

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4346237号
(P4346237)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月24日(2009.7.24)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 9/54 (2006.01)	C 1 2 N 9/54
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

請求項の数 18 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-517089 (P2000-517089)
 (86) (22) 出願日 平成10年10月23日 (1998.10.23)
 (65) 公表番号 特表2001-520044 (P2001-520044A)
 (43) 公表日 平成13年10月30日 (2001.10.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/022500
 (87) 国際公開番号 W01999/020769
 (87) 国際公開日 平成11年4月29日 (1999.4.29)
 審査請求日 平成17年10月24日 (2005.10.24)
 (31) 優先権主張番号 08/956,323
 (32) 優先日 平成9年10月23日 (1997.10.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 08/956,324
 (32) 優先日 平成9年10月23日 (1997.10.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 398056506
 ジェネンコア インターナショナル イン
 コーポレーテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 304-1013 パロ アルト ペイジ
 ミル ロード 925
 (73) 特許権者 590005058
 ザ プロクター アンド ギャンブル カ
 ンパニー
 アメリカ合衆国オハイオ州, シンシナティ
 ー, ワン プロクター アンド ギャンブ
 ル プラザ (番地なし)
 (74) 代理人 100073184
 弁理士 柳田 征史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数置換プロテアーゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Bacillus amyloliquefaciens スプチリシンの残基位置 232 に対応する残基位置でのアミノ酸置換を含み、該残基位置 232 のアミノ酸がバリンで置換されており、該置換を含まない前駆プロテアーゼと比較して高められた洗浄能力を有するプロテアーゼ。

【請求項2】

前記置換が A232V であることを特徴とする請求項1記載のプロテアーゼ。

【請求項3】

Bacillus スプチリシンに由来する請求項1または2記載のプロテアーゼ変異体。 10

【請求項4】

Bacillus lentus スプチリシンに由来する請求項3記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項5】

請求項1または2記載のプロテアーゼ変異体をコードするDNA。

【請求項6】

請求項5記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項7】

請求項6記載の発現ベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 1 から 4 いずれか 1 項記載のプロテアーゼ変異体を含む清浄組成物。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 いずれか 1 項記載のプロテアーゼ変異体を含むテキスタイルを処理するための組成物。

【請求項 10】

Bacillus amyloliquefaciens スプチリシンの下記の残基位置の組に対応する残基位置の組よりなる群から選択される残基位置の組での置換を含み、残基位置 2 3 2 のアミノ酸がバリンで置換されていることを特徴とする請求項 1 または 2 記載のプロテアーゼ変異体：

68/76/103/104/159/232/236/245;

76/103/104/232/245;

24/68/76/103/104/159/232/236/245;

68/103/104/159/232/236/245/252;

68/76/103/104/159/213/232/236/245/260;

68/103/104/159/232/236/245/248/252;

68/103/104/159/232/236/245;

68/103/104/140/159/232/236/245/252;

43/68/103/104/159/232/236/245/252;

43/68/103/104/159/232/236/245;

43/68/103/104/159/232/236/245/252;

68/87/103/104/159/232/236/245/252/275;

68/103/104/159/232/236/245/257;

68/103/104/116/159/232/236/245;

68/103/104/159/232/236/245/248;

10/68/103/104/159/232/236/245;

68/103/104/159/203/232/236/245;

68/103/104/159/232/236/237/245;

68/76/79/103/104/159/232/236/245;

68/103/104/159/183/232/236/245;

68/103/104/159/174/206/232/236/245;

68/103/104/159/188/232/236/245;

68/103/104/159/230/232/236/245;

68/98/103/104/159/232/236/245;

68/103/104/159/215/232/236/245;

68/103/104/159/232/236/245/248;

68/76/103/104/159/232/236/245;

68/76/103/104/159/210/232/236/245;

68/76/103/104/159/232/236/245/257;

76/103/104/232/236/245/257;

68/103/104/159/232/236/245/257/275;

68/103/104/159/224/232/236/245/257;

76/103/104/159/232/236/245/257;

68/76/103/104/159/209/232/236/245;

68/76/103/104/159/211/232/236/245;

12/68/76/103/104/159/214/232/236/245;

68/76/103/104/159/215/232/236/245;

12/68/76/103/104/159/232/236/245;

20/68/76/103/104/159/232/236/245/259;

68/87/76/103/104/159/232/236/245/260;

10

20

30

40

50

68/76/103/104/159/232/236/245/261;
76/103/104/232/236/242/245;
68/76/103/104/159/210/232/236/245;
12/48/68/76/103/104/159/232/236/245;
76/103/104/232/236/245;
76/103/104/159/192/232/236/245;
76/103/104/147/159/232/236/245/248/251;
12/68/76/103/104/159/232/236/245/272;
68/76/103/104/159/183/206/232/236/245;
68/76/103/104/159/232/236/245/256; 10
68/76/103/104/159/206/232/236/245;
27/68/76/103/104/159/232/236/245;
68/76/103/104/116/159/170/185/232/236/245;
61/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
43/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
68/103/104/99/159/184/232/236/245/248/252;
103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/209/232/236/245/248/252;
68/103/104/109/159/232/236/245/248/252; 20
20/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/209/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/261;
68/103/104/159/185/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/185/210/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/215/232/236/245/248/252; 30
68/103/104/159/216/232/236/245/248/252;
20/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/173/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/251/252;
68/103/104/159/206/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252;
55/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/255;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/256;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/260; 40
68/103/104/159/232/236/245/248/252/257;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/258;
8/68/103/104/159/232/236/245/248/252/269;
68/103/104/116/159/232/236/245/248/252/260;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/261;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/261;
68/76/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/232/236/245/248/252;
103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252; 50

18/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/76/101/103/104/159/213/218/232/236/245/260;
68/103/104/159/228/232/236/245/248/252;
33/68/76/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/76/89/103/104/159/210/213/232/236/245/260;
61/68/76/103/104/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/205/210/232/236/245;
61/68/103/104/130/159/232/236/245/248/252;
61/68/103/104/133/137/159/232/236/245/248/252; 10
61/103/104/133/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/218/232/236/245/248/252;
61/68/103/104/159/160/232/236/245/248/252;
3/61/68/76/103/104/232/236/245/248/252;
61/68/103/104/159/167/232/236/245/248/252;
97/103/104/159/232/236/245/248/252;
98/103/104/159/232/236/245/248/252;
99/103/104/159/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/232/236/245/248/252; 20
102/103/104/159/232/236/245/248/252;
103/104/106/159/232/236/245/248/252;
103/104/109/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/232/236/245/248/252/261;
62/103/104/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/184/232/236/245/248/252;
103/104/159/166/232/236/245/248/252;
103/104/159/217/232/236/245/248/252;
20/62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
62/103/104/159/213/232/236/245/248/252; 30
103/104/159/206/217/232/236/245/248/252;
62/103/104/159/206/232/236/245/248/252;
103/104/130/159/232/236/245/248/252;
103/104/131/159/232/236/245/248/252;
27/103/104/159/232/236/245/248/252;
38/103/104/159/232/236/245/248/252;
38/76/103/104/159/213/232/236/245/260;
68/76/103/104/159/213/232/236/245/260/271;
68/76/103/104/159/209/213/232/236/245/260;
68/76/103/104/159/210/213/232/236/245/260; 40
68/76/103/104/159/205/213/232/236/245/260;
68/76/103/104/159/210/232/236/245/260;
68/103/104/159/213/232/236/245/260;
76/103/104/159/213/232/236/245/260;
68/103/104/159/209/232/236/245;
68/103/104/159/210/232/236/245;
68/103/104/159/230/232/236/245;
68/103/104/159/126/232/236/245;
68/103/104/159/205/232/236/245;
68/103/104/159/210/232/236/245; 50

68/103/104/159/232/236/245/260;
103/104/159/232/236/245;
68/103/104/159/174/232/236/245/257;
68/103/104/159/194/232/236/245/257;
68/103/104/159/209/232/236/245/257;
103/104/159/232/236/245/257;
68/76/103/104/159/213/232/236/245/260/261;
68/103/104/159/232/236/245/257/261;
103/104/159/213/232/236/245/260;
103/104/159/210/232/236/245/248/252; 10
103/104/159/209/232/236/245/257;
68/76/103/104/159/210/213/232/236/245/260;
12/103/104/159/209/213/232/236/245/260;
103/104/209/232/236/245/257;
103/104/159/205/210/213/232/236/245/260;
103/104/159/205/209/232/236/245/260;
68/103/104/159/205/209/210/232/236/245;
103/104/159/205/209/210/232/236/245/257;
103/104/159/205/209/232/236/245/257;
68/103/104/159/205/209/210/232/236/245/260; 20
103/104/159/205/209/210/232/236/245;
103/104/159/209/210/232/236/245;
103/104/159/205/210/232/236/245;
68/103/104/128/159/232/236/245;
48/68/103/104/159/209/232/236/245;
48/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
48/68/103/104/159/232/236/245/257/261;
102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
12/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
101/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 30
98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
102/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
103/104/131/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/184/232/236/245/248/252;
103/104/159/232/236/244/245/248/252;
62/103/104/159/213/232/236/245/248/252/256;
12/62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/185/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/206/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/213/232/236/245/248/252; 40
98/102/103/104/159/232/236/245/248/252;
101/102/103/104/159/232/236/245/248/252;
98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
98/102/103/104/159/212/232/236/248/252;
62/103/104/109/159/213/232/236/245/248/252;
62/103/104/159/212/213/232/236/245/248/252;
62/101/103/104/159/212/213/232/236/245/248/252;
103/104/159/232/245/248/252;
62/103/104/130/159/213/232/236/245/248/252;
101/103/104/130/159/232/236/245/248/252; 50

101/103/104/128/159/232/236/245/248/252;
62/101/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
62/103/104/128/159/213/232/236/245/248/252;
62/103/104/128/159/213/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/232/236/245/248/252/260;
101/103/104/131/159/232/236/245/248/252;
98/101/103/104/159/232/236/245/248/252;
99/101/103/104/159/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/209/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/205/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/194/232/236/245/248/252;
76/101/103/104/159/194/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/230/232/236/245/248/252; および
62/103/104/159/185/206/213/232/236/245/248/252/271。

10

【請求項 11】

Bacillus amyloliquefaciens スプチリシンの下記のアミノ酸置換の組に対応するアミノ酸置換の組よりなる群から選択されるアミノ酸置換の組を含む請求項 10 記載のプロテアーゼ変異体：

20

V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 N76D/S103A/V104I/A232V/Q245R;
 S24T/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/N140D/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;
 N43S/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;
 N43K/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 N43D/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;
 V68A/S87G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K/R275S;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 V68A/S103A/V104I/N116D/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D;
 R10C/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/V203E/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/K237E/Q245R;
 V68A/N76D/I79N/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/N183D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A174V/Q206L/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S188C/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A230T/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/A98T/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A215T/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248S;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/P210R/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R/L257V;

30

40

50

V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V/R275H;
 V68A/S103A/V104I/G159D/T224A/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 N76D/S103A/V104IA/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/G211R/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/G211V/A232V/Q236H/Q245R;
 Q12R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Y214L/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A215R/A232V/Q236H/Q245R;
 Q12R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 G20R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/S259G; 10
 V68A/S87R/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/T260V;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N261G;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N261W;
 N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/S242P/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/P210L/A232V/Q236H/Q245R;
 Q12R/A48V/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R;
 N76D/S103A/V104I/G159D/Y192F/A232V/Q236H/Q245R;
 N76D/S103A/V104I/V147I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248S/K251R;
 Q12R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/A272S; 20
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/N183K/Q206L/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/S256R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Q206R/A232V/Q236H/Q245R;
 K27R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/N116T/G159D/R170S/N185S/A232V/Q236H/Q245R;
 G61E/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N43D/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S212P/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/S99N/G159D/N184D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 30
 V68A/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/Q109R/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G20R/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/Y209F/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/N261D;
 V68A/S103A/V104I/G159D/N185D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/P210R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/P210T/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/P210S/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/N185D/P210L/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 40
 V68A/S103A/V104I/G159D/P210L/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S212A/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S212E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/T213E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/T213S/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/A103V/V104I/G159D/T213E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/T213G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A215V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 50

V68A/S103A/V104I/G159D/A215R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S216T/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S216V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/S216C/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G20A/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/N173D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/K251V/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/Q206R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252F;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252L; 10
 P55S/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252F;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/T255V;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256N;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256E;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/T260R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/L257R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/G258D;
 I8V/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/N269D;
 V68A/S103A/V104I/N116S/G159D/A232V/Q26H/Q245R/N248D/N252K/T260E; 20
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/N261R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/N261D;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236R/Q245R/N248D/N252K;
 N18S/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245V/N248D/N252K;
 V68A/N76D/S101T/S103A/V104I/G159D/T213R/N218S/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A228V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 T33S/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 30
 V68A/N76D/E89D/S103A/V104I/G159D/P210L/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 G61E/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/V205I/P201I/A232V/Q236H/Q245R;
 G61E/V68A/S103A/V104I/S130A/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G61E/V68A/S103A/V104I/A133S/Q137R/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G61E/S103A/V104I/A133V/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248G/N252K;
 V68A/S103A/V104I/G159D/N218S/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G61E/V68A/S103A/V104I/G159D/S160V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S3L/G61E/V68A/N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 40
 G61E/V68A/S103A/V104I/G159D/S167F/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G97E/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 A98D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S99E/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101E/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G102A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/S106E/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/Q109E/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/N261R; 50

S103A/V104I/Q109R/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/N184D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/S166D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/L217E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G20R/N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/Q206R/L217E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/G159D/Q206R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/S130G/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 10
 S103A/V104I/P131V/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 K27N/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 T38G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 T38A/N76D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A/E271G;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Y209W/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/P210I/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/V205I/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/P210I/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A; 20
 N76D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/P210I/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A230V/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/L126F/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/V205I/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/P210L/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A174V/A232V/Q236H/Q245R/L257V; 30
 V68A/S103A/V104I/G159D/A194S/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 V68A/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A/N261W;
 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V/N261W;
 S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 S103A/V104I/G159D/P210I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/P210L/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 Q12R/S103A/V104I/G159D/Y209W/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A; 40
 S103A/V104I/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 S103A/V104I/G159D/V205I/P210I/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 S103A/V104I/G159D/V205I/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 V68A/S103A/V104I/G159D/V205I/Y209W/P210I/A232V/Q236H/Q245R;
 S103A/V104I/G159D/V205I/Y209W/P210I/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 S103A/V104I/G159D/V205I/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
 V68A/S103A/V104I/G159D/V205I/Y209W/P210I/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
 S103A/V104I/G159D/V205I/Y209W/P210I/A232V/Q236H/Q245R;
 S103A/V104I/G159D/Y209W/P210I/A232V/Q236H/Q245R;
 S103A/V104I/G159D/V205I/P210I/A232V/Q236H/Q245R; 50

V68A/S103A/V104I/S128L/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
 A48V/V68A/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R;
 A48V/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 A48V/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V/N261W;
 G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 Q12R/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 A98L/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 G102A/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/P131V/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 10
 S103A/V104I/G159D/N184S/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/N184G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/V244T/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/V244A/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256R;
 Q12R/N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/N185D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/Q206E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/T213Q/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 A98L/G102A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 20
 S101G/G102A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 A98L/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 A98L/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/Q109R/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/G159D/S212G/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S101G/S103A/V104I/G159D/S212G/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S103A/V104I/G159D/A232V/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/S130G/G159D/T213R/Q232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/S130G/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/S128G/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 30
 S101G/S103A/V104I/S128L/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S101G/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/S128G/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N62D/S103A/V104I/S128L/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/T260A;
 S101G/S103A/V104I/P131V/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 A98V/S101G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S99G/S101G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; 40
 S101G/S103A/V104I/G159D/P210I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/V205I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/A194P/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 N76D/S101G/S103A/V104I/G159D/A194P/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
 S101G/S103A/V104I/G159D/A230V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K; および
 N62D/S103A/V104I/G159D/N185D/Q206E/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/E271Q。

【請求項 1 2】

Bacillus amyloliquefaciens スプチリシンの下記の残基位置の組に対応する残基位置の組よりなる群から選択される残基位置の組での置換を含む請求項 1 0 記載のプロテアーゼ変異体：

68/103/104/159/232/236/245/252;
68/76/103/104/159/213/232/236/245/260;
68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245;
68/103/104/140/159/232/236/245/252;
43/68/103/104/159/232/236/245/252;
43/68/103/104/159/232/236/245;
68/103/104/159/232/236/245/257;
68/76/103/104/159/210/232/236/245;
68/103/104/159/224/232/236/245/257; 10
76/103/104/159/232/236/245/257;
68/76/103/104/159/211/232/236/245;
12/68/76/103/104/159/214/232/236/245;
68/76/103/104/159/215/232/236/245;
12/68/76/103/104/159/232/236/245;
20/68/76/103/104/159/232/236/245/259;
68/76/87/103/104/159/232/236/245/260;
68/76/103/104/159/232/236/245/261;
12/48/68/76/103/104/159/232/236/245;
76/103/104/159/192/232/236/245; 20
76/103/104/147/159/232/236/245/248/251;
12/68/76/103/104/159/232/236/245/272;
68/76/103/104/159/183/206/232/236/245;
68/76/103/104/159/232/236/245/256;
68/76/103/104/159/206/232/236/245;
27/68/76/103/104/159/232/236/245;
68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/209/232/236/245/248/252;
68/103/104/109/159/232/236/245/248/252; 30
20/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/209/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/215/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/216/232/236/245/248/252;
20/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/255; 40
68/103/104/159/232/236/245/248/252/256;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/260;
68/103/104/159/228/232/236/245/248/252;
68/76/89/103/104/159/210/213/232/236/245/260;および
68/103/104/159/218/232/236/245/248/252。

【請求項 1 3】

残基位置 6 2、2 1 2、2 3 0、2 5 2 および 2 5 7 の 1 以上の位置でのアミノ酸置換をさらに含む請求項 1 または 2 記載のプロテアーゼ。

【請求項 1 4】

Bacillus amyloliquefaciens スプチリシンの残基位置 6 50

8、103、104、159、232、236および245に対応する残基位置でのアミノ酸置換を含み、残基位置232のアミノ酸がバリンで置換されていることを特徴とする請求項1または2記載のプロテアーゼ。

【請求項15】

Bacillus amyloliquefaciens スブチリシンの残基位置103、104、159、232、236、245、248および252に対応する残基位置でのアミノ酸置換を含み、残基位置232のアミノ酸がバリンで置換されていることを特徴とする請求項1または2記載のプロテアーゼ。

【請求項16】

V68A、S103A、V104I、G159D、A232V、Q236HおよびQ245Rの置換組を含む請求項1または2記載のプロテアーゼ。

10

【請求項17】

S103A、V104I、G159D、A232V、Q236H、Q245R、N248DおよびN252Kの置換組を含む請求項1または2記載のプロテアーゼ。

【請求項18】

S101Gの置換をさらに含む請求項17記載のプロテアーゼ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願)

本出願は、ここに引用して本明細書に一体化させる1998年10月23日に出願された米国特許出願第08/956,323号、1998年10月23日に出願された米国特許出願第08/956,564号、および1998年10月23日に出願された米国特許出願第08/956,324号の一部継続出願である。

20

【0002】

(発明の背景)

セリンプロテアーゼ類はカルボニルヒドロラーゼの亜群である。それらは広い範囲の特異性および生物学的機能を有する多様なクラスの酵素を含む。Stroud, R. Sci. Amer., 131:74-88。その機能的多様性にも拘わらず、セリンプロテアーゼの触媒装置は、少なくとも2つの酵素の遺伝的に区別されるファミリー；1)スブチリシンおよび2)哺乳動物キモトリプシン-関連および相同細菌セリンプロテアーゼ(例えば、トリプシンおよびS. gresius トリプシン)によってアプローチされてきた。セリンプロテアーゼのこれらの2つのファミリーは、触媒の顕著に似たメカニズムを示す。Kraut, J. (1977), Annu. Rev. Biochem., 46:331-358。さらに、一次構造は関連しないが、これらの2つの酵素ファミリーの三次構造は、セリン、ヒスチジンおよびアスパルテートよりなるアミノ酸の保存された触媒トリアドを一緒にする。

30

【0003】

スブチリシンは、かなり種々のBacillus種および他の微生物から大量に分泌されるセリンプロテアーゼ(ほぼMW27,500)である。スブチリシンの蛋白質配列は、Bacillusの少なくとも9つの異なる種から決定されてきた。Markland, F.S.ら(1983), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364:1537-1540。Bacillus amyloliquefacience, Bacillus licheniformisおよびB. lentusのいくつかの天然変異体からのスブチリシンの三次元結晶学構造が報告されている。これらの研究は、スブチリシンは哺乳動物セリンプロテアーゼと遺伝的には無関係であるが、それは同様の活性部位構造を有する。スブチリシンを含有する共有結合したペプチド阻害剤(Robertus, J.D.ら(1972), Biochemistry, 11:2439-2449)または生産された複合体(Robertus, J.D.ら(1976), J. Biol. Chem., 251:1097-1103)のX-線結晶構造は、スブチリシンの活性部位および推定基質結合裂け目に関

40

50

する情報を提供してきた。加えて、非常に多数の速度論および化学的修飾研究がスブチリシンにつき報告されており；Svend sen, B. (1976), Carisb era Res. Commun., 41:237-291; Markland, F.S., (前掲)、ならびに、スブチリシンの残基222におけるメチオニンの側鎖が過酸化水素によってメチオニンスルホキッドに変換され(Stau ffer, D.C. ら(1965), J. Biol. Chem. 244:5333-5338)、広範な部位-特異的突然変異誘発が行われた(WellsおよびEstell (1988) TIBS 13:291-297)という少なくとも1つの報告がある。

【0004】

(発明の概要)

Bacillus amyloliquefaciens スブチリシンの62、212、230、232、252および257よりなる群から選択される残基位置に対応する1以上の残基においてアミノ酸置換を含有するプロテアーゼ変異体を提供するのがここに目的である。

【0005】

前記リストのアミノ酸置換のいずれの組合せを用いることもできるが、本発明の好ましいプロテアーゼ変異体酵素は以下の組合せにおけるアミノ酸残基の置換を含む。残基位置の全ては*Bacillus amyloliquefaciens* スブチリシンの位置に対応する：

(1) 位置62におけるおよび以下の位置103、104、109、159、213、232、236、245、248および252のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(2) 位置212におけるおよび以下の位置12、98、102、103、104、159、232、236、245、248および252のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(3) 位置230におけるおよび以下の位置68、103、104、159、232、236および245のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(4) 位置232におけるおよび以下の位置1、9、12、61、62、68、76、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、205、209、210、212、213、217、230、236、245、248、252、257、260、270および275のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(5) 位置232におけるおよび以下の位置103、104、236および245のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(6) 位置232および103におけるおよび以下の位置1、9、12、61、62、68、76、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、205、209、210、212、213、217、230、236、245、248、252、257、260、270および275のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(7) 位置232および104におけるおよび以下の位置1、9、12、61、62、68、76、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、205、209、210、212、213、217、230、236、245、248、252、257、260、270および275のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(8) 位置232および236におけるおよび以下の位置1、9、12、61、62、68、76、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、205、209、210、212、213、217、230、236、245、248、252、257、260、270および275のうち1以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

10

20

30

40

50

(9) 位置 232 および 245 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、76、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、205、209、210、212、213、217、230、236、245、248、252、257、260、270 および 275 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(10) 位置 232、103、104、238 および 245 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、76、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、205、209、210、212、213、217、230、236、245、248、252、257、260、270 および 275 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

10

(11) 位置 252 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、210、212、213、217、232、236、245、248 および 270 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(12) 位置 252 におけるおよび以下の位置 103、104、236 および 245 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(13) 位置 252 よび 103 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、210、212、213、217、232、236、245、248 および 270 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

20

(14) 位置 252 よび 104 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、210、212、213、217、232、236、245、248 および 270 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(15) 位置 252 よび 236 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、210、212、213、217、232、236、245、248 および 270 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

(16) 位置 252 よび 245 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、210、212、213、217、232、236、245、248 および 270 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；

30

(17) 位置 252、103、104、236 および 245 におけるおよび以下の位置 1、9、12、61、62、68、97、98、101、102、103、104、109、130、131、159、183、185、210、212、213、217、232、236、245、248 および 270 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体；および

(18) 位置 257 におけるおよび以下の位置 68、103、104、205、209、210、232、236、245 および 275 のうちの 1 以上におけるアミノ酸残基の置換を含むプロテアーゼ変異体。より好ましいプロテアーゼ変異体は、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの表 1 における位置に対応する残位置よりなる群から選択される置換組である；

40

【表 1】

表 1 (続き)

43	68	103	104	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245					
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
68	87	103	104	159	232	236	245	252	275			
68	103	104	159	232	236	245	257					
68	103	104	116	159	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
10	68	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	203	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	237	245					
68	76	79	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	183	232	236	245					
68	103	104	159	174	206	232	236	245				
68	103	104	159	188	232	236	245					
68	103	104	159	230	232	236	245					
68	98	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	215	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
68	76	103	104	159	232	236	245					

【表 3】

10

20

30

表 1 (続き)

68	76	103	104	159	210	232	236	245		
68	76	103	104	159	232	236	245	257		
76	103	104	232	236	245	257				
68	103	104	159	232	236	245	257	275		
76	103	104	257	275						
68	103	104	159	224	232	236	245	257		
76	103	104	159	232	236	245	257			
68	76	103	104	159	209	232	236	245		
68	76	103	104	159	211	232	236	245		
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245	
68	76	103	104	159	215	232	236	245		
12	68	76	103	104	159	232	236	245		
20	68	76	103	104	159	232	236	245	259	
68	87	76	103	104	159	232	236	245	260	
68	76	103	104	159	232	236	245	261		
76	103	104	232	236	242	245				
68	76	103	104	159	210	232	236	245		
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245	
76	103	104	232	236	245	159	232	236	245	

【表 4】

10

20

30

表 1 (続き)

76	103	104	159	192	232	236	245						
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251				
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272				
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245				
68	76	103	104	159	232	236	245	256					
68	76	103	104	159	206	232	236	245					
27	68	76	103	104	159	232	236	245					
68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245			
61	68	103	104	159	232	236	245	248	252				
43	68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252				
68	103	104	99	159	184	232	236	245	248	252			
103	104	159	232	236	245	248	252						
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252				
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252				
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261				
68	103	104	159	185	232	236	245	248	252				

【表 5】

表 1 (続き)

68	103	104	159	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	185	210	232	236	245	248	252	
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
68	103	104	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	173	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	251	252		
68	103	104	159	206	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252			
55	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	257		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	258		
8	68	103	104	159	232	236	245	248	252	269	

【表 6】

表 1 (続き)

68	103	104	116	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	76	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	232	236	245	248	252					
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
18	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	76	101	103	104	159	213	218	232	236	245	260	
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252			
33	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260	
61	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
103	104	159	205	210	232	236	245					
61	68	103	104	130	159	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	133	137	159	232	236	245	248	252	
61	103	104	133	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				

【表 7】

表 1 (続き)

68	103	104	159	218	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	159	160	232	236	245	248	252	
3	61	68	76	103	104	232	236	245	248	252	
61	68	103	104	159	167	232	236	245	248	252	
97	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	103	104	159	232	236	245	248	252			
99	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	232	236	245	248	252			
102	103	104	159	232	236	245	248	252			
103	104	106	159	232	236	245	248	252			
103	104	109	159	232	236	245	248	252			
103	104	159	232	236	245	248	252	261			
62	103	104	159	232	236	245	248	252			
103	104	159	184	232	236	245	248	252			
103	104	159	166	232	236	245	248	252			
103	104	159	217	232	236	245	248	252			
20	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252	
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
103	104	159	206	217	232	236	245	248	252		

【表 8】

表 1 (続き)

62	103	104	159	206	232	236	245	248	252				
103	104	130	159	232	236	245	248	252					
103	104	131	159	232	236	245	248	252					
27	103	104	159	232	236	245	248	252					
38	103	104	159	232	236	245	248	252					
38	76	103	104	159	213	232	236	245	260				
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	271			
68	76	103	104	159	209	213	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	205	213	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	210	232	236	245	260				
68	103	104	159	213	232	236	245	260					
76	103	104	159	213	232	236	245	260					
68	103	104	159	209	232	236	245						
68	103	104	159	210	232	236	245						
68	103	104	159	230	232	236	245						
68	103	104	159	126	232	236	245						
68	103	104	159	205	232	236	245						
68	103	104	159	210	232	236	245						

【表 9】

表 1 (続き)

103	104	159	205	209	232	236	245	257		
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245	260
103	104	159	205	209	210	232	236	245		
103	104	159	209	210	232	236	245			
103	104	159	205	210	232	236	245			
68	103	104	128	159	232	236	245			
48	103	104	159	230	236	245				
48	68	103	104	159	209	232	236	245		
48	68	103	104	159	232	236	245	248	252	
48	68	103	104	159	232	236	245	257	261	
102	103	104	159	212	232	236	245	248	252	
12	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252
101	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252
102	103	104	159	213	232	236	245	248	252	
103	104	131	159	232	236	245	248	252		
103	104	159	184	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	244	245	248	252		
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252	256

【表 1 1】

表 1 (続き)

12	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	248	252			
62	103	104	109	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252		
62	101	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252	
103	104	159	232	245	248	252						
103	104	159	230	245								
62	103	104	130	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	130	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	128	159	232	236	245	248	252			
62	101	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		

【表 1 2】

表 1 (続き)

101	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
101	103	104	131	159	232	236	245	248	252			
98	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
99	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	205	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	230	236	245						
101	103	104	159	194	232	236	245	248	252			
76	101	103	104	159	194	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	230	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	185	206	213	232	236	245	248	252	271

より好ましいプロテアーゼ変異体は、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの表 2 における位置に対応する残位置よりなる群から選択される置換組である：

【表 1 3】

10

20

30

表 2 (続き)

N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K					
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K					
V68A	S87G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K	R275S				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	S103A	V104I	N116D	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D						
R10C	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	V203E	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R						
V68A	N76D	I79N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	N183D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	Q206L	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	S188C	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A230T	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	A98T	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A215T	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						

【表 1 5】

表2 (続き)

Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	A232V	Q236H	Q245R		
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R								
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R						
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	Q245R	N248S	K251R		
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	Q236H	Q245R	A272S		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R	Q245R	S256R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	Q236H	Q245R			
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	N185S	A232V	Q236H	Q245R	
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	Q245R	N248D	N252K		
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	S99N	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		Q236H	Q245R	N248D	N252K	
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	Q245R	N248D	N252K		
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	Q245R	N248D	N252K		

【表17】

10

20

30

表 2 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

【表 1 8】

表 2 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	K251V	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L				
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D			
I8V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N269D		
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			

【表 19】

10

20

30

表 2 (続き)

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K				
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K				
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		

【表 2 0】

10

20

30

表 2 (続き)

G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R				
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

【表 2 1】

表 2 (続き)

S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
T38A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	V205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R						
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R								

【表 2 2】

表 2 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
A48V	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R					
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R			
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W		
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	N184S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K			

【表 2 4】

10

20

30

表 2 (続き)

N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R	
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R							
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	

【表 2 5】

表 2 (続き)

N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260A			
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q

10

20

30

プロテアーゼ変異体をコードするDNA配列、ならびにかかる変異体DNA配列を含有する発現ベクターを提供するのがさらなる目的である。

【0006】

かかるベクターで形質転換した宿主細胞、ならびにかかるDNAを発現してプロテアーゼ変異体を細胞内または細胞外で生産できる宿主細胞を提供するのがなおさらなる本発明のもう一つの目的である。

40

【0007】

さらに、本発明のプロテアーゼ変異体を含む清浄組成物が提供される。

【0008】

加えて、本発明のプロテアーゼ変異体を含む動物飼料が提供される。

【0009】

また、本発明のプロテアーゼ変異体を含むテキスタイルの処理用の組成物が提供される。

【0010】

(図面の説明)

50

図1-4は、*Bacillus amyloliquefaciens* スブチリシンについてのDNAおよびアミノ酸配列ならびにこの遺伝子の部分的制限地図を示す。

【0011】

図5は*Bacillus amyloliquefaciens* (BPN)および*Bacillus lentus* (野生型)からのスブチリシンの間での保存されたアミノ酸残基を示す。

【0012】

図6および7は4つのスブチリシンのアミノ酸配列を示す。頂部の線は*Bacillus amyloliquefaciens* スブチリシン(時々スブチリシンBPNともいう)からのスブチリシンのアミノ酸配列を表す。第2の線は*Bacillus subtilis*からのスブチリシンのアミノ酸配列を示す。第3の線は*B. licheniformis*からのスブチリシンのアミノ酸配列を示す。第4の線は*Bacillus lentus*からのスブチリシン(PCT WO89/06276ではスブチリシン309ともいう)のアミノ酸配列を示す。記号*はスブチリシンBPNと比較した特異的アミノ酸残基の不存在を示す。

【0013】

(発明の詳細な説明)

プロテアーゼは、一般的には、蛋白質またはペプチドのペプチド結合を切断するように作用するカルボニルヒドロラーゼである。本明細書で用いるごとく、「プロテアーゼ」は、天然に生じるプロテアーゼまたは組換えプロテアーゼを意味する。天然に生じるプロテアーゼは、L-アミノアシルペプチドヒドロラーゼ、ペプチジルアミノ酸ヒドロラーゼ、アシルアミノヒドロラーゼ、セリンカルボキシペプチダーゼ、メタロカルボキシペプチダーゼ、チオールプロテイナーゼ、カルボキシプロテイナーゼおよびメタロプロテイナーゼを含む。セリン、メタロ、チオールおよび酸性プロテアーゼ、ならびにエンドおよびエキソプロテアーゼが含まれる。

【0014】

本発明は、変異体のアミノ酸配列がそれに由来する前駆体カルボニルヒドロラーゼと比較して、異なる蛋白質分解活性、安定性、基質特異性、pHプロファイルおよび/または効率特徴を有する天然には生じないカルボニルヒドロラーゼ変異体(プロテアーゼ変異体)であるプロテアーゼ酵素を含む。具体的には、かかるプロテアーゼ変異体は、前駆体プロテアーゼの複数のアミノ酸残基の異なるアミノ酸での置換によって由来する、天然では見いだされないアミノ酸配列を有する。前駆体プロテアーゼは天然に生じるプロテアーゼまたは組換えプロテアーゼであり得る。

【0015】

ここに有用なプロテアーゼ変異体は、指名されたアミノ酸残基位置における19の天然に生じるL-アミノ酸のいずれかの置換を含む。かかる置換はいずれかの前駆体スブチリシン(原核生物、真核生物、哺乳動物等)でなすことができる。本出願を通じて、共通の1文字および3文字暗号によって種々のアミノ酸を引用する。かかる暗号はDale, M.W. (1989), *Molecular Genetics of Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd., Appendix Bで確認される。

【0016】

ここに有用なプロテアーゼ変異体は、好ましくは、*Bacillus* スブチリシンに由来する。より好ましくは、プロテアーゼ変異体は*Bacillus lentus* スブチリシンおよび/またはスブチリシン309に由来する。

【0017】

スブチリシンは、一般的には、蛋白質またはペプチドのペプチド結合を切断するように作用する細菌または菌類プロテアーゼである。本明細書で用いるごとく、「スブチリシン」は天然に生じるスブチリシンまたは組換えスブチリシンを意味する。一連の天然に生じるスブチリシンは種々の微生物種によって生産され、しばしば分泌されることが知られてい

10

20

30

40

50

る。このシリーズのメンバーのアミノ酸配列は全く相同というのではない。しかしながら、このシリーズのスブチリシンは、同一または類似のタイプの蛋白質分解活性を呈する。このクラスのスブチリシンは、それらをキモトリプシン関連クラスのスブチリシンから区別する触媒トリアドを規定する共通のアミノ酸配列を保有する。スブチリシンおよびキモトリプシン関連スブチリシンは、共に、アスパルテート、ヒトチジンおよびセリンを含む触媒トリアドを共に有する。スブチリシン関連プロテアーゼにおいて、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて読んだこれらのアミノ酸の相対的順序は、アスパルテート - ヒスチジン - セリンである。キモトリプシン関連プロテアーゼにおいて、しかしながら、相対的順序はヒスチジン - アスパルテート - セリンである。かくして、ここにスブチリシンは、スブチリシン関連プロテアーゼの触媒トリアドを有するスブチリシンをいう。その例は限定されるものではないが図 6 - 7 で確認されるスブチリシンを含む。一般的には、かつ本発明の目的では、プロテアーゼにおけるアミノ酸のナンバリングは、図 1 - 4 に提示された成熟 *Bacillus amyloliquefaciens* スブチリシン配列に帰属される番号に対応する。

10

【0018】

「組換えスブチリシン」または「組換えプロテアーゼ」とは、スブチリシンまたはプロテアーゼをコードする DNA 配列が修飾されて、天然に生じるアミノ酸配列における 1 以上のアミノ酸の置換、欠失または挿入をコードする変異体（または突然変異体）DNA 配列を生じるスブチリシンまたはプロテアーゼをいう。かかる修飾を生じる、本明細書に開示されているものと組み合わせることができる適当な方法は米国特許 RE 34, 606 号、

20

【0019】

米国特許第 5, 204, 015 号および米国特許第 5, 185, 258 号、米国特許第 5, 700, 676 号、米国特許第 5, 801, 038 号および米国特許第 5, 763, 257 号に開示されているものを含む。

「非ヒトスブチリシン」およびそれらをコードする DNA は、多くの原核生物および真核生物から得ることができる。原核生物の適当な例は、*E. coli* または *Pseudomonas* のときグラム陰性生物および *Micrococcus* または *Bacillus* のときグラム陽性細菌を含む。スブチリシンおよびそれらの遺伝子がそれから得ることができる真核生物の例は *Saccharomyces cerevisiae* のとき酵母、*Aspergillus* sp. のとき菌類を含む。

30

【0020】

「プロテアーゼ変異体」は、「前駆体プロテアーゼ」のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を有する。前駆体プロテアーゼは天然に生じるプロテアーゼおよび組換えプロテアーゼを含む。プロテアーゼ変異体のアミノ酸配列は、前駆体アミノ酸配列の 1 以上のアミノ酸の置換、欠失または挿入によって前駆体プロテアーゼアミノ酸配列に「由来」する。かかる修飾は、前駆体プロテアーゼ酵素それ自体の操作よりもむしろ前駆体プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする「前駆体 DNA 配列」のものである。前駆体 DNA 配列のかかる操作についての適当な方法は、ここに開示される方法、ならびに当業者に知られた方法を含む（例えば、EP 0 328 299、WO 89/06279 および既に引用された米国特許および出願参照）。

40

【0021】

Bacillus amyloliquefaciens スブチリシンの 62、212、230、232、252 および 257 よりなる群から選択残基位置に対応する 1 以上の残基位置におけるアミノ酸の特異的置換がここに確認される。

【0022】

好ましい変異体は、表 1 中の *Bacillus amyloliquefaciens* スブチリシンの位置に対応する残基位置における置換の組合せを有するものである。

【0023】

より好ましい変異体は、表 2 中の *Bacillus amyloliquefaciens* スブチリシンの位置に対応する残基位置における置換の組合せを有するものである。

50

表3 (続き)

68	76	103	104	159	232	236	245	261				
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245			
76	103	104	159	192	232	236	245					
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251			
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272			
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245			
68	76	103	104	159	232	236	245	256				
68	76	103	104	159	206	232	236	245				
27	68	76	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252			

【表28】

表3 (続き)

68	103	104	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	245	248	252	255		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252		
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252		

これらのアミノ酸位置番号は、図1-4に呈された成熟 *Bacillus amylo liquefaciens* スプチリシン配列に帰属されるものをいう。しかしながら、本発明は、この特定のスプチリシンの突然変異に限定されず、*Bacillus amylo liquefaciens* スプチリシンにおける特定の同定される残基と「同等である」位置におけるアミノ酸残基を含有する前駆体プロテアーゼまでに拡大される。本発明の好ましい具体例において、前駆体プロテアーゼは *Bacillus lentus* スプチリシンであり、前記リストのものに対応する *B. Lentus* における同等のアミノ酸残基位置で置換がなされる。

【0026】

前駆体プロテアーゼの残基(アミノ酸)位置は、もし、*Bacillus amylo liquefaciens* スプチリシンにおける特別の残基またはその残基の一部と相同(すなわち、一次または三次いずれかの構造における位置に対応する)または類似する(すなわち、化学的に組み合わせる、反応するまたは相互作用する同一または同様の機能的能力を有する)ならば、*Bacillus amylo liquefaciens* スプチリシンの残基と同等である。

【0027】

一次構造に対する相同性を確立するには、前駆体プロテアーゼのアミノ酸配列を *Bacillus amylo liquefaciens* スプチリシン一次配列、特に配列が知

10

20

30

40

50

られているスプチリシンにおいて不変であることが知られている残基の組と直接的に比較する。例えば、ここに図5は、*B. amyloliquefaciens* スプチリシンおよび*B. lentus* スプチリシンの間で保存された残基を示す。保存された残基を整列させ、整列を維持するのに必要な挿入および欠失を可能とした後（すなわち、任意の欠失および挿入を通じて保存された残基の排除を回避し）、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの一次配列における特定のアミノ酸と同等の残基が規定される。保存された残基の整列は、好ましくは、かかる残基の100%を保存すべきである。しかしながら、保存された残基の75%より大または50%と少ない整列もまた同等の残基を規定するのに適当である。触媒トリアド、Asp32/His64/Ser221の保存は維持されるべきである。Siezenら(1991) *Prot* 10
ein Eng. 4(7):719-737は、非常に多数のセリンプロテアーゼの整列を示す。Siezenらはスプチラーゼまたはスプチラーゼ-様セリンプロテアーゼとしてのグループ分けに言及する。

【0028】

例えば、図6-7において、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis* (*carisbergenis*) および*Bacillus lentus*からのスプチリシンのアミノ酸配列を整列させて、アミノ酸配列の間の相同性の最大量を提供する。これらの配列の比較は、各配列に含有される保存された多数の残基があることを示す。これらの保存された残基(*BPN'* および*B. lentus*の間)は図5に確認される。 20

【0029】

これらの保存された配列は、かくして、好ましい*Bacillus lentus*スプチリシンと高度に相同である、*Bacillus lentus*からのスプチリシンのごとき他のスプチリシンにおける*Bacillus amyloliquefaciens*スプチリシン(1989年7月13日に公開されたPCT公開番号W089/06279)、ここに好ましいプロテアーゼ前駆体酵素、またはPB92というスプチリシン(EP 0 328 299)の対応する同等のアミノ酸残基を規定するのに用いることができる。これらのスプチリシンのあるもののアミノ酸配列は、保存された残基の最大相同性を生じる*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの配列と共に図6および図7で整列される。分かるように、*Bacillus amyloliq* 30
uefaciens スプチリシンと比較して*Bacillus lentus*の配列には多数の欠失がある。かくして、例えば、他のスプチリシンにおける*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンでのVal165についての同等のアミノ酸は*B. lentus*および*B. licheniformis*についてのイソロイシンである。

【0030】

「同等の残基」は、その三次構造がX-線結晶解析によって決定されている前駆体プロテアーゼについての三次構造のレベルでの相同性を決定することによっても定義することができる。同等の残基は、前駆体プロテアーゼおよび*Bacillus amyloliq* 40
uefaciens スプチリシンの特定のアミノ酸残基の主要鎖原子の2以上の原子座標(N上のN、CA上のCA、C上のCおよびO上のO)が0.13nm以内にあり、好ましくは、整列後に0.1nmであるものと定義される。整列は、最良のモデルが、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンに対して問題のプロテアーゼの非水素蛋白質原子の原子座標の最大重複を与えるように配位させ位置付けされた後に達成される。最良のモデルは、最高の利用可能な分解における実験的解析データについての最低のR因子を与える結晶モデルである。

【0031】

R因子 =
$$\frac{h | F_o(h) | - | F_c(h) |}{h | F_o(h) |}$$

Bacillus amyloliquefaciens スプチリシンの特異的残基に 50

類似して機能的な同等の残基は、それらが、定義されたおよび *Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの特異的残基に帰属される方法で、蛋白質構造、基質結合または触媒作用を改変し、修飾またはそれに寄与するような立体配座を採り得る前駆体プロテアーゼのアミノ酸と定義される。さらに、それらは、所与の残基の主要鎖原子は相同位置を占めることを基礎とした同等の基準を満足できないが、残基の側鎖原子の少なくとも2つの原子座標は *Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの対応する側鎖原子の 0.13 nm 以内にある程度まで類似の位置を占める（それにつき三次構造が X-線結晶解析によって得られている）前駆体プロテアーゼの残基である。 *Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの三次元構造の座標は EPO 公開番号 0 251 446（米国特許第 5,182,204 号と同様、引用によりその開示を本明細書に一体化させる）に記載されており、前記で概説したように使用して、三次構造のレベルにつき同等の残基を決定することができる。

10

【0032】

置換につき同定される残基のいくつかは保存された残基であり、他方、他のものはそうではない。保存されていない残基の場合は、1以上のアミノ酸の置換は、天然で見いだされるものに対応しないアミノ酸配列を有する変異体を生じる置換に限定される。保存された残基の場合には、かかる置換の結果、天然に生じる配列はもたらされないはずである。本発明のプロテアーゼ変異体は、プロテアーゼ変異体の成熟形ならびにかかるプロテアーゼ変異体のプロ-およびプレプロ-形態を含む。プレプロ-形態は好ましい構築である。というのは、これは、プロテアーゼ変異体の発現、分泌および成熟を容易とするからである。

20

【0033】

「プロ配列」とは、除去される結果、プロテアーゼの「成熟」形態が出現するプロテアーゼの成熟形態の N-末端部分に結合したアミノ酸の配列をいう。多くの蛋白質分解酵素は、翻訳プレ酵素産物として天然で見いだされ、翻訳後プロセッシングの不存在下では、このようにして発現される。プロテアーゼ変異体を生産するための好ましいプロ配列は、 *Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの推定プロ配列であるが、他のプロテアーゼプロ配列も使用することができる。

30

【0034】

「シグナル配列」または「プレ配列」は、プロテアーゼの N-末端部分にまたはプロテアーゼの成熟またはプロ形態の分泌に参画できるプロプロテアーゼの N-末端部分に結合したアミノ酸のいずれの配列もいう。シグナル配列のこの定義は機能的なものであり、天然条件下でプロテアーゼの分泌の実行に参画するプロテアーゼ遺伝子の N-末端部分によってコードされた全てのアミノ酸配列を含むことを意味する。本発明は、ここに定義されたプロテアーゼ変異体の分泌を実行するためにかかる配列を利用する。1つの可能なシグナル配列は、 *Bacillus lentus* (ATCC 21536) からのスプチリシンのシグナル配列の残りに融合した *Bacillus subtilis* スプチリシンのシグナル配列の最初の7つのアミノ酸残基を含む。

40

【0035】

プロテアーゼ変異体の「プレプロ」形態は、プロテアーゼのアミノ末端に作動可能に連結されたプロ配列およびプロ配列のアミノ末端に作動可能に連結された「プレ」または「シグナル」配列を有するプロテアーゼの成熟形態よりなる。

【0036】

「発現ベクター」とは、適当な宿主中の当該 DNA の発現が可能な適当な制御配列に作動可能に連結された DNA 配列を含有する DNA 構築体をいう。かかる制御配列は、転写を行うためのプロモーター、かかる転写を制御するための所望のオペレーター配列、適当な mRNA リボソーム結合部位をコードする配列および転写および翻訳の終止を制御する配列を含む。ベクターはプラスミド、ファージ粒子、または単純に可能なゲノムインサートでよい。一旦適当な宿主に形質転換されたならば、ベクターは宿主ゲノムとは独立して複

50

製、機能でき、あるいはある場合には、ゲノム自体に組み込まれ得る。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、時々、相互交換可能に使用される。というのは、プラスミドは現在ではベクターの最も通常に使用される形態だからである。しかしながら、本発明は、同等の機能を供し、当該分野で知られているまたは知られるようになった発現ベクターのかかる他の形態を含むことを意図する。

【0037】

本発明で使用される「宿主細胞」は、一般に、好ましくは米国特許RE34,606号に開示されている方法によって操作されて、それらを酵素的に活性なエンドペプチダーゼを分泌できないようにしている原核生物または真核生物宿主である。プロテアーゼを発現するための好ましい宿主細胞は、酵素的に活性な中性プロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ（スブチリシン）において欠乏している *Bacillus* 株BG2036である。株BG2036の構築は米国特許第5,264,356号に詳細に記載されている。プロテアーゼを発現するための他の宿主細胞は、*Bacillus subtilis* 1168（引用して、その開示を本明細書に一体化させる米国特許RE34,606号および米国特許第5,264,366号にも開示されている）ならびに *B. licheniformis*, *B. lentus* 等のごときいずれかの適当な *Bacillus* 株を含む。

10

【0038】

宿主細胞は、組換えDNA技術を用いて構築されたベクターで形質転換またはトランスフェクトされる。かかる形質転換宿主細胞は、プロテアーゼ変異体をコードするまたは所望のプロテアーゼ変異体を発現するベクターを複製できる。プロテアーゼ変異体のプレ-またはプレプロ-形態をコードするベクターの場合、かかる変異体は、発現されると、典型的には、宿主細胞から宿主細胞培地に分泌される。

20

【0039】

2つのDNA領域の間を記載する場合に「作動可能に連結した」とは、単に、相互に機能的に関連することを意味する。例えば、プレ配列は、もし当該シグナル配列の切断に最も恐らくは関与する蛋白質の成熟形態の分泌に関与するシグナル配列としてそれが機能すれば、ペプチドに作動可能に連結している。プロモーターは、もしそれが配列の転写を制御すれば、コーディング配列に作動可能に連結している；リボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を可能とするように位置していれば、コーディング配列に作動可能に連結している。

30

【0040】

天然に生じる前駆体プロテアーゼをコードする遺伝子は、当業者に知られている一般的な方法に従って得ることができる。該方法は、一般的には、注目するプロテアーゼの領域をコードする推定配列を有する標的プローブを合成し、該プロテアーゼを発現する生物からゲノムライブラリーを調製し、次いで、プローブにハイブリダイズさせることによって、注目する遺伝子につきライブラリーをスクリーニングすることを含む。次いで、陽的にハイブリダイズするクローンをマップし、配列決定する。

【0041】

次いで、クローン化プロテアーゼを用いて、宿主細胞を形質転換してプロテアーゼを発現させる。次いで、プロテアーゼ遺伝子を高コピー数プラスミドに連結する。このプラスミドは、それがプラスミド複製に必要なよく知られたエレメント：（もしそれが宿主によって認識されれば、すなわち転写されれば、遺伝子自身の相同プロモーターとして供給することができる）問題の遺伝子に作動可能に連結されたプロモーター、転写終止および外因性であって、プロモーター遺伝子、望ましくは、抗生物質含有培地での増殖によってプラスミド-感染宿主細胞の連続的培養維持を可能とする抗生物質耐性遺伝子のごとき選択遺伝子の内因性ターミネーター領域によって供給される（ある種の真核生物宿主細胞におけるプロテアーゼ遺伝子からの宿主によって転写されるmRNAの安定性に必要な）ポリアデニル化シグナルを含有する意味で宿主中で複製する。また、高コピー数プラスミドは、宿主用の複製起点を含有し、それにより、染色体制限なくして非常に多数のプラスミドが

40

50

細胞質中で生成することを可能とする。しかしながら、複数コピーのプロテアーゼ遺伝子を宿主ゲノムに取り込むのは本明細書の範囲内のものである。これは、相同組換えに特に感受性の原核生物および真核生物生物によって容易とされる。

【0042】

該遺伝子は天然 B. lentus 遺伝子であり得る。別法として、天然に生じるまたは突然変異体前駆体プロテアーゼをコードする合成遺伝子を生産することができる。かかるアプローチにおいて、前駆体プロテアーゼの DNA および/またはアミノ酸配列が決定される。複数の重複する合成一本鎖 DNA 断片がしかる後に合成され、ハイブリダイゼーションおよび連結に際して、それは前駆体プロテアーゼをコードする合成 DNA を生じる。合成遺伝子構築の例は、出典明示して本明細書に一体化させる米国特許第 5,204,015 号の実施例 3 に記載されている。

10

【0043】

一旦、天然に生じるまたは合成前駆体プロテアーゼ遺伝子がクローン化されれば、多数の修飾を行って、天然に生じる前駆体プロテアーゼの合成を超えて遺伝子の使用を増強させる。かかる修飾は、米国特許 RE34,606 号および EPO 公開番号第 0251446 号に開示されている組換えプロテアーゼの生産およびここに記載されたプロテアーゼ変異体の生産を含む。

【0044】

以下のカセット突然変異誘発方法を用いて、本発明のプロテアーゼ変異体の構築を容易とすることができるが、他の方法を用いることもできる。まず、該プロテアーゼをコードする天然に生じる遺伝子が得られ、全部または一部が配列決定される。次いで、該配列を、コードされた酵素における 1 以上のアミノ酸の突然変異（欠失、挿入または置換）を作成するのが望ましい点につきスキャンする。この点にフランキングする配列を、遺伝子の短いセグメントを、発現された場合に種々の突然変異体をコードするオリゴヌクレオチドプールで置き換えるための制限部位の存在につき評価する。かかる制限部位は、好ましくは、遺伝子セグメントの置き換えを容易とるようにプロテアーゼ遺伝子内のユニークな部位である。しかしながら、プロテアーゼ遺伝子において総じて豊富ではないいずれの便宜な制限部位も用いることができる。但し、制限消化によって生じた遺伝子断片は適当な配列において再度組み立てることができるものとする。もし制限部位が選択された点（10 ないし 15 ヌクレオチド）から便宜な距離内の位置に存在しないならば、かかる部位は、リーディングフレームまたはコードされたアミノ酸も最終構築中で変化しないように、遺伝子中のヌクレオチドを置換することによって生成させる。所望の配列に適合させるようにその配列を変化させるための遺伝子の突然変異は、一般的に知られている方法により M13 プライマー伸長によって達成される。適当なフランキング領域を位置決定し、2つの便宜な制限部位配列に到達するのに必要な変化を評価する仕事は、遺伝暗号の縮重、遺伝子の制限酵素地図および非常に多数の異なる制限酵素によってルーチン的になされる。もし便宜なフランキング制限部位が利用できるならば、前記方法は、部位を含有しないフランキング配列に関してのみ使用する必要があることに注意されたし。

20

30

【0045】

一旦天然に生じる DNA または合成 DNA がクローン化されたならば、突然変異させるべき位置にフランキングする制限部位を、同族制限酵素で消化し、複数の末端相補性オリゴヌクレオチドカセットを遺伝子に連結する。突然変異誘発はこの方法によって単純化される。何故ならば、オリゴヌクレオチドの全ては同一制限部位を有するように合成でき、制限部位を生じさせるために合成リンカーは必要ではないからである。

40

【0046】

本明細書中で用いるごとく、蛋白質分解活性は、活性な酵素 1 ミリグラム当たりのペプチド結合の加水分解の速度と定義される。蛋白質分解活性を測定するための多くのよく知られた手法が存在する（K. M. Kalisz, 「Microbial Proteinases」, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, A. Fiechter ら, 1988）

50

。修飾された蛋白質分解活性に加えて、またはその代替法として、本発明の変異体酵素は K_m 、 K_{cat} 、 K_{cat}/K_m 比のごとき他の修飾された特性および/または修飾された基質特異性および/または修飾された pH 活性プロティールを有し得る。これらの酵素は、例えば、ペプチドの合成において、またはランドリー用途のごとき加水分解プロセスのために存在することが予測される特別の基質のために仕立てることができる。

【0047】

本発明の1つの態様において、当該目的は、少なくとも1つの洗剤処方において、および/または少なくとも1つの洗浄条件の組下で、前駆体プロテアーゼと比較して、改変された、好ましくは改良された洗浄性能を有する変異体プロテアーゼを確保することである。

【0048】

プロテアーゼ変異体が暴露されるであろう種々の洗剤処方、洗浄水容量、洗浄水温度および洗浄時間の長さを含めた種々の洗浄条件がある。例えば、異なる領域で使用される洗剤処方は、洗浄水中に存在するその関連成分の異なる濃度を有する。例えば、欧州洗剤は、典型的には、洗浄水中に約 4500 - 5000 ppm の洗剤成分を有するが、日本の洗剤は、典型的には、洗浄水中にほぼ 667 ppm の洗剤成分を有する。北米では、特に米国では、洗剤は典型的には洗浄水中に存在する約 975 ppm の洗剤成分を有する。

【0049】

低い洗剤濃度系は、約 800 ppm 未満の洗剤成分が洗浄水に存在する洗剤を含む。日本の洗剤は、典型的には、低い洗剤濃度系であると考えられる。というのは、それらは洗浄水中の存在するほぼ 667 ppm の洗剤成分を有するからである。

【0050】

中程度の洗剤濃度は、約 800 ppm および約 2000 ppm の間の洗剤成分が洗浄水に存在する洗剤を含む。北米洗剤は、一般に、中程度の洗剤濃度であると考えられる。というのは、それらは、洗浄水中に存在するほぼ 975 ppm の洗剤成分を有するからである。ブラジルは、典型的には、洗浄水に存在するほぼ 1500 ppm の洗剤成分を有する。

【0051】

高い洗剤濃度系は、約 2000 ppm より大の洗剤成分が洗浄水に存在する洗剤を含む。欧州の洗剤は、一般に、高い洗剤濃度系であると考えられる。というのは、それらは、洗浄水中にほぼ 4500 - 5000 ppm の洗剤成分を有するからである。

【0052】

ラテンアメリカの洗剤は、一般に、高いセッケン泡のホスフェートビルダー洗剤であり、ラテンアメリカで使用される洗剤の範囲は、中程度および高い洗剤濃度双方に入る得る。というのは、それらは、洗浄水中に 1500 ppm ないし 6000 ppm の洗剤成分の範囲だからである。前記したごとく、ブラジルは、典型的には、洗浄水中に存在するほぼ 1500 ppm の洗剤成分を有する。しかしながら、他のラテンアメリカ国に限定されず、他の高いセッケン泡ホスフェートビルダー洗剤地理は、洗浄水中に存在する約 6000 ppm までの洗剤成分の高い洗剤濃度系を有し得る。

【0053】

前記に徴すれば、世界中の典型的な洗浄溶液中の洗剤の濃度は、約 800 ppm 未満の洗剤組成物（「低い洗剤濃度の地理」）、例えば、日本における約 667 ppm から、約 800 ppm および約 2000 ppm の間（「中程度の洗剤濃度地理」）、例えば、米国における約 975 ppm およびブラジルにおける約 1500 ppm まで、約 2000 ppm より大（「高い洗剤濃度地理」）、例えば、欧州における約 4500 ないし約 5000 ppm および高いセッケン泡ホスフェートビルダー地理における約 6000 ppm の範囲であることは明らかである。

【0054】

典型的な洗浄溶液の濃度は経験的に決定される。例えば、米国においては、典型的な洗浄マシンは、約 64.4 L 容量の洗浄溶液を保持する。従って、洗浄溶液内で約 975 ppm の洗剤の濃度を獲得するためには、約 62.79 g の洗剤組成物が 64.4 L の洗浄溶液に添加されなければならない。この量は、洗浄を入れた測定カップを用いて消費者によ

10

20

30

40

50

て洗浄水に測定される典型的量である。

【0055】

さらなる例として、異なる地理は異なる洗浄温度を用いる。日本における洗浄水の温度は、典型的には、欧州で用いられるものよりも低い。

【0056】

従って、本発明の1つの態様は、少なくとも1組の洗浄条件において改良された洗浄性能を示すプロテアーゼ変異体を含む。

【0057】

本発明のもう1つの態様において、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンの62、212、230、232、252および257よりなる群から選択される1以上のアミノ酸残基位置に対応する残位置の置換が酵素の洗浄性能を改良するのに重要であると判断された。

10

【0058】

これらの置換は、好ましくは、*Bacillus lentus*（組換えまたは天然タイプ）スプチリシンでなされるが、置換は*Bacillus* プロテアーゼでなすこともできる。

【0059】

変異体プロテアーゼで得られたスクリーニング結果に基づき、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリシンにおける注目される突然変異は、これらの酵素の蛋白質分解活性、性能および/または安定性ならびにかかる変異体酵素の清浄または洗浄性能で重要である。

20

【0060】

本発明のプロテアーゼ変異体の多くは種々の洗剤組成物またはシャンプーもしくはローションのごとき個人のケア処方を処方するのに有用である。多数の公知化合物が、本発明のプロテアーゼ突然変異体を含む組成物で有用な適当な界面活性剤である。これらは、Barry J. Andersonに対する米国特許第4,404,128号およびJiri Florarに対する米国特許第4,261,888号に開示されているごときノニオン、アニオン、カチオンまたは両性洗剤を含む。適当な洗剤処方は、（先に出典明示して本明細書に一体化させる）米国特許第5,204,015号の実施例7に記載されているものである。該技術は、清浄組成物として使用することができる異なる処方に馴染み深い。典型的な清浄組成物に加えて、本発明のプロテアーゼ変異体は天然または野生型プロテアーゼが使用されるいずれかの目的で使用することができるのは容易に理解される。かくして、これらの変異体は、例えば、棒もしくは液体セッケン適用、ディッシュケア処方、コンタクトレンズ清浄溶液もしくは製品、ペプチド加水分解、廃物処理、テキスタイル適用において、蛋白質生産における融合・切断酵素として使用することができる。本発明の変異体は、（前駆体と比較して）洗剤組成物における増強された性能を含むことができる。本明細書で用いるごとく、洗剤における増強された性能は、標準的な洗浄サイクル後に通常の評価によって測定して、ガラスまたは血液のごときある種の酵素感受性汚染の清浄の増大と定義される。

30

【0061】

本発明のプロテアーゼは、約0.01ないし5重量%（好ましくは0.1%ないし0.5%重量）のレベルで6.5および12.0の間のpHを有する公知の粉末化および液体洗剤に処方することができる。これらの洗剤清浄組成物は、公知のプロテアーゼ、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のごとき他の酵素、ならびにビルダーおよび安定化剤を含むこともできる。

40

【0062】

本発明のプロテアーゼの通常清浄組成物への添加は、いずれの特別な使用制限も生じない。換言すれば、洗剤に適したいずれの温度およびpHも、該pHが前記範囲内であって、該温度が記載されたプロテアーゼの変性温度未満である限り本発明の組成物で適当である。加えて、本発明のプロテアーゼは、再度、単独またはビルダーおよび安定化剤と組み

50

合わせて、洗剤なくして清浄組成物で使用することができる。

【0063】

また、本発明は、本発明のプロテアーゼ変異体を含有する清浄組成物に関する。該清浄組成物は、該清浄組成物は、さらに、清浄組成物で通常使用される添加剤を含有することができる。これらは、限定されるものではないが、ブリーチ、界面活性剤、ビルダー、酵素およびブリーチ触媒から選択することができる。いずれの添加剤が組成物に含有されるのに適するかは当業者に容易に明らかであろう。本明細書で供するリストは、断じて、それに尽きるものではなく、適当な添加剤の例としてのみ採用すべきである。また、組成物中の酵素および他の成分、例えば、界面活性剤に適合する添加剤のみを使用することは当業者に容易に明らかであろう。

10

【0064】

存在する場合、清浄組成物に存在する添加剤の量は約0.01ないし99.9%、好ましくは約1%ないし約95%、より好ましくは約1%ないし約80%である。

【0065】

本発明の変異体プロテアーゼは、例えば、米国特許第5,612,055号；米国特許第5,314,692号および第5,147,642号に記載された動物飼料添加物の一部のごとき動物飼料に含めることができる。

【0066】

本発明の1つの態様は、本発明の変異体プロテアーゼを含むテキスタイルの処理用の組成物である。該組成物は、例えば、RD216,034号；EP134,267；US4,533,359；およびEP344,259のごとき刊行物に記載されている絹または羊毛を処理するのに使用することができる。

20

【0067】

以下のものは例として提示され、請求の範囲の範囲の限定として解釈されるべきではない。

【0068】

本明細書で引用した全ての刊行物および特許はここに引用してその全体を本明細書に一体化させる。

【0069】

【実施例】

30

(実施例1)

当該分野でよく知られた方法を用い、非常に多数のプロテアーゼ変異体を生産し、精製した。全ての突然変異は*Bacillus lentus* GG36スブチリシンでなした。変異体は表4に示す。

【0070】

【表29】

表 4 (続き)

N76D	S103A	V104I	V104I	Q12R	M222S	H249R															
N76D	S103A	V104I	V104I	N173R	M222S																
N76D	S103A	V104I	V104I	M222S	Y263F																
L21M	N76D	S103A	S103A	V104I	M222S	K237R	Y263F														
N76D	S103A	V104I	V104I	Q109R	M222S																
N76D	S103A	V104I	V104I	Q109R	M222S	E271D															
G61R	N76D	S103A	S103A	V104I	M222S																
N76D	S103A	V104I	V104I	Q137R	M222S																
N76D	S103A	V104I	V104I	Q109R	M222S	N248S															
N76D	S103A	V104I	V104I	M222S	H249R																
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	N261D													
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	S141N	G159D	Q236H	Q245R	T255S												
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	R247H													
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	G159D	A174V	N204D	Q236H	Q245R												
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R													
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	A133V	G159D	N218D	Q236H	Q245R												
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R													
V68A	N76D	S103A	S103A	V104I	G159D	A194I	V203A	Q236H	Q245R												

【表 3 7】

10

20

30

40

表 4 (続き)

Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215V	M222S	Q245R						
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	V227A	Q245R	L262S					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215T	M222S	Q245R						
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D						
N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R								
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	N218D	M222S	Q245R	L262S	N269D				
Q12R	S57P	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	K251Q					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R				
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A						
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	P210S	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	S103A	V104I	N116D	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D						
R10C	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	V203E	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R						
V68A	N76D	I79N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	N183D	A232V	Q236H	Q245R						

【表 3 9】

10

20

30

40

表 4 (続き)

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G			
V68A	S87R	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R							
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R					
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R				
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R		
												Q245R

【表 4 1】

10

20

30

40

表 4 (続き)

G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	S99N	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

【表 4 2】

10

20

30

40

表4 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	K251V	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L					
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				

【表 4 3】

10

20

30

40

表 4 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D		
I8V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N269D	
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260E	
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K			
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K			
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A

【表 4 4】

10

20

30

40

表 4 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				

【表 4 5】

10

20

30

40

表 4 (続き)

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	V205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A194S	A232V	Q236H	Q245R	L257V			

【表 4 7】

10

20

30

40

表 4 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	N261W		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W				
S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
Q12R	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R					

【表 4 8】

表 4 (続き)

S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q245R	Q245R	N248D	N252K
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R							
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	

【表 5 0】

10

20

30

40

表 4 (続き)

N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260A			
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q

(実施例 2)

実施例 1 で製造した非常に多数のプロテアーゼ変異体を、「An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preferred detergent composition」、米国 Serial No. 60/068,796 に記載されたマイクロスウォッチアッセイを用いて、2つのタイプの洗剤および洗浄条件で性能につきテストした。

【0071】

表 5 はアッセイした変異体プロテアーゼおよび2つの異なる洗剤でテストした結果をリストする。A 欄では、洗剤はガロン当たり3グレインの混合 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ 硬度を含有する溶液中の 0.67 g/l の濃過された Ariel Ultra (Procter

10

20

30

40

50

& Gamble, Cincinnati, オハイオ州, 米国)であり、0.3 ppmの酵素を20の各ウェルで用いた。B欄では、洗剤はガロン当たり15グレインの混合されたCa²⁺/Mg²⁺硬度を含有する溶液中の3.38g/lの濾過されたAriel Ultra (Procter & Gamble, Cincinnati, オハイオ州, 米国)であり、0.3 ppmの酵素を40で各ウェルで用いた。

【0072】

【表51】

表5

															A	B
N76D	S103A	V104I													1	1
S103A	V104I	A228T													0.56	1.11
V68A	S103A	V104I	G159D												1.41	1.85
V68A	S103A	V104I	G159D												2.77	1.20
V68A	S103A	V104I	G159D												2.26	1.67
V68A	S103A	V104I	N140D												2.96	1.42
N43S	V68A	S103A	V104I												1.91	1.80
N43K	V68A	S103A	V104I												2.05	1.78
N43D	V68A	S103A	V104I												2.00	1.34
V68A	S103A	V104I	G159D												2.38	1.67
V68A	S103A	V104I	G159D												2.83	0.53
V68A	S103A	V104I	G159D												2.87	0.20
V68A	S103A	V104I	G159D												2.56	1.41
V68A	S103A	V104I	G159D												3.97	0.47
V68A	S103A	V104I	G159D												3.35	1.28
G61E	V68A	S103A	V104I												3.77	0.09

【表52】

10

20

30

40

表 5 (続き)

N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		3.50	0.47
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.81	1.46
N76D	A98E	S103A	V104I								1.56	0.28
V4E	N76D	S103A	V104I								1.22	0.33
N76D	N77D	S103A	V104I								1.13	0.36
A16T	N76D	S103A	V104I	N248D							1.22	0.43
A1E	N76D	S103A	V104I								1.12	0.32
N76D	S103A	V104I	N261D								1.54	0.33
N76D	S103A	V104I	S216C								1.04	0.13
N76D	N77D	S103A	V104I	A174V							1.09	0.35
T38S	N76D	S103A	V104I	K237Q							1.11	0.55
N76D	S103A	V104I	N183D								1.50	0.25
R19L	N76D	S103A	V104I								1.11	0.48
R19C	N76D	S103A	V104I								1.05	0.19
N76D	S103A	V104I	N184D								1.32	0.29
N76D	S103A	V104I	N252D								1.19	0.53
N76D	S103A	V104I	S259C								0.92	0.12
N76D	S103A	V104I	K251T								1.31	0.43

【 表 5 3 】

10

20

30

表 5 (続き)

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R				3.34	0.02
V68A	N76D	S103A	V104I	A133V	G159D	N218D	Q236H	Q245R			3.28	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2.91	0.58
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A194I	V203A	Q236H	Q245R			2.86	0.13
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		1.30	1.73
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I							1.83	1.13
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R			1.28	1.54
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V			3.72	0.8
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V					0.6	1.5
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H							1.91	0.15
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1.92	1.09
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R			3.57	0.99
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R			1.74	1.76
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R			3.15	1.06
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R		2.33	1.92
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			1.67	1.45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			2.16	1.72
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G		2.77	1.59

【 表 5 〆 】

表 5 (続き)

V68A	N76D	S87R	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V	2.62	1.49
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G		2.92	0.68
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W		2.17	1.37
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R				0.48	1.2
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R		2.92	0.76
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	2.09	1.86
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R					0.51	1.44
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R			1.60	1.14
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R	1.35	1.29
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S	1.92	1.81
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R	1.17	1.53
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R		2.01	1.72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R		2.09	1.62
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R		3.00	1.08
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	ND	ND
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R						1.01	1.23
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	H249R					0.57	1.65
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S						0.86	0.46

【 表 5 9 】

表5 (続き)

Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A				0.77	1.60
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	P210S	Q245R				0.73	1.66
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2.09	0.86

10

20

30

(実施例3)

表6は実施例1でアッセイした変異体プロテアーゼおよび4つの異なる洗剤でテストした結果をリストする。実施例2におけるのと同じの性能テストを以下の洗剤で記載した変異体プロテアーゼに対してなした。A欄では、洗剤はガロン当たり3グレインの混合Ca²⁺/Mg²⁺硬度を含有する溶液中の0.67g/lの濾過されたAriel Ultra (Procter & Gamble, Cincinnati, オハイオ州, 米国)であり、0.3ppmの酵素を20の各ウェルで用いた。B欄では、洗剤はガロン当たり15グレインの混合されたCa²⁺/Mg²⁺硬度を含有する溶液中の3.38g/lの濾過されたAriel Futur (Procter & Gamble, Cincinnati, オハイオ州, 米国)であり、0.3ppmの酵素を40で各ウェルで用いた。C欄では、ガロン当たり8グレインの混合Ca²⁺/Mg²⁺硬度を含有する溶液中の3.5g/lのHSP1洗剤 (Procter & Gamble, Cincinnati, オハイオ州, 米国)であり、0.3ppmの酵素を20の各ウ

40

50

エルで用いた。D欄では、ガロン当たり3グレインの混合されたCa²⁺/Mg²⁺硬度を含有する溶液中の1.5ml/l Tide KT洗剤(Procter & Gamble, Cincinnati, オハイオ州, 米国)であり、0.3ppmの酵素を20で各ウェルで用いた。

【0073】

【表61】

	A	B	C	D
N76D	1	1	1	1
S103A	1.44	1.41	1.39	1.26
V68A	2.34	1.49	1.65	2.35
V68A	1.05	1.41	1.20	1.19
G20R	1.81	1.72	1.66	1.31
V68A	2.19	1.38	1.60	2.02
V68A	2.91	0.91	1.48	2.70
V68A	0.93	1.39	1.23	0.80
V68A	2.67	0.86	1.41	2.88
V68A	2.22	1.43	1.55	1.78
V68A	2.30	1.43	1.63	2.07
V68A	2.31	1.47	1.62	2.01
V68A	2.63	0.56	1.36	2.66
V68A	2.75	0.50	1.27	2.78
V68A	1.11	1.38	1.31	0.75

表6

10

20

30

40

【表62】

表 6 (続き)

V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.27	0.15	1.12	2.01
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.37	1.42	1.37	1.06
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.14	1.40	1.53	1.54
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.22	1.58	1.47	1.20
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.12	1.36	1.56	1.56
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.88	1.36	1.47	1.87
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.24	0.33	1.07	2.89
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.43	0.46	1.29	2.42
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				0.98	1.46	1.24	0.95
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F					2.52	1.00	1.42	2.42
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L					2.05	1.13	1.30	1.85
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				2.61	0.91	1.43	3.22
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V				2.18	1.36	1.58	1.72
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N				2.14	1.46	1.59	1.65
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E				2.46	0.77	1.33	2.58
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R				1.31	1.52	1.46	0.94
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R				1.21	1.41	1.31	1.05
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R				1.51	1.41	0.85	1.18

【表 6 3】

10

20

30

40

表 6 (続き)

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D				2.56	0.59	1.30	2.64
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R				1.02	1.47	1.37	0.84
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						1.04	1.50	1.32	0.73
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.60	0.93	1.41	2.67
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.31	1.38	1.53	1.57
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.83	0.25	1.33	2.44
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.10	0.97	1.36	2.29
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K					1.37	1.54	0.89	1.27
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.30	1.50	1.62	1.56
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.72	1.72	1.67	1.15
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		1.32	1.30	1.11	1.28
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.50	0.83	1.43	2.25
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.20	0.07	ND	1.28
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.47	0.60	ND	1.45
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	Y167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.32	0.79	ND	1.55
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					3.14	0.41	ND	1.40
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.71	0.68	ND	1.72
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.97	0.68	ND	1.71

【表 6 4】

10

20

30

40

表 6 (続き)

S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K												3.50	0.27	ND	1.90	
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													2.24	1.80	ND	1.33
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													3.35	1.33	ND	1.69
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													4.88	0.55	ND	2.71
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													4.22	1.05	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R													5.45	2.19	ND	2.58
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													3.76	2.16	ND	1.82
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													7.42	0.13	ND	2.46
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													5.43	1.36	ND	2.84
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													5.12	1.21	ND	3.97
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													6.38	0.95	ND	3.09
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K											3.17	2.83	ND	2.60
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K												4.38	1.92	ND	2.54
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K												3.05	2.61	ND	1.10
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K												4.09	2.46	ND	2.55
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K													2.32	2.08	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K													2.34	2.04	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K													2.24	2.11	ND	1.95

【表 6 5】

10

20

30

40

表 6 (続き)

K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.81	1.56	ND	2.47
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.30	2.09	ND	1.82
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			2.63	2.66	ND	1.44
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.01	2.78	ND	1.99
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q	7.74	0.94	ND	5.39
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.14	1.41	ND	1.92
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.97	0.57	ND	1.36
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.41	1.86	ND	1.01
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.42	0.50	ND	2.88
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.86	1.20	ND	3.84
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.87	2.10	ND	3.19
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.98	2.67	ND	2.17
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.02	0.41	ND	2.25
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			6.63	2.07	ND	2.08
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.03	2.48	ND	2.25
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.96	2.76	ND	2.34
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K							2.74	2.10	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R									2.11	2.35	ND	1.49

【表 6 6】

10

20

30

40

表 6 (続き)

N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.42	0.71	ND	2.58
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.59	1.32	ND	1.61
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.30	1.23	ND	9.0
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.94	0.71	ND	1.08
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.17	0.83	ND	2.35
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.15	1.38	ND	1.77
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.07	0.07	ND	1.45
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.26	1.16	ND	3.05
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.82	1.34	ND	1.08
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.16	1.47	ND	1.20
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.79	1.38	ND	1.01
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.15	1.18	ND	8.7
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.47	1.23	ND	1.03
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.90	1.38	ND	1.05
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							1.55	1.51	ND	1.23
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.96	1.30	ND	1.10
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.49	0.80	ND	1.25
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			420	7	128	ND

【表 6 7】

10

20

30

40

表 6 (続き)

S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			347	60	145	ND
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	Y167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			432	79	155	ND
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					314	41	140	ND
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					271	68	172	ND
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					297	68	171	ND
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					350	27	190	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					224	180	133	ND
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					335	133	169	ND
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					488	55	271	ND
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					422	105	240	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R					545	219	258	ND
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					376	216	182	ND
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					742	13	246	ND
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					543	136	284	ND
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					512	121	397	ND
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					638	95	309	ND
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			317	283	260	ND
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				438	192	254	ND

【表 6 8】

10

20

30

40

表 6 (続き)

S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				305	261	110	ND
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				409	246	255	ND
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					232	208	240	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K					234	204	186	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K					224	211	195	ND
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					281	156	247	ND
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					230	209	182	ND
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			263	266	144	ND
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			201	278	199	
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q	774	94	539	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				514	141	192	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				497	57	136	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				241	186	101	ND
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				442	50	288	ND
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				586	120	384	ND
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				587	210	319	ND
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			298	267	217	ND
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			402	41	225	ND

【表 6 9】

10

20

30

40

表6 (続き)

S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				663	207	208	ND
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					203	248	225	ND
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				296	276	234	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K								274	210	186	ND
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R										211	235	149	ND
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				342	71	258	ND
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					259	132	161	ND
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					130	123	90	ND
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					294	71	108	ND
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				317	83	235	ND
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				215	138	177	ND
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				307	7	145	ND
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					226	116	305	ND
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					182	134	108	ND
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					216	147	120	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					179	138	101	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					115	118	87	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					147	123	103	ND

【表70】

10

20

30

40

表 6 (続き)

S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				190	138	105	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							155	151	123	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				196	130	110	ND
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				249	80	125	ND

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリンについての DNA およびアミノ酸配列ならびにこの遺伝子の部分的制限地図を示す。

【図 2】 図 2 は、*Bacillus amyloliquefaciens* スプチリンについての DNA およびアミノ酸配列ならびにこの遺伝子の部分的制限地図を示す。

【図 3】 図 3 は、図 2 の続きを示す。

【図 4】 図 4 は、図 3 の続きを示す。

50

【 3 】

50 Pro Asn Asp
 549 Ala Gly GCA GGC GGA AGC AGC AGC GGT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC TDT CAC GGA ACT CAC GTT GGC
 70 Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys
 824 GGC ACA GTT GGC GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGC GTT TTA GGC GTT GCG GCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA
 90 Ser Ala
 110 Asp Ala 100 Thr Val Ala Ala Leu Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys
 699 GGT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GCA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG
 140
 120 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Pro Ser Gly Ser Thr Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Met
 774 GAC GTT ATT AAC AIG Ser Leu Gly GCA GTC GGT TCT GGT TCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GGC GTT GCA
 140
 150 Ser Thr 160 Thr Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly
 849 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GGC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT
 190
 170 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Val Asp Ser Ser Asn Glu Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro
 924 AAA TAC CCT TCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT
 210
 999 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Glu Ser Thr Leu Phe Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC AGC CTT CCT GCA AAC AAA TAC GCG GCG TAC AAC GGT
 240
 220 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
 1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

【 4 】

250 Gln 270
 1149 Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn
 CAA GTC CCG AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTC TAC TAT GGA AAA GCG GCG ATC AAC
 275 Val Gln Ala Ala Gln OC
 1224 GTA CAG CCG GCA GCT CAG TAA AACATAAAMAGCGCGCTTGGCCGCCGGTITTTTTCCTCCGGCATGTCACGCGCTC
 1316 ATATCCAGCGATGGCTCGTCAAAATTTTACGAGAACGGCGGCTTACCGCGCTCAGTCCCGGTACGGCCAGCTCTGAAGGTCATCATGCGCG
 1416 CTTCGCCGTTCCGGTACGCTAATGCCGTACGGTACGGCGCGCTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGAATC

【 5 】

Bacillus amyloliquefaciens からのスプテリシンにおける保存された残基

1 A Q S V P . G A P A . H 20
 21 . T G S . V K V A V . D . G H P 40
 41 D L . . . G G A S . V P Q D 60
 61 . N . H G F H V A G F A A L N N S I G 80
 81 V L G V A P S A . L Y A V K V L G A G 100
 101 S G . . . S . L 110 G E W A . N 120
 121 V . N . S L G . P S A 140
 141 G V . V V A A . G N . G 160
 161 Y P Y Y V G P 180
 181 D . . . N . . . S P S G L D A 200
 201 P G V . . . Q S . P P G K N G 220
 221 S M A . P H V A G A A A L K L G 240
 241 Q . P L . N F L G 260
 261 . . . Y G . G L . N A A 270

【 6 】

B. amyloliquefaciens
 B. subtilis
 B.licheniformis
 B. lentus
 からのスプテリシン配列の比較

01 A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
 A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
 A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P
 A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P
 10 20 30
 41 D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G
 D L N V R G G A S P V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
 D L N V R G G A S P V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
 D L N I R G G A S P V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T I A A L N N S I G
 60 70
 81 V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
 V L G V A P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
 V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D
 V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S I A Q Q G L E W A G N N G M H
 90 100 110
 121 V I N H S L G G P T G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S G
 V I N H S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G
 V I N H S L G G A S G S T A H K Q A V D N A Y A R C V V V A A A G N S G N S G
 V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V V N S A T T S R C V L V V A A S G N S G A G S
 130 140 150

【 7 】

161 S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N O R A S F S S V G P P E L D V M A
 170 S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V D S S N O R A S F S S A G S E L D V M A
 180 S T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S S N R A S F S S V G A E L E V M A
 * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S Q Y G A G L D I V A
 190

201 P G V S I Q S T L P G G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
 210 P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
 220 P G A G V Y S S T Y P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
 P G V N V Q S S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L V K Q K N P S
 230

241 W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 250 W T N A Q V R D R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 260 L S A S Q V R W R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
 W S N V Q I R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R
 270

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 A
 C 1 1 D 3/386 (2006.01) C 1 1 D 3/386

(31)優先権主張番号 08/956,564

(32)優先日 平成9年10月23日(1997.10.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100090468

弁理士 佐久間 剛

(72)発明者 シェレンバーガー, ヴォルカー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 1 0 バーリンガム セクォイア アヴェニュー 1
7 4 7

(72)発明者 ケリス, ジェイムズ ティー ジュニア

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 2 8 ポートラ ヴァリー タン オーク ドライヴ
1 1 1

(72)発明者 ピーチ, クリスチャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 パロ アルト モレノ アヴェニュー 9 1 4

(72)発明者 ナデルニー, ジョアンヌ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 8 サンフランシスコ アルゲロ ナンバー 6 6
8 1

(72)発明者 ネイキ, ドナルド ピー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 8 サンフランシスコ トウェンティーフィフス
ストリート 4 8 1 5

(72)発明者 ポーロス, アイルーカーラン ジェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 0 2 ベルモント ウェイクフィールド ドライヴ
2 8 4 8

(72)発明者 コリアー, キャセリン ディー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 6 2 レッドウッド シティー ウィルミントン ウ
エイ 9 1 5

(72)発明者 コールドウェル, ロバート エム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 6 2 レッドウッド シティー ウィルミントン ウ
エイ 9 1 5

(72)発明者 ベーク, アンドレ セー

ベルギー国 B - 2 8 2 0 ボンハイデン プッセステーンウェーフ 2 7 3

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 特表平04-505856(JP, A)

国際公開第95/030011(WO, A1)

特表平9-504170(JP, A)

Biochemistry, 1989, Vol. 28, No. 11, p. 4807-4815

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9/00-9/99

C12N 15/00-15/90

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed