

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4615723号

(P4615723)

(45) 発行日 平成23年1月19日 (2011. 1. 19)

(24) 登録日 平成22年10月29日 (2010. 10. 29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
請求項の数 13 (全 32 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2000-586884 (P2000-586884)	(73) 特許権者	500586299
(86) (22) 出願日	平成11年12月3日 (1999. 12. 3)		ノボザイムス アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2003-520016 (P2003-520016A)		デンマーク国, デーコー 2 8 8 0 バグ
(43) 公表日	平成15年7月2日 (2003. 7. 2)		スバエルト, クロシェイバイ 3 6
(86) 国際出願番号	PCT/DK1999/000678	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開番号	W02000/034450		弁理士 石田 敬
(87) 国際公開日	平成12年6月15日 (2000. 6. 15)	(74) 代理人	100087871
審査請求日	平成18年12月4日 (2006. 12. 4)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	PA 1998 01604	(74) 代理人	100092624
(32) 優先日	平成10年12月4日 (1998. 12. 4)		弁理士 鶴田 準一
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100114340
(31) 優先権主張番号	60/111, 591		弁理士 大関 雅人
(32) 優先日	平成10年12月9日 (1998. 12. 9)	(74) 代理人	100082898
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 西山 雅也
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 クチナーゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親真菌クチナーゼの変異体であって、

(1) 前記親クチナーゼが、ヒュミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) DSM 180 0株に由来し；そして

(2) 前記変異体が、下記置換 (a) ~ (g) のいずれか 1 つ：

(a) A14P+E47K；

(b) E47K；

(c) E179N/Q；

(d) E6N/Q+E47K+R51P；

(e) A14P+E47K+E179N/Q；

(f) E6N/Q+A14P+E47K+R51P+E179N/Q；又は

(g) E6N/Q+E10N/Q+A14P+E47K+R51P+E17N/Q、

を含み、且つ親クチナーゼより高い熱安定性を有する、
ことを特徴とする真菌クチナーゼの変異体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の変異体をコードするDNA。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のDNA配列を含むベクター。

【請求項 4】

請求項2に記載のDNA又は請求項3に記載のベクターを有する形質転換された宿主細胞。

【請求項5】

請求項1に記載の変異体を生産する方法であって、

a) 前記変異体を発現し、そして好ましくは分泌するように、請求項4に記載の細胞を培養し、そして

b) 該変異体を回収することを含む方法。

【請求項6】

ポリ（エチレンテレフタレート）の環式オリゴマーの酵素的加水分解のための方法であって、該環式オリゴマーを請求項1に記載のクチナーゼ変異体で処理することを含む方法。

10

【請求項7】

前記環式オリゴマーが環式トリ（エチレンテレフタレート）である請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記処理が60～80℃で、好ましくは65～75℃で行われる請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】

前記環式オリゴマーが、ポリエステル含有布帛又はヤーンの繊維中又はそれ上に存在する請求項6～8のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項10】

続いて、前記布帛又はヤーンをゆすぐ、好ましくは約pH7～約pH11の範囲のpHを有する水溶液でゆすぐことを更に含む請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

ポリエステル布帛又はヤーンを染色するための方法であって、

a) 該布帛又はヤーンを、請求項1に記載のクチナーゼ変異体で処理し；そして

b) 該処理した布帛を反応性染料又は分散染料で染色することを含む方法。

【請求項12】

界面活性剤及び請求項1に記載の変異体を含む洗剤組成物。

30

【請求項13】

PET含有ヤーン又は布帛の機能的仕上げを改良するための方法であって、

a) 該ヤーン又は布帛を請求項1に記載の変異体で処理し、そして

b) 次に、該ヤーン又は布帛を、軟化剤、防しわ樹脂、静電防止剤、抗汚染（anti-soiling）剤からなる群から選択される仕上げ剤で処理することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、クチナーゼ変異体、より詳しくは改良された熱安定性を有するクチナーゼ変異体に関する。本発明は、その変異体をコードするDNA配列、そのDNA配列を含むベクター、そのDNA配列又はベクターを有する形質転換された宿主細胞、その変異体を生産する方法、及びその変異体の使用に関する。

40

【0002】

発明の背景

クチナーゼは、基質クチンを加水分解することができる脂肪分解酵素である。クチナーゼは種々の真菌から知られている（P.E. Kolattukudy in “Lipases”, Ed. B. Borg-Stroem and H.L. Brockman, Elsevier 1984, 471～504）。フサリウム・ソラニ・ピシ（*Fusarium solani pisi*）のクチナーゼのアミノ酸配列及び結晶構造は記載されている（S. Longhi et al., Journal of Molecular Biology, 268 (4), 779～799 (199

50

7))。ヒュミコラ・インソレンス (Humicola insolens) からのクチナーゼのアミノ酸配列も公開されている (US 5, 827, 719)。

【0003】

フサリウム・ソラニ・ピシのクチナーゼのいくつかの変異体が公開されている: WO 94/14963; WO 94/14964; Appl. Environm. Microbiol. 64, 2794-2799, 1998; Proteins: Structure, Function and Genetics 26, 442-458, 1996; J. of Computational Chemistry 17, 1783-1803, 1996; Protein Engineering 6, 157-165, 1993; Proteins: Structure, Function, and Genetics 33, 253-264, 1998; J. of Biotechnology 66, 11-26, 1998; Biochemistry 35, 398-410, 1996。

【0004】

真菌クチナーゼは、ポリ (エチレンテレフタレート) の環式オリゴマーの酵素的加水分解に、例えばポリ (エチレンテレフタレート) 繊維からのヤーン又は布帛の仕上げに用いることができる (WO 97/27237)。しかしながら、より高いプロセス温度を許容するために、知られた真菌クチナーゼの熱安定性を改善することが要求される。

【0005】

発明の概要

本発明者らは、改良された熱安定性を有する真菌クチナーゼの特定の変異体を見出した。

従って、本発明は、

a) (結晶構造におけるアミノ酸残基から計算して) N末端アミノ酸の位置から 17 Å 以内、及び/又は

b) N末端アミノ酸から 20 位置以内

に位置する 1 又は複数のアミノ酸残基の置換を含む親真菌クチナーゼの変異体を供する。

【0006】

本発明はその変異体をコードする DNA 配列、その DNA 配列を含む発現ベクター、その DNA 配列又は発現ベクターを有する形質転換された宿主細胞、その変異体を生産する方法、その変異体を用いる方法、及びその変異体を含む界面活性組成物も供する。

発明の詳細な記載

真菌クチナーゼ

親クチナーゼは真菌クチナーゼ、例えば糸状菌クチナーゼ、例えばヒュミコラ (Humicola) 又はフサリウム (Fusarium) の株、特に H. インソレンス (H. insolens) 又は F. ソラニ・ピシ (F. solani pisi)、より詳しくは H. インソレンス株 DSM 1800 に対してネイティブであるものである。

【0007】

H. インソレンス株 DSM 1800 のクチナーゼのアミノ酸配列及びそれをコードする DNA 配列は、US 5, 827, 719 の配列番号: 2 及び配列番号: 1 に示される。H. インソレンスクチナーゼのために本明細書に用いるナンバリングシステムは、前記配列番号: 2 に示す成熟ペプチドに基づく。

F. ソラニ・ピシのクチナーゼのアミノ酸配列は、WO 94/14964 の図 1D に成熟ペプチドとして示される。F. ソラニ・ピシクチナーゼのための本明細書で用いるナンバリングシステムは、WO 94/14964 に用いるものであり; それは、前記図 1D に示されるプロ配列を含み; これにより、成熟クチナーゼは位置 16 ~ 214 にある。

【0008】

親クチナーゼは、H. インソレンス株 DSM 1800 のクチナーゼと、少なくとも 50% (特に少なくとも 70% 又は少なくとも 80%)、相同であるアミノ酸配列を有し得る。親クチナーゼは、特に、H. インソレンス株 DSM 1800 のクチナーゼと共にアラインすることができるものであり得る。

アミノ酸及び変化についての命名法

本明細書及び請求の範囲は、1 文字コードでアミノ酸を示す。配列中の特定のアミノ酸はその 1 文字コード及びその位置により同定され、例えば Q1 は位置 1、即ち N 末端の G1

10

20

30

40

50

n (グルタミン) を示す。

【0009】

置換を定義するために本明細書に用いる命名法は、基本的にWO92/05249に記載される。これによりR51Pは、位置51のR (A r g) のP (P r o) での置換を示す。

相同性及びアラインメント

本発明の目的のため、相同性の程度は、適切には、ポリペプチド配列比較について次のセッティング：3.0のGAP creation penalty及び0.1のGAP extension penaltyで、Needleman, S.B.及びWunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443~45 に記載される方法に従って決定することができる。その決定は、GCGプログラムパッケージ (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wisconsin, USA 53711) に供されるGAPのような知られたコンピュータープログラムにより行うことができる。

【0010】

2つの所定の配列は、同じパラメータを用いてNeedleman (前掲) に記載される方法に従ってアラインすることができる。これは、GAPプログラム (前掲) によって行うことができる。

クチナーゼの3次元構造

H. インソレンスのクチナーゼの構造は、例えば、X-Ray Structure Determination, Stout, G.K. and Jensen, L.H., John Wiley & Sons, Inc. NY, 1989 に供されるようなX線結晶学法についての原理に従って解いた。同形置換法を用いて2.2 Å分解能で解いた結晶構造についての構造配置を標準的なPDBフォーマット (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Brookhaven, CT) で図1に示す。

【0011】

F. ソラニ・ピシのクチナーゼの構造は、Martinezら (1992) Nature 356, 615~618に記載される。F. ソラニ・ピシ及びH. インソレンスのクチナーゼの3D構造は、図2でコンピューターモデルとして比較される。

真菌のクチナーゼの全体の3次元構造は極めて類似しており、X線結晶学により高度に相同であることが示されていることに注目すべきである。F. ソラニ・ピシ及びH. インソレンスからのクチナーゼ間の類似性は、図2のコンピューターモデルから明白に明らかである。それゆえ、1つの真菌クチナーゼについて示される型の改変は、他の真菌クチナーゼについても機能的であろう。

【0012】

N末端近くの置換

本発明の変異体は、N末端の近傍に1又は複数のアミノ酸置換を有する。その置換は、N末端の17 Åの距離以内 (例えば12 Å以内) 及び/又は20位置以内 (例えば15位置以内) である。N末端からの距離は、そのアミノ酸のC α 原子間で計算されるべきであり、結晶構造内の (即ちX線構造で見える) アミノ酸から計算される。

【0013】

H. インソレンス株DSM1800のクチナーゼにおいて、2つのN末端アミノ酸 (Q1及びL2、即ち位置1及び2のGln及びLeu) はX線構造において見えないので、その距離はアミノ酸G3から計算されるべきである。17 Å以内のアミノ酸は、位置3-12, 18, 20-60, 62-64, 82, 85-86, 100-108, 110-111, 130-132, 174, 176-182, 184-185, 188、及び192を含む。12 Å以内のものは、位置3-8, 22-27, 30-47, 53-59, 102, 177、及び180-181を含む。

【0014】

F. ソラニ・ピシのクチナーゼにおいて、N末端アミノ酸G17はX線構造で見える。17 Å以内のアミノ酸は、位置17-26, 34-75, 77-79, 101, 115, 1

10

20

30

40

50

17-119, 147, 191-197, 199-200、及び203を含む。12 Å以内のものは、位置17-22, 38, 40, 45-58, 60, 65、及び70-72を含む。

【0015】

本発明の変異体は、親酵素と比べて改良された熱安定性を有する。熱安定性は、例えば90 K/hrのスキャン速度でpH 8.5で、例えば例に記載されるように、DSC（示差走査熱量測定）により変性温度から決定することができる。その変異体は、親酵素より少なくとも5℃高い変性温度を有し得る。

上述の領域内の置換の総数は、上述の領域中、典型的には1~10、例えば1~5の置換である。更に、本発明のクチナーゼ変異体は、任意に、他の親酵素の改変、例えば上述の領域の外側の10又はそれ未満、例えば5又はそれ未満の変換（置換、欠失又は挿入）を含む。これにより、変異体の全体のアミノ酸配列は、親クチナーゼと比べて、典型的には1~20、例えば1~10の変換を含む。

【0016】

溶媒がアクセス可能な表面

露出したアミノ酸残基、即ち溶媒にアクセス可能な表面を有するアミノ酸残基に1又は複数の置換を行うことができる。これは、W. Kabsch及びC. Sander, Biopolymers, 22 (1983) pp.2577~2637に記載される“dssp”プログラム（version October 1988）により計算することができる。

【0017】

H. インソレンス株DSM1800のクチナーゼにおいて、以下のアミノ酸がN末端のG3の17 Å以内にあり、0より大きい溶媒にアクセス可能な表面を有する：3-12, 18, 26-33, 36-38, 40-45, 47-56, 59-60, 62-64, 82, 85-86, 104-105, 174, 176-179, 181-182, 192。

【0018】

特定の置換

N末端近くの置換は、特に、電荷を増加させるもの、即ち負に荷電したアミノ酸の中性もしくは正に荷電したアミノ酸での置換又は中性アミノ酸の正に荷電したアミノ酸での置換であり得る。これにより、ヒュミコラ・インソレンス株DSM1800のクチナーゼ中の位置E6, E10, E30, E47, D63, E82及び／又はE179に対応する位置での負のアミノ酸残基は、中性又は正のアミノ酸、例えばR, K, Y, H, Q又はNにより置換することができる。いくつかの特定の置換は、E6Q/N, E10Q/N, E47K/R又はE179Q/Nに相当するものである。また、H. インソレンスクチナーゼ中のN7, S11, N44又はN52に相当する位置の中性アミノ酸残基は、正のアミノ酸（R, K又はH）により置換することができる。

【0019】

N末端近くの置換の別の例は、Pro残基での置換、例えばヒュミコラ・インソレンス株DSM1800のクチナーゼ中のA14P又はR51Pに対応する置換である。

特定の変異体

以下は、H. インソレンスクチナーゼにおける変異体のいくつかの例である。他の親クチナーゼに基づいて対応する変異体を作り出すことができる。

【0020】

R51P

E6N/Q+L138I

A14P+E47K

E47K

E179N/Q

E6N/Q+E47K+R51P

A14P+E47K+E179N/Q

E47K+E179N/Q

E 4 7 K + D 6 3 N

E 6 N / Q + E 1 0 N / Q + A 1 4 P + E 4 7 K + R 5 1 P + E 1 7 9 N / Q

E 6 N / Q + A 1 4 P + E 4 7 K + R 5 1 P + E 1 7 9 N / Q

Q 1 P + L 2 V + S 1 1 C + N 1 5 T + F 2 4 Y + L 4 6 I + E 4 7 K

クチナーゼ変異体の使用

本発明のクチナーゼ変異体は、例えばポリ（エチレンテレフタレート）の環式オリゴマー、例えばc 3 E Tと略記される環式トリ（エチレンテレフタレート）の酵素的加水分解のために用いることができる。

【0021】

特に、これは、ポリエステル含有布帛又はヤーンから、このような環式オリゴマーを、その布帛又はヤーンをクチナーゼ変異体で処理し、任意に次にその布帛又はヤーンを約pH 7～約pH 11の範囲のpHを有する水溶液でゆすぐことにより除去するために用いることができる。ポリエステルの処理は、便利には、c 3 E Tのガラス転移温度（約55℃）超、ポリエステルのガラス転移温度（約70℃）未満で行われる。これにより、その処理は、好適には50～80℃で、例えば60～75℃で行うことができる。その過程はWO 97 / 2 7 2 3 7と同様に行うことができる。

10

【0022】

クチナーゼ変異体は、ポリエステル含有織物、例えばPET（エチレングリコール及びテレフタル酸のポリマー）、P 3 G T（1, 3-プロパンジオール及びテレフタル酸のポリマー）又はポリエステル／コットンブレンドを処理するために用いることができる。その処理は、ポリエステル織物に、例えばもち及び快適さを改良し、水透過性を増加させ、静電防止作用を減少させ、手ざわり及び柔らかさを改良し、再沈着特性を変化させ、及び／又は色を清澄化する利益を与え得る。

20

【0023】

クチナーゼ変異体は、クチナーゼ変異体での処理、次の仕上げ剤、例えば軟化剤、抗しわ樹脂、静電防止剤、抗ソイリング剤、又はしわのない永久的なプレス又は耐火効果を与える剤での処理により、PET含有ヤーン又は布帛の機能的な仕上がりを改良するために用いることができる。クチナーゼでの処理は、その表面内の官能基の数を増加させることができ、これは、機能的な仕上げを付与するために用いることができる。仕上げ剤の例は、N i h o n S e n i S e n t a a K Kにより1998年10月15日に公開された“S E N S H O K U S I A G E K A K O B E N R A N”に記載される。

30

【0024】

本発明のクチナーゼ変異体は、界面活性剤においても役立ち、ここではそれは、WO 94 / 0 3 5 7 8及びWO 94 / 1 4 9 6 4に記載されるように脂肪汚れの除去を改良するために組み込むことができる。クチナーゼ変異体の洗濯界面活性剤への付加は、いくつかの洗浄／着用サイクルの間に蓄積された布地からの悪臭を減少させることができる。

【0025】

クチナーゼ変異体は、ポリエステル、例えばポリカプロラクトン（PCL）、ポリエチレングリコール-テレフタレート（PET）、ポリ乳酸、ポリブチレンスクシネート、及びポリ（ヒドロキシ酪酸）-コー（ヒドロキシ吉草酸）、例えばJP-A-5-344897に記載されるような、例えばフィルム及びボトルの分解及びリサイクルのためにも用いることができる。

40

【0026】

クチナーゼ変異体は、リパーゼ及びクチナーゼの他の知られた適用のため、例えばベーキング工業（例えばWO 94 / 0 4 0 3 5及びEP 585 988に記載）において、製紙工業（例えばピッチ除去のため、EP 374 700を参照のこと）において、及び革、ウール及び関連工業（例えば動物の皮、羊皮又はウールの脱脂のため）において、並びに脂肪（d e g r e a s i n g）／脂肪（d e f a t t i n g）に関連する他の適用のためにも用いることができる。それは、有機合成（例えばエステル化、エステル交換反応又はエステル加水分解反応）における触媒として脂肪及び油工業において固定化された形

50

態で用いることができる。

【0027】

ポリエステル染色

本発明は、ポリエステル布帛又はヤーンを染色するための方法を提供する。この過程において、布帛又はヤーンは、最初に、クチナーゼで、例えば12～48時間、50～70℃で、又は65～70℃、pH7～10で処理され、次に染料、例えば反応性染料、分散染料又はカチオン性染料で染色される。反応性染料は、OH又はCOOH基と反応するもの、例えば構造：発色団-NHPh-SO₂CH₂CH₂OSO₃Naを有するものであり得る。染色は、40～80℃で、例えば20～60分、行うことができる。

【0028】

クチナーゼは、親クチナーゼより少くとも5°高い、例えば7～10°高いpH8.5での熱変性温度Td、例えば65℃又はそれ超の値を有するクチナーゼであり得る。その測定は、本明細書の実施例に記載されるようにDSCによって行うことができる。

界面活性剤

布帛又はヤーンの処理において、酵素との接触を改良するために慣用的な湿潤剤及び／又は分散剤を用いることができる。湿潤剤は、非イオン性界面活性剤、例えばエトキシ化脂肪アルコールであり得る。極めて有用な湿潤剤は、エトキシ化及びプロポキシ化脂肪酸エステル、例えばBerol 087 (Akzo Nobel, Swedenの製品)である。

【0029】

分散剤は好適には、非イオン性、アニオン性、カチオン性、両性又は双性イオン性界面活性剤から選択することができる。より詳しくは、分散剤は、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、アルキルアリアルスルホネート、長鎖アルコールスルフェート（一級及び二級アルキルスルフェート）、スルホン化オレフィン、硫酸化モノグリセリド、硫酸化エーテル、スルホスクシネート、スルホン化メチルエーテル、アルカンスルホネート、リン酸エステル、アルキルイソチオネート、アシルサルコシド、アルキルタウリド、フッ素界面活性剤、脂肪アルコール及びアルキルフェノール縮合物、脂肪酸縮合物、エチレンオキシドのアミンとの縮合物、エチレンオキシドのアミドとの縮合物、スクロースエステル、ソルビタンエステル、アルキロアミド、脂肪アミンオキシド、エトキシ化モノアミン、エトキシ化ジアミン、アルコールエトキシレート及びそれらの混合物から選択することができる。極めて有用な分散剤は、アルコールエトキシレート、例えばBerol 08 (Akzo Nobel, Swedenの製品)である。

【0030】

クチナーゼ変異体を調製するための方法

本発明のクチナーゼ変異体は、例えばWO94/14963又はWO94/14964 (Unilever)に記載されるように、当業界で知られた方法により調製することができる。以下に、クチナーゼコーディングDNA配列のクローニングのための方法、次にそのクチナーゼコーディング配列内の特定の部位で突然変異を作り出すための方法を記載する。

【0031】

クチナーゼをコードするDNA配列のクローニング

親クチナーゼをコードするDNA配列は、当業界で公知の種々の方法を用いて、問題のクチナーゼを生産するいずれかの細胞又は微生物から単離することができる。最初に、ゲノムDNA及び／又はcDNAライブラリーは、研究すべきクチナーゼを生産する生物からの染色体DNA又はメッセンジャーRNAを用いて作製されるべきである。次に、クチナーゼのアミノ酸配列が知られているなら、標識されたオリゴヌクレオチドプローブを合成し、問題の生物から調製したゲノムライブラリーからクチナーゼコーディングクローンを同定するために用いることができる。あるいは、別の知られたクチナーゼ遺伝子と相同な標識化オリゴヌクレオチドプローブ含有配列は、低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション及び洗浄条件を用いて、クチナーゼコーディングクローンを同定するためにプロ

10

20

30

40

50

ープとして用いることができよう。

【0032】

クチナーゼコーディングクローンを同定するための更に別の方法は、ゲノムDNAのフラグメントを発現ベクター、例えばプラスミドに挿入し、クチナーゼ陰性細菌を得られたゲノムDNAライブラリーで形質転換し、そして次にその形質転換された細菌を、クチナーゼのための基質（即ちマルトース）を含む寒天にプレートし、それによりクローンに同定すべきクチナーゼを発現させることに關するであろう。

【0033】

あるいはその酵素をコードするDNA配列は、確立されている標準的な方法、例えばS.L. Beaucage and M.H. Caruthers, (1981), Tetrahedron Letters 22, p.1859~1869に記載されるホスホロアミジト法、又はMatthesら、(1984), EMBO J. 3, p.801~805に記載される方法により合成して調製することができる。ホスホロアミジト法において、オリゴヌクレオチドは、例えば自動DNAシンセサイザーで合成し、精製し、アニーリングし、連結し、そして好適なベクターにクローニングされる。

10

【0034】

最後に、そのDNA配列は、標準的技術に従って、合成、ゲノム又はcDNA起源のフラグメント（好適には、全DNA配列の種々の部分に対応するフラグメント）を連結することにより調製される、ゲノム及び合成起源の混合、合成及びcDNA起源の混合、又はゲノム及びcDNA起源の混合のものであり得る。そのDNA配列は、例えばUS 4, 683, 202又はR.K. Saikiら (1988), Science 239, 1988, pp.487~491 に記載されるように、特定のプライマーを用いて、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）によって調製することもできる。

20

【0035】

部位特異的変異誘発

クチナーゼコーディングDNA配列を単離し、そして変異のための要求される部位を同定した後、合成オリゴヌクレオチドを用いて変異を同定した後、合成オリゴヌクレオチドを用いて変異を導入することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、要求される部位に隣接したヌクレオチド配列を含む。特定の方法において、DNAの一本鎖ギャップ、クチナーゼコーディング配列を、クチナーゼ遺伝子を有するベクター内に作る。次に、要求される変異を有する合成ヌクレオチドを一本鎖DNAの相同な部分とアニーリングする。次に残りのギャップをDNAポリメラーゼI（クレノウフラグメント）で満たし、その構成物をT4リガーゼを用いて連結する。この方法の特定の例はMorinagaら (1984), Biotechnology 2, p 646~639に記載される。US 4, 760, 025はそのカセットの小さな変化を行うことによる、多重変異体をコードするオリゴヌクレオチドの導入を開示する。しかしながら、Morinagaの方法により、いずれか一回で、更により多くの種々の変異を導入することができる。それは、種々の長さの多数のオリゴヌクレオチドを導入することができるからである。

30

【0036】

クチナーゼコーディングDNA配列に変異を導入するための別の方法はNelson and Long, (1989), Analytical Biochemistry 180, p.147~151に記載される。それは、PCR反応においてプライマーの1つとして化学的に合成したDNAを用いることにより導入された要求される変異を含むPCRフラグメントの3ステップ生成に關する。PCR生成フラグメントから、変異を有するDNAフラグメントは、制限エンドヌクレアーゼでの開裂により単離し、発現プラスミドに再挿入することができる。

40

【0037】

クチナーゼ変異体の発現

本発明によれば、上述の方法により、又は当業界で知られたいずれかの別の方法により生産された変異体をコードするDNA配列は、典型的には、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナルをコードする調節配列、並びに任意に、レプレッサー遺伝子又は種々のアクティベーター遺伝子を含む発現ベクターを用いて、酵素形態で

50

発現させることができる。

【0038】

発現ベクター

本発明のクチナーゼ変異体をコードするDNA配列を有する組換え発現ベクターは、組換えDNA手順に便利にかりることができるいずれのベクターであってもよく、ベクターの選択は、しばしばそれが導入される宿主細胞に依存するであろう。ベクターは、宿主細胞に導入した時に、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、それが導入されている染色体と一緒に複製されるものであってよい。好適な発現ベクターの例にはpMT838がある。

【0039】

プロモーター

ベクターにおいて、DNA配列は好適なプロモーター配列に作用可能に結合されるべきである。プロモーターは、選択された宿主細胞内で転写活性を示すいずれのDNA配列であってもよく、宿主細胞に対して同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から得ることができる。

【0040】

本発明のクチナーゼ変異体をコードするDNA配列の転写を、特に細菌宿主において命令するための好適なプロモーターの例は、大腸菌のlacオペロンのプロモーター、ストレプトマイセス・コエリコロール (Streptomyces coelicolor) アガロース遺伝子 dagA プロモーター、バチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) α-アミラーゼ遺伝子のプロモーター (amyL)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus) マルトジェニックアミラーゼ遺伝子のプロモーター (amyM)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens) α-アミラーゼのプロモーター (amyQ)、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) xyIA 及び xyIB 遺伝子のプロモーター等である。真菌宿主内での転写のために、有用なプロモーターの例は、A. オリザエ (A. oryzae) TAKA α-アミラーゼをコードする遺伝子から得られるもの、S. セレビシアエ (S. cerevisiae) からの TPI (トリオースリン酸イソメラーゼ) プロモーター (Alber 5 (1982), J. Mol. Appl. Genet. 1, p.419~434)、リゾムコル・ミエヘイ (Rhizomucor miehei) アスパラチックプロティナーゼ、A. ニゲル (A. niger) 中性 α-アミラーゼ、A. ニゲル酸安定性 α-アミラーゼ、A. ニゲルグルコアミラーゼ、リゾムコル・ミエヘイ (Rhizomucor miehei) リパーゼ、A. オリザエアルカリプロテアーゼ、A. オリザエトリオースリン酸イソメラーゼ又はA. ニジュランスアセトアミダーゼである。

【0041】

発現ベクター

本発明の発現ベクターは、好適な転写ターミネーター、及び真核生物においては本発明の α-アミラーゼ変異体をコードするDNA配列に作用可能に結合したポリアデニル化配列も含み得る。ターミネーション及びポリアデニル化配列は、好適には、プロモーターと同じソースから得ることができる。

【0042】

ベクターは、問題の宿主細胞内でベクターが複製するのを可能にするDNA配列を更に含み得る。このような配列の例は、プラスミド pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 及び pIJ702 の複製の起点である。

ベクターは、選択マーカー、例えばその産物が宿主細胞の欠損を補う遺伝子、例えばB. サブチリス又はB. リケニホルミスからの dal 遺伝子、又は抗生物質耐性、例えばアンピシリン、カナマイシン、クロランフェニコール又はテトラサイクリン耐性を与えるものも含み得る。更に、ベクターは、アスペルギルス選択マーカー、例えば amdS, argB, niaD 及び sC、ヒグロマイシン耐性を与えるマーカーを含み得、又は選択は、例えば WO91/17243 に記載されるように同時形質転換によって行うことができる。

10

20

30

40

50

【0043】

クチナーゼ変異体をコードする本発明のDNA構成物、プロモーター、ターミネーター及び他の要素を各々連結するため、並びに複製のために必要な情報を含む好適なベクターにそれらを挿入するために用いる手順は当業者に公知である（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989）。

【0044】

宿主細胞

先に定義した本発明のDNA構成物又は発現ベクターのいずれかを含む本発明の細胞は、有利には、本発明のクチナーゼ変異体の組換え生産において宿主細胞として用いられる。その細胞は、便利にはそのDNA構成物を（1又は複数のコピーにおいて）宿主染色体に組み込むことにより、変異体をコードする本発明のDNA構成物で形質転換することができる。この組み込みは、そのDNA配列は細胞内でより安定に維持されるので一般に有利であると考えられる。DNA構成物の宿主染色体への組み込みは、慣用的な方法に従って、例えば相同的又は非相同的組換えにより行うことができる。あるいは、細胞は、異なる型の宿主細胞とあわせて上述のように発現ベクターで形質転換することができる。

10

【0045】

本発明の細胞は、高等生物、例えば哺乳動物又は昆虫の細胞であってよいが、好ましくは微生物細胞、例えば細菌又は（イーストを含む）真菌細胞である。

好適な細菌の例は、グラム陽性細菌、例えば、*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*、又は*Streptomyces lividans*もしくは*Streptomyces murinus*、又はグラム陰性細菌、例えば*E. coli*である。細菌の形質転換は、例えば、プロトプラスト形質転換により、又はそれ自体、知られた方法でコンピテント細胞を用いることにより行うことができる。

20

【0046】

イースト生物は、好ましくは、サッカロマイセス（*Saccharomyces*）又はスキゾサッカロマイセス（*Schizosaccharomyces*）の種、例えばサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）から選択することができる。

30

宿主細胞は、糸状菌、例えばアスペルギルス（*Aspergillus*）の種に属する株、最も好ましくはアスペルギルス・オリザエ（*Aspergillus oryzae*）又はアスペルギルス・ニゲル（*Aspergillus niger*）、又はフサリウム（*Fusarium*）の株、例えば*Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum*（完全状態で*Gibberella zeae*、以前は*Sphaeria zeae*と呼ばれ、*Gibberella roseum*及び*Gibberella roseum* f. sp. *cerealis*と同義）、又は*Fusarium sulphureum*（完全状態で*Gibberella puricaris*と呼ばれ、*Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bactriclioides*, *Fusarium sambucium*, *Fusarium roseum*、及び*Fusarium roseum* var. *graminearum*と同義）、*Fusarium cerealis*（*Fusarium crokwellense*と同義）、又は*Fusarium venenatum*であってもよい。

40

【0047】

本発明の好ましい実施形態において、宿主細胞はプロテアーゼ欠損又はプロテアーゼマイナス株である。

これは、例えば、“alp”欠損と呼ぶアルカリプロテアーゼ遺伝子を有するプロテアーゼ欠損株アスペルギルス・オリザエJal125であり得る。この株は、WO97/35956（Novo Nordisk）に記載される。

50

【0048】

糸状菌細胞は、それ自体知られた方法で、プロトプラスト形成及びそのプロトプラストの形質転換、次の細胞壁の再生に関する方法によって形質転換することができる。宿主微生物としてのアスペルギルスの使用はEP 238 023 (Novo Nordisk A/S)に記載される。その内容は引用により本明細書に組み込まれる。

【0049】

形質転換体の培養によるクチナーゼ変異体の生産

本発明は、とりわけ、本発明のクチナーゼ変異体を生産する方法であって、その変異体の生産に資する条件下で宿主細胞を培養し、そしてその細胞及び／又は培養培地からその変異体を回収することを含む方法に関する。

細胞を培養するために用いる培地は、問題の宿主細胞を増殖させ、本発明のクチナーゼ変異体の発現を得るために適したいずれかの慣用的な培地であってもよい。好適な培地は、商業的供給元から利用でき、又は公開されている方法に従って（例えばAmerican Type Culture Collectionのカatalogに記載される通り）調製することができる。

【0050】

宿主細胞から分泌されたクチナーゼ変異体は、便利には、公知の手順、例えば遠心又はろ過により培地から細胞を分離し、そして硫酸アンモニウムのような塩により培地のタンパク質成分を沈殿させ、次にクロマトグラフィー法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を用いることにより、培養培地から回収することができる。

【0051】

植物における変異体の発現

本発明は、回収できる量でこの酵素を発現し、生産するように、本発明の変異体をコードするDNA配列で形質転換されているトランスジェニック植物、植物の部分又は植物細胞にも関する。その酵素は、植物又は植物の部分から回収することができる。あるいは、その組換え酵素を含む植物又は植物の部分をそれ自体、用いることができる。

【0052】

トランスジェニック植物は、双子葉植物でも単子葉植物でも、略してdicotでもmonocotでもよい。単子葉植物の例は、草、例えばイチゴツナギ(meadow grass) (ブルーグラス、Poa)、飼料草、例えばフェスキマ(festuca)、ライグラス(lolium)、温帯草、例えばAgrostis及び穀物、例えばコムギ、オート、ライムギ、オオムギ、コメ、モロコシ類及びトウモロコシ(コーン)である。

【0053】

双子葉植物の例は、タバコ、マメ類、例えばルピナス、ポテト、シュガービート、エンドウ、マメ及びダイズ、並びにアブラナ類(Brassicaceae科)、例えばカリフラワー、脂肪種子ナタネ及びそれに密接に関連するモデル生物アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana)である。

【0054】

植物の部分の例は、幹、カルス、葉、根、果実、種子及び塊茎である。本文脈において、特定の植物の組織、例えばクロロプラスト、アポプラスト、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシソーム及び細胞質も植物の部分と考えられる。更に、組織起源である限り、いずれの植物細胞も植物の部分であると考えられる。

これらの植物、植物の部分及び植物細胞の子孫も本発明の範囲に含まれる。

【0055】

本発明の変異体を発現するトランスジェニック植物又は植物細胞は、当業界で知られた方法に従って作製することができる。要約すると、植物又は植物細胞は、本発明の酵素をコードする1又は複数の発現構成物を植物宿主ゲノムに組み込み、そして得られた改変された植物又は植物種子をトランスジェニック植物又は植物細胞に伝播することにより作製される。

10

20

30

40

50

【0056】

便利には、発現構成物は、選択された植物又は植物の部分において遺伝子の発現のために要求される好適な調節配列と作用可能な関係で本発明の酵素をコードする遺伝子を含むDNA構成物である。更に、発現構成物は、その発現構成物が組み込まれている宿主細胞を同定するために役立つ選択マーカー、及び問題の植物へのその構成物の導入のために必要なDNA配列を同定するために役立つ選択マーカーを含み得る（後者は用いるDNA導入法に依存する）。

【0057】

調節配列、例えばプロモーター及びターミネーター配列並びにシグナル又はトランジット配列の選択は、例えば、いつ、どこでそしていかにして酵素の発現が要求されるかに基づく。例えば、本発明の酵素をコードする遺伝子の発現は、構成的であっても誘導性であってもよく、又は発達段階もしくは組織特異的であってもよく、その遺伝子産物は、特定の組織もしくは植物の部分、例えば種子もしくは葉を標的にすることができる。調節配列は、例えばTagueら、Plant, Phys, 86, 506, 1988 に記載される。

【0058】

構成的発現のため、35S-CaMVプロモーターを用いることができる（Franckら、1980, Cell 21 : 285~294）。器官特異的プロモーターは、貯蔵シンク器官、例えば種子、ポテト塊茎及び果実から（Edwards & Coruzzi, 1990, Annu. Rev. Genet. 24 : 275~303）、もしくは代謝シンク組織、例えば分裂組織から（Itôら、1994, plant Mol. Biol. 24 : 863~878）のプロモーター、種子特異的プロモーター、例えばコメからのゼラチン、プロラミン、グロブリン又はアルブミンプロモーター（Wuら、Plant and Cell Physiology Vol. 39, No.8 pp.885~889 (1998)）、レグミンB4からのVicia fabaプロモーター及びConrad U. らJournal of Plant Physiology Vol. 152, No.6 pp.708~711 (1998) に記載されるVicia fabaからの未知の種子タンパク質遺伝子、種子油体タンパク質からのプロモーター（Chenら、Plant and cell physiology vol. 39, No. 9 pp.935~941 (1998)）、Brassica napusからの貯蔵タンパク質napAプロモーター、又は例えばWO91/14772に記載されるような当業界で知られたいずれかの他の種子特異的プロモーターであり得る。更に、プロモーターは、葉特異的プロモーター、例えばコメ又はトマトからのrbcSプロモーター（Kozukaら、Plant Physiology Vol. 102, No.3 pp.991~1000 (1993)）、コレラウィルスアデニンメチルトランスフェラーゼ遺伝子プロモーター（Mitra, A及びHiggins, DW, Plant Molecular Biology Vol. 26, No.1, pp.85~93 (1994)）、又はコメからのaldP遺伝子プロモーター（Kagayaら、Molecular and General Genetics Vol. 248, No 6 pp.668~674 (1995)）、又は創傷誘導性プロモーター、例えばポテトpin2プロモーター（Xuら、Plant Molecular Biology Vol. 22, No.4 pp.573~588 (1993)）であり得る。

【0059】

植物において酵素のより高い発現を行うためにプロモーターエンハンサー要求を用いることができる。例えば、プロモーターエンハンサー要素は、プロモーターと酵素をコードするヌクレオチド配列との間におかれたイントロンであり得る。例えば、Xuら（前掲）は、発現を増強するためのコメアクチン1遺伝子の最初のイントロンの使用を開示する。

【0060】

選択マーカー遺伝子及びいずれかの他の発現構成物の部分は、当業界で利用できるものから選択することができる。

DNA構成物は、アグロバクテリウム媒介形質転換、ウィルス媒介形質転換、マイクロインジェクション、パーティクルボンバードメント、微粒子銃（biolistic）形質転換、及びエレクトロポレーションを含む、当業界で知られた慣用的な技術に従って植物ゲノムに組み込まれる（Gasserら、Science, 244, 1293; Potrykus, Bio/Techn. 8, 535, 1990; Shimamotoら、Nature, 338, 274, 1989）。

【0061】

現在、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）

f a c i e n s) 媒介遺伝子転移は、トランスジェニック双子葉植物を作り出すために選択される方法である（報告について、Hooykas & Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19 : 15~38）が、それは、単子葉植物を形質転換するためにも用いることができる。但し、他の形質転換法がこれらの植物のために一般的に好ましい。現在、トランスジェニック単子葉植物を作り出すための選択される方法は、胚カルス又は発達中の胚のパーティクルボンバードメント（形質転換するDNAでコーティングされた微細な金又はタングステン粒子）である（Christou, 1992, Plant J. 2 : 275~281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5 : 158~162; Vasil ら、1992, Bio/Technology 10 : 667~674）。単子葉植物の形質転換のための別の方法は、Omirulleh Sら ; Plant Molecular biology Vol . 21, No.3 pp.415~428 (1993)に記載されるようなプロトプラスト形質転換に基づく。 10

【0062】

形質転換の後、組み込まれた発現構成物を有する形質転換体が選択され、当業界で公知の方法に従って完全な植物に再生される。

材料及び方法

プラスミド

p J S O O 2 6

これは、WO 97 / 0 7 2 0 5、及びJ.S. Okkels, (1996) “A URA3-promoter deletion in a pYES vector increases the expression level of a fungal lipase in *Saccharomyces cerevisiae*”, Recombinant DNA Biotechnology III: The Integration of Biological and Engineering Sciences, vol. 782 of the Annals of the New York Academy of Sciences)に記載されるS. セレビシアエ発現プラスミドである。 20

【0063】

p F u k u 8 3

これは、p J S O O 2 6から作製された、T P Iプロモーターの制御下でのH. インソレンスクチナーゼの発現のためのイースト及び大腸菌シャトルベクターである。

基質

B E T E B

テレフタル酸ビス（2-ヒドロキシエチル）エステルジベンゾエートは本明細書においてB E T E B（ベンゾイル-エチレン-テレフタリック-エチレン-ベンゾエート）と略記する。それは、テレフタル酸ビス（2-ヒドロキシエチル）エステル及び安息香酸から調製した。 30

【0064】

リパーゼ活性（LU）

リパーゼのための基質は、乳化剤としてアラビアゴムを用いて、トリブチリン（グリセリントリブチレート）を乳化することにより調製する。pH7で30℃でのトリブチリンの加水分解の後、pH-titration実験を行った。リパーゼ活性の1ユニット（1LU）は、標準条件で1分当りに1 μmol の酪酸を放出することができる酵素の量に等しい。

【0065】

示差走査熱量測定

サンプル及び標準溶液を、熱量計へのサンプルの充填の直前に注意深く脱気する（標準：酵素を含まない緩衝液）。サンプル及び標準溶液（約0.5mL）を20分、5℃で熱的に予め平衡化させる。DSCスキャンを、5℃~95℃で、約90K/hrのスキャン速度で行う。変性温度を、約+/-1℃の精度で測定する。MicroCal tac. からのVP-DSCが本実験のために好適である。 40

【0066】

方法

P C R 条件

ステップ1 : 94℃、120秒

ステップ2 : 94℃、60秒 50

ステップ3：50℃、60秒
 ステップ4：72℃、150秒
 ステップ2にいく、35サイクル
 ステップ5：72℃、480秒
 ステップ6：4℃、永久に

実施例

実施例1：クチナーゼ変異体の調製

H. インソレンスをコードするDNA配列は、US 5,827,719 (Novo Nordisk) に記載されるように得て、配列番号：1に示すDNA配列を有することが見い出された。

10

【0067】

変異体を、局所化ランダム変異誘発、及びBETEBプレート上で1日、60℃でのインキュベーションによる陽性クローンの選択により調製した。BETEBプレートは、200mL/Lの500mMグリシン緩衝液(pH8.5)、1.25g/LのBETEB(熱いエタノールに溶解)及び20g/Lの寒天を含んだ。

3つの陽性変異体を単離し、それらのアミノ酸配列を決定した。それらは親H. インソレンスクチナーゼと比べて以下の改変を有することが見い出された：

A14P+E47K

E47K

E179Q

20

実施例2：部位特異的変異誘発

置換：E6Q+E47K+R51Pを有するH. インソレンスクチナーゼの変異体は以下の通り調製した：

一对のPCRプライマーを、以下の通り、近くの存在する制限酵素を利用して、アミノ酸置換を導入するためにデザインした(アスタリスクは導入された変異を示す)。

【0068】

上流プライマー：E6QF

cgg cag ctg gga gcc atc c*ag aac

Pvu II

下流プライマー：E47K, R51P

30

cgc cct gga tcc aga tgt tcg* gga tgt ggg act t*aa ggc

BamH I

PCRは、これらのプライマー及びテンプレートとしてpFukNL83を用いて、上述のPCR条件下で行った。

【0069】

得られたPCRフラグメントを、Clontech Spincolumにより精製し、PvuII及びBamHIで消化した。

得られたフラグメントをゲルで精製し、同じ制限酵素部位で消化した、pFukNL83に連結した。

実施例3：クチナーゼ変異体の熱安定性

40

変異体

H. インソレンスクチナーゼ及びその以下の変異体について以下に記載の通り熱安定性をテストした：

(a) A14P+E47K

(b) E47K

(c) E179Q

(d) E6Q+E47K+R51P

(e) A14P+E47K+E179Q

(f) E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q

(g) E6Q+E10Q+A14P+E47K+R51P+E179Q

50

示差走査熱量測定 (DSC)

クチナーゼ変異体の熱安定性を、pH4.5 (50mM酢酸緩衝液) 及びpH8.5 (50mMグリシルグリシン緩衝液) でDSCにより研究した。熱変性温度Tdは、一定のプログラムされた加熱速度での酵素溶液の加熱の後に得られたサーモグラム (Cp vs. T) における変性ピーク (主要な吸熱ピーク) の頂点として得た。

【0070】

親クチナーゼはpH8.5で63℃のTdを有することが見い出された。上述の変異体のうちの6つが70～73℃のTd、即ち7～10°の改良を有することが見い出された。親クチナーゼはpH4.5で61℃のTdを有することが見い出された。上述の変異体のうち5つが64～66℃のTd、即ち3～5°の改良を有することが見い出された。

10

【0071】

BETEBの加水分解

H. インソレンスクチナーゼ及び上述の変異体のうちの2つの熱安定性を、上昇温度でBETEBの加水分解により測定した。各々のクチナーゼについて、以下の混合物を55～70℃の範囲で種々の温度で17時間、インキュベートした。

【0072】

0.1mL 0.5Mグリシルグリシン緩衝液 (pH8.5)
0.1mL 0.5% BETEB (エタノールに溶解)
0.1mL 酵素溶液 (約25LU/mL)
0.7mL MilliQ水

20

加水分解の程度を、インキュベーションの後に測定した。結果を以下の表に示す。

【0073】

【表1】

	変異体	変異体	親
	27LU/ml	25LU/ml	24LU/ml
55℃	98%	99%	72%
60℃	91%	83%	33%
65℃	66%	13%	7%

30

【0074】

これらの結果は、変異体が親クチナーゼと比べて改良された熱安定性を有することを示す。

BETEBの加水分解

H. インソレンスクチナーゼ及び上述の変異体のうちの3つの熱安定性を、2時間、60℃でBETEBの加水分解により測定した。加水分解は、温度を60℃に固定し、クチナーゼ投与量を変化させたことを除いて上述の条件で行った。この結果を以下の表1に示す。

40

【0075】

【表2】

LU/ml	変異体	変異体	変異体	親
0	0%	0%	0%	0%
10	97%	99%	9%	6%
20	98%	99%	74%	
50	98%	94%	93%	15%
100	88%	69%	92%	34%
300				41%
600				63%
1200				82%

10

【0076】

結果は、親クチナーゼより変異体でかなり迅速な60℃での加水分解を示す。

20

実施例4：c3ETの加水分解

H. インソレンスクチナーゼ及び上述の変異体のうちの5つを、上昇温度でc3ETの加水分解においてテストした。各々のクチナーゼについて、以下の混合物を種々の温度で2時間、インキュベートした。

【0077】

0.115mg c3ET (HFIPに溶かした2mM c3ET 0.1mLを反応容器にとった。真空中で溶媒を除去し、次に70℃で一晩、乾燥させた。)

0.1mL 0.5Mグリシルーグリシン緩衝液 (pH8.5)

0.1mL 酵素溶液 (約600LU/mL)

0.8mL MilliQ水

30

インキュベーションの後、2mLの1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) を各々の反応混合物に加え、次に加水分解率をHPLCにより測定した。図3に示す結果は、変異体が親クチナーゼと比べて改良された熱安定性を有することを明らかに示す。

【0078】

実施例5：ヤーン上でのc3ETの加水分解

H. インソレンスクチナーゼ及び上述の変異体のうちの5つの熱安定性を、製品としてc3ETを含むポリエステルヤーンを用いてテストした。以下の基質混合物を60又は65℃でプレインキュベートした：

0.1g ポリエステルヤーン

40

0.2mL 0.5Mグリシルーグリシン緩衝液 (pH8.5)

1.7mL MilliQ水

プレインキュベーションの後、0.1mLの酵素溶液 (約1000LU/mL) を各々の反応容器に加え、17時間、インキュベートした。次に、2mLのHFIPを加え、30分放置して、ポリエステルヤーンの表面上にあるc3ETを抽出し、加水分解させ；次にその加水分解比を測定した。結果を図4に示す。

【0079】

変異体はポリエステルヤーン上のc3ETを加水分解するため親クチナーゼより有効である。1つの変異体は60℃でより65℃でより高い加水分解率を示す。

実施例6：クチナーゼ変異体でのヤーンの処理

50

異なる温度又は投与量でのポリエステルヤーン上でのc 3 E T加水分解の時間経過を検査した。異なる温度での時間経過を図5に示す。至適温度が65℃であることがわかる。70℃において、その活性の約半分がまだ残っている。酵素投与量の増加を伴う時間経過を図6に示す。投与量275及び550LU/mLでの曲線は、同じであるように見え、このことは、加水分解率は100～275LU/mLの投与量の間で安定状態に達することを示す。おそらく200LU/mLが十分である。

【0080】

実施例7：反応性染料でのポリエステルの染色

以下のポリエステル布帛をテストした：

織布：約2×2cm、34mg

メリヤス：約1.5×1.5cm、50mg

各々の布帛を0.9mLの50mM Gly Gly（グリシルグリシン）緩衝液（pH8.5）及びH. インソレンスクチナーゼの変異体の0.1mL溶液（1100LU/mL）に加え、65又は70℃でインキュベートした。1日後に、別の0.1mL酵素溶液を加え、インキュベーションを更に2日間、続け、次に布帛をとり、水でゆすいだ。親クチナーゼで比較実験を行い、ブランクは酵素なしで同様に処理した。

【0081】

それら布帛を60℃で30分、3リッターの脱イオン水中9g及び120gのNa₂SO₄並びに60gのNa₂CO₃の混合物中で攪拌し、次に温水を流しながらゆすいだ。反応性染料はCelmaazol Brilliant Blue B（Mitsui Chemical Co., Japanの製品）であり、それは、構造：発色団-NHPh-SO₂CH₂CH₂OSO₃Naを有する。

【0082】

全ての4つの実験（織布及びメリヤス、65及び70℃）によって、布帛は均一に染色された。

実施例8：編織物（Knitted textile）からのポリエステル断片の可溶化
編まれたポリエステル織物（PET、エチレングリコール及びテレフタル酸）の1×1cmサンプルを、0.01mgのH. インソレンスクチナーゼの変異体と共にpH10、60℃で1mLの緩衝液中で1時間、インキュベートした。その反応混合物を分離し、テレフタル酸の放出を、250nmでのOD（OD₂₅₀/mg PETとして表す）を測定することにより見い出した。比較実験は、酵素なし又は親クチナーゼで行った。結果：

【0083】

【表3】

	酵素	OD ₂₅₀
本発明	クチナーゼ変異体	4.5
標準	親クチナーゼ	0.3
	なし	0.1

【0084】

結果は、変異体がポリエステルを可溶化するのに有効であることを示す。

別の実験形態において、クチナーゼ変異体を65℃で2時間、0.5～200LU/mLの種々の量の変異体を用いて、非イオン性界面活性剤（アルコールエトキシレート、製品名Softanol 50）の添加あり及びなしでテストした。結果は、非イオン性界面活性剤の存在下でより可溶化することを示した。

【0085】

実施例 9：ポリカプロラクトン及びポリエステルフィルムの加水分解

約 0.1 g のポリカプロラクトン又はポリエステルフィルムをチューブに入れた。それらを H. インソレンスクチナーゼ (450 LU) あり又はなしで 5 mL の 50 mM Gly Gly 緩衝液 (pH 8.5) に浸漬した。それらを 70 °C で 5 時間、インキュベートした。その反応の後、我々は、ポリカプロラクトン及びポリエステルフィルムの両方で、酵素でのチューブの表面上の加水分解物の薄層を観察した。他方、酵素なしの対照では変化は観察されなかった。ポリカプロラクトンの場合、10 重量%の損失があった。ポリエステルの重量変化はなかった。

【0086】

実施例 10：c P E T 加水分解

10

クチナーゼ変異体の能力を、親酵素 (H. インソレンスクチナーゼ) と比較した。試験は次の通り行った：

(ブラック) P E T-布帛 (約 4 cm × 13 cm) のオリゴマーで染色したスワッチを、いわゆるミニタージトメーター (mini tergitometer) 装置において比較的低い攪拌での酵素処理にかける。P E T-布帛を、円柱状穿孔ホルダー (半径約 2 cm、高さ約 6 cm) にマウントする。それはその軸上を回転し、P E T 布帛のオリゴマー染色側がその円柱の外側に面する。

【0087】

布帛を所定の温度 (ここでは 65 °C) で 100 mL の処理溶液を含む 150 mL ガラスビーカーに浸漬する。所定の処理時間 (ここでは 90 分) の後、P E T スワッチをその浴から除去し、脱イオン水でゆすぎ、空気乾燥させる。

20

コンディショニングの後、そのスワッチを、オリゴマー染色を有する側上の (オリゴマー染色除去に関して) 視覚的にランク付けする。

【0088】

−2：ブランクよりかなり悪いサンプル (酵素なし)

−1：ブランクより少し悪いサンプル (酵素なし)

0：サンプルはブランクと区別できない

1：ブランクに対して少し改善されたサンプル

2：ブランクよりかなり改善されたサンプル

また、スワッチを、色の強さ (600 nm における K/S 値) を定量するために分光光度測定 (装置：Hunterlab Reflectometer) により読んだ。

30

【0089】

以下の表は、同様の条件下で酵素の能力を比較する試験についてのテスト条件を要約する。

温度	65 °C
緩衝液	50 mM グリシン緩衝液、pH 10.3
処理時間 (分)	90
酵素の投与量 (LU/g)	30000

試験からの結果を以下に要約する。

【0090】

40

【表 4】

酵素	視覚的レーティング (平均)	K/S差 @600 nm
なし	0 (定義)	2.33
親クチナーゼ	0	2.38
クチナーゼ変異体	1.5-2.0	2.89

10

【0091】

この実験のセットから、親酵素は所定のテスト条件で効果がないか又は極めて限られた効果しか示さない（おそらく酵素が活性を保持するのに温度が高すぎるため）のに対し、クチナーゼ変異体はPET-布帛からオリゴマー染色の実質的な除去を供することが明らかである。

実施例11：cPET加水分解

H. インソレンスクチナーゼのpH及び温度プロフィールを、モデル分散性染色実験においてテストした。その試験は以下の通り行った：

（ブラック）PET-布帛のオリゴマー染色スワッチをWerner Mathis Labomatにおいて典型的な分散染色配列の条件に加える。その方法の概略において、スワッチは、緩衝液に加えられ、130℃に加熱され、処理温度に冷却される。酵素又は緩衝液が加えられ、次に30分、要求される温度に保持される。その溶液を室温に冷やし、洗浄液中での濁度を測定する。濁度の減少はクチナーゼ活性の直接的基準であり、加水分解されたcPETオリゴマーに相当する。

20

【0092】

実験の詳細な記載

黒色のPET（約4cm×13cm）スワッチを、0.2g/LのLutensol AT11（BASF）を含む140mLの100mM Britton-Robinson緩衝液に加え、Labomat（分当り32回転）に充填する。

30

Labomatを9℃/分の勾配で130℃に加熱し、10分、維持する。

【0093】

ビーカーを（以下の表に従う）ラン温度に、9℃/分の勾配で冷やし、1分、維持する。好適なpHの10mL酵素溶液（100LU/mLの変異体）又は緩衝液（0LU/mL）をそのビーカーに注入する。

Labomatを2℃/分の勾配で温度に再加熱し、そして30分、維持する。

【0094】

スワッチを除去し、その洗浄液を室温に冷やす。

洗浄液の濁度を測定する。

評価：濁度は、Hach 18900 Ratio Turbidimeterで測定した（1.8, 18、及び180NTU濁度標準で標準化）。酵素の能力を、ブランク液（酵素なし）の濁度と酵素処理した液体の濁度との間の差としてブランクに対して計算した。

40

【0095】

クチナーゼ変異体の相対的能力（濁度の減少）を計算し、その結果を以下の表に示す。負の数字が得られた時、結果を“ネガティブ”として供する。負の数字は、セット・アップのバリエーションにより引き起こされる、アーティファクトと仮定する。

【0096】

【表5】

温度	pH 7	pH 8	pH 9	pH10
60℃	39	57	37	14
65℃	39	16	60	30
70℃	25	12	54	33
75℃	22	50	114	58
85℃	ネガティブ	ネガティブ	15	ネガティブ

10

【0097】

結果は、クチナーゼ変異体は、pH 9 及び 75℃ 周囲のセット・アップでの至適オリゴマー除去で、広い pH 及び温度範囲にわたって活性であることを示す。

実施例 12：cPET 加水分解

処理時間の効果を、モデル分散性染色実験において H. インソレンスクチナーゼについて研究した。試験は以下の通り行った：

（ブラック）PET-布帛のオリゴマー染色スワッチを、Werner Mathis Labomat における典型的な分散染色配列の条件にかける。その方法の概略において、スワッチは、緩衝液に添加され、130℃ に加熱され、処理温度に冷却される。酵素又は緩衝液（100mM Britton-Robinson pH 9）を加え、次に 0～40 分、75℃ に維持する。その溶液を室温に冷やし、洗浄液の濁度を測定する。濁度の減少は、クチナーゼ活性の直接的基準であり、加水分解された cPET オリゴマーに相当する。

20

【0098】

実験の詳細な記載

黒い PET（約 4cm×13cm）スワッチを、0.2g/L Lutensol AT11（BASF）を含む 140mL の 100mM Britton-Robinson 緩衝液に加え、Labomat に充填する（分当り 32 回転）。

30

Labomat を 9℃/分の勾配で 130℃ に加熱し、その温度を 10 分、保持する。

【0099】

そのビーカーを 75℃ に、9℃/分の勾配で冷却し、そして 1 分、保持する。

10mL の酵素溶液（100LU/mL の変異体）又は 100mM の Britton-Robinson 緩衝液 pH 9.0（0LU/mL）をそのビーカーに注入する。

その Labomat を、75℃ に、2℃/分の勾配で再加熱し、好適な分（0～40 分、以下の表を参照のこと）、保持する。

【0100】

スワッチを除去し、その洗浄液を室温に冷やす。

40

洗浄液の濁度を測定する。

評価：濁度を Hach 18900 Ratio Turbidimeter で測定する（1.8, 18, 及び 180 NTU 濁度標準で標準化）。酵素能力を、0 に等しい時間でのブランクに対して比較する：時間 0 のブランク液（酵素なし）の濁度から酵素処理した液体の濁度（所定時間）を引く。

【0101】

クチナーゼ変異体の相対的能力（濁度の減少）を計算し、結果を以下の表に示す。

【0102】

【表 6】

時間（分）	相対的能力（濁度の減少）
0	0
5	42
10	48
15	62
20	69
25	85
30	72
40	78

10

【0103】

20

結果は、酵素の効果が経時的に増加することを示す。この酵素投与量及びオリゴマー濃度で、約20分超で安定状態になるようである。

実施例13：繊維修飾

分散性染色ポリエステル布帛の湿潤特性への効果を、染色前にH. インソレンスクチナーゼの変異体でその布帛を処理することにより研究した。それゆえ、その実験は、2つのフェーズ：実際の繊維修飾及び分散性染色手順からなる。

フェーズ1－繊維修飾

装置：Atlas Launder-O-meter LP2

布帛：Test fabricsからのニット100%洗上げポリエステル

30

pH：50mMリン酸カルシウム緩衝液、pH7

研磨剤：5ビッグスチールボール

ビーカー容量：120mL

処理：65℃で2時間、次に90℃に上げ、そして1時間、保持する

スワッチ調製：3×1.5gスワッチの布帛に切断、ビーカー当たり3=4.5g

すすぎ：

脱イオン水ですすぐ。

フェーズ2－染色－分散性染料

染色液：

40

脱イオン水を一緒に加えて液体比1：20を作る。

【0104】

0.4% Dianix Red (DyStar) SE-CB (owt) pHを4.5～5にする。

染色手順：

1. 繊維修飾からの処理当たり1つのスワッチを染色のために用いる（1.5g／スワッチを液体比計算のために用いる）。

【0105】

2. 上述の方法に従って染浴を作る。冷たい染色液をLabomatビーカーに加え、3.5℃／分の勾配で55℃に加熱する。温度に達したら5分、行う。

50

3. ビーカーに布帛を加える。
 4. 1. 5℃/分の勾配で130℃に温度を上げる。30分、染色する。
 5. 5℃/分の勾配で70℃に冷やす。浴に入れるか、収集せず、そして10分、高温（60℃）で布帛をゆすぐ。高温すすぎの後、全てのブリーディングが停止するまで、室温でオーバーフローですすぐ。

【0106】

6. 一晩、空気乾燥させる。

テスト／分析：

AATCC Test Method 61－洗浄に対する染色堅牢度

染浴抽出パーセント分光光度計

K/S及びL*－反射率計

AATCC TM-79 Prop Test

結果：

繊維修飾からの結果を以下の表に示す。

【0107】

【表7】

変異体投与量	染色 (AATCC TM-61)	色の変化 (K/S @ 530前及び後TM-61)	ドロップテスト (AATCC TM-79)
ブランク	4.5	5	53秒
50LU/mL	4.5	5	18秒
100LU/mL	4.5	5	15秒

【0108】

結果は、ポリエステルの変異体での処理は湿潤度を実質的に増加させる。このセット・アップにおいて分散性染料での染色能力への悪影響は見られない。

実施例14：洗濯場でのクチナーゼ変異体の使用によるヒトの汗／脂で汚された織物での悪臭削減

悪臭削減に関するクチナーゼの能力は、Terg-O-meterで行う1サイクル洗浄試験においてテストすることができる。

【0109】

実験条件：

洗浄液：ビーカー当たり1000mL

スワッチ：100%ポリエステル（インターロックニット、先にSoxhlet抽出により洗浄）。ビーカー当たり24のスワッチ13. 3×3. 5cm)。

汚れ：運動後に腋窩をふくことにより適用するヒト男性の腋窩の甘及び脂

洗剤：5g/Lの標準色洗剤。pH調節なし。

【0110】

水の硬度：3. 2mM Ca²⁺/Mg²⁺（5：1の比）

水の温度：30℃

洗浄時間：30分

すすぎ：水道水で15分

評価：

洗浄後、湿潤スワッチを閉じた色のついた200mLガラスの中に入れる。訓練された感覚パネル（9～11の判定者）が、その湿ったサンプルの上部空き部分のにおいをかぐこと

によりにおいを評価し、全体のおい強度を評価する。そのにおい強度は、各々の端に言葉を書いた15cmの統一されていない線のスケール上にマークすることにより記録される（そのスケールの始めに‘なし’、端に極めて強い）。全ての評価を2回、行う。スワッチを、洗浄後1、2、及び3日目に評価する（スワッチは常にガラス内に維持する）。

【図面の簡単な説明】

【図1】 H. インソレンスのクチナーゼの3D構造についての座標を示す。

【図2】 F. ソラニ・ピシ（左側）及びH. インソレンス（右側）からのクチナーゼの3次元構造を示すコンピューターモデルである。N末端アミノ酸及びこの周囲12Å及び17Å直径のゾーンを同定するために異なる色を用いている。

【図3】 c3ETの加水分解を示す。詳細は例に示す。

【図4】 c3ETの加水分解を示す。詳細は例に示す。

【図5】 c3ETの加水分解を示す。詳細は例に示す。

【図6】 c3ETの加水分解を示す。詳細は例に示す。

10

【図1】

Fig. 1

Humicola insolensからのクチナーゼの3D構造

ATOM	1	N	GLY	A	3	24.424	-7.935	18.390	1.00	46.73
ATOM	2	CA	GLY	A	3	23.848	-8.994	17.546	1.00	42.29
ATOM	3	C	GLY	A	3	24.396	-10.112	16.727	1.00	37.35
ATOM	4	O	GLY	A	3	25.347	-10.913	16.728	1.00	35.38
ATOM	5	N	ALA	A	4	23.664	-10.625	15.797	1.00	34.53
ATOM	6	CA	ALA	A	4	23.051	-10.874	14.555	1.00	30.95
ATOM	7	C	ALA	A	4	21.574	-11.246	14.920	1.00	28.33
ATOM	8	O	ALA	A	4	20.677	-10.499	14.446	1.00	22.94
ATOM	9	CB	ALA	A	4	23.574	-11.780	13.556	1.00	26.92
ATOM	10	N	ILE	A	5	21.583	-12.058	16.043	1.00	26.48
ATOM	11	CA	ILE	A	5	20.281	-12.289	16.637	1.00	25.65
ATOM	12	C	ILE	A	5	20.316	-12.151	18.118	1.00	22.40
ATOM	13	O	ILE	A	5	21.060	-12.888	18.717	1.00	24.74
ATOM	14	CB	ILE	A	5	19.724	-13.683	16.524	1.00	26.04
ATOM	15	CG1	ILE	A	5	19.852	-13.927	15.050	1.00	29.85
ATOM	16	CG2	ILE	A	5	18.374	-13.558	17.159	1.00	20.48
ATOM	17	CD1	ILE	A	5	19.066	-15.133	14.709	1.00	27.96
ATOM	18	N	GLU	A	6	19.461	-11.377	18.668	1.00	20.52
ATOM	19	CA	GLU	A	6	19.207	-11.015	20.040	1.00	17.94
ATOM	20	C	GLU	A	6	17.711	-11.027	20.432	1.00	17.76
ATOM	21	O	GLU	A	6	16.931	-10.165	19.990	1.00	17.60
ATOM	22	CB	GLU	A	6	19.809	-9.614	20.199	1.00	14.22
ATOM	23	CG	GLU	A	6	21.232	-9.374	20.385	1.00	16.71
ATOM	24	CD	GLU	A	6	22.148	-10.387	21.030	1.00	34.47
ATOM	25	OE1	GLU	A	6	21.634	-11.347	21.693	1.00	49.57
ATOM	26	OE2	GLU	A	6	23.410	-10.310	20.975	1.00	37.43
ATOM	27	N	ASN	A	7	17.375	-11.895	21.333	1.00	21.67
ATOM	28	CA	ASN	A	7	16.070	-11.854	21.846	1.00	24.04
ATOM	29	C	ASN	A	7	15.927	-11.488	23.238	1.00	22.08
ATOM	30	O	ASN	A	7	15.098	-12.179	23.820	1.00	24.00
ATOM	31	CB	ASN	A	7	15.468	-13.307	21.820	1.00	25.06
ATOM	32	CG	ASN	A	7	15.039	-13.160	20.341	1.00	38.52
ATOM	33	OD1	ASN	A	7	15.519	-14.147	19.759	1.00	48.45
ATOM	34	ND2	ASN	A	7	14.318	-12.081	19.968	1.00	36.89
ATOM	35	N	GLY	A	8	16.671	-10.813	23.926	1.00	23.56
ATOM	36	CA	GLY	A	8	16.654	-10.628	25.363	1.00	23.69
ATOM	37	C	GLY	A	8	15.366	-10.247	25.984	1.00	22.72
ATOM	38	O	GLY	A	8	14.967	-10.939	26.867	1.00	32.25
ATOM	39	N	LEU	A	9	14.785	-9.144	25.755	1.00	23.61
ATOM	40	CA	LEU	A	9	13.470	-8.753	26.033	1.00	23.73
ATOM	41	C	LEU	A	9	12.559	-9.961	25.782	1.00	25.93
ATOM	42	O	LEU	A	9	11.494	-10.054	26.480	1.00	30.47
ATOM	43	CB	LEU	A	9	12.971	-7.621	25.105	1.00	5.84
ATOM	44	CG	LEU	A	9	11.556	-7.227	25.470	1.00	23.25
ATOM	45	CD1	LEU	A	9	11.422	-6.765	26.968	1.00	20.21
ATOM	46	CD2	LEU	A	9	11.009	-6.071	24.714	1.00	17.64
ATOM	47	N	GLU	A	10	12.775	-10.786	24.773	1.00	29.56

ATOM	48	CA	GLU	A	10	11.635	-11.681	24.484	1.00	33.93
ATOM	49	C	GLU	A	10	11.640	-12.872	25.412	1.00	32.18
ATOM	50	O	GLU	A	10	10.600	-13.159	25.996	1.00	36.67
ATOM	51	CB	GLU	A	10	11.513	-11.996	23.012	1.00	40.97
ATOM	52	CG	GLU	A	10	10.054	-12.303	22.745	1.00	51.96
ATOM	53	CD	GLU	A	10	9.570	-11.711	21.437	1.00	54.08
ATOM	54	OE1	GLU	A	10	10.488	-11.440	20.635	1.00	48.22
ATOM	55	OE2	GLU	A	10	8.323	-11.643	21.471	1.00	52.39
ATOM	56	N	SER	A	11	12.822	-13.334	25.688	1.00	29.58
ATOM	57	CA	SER	A	11	12.993	-14.455	26.645	1.00	35.25
ATOM	58	C	SER	A	11	13.403	-14.012	28.047	1.00	39.86
ATOM	59	O	SER	A	11	13.688	-14.790	28.919	1.00	43.72
ATOM	60	CB	SER	A	11	14.053	-15.364	25.983	1.00	33.73
ATOM	61	OG	SER	A	11	15.275	-14.620	25.928	1.00	46.98
ATOM	62	N	GLY	A	12	13.467	-12.802	28.456	1.00	41.40
ATOM	63	CA	GLY	A	12	13.841	-12.332	29.752	1.00	45.34
ATOM	64	C	GLY	A	12	12.673	-12.562	30.694	1.00	47.62
ATOM	65	O	GLY	A	12	11.485	-12.335	30.335	1.00	50.76
ATOM	66	N	SER	A	13	12.969	-12.900	31.936	1.00	48.09
ATOM	67	CA	SER	A	13	11.974	-13.158	32.995	1.00	45.26
ATOM	68	C	SER	A	13	11.509	-13.933	33.772	1.00	39.53
ATOM	69	O	SER	A	13	12.563	-11.204	33.992	1.00	36.30
ATOM	70	CB	SER	A	13	12.708	-14.006	34.101	1.00	51.20
ATOM	71	OG	SER	A	13	12.006	-13.947	35.338	1.00	57.14
ATOM	72	N	ALA	A	14	10.256	-11.785	34.214	1.00	35.22
ATOM	73	CA	ALA	A	14	10.068	-10.530	34.964	1.00	34.78
ATOM	74	C	ALA	A	14	10.574	-10.620	36.417	1.00	37.51
ATOM	75	O	ALA	A	14	10.809	-9.584	37.113	1.00	38.41
ATOM	76	CB	ALA	A	14	8.714	-9.915	34.903	1.00	32.71
ATOM	77	N	ASN	A	15	11.039	-11.834	36.737	1.00	38.85
ATOM	78	CA	ASN	A	15	11.715	-12.086	37.963	1.00	43.49
ATOM	79	C	ASN	A	15	13.073	-11.411	37.953	1.00	46.45
ATOM	80	O	ASN	A	15	13.453	-11.022	39.022	1.00	52.50
ATOM	81	CB	ASN	A	15	12.088	-13.533	38.207	1.00	53.08
ATOM	82	CG	ASN	A	15	10.772	-14.226	38.553	1.00	71.86
ATOM	83	OD1	ASN	A	15	9.837	-13.535	38.998	1.00	71.73
ATOM	84	ND2	ASN	A	15	10.866	-15.523	38.267	1.00	77.71
ATOM	85	N	ALA	A	16	13.712	-11.305	36.812	1.00	46.73
ATOM	86	CA	ALA	A	16	14.915	-10.470	36.743	1.00	41.22
ATOM	87	C	ALA	A	16	15.031	-9.286	35.798	1.00	36.70
ATOM	88	O	ALA	A	16	16.027	-9.254	35.075	1.00	37.67
ATOM	89	CB	ALA	A	16	15.903	-11.545	36.301	1.00	41.80
ATOM	90	N	CYS	A	17	14.614	-8.227	35.843	1.00	30.62
ATOM	91	CA	CYS	A	17	16.024	-7.093	34.997	1.00	31.78
ATOM	92	C	CYS	A	17	16.744	-6.579	35.149	1.00	32.94
ATOM	93	O	CYS	A	17	16.744	-6.850	36.113	1.00	39.10
ATOM	94	CB	CYS	A	17	13.679	-5.881	35.138	1.00	28.00
ATOM	95	SG	CYS	A	17	12.048	-6.583	34.858	1.00	24.72

ATOM	96	N	PRO	A	18	16.529	-5.910	34.092	1.00	30.49	ATOM	144	CB	PHE	A	24	18.195	-2.855	17.658	1.00	12.61
ATOM	97	CA	PRO	A	18	17.994	-5.626	33.971	1.00	22.04	ATOM	145	CG	PHE	A	24	19.015	-2.150	16.716	1.00	10.72
ATOM	98	C	PRO	A	18	18.178	-4.138	34.241	1.00	20.15	ATOM	146	CD1	PHE	A	24	19.457	-0.844	16.913	1.00	13.08
ATOM	99	O	PRO	A	18	17.085	-3.459	34.370	1.00	17.83	ATOM	147	CD2	PHE	A	24	19.325	-2.852	15.558	1.00	6.61
ATOM	100	CB	PRO	A	18	18.353	-6.003	32.559	1.00	19.20	ATOM	148	CE1	PHE	A	24	20.232	-0.187	15.983	1.00	4.86
ATOM	101	CG	PRO	A	18	17.044	-6.595	32.101	1.00	20.16	ATOM	149	CE2	PHE	A	24	20.061	-2.218	14.545	1.00	7.61
ATOM	102	CD	PRO	A	18	15.903	-5.936	32.792	1.00	24.35	ATOM	150	CZ	PHE	A	24	20.550	-0.823	14.804	1.00	8.78
ATOM	103	N	ASP	A	19	19.428	-3.652	34.011	1.00	14.85	ATOM	151	N	ALA	A	25	16.037	-1.700	15.449	1.00	6.32
ATOM	104	CA	ASP	A	19	19.451	-2.168	34.226	1.00	16.59	ATOM	152	CA	ALA	A	25	15.662	-2.158	14.068	1.00	7.18
ATOM	105	C	ASP	A	19	18.739	-1.367	33.156	1.00	20.42	ATOM	153	C	ALA	A	25	16.851	-1.976	13.055	1.00	8.59
ATOM	106	O	ASP	A	19	18.311	-0.242	33.430	1.00	23.84	ATOM	154	O	ALA	A	25	17.518	-1.000	13.133	1.00	5.95
ATOM	107	CB	ASP	A	19	20.896	-1.818	34.485	1.00	27.25	ATOM	155	CB	ALA	A	25	14.488	-1.402	13.562	1.00	8.27
ATOM	108	CG	ASP	A	19	21.433	-2.389	35.793	1.00	42.30	ATOM	156	N	ARG	A	26	17.174	-3.032	12.325	1.00	8.84
ATOM	109	OD1	ASP	A	19	21.162	-3.549	36.297	1.00	53.52	ATOM	157	CA	ARG	A	26	18.134	-3.278	11.277	1.00	4.04
ATOM	110	OD2	ASP	A	19	22.251	-1.719	36.543	1.00	54.02	ATOM	158	C	ARG	A	26	17.691	-2.694	9.894	1.00	7.67
ATOM	111	N	ALA	A	20	18.646	-1.780	31.895	1.00	20.18	ATOM	159	O	ARG	A	26	16.527	-2.361	9.525	1.00	9.36
ATOM	112	CA	ALA	A	20	18.066	-1.036	30.809	1.00	17.43	ATOM	160	CB	ARG	A	26	18.581	-4.659	10.756	1.00	6.06
ATOM	113	C	ALA	A	20	17.713	-2.087	29.703	1.00	16.06	ATOM	161	CG	ARG	A	26	17.705	-5.741	10.439	1.00	5.08
ATOM	114	O	ALA	A	20	18.334	-3.172	29.860	1.00	9.45	ATOM	162	CD	ARG	A	26	18.069	-7.224	10.382	1.00	6.73
ATOM	115	CB	ALA	A	20	18.975	-0.048	30.100	1.00	12.07	ATOM	163	NE	ARG	A	26	17.000	-8.053	9.709	1.00	9.04
ATOM	116	N	ILE	A	21	16.814	-1.602	28.829	1.00	8.47	ATOM	164	CZ	ARG	A	26	15.724	-8.206	9.912	1.00	7.06
ATOM	117	CA	ILE	A	21	16.657	-2.583	27.753	1.00	9.23	ATOM	165	NH1	ARG	A	26	15.085	-7.535	10.895	1.00	22.93
ATOM	118	C	ILE	A	21	16.952	-1.745	26.486	1.00	14.77	ATOM	166	NH2	ARG	A	26	14.809	-8.825	9.346	1.00	7.89
ATOM	119	O	ILE	A	21	16.681	-0.473	26.403	1.00	12.01	ATOM	167	N	GLY	A	27	18.761	-2.539	9.092	1.00	7.71
ATOM	120	CB	ILE	A	21	15.208	-2.984	27.837	1.00	16.28	ATOM	168	CA	GLY	A	27	18.537	-1.888	7.782	1.00	5.34
ATOM	121	CG1	ILE	A	21	14.851	-3.898	28.956	1.00	15.55	ATOM	169	C	GLY	A	27	18.063	-2.896	6.862	1.00	4.70
ATOM	122	CG2	ILE	A	21	14.689	-3.671	26.514	1.00	13.71	ATOM	170	O	GLY	A	27	18.155	-4.139	7.075	1.00	13.14
ATOM	123	CD1	ILE	A	21	13.401	-3.879	29.372	1.00	6.12	ATOM	171	N	SER	A	28	17.562	-2.612	5.765	1.00	11.82
ATOM	124	N	LEU	A	22	17.432	-2.451	25.391	1.00	12.24	ATOM	172	CA	SER	A	28	17.108	-3.325	4.615	1.00	14.72
ATOM	125	CA	LEU	A	22	17.665	-1.774	24.087	1.00	11.27	ATOM	173	C	SER	A	28	18.214	-4.327	4.142	1.00	7.74
ATOM	126	C	LEU	A	22	16.849	-2.517	23.038	1.00	14.60	ATOM	174	O	SER	A	28	19.286	-3.973	4.083	1.00	6.71
ATOM	127	O	LEU	A	22	16.908	-3.781	22.850	1.00	9.78	ATOM	175	CB	SER	A	28	16.460	-2.352	3.538	1.00	6.38
ATOM	128	CB	LEU	A	22	19.087	-1.865	23.693	1.00	10.96	ATOM	176	OG	SER	A	28	16.819	-0.978	3.833	1.00	28.10
ATOM	129	CG	LEU	A	22	19.493	-1.543	22.257	1.00	10.32	ATOM	177	N	THR	A	29	17.942	-5.634	4.241	1.00	4.79
ATOM	130	CD1	LEU	A	22	19.311	-0.081	21.906	1.00	4.72	ATOM	178	CA	THR	A	29	18.562	-6.763	3.914	1.00	8.71
ATOM	131	CD2	LEU	A	22	20.990	-1.842	22.156	1.00	7.42	ATOM	179	C	THR	A	29	19.500	-7.271	4.985	1.00	14.00
ATOM	132	N	ILE	A	23	16.038	-1.815	22.242	1.00	15.13	ATOM	180	O	THR	A	29	20.162	-8.326	4.713	1.00	17.68
ATOM	133	CA	ILE	A	23	15.298	-2.459	21.115	1.00	18.06	ATOM	181	CB	THR	A	29	19.454	-6.680	2.617	1.00	14.90
ATOM	134	C	ILE	A	23	15.916	-1.771	19.901	1.00	17.42	ATOM	182	OG1	THR	A	29	20.736	-6.066	2.595	1.00	14.00
ATOM	135	O	ILE	A	23	16.117	-0.519	19.795	1.00	19.31	ATOM	183	CG2	THR	A	29	18.785	-5.888	1.561	1.00	15.59
ATOM	136	CB	ILE	A	23	13.820	-2.194	21.392	1.00	18.16	ATOM	184	N	GLU	A	30	19.740	-6.599	6.105	1.00	14.52
ATOM	137	CG1	ILE	A	23	13.208	-3.076	22.447	1.00	14.23	ATOM	185	CA	GLU	A	30	20.677	-7.266	7.056	1.00	14.10
ATOM	138	CG2	ILE	A	23	12.787	-2.167	20.247	1.00	13.19	ATOM	186	C	GLU	A	30	20.092	-8.513	7.647	1.00	13.07
ATOM	139	CD1	ILE	A	23	12.142	-2.065	22.976	1.00	20.41	ATOM	187	O	GLU	A	30	18.916	-8.726	7.705	1.00	19.98
ATOM	140	N	PHE	A	24	16.218	-2.548	18.940	1.00	14.59	ATOM	188	CB	GLU	A	30	21.228	-6.371	8.072	1.00	15.45
ATOM	141	CA	PHE	A	24	16.859	-2.159	17.671	1.00	11.72	ATOM	189	CG	GLU	A	30	21.166	-4.945	7.709	1.00	8.37
ATOM	142	C	PHE	A	24	16.347	-2.719	16.353	1.00	7.25	ATOM	190	CD	GLU	A	30	22.073	-4.143	8.637	1.00	23.08
ATOM	143	O	PHE	A	24	16.095	-3.998	16.161	1.00	3.47	ATOM	191	OE1	GLU	A	30	21.395	-3.328	9.284	1.00	19.26

ATOM	192	OE2	GLU	A	30	23.317	-4.327	8.712	1.00	19.71	ATOM	240	CA	VAL	A	38	25.237	-0.800	13.411	1.00	15.22
ATOM	193	N	PRO	A	31	20.875	-9.479	7.918	1.00	13.09	ATOM	241	C	VAL	A	38	24.588	-1.455	14.612	1.00	14.68
ATOM	194	CA	PRO	A	31	20.477	-10.818	8.402	1.00	14.56	ATOM	242	O	VAL	A	38	24.906	-1.185	15.733	1.00	15.89
ATOM	195	C	PRO	A	31	20.167	-10.698	9.895	1.00	18.27	ATOM	243	CB	VAL	A	38	24.124	0.180	12.855	1.00	14.13
ATOM	196	O	PRO	A	31	20.148	-9.636	10.392	1.00	20.45	ATOM	244	CG1	VAL	A	38	23.663	0.897	14.167	1.00	13.55
ATOM	197	CB	PRO	A	31	21.690	-11.692	8.215	1.00	10.95	ATOM	245	CG2	VAL	A	38	24.570	1.025	11.670	1.00	6.75
ATOM	198	CG	PRO	A	31	22.790	-10.664	8.455	1.00	11.24	ATOM	246	N	GLY	A	39	23.745	-2.410	14.677	1.00	14.24
ATOM	199	CD	PRO	A	31	22.350	-9.316	7.864	1.00	13.71	ATOM	247	CA	GLY	A	39	23.135	-3.151	15.746	1.00	11.03
ATOM	200	N	GLY	A	32	19.612	-11.689	10.472	1.00	18.99	ATOM	248	C	GLY	A	39	24.096	-3.586	16.791	1.00	13.34
ATOM	201	CA	GLY	A	32	19.205	-11.774	11.816	1.00	13.53	ATOM	249	O	GLY	A	39	24.131	-3.181	17.934	1.00	15.13
ATOM	202	C	GLY	A	32	18.133	-10.808	12.188	1.00	16.62	ATOM	250	N	PRO	A	40	25.067	-4.340	16.352	1.00	14.70
ATOM	203	O	GLY	A	32	17.345	-10.294	11.411	1.00	17.01	ATOM	251	CA	PRO	A	40	26.094	-5.025	17.171	1.00	13.44
ATOM	204	N	ASN	A	33	18.055	-10.528	13.468	1.00	16.15	ATOM	252	C	PRO	A	40	27.010	-3.909	17.589	1.00	11.81
ATOM	205	CA	ASN	A	33	17.290	-9.346	13.623	1.00	14.74	ATOM	253	O	PRO	A	40	27.346	-3.871	18.764	1.00	12.79
ATOM	206	C	ASN	A	33	18.294	-8.273	14.230	1.00	15.46	ATOM	254	CB	PRO	A	40	26.723	-6.111	16.279	1.00	8.43
ATOM	207	O	ASN	A	33	17.774	-7.184	14.575	1.00	15.90	ATOM	255	CG	PRO	A	40	25.873	-6.243	14.950	1.00	4.84
ATOM	208	CB	ASN	A	33	16.241	-9.663	14.867	1.00	17.42	ATOM	256	CD	PRO	A	40	25.198	-4.902	14.995	1.00	12.36
ATOM	209	CG	ASN	A	33	16.827	-10.201	16.127	1.00	17.97	ATOM	257	N	ALA	A	41	27.226	-2.979	16.695	1.00	7.41
ATOM	210	OD1	ASN	A	33	16.112	-10.395	17.089	1.00	19.05	ATOM	258	CA	ALA	A	41	28.066	-1.962	17.278	1.00	11.03
ATOM	211	ND2	ASN	A	33	18.074	-10.460	16.112	1												

ATOM	288	CA	LEU	A	46	25.968	0.248	25.207	1.00	16.29	ATOM	336	CB	ASN	A	52	22.750	-5.884	34.232	1.00	34.86
ATOM	289	C	LEU	A	46	26.395	-0.651	26.346	1.00	13.48	ATOM	337	CG	ASN	A	52	21.637	-6.879	34.271	1.00	39.54
ATOM	290	O	LEU	A	46	26.579	-0.325	27.462	1.00	13.48	ATOM	338	OD1	ASN	A	52	20.781	-6.541	35.095	1.00	54.31
ATOM	291	CB	LEU	A	46	24.608	-0.243	24.847	1.00	19.46	ATOM	339	ND2	ASN	A	52	21.611	-7.954	35.503	1.00	48.82
ATOM	292	CG	LEU	A	46	23.642	0.551	25.664	1.00	13.97	ATOM	340	N	ILE	A	53	22.127	-5.699	30.800	1.00	24.42
ATOM	293	CD1	LEU	A	46	24.089	1.994	25.563	1.00	13.99	ATOM	341	CA	ILE	A	53	21.261	-5.092	29.772	1.00	20.15
ATOM	294	CD2	LEU	A	46	22.275	0.465	25.038	1.00	32.18	ATOM	342	C	ILE	A	53	20.585	-6.151	28.912	1.00	17.63
ATOM	295	N	GLU	A	47	26.523	-1.890	25.882	1.00	15.90	ATOM	343	O	ILE	A	53	21.020	-7.349	28.917	1.00	18.01
ATOM	296	CA	GLU	A	47	26.910	-2.886	26.909	1.00	24.03	ATOM	344	CB	ILE	A	53	22.245	-4.297	28.880	1.00	14.09
ATOM	297	C	GLU	A	47	28.140	-2.500	27.702	1.00	24.14	ATOM	345	CG1	ILE	A	53	21.682	-3.257	27.936	1.00	22.91
ATOM	298	O	GLU	A	47	28.722	-3.203	28.500	1.00	27.24	ATOM	346	CG2	ILE	A	53	22.907	-5.321	27.946	1.00	16.37
ATOM	299	CB	GLU	A	47	27.147	-4.206	26.204	1.00	33.33	ATOM	347	CD1	ILE	A	53	22.877	-2.315	27.622	1.00	38.17
ATOM	300	CG	GLU	A	47	27.386	-5.254	27.245	1.00	51.29	ATOM	348	N	TRP	A	54	19.447	-5.880	28.383	1.00	15.19
ATOM	301	CD	GLU	A	47	26.741	-7.007	26.524	1.00	68.40	ATOM	349	CA	TRP	A	54	18.804	-6.889	27.567	1.00	17.96
ATOM	302	OE1	GLU	A	47	28.856	-6.921	25.777	1.00	66.37	ATOM	350	C	TRP	A	54	18.803	-6.230	26.151	1.00	19.82
ATOM	303	OE2	GLU	A	47	28.992	-1.626	26.830	1.00	78.70	ATOM	351	O	TRP	A	54	18.340	-5.059	25.985	1.00	18.37
ATOM	304	N	SER	A	48	30.331	-1.518	27.789	1.00	27.50	ATOM	352	CB	TRP	A	54	17.364	-7.046	27.998	1.00	23.18
ATOM	305	CA	SER	A	48	30.108	-0.555	28.926	1.00	26.91	ATOM	353	CG	TRP	A	54	16.949	-7.932	29.100	1.00	24.57
ATOM	306	C	SER	A	48	31.124	-0.058	29.462	1.00	33.39	ATOM	354	CD1	TRP	A	54	17.757	-8.727	29.895	1.00	24.46
ATOM	307	O	SER	A	48	31.116	-0.990	26.621	1.00	21.90	ATOM	355	CD2	TRP	A	54	15.595	-8.164	29.603	1.00	30.21
ATOM	308	CB	SER	A	48	31.294	0.422	26.483	1.00	27.87	ATOM	356	NE1	TRP	A	54	17.004	-9.372	30.858	1.00	25.87
ATOM	309	OG	SER	A	48	28.826	-0.101	28.995	1.00	25.04	ATOM	357	CE2	TRP	A	54	15.692	-9.039	30.700	1.00	24.92
ATOM	310	N	HIS	A	49	28.542	0.955	29.956	1.00	19.72	ATOM	358	CE3	TRP	A	54	14.358	-7.633	29.243	1.00	36.26
ATOM	311	CA	HIS	A	49	27.480	0.461	30.950	1.00	22.55	ATOM	359	CZ2	TRP	A	54	14.611	-9.442	31.432	1.00	19.75
ATOM	312	C	HIS	A	49	27.186	1.089	31.898	1.00	27.93	ATOM	360	CZ3	TRP	A	54	13.316	-8.042	30.009	1.00	32.94
ATOM	313	O	HIS	A	49	28.094	2.197	29.463	1.00	16.13	ATOM	361	CH2	TRP	A	54	13.451	-8.916	31.068	1.00	23.02
ATOM	314	CB	HIS	A	49	28.806	3.036	28.520	1.00	39.79	ATOM	362	N	ILE	A	55	19.063	-7.152	25.204	1.00	15.21
ATOM	315	CG	HIS	A	49	29.564	4.058	28.953	1.00	45.66	ATOM	363	CA	ILE	A	55	19.178	-6.655	23.838	1.00	12.41
ATOM	316	ND1	HIS	A	49	28.776	3.070	27.979	1.00	46.91	ATOM	364	C	ILE	A	55	18.091	-7.215	22.962	1.00	11.40
ATOM	317	CD2	HIS	A	49	30.028	4.750	27.979	1.00	45.87	ATOM	365	O	ILE	A	55	17.955	-8.378	22.680	1.00	7.34
ATOM	318	CE1	HIS	A	49	29.544	4.139	26.934	1.00	50.84	ATOM	366	CB	ILE	A	55	20.546	-6.962	23.201	1.00	16.44
ATOM	319	NE2	HIS	A	49	27.009	-0.703	30.715	1.00	18.34	ATOM	367	CG1	ILE	A	55	21.939	-6.409	23.702	1.00	8.75
ATOM	320	N	ILE	A	50	25.874	-1.129	31.415	1.00	19.89	ATOM	368	CG2	ILE	A	55	20.384	-6.460	21.750	1.00	21.77
ATOM	321	CA	ILE	A	50	25.917	-2.629	31.146	1.00	26.29	ATOM	369	CD1	ILE	A	55	21.767	-5.582	24.863	1.00	16.23
ATOM	322	C	ILE	A	50	25.322	-3.023	30.168	1.00	25.33	ATOM	370	N	GLN	A	56	17.226	-6.412	22.390	1.00	9.67
ATOM	323	O	ILE	A	50	24.527	-0.535	31.008	1.00	10.50	ATOM	371	CA	GLN	A	56	16.161	-7.016	21.619	1.00	10.90
ATOM	324	CB	ILE	A	50	24.340	0.906	31.292	1.00	4.97	ATOM	372	C	GLN	A	56	16.432	-6.621	20.143	1.00	13.08
ATOM	325	CG1	ILE	A	50	23.466	-1.298	31.697	1.00	12.96	ATOM	373	O	GLN	A	56	16.402	-5.393	19.953	1.00	10.32
ATOM	326	CG2	ILE	A	50	23.413	1.845	30.602	1.00	16.65	ATOM	374	CB	GLN	A	56	14.786	-6.542	22.014	1.00	11.49
ATOM	327	CD1	ILE	A	50	25.707	-3.256	32.066	1.00	31.77	ATOM	375	CG	GLN	A	56	13.653	-7.256	21.316	1.00	23.47
ATOM	328	N	ARG	A	51	26.887	-4.714	32.107	1.00	29.06	ATOM	376	CD	GLN	A	56	13.789	-8.741	21.351	1.00	24.88
ATOM	329	CA	ARG	A	51	25.457	-5.331	32.170	1.00	32.68	ATOM	377	OE1	GLN	A	56	13.610	-9.379	20.324	1.00	9.56
ATOM	330	C	ARG	A	51	24.380	-4.817	31.512	1.00	37.16	ATOM	378	NE2	GLN	A	56	14.119	-9.221	22.544	1.00	17.94
ATOM	331	O	ARG	A	51	23.284	-5.767	32.788	1.00	28.48	ATOM	379	N	GLY	A	57	16.288	-7.645	19.216	1.00	6.84
ATOM	332	N	ASN	A	52	22.176	-5.178	31.993	1.00	27.75	ATOM	380	CA	GLY	A	57	16.174	-7.019	17.841	1.00	16.15
ATOM	333	CA	ASN	A	52	21.333	-4.488	32.636	1.00	26.68	ATOM	381	C	GLY	A	57	14.740	-7.085	17.267	1.00	13.72
ATOM	334	C	ASN	A	52						ATOM	382	O	GLY	A	57	14.124	-8.016	17.752	1.00	12.70
ATOM	335	O	ASN	A	52						ATOM	383	N	VAL	A	58	14.068	-6.264	16.525	1.00	12.73

ATOM	384	CA	VAL	A	58	12.739	-6.308	16.070	1.00	11.16	ATOM	432	C	ALA	A	65	13.143	-4.857	1.745	1.00	21.76
ATOM	385	C	VAL	A	58	12.715	-7.246	14.893	1.00	14.85	ATOM	433	O	ALA	A	65	12.855	-3.801	2.229	1.00	23.60
ATOM	386	O	VAL	A	58	13.234	-6.891	13.849	1.00	18.64	ATOM	434	CB	ALA	A	65	11.384	-6.390	2.364	1.00	17.31
ATOM	387	CB	VAL	A	58	12.262	-4.984	15.352	1.00	6.54	ATOM	435	N	LEU	A	66	13.401	-4.866	0.402	1.00	21.48
ATOM	388	CG1	VAL	A	58	10.894	-4.974	14.731	1.00	5.89	ATOM	436	CA	LEU	A	66	13.763	-3.581	-0.216	1.00	13.20
ATOM	389	CG2	VAL	A	58	12.650	-3.840	16.331	1.00	5.86	ATOM	437	C	LEU	A	66	12.469	-2.913	-0.452	1.00	13.90
ATOM	390	N	GLY	A	59	12.209	-8.465	15.008	1.00	21.96	ATOM	438	O	LEU	A	66	12.548	-1.767	-0.197	1.00	11.85
ATOM	391	CA	GLY	A	59	12.120	-9.385	13.874	1.00	17.81	ATOM	439	CB	LEU	A	66	14.593	-3.602	-1.470	1.00	3.92
ATOM	392	C	GLY	A	59	10.645	-9.561	13.550	1.00	23.35	ATOM	440	CG	LEU	A	66	15.891	-4.308	-1.191	1.00	9.05
ATOM	393	O	GLY	A	59	9.919	-8.579	13.249	1.00	27.99	ATOM	441	CD1	LEU	A	66	16.509	-4.725	-2.438	1.00	12.78
ATOM	394	N	GLY	A	60	10.166	-10.805	13.623	1.00	18.75	ATOM	442	CD2	LEU	A	66	16.569	-3.119	-0.580	1.00	13.44
ATOM	395	CA	GLY	A	60	8.841	-11.142	13.285	1.00	11.46	ATOM	443	N	ALA	A	67	11.413	-3.625	-0.801	1.00	14.94
ATOM	396	C	GLY	A	60	8.550	-10.833	11.851	1.00	14.56	ATOM	444	CA	ALA	A	67	10.253	-2.759	-1.277	1.00	12.42
ATOM	397	O	GLY	A	60	9.160	-11.439	11.003	1.00	16.32	ATOM	445	C	ALA	A	67	9.626	-1.879	-0.224	1.00	14.21
ATOM	398	N	PRO	A	61	7.505	-10.103	11.612	1.00	12.10	ATOM	446	O	ALA	A	67	9.218	-0.818	-0.643	1.00	14.29
ATOM	399	CA	PRO	A	61	7.123	-9.774	10.250	1.00	14.70	ATOM	447	CB	ALA	A	67	9.089	-3.588	-1.781	1.00	3.90
ATOM	400	C	PRO	A	61	8.230	-8.941	9.570	1.00	22.17	ATOM	448	N	THR	A	68	9.494	-2.409	1.006	1.00	12.11
ATOM	401	O	PRO	A	61	8.143	-8.758	8.344	1.00	25.74	ATOM	449	CA	THR	A	68	8.780	-1.647	1.997	1.00	11.77
ATOM	402	CB	PRO	A	61	5.911	-8.860	10.332	1.00	14.30	ATOM	450	C	THR	A	68	9.242	-0.214	2.219	1.00	13.05
ATOM	403	CG	PRO	A	61	5.880	-8.514	11.784													

ATOM	480	CD1	LEU	A	71	4.879	-0.764	2.885	1.00	18.12	ATOM	528	C	ALA	A	78	4.381	-4.332	10.819	1.00	24.48
ATOM	481	CD2	LEU	A	71	3.786	0.546	1.000	1.00	18.24	ATOM	529	O	ALA	A	78	4.389	-4.729	11.983	1.00	26.91
ATOM	482	N	PRO	A	72	4.535	4.663	2.529	1.00	33.01	ATOM	530	CB	ALA	A	78	3.390	-5.808	9.336	1.00	17.23
ATOM	483	CA	PRO	A	72	4.389	5.888	3.311	1.00	34.96	ATOM	531	N	ASN	A	79	5.350	-3.863	10.093	1.00	21.58
ATOM	484	C	PRO	A	72	4.865	5.590	4.778	1.00	32.90	ATOM	532	CA	ASN	A	79	6.602	-3.576	10.774	1.00	20.62
ATOM	485	O	PRO	A	72	4.619	4.512	5.331	1.00	28.55	ATOM	533	C	ASN	A	79	6.480	-2.673	11.969	1.00	20.93
ATOM	486	CB	PRO	A	72	2.983	6.453	3.095	1.00	32.98	ATOM	534	O	ASN	A	79	6.975	-2.944	13.053	1.00	15.52
ATOM	487	CG	PRO	A	72	2.224	5.189	2.827	1.00	30.36	ATOM	535	CB	ASN	A	79	7.474	-3.069	9.670	1.00	24.79
ATOM	488	CD	PRO	A	72	3.188	4.093	2.380	1.00	33.56	ATOM	536	CG	ASN	A	79	7.933	-4.238	8.824	1.00	28.76
ATOM	489	N	ARG	A	73	5.601	6.610	5.221	1.00	25.54	ATOM	537	OD1	ASN	A	79	7.867	-5.439	9.091	1.00	25.30
ATOM	490	CA	ARG	A	73	6.325	6.547	6.408	1.00	25.42	ATOM	538	ND2	ASN	A	79	8.488	-3.891	7.660	1.00	24.90
ATOM	491	C	ARG	A	73	7.613	5.755	6.321	1.00	21.78	ATOM	539	N	ILE	A	80	5.731	-1.611	11.936	1.00	15.93
ATOM	492	O	ARG	A	73	8.360	5.950	7.304	1.00	29.61	ATOM	540	CA	ILE	A	80	5.586	-0.574	12.924	1.00	17.00
ATOM	493	CB	ARG	A	73	5.469	5.978	7.549	1.00	24.29	ATOM	541	C	ILE	A	80	4.925	-1.187	14.118	1.00	20.63
ATOM	494	CG	ARG	A	73	4.575	6.998	8.155	1.00	23.47	ATOM	542	O	ILE	A	80	5.234	-0.939	15.264	1.00	18.79
ATOM	495	CD	ARG	A	73	3.818	6.793	9.360	1.00	29.73	ATOM	543	CB	ILE	A	80	4.756	0.629	12.436	1.00	11.98
ATOM	496	NE	ARG	A	73	3.222	5.460	9.392	1.00	36.30	ATOM	544	CG1	ILE	A	80	5.627	1.124	11.297	1.00	9.50
ATOM	497	CZ	ARG	A	73	2.891	5.312	10.713	1.00	42.26	ATOM	545	CG2	ILE	A	80	4.379	1.728	13.354	1.00	16.27
ATOM	498	NH1	ARG	A	73	3.145	6.288	11.555	1.00	26.57	ATOM	546	CD1	ILE	A	80	5.007	2.071	10.424	1.00	8.15
ATOM	499	NH2	ARG	A	73	2.320	4.144	10.883	1.00	39.03	ATOM	547	N	ASP	A	81	4.017	-2.019	13.708	1.00	19.21
ATOM	500	N	GLY	A	74	7.868	4.909	5.326	1.00	8.42	ATOM	548	CA	ASP	A	81	3.304	-2.778	14.728	1.00	15.15
ATOM	501	CA	GLY	A	74	9.120	4.291	5.332	1.00	5.06	ATOM	549	C	ASP	A	81	4.147	-3.711	15.510	1.00	15.77
ATOM	502	C	GLY	A	74	9.243	2.858	5.508	1.00	12.74	ATOM	550	O	ASP	A	81	4.084	-3.697	16.695	1.00	15.82
ATOM	503	O	GLY	A	74	10.256	2.286	5.317	1.00	16.46	ATOM	551	CB	ASP	A	81	2.291	-3.438	13.668	1.00	26.36
ATOM	504	N	THR	A	75	8.145	2.321	5.906	1.00	12.82	ATOM	552	CG	ASP	A	81	1.065	-2.530	13.790	1.00	23.71
ATOM	505	CA	THR	A	75	8.036	0.869	6.008	1.00	11.14	ATOM	553	OD1	ASP	A	81	1.105	-1.355	14.226	1.00	14.33
ATOM	506	C	THR	A	75	6.625	0.428	6.134	1.00	10.64	ATOM	554	OD2	ASP	A	81	0.061	-3.125	13.222	1.00	33.05
ATOM	507	O	THR	A	75	5.757	1.231	5.949	1.00	9.36	ATOM	555	N	GLU	A	82	5.148	-4.447	15.096	1.00	16.07
ATOM	508	CB	THR	A	75	8.843	0.398	7.219	1.00	6.97	ATOM	556	CA	GLU	A	82	5.984	-5.318	15.882	1.00	14.77
ATOM	509	OG1	THR	A	75	8.938	-0.950	7.125	1.00	5.64	ATOM	557	C	GLU	A	82	6.839	-4.355	16.667	1.00	19.33
ATOM	510	CG2	THR	A	75	8.108	0.865	8.603	1.00	6.30	ATOM	558	O	GLU	A	82	7.315	-4.708	17.752	1.00	23.58
ATOM	511	N	SER	A	76	6.409	-0.858	6.259	1.00	10.07	ATOM	559	CB	GLU	A	82	6.998	-6.031	15.064	1.00	13.20
ATOM	512	CA	SER	A	76	5.061	-1.384	6.354	1.00	13.33	ATOM	560	CG	GLU	A	82	7.792	-7.239	15.476	1.00	23.09
ATOM	513	C	SER	A	76	4.405	-1.163	7.747	1.00	21.87	ATOM	561	CD	GLU	A	82	6.767	-8.114	16.185	1.00	29.68
ATOM	514	O	SER	A	76	5.228	-1.102	8.679	1.00	24.22	ATOM	562	OE1	GLU	A	82	5.666	-7.670	16.403	1.00	26.63
ATOM	515	CB	SER	A	76	5.030	-2.832	6.083	1.00	4.81	ATOM	563	OE2	GLU	A	82	7.273	-9.181	16.411	1.00	33.08
ATOM	516	OG	SER	A	76	5.327	-3.664	7.107	1.00	16.98	ATOM	564	N	GLY	A	83	7.228	-3.227	16.199	1.00	16.79
ATOM	517	N	GLN	A	77	3.082	-1.100	7.911	1.00	24.90	ATOM	565	CA	GLY	A	83	8.033	-2.428	17.140	1.00	17.32
ATOM	518	CA	GLN	A	77	2.454	-1.020	9.166	1.00	23.85	ATOM	566	C	GLY	A	83	7.238	-2.018	18.366	1.00	17.54
ATOM	519	C	GLN	A	77	2.643	-2.236	10.015	1.00	19.58	ATOM	567	O	GLY	A	83	7.561	-2.103	19.528	1.00	15.06
ATOM	520	O	GLN	A	77	2.908	-2.140	11.203	1.00	15.15	ATOM	568	N	LYS	A	84	6.093	-1.408	18.114	1.00	18.72
ATOM	521	CB	GLN	A	77	0.983	-0.703	9.217	1.00	49.56	ATOM	569	CA	LYS	A	84	5.050	-1.146	19.096	1.00	16.90
ATOM	522	CG	GLN	A	77	0.567	-0.580	10.642	1.00	49.56	ATOM	570	C	LYS	A	84	4.893	-2.337	20.057	1.00	17.74
ATOM	523	CD	GLN	A	77	0.689	0.785	11.194	1.00	65.91	ATOM	571	O	LYS	A	84	4.962	-2.265	21.295	1.00	14.31
ATOM	524	OE1	GLN	A	77	0.956	0.869	12.356	1.00	66.06	ATOM	572	CB	LYS	A	84	3.799	-0.872	18.307	1.00	14.62
ATOM	525	NE2	GLN	A	77	0.481	1.750	10.350	1.00	68.91	ATOM	573	CG	LYS	A	84	3.535	0.565	18.291	1.00	19.30
ATOM	526	N	ALA	A	78	2.754	-3.376	9.402	1.00	15.90	ATOM	574	CD	LYS	A	84	2.787	1.013	17.044	1.00	34.24
ATOM	527	CA	ALA	A	78	3.071	-4.577	10.073	1.00	19.47	ATOM	575	CE	LYS	A	84	1.568	1.902	17.337	1.00	37.70

ATOM	576	NZ	LYS	A	84	0.346	1.226	16.827	1.00	48.42	ATOM	624	CB	ALA	A	90	10.080	-3.253	27.139	1.00	7.74
ATOM	577	N	ARG	A	85	4.617	-3.506	19.519	1.00	18.50	ATOM	625	N	ASN	A	91	7.457	-2.445	28.732	1.00	25.45
ATOM	578	CA	ARG	A	85	4.583	-4.705	20.280	1.00	19.04	ATOM	626	CA	ASN	A	91	6.665	-1.979	29.870	1.00	27.25
ATOM	579	C	ARG	A	85	5.677	-4.733	21.308	1.00	19.63	ATOM	627	C	ASN	A	91	5.847	-2.996	30.656	1.00	30.97
ATOM	580	O	ARG	A	85	5.442	-5.192	22.383	1.00	19.24	ATOM	628	O	ASN	A	91	5.346	-2.884	31.768	1.00	27.64
ATOM	581	CB	ARG	A	85	4.740	-5.979	19.464	1.00	14.74	ATOM	629	CB	ASN	A	91	5.560	-1.206	29.125	1.00	29.14
ATOM	582	CG	ARG	A	85	3.843	-7.094	19.887	1.00	8.85	ATOM	630	CG	ASN	A	91	4.946	-0.345	30.216	1.00	31.73
ATOM	583	CD	ARG	A	85	4.146	-8.554	19.705	1.00	7.20	ATOM	631	OD1	ASN	A	91	3.845	-0.692	30.645	1.00	46.76
ATOM	584	NE	ARG	A	85	5.483	-8.898	19.194	1.00	20.30	ATOM	632	ND2	ASN	A	91	5.641	0.629	30.643	1.00	29.03
ATOM	585	CZ	ARG	A	85	6.170	-9.705	19.899	1.00	18.19	ATOM	633	N	GLN	A	92	5.369	-4.008	29.969	1.00	35.37
ATOM	586	NH1	ARG	A	85	5.627	-10.161	21.040	1.00	34.03	ATOM	634	CA	GLN	A	92	4.702	-5.141	30.591	1.00	35.55
ATOM	587	NH2	ARG	A	85	7.345	-9.979	19.556	1.00	15.36	ATOM	635	C	GLN	A	92	5.619	-6.072	31.352	1.00	34.28
ATOM	588	N	LEU	A	86	6.901	-4.586	20.956	1.00	22.21	ATOM	636	O	GLN	A	92	5.227	-6.519	32.440	1.00	39.47
ATOM	589	CA	LEU	A	86	8.006	-4.792	21.873	1.00	20.94	ATOM	637	CB	GLN	A	92	3.866	-5.903	29.573	1.00	54.94
ATOM	590	C	LEU	A	86	8.044	-3.637	22.803	1.00	20.73	ATOM	638	CG	GLN	A	92	2.689	-6.698	30.142	1.00	78.63
ATOM	591	O	LEU	A	86	8.155	-3.970	23.925	1.00	22.18	ATOM	639	CD	GLN	A	92	2.806	-8.167	29.805	1.00	93.87
ATOM	592	CB	LEU	A	86	9.333	-4.932	21.168	1.00	6.67	ATOM	640	OE1	GLN	A	92	3.597	-8.840	30.475	1.00	96.99
ATOM	593	CG	LEU	A	86	9.358	-6.241	20.282	1.00	11.45	ATOM	641	NE2	GLN	A	92	2.083	-8.696	28.824	1.00	97.81
ATOM	594	CD1	LEU	A	86	10.546	-6.054	19.287	1.00	18.60	ATOM	642	N	LYS	A	93	6.859	-6.403	31.050	1.00	31.97
ATOM	595	CD2	LEU	A	86	9.362	-7.516	21.020	1.00	5.17	ATOM	643	CA	LYS	A	93	7.675	-7.204	31.972		

ATOM	672	N	THR	A	97	12.287	-0.409	34.507	1.00	30.32	ATOM	720	CD2	TYR	A	104	21.961	-0.044	9.172	1.00	6.85
ATOM	673	CA	THR	A	97	13.519	-0.367	33.794	1.00	22.83	ATOM	721	CE1	TYR	A	104	22.447	2.513	8.186	1.00	5.61
ATOM	674	C	THR	A	97	13.404	0.493	32.534	1.00	22.44	ATOM	722	CE2	TYR	A	104	22.751	0.052	8.072	1.00	7.49
ATOM	675	O	THR	A	97	12.446	0.779	31.816	1.00	21.14	ATOM	723	CZ	TYR	A	104	22.972	1.377	7.608	1.00	11.08
ATOM	676	CB	THR	A	97	13.835	-1.851	33.705	1.00	25.87	ATOM	724	OH	TYR	A	104	23.795	1.509	6.479	1.00	14.32
ATOM	677	OG1	THR	A	97	14.602	-1.915	32.528	1.00	38.91	ATOM	725	N	SER	A	105	18.939	2.975	8.852	1.00	18.39
ATOM	678	CG2	THR	A	97	12.769	-2.901	33.621	1.00	24.22	ATOM	726	CA	SER	A	105	18.190	2.854	7.601	1.00	9.66
ATOM	679	N	PRO	A	98	14.393	1.415	32.498	1.00	20.59	ATOM	727	C	SER	A	105	16.763	2.370	7.722	1.00	6.10
ATOM	680	CA	PRO	A	98	14.513	2.292	31.254	1.00	18.15	ATOM	728	O	SER	A	105	16.090	3.304	8.077	1.00	5.63
ATOM	681	C	PRO	A	98	14.882	1.494	29.978	1.00	16.07	ATOM	729	CB	SER	A	105	19.124	2.159	6.607	1.00	8.55
ATOM	682	O	PRO	A	98	15.622	0.462	29.934	1.00	17.19	ATOM	730	OG	SER	A	105	18.553	1.685	5.463	1.00	24.30
ATOM	683	CB	PRO	A	98	15.563	3.339	31.676	1.00	14.55	ATOM	731	N	GLN	A	106	16.241	1.405	7.079	1.00	9.93
ATOM	684	CG	PRO	A	98	16.270	2.646	32.699	1.00	12.29	ATOM	732	CA	GLN	A	106	14.759	1.316	7.002	1.00	8.25
ATOM	685	CD	PRO	A	98	15.735	1.331	33.046	1.00	12.02	ATOM	733	C	GLN	A	106	14.453	1.089	8.473	1.00	8.51
ATOM	686	N	VAL	A	99	14.322	2.107	28.940	1.00	13.81	ATOM	734	O	GLN	A	106	13.470	1.683	8.862	1.00	6.31
ATOM	687	CA	VAL	A	99	14.225	1.544	27.632	1.00	14.02	ATOM	735	CB	GLN	A	106	14.239	0.393	5.940	1.00	7.45
ATOM	688	C	VAL	A	99	14.956	2.407	26.663	1.00	10.66	ATOM	736	CG	GLN	A	106	13.184	-0.528	6.465	1.00	18.04
ATOM	689	O	VAL	A	99	14.716	3.679	26.712	1.00	6.90	ATOM	737	CD	GLN	A	106	12.228	-1.220	5.581	1.00	16.87
ATOM	690	CB	VAL	A	99	12.673	1.343	27.335	1.00	2.87	ATOM	738	OE1	GLN	A	106	11.024	-1.180	5.492	1.00	17.59
ATOM	691	CG1	VAL	A	99	12.666	1.272	25.872	1.00	17.40	ATOM	739	NE2	GLN	A	106	12.643	-2.032	4.713	1.00	8.32
ATOM	692	CG2	VAL	A	99	12.442	-0.111	27.744	1.00	5.75	ATOM	740	N	GLY	A	107	15.269	0.510	9.172	1.00	7.13
ATOM	693	N	VAL	A	100	15.885	1.776	25.861	1.00	6.45	ATOM	741	CA	GLY	A	107	15.190	0.159	10.606	1.00	4.61
ATOM	694	CA	VAL	A	100	16.525	2.755	24.900	1.00	9.61	ATOM	742	C	GLY	A	107	15.048	1.472	11.356	1.00	8.27
ATOM	695	C	VAL	A	100	16.399	2.159	23.561	1.00	10.79	ATOM	743	O	GLY	A	107	14.219	1.511	12.290	1.00	6.52
ATOM	696	O	VAL	A	100	16.256	0.973	23.477	1.00	9.11	ATOM	744	N	ALA	A	108	15.653	2.637	11.033	1.00	6.44
ATOM	697	CB	VAL	A	100	17.877	3.260	25.197	1.00	8.05	ATOM	745	CA	ALA	A	108	15.266	3.864	11.641	1.00	7.41
ATOM	698	CG1	VAL	A	100	17.824	4.252	26.336	1.00	6.05	ATOM	746	C	ALA	A	108	13.813	4.346	11.471	1.00	11.76
ATOM	699	CG2	VAL	A	100	18.853	2.053	25.591	1.00	6.68	ATOM	747	O	ALA	A	108	13.150	4.914	12.298	1.00	12.64
ATOM	700	N	ALA	A	101	16.277	2.928	22.511	1.00	13.14	ATOM	748	CB	ALA	A	108	16.121	5.006	11.170	1.00	13.93
ATOM	701	CA	ALA	A	101	16.127	2.266	21.183	1.00	15.67	ATOM	749	N	ALA	A	109	13.321	4.312	10.267	1.00	9.78
ATOM	702	C	ALA	A	101	17.065	2.747	20.053	1.00	12.08	ATOM	750	CA	ALA	A	109	12.056	4.685	9.861	1.00	10.47
ATOM	703	O	ALA	A	101	17.261	4.042	19.907	1.00	11.16	ATOM	751	C	ALA	A	109	11.093	3.858	10.727	1.00	12.32
ATOM	704	CB	ALA	A	101	14.685	2.609	20.812	1.00	6.57	ATOM	752	O	ALA	A	109	10.016	4.391	11.035	1.00	14.67
ATOM	705	N	GLY	A	102	17.218	1.787	19.099	1.00	7.53	ATOM	753	CB	ALA	A	109	12.035	4.173	8.456	1.00	10.24
ATOM	706	CA	GLY	A	102	17.949	2.415	17.939	1.00	7.10	ATOM	754	N	LEU	A	110	11.259	2.690	11.077	1.00	4.34
ATOM	707	C	GLY	A	102	17.477	1.803	16.744	1.00	7.27	ATOM	755	CA	LEU	A	110	10.458	1.760	11.783	1.00	11.71
ATOM	708	O	GLY	A	102	17.102	0.621	16.878	1.00	10.83	ATOM	756	C	LEU	A	110	10.305	2.253	13.203	1.00	15.26
ATOM	709	N	GLY	A	103	17.706	2.407	15.648	1.00	7.80	ATOM	757	O	LEU	A	110	9.298	2.672	13.685	1.00	18.07
ATOM	710	CA	GLY	A	103	17.446	1.745	14.356	1.00	5.33	ATOM	758	CB	LEU	A	110	11.031	0.319	11.634	1.00	7.52
ATOM	711	C	GLY	A	103	18.303	2.211	13.180	1.00	7.56	ATOM	759	CG	LEU	A	110	10.247	-0.801	12.258	1.00	8.41
ATOM	712	O	GLY	A	103	18.785	3.340	13.227	1.00	6.88	ATOM	760	CD1	LEU	A	110	10.685	-2.233	11.862	1.00	7.17
ATOM	713	N	TYR	A	104	18.490	1.387	12.139	1.00	7.09	ATOM	761	CD2	LEU	A	110	10.278	-0.659	13.783	1.00	5.25
ATOM	714	CA	TYR	A	104	19.392	1.682	11.069	1.00	5.99	ATOM	762	N	ILE	A	111	11.397	2.373	13.907	1.00	15.77
ATOM	715	C	TYR	A	104	18.705	1.614	9.705	1.00	9.47	ATOM	763	CA	ILE	A	111	11.510	2.860	15.246	1.00	12.22
ATOM	716	O	TYR	A	104	18.115	0.638	9.441	1.00	6.46	ATOM	764	C	ILE	A	111	11.027	4.255	15.234	1.00	9.39
ATOM	717	CB	TYR	A	104	20.592	0.797	11.079	1.00	5.40	ATOM	765	O	ILE	A	111	10.404	4.636	16.241	1.00	12.54
ATOM	718	CG	TYR	A	104	21.436	1.078	9.876	1.00	8.05	ATOM	766	CB	ILE	A	111	12.977	2.814	15.685	1.00	15.55
ATOM	719	CD1	TYR	A	104	21.708	2.302	9.352	1.00	5.91	ATOM	767	CG1	ILE	A	111	13.222	1.279	15.805	1.00	14.19

ATOM	768	CG2	ILE	A	111	13.195	3.465	17.005	1.00	4.64	ATOM	816	CA	SER	A	119	0.910	5.647	24.476	1.00	52.44
ATOM	769	CD1	ILE	A	111	12.410	0.887	17.002	1.00	14.88	ATOM	817	C	SER	A	119	1.212	6.063	25.866	1.00	52.57
ATOM	770	N	ALA	A	112	11.309	5.170	14.341	1.00	11.00	ATOM	818	O	SER	A	119	1.485	5.258	26.735	1.00	55.54
ATOM	771	CA	ALA	A	112	10.792	6.528	14.427	1.00	12.45	ATOM	819	CB	SER	A	119	0.550	4.132	24.488	1.00	70.55
ATOM	772	C	ALA	A	112	9.266	6.455	14.308	1.00	15.59	ATOM	820	OG	SER	A	119	1.393	3.091	23.908	1.00	66.80
ATOM	773	O	ALA	A	112	8.728	7.131	15.154	1.00	18.13	ATOM	821	N	GLY	A	120	1.532	7.307	26.024	1.00	52.95
ATOM	774	CB	ALA	A	112	11.334	7.505	13.486	1.00	5.70	ATOM	822	CA	GLY	A	120	1.910	7.761	27.382	1.00	53.35
ATOM	775	N	ALA	A	113	8.575	5.572	13.587	1.00	12.85	ATOM	823	C	GLY	A	120	2.944	7.109	28.291	1.00	49.09
ATOM	776	CA	ALA	A	113	7.167	5.512	13.557	1.00	15.39	ATOM	824	O	GLY	A	120	4.086	7.617	28.358	1.00	49.66
ATOM	777	C	ALA	A	113	6.475	5.093	14.861	1.00	18.21	ATOM	825	N	ALA	A	121	2.526	6.129	29.102	1.00	42.97
ATOM	778	O	ALA	A	113	5.498	5.750	15.226	1.00	14.59	ATOM	826	CA	ALA	A	121	3.477	5.574	30.022	1.00	40.72
ATOM	779	CB	ALA	A	113	6.678	4.562	12.500	1.00	17.63	ATOM	827	C	ALA	A	121	5.772	7.772	29.326	1.00	44.20
ATOM	780	N	ALA	A	114	6.937	3.948	15.303	1.00	16.02	ATOM	828	O	ALA	A	121	5.749	4.803	29.711	1.00	45.42
ATOM	781	CA	ALA	A	114	6.483	3.218	16.412	1.00	16.43	ATOM	829	CB	ALA	A	121	2.965	4.542	30.903	1.00	36.34
ATOM	782	C	ALA	A	114	6.578	4.114	17.643	1.00	22.20	ATOM	830	N	VAL	A	122	4.122	4.035	28.312	1.00	41.15
ATOM	783	O	ALA	A	114	5.673	4.321	18.426	1.00	18.94	ATOM	831	CA	VAL	A	122	5.090	3.269	27.548	1.00	33.41
ATOM	784	CB	ALA	A	114	7.474	2.084	16.565	1.00	4.69	ATOM	832	C	VAL	A	122	5.870	4.168	26.652	1.00	28.48
ATOM	785	N	VAL	A	115	7.722	4.836	17.744	1.00	22.46	ATOM	833	O	VAL	A	122	7.084	4.019	26.872	1.00	27.69
ATOM	786	CA	VAL	A	115	7.855	5.499	19.064	1.00	20.88	ATOM	834	CB	VAL	A	122	4.424	2.056	26.952	1.00	30.22
ATOM</																					

ATOM	864	N	VAL A 126	10.593	5.188	27.319	1.00	25.30	ATOM	912	CE1	PHE A 132	22.342	3.911	15.889	1.00	14.91
ATOM	865	CA	VAL A 126	11.738	5.124	26.361	1.00	22.55	ATOM	913	CE2	PHE A 132	24.176	5.323	15.513	1.00	18.02
ATOM	866	C	VAL A 126	12.546	6.334	26.614	1.00	17.55	ATOM	914	CZ	PHE A 132	23.426	4.530	16.403	1.00	15.09
ATOM	867	O	VAL A 126	12.109	7.408	26.329	1.00	12.79	ATOM	915	N	GLY A 133	21.431	6.876	9.580	1.00	7.35
ATOM	868	CB	VAL A 126	11.227	4.560	25.022	1.00	23.76	ATOM	916	CA	GLY A 133	21.026	6.893	8.148	1.00	5.86
ATOM	869	CG1	VAL A 126	9.706	4.686	24.946	1.00	23.77	ATOM	917	C	GLY A 133	19.503	6.919	8.061	1.00	12.25
ATOM	870	CG2	VAL A 126	11.795	5.081	23.743	1.00	23.81	ATOM	918	O	GLY A 133	18.890	5.926	7.593	1.00	9.03
ATOM	871	N	LYS A 127	13.726	6.233	27.264	1.00	16.41	ATOM	919	N	TYR A 134	18.926	8.070	8.532	1.00	9.85
ATOM	872	CA	LYS A 127	14.462	7.494	27.639	1.00	18.18	ATOM	920	CA	TYR A 134	17.455	8.022	8.838	1.00	7.40
ATOM	873	C	LYS A 127	15.239	8.063	26.488	1.00	18.49	ATOM	921	C	TYR A 134	16.647	8.365	7.584	1.00	10.61
ATOM	874	O	LYS A 127	15.812	9.103	26.680	1.00	18.99	ATOM	922	O	TYR A 134	16.785	9.513	7.131	1.00	5.85
ATOM	875	CB	LYS A 127	15.401	7.148	28.792	1.00	20.81	ATOM	923	CB	TYR A 134	17.161	9.128	9.836	1.00	7.27
ATOM	876	CG	LYS A 127	14.770	6.110	29.713	1.00	21.99	ATOM	924	CG	TYR A 134	15.842	9.393	10.391	1.00	7.89
ATOM	877	CD	LYS A 127	13.435	6.726	30.064	1.00	33.86	ATOM	925	CD1	TYR A 134	14.889	8.437	10.312	1.00	6.65
ATOM	878	CE	LYS A 127	12.779	6.612	31.399	1.00	32.17	ATOM	926	CD2	TYR A 134	15.661	10.651	10.948	1.00	11.44
ATOM	879	NZ	LYS A 127	12.279	7.863	31.993	1.00	45.34	ATOM	927	CE1	TYR A 134	13.657	8.690	10.821	1.00	9.05
ATOM	880	N	GLY A 128	15.522	7.281	25.416	1.00	20.56	ATOM	928	CE2	TYR A 134	14.408	10.928	11.467	1.00	12.89
ATOM	881	CA	GLY A 128	16.280	7.948	24.306	1.00	20.72	ATOM	929	CZ	TYR A 134	13.428	9.923	11.423	1.00	14.22
ATOM	882	C	GLY A 128	16.358	7.104	23.063	1.00	17.71	ATOM	930	OH	TYR A 134	12.146	10.110	11.975	1.00	12.41
ATOM	883	O	GLY A 128	16.168	5.901	23.226	1.00	16.66	ATOM	931	N	THR A 135	15.811	7.398	7.139	1.00	11.51
ATOM	884	N	VAL A 129	16.451	7.725	21.892	1.00	16.16	ATOM	932	CA	THR A 135	15.229	7.581	5.789	1.00	7.71
ATOM	885	CA	VAL A 129	16.497	6.872	20.691	1.00	13.82	ATOM	933	C	THR A 135	14.082	8.530	5.825	1.00	10.36
ATOM	886	C	VAL A 129	17.519	7.371	19.719	1.00	8.35	ATOM	934	O	THR A 135	13.845	8.878	4.727	1.00	11.26
ATOM	887	O	VAL A 129	17.602	8.553	19.556	1.00	3.85	ATOM	935	CB	THR A 135	14.772	6.394	4.967	1.00	12.02
ATOM	888	CB	VAL A 129	15.192	6.426	20.054	1.00	11.02	ATOM	936	OG1	THR A 135	13.821	5.399	5.398	1.00	22.81
ATOM	889	CG1	VAL A 129	14.007	7.041	20.726	1.00	6.50	ATOM	937	CG2	THR A 135	15.828	5.332	4.712	1.00	14.88
ATOM	890	CG2	VAL A 129	15.051	6.729	18.571	1.00	10.03	ATOM	938	N	GLN A 136	13.632	9.105	6.928	1.00	15.28
ATOM	891	N	ALA A 130	18.455	6.398	19.363	1.00	8.05	ATOM	939	CA	GLN A 136	12.596	10.134	6.968	1.00	16.48
ATOM	892	CA	ALA A 130	19.430	6.845	18.344	1.00	7.55	ATOM	940	C	GLN A 136	13.102	11.418	7.646	1.00	17.46
ATOM	893	C	ALA A 130	19.078	6.293	16.958	1.00	11.17	ATOM	941	O	GLN A 136	12.292	12.231	8.035	1.00	12.82
ATOM	894	O	ALA A 130	18.755	5.145	16.849	1.00	15.74	ATOM	942	CB	GLN A 136	11.336	9.671	7.701	1.00	5.71
ATOM	895	CB	ALA A 130	20.781	6.391	18.603	1.00	5.89	ATOM	943	CG	GLN A 136	11.178	8.191	7.263	1.00	13.60
ATOM	896	N	LEU A 131	18.911	6.953	15.892	1.00	7.36	ATOM	944	CD	GLN A 136	10.504	8.264	5.932	1.00	14.65
ATOM	897	CA	LEU A 131	18.635	6.625	14.553	1.00	7.70	ATOM	945	OE1	GLN A 136	9.587	9.102	5.986	1.00	23.99
ATOM	898	C	LEU A 131	19.876	6.908	12.001	1.00	12.02	ATOM	946	NE2	GLN A 136	10.852	7.529	4.914	1.00	14.68
ATOM	899	O	LEU A 131	20.436	8.033	13.604	1.00	6.80	ATOM	947	N	ASN A 137	14.421	11.532	7.566	1.00	18.52
ATOM	900	CB	LEU A 131	17.604	7.713	14.102	1.00	8.40	ATOM	948	CA	ASN A 137	14.953	12.752	8.141	1.00	18.16
ATOM	901	CG	LEU A 131	16.160	7.830	14.575	1.00	6.67	ATOM	949	C	ASN A 137	14.301	13.929	7.458	1.00	19.79
ATOM	902	CD1	LEU A 131	15.391	8.957	13.981	1.00	4.49	ATOM	950	O	ASN A 137	13.895	14.802	8.157	1.00	12.28
ATOM	903	CD2	LEU A 131	15.481	6.488	14.324	1.00	5.12	ATOM	951	CB	ASN A 137	16.481	12.573	8.239	1.00	14.17
ATOM	904	N	PHE A 132	20.271	6.009	12.802	1.00	11.56	ATOM	952	CG	ASN A 137	17.247	13.740	8.812	1.00	12.75
ATOM	905	CA	PHE A 132	21.422	6.183	11.908	1.00	10.44	ATOM	953	OD1	ASN A 137	17.821	14.341	7.934	1.00	14.52
ATOM	906	C	PHE A 132	20.965	6.013	10.478	1.00	8.46	ATOM	954	ND2	ASN A 137	17.390	14.130	10.042	1.00	17.43
ATOM	907	O	PHE A 132	20.175	5.101	10.097	1.00	11.04	ATOM	955	N	LEU A 138	14.180	14.062	6.141	1.00	27.31
ATOM	908	CB	PHE A 132	22.217	4.931	12.282	1.00	10.56	ATOM	956	CA	LEU A 138	13.640	15.270	5.553	1.00	25.53
ATOM	909	CG	PHE A 132	22.693	4.830	13.714	1.00	16.38	ATOM	957	C	LEU A 138	12.190	15.332	5.971	1.00	22.45
ATOM	910	CD1	PHE A 132	21.951	4.029	14.542	1.00	13.36	ATOM	958	O	LEU A 138	11.710	16.281	6.549	1.00	25.13
ATOM	911	CD2	PHE A 132	23.860	5.489	14.213	1.00	15.12	ATOM	959	CB	LEU A 138	13.632	15.269	4.056	1.00	41.28
ATOM	960	CG	LEU A 138	13.713	16.582	3.303	1.00	31.76	ATOM	1008	CD	PRO A 145	8.174	11.563	14.234	1.00	31.33
ATOM	961	CD1	LEU A 138	14.641	17.503	4.012	1.00	51.09	ATOM	1009	N	ASN A 146	5.796	13.462	17.878	1.00	27.07
ATOM	962	CD2	LEU A 138	14.207	16.573	1.958	1.00	46.20	ATOM	1010	CA	ASN A 146	5.454	13.274	19.230	1.00	28.59
ATOM	963	N	GLN A 139	11.378	14.403	5.569	1.00	20.48	ATOM	1011	C	ASN A 146	6.526	12.605	20.045	1.00	29.25
ATOM	964	CA	GLN A 139	10.034	14.390	6.037	1.00	19.98	ATOM	1012	O	ASN A 146	6.087	11.995	20.996	1.00	35.51
ATOM	965	C	GLN A 139	9.846	14.749	7.471	1.00	22.85	ATOM	1013	CB	ASN A 146	4.285	12.364	19.230	1.00	41.13
ATOM	966	O	GLN A 139	8.791	15.282	7.528	1.00	26.66	ATOM	1014	CG	ASN A 146	3.300	12.568	18.120	1.00	48.43
ATOM	967	CB	GLN A 139	9.517	12.969	5.899	1.00	18.37	ATOM	1015	OD1	ASN A 146	3.134	13.721	17.788	1.00	49.24
ATOM	968	CG	GLN A 139	9.684	12.643	4.450	1.00	22.02	ATOM	1016	ND2	ASN A 146	2.763	11.437	17.695	1.00	47.79
ATOM	969	CD	GLN A 139	10.984	11.983	4.110	1.00	22.69	ATOM	1017	N	TYR A 147	7.791	12.799	19.885	1.00	23.88
ATOM	970	OE1	GLN A 139	10.674	10.980	3.477	1.00	35.62	ATOM	1018	CA	TYR A 147	8.689	12.339	20.969	1.00	21.90
ATOM	971	NE2	GLN A 139	12.195	12.405	4.410	1.00	31.70	ATOM	1019	C	TYR A 147	9.583	13.495	21.285	1.00	22.57
ATOM	972	N	ASN A 140	10.454	14.072	8.427	1.00	26.14	ATOM	1020	O	TYR A 147	9.777	14.399	20.494	1.00	26.53
ATOM	973	CA	ASN A 140	10.215	14.183	9.848	1.00	19.06	ATOM	1021	CB	TYR A 147	9.309	11.098	20.498	1.00	21.16
ATOM	974	C	ASN A 140	10.941	15.429	10.293	1.00	16.99	ATOM	1022	CG	TYR A 147	10.285	10.471	21.348	1.00	20.45
ATOM	975	O	ASN A 140	11.040	15.654	10.541	1.00	17.20	ATOM	1023	CD1	TYR A 147	9.882	9.720	22.384	1.00	24.28
ATOM	976	CB	ASN A 140	10.581	12.910	10.541	1.00	17.20	ATOM	1024	CD2	TYR A 147	11.608	10.564	21.189	1.00	17.96
ATOM	977	CG	ASN A 140	9.465	11.998	10.210	1.00	16.28	ATOM	1025	CE1	TYR A 147	10.681	9.029	23.273	1.00	24.55
ATOM	978	OD1	ASN A 140	8.615	12.565	9.563	1.00	23.57	ATOM	1026	CE2	TYR A 147	12.509	9.948	21.983	1.00	20.73
ATOM	979	ND2	ASN A 140	9.460	10.756	10.630	1.00	22.65	ATOM	1027	CZ	TYR A 147	12.022	9.184	23.030	1.00	24.61
ATOM	980	N	ARG A 141	11.457	16.162	9.397	1.00	19.20	ATOM	1028	OH	TYR A 147	12.891	8.536	23.887	1.00	24.80
ATOM	981	CA	ARG A 141	12.170	17.350	9.790	1.00	26.25	ATOM	1029	N	PRO A 148	9.893	13.858	22.507	1.00	22.86
ATOM	982	C	ARG A 141	13.219	17.090	10.818	1.00	25.06	ATOM	1030	CA	PRO A 148	10.817	14.916	22.769	1.00	21.77
ATOM	983	O	ARG A 141	13.365	17.928	11.649	1.00	27.60									

ATOM	1056	N	ARG	A	151	15.396	13.807	23.727	1.00	19.70
ATOM	1057	CA	ARG	A	151	15.752	12.424	23.844	1.00	19.52
ATOM	1058	C	ARG	A	151	16.163	11.779	22.531	1.00	19.28
ATOM	1059	O	ARG	A	151	16.373	10.586	22.480	1.00	14.55
ATOM	1060	CB	ARG	A	151	14.548	11.796	24.412	1.00	23.06
ATOM	1061	CG	ARG	A	151	13.853	12.432	25.516	1.00	22.24
ATOM	1062	CD	ARG	A	151	13.200	11.451	26.393	1.00	33.40
ATOM	1063	NE	ARG	A	151	12.609	11.893	27.633	1.00	46.53
ATOM	1064	CZ	ARG	A	151	11.796	11.028	28.275	1.00	52.87
ATOM	1065	NH1	ARG	A	151	11.428	9.823	27.930	1.00	51.02
ATOM	1066	NH2	ARG	A	151	11.203	11.278	29.416	1.00	59.98
ATOM	1067	N	THR	A	152	16.360	12.526	21.505	1.00	14.12
ATOM	1068	CA	THR	A	152	16.629	11.925	20.253	1.00	15.05
ATOM	1069	C	THR	A	152	17.995	12.249	19.745	1.00	17.30
ATOM	1070	O	THR	A	152	18.282	13.373	19.965	1.00	21.34
ATOM	1071	CB	THR	A	152	15.680	12.408	19.158	1.00	13.91
ATOM	1072	CG1	THR	A	152	14.423	12.256	19.858	1.00	23.92
ATOM	1073	CG2	THR	A	152	15.737	11.934	17.759	1.00	6.77
ATOM	1074	N	LYS	A	153	18.704	11.336	19.121	1.00	15.49
ATOM	1075	CA	LYS	A	153	19.930	11.725	18.450	1.00	17.73
ATOM	1076	C	LYS	A	153	19.893	11.035	17.073	1.00	18.41
ATOM	1077	O	LYS	A	153	19.866	9.800	17.121	1.00	16.04
ATOM	1078	CB	LYS	A	153	21.112	11.260	19.338	1.00	14.55
ATOM	1079	CG	LYS	A	153	22.523	11.508	18.933	1.00	11.95
ATOM	1080	CD	LYS	A	153	22.893	12.882	19.403	1.00	40.35
ATOM	1081	CE	LYS	A	153	24.358	13.093	19.079	1.00	62.12
ATOM	1082	NZ	LYS	A	153	24.930	14.235	19.863	1.00	73.03
ATOM	1083	N	VAL	A	154	19.910	11.962	16.136	1.00	15.86
ATOM	1084	CA	VAL	A	154	20.031	11.508	14.730	1.00	15.79
ATOM	1085	C	VAL	A	154	21.406	11.481	14.040	1.00	13.11
ATOM	1086	O	VAL	A	154	21.958	12.460	13.675	1.00	13.51
ATOM	1087	CB	VAL	A	154	19.095	12.257	13.674	1.00	5.90
ATOM	1088	CG1	VAL	A	154	19.276	11.765	12.247	1.00	8.45
ATOM	1089	CG2	VAL	A	154	17.672	12.091	14.117	1.00	7.14
ATOM	1090	N	PHE	A	155	22.039	10.448	13.605	1.00	13.75
ATOM	1091	CA	PHE	A	155	23.263	10.473	12.843	1.00	10.67
ATOM	1092	C	PHE	A	155	22.906	10.406	11.402	1.00	11.64
ATOM	1093	O	PHE	A	155	22.505	9.367	10.893	1.00	15.09
ATOM	1094	CB	PHE	A	155	23.955	9.120	13.304	1.00	5.38
ATOM	1095	CG	PHE	A	155	24.396	9.266	14.739	1.00	16.52
ATOM	1096	CD1	PHE	A	155	23.678	8.642	15.696	1.00	23.70
ATOM	1097	CD2	PHE	A	155	25.503	9.950	15.107	1.00	11.27
ATOM	1098	CE1	PHE	A	155	24.037	8.702	17.011	1.00	23.25
ATOM	1099	CE2	PHE	A	155	25.888	9.994	16.372	1.00	7.37
ATOM	1100	CZ	PHE	A	155	25.139	9.384	17.357	1.00	16.13
ATOM	1101	N	CYS	A	156	23.205	11.255	10.511	1.00	12.38
ATOM	1102	CA	CYS	A	156	22.847	11.443	9.114	1.00	11.64
ATOM	1103	C	CYS	A	156	24.057	12.027	8.461	1.00	10.08

ATOM	1104	O	CYS	A	156	24.385	13.174	8.378	1.00	13.73
ATOM	1105	CB	CYS	A	156	21.575	12.391	8.917	1.00	6.30
ATOM	1106	SG	CYS	A	156	20.137	11.470	8.287	1.00	10.60
ATOM	1107	N	ASN	A	157	24.814	11.147	7.918	1.00	16.95
ATOM	1108	CA	ASN	A	157	26.229	11.665	7.576	1.00	19.16
ATOM	1109	C	ASN	A	157	26.197	12.367	6.310	1.00	17.70
ATOM	1110	O	ASN	A	157	25.368	12.330	5.469	1.00	20.91
ATOM	1111	CB	ASN	A	157	27.115	10.714	8.300	1.00	30.34
ATOM	1112	CG	ASN	A	157	27.733	9.498	7.932	1.00	34.95
ATOM	1113	OD1	ASN	A	157	28.011	8.573	8.606	1.00	44.28
ATOM	1114	ND2	ASN	A	157	27.965	9.541	6.660	1.00	54.18
ATOM	1115	N	VAL	A	158	26.849	13.501	6.313	1.00	25.65
ATOM	1116	CA	VAL	A	158	26.825	14.483	5.192	1.00	28.21
ATOM	1117	C	VAL	A	158	26.768	13.893	3.758	1.00	24.85
ATOM	1118	O	VAL	A	158	25.732	14.266	3.111	1.00	30.96
ATOM	1119	CB	VAL	A	158	27.954	15.512	5.217	1.00	27.87
ATOM	1120	CG1	VAL	A	158	28.751	14.595	4.238	1.00	40.51
ATOM	1121	CG2	VAL	A	158	27.791	16.704	4.399	1.00	34.39
ATOM	1122	N	GLY	A	159	27.483	12.956	3.016	1.00	5.94
ATOM	1123	CA	GLY	A	159	26.713	12.774	1.732	1.00	6.20
ATOM	1124	C	GLY	A	159	25.734	11.797	1.487	1.00	4.00
ATOM	1125	O	GLY	A	159	25.732	10.704	0.848	1.00	4.06
ATOM	1126	N	ASP	A	160	25.052	11.441	2.643	1.00	8.53
ATOM	1127	CA	ASP	A	160	24.106	10.302	2.828	1.00	11.97
ATOM	1128	C	ASP	A	160	22.755	10.698	2.177	1.00	14.44
ATOM	1129	O	ASP	A	160	21.928	11.398	2.692	1.00	10.21
ATOM	1130	CB	ASP	A	160	24.037	9.829	4.277	1.00	12.43
ATOM	1131	CG	ASP	A	160	23.126	8.629	4.261	1.00	20.99
ATOM	1132	OD1	ASP	A	160	22.525	8.408	3.179	1.00	33.03
ATOM	1133	OD2	ASP	A	160	22.956	7.840	5.216	1.00	10.13
ATOM	1134	N	ALA	A	161	22.455	10.402	0.961	1.00	12.33
ATOM	1135	CA	ALA	A	161	21.318	10.743	0.269	1.00	11.01
ATOM	1136	C	ALA	A	161	19.961	10.317	0.848	1.00	15.22
ATOM	1137	O	ALA	A	161	18.969	11.034	0.594	1.00	9.50
ATOM	1138	CB	ALA	A	161	21.365	10.334	-1.172	1.00	13.68
ATOM	1139	N	VAL	A	162	19.915	9.468	1.840	1.00	14.54
ATOM	1140	CA	VAL	A	162	18.653	9.014	2.287	1.00	9.86
ATOM	1141	C	VAL	A	162	18.235	10.063	3.258	1.00	13.50
ATOM	1142	O	VAL	A	162	17.094	10.458	3.377	1.00	20.47
ATOM	1143	CB	VAL	A	162	18.595	7.778	3.117	1.00	7.34
ATOM	1144	CG1	VAL	A	162	18.931	6.592	2.259	1.00	6.50
ATOM	1145	CG2	VAL	A	162	19.514	7.858	4.210	1.00	18.46
ATOM	1146	N	CYS	A	163	19.198	10.733	3.719	1.00	13.44
ATOM	1147	CA	CYS	A	163	18.864	11.811	4.720	1.00	11.26
ATOM	1148	C	CYS	A	163	18.256	12.963	4.042	1.00	15.57
ATOM	1149	O	CYS	A	163	18.219	13.857	4.880	1.00	14.09
ATOM	1150	CB	CYS	A	163	20.144	12.145	5.570	1.00	18.70
ATOM	1151	SG	CYS	A	163	20.748	10.705	6.581	1.00	13.38

ATOM	1152	N	THR	A	164	18.100	13.014	2.696	1.00	21.82
ATOM	1153	CA	THR	A	164	17.603	14.283	2.171	1.00	23.08
ATOM	1154	C	THR	A	164	16.597	14.022	1.098	1.00	23.39
ATOM	1155	O	THR	A	164	16.517	14.727	0.137	1.00	33.37
ATOM	1156	CB	THR	A	164	18.463	15.341	1.454	1.00	23.25
ATOM	1157	CG1	THR	A	164	19.486	14.707	0.674	1.00	23.21
ATOM	1158	CG2	THR	A	164	18.958	16.261	2.491	1.00	37.71
ATOM	1159	N	GLY	A	165	15.802	13.085	1.309	1.00	24.23
ATOM	1160	CA	GLY	A	165	14.606	12.783	0.579	1.00	26.69
ATOM	1161	C	GLY	A	165	14.699	11.814	-0.515	1.00	28.56
ATOM	1162	O	GLY	A	165	13.680	11.775	-1.124	1.00	39.76
ATOM	1163	N	THR	A	166	15.661	11.044	-0.736	1.00	25.80
ATOM	1164	CA	THR	A	166	16.006	10.220	-1.774	1.00	25.53
ATOM	1165	C	THR	A	166	16.195	8.666	-1.175	1.00	25.35
ATOM	1166	O	THR	A	166	16.913	9.760	-0.206	1.00	32.91
ATOM	1167	CB	THR	A	166	17.406	10.657	-2.230	1.00	31.57
ATOM	1168	CG1	THR	A	166	17.105	11.788	-2.982	1.00	24.13
ATOM	1169	CG2	THR	A	166	18.061	9.559	-2.983	1.00	34.67
ATOM	1170	N	LEU	A	167	15.734	7.833	-1.817	1.00	19.63
ATOM	1171	CA	LEU	A	167	16.219	6.552	-1.465	1.00	16.11
ATOM	1172	C	LEU	A	167	17.395	6.044	-2.300	1.00	19.87
ATOM	1173	O	LEU	A	167	17.265	4.869	-2.612	1.00	21.38
ATOM	1174	CB	LEU	A	167	15.086	5.624	-1.555	1.00	23.45
ATOM	1175	CG	LEU	A	167	14.123	5.773	-0.401	1.00	33.91
ATOM	1176	CD1	LEU	A	167	12.969	4.908	-0.793	1.00	42.10
ATOM	1177	CD2	LEU	A	167	14.776	5.385	0.903	1.00	25.86
ATOM	1178	N	ILE	A	168	18.534	6.726	-2.507	1.00	21.67
ATOM	1179	CA	ILE	A	168	19.608	6.051	-3.170	1.00	23.38
ATOM	1180	C	ILE	A	168	20.675	5.585	-2.189	1.00	20.47
ATOM	1181	O	ILE	A	168	21.139	6.541	-1.581	1.00	18.08
ATOM	1182	CB	ILE	A	168	20.254	6.835	-4.297	1.00	23.

ATOM	1248	OH	TYR	A	176	24.074	8.375	7.635	1.00	5.76
ATOM	1249	N	THR	A	177	29.430	2.685	12.167	1.00	10.72
ATOM	1250	CA	THR	A	177	29.797	1.854	13.284	1.00	13.31
ATOM	1251	C	THR	A	177	30.516	2.659	14.320	1.00	12.46
ATOM	1252	O	THR	A	177	30.311	2.436	15.475	1.00	13.12
ATOM	1253	CB	THR	A	177	30.658	0.683	12.798	1.00	3.49
ATOM	1254	CG1	THR	A	177	31.361	1.247	11.870	1.00	32.08
ATOM	1255	CG2	THR	A	177	29.675	-0.149	12.083	1.00	6.42
ATOM	1256	N	ILE	A	178	31.409	3.474	13.920	1.00	10.48
ATOM	1257	CA	ILE	A	178	32.203	4.246	14.763	1.00	15.25
ATOM	1258	C	ILE	A	178	31.180	5.045	15.632	1.00	16.95
ATOM	1259	O	ILE	A	178	31.092	4.774	16.851	1.00	22.68
ATOM	1260	CB	ILE	A	178	33.338	5.121	14.357	1.00	25.11
ATOM	1261	CG1	ILE	A	178	34.701	4.496	14.056	1.00	25.05
ATOM	1262	CG2	ILE	A	178	33.599	6.205	15.392	1.00	27.60
ATOM	1263	CD1	ILE	A	178	34.553	3.006	14.071	1.00	55.86
ATOM	1264	N	GLU	A	179	30.218	5.799	15.178	1.00	16.34
ATOM	1265	CA	GLU	A	179	29.290	6.610	15.985	1.00	16.94
ATOM	1266	C	GLU	A	179	28.324	5.713	16.692	1.00	14.79
ATOM	1267	O	GLU	A	179	27.683	6.012	17.716	1.00	19.20
ATOM	1268	CB	GLU	A	179	28.555	7.637	15.169	1.00	21.16
ATOM	1269	CG	GLU	A	179	28.790	7.283	13.691	1.00	50.37
ATOM	1270	CD	GLU	A	179	29.933	7.701	12.851	1.00	61.82
ATOM	1271	OE1	GLU	A	179	30.163	8.890	12.697	1.00	77.56
ATOM	1272	OE2	GLU	A	179	30.627	6.854	12.309	1.00	75.83
ATOM	1273	N	ALA	A	180	28.240	4.418	16.412	1.00	8.00
ATOM	1274	CA	ALA	A	180	27.353	3.520	17.042	1.00	14.34
ATOM	1275	C	ALA	A	180	28.048	2.991	18.280	1.00	19.53
ATOM	1276	O	ALA	A	180	27.397	3.142	19.265	1.00	21.17
ATOM	1277	CB	ALA	A	180	26.843	2.437	16.128	1.00	11.97
ATOM	1278	N	ARG	A	181	29.317	2.547	18.287	1.00	21.89
ATOM	1279	CA	ARG	A	181	29.992	1.982	19.398	1.00	16.48
ATOM	1280	C	ARG	A	181	30.296	3.106	20.367	1.00	19.44
ATOM	1281	O	ARG	A	181	30.243	3.104	21.639	1.00	28.53
ATOM	1282	CB	ARG	A	181	31.310	1.408	19.143	1.00	12.43
ATOM	1283	CG	ARG	A	181	31.954	0.432	20.052	1.00	45.44
ATOM	1284	CD	ARG	A	181	32.596	-0.688	19.242	1.00	66.21
ATOM	1285	NE	ARG	A	181	33.333	-0.030	18.164	1.00	85.83
ATOM	1286	CZ	ARG	A	181	33.306	-0.321	16.895	1.00	91.35
ATOM	1287	NH1	ARG	A	181	32.551	-1.320	16.530	1.00	96.98
ATOM	1288	NH2	ARG	A	181	34.023	0.400	16.095	1.00	92.83
ATOM	1289	N	GLY	A	182	30.387	4.262	19.847	1.00	13.94
ATOM	1290	CA	GLY	A	182	30.553	5.404	20.728	1.00	7.40
ATOM	1291	C	GLY	A	182	29.741	6.574	20.960	1.00	7.95
ATOM	1292	O	GLY	A	182	29.171	6.512	22.083	1.00	12.73
ATOM	1293	N	GLU	A	183	29.725	7.622	20.138	1.00	6.42
ATOM	1294	CA	GLU	A	183	28.816	8.775	20.405	1.00	10.04
ATOM	1295	C	GLU	A	183	27.421	8.369	20.645	1.00	14.41

ATOM	1296	O	GLU	A	183	26.846	8.530	21.749	1.00	15.43
ATOM	1297	CB	GLU	A	183	29.053	9.791	19.402	1.00	21.24
ATOM	1298	CG	GLU	A	183	28.079	10.638	18.725	1.00	62.21
ATOM	1299	CD	GLU	A	183	28.248	12.103	19.141	1.00	81.34
ATOM	1300	OE1	GLU	A	183	28.850	12.243	20.232	1.00	95.85
ATOM	1301	OE2	GLU	A	183	27.791	13.027	18.430	1.00	90.85
ATOM	1302	N	ALA	A	184	26.766	7.605	19.808	1.00	15.56
ATOM	1303	CA	ALA	A	184	25.444	7.083	20.117	1.00	14.54
ATOM	1304	C	ALA	A	184	25.549	6.382	21.464	1.00	13.62
ATOM	1305	O	ALA	A	184	24.575	6.533	22.215	1.00	16.75
ATOM	1306	CB	ALA	A	184	25.019	6.015	19.089	1.00	9.58
ATOM	1307	N	ALA	A	185	26.428	5.396	21.774	1.00	9.42
ATOM	1308	CA	ALA	A	185	26.219	4.677	23.031	1.00	7.48
ATOM	1309	C	ALA	A	185	26.330	5.715	24.100	1.00	12.30
ATOM	1310	O	ALA	A	185	25.761	5.503	25.179	1.00	9.50
ATOM	1311	CB	ALA	A	185	27.138	3.475	23.260	1.00	4.60
ATOM	1312	N	ARG	A	186	27.271	6.673	24.090	1.00	15.54
ATOM	1313	CA	ARG	A	186	27.352	7.507	25.300	1.00	13.57
ATOM	1314	C	ARG	A	186	26.085	8.286	25.561	1.00	11.49
ATOM	1315	O	ARG	A	186	25.421	8.267	26.573	1.00	8.74
ATOM	1316	CB	ARG	A	186	28.484	8.460	25.043	1.00	30.29
ATOM	1317	CG	ARG	A	186	29.869	7.851	25.240	1.00	37.15
ATOM	1318	CD	ARG	A	186	30.983	8.826	24.813	1.00	42.36
ATOM	1319	NE	ARG	A	186	31.902	7.942	24.064	1.00	51.82
ATOM	1320	CZ	ARG	A	186	32.324	8.346	22.870	1.00	50.20
ATOM	1321	NH1	ARG	A	186	31.924	9.538	22.424	1.00	47.65
ATOM	1322	NH2	ARG	A	186	33.115	7.476	22.318	1.00	39.90
ATOM	1323	N	PHE	A	187	25.565	8.774	24.434	1.00	8.37
ATOM	1324	CA	PHE	A	187	24.195	9.370	25.426	1.00	13.48
ATOM	1325	C	PHE	A	187	23.187	8.476	25.182	1.00	15.92
ATOM	1326	O	PHE	A	187	22.379	8.916	25.995	1.00	14.81
ATOM	1327	CB	PHE	A	187	23.667	9.791	23.087	1.00	11.81
ATOM	1328	CG	PHE	A	187	22.282	10.323	23.032	1.00	14.64
ATOM	1329	CD1	PHE	A	187	21.984	11.586	23.391	1.00	8.47
ATOM	1330	CD2	PHE	A	187	21.186	9.599	22.564	1.00	18.34
ATOM	1331	CE1	PHE	A	187	20.698	12.134	23.353	1.00	12.89
ATOM	1332	CE2	PHE	A	187	19.895	10.026	22.485	1.00	17.42
ATOM	1333	CZ	PHE	A	187	19.661	11.322	22.924	1.00	3.70
ATOM	1334	N	LEU	A	188	23.033	7.232	24.803	1.00	15.17
ATOM	1335	CA	LEU	A	188	21.908	6.427	25.324	1.00	18.43
ATOM	1336	C	LEU	A	188	22.207	6.221	26.775	1.00	19.67
ATOM	1337	O	LEU	A	188	21.280	6.512	27.461	1.00	18.17
ATOM	1338	CB	LEU	A	188	21.703	5.088	24.552	1.00	18.72
ATOM	1339	CG	LEU	A	188	21.116	5.375	23.136	1.00	9.96
ATOM	1340	CD1	LEU	A	188	20.950	4.066	22.601	1.00	7.86
ATOM	1341	CD2	LEU	A	188	19.849	6.206	23.168	1.00	4.70
ATOM	1342	N	ARG	A	189	23.333	5.805	27.230	1.00	17.48
ATOM	1343	CA	ARG	A	189	23.798	5.812	28.547	1.00	18.41

ATOM	1344	C	ARG	A	189	23.353	7.039	29.321	1.00	16.87
ATOM	1345	O	ARG	A	189	22.852	7.164	30.389	1.00	13.64
ATOM	1346	CB	ARG	A	189	25.325	6.017	28.529	1.00	21.93
ATOM	1347	CG	ARG	A	189	25.882	5.624	29.894	1.00	19.95
ATOM	1348	CD	ARG	A	189	27.239	6.140	30.235	1.00	21.42
ATOM	1349	NE	ARG	A	189	27.257	7.545	29.926	1.00	25.62
ATOM	1350	CZ	ARG	A	189	28.491	7.983	29.699	1.00	29.22
ATOM	1351	NH1	ARG	A	189	29.315	6.960	29.840	1.00	26.71
ATOM	1352	NH2	ARG	A	189	28.780	9.210	29.383	1.00	33.27
ATOM	1353	N	ASP	A	190	23.837	8.150	28.796	1.00	13.76
ATOM	1354	CA	ASP	A	190	23.489	9.338	29.615	1.00	17.78
ATOM	1355	C	ASP	A	190	22.008	9.364	29.711	1.00	16.79
ATOM	1356	O	ASP	A	190	21.661	9.891	30.692	1.00	23.13
ATOM	1357	CB	ASP	A	190	23.995	10.663	29.070	1.00	23.17
ATOM	1358	CG	ASP	A	190	25.553	10.664	29.079	1.00	33.40
ATOM	1359	OD1	ASP	A	190	26.250	9.836	29.761	1.00	22.69
ATOM	1360	OD2	ASP	A	190	25.961	11.595	28.321	1.00	30.24
ATOM	1361	N	ARG	A	191	21.156	9.128	28.781	1.00	21.61
ATOM	1362	CA	ARG	A	191	19.707	9.265	28.849	1.00	20.99
ATOM	1363	C	ARG	A	191	19.176	8.237	29.825	1.00	21.23
ATOM	1364	O	ARG	A	191	18.327	8.515	30.651	1.00	20.98
ATOM	1365	CB	ARG	A	191	19.014	9.214	27.450	1.00	19.76
ATOM	1366	CG	ARG	A	191	19.605	10.282	26.521	1.00	27.49
ATOM	1367	CD	ARG	A	191	18.848	11.594	26.689	1.00	36.68
ATOM	1368	NE	ARG	A	191	17.559	11.023	27.144	1.00	60.89
ATOM	1369	CZ	ARG	A	191	16.841	11.651	28.087	1.00	73.30
ATOM	1370	NH1	ARG	A	191	17.404	12.780	28.496	1.00	76.65
ATOM	1371	NH2	ARG	A	191	15.675	11.224	28.574	1.00	62.02
ATOM	1372	N	ILE	A	192	19.734	7.037	29.885	1.00	21.02
ATOM	1373	CA	ILE	A	192	19.500	6.080	30.913	1.00	21.92
ATOM	1374	C	ILE	A	192	19.705	6.598	32.337	1.00	25.67

【図 3】

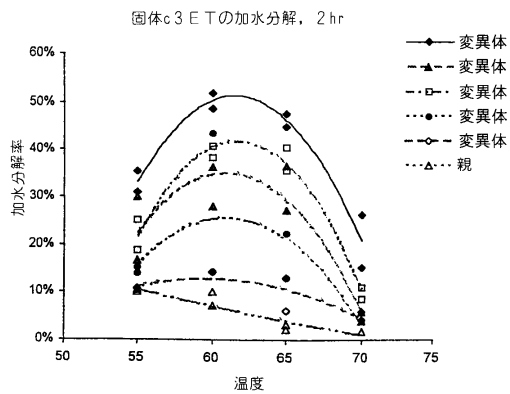


Fig. 3

固体c3 E Tの加水分解, 2 hr

【図 4】

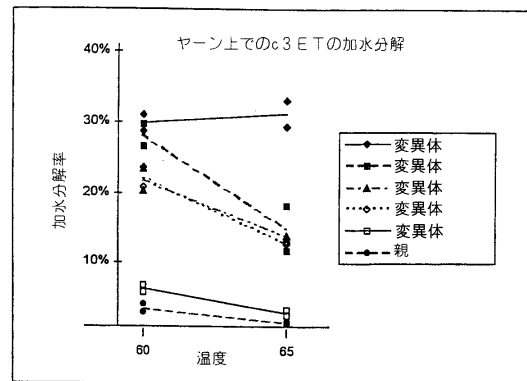
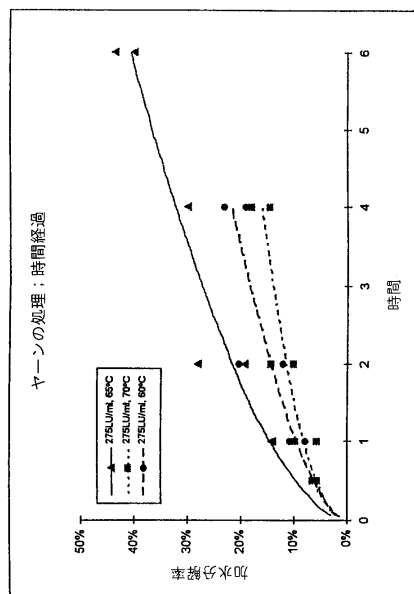


Fig. 4

ヤーン上でのc3 E Tの加水分解, 17hr

【図 5】

Fig. 5
ヤーンの処理：時間経過

【図 6】

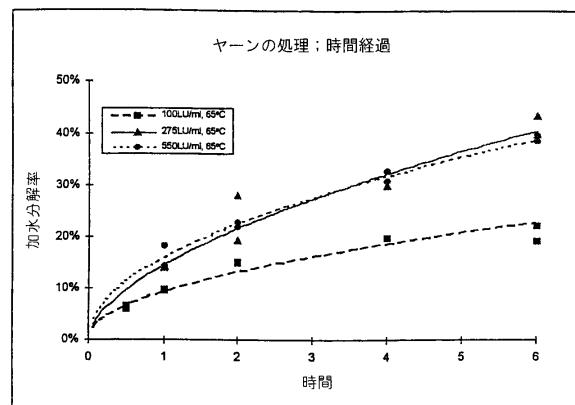


Fig. 6

ヤーンの処理：時間経過

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	9/14 (2006.01)	C 1 2 N 9/14
C 1 2 Q	1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34
C 1 2 S	11/00 (2006.01)	C 1 2 S 11/00

(31)優先権主張番号 PA 1999 00330
 (32)優先日 平成11年3月9日(1999.3.9)
 (33)優先権主張国 デンマーク(DK)
 (31)優先権主張番号 60/124,671
 (32)優先日 平成11年3月16日(1999.3.16)
 (33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 DSM 1800

(74)代理人 100081330
 弁理士 樋口 外治
 (72)発明者 阿保 正伸
 千葉県船橋市高野台2-5-3
 (72)発明者 福山 志朗
 千葉県千葉市緑区有吉町1-6-2
 (72)発明者 スベンゼン, アラン
 デンマーク国, デーコー 3460 ビルケレズ, バックレデット 28
 (72)発明者 松井 知子
 千葉縣市川市東大和田1-6-9-A303

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特表平08-504588(JP, A)
 特表平08-504589(JP, A)
 特表平10-507642(JP, A)
 特表平06-509122(JP, A)
 特表平10-509776(JP, A)
 Proteins, 26 (1996) p.442-458
 J Biotech., 66 (1998) p.11-26

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00-15/90
 C12S 11/00
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 PubMed
 BIOSIS/WPI(DIALOG)