製される、(A) または (B) の方法；または、

(D) 生物が、*S. ポンベ* (*pombe*)、*S. セレビシア*エ、*ピキア・パストリス*、*大腸菌*、*ストレプトミセス*種、*バチルス*種及び*ラクトバチルス*種からなる群から選択される、(A) 、(B) 、または (C) に記載の方法。

30

## 【請求項 1 6】

請求項 5 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。

## 【請求項 1 7】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む、セルロース組成物またはセルロース誘導体組成物。

## 【請求項 1 8】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む、木材、木材パルプまたは木材製品。

## 【請求項 1 9】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む、紙、紙パルプまたは紙製品。

40

## 【請求項 2 0】

紙、木材または木材製品を請求項 5 記載のポリペプチドと接触させることを含む、紙、木材または木材製品においてリグニンを減少させる方法。

## 【請求項 2 1】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む洗剤組成物。

## 【請求項 2 2】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

## 【請求項 2 3】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む燃料。

## 【請求項 2 4】

50

セルロース、ヘミセルロースおよび／またはリグニンを請求項5記載のポリペプチドと接触させることを含む、燃料の製造方法。

【請求項25】

(a) 請求項5記載のポリペプチドを含む乳製品；または

(b) ミルク、アイスクリーム、チーズまたはヨーグルトを含む、(a)の乳製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に酵素、前記酵素をコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチド及びポリペプチドの使用に関し、より具体的には、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）活性（例えば内部エンド-β-1,4-および／またはβ-1,3-グルカナーゼ結合の加水分解を触媒する）を有するポリペプチド（例えば酵素、抗体）に関する。ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性（例えばエンド-1,4-ベータ-D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼ活性）は、セルロース、セルロース誘導体（例えばカルボキシメチルセルロース及びヒドロキシエチルセルロース）、リケニン中の1,4-及び／又はβ-1,3-ベータ-D-グリコシド結合の加水分解、混合ベータ-1,3-グルカン（例えば穀類のベータ-D-グルカン又はキシログルカン）および他の植物またはセルロース部分含有有機物質中のベータ-1,4-結合の加水分解を含む。ある特徴では、本発明のポリペプチドはキシラナーゼ、又はマンナーゼ活性を有する。

【背景技術】

【0002】

エンドグルカナーゼ（例えばエンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、EC3.2.1.4；エンド-ベータ-1,3(1)-グルカナーゼ、EC3.2.1.6；エンド-ベータ-1,3-グルカナーゼ、EC3.2.1.39）は、セルロース及びグルカン内の内部β-1,4-及び／又はβ-1,3-グリコシド結合を加水分解して、より小さな分子量のグルコース及びグルコースオリゴマーを生成する。グルカンは、1,4-β-及び／又は1,3-グリコシド結合D-グルコピラノースから形成される多糖類である。エンドグルカナーゼは産業的価値が高く、食品工業で焼成並びに果実及び野菜の加工に用いられ、農業廃棄物の分解、動物用飼料（例えばニワトリの飼料）の製造、パルプ及び紙の製造、繊維の製造、並びに家庭用及び工業用洗浄剤で用いられる。エンドグルカナーゼは真菌及び細菌によって生成される。

ベータ-グルカンは穀類の主要な非デンプン多糖類である。グルカンの含有量は、種類及び生長条件により顕著に変動する。この多糖類の物理化学的特性は、酸化条件下で粘稠な溶液又は場合によってゲルを生じるようなものである。さらにまた、グルカンは水との高い結合能力を有する。これらの特徴のいずれも、醸造、焼成、動物飼料を含むいくつかの産業に対し問題を与えている。醸造で用いられる場合、グルカンの存在は、麦汁のろ過性及び混濁の形成に関する問題をもたらす。焼成用途（特にクッキー及びクラッカー）では、グルカンは粘着性の生地を生じ、機械製造が困難でありビスケットのサイズを低下させるであろう。さらにまた、この炭水化物は焼成生成物の急速な再水和を招き、ぱりとした硬さを失わせ保存期間を短くする。穀物性飼料による単胃動物飼育での利用の場合、ベータ-グルカンは腸内容物の粘性に対する寄与因子であり、したがって飼料の消化及び動物の成長速度に悪影響を及ぼす。反芻動物の場合、これらのベータ-グルカンは繊維摂取の実質的成分であり、グルカンのより完全な消化はより高い飼料変換効率を容易にするであろう。動物の胃で活性を有する動物飼料用エンドグルカナーゼが所望される。

エンドグルカナーゼはまた、セルロース、全ての植物材料でみいだされるベータ-1,4-結合グルカンの消化に重要である。セルロースは自然界でもっとも豊富な多糖類である。セルロースを消化する市販の酵素は、紙パルプ工業で、繊維の製造で、並びに家庭用及び工業用洗浄剤で重要である。

本明細書で考察される刊行物はもっぱら本出願の出願日前のそれら刊行物の開示内容を目的として提供される。前記のいずれも、本発明が先きの発明のためにそのような開示に先行しないことを容認するものと解釈されるべきではない。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0003】

本発明は、ポリペプチドおよびそれらをコードするポリヌクレオチド並びにそれらを製造および使用する方法を提供する。本発明のポリペプチドの酵素活性は、加水分解酵素活性（例えばグルカナーゼ活性）を有するポリペプチド、例えばグルカンに存在するグリコシド結合を加水分解する（例えば内部 $\beta$ -1,4-グリコシド結合の加水分解を触媒する）ことができるポリペプチドを包含する。本発明のポリペプチド（抗体を含む）の酵素活性は、グルカナーゼ、キシラナーゼ及び／又はマンナーゼ活性を有するポリペプチドを包含する。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本発明は、本発明の例示的な核酸、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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、

20

30

40

50

配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、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、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、合成又は組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルカナーゼ(例えばエンドグルカナーゼ)活性、キシラナーゼ又はマンナ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

20

**【0005】**

本発明の例示的な核酸にはまた、本発明のポリペプチドをコードする単離、合成又は組換え核酸が含まれる。前記本発明のポリペプチドは例えば、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、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、

30

40

50

配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518に示す配列、並びにその部分配列及びその変種を有するポリペプチドである。ある特徴では、前記ポリペプチドは、グルカナーゼ活性（例えばエンドグルカナーゼ活性、例えば内部エンド- $\beta$ -1,4-及び／又は1,3-グルカナーゼ結合の加水分解を触媒する）、キシラナーゼ又はマンナーゼ活性を有する。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0006】

【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。

30

【図5】種々の条件下で本発明のいくつかの例示的酵素の相対的活性を要約した表である。

【図6】実施例3で考察したように、“標準曲線”として示される例示的データ式のグラフによる図解である。

【図7】実施例4で考察したように、配列番号:5のコドン最適化版（すなわち最適化版は配列番号:463）によってコードされる配列番号:464に示される配列を有する本発明の例示的グルカナーゼのピキア・パストリスでの発現の改善を示すグルカナーゼ活性アッセイの結果の図解である。

【図8】実施例4で考察したように、配列番号:5のコドン最適化版（すなわち最適化版は配列番号:463）によってコードされる配列番号:464に示される配列を有する本発明の例示的グルカナーゼのピキア・パストリスでの発現の改善を示すグルカナーゼ活性アッセイの結果の図解である。

40

【図9】実施例5で考察したように、配列番号:6によってコードされる本発明の例示的グルカナーゼの温度プロファイルを示すグルカナーゼ活性アッセイの結果の図解である。

【図10】実施例5で考察したように、配列番号:6によってコードされる本発明の例示的グルカナーゼの半減期の測定を示すグルカナーゼ活性アッセイの結果の図解である。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明は、本発明の例示的な核酸、例えば、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配

50

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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、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、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、合成又は組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルカナーゼ(例えばエンドグルカナーゼ)活性、キシラナーゼ又はマンナ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。

【0008】

本発明の例示的な核酸にはまた、本発明のポリペプチドをコードする単離、合成又は組換え核酸が含まれる。前記本発明のポリペプチドは例えば、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、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号352:、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列

10

20

30

40

50

番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518に示す配列、並びにその部分配列及びその変種を有するポリペプチドである。ある特徴では、前記ポリペプチドは、グルカナーゼ活性（例えばエンドグルカナーゼ活性、例えば内部エンド- $\beta$ -1,4-及び／又は1,3-グルカナーゼ結合の加水分解を触媒する）、キシラナーゼ又はマンナーゼ活性を有する。

【0009】

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カナーゼコード核酸を提供する。本発明は、本発明の例示的な核酸、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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453

10

20

30

40

50

、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150又はそれより多い残基（塩基）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、混合培養から単離されたグルカナーゼコード核酸を提供する。

10

#### 【0010】

ある特徴では、本発明は、共通の供給源、例えば環境性供給源又は古細菌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カナーゼコード核酸及び前記によってコードされるポリペプチドを提供する（表1参照）。

ある特徴では、本発明はまた、下記で考察されるように共通のファミリー3、ファミリー5、ファミリー6、ファミリー8、ファミリー9、ファミリー12に存在するという点で共通の新規性を有するグルカナーゼコード核酸及び前記によってコードされるポリペプチドを提供する（表2A及び2B参照）。

20

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カナーゼコード核酸を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明の例示的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又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、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、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カナーゼコード核酸を提供し、ここで前記核酸は、グルカナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、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。

30

#### 【0011】

ある特徴では、前記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。

本発明のまた別の特徴は、本発明の核酸配列の少なくとも10の連続する塩基、前記と実質的に同一の配列、及び前記と相補的な配列を含む単離、合成又は組換え核酸である。

40

ある特徴では、本発明のグルカナーゼ活性は、エンドグルカナーゼ活性、例えばエンド-1,4-及び／又は1,3-ベータ-D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼ活性である。ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性は、1,4-ベータ-D-グリコシド結合の加水分解を触媒する活性を含む。ある特徴では、前記グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）活性は、エンド-1,4-及び／又は1,3-ベータ-エンドグルカナーゼ活性、又はエンド-β-1,4-グルカナーゼ活性を含む。ある特徴では、前記グルカナーゼ活性（例えばエンド-1,4-ベータ-D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼ活性）は、セルロース、セルロース誘導体（例えばカルボキシメチルセルロース及びヒドロキシエチルセルロース）、リケニン中の1,4-ベータ-D-グリコシド結合の加水分解活性、混合ベータ-1,3-グルカン（例えば穀類のベータ-D-グ

50

ルカン) 及びセルロース部分を含有する他の植物材料中のベータ-1,4-結合の加水分解活性を含む。

ある特徴では、グルカナーゼ、キシラナーゼ、又はマンナーゼ活性は、グルカン又は他の多糖類を加水分解してより小さな分子量の多糖類又はオリゴマーを生成することを含む。ある特徴では、前記グルカンはベータ-グルカン (例えば水溶性ベータ-グルカン) を含む。前記水溶性ベータ-グルカンは生地又はパン製品を構成することができる。

ある特徴では、グルカナーゼ活性は、1,4-β-グリコシド結合D-グルコピラノースを含む多糖類の加水分解活性を含む。ある特徴では、グルカナーゼ活性はセルロースの加水分解活性を含む。ある特徴では、グルカナーゼ活性は、木又は紙パルプ又は紙製品のセルロースの加水分解活性を含む。

ある特徴では、グルカナーゼ (例えばエンドグルカナーゼ) 活性は、飲料又は飼料 (例えば動物飼料、例えばニワトリの飼料) 又は食品中のグルカンを加水分解することを含む。前記飲料、飼料又は食品は、穀物性動物飼料、麦汁若しくはビール、果実又は野菜を含むことができる。ある特徴では、本発明は、本発明のポリペプチドを含む、食物、飼料 (例えば動物飼料、例えばニワトリの飼料)、液体、例えば飲料 (例えばフルーツジュース又はビール) 又は飲料の前駆物質 (例えば麦汁) を提供する。前記食物は生地又はパン製品であり得る。前記飲料又は飲料前駆物質は、フルーツジュース、ビール又は麦汁であり得る。ある特徴では、本発明は、本発明の酵素を用いて液体を処理することによる、液体 (例えばジュース (例えばフルーツジュース) 又はビール) の清澄化の方法を提供する。

#### 【0012】

ある特徴では、本発明は、生地をコンディショニングする方法を提供する。前記方法は、生地又はパン製品を生地のコンディショニングに十分な条件下で本発明の少なくとも1つのポリペプチドと接触させることを含む。ある特徴では、本発明は飲料の製造方法を提供し、前記方法は、飲料の粘性を低下させるために十分な条件下で本発明の少なくとも1つのポリペプチドを前記飲料又は飲料前駆物質に添加することを含む。

ある特徴では、前記グルカナーゼ (例えばエンドグルカナーゼ) 活性は、細胞 (例えば植物細胞又は微生物細胞) 中のグルカンの加水分解を触媒する活性を含む。

ある特徴では、前記単離、合成又は組換え核酸は、熱安定性のグルカナーゼ (例えばエンドグルカナーゼ)、キシラナーゼ、又はマンナ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℃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カナーゼ、キシラナーゼ、若しくはマンナーゼ活性又は他の活性を維持することができる。

別の特徴では、前記単離、合成又は組換え核酸は、耐熱性のグルカナーゼ (例えばエンドグルカナーゼ)、キシラナーゼ、又はマンナ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、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カナーゼ又は他の活性を維持することができる。前記ポリペプチドは、約1℃から約5℃、約5℃から約15℃、約15℃から約25℃、約25℃から約37℃、約37℃から約95℃、約55℃から約85℃、約70℃から約75℃、又は約90℃から約95℃の範囲の温度に暴露した後でグルカナーゼ又は他の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90℃より高く約95℃の範囲の温度に暴露した後でグルカナーゼ又は他の活性を維持する。

#### 【0013】

本発明は、本発明の配列、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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、

配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:199、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517に示される配列、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、合成又は組換え核酸を提供する。ある特徴では、前記核酸は、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、キシラナーゼ、又はマンナ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、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200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り得る。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。

#### 【0014】

本発明は、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）活性、キシラナーゼ、又はマンナ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、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

10

20

30

40

50

の少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、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、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、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）活性、キシラナーゼ、又はマンナナ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、前記プローブは、本発明の核酸と少なくとも約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、少なくとも約10、15、20、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又はそれより多くの塩基の配列を含む核酸を含み、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。

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、グルカナ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、又は前記配列の約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30又はそれより多い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。

#### 【0015】

本発明は増幅プライマー対を提供し、ここで前記プライマー対は、本発明の核酸の最初の（5'の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30又はそれより多い残基によって示される配列を有する第一のメンバー、及び前記第一のメンバーの相補鎖の最初の（5'の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30又はそれより多い残基によって示される配列を有する第二のメンバーを含む。

本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて増幅により、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により生成されるグルカナーゼ-（例えばエンドグルカナーゼ-）、マンナナーゼ-又はキシラナーゼ-コード核酸を提供する。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて増幅により、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により生成されるグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼを提供する。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて増幅により、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によりグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼを生成する方法を提供する。ある特徴では、前記増幅プライマー対は、ライブラリー、例えば遺伝子ライブラリー（例えば環境性ライブラリー）から核酸を増幅する。

本発明は、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする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。

#### 【0016】

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、前記発現カセットは、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

10

20

30

40

50

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。

10

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ビヒクルを提供する。前記クローニングビ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。前記クローニングビ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ビ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、前記植物細胞は穀類、ジャガイモ、コムギ、イネ、トウモロコシ、タバコまたはオオムギの細胞であり得る。

20

#### 【0017】

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、穀類、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穀類、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、細胞内のグルカナーゼ(例えばエンドグルカナーゼ)、マンナナーゼ又はキシラナーゼ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。ある特徴では、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塩基であり得る。

40

本発明は、細胞内のグルカナーゼ(例えばエンドグルカナーゼ)、マンナナーゼ又はキシラナーゼ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カナーゼ(例えばエンドグルカナーゼ)、マンナナーゼ又はキシラナーゼの発現を阻害する方

50

法を提供し、前記方法は、本発明の配列の部分配列を含む二本鎖の阻害性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む。

【0018】

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25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350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、合成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: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、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号

10

20

30

40

50

:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518、並びにその部分配列及びその変種が含まれる。例示的なポリペプチドにはまた、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若しくはそれより多い残基、又は完全長の酵素が含まれる。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。

10

**【0019】**

ある特徴では、本発明のポリペプチドは少なくとも1つのグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有する。

ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性はエンド-1,4-ベータ-D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼ活性を含む。ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性は、1,4-ベータ-D-グリコシド結合又は1,3-ベータ-D-グリコシド結合の加水分解を触媒する活性を含む。ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性は、エンド-1,4-ベータ-D-エンドグルカナーゼ活性又はエンド-β-1,4-グルカナーゼ活性、エンド-1,3-ベータ-D-エンドグルカナーゼ活性又はエンド-β-1,3-グルカナーゼ活性を含む。ある特徴では、前記グルカナーゼ活性（例えばエンド-1,4及び／又は1,3-ベータ-D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼ活性）は、セルロース、セルロース誘導体（例えばカルボキシメチルセルロース及びヒドロキシエチルセルロース）、リケニン中の1,4-ベータ-D-グリコシド結合を加水分解すること、混合ベータ-1,3-グルカン（例えば穀類のベータ-D-グルカン又はキシログルカン）およびセルロース部分を含有する他の植物中のベータ-1,4-結合及び／又は1,3-結合の加水分解することを含む。

20

本発明のまた別の特徴は、本発明のポリペプチド又はペプチドの少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95若しくは100又はそれより長い連続する残基、前記と実質的に同一の配列、及び前記と相補的な配列を含む単離、合成又は組換えポリペプチドを提供する。前記ペプチドは、例えば免疫原性フラグメント、モチーフ（例えば結合部位）、シグナル配列、プレプロ配列又は触媒性ドメイン（CD）又は活性部位であり得る。

30

本発明は、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチド及びシグナル配列をコードする配列を含む単離、合成又は組換え核酸を提供し、ここで前記核酸は本発明の配列を含む。前記シグナル配列は別のグルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼ又は非グルカナーゼなど（すなわち異種酵素）から由来してもよい。本発明は、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする配列を含む単離、合成又は組換え核酸を提供し、ここで前記配列はシグナル配列を含まず、さらに前記核酸は本発明の配列を含む。

40

**【0020】**

ある特徴では、前記グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）活性は、1,4-ベータ-D-グリコシド結合又は1,3-ベータ-D-グリコシド結合の加水分解を触媒する活性を含む。ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性は、エンド-1,4-ベータ-D-エンドグルカナーゼ活性を含む。

ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性は、グルカンを加水分解してより小さな分子量の多糖類又はオリゴマーを生成することを含む。ある特徴では、前記グルカンはベータ

50

タ-グルカン（例えば水溶性ベータ-グルカン）を含む。前記水溶性ベータ-グルカンは生地又はパン製品を構成することができる。

ある特徴では、前記グルカナーゼ活性は、1,4-β-グリコシド結合D-グルコピラノースを含む多糖類の加水分解活性を含む。ある特徴では、前記グルカナーゼ活性はセルロースの加水分解活性を含む。ある特徴では、前記グルカナーゼ活性は、木又は紙パルプ又は紙製品のセルロースを加水分解することを含む。

ある特徴では、前記グルカナーゼ、キシラナーゼ又はマンナーゼ活性は、飼料（例えば動物飼料、例えばニワトリの飼料）若しくは食品中のグルカン又は他の炭水化物の加水分解の触媒を含む。前記飼料又は食品は穀物性動物飼料、麦汁若しくはビール、ジュース又は野菜を含むことができる。

10

ある特徴では、前記グルカナーゼ、キシラナーゼ又はマンナーゼ活性は、細胞（例えば植物細胞、真菌細胞又は微生物（たとえば細菌）細胞）中のグルカン又は他の炭水化物の加水分解を触媒することを含む。

ある特徴では、前記グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナーゼ又はキシラナーゼ活性は熱安定性である。前記ポリペプチドは、約1℃から約5℃、約5℃から約15℃、約15℃から約25℃、約25℃から約37℃、約37℃から約95℃、約55℃から約85℃、約70℃から約75℃、又は約90℃から約95℃、又はそれより高い温度範囲を含む条件下でグルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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カナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）マンナーゼ又はキシラナーゼ活性は耐熱性であり得る。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カナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナーゼ又はキシラナーゼ活性を維持することができる。

20

#### 【0021】

ある特徴では、前記単離、合成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むことができる。ある特徴では、前記単離、合成又は組換えポリペプチドは、異種シグナル配列、例えば異種グルカナーゼ、マンナーゼ若しくはキシラナーゼのシグナル配列又は非グルカナーゼ、マンナーゼ若しくはキシラナーゼ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。

30

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。前記酵素はグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナーゼ又はキシラナーゼであり得る。

本発明は、本発明のシグナルペプチド（SP）、プレプロ配列及び／又は触媒ドメイン（CD）を含む少なくとも第一のドメイン、及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含むキメラタンパク質を提供し、ここで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）、プレプロ配列及び／又は触媒ドメイン（CD）と天然には連結していない。ある特徴では、前記異種ポリペプチド又はペプチドはグルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナーゼではない。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）、プレプロ配列及び／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存在することができる。

40

本発明は、キメラポリペプチドをコードする単離、合成又は組換え核酸を提供する。ここで前記キメラポリペプチドは、本発明のシグナルペプチド（SP）、プレプロドメイン及び／又は触媒ドメイン（CD）を含む少なくとも第一のドメイン、及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含み、ここで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）、プレプロドメイン及び／又は触媒ドメイン（CD）と天然には連結していない。

#### 【0022】

本発明は、本発明のポリペプチド、例えば、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配

50

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、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518の残基1から14、1から15、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40、1から41、1から42、1から43又は1から44に示される配列から成る、又は前記配列を含む単離、合成、又は組換えシグナル配列（例えばシグナルペプチド）を提供する。本発明は、下記の表3に示される配列から成る、又は前記配列を含む単離、合成

10

20

30

40

50

、又は組換えシグナル配列（例えばシグナルペプチド）を提供する。

【0023】

ある特徴では、前記グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性は、約37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約1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、前記グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性はタンパク質1ミリグラムにつき約100から約1000ユニット、又はタンパク質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、前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性は、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約1から約750ユニット、又はタンパク質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、前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性は、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約1から約500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。また別の特徴では、前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性は、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約1から約250ユニットの範囲の比活性を含む。あるいは、前記グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性は、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約1から約100ユニットの範囲の比活性を含む。別の特徴では、前記耐熱性は、上昇温度に加熱した後で37℃において前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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1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500から約1000ユニットの範囲の比活性が維持されることを含むことができる。別の特徴では、前記耐熱性は、上昇温度に加熱した後で、37℃においてタンパク質1ミリグラムにつき約1から約500ユニットの範囲の比活性が維持されることを含むことができる。

【0024】

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、合成又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。

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カナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、約pH6.5、pH6、pH5.5、pH5、pH4.5又はpH4を含む条件下に暴露後、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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を含む条件下に暴露後、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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タンパク質又はドメインを含むヘテロダイマーを提供する。前記ヘテロダイマーの第二のメンバーは異なるグリカナーゼでも、他の酵素または他のタンパク質でもよい。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。

本発明はグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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。

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。

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、合成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。

#### 【0025】

本発明は、以下の工程を含む、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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、それによってグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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。

本発明は、以下の工程を含む抗グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ液性又は細胞性免疫応答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。

本発明は、以下の工程を含むグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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) グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを検出する工程。

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、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼグルカナーゼ基質として同定する、前記方法を提供する。

#### 【0026】

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

10

20

30

40

50

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。

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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼの活性を測定する工程を含む、グルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性が変化したならば、前記試験化合物はグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性は、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ基質を提供し、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、試験化合物をグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼの阻害物質と同定する。

#### 【0027】

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。

#### 【0028】

本発明は、以下の工程を含む、環境サンプルからグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する方法を提供する：(a) グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする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。ある特徴では、前記増幅プライマー配列対は本発明の増幅対である。

本発明は、以下の工程を含む環境サンプルからグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする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。

#### 【0029】

本発明は、以下の工程を含むグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする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) 前記鋳型の配列内の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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、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)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。

#### 【0030】

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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、前記変種グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、前記変種グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼは高温下でグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、鋳型核酸のコドン使用頻度とは変異したコドン使用頻度を示すグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼコード配列が得られるまで反復することができる。別の特徴では、前記方法は、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カナーゼ、マンナナーゼ又は

キシラナ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。

#### 【0031】

本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更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) グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする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、それによって核酸を変更して宿主細胞における前記の発現を増加させる工程（前記優先コドン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、前記非優先コドンまたは前記低優先コドン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）。

10

本発明は、以下の工程を含む、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更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、それによってグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼをコードする核酸内のコドンを変更する工程。

本発明は、以下の工程を含む、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞でその発現を高める方法を提供する：(a) グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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変更して宿主細胞におけるその発現を高める工程。

20

本発明は、以下の工程を含む、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更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変更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。

30

#### 【0032】

本発明は、複数の変更グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性部位（触媒ドメイン (CD)）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（前記変更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、前記核酸はグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性部位またはグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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変更グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核

40

50

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ムブリ (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) 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。

### 【0033】

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カナーゼ、マンナーゼ又はキシラナーゼ酵素を含む）； (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) グルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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；および、 (c) 前記グルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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、それによってグルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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、それによってグルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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。

### 【0034】

本発明は、以下の工程を含むグルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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) グルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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）；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、グルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナーゼ活性について残余の配列を試験し、それによってグルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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、グルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナーゼ活性は、グルカナーゼ、マンナーゼ又はキシラナ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ための全

細胞操作方法を提供する。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。

10

**【0035】**

本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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、前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼの比活性は約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。

20

本発明は、細胞で組換えグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナ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。

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。

30

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、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配列を含む）；(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。

40

**【0036】**

本発明は、以下の工程を含む、グルカン含有組成物を加水分解、分解又は破壊する方法を提供する：(a) グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有する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提供する工程；(b)

50

）グルカンを含む組成物を提供する工程；および（c）グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼが前記グルカン含有組成物を加水分解、分解又は破壊する条件下で工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程。ある特徴では、前記組成物は、植物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または動物細胞を含む。したがって、前記組成物は、任意の植物細胞若しくは植物部分、任意のグルカン含有食品若しくは飼料（例えば動物飼料、例えばニワトリの飼料）、廃棄物などを含むことができる。本発明は、以下の工程を含む、グルカン含有組成物を液化または除去する方法を提供する：（a）グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有する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）グルカンを含む組成物を提供する工程；および（c）グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼが前記グルカン含有組成物を除去、軟化または液化する条件下で工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程。

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カナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有する。前記グルカナーゼは非表面活性グルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼ、または表面活性グルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼであり得る。前記グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼは、非水性液体、鑄造固形物、顆粒形、粒子形、圧縮錠剤、ゲル形、ペーストまたはスラリー形として製剤化することができる。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）グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有する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組成物を提供する工程；（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

#### 【0037】

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を含む布地または織物（例えば糸を含む）を提供する。ある特徴では、前記布地または織物はグルカン含有繊維を含む。本発明は、以下の工程を含む、布地または織物を処理する（例えば組成物から汚れを除去する）方法を提供する：（a）グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有する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組成物を提供する工程；（b）グルカンを含む布地または織物を提供する工程；および（c）グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼが前記布地または織物を処理する（例えば汚れを除去する）ことができる条件下で工程（a）ポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程。本発明は、以下の工程を含む、織物の仕上がりを改善する方法を提供する：（a）グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ活性を有する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組成物を提供する工程；（b）織物を提供する工程；および（c）前記ポリペプチドが前記織物を処理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）の織物と接触させる工程。ある特徴では前記織物はウールまたは絹である。

30

#### 【0038】

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を含む飼料（例えば動物の飼料、例えばニワトリの飼料）または食品を提供する。本発明は、以下の工程を含む、動物による消費に先立って飼料または食品中のグルカンまたは他の多糖類を加水分解する方法を提供する：（a）グルカナーゼ、例えば本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ、または本発明の核酸によってコードされるグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼを含む飼料材料を得る工程；（b）工程（a）のポリペプチドを前記飼料または食品材料に、グルカンまたは他の多糖類の加水分解および処理された食品または飼料の生成をもたらすために十分な時間、十分な量で添加し、それによって動物による消費に先立って食品または飼料中のグルカンまたは他の多糖類を加水分解する工程。ある特徴では、本発明は、以下の工程を含む、動物による消費の後で飼料または食品中のグルカンまたは他の多糖類を加水分解する方法を提供する：（a）本発明

40

50

のグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼ、または本発明の核酸によってコードされるグルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼを含む飼料材料を得る工程；(b) 工程(a)のポリペプチドを前記飼料または食品材料に添加する工程；および(c) 前記飼料または食品材料を動物に与え、消費の後で、グルカナーゼ、マンナナーゼ又はキシラナーゼが前記飼料または食品中のグルカンまたは他の多糖類を前記動物の消化管の中で加水分解する工程。前記食品または飼料(例えば動物の飼料、例えばニワトリの飼料)は、例えば穀物、穀粒、トウモロコシなどであり得る。

別の特徴では、本発明は、組成物(例えば食品または飼料(例えば動物の飼料、例えばニワトリの飼料))中のグルカンの粘性を、前記組成物を本発明のグルカナーゼで処理するか、または前記組成物に本発明のグルカナーゼを含ませることによって低下させる方法を提供する。前記食品または飼料はオオムギまたはコムギを含むことができ、例えば高オオムギまたは高コムギ食用食品または飼料(例えば家禽用飼料)であり得る。ある特徴では、本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼによって処理された、または本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む食品または飼料で動物(例えば鳥、例えば家禽)を飼育することによって水性糞を最小限にする方法を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼによって処理された、または本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む食品または飼料で動物(例えば鳥、例えば家禽)を飼育することによって、成長速度及び/又は飼料効率を増大させる方法を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼによって処理された、または本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む食品または飼料で動物(例えば鳥、例えば家禽)を飼育することによって、排泄物を減少させる方法を提供する。

#### 【0039】

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)を含む動物用(例えば家禽、例えばニワトリ)の食品または栄養性サプリメントを提供する。ある特徴では、前記食品または栄養性サプリメント中のポリペプチドはグリコシル化することができる。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、本発明の酵素を含むペレット、例えば本発明の耐熱性または熱安定性酵素を含むペレットを含む。ある特徴では、前記ポリペプチドはグリコシル化することができる(それによってある特徴では酵素をより耐熱性または熱安定性にすることができる)。ある特徴では、前記グルカナーゼ(例えばエンドグルカナーゼ)、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性は耐熱性である。別の特徴では、前記グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは熱安定性である。

本発明は、本発明のポリペプチドを含む食品、飼料(例えば動物の飼料、例えばニワトリの飼料)または栄養性サプリメントを提供する。本発明は、以下の工程を含む、動物の食物中で栄養性サプリメントとしてグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを利用する方法を提供する：本発明のポリペプチドの連続する少なくとも30アミノ酸を含むグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素を含む栄養性サプリメントを調製する工程；および前記栄養性サプリメントを動物に与え、前記動物が摂取する飼料または食品中に含まれるグルカンまたは他の多糖類の利用を増進させる工程。前記動物は人間、反芻動物または単胃動物であり得る。例えば、前記動物は鳥、例えばニワトリであり得る。前記グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素は、生物(例えば細菌、酵母、昆虫、真菌または動物)でグルカナーゼをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって調製することができる。本発明のポリペプチドを発現させる例示的な生物は、*S. pombe* (*pombe*)、*S. cerevisiae* (*cerevisiae*)、*P. pastoris* (*pastoris*)、大腸菌(*E. coli*)、ストレプトミセス種、バチルス種及びラクトバチルス種であり得る。

#### 【0040】

本発明は、熱安定性組換えグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素を含む

食用酵素デリバリーマトリックスを提供する。本発明は、以下の工程を含む、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ補助食品を動物（人間、反芻動物、単胃動物、鳥（例えばニワトリ））にデリバリーする方法を提供する：顆粒状の食用担体および熱安定性の単離、合成または組換えグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素を含むペレットの形状の食用酵素デリバリーマトリックスを調製する工程（ここで前記ペレットはその中に含まれる前記グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素を容易に水性媒体中に分散させる）、および前記食用酵素デリバリーマトリックスを前記動物に与える工程。前記組換えグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素は本発明のポリペプチドを含むことができる。前記顆粒状食用担体は、穀類の胚芽、脱油した(spent of oil)穀類の胚芽、干し草、アルファルファ、チモシー、ダイズ外皮、ヒマワリのひき割り種子およびコムギのミッド(midd)から成る群から選択される担体を含むことができる。前記食用担体は脱油した穀類の胚芽であり得る。前記グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素はグリコシル化されて、ペレット化条件で熱安定性を提供することができる。前記デリバリーマトリックスは、穀類の胚芽およびグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む混合物をペレット化することによって形成することができる。前記ペレット化条件は、蒸気を当てることを含むことができる。前記ペレット化条件は約80℃を超える温度を約5分適用することを含むことができ、前記酵素は、酵素1ミリグラムにつき少なくとも350から約900ユニットの比活性を維持する。

10

#### 【0041】

本発明は、以下の工程を含む、乳製品の触感および風味を改善する方法を提供する：（a）グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する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グルカナーゼを提供する工程；（b）乳製品を提供する工程；（c）グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼが前記乳製品の触感または風味を改善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）の乳製品と接触させる工程。ある特徴では、前記乳製品はチーズまたはヨーグルトを含む。本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼまたは本発明の核酸によってコードされるグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む乳製品を提供する。

20

本発明は、以下の工程を含む、油の豊富な植物材料の油の抽出を改善する方法を提供する：（a）グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを提供する工程；（b）油の豊富な植物材料を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドを前記油の豊富な植物材料と接触させる工程。ある特徴では、前記油の豊富な植物材料は油の豊富な種子を含む。前記油はダイズ油、オリーブ油、ナタネ（キャノーラ）油またはヒマワリ油などであり得る。

30

ある特徴では、本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用いて、燃料エタノールに変換することができる醗酵性糖を生成する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する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グルカナーゼを含む燃料を提供する。ある特徴では、本発明の酵素を用いて、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの加水分解が触媒される。セルロースの分解は、植物バイオマスを燃料および化学物質に変換するために用いることができる（例えば以下を参照されたい：Kohlmann (1996) Adv. Space Res. 18:251-265；Perez (2002) Int. Microbiol. 5:53-63）。

40

#### 【0042】

本発明は、以下の工程を含む、フルーツ若しくは野菜ジュース、シロップ、ピューレまたは抽出物を調製する方法を提供する：（a）グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを提供する工程；（b）果実または野菜材料を含む組成物または液体を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドおよび前記組成物を接触させ、それによってフルーツ若しくは野菜ジュース、シロップ、ピュー

50

レまたは抽出物を調製する工程。

本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼ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紙若しくは紙製品、または紙パルプを提供する。本発明は、以下の工程を含む、紙または紙若しくは木材パルプを処理する方法を提供する：(a) グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを提供する工程；(b) 紙または紙若しくは木材パルプを含む組成物を提供する工程；および(c) 工程(a)のポリペプチドおよび工程(b)の組成物を、前記グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼが前記紙または紙若しくは木材パルプを処理することができる条件下で接触させる工程。ある特徴では、医薬組成物は消化促進剤または抗菌剤（例えば抗サルモネラ）として作用する。ある特徴では前記処理は予防的である。ある特徴では、本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む口腔手入れ製品を提供する。前記口腔手入れ製品は、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。本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含むコンタクトレンズ洗浄組成物を提供する。

#### 【0043】

ある特徴では、本発明は、本発明のポリペプチドを投与することを含む、グルカンまたは他の多糖類を含む微生物を除去するか、または前記微生物から動物を保護する方法を提供する。前記微生物はグルカンを含む細菌、例えばサルモネラであり得る。

本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドを製造する方法である。前記方法は、前記ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞に導入する工程（ここで前記核酸はプロモーターに機能的に連結されてある）；および前記宿主細胞を前記核酸の発現が許容される条件下で培養する工程を含む。本発明の別の特徴は、本発明のアミノ酸配列で示される配列の少なくとも10アミノ酸を有するポリペプチドを製造する方法である。前記方法は、前記ポリペプチドをコードする核酸を核酸を宿主細胞に導入する工程（ここで前記核酸はプロモーターに機能的に連結されてある）；および前記宿主細胞を前記核酸の発現が許容される条件下で培養し、それによって前記ポリペプチドを製造する工程を含む。

本発明のまた別の特徴は、以下の工程を含む変種を作出する方法である：本発明の配列、前記と実質的に同一の配列、本発明の配列と相補的な配列、前述の配列の少なくとも30ヌクレオチドを得る工程；および前記配列中の1つまたは2つ以上のヌクレオチドを別のヌクレオチドに変更するか、前記配列中の1つまたは2つ以上のヌクレオチドを欠失させるかまたは前記配列に1つまたは2つ以上のヌクレオチドを付加する工程。

本発明のまた別の特徴は、本発明の核酸またはポリペプチドが保存されているコンピュータの読み出し可能媒体である。本発明のまた別の特徴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であり、ここで前記データ保存装置には本発明の核酸またはポリペプチド配列が保存されている。本発明のまた別の特徴は、第一の配列を参照配列と比較する方法であり、ここで前記第一の配列は本発明の核酸またはポリペプチド配列である。前記方法は、配列を比較するコンピュータプログラムを用いることにより第一の配列および参照配列を読み取る工程；および前記第一の配列と参照配列との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を含む。本発明のまた別の特徴は、以下の工程を含む、本発明の核酸またはポリペプチド配列中の特徴を同定する方法である：配列中の特徴を同定するコンピュータプログラムを使用することにより前記配列を読み取る工程；および前記コンピュータプログラムにより前記配列中の特徴を同定する工程。

#### 【0044】

本発明のさらに別の特徴は、グルカンまたはその誘導体を含むサンプルを本発明のポリペプチドとグルカンの分解を促進する条件下で接触させる工程を含む、グリカンまたはそ

の誘導体の分解を触媒する方法である。

本発明のまた別の特徴は、本発明のポリペプチドのフラグメントまたは変種（前記は本発明のポリペプチドの酵素的機能を維持する）を同定するアッセイである。前記アッセイは、前記ポリペプチドフラグメントまたは変種が機能することができる条件下で本発明のポリペプチドを基質分子と接触させ、基質レベルの減少または前記ポリペプチドと基質との反応の特異的反応生成物レベルの増加を検出し、それによって前記配列のフラグメントまたは変種を同定することを含む。

本発明のまた別の特徴は長さが約10から50ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプローブであって、前記プローブは本発明の核酸配列の核酸標的領域に対して少なくとも50%相補性である連続する少なくとも10ヌクレオチドを有し、さらに中等度から高度にストリンジェントな条件下で前記核酸標的領域とハイブリダイズして検出可能な標的：プローブ二重鎖を形成する。

10

本発明のまた別の特徴は、少なくとも本発明の核酸配列と同じであるか、または完全に相補的である配列を有するグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ遺伝子を単離または同定するためのポリヌクレオチドプローブである。

さらに別の特徴では、本発明は、本発明のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、液体のタンパク質調製物を提供する。本発明のさらに別の特徴は、本発明のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、固体のタンパク質調製物を提供する。

本発明のさらに別の特徴は小分子を改変する方法を提供する。前記方法は、本発明の少なくとも1つのポリペプチドを少なくとも1つの小分子と混合し、少なくとも1つの生物触媒反応により少なくとも1つの改変小分子を生成する工程を含み、ここで前記少なくとも1つのポリペプチドはグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する。

20

#### 【0045】

本発明のまた別の特徴は、グルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ活性を有する本発明のポリペプチドをコードする配列のクローニングベクターである。本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドをコードする配列を含む宿主細胞である。さらに別の特徴では、本発明は、本発明の核酸または本発明のポリヌクレオチドをコードする核酸を含む、宿主細胞で複製することができる発現ベクターを提供する。

別の特徴では、本発明は、生地のコンドィショニングに十分な条件下で本発明の少なくとも1つのポリペプチドと生地を接触させることを含む、生地をコンディショニングする方法を提供する。本発明のまた別の特徴は、麦汁またはビールの粘性の低下のために十分な条件下、または前記飲料の透明度の増進（例えば清澄化）のために十分な条件下で本発明の少なくとも1つのポリペプチドを添加することを含む飲料の製造方法である。

30

本発明のグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナーゼまたはキシラナーゼを用いて、動物の食物（例えば人間、反芻動物、単胃動物、鳥（例えばニワトリ）のための食糧）中の高分子量グルカンまたは他の多糖類が分解される。本発明の酵素の添加は、消化性の改善により成長速度を高め、このことはさらに動物の同腹子の質を改善する。グルカナーゼは胃腸管で機能し、腸内の粘性を低下させて膵臓酵素の拡散を高める。さらにまた、本発明の酵素は、飼料穀物の内乳細胞壁および野菜タンパク質の処理に用いることができる。本発明のある特徴では、本発明の新規な酵素は、食品中のグルカンまたは他の多糖類の利用を増進させるために動物に投与される。本発明の酵素のこの活性を用いて、不溶性の細胞壁物質を分解し、細胞壁中の栄養素を遊離させることができる（栄養素はその後動物が利用することができるようになる）。本発明の酵素はまたヘミセルロースを栄養糖に変化させ、その結果、以前には細胞壁内に拘束されていた栄養素が遊離される。本発明のグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ酵素は、反芻動物の細菌叢のための栄養源となり得る化合物を生成することができる。

40

#### 【0046】

本発明のまた別の特徴は、以下の工程を含む、動物の食物における栄養性サプリメントとしてグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼを利用する方法を提供する：本発明のアミノ酸配列の少なくとも30の連続するアミノ酸を含む組換えグルカナーゼ酵素を含

50

む栄養性サプリメントを調製する工程；および前記栄養性サプリメントを動物に投与して前記動物が摂取する食餌中に含まれるグルカンまたは他の多糖類の利用を増進させる工程。

本発明の別の特徴では、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ補助食品を動物にデリバリーする方法が提供される。前記方法は以下の工程を含む：顆粒状の食用担体および熱安定性の組換えまたは合成グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素を含むペレットの形状の食用酵素デリバリーマトリックスを調製する工程（ここで前記粒子はその中に含まれるグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素を容易に水性媒体中に分散させる）、および前記食用酵素デリバリーマトリックスを前記動物に投与する工程。前記顆粒状食用担体は、脱油穀類の種、干し草、アルファルファ、チモシー、ダイズ外皮、ヒマワリのひき割り種子およびコムギのミッド（midd）から成る群から選択される担体を含むことができる。前記グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素は本発明のアミノ酸配列を有することができる。

10

別の特徴では、本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする本発明の配列を含む単離、合成または組換え核酸を提供し、ここで前記配列はシグナル配列を含む。本発明はまた、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする配列を含む単離、合成または組換え核酸を提供し、さらに前記配列は、別のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼに由来するシグナル配列を含む。さらにまた、本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする配列を含む単離、合成または組換え核酸を提供し、さらに前記配列はシグナル配列を含まない。

20

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。

本明細書および配列リストが含まれるコンパクトディスク（4部提出）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。

#### 【0047】

本発明は、ポリペプチドおよびそれらをコードするポリヌクレオチド並びにそれらを製造および使用方法を提供する。本発明のポリペプチドの酵素活性は、加水分解酵素活性（例えばグルカナーゼ活性）を有するポリペプチド、例えばグルカンに存在するグリコシド結合を加水分解する（例えば内部 $\beta$ -1,4-グリコシド結合の加水分解を触媒する）ことができるポリペプチドを包含する。本発明のポリペプチド（抗体を含む）の酵素活性は、グルカナーゼ、キシラナーゼ及び／又はマンナナーゼ活性を有するポリペプチドを包含する。本発明の酵素を用いて、食品、飼料（例えば人間用、反芻動物用、単胃動物用、鳥（例えばニワトリ）用）、飲料、栄養性サプリメント、繊維、洗剤などを製造及び／又は加工することができる。本発明の酵素は医薬組成物および栄養性サプリメントで用いることができる。本発明のグルカナーゼ、キシラナーゼまたはマンナナーゼは、食品加工、焼成、動物飼料または、食品、飲料、染料、パルプ加工および紙の処理で有用である。

30

#### 定義

40

“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')<sub>2</sub>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

50

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) 抗体の単一の腕の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。

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された一定量の1つまたは2つ以上のポリペプチド (抗体を含む) もしくは核酸を含む (更なる詳細は下記に記載される) 。

#### 【0048】

本明細書において、“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“核酸”または“核酸配列”という語句はオリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または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 (PN A) 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) を指す。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) 。“オリゴヌクレオチド”は一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは2つの相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖のいずれかが含まれ、前記は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'リン酸基をもたず、したがってキナーゼの存在下でATPを用いてリン酸基を付加されなければ別のオリゴヌクレオチドと連結されない。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と連結することができる。

#### 【0049】

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“コードするヌクレオチド配列”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。

“遺伝子”という用語は、ポリペプチド鎖の生成に関与するDNAセグメントを意味し、コード領域に先行する領域および後続する領域 (リーダーおよびトレイラー) を含み、適切な場合には個々のコードセグメント (エクソン) の間に介在する配列 (イントロン) も同様に含む。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。

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 (すなわちタンパク質コード配列、例えば本発明のグルカナーゼ) 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

10

20

30

40

50

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。

“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線状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”を宿主として受け入れていると記述されている場合には、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ている場合は、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いても、または宿主のゲノム内に取り込まれていてもよい。

#### 【0050】

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。

“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。

“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じように広く、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。この語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、市販もしくは制限なく公開されているか、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。

#### 【0051】

“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。本明細書で用いられる“ポリペプチド”という用語は、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を指し、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。ポリペプチドは、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）によって、または化学的修飾技術（当業界で周知である）によって改変することができる。改変はポリペプチドの任意の場所（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）で生じ得る。あるポリペプチドで同じタイプの改変が同程度または種々の程度で存在し得ることは理解されよう。さらにまた、あるペプチドが多くのタイプの改変を有することもできる。改変にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチド若しくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質若しくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合環状化、ジスルフィド結合の形成、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-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリスツール化、酸化、ポリエチレングリコール化、グルカンヒドロラーゼプロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA仲介付加が含まれる（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)）。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。

#### 【0052】

本明細書において、“単離”という用語は、材料がその本来の環境（例えば、材料が天然に存在する場合はその天然の環境）から取り出されることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然に出現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と同じ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、“精製される”という用語は完全な純度を要求せず、むしろ相対的な定義と考えられている。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されている。これらのクローンから得られる配列は、ライブラリーからもまたは人間の全DNAからも直接入手することはできないであろう。本発明の核酸はその生物体のゲノムDNAの残余のものから少なくとも $10^4$ – $10^6$ 倍精製されてある。しかしながら、“精製される”という用語はまた、ゲノムDNAの残余のものから、またはライブラリー若しくは他の環境中の他の配列から少なくとも1桁、典型的には2または3桁、より典型的には4または5桁まで精製された核酸を含む。

本明細書において、“組換え”という用語は、その天然の環境では近傍にない“骨格”核酸に核酸が近接することを意味する。さらにまた、“濃縮される”ためには、その核酸は、核酸の骨格分子集団において核酸挿入物の数の5%を占めるであろう。本発明の骨格分子には、核酸、例えば発現ベクター、自己複製核酸、ウイルス、問題の核酸挿入物を維持または操作するために用いられる組み込み用核酸および他のベクターまたは核酸が含まれる。典型的には、濃縮された核酸は、組換え骨格分子集団において核酸挿入物の数の15%またはそれより多くを占める。より典型的には、濃縮された核酸は、組換え骨格分子集団において核酸挿入物の数の50%またはそれより多くを占める。ある特徴では、濃縮された核酸は、組換え骨格分子集団において核酸挿入物の数の90%またはそれより多くを占め

る。

#### 【0053】

“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化学的合成によって調製されたものである。ペプチド固相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。そのような方法は1960年初頭以来当業界で知られており (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) )、さらに最近では市販の実験室用ペプチドデザイン合成キット (Cambridge Research Biochemicals) が利用されている。そのような市販の実験室キットは一般的に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” (前記はいずれも一枚のプレートに連結されている) の先端に合成ペプチドを提供する。そのような系を利用する場合、ロッドまたはピンのプレートはひっくり返され、対応するウェルまたはレザバーをもつ第二のプレートに挿入される。前記ウェルまたはレザバーは、前記ピンまたはロッドの先端に適切なアミノ酸を付着または固定させるための溶液を含んでいる。そのような反応工程 (すなわちひっくり返しとロッドとピンの先端を適切な溶液への挿入すること) 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ていく。さらにまた、多数の利用可能な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センブリは、アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems, Inc.) のモデル431A自動ペプチド合成装置を用いて固相上で実施できる。そのような装置は、直接合成によってまたは一連のフラグメントを合成することによって (それらフラグメントは他の公知の技術により結合することができる)、本発明のペプチドの容易な入手を提供する。

#### 【0054】

プロモーター配列は、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をmRNAへ転写するときには“機能可能に連結”されている。

“プラスミド”は、先行する小文字“p”及び／又は後続する大文字及び／又は数字によって示される。本明細書では、開始プラスミドは市販または無制限に公開されているか、または発表された方法にしたがって利用可能なプラスミドから構築することができる。さらにまた、本明細書に記載したプラスミドと等価のものが当分野で知られており、当業者には明白であろう。

DNAの“消化”は、DNA内の一定の配列でのみ作用する制限酵素によるDNAの触媒的切断を指す。本明細書で用いられる種々の制限酵素は市販されており、それらの反応条件、補助因子および他の要件は、当業者に公知のとおり用いられる。分析目的のためには、典型的には1μgのプラスミドまたはDNAフラグメントが約2ユニットの酵素とともに約20μLの緩衝溶液中で用いられる。プラスミドの構築のためにDNAフラグメントを単離する目的の場合には、典型的には5から50μgのDNAが20から250ユニットの酵素とともにより大きな容積で消化される。具体的な制限酵素の適切な緩衝液および基質量は製造元によって特定される。37℃で約1時間のインキュベーション時間が一般的に用いられるが、供給元の指示にしたがって変動し得る。消化後に、ゲル電気泳動を実施して所望のフラグメントを単離することができる。

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、公知の配列比較アルゴリズムの1つ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つ以上の配列を指す。典型的には、実質的同一性は少なくとも約100残基の領域にわたって存在し、もっとも一般的には、配列は少なくとも約150-200残基にわたって実質的に同一である。いくつかの特徴では、配列はコード領域の全長にわたって実質的に同一である。

#### 【0055】

さらにまた、“実質的に同一”なアミノ酸配列は、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部位（触媒ドメイン（CD））ではない部位で生じるとき、および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する）によって参照配列と異なる配列である。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カナーゼポリペプチドから欠失させて、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、グルカナーゼの生物学的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。本発明の改変ポリペプチド配列は、多数の方法によってグルカナーゼの生物学的活性についてアッセイすることができる。前記方法は、改変ポリペプチド配列をグルカナーゼ基質と接触させ、アッセイにおいて前記改変ポリペプチドが特異的基質の量を減少させるか、または機能的なグルカナーゼポリペプチドと基質との酵素反応の生物生成物を増加させるかを決定することを含む。

本明細書で用いられる“フラグメント”は、少なくとも2つの別個の構造物として存在することができる天然に存在するタンパク質の部分である。フラグメントは、天然に存在するタンパク質と同じまたは実質的に同じアミノ酸配列を有し得る。“実質的に同じ”とは、アミノ酸配列がほぼ同じである（完全にではない）が、関連するその配列の少なくとも1つの機能的活性は維持されていることを意味する。一般的には、2つのアミノ酸配列は、もしそれらが少なくとも約85%同一であるならば“実質的に同じ”または“実質的に相同”である。天然に存在するタンパク質と異なる三次元構造を有するフラグメントもまた含まれる。この例は、“プロ型”分子、例えば切断によつて改変され顕著に高い活性をもつ成熟酵素を生じることができる低活性のプロタンパク質である。

#### 【0056】

“ハイブリダイゼーション”は、核酸鎖が相補的な鎖と塩基対形成によって結合する過程を指す。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問題の特定の配列を同定することができる。適切に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。特に、ストリンジェンシーは、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。

例えば、高ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションは約37℃から42℃で約50%のホルムアミドで生じ得よう。約30℃から35℃で約35%から25%のホルムアミドのストリンジェンシーが低下した条件下でハイブリダイゼーションは起り得よう。特にハイブリダイゼーションは、約50%のホルムアミド、5XのSSPE、0.3%SDSおよび200n/mLのせん断変性サケ精子DNA中で約42℃の高ストリンジェンシー条件下で起り得よう。ハイブリダイゼーションは上記のような（しかしながら35℃の低温で35%のホルムアミドの）低ストリンジェンシー条件下で起り得る。個々のストリンジェンシーレベルに対応する温度範囲は、問題の核酸のプリン対ピリミジン比を算出し、それにしたがって温度を調整することによってさらに狭められ得る。上記の範囲および条件についての変動は当業界で周知で

ある。

#### 【0057】

“変種”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（それぞれが）本発明のグルカナ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を指す。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。

10

“飽和変異導入”または“遺伝子部位飽和変異導入(商標)”または“GSSM(商標)”という用語は、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を含む。

“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ングする方法を含み、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を含み、下記で詳細に説明される。

#### 【0058】

##### 核酸の作製および操作

20

本発明は単離、組換えおよび合成核酸を提供する。前記核酸は、例えば本発明の例示的核酸であり、以下を含む：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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335

30

40

50

50

列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518に示される例示的アミノ酸配列をコードする核酸。本発明はまた、本発明の核酸（本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む）を含む発現カセット、例えば発現ベクターを提供する。本発明はまた、本発明の核酸を用いて新規なグルカナーゼ配列を発見する方法を含む。本発明はまた、本発明の核酸を用いてグルカナーゼ遺伝子、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ムブリ、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。

10

#### 【0059】

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の増幅によって製造、単離及び／又は操作することができる。

20

例えば、以下の本発明の例示的配列は、最初に下記の表1に示される以下の供給源から得られた：

表1

| 配列番号    | 供給源                             |
|---------|---------------------------------|
| 291、292 | アキフェクス・エオリクス (Aquifex aeolicus) |
| 161、162 | 古細菌                             |
| 175、176 | 古細菌                             |
| 367、368 | 古細菌                             |
| 479、480 | 古細菌                             |
| 495、496 | 古細菌                             |
| 59、60   | 古細菌                             |
| 75、76   | 古細菌                             |
| 109、110 | 細菌                              |
| 229、230 | 細菌                              |
| 261、262 | 細菌                              |
| 263、264 | 細菌                              |
| 273、274 | 細菌                              |
| 277、278 | 細菌                              |
| 287、288 | 細菌                              |
| 293、294 | 細菌                              |
| 295、296 | 細菌                              |
| 331、332 | 細菌                              |
| 333、334 | 細菌                              |
| 363、364 | 細菌                              |
| 365、366 | 細菌                              |
| 369、370 | 細菌                              |
| 395、386 | 細菌                              |
| 397、398 | 細菌                              |
| 401、402 | 細菌                              |

30

40

50

|         |                      |    |
|---------|----------------------|----|
| 427、428 | 細菌                   |    |
| 433、434 | 細菌                   |    |
| 435、436 | 細菌                   |    |
| 439、440 | 細菌                   |    |
| 447、448 | 細菌                   |    |
| 449、450 | 細菌                   |    |
| 455、456 | 細菌                   |    |
| 483、484 | 細菌                   |    |
| 485、486 | 細菌                   |    |
| 499、500 | 細菌                   | 10 |
| 5、6     | 細菌                   |    |
| 231、232 | 細菌                   |    |
| 67、68   | 細菌                   |    |
| 517、518 | 細菌                   |    |
| 399、400 | テルモトガ (Thermotoga) 種 |    |
| 1、2     | 不明                   |    |
| 101、102 | 不明                   |    |
| 103、104 | 不明                   |    |
| 107、108 | 不明                   |    |
| 11、12   | 不明                   | 20 |
| 111、112 | 不明                   |    |
| 113、114 | 不明                   |    |
| 115、116 | 不明                   |    |
| 117、118 | 不明                   |    |
| 119、120 | 不明                   |    |
| 121、122 | 不明                   |    |
| 123、124 | 不明                   |    |
| 125、126 | 不明                   |    |
| 127、128 | 不明                   |    |
| 129、130 | 不明                   | 30 |
| 13、14   | 不明                   |    |
| 131、132 | 不明                   |    |
| 135、136 | 不明                   |    |
| 137、138 | 不明                   |    |
| 139、140 | 不明                   |    |
| 141、142 | 不明                   |    |
| 143、144 | 不明                   |    |
| 145、146 | 不明                   |    |
| 147、148 | 不明                   |    |
| 149、150 | 不明                   | 40 |
| 15、16   | 不明                   |    |
| 151、152 | 不明                   |    |
| 153、154 | 不明                   |    |
| 155、156 | 不明                   |    |
| 157、158 | 不明                   |    |
| 159、160 | 不明                   |    |
| 163、164 | 不明                   |    |
| 165、166 | 不明                   |    |
| 167、168 | 不明                   |    |
| 169、170 | 不明                   | 50 |

|          |    |    |
|----------|----|----|
| 17、 18   | 不明 |    |
| 171、 172 | 不明 |    |
| 173、 174 | 不明 |    |
| 177、 178 | 不明 |    |
| 179、 180 | 不明 |    |
| 181、 182 | 不明 |    |
| 183、 184 | 不明 |    |
| 185、 186 | 不明 |    |
| 187、 188 | 不明 |    |
| 189、 190 | 不明 | 10 |
| 19、 20   | 不明 |    |
| 191、 192 | 不明 |    |
| 193、 194 | 不明 |    |
| 195、 196 | 不明 |    |
| 197、 198 | 不明 |    |
| 199、 200 | 不明 |    |
| 201、 202 | 不明 |    |
| 203、 204 | 不明 |    |
| 205、 206 | 不明 |    |
| 207、 208 | 不明 | 20 |
| 209、 210 | 不明 |    |
| 21、 22   | 不明 |    |
| 211、 212 | 不明 |    |
| 213、 214 | 不明 |    |
| 215、 216 | 不明 |    |
| 217、 218 | 不明 |    |
| 219、 220 | 不明 |    |
| 221、 222 | 不明 |    |
| 223、 224 | 不明 |    |
| 225、 226 | 不明 | 30 |
| 227、 228 | 不明 |    |
| 23、 24   | 不明 |    |
| 233、 234 | 不明 |    |
| 235、 236 | 不明 |    |
| 237、 238 | 不明 |    |
| 239、 240 | 不明 |    |
| 241、 242 | 不明 |    |
| 243、 244 | 不明 |    |
| 245、 246 | 不明 |    |
| 247、 248 | 不明 | 40 |
| 249、 250 | 不明 |    |
| 25、 26   | 不明 |    |
| 251、 252 | 不明 |    |
| 253、 256 | 不明 |    |
| 257、 258 | 不明 |    |
| 259、 260 | 不明 |    |
| 265、 266 | 不明 |    |
| 267、 268 | 不明 |    |
| 269、 270 | 不明 |    |
| 27、 28   | 不明 | 50 |

|         |    |    |
|---------|----|----|
| 271、272 | 不明 |    |
| 275、276 | 不明 |    |
| 279、280 | 不明 |    |
| 281、282 | 不明 |    |
| 283、284 | 不明 |    |
| 285、286 | 不明 |    |
| 289、290 | 不明 |    |
| 29、30   | 不明 |    |
| 297、298 | 不明 |    |
| 299、300 | 不明 | 10 |
| 3、4     | 不明 |    |
| 301、302 | 不明 |    |
| 303、304 | 不明 |    |
| 305、306 | 不明 |    |
| 307、308 | 不明 |    |
| 309、310 | 不明 |    |
| 31、32   | 不明 |    |
| 311、312 | 不明 |    |
| 313、314 | 不明 |    |
| 315、316 | 不明 | 20 |
| 317、318 | 不明 |    |
| 319、320 | 不明 |    |
| 321、322 | 不明 |    |
| 323、324 | 不明 |    |
| 325、326 | 不明 |    |
| 327、328 | 不明 |    |
| 329、330 | 不明 |    |
| 33、34   | 不明 |    |
| 335、336 | 不明 |    |
| 337、338 | 不明 | 30 |
| 339、340 | 不明 |    |
| 341、342 | 不明 |    |
| 343、344 | 不明 |    |
| 345、346 | 不明 |    |
| 347、348 | 不明 |    |
| 349、350 | 不明 |    |
| 35、36   | 不明 |    |
| 351、352 | 不明 |    |
| 353、354 | 不明 |    |
| 355、356 | 不明 | 40 |
| 357、358 | 不明 |    |
| 359、360 | 不明 |    |
| 361、362 | 不明 |    |
| 37、38   | 不明 |    |
| 371、372 | 不明 |    |
| 373、374 | 不明 |    |
| 375、376 | 不明 |    |
| 377、378 | 不明 |    |
| 379、380 | 不明 |    |
| 381、382 | 不明 | 50 |

|         |    |    |
|---------|----|----|
| 383、384 | 不明 |    |
| 385、386 | 不明 |    |
| 387、388 | 不明 |    |
| 389、390 | 不明 |    |
| 39、40   | 不明 |    |
| 391、392 | 不明 |    |
| 393、394 | 不明 |    |
| 403、404 | 不明 |    |
| 405、406 | 不明 |    |
| 407、408 | 不明 | 10 |
| 409、410 | 不明 |    |
| 41、42   | 不明 |    |
| 411、412 | 不明 |    |
| 413、414 | 不明 |    |
| 415、416 | 不明 |    |
| 417、418 | 不明 |    |
| 419、420 | 不明 |    |
| 421、422 | 不明 |    |
| 423、424 | 不明 |    |
| 425、426 | 不明 | 20 |
| 429、430 | 不明 |    |
| 43、44   | 不明 |    |
| 431、432 | 不明 |    |
| 437、438 | 不明 |    |
| 441、442 | 不明 |    |
| 443、444 | 不明 |    |
| 445、446 | 不明 |    |
| 45、46   | 不明 |    |
| 451、452 | 不明 |    |
| 453、454 | 不明 | 30 |
| 457、458 | 不明 |    |
| 459、460 | 不明 |    |
| 461、462 | 不明 |    |
| 463、464 | 不明 |    |
| 465、466 | 不明 |    |
| 467、468 | 不明 |    |
| 469、470 | 不明 |    |
| 47、48   | 不明 |    |
| 471、472 | 不明 |    |
| 473、474 | 不明 | 40 |
| 475、476 | 不明 |    |
| 477、478 | 不明 |    |
| 481、482 | 不明 |    |
| 487、488 | 不明 |    |
| 489、490 | 不明 |    |
| 49、50   | 不明 |    |
| 491、492 | 不明 |    |
| 493、494 | 不明 |    |
| 497、498 | 不明 |    |
| 501、502 | 不明 | 50 |

|         |    |    |
|---------|----|----|
| 503、504 | 不明 |    |
| 505、506 | 不明 |    |
| 507、508 | 不明 |    |
| 509、510 | 不明 |    |
| 51、52   | 不明 |    |
| 511、512 | 不明 |    |
| 513、514 | 不明 |    |
| 515、516 | 不明 |    |
| 53、54   | 不明 |    |
| 55、56   | 不明 | 10 |
| 57、58   | 不明 |    |
| 61、62   | 不明 |    |
| 63、64   | 不明 |    |
| 65、66   | 不明 |    |
| 69、70   | 不明 |    |
| 7、8     | 不明 |    |
| 71、72   | 不明 |    |
| 73、74   | 不明 |    |
| 77、78   | 不明 |    |
| 79、80   | 不明 | 20 |
| 81、82   | 不明 |    |
| 83、84   | 不明 |    |
| 85、86   | 不明 |    |
| 87、88   | 不明 |    |
| 89、90   | 不明 |    |
| 9、10    | 不明 |    |
| 91、92   | 不明 |    |
| 93、94   | 不明 |    |
| 95、96   | 不明 |    |
| 97、98   | 不明 | 30 |
| 99、100  | 不明 |    |

#### 【0060】

ある特徴では本発明は、グルカナーゼコード核酸および前記によってコードされるポリペプチドを提供する（これらは共通の供給源（例えば環境性供給源または古細菌供給源）から得られるという共通の新規性を有する）。

本発明の方法の実施では、本明細書に記載されているように鑄型核酸を操作することによって相同な遺伝子を改変することができる。本発明は、当業界で知られている（学術文献および特許文献に詳しく記載されている）任意の方法またはプロトコルまたは装置と組み合わせて実施することができる。

本発明のある特徴は、本発明の配列の1つを含む単離核酸、または本発明の核酸の連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400または500塩基を含むフラグメントである。前記単離核酸は、DNA（cDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAを含む）を含むことができる。前記DNAは二本鎖でも一本鎖でもよく、一本鎖の場合はコード鎖でも非コード（アンチセンス）鎖でもよい。あるいは、前記単離核酸はRNAでもよい。

本発明の単離核酸を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドの1つの連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150のアミノ酸を含むフラグメントを調製することができる。

したがって、本発明のまた別の特徴は、本発明のポリペプチドの1つ、または本発明のポリペプチドの1つの連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100ま

10

20

30

40

50

たは150のアミノ酸を含むフラグメントをコードする単離核酸である。これら核酸のコード配列は本発明の核酸の1つのコード配列の1つと同一であってもよく、または、遺伝暗号の重複性または縮退性の結果として、本発明のポリペプチドの1つの連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150のアミノ酸を含む、本発明のポリペプチドの1つをコードする異なるコード配列でもよい。遺伝暗号は当業者には周知であり、例えば以下の文献の214ページで入手することができる：B. Lewin, Genes VI, Oxford University Press, 1997。

#### 【0061】

本発明のポリペプチドの1つをコードする単離核酸は以下を含む（ただしこれらに限定されない）：本発明の核酸のコード配列のみ、および追加のコード配列、例えばリーダー配列、またはプロタンパク質配列および非コード配列、例えばイントロンまたはコード配列の5'及び／又は3'配列。したがって、本明細書において、“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”という用語は、ポリペプチドのコード配列のみを含む含むポリヌクレオチドだけではなく追加のコード配列及び／又は非コード配列を含むポリヌクレオチドも同様に包含する。

10

また別には、本発明の核酸配列を、通常の技術、例えば位置特異的変異導入または当業者に周知の他の技術を用いて変異させ、サイレント変化を本発明のポリヌクレオチドに導入してもよい。本明細書で用いられるように、“サイレント変化”には、例えばポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸を変更させない変化が含まれる。そのような変化は、前記ポリペプチドをコードするベクターを含む宿主細胞で頻繁に生じるコドンまたはコドン対を導入することによって前記宿主生物によって生成されるポリペプチドのレベルを増加させるために望ましい。

20

本発明はまた、本発明のポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および切端を生じるヌクレオチド変化を有するポリペプチドに関する。そのようなヌクレオチドの変化は、例えば位置特異的変異導入、化学物質によるランダム変異導入、エキソヌクレアーゼIIIによる欠失および他の組換えDNA技術のような技術を用いて導入することができる。あるいは、そのようなヌクレオチド変化は天然に存在する対立遺伝子座変種であってもよい。前記変種は、本明細書で提供される高度、中等度または低度のストリンジェンシー条件下で、本発明の配列の1つの連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400または500塩基（または前記に対して相補的な配列）を含むプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を同定することによって単離される。

30

#### 【0062】

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（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）は個々に単離またはクロニングし、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

50

Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acids Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)。

#### 【0063】

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 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位相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、例えば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などの目的のために、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FLAGS 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レドキシニ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; D obeli (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)。

#### 【0064】

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-ホスホグリセレートキナーゼ (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前初期プロモーター、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。細菌でポリペプチドまたはそのフラグメントを発現するために適切なプロモーターには、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P<sub>R</sub>プロモーター、ラムダP<sub>L</sub>プロモーター、糖分解酵素（例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ（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。真菌のプロモーターには、\_\_因子プロモーターが含まれる。真核細胞プロモーターには、CMV前初期プロモーター、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。

#### 【0065】

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カナ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、本発明のグルカナ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。

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。

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）が含まれ得る。

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カナ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。

#### 【0066】

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 (例えば上掲書 (Rinehart (1996)) に記載されている)。核酸は、ワタの繊維細胞で優先的に発現されるようにFbl2A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: Ficker (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させ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。

#### 【0067】

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応答するプロモーター (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、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。

10

#### 【0068】

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、組織特異的植物プロモーターは、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。

20

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。本発明のグルカナーゼ生成核酸の誘導性発現によって、栽培者は最適グルカナーゼ発現および／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。

30

いくつかの特徴では、適切なポリペプチド発現には、コード領域の3'末端のポリアデニル化領域が必要かもしれない。前記ポリアデニル化領域は、天然の遺伝子、種々の他の植物（または動物またその他の）遺伝子、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。

40

#### 【0069】

発現ベクターおよびクローニングビヒクル：本発明は、本発明の核酸、例えば本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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ビヒクルを提供する。本発明の発現ベクターおよびクローニングビヒクルは、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の誘導体）、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

50

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：pQ E 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、ポリアダニル化部位、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ダ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提供することができる。

10

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なマーカーには、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、大腸菌に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. 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。

20

#### 【0070】

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 および Sambrook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。

30

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の誘導体、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使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。

40

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 Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA)、pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pD10、psiX174、pBluescript IIS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)、pKK232-8およびpCM7。具体的な真核細胞ベクターには、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)、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。

#### 【0071】

50

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知で、例えばアグロバクテリウム種、ジャガイモウイルス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)、ビーコンゴールドモザイクウイルス (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由来のベクターが含まれよう。

#### 【0072】

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。

発現ベクター内のDNA配列は、RNA合成の指令のために適切な発現制御配列 (プロモーター) に機能可能に連結される。具体的な細菌プロモーターを例示すればlacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダP<sub>R</sub>、P<sub>L</sub>およびtrpが含まれる。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、レトロウイルス由来のLTR並びにマウスのメタルチオネイン-Iが含まれる。適切なベクターおよびプロモーターの選別は当業者の技術レベル内である。発現ベクターはまた転写開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含む。ベクターはまた発現増幅のために適切な配列を含むことができる。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マーカーをもつ他のベクターを用いて任意の所望遺伝子から選択することができる。さらにまた、ある特徴では発現ベクターは1つまたは2つ以上の選別可能マーカー遺伝子を含み、形質転換細胞の選別のために表現型の特質 (真核細胞培養については例えばジヒ

ドロホレートレダクターゼ若しくはネオマイシン耐性、または大腸菌については例えばテトラサイクリン若しくはアンピシリン耐性)を提供する。

哺乳動物の発現ベクターはまた、複製起点、必要な任意のリボソーム結合部位、ポリアダニル化部位、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'フランキング非転写配列を含むことができる。いくつかの特徴では、必要な非転写遺伝的エレメントを提供するためSV40スプライスおよびポリアダニル化部位に由来するDNA配列が用いられる。

#### 【0073】

真核細胞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発現レベルを増加させ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、通常長さが約10から300bpで、プロモーターに近接して作用しその転写を増進させる。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。

さらにまた、発現ベクターは典型的には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、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、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. cerevisiae* (S. cerevisiae) のTRP1遺伝子が含まれる。

いくつかの特徴では、本発明のポリペプチドの1つ、または前記の連続する5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメント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。場合によって、前記核酸は融合ポリペプチドをコードすることができ、前記融合ポリペプチドでは、本発明のポリペプチドの1つ、または連続する5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むそのフラグメントが異種ペプチドまたはポリペプチド(例えばN-末端識別ペプチド)に融合され、所望の性状(例えば安定性強化または精製の簡便化)が付与される。

適切なDNA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、DNA配列は、挿入物およびベクターの適切な制限酵素による消化に続いて、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文献に記載されている: Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997およびSambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。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。

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使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(Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor, NY (1989))。

#### 【0074】

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カナ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、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*)、ストレプトミセス、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バチルス・セレウス (*B. cereus*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) またはバチルス属、ストレプトミセス属、およびスタフ

イ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。例示的な酵母細胞には、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) が含まれる。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若しくは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. Dibner, I. Battey, *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986))。

#### 【0075】

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CaPO<sub>4</sub>沈殿、リポソーム融合、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、ヒドロキシア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。

#### 【0076】

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応じて、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

10

20

30

40

50

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線状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。

関心のあるポリヌクレオチド、例えば本発明の核酸を含む宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選別または遺伝子の増幅に適切のように改変した通常の栄養培養液で培養することができる。培養条件（例えば温度、pHなど）は発現のために選択された宿主細胞で以前に用いられた条件であり、当業者には明白であろう。続いて、特定の酵素活性を有すると同定されたクローンの配列を決定し、活性が強化された酵素をコードするポリヌクレオチド配列を同定する。

本発明は、本発明の核酸、例えば本発明の例示的配列と少なくとも約100残基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%またはそれより高い配列同一性を有する核酸配列を含む核酸（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）、または本発明の核酸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を含むベクターを発現させることを含む、細胞内で組換えグルカナーゼを過剰発現させる方法を提供する。過剰発現は任意の手段、例えば高活性プロモーターの使用、二シストロン性ベクターまたはベクターの遺伝子増幅によって実施することができる。

#### 【0077】

本発明の核酸は、任意のin vitroまたはin vivo発現系で発現または過剰発現させることができる。任意の細胞培養系（細菌、酵母、真菌または哺乳動物細胞培養を含む）を利用して、組換えタンパク質を発現または過剰発現させることができる。過剰発現は、プロモーター、エンハンサー、ベクター（例えばレプリコンベクター、二シストロン性ベクター（例えば以下を参照されたい：Gurtu (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 229:295-8）、培養液、培養系などを適切に選択することによって実施できる。ある特徴では、細胞系で選別マーカー（例えばグルタミンシンターゼ（例えば以下を参照されたい：Saders (1987) Dev. Biol. Stand. 66:55-63））を使用する遺伝子増幅を用いて本発明のポリペプチドが過剰発現される。

このアプローチに関するさらなる詳細は刊行物に記載され及び／又は当業者に公知である。特に非限定的に例示すれば、そのような利用可能な刊行物には、EP0659215 (WO9403612A1) (Nevalainen et al.) ; A. Lapidot, A. Machly, Y. Shoham, "Overexpression and single-step purification of a thermostable glucanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6," J. Biotechnol. Nov. 51:259-64 (1996) ; E. Leuthi, N.B. Jasmat, P.L. Bergquist, "Endoglucanase from extremely thermophilic bacterium *Caldocellum Saccharo lyticum*: overexpression of the gene in *Escherichia coli* and characterization of the gene product," Appl. Environ. Microbiol. Sep. 56:2677-83 (1980) ; およびW.L. Sung, C.K. Luk, D.M. Zahab, W. Wakarchuk, "Overexpression of the *Bacillus subtilis* and *circulans* endoglucanases in *Escherichia coli*," Protein Expr. Purif. Jun 4:200-6 (1993)が含まれるが、ただしこれらの参考文献は本出願の酵素を開示してはいない。

#### 【0078】

前記宿主細胞は当業者に周知の任意の宿主細胞でもよく、原核細胞、真核細胞、哺乳動

物細胞、昆虫細胞または植物細胞が含まれる。適切な宿主の代表的な例として、以下を挙げることができる：細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 並びに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；菌類（例えば酵母）；昆虫細胞、例えばドロソフィラ S2 およびスポドプテラ Sf9；動物細胞、例えば CHO、COS またはボウズ・メラノーマ；およびアデノウイルス。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。

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. Dibner, I. Battey, *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986))。

10

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、形質転換体の選別または遺伝子の増幅に適切のように改変した通常の栄養培養液で培養することができる。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。

細胞を典型的には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。

20

30

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 (Gluzman が記載: *Cell*, 23:175, 1981) および適合ベクターからタンパク質を発現す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。組換え体の産生方法で用いられる宿主細胞に応じて、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。

あるいは、本発明のポリペプチドまたは前記の連続する少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100 または 150 アミノ酸を含むフラグメントは、通常のペプチド合成装置による合成によって製造することもできる。ある特徴では、ポリペプチドのフラグメントまたは部分をペプチド合成によって対応する完全長のポリペプチドの製造に用いることができる。

40

無細胞翻訳系もまた、本発明のポリペプチドの 1 つまたは前記の連続する少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100 または 150 アミノ酸を含むフラグメント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 を使用する）。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線状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

50

）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。

【0079】

核酸の増幅：本発明を実施するとき、本発明の核酸および本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたは帰しラーゼ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。

ある特徴では、本発明は、本発明のプライマー対によって増幅された核酸を提供する。前記プライマー対は、例えば本発明の核酸の最初の（5'側の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基、および相補鎖の最初の（5'側の）約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基によって示される。

本発明は、グルカナ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を提供する。前記プライマー対は、本発明の配列を含む核酸また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することができる。前記増幅プライマー配列の一方または各メンバーは、前記配列の連続する少なくとも約10から50塩基、または前記配列の連続する約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。本発明は増幅プライマー対を提供し、前記プライマー対は、本発明の核酸の最初の（5'側の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基によって示される配列を有する第一のメンバーおよび前記第一のメンバーの相補鎖の最初の（5'側の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基によって示される配列を有する第二のメンバーを含む。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて、増幅（例えばポリメラーゼ連鎖反応）によって生成されたグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを提供する。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて、増幅（例えばポリメラーゼ連鎖反応）によってグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを製造する方法を提供する。ある特徴では、前記増幅プライマー対は、ライブラリー、例えば遺伝子ライブラリー（例えば環境性ライブラリー）から核酸を増幅させる。

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の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。

【0080】

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。

【0081】

配列同一性の程度の決定

本発明は、本発明の例示的核酸（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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:199、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517）と少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、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%、

10

20

30

40

50

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。

10

#### 【0082】

本発明の核酸配列は、本発明の例示的配列の連続する少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400または500ヌクレオチド、および前記と実質的に相同な配列を含むことができる。本発明の核酸配列に相同な配列およびフラグメントは、これら配列に対して99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%または50%相同であると称することができる。相同性は、任意のコンピュータプログラム(FASTA ver. 3.0t78を含む)および本明細書に記載のパラメーター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, 3<sup>rd</sup> 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。

20

本特許明細書のいずれかの箇所で特定される種々の配列比較プログラムは、特に本発明のこの特徴において使用することが意図される。タンパク質及び/又は核酸配列の相同性は、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)。

30

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出す。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、多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、特定のパーセンテージの同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つまたは3つ以上の配列または部分配列を指す。

40

配列比較の場合、典型的には一方の配列は参照配列として機能し、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

50

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。

### 【0083】

本明細書で用いられる“比較ウィンドウ”は、20から600、通常は約50から約200、より通常は約100から約150から成る群から選択される任意数の連続する位置のセグメントに対する参照を含み、前記ウィンドウにおいて、ある配列が同じ数の連続した位置の参照配列と前記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。比較のために参照配列をアラインメントする方法は当業者に周知である。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、Intervals & Points、BMB、CLUSTALV、CLUSTALW、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Waterman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の一部として利用可能である (J. Roach, [http://weber.u.washington.edu/~roach/human\\_genome\\_progress2.html](http://weber.u.washington.edu/~roach/human_genome_progress2.html)) (Gibbs, 1995)。少なくとも21の他のゲノムが既に配列決定されており、前記には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) が含まれる。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。

### 【0084】

有用なアルゴリズムの一例は、BLASTおよびBLAST2.0であり、前記は、それぞれ以下に記載されている: Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402および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。

#### 【0085】

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、前記は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提供する。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、ある特徴では、好ましくは約0.01未満、ある特徴では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”) を用いて評価される。特に、5つの特別なBLASTプログラムを用いて以下のタスクが実行される：(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、ある特徴では、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、ある特徴では、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)。ある特徴では、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))。ある特徴では、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)。BLASTプログラムは米国国立医学図書館 (U.S. National Library of Medicine) から入手できる。

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、調査される配列の長さおよび相同性の程度に応じて適合させることができる。いくつかの特徴では、前記パラメーターは、ユーザーの指示のない状態でアルゴリズムによって使用される規定値パラメーターでもよい。

## 【0086】

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。

10

本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチド配列（例えば本発明の例示的配列）並びに前記と実質的に同一の配列、および先行する配列のいずれかのフラグメントを含む。実質的に同一の（または相同な）ポリペプチド配列は、本発明の例示的配列と少なくとも約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、または完全な（100%）配列同一性を有するポリペプチド配列を指す。

相同性は本明細書に記載した任意のコンピュータプログラムおよびパラメーター（規定値パラメーターまたは任意の改変パラメーターによるFASTAバージョン3.0t78を含む）を用いて決定できる。相同な配列は本明細書に記載した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。前記ポリペプチドフラグメントは、本発明のポリペプチドの連続する少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500またはそれより長いアミノ酸を含む。本発明のアミノ酸配列で示されるポリペプチドコードは、伝統的な一文字形式または三文字形式（Stryer, Lubert. Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New Yorkの裏表紙の内側を参照されたい）、またはポリペプチドの実態に関する他の任意の様式で表わすことができることは理解されよう。

20

## 【0087】

本発明の核酸またはポリペプチド配列は、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保存し、記録し、さらに操作することができる。本明細書で用いられるように、“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現在知られている任意の方法を容易に利用して、1つまたは2つ以上の本発明の核酸配列、1つまたは2つ以上の本発明のポリペプチド配列を含む製品を製造することができる。本発明の別の特徴は、少なくとも2、5、10、15若しくは20、またはそれより多い本発明の核酸配列が記録されたコンピュータ読み出し可能媒体である。

30

本発明のまた別の特徴は、1つまたは2つ以上の本発明の核酸配列が記録されたコンピュータ読み出し可能媒体である。本発明のまた別の特徴は、1つまたは2つ以上の本発明のポリペプチド配列が記録されたコンピュータ読み出し可能媒体である。本発明のまた別の特徴は、上記に示された配列の少なくとも2、5、10、15若しくは20、またはそれより多い配列が記録されたコンピュータ読み出し可能媒体である。

40

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。

## 【0088】

50

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、本明細書に記載されている配列情報を保存し、これを実行するコンピュータシステムが含まれる。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、本発明の核酸配列のヌクレオチド配列、または本発明の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）は典型的には、配列データを処理し、これにアクセスし、さらに前記を実行するプロセッサを含む。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・マシーンズ（IBM）の類似のプロセッサであり得る。

10

典型的には、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。

#### 【0089】

特にある特徴では、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。いくつかの特徴では、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。

20

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。いくつかの特徴では、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。

30

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。

本発明の核酸配列のヌクレオチド配列または本発明のポリペプチド配列にアクセスし前記を実行するためのソフト（例えば検索ツール、比較ツールまたはモデリングツールなど）は実行時にはメインメモリー（115）に存在するであろう。

40

#### 【0090】

いくつかの特徴では、コンピュータシステム（100）はさらに、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列（コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている）を参照ヌクレオチドまたはポリペプチド配列（コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている）と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。“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核酸配列のヌクレオチド配列または本発明のポリペプチド配列を、コンピュータ読み出し可能媒体に保存されてい

50

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。

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。

#### 【0091】

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内にある配列は、プロセス（200）で“同じ”と示される。

2つの配列が同じであるという決定が下されたら、プロセス（200）は状態（214）に移行し、ここ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、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列が保存されているデータ保存装置、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列と比較するための参照ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が検索できるように保存されたデータ保存装置、および比較を実施するための配列コンペアラール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、または本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列コード内の構造モチーフを同定するか、またはこれら核酸コードおよび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。いくつかの特徴では、前記データ保存装置には、本発明の核酸配列、または本発明のポリペプチド配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30若しくは40またはそれより多い配列が保存されていることもあり得る。

#### 【0092】

また別の特徴は、本発明の核酸配列（または本発明のポリペプチド配列）と参照ヌクレ

オチド配列との間の相同性レベルを決定する方法である。前記方法は、核酸コードまたはポリペプチドコード、および参照ヌクレオチドまたはポリペプチド配列をコンピュータプログラム（前記は相同性レベルを決定する）により読み取り、核酸コードまたはポリペプチドコードと参照ヌクレオチドまたはポリペプチド配列との間の相同性を前記コンピュータプログラムにより決定することを含む。前記コンピュータプログラムは、相同性レベルを決定するための多数のコンピュータプログラムのいずれでもよいが、特に本明細書に列挙されたものが含まれる（例えば規定値パラメーターまたは任意の改変パラメーターを用いるBLAST2N）。前記方法は上記に記載したコンピュータシステムを用いて実行することができる。前記方法はまた、上記に記載した本発明の核酸配列、または本発明のポリペプチド配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30若しくは40またはそれより多い配列をコンピュータプログラムを用いてより読み取り、さらに核酸コードまたはポリペプチドコードと参照ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列との間の相同性を決定することによって実施することができる。

10

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。

20

#### 【0093】

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。

30

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配列間で同じであった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。

あるいは、コンピュータプログラムは、本発明に示された核酸配列のヌクレオチド配列を1つまたは2つ以上の参照ヌクレオチド配列と比較して、本発明の核酸コードが参照核酸配列と1つまたは2つ以上の位置で異なるか否かを決定するコンピュータプログラムであってもよい。場合によってはそのようなプログラムは、参照ポリヌクレオチド配列または本発明の核酸配列の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の長さまたはそれらが何であるかを記録する。ある特徴では、コンピュータプログラムは、本発明の核酸配列が、参照ヌクレオチド配列に対して一ヌクレオチド多型性（SNP）を含むか否かを決定するプログラムであってもよい。

40

#### 【0094】

したがって、本発明の別の特徴は、本発明の核酸配列が、参照ヌクレオチド配列と1つまたは2つ以上のヌクレオチドで異なるか否かを決定する方法であり、前記方法は以下の工程を含む：核酸配列間の相違を同定するコンピュータプログラムを使用して核酸コードおよび参照ヌクレオチド配列を読み取る工程および核酸コードおよび参照ヌクレオチド配列との間の相違を前記コンピュータプログラムにより同定する工程。いくつかの特徴では

50

コンピュータプログラムは一ヌクレオチド多型性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。前記方法はまた、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核酸配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30若しくは40またはそれより多い配列および参照ヌクレオチド配列を読み取り、さらにコンピュータプログラムにより核酸コードと参照ヌクレオチド配列との間の相違を同定することによって実施することができる。

他の特徴では、前記コンピュータ使用システムはさらに、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列内の特徴を同定するアイデンティファイヤーを含むことができる。“アイデンティファイヤー”は、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド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。ある特徴では、アイデンティファイヤーは、本発明の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。

#### 【0095】

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、例えば酵素触媒ドメイン（CD）または活性部位、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、前記特徴の属性の比較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。

#### 【0096】

したがって、本発明のまた別の特徴は、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列内の特徴を同定する方法であり、前記方法は以下の工程を含む：本発明の核酸コードまたはポリペプチド配列を、それらに存在する特徴を同定するコンピュータプログラムを使用して読み取る工程および核酸コード内の特徴を前記コンピュータプログラムにより同定する工程。ある特徴では、コンピュータプログラムはオープンリーディングフレームを同定するコンピュータプログラムを含む。前記方法は、ただ1つの配列または本発明の複数の核酸配列もしくは複数のポリペプチド配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30、または40をコンピュータプログラムを使用して読み取り、さらに前記コンピュータプログラムを用いて核酸コードまたはポリペプチドコード内の特徴を同定することによって実施することができる。

本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列は、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、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列は、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（商標）、SYBASE（商標）またはORACLE（（商標））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（WORD（商標））またはワードパーフェクト（WORDPERFECT（商標））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または本発明のポリペプチド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。以下のリストは、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列に関して有用なプログラムおよびデータベースの手引きを提供することを意図し、本発明を限定しようとするものではない。

#### 【0097】

使用することができ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.）、Cerius<sup>2</sup>.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。他の多くのプログラムおよびデータベースも本発明の開示が提供された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（触媒ドメイン（CD））、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。

#### 【0098】

##### 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、合成または組換え核酸を提供する。前記例示的な配列は、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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:8

9、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517である。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、及び／又は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。

#### 【0099】

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又はそれより大きい残基であり得る。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、

10

20

30

40

50

標識プローブ、PCRオリゴヌクレオチドプローブ、iRNA（一本鎖または二本鎖）、アンチセンス配列、または抗体結合ペプチド（エピトープ）、モチーフ、活性部位（触媒ドメイン（CD））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。

あるいは、本発明の核酸は、42℃、約50%ホルムアミド、5XのSSPE、0.3%SDSおよび反復配列ブロッキング核酸（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。

核酸のハイブリダイゼーションでは、具体的な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応じて変動するであろう。例えば核酸のハイブリダイズする領域の長さ、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）および核酸のタイプ（例えばRNA対DNA）はハイブリダイゼーションの条件の選択で考慮することができる。さらにまた考慮されることは、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ということである。

#### 【0100】

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、固定された変性核酸を含むポリマーメンブレンは、先ず初めに0.9MのNaCl、50mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>（pH7.0）、5.0mMのNa<sub>2</sub>EDTA、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から成る溶液中で45℃、30分予備ハイブリダイズされる。続いて、約2X10<sup>7</sup>cpm（比活性4-9X10<sup>8</sup>cpm/μg）の<sup>32</sup>P末端標識オリゴヌクレオチドプローブを前記溶液に添加する。12から16時間インキュベートした後、前記メンブレンを0.5%のSDSを含む、1XのSET（150mMのNaCl、20mMのトリス-塩酸（pH7.8）、1mMのNa<sub>2</sub>EDTA）中で30分、室温で洗浄し、続いて前記オリゴヌクレオチドプローブのT<sub>m</sub>-10℃で新しい1XのSETで30分洗

前述の全てのハイブリダイゼーションは高ストリンジェンシー条件下にあると考えられるであろう。

ハイブリダイゼーションの後、フィルターを洗浄して比特異的に結合した検出可能なプローブを一切除去することができる。フィルターの洗浄に用いられるストリンジェンシーはまた、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含有量）および核酸のタイプ（例えばRNA対DNA）に応じて変動し得る。ストリンジェンシーがだんだんと高くなる洗浄条件の例は以下のとおりである：2XのSSC、0.1%のSDS、室温で15分（低ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5%のSDS、室温で30分から1時間（中等度ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5%のSDS、ハイブリダイゼーション温度から68℃で15から30分（高ストリンジェンシー）；および0.15MのNaCl、72℃で15分（超高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。前述の例は、フィルターの洗浄で用いることができる1組の条件の単なる例示である。種々のストリンジェンシーの洗浄レシピが多数存在することは当業者には知られていよう。

プローブと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通常的な技術によって同定される。

#### 【0101】

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、ストリンジエ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<sup>+</sup>濃度を有するハイブリダイゼーション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）中で42℃の温度で実施することができる。この場合、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を50%から0%まで5%ずつ減少させ、プローブに対して相同性レベルの低いクロンを同定することができる。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% 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。“中等度の”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。

#### 【0102】

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：pH 7で約0.02Mの塩濃度、および少なくとも約50℃または約55℃から約60℃；または約0.15MのNaClの塩濃度で72℃、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から約20分；またはハイブリダイゼーション複合体を、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。例えば、前述の方法を用いて、本発明の配列の1つ、または連続する少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、300、400または500塩基を含む前記のフラグメント、およびそれらと相補的な配列から成る群から選択される核酸配列に対して少なくとも約97%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%相同性を有する核酸配列を単離することができる。相同性はアラインメントアルゴリズムを用いて測定することができる。例えば、相同なポリヌクレオチドは、本明細書に記載したコード配列の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ことができる。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ことができる。

さらにまた、上記の方法を用いて、本発明のポリペプチドまたは連続する前記の少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメントに対して、配列アラインメントアルゴリズム（例えば規定値パラメータを用いるFASTAバージョン3.0t78アルゴリズム）を用いたとき、少なくとも約99%、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%、または少なくとも50%の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。

#### 【0103】

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、例えばグルカナ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、またはグルカナ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、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、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。

10

本発明の単離核酸、または本発明の配列の1つの連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400若しくは500塩基を含むフラグメント、または前記と相補的な配列を用いて、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プローブを接触させることによって、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。

20

#### 【0104】

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。

30

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。前記方法の各々のプロトコルは以下に示されている：Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley 503 Sons, Inc. (1997)およびSambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。

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。典型的には、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、上掲書）に記載されている。あるいは、増幅はリガーゼ連鎖反応、3SRまたは鎖置換反応を含むことができる（以下を参照されたい：F. Barany, "The Ligase Chain Reaction in a PCR World", *PCR Methods and Applications* 1:5-16, 1991; E. Fahy et al., "Self-sustained Sequence Replication (3SR): An Isothermal Transcription-based Amplification System Alternative to PCR", *PCR Methods and Applications* 1:25-33, 1991;およびG.T. Walker et al., "Strand Displacement Amplification an Isothermal in vitro DNA Amplification Technique", *Nucleic Acid Research* 20:1691-1696, 1992)。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

40

50

応を実施し、さらに生成された任意の増幅生成物を検出する。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オートラジオグラフィーによって検出してもよい。

#### 【0105】

本発明の配列の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、本発明の配列の近傍に位置する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、さらに別のタンパク質をコードする遺伝子を前記宿主生物から単離

10

することを可能にする。

本発明の単離核酸、前記と相補的な配列、または本発明の配列の1つの連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400若しくは500塩基を含むフラグメント、若しくは前記と相補的な配列をプローブとして用いて関連核酸を同定および単離することができる。いくつかの特徴では、前記関連核酸は、前記核酸が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であり得る。例えば前記の他の生物は関連する生物であり得る。そのような方法では、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、核酸サンプルを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用いて検出される。

検出可能なプローブとハイブリダイズする核酸（例えばcDNAまたはゲノムDNA）を同定するために用いられるハイブリダイゼーションのストリンジェンシーレベルを変動させることによって、プローブに対して種々のレベルの相同性を有する核酸を同定および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℃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。

20

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。

30

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： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log[Na^+]) + 0.41 (G+C \text{ の割合}) - (0.63 \% \text{ホルムアミド}) - (600/N)$ 、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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およびデンハルト溶液のための組成は例えば上掲書（Sambrook）に挙げられている。

ハイブリダイゼーションは、検出可能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。典型的には、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。通常では、50%ホルムアミド含有溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、ハイブリダイゼーションは約42℃で実施される。

40

#### 【0106】

酵素（グルカナーゼ）の発現阻害

50

本発明は、本発明の核酸（例えばエンドグルカナーゼ-、マンナナーゼ-、またはキシラナーゼ-コード核酸）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、グルカナーゼ-コード、エンドグルカナーゼ-、マンナナーゼ-、またはキシラナーゼ-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、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ遺伝子またはメッセンジャーに結合することができるオリゴヌクレオチドが含まれる（いずれの事例でもグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの生成または機能を防止または抑制する）。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ことができる。別の有用な阻害物質の種類にはグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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。したがって、本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの発現を核酸及び／又はタンパク質レベルで阻害する種々の組成物を提供する。前記は、例えば本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ配列を含むアンチセンス、iRNAおよびリボザイム、並びに本発明のアンチグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ抗体である。

グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの発現阻害は多様な工業的用途を有し得る。例えば、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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（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し得る。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、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの発現及び／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に、植物又は植物製品（例えば穀物、穀粒、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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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。

グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの発現を阻害する本発明の組成物（例えばアンチセンス、iRNA、リボザイム、抗体）は、医薬組成物として、例えば抗病原体薬剤として、または他の治療薬において、例えば抗菌（例えばサルモネラ）剤として用いることができる。

#### 【0107】

アンチセンスオリゴヌクレオチド：本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼメッセージまたは遺伝子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。前記は、標的遺伝子またはメッセージの阻害することができる（例えばmRNAを標的とすることによってグルカニヒドロラーゼ活性（例えば内部 $\beta$ -1,4-キシロシド結合の加水分解を触媒する）を阻害することができる）。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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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。

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極めて多様な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：WO97/03211; WO96/39154; 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。

10

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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ配列）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）。

20

#### 【0108】

阻害性リボザイム：本発明は、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼメッセージまたは遺伝子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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を阻害することができる。リボザイムを設計し、ターゲッティングのためにグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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の酵素部分に極めて近傍に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。

30

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、リボザイムは典型的には特異性が高い阻害因子であり、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参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。

40

#### 【0109】

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

50

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。

#### 【0110】

RNA干渉 (RNAi) : ある特徴では本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ配列を含む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はグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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。

#### 【0111】

##### 核酸の改変

本発明は、本発明の核酸 (例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼをコードする核酸) の変種を作製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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼのそれ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持つグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ酵素を生成するために反復または多様な組合せで使用するすることができる。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、例えばランダム若しくは確率論的な方法、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-プロモウラシル、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。

#### 【0112】

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。

#### 【0113】

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。

#### 【0114】

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: 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)。

## 【0115】

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  $\alpha$ -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 shotgun' 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。

## 【0116】

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 Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines”) ; EP 752008 (Stemmer and Cramer, “DNA Mutagenesis 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 Ste

mmmer, “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”) 10

#### 【0117】

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” (Patton et al., 1999年9月28日出願、U.S. Ser. No. 09/407,800) ; “EVOLUTION OF WHOLE CELLS 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。 20

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での活性）を有するグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼが作製される。改変された核酸によってコードされるポリペプチドは、グルカンまたは他の多糖類の加水分解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。 30

#### 【0118】

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カナナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼまたは抗体）に点変異を導入し、一組の子孫ポリペプチド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。前記一組の子孫ポリペプチドでは、例えば改変の標的となる酵素活性部位（触媒ドメイン）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範囲が出現する。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 40 50

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つの本来のコドンを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。

#### 【0119】

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)<sub>n</sub>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並べ換え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。

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。

#### 【0120】

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（例えばグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ）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グルカンの加水分解活性が増加する）、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に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で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

10

20

30

40

50

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、この順列は各位置かつ3つの位置で3つの可能性（最初のアミノ酸から変化のないものおよび2つの好ましい変化のそれぞれ）を含む。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つー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。

#### 【0121】

さらに別の特徴では、スクリーニングと併せて、位置飽和変異導入をシャッフリング、キメラ化、組換えおよび他の変異導入方法と一緒に用いることができる。本発明は任意の突然変異導入方法の使用を提供する。前記方法には反復態様で用いられる飽和変異導入が含まれる。ある実施態様では、任意の変異導入方法がスクリーニングと併用して反復使用される。

本発明はまた、点変異をポリヌクレオチドに導入して、全範囲の単一アミノ酸置換が各アミノ酸の位置で出現する一組の子孫ポリペプチドを作製するために専有コドンプライマー（縮退N,N,N配列を含む）の使用を提供する（遺伝子位置飽和変異導入(商標) (GSSM(商標))）。使用されるオリゴは、連続する第一の相同配列、縮退N,N,N配列および、ある特徴では（必ずというわけではない）第二の相同な配列を含む。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,N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（1つの縮退N,N,N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つの本来のコドンに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N,N,Nカセットが（同じオリゴまたは別個のオリゴで）用いられる。したがって、2つ以上のN,N,N配列を1つのオリゴ内に含ませ、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,N配列は連続していてもよいし、または1つ若しくは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を単独またはN,N,N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を導入することができる。

#### 【0122】

特にある実施態様では、連続するN,N,Nトリプレット（すなわち縮退(N,N,N)<sub>n</sub>配列）を含むオリゴを用いて、2つまたは3つ以上の連続するアミノ酸位置で同時に変異を導入することが可能である。あるいは、いくつかの事例では、縮退N,N,Nトリプレット配列、N,N,G/TまたはN,N,G/Cトリプレット配列を（例えばオリゴで）使用することが望ましいことがある。

しかしながら、本発明で開示したような縮退配列（例えばN,N,G/TまたはN,N,G/Cトリプレット配列）を使用することはいくつかの理由で有利であることは理解されよう。ある特徴では、本発明は、ポリペプチド中の各々および全てのアミノ酸の位置で可能なアミノ酸の全範囲（合計20アミノ酸について）の置換が系統的且つ容易に得られる手段を提供する。したがって、100アミノ酸のポリペプチドについて、本発明は系統的にかつそこそ容易に2000個の別個の種（すなわち各位置につき20の可能なアミノ酸X 100個のアミノ酸の位置）を作製する方法を提供する。縮退N,N,G/TまたはN,N,G/Cトリプレット配列を含むオリゴの使用により、20の可能なアミノ酸をコードする32個の配列が提供されることは理解されよう。したがって、1つのそのようなオリゴを用いて親のポリヌクレオチド配列が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個の別個の子孫ポリヌクレオチドが生成される。対照的に、位置特異的変異導入において非縮退オリゴを使用した場合、反応容器に付きただ1個の子孫ポリペプチド生成物しか得られない。

本発明はまた、非縮退オリゴの使用を提供する。場合によって、前記オリゴは開示した

縮退プライマーと一緒に用いることができる。いくつかの状況では、対象のポリヌクレオチドで特定の点変異を作製するためには、非縮退オリゴを用いることが有利であることは理解されよう。これによって、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および終止コドンを生産させる点変異並びにポリペプチドフラグメントの対応する発現をもたらす手段が提供される。

#### 【0123】

したがって、本発明のある特徴では、飽和変異導入の各反応容器は、20アミノ酸の全てが、親のポリヌクレオチドで変異が導入されたコドンの位置に対応する特定の1つのアミノ酸の位置で提示されるように、少なくとも20の子孫ポリペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含んでいる。飽和変異導入の各反応容器から生成された32倍の縮退子孫ポリペプチドはクローン増幅に付すことができ（例えば発現ベクターを用いて適切な大腸菌宿主でクローニングできる）、さらに発現スクリーニングに付すことができる。（親のポリペプチドと比較したとき）個々の子孫ポリペプチドが好ましい特性変化を示すことがスクリーニングによって同定されたら、前記の配列を決定して、前記配列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。

本明細書に開示した飽和変異導入を用いて親のポリペプチド中の各々および全てのアミノ酸の位置に変異を導入するとき、好ましいアミノ酸変異が2つ以上のアミノ酸の位置で同定できることは理解されよう。これら好ましいアミノ酸置換の全てまたは部分が組み合わされた1つまたは2つ以上の新規な子孫分子を作製することができる。例えば、あるポリペプチド中の3つのアミノ酸の位置の各々で2つの特定のアミノ酸の変異が同定された場合、前記入れ替えは各位置で3つの可能性（最初のアミノ酸から変化のないものおよび2つの好ましい変化のそれぞれ）を含む。したがって、合計 $3 \times 3 \times 3$ 、または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。

したがって、非限定的な具体例では、本発明は、また別の変異導入プロセスと組み合わされた飽和変異導入の使用を提供する。前記別の変異導入プロセスは例えば、ハイブリッドポリヌクレオチドを組換えおよび還元的再組合せによって生成することができるように2つまたは3つ以上の関連ポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入するプロセスである。

遺伝子の配列全体に変異を導入すること以外にも、本発明は、変異導入を用いてポリヌクレオチド中の多数の塩基の各々を置換することができる。この場合、変異を導入される塩基の数は、ある特徴では15から100,000のいずれかである。したがって、分子の全ての位置に変異を導入する代わりに、全ての塩基または所定の数の塩基（ある特徴では合計で15から100,000になるサブセット）に変異を導入することができる。ある特徴では、ポリヌクレオチド配列の各々の位置または位置群に変異を導入するために、別々のヌクレオチドが用いられる。変異を導入される3つの位置から成る群はコドンであってもよい。前記変異は、変異原プライマー（異種カセットを含み、変異原カセットとも称される）を用いて導入することができる。例示的カセットは1つから500の塩基を有することができる。そのような異種カセットの各ヌクレオチドの位置はN、A、C、G、T、A/C、A/G、A/T、C/G、C/T、G/T、C/G/T、A/G/T、A/C/T、A/C/G、またはEで、ここでEはA、C、GまたはTではない任意の塩基である（Eはデザイナーオリゴと称することができる）。

#### 【0124】

一般的な意味では、飽和変異導入は、変異を導入される所定のポリヌクレオチド配列（この場合変異を導入される配列は、ある特徴では長さが約15から100,000塩基である）中の完全な一組の変異原カセット（この場合各カセットはある特徴では長さが約1〜500塩基である）に変異を導入することを含む。したがって、変異群（1から100変異に及ぶ）が変異を導入される各カセットに導入される。1回の飽和変異導入の実施中に、1つのカセットに導入される変異群は、第二のカセットに導入される第二の変異群とは異なっても同じであってもよい。そのような群の例は、欠失、付加、特定コドン群および特定ヌクレオチド群である。

変異を導入される所定配列には完全な遺伝子、経路、cDNA、完全なオープンリーディング

グフレーム (ORF) および完全なプロモーター、エンハンサー、リプレッサー/トランスアクチベーター、複製起点、イントロン、オペレーターまたは任意のポリヌクレオチド機能群が含まれる。一般的には、この目的のための“所定配列”は、15塩基のポリヌクレオチド配列および15塩基から15,000塩基の長さのポリヌクレオチド配列のいずれかのポリヌクレオチドであり得る (本発明では特に15から15,000の間の全てのものが含まれる)。コドン群の選択で考慮しなければならないことには、縮退変異原カセットによってコードされるアミノ酸のタイプが含まれる。

変異原カセットに導入することができる変異群のある具体例では、本発明は特に縮退コドン置換およびそれによってコードされるポリペプチドライブラリーを提供する。前記は縮退オリゴを用いて提供され、前記オリゴは各位置で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および20アミノ酸をコードする。

#### 【0125】

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カナーゼ、マンナーゼ若しくはキシラナーゼまたは抗体) 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ルングとは異なる。例えば以下を参照されたい：米国特許出願 (USSN) 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に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。

SLRは、再編成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。

#### 【0126】

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、核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセムブリの順番は、前記アッセム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、アニールした構築片が酵素 (例えばリガーゼ (例えばT4DNアリガーゼ)) 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

10

20

30

40

50

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ム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、連結再アッセムブリ工程は、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せら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、別の特徴では、各組合せにおけるアッセムブリの順番(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ムブリの順番)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。

#### 【0127】

別の特徴では、前記連結再アッセム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ム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ム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ム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。

## 【0128】

ある特徴では、本発明は、合成遺伝子再アッセンブリと称される非確率的方法を提供する。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ンブリングされるという点を除けば確率論的シャッフリ

ングとある程度関連する。  
合成遺伝子再アッセンブリ法は、シャッフリング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。本発明は、 $10^{100}$ を超える異なる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。おそらく、合成遺伝子再アッセンブリを用いて $10^{100}$ を超える種々の子孫キメラを含むライブラリーを作製することができる。

10

したがって、ある特徴では、本発明は、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ン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ンブリングする工程。

アッセンブリングされる互いに適合する連結可能な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ンブリに対して“利用可能”であると考えられる。したがって、ある特徴では、前記核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセンブリの順番は、連結させることができる末端の設計によって特定され、2つ以上のアッセンブリ工程が用いられる場合、核酸構築ブロックが結合される全体的な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。本発明のある特徴では、アニールされた構築片が酵素（例えばリガーゼ（例えばT4DNA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。

20

## 【0129】

また別の特徴では、オリゴヌクレオチド構築ブロックの設計は、祖先核酸鋳型セットの配列を分析することによって得られる（祖先核酸鋳型は完成したキメラ核酸分子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、これら祖先核酸鋳型は、変異が導入される（すなわちキメラ化またはシャッフルされる）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。

30

ある実施態様では、本発明は、関連遺伝子の1つのファミリーおよびそれらによってコードされる関連性生物のファミリーのキメラ化を提供する。特にある実施態様では、前記コードされる生成物は酵素である。本発明のグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼにここに記載した方法に従って変異が導入される。

したがって本発明の特徴に従えば、複数の祖先核酸鋳型（例えば本発明のポリヌクレオチド）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することができる。前記境界点は作製される核酸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。したがって、祖先分子中で同定され選別される境界点は、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。

典型的には、有用な境界点は、少なくとも2つの祖先鋳型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）であるが、前記境界点は、祖先鋳型の少なくとも半分、祖先鋳型の少なくとも2/3、祖先鋳型の少なくとも3/4、およびある特徴では祖先鋳型のほぼ全てによって共有され得る。ある特徴では、さらに有用な境界点は、祖先鋳型の全部によって共有される相同領域である。

40

ある特徴では、遺伝子再アッセンブリ工程は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せられた核酸構築ブロックが、完成キメラ核酸分子セットで提示される。同時に、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）は設計にしたがう（または非確率論的である）。本方法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。

50

## 【0130】

別の特徴では、前記方法は、例えば系統的に区画化されたライブラリーを作製するために実施される遺伝子再アッセムブリプロセスを提供する。前記ライブラリーは、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ムブリング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実験的な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。

10

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、本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。本発明の遺伝子再アッセムブリの非確率論的性質のために、生成される子孫分子は、ある特徴では、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。特にある特徴では、そのように作製されたライブラリーは $10^3$ を超える種々の子孫分子種から $10^{1000}$ を超える種々の子孫分子種を含む。

ある特徴では、記載のように生成された完成キメラ核酸分子はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特徴にしたがえば、このポリヌクレオチドは遺伝子であり、前記は人工遺伝子でもよい。別の特徴にしたがえば、このポリヌクレオチドは遺伝子経路であり、前記は人工遺伝子経路でもよい。本発明は、本発明により作製された1つまたは2つ以上の人工の遺伝子が人工の遺伝子経路（例えば真核生物（植物を含む）で作働できる経路）に取り込まれたものを提供する。

20

## 【0131】

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*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、有用な境界点を創出できるという潜在的な利点以外にも他の多くの理由からこれらヌクレオチドの導入はまた望ましいものであり得ることは理解されよう。

30

したがって、別の特徴にしたがえば、本発明によって、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、本発明によって、機能的なイントロンを本発明の人工遺伝子に導入することができる。また本発明によって、本発明の人工遺伝子経路に機能的イントロンを導入することができる。したがって、本発明は、人工的に導入されたイントロンを含む人工遺伝子であるキメラポリヌクレオチドの生成を提供する。

したがって、本発明はまた、1つの（または2つ以上の）人工的に導入されたイントロンを含む人工遺伝子経路であるキメラポリヌクレオチドの生成を提供する。ある特徴では、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1つまたは2つ以上の宿主細胞で機能する。本発明は、組換え及び／又はスプライシングのために宿主生物に導入されるべき人工イントロン含有ポリヌクレオチドの作製方法を提供する。

40

本発明を用いて作製された人工遺伝子はまた、また別の核酸との組換えのための土台として機能することができる。同様に、本発明を用いて作製された人工遺伝子経路はまた、また別の核酸との組換えのための土台として機能することができる。ある特徴では、前記組換えは、人工の、イントロン含有遺伝子と核酸（組換えのパートナーとして機能する）との間の相同領域によって促進されるか、または前記相同領域で生じる。ある特徴では、前記組換えパートナーはまた、本発明によって生成された核酸（人工遺伝子または人工遺伝子経路を含む）であり得る。組換えは、人工遺伝子内に人工的に導入された1つ（または2つ以上）のイントロンに存在する相同性領域によって促進されるか、または前記領域

50

で生じる。

### 【0132】

本発明の合成遺伝子再アッセムブリの方法は、複数の核酸構築ブロック（その各々はある特徴では2つの連結可能末端を有する）を利用する。各核酸構築ブロックの2つの連結可能末端は2つの平滑端であるか（すなわち各々はヌクレオチドのオーバーハングをもたない）、またある特徴では1つの平滑端および1つのオーバーハングを有するか、また別の特徴では2つのオーバーハングを有することができる。

この目的のために有用なオーバーハングは3'側のオーバーハングでも5'側のオーバーハングでもよい。したがって、核酸構築ブロックは3'オーバーハングを有するか、また別には5'オーバーハングを有するか、また別には2つの3'オーバーハングまたは2つの5'オーバーハングを有することができる。核酸構築ブロックがアッセムブリングされて感性感性キメラ核酸分子が形成される全体的な順序は、意図的な実験設計によって決定され、ランダムではない。

ある特徴では、核酸構築ブロックは、2つの一本鎖核酸（一本鎖オリゴとも称される）を化学的に合成し、それらをアニールさせて二本鎖核酸構築物を形成することによって作製される。

二本鎖核酸構築ブロックのサイズは変動し得る。これら構築ブロックのサイズは小さくても大きくてもよい。構築ブロックの例示的サイズは1塩基対（いずれのオーバーハングも含まない）から100,000塩基対（いずれのオーバーハングも含まない）の範囲である。他の例示的なサイズ範囲もまた提供される。前記は1bpから10,000bp（その間の全ての整数値を含む）の下限からbpから100,000bp（その間の全ての整数値を含む）の上限を有する。

本発明で有用な二本鎖核酸構築ブロックを作製することができる多くの方法があり、これらは当業者に公知であり、さらに当業者は容易にこれらを実施できる。

### 【0133】

ある特徴にしたがえば、二本鎖核酸構築物は、先ず初めに2つの一本鎖核酸を作製し、さらにそれらをアニールさせて二本鎖核酸構築ブロック形成することによって作製される。二本鎖核酸構築ブロックの2つの鎖は、オーバーハングを形成するものは別として全てのヌクレオチドと相補的であり得る。したがって、オーバーハングを除いてミスマッチを含まない。別の特徴にしたがえば、二本鎖核酸構築ブロックの2つの鎖は、オーバーハングを形成するものは除いて、全ヌクレオチドより少ないヌクレオチドにおいて相補的である。したがって、この特徴にしたがえば、二本鎖核酸構築物を用いてコドンの縮退を導入することができる。ある特徴では、コドンの縮退は、本明細書に開示した位置飽和変異導入により、1つまたは2つ以上のN,N,G/Tカセット、または別には1つまたは2つ以上のN,N,Nカセットを用いて導入される。

本発明のin vivo組換え方法は未知のハイブリッドプールまたは特定のポリヌクレオチド配列の対立遺伝子座プールで手当たり次第に実施することができる。しかしながら、前記特定のポリヌクレオチドのDNAまたはRNAの実際の配列を知ることは必須というわけではない。

遺伝子の混合集団内での組換えを用いるアプローチは、任意の有用なタンパク質、例えばインターロイキンI、抗体、tPAおよび成長ホルモンの作出に有用であり得る。このアプローチを用いて、変異した特異性または活性を有するタンパク質を作出することができる。前記アプローチはまた、ハイブリッド核酸配列、例えばプロモーター領域、イントロン、エキソン、エンハンサー配列、遺伝子の3'非翻訳領域または5'非翻訳領域の作出に有用であり得る。したがって、このアプローチを用いて発現速度が増した遺伝子を作成することができる。このアプローチはまた、反復DNA配列の研究で有用である。最後に、このアプローチはリボザイムまたはアプタマーに変異を導入するために有用であり得る。

ある特徴では、本明細書に開示した発明は、高度に複雑な直鎖状配列（例えばDNA、RNAまたはタンパク質）の組換えによる定方向分子進化を可能にする還元的組合せ、組換えおよび選別サイクルを繰り返して使用することを意図する。

## 【0134】

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カナーゼ、マンナーゼ若しくはキシラナーゼ、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、進化させたキメラ配列の大きな集団の作出を可能にする。この場合、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。本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。

## 【0135】

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、ある特徴では、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。

各親変種のために作出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、連結アセンブリ工程の間に、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。

## 【0136】

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と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。

10

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。

20

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ムブリング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。

#### 【0137】

30

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）、再アッセム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。

#### 【0138】

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カナーゼ、マンナーゼ、またはキシラナ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（例えばグルカナーゼ、マンナーゼ、またはキシラナーゼ活性を含む）を細胞内に高度な操作により生成することができる。

40

同様に、特定のオリゴヌクレオチドが所望の属性（例えば新規なグルカナーゼ、マンナーゼ、またはキシラナーゼ表現型）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

50

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。

#### 【0139】

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、グルカナーゼ、マンナーゼ、またはキシナーゼなど）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、および組換えキアズマ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解離。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および第二のポリヌクレオチド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、少なくとも1つの部分的な配列相同性領域を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（例えば配列番号：、1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、267およびそれらの組合せ）を適切な宿主細胞に導入することによってハイブリッドヌクレオチドを生成することができる。前記の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再編成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得られる、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、DNA分子内のヌクレオチド配列を変異させるために反復配列を利用する分子内還元的再組合せ方法により生成することができる。

#### 【0140】

in vivo再組合せは、包括的に“組換え”と称される“分子間”プロセス（細菌では一般的に“RecA-依存”現象とみなされる）に集約される。本発明は、配列を再結合し再組合せを生じる宿主細胞の組換えプロセス、または細胞内の擬似反復配列の複雑度を欠失によって減少させる還元的プロセスを仲介する細胞の能力を必要とするであろう。“還元的再組合せ”のこのプロセスは“分子内”Rec-A非依存プロセスによって生じる。

したがって、本発明の別の特徴では、新規なポリヌクレオチドは、還元的再組合せのプロセスによって作製することができる。本方法は、連続配列を含む構築物の生成（原型コード配列）、それらの適切なベクターへの挿入およびそれに続く適切な宿主へのそれらの導入を必要とする。個々の分子実体の再組合せは、相同性領域を有する構築物中の連続配列間または擬似反復ユニット間のコンビナトリアルプロセスによって生じる。再組合せプロセスは再結合及び／又は反復配列の複雑度および程度の減少をもたらす、新規な分子種の生成をもたらす。多様な処理を適用して、再組合せの速度を速めることができる。これらの処理には、紫外線またはDNA損傷化学物質による処理及び／又は“遺伝的不安定性”レベルの強化を示す宿主細胞株の使用が含まれよう。したがって、再組合せプロセスは相同な組換えまたは自身の進化を指令する擬似反復配列の自然の特性を必要とするであろう。

反復配列または“擬似反復”配列は遺伝的不安定性において役割を果たす。本発明では、“擬似リピート”はそれらの原型ユニットの構造に制限されないリピートである。擬似反復ユニットは構築物中で配列のアレイ（すなわち類似配列の連続ユニット）として提示され得る。いったん連結されると、連続配列間の結合点は本質的に見えなくなり、生成された構築物の擬似反復特性は今や分子レベルで連続性である。細胞の欠失プロセスは、生成構築物が擬似反復配列間の複雑度を低下させるために実施される。擬似反復ユニットは、スリップ事象を発生させることができる鋳型のレパートリーを実際的には無制限に提供する。したがって、擬似リピートを含む構築物は、擬似反復ユニット内の実質的にはいずれの場所でも欠失（および潜在的には挿入）事象が発生できるように十分な分子の弾性を効果的に提供する。

10

擬似反復配列が全て同じ向き（例えば頭尾連結またはその逆）で連結されるとき、細胞は個々のユニットを区別することができない。結果的に、還元プロセスが配列全体で発生することが可能である。対照的に、例えばユニットが頭尾連結ではなく頭頭連結で提示されるとき、本発明は近傍のユニットの末端の輪郭を明らかにし、その結果欠失形成は分離されてある別個のユニットが失われるのを促進するであろう。したがって、配列が同じ向きで存在することは本発明の方法においては好ましいであろう。擬似反復配列のランダムな向きは再組合せの効率の低下をもたらすが、前記配列の一定の向きは最高の効率を提供するであろう。しかしながら、同じ向きの連続配列の数が減少することによって効率は低下するが、それによって新規な分子の効果的な回収のために十分な弾性はなお提供され得る。構築物は、より高い効率を可能にするために同じ向きの擬似反復配列を用いて作製することができる。

20

#### 【0141】

配列は、以下を含む多様な方法のいずれかを用いて頭尾の向きでアッセンブリーすることができる：

a) ポリ-Aヘッドおよびポリ-Tテールを含むプライマー（一本鎖として作製されたとき、前記は方向性を提供する）を利用することができる。これは、プライマーの最初の数塩基をRNAから作製（したがってRnaseHで容易に除去できる）することにより達成される。

b) 固有の制限切断部位を含むプライマーを利用することができる。マルチ部位、固有配列一式、並びに反復合成および連結工程が要求されるであろう。

c) プライマーの内部数塩基をチオール化し、さらにエキソヌクレアーゼを用いて適切なテールを有する分子を生成することができる。

30

再組合せされた配列の回収は反復指数（RI）が低下したクローニングベクターの同定を必要とする。続いて再組合せされたコード配列を増幅によって回収することができる。生成物を再クローニングして発現させる。RIが低下したクローニングベクターの回収は以下によって実施することができる：

1) 複雑度が低下したときにのみ構築物が安定的に維持されるベクターの使用。

2) 物理的方法による短縮ベクターの物理的回収。この場合には、クローニングベクターは、標準的なプラスミド単離方法およびアガロースゲルでの、または標準的な方法を使用する低分子量カットオフによるカラムサイズ分画を用いて回収されるであろう。

3) 挿入物のサイズが低下したときに選別することができる分断遺伝子を含むベクターの回収。

40

4) 発現ベクターおよび適切な選別を用いる直接選別技術の使用。

関連生物から得られたコード配列（例えば遺伝子）は高度な相同性を示すことが可能で、極めて多様なタンパク質生成物をコードし得る。このような配列タイプは、擬似リピートとして本発明で特に有用である。下記に例示する例はほぼ同一の原型コード配列（擬似リピート）の再組合せを示しているが、しかしながら本方法はそのようなほぼ同一のリピートに限定されない。

#### 【0142】

下記の例は本発明の方法を明示する。3つの固有種に由来するコード核酸配列（擬似リピート）が記載される。各配列は別個の一組の特性を有するタンパク質をコードする。前

50

記配列の各々はただ1つの塩基対または数塩基対が配列内の固有の位置で異なっている。擬似反復配列は別々にまたは包括的に増幅され、ランダム連結によりアッセムブリーされ、それによって連結分子集団において全ての可能な入れ替えおよび組合せが入手できる。擬似リピート数はアッセムブリー条件によって制御することができる。構築物中の擬似反復ユニットの平均数は反復指数 (RI) と定義される。

いったん形成されたら、構築物は公表されているプロトコルにしたがってアガロースゲルでサイズ分画し (または分画せずに)、クローニングベクターに挿入し、適切な宿主細胞にトランスフェクトすることができる。続いて細胞を増殖させ、“還元的再組合せ”を起こさせる。所望する場合は、還元的再組合せ過程の速度はDNA損傷の導入によって速めることができる。RIの低下が“分子内メカニズム”により反復配列間の欠失形成によって仲介されるか、または“分子間メカニズム”により組換え様事象によって仲介されるかは重要ではない。最終的な結果は分子の再組合せによる全ての可能な組合せを得ることである。

10

場合によって、本方法はシャッフルされたプールのライブラリーメンバーをスクリーニングし、予め定めた巨大分子 (例えばタンパク質性レセプター、オリゴ糖、ビリオンまたは他の予め定めた化合物若しくは構造) と結合または相互作用するか、または前記との特定の反応を触媒する能力を有する個々のシャッフルされたライブラリーメンバー (例えば酵素の触媒ドメイン) を同定するさらに別の工程を含む。

そのようなライブラリーから同定されたポリペプチドを治療、診断、研究および関連する目的 (例えば触媒、水溶液の浸透圧を高めるための溶質) に用いることができ、及び／又は1つまたは2つ以上の更なるシャッフリング及び／又は選別サイクルに付すことができる。

20

#### 【0143】

別の特徴では、組換え若しくは再組合せ前またはそれらの間に、原型ポリヌクレオチドへの変異の導入を促進する薬剤またはプロセスに本発明の方法によって生成されたポリヌクレオチドを付すことができる。そのような変異の導入は生成されるハイブリッドポリヌクレオチドおよびそれらからコードされるポリペプチドの多様性を高めるであろう。変異導入を促進する薬剤またはプロセスには以下が含まれる得る (ただしこれらに限定されない) : (+)-CC-1065または合成類似体、例えば(+)-CC-1065-(N3-アデニン) (Sun and Hurl ey, 1992) ; DNA合成を阻害することができるN-アセチル化または脱アセチル化-4'-フルオロ-4-アミノビフェニル付加物 (例えば以下を参照されたい: van de Poll et al. (1992)) ; またはDNA合成を阻害することができるN-アセチル化または脱アセチル化-アミノビフェニル付加物 (さらにまた例えば以下を参照されたい: van de Poll et al. (1992), p. 751-758) ; 三価クロム、三価クロム塩、DNA複製を阻害することができる多環式芳香族炭化水素 (PAH) DNA付加物、例えば7-プロモメチル-ベンゾ[a]アントラセン (“BMA”) 、トリス (2,3-ジプロモプロピル) ホスフェート (“トリス-BP”) 、1,2-ジプロモ-3-クロロプロパン (“DBCP”) 、2-プロモアクロレイン (2BA) 、ベンゾ[a]ピレン-7,8-ジヒドロジオール-9-10-エポキシド (“BPDE”) 、白金(II)ハロゲン塩、N-ヒドロキシ-2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]-キノリン (“N-ヒドロキシ-IQ”) およびN-ヒドロキシ-2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-f]-ピリジン (“N-ヒドロキシ-PhIP”) 。PCR増幅を遅くするかまたは停止させるための例示的手段は、紫外線(+)-CC-1065および(+)-CC-1065-(N3-アデニン)から成る。特に包含される手段は (ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプール由来のDNA付加物を含む) DNA付加物またはポリヌクレオチドであり、前記は、更なる処理の前にポリヌクレオチドを含む溶液を加熱することを含む過程によって遊離または除去することができる。

30

40

また別の特徴では、本発明は、生物学的活性を有する組換えタンパク質を製造する方法を意図し、前記方法はハイブリッドまたは再組合せされたポリヌクレオチドの生成を提供する本発明の条件下で、野生型タンパク質をコードする二本鎖鋳型ポリヌクレオチドを含むサンプルを処理することを含む。

#### 【0144】

50

配列変種の作製：本発明はまた、本発明の核酸（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）配列の変種を作製するさらに別の方法を提供する。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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼコード配列（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欠失方法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の相違は、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。

#### 【0145】

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、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、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 $MgCl_2$ 、0.5mMの $MnCl_2$ 、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。

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。

#### 【0146】

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、異なるが高度の相関性を有するDNA配列をもつDNA分子間でin vitroで生じる。セクシュアルPC

R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/ $\mu$ Lの濃度で溶液（0.2Mの各dNTP、2.2mMのMgCl<sub>2</sub>、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。100 $\mu$ L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する：94°C60秒、94°C30秒、50-55°C30秒、72°C30秒（30-45回）および72°C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。

#### 【0147】

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（1991年10月31日公開、発明の名称“Methods for Phenotype Creation from Multiple Gene Populations”）に記載されている。

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。

#### 【0148】

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な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。

いくつかの特徴では変種はシャッフリングの方法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（1996年7月9日出願、発明の名称“Methods of DNA Reassembly by Interrupting Syntesis”）、および同第5,939,250号（1996年5月22日出願、発明の名称“Production of Enzymes Having Desired Activities by Mutagenesis”）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。

本発明のポリペプチドの変種は、本発明の配列のポリペプチドの1つまたは2つ以上のア

ミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（ある特徴では保存アミノ酸残基）で置換された変種であり得る。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。

本発明は、本発明のポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）のまた別の実施態様を提供し、前記は、本明細書に記載するように少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を含む（例えば保存的アミノ酸置換は、同様な特徴を有する別のアミノ酸によってポリペプチド内のあるアミノ酸が置換されるものである）。本発明は、任意のアミノ酸残基、いくつかのアミノ酸残基または全てのアミノ酸残基が同様な特徴を有するまた別のアミノ酸によって置換された（例えば保存的アミノ酸置換）ポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）を提供する。

10

保存的置換は、同様な特徴を有する別のアミノ酸によってポリペプチド内のあるアミノ酸が置換されるものである。保存的置換として典型的に観察されるものは以下の置換である：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。また別の特徴では、これらの保存的置換はまたこれらアミノ酸の合成等価物によるものでもよい。

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。

20

さらに他の変種は、前記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。

さらに別の変種は、さらに追加のアミノ酸が前記ポリペプチドに融合されているものである。前記追加されるアミノ酸は例えばリーダー配列、分泌配列、プロプロテ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、その変種、フラグメント、誘導体および類似体は、本発明のポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を保持している。他の特徴では、前記変種、フラグメント、誘導体または類似体は、そのプロ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なプロプロテインを含む。

30

#### 【0149】

##### 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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼをコードする核酸、そのように改変されたグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼおよび前記改変グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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”コドンをグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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”で置き換えることを含み、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優先コドンによって置き換えられている。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で提示されるコドンである。

40

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、昆虫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

50

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（例えばストレプトミセス、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*）、バチルス種、バチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）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*）、ハンセヌラ・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が含まれる。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。例えば、本発明の核酸は、宿主細胞、例えばピキア種（例えばP.パストリス）、サッカロミセス種またはバチルス種、ストレプトミセス種などでの発現のためにコドンが最適化されている。

#### 【0150】

例えば、細菌細胞から単離された本発明のポリペプチド、例えばグルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼまたは同様な酵素をコードする核酸のコドンは、前記酵素（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）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. 12:185-188; 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）；Gao (2004) Biotechnol Prog. 20:443-448（“UpGene”、ウェブによるDNAコドン最適化アルゴリズムの適用を記載）。

例えば、下記の実施例4に記載したように、配列番号:6に示すポリペプチドをコードする核酸（例えば配列番号:5）は、ピキア・パストリスでの最適な発現のためにコドン最適化に付される（ピキア・パストリスコドン最適化酵素をコードする核酸は配列番号:463である）。配列番号:464に示す例示的ポリペプチドの91位はアラニンであり（配列番号:464）、さらに別の特徴では（配列番号:6のように）バリンである。同様に、配列番号:464をコードする例示的核酸（すなわち配列番号:463）は、また別の実施態様では91位でアラニンまたはバリン（または別の保存的置換）をコードする。同様に、配列番号:6をコードする例示的核酸（すなわち配列番号:5）は、また別の実施態様では91位でアラニンまたはバリン（または別の保存的置換）をコードする。実際、本発明は、本発明のポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）のまた別の実施態様を提供する。前記は、ここに記載したように少なくとも1つの保存的置換を含む（例えば保存的置換は、本明細書に記載されているように前記ポリペプチド中のある1つのアミノ酸が同様な特徴を有するまた別のアミノ酸によって置換されるものである）。

#### 【0151】

##### 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（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）、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。

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、例えばグルカナーゼ

、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を調べるin vivoモデルとして、またはグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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作製することができる。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。

“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が発現しないように操作された“ノックアウトマウス”を含み、前記は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを発現する遺伝子、または本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む融合タンパク質で置き換えられている。

#### 【0152】

##### 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（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）、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（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）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。

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、宿主のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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り得る。本発明はまた、例えば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。

#### 【0153】

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、宿主のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を変化させることができる。また別に、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼをトランスジェニック植物の製造に用いて、前記植物によって天然に産生することができない化合物を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製造することができる。

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。

#### 【0154】

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。

#### 【0155】

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 (1997) 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）。

#### 【0156】

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はタングステン製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。

#### 【0157】

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（この場合、トランスジーンは植物細胞に移入し、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）。

#### 【0158】

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ーン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 $\alpha$ -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。

#### 【0159】

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、例えばメドークラス（meadow grass（ブルーグラス、Poa））、飼料用草類、例えばウシノケグサ（*festuca*）、ロリウム（*lolium*）、温帯性イネ科草本、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の属に由来する種を含む（ただしこれらに限定されない）広範囲の植物が含まれる：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*）、ヒオシラムス（*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（*Panicum*）、パニセツム（*Panicetum*）、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ッシピウム（*Gossypium*）属のメンバー（一切のゴッ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*）；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ニンターゼ（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の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の検出および定量手段は当業界で周知である。

#### 【0160】

##### 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: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、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配

10

20

30

40

50

列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518に示される配列を有するタンパク質に対して配列同一性（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%若しくはそれより高いか、又は完全な（100%）配列同一性）を有する単離、合成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、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を有し、例えば多糖類（例えばグルカン）中のグリコシド結合を加水分解することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、1,4-ベータ-D-グリコシド結合または $\beta$ -1,3-グリコシド結合の加水分解を触媒する活性を含むグルカナーゼ活性を有する。ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性はエンド-1,4-ベータ-エンドグルカナーゼ活性を含む。ある特徴では、前記エンドグルカナーゼ活性は、グルカンを加水分解してより小さな分子量のグルカンまたはグルカンオリゴマー生成することを含む。ある特徴では、前記グルカンはベータ-グルカン、例えば水溶性ベータ-グルカンを含む。

10

20

#### 【0161】

本発明のポリヌクレオチドによってコードされる核酸にはヒドロラーゼ、例えばグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼまたはキシラナーゼが含まれるが、ただしこれらに限定されない。図5は、種々の条件下（例えば種々のpHおよび温度）における本発明のいくつかの例示的酵素の相対活性をまとめた表である。図5では、ND＝測定せず；\*至適pHまたは温度は決定されていないが、酵素活性は表示のpH及び／又は温度で測定された；1 熱安定性、酵素が顕著な活性（約>50%）を維持する時間または表示の温度で酵素がその活性の50%を失った時間（ $t_{1/2}$ ）；2 RA＝至適pHおよび温度での活性に対するそれぞれpH2.6、4.0、5.5、7.0、8.0、9.0、または25℃、37℃、50℃、65℃、75℃、85℃での相対活性；3 至適pHに対するpH3.75、5、5.3、6.25、7および至適温度に対する40℃、55℃、70℃、90℃でのRA；4 BGE＝オオムギのベータ-グルカン、CMC＝カルボキシメチルセルロース。グルカナーゼのファミリーグループは下記で考察する。

30

ある特徴では、本発明の酵素はまたマンナーゼ活性を有することができ、例えば前記はマンナンを分解（加水分解）することができる。マンナン含有多糖類は、硬木および軟木の両方とともに多くの豆類種子の内乳および非豆類植物のいくつかの成熟種子でヘミセルロース分画の主要成分である。ある特徴では、本発明のマンナナーゼは、マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンおよびガラクトグルコマンナン中のベータ-1,4結合を加水分解する（マンナンはベータ-1,4結合マンノースを含む骨格を有する多糖類であり、グルコマンナンはベータ-1,4結合マンノースおよびグルコースがいくぶん規則的に交互に入る骨格を有する多糖類である）。例えば、ある特徴では、配列番号:454に示される配列を有するポリペプチド（例えば配列番号:453によってコードされる）は、グルカナーゼ、マンナナーゼおよびキシラナーゼ活性を有する。マンナナーゼ活性を測定するアッセイは当業界で周知であり、例えば以下を参照されたい：米国特許出願20030215812号；20030119093号；米国特許5,661,021号；5,795,764号；6,376,445号；6,420,331号。キシラナーゼ活性を測定するアッセイは当業界で周知であり、例えば以下を参照されたい：米国特許出願5,693,518号；5,885,819号；6,200,797号；6,586,209号；6,682,923号。

40

#### 【0162】

本発明はまた、本発明の少なくとも2つの酵素またはその部分配列（例えば活性部位ま

50

たは触媒ドメイン（CD））を含むキメラポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）を提供する。本発明のキメラタンパク質（例えば融合タンパク質または他のヘテロダイマー、例えば他の手段（例えばリンカーまたは静電的）によって結合した2つのドメイン）は、本発明の1つのポリペプチド（例えば活性部位または触媒ドメインペプチド）および本発明のまた別のポリペプチド（例えば活性部位または触媒ドメインペプチド）または他のポリペプチドを含むことができる。例えば、本発明のキメラタンパク質は、マンナーゼおよびキシラナーゼ活性、マンナーゼおよびグリカナーゼ活性などを有することができる。ある特徴では、本発明のキメラタンパク質はドメインの融合を含むことができる。例えばただ1つのドメインはグルカナーゼ/キシラナーゼ/マンナーゼを示すか、または任意の活性の組合せを示すことができる。

10

本発明は類似する“グリコシダーゼヒドロラーゼ”ファミリーからまず初めに誘導されたという点で共通の新規性を有するグルカナーゼを提供する。グリコシダーゼヒドロラーゼは先ず初めに複数のファミリーに1991年に分類された（例えば以下を参照されたい：Henrissat (1991) Biochem. J. 280:309-316）。そのとき以来ずっと前記分類は最新のものに更新されてきた（例えば以下を参照されたい：Henrissat (1993) Biochem. J. 293:781-788; Henrissat (1993) Biochem. J. 316:695-696; Henrissat (2002) Plant Physiology 124:1515-1519）。約87の同定されたグリコシダーゼヒドロラーゼファミリーが存在する。ある特徴では、本発明のグルカナーゼはファミリーとして、例えば下記の表2に示すファミリー3、5、6、8、9、12および16として分類される。

20

【0163】

表2

| 配列番号     | ファミリー |
|----------|-------|
| 1, 2     | 5     |
| 101, 102 | 16    |
| 103, 104 | 5     |
| 105, 106 | 5     |
| 107, 108 | 5     |
| 109, 110 | 5     |
| 11, 12   | 8     |
| 111, 112 | 5     |
| 113, 114 | 16    |
| 115, 116 | 5     |
| 117, 118 | 5     |
| 119, 120 | 16    |
| 121, 122 | 12    |
| 123, 124 | 8     |
| 125, 126 | 16    |
| 127, 128 | 5     |
| 129, 130 | 5     |
| 13, 14   | 8     |
| 131, 132 | 9     |
| 133, 134 | 8     |
| 135, 136 | 5+CBD |
| 137, 138 | 5     |
| 139, 140 | 8     |

30

40

|          |           |    |
|----------|-----------|----|
| 141, 142 | 9         |    |
| 143, 144 | 5         |    |
| 145, 146 | 5+CBD+SLH |    |
| 147, 148 | 5+CBD+SLH |    |
| 149, 150 | 5         |    |
| 15, 16   | 3         |    |
| 151, 152 | 16        |    |
| 153, 154 | 5         |    |
| 155, 156 | 9+CBD     |    |
| 157, 158 | 16        | 10 |
| 159, 160 | 16        |    |
| 161, 162 | 16        |    |
| 163, 164 | 9         |    |
| 165, 166 | 5         |    |
| 167, 168 | 5         |    |
| 169, 170 | 5         |    |
| 17, 18   | 9 および 1   |    |
| 171, 172 | 16        |    |
| 173, 174 | 16        |    |
| 175, 176 | 5         | 20 |
| 177, 178 | 16        |    |
| 179, 180 | 5+CBD     |    |
| 181, 182 | 16        |    |
| 183, 184 | 8         |    |
| 185, 186 | NA        |    |
| 187, 188 | 8 および 1   |    |
| 189, 190 | 5         |    |
| 19, 20   | 5         |    |
| 191, 192 | 16        |    |
| 193, 194 | 5         | 30 |
| 195, 196 | 16        |    |
| 197, 198 | 16        |    |
| 199, 200 | 16        |    |
| 201, 202 | 5         |    |
| 203, 204 | 3         |    |
| 205, 206 | 5         |    |
| 207, 208 | 5         |    |
| 209, 210 | 16        |    |
| 21, 22   | 12        |    |
| 211, 212 | 8         |    |
| 213, 214 | 16        | 40 |
| 215, 216 | 6         |    |
| 217, 218 | 16        |    |
| 219, 220 | 5         |    |
| 221, 222 | 5         |    |
| 223, 224 | 5         |    |
| 225, 226 | 8         |    |

|          |        |    |
|----------|--------|----|
| 227, 228 | 5+CBD  |    |
| 229, 230 | 5      |    |
| 23, 24   | 12     |    |
| 231, 232 | 5      |    |
| 233, 234 | 5      |    |
| 235, 236 | 5      |    |
| 237, 238 | 6      |    |
| 239, 240 | NA+CBD |    |
| 241, 242 | 5      |    |
| 245, 246 | 9      | 10 |
| 247, 248 | 8      |    |
| 249, 250 | 5      |    |
| 25, 26   | 8      |    |
| 251, 252 | 9+CBD  |    |
| 253, 254 | 5      |    |
| 255, 256 | 5      |    |
| 257, 258 | 9      |    |
| 259, 260 | 5      |    |
| 261, 262 | 5      |    |
| 263, 264 | 1+CBD  | 20 |
| 265, 266 | NA     |    |
| 267, 268 | 5      |    |
| 269, 270 | 9      |    |
| 27, 28   | 8      |    |
| 271, 272 | 9      |    |
| 273, 274 | 48+CBD |    |
| 275, 276 | 8      |    |
| 277, 278 | 3      |    |
| 279, 280 | 5      |    |
| 281, 282 | 9      | 30 |
| 283, 284 | 5      |    |
| 285, 286 | 5      |    |
| 287, 288 | 6      |    |
| 289, 290 | 8      |    |
| 29, 30   | 9      |    |
| 291, 292 | 8      |    |
| 293, 294 | 6      |    |
| 295, 296 | 9+DOCR |    |
| 297, 298 | 9      |    |
| 299, 300 | 5      | 40 |
| 3, 4     | 8      |    |
| 301, 302 | 5      |    |
| 303, 304 | 9+CBD  |    |
| 305, 306 | 5      |    |
| 307, 308 | 5      |    |
| 309, 310 | 10     |    |
| 31, 32   | 5      |    |

|          |            |    |
|----------|------------|----|
| 311, 312 | 5          |    |
| 313, 314 | 5          |    |
| 315, 316 | 5          |    |
| 317, 318 | 5          |    |
| 319, 320 | 5          |    |
| 321, 322 | 5          |    |
| 323, 324 | 5          |    |
| 325, 326 | 5          |    |
| 327, 328 | 5          |    |
| 329, 330 | 9+CBD      | 10 |
| 33, 34   | 8          |    |
| 333, 334 | 5          |    |
| 335, 336 | 6          |    |
| 337, 338 | 5          |    |
| 339, 340 | 6          |    |
| 341, 342 | 5          |    |
| 343, 344 | 5          |    |
| 345, 346 | 6          |    |
| 347, 348 | 5          |    |
| 349, 350 | 5          | 20 |
| 35, 36   | 12         |    |
| 351, 352 | 5+CBD      |    |
| 353, 354 | 12         |    |
| 355, 356 | 5+CBD      |    |
| 357, 358 | 5          |    |
| 359, 360 | 5          |    |
| 361, 362 | 5          |    |
| 363, 364 | CBD        |    |
| 365, 366 | 5          |    |
| 367, 368 | 5          | 30 |
| 369, 370 | 5          |    |
| 37, 38   | 5 および/又は 6 |    |
| 371, 372 | 5          |    |
| 373, 374 | 5          |    |
| 375, 376 | 9          |    |
| 377, 378 | 5          |    |
| 379, 380 | 3          |    |
| 381, 382 | 9          |    |
| 383, 384 | 5          |    |
| 385, 386 | 8          | 40 |
| 387, 388 | 5          |    |
| 389, 390 | 9          |    |
| 39, 40   | 5          |    |
| 391, 392 | 9          |    |
| 395, 396 | 8          |    |
| 397, 398 | 3          |    |
| 399, 400 | 5          |    |

|          |             |    |
|----------|-------------|----|
| 401, 402 | 5 または 6+CDB |    |
| 403, 404 | 5           |    |
| 405, 406 | 5           |    |
| 407, 408 | 5           |    |
| 409, 410 | 5           |    |
| 41, 42   | 12          |    |
| 411, 412 | 5           |    |
| 413, 414 | 6           |    |
| 415, 416 | 9+CBD       |    |
| 417, 418 | 5           | 10 |
| 419, 420 | 5           |    |
| 421, 422 | 5           |    |
| 423, 424 | 9           |    |
| 425, 426 | 44          |    |
| 427, 428 | 5           |    |
| 429, 430 | 3           |    |
| 43, 44   | 16          |    |
| 431, 432 | 9           |    |
| 433, 434 | 6           |    |
| 435, 436 | 5           | 20 |
| 437, 438 | 5           |    |
| 439, 440 | 5           |    |
| 441, 442 | 9           |    |
| 443, 444 | NA          |    |
| 445, 446 | NA          |    |
| 447, 448 | 26          |    |
| 449, 450 | 5+DOCR      |    |
| 45, 46   | 9           |    |
| 451, 452 | 5           |    |
| 453, 454 | 5 および 26    | 30 |
| 455, 456 | 1           |    |
| 457, 458 | 5           |    |
| 459, 460 | 9           |    |
| 461, 462 | 5           |    |
| 463, 464 | 5           |    |
| 465, 466 | 5           |    |
| 467, 468 | 10          |    |
| 469, 470 | 5           |    |
| 47, 48   | 8           | 40 |
| 471, 472 | 16          |    |
| 473, 474 | 5           |    |
| 475, 476 | 5           |    |
| 477, 478 | 11          |    |
| 481, 482 | 5           |    |
| 483, 484 | 16          |    |
| 485, 486 | 16          |    |

|          |     |    |
|----------|-----|----|
| 487, 488 | 12  |    |
| 489, 490 | 5   |    |
| 49, 50   | 5   |    |
| 491, 492 | 11  |    |
| 493, 494 | 16  |    |
| 495, 496 | 5   |    |
| 497, 498 | 16  |    |
| 499, 500 | 16  |    |
| 5, 6     | 5   |    |
| 501, 502 | 1   | 10 |
| 503, 504 | 5   |    |
| 505, 506 | 5   |    |
| 507, 508 | 1   |    |
| 509, 510 | 5   |    |
| 51, 52   | 5   |    |
| 511, 512 | 26  |    |
| 513, 514 | 26  |    |
| 515, 516 | 5   |    |
| 517, 518 | 3   |    |
| 53, 54   | 5   | 20 |
| 55, 56   | 5   |    |
| 57, 58   | 9   |    |
| 59, 60   | 16  |    |
| 61, 62   | 12  |    |
| 63, 64   | 16  |    |
| 65, 66   | 16  |    |
| 67, 68   | 9   |    |
| 69, 70   | 5   |    |
| 7, 8     | 9   |    |
| 71, 72   | 16  | 30 |
| 73, 74   | 5   |    |
| 75, 76   | 12  |    |
| 77, 78   | 5   |    |
| 79, 80   | CBD |    |
| 81, 82   | 16  |    |
| 83, 84   | 5   |    |
| 87, 88   | 16  |    |
| 89, 90   | 16  |    |
| 9, 10    | 5   |    |
| 91, 92   | 3   | 40 |
| 93, 94   | 6   |    |
| 95, 96   | 16  |    |
| 97, 98   | 5   |    |
| 99, 100  | 16  |    |

## 【0164】

本発明のポリペプチドは活性型または不活性型のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む。例えば、本発明のポリペプチドは、“成熟”前のプロプロテイン、または“活性な”成熟タンパク質を生じるプロプロテインプロセッシング酵素（例えばプロプロテインコンバーターゼ）によるプレプロ配列のプロセッシング前のプロプロテインを含

む。本発明のポリペプチドには、他の理由のために不活性な（例えば翻訳後プロセッシング事象（例えばエンド-若しくはエキソ-ペプチダーゼまたはプロテイナーゼ作用）による“活性化”の前、リン酸化事象、アミド化、グリコシル化または硫酸化、ダイマー形成事象など）、グルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラーゼが含まれる。本発明のポリペプチドは、グルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラーゼの全ての活性型（活性な部分配列（例えば触媒ドメインまたは活性部位）を含む）を含む。

“プレプロ”ドメイン配列およびシグナル配列を同定する方法は当業界で周知である（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、タンパク質を細胞外間隙から精製し、N-末端タンパク質配列を決定し、未処理形と比較する。

10

本発明には、シグナル配列及び／又はプレプロ配列をもつポリペプチドまたはもたないポリペプチドが含まれる。本発明には、異種シグナル配列及び／又はプレプロ配列をもつポリペプチドが含まれる。前記プレプロ配列（異種プレプロドメインとして用いられる本発明の配列を含む）は、前記タンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端または両端に存在することができる。本発明にはまた、本発明の配列を含む単離または組換えシグナル配列、プレプロ配列および触媒ドメイン（例えば“活性部位”）が含まれる。

#### 【0165】

パーセント配列同一性はポリペプチドの完全長に及び得る。同一性はまた、少なくとも約50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700またはそれより大きい残基の領域に及び得る。本発明のポリペプチドはまた例示的ポリペプチドの完全長より短くてもよい。また別の特徴では、本発明は、ポリペプチド（例えば酵素、例えばグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラーゼ）の約5から完全長のサイズ範囲のポリペプチド（ペプチド、フラグメント）を提供し、例示的サイズは約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700またはそれより大きい残基、例えば本発明の例示的グルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラーゼの連続する残基である。

20

本発明のペプチド（例えば本発明の例示的ポリペプチドの部分配列）は、例えば標識用プローブ、抗原、寛容原、モチーフ、グルカナーゼ、マンナーゼ若しくはキシラーゼ活性部位（例えば“触媒ドメイン”）、シグナル配列及び／又はプレプロドメインとして有用であり得る。

30

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しても、合成しても、または組換えによって生成されるペプチドでもよい。ペプチドおよびタンパク質は組換えによってin vitroまたはin vivoで発現することができる。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作製および単離することができる。本発明のポリペプチドおよびペプチドはまた、全体または部分を当業界で周知の化学的方法を用いて合成することもできる。例えば以下を参照されたい：Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 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でき（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ABI431Aペプチド合成装置（Perkin Elmer）を製造業者によって提供される指示にしたがって用いて、自動合成を実施することができる。

40

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ができる。グリコシル化は化学的または細胞の生合成メカニズムによって翻訳後に実施することができる（後者は公知のグリコシル化モチーフの使用を含む）。前記グリコシル化は前記配列にとって天然であってもよいが、またはペプチドとして添加しても、核酸コード配列で添加してもよい。前記グリコシル化はO-結合でもN-結合でもよい。

#### 【0166】

50

本発明のペプチドおよびポリペプチド（上記で定義された）は、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は決定されるであろう。したがって、ある特徴では、模倣体組成物がグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナ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。

10

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)-CH<sub>2</sub>-）、アミノメチレン（CH<sub>2</sub>-NH）、エチレン、オレフィン（CH=CH）、エーテル（CH<sub>2</sub>-O）、チオエーテル（CH<sub>2</sub>-S）、テトラゾール（CN<sub>4</sub>-）、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）。

20

#### 【0167】

30

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。

40

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

50

-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。アスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基もまた、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギン残基およびグルタミン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。アスパラギンおよびグルタミン残基は、対応するアスパラギン酸またはグルタミン酸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、アルギニン残基を例えば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ン残基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romo-トリフルオロアセトン、アルファ-ブromo-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、リジン残基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、ピリドキサールホスフェート、ピリドキサール、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、O-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ルを例えばジエチルプロカーボネートまたはパラ-ブromoフェナシルブromid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ル化;セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化;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-末端カルボキシル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。

#### 【0168】

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。

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

10

20

30

40

50

およびアミノまたはカルボキシル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-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、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* 2<sup>nd</sup> 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)。

10

**【0169】**

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)、さらに最近で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。

20

30

本発明には、シグナル配列をもつ、またはシグナル配列をもたない本発明のグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼが含まれる。本発明のシグナル配列を含むポリペプチドは、本発明のグルカナーゼでも若しくは別のグルカナーゼでもまたは他のポリペプチドであってもよい。

40

本発明には、固定化グルカナーゼ、マンナーゼ若しくはキシラナーゼ、抗グルカナーゼ、抗マンナーゼ若しくは抗キシラナーゼ抗体およびそれらのフラグメントが含まれる。本発明は、グルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ活性を阻害する方法を提供する。前記は負の優性変異体または本発明の抗グルカナーゼ、抗マンナーゼ若しくは抗キシラナーゼ抗体を用いることによって実施される。本発明には、本発明のグルカナ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。

**【0170】**

本発明のポリペプチドは、種々の条件下で (例えば極端なpH及び/又は温度、酸化剤など) グルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ活性を有することができる。本発明は、種々の触媒効率および安定性 (例えば温度、酸化剤および洗浄条件の変化に対して)

50

を有するまた別のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ調製物をもたらす方法を提供する。ある特徴では、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ変種は、位置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、定方向進化を用い、また別の特異性および安定性を有する極めて多様なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ調節物質、例えばグルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼ活性の活性化物質または阻害物質の同定のための研究用試薬として有用である。簡単に記せば、テストサンプル（化合物、プロス、抽出物など）をグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼアッセイに添加し、基質の切断を阻害するそれらの活性を測定する。このようにして同定された阻害物質を工業および研究で用いて、望ましくないタンパク質分解を低下または防止することができる。グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ阻害物質を混合して活性スペクトルを広げることができる。

10

本発明の酵素はまた、タンパク質消化またはタンパク質の配列決定において研究用試薬として有用である。例えば、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用い、例えば自動配列決定装置を用いる配列決定のためにより小さなフラグメントにポリペプチドを分解することができる。

#### 【0171】

本発明はまた、本発明の核酸、ポリペプチドおよび抗体を用いて新規なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを発見する方法を提供する。ある特徴では、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの発現を基準にしてファージミドライブラリーをスクリーニングして前記を発見する。別の特徴では、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの発現を基準にしてラムダファージライブラリーをスクリーニングして前記を発見する。ファージまたはファージミドライブラリーのスクリーニングは、毒性クローン

の検出、基質への接近の改善、高度操作の必要性の減少（ライブラリーの大量の排除により生じる全ての偏りの可能性を無視することによる）および低いクローン密度でのより迅速な増殖を可能にすることができる。ファージまたはファージミドライブラリーのスクリーニングは液相でも固相でもよい。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。それによって、アッセイ条件でのより大きな融通性、追加される基質の融通性、弱いクローンに対するより高い感度およ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。

20

30

本発明は、本発明のタンパク質および核酸並びに機械による自動化を用いて、何千もの生触媒反応およびスクリーニングアッセイを短時間で（例えば毎日）実施でき、同様に高度な正確性および再現性を担保できるスクリーニング方法を提供する（下記のアレイに関する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で作製することができる。分子（小分子を含む）の改変に関する更なる教示については、PCT/US94/09174を参照されたい。

本発明のまた別の特徴は、本発明の1つの配列、または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100若しくは150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントを含む単離または精製されたポリペプチドである。上記で考察したように、そのようなポリペプチドは、前記ポリペプチドをコードする核酸をベクターに、コードされる配列の発現を駆動することができる配列に機能可能に連結されるように挿入することによって得ることができる。例えば前記発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始および転写終了のためのリボソーム結合部位を含むことができる。前記ベクターはまた発現を増幅させるための適切な配列を含むことができる。

40

#### 【0172】

本発明のまた別の特徴はポリペプチドまたはそのフラグメントであり、前記は、本発明のポリペプチドの1つに対して少なくとも約50%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または約95%より高い配列同一

50

性（相同性）を有し、フラグメントは、前記ペプチドの少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100若しくは150またはそれより大きい連続するアミノ酸残基を含む。配列同一性（相同性）は、上記に記載したプログラムのいずれかを用いて決定することができる（前記プログラムは比較されるポリペプチドまたはフラグメントでアラインメントを実施し、それらの間のアミノ酸同一性または類似性の程度を決定する）。アミノ酸等価物、同一性または“相同性”には保存的アミノ酸置換（例えば上述のもの）が含まれることは理解されよう。

本発明のポリペプチドの1つに対して相同性を有するポリペプチド若しくはフラグメント、または少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントは、上述の技術を用いてそれらをコードする核酸を単離することによって得ることができる。

10

あるいは、相同なポリペプチドまたはフラグメントは、生化学的濃縮または精製方法により得ることができる。潜在的に相同なポリペプチドまたはフラグメントの配列は、ゲルカンヒドロラーゼ消化、ゲル電気泳動及び／又はマイクロシーケンシングによって決定することができる。相同性が予想されるポリペプチドまたはフラグメントの配列は、本発明のポリペプチドの1つまたは少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントと上述のプログラムのいずれかを用いて比較することができる。

#### 【0173】

本発明のまた別の特徴は、本発明のポリペプチドの酵素機能を保持している、本発明のフラグメントまたは変種を同定するアッセイである。例えば前記ポリペプチドのフラグメントまたは変種を用いて生化学反応（前記反応は本発明のポリペプチドの酵素活性を前記フラグメントまたは変種が保持していることを示す）を触媒することができる。

20

変種のフラグメントが本発明のポリペプチドの酵素活性を保持しているかどうかを決定するアッセイは以下の工程を含む：ポリペプチドフラグメントまたは変種を基質分子と前記ポリペプチドフラグメントまたは変種が機能できる条件下で接触させ、基質レベルの減少または前記ポリペプチドと基質との間の反応の特異的反応生成物レベルの増加を検出する。

本発明のポリペプチドまたは少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントは多様な用途で用いることができる。例えば、前記ポリペプチドまたはそのフラグメントを用いて生化学反応を触媒することができる。本発明のある特徴にしたがえば、本発明のポリペプチドまたはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをグリコシド結合の加水分解に利用する方法が提供される。そのような方法では、グリコシド結合を含む基質（例えばデンプン）を本発明のポリペプチドの1つまたは前記と実質的に同一の配列と、グリコシド結合の加水分解を促進する条件下で接触させる。

30

本発明は、酵素の固有の触媒特性を利用する。化学的変換における生物触媒（すなわち精製酵素、粗酵素、非生細胞または生細胞）の使用は、特定の出発化合物と反応する個々の生物触媒の同定を必要とするが、本発明は選択した生物触媒および反応条件を使用する（前記生物触媒および反応条件は、多くの出発化合物、例えば小分子に存在する官能基に特異的である）。各生物触媒は1つの官能基または関連するいくつかの官能基に特異的であり、この官能基を含む多くの出発化合物と反応することができる。

40

#### 【0174】

前記生触媒反応はただ1つの出発化合物に由来する誘導体集団を生成する。これらの誘導体をさらにもう1回の生触媒反応に付して誘導体化合物の第二の集団を生成することができる。生触媒反応による誘導体形成の繰り返し毎に原型小分子または化合物から数千の変種を生成することができる。

酵素は、分子の残り部分に影響を与えることなく出発化合物の特異的部位で反応する。

前記は伝統的な化学的方法を用いて達成することは非常に困難な過程である。生触媒反応のこの高度な特異性は、ライブラリー内のただ1つの活性化合物を同定する手段を提供

50

する。前記ライブラリーは、それを作製するために用いられる生触媒反応シリーズ（いわゆる“生合成歴”）によって特徴付けられる。生物学的活性についてのライブラリーのスクリーニングおよび生合成歴のトレーシングによって活性な化合物を生成する特異的連続反応が同定される。前記連続反応を繰り返し、合成された化合物の構造を決定する。前記の同定態様は、他の合成およびスクリーニングの方法と違って固定化技術を必要とせず、化合物は溶液中で自由な状態で合成され、実質的に任意のタイプのスクリーニングアッセイを用いて試験することができる。官能基に対する酵素反応の高度な特異性は、生触媒反応により作製されるライブラリーを構築する特異的な酵素反応の“追跡”を可能にすることは特記に値する。

工程の多くは機械による自動化を用いて実施され、毎日何千もの生触媒反応およびスクリーニングの実施を可能にするとともに、高レベルの正確さと再現性が担保される。結果として、従来の化学的方法を用いた場合数年を要する誘導体化合物ライブラリーが数週間で作製することができる。

特にある特徴では、本発明は小分子の改変方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載したポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを小分子と接触させ、改変小分子を生成することを含む。所望の活性を示す改変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、改変小分子ライブラリーを試験する。ライブラリーの一部の作製に用いられた生触媒反応の各々を系統的に排除し、さらに所望の活性を有する改変小分子の有無についてライブラリーの前記部分で生成された小分子を試験することによって、所望の活性を有する改変小分子を生成する特異的な生触媒反応を同定する。所望の活性を有する改変小分子を生成する特異的な生触媒反応が場合によって繰り返される。前記生触媒反応を、小分子の構造内で見出される別個の構造成分と反応する生物触媒群を用いて実施する。各々の生物触媒は1つの構造成分または関連構造成分群に対して特異的であり、各生物触媒は前記別個の構造成分を含む多くの種々の小分子と反応する。

#### 【0175】

シグナル配列、プレプロおよび触媒ドメイン：本発明は、グルカナーゼ、マンナーゼまたはキシナーゼシグナル配列（例えばシグナルペプチド（SP））、プレプロドメインおよび触媒ドメイン（CD）（例えば活性部位）を提供する。本発明のSP、プレプロドメイン及び／又はCDは単離若しくは組換えペプチドでもよく、または融合タンパク質の部分（例えばキメラタンパク質の異種ドメイン）であってもよい。本発明は、これらの触媒ドメイン（CD）、プレプロドメインおよびシグナル配列（SP、例えば本発明のペプチドのアミノ末端残基を含む／から成る配列を有するペプチド）をコードする核酸を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明のペプチドの残基1から15、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、1から40、1から41、1から42、1から43、1から44に示される配列を含む／配列から成るペプチドを含むシグナル配列を提供する。

ある特徴では、本発明はまた、本発明の少なくとも2つの酵素またはその部分配列（例えば触媒ドメインまたは活性部位）を含むキメラポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）を提供する。例えば、本発明のキメラタンパク質は、マンナーゼおよびキシナーゼ活性、マンナーゼおよびグルカナーゼ活性などを含むことができる。ある特徴では、本発明のキメラタンパク質はドメインの融合を含むことができる。例えば単一のドメインが、グルカナーゼ/キシナーゼ/マンナーゼ活性または任意の活性の組合せ（例えば組換えキメラタンパク質として）を示すことができる。

本発明はまた、本発明のシグナル配列、例えば下記表3に示される例示的シグナル配列を含む／配列から成る単離、合成または組換えシグナル配列、およびこれらシグナル配列を含むポリペプチドを提供する。前記ポリペプチドは、本発明のまた別のグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシナーゼであっても、別のグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシナーゼであっても、別のグルコシダーゼまたはヒドロラーゼであっても、または別の

タイプの酵素若しくはポリペプチドであってもよい。表3を読むと、例えば本発明は、配列番号:102（ある特徴では例えば配列番号:101の部分配列によってコードされる）の残基1から21に示される、単離、合成または組換えシグナル配列を提供するか、または本発明は、配列番号:104（ある特徴では配列番号:103の部分配列によってコードされる）の残基1から30に示される、単離、合成または組換えシグナル配列を提供する、云々。

【0176】

表3

| 配列番号     | シグナル(AA) | 予想されるシグナル配列 |    |
|----------|----------|-------------|----|
| 101, 102 | 1-21     |             |    |
| 103, 104 | 1-30     |             | 10 |
| 105, 106 | 1-33     |             |    |
| 107, 108 | 1-18     |             |    |
| 109, 110 | 1-25     |             |    |
| 11, 12   | 1-25     |             |    |
| 111, 112 | 1-39     |             |    |
| 113, 114 | 1-24     |             |    |
| 115, 116 | 1-21     |             |    |
| 117, 118 | 1-29     |             |    |
| 121, 122 | 1-24     |             |    |
| 123, 124 | 1-30     |             | 20 |
| 125, 126 | 1-19     |             |    |
| 127, 128 | 1-22     |             |    |
| 129, 130 | 1-40     |             |    |
| 13, 14   | 1-22     |             |    |
| 133, 134 | 1-34     |             |    |
| 135, 136 | 1-53     |             |    |
| 137, 138 | 1-37     |             |    |
| 139, 140 | 1-22     |             |    |
| 141, 142 | 1-32     |             |    |
| 143, 144 | 1-29     |             | 30 |
| 145, 146 | 1-29     |             |    |
| 147, 148 | 1-29     |             |    |
| 149, 150 | 1-30     |             |    |
| 15, 16   | 1-44     |             |    |
| 151, 152 | 1-22     |             |    |
| 153, 154 | 1-24     |             |    |
| 155, 156 | 1-21     |             |    |
| 157, 158 | 1-38     |             |    |
| 159, 160 | 1-34     |             |    |
| 161, 162 | 1-19     |             | 40 |
| 163, 164 | 1-19     |             |    |
| 165, 166 | 1-51     |             |    |
| 169, 170 | 1-22     |             |    |
| 171, 172 | 1-22     |             |    |
| 173, 174 | 1-19     |             |    |
| 175, 176 | 1-19     |             |    |
| 177, 178 | 1-26     |             |    |
| 179, 180 | 1-71     |             |    |

|          |      |                                          |    |
|----------|------|------------------------------------------|----|
| 181, 182 | 1-35 |                                          |    |
| 183, 184 | 1-22 |                                          |    |
| 185, 186 | 1-17 |                                          |    |
| 187, 188 | 1-22 |                                          |    |
| 19, 20   | 1-68 |                                          |    |
| 191, 192 | 1-20 |                                          |    |
| 193, 194 | 1-29 |                                          |    |
| 199, 200 | 1-22 | MKTKLISTLVAGLIVISPATYA                   |    |
| 201, 202 | 1-32 |                                          | 10 |
| 203, 204 | 1-27 |                                          |    |
| 205, 206 | 1-34 |                                          |    |
| 207, 208 | 1-28 |                                          |    |
| 209, 210 | 1-22 |                                          |    |
| 21, 22   | 1-34 |                                          |    |
| 211, 212 | 1-22 |                                          |    |
| 213, 214 | 1-22 |                                          |    |
| 215, 216 | 1-42 |                                          |    |
| 217, 218 | 1-23 |                                          |    |
| 219, 220 | 1-27 |                                          | 20 |
| 221, 222 | 1-29 |                                          |    |
| 223, 224 | 1-31 |                                          |    |
| 225, 226 | 1-29 |                                          |    |
| 227, 228 | 1-22 | MTSKHFFKITLMSILLFTTTLA                   |    |
| 229, 230 | 1-25 | MKRRNWNYYLLIILLVISAFTLISAQ               |    |
| 23, 24   | 1-22 |                                          |    |
| 235, 236 | 1-19 | MKSVLALALIVSINLVLLA                      |    |
| 237, 238 | 1-29 | MTRRSIVRSSSNKWLVLAGAALLACTALG            |    |
| 241, 242 | 1-39 | MSSFKA SAINPRMAGALTRSLYAAGFSLAVSTLSTQAYA |    |
| 243, 244 | 1-26 | MKKLLKLSMLSTSVALGIMASSGAIA               | 30 |
| 247, 248 | 1-21 | MNVLRSGIVTMLLLAAFSVQA                    |    |
| 25, 26   | 1-21 |                                          |    |
| 251, 252 | 1-23 | MLKKLALAAGIAAATLAASGSHG                  |    |
| 255, 256 | 1-28 | MKRTGWTCLKLLAALLLPATLGLHNGA              |    |
| 257, 258 | 1-30 | MYRLFFRSLKRSGILLPVLLYFFILPSATA           |    |
| 269, 270 | 1-22 | MKFTLTPLLCGFALLLGCAVQA                   |    |
| 27, 28   | 1-19 |                                          |    |
| 271, 272 | 1-18 | MVSMLLLTVGAVSVSAVS                       |    |
| 273, 274 | 1-37 | MPRLRARTPRRQLTALAAALSLPLGLTAVGATTAQA     |    |
| 275, 276 | 1-27 | MQNLFKRVFFHLLLALLAGCAGPSPV               |    |
| 277, 278 | 1-28 | MSGRSAGRGPWARLVVALAAGALVAGA              | 40 |
| 279, 280 | 1-38 | MQNKIINTKIKLRKFMSQLIKITYIFIIIFCMQRTYA    |    |
| 281, 282 | 1-18 | MKKLILTLFSLWAISAYA                       |    |
| 285, 286 | 1-27 | MRKSIRSFSILLAITFIIALLSFPAMG              |    |
| 287, 288 | 1-30 | MNPRSLRRRTTAALAACAALLATQAQA              |    |
| 289, 290 | 1-29 | MFPRLSPSRFRQVTLTLLTLGLVSLTGCA            |    |

|          |      |                                                 |    |
|----------|------|-------------------------------------------------|----|
| 29, 30   | 1-19 |                                                 |    |
| 291, 292 | 1-16 | MKFFTVLLFFLSFVFS                                |    |
| 293, 294 | 1-27 | MRRRIRALVAALSALPLALVVAPSAHA                     |    |
| 3, 4     | 1-25 |                                                 |    |
| 301, 302 | 1-17 | MAIGISATMLLAMPQQA                               |    |
| 303, 304 | 1-30 | MSCRTLMSRRVGWGLLWGGFLRTGSVTG                    |    |
| 305, 306 | 1-26 | MNPKYIYRITFLLISILSMTALQSFS                      |    |
|          |      | MVWTPARSTLAGSSEIPLMTMNIFPNRKDSRMSLWIKLGILCMMAGT |    |
| 307, 308 | 1-52 | VMVHG                                           |    |
| 31, 32   | 1-39 |                                                 | 10 |
| 311, 312 | 1-24 | MKRREFMLGGAGVAALASTLGVSA                        |    |
| 313, 314 | 1-20 | MLIIGGLLVLLGFSSCGRQA                            |    |
| 315, 316 | 1-32 | MDKTITAKDSGKITALILILLVLPYAGYVVA                 |    |
| 319, 320 | 1-29 | MREIILKSGALLMVVILIVSILQILTVFA                   |    |
| 323, 324 | 1-32 | MFQSLKMRTLSFLLLALLASFLALPTDVAHA                 |    |
| 325, 326 | 1-29 | MKKIILKSGILLVILIVSILQILPVFA                     |    |
| 327, 328 | 1-46 | MLVYRVSIQKHLASLTVLVSLLLILAGCSSSDSIAPVSSSSVSSA   |    |
| 33, 34   | 1-35 |                                                 |    |
| 331, 332 | 1-28 | MNNPTNGARRGRHRRRWSATALLGVPA                     |    |
| 333, 334 | 1-28 | MNRTRVLSAATLLALVATLASVPVTAQA                    | 20 |
| 337, 338 | 1-29 | MRNHLNVPFYFIFFFLIASIFTVCSSSTA                   |    |
| 339, 340 | 1-23 | MNNPRILTYLLIGIVVAVLIVFA                         |    |
| 343, 344 | 1-31 | MRKIVKQINYLTSPVLGLLVLSLFFQVPTQA                 |    |
| 345, 346 | 1-33 | MKRTRYGVRSRSPRSGVLFVFGAAAAGVLTGA                |    |
| 349, 350 | 1-38 | MNSSPVSVKKKPCPVDPRNPLWAAGFSLALATLSTQTQA         |    |
| 351, 352 | 1-28 | MKKVSNAARVLSFLLILVLIFGNLASVFA                   |    |
| 357, 358 | 1-32 | MEKQICSNVFSTMLIIGGLLVLLGFSSCGRQA                |    |
| 359, 360 | 1-22 | MRLITILATAVAILSTTSCS                            |    |
| 361, 362 | 1-20 | MSRGILILVMSVLGAALA                              |    |
| 363, 364 | 1-30 | MRRTRSLLAGLALTAGLLTGAGAGAPPATA                  | 30 |
|          |      | MLGAPSPHFPMRGMTKSQRRTWLTAVGSAIAGIAGLLLPVFATAGA  |    |
| 365, 366 | 1-50 | AQA                                             |    |
| 367, 368 | 1-42 | MPHPKLLTNGGSYVSSKQKTVAIFVLVVLAVAGSIPASYA        |    |
| 37, 38   | 1-33 |                                                 |    |
| 373, 374 | 1-23 | MNKILKLFSSLLLFAGICPALQA                         |    |
| 377, 378 | 1-30 | MKMLTTLKKPLLKKTALALLTSAMVAPAF                   |    |
| 381, 382 | 1-26 | MRAIRLSLSIAAGAVLLLAGCTTKPA                      |    |
| 383, 384 | 1-28 | MTMHRKLHRSIAAGALSAIFFVGLQAGA                    |    |
| 387, 388 | 1-25 | MSI IKKVPLIFLCLLMFATSLFIFK                      |    |
| 39, 40   | 1-24 |                                                 |    |
| 393, 394 | 1-29 | MSKFLSLSNFFSLLVVCVLLGACSGGSSS                   | 40 |
| 401, 402 | 1-30 | MGTSMLIKSTLTGMITAVAAAVFTTSAFA                   |    |
| 403, 404 | 1-32 | MGKISKYFAMFLAFLMVFSFLFVNFQPRNVQA                |    |
| 407, 408 | 1-28 | MRKNILMLAVAMIAAMCVTTSCGNKAQK                    |    |
| 409, 410 | 1-24 | MTRNWLKILAALLLAGCAIPAPA                         |    |
| 411, 412 | 1-24 | MPYVVRLALVCAWTVLACTGAPIA                        |    |
| 413, 414 | 1-28 | MSRHLISLGLLVVALGAMLWISSRDVA                     |    |

|          |      |                                            |    |
|----------|------|--------------------------------------------|----|
| 419, 420 | 1-21 | MLRKLILFCVLLSMSWVALA                       |    |
| 421, 422 | 1-26 | MKTKSIYSIAILSIALFFFTTAQTFS                 |    |
| 423, 424 | 1-25 | MWSQDVRKVWLVGFLLLVAGMPALA                  |    |
| 425, 426 | 1-20 | MRIRLATLALCAALSPVTFA                       |    |
| 427, 428 | 1-43 | METPMTSARSARPRRLRRYGIAGTALGALLLGLATLPPTATA |    |
| 43, 44   | 1-48 |                                            |    |
| 431, 432 | 1-22 | MKFTLMPLLCGFALLLGCAVQA                     |    |
| 441, 442 | 1-26 | MRAIRLSLSIAAGAVLLLAGCTTKPA                 |    |
| 445, 446 | 1-29 | MRRFRVVFLGLFVFFGIVIASQYGQTAAA              |    |
| 449, 450 | 1-25 | MKKIVSLVCVLVMLVSILGSFSVVA                  | 10 |
| 45, 46   | 1-16 |                                            |    |
| 457, 458 | 1-39 | MKSKTSTAAPSAGPLRNYKKLTACIAVASTALLAGSASA    |    |
| 459, 460 | 1-18 | MKKLILTLFSLWASAYA                          |    |
| 461, 462 | 1-28 | MFKHLLHVLKIGFLPLLATLLLAGHAHG               |    |
| 465, 466 | 1-21 | MLRKLIVSVFGFVMLTSAAAA                      |    |
| 469, 470 | 1-25 | MKYKAIFIYLVILFYSINIYANA                    |    |
| 47, 48   | 1-23 |                                            |    |
| 471, 472 | 1-22 | MKTKLISTLVAGLIVISPATYA                     |    |
| 473, 474 | 1-28 | MKRKRVIHSLIVFFLMIGSFTSCGSVA                |    |
| 475, 476 | 1-25 | MNLLAQYFSGFLIFLISIFFVSSA                   | 20 |
| 477, 478 | 1-27 | MKSIRSRSLATAVLAGALGVAAAGAQA                |    |
| 481, 482 | 1-21 | MKLLKLLIFLLITVIFSDVSA                      |    |
| 483, 484 | 1-26 | MYKRLLSSVLIIMLLSAWSPISVQA                  |    |
| 489, 490 | 1-23 | MKYIFSIIIMMILIGFIPVYGFG                    |    |
| 49, 50   | 1-42 |                                            |    |
| 491, 492 | 1-26 | MSMFLSLKRVAALVCVAGFGISAANA                 |    |
| 493, 494 | 1-28 | MPYLKRVLVLLVTGLFMSLFAVTSTASA               |    |
| 495, 496 | 1-29 | MSSKQKTVAIFVLFVALAGVAGSIPASYA              |    |
| 499, 500 | 1-17 | MKKLVLVLLLPVFILA                           |    |
| 505, 506 | 1-24 | MKSKVKMFFAAAIWSACSSTGYA                    | 30 |
| 509, 510 | 1-20 | MPKKLLASFIALFFAANAAA                       |    |
| 51, 52   | 1-38 |                                            |    |
| 511, 512 | 1-21 | MKKLHILLALTAMTAFASCS                       |    |

## 【0177】

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼシグナル配列（SP）及び／又はプレプロ配列は単離ペプチドであっても、または別のグルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナーゼまたは非グルカナーゼ、マンナナーゼ若しくはキシラナ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、本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼシグナル配列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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼにとっ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ又は非グルカナ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SP及び／又はプレプロ配列を有する本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ（例えば酵母のシグナル配列を有する配列）を提供する。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、異種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。

ある特徴では、本発明のSP及び／又はプレプロ配列は、新規なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼポリペプチドを同定した後で同定される。タンパク質が分類されそれらの適切な細胞内の存在場所に輸送される経路はしばしばタンパク質ターゲッティング経路と称される。これらのターゲッティング系の全てにおけるもっとも重要な構成成分の1つは、新たに合成されたペプチドのアミノ末端に存在する短いアミノ酸配列（シグナル配列と称される）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存在場所に誘導し、輸送中または前記タンパク質がその最終的な行き先に到達したときに除去される。ほとんどのリゾチームタンパク質、膜たんぱく質または分泌タンパク質はアミノ末端シグナル配列を有し、前記配列は小胞体管腔内への輸送のために前記タンパク質に目印を付ける。この群のタンパク質について100を超えるシグナル配列が決定されている。シグナル配列の長さは13から36アミノ酸残基まで変動し得る。シグナル配列を認識する種々の方法が当業者に知られている。例えば、ある特徴では、新規なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼシグナルペプチドがシグナルP (SignalP) と称される方法によって同定される。シグナルPは合体神経ネットワークを用い、前記は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, vol.10, no.1, p.1-6)。

#### 【0178】

いくつかの特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、SP及び／又はプレプロ配列またはドメインを持たないことがあり得ることは理解されよう。ある特徴では、本発明は、SP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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼに由来するシグナル配列 (SP) 及び／又はプレプロをコードする核酸が別のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼタンパク質のシグナル配列 (SP) 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 (例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼと) 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 (例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ配列) 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'端、5'端及び／又はその両端に存在することができる。

#### 【0179】

ハイブリッド (キメラ) グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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 (例えばグルカナーゼ、マンナナーゼま

たはキシラナーゼ基質、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、標的の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。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列(S)、プレプロドメイン及び/又は触媒ドメイン(CD)またはそれらの組合せおよび異種配列(上記参照)を含むキメラタンパク質を提供する。

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、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼと他のペプチド(既知および任意のペプチドを含む)の融合を提供する。それらは、グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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(例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、発現されたグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、例えば本明細書ではM13プライマー変異導入およびPCR変異導入が考察される。変異体のスクリーニングは、例えばグルカン加水分解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が、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得る。

#### 【0180】

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)が改変されたグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを提供する。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(例えばグルタミル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(例えばエンドグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性)を示し得るが、変種を選別してグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの

性状を必要とされるように改変することができる。

#### 【0181】

ある特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、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、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを任意のペプチドと融合させて、融合ポリペプチドを形成することができる。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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼが、前記グルカナーゼ構造の安定性の破壊を最小限に止める（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ活性を維持する）こ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融合ポリヌクレオチド）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。

10

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成ることを意味する。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得る。合成プロセスは、ランダム化された核酸が生成されるように設計して、核酸の全長にわたって可能な全てのまたは大半の組合せを形成し、したがってランダム化された核酸ライブラリーの形成を可能にすることができる。前記ライブラリーは、ランダム化された発現生成物の十分に構造的に多様な集団を提供し、所望の反応を示す1つまたは2つ以上の細胞を提供するために確率的に十分な範囲の細胞反応に影響を与えることができる。したがって、本発明は、ライブラリーメンバーの少なくとも1つがいくつかの分子、タンパク質または他の因子に対する親和性を与える構造を有することができるように十分に大きな相互作用ライブラリーを提供する。

20

エンドグルカナーゼはマルチドメイン酵素であり、前記は場合によってシグナルペプチド、炭水化物結合モジュール、グルカナーゼ触媒ドメイン、リンカー及び／又は別の触媒ドメインから成る。

30

#### 【0182】

本発明は、生物学的に活性なハイブリッドポリペプチド（例えばハイブリッドグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）をコードすることができるキメラポリペプチドを作製する手段を提供する。ある特徴では、原型ポリヌクレオチドは生物学的に活性なポリペプチドをコードする。本発明の方法は、生成されるハイブリッドポリヌクレオチドが生物学的に活性な原型ポリペプチドに由来する活性を表すポリペプチドをコードできるように原型ポリヌクレオチドの配列を組み込む細胞性過程を利用することによって新規なハイブリッドポリペプチドを作製する。例えば、原型ポリヌクレオチドは異なる細菌に由来する特定の酵素をコードすることができる。1つの生物または変種に由来する第一のポリヌクレオチドによってコードされる酵素は、例えば特定の環境条件下（例えば高塩濃度）で効率的に機能することが可能である。異なる生物または変種に由来する第二のポリヌクレオチドによってコードされる酵素は、異なる環境条件下（例えば超高温）で効率的に機能することができる。第一および第二の原型ポリヌクレオチドに由来する配列を含むハイブリッドポリヌクレオチドは、原型ポリヌクレオチドによってコードされる両方の酵素の特徴を示す酵素をコードすることができる。したがって、ハイブリッドポリヌクレオチドによってコードされる酵素は、第一および第二のポリヌクレオチドによってコードされる酵素の各々が共有する環境条件下（例えば高塩濃度および超高温）で効率的に機能することができる。

40

本発明の方法から得られるハイブリッドポリペプチドは、原酵素では示されない特殊化された酵素活性を示すことができる。例えば、ヒドロラーゼ活性をコードするポリヌクレ

50

オチドの組換え及び／又は還元的再組合せに続いて、ハイブリッドポリヌクレオチドによってコードされる生成ハイブリッドポリペプチドを、原酵素の各々から得られる特殊化されたヒドロラーゼ活性（すなわちヒドロラーゼが作用する結合のタイプおよびヒドロラーゼが機能する温度）についてスクリーニングすることができる。したがって、例えばヒドロラーゼは、原ヒドロラーゼからハイブリッドヒドロラーゼを区別するそれら化学的官能性（例えば（a）アミド（ペプチド結合）、すなわちエンドグルカナーゼ；（b）エステル結合、すなわちエステラーゼおよびリパーゼ；（c）アセタール、すなわちグリコシダーゼ）および例えば、ハイブリッドポリペプチドが機能する温度、pHまたは塩濃度を確認するためにスクリーニングすることができる。

#### 【0183】

原ポリヌクレオチドの供給源は、個々の生物（“単離株”）、所定の培地で増殖させた生物集合物（“濃縮培養”）、または未培養生物（“環境サンプル”）から単離することができる。環境サンプルから新規な生物活性をコードするポリヌクレオチドを誘導するために培養非依存的方法を用いることは、生物多様性を有する手付かずの資源への接近を可能にするのもっとも好ましい。

“環境ライブラリー”は環境サンプルから作製され、適切な原核細胞宿主で増殖させることができるクローニングベクター内に保管された状態で、天然に存在する生物のゲノム集合物を提示する。前記クローン化されたDNAは先ず初めに環境サンプルから直接抽出されるので、前記ライブラリーは純粋培養として増殖することができる原核細胞の小分画に限定されない。さらにまた、これらサンプルに存在する環境DNAの正規化によって、最初のサンプルに存在する種の全てに由来するDNAのより均等な提示が可能になる。このことは、サンプルのきわめてわずかな構成成分（これらは優勢な種と比較して数桁低く提示される可能性がある）から興味深い遺伝子を発見する効率を劇的に高めることができる。

例えば、1つまたは2つ以上の未培養微生物から作製された遺伝子ライブラリーを問題の活性についてスクリーニングする。問題の生物活性分子をコードする潜在的経路は原核細胞で遺伝子発現ライブラリーの形態で先ず捕捉される。問題の活性をコードするポリヌクレオチドをそのようなライブラリーから単離し、宿主細胞に導入する。前記宿主細胞を組換え及び／又は還元的再組合せが促進される条件下で増殖させ、新規なまたは強化された活性を有する潜在的に活性な生物分子を作出する。

#### 【0184】

さらにまた、サブクローニングを実施して問題の配列をさらに単離することができる。

サブクローニングでは、DNAの一部を増幅、消化（一般的には制限酵素による）し、所望の配列を切り出し、前記所望の配列をレシピエントベクターに連結し増幅させる。サブクローニングの各工程で、構造タンパク質をコードするDNAが排除されていないことを確認するために、前記の部分を問題の活性について試験する。挿入物は、サブクローニングの任意の工程で（例えばベクターへの連結前にゲル電気泳動によって）、またはレシピエントベクター含有または非含有細胞を例えば抗生物質（前記はレシピエントベクターを含まない細胞を死滅させる）を含む選択培地に入れる工程で精製してもよい。cDNA挿入物をベクターでサブクローニングする具体的な方法は当業界で周知である（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）。また別の特徴では、本発明の酵素はサブクローンである。そのようなサブクローンは親クローンとは例えば長さ、変異、タグまたは標識が異なっている可能性がある。

ある特徴では、本発明のシグナル配列は新規なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼポリペプチドを同定した後で同定される。タンパク質が分類されそれらの適切な細胞内の存在場所に輸送される経路はしばしばタンパク質ターゲッティング経路と称される。これらのターゲッティング系の全てにおけるもっとも重要な構成成分の1つは、新たに合成されるペプチドのアミノ末端に存在する短いアミノ酸配列（シグナル配列と称される）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存在場所に誘導し、輸送中または前記タンパク質がその最終的な行き先に到達したときに除去される。ほとんど

10

20

30

40

50

のリゾチームタンパク質、膜たんぱく質または分泌タンパク質はアミノ末端シグナル配列を有し、前記配列は小胞体管腔内への輸送のために前記タンパク質に目印を付ける。この群のタンパク質について100を超えるシグナル配列が決定されている。シグナル配列の長さは13から36アミノ酸残基まで変動し得る。シグナル配列を認識する種々の方法が当業者に知られている。ある特徴では、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。シグナルPは結合した神経ネットワークを用い、前記は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 (例えば以下を参照されたい: Nielsen et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites", Protein Engineering, vol.10, no.1, p.1-6)。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼのいくつかはシグナル配列を含むことがあり、また含まないことがあることは理解されよう。あるグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼに由来するシグナル配列をコードする核酸配列が異なるグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの核酸配列に機能可能に連結されたものを含むことが所望されることもあり、また場合によって非グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼタンパク質に由来するシグナル配列が所望されることもあり得る。

#### 【0185】

前記ポリヌクレオチドを調製することができる微生物には原核細胞微生物 (例えば真性細菌および古細菌) および下等真核微生物 (例えば真菌、いくつかの藻類および原虫) が含まれる。ポリヌクレオチドは環境サンプルから分離することができ、その場合には核酸が生物を培養することなく回収されるか、または1つまたは2つ以上の培養生物から回収することができる。ある特徴では、そのような微生物は、エクストレモフィル、例えば超好熱菌、低温菌、低栄養菌、好塩菌、好圧性菌、好酸性菌であろう。エクストロモフィルから単離された酵素をコードするポリヌクレオチドを用いることができる。そのような酵素は、陸上の温泉または深海の熱水噴出孔の100℃を超える温度で、北極海の0℃未満の温度で、死海の飽和食塩の環境で、石炭堆積物および硫黄に富む地熱温泉での0に近いpH値で、または下水汚泥の11を超えるpH値で機能することができる。例えば、エクストレモフィルから単離され発現されたいくつかのエステラーゼおよびリパーゼは広範囲の温度およびpHを通して高い活性を示す。

上述のように選別および単離したポリヌクレオチドは適切な宿主細胞に導入される。適切な宿主細胞は、組換え及び／又は還元的再組合せを促進することができる任意の細胞である。ある特徴では選別したポリヌクレオチドは既に適切なコントロール配列を含むベクター内に存在する。前記宿主細胞は、高等な真核細胞 (例えば哺乳動物細胞) でも、下等な真核細胞 (例えば酵母細胞) でもよいが、ある特徴では、前記宿主細胞は原核細胞 (例えば細菌細胞) である。構築物の宿主細胞への導入は、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、またはエレクトロポレーション (Davis et al., 1986) によって実施することができる。

適切な宿主の代表的な例として、以下を挙げることができる: 細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセス、ネズミチフス菌; 真菌細胞、例えば酵母; 昆虫細胞、例えばドロソフィラS2およびスポドプテラSf9; 動物細胞、例えばCHO、COSまたはボウズメラノーマ; アデノウイルス; および植物細胞。適切な宿主細胞の選択は、本明細書の開示から当業者の技術範囲内にあると考えられる。

#### 【0186】

組換えタンパク質の発現に用いることができる種々の哺乳動物細胞培養系について特に言及すれば、哺乳動物発現系の例には、サル腎線維芽細胞のCOS-7株 ("SV40-trnsformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981)に記載されている) および適合しえるベクターを発現す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。哺乳動物の発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、並びに任意の必要なりボソーム結合部位、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'フランキング非転写配列を含むであろう。必要な非転写遺伝エレメントを提供するため

にSV40スプライス部位およびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いることができる。

別の特徴では、本発明の方法は、1つ若しくは2つ以上のオペロンまたは遺伝子クラスターまたはその部分から生化学的経路をコードする新規なポリヌクレオチドを作製するために使用できることが意図されている。例えば、細菌および多くの真核細胞は、その生成物が関連する過程に必要とされる遺伝子を調節するために協調的なメカニズムを有する。前記遺伝子は、“遺伝子クラスター”と称される構造を有するクラスターを単一の染色体上に形成し、ただ1つの調節配列（全クラスターの転写を開始するただ1つのプロモーターを含む）の制御下で一緒に転写される。したがって、遺伝子クラスターは、通常それらの機能に関して同一または関連する隣接する遺伝子の一群である。遺伝子クラスターによってコードされる生化学的経路の例はポリケチドである。

10

#### 【0187】

遺伝子クラスターDNAは種々の生物から単離して、ベクター、特に調節配列を発現することができるベクターに連結することができる（前記調節配列は、連結された遺伝子クラスターから検出可能なタンパク質またはタンパク質関連アレイの活性の生成を制御および調節することができる）。外因性DNAの導入に対して格別に大きな収容能力を有するベクターの使用が、そのような遺伝子クラスターとともに使用するためには特に適切であり、大腸菌のF因子（または稔性因子）を含む例示として本明細書に記載されている。大腸菌のこのF因子は、接合中にそれ自体の高頻度の伝達に影響を与えるプラスミドであり、大きなDNAフラグメント、例えば混合微生物サンプルの遺伝子クラスターの安定的な増殖の達成に理想的である。ある特徴では、“フォスミド”または細菌人工染色体（BAC）ベクターと称されるクローニングベクターが使用される。これらは大腸菌のF因子に由来し、ゲノムDNAの大きなセグメントを安定的に組み込むことができる。未培養の混合環境サンプル由来のDNAとともに組み込まれたとき、これは、安定な“環境DNAライブラリー”の形態で大きなゲノムフラグメントを獲得することを可能にする。本発明で使用するまた別のベクターのタイプはコスミドベクターである。最初コスミドベクターは、ゲノムDNAの大きなセグメントのクローニングおよび増殖のために設計された。コスミドベクターによるクローニングは以下に詳細に記載されている：Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。いったん適切なベクターに連結したら、種々のポリケチドシンターゼ遺伝子クラスターを含む1つまたは2つ以上のベクターを適切な宿主細胞に導入することができる。前記遺伝子クラスターによって共有される部分的な配列相同性を有する領域は、ハイブリッド遺伝子クラスターを生じる配列再編成をもたらす過程を促進するであろう。続いて、原型遺伝子クラスターには見出されない強化された活性について、新規なハイブリッド遺伝子クラスターをスクリーニングすることができる。

20

30

したがって、ある特徴では、本発明は、生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドの製造方法およびそのようなポリペプチドを強化された活性についてスクリーニングする方法に関し、前記方法は以下による：

1) 機能可能に連結された少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび機能可能に連結された第二のポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入し、ここで前記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は部分的に配列相同性を有する少なくとも1つの領域を共有し；

40

2) 機能可能に連結されたハイブリッドポリヌクレオチドを生じる配列の再編成が促進される条件下で、宿主細胞を生育させ；

3) 前記ポリヌクレオチドによってコードされるハイブリッドポリペプチドを発現させ；

4) 強化された生物学的活性の同定を促進する条件下でハイブリッドポリペプチドをスクリーニングし；さらに

5) 前記ハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離する。

種々の酵素活性についてスクリーニングする方法は当業者に公知であり、本明細書を通

50

して考察されている。そのような方法は、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを単離した時に利用することができる。

#### 【0188】

##### 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

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、例えばグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ活性についてポリペプチドをスクリーニングし（例えばザイモグラムにおけるカゼインの加水分解、ゼラチンから蛍光の遊離、または種々の小ペプチド基質からp-ニトロアナライドの遊離のようなアッセイ）、例えばグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナ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）として化合物をスクリーニングし、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についてスクリーニングすることなどが可能である。さらに、サンプルのスクリーニングについて下記で詳細に記載するアレイ様式の他に、また別の様式もまた本発明の方法の実施に用いることができる。そのような様式には、例えば質量分光光度計、クロマトグラフ（例えば高速HPLCおよび他の液体クロマトグラフィー様式）およびより小型の様式（例えば1536-ウェルプレート、384-ウェルプレート）などが含まれる。高処理スクリーニング装置を適合させて、本発明の方法の実施に用いてもよい（例えば米国特許出願20020001809を参照されたい）。

#### 【0189】

キャピラリーアレイ：本発明の核酸又はポリペプチドは、アレイ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（例えばGIGAMATRIX(商標) (Diversa Corporation, San Diego, CA) および例えば米国特許出願No. 20020080350 A1; W00231203; W00244336Aに記載されたアレイ）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装置を提供する。ある特徴では、キャピラリーアレイは、隣接するキャピラリーのアレイを形成する複数のキャピラリーを含み、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。管腔は、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在り得る。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。さらにまた、キャピラリーアレイは、アレイ中の隣接するキャピラリー間に沈積された間隙物質を含むことができ、それによって複数の貫通孔を含む硬い平板状装置を形成する。

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。さらに、約100,000本またはそれ以上の個々のキャピラリーを有するキャピラリーアレイを、標準的な研究室用装置に適合させるためにマイクロタイター（Microtiter(商標)）プレートの標準的サイズおよび形状に形成することができる。管腔は手動で満たされるか、または毛細管作用もしくは細い注射針によるマイクロインジェクションを用いて自動的に満たされる。問題のサンプルは続いて更なる分析または性状決定のために個々のキャピラリーから除去される。例えば、細い注射針様プローブが液体通路に配置される（前記液体通路は添加のためまたは管腔から物質を引き出すために選択されるキャピラリーを有する）。

#### 【0190】

一容器スクリーニングアッセイでは、キャピラリーアレイへの挿入の前にアッセイ成分は混合され、対象溶液が得られる。アレイの少なくとも一部分が対象溶液中に浸されたとき、管腔は毛細管作用によって満たされる。各キャピラリーにおける化学反応または生物学的反応及び／又は活性は検出可能な事象についてモニターされる。検出可能な事象はしばしば“ヒット”と称され、これは通常は光学的検出によって“無ヒット”をもたらすキ

ャピラリーと区別される。したがって、キャピラリーアレイは大量の並行的な“ヒット”の検出を可能にする。

複数容器スクリーニングアッセイでは、ポリペプチドまたは核酸、例えばリガンドは第一の成分に導入することができる。前記第一の成分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に導入される。続いて、気泡を第一の成分の後ろのキャピラリーに導入することができる。続いて、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。続いて、キャピラリーの両側に水圧をかけて気泡を壊すことによって第一の成分および第二の成分を混合することができる。続いて、前記2つの成分の反応または無反応から生じる検出可能な事象についてキャピラリーアレイをモニターする。

10

結合スクリーニングアッセイでは、問題の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、この場合、キャピラリーの管腔は前記検出可能粒子を管腔と結合させるための結合物質で被覆される。続いて、第一の液体をキャピラリー管から除去することができ（この場合、結合した検出可能粒子はキャピラリー内に維持される）、さらに第二の液体をキャピラリー管に導入することができる。続いて、前記粒子と第二の液体との反応または無反応から生じる検出可能な事象についてキャピラリーをモニターする。

#### 【0191】

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カナーゼ、マンナーゼまたはキシナーゼ遺伝子の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が、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”またはその変型をもう）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。

20

30

#### 【0192】

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6,022,963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；Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092；Kern (1997) Biotechniques 23:120-124；Solin as-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407；Bowtell (1999) Nature Genetics 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

40

50

18642号；同第20010019827号；同第20010016322号；同第20010014449号；同第20010014448号；同第20010012537号；同第20010008765号。

### 【0193】

#### 抗体および抗体使用スクリーニング方法

本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを単離することができる。これらの抗体はグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを阻害する方法を提供する（本発明の抗グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ組成物に関しての応用については上記の考察を参照されたい）。

10

本発明は、本発明の酵素のフラグメント（本発明のポリペプチドの免疫原性フラグメントを含む）を提供する。本発明は、本発明のポリペプチドまたはペプチドおよびアジュバントまたは担体などを含む組成物を提供する。

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

### 【0194】

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 (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (7th ed.) Lang Medical Publications, Los Altos, CA (“Stites”); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed.) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) *Nature* 256:495; Harlow (1988) *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) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45。

30

また本発明のポリペプチドまたは連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100若しくは150のアミノ酸を含む前記のフラグメントを用いて、前記ポリペプチドまたはフラグメントと特異的に結合する抗体を作製することができる。得られた抗体をイムノアフィニティークロマトグラフィー方法で用いて、前記ポリペプチドを単離または精製するか、または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ことができる。そのような方法では、本発明のポリペプチドの1つ、または連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100若しくは150のアミノ酸を含む前記のフラグメントと特異的に結合することができる抗体と、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接触させる。

40

イムノアフィニティークロマトグラフィーの方法では、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つまたはそのフラグメント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。

50

## 【0195】

生物学的サンプル中のタンパク質の前記抗体との結合能力は、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または連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100若しくは150のアミノ酸を含む前記のフラグメント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、または動物（例えば非ヒト動物）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。

モノクローナル抗体の調製の場合、継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（Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72, 1983）およびEBV-ハイブリドーマ技術（Cole (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）が含まれる。

単鎖抗体の生成のために記載された技術（米国特許第4,946,778号）を利用して、本発明のポリペプチドまたは連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100若しくは150のアミノ酸を含む前記のフラグメントに対する単鎖抗体を生成することができる。あるいは、トランスジェニックマウスを用いて、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。

本発明のポリペプチドまたは連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100若しくは150のアミノ酸を含む前記のフラグメントに対して作製された抗体を他の生物およびサンプルに由来する類似のポリペプチド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、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。そのようなスクリーニングアッセイの1つが以下に記載されている：“Methods for Measuring Cellulase Activities” ., *Methods in Enzymology*, vol.160, pp. 87-116。

## 【0196】

キット

本発明は、前記組成物（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（例えばグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ）及び／又は抗体）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。

## 【0197】

全細胞操作および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カナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ活性）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、本発明の酵素のコード配列を細胞に導入することによって改変することができる。例えばW00220032、W00196551を参照されたい。

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を“リアルタイム”または“オンライン”時間枠でモニターする。ある特徴では、複数の細胞（例

10

20

30

40

50

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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用いてモニターできる。

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。質量保存の法則および細胞内代謝に関する擬似定常状態仮説(pseudo-steady state hypothesis, PSSH)に基づいて線形独立な代謝行列が構築される。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、前記経路の反応の化学量論の実体; 10
- 前記反応を触媒する全ての酵素、前記酵素反応のカイネティクスの実体;
- 経路の成分間の調節的相互反応、例えばアロステリック相互反応、酵素-酵素相互反応など;
- 酵素の細胞内区画局在性または前記酵素の超分子的構成; および
- 代謝物、酵素またはエフェクター分子またはそれらの移動に対する拡散障壁の何らかの濃度勾配の存在。

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、オンラインメタボロームデータが利用可能ならば行列認識によって数学的提示を導入し、細胞内代謝フラックスを見積もることができる。代謝表現型は細胞内の完全な代謝ネットワークの変化を必要とする。代謝表現型は、環境条件、遺伝的調節、発育状態および遺伝子型などに対応する経路の利用変化に左右される。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、それらの表現型および他の特性が前記経路の利用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態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、誘発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てることができる。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の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。 20 30

本発明の方法の実施では、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)を付与しこれを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。

#### 【0198】

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(例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼメッセージ)の発現の増加もしくは減少、または新規転写物(例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ)の生成を含む。この発現増加または低下は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの存在について試験するか、またはグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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(ノザンブロット、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)。 40

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ノックアウトすることによって作出される。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(例えばプロモータまたはエンハンサー)をノ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。 50

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。前記は、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）のノックアウト、または正の制御エレメントの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、または細胞の核酸相当物または細胞の転写物と相補的な核酸をアレイ上に固定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。

#### 【0199】

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（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）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、存在するグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの量の決定またはグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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法（例えば核磁気共鳴（NMR）、分光光度法、ラジオグラフィ（タンパク質放射能標識）、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、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、またはその全てはタンパク質アレイを用いて測定することができる。

#### 【0200】

##### 工業的応用

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは高度に選択的な触媒である。それらは、通常の合成化学では比類のない完璧な立体選択性、領域選択性および化学的选择性を有する反応を触媒することができる。本発明の酵素は、有機溶媒中で機能するように、極端なpH（例えば高pHおよび低pH）、極端な温度（例えば高温および低温）、極端な塩レベル（例えば高塩濃度および低塩濃度）で作用するように調製することができ、前記酵素の天然の生理学的な基質とは構造的に無関係の化合物との反応を触媒することができる。

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（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）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、1要素および2要素水生組成物、非水性液体組成物、鑄造固形物、顆粒形、粒状形、圧縮錠剤、ゲルおよび／またはペーストおよびスラリー形であろう。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼはまた、固形または液体形の洗剤添加生成物としてもまた用いることができる。そのような添加生成物は通常の洗剤組成物の性能の補充または補強を目的とし、洗浄プロセスの任意の段階で添加できる。

洗剤溶液が所望の酵素活性を有すると仮定して、実際の活性酵素含有量は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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの量は、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、

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、約4から約12の範囲のpH、約20℃から約95℃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。

#### 【0201】

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは粉末または液体洗剤に製剤化できる（約0.01から約5質量%（ある特徴では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、例えば他のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ、またはセルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、カタラーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、ブルナーゼ、アラビナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ガラクタナーゼ、プロテアーゼ、ペクテートリアーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼを含むことができる。前記洗剤組成物はまたビルダーおよび安定化剤を含むことができる。前記洗剤組成物はまたビルダーおよび安定化剤を含むことができる。

通常の洗浄組成物への本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、酵素が目的の使用pHおよび／または温度で活性を示すか、前記が許容される限り、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、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは洗剤を含まない洗浄組成物で、単独またはビルダーおよ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、織物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。

#### 【0202】

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。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ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または機械による洗濯洗剤組成物として製剤化することができる。汚れの付着した布地の予備処理に適した洗濯添加物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グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含むことができる。あるいは、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、一般的な家庭用硬質表面洗浄作業に使用される洗剤組成物として製剤化することができる。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、例えば別のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ、またはキシラナーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、オキシダーゼ、たとえばラクターゼおよび／またはペルオキシダーゼを含むことができる（上記もまた参照されたい）。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、本発明の酵素を用いて布地から悪臭を有する物質が除去される。本発明の実施で用いることができる種々の洗剤組成物および前記を製造する方法は、例えば米国特許6,387,690号、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。

洗濯機洗浄方法で使用するために適した組成物として製剤化する場合は、本発明の酵素は界面活性剤およびビルダーの両方を含むことができる。前記はさらに1つまたは2つ以上の洗剤成分、例えば有機ポリマー化合物、漂白剤、追加の酵素、石鹼泡抑制剤、分散剤、

ライムソーブ分散剤、汚れ遊離および再沈着防止剤、および腐食防止剤を含むことができる。さらに別の洗剤成分として、本発明の洗濯組成物はまた柔軟化剤を含むことができる。カーボヒドラーゼを含むそのような組成物は、洗濯洗剤組成物として製剤化された場合、布地の洗浄、シミの除去、白さの維持、柔軟化、カラーアピアランス、染色移りの防止および殺菌を提供する。

本発明の選択洗剤組成物の濃度は、組成物の約200から1500g/L、または約400から1200 g/L、または約500から950 g/L、または600から800 g/Lの範囲であろう。前記は約20℃で測定できる。

#### 【0203】

本発明の選択洗剤組成物の“圧縮”型は、密度によって、さらに組成に関しては無機充填塩によってもっともよく示される。無機充填塩は、粉末型の洗剤組成物の一般的な成分である。一般的な洗剤組成物では、前記充填塩はかなりの量、典型的には全組成物の17から35質量%で存在する。圧縮組成物のある特徴では、前記充填塩は、全組成物の15質量%を超えない、または10質量%を超えない、または5質量%を超えない量で存在する。無機充填塩は、硫酸塩および塩化物のアルカリおよびアルカリ土類金属塩、例えば硫酸ナトリウムから選択することができる。

本発明の液体洗剤組成物はまた“濃縮型”であり得る。ある特徴では、液体洗剤組成物は、一般的な液体洗剤と比較して少ない量の水を含むことができる。また別の特徴では、濃縮液体洗剤の水の含有量は、洗剤組成物の40質量%未満、または30質量%未満、または20質量%未満である。本発明の洗剤化合物は、W097/01629に記載の成分組成を含むことができる。

本発明の酵素は、種々の洗浄組成物の製剤化に有用であり得る。界面活性剤として適切な多数の公知の化合物（非イオン性、陰イオン性、陽イオン性または双性イオン性洗剤を含む）を、例えば米国特許4,404,128号、同4,261,868号、5,204,015号に開示されたように使用することができる。さらにまた、本発明のグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、例えば棒状石鹼もしくは液体石鹼として、皿洗浄洗剤、コンタクトレンズ洗浄溶液もしくは製品、ペプチド加水分解、水処理、布地処理、タンパク質製造での融合-切断酵素として用いることができる。本発明のグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、別の洗剤プロテアーゼと比較して洗剤組成物の性能強化を提供する。すなわち、本酵素群は、ある種の酵素感受性汚れ（例えば草または血液）の洗浄を高めることができる（前記は標準的洗浄サイクル後の通常の評価によって決定された）。本発明のグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、公知の粉末洗剤または液体洗剤（約0.01から約5質量%（例えば約0.1から0.5質量%）のレベルで6.5から12.0のpHを有する）に製剤化することができる。前記の洗剤洗浄組成物はまた他の酵素、例えば公知のグルカナナーゼ、マンナナーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ、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および安定化剤と同様に含むことができる。

ある特徴では、本発明は、果実、野菜及び／又は泥および粘土物質に対して使用されるグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ（本発明のグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）活性を有する洗剤組成物を提供する。

#### 【0204】

繊維および布地の処理：本発明は、本発明の1つまたは2つ以上の本発明のグルカナナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用いて繊維および織物を処理する方法を提供する。

本発明の酵素は任意の繊維処理方法または布地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6,261,828号、同6,077,316号、同6,024,766号、同6,021,536号、同6,017,751号、5,980,581号、米国特許公開広報20020142438A1を参照されたい。例えば、本発明の酵素は、繊維および／または織物の糊抜きで用いることができる。ある特徴では、繊維の感触および外観は、繊維を溶液中で本発明の酵素と接触することを含む方法によって改善される。ある特徴では、繊維は加圧下において前記溶液で処理される。例えば、本発明の酵素は汚れの除去で用いることができる。

ある特徴では、本発明の酵素は、布地を織っている間もしくは織った後で、または糊抜

き工程中に、または1つもしくは2つ以上の追加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、縦糸はしばしばサイズ用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。布地を織り上げた後、織物は脱サイズ工程に進むことができる。前記工程の後に1つまたは2つ以上の追加の織物加工工程が続く。脱サイズは“サイズ”を布地から除去する作業である。機織り後に、前記サイズ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。

本発明の酵素を用いて以下を含む任意のセルロース材料を処理することができる：繊維（例えば綿、麻、亜麻またはリンネルの繊維）、縫製若しくは未縫製織物、例えばニット、織物、デニム、織物糸、およびタオル地（綿、綿混紡または天然若しくは人造セルロース（例えばグルカン含有セルロース繊維（例えば木材パルプ）に由来するもの）から製造されたもの）、およびそれらの混合物。混合物の例は、綿またはレーヨン/ビスコースと1つまたは2つ以上の組合せ素材、例えばウール、合成繊維（例えばポリアミド繊維、アクリル繊維、ポリエステル繊維、ポリビニルアルコール繊維、塩化ポリペプチドビニル繊維、塩化ポリビニリデン繊維、ポリウレタン繊維、ポリウレア繊維、アラミド繊維）およびセルロース含有繊維（例えばレーヨン/ビスコース、カラムシ、麻、亜麻/リンネル、ジュート、酢酸セルロース繊維、リオセル）との混合である。

#### 【0205】

本発明の酵素を洗剤添加物として（例えば水性組成物で）用いて、織物または任意のグルカン、マンナン、キシランまたはセルロース含有材料（綿含有繊維を含む）を処理することができる。衣類の製造のために、布地を裁断し縫製して衣類または衣服を作ることができる。衣類は処理の前または後で仕立てることができる。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で開始し、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、酵素（例えば本発明のマンナーゼ、キシラナーゼまたはグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ））の任意の組合せを用いて、布地の処理（例えばデニムの衣料の仕上げ）、酵素による糊抜きおよび織物に柔軟さを提供する方法を提供する。ある特徴では、本発明の酵素は、布地の老化を防止するための処理で用いることができる。

ある特徴では、アルカリ性及び／又は熱安定性の本発明のマンナーゼ、キシラナーゼまたはグルカナーゼ（例えばエンドグルカナーゼ）を、単一浴脱サイズおよびバイオスカーリングで混合することができる。一工程で脱サイズおよびバイオスカーリングにまとめて行う利点はとりわけ、エネルギーおよび水使用の削減並びに廃棄生成物の減少によるコスト削減および環境への影響の減少である。脱サイズおよびバイオスカーリングのための典型的な適用条件は、pH約8.5から10.0および温度約40℃以上である。低い酵素使用量（例えば約5g/トン綿）および短い反応時間（例えば約15分）を用いて、効率的な糊抜きおよび洗練がカルシウムを添加することなく得られる。

#### 【0206】

本発明の酵素は、セルロース含有織物の粗さを減少させ、色を鮮明にさせ、または前記のような織物で色の局所的変化を提供するための処理で用いることができる。例えば米国特許6,423,524号を参照されたい。例えば、綿を含む織物の粗さを減少させるために、例えば粗さを減少させる洗剤添加物として、本発明の酵素を用いることができる。本発明の酵素は、着色織物において“ストーン洗淨された”外観を与え、一方で着色剤の再沈着量を減少させるために織物の処理に用いることができる。

本発明の布地処理の過程（本発明の酵素を使用する）は、他の布地処理、例えばスカーリングおよび漂白と一緒に用いることができる。スカーリングは、綿繊維から非セルロース性物質（例えばキューティクル（主としてロウから成る）および一次細胞壁（主としてペクチン、タンパク質およびキシログルカンから成る））を除去することである。適切なロウの除去は高い吸湿性を得るために必要である。高い吸湿性は染色のために必要である。本発明の過程による一次細胞壁の除去はロウの除去を改善し、より均一な染色を担保す

10

20

30

40

50

る。本発明の過程による布地の処理は、漂白過程で白さを改善する。スカーリングで用いられる主要な化学物質は、高濃度で高温の水酸化ナトリウムである。漂白は布地を酸化することを含む。漂白は、完全に漂白された（白色）布地を得るか、または染料の完全な濃淡の度合いを担保するために、典型的には酸化剤として過酸化水素の使用を必要とする。

本発明はまたアルカリ性グルカナーゼ（例えば、アルカリ性条件下で活性を有するエンドグルカナーゼ）、マンナナーゼまたはキシラナーゼを提供する。前記は、織物加工、植物繊維（例えば植物靱皮繊維）の脱ガム、廃棄物（例えばペクチン廃液）の処理、製紙、並びにコーヒーおよび紅茶発酵で広い応用範囲を有する（例えば以下を参照されたい：Hondal (2002) Applied Microbiology and Biotechnology 59:409-418）。

#### 【0207】

本発明の布地の処理過程はまた、他の酵素（炭水化物分解酵素を含む）の任意の組合せを使用することを含むことができる。前記他の酵素は、例えばカタラーゼ、他のグルカナーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルナーゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、他のマンナナーゼ、キシログルカナーゼ、他のキシラナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、プロテアーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクテートリアーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼである。本発明の酵素を他の炭水化物分解酵素（例えばセルラーゼ、アラビナナーゼ、キシログルカナーゼ、ペクチナーゼなど）と組み合わせて用いて、繊維を製造または繊維を洗浄することができる。プロテアーゼもまた本発明の酵素と組み合わせて用いることができる。これらは洗剤と組み合わせて用いることができる。

#### 【0208】

食品処理および食品加工：本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは食品加工工業において多数の用途を有する。例えば、ある特徴では、本発明の酵素を用いて、油に富む植物材料（例えば油に富む種子）の油の抽出、例えばダイズから大豆油の抽出、オリーブからオリーブ油の抽出、ナタネからナタネ油の抽出および／またはヒマワリの種子からヒマワリ油の抽出が改善される。

本発明の酵素は植物細胞材料の成分の分離に用いることができる。例えば、本発明の酵素は、グルカンに富む材料（例えば植物細胞）の成分への分離に用いることができる。ある特徴では、本発明の酵素を用いて、グルカンに富む、または油に富む作物を有益なタンパク質および油および外皮部分に分離することができる。前記分離過程は当業界で公知の方法を使用して実施できる。

本発明の酵素を果実ジュース、野菜ジュース、シロップ、抽出物などの製造に用いて収量を高めることができる。本発明の酵素は、種々の植物細胞壁由来材料または廃棄物質（例えば穀類、穀粒、ワインまたはジュース製造に由来する）、または農作物残渣（例えば野菜の外皮、豆類外皮、テンサイの茎髓、オリーブの茎髓、ジャガイモの茎髓など）の酵素処理に用いることができる。本発明の酵素は、加工果実または野菜の濃度および外観の改変に用いることができる。本発明の酵素を用いて植物材料を処理し、植物材料（食品を含む）の加工を促進、植物成分の精製もしくは抽出を促進することができる。本発明の酵素を用いて、飼料価値を高め、水との結合能力を低下させ、排水プラントでの分解能を改善し、および／または植物材料のサイロ貯蔵物への変換を改善することなどが可能である。本発明の酵素はまた、果実および発酵工業で洗浄およびメンテナンス装置のために用いることができる。

#### 【0209】

ある特徴では、酵素（例えば本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）は、グルカンの加水分解および粘性の減少のために焼成用途（例えばクッキーおよびクラッカー）で用いられる。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼはま

た、非粘着性の生地 of 製造に用いることができる（非粘着性の生地は機械製造が困難ではなく、ビスケットのサイズを小さくする）。グルカンの加水分解に本発明の酵素を使用することによって、焼成製品の急速な再水和（クリスピーさの低下および保存期間の短縮をもたらす）が防止される。ある特徴では、本発明の酵素は生地加工時の添加物として用いられる。ある特徴では、本発明の酵素は生地のコンディショニングに用いられ、この場合、ある特徴では前記酵素は、約25℃から35℃の温度範囲および中性pH付近（7.0-7.5）で高い活性を有する。ある特徴では、生地をコンディショニングする酵素は高い焼成温度（>260℃（500 ° F））で不活化することができる。

本発明の食品処理過程はまた、他の酵素の任意の組合せの使用を含むことができる。前記他の酵素は、例えばカタラーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、  
10 エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、アミログリコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、リポオキシゲナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、  
ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、  
デカルボキシラーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、アラ  
20 ビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、ペク  
チンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、プロテアーゼ、  
ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ガ  
ラクタナーゼ、ペクテートリアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ペクチンメチルエステ  
ラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼである。

#### 【0210】

紙又はパルプの処理：本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用いる紙の処理方法を提供する。ある特徴では、本発明の酵素は、化学漂白剤（例えば二酸化塩素）の要求性が低い状態で、さらに高アルカリ性および高温環境で用いることができる。ある特徴では、本発明の酵素は熱安定性のアルカリ性グルカナーゼであり、前記は、クラフトパルプの二酸化塩素要求性を25%以上低下させることができ、このときパルプ収量の低下は0.5%未満である。ある特徴では、境界パラメーターは、pH10、65-85℃、0.001重量%未満の酵素添加で60分未満の処理時間である。エンドグルカナーゼのプールを、例えばpH10および60℃  
30 で染料標識グルカンの加水分解能力について試験することができる。これらの条件下で陽性であった酵素を続いて例えばpH10および70℃で評価することができる。あるいは、酵素を70℃でpH8およびpH10で試験してもよい。紙パルプ工業で所望されるエンドグルカナーゼの発見では、高温または高アルカリ性環境から得られるライブラリーを標的とした。特に、これらのライブラリーをアルカリ性pHおよび約45℃の温度で機能する酵素についてスクリーニングした。別の特徴では、本発明のグルカナーゼは、紙パルプ工業においてリグニンを遊離させるためにリグニンヘミセルロースの分解で有用である。

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、例えば以下に記載されているように紙パルプ工業で用いることができる：米国特許5,661,021号；6,387,690号；6,083,733号；6,140,095号および6,346,407号。例えば、米国特許6,140,095号に記載されて  
40 いるように、本発明の酵素はアルカリ耐性グルカナーゼであり得る。本発明の酵素は紙パルプ工業で用いることができ、この場合、前記酵素は65℃から75℃の温度範囲および約10のpHで活性を有する。さらにまた、紙パルプ工業で有用な本発明の酵素は、化学漂白剤（例えば二酸化塩素）の要求性が低いであろう。本発明の酵素は、40℃から70℃の温度範囲においてわずかに酸性pH（5.5-6.0）で活性を有することができ、95℃で不活化される。

ある特徴では、本発明の酵素は40-75℃およびpH5.5-6.0で至適活性を有し；70℃で少なくとも50分安定であり、さらに96-100℃で不活化される。

#### 【0211】

さらにまた、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、例えば米国特許5,202,249号に記載されているようにバイオ漂白および化学パルプの処理で、例えば  
50

米国特許5,179,021号；5,116,746号；5,407,827号；5,405,769号；5,395,765号；5,369,024号；5,457,045号；5,434,071号；5,498,534号；5,591,304号；5,645,686号；5,725,732号；5,759,840号；5,834,301号；5,871,730号および6,057,438号に記載されているように木材または紙パルプの生物漂白および処理で、例えば米国特許5,486,468号および5,770,012号に記載されているように木材および改変木材でリグニンを減少させる場合に有用であり得る。

ある特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、紙パルプ工業で単独でまたはキシラナーゼ（例えば本発明のキシラナーゼ）とともに用いられる。

ある特徴では、本発明の酵素を漂白過程で用い、漂白パルプ（例えば完全にまたは部分的に軟木に由来する）の白さが強化される。本発明の酵素を用いて、漂白段階で使用される塩素の量を少なくすることができる。ある特徴では、本発明のマンナナーゼを用いて、紙のリサイクル過程でパルプの濾水度が高められる。ある特徴では、本発明のマンナナーゼを、リグノセルロースパルプ（例えば完全にまたは部分的に軟木に由来する）の処理で単独またはキシラナーゼとともに（例えば本発明のキシラナーゼ）用いて、その漂白性が改善される。例えば米国特許5,795,764号を参照されたい。

本発明の紙パルプ処理はまた、他の酵素の任意の組合せの使用を含むことができる。前記他の酵素は、例えばカタラーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、アミログリコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、リポオキシゲナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、デカルボキシラーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクテートリアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼである。

#### 【0212】

動物飼料および食品または飼料添加物：本発明は、本発明のグルカナーゼを用いて動物飼料および食品または飼料添加物を処理する方法を提供する。前記動物には哺乳動物（例えばヒト）、鳥類（例えばニワトリ）、爬虫類、魚類などが含まれる。本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む動物飼料、食品および添加物を提供する。ある特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用いて動物飼料、食品および添加物を処理することによって、動物の食物または添加物中の栄養物、例えばデンプン、タンパク質などの利用性を高めることができる。消化が困難なタンパク質を分解することによって、または間接的または直接的にデンプンを露出させることによって、本発明の酵素は他の内因性または外因性酵素が栄養物により接近可能にする。本発明の酵素はまた簡単に、容易に消化可能で容易に吸収可能な栄養物及び糖の遊離を惹起することができる。別の特徴では、本発明の酵素を飼料で用いて、食品または飼料（例えばオオムギ高含有飼料またはコムギ高含有飼料、例えば家禽用飼料）中のグルカンの粘性を低下させる。ある特徴ではこれによって水性糞(wet dropping)を最小限にすることができる。

動物飼料に添加したとき、本発明のグルカナーゼは、部分的には腸内の粘性を低下させることにより植物細胞壁物質のin vivo分解を改善し、それによって植物栄養物の動物によるより良好な利用が達成される（例えば以下を参照されたい：Bedford et al., Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition, 1993, pp.73-77）。したがって、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを飼料で使用することによって、動物の成長速度及び／又は飼料変換率（すなわち、摂取飼料の重量対体重増加）が改善される。

本発明の動物飼料添加物は顆粒化された酵素生成物（前記は容易に飼料成分と混合する

ことができる)でもよい。あるいは、本発明の飼料添加物はプレミックスの成分を構成することができる。本発明の顆粒化酵素生成物は被覆されてもされてなくてもよい。酵素顆粒の粒子サイズは飼料およびプレミックス成分のそれに適合させることができる。これは、酵素を飼料に取り込ませるために確実に簡単な手段を提供する。あるいは、本発明の動物飼料添加物は安定化された液体組成物であってもよい。前記は水性または油性スラリーでもよい。例えば米国特許6,245,546号を参照されたい。

### 【0213】

動物飼料または食品の改変で、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、前記食品または飼料を(飼料または食品の成分を改変することによって) *in vitro* でまたは *in vivo* で処理することができる。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、大量のグルカンを含む動物の食物または食品組成物(例えば穀類、穀粒などに由来する植物物質を含む飼料または食品)に添加することができる。飼料または食品に添加したとき、グルカナーゼは、グルカン含有物質(例えば植物細胞壁)の *in vivo* 分解を顕著に改善し、それによって植物性栄養物の動物(例えば人間)によるより良好な利用が達成される。ある特徴では、動物の成長速度及び/又は飼料変換率(すなわち、摂取飼料の重量対体重増加)が改善される。例えば部分的にまたは消化不能のグルカンを含むタンパク質が、完全にまたは部分的に本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼによって(例えば別の酵素、例えばベータ-ガラクトシダーゼと組み合わせられて)ペプチドおよびガラクトース及び/又はガラクトオリゴマーに分解される。これらの酵素消化生成物は動物によってより消化可能である。したがって、本発明のグルカナーゼは飼料または食品の利用可能なエネルギーに寄与することができる。さらにまた、グルカン含有タンパク質の分解に寄与することによって、本発明のグルカナーゼは、炭水化物性または非炭水化物性の飼料または食品構成物(例えばタンパク質、脂肪および鉱物)の消化性および取り込みを改善することができる。

別の特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、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)、例えば穀粒、穀類、トウモロコシ、ダイズ、アブラナの種子、ルピンなど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。上記で考察したように、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、本発明のグルカナーゼが回収可能な量で産生されるように発現される。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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、前記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。

### 【0214】

ある特徴では、本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用いて、動物が消費する前に飼料からオリゴ糖を除去する方法を提供する。この方法では、代謝可能なエネルギー値が増加した飼料が形成される。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの他に、セルラーゼおよびその組合せを用いることができる。

ある特徴では、酵素は飼料物質の重量の約0.1%から1%に等しい量で添加される。ある特徴では、飼料は穀類、穀粒、ダイズ(例えばダイズ粉)である。例えば米国特許6,399,123号を参照されたい。

別の特徴では、本発明は、動物の食物における栄養性サプリメントとして本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを利用する方法を提供する。前記方法は、本発明の組換え酵素を含む栄養性サプリメントを調製し、前記栄養性サプリメントを動物に与えて動物が摂取する食品に含まれるグルカンの利用を高めることによる。

さらに別の特徴では、本発明はペレット化された食用酵素を提供し、さらに例えば栄養性サプリメントとして本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼをデリバリーするために前記を使用する方法を提供する。前記酵素デリバリーマトリックスは、容

10

20

30

40

50

易にグルカナーゼ酵素（例えば本発明のアミノ酸配列、または少なくとも前記の連続する30アミノ酸を有する酵素）を水性媒体（例えば動物の消化液）中に放出する。本発明の酵素デリバリーマトリックスは、顆粒状の食用担体から調製され、前記担体は、例えば油を搾り取った穀物胚芽、干し草、アルファルファ、チモシー、ダイズ外皮、ヒマワリ種子の粉、コムギのミッドなどのような、その中に含まれる組換え酵素を水性媒体中に容易に分散させる成分から選択される。使用に際しては、ペレット化された食用酵素デリバリーマトリックスは動物に投与され、動物にグルカナーゼがデリバーされる。適切な穀粒系基質は、任意の適切な食用穀粒（例えばコムギ、トウモロコシ、ソルガム、アルファルファ、オオムギなど）を含むか、またはそれらに由来するであろう。例示的な穀粒系基質はダイズ使用基質である。基質は穀粒の適切な任意の部分から得ることができるが、ある特徴では動物の飼料としての使用が承認されている穀物胚芽、例えば湿式または環式製粉過程で得られるトウモロコシ胚芽である。ある特徴では、穀物胚芽には使用済み胚芽（例えば圧搾またはヘキサン若しくは他の溶媒による抽出によって油が絞り抜かれた穀物胚芽）が含まれる。あるいは、穀物胚芽はエクスペラーで抽出され、すなわち油は圧搾によって抽出されている。

10

#### 【0215】

本発明の酵素マトリックスは別個の複数の粒子、ペレットまたは顆粒の形態を有する。“顆粒”とは、例えばペレット化、抽出または同様な凝縮によって圧縮または凝縮され、マトリックスから水分が除去された粒子を意味する。そのような粒子の圧縮または凝縮は粒子の粒子間結合を促進する。例えば、顆粒は穀粒系基質をペレットミルでペレット化することによって製造することができる。そのようにして製造されたペレットは、動物飼料のアジュバントとして使用するために適した顆粒サイズに磨り潰すか砕かれる。マトリックスそれ自体は動物の飼料での使用が承認されているので、前記は動物飼料における酵素のデリバリーのための希釈剤として用いることができる。

20

ある特徴では、酵素デリバリーマトリックスは、約4から約400メッシュ（USS）；さらにある特徴では約8から約80メッシュ；さらにある特徴では約14から約20メッシュの範囲の顆粒サイズを有する顆粒形である。前記穀物胚芽が溶媒抽出により抽出される場合、滑沢剤（例えばトウモロコシ油）の使用がペレット生成装置で必要とされるかもしれないが、そのような滑沢剤は、前記胚芽がエクスペラーで抽出される場合は通常は不要である。本発明の他の特徴では、マトリックスは、凝縮または圧縮過程、例えば穀粒系基質をダイ

30

から押出し、さらに押出されたもの適切な顆粒サイズに磨り潰すことによって製造される。

酵素デリバリーマトリックスはさらに粘着剤として多糖類成分を含み、マトリックス顆粒の粘着性を強化することができる。粘着剤はさらに追加のヒドロキシル基を提供すると考えられる（ヒドロキシル基はマトリックス顆粒内で顆粒タンパク質間の結合を強化する）。さらにまた、追加されたヒドロキシル基はタンパク質とデンプンおよび他のタンパク質との水素結合を強化することによってそのように機能すると考えられている。粘着剤は、酵素デリバリーマトリックスの顆粒の粘着性を強化するために適切な任意の量で存在することができる。適切な粘着剤には1つまたは2つ以上のデキストリン、マルトデキストリン、デンプン、例えばトウモロコシデンプン、小麦粉、セルロシック、ヘミセルロシック

40

#### 【0216】

本発明の酵素放出マトリックスは生物分解性物質から製造されるので、前記マトリックスは（例えばカビの増殖による）腐敗を受ける可能性がある。そのようなカビの増殖を予防または阻害するために、マトリックスはカビ抑制剤、例えばプロピオン酸塩を含むことができ、前記は酵素放出マトリックスのカビの増殖を抑制するために十分な任意の量で存在することができる。したがって本発明は、冷蔵を必要としない安定な製剤としてのデリバリーマトリックスを提供する。

本発明の酵素デリバリーマトリックスおよびその方法に含まれるグルカナーゼ酵素は、

50

ある特徴では、本明細書に記載されているように熱安定性グルカナーゼであり、上昇温度および蒸気がペレット化酵素デリバリーマトリックスの製造に用いられる製造時にグルカナーゼの不活化に対し耐性を示す。本発明の酵素デリバリーマトリックスを含む飼料の消化時に、水性の消化液は活性酵素の放出を引き起こすであろう。他のタイプの熱安定性酵素および熱安定性栄養性サプリメントもまた、任意のタイプの水性条件下で放出されるデリバリーマトリックスに取り込ませることができる。

多くの種々の目的のために（例えば動物の食物に香りまたは栄養性サプリメントを添加するため、胃の中で動物飼料の栄養性サプリメントおよび酵素の放出を遅らせるためなど）、本発明の酵素マトリックス粒子にコーティングを適用することができる。または前記コーティングは、機能的な目的を達成するために、例えばマトリックス粒子から酵素の緩徐な放出を所望するか、または酵素が放出される条件を制御することを所望するときはいつでも適用することができる。コーティング物質の組成は、前記コーティングが感受性を有する因子（例えば熱、酸若しくは塩基、酵素または他の化学物質）によって選択的に分解されるようなものである。あるいは、前記のような種々の分解因子に感受性を有する2つまたは3つ以上のコーティングを連続的にマトリックス粒子に適用してもよい。

本発明はまた、酵素放出マトリックスの製造を目的とする。本発明にしたがえば、前記方法は、酵素放出マトリックスとしての使用に適した粒子サイズの穀粒系基質の複数の別個の粒子を提供することを含み、この場合、前記粒子は本発明のアミノ酸配列によってコードされるグルカナーゼ酵素を含む。ある特徴では、前記方法は、酵素放出マトリックスを凝縮または圧縮して顆粒にすることを含み、ある特徴では前記はペレット化によって達成される。カビの抑制剤および粘着剤を使用するときは、それらは任意の適切なときに添加することができ、ある特徴では前記は穀粒系基質のペレット化の前に所望の割合で穀粒系基質と混合される。ペレットミルの飼料中の水分含有量は、ある特徴では完成製品中の水分含有量に関して上記で述べた範囲であり、ある特徴では約14-15%である。ある特徴では、水分は酵素の水性調製物の形で原料ストックに添加され、原料ストックを前記の水分含有量にする。ペレットミル中の温度は、ある特徴では蒸気により約82℃にされる。ペレットミルは原料ストックに十分な成果が付与される任意の条件下で操作され、ペレットが提供される。前記ペレット形成過程自体は、酵素含有組成物から水を除去するための費用効率の高い工程である。

#### 【0217】

ある特徴では、ペレットミルは、1/8インチx2インチのダイを用いて100lb/分の圧力で82℃で操作され、ペレットが提供される。続いて、前記ペレットをペレット破碎装置で碎いて、8メッシュのスクリーンを通過することができるが20メッシュスクリーンには保持され得る粒子サイズを有する別個の複数の粒子を提供する。

本発明の熱安定性グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは本発明のペレットで用いることができる。それらは高い至適温度および高い熱耐性を有し、これまで実施されることがない温度での酵素反応が実施できる。本発明のグルカナーゼをコードする遺伝子（例えば本発明の配列のいずれかで示されるもの）を、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの特徴（至適pH、至適温度、耐熱性、溶媒に対する安定性、比活性、基質親和性、分泌能力、翻訳速度、転写制御などに関して）とは異なる特徴を有するグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの調製に用いることができる（例えば本明細書に記載したGSSM(商標)を用いる）。さらにまた、本発明のポリヌクレオチドを、本明細書に記載した方法によって調製したグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの変種のスクリーニングに利用し、所望の活性（例えば改善または改変された熱安定性または耐熱性）を有するものを決定することができる。例えば米国特許5,830,732号はグルカナーゼの耐熱性を測定するスクリーニングアッセイを記載している。

#### 【0218】

ある特徴では、動物飼料中の本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは動物の胃の中で活性を有する。したがって、ある特徴では、（例えば飼料中の）本発明の酵素は、約37℃で例えば単胃動物では低pH（pH2-4）で、反芻動物ではほぼ中性pH（pH6.

5-7)で活性を有する。本発明の酵素は、動物の腸の酵素(例えばプロテアーゼ)に対する耐性、および飼料のペレット化に必要な高温での安定性を有する。ある特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは飼料添加物(例えば単胃動物の食料)で用いられ、高い比活性を有することができる。例えば、35-40℃およびpH2-4で半減期がSGFで30分を超える活性、さらに製剤化された状態で半減期が85℃で5分を超える活性を有する。反芻動物の飼料の場合、飼料添加物中の本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは高い比活性を有し、例えば、35-40℃およびpH6.5-7で半減期がSRFで30分を超える活性、および濃縮乾燥粉末として安定性を示す。

本発明の動物飼料および動物飼料製造方法は、他の酵素の任意の組合せ、例えばカタラーゼ、他のグルカナーゼ、セルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、アミログリコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、リポオキシゲナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、デカルボキシラーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、フィターゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、他のマンナナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクテートリアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび/またはトランスグルタミナーゼを含むことができる。

#### 【0219】

廃棄物処理：本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは多様な他の工業的用途、例えば廃棄物処理(バイオマスの燃料への変換の他に)で用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを用いる固形廃棄物の消化方法を提供する。前記方法は、実質的に未処理の固形廃棄物の体積及び容積を減少させることを含み得る。固形廃棄物は、制御温度で酵素溶液(本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む)の存在下で酵素消化過程を用いて処理することができる。前記は、添加微生物による相当な細菌発酵無しに反応を生じる。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。

本発明の廃棄物の処理方法は、他の酵素の任意の組合せの使用を含むことができる。前記酵素は、例えばカタラーゼ、他のグルカナーゼ、セルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、アミログリコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、リポオキシゲナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、デカルボキシラーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、フィターゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、他のマンナナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクテートリアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび/またはトランスグルタミナーゼである。

#### 【0220】

口腔手入れ製品：本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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。

本発明の口腔用製品は、他の酵素の任意の組合せ、例えばプロテアーゼ、ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、アミログリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、アミログルコシダーゼおよびグルコシダーゼを含むことができる。

#### 【0221】

醸造および発酵：本発明は、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含むビールの醸造（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。本発明の酵素は発酵処理の任意の時点で用いられる。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、発酵工業でベータグルカンの分解に用いることができる。ある特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは飲料の清澄化のために発酵工業で用いられる。

10

ある特徴では、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナ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。

これは三段階過程であり得る。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。ある特徴では、本発明の酵素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。

ある特徴では、本発明の酵素は糖化および転換工程で用いられる。醸造発酵工業では、糖化および転換工程は、水溶性グルカンおよびキシランの適切な分解を促進するには低すぎる温度で実施される。前記のポリマーは粘着性の基質を形成し、前記はかゆ状麦汁の粘性を増加させ、マッシュのランオフにより長時間を要し、非効率的なろ過のために最終的なビール製品に残留混濁および沈殿物を生じ、さらに抽出収量を低下させる。これらの理由のために、醸造過程で酵素を添加し $\beta$ -1,4-および $\beta$ -1,3-結合グルカンを分解する。

20

#### 【0222】

ある特徴では、本発明の酵素はモルトハウスの操作で用いられ、例えばグルカナーゼは処理水に添加され発芽時間を短縮及び／又は低品質オオムギの許容可能なモルトへの変換を促進する。ある特徴では、本発明の酵素はマッシングに用いられ、例えばそれらは麦汁のろ過性の増加及び／又はロータリング（lautering）の改善のために添加される。ある特徴では、本発明の酵素は発酵槽及び／又は沈積タンクで用いられ、例えば混濁の清澄化及び／又はろ過の改善が促進される。ある特徴では、本発明の酵素は付属的醸造で用いられ、例えば本発明のグルカナーゼは、オオムギ、コムギ及び／又は他の穀類由来のグルカン（モルトのグリカンを含む）の分解のために添加される。ある特徴では、本発明の酵素はモルトの醸造で用いられ、例えば本発明のグルカナーゼはグルカンの含有量の高い低品質モルトの改変のために添加される。

30

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、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、任意のビールまたはアルコール飲料の製造方法で用いることができる。

本発明の醸造方法は他の酵素の任意の組合せの使用を含むことができる。前記他の酵素は、例えば他のキシラナーゼ、エステラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、ペクテートリアーゼ、アミラーゼ、デカルボキシラーゼ、ラッカーゼ、グルカナーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、アミログリコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グルコアミラーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、ヘミセルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、ホスホリパーゼ、リポオキシゲナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルナーゼ、アラビナーゼ、他のマンナナーゼ、キシログルカナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトンアセチルエステラーゼ、ポリガラクトンナーゼ、ラムノガラクトンナーゼ、ガラクタナーゼ、トランスグルタミナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／または

40

50

トランスグルタミナーゼである。

### 【0223】

医療および研究への利用：本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを、それらの細菌溶解特性および抗真菌特性により抗菌剤として用いることができる。例えばPCT出願W00049890号およびW09903497号に記載されているように、本発明のグルカナーゼを用いて、サルモネラを排除または動物をそれらから防御することができる。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、カルボヒドラーゼの使用法および前記の組成物で用いることができ、及び／又はグルカナーゼをコクシジウム症の治療及び／又は予防のための薬剤の製造に用いることができる。製造された薬剤は穀類系動物飼料の形態であることができる（例えば米国特許5,624,678号を参照されたい）。

10

### 【0224】

掘削への利用：本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを植物由来物質の粘性の改変に用いることができる。ある特徴では、本発明の酵素は、例えば破碎流体および掘削泥でグアーゴムおよび改変グアーゴムが使用される石油工業で用いられる。本発明の酵素は油井の浄化、例えば破碎後の破碎流体の高い粘性またはゲル構造の破壊に用いることができる。ある特徴では、これらの用途で用いられる本発明の酵素は高い熱安定性を有する。ある特徴では、これらの用途で用いられる本発明の酵素は、地中のまたは掘削過程で生じる上昇温度に対し耐性を有する。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは掘削泥（例えば使用された泥）の処理に用いることができる。

20

### 【0225】

他の工業的利用：本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは多様な食品、動物飼料および飲料で利用することができる。新規なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、現存のライブラリーおよび、多様な中温性および適度に好熱性の場所だけでなく標的と定めた供給源（消化管菌叢、動物の排泄物中の細菌、土壤細菌および高度にアルカリ性の生育環境を含む）から構築されるDNAライブラリーのスクリーニングによって発見される。グルカン含有基質及び／又は動物飼料材料の非可溶性多糖類分画を用いるバイオトラップおよび直接濃縮方法もまた有用である。

例えばPCT出願W00043496号およびW08100857号に記載されているように、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼをバイオマスの燃料への転換およびエタノール生成に用いることができる。

30

本発明のグルカナーゼを用いて、燃料エタノールに転換することができる発酵性の糖およびグルカン含有バイオマスを生成することができる。

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを、セルロースの消化に必要なセロビオヒドラーゼおよびベータ-グルコシダーゼのような他の酵素と組み合わせて用いることができる。

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは多数の他の用途で用いることができる。例えば、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、乳牛の牛乳タンパク質の生成量および質の改善（例えば以下を参照されたい：L. Kung et al., J. Dairy Science, 2000 Jan. 83:115-122）、ブタの胃および小腸における可溶性糖類の量の増加（例えば以下を参照されたい：J. van der Meulen et al., Arch. Tierenahr, 2001 54:101-115）、めんどりの晩期の卵の生産効率および卵の収量の改善（例えば以下を参照されたい：D. Jaroni et al., Poult. Sci. 1999, June 78:841-847）に用いることができる。さらにまた、本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは、小麦粉、生地およびパンの改善剤として（例えば米国特許5,108,765号および5,306,633号を参照されたい）、上記に示したように飼料添加剤及び／又はサプリメントとして（例えば米国特許5,432,074号；5,429,828号；5,612,055号；5,720,971号；5,981,233号；5,948,667号；6,099,844号；6,132,727号および6,132,716号を参照されたい）、セルロース溶液の製造に（例えば米国特許5,760,211号を参照されたい）用いることができる。本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼを含む洗剤組成物は、果実、野菜及び／又は泥および粘土化合物に対して用いることができる（例えば米国特許5,786,316号を

40

50

参照されたい)。

#### 【0226】

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼのまた別の使用には、水溶性ダイエット繊維の製造における使用（例えば米国特許5,622,738号を参照されたい）、デンプンのろ過性、分離および製造の改善における使用（例えば米国特許4,960,705号および5,023,176号を参照されたい）、飲料工業で麦汁またはビールのろ過性の改善における使用（例えば米国特許4,746,517号を参照されたい）、家畜のミルク分泌の改善用酵素組成物、および前記ミルクの品質の改善における使用（例えば米国特許4,144,354号を参照されたい）、植物材料の粘性の減少における使用（例えば米国特許5,874,274号を参照されたい）、食品、例えばジャム、マーマレード、ジェリー、ペースト、スープ、チリソースなどの粘性またはゲルの強度の増加における使用（例えば米国特許6,036,981号を参照されたい）が含まれる。グルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼはまた、ヘミセルロースの加水分解で使用する（前記はヘミセルロースに対して選択的で、特にセルロースの存在下で選択的である）。さらにまた、セルラーゼに富むレテンテート (retentate) はセルロースの加水分解に適している（例えば米国特許4,725,544号を参照されたい）。

10

本発明のグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの種々の使用には、エタノール生産菌の形質転換（例えばPCT出願W099/46362号を参照されたい）、ぶどうのタンニンの産生および酵素組成物（例えばPCT出願W0164830号を参照されたい）、植物の天然の防御（例えばPCT出願W00130161号を参照されたい）、ヘミセルロース基質から糖の製造（例えばPCT出願W09203541号を参照されたい）、果実、野菜、泥または粘土含有土壌の洗浄（例えばPCT出願W09613568号を参照されたい）、ビールろ過膜の洗浄（例えばPCT出願W09623579号を参照されたい）、殺菌または微生物細胞の阻害方法（例えばPCT出願W09732480号を参照されたい）、および2つのUV吸収測定値の比およびスペクトルの比較を用いることによる木材パルプの漂白に由来する処理水の性状決定（例えばPCT出願W09840721号を参照されたい）が含まれる。

20

#### 【0227】

本発明のいずれの生成物または方法も、他の酵素の任意の組合せを含むことができる。

前記他の酵素は、例えばカタラーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、アミログリコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、ホスホリパーゼ、リポオキシゲナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、デカルボキシラーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルナーゼ、フィターゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクテートリアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼである。

30

新規なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼの発見で2つのスクリーニング様式（活性を基準にするものおよび配列を基準にするもの）が用いられる。活性を基準にするアプローチは、例えばAZO-オオムギベータグルカン (Megazyme) のような基質を用いる寒天プレートでのグルカナーゼ活性の直接的スクリーニングである。また別には配列を基準にするアプローチを用いることができる。前記は、ハイブリダイゼーションおよびバイオパンニングのためのプローブの設計にバイオインフォマティクスおよび分子生物学を必要とする。例えば、米国特許6,054,267号、6,030,779号、6,368,798号、6,344,328号を参照されたい。スクリーニングから得られたヒットを精製し、配列を決定し、性状を調べ（例えば特異性、至適温度およびpHの決定）、バイオインフォマティクスを用いて分析し、サブクローニングし、基本的な生化学的性状決定のために発現させる。これらの方法を、無数の用途（生地のコンディショニングおよび動物飼料添加物酵素としての用途を含む

40

50

）に有用なグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼのスクリーニングに用いることができる。

#### 【0228】

スクリーニングから得られた酵素の性状決定において、生地処理および焼成での利用における例示の有用性を評価することができる。性状決定には、例えば基質特異性（グルカン、CMC、BBG）の測定、温度およびpH安定性並びに比活性が含まれ得る。市販の酵素をベンチマークとして用いることができる。ある特徴では、本発明の酵素はpH=7および25-35℃で顕著な活性を有し、不溶性グルカンに対して活性を示さず、さらに50-67%のシェクロース中で安定であり活性を有する。

別の特徴では、飼料添加物としての有用性が候補酵素の性状から評価することができる。性状決定には、例えば基質特異性（グルカン、CMC、BBG）の測定、温度およびpH安定性、比活性並びに胃での安定性が含まれ得る。ある特徴では飼料は単胃動物用に設計され、また別の特徴では飼料は反芻動物用に設計される。ある特徴では、本発明の酵素はpH2-4および35-40℃で顕著な活性を有し、胃液中の半減期は30分を越え、製剤の半減期（緩衝液または細胞中）は85℃で5分を超え、単胃動物の飼料添加物として用いられる。別の特徴では、本発明の酵素は以下の性状の1つまたは2つ以上を有する：pH6.5-7.0および35-40℃で有意な活性、反芻胃の第一胃の胃液中での30分を越える半減期、乾燥粉末と同じ製剤安定性を有し、反芻動物の飼料添加物として用いられる。

酵素は、広範囲の天然および非天然基質に対して活性を有し、したがって実質的に任意の有機リード化合物の改変を可能にする。さらにまた、伝統的な化学的触媒とは異なり、酵素は高度に鏡像選択性および領域選択性である。酵素が示す高度な官能基特異性は、新規な活性化化合物に行き着く合成の流れの中の各反応の軌道を保つことを可能にする。酵素はまた、天然におけるそれらの生理学的機能とは無関係の多くの多様な反応を触媒することができる。例えば、ペルオキシダーゼは、過酸化水素によるフェノールの酸化を触媒する。ペルオキシダーゼはまた、前記酵素の天然の機能とは関係がないヒドロキシル化を触媒することができる。他の例はグルカナーゼであり、前記はポリペプチドの分解を触媒する。いくつかのグルカナーゼはまた有機溶媒中で糖をアシル化することができ、この機能はこれらの酵素の天然の機能とは無関係である。

#### 【0229】

本発明は酵素の固有の触媒特性を利用する。一方、化学的変換における生物触媒（すなわち精製若しくは粗酵素、非生細胞または生細胞）の使用は、通常は特異的な出発化合物と反応する具体的な生物触媒の同定を要求するが、本発明は、多くの出発化合物に存在する官能基に特異的な選択された生物触媒および反応条件を使用する。各生物触媒は1つの官能基またはいくつかの関連する官能基に特異的であり、この官能基を含む多くの出発化合物と反応することができる。生物触媒反応はただ1つの出発化合物から誘導体集団を生じる。これらの誘導体はさらにもう1回の生物触媒反応に付して第二の誘導化合物集団を生成することができる。生物触媒反応による誘導体形成を繰り返す度に、最初の化合物から数千の変化形を生成することができる。

酵素は出発化合物の特異的な部位で反応し分子の残余部分には影響を与えない。前記過程は、伝統的な化学的方法を用いて達成することは非常に困難である。この高度な生物触媒反応特異性はライブラリー内のただ1つの活性化化合物を同定する手段を提供する。ライブラリーは前記ただ1つの活性化化合物を生成するために用いられる生物触媒反応シリーズ、いわゆる“生合成歴”によって特徴付けられる。生物学的活性についてのライブラリーのスクリーニングおよび生合成歴の追跡によって前記活性化化合物を生成する特異的な一連の反応が同定される。前記一連の反応を繰り返し、合成された化合物の構造を決定する。他の合成およびスクリーニングアプローチと異なり、前記の同定の態様は固定化技術を必要とせず、化合物は実質的には任意のタイプのスクリーニングアッセイを用いて溶液中で遊離の状態で試験することができる。官能基に対する酵素反応の高度な特異性は、生物触媒反応により作製されるライブラリーを構成する特異的な酵素反応の“追跡”を可能にすることを特記することは重要なことである。

多くの作業工程が機械による自動化を用いて実施され、1日当たり何千もの生物触媒反応およびスクリーニングアッセイの実施を可能にするとともに、高レベルの正確さおよび再現性が担保される。結果として、従来の化学的方法を用いたら作製に数年を要する誘導化合物ライブラリーを数週間の事柄として作製することができる（分子（小分子を含む）の改変に関する更なる教示については、PCT/US94/09174を参照されたい）。

### 【0230】

以下に本発明の具体的な実施態様を列举する。

（1）以下のいずれかの単離、合成または組換え核酸：

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、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号

50

12、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518記載の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む、単離、合成または組換え核酸。

(2) (1) 記載の核酸を含む発現カセットまたはベクター。

(3) (a) (1) 記載の核酸を含むクローニングベヒクルであって、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、前記クローニングベヒクル；

(b) 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またはアデノ随伴ウイルスベクターを含む、(a) に記載のクローニングベヒクル；または、

(c) 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、(a) のクローニングベヒクル。

10

(4) (a) (1) 記載の核酸を含む核酸を含む形質転換細胞；

(b) (2) 記載の発現カセットまたはベクターを含む形質転換細胞；または、

(c) 細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または植物細胞である、(a) または (b) の形質転換細胞。

(5) 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、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列

20

30

40

50

番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516又は配列番号:518と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより大きい領域にわたるか、または完全な（100%の）配列同一性を有する配列を有する、単離、合成、または組換えポリペプチドであって、グルカナーゼ活性を有する、または、（1）記載の核酸によってコードされるアミノ酸配列を有する、前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドの酵素的に活性な断片。

10

（6）（5）記載のポリペプチドを含むタンパク質調製物であって、液体、固体又はゲルを含む、前記タンパク質調製物。

（7）（a）（5）記載のポリペプチドの配列を含む、固定化ポリペプチド；または、

（b）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、（17）記載のポリペプチドの配列を含む、固定化ポリペプチド。

20

（8）（5）記載のポリペプチドの配列を含む、固定化ポリペプチドを含むアレイ。

（9）（A）以下の工程を含む、グルカナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、

（1）記載の核酸の変種を作製する方法：

（A）（a）（1）記載の核酸を提供する工程；および、

（b）前記鋳型の配列内の1つまたは2つ以上のヌクレオチドの改変、欠失若しくは付加、また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；

（B）さらに変種核酸を発現させて変種グルカナーゼポリペプチドを生成することを含む、（A）の方法；

（C）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）、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によって導入される、（A）または（B）の方法；

30

（D）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カナーゼが得られるまで反復される、（A）、（B）または（C）の方法；

40

（E）変種グルカナーゼポリペプチドが耐熱性であり、上昇温度に暴露された後ある程度の活性を維持する、（A）、（B）、（C）または（D）の方法；

（F）変種グルカナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼと比較してグリコシル化が増加している、（A）、（B）、（C）または（D）の方法；

（G）変種グルカナーゼポリペプチドは高温下でグルカナ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カナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼは高温下で活性をもたない、（A）、（B）、（C）または（D）の方法；

（H）鋳型核酸のコドン使用頻度とは変異したコドン使用頻度を示すグルカナーゼコー

50

ド配列が得られるまで反復される、(A)、(B)、(C)または(D)の方法；または、

(I) 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カナーゼ遺伝子が得られるまで反復される、(A)、(B)、(C)または(D)の方法。

(10) (A) 以下の工程を含む、グルカン含有組成物を加水分解、分解又は破壊する方法：

(a) (5) 記載のポリペプチドを提供する工程；

(b) グルカンを含む組成物を提供する工程；および、

(c) 前記グルカナーゼが前記グルカン含有組成物を加水分解、分解または破壊する条件下で工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程；または、

(B) 組成物が、植物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または動物細胞を含む、(A)の方法。

(11) (5) 記載のポリペプチドを含む生地またはパン製品。

(12) 生地のコンディショニングに十分な条件下で生地またはパン製品を(5)記載の少なくとも1つのポリペプチドと接触させることを含む、生地をコンディショニングする方法。

(13) (5) 記載のポリペプチドを含む飲料。

(14) (A) (5) 記載の少なくとも1つのポリペプチドを飲料または飲料前駆物質に、前記飲料の粘性を低下させるために十分な条件下で添加することを含む、飲料の製造方法；または、

(B) 飲料または飲料前駆物質が麦汁またはビールである、(A)の方法。

(15) (5) 記載のポリペプチドを含む食品、飼料または栄養性サプリメント。

(16) (A) 以下の工程を含む、動物の食物中で栄養性サプリメントとしてグルカナーゼを利用する方法：

(5) 記載のポリペプチドを含む栄養性サプリメントを調製する工程；および、

前記栄養性サプリメントを動物に与え、前記動物が摂取する飼料または食品中に含まれるキシランの利用を増進させる工程；

(B) 動物が人間である、(A)の方法；

(C) 動物が反芻動物または単胃動物である、(A)の方法；

(D) グルカナーゼが、細菌、酵母、昆虫、真菌および動物からなる群から選択される生物においてグルカナーゼをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって調製される、(A)、(B)または(C)の方法；または、

(E) 生物が、*S. ポンベ* (*pombe*)、*S. セレビシア* *E.ピキア・パストリス*、大腸菌、ストレプトミセス種、バチルス種及びラクトバチルス種からなる群から選択される、(A)、(B)、(C)または(D)に記載の方法。

(17) (a) 熱安定性組換えグルカナーゼ酵素を含む食用酵素デリバリーマトリックス、または、

(b) (5) 記載のポリペプチドを含む、(A)に記載の食用酵素デリバリーマトリックス。

(18) (5) 記載のポリペプチドを含む、セルロース組成物またはセルロース誘導体組成物。

(19) (5) 記載のポリペプチドを含む、木材、木材パルプまたは木材製品。

(20) (5) 記載のポリペプチドを含む、紙、紙パルプまたは紙製品。

(21) 紙、木材または木材製品を(5)記載のポリペプチドと接触させることを含む、紙、木材または木材製品においてリグニンを減少させる方法。

(22) (5) 記載のポリペプチドを含む洗剤組成物。

(23) (5) 記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

(24) (a) (5) 記載のポリペプチドを投与することを含む、グルカンを含む微生物を排除するか、または前記微生物から動物を防御する方法；

(b) 微生物が細菌である、(a)の方法；または、

10

20

30

40

50

(c) 細菌がサルモネラである、(b)の方法。

(25) (5) 記載のポリペプチドを含む燃料。

(26) セルロース、ヘミセルロースおよび／またはリグニンを(5) 記載のポリペプチドと接触させることを含む、燃料の製造方法。

(27) (a) (5) 記載のポリペプチドを含む乳製品；または

(b) ミルク、アイスクリーム、チーズまたはヨーグルトを含む、(a) の乳製品。

(28) 以下の工程を含む、乳製品の触感および風味を改善する方法：

(a) (5) 記載の本発明のポリペプチドを提供する工程；

(b) 乳製品を提供する工程；および、

(c) グルカナーゼが前記乳製品の触感または風味を改善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) の乳製品と接触させる工程。

10

#### 【0231】

本発明は以下の実施例を参照しながらさらに記述されるが、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。

#### 【実施例1】

#### 【0232】

##### 実施例1：プレートによるエンドグリコシダーゼ酵素の発見：発現スクリーニング

以下の実施例は、本発明の例示的酵素および核酸の酵素活性の単離および確認を示す。これらのアッセイはまた、ポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるための必須の酵素（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）活性を有するか否かを決定するために用いることができる。

20

ラムダライブラリーの力価測定：1.0  $\mu$ Lのラムダザップエクスプレス（Lamda Zap Express）増幅ライブラリーストックを600  $\mu$ Lの大腸菌MRF'細胞（ $OD_{600}=1.0$ ）に添加する。MRF'ストックは10mMの $MgSO_4$ で希釈する。混合物を37°Cで15分インキュベートし、続いて懸濁液を5–6mLの50°CのNZYトップアガーに移し、穏やかに混合する。寒天溶液を直ちに大きな（150mm）NZY培地プレートに流し入れ、トップアガーを完全に固まらせる（約30分）。前記プレートを逆さにする。プレートを39°Cで8–12時間インキュベートする。（プラークの数を概算する。ファージ力価は50,000pfu/プレートとなるように定める。必要ならば、ライブラリーファージの少量をSM緩衝液で希釈する。）

基質のスクリーニング：増幅ライブラリーからのラムダザップエクスプレス（50,000pfu）を600  $\mu$ Lの大腸菌MRF'細胞（ $OD_{600}=1.0$ ）に添加し、37°Cで15分インキュベートする。ファージ／細胞懸濁液をインキュベートしている間に、1.0mLの所望の多糖類の染料標識基質（通常は1–2%w/v）をNZYトップアガー（50°C）に添加し完全に混合する。（溶液は必要になるまで50°Cで維持する。）細胞懸濁液を基質／トップアガー溶液に移し穏やかに混合する。溶液を直ちに大きな（150mm）NZY培地プレートに流し入れる。トップアガーを完全に固まらせ（約30分）、プレートを逆さにする。プレートを39°Cで8–12時間インキュベートする。プラーク周囲の透明ゾーン（ハロー）についてプレートを観察する。ハローを有するプラークを寒天からくり抜き、滅菌マイクロチューブに移す（所望のプラークを含む寒天プラグを取り出す（くり抜く）ために穴の内径が大きな200  $\mu$ Lのピペットの先端を使用することができる）。ファージを500  $\mu$ LのSM緩衝液に再懸濁させる。更なる細胞の増殖を一切抑制するために20  $\mu$ Lのクロロホルムを添加する。

30

40

#### 【0233】

純粋なクローンの単離：5  $\mu$ Lの再懸濁ファージ液を500  $\mu$ Lの大腸菌MRF'細胞（ $OD_{600}=1.0$ ）に添加する。37°Cで15分インキュベートする。ファージ／細胞懸濁液をインキュベートしている間に、600  $\mu$ Lの所望の多糖類の色素標識基質（通常は1–2%w/v）を3.0mLのNZYトップアガー（50°C）に添加し完全に混合する。（溶液は必要になるまで50°Cで維持する。）細胞懸濁液を基質／トップアガー溶液に移し穏やかに混合する。溶液を直ちに小さな（90mm）NZY培地プレートに流し入れ、トップアガーを完全に固まらせ（約30分）、続いてプレートを逆さにする。プレートを39°Cで8–12時間インキュベートする。単一のプラーク（純粋なクローン）周囲の透明ゾーン（ハロー）についてプレートを観察す

50

る（単一のプラークを単離できない場合は、力価を調整してファージ懸濁液を再度プレート培養する。）。ファージを500  $\mu$ LのSM緩衝液に再懸濁させ、更なる細胞の増殖を一切抑制するために20  $\mu$ Lのクロロホルムを添加する。

#### 【0234】

純粋なクロンの切り出し：純粋なファージ懸濁液を室温で2から3時間または4℃で一晩インキュベートする。100  $\mu$ Lの純粋なファージ懸濁液を200  $\mu$ Lの大腸菌MRF'細胞（ $OD_{600}=1.0$ ）に添加する。1.0  $\mu$ Lのエクサシスト（ExAssist）ヘルパーファージ（ $>1 \times 10^6$  pfu/mL；Stratagene）を添加する。懸濁液を37℃で15分インキュベートする。3.0mLの2xYT培地を細胞懸濁液に添加する。振盪しながら、37℃で2–2.5時間インキュベートする。試験管を70℃に20分移す。50–100  $\mu$ Lのファージミド懸濁液を200  $\mu$ Lの大腸菌Exp505細胞（ $OD_{600}=1.0$ ）を含むマイクロチューブに移す。懸濁液を37℃で45分インキュベートする。100  $\mu$ Lの細胞懸濁液をLB<sub>kan50</sub>培地（カナマイシン50  $\mu$ g/mLを含むLB培地）でプレート培養する。プレートを37℃で8–12時間インキュベートする。プレートをコロニーについて観察する。増殖するいずれのコロニーも純粋なファージミドを含む。コロニーを釣り上げ、少量（3–10mL）の液体培養を8–12時間増殖させる。培養液は液体のLB<sub>kan50</sub>培地である。

10

#### 【0235】

活性の確認：1.0mLの液体培養を滅菌マイクロチューブに移す。13200rpm（16000g）で1分遠心沈殿させる。上清を廃棄し、200  $\mu$ Lのリン酸緩衝液（pH6.2）を添加する。マイクロチップを用い氷上で5から10分超音波処理する。200  $\mu$ Lの適切な基質を添加し、穏やかに混合し、37℃で1.5–2時間インキュベートする。緩衝液のみおよび基質のみを含む陰性コントロールも調べるべきである。1.0mLの無水エタノール（200プルーフ）を懸濁液に添加し混合する。13200rpmで10分遠心沈殿させる。上清の色を観察する。着色は変動し得るが、コントロールよりも強い着色を示すいずれの試験管も活性について陽性であると考えられる。所望ならばまたは必要ならば、この工程で分光光度計を用いることができる（アゾ-オオムギベータグルカン（Megazyme）の場合590nmで読み取る）。

20

同じライブラリーに由来する純粋クロンのRFLP：1.0mLの液体培養を滅菌マイクロチューブに移す。13200rpm（16000g）で1分遠心沈殿させる。QIAプレップスピ（QIAprep spi）ミニキット（Qiagen）のプラスミド単離のプロトコルにしたがい、溶出緩衝液として40  $\mu$ Lの純水を使用する。10  $\mu$ LのプラスミドDNAを滅菌マイクロチューブに移す。1.5  $\mu$ Lの緩衝液（New England Biolabs）、1.5  $\mu$ Lの100xのBSA溶液（New England Labs）および2.0  $\mu$ Lの純水を添加する。前記に1.0  $\mu$ LのNotIおよび1.0  $\mu$ LのPstI制限エンドヌクレアーゼ（New England Biolabs）を添加する。1.5時間37℃でインキュベートする。3.0  $\mu$ Lの6xのローディング緩衝液（Invitrogen）を添加する。15  $\mu$ Lの消化サンプルを1.0%のアガロースゲルで1–1.5時間120ボルトで泳動させる。ゲルイメージャーでゲルを観察する。異なる消化パターンを有する全てのクロンについて配列分析を実施する。

30

図5は、本発明の酵素の性状決定を含む表であり、前記は、本発明のいくつかの例示的な酵素の種々の条件下（例えば上記で述べたように種々のpHおよび温度）での相対活性の要旨を含んでいる。

#### 【実施例2】

40

#### 【0236】

##### 実施例2：活性のアッセイ

以下の実施例は本発明の例示的な酵素の酵素活性を示す。これらのアッセイはまた、ポリペプチドが、本発明の範囲内に包含されるための必須の酵素（例えばグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ）活性を有するか否かを決定するために用いることができる。

下記に列挙した配列番号に示される配列を有する本発明のポリペプチドは、下記で説明するようにグルカナーゼ活性を有することが示された。比活性は、BCA還元糖アッセイを用いオオムギの $\beta$ -グルカン（BBG）またはカルボキシメチルセルロース（CMC）により測定した。1ユニット（U）のグルカナーゼ活性=37℃、pH5.3で遊離される1  $\mu$ mol/min<sup>-1</sup>の

50

グルコース還元等価物。

【0237】

| グルカナーゼ                      | Mw<br>(kDa) | pI  | GHファミリー | 比活性 (U/mg)  |                    |                    | T <sub>opt</sub><br>(°C) | pH <sub>opt</sub> |
|-----------------------------|-------------|-----|---------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
|                             |             |     |         | 未改変,<br>BBG | 6Hタグ<br>付き,<br>BBG | 6Hタグ<br>付き,<br>CMC |                          |                   |
| 配列番号6 (配列番号5によってコードされる)     | 37.5        | 5.9 | 5       | 22          | ND                 | ND                 | ≈90                      | 5-7               |
| 配列番号400 (配列番号399によってコードされる) | 37.9        | 5.5 | 5       | 0.85        | ND                 | ND                 | ≈90                      | 5-7               |
| 配列番号162 (配列番号161によってコードされる) | 34.0        | 5.2 | 5       | 0.95        | ND                 | ND                 | ≈85                      | ND                |
| 配列番号84 (配列番号83によってコードされる)   | 36.9        | 6.3 | 5       | >40         | ND                 | ND                 | 80                       | 4-6               |
| 配列番号172 (配列番号171によってコードされる) | 29.8        | 5.0 | 16      | 32          | ND                 | ND                 | 50                       | 5-6               |
| 配列番号104 (配列番号103によってコードされる) | 39.7        | 5.9 | 5       | ND          | 3.2                | 2.8                | 85                       | 5-6               |
| 配列番号10 (配列番号9によってコードされる)    | 77.7        | 4.9 | 5       | ND          | ND                 | 0.5                | 85                       | 5-6               |
| 配列番号222 (配列番号221によってコードされる) | 53.8        | 9.1 | 5       | >40         | 16                 | 24                 | 85                       | 5-6               |
| 配列番号108 (配列番号107によってコードされる) | 78.9        | 4.3 | 5       | ND          | 3.8                | 4.0                | 75                       | ND                |
| 配列番号176 (配列番号175によってコードされる) | 37.2        | 6.0 | 5       | ND          | 3.5                | 21                 | 75                       | 5-6               |

10

20

30

40

|                             |      |     |   |    |     |     |    |    |    |
|-----------------------------|------|-----|---|----|-----|-----|----|----|----|
| 配列番号110 (配列番号109によってコードされる) | 39.9 | 6.2 | 5 | ND | 13  | 12  | ND | ND | 10 |
| 配列番号268 (配列番号267によってコードされる) | 51.8 | 4.6 | 5 | ND | 3.6 | 2.8 | 50 | ND |    |
| 配列番号324 (配列番号323によってコードされる) | 49.3 | 6.1 | 5 | ND | ND  | ND  | ND | ND |    |
| 配列番号370 (配列番号369によってコードされる) | 42.1 | 5.8 | 5 | ND | ND  | ND  | ND | ND |    |
| 配列番号168 (配列番号167によってコードされる) | 37.3 | 5.7 | 5 | ND | ND  | ND  | ND | ND | 20 |
| 配列番号154 (配列番号153によってコードされる) | 35.6 | 5.4 | 5 | ND | ND  | ND  | ND | ND |    |
| 配列番号118 (配列番号117によってコードされる) | 34.5 | 6.1 | 5 | ND | ND  | ND  | ND | ND | 30 |
| 配列番号148 (配列番号147によってコードされる) | 74.1 | 5.3 | 5 | ND | ND  | ND  | ND | ND |    |

ND = 未決定

下記の配列番号に示される配列を有する本発明の例示的ポリペプチドは、下記に示す至適pH および温度でアルカリ性エンドグルカナーゼ／セルラーゼ活性を有することが示された。この活性は、下記の実施例3で詳細に記載するセルラーゼ活性アッセイ（BCA還元末端アッセイ）を用いて決定された。

【0238】

| 配列番号     | 型                   | 至適pH     | 至適温度 |    |
|----------|---------------------|----------|------|----|
| 409, 410 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 5        | NA   |    |
| 343, 344 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 6        | 60   |    |
| 319, 320 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 6        | 70   |    |
| 383, 384 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 7        | 60   |    |
| 301, 302 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 7        | 60   |    |
| 257, 258 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 8        | 42   |    |
| 419, 420 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 8        | 70   |    |
| 421, 422 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 9        | 60   |    |
| 405, 406 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 9        | 50   | 10 |
| 329, 330 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | 9        | 50   |    |
| 325, 326 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (5-7)*   | 70   |    |
| 415, 416 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-10)*  | 70   |    |
| 303, 304 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-10)*  | 60   |    |
| 271, 272 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-7)*   | 60   |    |
| 175, 176 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-7)*   | 70   |    |
| 9, 10    | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-7)*   | 70   |    |
| 297, 298 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-8)*   | 50   |    |
| 109, 110 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-8)*   | 60   |    |
| 267, 268 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-8)*   | 70   | 20 |
| 107, 108 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (6-8)*   | 70   |    |
| 305, 306 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (7-10)*  | 60   |    |
| 417, 418 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (7-8.5)* | NA   |    |
| 227, 228 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (7-9)*   | 60   |    |
| 375, 376 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (7-9)*   | 70   |    |
| 335, 336 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (7-9)*   | 50   |    |
| 155, 156 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (7-9)*   | 60   |    |
| 445, 446 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (7-9)*   | 60   |    |
| 259, 260 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (8-10)*  | 50   |    |
| 423, 424 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (8-10)*  | 50   | 30 |
| 345, 346 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (8-9)*   | 25   |    |
| 285, 286 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (8-9)*   | 50   |    |
| 351, 352 | アルカリエンドグルカナーゼ／セルラーゼ | (9-10)*  | 80   |    |

## 【実施例 3】

## 【0239】

## 実施例 3：セルラーゼ活性アッセイ：BCA還元末端アッセイ

以下の実施例はあるアッセイ、セルラーゼ活性アッセイ（BCA還元末端アッセイ）について述べる。本アッセイは、ポリペプチドが、本発明の範囲内に包含されるための必要条件である酵素（例えばグルカナーゼ、マンナナーゼまたはキシラナーゼ）活性、例えばアルカリ性エンドグルカナーゼ／セルラーゼ活性（上記の実施例2を参照されたい）を有するかどうかを決定するために用いることができる。

本アッセイは、96ウェルのマルチサンプル高処理様式でカルボキシメチルセルロース（CMC）を酵素分解した時に生成される還元末端の量を測定するために設計された。

材料：

基質溶液：

1%CMC：

1グラムのCMCを100mLの50mMブリットン-ロビンソン（Britton-Robinson）緩衝液（pH約4）に溶解し、攪拌しながら沸騰水浴中で溶解するまでCMC溶液を20-40分加熱する（溶液はなおわずかにミルク状の外観を有するが、透明である）。1NのNaOHまたはHClで所望のp

10

20

30

40

50

Hに調整する。

溶液A：

64mg/mLの炭酸ナトリウム一水和物

24mg/mLの重曹

1.95mg/mLのBCA（4,4'-ジカルボキシ-2,2'-ビキノリン二ナトリウム塩（Sigama Chemical cat# D-8284）

上記を蒸留水に添加する。加熱してBCAを溶解する必要があるかもしれないが、約80℃を超えて加熱してはいけない。

溶液B：

1.24mg/mLの硫酸第二銅 5 水和物

1.26mg/mLのL-セリン

上記を蒸留水に添加する。

作業用試薬：

1：1の溶液AおよびB、新しい作業用試薬混合物を毎日作製し（各アッセイに必要な量だけ作製する）、新しい溶液AおよびBを毎週作製する。

グルコースストック溶液：

蒸留水で10mMのグルコースを作製し、ろ過して4℃で保存する。

グルコース標準品：

10mMのグルコースストックを所望のpHの1%CMCで希釈し、最終濃度を0、100、200、300、400、500  $\mu$ Mにする。曲線は10  $\mu$ Lの標準物を作業用試薬に添加することによって決定されるので、0-0.005  $\mu$ moleグルコース/ウェルで十分である。加熱サイクルが観察されるシグナル量に影響を及ぼし得るので、標準曲線はサンプルのタイムポイントの各プレートについて作製する必要がある。

**【0 2 4 0】**

方法：

セットアップ：

基質溶液（1%CMC）の1mLを深いウェルを有するプレート（室温を用いる場合）またはホットブロックに置いたアキュムチューブに添加し、加熱ブロックまたは加熱水浴中で所望の温度に平衡化させる（約5分）。

溶液を平衡化させている間に、10mLの作業用試薬を作製し、100  $\mu$ Lを96ウェルのPCRプレートに添加する。プレートを氷上にセットする。

反応／サンプリング：

温度の平衡化が完了した後、酵素溶液を基質溶液に添加する。直ちにピペットで液を出し入れして混合する。直ちに10  $\mu$ LをPCRプレートに添加する（このときがt=0、ゼロタイムポイント）。所望のタイムポイントの各々で（例えば0、2、5、10、15、20、30分）10  $\mu$ LをPCRプレートに小分けする。

プレートの最後の横列をグルコース標準物の添加のために残しておく（すなわちウェルはその中に100  $\mu$ Lの作業用試薬のみを含むはずである）。

アッセイの発色：

全てのタイムポイントが集められ、標準物が添加されたならば、プレートに蓋をし、PCR装置を用いて10分100℃に加熱する。プレートを0℃に5-10分冷却する（またはPCR装置を10分間1℃にセットする）。

100  $\mu$ Lの水をウェルに添加する。混合する。100  $\mu$ Lの混合物を透明な平底の96ウェルプレートに添加し、560nmでの吸収を読み取る。

標準曲線の作成：

A560に対しグルコース標準物を含むウェルのグルコースの  $\mu$ moleをプロットする。直線回帰を用いて勾配を算出する（ $S_{std}$ ）。

反応勾配グラフの作成：

A560に対してタイムポイントをプロットする。各サンプルのタイムポイントをそれ自体のT=0に対してゼロ点補正する（すなわち、サンプルのT=0の吸収を同じサンプルの他の

10

20

30

40

50

全てのタイムポイントから差し引く)。サンプルのタイムポイントの各セットについて勾配 ( $S_{rxn}$ ) を作成する (A560/時間)。

#### 【0241】

##### 活性の測定：

$S_{rxn}$  を  $S_{std}$  で割り、100を掛ける (検出された生成物の  $\mu\text{mole}$  はアッセイで用いた  $10\mu\text{L}$  中の還元末端量であり、 $1\text{mL}$  の酵素反応で生成された総量ではないからである)。

##### 比活性の測定：

活性 ( $\mu\text{mole}/\text{分}$  の単位で) を  $1\text{mL}$  の反応に加えた総タンパク質 ( $\text{mg}$ ) で割る。ブラッドフォード法または類似のアッセイでタンパク質濃度を決定する。前記タンパク質濃度を使用した任意の希釈で割る。反応に使用した容積 ( $\text{mL}$ ) を掛ける。全てのタイムポイントは2つ組で実施するべきであり、三つ組がより望ましい。以下の表は例示的なデータ (“サンプルデータ”) を示し、前記は図6で“標準曲線”としてグラフで示されている。

#### 【0242】

##### サンプルデータ

|       | 日付    | mg/ml | Diln. | ul/rxn | 0分     | 5分     | 8分     | 12分    | 24分    | 36分    | 45分    |
|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Enz x | 06/09 | 20    | 500   | 20     | 0.1252 | 0.1654 | 0.1889 | 0.2315 | 0.3386 | 0.4036 | 0.4695 |

標準曲線の勾配：88.375 A560/ $\mu\text{mole}$  グルコース

反応勾配：0.0076 A560/分

活性 (反応勾配/標準勾配)：8.70061E-05  $\mu\text{mole}/\text{分}$

真の活性/ $1\text{mL}$  の反応 (=活性 x 100)：0.0087  $\mu\text{mole}/\text{分}$

比活性：10.87  $\mu\text{mole}/\text{分}, \text{mg}$

#### 【実施例4】

#### 【0243】

##### 実施例4：コドンの最適化

以下の実施例は、本発明の例示的酵素をコードする配列の例示的コドン最適化を示す。当業界で知られている任意のコドン最適化プロトコルを用いて、本発明のいずれの核酸についてもコドン最適化を実施できる。

配列番号:6に示される配列を有するポリペプチドをコードする例示的核酸 (すなわち配列番号:5) を、ピキア・パストリス (*Picia pastoris*) での最適な発現のためにコドン最適化に付した (ピキア・パストリスのコドン最適化酵素コード核酸は配列番号:463である)。酵素コード核酸のコドンを最適化するだけでなく、1つのアミノ酸も改変され (A91V)、この新規なポリペプチドは配列番号:464に示されている。

グルカナーゼ活性アッセイ (そのデータは図7および8に示されている) は、配列番号:464 (例えば配列番号:463によってコードされる) のピキア・パストリスでの発現の改善を示した (配列番号:464は、配列番号:6 (例えば配列番号:5によってコードされる) に示される配列を有するポリペプチドのコドン最適化型である)。発現レベルはpHを変化させることによって改善された。

#### 【0244】

図7では、発酵過程でのグルカナーゼ活性は培養  $1\text{mL}$  当たりのユニット (U) で示される。1ユニット (U) のグルカナーゼ活性 =  $37^\circ\text{C}$ 、pH5.3で遊離される  $1\mu\text{mol}/\text{分}^{-1}$  のグルコース還元等価物。ピキア・パストリスで発現させた、コドン最適化グルカナーゼ、配列番号:464 (配列番号:463によってコードされる) を用いた。発酵はpH5.0で実施した。

図8では、発酵過程でのグルカナーゼ活性は培養  $1\text{mL}$  当たりのユニット (U) で示される。1ユニット (U) のグルカナーゼ活性 =  $37^\circ\text{C}$ 、pH5.3で遊離される  $1\mu\text{mol}/\text{分}^{-1}$  のグルコース還元等価物。ピキア・パストリスで発現させた、コドン最適化グルカナーゼ、配列番号:464 (配列番号:463によってコードされる) を用いた。発酵はpH6.2で実施した。

#### 【実施例5】

#### 【0245】

##### 実施例5：酵素活性

以下の実施例は本発明の例示的な酵素の酵素活性の確認を示す。これらのアッセイはま

た、ポリペプチドが、本発明の範囲内に包含されるための必須の酵素（例えばグルカナーゼ、マンナーゼまたはキシラナーゼ）活性を有するか否かを決定するために用いることができる。

配列番号:6によってコードされるグルカナーゼの比活性：配列番号:6（例えば配列番号:5によってコードされる）に示される配列を有する本発明の例示的酵素の比活性は、以下のプロトコルを用いて示された：

配列番号:6によってコードされるグルカナーゼをイオン交換クロマトグラフィーを用いて均一になるまで精製した。比活性は、BCA還元糖アッセイを用いて37℃で50mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.3）中の1%基質により測定した。1ユニット（U）のグルカナーゼ活性＝37℃、pH5.3で遊離される $1\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$ のグルコース還元等価物。

- －オオムギベータグルカン（BBG）：30U/mg
- －エンバクベータグルカン（OBG）：38U/mg
- －カルボキシメチルセルロース（CMC）：40U/mg
- －キャロブ（Carob）ガラクトマンナン：0.3U/mg

#### 【0246】

配列番号:6によってコードされるグルカナーゼの温度プロファイル：温度プロファイルは3つの別個の基質（BBG、OBGおよびCMC）で決定された。配列番号:6によってコードされるグルカナーゼはより高温で最高の活性を有していた。BBGおよびCMC基質での80℃における配列番号:6によってコードされるグルカナーゼの比活性は、37℃で観察される活性よりも10倍高かった。図9に示したように、マンナンの存在下では、配列番号:6によってコードされるグルカナーゼは100℃で最高の活性を示した。

温度プロファイルは基質（CMC、BBGまたはマンナン）の存在下でBD10をインキュベートすることによって決定した。初速は、BCA還元糖アッセイおよび酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.3）を用いて決定した。初速を正規化し、図9に示したように%活性としてプロットした。

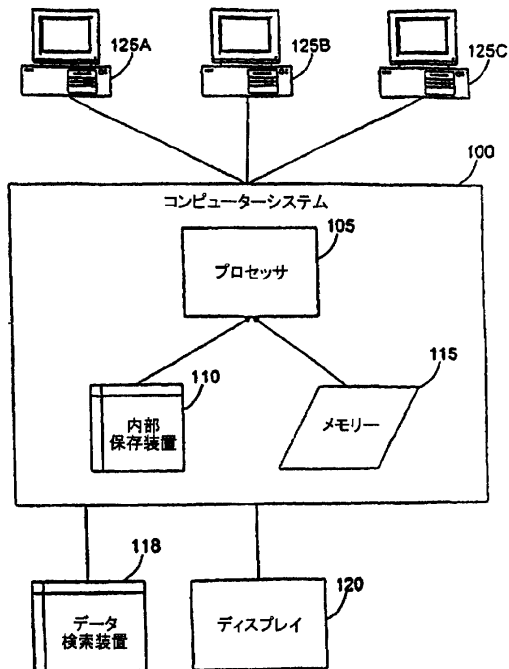
#### 【0247】

配列番号:6によってコードされるグルカナーゼの半減期測定：配列番号:6によってコードされるグルカナーゼの半減期を85℃および90℃で測定した。配列番号:6によってコードされるグルカナーゼを85℃および90℃で種々の時間熱処理し、残留活性を37℃で測定した。配列番号:6によってコードされるグルカナーゼは、85℃で10分インキュベートした後その活性の60%を越える活性を維持した。図10に示したように、90℃では2分後に残された残留活性はなかった。

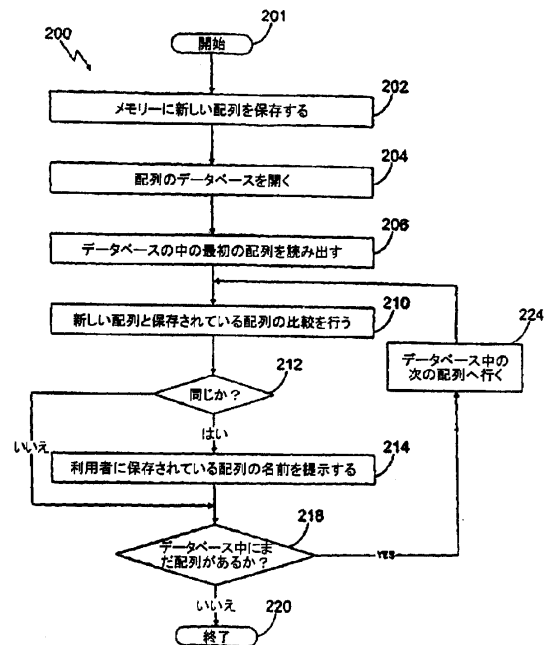
図10に示したように、BD10の半減期は、酵素を表示の温度（85℃および90℃）で30秒、1分、2分、3分、4分、5分および10分熱処理し、標準条件下でBCA還元糖を用いて活性をモニターすることによって測定した。

本発明は、本発明のある種の例示的特徴を参考にして詳細に記載してきたが、開示し請求の範囲に記載した本発明の範囲内で種々の改変および変更が存在することは理解されよう。以下の図面は本発明の特徴の例示であって、請求の範囲に包含される本発明を制限しようとするものではない。

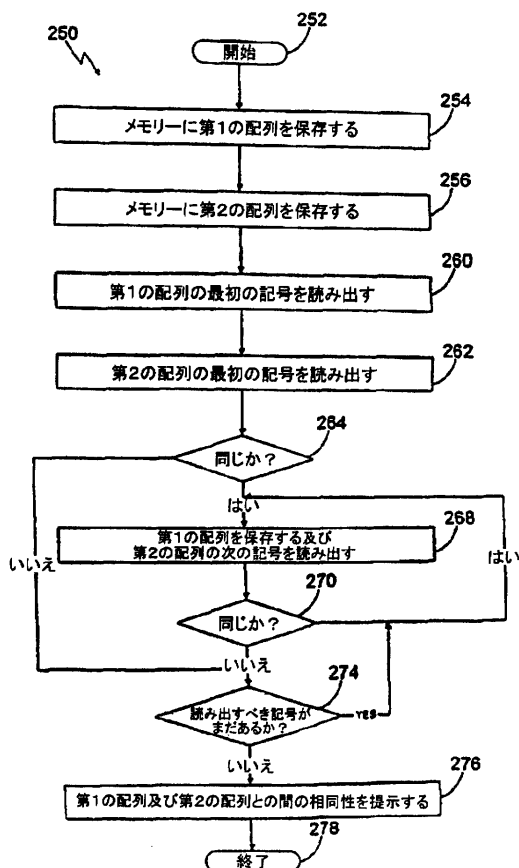
【図 1】



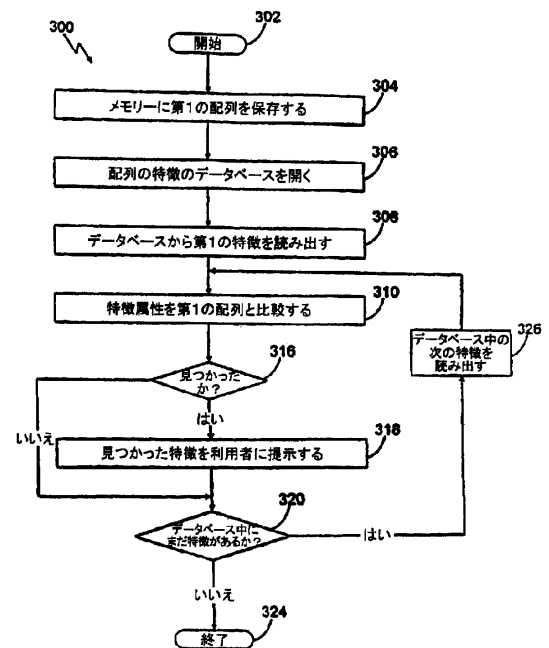
【図 2】



【図 3】



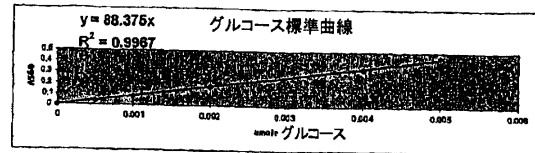
【図 4】



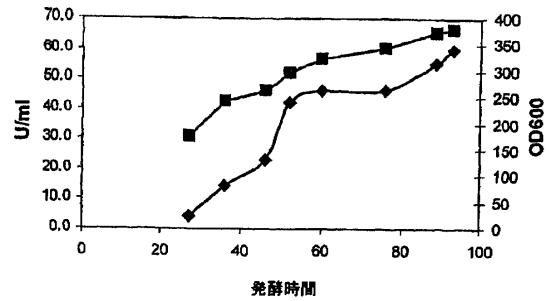
【図 5】

[illegible]

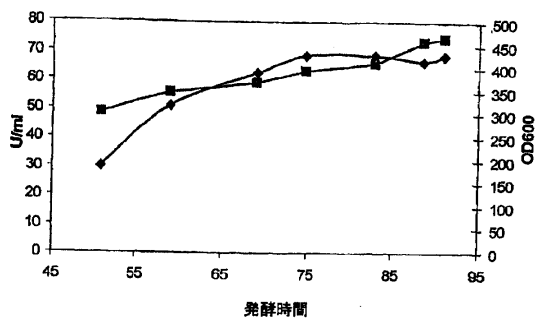
【図 6】



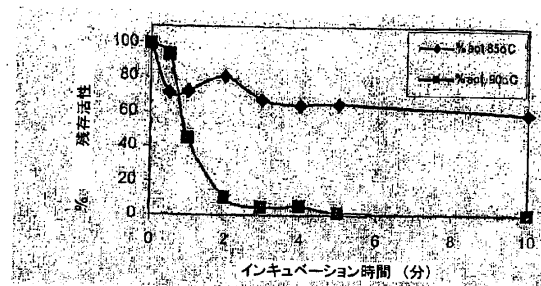
【图 7】



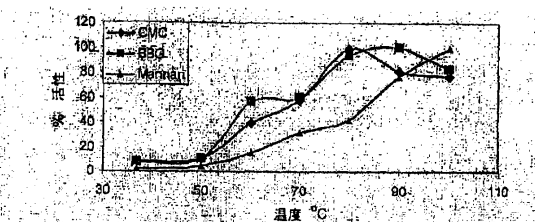
【图 8】



【図 10】



【图 9】



【配列表】

0005804331000001.app

フロントページの続き

|             |       |           |         |              |
|-------------|-------|-----------|---------|--------------|
| (51)Int.Cl. |       | F I       |         |              |
| C 1 2 N     | 9/26  | (2006.01) | C 1 2 N | 9/26 Z       |
| C 1 2 N     | 11/00 | (2006.01) | C 1 2 N | 11/00        |
| C 1 2 P     | 19/14 | (2006.01) | C 1 2 P | 19/14 Z      |
| A 2 3 L     | 1/305 | (2006.01) | A 2 3 L | 1/305        |
| C 1 2 C     | 5/02  | (2006.01) | C 1 2 C | 5/02         |
| A 2 1 D     | 2/26  | (2006.01) | C 1 2 P | 19/14 A      |
| A 2 1 D     | 13/00 | (2006.01) | A 2 1 D | 2/26         |
| A 2 3 L     | 2/00  | (2006.01) | A 2 1 D | 13/00        |
| A 6 1 K     | 38/00 | (2006.01) | A 2 3 L | 2/00 A       |
| A 6 1 P     | 1/14  | (2006.01) | A 6 1 K | 37/02        |
| C 1 1 D     | 3/386 | (2006.01) | A 6 1 P | 1/14         |
| A 2 3 K     | 1/16  | (2006.01) | C 1 1 D | 3/386        |
|             |       |           | A 2 3 K | 1/16 3 0 3 F |

(74)代理人 100093300  
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013  
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777  
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111501  
弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 スティア ブライアン  
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 カレン ウォルター  
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 ステットソン アベニュー  
3 4 6 9

(72)発明者 ヒーリー ショーン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 0 8 カールスバッド ハーディング ストリート  
3 3 8 0 # 7 エイ

(72)発明者 プリアム デリク  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 7 0 9 リサーチ トライアングル パーク コーン  
ウォーリス ロード 3 0 5 4 シンジェンタ バイオテクノロジー インコーポレイテッド内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表2001-515127 (JP, A)  
特表2002-528653 (JP, A)  
特表2002-513275 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

A 6 1 K 3 8 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0

C 1 2 N 5 / 1 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
C i N i i  
W P I D S ( S T N )