

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4068142号  
(P4068142)

(45) 発行日 平成20年3月26日 (2008.3.26)

(24) 登録日 平成20年1月18日 (2008.1.18)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/20 (2006.01)

C 1 2 N 9/20

請求項の数 3 (全 195 頁)

(21) 出願番号 特願平9-508840  
 (86) (22) 出願日 平成8年8月12日 (1996.8.12)  
 (65) 公表番号 特表平11-510699  
 (43) 公表日 平成11年9月21日 (1999.9.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK1996/000341  
 (87) 国際公開番号 W01997/007202  
 (87) 国際公開日 平成9年2月27日 (1997.2.27)  
 審査請求日 平成15年8月1日 (2003.8.1)  
 (31) 優先権主張番号 0905/95  
 (32) 優先日 平成7年8月11日 (1995.8.11)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)  
 (31) 優先権主張番号 1096/95  
 (32) 優先日 平成7年9月29日 (1995.9.29)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(73) 特許権者 500586299  
 ノボザイムス アクティーゼルスカプ  
 デンマーク国、デーコーー 2 8 8 0 バグ  
 スバエルト、クロシェイバイ 3 6  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次  
 (74) 代理人 100108903  
 弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の脂肪分解酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親脂肪分解酵素の変異体である脂肪分解酵素であり、ここで、上記親脂肪分解酵素がヒュミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) 株、DSM4109に由来し、かつ、上記酵素のアミノ酸配列をもち、かつ、上記変異体は、以下の突然変異：

- a) SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+Q249R ;
- b) SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A ;
- c) SPIRPRP+N94K+D96L+L97M+Q249R ;
- d) SPPRRP+N94K+D96L+L97M+Q249R ;
- e) SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R ;
- f) SPPRRP+I90F+D96L+E99K+V187A ;
- g) SPIRPRP+D137G+D167G+E210V+W221L ;
- h) E1SPIRPRP+I90F+D96L+E99K+V187A ;
- i) E1SRKRKRK+I90F+D96L+E99K+V187A ;
- j) E1SPIKPRIK+I90F+D96L+E99K+V187A ;
- k) E1SPPRRP+D62R+I90F+D96L+E99K+V187A ;
- l) E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+N200R+R209A ;
- m) E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+T199R+N200R+R209A ;
- n) E1SPIRPRP+D57G+D62R+N94K+D96L+Q249R ;
- o) E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+N200R+R209A+Q249R ;
- p) E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+T199R+N200R+Q249R ;
- q) E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+T199R ;
- r) E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+T199R+R209A+Q249R ;
- s) E1SPIRPRP+I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R ;
- t) E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+P253R ;
- u) E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+D167G+V187A+Q249R ;
- v) E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A+Q249R ;
- w) E1SPPRRP+D96L+E99K+V187A+Q249R ;
- x) E1SPPRRP+V2P+N94K+D96L+Q249R ;
- y) E1SPPWWP+V2W+S3R+N94K+D96L+Q249R ;
- z) E1SPPWRP+V2R+S3R+N94K+D96L+Q249R ;
- aa) E1SPPRWP+V2R+S3R+N94K+D96L+Q249R ;
- bb) E1SPPWWP+V2R+S3W+N94K+D96L+Q249R ;
- cc) E1SPPRWP+V2W+S3R+N94K+D96L+Q249R ;
- dd) E1SPPRWP+V2R+S3W+N94K+D96L+Q249R ;
- ee) E1SPPRWP+N94K+D96L+Q249R ;
- ff) E1SPPRRP+N94K+D96L+Q249R ;
- gg) E1APPPRRPRPRP+V2G+S3T+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R ;
- hh) E1APPPRTRPRPRS+V2G+S3T+Q4P+D5E+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R ;
- ii) E1APPPKASPRQRP+V2G+D5Q+L6M+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R ;
- jj) SCIRR+N94K+D96L+E239C+Q249R ;
- kk) E1SPPRRP+D57G+N94K+D96L+Y53C+K127C+Q249R ;
- ll) E1SPPRRPR+V2R+S3P+N94K+D96L+Q249R ;
- mm) E1SPPWPRP+V2R+S3P+N94K+D96L+Q249R ;
- nn) E1SPPRRP+N94K+D96L+E99K ;
- oo) E1SPPRRP+N94K+D96L+E99K+Q249R ;
- pp) E1SPPCRRP+N94K+D96L+E239C+Q249R ;
- qq) E1SPCRPRP+N94K+D96L+E239C+Q249R ;
- rr) SPPCRRRP+N94K+D96L+E239C+Q249R ; 又は
- ss) E1SPPRRP+D57G+N94K+D96L+Q249R ;

の中の 1 を含む、前記脂肪分解酵素。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の脂肪分解酵素をコードする DNA 配列を含む DNA 構築物。

【請求項 3】

界面活性剤、及び請求項 1 に記載の脂肪分解酵素を含む洗剤組成物。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 発明の分野

本発明は、1 回のサイクルの洗浄の間、実質的な量の脂肪物質を除去することができる新規の脂肪分解酵素に関する。

##### 発明の背景

長年、脂肪分解酵素は、洗剤酵素として、すなわち布及び他の織物から脂質又は脂肪染色を除去するために使用されてきた。たとえば、種々の微生物リパーゼが洗剤酵素として提案されている。そのようなリパーゼの例は、ヒュミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) リパーゼ (ヨーロッパ特許第258068号及び第305216号に記載される)、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ (ヨーロッパ特許第238023号及びBoel, など., *Lipids* 23, 701-706, 1988に記載される)、アブジジア sp. (*Absidia* sp.) 脂肪分解酵素 (WO 96/13578)、カンジダ (*Candida*) リパーゼ、たとえば C. アンタルクチカ (*C. antarctica*) リパーゼ、たとえば C. アンタルクチカ リパーゼ A 又は B (ヨーロッパ特許第214761号に記載される)、シュードモナス (*Pseudomonas*) リパーゼ、たとえば Ps. アルカリゲネス (*Ps. alcaligenes*) 及び Ps. シュードアルカリゲネス (*Ps. pseudoalcaligenes*) リパーゼ (ヨーロッパ特許第218272号に記載される)、Ps. セパシア (*Ps. cepacia*) リパーゼ (ヨーロッパ特許第331376号に記載される)、シュードモナス sp. (*Pseudomonas* sp.) リパーゼ (WO 95/14783)、バシルス (*Bacillus*) リパーゼ、たとえば B. サブチリス (*B. subtilis*) リパーゼ (Dartois など., 1993)、B. ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*) リパーゼ (JP64/744992)、及び B. プミラス (*B. pumilus*) リパーゼ (ヨーロッパ特許第9100664号) を包含する。

さらに、多くのクローン化されたリパーゼ、たとえばペニシリアム・カメムベルチ (*Penicillium camembertii*) リパーゼ (Yamaguchi, S. など., 1991により記載される)、ゼオチカム・カンジダム (*Geotricum candidum*) リパーゼ (Schimada, Y. 1989; など., Schrag, J.D. など., 1991, *Nature* 351, p.761)、及び種々のリゾパス (*Rhizopus*) リパーゼ、たとえば R. デレマル (*R. delemar*) リパーゼ (R.D. Joerger and M.J. Hass (1993), *Lipids* 28, p.81-88)、R. ニベウス (*R. niveus*) リパーゼ (W. kugimiya など., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.* ら, p.716-719)、R. ジャビニカス (*R. javinicus*) (W. Uyttenbroeck など., (1993) *Biol. chem. Hoppe-Seyler* 374, p.245-254)、及び R. オリザエ (*R. oryzae*) (Haas, M.J., Allen, J. and Berka, T.R. (1991) *Gene* 109, p.107-113) (他のリゾパス・リパーゼと実質的に同一の配列を有する) が、記載されて来た。

洗剤酵素として提案されて来た他のタイプの脂肪分解酵素は、たとえば、WO88/09367に記載されるようなシュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) に由来するいわゆるクチナーゼ、又はフサリウム・ソラニ・ピシ (*Fusarium solani pisi*) に由来するクチナーゼ (たとえば、WO 90/09446に記載される) を包含する。

最近、洗剤目的のために改良された性質を有するリパーゼ変異体を調製する試みが行なわれている。たとえば、WO 92/05249は、野生型リパーゼ酵素のある特徴がそのアミノ酸配列の特異的、すなわち部位特異的変性により変更されている、改良された性質を有するリパーゼ変異体を開示する。より特定には、親リパーゼのいわゆる脂質接触部分の 1 又は複数のアミノ酸残基が変性されているリパーゼ変異体が記載されている。

WO 94/01541は、リパーゼの活性部位に関して決定的な位置を占めるアミノ酸残基が変性されている、改良された性質を有するリパーゼ変異体を記載する。

ヨーロッパ特許第407225号は、特別に定義されたアミノ酸変性により調製された、タンパク質分解酵素に対して改良された耐性を有するリパーゼ変異体を開示する。

ヨーロッパ特許第260105号は、活性部位から 15 以内のアミノ酸残基が置換されているヒドロラーゼを記載する。

WO 95/35381は、酵素の表面での疎水性を高めるために変性されているシュードモナス sp. リパーゼ、特に P. グルマエ (*P. glumae*) 及び P. シュードアルカリゲネス・リパー

10

20

30

40

50

ゼ変異体を開示する。

WO 96 / 00292は、アニオン性界面活性剤に対する酵素の適合性を改良するために変性されているシュードモナスsp. リパーゼ変異体、特にP . グルマエ及びP . シュードアルカリゲネス・リパーゼ変異体を開示する。

WO 95 / 30744は、高められた耐界面活性性に変性されている突然変異リパーゼ、たとえばシュードモナスsp. リパーゼを開示する。

WO 94 / 25578は、P . シュードアルカリゲネス・リパーゼにおける位置21に対応するメチオニンの特にロイシン、セリン又はアラニンへの少なくとも置換を含んで成る突然変異リパーゼを開示する。

上記リパーゼ変異体のすべては、親リパーゼの二次又は三次構造体におけるそれらのタイプ又はそれらの位置に基づいて選択された特定のアミノ酸残基の変性をもたらす特定部位突然変異誘発により構成されている。

一定のタンパク質の変異体を構成するための他のアプローチは、ランダム突然変異誘発に基づかれている。たとえば、アメリカ特許第4,898,331号及びWO 93 / 01285は、そのような技法を開示する。

WO 95 / 22615は、親脂肪分解酵素をコードするDNA配列をランダム突然変異誘発にゆだね、そして親脂肪分解酵素に比較して、洗剤又は1又は複数の洗剤成分に対して高められた耐性及び/又はカルシウムに対する低められた依存性を有する変異体をスクリーニングすることを包含する方法により調製された、改良された洗浄能力を有する脂肪分解酵素の変異体を開示する。

WO 95 / 09909は、その対応する変性された酵素よりも高いpIを有する、化学的に変性されたリパーゼ又はリパーゼ変異体の中でも開示している。

現在までに記載されたすべての洗剤脂肪分解酵素の欠点は、それらは、既知の脂肪分解酵素が、除去されるべき脂肪染色上に付着される場合、洗浄工程自体の間よりも乾燥工程の一定の期間、より活性的であるので、1回以上の洗浄サイクルの後、最良の脂肪除去効果を付与することである(Gormsenなど., Proceedings of the 3rd World Conference on Detergents, AOCs press, 1993, pp198-203)。これは、少なくとも2回の洗浄サイクル(十分な乾燥期間により分離される)が脂肪染色の実質的な除去を得るために必要とされる実際的な結果を有する。

いくつかの脂肪分解酵素は、最初の洗浄サイクルの間、脂肪物質を除去することができるものとして伝えられるところでは、記載されている。従って、WO 94 / 03578は、種々の洗剤成分の他に、洗浄工程の主サイクルの間、実質的な脂肪分解活性を示すことができるよう強く主張されている酵素を含んで成る洗剤組成物を開示する。伝えられるところでは、上記活性を示す脂肪分解酵素の例は、ステム - 特異的クチナーゼ、たとえばフサリウム・ソラニ・ピシ(*Fusarium solani pisi*)、フサリウム・ロゼウム・クルモリウム(*Fusarium roseum culmorum*)、リゾクトニア・ソラニ(*Rhizoctonia solani*)及びアルテルナリア・ブラシニコラ(*Alternaria brassicicola*)からのクチナーゼを包含する。しかしながら、実際的な洗浄条件下で試験される場合、それらの酵素のどれも、1サイクルの洗浄工程の間、脂肪染色の実質的な量を除去をすることができない(この後の例を参照のこと)。

従って、実際的な洗浄条件下で、1回の洗浄サイクルの間、実質的な量の脂肪物質を除去することができる脂肪分解酵素の必要性が存在する。

#### 発明の要約

本発明者は、実際的な洗浄条件下で行なわれる1サイクル洗浄の間、実質的な量の脂肪材料を除去することができる新規種類の脂肪分解酵素を、現在驚くべきことには同定し、そして構成した。本発明は、この発見に基づく。

従って、第1の観点において、本発明は、本明細書において定義された洗剤組成物A及び/又はBに存在する場合、1サイクル洗浄アッセイにおいて、本発明の脂肪分解酵素を含まない同じ洗剤組成物よりも、ラードで汚れた布ぎれから少なくとも15%高くラードを除去することができる脂肪分解酵素に関し、ここで前記アッセイは、3.2mMのCa<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup> (

10

20

30

40

50

5 : 1 の比での) 及び 5 g / l の前記洗剤組成物及び 12500LU / l の前記脂肪分解酵素を含んで成る、水 1000ml を含むビーカー当たり 7 枚のラードで汚れた綿の布ぎれ ( 9 × 9 cm ) を熱調節された Terg-O-to-Meter ( TOM ) における 1 サイクル洗浄にゆだねることを含んで成り、そして前記処理は、30 の温度で 20 分間、行なわれ、続いて 15 分間、水道水によりすすがれ、そして室温で一晩、物干し網上で乾燥せしめられ、続いてソックスレー抽出により布ぎれ上の脂肪物質の抽出及び定量化が行なわれる。

洗剤組成物 A 及び / 又は B、及び 1 サイクル洗浄アッセイはさらに、本明細書における材料及び方法のセクションに記載される。

本発明は、第 1 の洗浄脂肪分解酵素を開発すること ( 同定し、そして / 又は創造すること ) が可能である驚くべき事実の最初の真の例示を構成する。従って、今日まで不可能であると思われてきたこと ( 世界じゅうの多くの研究チームによる数年間の集中的な研究に基づかれる ( 上記のようなこの分野における有望な特許出願分野の数により影響されるような ) ) が、可能であることが現在、示された。

本発明者は、第 1 の洗浄脂肪分解酵素を創造するためのひじょうに便利且つ有用な方法を開発した。

従って、第 2 の重要な観点において、本発明は、第 1 の洗浄用突然変異誘発された脂肪分解酵素を調製するための方法に関し、ここで前記方法は、下記段階：

( a ) 親脂肪分解酵素をコードする DNA 配列を、種々の突然変異誘発された DNA 配列を形成するために、突然変異誘発、便利にはランダム突然変異誘発にゆだね；

( b ) 前記突然変異誘発された DNA 配列を宿主細胞において発現し；

( c ) 親脂肪分解酵素に比較して、カルシウムに対する低められた依存性及び / 又は洗剤又は洗剤成分に対して改良された耐性を有する突然変異誘発された脂肪分解酵素を発現する宿主細胞についてスクリーンし；そして

( d ) 洗剤組成物 A 及び / 又は b において 12500LU / l の濃度で存在する場合、上記 1 サイクル洗浄アッセイにおいて、前記酵素を有さない同じ洗剤組成物よりも、ラードで汚れた布ぎれから少なくとも 15% 高くラードを除去することができる、段階 ( c ) に起因する細胞間の突然誘発された脂肪分解酵素を選択することを少なくとも含んで成る。

さらなる観点において、本発明は、第 1 の洗浄用突然変異誘発された脂肪分解酵素を調製するための方法に関し、ここで前記方法は次の段階：

( a ) 第 1 の親脂肪分解酵素をコードする DNA 配列、及び第 2 の親脂肪分解酵素をコードする DNA 配列、並びに、任意には、第 3 の ( 及び任意には、追加の ) 親脂肪分解酵素をコードする追加の DNA 配列を組合すことによって、突然変異誘発された DNA 配列を構成し、ここで前記 DNA 配列は、完全な DNA 配列の部分間の組換えの発生を可能にするために十分に相同であり；

( b ) 前記得られる突然変異誘発された DNA 配列を宿主細胞において発現し；そして

( c ) 洗剤組成物 A 又は B において 12500LU / l の濃度で存在する場合、上記 1 サイクル洗浄において、前記酵素を有さない同じ洗剤組成物よりも、ラードで汚れた布ぎれから少なくとも 15% 高くラードを除去することができる、突然変異誘発された DNA 配列によりコードされる突然変異誘発された酵素を選択することを少なくとも含んで成る。

好ましい態様において、本発明の第 2 及び第 3 の観点の方法は組合され、すなわち第 2 の観点の方法に起因する突然変異誘発された脂肪分解酵素は、第 3 の観点の方法において親酵素として使用される。

さらなる観点においては、本発明は、上記で定義されたような第 1 の洗浄脂肪分解酵素をコードする DNA 配列を含んで成る DNA 構造体に関する。

さらに追加の観点においては、本発明は、前記 DNA 構造体を担持する組換え発現ベクター、前記 DNA 構造体又は前記ベクターにより形質転換された細胞、及び前記細胞を、酵素の生成の助けとなる条件下で培養し、その後、酵素を前記培養物から回収することによって第 1 の洗浄脂肪分解酵素を生成するための方法に関する。

最終の観点においては、本発明は、特に洗浄又は皿洗いのための洗剤酵素としての、及び酵素を含んで成る洗剤添加物及び洗剤組成物への第 1 の洗浄脂肪分解酵素の使用に関する

10

20

30

40

50

。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、プラスミド pYESHL を示す。

図 2 は、プラスミド pAO1 を示す。

図 3 は、プラスミド pAHL を示す。

図 4 及び 5 は、PCR 突然変異誘発法のグラフ的な例示である。

図 6 は、プラスミド pJS037 を示す。

図 7 は、プラスミド pDM177 の構成を示す。

図 8 は、アスペルギラス・ベクター pCaHj485 の構成を示す。

図 9 は、アブジジア・レフレキサ (*Absidia reflexa*) ATTC 44896 リパーゼの元の配列を示す。成熟 NL127 の最初のアミノ酸セリンをコードするトリプレット、及び停止コドンが下線を引かれている。

図 10 は、酵母発現ベクター pTiK05 に関してのアブジジア・レフレキサ ATTC 44896 配列を示す。

図 11 は、接合因子 1 シグナル配列を示す。

リパーゼ構造体に対する定義及び背景

特許出願に使用される用語の定義

本発明において、用語“脂肪分解酵素”とは、International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) の推薦 (1992) に従って、Enzyme Classification 番号 E.C. 3.1.1 (カルボン酸エステルヒドロラーゼ) 下で分類された酵素を示すことを意図する。

従って、脂肪分解酵素は、次の脂質の少なくとも 1 つに存在するエステル結合のタイプの少なくとも 1 つに対して加水分解活性を示す：モノ -、ジ - 及びトリグリセリド、リン脂質 (すべての種類)、チオエステル、コレステロールエステル、ワックス - エステル、クチン、スベリン、合成エステル、等 (E.C. 3.1.1 に言及される種々のタイプのエステル結合を参照のこと)。

従って、脂肪分解酵素は、たとえば、従来、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ又はクチナーゼとして称せられて来たものであり得る。用語“脂肪分解酵素”とは、天然に存在する酵素、及び天然に存在する酵素に比較される場合、酵素の 1 又は複数のアミノ酸残基の変性により、又は化学的変性により変性されている酵素を包含することを意図する。本発明においては、脂肪分解酵素の後者のタイプは、変異体と称せられる。

本発明において、1 サイクル洗浄の間、実質的な量の脂肪物質を除去することにおける酵素の能力はまた、第 1 の洗浄効果、1 サイクル洗浄効果、洗浄を通しての効果、及び同様のものとしても言及される。同様に、1 サイクル洗浄の間、実質的な量の脂肪物質の除去をもたらすことができる本発明の脂肪分解酵素は、第 1 の洗浄脂肪分解酵素、洗浄を通しての脂肪分解酵素、1 サイクル洗浄脂肪分解酵素、及び同様のものと呼ばれる。

本発明において、本発明の一定の脂肪分解酵素のラード除去能力を定義するために使用されるような用語“洗剤組成物 A 及び / 又は B”とは、脂肪分解酵素が、洗剤組成物 A 又は B のいずれか又は A 及び B の両者に存在する場合、前記に示されたラード除去能力を有することを示すことを意味する。

本発明において、用語“親酵素”とは、天然に存在する酵素、及びそのような酵素の変異体を包含することを意味する。従って、前記用語は、第 1 の洗浄脂肪分解酵素を調製するための本発明の方法に従って変性されるべき出発材料を、その出発材料が天然に存在する酵素であるか又はそのような酵素の変異体であるかどうかに関係なく、同定するために使用される。

第 2 の観点の方法に関して使用されるような用語“種々の突然変異誘発された配列”とは、少なくとも 2、但し好ましくは、より多くの数の異なった配列、たとえば少なくとも 10、少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 1000 の配列が突然変異誘発に起因したことを示すことを意味する。

用語“ランダム突然変異誘発”とは、親酵素のランダム位置での 1 又は複数の突然変異の導入、又は親酵素の選択された位置又は領域におけるランダムアミノ酸残基の導入を示す

10

20

30

40

50

ことを意味する。ランダム突然変異誘発は、親酵素に比較される場合、改良された性質を有する突然変異誘発された脂肪分解酵素の選択を可能にするスクリーニングにより通常、達成される。ランダム突然変異を導入するための適切な技法、及び改良された性質についてのスクリーニングは、下記に詳細に論じられる。

本明細書に開示される脂肪分解酵素について使用される場合、用語“満足した洗浄性能”とは、その酵素が、市販の脂肪分解酵素（GenencorからのLumafast及びLipomax, Novo NordiskからのLipolase及びShowa DenkoからのLiposam）に比較して、適切な洗浄アッセイ又は洗浄関連アッセイ（たとえば、下記の材料及び方法、及び例5に記載されるようなアッセイ）において試験される場合、改良された性能を有することを示すことを意味する。改良された性能は、脂質染色除去能力及び／又は低められたカルシウム依存性、洗剤又は洗剤成分に対する改良された耐性、高められた疎水性、興味ある基質特異性、又は同様のものの点において存在することができる。

本発明において、突然変異誘発された脂肪分解酵素、特に、約6～8個のC-原子を越える長さの炭化水素鎖（ffa-部分）を有するリパーゼ基質に対する酵素活性を示す脂肪分解酵素についてのスクリーニングに関して使用される場合、用語“カルシウムに対する低められた依存性”とは、突然変異誘発された脂肪分解酵素が、類似する条件下で試験される場合、親酵素と同じ程度の活性及び／又は安定性を示すためにより低い量の $\text{Ca}^{2+}$ を必要とすることを意味する。換言すれば、酵素の安定性及び／又は活性は、親酵素のそれと比較される場合、カルシウムの不在下で高められる。安定性は、たとえばCa-フリー条件下でのブレインキュベーションに基づいての残留活性の決定により、及び／又はフリー $\text{Ca}^{2+}$ の不在／存在下でのDSC（示差走査熱量法）によりアッセイされ得る。好ましくは、本発明の突然変異誘発された脂肪分解酵素は、特に8よりも高いpHで酵素活性を示すためにカルシウムの存在に実質的に無関係である。

突然変異誘発された脂肪分解酵素についてのスクリーニングに関して使用される場合、用語“洗剤又は洗剤成分に対する改良された耐性”とは、その突然変異誘発された脂肪分解酵素が親脂肪分解酵素よりも、洗剤又は洗剤成分の高い濃度で活性的であることを意味する。

本発明において、用語“洗剤”とは、洗浄又は皿洗いのために通常、使用される洗剤成分の混合物を示すことを意味する。同様に、“洗剤成分”とは、洗剤又は皿洗い組成物に通常見出される成分を示すことを意味し、それらの特定の例は、下記“洗剤組成物”のセクションに記載される。

脂肪分解酵素構造体に対する背景及び構造体用語法の定義

多くの脂肪分解酵素の3D構造体は決定されている。その構造体が中央-シートから成るタンパク質のコアに共通するモチーフ、すなわち活性セリン残基を包含する求核エルボーを末端に有する鎖の1つを有することは見出されている（Ollisなど、1992）。脂肪分解酵素は、加水分解で又はその間、脂質基質と相互作用する高められた表面疎水性を有する表面である脂質接触領域を含んで成る。リッド（lid）を含む脂肪分解酵素に関しては、脂質接触領域は典型的には、酵素が基質により活性化される（そしてそれにより、リッドが置換される）場合に形成される。リッドを含まない脂肪分解酵素に関しては、脂質接触領域の創造を導びく対応する実質的な活動は一般的にほとんど存在しないか又はまったく存在しない。脂質基質は、単一の脂質基質分子の集合体である。脂質接触領域は、加水分解の前、単一の脂質基質分子が結合する結合領域を含む。この結合領域は、アシル-結合の疎水性裂け目（cleft）、及び活性部位Serのまわりに位置し、そして脂質基質の加水分解が起こると思われる、いわゆる加水分解ポケットを含む。脂質接触領域は、1又は複数の二次タンパク質構造体要素、すなわちループ配列を含み、このアミノ酸残基は、脂肪分解酵素が活性化される場合、加水分解の間、基質に接触し、それに結合し、そして／又はそれと相互作用する。

脂質接触領域は、たとえば、適切なコンピュータープログラムにより創出される注目の脂肪分解酵素の三次元構造体から認識され得る。脂質接触領域は、活性部位残基の上部上に位置し、そして開放される場合、狭い疎水性結合ポケットを含む疎水性表面を創造するリ

ッド構造体（リッドを含む脂肪分解酵素のための）を含む領域を包含する、前記領域を定義するその相当する特徴のための構造体を研究することによって同定され得る。それぞれ、不活性及び活性化されたH・ラヌギノサ脂肪分解酵素のコンホーメーションは、WO 92 / 05249の図1及び2に示されている。

アミノ酸残基に関して、H・ラヌギノサ脂肪分解酵素の脂肪接触領域は、アミノ酸残基21 - 25, 36 - 38, 56 - 62, 81 - 98, 110 - 116, 144 - 147, 172 - 174, 199 - 213及び248 - 269により定義される。それらの残基は、脂肪分解酵素と脂肪基質との間の相互作用のコンピュータモデルシミュレーションに基づいて同定された。H・ラヌギノサ脂肪分解酵素、たとえばリゾムコル・ミエヘイ、リゾパス・オリザエ、ペニシリアム・カメムベルチ及びアブジシアsp.により生成される脂肪分解酵素と実質的に同じ構造体を有する脂肪分解酵素（上記、“発明の背景”のセクションを参照のこと）に関しては、脂質接触領域は、H・ラヌギノサ酵素に関して上記に付与された位置と相同の位置を占めるアミノ酸残基により構成される。その相同位置は、配列類似性のグループを見出すその相当する一連のアミノ酸配列により同定され得るが（たとえば、UWCGC GAPプログラムを用いて）、しかしより便利には、その相当する酵素の構造体又は構造体モデルを比較することによって同定され得る。より特別には、それらの酵素の脂質接触領域は、次の残基から構成される（使用される番号付けは、成熟酵素におけるアミノ酸残基を言及し、その配列は、特にことわらない限り、上記の発明の背景に開示される文献から明らかである）：

ペニシリアム・カメムベルチ：21 - 25, 36 - 38, 56 - 62, 81 - 98, 109 - 115, 143 - 146, 172 - 174, 198 - 212, 247 - 280；

リゾパス・オリザエ：29 - 33, 39 - 41, 57 - 62, 81 - 98, 109 - 115, 143 - 146, 175 - 177, 202 - 216, 245 - 269；

リゾムコリ・ミエヘイ：29 - 33, 39 - 41, 56 - 61, 80 - 97, 108 - 114, 142 - 145, 174 - 176, 201 - 215, 245 - 269；

アブジシアsp. リパーゼ：29 - 33, 39 - 41, 56 - 61, 80 - 97, 108 - 114, 142 - 145, 171 - 173, 198 - 212、及び239 - 263；番号付けは、成熟タンパク質が次のN - 末端配列：SSK QDYRを有することに基づかれている。完全な配列は、配列番号98から明らかである。

脂質接触領域の他の相同性に基づく同定又はその他に、脂質接触領域は、

- a) 活性化された酵素の3 - D分子構造体の疎水性ベクターを計算し；
- b) 線状配列における活性部位セリンの後の第2アミノ酸残基のCA - 原子（C - 原子）を通して前記ベクターに対して垂直な切断を行ない；
- c) 前記ベクターが向く前記切断のその側に少なくとも1つの原子を有するすべての残基を包含し；そして
- d) それらの残基から、前記タンパク質の表面の5 Å以内に少なくとも1つの原子を有する残基を選択することによって、同定され得る。

疎水性ベクターは、少なくとも15%の表面接近容易性（Leeなど., Mol. Biol. 55, pp.379-400（1971））を有する残基についてのすべての残基ベクターを評価することによって、タンパク質構造体から計算される。残基ベクターの出発点は、残基のCA - 原子として定義され、そしてその方向性は、その側鎖の質量中心を通して存在する。個々の残基ベクターの大きさは、水とより疎水性の溶媒との間の残基のトランスファー自由エネルギーとして定義される（たとえば、Creighton, Protein, W. Freeman & Co., p.151（1984））を参照のこと。個々の残基の表面接近容易性は、Connollyのプログラム（Leeなど., op. cit.）を用いて計算される。

Svensenなど、Biochimica et Biophysica Acta（1259）9-17から明らかである、種々の配列の上記方法及び/又は整合を用いて、種々のシュードモナスsp. から単離される脂肪分解酵素の次の脂質接触領域が同定されている（使用される番号付けは、上記出版物（Svensenなど、（1995））に示されるように成熟酵素のアミノ酸残基を言及する）：

シュードモナス・セパシア・リパーゼ：15 - 36, 110 - 167, 209 - 266, 281 - 304；

シュードモナス・シュードアルカリゲネス・リパーゼ：15 - 35, 106 - 163, 200 - 232, 250 - 271；



シュードモナス・グルマエ：15 - 36, 110 - 167, 209 - 266, 281 - 304；

シュードモナス・メンドシナSD702リパーゼ：19 - 39, 111 - 166, 213 - 244, 258 - 279（配列はWO 95 / 14783から明らかである）；

シュードモナスsp.（Liposam<sup>R</sup>）リパーゼ：17 - 37, 109 - 161, 208 - 239, 253 - 274（配列番号99）；

シュードモナス・ウイスコンシンシス（*Pseudomonas wisconsinensis*）リパーゼ：13 - 34, 106 - 161, 200 - 242, 250 - 270（配列はWO 96 / 12012から明らかである）。

リッド構造体を含まない脂肪分解酵素のための脂質接触領域は、脂肪分解酵素の三次元構造体の構造又はモデルにおいて評価されるようにコアのトポロジーから決定され得る。この態様においては、フサリウム・ソラニ・ピシ脂肪分解酵素の脂質接触領域は、アミノ酸残基40 - 50, 78 - 91, 119 - 121, 147 - 154, 171 - 193（成熟酵素に基づいて評価される場合）に決定されている。

10

いくつかの脂肪分解酵素はまた、表面ループ構造体、すなわち脂質接触領域の一部であるリッドを含んで成る。その表面ループ構造体は、脂肪分解酵素が不活性形で存在する場合、活性セリンを被覆する。前記酵素が活性化される場合、表面ループ構造体は、活性セリン残基を暴露するよう移動する。表面ループ構造体は、結合ポケットに面する主に疎水性の内面及び主に親水性の外面を有する。

表面ループ構造体を有する脂肪分解酵素の例は、ヒュミコラ・ラヌギノサ、リゾムコル・ミエヘイ、リゾパスsp.、ペニシリアム・カメムベルチ及びアブシダsp.、多くのシュードモナスsp.、たとえばPs. セパシア、Ps. アエロギノサ（Ps. aeruginosa）、Ps. フラジ（Ps. fragi）（上記の“発明の背景”のセクションを参照のこと）、カンジダ・ルゴサ（*Candida rugosa*）（Grochulski, Pなど（1993）J. Biol. Chem. 268, p.12843）により生成される酵素、及びWinklerなど., Nature 343, pp.771-74（1990）に記載されるヒト膵臓リパーゼである。

20

ヒュミコラ・ラヌギノサDSM4109により生成される脂肪分解酵素の表面ループ構造体は、位置82 - 96でのアミノ酸残基により定義される。実質的に同じ三次元構造体（上記を参照のこと）を有する脂肪分解酵素の表面ループ構造体は、H. ラヌギノサ脂肪分解酵素の位置に対して相同の位置を占めるアミノ酸残基、すなわち81 - 98（ペニシリアム・カメムベルチ・リパーゼのための）、82 - 99（リゾパス・オリザエのための）、80 - 97（リゾムコリ・ミエヘイのための）、80 - 97（アブシダエsp. リパーゼのための）により定義される。

30

シュードモナスsp. により生成される代表的な数の脂肪分解酵素の表面ループ構造体は、配列番号99に示される、Ps. グルマエ135 - 155、Ps. セパシア135 - 155、Ps. シュードアルカリゲネス132 - 152、シュードモナスsp. リパーゼ（SD705）（Liposam<sup>R</sup>）129 - 149である。

#### 発明の詳細な記載

##### 本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素

好ましくは、本発明の脂肪分解酵素は、上記で言及された酵素よりも一層高いラード除去能力をもたらすことができる。従って、好ましい態様においては、本発明の脂肪分解酵素を含んで成る洗剤組成物A及び／又はBは、12500LU / lの濃度で本発明に記載される1サイクル洗浄アッセイにおいて試験される場合、脂肪分解酵素を含まないそれぞれの洗剤組成物A及び／又はBよりも、少なくとも15%、たとえば少なくとも20%高くラードを除去することができる。より好ましい態様においては、脂肪分解酵素は、洗剤組成物A及び／又はBに存在する場合、その洗剤組成物が、脂肪分解酵素を含まない洗剤組成物A及び／又はBよりも、本発明に記載される1サイクル洗浄アッセイにおいて試験される場合、少なくとも25%、たとえば少なくとも30%又は35%、又は40%、又は50%高いラードの除去を可能にする酵素である。

40

上記1サイクル洗浄アッセイに使用される脂肪分解酵素の濃度（すなわち、12500LU / l）は、実際的な適用のためには高いと思われるが、しかし分析的な変動を最少にするためのアッセイ目的のために選択された。より実際的な濃度は1250LU / lであり、これは他の

50

態様において、本発明の脂肪分解酵素ラード除去能力を定義するためにも使用され得る。従って、さらなる態様においては、脂肪分解酵素は、1250LU / l の濃度で本明細書に記載される1サイクル洗浄アッセイにおいて使用される場合、その脂肪分解酵素を含まない洗剤組成物A及び/又はBよりも少なくとも15%、たとえば少なくとも20%高くラードを除去することができる酵素である。さらにより好ましい態様においては、脂肪分解酵素は、1250LU / l の濃度で洗剤組成物A及び/又はBに存在する場合、本明細書に記載されるような1サイクル洗浄アッセイに使用される場合、脂肪分解酵素を含まない洗剤組成物A及び/又はBよりも少なくとも25%、たとえば少なくとも30%又は35%高くラードの除去を可能にする。

好ましい態様においては、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、本明細書に記載されるような1サイクル洗浄アッセイにおいて試験される場合、

1250LU / l の濃度で洗剤組成物Aに存在する場合、その酵素を含まない洗剤組成物Aよりも、ラードで汚れた布ぎれから少なくとも15%高くラードを除去することができ；

12500LU / l の濃度で洗剤組成物Aに存在する場合、その酵素を含まない洗剤組成物Aよりも、ラードで汚れた布ぎれから少なくとも40%高くラードを除去することができ；

1250LU / l の濃度で洗剤組成物Bに存在する場合、その酵素を含まない洗剤組成物Bよりも、ラードで汚れた布ぎれから少なくとも15%高くラードを除去することができ；

12500LU / l の濃度で洗剤組成物Bに存在する場合、その酵素を含まない洗剤組成物Bよりも、ラードで汚れた布ぎれから少なくとも15%高くラードを除去することができる。

本明細書の例5においては、本発明の脂肪分解酵素の脂肪除去能力と洗浄を通しての効果を有するものとして主張されたWO 94 / 03578に記載される脂肪分解酵素のその能力との比較が示されている。本発明の酵素は、従来技術の酵素よりも1サイクル洗浄において実質的に高いラードを除去することが見出された。前記酵素間の比較、同じアッセイの使用により行なわれた。

本発明の脂肪分解酵素は、上記タイプの脂肪分解酵素のいずれか、たとえばエステル及び/又はリン脂質結合に対する活性を示すヒドロラーゼであり得るが、その酵素はモノ -、ジ - と及び/又はトリ - グリセリドにおけるエステル結合に対する活性を示し、そして/又はクチンに対しての活性を示す脂肪分解酵素であることが特に好ましい。そのような酵素は一般的に、洗剤酵素としてひじょうに興味あるものであると思われる。

下記の材料及び方法のセクション、及び例5において、第1の洗浄脂肪分解酵素を同定するための適切なアッセイが与えられている。それらのアッセイは、天然に存在する第1の洗浄脂肪分解酵素を同定するために使用され得る。より特定には、本発明の天然に存在する第1の洗浄脂肪分解酵素を同定するためには、候補体酵素が、脂肪分解酵素を生成することが予測される適切な生物、たとえば上記の“発明の背景”のセクションに与えられ、又は“親脂肪分解酵素”のセクションにおいて後で、論ぜられる生物に分類的に関連する生物、又は脂肪分解酵素を生成する生物を必要とする環境に見出される生物から回収される。続いて、回収された酵素は、本明細書に開示される第1の洗浄脂肪分解酵素アッセイにゆだねられる。

本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は新規の天然に存在する酵素（その第1の洗浄性能に基づいて同定される）であり得るけれども、その酵素は、変性された酵素、すなわち第1の洗浄活性を有する変性された脂肪分解酵素をもたらすために、親脂肪分解酵素を突然変異誘発に及び/又は化学的変性にゆだねることによって調製された酵素であることが現在、好ましい。親脂肪分解酵素は、第1の洗浄活性（従って、突然変異誘発又は化学的変性により改良され得る）を有する酵素であり得、又は本明細書に記載されるようないずれの第1の洗浄活性を有することができない。1つの態様において、親酵素は満足する洗浄性能自体又は第1の洗浄性能さえを有することが好都合であると思われ、次に後者の性質は突然変異により改良される。満足する（しかし必ずしも必要ではない）第1の洗浄性能を有する親酵素は、この後の例6に記載されるアッセイを用いて選択され得る。

親酵素のアミノ酸残基の化学的変性は、WO 95 / 09909に開示される原理（この内容は引用により本明細書に組込まれる）に従って実施され得る。たとえば、化学的変性は、酵素に

10

20

30

40

50

おけるグルタミン酸又はアスパラギン酸残基のカルボキシル基にアミンリガンド（たとえばアミノ化された糖、アミノ化されたアルコール、又はアミノ化されたグルコサミン又はその異性体形）をカップリングすることによって達成され得る。化学的変性は、当業界において知られている方法、たとえばW0 95 / 09909に記載される方法により実施され得る。化学的変性は、負の電荷を除去するために酸基に対して行なわれ得る。

親脂肪分解酵素の突然変異誘発は好ましくは、親酵素の基質結合親和性を改良するために行なわれる。より特定には、改良された基質結合親和性は、得られる第1の洗浄活性をもたらすことが見出された。改良された基質結合親和性は親酵素の表面を低い陰性にするによって達成され得ることが現在、予測される。従って、突然変異誘発は、親酵素の表面に位置する少なくとも1つの中性アミノ酸残基を、正に荷電されたアミノ酸残基により置換し、親酵素の表面に位置する負に荷電されたアミノ酸残基を欠失せしめ、又は親酵素の表面に位置する負に荷電されたアミノ酸残基を、中性（疎水性を包含する）の又は正に荷電されたアミノ酸残基により置換することによって実施され得る。前記酵素の表面に位置するアミノ酸残基は、上記の定義セクションにおいて言及されるConollyプログラムにより同定され得る。好ましい態様においては、突然変異誘発は、アミノ酸残基D及び／又はEを除去するために、又は便利には、R、K、W、F、Y、I、Lを置換により挿入するために行なわれる。改良された基質結合親和性についての適切な試験は、この後の例11に記載される。

10

負の表面から正の表面への上記変更の第1の洗浄効果は、その構造体又は安定性を最適化する交換の導入により改良され、そして／又は安定化され得る。従って、たとえば、酵素表面中へのプロリン残基の導入は、高められたタンパク質分解及び／又は熱安定性を導びくことができ；親水性アミノ酸残基、たとえばGlu及び／又はAspの導入はアニオン性洗剤安定性を高めることができ；そして疎水性アミノ酸残基の導入は酵素の吸着／親和性を高めることができる。上記タイプのアミノ酸残基の導入は、酵素の表面での適切な位置中にアミノ酸残基を単純に導入することによって、又はそのような位置に位置するアミノ酸残基を置換することによって達成され得る。

20

本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、好ましくは酵素の表面に位置する、少なくとも1つの突然変異、但し典型的にはより多くの突然変異を含んで成る親脂肪分解酵素の変異体であると現在思われている。その変異体は、より多くの突然変異、たとえば少なくとも2、3、4又は5の突然変異、たとえば1～20、1～15、1～12、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5又は1～4の範囲の突然変異、又は酵素の酵素活性を減じないいづれかの数の突然変異を含んで成ることができる。

30

本明細書に開示される親H・ラヌギノサ・リパーゼの脂質接触領域の内部及び外部での突然変異が第1の洗浄活性を達成するためには重要なものであることが見出された。従って、突然変異を担持する本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、親酵素の脂質接触領域の外部の少なくとも1つのアミノ酸残基の変性及び／又は前記領域の外部の少なくとも1つのアミノ酸残基の付加により、及び／又は親酵素の脂質接触領域の内部の少なくとも1つのアミノ酸残基の変性及び／又は前記領域の内部への少なくとも1つのアミノ酸残基の付加により、親脂肪分解酵素から構成され得る。

従って、もう1つの態様においては、本発明の脂肪分解酵素は、親酵素の脂質接触領域における少なくとも1つのアミノ酸残基の修飾、欠失又は置換により、又は前記領域への少なくとも1つのアミノ酸残基の付加により親酵素から調製されたものである。さらにもう1つの態様においては、脂肪分解酵素は、脂質接触領域外の少なくとも1つのアミノ酸残基の修飾、欠失又は置換により、又は前記領域への少なくとも1つのアミノ酸残基の付加により親酵素から調製されたものであり、ここで前記アミノ酸残基は好ましくは、親酵素の表面に位置する。脂質接触領域内又は外での突然変異は好ましくは、得られる修飾された酵素の基質結合親和性を改良するために、便利には、上記のように負の電荷の除去のために行なわれる。

40

上記原理に従っての（及び第1の洗浄活性についての得られる酵素変異体の試験と組合される）特定部位突然変異誘発は第1の洗浄脂肪分解酵素の創造のために用いられ得るけれ

50

ども、第1の洗浄脂肪分解酵素を創造するためには他の方法を使用することが現在好ましい。ランダム突然変異誘発、特に局在化されたランダム突然変異誘発、及び相同遺伝子のインビボ組換えが、その目的のために特に興味あるものであることが見出された - それらの方法は、下記により詳細に記載される。

そのC - 又はN - 末端の非構造部分が変性された第1の洗浄脂肪分解酵素

その成熟形における親酵素の非構造部分で又はその内部に少なくとも1つのN - 末端及び / 又はC - 末端ペプチド付加を適用することによって、又は親成熟酵素のC - 末端及び / 又はN - 末端の非構造部分に他の変化を導入することによって、親脂肪分解酵素に第1の洗浄効果を付与し、又は親脂肪分解酵素の第1の洗浄効果を有意に増強することが可能であることが、驚くべきことには見出された。

10

従って、さらに好ましい態様においては、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、親酵素に比較して、その親酵素のN - 及び / 又はC - 末端の非構造部分で又はその部分内で修飾されている親脂肪分解酵素の変異体である。

本発明において、用語“修飾された”とは、i) 適切なペプチド付加が親酵素に適用されており、又はii) 親成熟酵素のC - 末端及び / 又はN - 末端部分の非構造部分内の1又は複数のアミノ酸残基が欠失しているか又は他のアミノ酸残基により置換されているか、又はiii) 親酵素がi) 又はii) の組合せにより変性されていることを示すことを意味する。本発明において、この手段で修飾されている本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、本発明の修飾された酵素と称され得る。

本発明において、用語“ペプチド付加”とは、1又は複数の連続したアミノ酸残基の延長部が、親酵素のN - 及び / 又はC - 末端のいずれか又は両者に付加されているか（すなわち、親酵素の最初の及び / 又は最後のアミノ酸残基に融合されているか）、又は親酵素のN - 及び / 又はC - 末端の非構造部分内に挿入されていることを示すことを意味する。変性された酵素は、親脂肪分解酵素のN - 又はC - 末端のいずれかで、又はそのN - 及びC - 末端の両者においてペプチド付加を含んで成る。ペプチド付加が親酵素のN - 及びC - 末端の両者に適用される場合、そのいずれかの末端でのペプチド付加物は、同じアミノ酸配列か又は異なったアミノ酸配列を有することができる。同じか又は異なったペプチド付加の複数のコピーが挿入され、又は付加され得る。

20

用語“適切なペプチド付加”とは、使用されるべきペプチド付加が、第1の洗浄性能又は改良された第1の洗浄性能をもたらすことができるものであることを示すために用いられる。ペプチド付加の“適切性”は、ペプチド付加が適用されている変性された酵素及びその対応する親酵素の第1の洗浄性能の比較分析により調べられ得る。その洗浄性能はたとえば、材料及び方法のセクションに記載される1サイクル洗浄アッセイにより決定され得る。

30

ペプチド付加によりもたらされる改良された第1の洗浄性能は、少なくとも一部、その脂質基質に対する変性された脂肪分解酵素の高められた親和性によると現在思われている（但し、これが唯一の理由ではない）。従って、好ましい態様については、ペプチド付加は、その脂質基質に対する変性された酵素の高められた親和性を付与するものである。

用語“成熟酵素”は、すなわち問題の生成体生物により発現及び後翻訳プロセッシング（プロ - 及び / 又はプレ - 配列を除去するために）の後に得られる酵素の活性形を示すために、その従来の手段において使用される。酵素が分泌された酵素である場合、成熟酵素は通常、分泌の後に得られる酵素の形であろう。より特定には、これは、プレ - 及びプロ - ペプチド配列が、存在するなら、初期に翻訳された酵素、すなわちプロセッシングされていない酵素から除去されていることを意味する。

40

用語“非構造部分”とは、折りたたまれた成熟酵素の最初又は最後の構造要素、たとえば - ヘリックス又は - シート構造体外に存在する、それぞれN - 及びC - 末端の部分を示すことを意味する。その非構造部分は、問題の酵素の三次元構造体又はモデルにおいて容易に同定され得る。典型的には、その非構造部分は、酵素を構成するアミノ酸の最初又は最後の約1 ~ 20個のアミノ酸残基を含んで成る。H. ラヌギノサ脂肪分解酵素の構造に対しての類似する三次元構造を有する酵素に関しては、挿入は、H. ラヌギノサ脂肪分解

50

酵素の“非構造部分”に対応する前記酵素の部分において行なわれ得る。

H. ラヌギノサ脂肪分解酵素の非構造部分は通常、成熟酵素の最初の又は最後の約1～20個のアミノ酸残基を含んで成る。所望する第1の洗浄効果を提供するペプチド付加の能力は、たとえば変性される親酵素の独自性、ペプチド付加の構造（長さを包含する）、完全な脂肪分解酵素の構造に対するペプチド付加の衝撃、ペプチド付加物のアミノ酸残基の性質又は官能性、等に依存すると現在、思われている。もちろん、所望する効果を提供することができるペプチド付加のための先行必要条件は、ペプチド付加を含む変性された酵素が適切な宿主生物において発現できることである。次の一般的な考慮は、適切なペプチド付加の企画のために適切なものである：

ペプチド付加の長さ：種々の数のアミノ酸残基を含むペプチド付加物が所望する第1の洗浄効果を提供できることが見出されており、本発明に従って使用されるペプチド付加に存在するアミノ酸残基の正確な数を特定することは不可能である。アミノ酸残基の数の上限は、その得られる変性された酵素の発現、構造及び/又は活性に対するペプチド付加の衝撃に基づいて決定されると思われる。ペプチド付加物は、実質的な数のアミノ酸残基を含んで成るが、しかしながら、それらのアミノ酸残基のすべてが所望する第1の洗浄効果に寄与する必要はないと思われる（ペプチド付加が実質的な数のアミノ酸残基を含んでいるとしても、それらの少数のみが、所望する機能を提供するために必要であり、この少数がペプチド付加物の機能的部分と呼ばれる。ペプチド付加のアミノ酸残基の数の下限に関する主な考慮は通常、その数が所望する第1の洗浄効果を提供するのに十分であるべきであることであろう。

従って、ペプチド付加は、単一のアミノ酸残基、又は2～500個のアミノ酸、たとえば1～200個又は2～100個、好ましくは2～50個、たとえば3～50個、さらにより好ましくは7～45個及びさらに一層好ましいことには1～15個、たとえば1～10個又は1～7個、特に4～10個、たとえば4～7個のアミノ酸のアミノ酸鎖を含んで成る。

安定性：ペプチド付加は好ましくは、親酵素の構造安定性を有する変性された脂肪分解酵素を供給するために選択されるべきである。たとえば、構造要素、たとえば $\alpha$ -ヘリックス又は $\beta$ -シートを実質的に形成するペプチド付加は、その得られる変性された酵素を安定化し、そして従って、本発明に使用され得る。そのような構造を形成することができるペプチド配列は当業界において知られている。他方、改良された構造安定性は、本発明の変性された脂肪分解酵素にシステイン架橋の導入により提供され得る。たとえば、ペプチド付加物と酵素の成熟部分との間のシステイン架橋は、ペプチド付加物のアミノ酸残基の少なくとも1つが酵素の成熟部分におけるシステイン残基に対して共有結合を形成することができるよう配置されるシステイン残基である場合に確立され得る。適切なシステインが成熟酵素に存在しない場合、システインが、前記親酵素の適切な位置で、便利には、活性のためには重要でないと思われる親酵素のアミノ酸を置換することによって挿入され得る。

さらに、ペプチド付加物のアミノ酸残基の少なくとも1つが、変性された脂肪分解酵素を発現するために使用される宿主のタンパク質分解酵素によるタンパク質分解変性に対して低い感受性にペプチド付加物をするために選択されることが所望される。たとえば、ペプチド付加物は、1～5個、たとえば1～4個又は1～3個又は2個又は1個のプロリン残基を含んで成る。プロリン残基は好ましくは、タンパク質分解切断部位又はそれに隣接する部位に配置される。他方、ペプチド付加は、たとえばヨーロッパ特許第407225号又はWO 93/11254に記載されるように、変性されたりパーゼに対してプロテアーゼ安定性ループを付与するものであり得る。

ペプチド付加物のアミノ酸残基の性質：上記で言及されたように、及びいづれの理論にも制限されないが、改良された性能は、ペプチド付加により供給される基質に対する変性された脂肪分解酵素の高められた親和性に少なくとも部分的に依存するとと思われる。特に、好ましい静電相互作用が、負に荷電された脂質表面と変性された酵素に存在する正に荷電された及び/又は疎水性アミノ酸残基との間で得られると思われる。従って、本発明の変性された酵素は少なくとも1つの正の電荷、たとえば少なくとも2, 3, 4又はそれ以上

の正の電荷を有するペプチド付加物、又はペプチド付加物の実質的な数のアミノ酸残基が正に荷電され、そして／又は疎水性である異なって発現されたペプチド付加物を含んで成ることが特に好ましい。

同様に、及び親酵素の非構造端における負の電荷を減じるためには、選択された親酵素の非構造 N - 末端又は C - 末端部分から、特に 1 ~ 5 個、たとえば 1 ~ 4 個、又は 1 ~ 3 個、もしくは 1 ~ 2 個の最初又は最後の N - 末端又は C - 末端アミノ酸残基から構成される親リパーゼの部分から、少なくとも 1 つ、たとえば 2 又はそれ以上の負に荷電されたアミノ酸残基を除去することが好ましい。負に荷電されたアミノ酸残基は、除去され得、あるいは中性の、正に荷電された又は疎水性のアミノ酸残基により置換され得る。たとえば、除去されるべき負に荷電されたアミノ酸残基は、正の荷電されたアミノ酸残基 R , K もしくは H、中性のアミノ酸残基 S , T , G もしくは Q、又は疎水性アミノ酸残基 A , I , W , F もしくは L のいずれかにより置換され得る E 又は D であり得る。同様に、親酵素の非構造 N - 末端又は C - 末端部分の中性アミノ酸残基は、上記で定義されたように正の荷電された又は疎水性のアミノ酸残基により置換され得る。

従って、N - 末端及び／又は C - 末端延長の他に、あるいはその代替としての本発明の変性された脂肪分解酵素は、親酵素の非構造 C - 末端及び／又は N - 末端における突然変異を含んで成り、ここで前記突然変異は前記非構造部分の負に荷電されたアミノ酸残基の欠失、あるいは正の荷電されたもしくは中性のアミノ酸残基、又は疎水性アミノ酸残基による置換を包含している。

ペプチド付加が親酵素の N - 及び C - 末端の両者に存在する場合、個々の末端での又はその末端内でのペプチド付加物は同じか又は異なったアミノ酸配列を有することができる。ペプチド付加物の安定性の試験：たとえば上記原理に基づいて企画された、与えられたペプチド付加物を用いる効果が、ペプチド付加物を含む変性された脂肪分解酵素を構成し、そして第 1 の洗浄活性について得られる酵素の性質を、試験することによって、試験され得る。

ペプチド付加は次の手段で一般化され得る：

最初の残基（外側の残基から計数される）は“ a ”と命名され、第 2 の残基は“ b ”と命名され、第 3 の残基は“ c ”と命名される。従って、N - 末端付加の場合、最初のアミノ酸残基は“ a ”と命名され、C - 末端付加の場合、最後のアミノ酸残基は“ a ”と命名される。

本発明の重要な態様において、ペプチド付加物は 1 ~ 7 個のアミノ酸から成る。親酵素の N - 及び／又は C - 末端の両者に適用され得るそのようなペプチド付加は、下記のように言及され得る：

- a（1 個のアミノ酸ペプチド付加）
- a - b（2 個のアミノ酸ペプチド付加）
- a - b - c（3 個のアミノ酸ペプチド付加）
- a - b - c - d（4 個のアミノ酸ペプチド付加）
- a - b - c - d - e（5 個のアミノ酸ペプチド付加）
- a - b - c - d - e - f（6 個のアミノ酸ペプチド付加）
- a - b - c - d - e - f - g（7 個のアミノ酸ペプチド付加）。

個々の文字は次のようなアミノ酸残基を定義する：

a , b , c , d , e , f 及び g は、独立して、次のアミノ酸のいずれかであり得る：アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、プロリン（P）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、メチオニン（M）、グリシン（G）、セリン（S）、トレオニン（T）、システイン（C）、チロシン（Y）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、リシン（K）、アルギニン（R）及びヒスチジン（H）。

特定の態様においては、a , b , c , d , e , f 及び g は独立して、次のアミノ酸の 1 つである：

- a: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Ser, Arg, Cys, 又は Lys,
- b: Leu, Ile, Val, Trp, Phe Ser, Pro, Arg, Lys, Cys 又は His,
- c: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Ser, Pro, Arg, Cys, 又は Lys.
- d: Leu, Ile, Val, Trp, Phe Ser, Pro, Arg, Cys, 又は Lys.
- e: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Ala, Glu, Cys, 又は Asp,
- f: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Ala, Glu, Cys, 又は Asp,
- g: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Cys, 又は Met.

10

好ましい態様において、a, b, c, d, e, f 又は g のうち少なくとも 1 個、たとえば 1, 2, 3 又は 4 個が正に荷電されたアミノ酸、すなわち Arg (R)、又は Lys (K)、又は疎水性アミノ酸、すなわち Leu, Ile, Val, Trp 又は Phe である。

上記で言及されたように、及び選択される宿主細胞に依存して、ペプチド付加物は、選択される宿主細胞による酵素のプロセッシングの間、タンパク質分解性の分解に対して変性された脂肪分解酵素を保護するために少なくとも 1 つのプロリン残基を含むことが重要であると一般的に思われる。プロリン残基は、ペプチド付加の位置 2 (すなわち、b) 及び / 又は 3 (すなわち、c)、又は所望する切断点 (すなわち、注目の宿主細胞によるプロセッシングが生じると思われる点) に隣接する位置を占有することが所望される。従って、1 つの態様においては、ペプチド付加物の b 及び任意には、c は Pro である。

20

本発明の他の態様においては、a - b は SP (Ser-Pro), A - P 又は Q - P である。ペプチド付加が複数のアミノ酸残基、たとえば 4 ~ 7 個のアミノ酸を含む場合、そのペプチド付加物は一般式 SPcd, SPcde, SPcdef, SPcdefg 又は APcd, APcde, APcdef, APcdefg、又は QPcd, QPcde, OPcdef 又は QPcdefg を有する。それらの個々の式において、c, d, e, f 及び g はいずれかのアミノ酸であり得る。しかしながら、上記アミノ酸のグループが好ましい。

他の態様においては、a - b は、少なくとも 1 つの正のアミノ酸 (すなわち Arg 及び Lys)、又は疎水性アミノ酸残基 (すなわち、Leu, Ile, Val, Trp 及び Phe) を含んで成る。

特に、親脂肪分解酵素に適用されるペプチド付加は、好都合には、次のアミノ酸残基又はペプチドの 1 つであり得る：

30

Arg (R)、又は Lys (K)、又は Leu (L)、又は Ile (I)、又は Val (V)、又は Trp (W)、又は Phe (F)、又は

Arg-Pro (RP), 又は  
Lys-Lys (KK), 又は  
Arg-Lys (RK), 又は  
Lys-Arg (KR), 又は  
Arg-Arg (RR), 又は  
Arg-Arg-Pro (RRP), 又は  
Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp (RPVSQD)

10

Ser-Pro-Ile-Arg-Met (SPIRM), 又は  
Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg (SPIRAR), 又は  
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg (SPIRPR) 又は  
Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg (SPIRER), 又は  
Ser-Pro-Ile-Arg-Lys (SPIRK), 又は  
Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SPIKK), 又は  
Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro (SPIRRP), 又は  
Ser-Pro-Pro-Arg-Arg (SPPRR), 又は  
Ser-Pro-Iso-Pro-Arg (SPIPR), 又は  
Ser-Pro-Arg-Pro-Arg (SPRPR), 又は

20



Ser-Pro-Ile-Arg (SPIR), 又は  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Arg (SPIRR), 又は  
 Ser-Cys-ile-Arg-Arg, (SCIRR), 又は  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SPIRPRP), 又は  
 Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SCPIRPRP), 又は  
 Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr (SPRRPRT), 又は  
 Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu (SPFRPKL), 又は 10  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro (SPPRRP), 又は  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu (SPIRRE), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro (SPPRPP), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg (SPPRPR), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro (SPPWWP), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro (SPPWRP), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro (SPPRWP), 又は 20  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro (SPPRWP), 又は  
 Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp (SHWRRW), 又は  
 Ser-His-Trp-Arg-Lys (SHWRK), 又は  
 Ser-His-Trp-Arg-Arg (SHWRR), 又は  
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK),  
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP),  
 Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (GPIRPRP), 又は 30  
 Leu-Pro-Phe-Arg-Gln-Arg-Pro (LPFRQRP), 又は  
 Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asn-Ala (SRSRHNA), 又は  
 Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg (IPIRPRR), 又は  
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP), 又は  
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK), 又は  
 Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-Arg (WRWRWR), 又は  
 Gln-Pro-Ile-Arg-Arg (QPIRR), 又は 40  
 Ser-His-Trp-Gln-Gln (SHWQQ), 又は  
 Ser-Ala-Leu-Arg-Pro-Arg-Lys (SALRPRK).

また本発明によれば、7 個以上のアミノ酸、たとえば 8 ~ 15 個のアミノ酸を含んで成る付加物も企画される。

そのようなペプチドは次のように一般化され得る。

a-b-c-d-e-f-g-h (8個のアミノ酸ペプチド)  
a-b-c-d-e-f-g-h-i (9個のアミノ酸ペプチド)  
a-b-c-d-e-f-g-h-i-j (10個のアミノ酸ペプチド)  
a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k (11個のアミノ酸ペプチド)  
a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l (12個のアミノ酸ペプチド)  
a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m (13個のアミノ酸ペプチド)  
a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n (14個のアミノ酸ペプチド)  
a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n-o (15個のアミノ酸ペプチド)。

10

a ~ o は、前記20個のアミノ酸のいずれかであり得る。

a ~ g ストレッチは、1 ~ 7 個のアミノ酸残基を含んで成るペプチド付加物に関して上記で定義された通りであり得る。

h , i , j , k , l , m , n , o は、上記のいずれかのアミノ酸であり得、好ましくは、次のアミノ酸のいずれかであり得る：Arg , Lys , Ala , Val , Trp , Ile , Phe , Ser 又はPro

。

そのような付加物の特定の例は、下記に列挙される：

Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (RPRPRPRP), 又は  
 Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SSTRASPIKK), 又は  
 Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (AWWPSPIRPRP), 又は  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP), 又は  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS), 又は  
 Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro (SPKRKPRP), 又は  
 Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys (SQRIKQRIK), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPPRPRP), 又は  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg SPIRPRPRPR, 又は  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro (SPIRKAWWP), 又は  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro (APPPKASPRQRP), 又は  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg (SPIRPRPSPIRPRP), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg (SPPRWPRR), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPRWPRW), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPRWPRW), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg (SPPWRPRR), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPWWPRW), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg (SPPWWPRW), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp (SPPWWPWW), 又は  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPWPRPRP), 又は  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser (APPPRPRLLPIS), 又は  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro (APPPTRQRQSP), 又は  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro (APPPRTIPRSP).

位置“a”がSer, Ala, Arg, Lys又はProである上記特定されたペプチド付加物(1~7個又は1~15個のアミノ酸残基を含んで成る)のいずれかにおいては、SerはAla, Arg, Lys又はProにより、AlaはSer, Arg, Lys又はProにより、そしてArg, Lys又はProはAla又はSerにより置換され得る。

上記ペプチド付加は、N-末端及び/又はC-末端のいずれかで存在できることが強調されるべきである。N-及びC-末端ペプチド付加の両者を有する変性された脂肪分解酵素の例は、上記で特定されたペプチド付加のすべての組合せを包含する。そのような2つの特定の例は、N-末端付加物SPIRPRP、及びC-末端付加物RRP又はRRである。

上記に特定されたペプチド付加の他に、適切なペプチド付加物は、問題の親脂肪分解酵素に通常関連する完全なプロペプチド配列の一部から単に構成され、又はその一部を含んで成ることが見出された。従って、たとえば、第1の洗浄H.ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体に関しては、適切なペプチド付加は、SPIRR、すなわちH.ラヌギノサ脂肪分解酵素配列の通常のプロペプチド配列の一部を含んで成り、又はその一部から構成され得る。

ペプチド付加物が親酵素の非構造部分中に挿入される場合、それは前記非構造部分の1又は複数のアミノ酸残基を置換することができる。たとえば、ペプチド付加は、最初の、たとえばN-末端の1~5個のアミノ酸残基、及び/又は最後の、たとえば酵素の1~5個のアミノ酸(すなわち、C-末端の1~5個のアミノ酸)を占有する1又は複数のアミノ酸残基を置換することができる。たとえば、ペプチド付加は、親酵素のいずれかの端から

、アミノ酸残基 1、及び／又は 2、及び／又は 3、及び／又は 4、及び／又は 5、等を置換することができる。親酵素がその構造的成熟部分におけるアミノ酸変性を含んで成る H・ラヌギノサ・リパーゼの変異体である場合、欠失と、上記ペプチド付加（N - 末端に適用される）のいずれかとを組合すことが特に興味の対象であった。

親脂肪分解酵素へのペプチド付加の適用の方法

本発明の第 1 の洗浄脂肪分解酵素は、合成的に生成されたペプチド付加物を注目の親脂肪分解酵素中に添加（融合又は挿入）することによって得られるが、本発明の変性された酵素は、i）親酵素の N - 及び／又は C - 末端に適用される所望のペプチド付加をコードするよう、親酵素をコードするヌクレオチド配列、好ましくは DNA 配列を変性し（たとえば、親酵素をコードする核酸（好ましくは DNA）配列における適切な位置で、ペプチド付加物をコードする核酸（好ましくは DNA）配列を挿入することによって）、ii）得られる変性された核酸（好ましくは DNA）配列を適切な発現系において発現し、そして iii）その得られる変性された酵素を回収することによって調製される。

10

本発明において、用語“適用される”とは、付加物が成熟酵素の N - 及び／又は C - 末端に（たとえば最初又は最後のアミノ酸残基に）融合されるか又は成熟酵素の N - 末端及び／又は C - 末端の非構造部分中に挿入されることを示すことを意図する。

多くの酵素は、“プレプロ - 酵素”として、すなわち成熟酵素、分泌シグナルペプチド（すなわちプレペプチド）及びプロ - ペプチドから成る酵素として発現される。プレプロ - 酵素は発酵培地中に分泌されるよう細胞内でプロセスされ、これから成熟酵素が単離され、そして／又は精製され得る。親酵素へのペプチドの付加は、所望するペプチド付加物をコードする核酸配列を、親酵素をコードする DNA 配列の上流（N - 末端ペプチド付加のためには）及び／又は下流（C - 末端ペプチド付加のためには）に適用することによって実施され得る。

20

前記挿入は、所望の変性された酵素（すなわち、所望するペプチド付加物を有する）が、その酵素の転写、翻訳及びプロセッシングの後、発現されそして分泌されるような態様で実施されるべきである。用語“プロセッシング”とは、プレ - 及びプロ - ペプチドの除去を意味する（但し、もちろん、プロ - ペプチドが所望するペプチド付加物と同一である場合は除く）。これは下記にさらに示されるであろう。

下流の配列（C - 末端付加物をコードする）は、親酵素をコードする DNA 配列と停止コドンとの間に挿入され得る。しかしながら、プロセッシングされていない DNA 配列が C - 末端でプロ - ペプチドをコードする DNA を含んで成る場合、ペプチド付加物をコードする DNA 配列の挿入／付加はまた、それぞれ、プロ - ペプチドをコードする DNA 配列と成熟酵素をコードする DNA との間で生じ得る。

30

ほとんどの場合、ペプチドをコードする DNA 配列を、プロ - ペプチド又はプレ - ペプチド（プロ配列が存在しない場合）をコードする DNA 配列と、成熟酵素をコードする DNA 配列との間に挿入することによって、親酵素を上流に延長することが可能である。

もちろん、問題のペプチド付加をコードする DNA 配列は、本発明の第 1 の洗浄脂肪分解酵素の生成のために意図された発現系のコドン対照と適合するよう選択されるであろう。ペプチド付加をコードする DNA 配列の挿入／付加は、分子生物の分野における当業者により知られているいくつかの標準的技法により実施され得る（たとえば、Sambrook など、1989 を参照のこと）。これは、たとえばアメリカ特許第 4,683,202 号又は R.K. Saiki など、（1988）、Science, 239, 487-491 に記載される、特定のプライマーを用いてのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を包含する。隣接する DNA 配列の発現及び分泌をいかにして提供するかは、下記に記載されるであろう。

40

本発明に関して、いくつかの宿主細胞は、ペプチド付加物の一部又はすべてが宿主細胞により行なわれる翻訳後プロセッシング又は他のプロセッシングの間に切断され得ることに、ペプチド付加物を含んで成る第 1 の洗浄脂肪分解酵素の生成のためにほとんど適切でないことが見出された。従って、用語“適切な発現系”とは、ペプチド付加物を含んで成る、損なわれていない所望の第 1 の洗浄脂肪分解酵素の少なくとも一部の生成を可能にする発現系（宿主細胞及び任意には、発現ベクター）、すなわち選択された宿主細胞に

50

よる翻訳後プロセッシング又は他のプロセッシングの一部として、ペプチド付加物の一部又はすべてを除去しない（そして、それにより、所望するペプチド付加物なしでは酵素を生成しない）発現系を示すこと意図する。前記とは異なって発現される場合、発現系（宿主細胞、培養条件及び／又は回収条件を包含する）は、好ましくは、脂肪分解酵素のプレ、プロ又はプレプロ - 形の部分プロセッシングが生じ、生成された酵素分子の少なくとも5%、たとえば少なくとも10%、たとえば少なくとも15%、たとえば少なくとも20%、たとえば少なくとも25%、たとえば少なくとも50%、たとえば少なくとも75%が所望するペプチド付加、たとえば完全なプロ配列又は実質的にその一部を含んで成ることをもたらすよう選択される。典型的には、使用される発現系は、所望しない翻訳後プロセッシングを発揮する1又は複数のタンパク質分解活性を欠いているか又は減じられる。発現系及び従って、宿主細胞の選択は、下記で詳細に論ぜられるように、生成される脂肪分解酵素に依存するであろう。そのN - 及び／又はC - 末端でペプチド付加を含んで成る本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素を生成するために適切な発現系を選択することに注意が払われるべきであるが（特に、変性されたDNA配列がその生成のために使用される場合）、前記ペプチド付加物が注目の親脂肪分解酵素に通常関連するプロペプチド又はその一部である場合、前記ペプチド付加（従って、完全なプロペプチド配列又はその一部を構成する）は、通常の態様で、翻訳されたポリペプチドをプロセッシングすることができず、そしてそれにより、そのプロセッシングすることができず、そしてそれより、そのプロセッシングの前、完全なポリペプチド又はその一部、又は成熟タンパク質に関連する類似するペプチド配列を含んで成る酵素の生成をもたらす発現システムにおいて、問題の親脂肪分解酵素をコードするDNA配列を発現することによって適用され得ることが見出された。この場合、プロペプチド又は類似するペプチド配列が、ペプチド付加物を構成する。そのプロ - ペプチド又は類似するペプチド配列は、親酵素に対して非相同（heterologous）又は相同（homologous）であり、そして親酵素のN - 及びC - 末端の両者に存在することができる。

従って、アミノ酸の適切な延長が親酵素のプレプロ形においてすでにコードされ、そしてこのアミノ酸の延長が与えられた発現系による酵素のプロセッシングにおいて切断される場合、ペプチド付加物は、前記アミノ酸の延長の前記プロセッシングが生じないか又は翻訳後プロセッシングを排除するようその遺伝子配列を変性するシステムに前記発現宿主システムを変えることによって、たとえばプロ - 様ペプチド（たとえば本明細書に示されるペプチド付加物の1つ）の1又は複数のコピーにより前記プロセッシング酵素を飽和することによって、又は後 - 翻訳プロセッシング部位を除去するようプロ - ペプチド配列を変えることによって適用され得る。そのような場合、分泌シグナルプレ - ペプチドが分泌の間又はその後に切断され、プロ - ペプチドもしくはその一部、又はその対応するDNA配列によりコードされる類似するペプチド配列を含んで成る、親酵素から成る変性された酵素、すなわちそのN - 末端又はC - 末端のいずれかで拡張された脂肪分解酵素をもたらす。換言すれば、ペプチド付加物を含んで成る、本発明の第1洗浄脂肪分解酵素は：

その（プレ）プロ配列を包含する親脂肪分解酵素をコードするDNA配列により形質転換された宿主細胞を、完全なプロ（プレ） - 配列の少なくとも一部を含んで成る酵素の生成のために適切な条件下で培養し、前記宿主細胞は、成熟酵素への発現のためにプロ - 酵素をプロセッシングすることができないか又はそのプロセッシングにおいて役に立たない宿主であり、そして

得られる変性された酵素を回収し、そして任意には精製することを含んで成る方法により企画され得、そして／又はその方法により生成され得る。親脂肪分解酵素をコードするDNA配列は、宿主細胞を形質転換する場合、発現ベクター上に存在することができる。

宿主細胞は、親酵素とは異なった起源のもの、たとえば親酵素が由来する属以外の他の属のものであり得、又は親酵素の源以外の他の翻訳後プロセッシング機構を有することができる。酵母細胞は、糸状菌細胞に比較して酵母細胞の異なったプロセッシングシステムのために、親糸状菌脂肪分解酵素、特にH. ラヌギノサ脂肪分解酵素にペプチド付加（プロペプチド又はその一部の形での）を適用するために特に有用であることが見出された。前記目的のための適切な酵母細胞の例は、サッカロミセス sp. 特にサッカロミセス・セレビ

10

20

30

40

50

シアエの株、又はハンセヌラsp. (*Hansnula* sp.) の株に由来する細胞である。

他の及びひじょうに好ましい態様においては、ペプチド付加物を含んで成る本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、次の段階：

a) ペプチド付加物を有する親脂肪分解酵素をコードするDNA配列を、前記ペプチド付加物における、又は前記親酵素のC - 末端又はN - 末端の非構造部分における局在化されたランダム突然変異誘発にゆだね、

b) 段階a) で得られた突然変異誘発されたDNA配列を宿主細胞において発現し、

c) 親脂肪分解酵素に比較して、改良された性能を有する突然変異誘発された脂肪分解酵素を発現する宿主細胞をスクリーンし、

d) 12500LU / 1 洗剤で洗剤組成物A及び/又はBに存在する場合、本明細書に開示されるような1サイクル洗浄アッセイにおいて、前記酵素を有さない同じ洗剤組成物よりも、ラード染色された布ぎれから少なくとも15%高くラードを除去することができる突然変異誘発された脂肪分解酵素を、段階c) に起因するものから選択することを含んで成る方法により企画され、そして/又は生成される。

このアプローチにより、異なったペプチド付加物を有する、多くのひじょうに好都合な第1の洗浄脂肪分解酵素が創造された。突然変異誘発されるべきDNA配列上に存在するペプチド付加物は、親脂肪分解酵素に通常関係するプロ配列又はその一部により構成され、又はそれを含んで成ることができ、又はいずれか他のペプチド付加物、たとえば上記で例示されたペプチド付加物の1つであり得る。段階a) ~ d) の個々は、“ランダム突然変異誘発”及び“局在化されたランダム突然変異誘発”と称する下記のセクションに記載されているようにして実施され得る。

#### 親脂肪分解酵素

本発明に従って変性されるべき親脂肪分解酵素は、いづれの起源のものでもあり得る。従って、酵素は、哺乳類、植物、脊椎動物又はいずれか他の起源のものであり得る。しかしながら、前記酵素は、多くの微生物株が洗剤目的のための特定の使用の酵素を生成することが見出されているので、微生物起源のものであることが現在、好ましい。

より特定には、親脂肪分解酵素は、菌類、すなわち酵母又は糸状菌に由来することができる。たとえば、前記酵素は、プレクトマイセラス (*Plectomycetes*) の綱、好ましくはユーロチアレス (*Eurotiales*) の目及びより好ましくはエレマスカセアエ (*Eremascaceae*)、モノアスカセアエ (*Monoascaceae*)、プソイゾエウロチアセアエ (*Pseudoeurotiaceae*) 及びトリココマカアエ (*Trichocomaceae*) のような科の糸状菌に由来し、後者は、エメリセラ (*Emericella*)、アスペルギラス (*Aspergillus*)、ペニシリアム (*Penicillium*)、ユーベニシリアム (*Eupenicillium*)、パエシロマイセス (*Paecilomyces*)、タラロマイセス (*Talaromyces*)、サーモアスカス (*Thermosus*) 及びスクレロクレイスタ (*Sclerocleista*) のような属を包含する。より特定には、前記親酵素は次の微生物に由来できるものであり得る：ヒュミコラsp.の株、たとえばH. ブレビスポラ (*H. brevispora*)、H. ラヌギノサ、H. ブレビスvar.サーモイデア (*H. brevisvar. thermoidea*) 及びH. インソレンス (*H. insulens*) (アメリカ特許第4,810,414号)；リゾムコルsp. 株、たとえばRh. ミエヘイ (ヨーロッパ特許第238023号；リゾパスsp. の株、たとえばR. デルマル (*Hass*など., (1991), *Gene* 109, 107-113)、R. ニベウス (*Kugimiya*など., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem* 56, 716-719) 又はR. オリザエ；ガンジダsp. の株、たとえばC. シリンドラセア (*C. cylindraces*) (また、C. ルゴサ (*C. rugosa*) と呼ばれる)、又はC. アンタルクチカ (WO 88 / 02775) 又はC. アンタルクチカ・リパーゼA 又はB (ヨーロッパ特許第214761号)；フサリウムsp. の株、たとえばF. オキシスポラム (*F. oxysporum*) (ヨーロッパ特許第130,064号) 又はF. ソラニ・ピシ (WO 90 / 0944 6) 又はそれらの変異体 (WO 94 / 14964)、又はF. ソラニ・ピシ (GB2296011)、ベンチュリア spp (*Venturia* spp.) の株、たとえばV. イナエクアリス (*V. inaequalis*)、コレトトリカム spp. (*Colletotrichum* spp.) の株、たとえばC. グロエオスポリオイデス (*C. gloeosporioides*) 又はC. ラグナリウム (*C. lagenarium*)、ゼオトリカム (*Geotricum*) の株、たとえばG. カンジダム (*G. candidam*) (*Schimada*など., (1989) *J. Bioc*

10

20

30

40

50

hem., 106, 383-388)、アスペルギラス (*Aspergillus*) の株、たとえば *A. niger*)、又はアスペルギラス sp. 脂肪分解酵素変異体 (ヨーロッパ特許第167,309号)、又はペニシリアム spp. (*Penicillium* spp.) の株、たとえば *P. spinulosum*) 又は *P. camembertii* (*P. camembertii*) (Yamaguchi など., (1991), Gene 103, 61-67)。

本発明において、“由来できる”とは、問題の生物の株により生成される酵母を示すのみならず、またそのような株から単離されたDNA配列によりコードされ、そして前記DNA配列により形質転換された宿主生物において生成される酵素も示すことを意図する。さらに、その用語は、合成及び/又はcDNA起源のDNA配列によりコードされ、そして問題の酵素と同一の特徴を有する酵素を示すためにも意図される。最終的には、前記用語は、天然に存在する酵素に比較して、1又は複数の突然変異を担持する酵素の変異体、又は他の菌株又は生物により生成される天然に存在する酵素であり得、前記酵素のいずれかのアミノ酸又はDNA配列に基づいて調製されたオリゴヌクレオチドプローブに対するハイブリダイゼーションにより単離され得 (前記ハイブリダイゼーション条件は、5 × SSCにおける予備ソーキング及び20%ホルムアミド、5 × Donhardt 溶液、50mMのリン酸ナトリウム、pH6.8、及び50 gの音波処理された変性ウシ胸腺DNAの溶液における40 °Cでの1時間の予備ハイブリダイゼーション、続く、100mMのATPにより補充された同じ溶液における40 °Cでの18時間のハイブリダイゼーション、又はSambrook など., 1989により記載される他の方法を包含する)、又は前記酵素と免疫学的に交差する (たとえば、Hudson など., 1989の方法により決定されるような) 相同の酵素を包含することを意図する。

親脂肪分解酵素として特に興味あるものは、*H. ラヌギノサ*の株、たとえば *H. ラヌギノサ*株 DSM4109に由来できるもの、たとえばヨーロッパ特許第305216号に記載される酵素の成熟形、又は WO 92/05249, WO 94/01541, WO 94/14951, WO 94/25577, PCT/DK94/00079 (すべては、Novo Nordisk A/Sからのものである; それらは引用により本明細書に組込まれる)に記載されるようなそれらの変異体である。

本出願を通して、名称ヒュミコラ・ラヌギノサは、1つの好ましい親酵素、すなわち上記で言及された酵素を同定するために使用されて来た。しかしながら、最近では、*H. ラヌギノサ*はまた、サーモマイセス・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) に対する形態学的且つ生理学的類似性を示すので、サーモマイセス・ラヌギノサス (1989年、Tsiklinskyにより最初に紹介された種) としても呼ばれて来た。従って、*H. ラヌギノサ*を言及する場合いつでも、この用語は、サーモマイセス・ラヌギノサスにより置換され得ることが理解されるであろう。サーモマイセス・ラヌギノサス (又は *H. ラヌギノサ*) からの18 S リボソーム遺伝子の一部をコードするDNAが配列決定されている。その得られる18 S 配列が、GenBank データバンクにおける他の18 S 配列と比較され、そして極度の俟約を用いての系統発生分析 (PAUP, Version 3.1.1, Smithsonian Institution, 1993) がまた行なわれた。これはサーモマイセス・ラヌギノサスを、プレクトマイセチスの綱、たぶんユーロチアレスの目に明確に割り当てる。NCBI (National Center for Biotechnology Information) でのEntrez Browserによれば、これはサーモマイセ・ラヌギノサスを、エレマスカセアエ、チノアスカセアエ、プソイドエウロチアセアエ及びトリココマセアエのような科に関連づけており、後者は、エメリセラ (*Emericella*)、アスペルギラス (*Aspergillus*)、ペニシリアム (*Penicillium*)、ユーペニシリアム (*Eupenicillium*)、パエシロマイセス (*Paecilomyces*)、タラロマイセス (*Talaromyces*)、サーモアスカス (*Thermoascus*) 及びスクレロクレイスタ (*Sclerocleista*) のような属を包含する。

本発明に従って変性されるべき親脂肪分解酵素は、細菌に由来できる。たとえば、親脂肪分解酵素をコードするDNA配列は、シュードモナス spp. の株、たとえば *Ps. セパシア*、*Ps. アルカリゲネス*、*Ps. シュードアルカリゲネス*、*Ps. メンドシナ* (また、*Ps. プチダ*とも称する)、*Ps. ジクンガエ*、*Ps. アエロギノサ*、*Ps. ウィスコンシネンシス* (WO 96/12012) 又は *Ps. フラジ*、*Ps. バシルス* spp. の株、たとえば *B. サブチリス*、又はストレプトミセスの株、たとえば *S. スカビエス*に由来することができる。

シュードモナス sp. リパーゼに関しては、次の生物からのリパーゼが、高い程度の相同性

、たとえば少なくとも60%の相同性、少なくとも80%の相同性、又は少なくとも90%の相同性を有し、そして従って、リパーゼの同じ科に属すると思われることが見出された：Ps. ATCC21808, Liposam<sup>®</sup> として市販されているシュードモナスsp. リパーゼ、Ps. アエルギノサEF2、Ps. アエルギノサPACIR, Ps. アエルギノサPA01、Ps. アエルギノサTE3285、Ps. sp. 109、Ps. シュードアルカリゲネス M1、Ps. グルマエ、Ps. セパシアDSM3959、Ps. セパシアM-12-33、Ps. sp. KWI-56、Ps. プチダIF03458、Ps. プチダIF012049 (Gilbert, E.J., (1993), Pseudomonas lipase: Biochemical properties and molecular cloning. Enzyme Microb. Technol., 15, 634-645)。シュードモナス・セパシア種は最近、ブルクホルデリア・セパシア (Burkholderia cepacia) として再分類されているが、しかし本出願においては、Ps. セパシアと称する。

10

その特定の例は、シュードモナス脂肪分解酵素、たとえばPs. フラジ、Ps. スツツゼリ (P. stutzeri)、Ps. セパシア及びPs. フルオレセンス (WO 89/04361)、又はPs. プランタリ (Ps. plantarii) 又はPs. グラジオリ (Ps. gladioli) (アメリカ特許第4,950,417号) 又はPs. アルカリゲネス及びPs. シュードアルカリゲネス (ヨーロッパ特許第218272号、ヨーロッパ特許第331376号) 又はWO 94/25578 (突然変異M21S、M21L又はM21AによるPs. シュードアルカリゲネス脂肪分解酵素の変異体を開示する)、ヨーロッパ特許第407225号に開示されるシュードモナスsp. 変異体、又はシュードモナスsp. の脂肪分解酵素、たとえばWO 88/09367及びアメリカ特許第5,389,536号に記載されるPs. メンドシナ脂肪分解酵素又はアメリカ特許第5,352,594号に記載されるようなその変異体を包含する。

20

他の特定の例は、バシルス脂肪分解酵素、たとえばB. スプチリス (Dartoisなど., (1993) Biochemica et Biophysica acta 1131,253-260) 又はB. ステアロサーモフィラス (B. stearothermophilus) (JP64/7744992) 又はB. プミラス (B. pumilus) (WO 91/16422) からの脂肪分解酵素、及びクロモバクテリウム (Chromobacterium) 脂肪分解酵素 (特に、C. ビスコサム (C. viscosum) に由来する酵素) を包含する。

本発明の親脂肪分解酵素として作用することができる容易に入手できる市販の脂肪分解酵素の特定の例は、Lipolase<sup>®</sup>, Lipolase<sup>®</sup> Ultra (Novo Nordisk A/Sから入手できる) を包含する。

本発明に従って変性できるように特別に企画された他の酵素の例は、次のものである：Lumafast<sup>®</sup>、すなわちPs. メンドシナ脂肪分解酵素、及びLipomax<sup>®</sup>、すなわちPs. アルカリゲネス脂肪分解酵素、Unileverからのフサリウム・ソラニ・リパーゼ (クチナーゼ)、Solvay酵素からのバシラスsp. リパーゼ (アメリカ特許第5427936号、ヨーロッパ特許第528828号)；及びLiposam<sup>®</sup> (Showa DenkoからのPs. メンドシナ・リパーゼ)、及び配列決定され、そして配列番号99に示されるアミノ酸配列を有することが見出されているWO 95/06720に記載されるシュードモナスsp. リパーゼ。

30

本発明に従って変性されるべき親脂肪分解酵素は、上記の脂肪分解酵素のいずれか、及びそのいずれかの変異体、変性体、又は切断体であり得る。特別に企画されたそのような親酵素の例は、WO 92/05249, WO 94/01541, WO 94/14951, WO 94/25577, WO 95/22615に記載される酵素、及びヨーロッパ特許407225号に記載されるようなタンパク質構築されたリパーゼ変異体；アメリカ特許第5,352,594号に記載されるようなタンパク質構築されたPs. メンドシナ・リパーゼ；WO 94/14964に記載されるようなクチナーゼ変異体；ヨーロッパ特許第167,309号に記載されるようなアスペルギラス脂肪分解酵素の変異体；及びWO 95/06720に記載されるシュードモナスsp. リパーゼを包含する。

40

特定の第1の洗浄H. ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体

容易に参照するために、本発明の特定の変異体が次の命名法の使用により記載される：元のアミノ酸：位置：置換されるアミノ酸。

この命名法によれば、位置96でのバリンによるアスパラギン酸の置換は次のように示される：

Asp 96 Val、又はD96V

同じ位置でのアスパラギン酸の欠失は次のように示される：

50



Asp 96<sup>\*</sup>、又は D 96<sup>\*</sup>

そして、追加のアミノ酸残基、たとえばリシンの挿入は次ように示される：

Asp 96 Val Lys、又は D 96VK

複数の突然変異は、次のようにプラス（＋）により分離され：

Asp 96 Val + Glu 87 Lys、又は D 96 V + E 87 K、

ここで前記突然変異は、それぞれ位置96及び87でのバリン及びリシンによるアスパラギン酸及びグルタミン酸の置換を示す。

1 又は複数の交互のアミノ酸残基が一定の位置に挿入され得る場合、それは次のように示される：

D 96 V , N、又は D 96 V 又は D 96 N。

10

さらに、変性のために適切な位置が、いづれの特定の変性も示唆されないで、同定される場合、いづれかのアミノ酸残基がその位置に存在するアミノ酸残基と置換され得ることが理解されるべきである。従って、たとえば、位置96でのアスパラギン酸の変性が言及されているが、しかし特定されていない場合、アスパラギン酸は欠失され得るか、又はいづれか他のアミノ酸、すなわち R , N , A , C , Q , E , G , H , I , L , K , M , F , P , S , T , W , Y , V のいづれか 1 つにより、又はその位置で挿入される追加のアミノ酸残基により置換され得ることが理解されるべきである。

最終的に、親 H . ラヌギノサ脂肪分解酵素の突然変異が同定される場合、H . ラヌギノサ酵素の構造又はアミノ酸配列と整合され得るそれらの配列と実質的に同じ構造を有する脂肪分解酵素（たとえば、本明細書に言及されるリゾパス・オリザエ、リゾムコル・ミエヘイ、アブシジア sp. 及びペニシリアム・カメムベルチの脂肪分解酵素）における相同位置を占めるアミノ酸残基の突然変異を包含することが理解されるべきである。前記相同位置は、前記構造間の比較により容易に同定され得る。

20

H . ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体は、良好な洗浄性能、又は上記のような他の興味ある性質を有することが個々に見出されているか又は示されている少なくとも 2 種の異なった親変異体の組合せであることにより特徴づけられる。良好な洗浄性能は、たとえば例 6 に記載のようにして決定され得る。親変異体間の組合せは、ランダムか又は特異的であり得る。本発明に関して、特に興味ある結果が、組合せられるべき親変異体が少なくとも 1 つの、但し好ましくは複数の次の位置：

1, 2, 3, 4, 5, 19, 49, 53, 56, 57, 59, 62, 83, 85, 90, 94, 96, 97, 99,

30

101, 102, 111, 116, 126, 127, 137, 167, 170, 181, 187, 210, 221, 225, 234, 239, 249, 252

256, 263, 264, 267

で、突然変異、たとえば少なくとも 1 つ又は好ましくは複数の次の突然変異を含む場合に得られることが見出された

E1K, E1S, V2G, S3T, Q4P, D5E, A19T, A49P , Y53C, E56K, D57G, G59V, D62R, S83T, S85F, I90F, N94K, F95L, D96A, D96H, D96L, L97M, E99K, N101S, D102Y, D111N, S116P, Q126R, K127C, D137G, D167G, S170P, F181L, V187A, E210K, E210V, W221L, W221A, G225P, D234R, D234Y, E239C, Q249R, I252L, P256T, G263A, L264Q, T267R.

40

上記突然変異又は突然変異される位置は、同じ親脂肪分解酵素上に存在するが、しかし好ましくは、組合せられるべき種々の異なった親脂肪分解酵素上に存在することができることが理解されるであろう。

特に、本発明の第 1 の洗浄 H . ラヌギノサ脂肪分解酵素は、次の親 H . ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体又はそれらの変異体の一部の少なくとも 2 種の組合せであり得ることが見出された：

- (a) E56R+D57L+I90F+D96L+E99K
- (b) E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
- (c) D57G+N94K+D96L+L97M
- (d) E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
- (e) E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I
- (f) E210K
- (g) S83T+N94K+D96N 10
- (h) E87K+D96V
- (i) N94K+D96A
- (j) E87K+G91A+D96A
- (k) D167G+E210V
- (l) S83T+G91A+Q249R
- (m) E87K+G91A
- (n) S83T+E87K+G91A+N94K+D96N+D111N 20
- (o) N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
- (p) L67P+I76V+S83T+E87N+I90N+G91A+D96A+K98R
- (q) S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
- (s) S85P+E87K+G91A+D96L+L97V
- (t) E87K+I90N+G91A+N94S+D96N+I100T
- (u) I34V+S54P+F80L+S85T+D96G+R108W+G109V+D111G+S116P+L124S+  
V132M+V140Q+V141A+F142S+H145R+N162T+I166V+F181P+F183S+R205G+A 30  
243T+D254G+F262L,
- (v) N94K, D96A, Q249R,
- (w) E87K, G91A, D96W, D102N

異なった親変異体を組合すための適切な方法は、“脂肪分解酵素をコードするDNA配列の組合せ”と称する下記のセクションに記載されている。特に適切な方法は、本明細書の材料及び方法のセクションに記載される方法である。もう1つの態様においては、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、少なくとも1つの、但し好ましくは複数の次の位置：

1, 2, 3, 4, 5, 19, 49, 53, 56, 57, 59, 62, 83, 85, 90, 94, 96, 97, 99, 101, 102, 111, 116, 126, 40  
127, 137, 167, 170, 181, 187, 210, 221, 225, 234, 239, 249, 252, 256, 263, 264, 267

で、少なくとも1つの、又は好ましくは複数の次の突然変異：

E1K, E1S, V2G, S3T, Q4P,  
D5E, A19T, A49P, Y53C, E56K, D57G, G59V, D62R, S83T, S85F, I90F, N94K, F95L,  
D96A, D96H, D96L, L97M, E99K, N101S, D102Y, D111N, S116P, Q126R, K127C,  
D137G, D167G, S170P, F181L, V187A, E210K, E210V, W221L, W221A, G225P,  
D234R, D234Y, E239C, Q249R, I252L, P256T, G263A, L264Q, T267R 50

を含んで成る、H．ラヌギノサ脂肪分解酵素の変異体である（そのアミノ酸配列は、配列番号 1 に示される）。最とも特定の態様においては、本発明の第 1 の洗浄脂肪分解酵素は、次のアミノ酸残基の少なくとも 1 つが他のアミノ酸残基により置換されている、H．ラヌギノサ脂肪分解酵素の変異体である（そのアミノ酸配列は配列番号 1 に示される）：A 49, G 59, S 85, I 90, S 116, Q 126, D 137, S 170 又は W 221。

上記固定されたアミノ酸残基は、いずれか他の 19 の可能なアミノ酸残基により置換され得るが、好ましくは、そのアミノ酸残基は、次の通りに：A 49 P, G 59 V, S 85 F, I 90 F, S 116 P, Q 126 R, D 137 G, S 170 P 又は W 221 L、又は挿入されるアミノ酸残基の電荷グループと同じ電荷グループ（下記の定義を参照のこと）に属するアミノ酸残基、たとえば A 49 P の代わりに A 49 T により置換される。負に荷電されたアミノ酸残基、たとえば D 137 が置換される場合、好ましくは、それは、下記に定義されるように、正の電荷グループ又は中性のグループに属するアミノ酸残基、たとえば D 137 G, N, K により置換される：

負の電荷グループ：D, E

正の電荷グループ：K, R, H

中性のグループ：I, C, S, T, P, W, M, G, A, P, N, Y, Q, L, V。

次の位置での突然変異を含んで成る変異体が、第 1 の洗浄活性又は改良された洗浄性能を示すことができることが企画される：

**D57X+N94(K又はR)+D96X+L97X+Q249(K又はR)**

**N94(K又はR)+D96X+L97X+Q249(K又はR)**

**N94(K又はR)+D96X+Q249(K又はR)**

**D137X+D167X+E210X+W221X**

**D137X+D167X+E210X**

**I90X+D96X+E99X+V187X**

**I90X+D96X+E99X**

**I90(F又はW又はY)+D96X+E99X**

**E56X+D57X+D62X+S85X+D96X+D102X+E210X N94(K又はR)+F95L+D96X+D234X**

（ここで、X は、いずれのアミノ酸残基でもあり得、そして同一、対位置での同一、又は異なっていることができる）。

本発明の H．ラヌギノサ脂肪分解酵素は、次の突然変異を含んで成ることができる：

**D57G+N94K+D96L+Q249R**

**D57G+N94K+D96L+S116P+Q249R**

**D57G+G59V+N94K+D96L+Q249R**

**D57G+N94K+D96L+S116P+S170P+Q249R**

**D57G+G59V+N94K+D96L+S170P+Q249R**

D57G+N94K+D96L+S170P+Q249R

D167G+E210V+Q249R

E56K+D167G+E210V

D137G+D167G+E210V+Q249R

D167G+E210V+W221L+Q249R

D57G+N94K+F95L+D96H,L+Q249R

D57G+N94K+D96L+E210K

10

D57G+G59V+N94K+D96L+S116P+S170P+Q249R

S3R+D137G+D167G+E210V+W221L

D137G+D167G+E210V+W221L+N233R

S3R+I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R

I90F+D96L+E99K+V187A+D233R

I90F+D96L+E99K+V187A+D234Y

I90F+D96L+E99K+V187A+T231R

20

I90F+D96L+E99K+V187A

D62R+I90F+D96L+E99K+V187A

I90F+D96L+E99K+V187A+N200R+R209A

I90F+D96L+E99K+V187A+T199R+N200R+R209A

D57G+D62R+N94K+D96L+Q249R

D57G+N94K+D96L+N200R+R209A+Q249R

D57G+N94K+D96L+T199R+N200R+Q249R

30

I90F+D96L+E99K+V187A+T199R

D57G+N94K+D96L+T199R+R209A+Q249R

I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R

I90F+D96L+E99K+V187A+P253R

I90F+D96L+E99K+D137G+D167G+V187A+Q249R

I90F+D96L+E99K+D137G+V187A+Q249R

D96L+E99K+V187A+Q249R

40

V2P+N94K+D96L+Q249R

V2W+S3R+N94K+D96L+Q249R

V2R+S3R+N94K+D96L+Q249R

V2R+S3R+N94K+D96L+Q249R

V2R+S3W+N94K+D96L+Q249R

V2W+S3R+N94K+D96L+Q249R

N94K+D96L+Q249R

V2G+S3T+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R

V2G+S3T+Q4P+D5E+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R

V2G+D5Q+L6M +D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R 。

次の変異体が特に興味あるものである：

D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P+S170P+Q249R

A49P+D167G+E210V

E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+D96L+D102Y+E210K

D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R

D137G+D167G+E210V+W221L

N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+D234Y+I252L+P256T+G263A+L264Q

I90F+D96L+E99K+V187A

N94K+D96A+Q249R

A19P+D167G+E210V+W221L

N94K+D96L+L97M+Q249R

D57G+N94K+D96L+Q249R

I90F+D96L+E99K+D137G+V187A

N94K+D96L+E99K+Q249R

N94K+D96L+E99K+T231R+N233R+D234R+Q249R

N94K+D96L+E99K+D111N+F211A+G225P+Q249R+T267R

N94K+D96L+E99K+D111N+F211A+G225P+T231R+N233R+D234R+Q249R+  
T267R

E1K+N94K+D96L+E99K+Q249R

N94K+D96L+K223R+Q249R

N94K+D96L+E99K+N233R

N94K+D96L+E99K+T231R+N233R+Q249R

N94K+D96L+E99K+N233R+Q249R

N94K+D96L+E99K+D234R+Q249R 。

本発明の変異体は、好都合には、位置 E 1 で追加の突然変異を含んで成ることができ、ここで前記突然変異は、E 1 の欠失であるか、又はいずれか他のアミノ酸残基、特に P 又は S による E の置換である。

さらに、上記特定の変異体が、本明細書において論ぜられる N - 末端又は C - 末端ペプチド拡張部分のいずれかを含んで成ることができ、それらの特定の例は、

10

20

30

40

SPIRR, TAIRPRK, SPIRPR, SPPRRP, RP,  
 GPIRPR, SRSRHNA, SALRPRK, STRRPR, SPRRPRT, APPRPRPLLIS, SPIRK,  
 SPPRRP, WP, SPPRRPR, SPIRRP, APPRPRPRPR又はSPIRR

である。N - 末端拡張部分は、たとえば、成熟親リパーゼのアミノ酸残基 E 1 に適用され、又はアミノ酸残基 2 - 20、たとえば成熟親酵素の 2 , 3 , 4 又は 5 に適用され、ここで残基 E 1 ( 及び任意には、親酵素の非構造部分のより多くのアミノ酸残基、たとえば成熟親酵素の 2 ~ 20 N - 末端部分内のアミノ酸残基 ) は欠失される。さらに、ペプチド付加は、本明細書に言及されるペプチド拡張部分の最後のアミノ酸残基の 1 又は複数の残基が、位置 1 及び任意には 2、及びさらなる位置を占める成熟親酵素のアミノ酸残基を置換するように適用され得る。たとえば、ペプチド拡張部分 “ SPPRRP ” は、成熟親 H . ラヌギノサ・リパーゼの E 1 を、ペプチド付加物の最後の “ P ” により置換し、そして野生型プロペプチド “ SPIRR ” を “ SPPRR ” により置換することによって適用され得る。

10

置換が成熟親酵素の N - 末端部分において行なわれない場合、N - 末端付加物は、N - 末端拡張部分が親酵素のプロペプチド ( の一部 ) に同一である場合、S . セレビジアエにおいて発現されている変異体の結果として、又はより好ましくは、成熟親酵素のアミノ酸残基 1 をコードするコドンの下流の ( プレ ) プロ配列又は他の配列をコードする、親酵素をコードする DNA 配列の一部の適切な変性により適用され得る。

本発明の現在最も好ましい変異体は、次のものを包含する：

20

SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+Q249R  
 SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A  
 SPIRPRP+N94K+D96L+L97M+Q249R  
 SPPRRRP+N94K+D96L+L97M+Q249R  
 SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R  
 SPPRRP+I90F+D96L+E99K+V187A  
 SPIRPRP+D137G+D167G+E21V+W221L 10  
 E1SPIRPRP+I90F+D96L+E99K+V187A  
 E1SRKRKRK+I90F+D96L+E99K+V187A  
 E1SPRIKPRIK+I90F+D96L+E99K+V187A  
 E1SPRRRP+D62R+I90F+D96L+E99K+V187A  
 E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+N200R+R209A  
 E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+T199R+N200R+R209A  
 E1SPIRPRP+D57G+D62R+N94K+D96L+Q249R 20  
 E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+N200R+R209A+Q249R  
 E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+T199R+N200R+Q249R  
 E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+T199R  
 E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+T199R+R209A+Q249R  
 E1SPIRPRP+I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R  
 E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+V187A+P253R  
 E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+D167G+V187A+Q249R 30  
 E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A+Q249R  
 E1SPRRRP+D96L+E99K+V187A+Q249R  
 E1SPRRRP+V2P+N94K+D96L+Q249R  
 E1SPWWP+V2W+S3R+N94K+D96L+Q249R  
 E1SPWRP+V2R+S3R+N94K+D96L+Q249R  
 E1SPWRP+V2R+S3R+N94K+D96L+Q249R  
 E1SPWWP+V2R+S3W+N94K+D96L+Q249R 40  
 E1SPWRP+V2W+S3R+N94K+D96L+Q249R  
 E1SPWRP+V2R+S3W+N94K+D96L+Q249R  
 E1SPWRP+N94K+D96L+Q249R  
 E1SPRRRP+N94K+D96L+Q249R

E1APPPRPRPRRP+V2G+S3T+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R

E1APPPRTRPRPRS+V2G+S3T+Q4P+D5E+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R

E1APPPKASPRQRP+V2G+D5Q+L6M+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R

SCIRR+N94K+D96L+E239C+Q249R

E1SPRRRP+D57G+N94K+D96L+Y53C+K127C+Q249R

E1SPRRRPR+V2R+S3P+N94K+D96L+Q249R

E1SPPWPRP+V2R+S3P+N94K+D96L+Q249R

E1SPRRRP+N94K+D96L+E99K

E1SPRRRP+N94K+D96L+E99K+Q249R

E1SPPCGRRP+N94K+D96L+E239C+Q249R

E1SPCRPRP+N94K+D96L+E239C+Q249R

SPPCRRRP+N94K+D96L+E239C+Q249R .

そしてそれらの変異体はこの後の例に開示される。N - 末端拡張部分が上記特定された変異体に存在する場合、命名“ E 1 ... ”とは、位置 1 での E が“ E 1 ”の後に列挙されるペプチド付加物の最後のアミノ酸残基により置換されており、残りの残基は位置 1 を占めるアミノ酸残基に融合されていることを示すために用いられる。たとえば、“ E1SPPEQP ”は、アミノ酸残基 E 1 が“ P ”により置換され、そして残りの残基“ SPPEQ ”が E 1 P に融合されていることを示す。実際、そのような変異体は、プロセッシングされていない親酵素のアミノ酸残基 ( - 5 ) - ( - 1 ) を、ペプチド延長部分の適切なアミノ酸残基により置換し、そして E 1 を適切なアミノ酸残基により置換することによって便利には構成され、ここで前記置換は、その対応する DNA 配列に適切な突然変異を導入することによって行なわれ、そして続いて、( 本明細書にさらに開示されるように ) 得られる変異体を発現系において生成し、それらの N - 末端拡張部分の発現された変異体の少なくとも一部における維持を可能にする。E 1 の置換が示されない場合、N - 末端ペプチド付加物は、成熟親酵素の位置 1 を占めるアミノ酸残基に単純に融合される。

上記変異体は初め、本発明のランダム突然変異誘発及び / 又は遺伝子組換え法 ( gene shuffling methods ) を用いて構成され、そして続いて、それらにより導入された突然変異に関して特徴づけられる。それらの変異体を構成するための他の方法は、当業界において知られている方法に従って適切なオリゴヌクレオチドプローブを用いての特定部位突然変異誘発に基づかれることが明らかであろう。

良好な洗浄性能 / 第 1 の洗浄活性は、上記特定の個々の突然変異の 1 つが上記で提案された突然変異と同じ電荷グループに属するアミノ酸残基に対する突然変異により置換される場合に維持されるであろうことが企画される。たとえば、突然変異 N94K は N94R , H により置換され得、又は突然変異 D13G 又は D167G における“ G ”が中性グループに属する他のアミノ酸残基の 1 つにより置換され得る。さらに、中性グループのアミノ酸残基を、正の電荷グループに属する残基により置換することが好都合であり、たとえば、それぞれ、D137G 及び D167G における“ G ”が K , R 又は H により置換され、それぞれ、突然変異 D137K , R , H 及び D167K , R , H がもたらされ得る。

すでに言及されたように、H . ラヌギノサ脂肪分解酵素は、他の脂肪分解酵素、たとえば本明細書に開示されるリゾムコル・ミエヘイ、ペニシリアム・カメムベルチ、アピシジア sp. 及び種々のリゾパス sp. に由来できるそれらの酵素に、構造的に密接に関係している。従って、H . ラヌギノサ・リパーゼにおける上記変性に対応する変性及び他の構造的に関連する脂肪分解酵素における相同位置への導入がまた、第 1 の洗浄性能に関して機能的であると思われる。従って、さらなる観点において、本発明は、H . ラヌギノサ・リパーゼ・アミノ酸配列又は構造 (たとえば、UWGGG GAP プログラム又は“ 構造 ”類似性を用い

10

20

30

40

50



て少なくとも50%、たとえば少なくとも60%又は70%のギャップ又は全体のタンパク質類似性を可能する少なくとも20%の配列同一性を有する)と整合され得る、アミノ酸配列又は三次元構造を有する親脂肪分解酵素の第1の洗浄変異体に関し、ここで前記アミノ酸配列は、問題の親脂肪分解酵素中に、上記H・ラヌギノサ・リパーゼの突然変異に対応する突然変異を導入するために及び/又は野生型H・ラヌギノサ・リパーゼに見出されるアミノ酸残基を導入するために変性されている。構造的に配列相同のリパーゼにおける変性されるべきアミノ酸残基又は位置は、H・ラヌギノサ・リパーゼの構造/配列とその対応する構造/配列との整合性から同定され得る。そのような変異体は、H・ラヌギノサ・リパーゼ(そのような脂肪分解酵素は上記で同定されている)に対する構造及び/又は配列相同性を示す親脂肪分解酵素から調製された第1の洗浄脂肪分解酵素変異体を構成する方法により構成され得、ここで前記方法は、問題の親酵素の配列とH・ラヌギノサ・リパーゼ又はその第1の洗浄変異体とを整合し、又は問題の親酵素の構造とH・ラヌギノサ・リパーゼ又は変異体の構造とを重ね合せ、第1の洗浄活性(上記に開示される突然変異を参照のこと)を達成するために不可欠であると思われるH・ラヌギノサ・リパーゼ又は変異体の位置に対して相同である、親酵素における位置を同定し、そしてtに従ってその適切な位置を占めるアミノ酸残基を置換し、そして得られる変異体酵素を生成することを含んで成る。

10

#### 親脂肪分解酵素をコードするDNA配列のクローニング

第1の洗浄脂肪分解酵素が本発明に従って創造される親脂肪分解酵素をコードするDNA配列が、当業界において知られている方法の使用により、問題の親酵素を生成するいずれかの細胞又は微生物から単離され得る。

20

たとえば、DNA配列は、その配列を含むと思われる生物からcDNA又はゲノムライブラリーを確立し、そして従来の方法により陽性クローンについてスクリーンすることによって単離され得る。そのような方法の例は、標準技法(Sambrookなど、1989を参照のこと)に従って親酵素(配列情報が入手できる場合)又は関連する脂肪分解酵素(親酵素に関する配列情報が入手できない場合)のアミノ酸又はDNA配列に基づいて調製されたオリゴヌクレオチドプローブに対するハイブリダイゼーション、及び/又は脂肪分解活性を発現するクローンについての選択、及び/又は親脂肪分解酵素に対して生ぜしめられた抗体と対応するタンパク質を生成するクローンについての選択である。

cDNA又はゲノムライブラリーから本発明に従って変性される親脂肪分解酵素をコードするDNA配列を単離するための好ましい方法は、親酵素のDNA又はアミノ酸配列に基づいて調製された変性オリゴヌクレオチドプローブを用いるポリメラーゼ鎖反応(PCR)の使用による。たとえば、PCRは、アメリカ特許第4,683,202号に記載される技法を用いて、又はR.K. Saikiなど。(1988)により実施され得る。

30

他方では、親酵素をコードするDNA配列は、確立された標準の方法、たとえばBeaucage and Caruthers(1981)により記載されるホスホアミジット法、又はMattesなど。(1984)により記載される方法により合成的に調製され得る。ホスホアミジット法によれば、オリゴヌクレオチドは、たとえば自動DNA合成機において合成され、精製され、アニールされ、連結され、そして適切なベクターにおいてクローン化される。

最終的に、親酵素をコードするDNA配列は、標準の技法に従って、合成、ゲノム又はcDNA起源(適切な場合)のフラグメント(親酵素をコードする完全な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って調製された、混合されたゲノム及び合成、混合された合成及びcDNA、又は混合されたゲノム及びcDNA起源のDNAから調製され得る。

40

#### 第1の洗浄脂肪分解酵素変異体の構成方法

本発明の簡単な記載から明らかなように、本発明者は、本明細書に記載されるように1洗浄サイクルアッセイの間、実質的な量の脂肪物質を除去することができる脂肪分解酵素を創造するためのひじょうに効果的な方法を開発した。

従って、1つのひじょうに好ましい態様においては、本発明の脂肪分解酵素は、少なくとも次の段階を含んで成る方法の結果である、天然に存在する親脂肪分解酵素の変異体であ

50

り、ここで前記方法は：

(a) 適切な宿主細胞において、親脂肪分解酵素に起因する種々の突然変異誘発されたDNA配列を発現し；

(b) 親脂肪分解酵素に比較して、低められたカルシウム依存性及び／又は洗剤又は洗剤成分に対する改良された耐性を有する突然変異誘発された脂肪分解酵素を発現する宿主細胞についてスクリーンし；そして

(c) 12500LU / l の濃度で、洗剤組成物のA又はBに存在する場合、本明細書に記載されるように1サイクル洗浄アッセイにおいて、前記酵素を含まない同じ洗剤組成物よりも少なくとも15%高くロードを、ロードで汚れた布ぎれから除去することができる、段階(b)に起因する酵素間から突然変異誘発された脂肪分解酵素を選択する段階を含んで成る。

10

段階(a)において言及される突然変異誘発されたDNA配列の種類は、親脂肪分解酵素をコードするDNA配列を、突然変異誘発されたDNA配列を形成するために突然変異誘発にゆだねることによって便利には得られる。その突然変異誘発はいづれか適切な方法、たとえば特定部位突然変異誘発により実施され得るが、好ましくは、その突然変異誘発はランダム突然変異誘発である。従って、ランダム突然変異誘発の使用により、特定部位突然変異誘発の使用により可能であるよりも、より多数の突然変異誘発されたDNA配列を創造することが可能である。ランダム突然変異誘発は、“ランダム突然変異誘発”のセクションにおいてさらに詳細に説明される。そのセクションにおいては、また、前記方法の1又は複数の段階(a) - (c)が、連続的な改良を行なうために、いかにして1又は複数回くり返えされ得るかを記載する。たとえば、第1回目の段階(a) - (c)から選択された突然変異誘発された脂肪分解酵素が、第2回目の方法にゆだねられ、ここで前記スクリーニング段階(b)は第1回目のスクリーニング段階(b)に使用される条件よりもより緊縮した条件での選択を包含し、それにより、第1回目起因する突然変異誘発された脂肪分解酵素に比較して、低められたカルシウム依存性及び／又は洗剤又は洗剤成分に対する改良された耐性を有する突然変異誘発された脂肪分解酵素を選択する。

20

ランダム突然変異誘発

上記方法の段階(a)に従って行なわれる、親脂肪分解酵素(又はペプチド付加物)をコードするDNA配列のランダム突然変異誘発は便利には、当業界において知られているいづれかの方法の使用により行なわれ得る。

30

たとえば、ランダム突然変異誘発は、適切な物理的又は化学的突然変異誘発剤の使用により、適切なオリゴヌクレオチドの使用により、又はDNA配列をPCR生成された突然変異誘発にゆだねることによって実施され得る。さらに、ランダム突然変異誘発は、それらの突然変異誘発剤のいづれかの組合せの使用により実施され得る。

突然変異誘発剤は、たとえば、トランジション、トランスバージョン、逆位、スクランブリング、欠失及び／又は挿入を包含する剤であり得る。

本発明の目的のために適切な物理的又は化学的突然変異誘発剤の例は、紫外線(UV)照射、ヒドロキシルアミン、N - メチル - N - ニトロ - N - ニトロソグアニジン(MNNG)、O - メチルヒドロキシルアミン、亜硝酸、エチルメタンスルホネート(EMS)、亜硫酸水素ナトリウム、蟻酸、 $\gamma$ 線照射、1 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - ニトロソグアニジン(NTG)及びヌクレオチド類似体を包含する。

40

そのような剤が使用される場合、突然変異誘発は典型的には、突然変異誘発のための適切な条件下で、選択される突然変異誘発剤の存在下で突然変異誘発されるべき親酵素をコードするDNA配列をインキュベートし、そして所望する性質を有する突然変異誘発されたDNAを選択することによって行なわれる。

突然変異誘発がオリゴヌクレオチドの使用により実施される場合、そのオリゴヌクレオチドは、変更されることが所望される位置でのオリゴヌクレオチドの合成の間、3種の非親ヌクレオチドによりドーピングされ、又はスパイキングされ得る。そのドーピング又はスパイキングは、所望しないアミノ酸のためのコドンがそれらのコドンをもたらしヌクレオチドの量を低め又はそのヌクレオチドを完全に回避することによって回避されるように行

50

なわれ得る。その一般知識及びコンピュータプログラムの状態は、与えられたアミノ酸対照のための最も最適なヌクレオチド混合物を計算するために使用され得る。ドーピング又はスパイキングされたオリゴヌクレオチドは、たとえばPCR、LCR又はいずれかのDNAポリメラーゼ及びリパーゼを用いて、いずれかの公開された技法により、脂肪分解酵素をコードするDNA中に組込まれ得る。

PCR生成の突然変異誘発が使用される場合、親脂肪分解酵素をコードする、化学的に処理されているか又は処理されていないいずれかの遺伝子が、ヌクレオチドの誤った組込みを高める条件下でPCRにゆだねられる (Deshler 1992, Leung など。1989)。

E. コリ (Fowler など。1974), S. セレピシアエ又はいずれか他の微生物のミューテーター株は、たとえばミューテーター株を、親酵素を含むプラスミドにより形質転換し、前記プラスミドを有するミューテーター株を増殖せしめ、そしてそのミューテーター株から突然変異誘発されたプラスミドを単離することによって、脂肪分解酵素をコードするDNAのランダム突然変異誘発のために使用され得る。続いて、その突然変異誘発されたプラスミドを用いて、発現生物を形質転換することができる。

突然変異誘発されるべきDNA配列は便利には、親脂肪分解酵素を発現する生物から調製されるゲノム又はcDNAライブラリーに存在することができる。他方では、そのDNA配列は、それ自体、突然変異誘発剤と共にインキュベートされ得又はその剤に暴露され得る、適切なベクター、たとえばプラスミド又はバクテリオファージ上に存在することができる。突然変異誘発されるべきDNAはまた、宿主細胞のゲノムに組込まれることによって、又は前記細胞に収容されるベクター上に存在することによって、その宿主細胞に存在することもできる。最終的に、突然変異誘発されるべきDNAは、単離された形で存在することができる。ランダム突然変異誘発にゆだねられるべきDNA配列は好ましくは、cDNA又はゲノムDNA配列である。

多くの場合、発現又はスクリーニングが実施される前、突然変異誘発されたDNA配列を増幅することが便利である。そのような増幅は、当業界において知られている方法に従って行なわれ、その現在好ましい方法は、親酵素のDNA又はアミノ酸配列に基づいて調製されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いてのPCR生成の増幅である。

突然変異誘発剤と共にインキュベーションした後、又はその剤に暴露した後、突然変異誘発されたDNAは、発現の発生を可能にする条件下でそのDNA配列を担持する適切な宿主細胞を培養することによって発現される。この目的のために使用される宿主細胞は、任意にはベクター上に存在する突然変異誘発されたDNA配列により形質転換された細胞、又は突然変異誘発処理の間、親酵素をコードするDNA配列を担持する細胞であり得る。適切な宿主細胞の例は下記に与えられる。特に、親脂肪分解酵素が菌類、たとえば糸状菌又は酵母に由来する場合、宿主細胞として酵母細胞を用いることが特に好ましい。突然変異誘発されたDNA配列はさらに、突然変異誘発されたDNA配列の発現を可能にする機能をコードするDNA配列を含むことができる。

本発明の方法の段階 (b) に言及されるスクリーニング基準は注意して選択されることが理解されるであろう。従って、いづれの理論にも制限されないが、アルカリ性pH (7以上のpH) でのカルシウムに対する低められた依存性についてのスクリーニングは、遊離カルシウムイオンの濃度が洗剤マトリックス (ビルダー) におけるキレート化剤により故意に低められる事実により特徴づけられる特別な洗浄条件下で、カルシウムのための必要条件が最適な活性のための制限因子として見なされ得る全体的な改良された性能を有する変異体をもたらすと思われる。

変異体が改良された耐性を有する洗剤又は洗剤成分は、たとえばさらに下記に記載されるようないづれかのタイプのものであり得る。好ましくは、洗剤成分は、非イオン性、アニオン性、カチオン性、両性イオン性又は両性界面活性剤である。非イオン性界面活性剤の例は、アルコールエトキシレートを含むし、アニオン性界面活性剤の例はLAS、アルキルスルフェート、アルコールエトキシスルフェート及び同様のものを包含する。洗剤の選択は、たとえば親脂肪分解酵素の固有の弱さ (洗剤耐性に関して) に依存するであろう。

ヒュミコラ・ラヌギノサ脂肪分解酵素及び相同の酵素 (たとえば、ペニシリアム、リゾム

10

20

30

40

50

コル、リゾパス及びアブシジアsp. 脂肪分解酵素) に関して、非イオン性界面活性剤アルコールエトキシレート、すなわちDobanol<sup>®</sup> 25-7として市販される剤に対する改良された耐性は改良された洗浄性能を示すことができる。シュードモナスタイプ、たとえばP・シュードアルカリゲネス、P・セパシアの脂肪分解酵素に関しては、アニオン性界面活性剤、たとえば“アルキルスルフェート(HEODOL45が市販の例である)又はLAS(Nansa 1169/Pが市販の例である)に対する改良された耐性は、改良された洗浄性能を示すことができる。

段階(b)のスクリーニングは、次の原理に基づいてフィルターアッセイの使用により便利には行なわれる：

興味ある突然変異誘発された脂肪分解酵素を発現できる微生物が、適切な培地上で及び分泌されるべき酵素のための適切な条件下でインキュベートされ、ここで前記培地は、第1のタンパク質結合フィルター、及びその上部上に、低いタンパク質能力を示す第2のフィルターを含んで成る二重フィルターを供給されている。微生物は第2フィルター上に位置している。インキュベーションに続いて、微生物から分泌される酵素を含んで成る第1のフィルターが、微生物を含んで成る第2のフィルターから分離される。第1のフィルターが、所望する酵素活性についてのスクリーニングにゆだねられ、そして第2のフィルター上に存在するその対応する微生物コロニーが同定される。

他方では、コロニーを担持する第2のフィルターがスクリーニングプレート上に直接的に使用され得る。これは、正しいコロニーの採取を容易にし、そして多くの場合、より強いシグナルを付与し、そしてわずか1つのフィルターを用いて、タンパク質結合又は非タン

パク質結合のいずれかが、多くの場合、十分である。  
酵素活性を結合するために使用されるフィルターは、いずれかのタンパク質結合フィルター、たとえばナイロン又はニトロセルロースであり得る。発現生物のコロニーを担持する上部フィルターは、タンパク質を結合するための親和性を有さないか又は低い親和性を有するいずれかのフィルター、たとえば酢酸セルロース、又はDurapore<sup>TM</sup>であり得る。フィルターは、スクリーニングのために使用されるいずれかの条件により予備処理され、又は酵素活性の検出の間、処理され得る。

酵素活性は、色素、蛍光、沈殿、pHインジケーター、IR-吸光度又は酵素活性の検出のためのいずれか他の既知の技法により検出され得る。

検出化合物は、いずれかの固定化剤、たとえばアガロース、寒天、ゼラチン、ポリアクリルアミド、スターチ、フィルター紙、布、又は固定化剤のいずれかの組合せにより固定され得る。

脂肪分解活性は、脂質、たとえばオリーブ油又はラードと組合して、ブリリアントグリーン、ローダミンB又はスーダンブラックにより検出され得る。改良された洗浄性能を有する親脂肪分解酵素の変異体を同定するためのスクリーニング基準は、上記酵素活性の検出体の1つと組合して、EDTA、非イオン性及び/又はアニオン性テンスイド(tensides)、アルカリ性pH、又はいずれかの洗剤組成物であり得る。

段階(b)におけるスクリーニングに続いて、所望する性質(すなわち、スクリーニング基準により定義されるような)を有する脂肪分解酵素が単離され、そしてそれらの第1の洗浄能力が本明細書の材料及び方法のセクションに記載される1サイクル洗浄アッセイにおいて試験される。

酵素の第1の洗浄活性が、1回目の上記処理の後、十分に良好でない場合、酵素は、たとえば第1の洗浄性能を達成するためにリパーゼの変性のための上記でさらに与えられた原理のいずれかに従って、酵素の第1の洗浄活性を改良するために、特定部位又はランダム突然変異誘発により変性され得る。

最も便利には、段階(b)で生成される宿主細胞は、便利には、前の突然変異誘発処理で使用されるよりも一層緊縮した選択基準を用いることによって、上記段階(a)-(b)及び任意には(c)に定義されるような追加の回の突然変異誘発にさらにゆだねられ得る。追加の回の突然変異誘発は、前で同定された好都合な突然変異、特にD96L, Q249R, E87K, D254K, E210Kを導入するために、又は選択された領域、たとえば脂質接

10

20

30

40

50

触領域に、ランダム突然変異、たとえば正の及び／又は疎水性のアミノ酸残基の導入のためにドーピングされ又はスパイキングされたオリゴヌクレオチドによるランダム突然変異誘発を導入するために、又は本明細書に言及されるいずれか他の特定の突然変異誘発を導入するために、ランダム、局在化されたランダム、又は特定部位突然変異誘発であり得る。他方では、異なった親脂肪分解酵素をコードする遺伝子が、個々の変異体から 1 又は複数の突然変異を担持する新規変異体を得るためにランダム態様で組合せられ得る。これは、“脂肪分解酵素をコードする DNA 配列の組合せ”と称するセクションにさらに詳細に論ぜられる。

段階 (b) 又は (c) において選択される宿主細胞は、脂肪分解酵素の変異体の生成のために直接的に使用され得る。他方では、前記変異体をコードする DNA が、便利には、適切な宿主細胞がまた列挙される、“本発明の変異体の発現”と称する下記セクションに記載される方法の使用により、宿主細胞から単離され、そして他の適切な宿主細胞中に挿入され得る。

#### 局在化されたランダム突然変異誘発

本発明によれば、ランダム突然変異誘発は、好都合には、問題の親脂肪分解酵素の部分に位置することができる。これは、たとえば酵素のある領域が酵素の一定の性質のために特に重要なものであることが同定されている場合、好都合であり、そしてその領域は、変性される場合、改良された性質を有する変異体をもたらすことが予測される。そのような領域は、親酵素の三次構造が解明され、そして酵素の機能に関連する場合に通常同定され得る。

変性アミノ酸残基のために特に興味ある 1 つの領域は、脂質接触領域の内部又は外部の親酵素の表面、すなわち脂質基質と接触して存在し、そしてたとえばリッド領域、疎水性クレフト又はそれらの構造体のいずれかの部分を含んで成る脂肪分解酵素の部分に位置した。本発明の脂肪分解酵素のための興味あるもう 1 つの領域は、成熟親酵素の N - 末端又は C - 末端の非構造部分内のペプチド付加物又は他の変性を含む。

局在化されたランダム突然変異誘発は、上記のような PCR 生成の突然変異誘発技法又は当業界において知られているいずれか他の適切な技法の使用により便利には行なわれる。特に、大きなペプチド付加物を突然変異誘発するためには、PCR 生成の突然変異誘発 (たとえば、Deshler 1992 又は Leung など, 1989 により記載されるような) を使用することが適切であり、ここにおいては、突然変異誘発されるべき領域を両端に有する 1 又は複数の適切なオリゴヌクレオチドプローブが使用される。短いペプチド付加物の突然変異誘発のためには、ドーピングされた又はスパイキングされたオリゴヌクレオチドの使用により局在化されたランダム突然変異誘発を行なうことが好ましい。ドーピング又はスパイキングは、たとえば所望しないアミノ酸残基のためのコドン回避のために、又は特定タイプのアミノ酸残基、たとえば正に荷電された又は疎水性のアミノ酸残基が所望する位置で導入される可能性を高めるために使用される。

他方では、変性されるべき DNA 配列の部分をコードする DNA 配列は、適切なベクター中に挿入されることによって単離され得、そして前記部分は続いて、上記で論ぜられたいづれかの突然変異誘発法の使用により突然変異誘発にゆだねられ得る。

ランダム突然変異にゆだねられる DNA 配列は、親脂肪分解酵素の脂質接触領域又はリッド領域をコードする DNA 配列の部分を含んで成り、又はその部分を構成することが特に興味あるものである。局在化されたランダム突然変異誘発は、1 又は複数のそれらの領域において及び／又は脂質接触領域を構成する 1 又は複数の領域において行なわれ得、そして好ましくは、少なくとも 2 の領域において行なわれる。本発明のこの観点による変性のために特に興味ある親脂肪分解酵素は、DSM4109 株から得られる H. ラヌギノサ脂肪分解酵素又はその変異体又は類似体、ペニシリアム・カメムベルチに由来する親脂肪分解酵素、リゾパス・オリザエに由来する親脂肪分解酵素、リゾムコル・ミエヘイに由来する親脂肪分解酵素、アブジジア sp. に由来する親脂肪分解酵素、好ましくは Ps. アエロギノサ科に属するシュードモナス sp. に由来する親脂肪分解酵素、たとえばシュードモナス・セパシア・リパーゼ、シュードモナス・シュードアルカリゲネス・リパーゼ、シュードモナス・グ

10

20

30

40

50

ルマエ・リパーゼ、シュードモナス・メンドシナ・リパーゼ、シュードモナス・ウイスコンシネンシス、又は配列番号99で示されるシュードモナスsp. リパーゼ (SD705) (Liposam<sup>R</sup>) を包含する。脂質接触領域及びリッド領域は、上記の定義セクションに同定される。

局在化されたランダム突然変異誘発は、たとえば約90～93%の野生型及び約7～10%の変異体を確保する条件下で、L, I, V, F, W, A (疎水性アミノ酸残基)、又はK, R (正のアミノ酸残基) の方向にドーピングされるドーピングされたオリゴヌクレオチドの使用により行なわれる。適切なドーピングレジメの特定の例は、下記の例セクションに与えられる。

#### インビボ組換え

本発明の好ましい態様によれば、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードするDNA配列が、重要な段階として、異なった親脂肪分解酵素をコードする選択されたDNA配列又はそのようなDNA配列の一部の組合せを包含する方法により構成され得る。

好ましくは、組合せされるべきDNA配列は、満足のいく洗浄及び/又は皿洗い性能(たとえば、例6に同定されるような)を有する脂肪分解酵素をコードする遺伝子に由来する。DNAを組合す目的は、個々の“親酵素”からの最良の要素が1つの及び同じ変異体酵素中に組合せられることである。

本発明において、用語“満足する洗浄能力”とは、親酵素が、適切な洗剤に存在する場合、1又は数回の洗浄サイクルの間、脂肪染料を除去することができることを示すことを意味する。好ましくは、問題の親酵素は、Lipolase (TM) よりも良好な洗浄性能を有する。DNA配列の組合せは、当業界において知られているいずれか適切な方法により行なわれ得る。たとえば、組合せされるべきDNA配列が相同のフラグメントを含んで成る場合、その組合せは好ましくは、相同のクロスオーバーにより、たとえば従来の方法、たとえばアメリカ特許第5,093,257号に記載される方法の使用により、又は遺伝子シャフリング (gene shuffling) (Stemmer (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.91, 10747-10751; Stemmer (1994), Nature, vol.370, 389-391; Smith (1994), Nature, vol.370, 324-25; WO 95/17413) により達成される。遺伝子シャフリングとは、多くのヌクレオチドの交換を引き起こす生成DNA配列をもたらす、複数の相同DNA間のヌクレオチド配列の組換えを意味する。

次の方法に基づくインビボ遺伝子シャフリング法 (Gene Shuffling Method) が特に興味の対象である：

- a) 親脂肪分解酵素をコードするDNA配列又はその実質的な一部を含んで成る少なくとも1つの環状発現ベクターの形成、
- b) 前記脂肪分解酵素をコードするDNA配列又はその一部内での前記環状発現ベクターの開環、
- c) 少なくとも1つの前記環状発現ベクター上の酵素コード領域の少なくとも一部に対して相同であるDNA配列を含んで成る少なくとも1つのDNAフラグメントの調製、
- d) 前記脂肪分解酵素をコードする十分な長さのDNA配列又はその一部を包含する少なくとも1つの前記相同DNAフラグメントと共に、少なくとも1つの前記開環されたベクターの、組換え宿主細胞中への導入、
- e) 発生する相同DNAフラグメント間での組換えの助けとなる条件下で前記酵母組換え宿主細胞の培養、
- f) 改良された洗浄性能を有する陽性の脂肪分解酵素変異体のスクリーニング。

上記段階a) において使用されるベクターは、酵母組換え宿主細胞を形質転換し、そして発現され得る酵母発現ベクターであり得る。そのような発現ベクターの例は、pYES2.0 (Invitrogene) から構成される酵母発現ベクター、たとえば野生型ヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼ遺伝子を含んで成るpJS037を包含する。

段階b) におけるベクターの開環は、当業界において知られているいずれかの従来技法により達成され得、そしてたとえば、単一の部位で切断し又はベクターに切れ目を付けることにより(すなわち、たとえば遺伝子の小さな部分の切断をもたらす2つの部位で切断

10

20

30

40

50

することにより)、リパーゼ遺伝子内のベクターを開環することにより行なわれ得る。  
段階c)における相同DNAフラグメントの調製は、いずれか適切な方法、たとえばアメリカ特許第4,683,202号又はSaikiなど., (1988), Science 239, 487-491に記載される標準のPCR増幅方法により、相同DNA配列(たとえば、脂肪分解遺伝子に1又は複数の突然変異を含んで成り、そしてプラスミド又はベクターに含んで成る)を増幅することによって行なわれ得る。

ベクターは、形質転換により組換え宿主細胞(段階d)における)中に導入され得る。組換えの場合、宿主細胞は、サッカロミセス・セレピシアエ株、たとえばサッカロミセス・セレピシアエYNG318(下記に記載される)であり、形質転換はSambrookなど., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, NY, USAに記載されるようにして行なわれ得る。

陽性の脂肪分解酵素変異体についてのスクリーニングはたとえば、上記ランダム突然変異誘発に関して記載されるスクリーニング法により行なわれ得る。

段階a)~f)のサイクルの1つは、第1の洗浄脂肪分解酵素変異体の選択が上記でさらに定義された選択条件を用いて行なわれる前に実施され得る。

シャフリング方法によれば、有意に複数のDNA配列がシャフリングされ得る。適切なプラスミドに含まれるいずれかの数の異なったDNAフラグメント及び相同の脂肪分解酵素が同時にシャフリングされ得る。

組合されるべきDNA配列は、完全な遺伝子であり得、その少なくとも1つの部分が、遺伝子の組換えの発生を可能にするために他の遺伝子に対して十分相同性を示す。他方では、DNA配列は、組合される場合、脂肪分解酵素を発現することができる機能的遺伝子を生ぜしめることができる部分遺伝子であり得る。

組合されるべきDNA配列が高い相同性であり又は部分的に同一である場合、調節された組合せが、たとえば、2種のDNA配列の組合せの場合、前記配列の1つのN-末端部分と他の配列のC-末端部分(第1の配列の残りの部分に対応する)とを組合すために、又は問題のそれぞれの遺伝子の他の適切な部分を組合すことによって、実施され得る。

天然に存在する酵素は、遺伝子シャフリングにゆだねられる前、上記のようなランダム、局在化されたランダム又は特定部位の突然変異誘発により遺伝子的に変性され得る。他方では、1種の酵素の一部が、キメラ酵素を得るために他の酵素の一部により置換され得る。この置換は、従来のインビトロ遺伝子スプライシング技法により又はインビボ組換えにより、もしくは両者の技術の組合せにより達成され得る。従来のインビトロ遺伝子スプライシング技法を用いる場合、脂肪分解酵素遺伝子の所望する部分が適切な部位特異的制限酵素を用いて欠失され;次に、そのコード配列の欠失された部分が、異なった脂肪分解酵素コード配列の所望する部分の挿入により置換され、その結果、新規の脂肪分解酵素をコードするキメラヌクレオチド配列が生成される。他方では、脂肪分解酵素遺伝子が、たとえばHiguchiなど、1988により記載されるPCRオーバーレイ付加方法の使用により融合され得る。

インビボ組換え技法は、高い相同性の領域(DNA配列の同一性)を有する異なったDNAセグメントが組換えることができ、すなわち破壊し、そしてDNAを交換し、そして相同領域に新規の結合を確立することができる事実依存する。従って、複数の異なっているが、しかし相同の脂肪分解酵素についてのコード配列が宿主細胞を形質転換するために使用される場合、インビボでの相同配列の組換えがキメラ遺伝子配列の生成をもたらす。宿主細胞によるそれらのコード配列の翻訳は、キメラ性脂肪分解酵素遺伝子生成物の生成をもたらすであろう。特定のインビボ組換え技法は、アメリカ特許第5,093,257号及びヨーロッパ特許第252,666号に記載される。

相同組換えの発生を可能にするためには、脂肪分解酵素は、少なくとも60%相同である部分を含むことが所望される。完全な酵素は少なくとも60%相同であることが特に好ましい。組合されるべき酵素は、同じ親酵素の異なった変異体、たとえば本明細書に開示されるH.ラヌギノサ脂肪分解酵素に由来する変異体、又は上記に言及される、Ps. アルカリゲネス又はPs. フーリイバアルカリゲネス脂肪分解酵素に由来する変異体、又はF. ソラニ

10

20

30

40

50

・ピシ脂肪分解酵素（上記を参照のこと）に由来する変異体、又はP・メンドシナ脂肪分解酵素又はシュードモナスsp. リパーゼ（Liposam）（上記を参照のこと）に由来する変異体であり得る。ランダム組換えは、天然に存在する脂肪分解酵素と前記酵素の1又は複数の変異体との間で、異なった天然に存在する酵素間で、天然に存在する酵素の変異体（前記変異体は同じ親酵素又は異なった酵素の変異体である）間で、又は天然に存在する酵素及び天然に存在する酵素の変異体のいずれかの組合せ間で、それらの対応するDNA配列が組換えすることができる限り実施され得ることが理解されるであろう。組合せられるべきDNA配列が親酵素の変異体である場合、それらの変異体は便利には、突然変異誘発、特に上記に開示されるランダム突然変異誘発法により調製され得る。

他の態様においては、ハイブリッド酵素は、当業界において知られている標準の化学法により合成され得る。たとえば、Hunkapillerなど、（1984）を参照のこと。従って、上記アミノ酸配列を有するペプチドは、完全に又は部分的に合成され、そして連結され、本発明のハイブリッド酵素が形成される。

より好ましい態様においては、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、親脂肪分解酵素を、突然変異誘発、特にランダム突然変異誘発にゆだね、種々の突然変異誘発されたDNA配列を形成し、適切な宿主においてその突然変異誘発されたDNA配列を発現し、そして低められたカルシウム依存性及び／又は洗剤又は洗剤成分に対する改良された耐性を有する突然変異誘発された脂肪分解酵素を生成する宿主細胞についてスクリーンし、前記スクリーニングにおいて選択された突然変異誘発された脂肪分解酵素をコードするDNA配列を、同じ親脂肪分解酵素から類似する態様で調製された1又は複数の他の突然変異誘発されたDNA配列と共に、インビボ組換え、特に遺伝子シャフリング又は性的PCRにゆだね、その突然変異誘発されたDNA配列を適切な宿主において発現し、場合によっては、低められたカルシウム依存性及び／又は洗剤又は洗剤成分に対する改良された耐性を有する突然変異誘発された脂肪分解酵素を生成する宿主細胞について選択し、任意には、上記突然変異誘発及びインビボ組換え法のいずれか又は両者を、より緊縮したスクリーニング基準を用いて1又は数回くり返し、そして最終的に、本明細書に定義されるような第1の洗浄活性を示す脂肪分解酵素をコードする組換えされたDNA配列を選択することを含んで成る方法により構成される。

さらに、親酵素の構造部分にペプチド付加物及び突然変異を含んで成る、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、ペプチド付加物をコードするDNA配列の部分及び親脂肪分解酵素の成熟部分をコードするDNA配列の選択された部分における、局在化された突然変異誘発、特に局在化されたランダム突然変異誘発を包含する方法により、すなわち親酵素の構造部分に行なわれる本発明の第2の観点に従ってのランダム突然変異誘発法、及びそのN-末端及び／又はC-末端の非構造部分及び／又はN-末端及び／又はC-末端部分に適用されるペプチド付加物におけるランダム突然変異誘発の組合せ方法により構成され得ることが理解されるであろう。

本明細書に開示されるインビボ組換え及び突然変異誘発方法は、本明細書における“親脂肪分解酵素”のセクションに言及されるいずれかの親脂肪分解酵素に適用され得ることが理解されるであろう。特に好ましい親脂肪分解酵素は、ヒュミコラ・ラヌギノサ、及びシュードモナスsp.、たとえばPs. アルカリゲネス及びPs. シュードアルカリゲネスに由来する。

#### 本発明の脂肪分解酵素の発現

本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする、単離された核酸配列は、酵素の発現を提供するための種々の手段で操作され得る。ベクター中へのその挿入の前、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列の操作は、発現ベクターに依存して、所望され、又は必要とされる。クローニング法を用いての核酸配列の変性技法は、当業界において良く知られている。

用語“制御配列”とは、核酸配列のコード配列の発現のために必要であるか又は好都合であるすべての成分を包含するよう、本明細書においては、定義される。個々の制御配列は、変性された脂肪分解酵素をコードする核酸配列に対して生来のものであるか又は外来性

10

20

30

40

50



のものであり得る。そのような制御配列は、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナル配列及び転写ターミネーターを包含するが、但しそれらだけには限定されない。最少で、制御配列は、プロモーター、及び転写及び翻訳停止シグナルを包含する。制御配列は、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列のコード領域を有する制御配列の連結を促進する特定の制限部位を導入するためのリンカーを供給され得る。

制御配列は、適切なプロモーター配列であり得、この核酸配列はその核酸配列の発現のために宿主細胞により認識される。プロモーター配列は、第1の洗浄脂肪分解酵素の発現を仲介する転写及び翻訳制御配列を含む。プロモーターは、選択の宿主細胞において転写活性を示すいづれかの核酸配列であり得、そして宿主細胞に対して相同であるか又は非相同である細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られる。特に、細菌宿主細胞において本発明の核酸構造体の転写を方向づけるための適切なプロモーターの例は、*E. coli* lacオペロン、*Streptomyces coelicolor* アガラーゼ遺伝子 (*dagA*)、*B. subtilis* レバンスクラーゼ遺伝子 (*sacB*) 又はアルカリプロテアーゼ遺伝子、*B. licheniformis* - アミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、*B. stearothermophilus* マルトジェニクアミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、*B. amyloliquefaciens* - アミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、*B. licheniformis* ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、*B. subtilis* xylA及びxylB遺伝子、*B. pumilus* キシロシダーゼ遺伝子、及び原核性 - ラクタマーゼ又はトリプトファン遺伝子 (*Villa-Kamaroff* など., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731)、並びに *tac* 遺伝子 (*DeBoer* など., 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25) から得られるプロモーターである。さらなるプロモーターは、“Useful proteins from recombinant bacteria” in *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; 及び *Sambrook* など., 1989、前記に記載される。糸状菌宿主細胞における本発明の核酸構造体の転写を指図するための適切なプロモーターの例は、*A. oryzae* TAKAアミラーゼ、*A. oryzae* トリホスホスフェート・イソメラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*A. niger* 中性 - アミラーゼ、*A. niger* 酸安定性 - アミラーゼ、*A. niger* 又は *A. awamori* グルコアミラーゼ (*glaA*)、*Rhizomucor miehei* リパーゼ、*A. oryzae* アルカリ・プロテアーゼ、*A. oryzae* トリホスホスフェートイソメラーゼ、*A. nidulans* アセトアミダーゼ、*Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼ (アメリカ特許第4,288,627号に記載されるような; これは引用により明細書に組込まれる)、又は *ADH-3* プロモーター (*McKnight* など., (1985), *The EMBO J.* 4, 2093-3099)、及びそれらのハイブリッドをコードする遺伝子から得られたプロモーターである。糸状菌宿主細胞に使用するための特に好ましいプロモーターは、TAKAアミラーゼ及び *glaA* プロモーターである。酵母宿主においては、酵母解糖遺伝子 (+) *Hszman* など., (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 12073-12080; *Alber and Kawasaki*, (1982), *J. Mol. Appl. Gen.* 1, 419-434)、又はアルコール・デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*Young* など., *Genetic Engineering OF Microorganisms for Chemicals* (*Hollaender* など、eds.), Plenum Press, New York, 1982) からのプロモーター、又は *TPI 1* (アメリカ特許第4,599,311号) 又は *ADH2 - 4c* (*Russell* など., (1983), *Nature* 304, 652-654) プロモーターが好ましい。有用なプロモーターは、*S. cerevisiae* エノラーゼ (*ENO - 1*) 遺伝子、*S. cerevisiae* ガラクトキナーゼ遺伝子 (*GAL 1*)、*S. cerevisiae* アルコール・デヒドロゲナーゼ / グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ADH 2 / GAP*) 及び *S. cerevisiae* 3 - ホスホグリセレート・キナーゼ遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための他の有用なプロモーターは、*Romanos* など., 1992, *Yeast* 8: 423-488により記載される。

制御配列はまた、適切な転写ターミネーター配列、すなわち転写を停止するために宿主細胞により認識される配列でもあり得る。ターミネーター配列は、脂肪分解酵素をコードする核酸配列の3'末端に操作可能的に連結される。ターミネーター配列は、変性された脂

10

20

30

40

50

脂肪分解酵素をコードする核酸配列に対して生来のものであり、又は外来性源から得られる。選択の宿主細胞において機能的であるいずれかのターミネーターが本発明において使用され得る。糸状菌宿主細胞のための好ましいターミネーターは、A・オリザエTAKAアミラーゼ、A・ニガー・グルコアミラーゼ、A・ニジュランス・アントラニレート・シンターゼ、A・ニガー・グルコシダーゼ、及びフサリウム・オキシシホラム・トリブシン様プロテアーゼをコードする遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための好ましいターミネーターは、S・セレピシアエ・エノラーゼ、S・セレピシアエ・チトクロームC (CYC1)、又はS・セレピシアエ・グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための他の有用なターミネーターは、Romanosなど、1992、前記により記載される。

10

制御配列はまた、適切なリーダー配列、すなわち宿主細胞による翻訳のために重要であるmRNAの非翻訳領域でもあり得る。そのリーダー配列は、脂肪分解酵素をコードする核酸配列の5'末端に操作可能的に連結される。リーダー配列は、脂肪分解酵素をコードする核酸配列に対して生来のものであり得、又は外来性源から得られる。選択の宿主細胞において機能的であるいずれかのリーダー配列が、本発明において使用され得る。糸状菌宿主細胞のための好ましいリーダーは、A・オリザエTAKAアミラーゼ及びA・オリザエ・トリホスリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための適切なリーダーは、S・セレピシアエ・エノラーゼ (ENO-1) 遺伝子、S・セレピシアエ・3-ホスホグリセレート・キナーゼ遺伝子、S・セレピシアエ・因子、S・セレピシアエ・アルコール・デヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH2 / GAP) から得られる。

20

制御配列はまた、ポリアデニル化配列、すなわち、核酸配列の3'端に操作可能的に連結され、そして転写される場合、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するためのシグナルとして宿主細胞により認識される配列である。ポリアデニル化配列は、変性された脂肪分解酵素をコードする核酸配列に対して生来のものであり得、又は外来性源から得られる。選択の宿主細胞において機能的であるいずれかのポリアデニル化配列が、本発明において使用され得る。糸状菌宿主細胞のための好ましいポリアデニル化配列は、A・オリザエTAKAアミラーゼ、A・ニガー・グルコアミラーゼ、A・ニジュランス・アントラニレート・シンターゼ、及びA・ニガー・グルコシダーゼをコードする遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための有用なポリアデニル化配列は、Guo and Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990により記載される。ポリアデニル化配列は、哺乳類宿主細胞のためには当業界において良く知られている。

30

制御配列はまた、細胞の分泌路中に発現された、第1の洗浄脂肪分解酵素を向けることができる、第1の洗浄脂肪分解酵素のアミノ末端に連結されるアミノ酸配列をコードするシグナルペプチドコード領域でもあり得る。そのシグナルペプチドコード領域は、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素に対して生来のものであり、又は外来性源から得られる。核酸配列のコード配列の5'端は本来、分泌され、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードするコード領域のセグメントと翻訳読み取り枠を整合して天然において連結されるシグナルペプチドコード領域を含むことができる。他方、前記コード配列の5'端は、分泌され、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードするコード配列のその部分に対して外来性であるシグナルペプチドコード領域を含むことができる。シグナルペプチドコード領域を通常、含まない外来性シグナルペプチドコード領域が必要とされる。他方、前記外来性シグナルペプチドコード領域は、そのコード配列に通常、関連する天然のシグナルペプチドコード領域に関して脂肪分解酵素の増強された分泌を得るために、天然のシグナルペプチドコード領域を単純に置換することができる。シグナルペプチドコード領域は、アスペルギラス種からのグルコアミラーゼ又はアミラーゼ遺伝子、リゾムコル種からのリパーゼ又はプロテイナーゼ遺伝子、サッカロミセス・セレピシアエからの因子のための遺伝子、バシラス種からのアミラーゼ又はプロテアーゼ遺伝子、又はウシブレブロキモシン遺伝子から得られる。細菌宿主細胞のための効果的なシグナルペプチドコード領域は、バシラスNCIB11837からのマルチエン性アミラーゼ遺伝子、B・ステアロサーモフィラス・アミラーゼ遺伝子、

40

50

B . リケニホルミス・サブチリシン遺伝子、B . リケニホルミス・ - ラクタマーゼ遺伝子、B . ステアロサーモフィラス中性プロテアーゼ遺伝子 (nprT, nprS, nprM)、及びB . サブチリスPrsA遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。さらなるシグナルペプチドは、Simonen and Palva, 1993, Microbiology Reviews 57 : 109-37により記載されている。糸状菌宿主細胞のための効果的なシグナルペプチドコード領域は、A . オリザエTAKAアミラーゼ遺伝子、A . ニガー中性アミラーゼ遺伝子、リゾムコル・ミエヘイ・アスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子、H . ラヌギノサ・セルラーゼ遺伝子、又はリゾムコル・ミエヘイ・リパーゼ遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。酵母宿主細胞のための有用なシグナルペプチドは、S . セレビスシアエ・ - 因子及びS . セレビスシアエ・インバーターゼのための遺伝子から得られる。他の有用なシグナルペプチドコード領域は、Romanosなど., 1992、前記により記載される。しかしながら、選択の宿主細胞の分泌路中に発現された酵素を方向づけることができるいづれかのシグナルペプチドコード領域が、本発明に使用され得る。

本発明の核酸構造体はまた、第1の洗浄脂肪分解酵素の発明において好都合である1又は複数の因子、たとえば活性化因子(たとえばトランス-作用因子)、シャペロン及びプロセッシングプロテアーゼをコードする1又は複数の核酸配列を含んで成る。1又は複数のそれらの因子をコードする核酸は、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列と組をなす必要はない。活性化因子は、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列の転写を活性化するタンパク質である(Kudlaなど., 1990, EMBO Journal 9 : 1355-1364 ; Jarai and Buxton, 1994, Current Genetics 26 : 2238-244 ; Verdier, 1990, Yeast 6 : 271-297 )。活性化因子をコードする核酸配列は、B . ステアロサーモフィラスNprA (nprA)、S . セレビスシアエ・ヘム活性化因子タンパク質1 (hap1)、S . セレビスシアエ・ガラクトース代謝タンパク質4 (gal4)、及びA . ニジェラン・アンモニア調節タンパク質 (areA) をコードする遺伝子から得られる。さらなる例のためには、Verdier, 1990、前記及びMackenzieなど., 1993, Journal of General Microbiology 139 : 2295-2307を参照のこと。シャペロンは、もう1つのポリペプチドの折たたみを適切に助けるタンパク質である(Hartlなど., 1994, TIBS 19 : 20-25 ; Bergeronなど., 1994, TIBS 19 : 124-128 ; Demolterなど., 1994, Journal of Biotechnology 32 : 179-189 ; Craig, 1993, Science 260 : 1902-1903 ; Gething and Sambrook, 1992, Nature 355 : 33-45 ; Puig and Gilbert, 1994, Journal of Biological Chemistry 269 : 7764-7771 ; Wang and Tsou, 1993, The FASEB Journal 7 : 1515-11157 ; Robinsonなど., 1994, Bio/Technology 1 : 381-384)。シャペロンをコードする核酸配列は、B . サブチリスGroEタンパク質、A . オリザエ・タンパク質ジスルフィド・イソメラーゼ、S . セレビスシアエ・カルネキシン、S . セレビスシアエBiP / GRP78及びS . セレビスシアエHsp70をコードする遺伝子から得られる。さらなる例のためには、Gething and Sambrook, 1992、前記及びHartlなど., 1994、前記を参照のこと。選択の宿主細胞において機能するいづれかの因子が、本発明において使用され得る。

宿主細胞の増殖に関して第1の洗浄脂肪分解酵素の発現の調節を可能にする調節配列を付加することがまた所望される。調節システムの例は、調節化合物の存在を包含する、化学的又は物理的刺激に応じて遺伝子の発現のターン-オン又はターン-オフを引き起こすものである。原核システムにおける調節システムは、lac, tac及びtrpオペレーターシステムを包含する。酵母においては、ADH2システム又はGAL1システムが使用され得る。糸状菌においては、TAKA - アミラーゼ・プロモーター、A . ニガー・グルコアミラーゼ・プロモーター及びA . オリザエ・グルコアミラーゼ・プロモーターが、調節配列として使用され得る。調節配列の他の例は、遺伝子増幅を可能にするものである。真核システムにおいては、それらは、メトトレキセートの存在下で増幅されるジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、及び重金属により増幅されるメタロチオネイン遺伝子を包含する。それらの場合、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列は、調節配列と組をなして配置されるであろう。

#### 発現ベクター

本発明はまた、本発明の核酸配列、プロモーター、及び転写及び翻訳停止シグナルを含ん

で成る組換え発現ベクターにも関する。上記の種々の核酸及び制御配列は、一緒に連結され、1又は複数の便利な制限部位で第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列の挿入又は置換を可能にするためにそのような部位を含むことができる組換え発現ベクターが生成される。他方、本発明の核酸配列は、発現のための適切なベクター中に、前記核酸配列又はその配列を含んで成る核酸構造体を挿入することによって発現され得る。発現ベクターを創造する場合、コード配列は、そのコード配列が発現及びたぶん分泌のための適切な制御配列により操作可能的に連結されるようベクターに配置される。

組換え発現ベクターは、組換えDNA方法に便利にゆだねられ得、そして核酸配列の発現をもたらすことができるいづれかのベクターであり得る。ベクターの選択は典型的には、ベクターが導入される予定である宿主細胞と前記ベクターとの適合性に依存するであろう。ベクターは、線状又は閉じられた環状プラスミドであり得る。ベクターは、自主的に複製するベクター、すなわち染色体外実在物（この複製は染色体複製とは無関係である）；たとえばプラスミド、染色体外要素、ミニ染色体又は人工染色体として存在するベクターであり得る。ベクターは、自己複製を確かにするためのいづれかの手段を含むことができる。他方、ベクターは、宿主細胞中に導入される場合、ゲノム中に組込まれ、そしてそれが組込まれている染色体と一緒に複製されるベクターであり得る。ベクター系は、宿主細胞のゲノム中に導入される全DNA、又はトランスポリゾンと一緒に含む、単一のベクター又はプラスミド、又は複数のベクター又はプラスミドであり得る。

本発明のベクターは好ましくは、形質転換された細胞の容易な選択を可能にする1又は複数の選択可能マーカーを含む。選択マーカーは、殺生物剤又はウィルス耐性、重金属に対する耐性、原栄養性～栄養要求性、及び同様のものを提供する生成物の遺伝子である。細菌選択可能マーカーの例は、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、たとえばアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール又はテトラサイクリン耐性を付与するマーカーである。ときおり使用される哺乳類マーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子である。酵母宿主細胞のための適切なマーカーは、 $ADE2$ 、 $HIS3$ 、 $LEU2$ 、 $LYS2$ 、 $MET3$ 、 $TRP1$ 及び $URA3$ である。糸状菌宿主細胞への使用のための選択可能マーカーは、 $amdS$ （アセトアミダーゼ）、 $argB$ （オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、 $bar$ （ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ）、 $hygB$ （ヒグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ）、 $niaD$ （ニトレート・レダクターゼ）、 $pyrG$ （オロチジン - 5 - リン酸デカルボキシラーゼ）、 $sC$ （スルフェート・アデニルトランスフェラーゼ）、 $trpC$ （アントラニレート・シンターゼ）及びグルホシネート耐性マーカー、並びに他の種からの同等物を包含する群から選択され得るが、但しこれらだけには、限定されない。アスペルギラス細胞への使用のためには、A. ニジェランス又はA. オリザエの $amdS$ 及び $pyrG$ マーカー、及びストレプトマイセス・ヒグロスコピカス（*Streptomyces hygroscopicus*）の $bar$ マーカーが好ましい。さらに、選択は、たとえばWO 91/17243に記載されるように、選択マーカーが別のベクター上に存在する、同時形質転換により達成され得る。

本発明のベクターは、宿主細胞ゲノム中へのそのベクターの安定した組込み、又は細胞のゲノムに無関係な細胞におけるベクターの自主的な複製を可能にする要素を含む。

本発明のベクターは、宿主細胞中に導入される場合、宿主細胞ゲノム中に組込まれ得る。組込みのためには、ベクターは、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列、又は相同又は非相同組換えによるゲノム中へのベクターの安定した組込みのためのベクターのいづれか他の要素に依存する。他方、ベクターは、宿主細胞のゲノム中への相同組換えによる組込みを指図するために追加の核酸配列を含むことができる。その追加の核酸配列は、染色体における正確な位置での宿主細胞ゲノム中へのベクターの組込みを可能にする。正確な位置での組込みの見込みを高めるためには、組込み要素は好ましくは、相同組換えの確率を増強するためにその対応する標的配列に対して高い相同性である、十分な数の核酸、たとえば100～1,500個の塩基対、好ましくは400～1,500個の塩基対、及び最も好ましくは、800～1,500個の塩基対を含むべきである。その組込み要素は、宿主細胞のゲノムにおける標的配列に対して相同であるいづれかの配列であり得る。さらに、その組込み要素

10

20

30

40

50

は、非コード、又はコードの核酸配列であり得る。他方、ベクターは、非相同組換えにより宿主細胞のゲノム中に組込まれ得る。それらの核酸配列は、宿主細胞のゲノムにおける標的配列と相同であるいずれかの配列であり得、又はさらに、非コード又はコードの配列であり得る。

自主複製のためには、ベクターはさらに、問題の宿主細胞においてベクターの自主的複製を可能にする複製起点を含んで成る。複製の細菌起点の例は、プラスミドpBR322, pUC19, pACYC177, pACYC184, pUB110, pE194, pTA1060及びpAM 1の複製の起点である。酵母宿主細胞への使用のための複製の起点の例は、複製の2ミクロン起点、CEN 6及びARS 4の組合せ、及びCEN 3及びARS 1の組合せである。複製起点は、宿主細胞においてその機能を感じ性にする突然変異を有するものであり得る（たとえば、Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433を参照のこと）。

本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする核酸配列の1つ以上のコピーが、核酸配列の発現を増幅するために宿主細胞中に導入され得る。核酸配列の安定した増幅は、当業界において良く知られた方法を用いて、宿主細胞ゲル中に前記配列の少なくとも1つの追加のコピーを組み込み、そして形質転換体について選択することによって得られる。

本発明の組換え発現ベクターを構成するために上記要素を連結するために使用される方法は、当業者に良く知られている（たとえば、Sambrookなど., 1989、前記を参照のこと）。

#### 宿主細胞

本発明はまた、第1の洗浄脂肪分解酵素の組換え生成に都合良く使用される、本発明の核酸配列を含んで成る組換え宿主細胞にも関する。細胞は好ましくは、本発明の核酸配列を含んで成るベクターにより形質転換され、続いて宿主染色体中へのそのベクターの組み込みを包含する。“形質転換”とは、宿主細胞中への本発明の核酸配列を含んで成るベクターの導入を意味し、その結果、前記ベクターは染色体組み込み体として又は自己複製する染色体外ベクターとして維持される。組み込みは一般的に、核酸配列が細胞に安定して維持される場合、好都合であると思われる。宿主染色体中へのベクターの組み込みは、上記のような相同又は非相同組換えにより生じることができる。

宿主細胞の選択は、第1の洗浄脂肪分解酵素をコードする遺伝子及びその源にひじょうに依存するであろう。さらに、宿主細胞の選択は、しばしば、宿主細胞のタンパク質分解酵素系、及び本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素の生成に対するその影響に依存するであろう。従って、1又は複数のタンパク質分解酵素又は他の酵素プロセッシング手段を欠失している宿主細胞を用いることが所望される。プロテアーゼ欠失の細菌及び菌類（糸状菌及び酵母）宿主細胞は、当業界において良く知られている。本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素がペプチド付加を含む場合、好都合には、宿主は、ペプチド付加に近い部位で修飾された脂肪分解酵素を切断することができる1又は複数のエクソ - プロテアーゼ、又はペプチド付加内で切断することができるプロテアーゼを減じられているか、又はそれを欠失している菌株である。たとえば、その宿主細胞は、トリペプチジル - アミノペプチダーゼ（TPAP）（たとえば、Novo Nordisk A/SからのWO 96/14404を参照のこと）、ジペプチジル - アミノペプチダーゼ（DDAP）、及び/又はKex 2 プロテアーゼ又はKex 2 - 様プロテアーゼを減じられているか又はそれを欠失することができ、そして従って、二塩基部位、たとえば Arg-Arg（RR）を切断することができない。

宿主細胞の他の例は、アルカリプロテアーゼ欠失の又はそれを減じられた宿主細胞、アスパラギン酸プロテアーゼ欠失の宿主細胞（ヨーロッパ特許第429490号）、及びタンパク質分解酵素を欠いている宿主細胞、たとえばWO 93/00925、WO 92/17595、ヨーロッパ特許第341215号、ヨーロッパ特許第574347号及びPCT/DK96/00111に記載される宿主細胞を包含する。

宿主細胞は単細胞微生物、又は非単細胞微生物であり得る。有用な単細胞は、細菌細胞、たとえばグラム陽性細菌、たとえばバシラス細胞、たとえばB. サブチリス、B. リケニホルミス、B. レンタス、B. プレビス、B. ステアロサーモフィラス、B. アルカロフィラス、B. アミロリクエファシエンス、B. コアグランス、B. サーキュランス、B.

10

20

30

40

50

ラウタス、B. メガテリウム、及びB. トリンギエンシス、又はストレプトマイセス細胞、たとえばS. リピダンス又はS. ムリナス、又はグラム陰性細菌、たとえばE. コリ及びシュードモナスsp. (特に、細菌性脂肪分解酵素、たとえばシュードモナスsp. 酵素が生成される予定である場合)であるが、但しそれらだけには限定されない。細菌宿主の形質転換は、たとえばプロトプラスト形質転換(たとえば、Chang and Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115)により、コンピテント細胞の使用(たとえば、Young and Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829、又はDubnar and Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221)により、エレクトロポレーション(たとえば、Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751)により、又は接合(たとえば、Koehler and Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5171-5278)によりもたらされ得る。

10

宿主細胞は、真核生物であり、そして好ましくは菌類、すなわち特に真核起源の変性された脂肪分解酵素の生成のためには、酵母細胞又は糸状菌細胞であり得る。

“酵母”とは、本明細書において使用される場合、子ノウ胞子性酵母(エンドマイセタール(Endomycetales))、担子胞子性酵母、及び不完全菌類(ブラストマイセテス(Blastomycetes))に属する酵母を包含する。子ノウ胞子性酵母は、2種のスペルモプソラセアエ(Spermophthoraceae)及びサッカロミセタセアエ(Saccharomycetaceae)科に分割される。後者は、4種の亜科、すなわちシゾサッカロミコイデアエ(Schizosaccharomycoidae)(たとえば、シゾサッカロミセス(Schizosaccharomyces)属)、ナドソニオイデアエ(Nadsonioideae)、リボマイコイデアエ(Lipomycoideae)及びサッカロマイコイデアエ(Saccharomycoidae)(たとえばピチア(Pichia)、クルイペロミセス(Kluyveromyces)及びサッカロミセス(Saccharomyces)属)から成る。担子胞子性酵母は、ロイコスポリジウム(Leucosporidium)、ロードスポリジウム(Rhodosporidium)、スポリジオボラス(Sporidiobolus)、フィロバシジウム(Filobasidium)及びフィロバシジエラ(Filobasidiella)属を包含する。不完全菌類に属する酵母は、2種の科、すなわちスポロボロマイセタセアエ(Sporobolomycetaceae)(たとえばソロボロマイセス(Sorobolomyces)及びブレラ(Bullera)属)及びクリプトコカセアエ(Cryptococcaceae)(たとえばカンジダ(Candida)属)に分割される。酵母の分類は未来においては変化するので、本発明のためには、酵母は、Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S. M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1989)

20

30

に記載されるように定義されるであろう。酵母の生物学及び酵母遺伝学の操作は当業界において良く知られている(たとえば、Biochemistry and Genetics of Yeast, Bacil, M., Horecker, B.J., and Stepani, A.O.M., editors, 2nd edition, 1987; The Yeasts, Rose, P.H., and Harrison, J.S., editors, 2nd edition, 1987; 及びThe Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Strathernなど., editors, 1981を参照のこと)。本発明に関して、もう1つのタンパク質分解酵素プロセッシング系、たとえば細菌及び糸状菌を典型的には有する酵母細胞の使用は、問題の親脂肪分解酵素の天然のプロ配列の一部又はすべてを、ペプチド付加物として含んで成る変性された脂肪分解酵素を調製するために特に好都合である。菌類宿主細胞が酵母細胞(たとえば、親酵素のプロ配列の一部又は完全な形でペプチド付加を適用することに使用されるべき)である場合、その酵母細胞は、カンジダ、クルイペロミセス、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、ピチア、又はヤロウシア(Yarrowia)の種の細胞、たとえばS. セレピシアエ細胞、S. スカルスベルゲンシス(S. scarlbergensis)細胞、S. ジアスタチカス(S. diastaticus)細胞、S. ドウグラシ(S. douglasii)細胞、S. クレイビリ(S. kluyveri)細胞)、S. ノルベンシス(S. norbensis)細胞、又はS. オビホルミス(S. oviformis)細胞であり得る。

40

本明細書において使用されるような“菌類(Fungi)”とは、アスコマイコタ(Ascomycota)、バシジオマイコタ(Basidiomycota)、キトリジオマイコタ(Chytridiomycota)、及びズイゴマイコタ(Zygomycota)(Hawksworthなど., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UKにより定義されるような)、並びにオーマイコタ(Oomycota)(Hawksworth

50

など., 1995、前記、171p) に引用されるような)、及びすべての栄養胞子菌類 (Hawsworth など., 1995、前記) を包含する。アスコマイコタの代表的なグループは、たとえばニューロスボラ (Neurospora)、ユーペニシリアム (Eupenicillium) (= ペニシリアム)、エメリセラ (Emericella) (= アスペルギラス)、ユーロチウム (Eurotium) (= アスペルギラス)、及び上記に列挙される真の酵母を包含する。バシジオマイコタの例は、マッシュルーム、サビ菌及び黒穂菌を包含する。キトリジオマイコタの代表的なグループは、たとえばアロマイセス (Allomyces)、ブラストクラジエラ (Blastocladiella)、コエロモマイセス (Coelomomyces) 及び水性菌を包含する。オーマイコタの代表的なグループは、たとえばサプロレグニオマイセトアス (Saprolegniomycetous) 水性菌 (水カビ)、たとえばアキリヤ (Achlya) を包含する。栄養胞子菌の例は、アスペルギラス、ペニシリアム、カンジダ及びアルテルナリアを包含する。ズイゴマイコタの代表的なグループは、たとえばリゾパス及びムコルを包含する。

“糸状菌 (Filamentous fungi)” は、ユーマイコタ (Eumycota) 及びオーマイコタのすべての糸状形を包含する (Hawsworth など., 1995、前記により定義されるような)。糸状菌は、キチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン及び他の複雑な多糖類から構成される活性菌糸体により特徴づけられる。栄養増殖 (vegetative growth) は、菌糸の伸長によってであり、そして炭素異化は通性好気性である。対照的に、酵母、たとえばサッカロミセス・セレビシアエによる栄養増殖は、単細胞性葉状体 (unicellular thallus) の出芽によってであり、そして炭素異化は発酵的であり得る。

好ましい態様において、菌類宿主細胞は、糸状菌細胞である。より好ましい態様においては、糸状菌宿主細胞は、アクレモニウム、アスペルギラス、フサリウム、ヒュミコラ、マイセリオブソラ、ムコル、ニューロスボラ、ペニシリアム、チエラピア、トリボクラジウム及びトリコダーマの種の細胞であるが、但し、これらだけには限定されない。さらにより好ましい態様においては、糸状菌宿主細胞はアスペルギラス細胞である。さらにより好ましい態様においては、糸状菌宿主細胞はフサリウム細胞である。最も好ましい態様においては、糸状菌宿主細胞は、A. オリザエ細胞、A. ニガー細胞、A. フォエチダス (A. foetidus) 細胞又は A. ジャポニカス (A. japonicus) 細胞である。さらに最も好ましい態様においては、糸状菌宿主細胞は、フサリウム・オキシスポラム細胞又は F. グラミネアラム (F. graminearum) 細胞である。

菌類細胞は、プロトプラスト形成、前記プロトプラストの形質転換、及び細胞壁の再生を包含する方法により形質転換され得る。アスペルギラス宿主細胞の形質転換のための適切な方法は、ヨーロッパ特許第238023号及びYelton など., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474に記載されている。フサリウム種を形質転換する適切な方法は、Malardier など., 1989, Gene 78: 147-156又はWO 96/00787により記載されている。酵母は、Becker and Guarente, In Abelgon, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide of Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito など., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; 及びHinnen など., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920により記載される方法を用いて形質転換され得る。哺乳類細胞は、Graham and Van der Eb (1978, Virology 52: 546) のリン酸カルシウム沈殿法を用いての直接的な取込みにより形質転換され得る。

#### 製造方法

本発明はまた、(a) 本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素の発現の助けとなる条件下で前記酵素をコードするDNA配列により形質転換された宿主細胞を培養し、そして(b) 前記第1の洗浄脂肪分解酵素を回収することを含んで成る、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素を製造するための方法にも関する。

宿主細胞は、当業界において知られている方法を用いて第1の洗浄脂肪分解酵素の生成のために適切な栄養培地において培養され得る。たとえば、前記細胞は、変性された脂肪分解酵素の発現及び/又は単離を可能にする条件下で及び適切な培地において実施される実験室用又は産業用発酵器における振盪フラスコ培養、小規模又は大規模発酵 (連続、バッ

10

20

30

40

50

チ、供給バッチ、又は固体状態発酵を包含する)により培養され得る。培養は、当業界において知られている方法を用いて、炭素及び窒素源、及び無機塩を含んで成る適切な栄養培地において行なわれる(たとえば、細菌及び酵母についての文献; Bennett, J.W. and LaSure, L., editors, *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991を参照のこと)。適切な培地は商業的な供給者から入手でき、又は公開された組成に従って調製され得る(たとえば、American Type Culture Collectionのカatalogにおける)。第1の洗浄脂肪分解酵素が栄養培地中に分泌される場合、その脂肪分解酵素は培地から直接的に回収され得る。第1の洗浄脂肪分解酵素が分泌されない場合、それは細胞溶解物から回収される。

得られる第1の洗浄脂肪分解酵素は当業界において知られている方法により回収され得る。たとえば、第1の洗浄脂肪分解酵素は、従来の方法、たとえば遠心分離、濾過、抽出、噴霧乾燥、蒸発又は沈殿(但し、これらだけには限定されない)により栄養培地から回収され得る。次に、回収された、第1の洗浄脂肪分解酵素は、種々のクロマトグラフィー方法、たとえばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過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又は同様のものにより、さらに精製され得る。

本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、当業界において知られている種々の方法、たとえばクロマトグラフィー(たとえば、イオン交換、アフィニティー、疎水性、クロマトフォーカシング及びサイズ排除)、電気泳動法(たとえば分離用等電点電気泳動(IEF)、示差溶解性(たとえば、硫酸アンモニウム沈殿)、又は抽出(但し、これらだけには限定されない)により精製される(たとえば、Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989を参照のこと)。

本発明によれば、第1の洗浄脂肪分解酵素に、変性された酵素の効果的な精製を可能にする1又は複数の荷電されたアミノ酸を適用することが企画される。それを行なうための技法は、分子生物学の当業者に良く知られている。

宿主細胞、培養条件、及び/又は回収条件が好ましくは選択され、その結果、親酵素のブレ、プロ又はブレプロ-形の部分的プロセッシングが生ぜしめられ、その結果、生成された、変性された酵素分子の少なくとも5%、たとえば少なくとも10%、たとえば少なくとも15%、たとえば少なくとも20%、たとえば少なくとも25%、たとえば少なくとも50%又は少なくとも75%が、所望の、たとえば完全なブレ配列又はその実質的な部分を含んで成る。

本発明の酵素組成物

さらなる観点において、本発明は、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素を含んで成る酵素組成物に関する。

本明細書で定義される場合、“実質的に純粋な”酵素は、SDS-PAGEにより決定される場合、他の相同汚染物(第1の洗浄脂肪分解酵素と同じ源に起因する)を実質的に有さない、たとえば少なくとも約20%の純度、好ましくは少なくとも約40%の純度、より好ましくは約60%の純度、さらにより好ましくは約80%の純度、最とも好ましくは約90%の純度、及びさらに最とも好ましくは約95%の純度を有する酵素である。

本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素がペプチド付加を含む場合、与えられた宿主細胞により発現される第1の洗浄脂肪分解酵素分子のすべてが同じ切断部位でプロセッシングされるとは限らないことが見出れた。これは、そのような宿主細胞による発酵から回収された第1の洗浄脂肪分解酵素生成物が、十分な長さのペプチド付加物を有する部分、及びペプチド付加の一部のみを有する1又は複数の他の部分を含んで成る結果を有する。本発明者は、これが洗浄性能に実質的に影響を与えないことを見出した。結果的に、本発明の酵素組成物中の脂肪分解酵素のすべては十分な長さのペプチド付加を保持するとは限らない場合でさえ、その酵素組成物は第1の洗浄効果をまだ付与することができる。実際、ペプチド付加を含む本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素の合計量の少なくとも約5%が上記で開示されたような損なわれていないペプチド付加を有する限り、これは所望する第1の洗浄効果を提供するのに十分であることが見出された。次に、第1の洗浄脂肪分解酵素分子の残る部分は、意図される付加物よりも短いペプチド付加を有する(たとえば、1又は複数のア

10

20

30

40

50



ミノ酸残基が宿主細胞による酵素のプロセッシングの間、切断されるゆえに)。従って、本発明の酵素組成物は、その十分な長さの付加物を有する第1の洗浄脂肪分解酵素の少なくとも約5%、好ましくは少なくとも約10%、たとえば少なくとも約25%、良好には少なくとも約50%、特に少なくとも約75%を単に含む必要がある。

前記酵素組成物はさらに、プロテアーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ及び/又はリパーゼから成る群から選択された酵素、及び洗浄のために意図される場合、洗剤組成物に通常使用される成分を含むことができる。

洗剤の開示

#### 界面活性剤系

本発明の洗剤組成物は、非イオン性及び/又はアニオン性及び/又はカチオン性及び/又は両性及び/又は両性イオン性及び/又は半極性界面活性剤から選択され得る界面活性剤系を含んで成る。

10

界面活性剤は典型的には、0.1~60重量%のレベルで存在する。

界面活性剤は、好ましくは、組成物に存在する酵素成分と適合できるように配合される。液体又はゲル組成物において、界面活性剤は最も好ましくは、それがそれらの組成物におけるいくつかの酵素の安定性を促進し、又は少なくとも分離しないように配合される。本発明に従って使用されるべき好ましい界面活性剤系は、本明細書に記載される1又は複数の非イオン性及び/又はアニオン界面活性剤を界面活性剤として含んで成る。

非イオン性洗剤界面活性剤は通常、たとえばアルキル基が約6~約12個の炭素原子を含むアルキルフェノール、個々のアルキル基が6~12個の炭素原子を含むジアルキルフェノール、好ましくは8~20個の炭素原子を有する第一、第二又は第三脂肪族アルコール(又はそのアルキル-キャップド誘導体)、アルキル基に10~約24個の炭素原子を有するモノカルボン酸、及びポリオキシプロピレンに由来する有機疎水性グループと化学的組合しての水可溶性ポリアルコキシレン又はモノ-又はジアルカノールアミドグループから成る。脂肪酸基のアルキル基が10~約20個の炭素原子を含み、そしてアルキロイル基が1~3個の炭素原子を有する脂肪酸モノ-及びジアルカノールアミドもまた通常である。任意には、モノ-及びジアルカノールアミド誘導体のいくつかにおいて、後者のグループ及び分子の疎水性部位を連結するポリオキシアルキレン成分が存在することができる。すべてのポリアルコキシレン含有界面活性剤においては、ポリアルコキシレン成分は好ましくは、2~20個のグループの酸化エチレン、又は酸化エチレン及び酸化プロピレングループから成る。

20

30

アルキルフェノールの酸化ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリブチレン縮合物は、本発明の界面活性剤システムの非イオン性界面活性剤としての使用のために適切であり、そして酸化ポリエチレン縮合物が好ましい。それらの化合物は、約6~約14個の炭素原子、好ましくは約8~約14個の炭素原子を含むアルキル基を直鎖又は枝分れ鎖の形状で有するアルキルフェノールとアルキレンオキサイドとの縮合組成物を包含する。好ましい態様においては、酸化エチレンは、アルキルフェノール1モル当たり、約2~約25モル、より好ましくは約3~約15モルの酸化エチレンに等しい量で存在する。このタイプの市販の非イオン性界面活性剤は、GAF Corporationから市販されているIgepal<sup>TM</sup> CO-630; 及びRphm & Haas Companyから市販されている、Triton<sup>TM</sup> X-45, X-114, X-100及びX-102を包含する。

40

第一及び第二脂肪族アルコールと約1~約25モルの酸化エチレンとの縮合生成物は、本発明の非イオン性界面活性剤システムの非イオン性界面活性剤としての使用のために適切である。脂肪族アルコールのアルキル鎖は、直鎖又は枝分れ鎖、一次又は二次のいずれかであり得、そして一般的には、約8~約22個の炭素原子を含む。約8~約20個の炭素原子、より好ましくは約10~約18個の炭素原子を含むアルキル基を有するアルコールと、アルコール1モル当たり約2~約10モルの酸化エチレンとの縮合生成物が好ましい。アルコール1モル当たり約2~約7モルの酸化エチレン及び最も好ましくは、2~5モルの酸化エチレンが、前記縮合生成物に存在する。このタイプの市販の非イオン性界面活性剤の例は

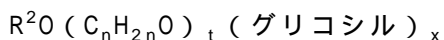
50

、Tergitol<sup>TM</sup> 15-S-9 (C<sub>11</sub> - C<sub>15</sub>の線状アルコールと9モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、Tergitol<sup>TM</sup> 24-L-6 NMW (C<sub>12</sub> - C<sub>14</sub>の一次アルコールを狭い分子量分布を有する6モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、両者ともUnion Carbide Corporationにより市販されている; Neodal<sup>TM</sup> 45-9 (C<sub>14</sub> - C<sub>15</sub>の線状アルコールと9モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、Neodal<sup>TM</sup> 23-3 (C<sub>12</sub> - C<sub>13</sub>の線状アルコールと3モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、Neodal<sup>TM</sup> 45-7 (C<sub>14</sub> - C<sub>15</sub>の線状アルコールと7モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、Neodal<sup>TM</sup> 45-5 (C<sub>14</sub> - C<sub>15</sub>の線状アルコールと5モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、これらはShell Chemical Companyにより市販されている; Kyro<sup>TM</sup> EOB (C<sub>13</sub> - C<sub>15</sub>のアルコールと9モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、The Procter & Gamble Companyにより市販されている; 及びGenapol LA 050 (C<sub>12</sub> - C<sub>14</sub>のアルコールと5モルの酸化エチレンとの縮合生成物)、Hoechstにより市販されている; を包含する。それらの生成物におけるHLBの好ましい範囲は、8~11であり、そして最も好ましくは、8~10である。

本発明の洗剤組成物は、少なくとも25個の酸化アルキレン基、好ましくは少なくとも50個の酸化アルキレン基、及びより好ましくは少なくとも80個の酸化アルキレン基を含むアルコキシ化された脂肪族アルコールである非イオン性材料を含んで成る。約6~約30個の炭素原子、好ましくは約10~約16個の炭素原子を含む疎水性基、及び多糖類、たとえば約1.3~約10、好ましくは約1.3~約3、最も好ましくは約1.3~約2.7のサッカリド単位を含むポリグリコシド親水性基を有する、アメリカ特許第4,565,647号に開示されるアルキルポリサッカリドである。5又は6個の炭素原子を含むいづれかの還元サッカリドを使用され得、たとえばグルコース、ガラクトース及びガラクトシル成分がグルコシル成分により置換され得る(任意には、疎水性基が2-, 3-, 4-, 等の位置で結合され、従って、グルコシド又はガラクトシドとは対照的にグルコース又はガラクトースを付与する)。サッカリド間結合は、たとえば、追加のサッカリド単位の1つの位置と前方のサッカリド単位上の2-, 3-, 4-及び/又は6-位置との間で存在することができる。

もう1つの有用な非イオン性界面活性剤は、WO 95/10524に記載されるように、6~24個の炭素原子の直鎖又は枝分れ鎖の飽和又は不飽和脂肪族鎖を有し、任意には芳香族、脂環式、混合された芳香族-脂肪族又はポリアルキルオキシアルキル基を含む、ウロン酸、ウロン酸塩、又はウロン酸ラクトン又はポリウロン酸のグリコシドである。

好ましいアルキルポリグリコシドは、下記式:



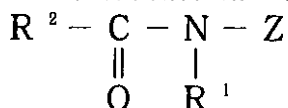
[式中、R<sup>2</sup>はアルキル、アルキルフェニル、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルキルフェニル、及びそれらの混合物から選択され、ここで前記アルキル基は約10~約18個、好ましくは約12~約14個の炭素原子を含み; nは2又は3、好ましくは2であり; tは0~約10、好ましくは0であり; そしてxは約1.3~約10、好ましくは約1.3~約3、最も好ましくは約1.3~約2.7である]を有する。グリコシルは好ましくは、グルコースから誘導される。それらの化合物を調製するためには、アルコール又はアルキルポリエトキシアルコールがまず形成され、そして次に、グルコース、又はグルコースの源と反応せしめられ、グルコシド(1-位置での結合)が形成される。次に、追加のグリコシル単位は、それらの1-位置と前方のグリコシル単位2-, 3-, 4-及び/又は6-位置、好ましくは優先的には2-位置との間に結合され得る。

酸化プロピレンとプロピレングリコールとの縮合により形成される疎水性基材と酸化エチレンとの縮合生成物はまた、本発明の追加の非イオン性界面活性剤システムとしての使用のために適切である。それらの化合物の疎水性部分は好ましくは、約1500~約1800の分子量を有し、そして水不溶性を示すであろう。この疎水性部分へのポリオキシエチレン成分の付加は、分子の水溶解性を全体として高める傾向があり、そして生成物の流体特徴は、ポリオキシエチレン含有率が縮合生成物の合計重量の約50%である点まで(これは、約40モルまでの酸化エチレンとの縮合に対応する)保持される。このタイプの化合物の例は、BASFにより市販されているPluronic<sup>TM</sup>界面活性剤を包含する。

酸化プロピレンとエチレンジアミンとの反応に起因する生成物を酸化エチレンとの縮合生

成物もまた、本発明の非イオン性界面活性剤システム中の非イオン性界面活性剤としての使用のために適切である。それらの生成物の疎水性成分は、エチレンジアミン及び過剰の酸化プロピレンの反応生成物から成り、そして一般的には、約2500～約3000の分子量を有する。この疎水性成分は、その縮合生成物が約40～約80重量%のポリオキシエチレンを含み、そして約5,000～約11,000の分子量を有する程度まで酸化エチレンにより縮合される。このタイプの非イオン性界面活性剤の例は、BASFにより市販されているTetronic™化合物を包含する。

アルキルフェノールの酸化ポリエチレン縮合者、第一及び第二脂肪族アルコールと約1～約25モルの酸化エチレンとの縮合生成物、アルキルポリサッカリド、及びそれらの混合物は、本発明の界面活性剤システムの非イオン性界面活性剤としての使用のために適切である。3～15個のエトキシ基を有するC<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>のアルキルフェノールエトキシレート、及び2～10個のエトキシ基を有するC<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>のアルコールエトキシレート（好ましくは平均約10個の炭素原子）、及びそれらの混合物が最も好ましい。ひじょうに好ましい非イオン性界面活性剤は、下記一般式：



〔式中、R<sup>1</sup>はHであり、又はR<sup>1</sup>はC<sub>1-4</sub>ヒドロカルビル、2-ヒドロキシエチル、2-ヒドロキシプロピル又はそれらの混合物であり、R<sup>2</sup>はC<sub>5-31</sub>ヒドロカルビルであり、Zは線状ヒドロカルビル鎖に直接的に結合される少なくとも3個のヒドロキシルを有する前記鎖を有するポリヒドロキシカルビル、又はそのアルコキシ化された誘導体である〕で表わされるポリヒドロキシ脂肪酸アミド界面活性剤である。好ましくは、R<sup>1</sup>はメチルであり、R<sup>2</sup>は直鎖のC<sub>11-15</sub>アルキル又はC<sub>16-18</sub>アルキル又はアルケニル鎖、たとえばココナッツアルキル、又はそれらの混合物であり、そしてZは還元性アミノ化反応において還元糖、たとえばグルコース、フルクトース、マルトース、ラクトースから誘導される。少なくとも6の平均アルコキシ化程度を有するアルコキシ化された非イオン性界面活性剤及びANR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>（ここで、Aはアルドピオン酸である糖成分であるが、但し、それはアルドシ酸上のカルボニル基から通常延長するOH基を含まない）の構造のアルドピオンアミドを含んで成る非イオン性界面活性剤システムは本発明において適切である。NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>は、アルドピオン酸上のヒドロキシル基が通常見出される場所に結合される。R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>は、同じであっても又は異なっても良く、水素原子、脂肪族炭化水素基、芳香族基、脂環式基、アミノ酸エステル、又はエーテルアミンである。R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、WO 95/2770に記載されるように両者とも水素原子ではあり得ない。

他のいわゆる非イオン性洗剤化合物は、長鎖の第三アミノオキシド、長鎖の第三オスフィンオキシド及びジアルキルスルホキシドを包含する。

ひじょうに好ましいアニオン性界面活性剤は、アルキルアルコキシ化されたスルフェート界面活性剤を包含し、式RO(A)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub>M（ここでRは置換されていないC<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>アルキル、又はC<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>アルキル成分、好ましくはC<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>アルキル又はヒドロキシアルキル、より好ましくは、C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>アルキル又はヒドロキシアルキルを有するヒドロキシアルキル基であり、Aはエトキシ又はプロポキシ単位であり、mはゼロよりも大きく、典型的には約0.5～約6、より好ましくは約0.5～約3であり、そしてMはH又はカチオン、たとえば金属カチオン（たとえば、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、等）、アンモニウム又は置換されたアンモニウムカチオンである）で表わされる水可溶性塩又は酸である。アルキルエトキシ化されたスルフェート及びアルキルプロポキシ化されたスルフェートが本明細書において企画される。置換されたアンモニウムカチオンの特定の例は、メチル-、ジメチル-トリメチル-アンモニウムカチオン及び第四アンモニウムカチオン、たとえばテトラメチル-アンモニウム及びジメチルピペルジニウムカチオン、及びアルキルアミンから誘導されたもの、たとえばエチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、それらの混合物、及び同様のものを包含する。代表的な界面活性剤は、C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>アルキルポリエトキシレート（1.0）スルフェート（C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>E

10

20

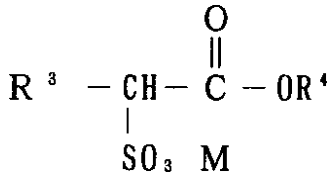
30

40

50

(1.0) M)、 $C_{12} - C_{18}$ アルキルポリエトキシレート(2.25)スルフェート( $C_{12} - C_{18}$ (2.25) M)、及び $C_{12} - C_{18}$ アルキルポリエトキシレート(3.0)スルフェート( $C_{12} - C_{18}E$ (3.0) M)、並びに $C_{12} - C_{18}$ アルキルポリエトキシレート(4.0)スルフェート( $C_{12} - C_{18}E$ (4.0) M)(ここで、Mは便利には、ナトリウム及びカリウムから選択される)である。使用される適切なアニオン性界面活性剤は、アルキルエステルスルホネート界面活性剤、たとえば“The Journal of the American Oil Chemists Society”, 52(1975), pp.323-329に従って、気体 $SO_3$ によりスルホン化される $C_8 - C_{20}$ カルボン酸(すなわち、脂肪分解)の線状エステルである。適切な開始材料は、牛脂、ヤシ油、等に由来する天然の脂肪物質を包含する。

特に洗濯用途のための好ましいアルキルエステルスルホネート界面活性剤は、下記構造式



[式中、 $R^3$ は $C_8 - C_{20}$ ヒドロカルビル、好ましくはアルキル、又はそれらの組合せであり、 $R^4$ は $C_1 - C_6$ ヒドロカルビル、好ましくはアルキル、又はそれらの組合せであり、そしてMはアルキルエステルスルホネートと水溶性塩を形成するカチオンである]で表わされるアルキルエステルスルホネート界面活性剤を含んで成る。適切な塩形成カチオンは、金属、たとえばナトリウム、カリウム、及びリチウム、及び置換された又は置換されていないアンモニウムカチオン、たとえばモノエタノールアミン、ジエタノールアミン及びトリエタノールアミンを包含する。好ましくは、 $R^3$ は $C_{10} - C_{16}$ であり、そして $R^4$ は、メチル、エチル又はイソプロピルである。 $R^3$ が $C_{10} - C_{16}$ アルキルであるメチルエステルスルホネートが特に好ましい。

他の適切なアニオン性界面活性剤は、式 $ROSO_3M$ (式中、Rは好ましくは、 $C_{10} - C_{24}$ ヒドロカルビル、好ましくはアルキル又は $C_{10} - C_{20}$ アルキル成分を有するヒドロキシアルキル、より好ましくは $C_{12} - C_{18}$ アルキル又はヒドロキシアルキルであり、そしてMはH又はカチオン、たとえばアルカリ金属カチオン(たとえば、ナトリウム、カリウム、リチウム)、又はアンモニウム又は置換されたアンモニウム(たとえば、メチル - 、ジメチル - 及びトリメチルアンモニウムカチオン及び第四アンモニウムカチオン、たとえばテトラメチル - アンモニウム及びジメチルピペリジウムカチオン、及びアルキルアミン、たとえばエチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、及びそれらの混合物に由来する第四アンモニウムカチオン、及び同様のもの)である)で表わされる水溶性塩又は酸であるアルキルスルフェート界面活性剤を包含する。典型的には、 $C_{12} - C_{16}$ のアルキル鎖が低い洗浄温度(たとえば約50 以下)のために好ましく、そして $C_{16} - C_{18}$ のアルキル鎖が高い洗浄温度(たとえば約50 以上)のために好ましい。

洗浄目的のために有用な他のアニオン性界面活性剤はまた、本発明の洗濯洗剤組成物に含まれ得る。それらは、石鹼の塩(たとえば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、及び置換されたアンモニウム塩、たとえばモノ - 、ジ - 、及びトリエタノールアミン塩)、 $C_8 - C_{22}$ 第一又は第二アルカンスルホネート、 $C_8 - C_{24}$ オレフィンスルホネート、イギリス特許第1,082,179に記載されるようにしてアルカリ土類金属シトレートの熱分解された生成物のスルホン化により調製されたスルホン化されたポリカルボン酸、 $C_8 - C_{24}$ アルキルポリグリコールエーテルスルフェート(10モルまでの酸化エチレンを含む);アルキルグリセロールスルホネート、脂肪アシルグリセロールスルホネート、脂肪オレイルグリセロールスルフェート、アルキルフェノールエチレンオキシドエーテルスルフェート、パラフィンスルホネート、アルキルホスフェート、イセチオネート、たとえばアシルイセチオネート、アルコキシカルボン酸のイセチオネートエステル(WO 95/14661に記載されるような)、N - アシルタウレート、アルキルスクシナメート及びスルホスクシネート、スルホスクシネートのモノエステル(特に飽和及び不飽和 $C_{12} - C_{18}$ モノエステル)及びス

10

20

30

40

50

ルホスクシネートのジエステル（特に飽和及び不飽和  $C_6 - C_{12}$  ジエステル）、アシルサルコシネート、オレオイルサルコシネート、アルキルポリサッカリドのスルフェート、たとえばアルキルポリグリコシドのスルフェート（その非イオン性非スルホネート化合物は下記に記載される）、枝分れした第一アルキルスルフェート、及びアルキルポリエトキシ、カルボキシレート、たとえば式  $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO-M^+$ （式中、 $R$  は  $C_8 - C_{22}$  アルキルであり、 $k$  は 1 ~ 10 の整数であり、そして  $M$  は可溶性塩形成カチオンである）で表わされるものを包含することができる。樹脂酸及び水素化された樹脂酸、たとえばロジン、水素化されたロジン、及びタル油に存在するか又はタル油から誘導された樹脂酸及び水素化された樹脂酸もまた適切である。アルキルベンゼンスルホネート、特に直鎖状アルキルベンゼンスルホネート（LAS）（ここで、アルキル基は 10 ~ 18 個の炭素原子を含む）がひ

10

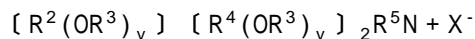
じょうに好ましい。さらなる例は、“Surface Active Agents and Detergents”（Vol. I and II by Schwartz, Perry and Berch）に記載されている。種々のそのような界面活性剤はまた一般的にアメリカ特許第 3,929,678 号（第 23 欄第 58 行 ~ 第 29 欄第 23 行）に開示される。

本明細書に包含される場合、本発明の洗濯洗剤組成物は典型的には、約 1 ~ 約 40 重量%、好ましくは約 3 ~ 約 20 重量%のそのようなアニオン性界面活性剤を含んで成る。

本発明の洗濯洗剤組成物はまた、カチオン性、両性、両性イオン、及び半極性界面活性剤、及び本明細書にすでに記載された以外の非イオン性及び / 又はアニオン性界面活性剤を含むことができる。

本発明の洗濯洗剤組成物への使用のために適切なカチオン性洗浄界面活性剤は、1 つの長鎖のヒドロカルビル基を有するものである。そのようなカチオン性界面活性剤の例は、アンモニウム界面活性剤、たとえばアルキルトリメチルアンモニウムハロゲンイド、及び下記式：

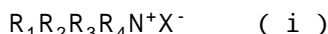
20



〔式中、 $R^2$  はアルキル鎖に約 8 ~ 約 18 個の炭素原子を有するアルキル又はアルキルベンジル基であり、個々の  $R^3$  は、 $-CH_2CH_2-$ 、 $CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH(CH_2OH)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$  及びそれらの混合物から成る群から選択され；個々の  $R^4$  は  $C_1 - C_4$  アルキル、 $C_1 - C_4$  ヒドロキシアルキル、2 つの  $R^4$  基を連結することにより形成されるベンジル環構造体、 $-CH_2CHOHCHOHCO R^6CHOHCH_2OH$ （ここで  $R^6$  はいづれかのヘキソース又は 1000 以下の分子量を有するヘキソースポリマーである）、及び  $y$  が 0 でない場合、水素から成る群から選択され； $R^5$  は  $R^4$  と同じであるか、又はアルキル鎖（ここで炭素原子の合計数又は  $R^2 + R^5$  が約 18 個よりも多くない）であり；個々の  $y$  は 0 ~ 約 10 であり、そして  $y$  値の合計は 0 ~ 約 15 であり；そして  $X$  はいづれかの適合性アニオンである〕で表わされるそれらの界面活性剤を包含する。

30

ひじょうに好ましいカチオン性界面活性剤は、下記式：



〔式中、 $R_1$  は  $C_8 - C_{16}$  アルキルであり、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  の個々は独立して、 $C_1 - C_4$  アルキル、 $C_1 - C_4$  ヒドロキシアルキル、ベンジル及び  $-(C_2H_4O)_xH$ （ここで、 $x$  は 2 ~ 5 の値である）であり、そして  $X$  はアニオンである〕を有する、本発明の組成物において有用な水溶性第四アンモニウム化合物である。1 つよりも多くの  $R_2$ 、 $R_3$  又は  $R_4$  はベン

40

ジルであるべきではない。 $R_1$  のための好ましいアルキル鎖長は  $C_{12} - C_{15}$  であり、特にこの場合、アルキル基はヤシ又はヤシの仁の脂肪に由来する鎖長の混合物であり、又はオレフィン構成又は OXO アルコール合成により合成的に誘導される。

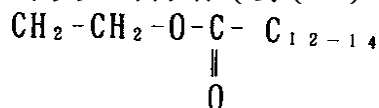
$R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  についての好ましい基は、メチル及びヒドロキシエチル基であり、アニオン性基の  $X$  は、ハリド、メトスルフェート、アセテート及びホスフェートイオンから選択され得る。本発明において使用するための式 (i) の適切な第四アンモニウム化合物の例は、下記のものである：

ヤシトリメチルアンモニウムクロリド又はブロミド；

ヤシメチルジヒドロキシエチルアンモニウムクロリド又はブロミド；

50

デシルトリエチルアンモニウムクロリド；  
 デシジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリド又はブロミド；  
 C<sub>12</sub> - C<sub>15</sub>ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリド又はブロミド；  
 ヤシジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリド又はブロミド；  
 ミリスチルトリメチルアンモニウムメチルスルフェート；  
 ラウリルジメチルベンジルアンモニウムクロリド又はブロミド；  
 ラウリルジメチル(エテノキシ)<sub>4</sub>アンモニウムクロリド又はブロミド；  
 コリンエステル(式(i)の化合物、式中、R<sub>1</sub>は



10

アルキルであり、そしてR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>はメチルである)；

ジアルキルイミダゾリン〔式(i)の化合物〕。

本発明において有用な他のカチオン界面活性剤はまた、アメリカ特許第4,228,044号及びヨーロッパ特許第000224号にも記載される。

本発明に包含される場合、本発明の洗濯洗剤組成物は典型的には、0.2～約25重量%、好ましくは約1～約8重量%のそのようなカチオン性界面活性剤を含んで成る。

両性界面活性剤はまた、本発明の洗濯洗剤組成物への使用のために適切である。それらの界面活性剤は、第二又は第三アミンの脂肪族誘導体、又は複素環式第二及び第三アミンの脂肪族誘導体(ここで、脂肪族基は直鎖又は枝分れ鎖である)として広く記載され得る。

20

脂肪族置換基の1つは、少なくとも8個の炭素原子、典型的には約8～約18個の炭素原子を含み、そしてその少なくとも1つは、アニオン性水溶性基、たとえばカルボキシ、スルホネート、スルフェートを含む。両性界面活性剤の例については、アメリカ特許第3,929,678号(第19欄第18～35行)を参照のこと。

本発明に包含される場合、本発明の洗濯洗剤組成物は典型的には、0.2～約15重量%、好ましくは約1～約10重量%のそのような両性界面活性剤を含んで成る。

両性イオン界面活性剤はまた、洗濯洗剤組成物への使用のために適切である。それらの界面活性剤は、第二及び第三アミンの誘導体、複素環式第二又は第三アミンの誘導体、又は第四アンモニウム、第四ホスホニウム又は第四スルホニウム化合物の誘導体として広く記載され得る。両性イオン界面活性剤の例については、アメリカ特許第3,929,678号(第19

30

欄第38行～第22欄第48行)を参照のこと。

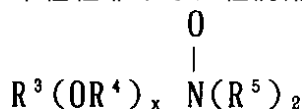
本発明に包含される場合、本発明の洗濯洗剤組成物は典型的には、0.2～約15重量%、好ましくは約1～約10重量%のそのような両性イオン界面活性剤を含んで成る。

半極性非イオン性界面活性剤は、特定のカテゴリーの非イオン性界面活性剤であり、次のものを包含する：約10～約18個の炭素原子の1つのアルキル成分、及びアルキル基及び約1～約3個の炭素原子を含むヒドロキシルアルキル基から成る群から選択された2種の成分を含む水溶性アミノオキシド；約10～約18個の炭素原子の1つのアルキル成分、及びアルキル基及び約1～約3個の炭素原子を含むヒドロキシルアルキル基から成る群から選択された2種の成分を含む水溶性ホスフィンオキシド；及び約10～約18個の炭素原子の1つのアルキル成分、及びアルキル基、及び約1～約3個の炭素原子のヒドロキシルアルキル基から

40

成る群から選択された成分を含む水溶性スルホキシド。

半極性非イオン性洗剤界面活性剤は、下記式：



〔式中、R<sup>3</sup>は約8～約22個の炭素原子を含む、アルキル、ヒドロキシルアルキル又はアルキルフェニル基、又はそれらの混合物であり；R<sup>4</sup>は約2～約3個の炭素原子を含むアルキレン又はヒドロキシルアルキレン基又はそれらの混合物であり；xは0～約3であり；そしてR<sup>5</sup>は約1～約3個の炭素原子を含むアルキル又はヒドロキシルアルキル基、又は約1～約3個の酸化エチレン基を含むポリ酸化エチレンである〕で表わされる酸化アミン界面

50

活性剤を包含する。前記 R<sup>5</sup>基はたとえば環構造体を形成するために、酸素又は窒素原子を通してお互い結合され得る。

それらの酸化アミン界面活性剤は、C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub>アルキルジメチルアミノキシド及びC<sub>8</sub> - C<sub>12</sub>アルコキシエチルジヒドロキシエチルアミノキシドを包含する。

本発明に包含される場合、本発明の洗濯洗剤組成物は、典型的には、0.2～約15重量%、好ましくは約1～約10重量%のそのような半極性非イオン性界面活性剤を含んで成る。

#### ビルダー系

本発明の組成物は、さらにビルダー系を含むことができる。いずれかの従来のビルダー系、たとえばアルミノシリケート材料、シリケート、ポリカルボキシレート及び脂肪酸、エチレンジアミン四酢酸のような材料、金属イオン封鎖剤、たとえばアミノポリホスホネート、特にエチレンジアミンテトラメチレンホスホン酸、及びジエチレントリアミンペンタメチレンホスホン酸は、本発明への使用のために適切である。ホスフェートビルダー、たとえばピロホスフェート、オルトホスフェート又はポリホスフェートがまた、本発明において使用され得る。

適切なビルダーは、無機イオン交換材料、通常、無機の水和化されたアルミノシリケート材料、より特定には、水合化された合成ゼオライト、たとえば水合化されたゼオライトA、X、B、HS又はMAPである。他の適切な無機ビルダー材料は、積層されたシリケート、たとえばSKS-6 (Hoechst) である。SKS-6は、珪酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) から成る結晶性の積層されたシリケートである。

1つのカルボキシ基を含む適切なポリカルボキシレートは、BE831,368, BE821,369及びBE821,370に開示されるような乳酸、グリコール酸及びそれらのエーテル誘導体を包含する。

2つのカルボキシ基を含むポリカルボキシレートは、琥珀酸、マロン酸、(エチレンジオキシ)二酢酸、マレイン酸、ジグリコール酸、酒石酸、タルトロン酸及びフマル酸の水溶性塩、及びデンマーク特許第2,446,686号、デンマーク特許第2,446,487号、アメリカ特許第3,935,257号に記載されるエーテルカルボキシレート、並びにBE840,623に記載されるスルフィニルカルボキシレートを包含する。3個のカルボキシ基を含むポリカルボキシレートは、特に水溶性シトレート、アコニトレート及びシトラコネート、並びにそれらのスクシネート誘導体、たとえばイギリス特許第1,379,241号に記載されるカルボキシメチルオキシスクシネート、ニュージーランド特許出願第7205873号に記載されるラクトキシスクシネート、及びオキシポリカルボキシレート材料、たとえばイギリス特許第1,387,447号に記載される2-オキサ-1,1,3-プロパントリカルボキシレートを包含する。

4個のカルボキシ基を含むポリカルボキシレートは、イギリス特許第1,261,829号に開示されるオキシジスクシネート、1,1,2,2-エタンテトラカルボキシレート及び1,1,3,3-プロパントテトラカルボキシレートを包含する。スルホ置換基を含むポリカルボキシレートは、イギリス特許第1,398,421号及び第1,398,422号、及びアメリカ特許第3,936,448号に開示されるスルホスクシネート誘導体、及びイギリス特許第1,082,179号に記載されるスルホン化された熱分解シトレートを包含し、そしてホスホン置換基を含むポリカルボキシレートは、イギリス特許第1,439,000号に開示される。

脂環式及び複素環式ポリカルボキシレートは、シス、シス-シス-シクロペンタン-テトラカルボキシレート、ペンタカルボキシレートシクロペンタジエン、シス、シス、シス-テトラヒドロフラン-テトラカルボキシレート、シス-テトラヒドロフラン-2,5-ジカルボキシレート、テトラヒドロフラン-2,2,5,5-テトラカルボキシレート、ヘキサ-1,2,3,4,5,6-ヘキサカルボキシレート及び多価アルコール、たとえばソルビトール、マンニトール及びキシリトールのカルボキシメチル誘導体を包含する。芳香族ポリカルボキシレートは、イギリス特許第1,425,343号に開示されるメリット酸、ピロメリット酸及びフタル酸誘導体を包含する。上記のうち、好ましいポリカルボキシレートは、分子当たり3個までのカルボキシ基を含むヒドロキシカルボキシレート、より好ましくはシトレートである。

本発明に使用するための好ましいビルダー系は、水不溶性アルミノシリケートビルダー、たとえばゼオライトA、積層されたシリケート (SKS-6)、及び水溶性カルボキシレート

キレート化剤、たとえばクエン酸の混合物を包含する。

本発明の洗剤組成物への包含のための適切なキレート化剤は、エチレンジアミン - N , N - 二琥珀酸 (EDDS)、又はそのアルカリ金属、アルカリ土類金属アンモニウム、又は置換アンモニウム塩、又はそれらの混合物である。好ましいEDDS化合物は、遊離酸形、及びそのナトリウム又はマグネシウム塩である。EDDSのそのような好ましいナトリウム塩の例は、 $\text{Na}_2\text{EDDS}$ 及び $\text{Na}_4\text{EDDS}$ を包含する。EDDSのそのような好ましいマグネシウム塩の例は、 $\text{MgEDDS}$ 及び $\text{Mg}_2\text{EDDS}$ を包含する。前記マグネシウム塩は、本発明の組成物への包含のために最も好ましいものである。

好ましいビルダー系は、水不溶性アルミノシリケートビルダー、たとえばゼオライト A、及び水溶性カルボキシレートキレート化剤、たとえばクエン酸の混合物を包含する。

粒状組成物への使用のためのビルダー系の一部を形成できる他のビルダー材料は、無機材料、たとえばアルカリ金属の炭酸塩、炭酸水素塩、珪酸塩、及び有機材料、たとえば有機ホスホネート、アミノポリアルキレンホスホネート及びアミノポリカルボキシレートを包含する。

他の適切な水溶性有機塩は、ホモ - 又はコ - ポリマー酸又はそれらの塩であり、ここでポリカルボン酸は、2つよりも多くない炭素原子によりお互い分離される少なくとも2つのカルボキシル基を含んで成る。

このタイプのポリマーはイギリス特許出願第1,596,756号に開示されている。そのような塩の例は、MW 2000 ~ 5000のポリアクリレート、及び無水マレイン酸とのそれらのコポリマー、たとえば20,000 ~ 70,000、特に約40,000の分子量を有するコポリマーである。

洗剤ビルダー塩は通常、組成物において5 ~ 80重量%の量で含まれる。液体洗剤のためのビルダーの好ましいレベルは、5 ~ 30重量%である。

#### 酵素

好ましい洗剤組成物は、本発明の酵素の他に、洗浄性能及び/又は布用保護利点を提供する他の酵素を含んで成る。そのような酵素は、プロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ、オキシダーゼ(たとえばラッカーゼ)を包含する。

プロテアーゼ: アルカリ性溶液における使用のために適切ないづれかのプロテアーゼが使用され得る。適切なプロテアーゼは、動物、植物又は微生物起源のものを包含する。微生物起源が好ましい。化学的に又は遺伝子的に変性された突然変異体が包含される。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ、好ましくはアルカリ性微生物プロテアーゼ又はトリプシン様プロテアーゼであり得る。アルカリプロテアーゼの例は、スブチリシン、特にバシラスに由来するもの、たとえばスブスチリシンNovo、スブチリシンCarlsberg、スブチリシン309、スブチリシン147及びスブチリシン168 (WO 89 / 06279に記載される)。トリプシン様プロテアーゼの例は、トリプシン(たとえば、ブタ又はウシ起源のもの)、及びWO 89 / 06270に記載されるフサリウムプロテアーゼである。好ましい市販のプロテアーゼ酵素は、Alcalase, Savinase, Primase, Durazym及びEsperaseとしてNovo Nordisk A/S (Denmark)により市販されているもの、Maxatase, Maxacal, Maxapem及びProperaseとしてGist-Bracades/Genencorより市販されているもの、及びOpticlean及びOptimaseとしてSolvay Enzymesにより市販されているものを包含する。プロテアーゼ酵素は、組成物の酵素タンパク質の0.0001 ~ 2重量%のレベルで、特に組成物の酵素タンパク質の0.001 ~ 0.1重量%のレベルで本発明の組成物中に導入され得る。

リパーゼ: アルカリ溶液における使用のために適切ないづれかのリパーゼが使用され得る。適切なリパーゼは、細菌又は菌類起源のもの及び化学的に又は遺伝子的に変性されたりパーゼ突然変異体を包含する。

有用なリパーゼの例は、ヨーロッパ特許第258068号及び第305216号に記載されるようなヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼ、及びWO 92 / 05249, WO 94 / 25577及びWO 95 / 22615に記載されるようなそれらの変異体、ヨーロッパ特許238023号に記載されるようなリゾムコル・ミエヘイ・リパーゼ、カンジダ・リパーゼ、たとえばC . アンタルクチカ・リパーゼ、たとえばヨーロッパ特許第214761号に記載されるC . アンタルクチカ・リパーゼA又は

10

20

30

40

50



B、シュードモナス・リパーゼ、たとえばヨーロッパ特許第218272号に記載されるようなP・アルカリゲネス及びP・シュードアルカリゲネス・リパーゼ、又は前記シュードモナス・リパーゼのいずれかの変異体、ヨーロッパ特許第331376号に記載されるようなP・セパシア・リパーゼ、BP第1,372,034号に開示されるようなP・スチュテゼリ・リパーゼ、P・フルオレスセンス・リパーゼ、バシラス・リパーゼ、たとえばB・スブチリス・リパーゼ(Dartoisなど、(1993) Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260)、B・ステアロサーモフィラス・リパーゼ(日本特許64/744992)及びB・ブミラス・リパーゼ(WO 91/16422)を包含する。さらに、多くのクローン化されたリパーゼ、たとえばYamaguchiなど、(1991) Gene 103, 61-67に記載されるようなペニシリアム・カメムベルチ・リパーゼ、ゼオチカム・カンジダム・リパーゼ(Schimada, Y. など、(1989), J. Biochem., 106, 383-388)、及び種々のリゾパス・リパーゼ、たとえばR・デルマル・リパーゼ(Hass, M.J. など、(1991), Gene 109, 117-113)、R・ニベウス・リパーゼ(Kugimiyanaなど、(1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716-719)及びR・オリザエ・リパーゼはまた、有用である。

10

他のタイプの脂肪分解酵素、たとえばクチナーゼ、たとえばWO 88/09367に記載されるようなシュードモナス・メンドシナに由来するクチナーゼ、又はフサリウム・ソラニ・ピシに由来するクチナーゼ(たとえば、WO 90/09446に記載される)もまた有用である。特に適切なリパーゼは、M1 Lipase<sup>TM</sup>、Luma fast<sup>TM</sup>及びLipomax<sup>TM</sup>(Gist-Brocades/Genencor)、Lipolase<sup>TM</sup>及びLipolase Ultra<sup>TM</sup>(Novo Nordisk A/S)、及びLipase P "Amano"(Amano Pharmaceutical Co. Ltd)のようなリパーゼである。

20

リパーゼは通常、洗剤組成物の酵素タンパク質の0.0001~2重量%のレベルで、特に組成物の酵素タンパク質の0.001~0.1重量%のレベルで洗剤組成物に導入される。

アミラーゼ：アルカリ溶液における使用のために適切ないずれかのアミラーゼ(及び/又は)が使用され得る。適切なアミラーゼは、細菌又は菌類起源のものを包含する。化学的に又は遺伝子的に変性された突然変異体も包含される。アミラーゼは、たとえばイギリス特許第1,296,839号に、より詳細に記載される、B・リケニホルミスの特定株から得られる - アミラーゼを包含する。市販のアミラーゼは、Duramyl<sup>TM</sup>、Termamyl<sup>TM</sup>、Fungamyl<sup>TM</sup>及びBAN<sup>TM</sup>(Novo Nordisk A/Sから入手できる)、及びRapidase<sup>TM</sup>及びMaxamyl<sup>IP</sup><sup>TM</sup>(Gist-Brocades/Genencorから入手できる)である。

アミラーゼは通常、洗剤組成物の酵素タンパク質の0.0001~2重量%のレベルで、特に組成物の酵素タンパク質の0.001~0.1重量%のレベルで洗剤組成物に導入される。

30

セルラーゼ：アルカリ溶液における使用のために適切ないずれかのセルラーゼが使用され得る。適切なセルラーゼは、細菌又は菌類起源のものを包含する。化学的に又は遺伝的に変性された突然変異体が包含される。適切なセルラーゼは、ヒュミコラ・インソレンス(Humicola insolens)から生成される菌類セルラーゼを開示するアメリカ特許第4,435,307号に開示される。特に適切なセルラーゼは、色彩保護利点を有するセルラーゼである。そのようなセルラーゼの例は、公開されたヨーロッパ特許出願第0495257号に記載されるセルラーゼである。市販のセルラーゼは、ヒュミコラ・インソレンスの株により生成されるCelluzyme<sup>TM</sup> R (Novo Nordisk A/S)及びKAC-500(B)<sup>TM</sup> R (Kao Corporation)である。

40

前記セルラーゼは通常、洗剤組成物の酵素タンパク質の0.0001~2重量%のレベルで、特に組成物の酵素タンパク質の0.001~0.1重量%のレベルで洗剤組成物に導入される。

ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ：ペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼたとえばラッカーゼが使用され得、ここで前者は、溶液漂白のために、すなわち染色された布がWO 94/12621及びWO 95/01426に記載されるように、洗液において一緒に、好ましくは増強剤と一緒に洗浄される場合、前記布から他の布への繊維用染料の移行を妨げるために、過酸化水素源、たとえばペルカーボネート・ペルボレート又はペルスルフェートと組合して使用される。それらのタイプの適切な酵素は、植物、細菌又は菌類起源のものを包含する。化学的に又は遺伝的に変性された突然変異体が包含される。

前記ペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼ酵素は洗剤組成物の酵素タンパク質の0.00

50

0.1 ~ 2 重量 % のレベルで、特に組成物の酵素タンパク質の0.001 ~ 0.1 重量 % のレベルで洗剤組成物に導入され得る。

上記酵素の混合物、特にプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ及び/又はセルラーゼの混合物が本発明において包含される。

#### 任意の洗剤成分

漂白剤：本発明の洗剤組成物に含まれ得る追加の任意の洗剤成分は、400 ~ 800ミクロンの粒子サイズを有する、過氧化物漂白剤、たとえば過硼酸ナトリウム - 水 ( 1 / 1 )、BP 1、過硼酸ナトリウム ( 1 / 4 )、BP 4 及び炭酸ナトリウム - 過酸化水素 ( 2 / 3 )、ペルカーボネートを包含する。含まれる場合、過氧化物漂白剤は典型的には、約 1 ~ 約25 % のレベルで存在するであろう。

使用され得る化の過氧化物基材の漂白剤は、ペルカルボン酸及びその塩である。このクラスの剤の適切な例は、マグネシウムモルペルオキシフタレート六水和物、メタ - クロロ過安息香酸のマグネシウム塩、4 - ノニルアミノ - 4 - オキソペルオキシ酪酸及びジペルオキシドデカンジオン酸を包含する。そのような漂白剤は、アメリカ特許第4,483,781号、アメリカ特許第740,446号、ヨーロッパ特許第0133354号及びアメリカ特許第4,412,934号に開示される。ひじょうに好ましい漂白剤はまた、アメリカ特許第4,634,551号に開示されるような6 - ノニルアミノ - 6 - オキソペルオキシカプロン酸を包含する。

本明細書での使用のための漂白剤はまた、洗剤組成物に使用するための、当業界において知られている他の漂白剤でもあり得る。

非 - 水性液体洗剤組成物は、ペルオキシ酸材料、たとえば N , N - ジ ( 4 - ペルカルボキシベンゾイル ) エチレンジアミン ( PCBEC )、N , N - テレフタロイル - ジ ( 6 - アミノペルカルボキシカプロン酸 ) ( TPCAP )、N , N - ジ ( 4 - ペルカルボキシベンゾイル ) ピペラジン ( PCBPPI )、N , N - ジ ( 4 - ペルカルボキシベンゾイル ) - 1 , 4 - ジアミノシクロヘキサン ( PCBHEX )、N , N - ジ ( 4 - ペルカルボキシベンゾイル ) - 1 , 4 - ブタンジアミン ( PCBBD )、N , N - ジ ( 4 - ペルカルボキシアニリン ) - テレフタレート ( DPCAT )、N , N , N , N - 1 , 2 , 4 , 5 - テトラカルボキシベンゾイル - ジ ( 6 - アミノペルカルボキシカプロン酸 ( DiPAP )、N , N - ジ ( ペルカルボキシアジボイル ) フェニルジアミン ( DPAPD )、N , N - スクシノイル - ジ ( 4 - ペルカルボキシ ) アニリン ( SDPCA )、WO 95 / 06104に記載されるような N , N - テレフタロイル - ジ ( 8 - アミノペルオキシオクタン酸 ( TPOCT ) の C<sub>3</sub>類似体から成るペルオキシ酸を含むことができる。

使用され得る漂白剤のもう1つのそのようなカテゴリーは、ハロゲン漂白剤を包含する。ヒポハライト - 開放漂白剤の例は、トリクロロイソシアヌル酸、及びナトリウム及びカリウムジクロロイソシアヌレート、及び N - クロロ及び N - ブロモアルカンスルホンアミドを包含する。そのような材料は、通常、最終生成物の0.5 ~ 10 重量 %、好ましくは 1 ~ 5 重量 % で添加される。

特に興味あるさらなるタイプの非ペルオキシダーゼ基材の漂白剤は、光活性化された漂白剤、たとえばスルホン化された亜鉛及び/又はアルミニウムフタロシアニンを包含する。それらの材料は、洗浄工程の間、支持体上に付着され得る。酵素の存在下での光による照射に基づいて、たとえば布を日光下に干すことによって、スルホン化されたフタロシアニン錯体が活性化され、そして結果的に、支持体が漂白される。好ましい亜鉛フタロシアニン錯体及び光活性化された漂白工程はアメリカ特許第4,033,718号に記載される。典型的には、洗剤組成物は、約0.025 重量 % ~ 約1.25 重量 % のスルホン化された亜鉛フタロシアニンを含むであろう。

過氧化物基材の漂白剤は、漂白活性化剤、たとえばテトラアセチルエチレンジアミン ( TAED )、ノナノイルオキシベンゼンスルホネート ( NOBS、アメリカ特許第4,412,934号に記載される )、3 , 5 , 5 - トリメチルヘキサノイルオキシベンゼンスルホネート ( ISONOBS、ヨーロッパ特許第120591号に記載される ) 又はペンタアセチルグルコース ( PAG ) ( それらは、過加水分解され、活性漂白種としての過酸が形成され、改良された漂白効果が導びかれる ) と組合して使用され得る。さらに、漂白活性化剤 6 - オクタンアミドカプロイル

オキシベンゼンスルホネート、6 - ノナンアミドカプロイルオキシベンゼンスルホネート及び6 - デカンアミドカプロイルオキシベンゼンスルホネート又はそれらの混合物がひじょうに適切である。また適切な活性化剤は、ヨーロッパ特許出願第91870207.1号に開示されるアシル化されたクエン酸エステルである。

さらに有用な漂白剤、たとえばペルオキシ酸、及び本発明の洗浄組成物への使用のための漂白活性化剤及び過酸素漂白化合物を含んで成る漂白システムがUSSN 08 / 136,626に記載される。

過酸化水素はまた、洗浄及び / 又はすすぎ工程の開始で又はその工程の間、過酸化水素を発生せしめることができる酵素システム（すなわち、酵素及びそのための基質）を添加することによって洗剤溶液において生成される。そのような酵素システムは、公開されたヨーロッパ特許出願第0537381号に開示される。

過酸素漂白源からの過酸の開放は、本発明のリパーゼの使用により活性化され得る。酵素加水分解システムのための必要な成分は次の過酸前駆体基質である：過酸化ジアシル $R_1$ -C O-O-O-CO-R（ここで、R及び $R_1$ は飽和又は不飽和アルキル、アリール基又はアルカリールであり得る）。リパーゼは、前記基質と反応し、そして洗浄において過酸を開放する。第四イミン塩は、WO95 / 13352に記載されるように過酸素化合物と一緒に漂白触媒として使用され得る。

過氧化物 - 基材の漂白システムはまた、マンガン触媒を含むことができる。そのマンガン触媒は、たとえば“Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching”, *Nature* 369, 1994, pp.637-639に記載される化合物の1つであり得る。

泡抑制剤：他の任意の成分は、シリコーン、及びシリカ - シリコーン混合物により例示される泡抑制剤である。シリコーンは一般的に、アルキル化されたポリシクロキサン材料により示され得、そしてシリカは通常、種々の型をシリカエーロゲル及びキセロゲル、及び疎水性シリカにより例示される細かく分類された形で使用される。それらの材料は、泡抑制剤が好都合には、水溶性又は水分散性で実質的に非界面活性洗剤不透過性のキャリアーに開放的に組込まれる粒状物として組込まれ得る。他方では、泡抑制剤は、液体キャリアーに溶解され、又は分散され、そして1又は複数の他の成分上に噴霧することによって適用される。

好ましいシリコーン泡調節剤は、アメリカ特許第3,933,672号に開示されている。他の特に有用な泡抑制剤は、デンマーク特許第2,646,126号に記載される自己乳化シリコーン泡抑制剤である。そのような化合物の例は、シロキサン - グリコールのコポリマーである、Dow Corningから市販されているDC-544である。特に好ましい泡調節剤は、シリコーン油及び2 - アルキル - アルカノールの混合物を含んで成る泡抑制剤システムである。適切な2 - アルキル - アルカノールは、商標名Isofol 12Rとして市販されている2 - ブチル - オクタノールである。

そのような泡抑制剤システムは、公開されたヨーロッパ特許出願第0593841号に記載されている。

特に好ましいシリコーン泡調節剤は、公開されたヨーロッパ特許出願第0573699号に記載される。前記組成物は、非多孔性のヒュームドシリカ、たとえばAerosil<sup>R</sup>と組合してシリコーン / シリカ混合物を含んで成る。

上記泡抑制剤は通常、組成物中、0.001 ~ 2 重量%、好ましくは0.01 ~ 1 重量%のレベルで使用される。

他の成分：洗剤組成物に使用される他の成分、土壌 - 懸濁剤、土壌 - 開放剤、蛍光増白剤、研磨剤、殺菌剤、曇りインヒビター、着色剤及び封入された又は封入されていない香料が使用され得る。

特に適切な封入材料は、イギリス特許第1,464,616号に記載されるような、ポリサッカリド及びポリヒドロキシ化合物のマトリックスから成る水溶性カプセルである。

他の適切な水溶性封入材料は、アメリカ特許第3,455,838号に記載されるような、置換されたジカルボン酸のゲル化されていないスターチ酸エステルに由来するデキストリンを含んで成る。それらの酸 - エステルデキストリンは、好ましくは、ロウ状トウモロコシ、ロ

10

20

30

40

50

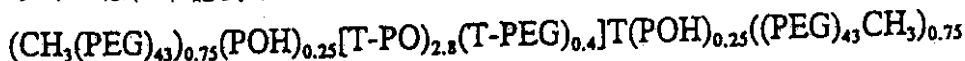
ン状サトウモロコシ、サゴ、タピオカ及びジャガイモのようなスターチから調製される。前記封入材料の適切な例は、National Starchにより製造されるN-Lokを包含する。そのN-Lok封入材料は、変性されたトウモロコシスターチ及びグルコースから成る。スターチは、一官能置換基、たとえばオクテニル無水琥珀酸を添加することによって変性される。本発明において適切な抗再沈着剤及び土壌懸濁剤は、セルロース誘導体、たとえばメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース及びヒドロキシエチルセルロース及びホモ - 又はコ - ポリマー性ポリカルボン酸又はそれらの塩を包含する。このタイプのポリマーは、ポリアクリレート及び無水マレイン酸 - アクリル酸のコポリマー、たとえば前でビルダーとして言及されたSokalan CP5、及び無水マレイン酸とエチレン、メチルビニルエーテル又はメタクリル酸とのコポリマー（前記無水マレイン酸は前記コポリマー中において少なくとも20モル%を構成する）を包含する。それらの材料は、組成物において、0.5~10重量%、より好ましくは0.75~8重量%、最も好ましくは1~6重量%のレベルで使用される。

好ましい蛍光増白剤は特徴的にはアニオン性であり、その例としては、二ナトリウム 4, 4 - ビス - ( 2 - ジエタノールアミノ - 4 - アニリノ - s - トリアジン - 6 - イルアミノ ) スチルベン - 2 : 2 - ジスルホネート、二ナトリウム 4, 4 - ビス - ( 2 - モルホリノ - 4 - アニリノ - s - トリアジン - 6 - イルアミノ ) スチルベン - 2 : 2 - ジスルホネート、二ナトリウム 4, 4 - ビス - ( 2, 4 - ジアニリノ - s - トリアジン - 6 - イルアミノ ) スチルベン - 2 : 2 - ジスルホネート、二ナトリウム 4, 4 - ビス - ( 2 - アニリノ - 4 - ( N - メチル - N - 2 - ヒドロキシエチルアミノ ) - s - トリアジン - 6 - イルアミノ ) スチルベン - 2, 2 - ジスルホネート、二ナトリウム 4, 4 - ビス - ( 4 - フェニル - 2, 1, 3 - トリアゾール - 2 - イル ) スチルベン - 2, 2 - ジスルホネート、二ナトリウム 4, 4 - ビス - ( 2 - アニリノ - 4 - ( 1 - メチル - 2 - ヒドロキシエチルアミノ ) - s - トリアジン - 6 - イルアミノ ) スチルベン - 2, 2 - ジスルホネート、ナトリウム - 2 ( スチルビル - 4 - ( ナフト - 1, 2 : 4, 5 ) - 1, 2, 3 - トリアゾール - 2 - スルホネート、及び 4, 4 - ビス ( 2 - スルホスチリル ) ピフェニルを挙げることができる。

他の有用なポリマー材料は、ポリエチレングリコール、特に分子量1000~10000、より好ましくは2000~8000及び最も好ましくは約4000のものである。それらは、0.20~5重量%、より好ましくは0.25~2.5重量%のレベルで使用される。それらのポリマー及び前で言及されたホモ - 又はコ - ポリマー性ポリカルボキシレート塩は、白色度の維持、布への灰の付着、及び粘土、タンパク質性及び酸化可能な土壌に対する洗浄性能を遷移金属不純物の存在下で改良するために価値あるものである。

WO 95 / 22593に記載されるようなグラフトポリマーもまた使用され得る。

本発明の組成物において有用な土壌開放剤は、テレフタル酸とエチレングリコール及び / 又はプロピレングリコール単位との種々の配置でのコポリマー又はターポリマーである。そのようなポリマーの例は、アメリカ特許第4,116,885号、アメリカ特許第4,711,730号及びヨーロッパ特許第0272033号に開示される。ヨーロッパ特許0272033号の特に好ましいポリマーは、下記式：



〔式中、PEGは-(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>0</sub>-であり、POは(OC<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)であり、そしてTは(pcOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO)である〕を有する。

ジメチルテレフタレート、ジメチルスルホイソフタレート、エチレングリコール及び1, 2 - プロパンジオールのランダムコポリマーのような変性されたポリエステルもまた、ひじょうに有用であり、ここで前記末端基は第1に、スルホベンゾエート及び第2に、エチレングリコール及び / 又はプロパン - ジオールのモノエステルから成る。その標的は、本発明においてはスルホベンゾエート基によりその両端でキャップされたポリマーを得ることであり、“第1に”本明細書においては、前記コポリマーのほとんどはスルホベンゾエ

ート基により末端キャップされるであろう。しかしながら、いくつかのコポリマーは十分にキャップされておらず、そして従って、それらの末端基はエチレングリコール及び／又はプロパン、1,2-ジオールのモノエステルから成り、それゆえ、“第2には”、そのような種から成る。

本発明における選択されたポリエステルは、約46重量%のジメチルテレフタル酸、約16重量%のプロパン-1,2-ジオール、約10重量%のエチレングリコール、約13重量%のジメチルスルホ安息香酸及び約15重量%のスルホイソフタル酸を含み、そして約3,000の分子量を有する。ポリエステル及びそれらの調製方法は、ヨーロッパ特許第311342号に詳細に記載される。

軟化剤：布用軟化剤はまた、本発明の洗濯洗剤組成物中に組込まれ得る。それらの剤は、無機又は有機タイプのものであり得る。無機軟化剤は、イギリス特許出願第1400898号及びアメリカ特許第5,019,292号に開示されるスメクチルクレーにより例示される。布用有機軟化剤は、イギリス特許出願第1514276号及びヨーロッパ特許第0011340号に開示されるような水不溶性第三アミンを含み、そしてモノ $C_{12}$ - $C_{14}$ 第四アンモニウム塩とのそれらの組合せがヨーロッパ特許第026528号に開示され、そして二長鎖アミドがヨーロッパ特許第0242919号に開示される。布用軟化システムのための他の有用な有機成分は、ヨーロッパ特許第0299575号及び第0313146号に開示されるような高分子量ポリ酸化エチレン材料を包含する。

スメクチルクレーのレベルは通常、5~15重量%、より好ましくは8~12重量%であり、そしてその材料は配合物の残りに乾燥混合された成分として添加される。布用有機軟化剤、たとえば水不溶性第三アミン又は二長鎖アミド材料は、0.5~5重量%、通常1~3重量%のレベルで組込まれ、そして高分子量ポリ酸化エチレン材料及び水可溶性カチオン性材料は0.1~2重量%、通常0.15~1.5重量%のレベルで添加される。それらの材料は通常、組成物の噴霧乾燥された部分に添加されるが、但し、多くの場合、乾燥混合された粒状物としてそれらを添加し、又は組成物の他の固形成分上に溶解された液体としてそれらを添加することがより便利である。

ポリマー性染料移行阻害剤：本発明の洗剤組成物はまた、0.001~10重量%、好ましくは0.01~2重量%、より好ましくは0.05~1重量%のポリマー性染料移行阻害剤を含むことができる。前記ポリマー性染料移行阻害剤は通常、着色された布からの染料の、それらにより洗浄された布上への移行を阻害するために洗剤組成物中に組込まれる。それらのポリマーは、染料が洗浄において他の製品に結合するようになる機会を有する前、染色された布から洗浄されるあせやすい染料を複合体化し又は吸着する能力を有する。

特に適切なポリマー性染料移行阻害剤は、ポリアミンN-オキシドポリマー、N-ビニルピロリドン及びN-ビニルイミダゾールのコポリマー、ポリビニルピロリドンポリマー、ポリビニルオキサゾリドン及びポリビニルイミダゾール又はそれらの混合物である。そのようなポリマーの付加はまた、本発明の酵素の性能を高める。

本発明の洗剤組成物は、液体、ペースト、ゲル、棒又は粒質形で存在することができる。非ダスティング粒質物は、たとえばアメリカ特許第4,106,991号及び第4,661,452号（両者ともNovo Industri A/Sのもの）に開示されるようにして生成され得、そして任意には、当業界において知られている方法により被覆され得る。ロウ質被覆材料の例は、1000~20000の平均分子量を有するポリ（酸化エチレン）生成物（ポリエチレングリコール、PEG）；16~50個の酸化エチレン単位を有するエトキシ化されたノニルフェノール；アルコールが12~20個の炭素原子を含み、そして15~80個の酸化エチレン単位を有するエトキシ化された脂肪アルコール；脂肪アルコール；脂肪酸；及び脂肪酸のモノ-及びジ-、並びにトリグリセリドである。流動層技法による適用のために適切なフィルム形成被覆材料の例は、イギリス特許第1483591号に与えられる。

本発明の粒質組成物はまた“圧縮形”でも存在することができ、すなわち、それらは従来の粒質洗剤よりも比較的高い密度を有することができ、すなわち、550~950 g / lを形成することができ；そのような場合、本発明の顆粒洗剤組成物は、従来の顆粒洗剤に比較して、少量の“無機充填剤塩”を含み；典型的な充填剤塩はスルフェート及びクロリドのア

10

20

30

40

50

ルカリ土類金属塩、典型的には硫酸ナトリウムであり；“圧縮”洗剤は典型的には10%よりも多くない充填剤塩を含んで成る。本発明の液体組成物はまた、“濃縮された形”で存在することができ、そのような場合、本発明の液体洗剤組成物は、従来の液体洗剤に比較して、少量の水を含むであろう。典型的には、濃縮された液体洗剤の水の含有率は、洗剤組成物の30重量%以下、より好ましくは20重量%以下、最も好ましくは10重量%以下である。

本発明の組成物は、手動及び機械用洗濯洗剤組成物、たとえば洗濯添加剤組成物、及び染色された布の予備処理への使用のために適切な組成物、すすぎのために添加される布用軟化剤組成物、及び一般的な家庭用ハードウェア表面洗浄操作及び皿洗い操作への使用のための組成物として配合され得る。

本発明内の洗濯洗剤組成物の特定の形は次のものを包含する：

1) 下記成分を含んで成る、少なくとも600 g / l の嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物：

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	7 - 12%
アルコールエトキシスルフェート (たとえば C <sub>12-18</sub> アルコール、1-2 EO) 又はアルキルスルフェート (たとえば C <sub>16-18</sub> )	1 - 4%
アルコールエトキシレート (たとえば C <sub>14-15</sub> アルコール、7 EO)	5 - 9 %
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> として)	14 - 20%
可溶性シリケート (Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> として)	2 - 6%
ゼオライト (NaAlSiO <sub>4</sub> として)	15 - 22%
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> として)	0 - 6%
クエン酸ナトリウム／クエン酸 (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ／C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> として)	0 - 15%
過硼酸ナトリウム (NaBO <sub>3</sub> ・H <sub>2</sub> Oとして)	11 - 18%
TAED	2 - 6%
カルボキシメチルセルロース	0 - 2%
ポリマー (たとえばマレイン酸／アクリル酸コポリマー、PVP、PEG)	0 - 3%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%

2) 下記成分を含んで成る、少なくとも600 g / l の嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

40

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	6 - 11%
アルコールエトキシスルフェート (たとえば $C_{12-18}$ アルコール、1-2 EO又はアルキルスルフェート (たとえば $C_{16-18}$ )	1 - 3%
アルコールエトキシレート (たとえば $C_{14-15}$ アルコール、7 EO)	5 - 9%
炭酸ナトリウム ( $Na_2CO_3$ として)	15 - 21%
可溶性シリケート ( $Na_2O$ , $2SiO_2$ として)	1 - 4%
ゼオライト ( $NaAlSiO_4$ として)	24 - 34%
硫酸ナトリウム ( $Na_2SO_4$ として)	4 - 10%
クエン酸ナトリウム／クエン酸 ( $C_6H_5Na_3O_7$ ／ $C_6H_8O_7$ として)	0 - 15%
カルボキシメチルセルロース	0 - 2%
ポリマー (たとえば、マレイン酸／アクリル酸 コポリマー、PVP、PEG)	1 - 6%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料)	0 - 5%

3) 下記成分を含んで成る、少なくとも600 g / l の嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物:

10

20

30

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	5 - 9%
アルコールエトキシレート (たとえば $C_{12-15}$ アルコール、7 EO)	7 - 14%
脂肪酸としての石鹼 (たとえば $C_{16-22}$ 脂肪酸)	1 - 3%
炭酸ナトリウム ( $Na_2CO_3$ として)	10 - 17%
可溶性シリケート ( $Na_2O$ , $2SiO_2$ として)	3 - 9%
ゼオライト ( $NaAlSiO_4$ として)	23 - 33%
硫酸ナトリウム ( $Na_2SO_4$ として)	0 - 4%
過硼酸ナトリウム ( $NaBO_3 \cdot H_2O$ として)	8 - 16%
TAED	2 - 8%
ホスホネート (たとえば EDTMPA)	0 - 1%
カルボキシメチルセルロース	0 - 2%
ポリマー (たとえば、マレイン酸／アクリル酸 コポリマー、PVP、PEG)	0 - 3%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白 剤)	0 - 5%

10

20

30

4) 下記成分を含んで成る、少なくとも600 g / l の嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物:



線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	8 - 12%
アルコールエトキシレート (たとえば、C <sub>12-15</sub> アルコール、7 EO)	10 - 25%
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> として)	14 - 22%
可溶性シリケート (Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> として)	1 - 5%
ゼオライト (NaAlSiO <sub>4</sub> として)	25 - 35%
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> として)	0 - 10%
カルボキシメチルセルロース	0 - 2%
ポリマー (たとえば、マレイン酸／アクリル酸 コポリマー、PVP、PEG)	1 - 3%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料)	0 - 5%

10

20

5) 下記成分を含んで成る水性液体洗剤組成物：

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	15 - 21%
アルコールエトキシレート (たとえば、C <sub>12-15</sub> アルコール、7 EO 又はC <sub>12-15</sub> アルコール、5 EO)	12 - 18%
脂肪酸としての石鹼 (たとえばオレイン酸)	3 - 13%
アルケニル琥珀酸 (C <sub>12-14</sub> )	0 - 13%
アミノエタノール	8 - 18%
クエン酸	2 - 8%
ホスホネート	0 - 3%
ポリマー (たとえば、PVP、PEG)	0 - 3%
硼酸塩 (B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> として)	0 - 2%
エタノール	0 - 3%
プロピレングリコール	8 - 14%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、分散剤、泡抑制剤、香料、 蛍光増白剤)	0 - 5%

6) 下記成分を含んで成る構造体化された水性液体洗剤組成物:

10

20

30

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	15 - 21%
アルコールエトキシレート (たとえば、C <sub>12-15</sub> アルコール、7 EO、 又はC <sub>12-15</sub> アルコール、5 EO)	3 - 9%
脂肪酸としての石鹼 (たとえば、オレイン酸)	3 - 10%
ゼオライト (NaAlSiO <sub>4</sub> として)	14 - 22%
クエン酸カリウム	9 - 18%
硼酸塩 (B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> として)	0 - 2%
カルボキシメチルセルロース	0 - 2%
ポリマー (たとえば、PEG、PVP)	0 - 3%
定着ポリマー、たとえばラウリルメタクリレート／アクリル酸コポリマー；モル比25：1；Mw 3800	0 - 3%
グリセロール	0 - 5%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、分散剤、泡抑制剤、香料、 蛍光増白剤)	0 - 5%

7) 下記成分を含んで成る、少なくとも600 g / l の嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

脂肪アルコールスルフェート	5 - 10%
エトキシ化された脂肪酸モノエタノールアミド	3 - 9%
脂肪酸としての石鹼	0 - 3%
炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ として)	5 - 10%
可溶性シリケート ( $\text{Na}_2\text{O}$ , $2\text{SiO}_2$ として)	1 - 4%
ゼオライト ( $\text{NaAlSiO}_4$ として)	20 - 40%
硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ として)	2 - 8%
過硼酸ナトリウム ( $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ として)	12 - 18%
TAED	2 - 7%
ポリマー (たとえば、マレイン酸/アクリル酸 コポリマー、PEG)	1 - 5%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、蛍光増白剤、泡抑制剤、 香料)	0 - 5%

10

20

8) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物:

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	8 - 14%
エトキシ化された脂肪酸モノエタノールアミド	5 - 11%
脂肪酸としての石鹼	0 - 3%
炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ として)	4 - 10%
可溶性シリケート ( $\text{Na}_2\text{O}$ , $2\text{SiO}_2$ として)	1 - 4%
ゼオライト ( $\text{NaAlSiO}_4$ として)	30 - 50%
硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ として)	3 - 11%
クエン酸ナトリウム ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ として)	5 - 12%
ポリマー (たとえば、PVP、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、PEG)	1 - 5%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料)	0 - 5%

10

20

9) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルスルフェート（たとえば、 $C_{12-18}$ ）	6 - 12%
石鹼、Na-塩	0 - 3%
非イオン性物質（たとえば、アルコールエトキシレート $C_{10-18}$ 、2-7 EO）	2 - 8%
アルキルグルカミド（たとえば $C_{16-18}$ ）	2 - 6%
ゼオライト ( $NaAlSiO_4$ )	14 - 24%
炭酸ナトリウム ( $Na_2CO_3$ )	7 - 13%
ナトリウムジシリケート ( $Na_2O:2SiO_2$ ) (たとえば、SKS6)	10 - 14%
硫酸ナトリウム ( $Na_2SO_4$ )	5 - 9%
過炭酸ナトリウム	10 - 16%
TAED	1 - 5%
CMC	0 - 3%
ポリカルボキシレート	1 - 7%
ポリマー（たとえば、PVP、PEG、マレイン酸／アクリル酸コポリマー）	0 - 2%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
嵩密度 ( $g/l$ )	700 (少なくとも)

10) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルスルフェート（たとえば、 $C_{12-18}$ ）	7 - 11%
石鹼、Na-塩	0 - 30%
非イオン性物質（たとえば、アルコールエトキシレート $C_{10-18}$ 、2-7 EO）	7 - 11%
アルキルグルカミド（たとえば、 $C_{16-18}$ ）	2 - 6%
ゼオライト（ $NaAlSiO_4$ ）	19 - 29%
炭酸ナトリウム（ $Na_2CO_3$ ）	12 - 18%
ナトリウムジシリケート； （ $Na_2O:2SiO_2$ ）（たとえば、SKS6）	7 - 11%
硫酸ナトリウム（ $Na_2SO_4$ ）	5 - 9%
CMC	0 - 3%
ポリカルボキシレート	4 - 8%
ポリマー（たとえば、PVP、PEG、マレイン酸／アクリル酸コポリマー）	1 - 3%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
嵩密度（ $g/l$ ）	700 （少なくとも）

10

20

30

11) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルスルフェート（たとえば、 $C_{12-18}$ ）	4 - 10%
非イオン性物質（たとえば、アルコールエトキシレート $C_{10-18}$ 、2-7 EO）	2 - 7%
リン酸塩（STPPとして）	17 - 27%
炭酸ナトリウム（ $Na_2CO_3$ ）	4 - 8%
ナトリウムジシリケート； （ $Na_2O:2SiO_2$ ）（たとえば、SKS6）	4 - 8%
硫酸ナトリウム（ $Na_2SO_4$ ）	18 - 26%
過硼酸ナトリウム四水和物	13 - 19%
TAED	1 - 4%
CMC	0 - 2%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
嵩密度（ $g/l$ ）	600 （少なくとも）

10

20

12) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：



アルキル硫酸（たとえば、 $C_{12-18}$ ）	2 - 9%
石鹼、Na-塩	1 - 4%
非イオン性物質（たとえば、アルコールエトキシレート $C_{10-18}$ 、2-7 EO）	9 - 15%
ゼオライト ( $NaAlSiO_4$ )	35 - 45%
炭酸ナトリウム ( $Na_2CO_3$ )	3 - 10%
ナトリウムジシリケート; ( $Na_2O:2SiO_2$ )（たとえば、SKS6）	0 - 4%
硫酸ナトリウム ( $Na_2SO_4$ )	2 - 6%
過炭酸ナトリウム	14 - 20%
TAED	2 - 7%
CMC	0 - 3%
ポリカルボキシレート	0 - 2%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
高密度 ( $g/l$ )	700 (少なくとも)

13) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

アルキルベンゼンスルホン酸	8 - 14%
アルキル硫酸 (たとえば $C_{12-18}$ )	2 - 6%
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート $C_{10-18}$ 、2-7 EO)	9 - 13%
ゼオライト ( $NaAlSiO_4$ ) (たとえばゼオライト 4A)	20 - 30%
炭酸ナトリウム ( $Na_2CO_3$ )	0 - 6%
ナトリウムジシリケート; ( $Na_2O:2SiO_2$ )	0 - 3%
硫酸ナトリウム ( $Na_2SO_4$ )	0 - 6%
過硼酸ナトリウム四水和物	22 - 28%
TAED	5 - 9%
CMC	0 - 2%
ポリマー (たとえば、マレイン酸/アクリル酸 コポリマー)	0 - 4%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白 剤、光漂白剤)	0 - 5%
嵩密度 ( $g/l$ )	600 (少なくとも)

10

20

30

14) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物:

アルキルベンゼンスルホン酸	6 - 12%
アルキルエーテル硫酸 (たとえば、 $C_{12-18}$ アルコール、4-10 EO) 又はアルキルスルフェート (たとえば、 $C_{12-18}$ )	2 - 6%
石鹼、Na-塩	0 - 2%
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート $C_{12-18}$ 、3-10 EO)	9 - 13%
ゼオライト ( $NaAlSiO_4$ ) (たとえば、ゼオライト 4A)	39 - 49%
炭酸ナトリウム ( $Na_2CO_3$ )	2 - 8%
ナトリウムジシリケート ; ( $Na_2O:2SiO_2$ )	0 - 3%
硫酸ナトリウム ( $Na_2SO_4$ )	2 - 8%
CMC	0 - 9%
ポリマー (たとえば、マレイン酸/アクリル酸 コポリマー)	0 - 4%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白 剤、光漂白剤)	0 - 5%
嵩密度 ( $g/l$ )	600 (少なくとも)

15) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物 :

10

20

30

アルキルスルフェート（たとえば、 $C_{12-18}$ ）	2 - 8%
石鹼、Na-塩	0 - 3%
非イオン性物質、（たとえば、アルコールエトキシレート $C_{12-16}$ 、3-10 EO）	10 - 16%
ゼオライト（ $NaAlSiO_4$ ） （たとえば、ゼオライト 4A）	47 - 57%
炭酸ナトリウム（ $Na_2CO_3$ ）	15 - 23%
クエン酸ナトリウム／クエン酸 （ $C_6H_5Na_3O_7$ ／ $C_6H_8O_7$ ）	0 - 16%
硫酸ナトリウム（ $Na_2SO_4$ ）	1 - 5%
CMC	0 - 3%
ポリカルボキシレート	0 - 2%
ポリマー（たとえば、PVP）	0 - 2%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
高密度（ $g/l$ ）	800 (少なくとも)

10

20

16) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルベンゼンスルホン酸	0 - 3%
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO)	1 - 5%
リン酸塩 (STPPとして)	12 - 18%
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	16 - 24%
ナトリウムジシリケート;(Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> )	1 - 3%
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	38 - 48%
過硼酸ナトリウム四水和物	8 - 14%
TAED	0 - 3%
CMC	0 - 3%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%
嵩密度 (g / ℓ)	500 (少なくとも)

10

20

17) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

石鹼、Na-塩	1 - 3%	
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO)	2 - 6%	
ベタイン (たとえば、アルキルアミドプロピルベタイン)	0 - 3%	
リン酸塩 (STPPとして)	27 - 37%	
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	17 - 23%	10
ナトリウムジシリケート;(Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> )	3 - 7%	
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 - 11%	
過硼酸ナトリウム四水和物	15 - 21%	
TAED	1 - 4%	
CMC	1 - 3%	
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%	20
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%	
嵩密度 (g / l)	600 (少なくとも)	

18) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルベンゼンスルホン酸	5 - 11%
石鹼、Na-塩	0 - 3%
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO)	3 - 7%
ゼオライト (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (たとえばゼオライト 4A)	20 - 30%
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	15 - 23%
クエン酸ナトリウム/クエン酸 (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0 - 3%
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 - 10%
過硼酸ナトリウム	7 - 13%
TAED	2 - 6%
CMC	1 - 3%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%
嵩密度 (g / l)	600 (少なくとも)

10

20

19) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルベンゼンスルホン酸	0 - 4%
石鹼、Na-塩	0 - 3%
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO)	2 - 6%
ゼオライト (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (たとえばゼオライト 4A)	11 - 17%
リン酸塩 (STPPとして)	25 - 35%
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	3 - 7%
珪酸ナトリウム ; (Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> )	0 - 19%
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	20 - 28%
過硼酸ナトリウム四水和物	9 - 13%
TAED	1 - 5%
CMC	0 - 2%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%
嵩密度 (g / l)	600 (少なくとも)

10

20

20) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物:

30



アルキルベンゼンスルホン酸	17 - 23%
石鹼、Na-塩	0 - 3%
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO)	11 - 15%
ゼオライト (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (たとえばゼオライト 4A)	60 - 70%
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0 - 3%
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 - 11%
CMC	0 - 3%
ポリマー (たとえば、PVP、PEG、マレイン酸／アクリル酸コポリマー)	2 - 6%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%
嵩密度 (g / ℓ)	350 (少なくとも)

10

20

21) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルベンゼンスルホン酸	16 - 22%
石鹼、Na-塩	0 - 2%
非イオン性物質、(たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO)	3 - 9%
ゼオライト (NaAlSiO <sub>4</sub> )	25 - 33%
炭酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	3 - 7%
珪酸ナトリウム ; (Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> )	0 - 4%
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 - 11%
リン酸塩	0 - 3%
過硼酸ナトリウム一水和物	15 - 19%
TAED	3 - 7%
CMC	0 - 3%
ポリマー (たとえば、PVP、PEG、マレイン酸／アクリル酸コポリマー)	0 - 3%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%
嵩密度 (g / l)	700 (少なくとも)

22) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

アルキルベンゼンスルホン酸	4 - 8%
アルキルスルフェート（たとえば $C_{12-18}$ ）	0 - 3%
非イオン性物質（たとえば、アルコールエトキシレート $C_{12-18}$ 、3-10 EO）	5 - 9%
ゼオライト（ $NaAlSiO_4$ ）	20 - 28%
炭酸ナトリウム（ $Na_2CO_3$ ）	9 - 15%
ナトリウムジシリケート；（ $Na_2O:2SiO_2$ ）	0 - 4%
過硼酸ナトリウム四水和物	21 - 31%
TAED	1 - 5%
CMC	0 - 3%
ポリマー（たとえば、PVP、PEG、マレイン酸／アクリル酸コポリマー）	0 - 3%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
嵩密度（ $g/l$ ）	600 （少なくとも）

10

20

23) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	6 - 12%
非イオン性界面活性剤	1 - 4%
脂肪酸としての石鹼	2 - 6%
炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ として)	14 - 22%
ゼオライト ( $\text{NaAlSiO}_4$ として)	18 - 32%
硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ として)	5 - 20%
クエン酸ナトリウム ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ として)	3 - 8%
過硼酸ナトリウム ( $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ として)	4 - 9%
漂白活性剤 (たとえば、NOBS又はTAED)	1 - 5%
カルボキシメチルセルロース	0 - 2%
ポリマー (たとえば、ポリカルボキシレート又はPEG)	1 - 5%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、蛍光増白剤分、香料)	0 - 5%

10

20

24) 下記成分を含んで成る水性液体洗剤組成物:

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	15 - 23%
アルコールエトキシスルフェート (たとえば、C <sub>12-15</sub> アルコール、2-3 EO)	8 - 15%
アルコールエトキシレート (たとえば、C <sub>12-15</sub> アルコール、7 EO、 又はC <sub>12-15</sub> アルコール、5 EO)	3 - 9%
脂肪酸としての石鹼 (たとえばラウリン酸)	0 - 3%
アミノエタノール	1 - 5%
クエン酸ナトリウム	5 - 10%
ヒドロトロープ (たとえば、ナトリウムドルエ ンスルホネート)	2 - 6%
硼酸塩 (B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> として)	0 - 2%
カルボキシメチルセルロース	0 - 1%
エタノール	1 - 3%
プロピレングリコール	2 - 5%
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、ポリマー、分散剤、香料、 蛍光増白剤)	0 - 5%

25) 下記成分を含んで成る水性液体洗剤組成物：

10

20

30

線状アルキルベンゼンスルホネート (酸として計算される)	20 - 32%	10
アルコールエトキシレート (たとえば、C <sub>12-15</sub> アルコール、7 EO、 又はC <sub>12-15</sub> アルコール、5 EO)	6 - 12%	
アミノエタノール	2 - 6%	
クエン酸	8 - 14%	
硼酸塩 (B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> として)	1 - 3%	
ポリマー (たとえば、マイレン酸／アクリル酸 コポリマー、定着ポリマー、たとえばラウリル メタクリレート／アウリル酸コポリマー)	0 - 3%	
グリセロール	3 - 8%	20
酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%	
微成分 (たとえばヒドロトロープ、分散剤、香 料、蛍光増白剤)	0 - 5%	

26) 濃縮された液体として配合される洗剤組成物：

アルキルベンゼンスルホン酸	6 - 12%	30
アルキル硫酸	0 - 4%	
モノエタノールアミン	2 - 6%	
非イオン性物質 (たとえばアルコールエトキシ レート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO)	9 - 15%	
クエン酸ナトリウム／クエン酸 (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ／C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	2 - 8%	
グリセロール	2 - 6%	
硼酸塩 (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> として)	0 - 4%	40
ポリマー (たとえば、PVP、PEG、マレイン酸 ／アクリル酸コポリマー)	0 - 3%	
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%	
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白 剤、光漂白剤)	0 - 5%	
合計の水	40%	

27) 濃縮された液体として配合される洗剤組成物：

アルキルベンゼンスルホン酸	11 - 17%
アルキルエーテル硫酸 (たとえば $C_{12-18}$ アルコール、4-10 EO) 又はアルキルスルフェート (たとえば $C_{12-18}$ )	0 - 4%
トリエタノールアミン	0 - 3%
非イオン性物質 (たとえば、アルコールエトキシレート $C_{12-18}$ 、3-10 EO)	6 - 10%
クエン酸ナトリウム / クエン酸 ( $C_6H_5Na_3O_7$ / $C_6H_8O_7$ )	2 - 6%
ヒドロトロープ (ナトリウムトルエンサルホネート)	1 - 5%
グリセロール	6 - 12%
MPG	0 - 5%
エタノール	0 - 3%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1%
微成分 (たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤)	0 - 5%
合計の水	55%

28) 下記成分を含んで成る、少なくとも600 g / l の高密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物:

アニオン性界面活性剤（線状アルキルベンゼン スルホネート、アルキルスルフェート、 $\alpha$ -オ レフィンスルホネート、 $\alpha$ -スルホ脂肪酸メチ ルエステル、アルカンスルホネート、石鹼）	25 - 40%
非イオン性界面活性剤（たとえば、アルコール エトキシレート）	1 - 10%
炭酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ として）	8 - 25%
可溶性シリケート（ $\text{Na}_2\text{O}$ , $2\text{SiO}_2$ として）	5 - 15%
硫酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ として）	0 - 5%
ゼオライト（ $\text{NaAlSiO}_4$ として）	15 - 28%
過硼酸ナトリウム（ $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ として）	0 - 20%
漂白活性化剤（TAED又はNOBS）	0 - 5%
酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば香料、蛍光増白剤）	0 - 3%

10

20

29) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：



アルキルベンゼンスルホン酸	25 - 35%
非イオン性物質（たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、3-10 EO）	0 - 3%
ゼオライト（NaAlSiO <sub>4</sub> ）	3 - 9%
リン酸塩（STPPとして）	25 - 35%
炭酸ナトリウム（Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ）	0 - 3%
ナトリウムシリケート；（Na <sub>2</sub> O：2SiO <sub>2</sub> ）	2 - 8%
硫酸ナトリウム（Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ）	17 - 23%
過硼酸ナトリウム－水和物	1 - 5%
TAED	0 - 3%
CMC	0 - 3%
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
嵩密度（g / ℓ）	600 （少なくとも）

10

20

30) 下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルキルベンゼンスルホン酸	25 - 35%
石鹼、脂肪酸Na-塩	0 - 3%
非イオン性物質（たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>13-15</sub> 、7 EO）	4 - 9%
ゼオライト（NaAlSiO <sub>4</sub> ）	7 - 11%
リン酸塩（STPPとして）	26 - 36%
炭酸ナトリウム（Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ）	6 - 12%
ナトリウムシリケート；（Na <sub>2</sub> O：2SiO <sub>2</sub> ）	4 - 10%
硫酸ナトリウム（Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ）	4 - 8%
CMC	0 - 3%
酵素、たとえば、脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1%
微成分（たとえば、泡抑制剤、香料、蛍光増白剤、光漂白剤）	0 - 5%
嵩密度（g / ℓ）	700 （少なくとも）

次の特定の組成が本発明のための組成物を例示するために使用されるが、しかし必ずしも限定するものではなく、又は本発明の範囲内に定義される。

洗剤組成物においては、短縮された成分は次の意味を有する：

LAS：ナトリウム線状 C<sub>12</sub> アルキルベンゼンスルホネート、

TAS：ナトリウム牛脂アルキルスルフェート

XYAS：ナトリウム C<sub>1X</sub> - C<sub>1Y</sub> アルキルスルフェート

SS：2 - ブチルオクタン酸の第2の石鹼界面活性剤

25EY：平均 Y モルの酸化エチレンにより縮合される C<sub>12</sub> - C<sub>15</sub> の主な線状第一アルコール

45EY：平均 Y モルの酸化エチレンにより縮合される C<sub>14</sub> - C<sub>15</sub> の主な線状第一アルコール

XYEYS：モル当たり平均 Z モルの酸化エチレンにより縮合される C<sub>1X</sub> - C<sub>1Y</sub> のナトリウムアルキルスルフェート

非イオン性物質：BASF GmbHにより商品名Plurafax LF404として市販されている、平均3.8のエトキシ化の程度及び平均4.5のプロポキシ化の程度を有する C<sub>13</sub> - C<sub>15</sub> の混合されたエトキシ化された / プロポキシ化された脂肪アルコール

CFAA：C<sub>12</sub> - C<sub>14</sub> アルキル N - メチルグルカミド

TFAA：C<sub>16</sub> - C<sub>18</sub> アルキル N - メチルグルカミド

珪酸塩：非晶性珪酸ナトリウム（SiO<sub>2</sub>：Na<sub>2</sub>Oの比 = 2.0）

NaSKS-6：式 d - Na<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の結晶性積層シリケート

炭酸塩：非晶性炭酸ナトリウム

リン酸塩：トリポリリン酸ナトリウム

MA / AA：約80,000の平均分子量を有する、1：4の比でのマレイン酸 / アクリル酸のコポリマー

ポリアクリレート：BASF GmbHにより商品名PA30として市販されている、8,000の平均分子量を有するポリアクリレートホモポリマー

ゼオライト A : 1 ~ 10  $\mu$  の範囲の一次粒子サイズを有する、式  $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$  の水和化されたナトリウムアルミノシリケート

クエン酸塩 : クエン酸三ナトリウム二水和物

クエン酸 : クエン酸

過硼酸塩 : 実験式  $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$  を有する非晶性過硼酸ナトリウム一水和物漂白剤

PB 4 : 非晶性過硼酸ナトリウム四水和物

過炭酸塩 : 実験式  $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$  を有する非晶性過炭酸ナトリウム漂白剤

TAED : テトラアセチルエチレンジアミン

CMC : ナトリウムカルボキシメチルセルロース

DETPMP : 商品名 Dequest 2060 として Monsanto により市販されているジエチレントリアミンペンタ (メチレンホスホン酸)

PVP : ポリビニルピロリドンポリマー

EDDS : ナトリウム塩の形でのエチレンジアミン - N, N - 二琥珀酸、[ S, S ] 異性体

泡抑制剤 : 25% パラフィンワックス (Mpt 50)、17% 疎水性シリカ、58% パラフィン油

粒状泡 : 粒状形での 12% シリコン / シリカ、18% ステアリルアルコール、70% スターチ

硫酸塩 : 非晶性硫酸ナトリウム

HMWPEO : 高分子量ポリ酸化エチレン

TAE25 : 牛脂アルコールエトキシレート (25)

#### 組成物 1

本発明の粒状布用洗浄組成物を、次の通りに調製することができる :

ナトリウム線状 $\text{C}_{12}$ アルキルベンゼンスルホネート	6.5	
硫酸ナトリウム	15.0	
ゼオライト A	26.0	
ナトリウムニトリロトリアセテート	5.0	
本発明の酵素	0.1	
PVP	0.5	
TAED	3.0	
硝酸	4.0	
過硼酸塩	18.0	
フェノールスルホネート	0.1	30
微成分	100% まで	

#### 組成物 2

本発明の圧縮粒状布用洗浄組成物 (密度 800 / l) を、次の通りに調製することができる :

45AS	8.0	
25E3S	2.0	
25E5	3.0	
25E3	3.0	
TFAA	2.5	
ゼオライト A	17.0	40
NaSKS-6	12.0	
クエン酸	3.0	
炭酸塩	7.0	
MA / AA	5.0	
CMC	0.4	
本発明の酵素	0.1	
TAED	6.0	
過硼酸塩	22.0	
EDDS	0.3	
粒状泡抑制剤	3.5	50

水／微成分

100%まで

組成物 3

着色された布の洗濯に特に有用である本発明の粒状布用洗浄組成物を次の通りに調製した：

	I	II	
LAS	10.7	-	
TAS	2.4	-	
TFAA	-	4.0	10
45AS	3.1	10.0	
45E7	4.0	-	
25E3S	-	3.0	
68E11	1.8	-	
25E5	-	8.0	
クエン酸塩	15.0	7.0	20
炭酸塩	-	10	
クエン酸	2.5	3.0	
ゼオライト A	32.1	25.0	
Na-SKS-6	-	9.0	
MA/AA	5.0	5.0	30
DETPMP	0.2	0.8	
本発明の酵素	0.10	0.05	
珪酸塩	2.5	-	
硫酸塩	5.2	3.0	
PVP	0.5	-	
ポリ（４－ビニルピリジン）－N －オキシド／ビニルイミダゾール 及びビニルピロリドンのコポリマー	-	0.2	40
過硼酸塩	1.0	-	
フェノールスルホネート	0.2	-	

水／微成分

100%まで

組成物 4

“ 洗浄を通しての軟化 ” 能力を提供する本発明の粒状布用洗浄組成物を次の通りに調製することができる：

45AS	-	10.0	
LAS	7.6	-	
68AS	1.3	-	
45E7	4.0	-	
25E3	-	5.0	
Coco-アルキル-ジメチルヒドロキシ -エチルアンモニウムクロリド	1.4	1.0	10
クエン酸塩	5.0	3.0	
Na-SKS-6	-	11.0	
ゼオライト A	15.0	15.0	
MA/AA	4.0	4.0	
DETPMP	0.4	0.4	20
過硼酸塩	15.0	-	
過炭酸塩	-	15.0	
TAED	5.0	5.0	
スメクチッククレ-	10.0	10.0	
HMWPEO	-	0.1	
本発明の酵素	0.10	0.05	30
珪酸塩	3.0	5.0	
炭酸塩	10.0	10.0	
粒状泡抑制剤	1.0	4.0	
CMC	0.2	0.1	

水／微成分

100%まで

組成物 5

40

本発明の強力液体布用洗浄組成物を次の通りに調製することができる：

	I	II	
LAS 酸形	-	25.0	
クエン酸	5.0	2.0	
25AS酸形	8.0	-	
25AE2S酸形	3.0	-	
25AE7	8.0	-	10
CFAA	5	-	
DETPMP	1.0	1.0	
脂肪酸	8	-	
オレイン酸	-	1.0	
エタノール	4.0	6.0	
プロパンジオール	2.0	6.0	20
本発明の酵素	0.10	0.05	
ココーアルキルジメチルヒド ロキシエチルアンモニウム クロリド	-	3.0	
スメクチッククレー	-	5.0	
PVP	2.0	-	30
水／微成分	100%まで		

## 組成物 6

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

アルコールエトキシレート C <sub>12-18</sub> 、5-7 EO	6	4
アルキルベンゼンスルホネート ; C <sub>11-18</sub>	5	20
線状アルキルスルフェート ; C <sub>16-18</sub> (たとえば、Sulfofon)	5	0
石鹼	1	4
炭酸ナトリウム	10	0
ゼオライト Na-A	25	35
珪酸ナトリウム Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> = 3	2	2
硫酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1	20
ポリカルボキシレート ; (Sokalan-CP5)	5	5
カルボン酸 (Sokalan DCS)	0	4
過硼酸ナトリウム四水和物	20	0
TAED	6	0
泡抑制剤	5	0
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算 される)	0.0001-0.1	0.0001-0.1

10

20

30

## 組成物 7

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される漂白剤含有洗剤組成物：

第一アルコールスルフェート (Coco PAS)	5	6
非イオン性3 EO (たとえば、アルコールエトキシレート C <sub>12-15</sub> ; 3 EO)	5	0
非イオン性7 EO (アルコールエトキシレート C <sub>12-15</sub> ; 7 EO)	8	14
Sokalan HP22*	0.7	0.8
石鹼	1.3	0
ゼオライトMAP	39	39
クエン酸ナトリウム	4	5
炭酸ナトリウム	3.3	1
水／塩	0.4	0.5
消泡剤／蛍光剤／香料	4	5
TAED	5	5
Mn-触媒	1.7	1.7
過炭酸塩	21	21
EDTMP	0.4	0.4
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1	0.0001-0.1

\* : WO 95/22593に記載されるようなグラフトポリマー

#### 組成物 8

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される非漂白剤含有洗剤組成物：



第一アルコールスルフェート (Coco PAS)	6	6	11	9	6	6
非イオン性3 EO (たとえば、 アルコールエトキシレートC <sub>12-15</sub> ; 3 EO)	6	0	4	4	6	0
非イオン性7 EO (たとえばア ルコールエトキシレートC <sub>12-15</sub> ; 7 EO)	6	14	6	6	9	15
Sokalan HP22*	0.7	0.7	0.6	0.7	0.5	0.5
石鹼	2	2	2	2	2	2
ゼオライトMPA	39	39	30	32	40	40
クエン酸ナトリウム	25	25	30	32	22	22
炭酸ナトリウム	1	1	2	2	1	1
ナトリウムCMC	0	0	0	0	0.7	0.7
水／塩	5	6	5	6	6	6
消泡剤／PVP／香料	3	3	4	4	3	3
EDTMP	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質とし て計算される)	0.001 - 0.1					

\* WO 95622593に記載されるようなグラフトポリマー

#### 組成物 9

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

粒質物として配合される洗剤組成物； 粒状アルコールエトキシレート C <sub>12-14</sub> ， 5 EO として配合される洗剤組成物	0.5	0	0
アルキルグリコシド C <sub>12-14</sub> 重合度：1.4	5	5	10
線状アルキルスルフェート C <sub>16-18</sub> (たとえば Sulfopon Henkel)	10	18	15
石鹼	1	6	6
炭酸ナトリウム	12	0	0
ゼオライト Na-A	23	50	33
珪酸ナトリウム (SiO <sub>2</sub> :Na <sub>2</sub> O=3.0)	5	0	3
ポリカルボキシレート (Sokalan CP5)	6	0	0
カルボン酸 (Sokalan DCS)	0	4	0
過炭酸ナトリウム	0	0	15
TAED	6	0	3
泡抑制剤	6	6	6
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001 - 0.1		
水	100% まで		

10

20

30

## 組成物10

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

ゼオライト A	38	38	0	0	0
ナトリウムジシリケート (たとえば、SKS-6, Hoechst)	0	0	25	30	30
非晶性珪酸ナトリウム $\text{SiO}_2:\text{Na}_2\text{O}=1:2.0$	5.5	5.5	0	0	0
炭酸ナトリウム	3	3	3	5	0
ポリカルボキシレート (Sokalan CP5)	0	2	6	5	5
80% アルコールエトキシレート $\text{C}_{12-18}$ , 5 EO 及び 20% アルコールエトキシレート $\text{C}_{12-14}$ , 3 EO の混合物 (Dehydol LST80/20)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
アルコールエトキシレート $\text{C}_{16-18}$ ; 14 EO (たとえば (Dehydol TA 14))	2	2	2	2	2
ナトリウムアルキルベンゼン スルホネート; $\text{C}_{12}$	0	0	2	0	0
アルキルスルフェート; $\text{C}_{16-18}$ ,	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
過硼酸塩四水和物	25	25	25	25	25
TAED	2	2	2	2	2
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として 計算される)	0.0001 - 0.1				
水、香料、泡抑制剤、等	100% まで				

## 組成物11

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

線状アルキルベンゼンスルホネート	9	
非イオン性エトキシ化されたアルコール 7 EO- (たとえば、Synperonic A7)	2	
非イオン性エトキシ化されたアルコール、 Superonic A3 & A7 の1:1 混合物(3/7 EO 基)	5	
ゼオライト 4A	29	
ポリカルボキシレート (たとえばSokalan CP5)	4	10
炭酸ナトリウム	7	
粒状珪酸ナトリウム	4	
TAED	8	
過硼酸ナトリウム一水和物	15	
EDTMP(エチレンジアミンテトラメチレンスルホン酸)	0.4	20
少なくとも25のEO基を非イオン性材料 (たとえば、Lutensol AT-BASF及びBRIJ-ICI)	0.1	
微成分 (蛍光剤、CMC、塩、消泡剤粒状物、香料)	4	
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1	
湿度	100%まで	30

## 組成物12

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

ナトリウム一次アルキルスルフェート(PAS)	6
非イオン性エトキシ化されたアルコール 3 EO- (たとえば、Synperonic A3)	7
非イオン性エトキシ化されたアルコール 7 EO- (たとえば、Synpernic A7)	6
ゼオライトMAP	36
ステアリン酸	2
牛脂80 EO	0.2
珪酸ナトリウム	3
TAED	5
マンガン触媒	2
過炭酸ナトリウム	21
Dequest 2047	0.4
微成分 (蛍光剤、CMC、塩、消泡剤粒質物、香料)	4
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1
湿度	100%まで

## 組成物13

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

デシリデン又はドデシリデンジグリセロール	17	0
デシリデン又はドデシリデントリグリセロール	0	9
C <sub>12-15</sub> EO 7 エトキシレート		9
ゼオライト	32	32
炭酸ナトリウム	12	12
アルカリ性珪酸ナトリウム	1	1
脂肪酸石鹼	2	2
ナトリウムカルボキシメチルセルロース	1	1
過硼酸ナトリウム一水和物	15	15
TAED	7	7
漂白剤安定剤 (EDTMP)	0.4	0.4
シリコーン泡抑制剤	0.4	0.4
蛍光剤／香料	1	1
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1	
湿度	100%まで	

## 組成物14

下記成分を含んで成る、粒質物として配合される洗剤組成物：

10

20

30

アルキルベンゼンスルホネート C <sub>10-18</sub>	18	13	15	11	15	3
線状アルキルスルフェート ; C <sub>16-18</sub> (たとえばSolfopon)		3		3	4	14
アルコールエトキシレート ; C <sub>16-18</sub> ; 5 EO	1.5	0.5		0.5		
セチル／オレイルアルコール 5 EO	1.5	1		0.7	1.4	
セチル／オレイルアルコール 10 EO	1.5	1		0.7	1.4	
アルコールエトキシレート ; C <sub>14-15</sub> ;7 EO(Dobanol 45-7)			2			0.5
アルコールエトキシレート ; C <sub>14-15</sub> ;4 EO(Dobanol 45-4)			6			0.5
ゼオライトNa-A	50	15	42	15	51	42
Na－珪酸塩			5			5
Na－炭酸塩			12			12
Na－硫酸塩	1	45	1	42		
ポリカルボキシレート (Sokalan CP5)	5	3	5	2	5	4
Na－硫酸水素塩		3				
有機酸 (Sokalan DSC)	3					1.5
水	14.5	11.8	10.1	14.5	16.0	13.1
石鹼、C <sub>12-18</sub>	3	3	1	3	4	3
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として 計算される)	0.0001 - 0.1					

組成物15

下記成分を含んで成る粉末化された組成物：

10

20

30

40

ナトリウムアルキルベンゼン スルホネート C <sub>10-13</sub>	11	11.5	7	11	15	
アルコールエトキシスルフェ ート (スルフェート化された Alfonic 1412-70)		5.5				
一次アルコールスルフェート	10			9	5	
アルコールエトキシレート (たとえば Neodol 25-9)		3		2	3	10
石鹼	1				1	
トリポリリン酸ナトリウム					25	
アルミノシリケート、 たとえばゼオライト 4A	10- 35	0-15	5-20	0-12		
ポリカルボキシレート	0-3					
MA/AA/疎水性ターポリマー*	2-25	2-25	2-25	2-25	5	2-20
アルカリ性珪酸塩	2-5	20	5	3-20	15	15
炭酸ナトリウム	18	18	15	30	20	40
第四アミン			2.4			
エトキシ化されたアミン (たとえば Varonic U202)			2			
潤滑クレー			10			
蛍光剤 (Tinopal AMS)	0.15	0.2	0.25	0.15	1.5	1.5
香料	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
酵素、脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質とし て計算される)	0.0001 - 0.1					
硫酸ナトリウム	100%まで					

\* : アメリカ特許第 5,308,530 に記載されるような

#### 組成物 16

下記成分を含んで成る水性液体洗剤 :

10

20

30

40



アルキルベンゼンスルホネート；C <sub>10-13</sub> ；モノエタノールアミン塩	0	0	0	0	9	17	0	0	0
アルキルエーテルスルフェート、C <sub>12-14</sub> ；2 EO	16	10	10	21	11	0	14	38	21
ラウリル硫酸ナトリウム	0	5	5	0	0	0	4	0	0
石鹼（C <sub>12-18</sub> 一脂肪酸）	5	5	5	5	5	5	5	5	5
アルコールエトキシレート C <sub>12-15</sub> ；7 EO	22	30	30	30	30	30	20	25	30
アルキルグリコシド、C <sub>8-10</sub> ーオリゴマー化の程度：1.6	15	0	7	0	0	0	0	0	0
アルキルグリコシド、C <sub>12-16</sub> ーオリゴマー化の程度：1.4	0	5	0	5	5	5	10	0	5
1，2 ープルパンジオール	15	15	15	15	15	15	15	15	15
エタノール	5	5	5	5	5	5	5	5	5
酵素、たとえば脂肪分解酵素（純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001 - 0.1								
水	100%まで								

10

20

## 組成物17

下記成分を含んで成る液体洗剤組成物：

30

脂肪酸モノグリセリド (たとえばCutina AGS, Henkel)	0.5
C <sub>12-18</sub> 脂肪酸 (たとえばEdenor K12-18, Henkel)	5
アルコールエトキシレート ; C <sub>12-18</sub> ; 7 EO	20
アルキルグリコシド、C <sub>12-14</sub> 、 重合の程度 : 1.4	20
アルキルスルフェート C <sub>16-18</sub> (たとえばSulfoapon K35, Henkel)	5
エタノール	5
1, 2-プロピレングリコール	8
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1
水	100%まで

## 組成物18

下記成分を含んで成る、非水性液体洗剤として配合される洗剤組成物：

アルコールエトキシレート C <sub>10-12</sub> ; 7 EO	28
アルコールエトキシレート C <sub>10-12</sub> ; 3 EO	23
グリセロールトリアセテート	6
シリコーン消泡剤	1.5
アルキルベンゼンスルホン酸	7
炭酸ナトリウム	20
方解石	7
抗播種ポリマー	2
シリカ	4
カルボキシメチルセルロース	2
過酸*	0.1
増白剤	0.2
香料	0.6
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1

\* : WO 95/06104 に記載されるような

## 組成物19

下記成分を含んで成る、非水性液体洗剤として配合される洗剤組成物：

デシリデン又はドデシリデンジグリセロール	25
C <sub>10-15</sub> EO 7 エトキシレート	25
炭酸ナトリウム	17
過硼酸ナトリウムー水和物	11
アルキルベンゼンスルホン酸	6
炭酸カルシウム	6
シリカ（分散剤）	4
シリコーン泡抑制剤	3
蛍光剤／抗灰化ポリマー／抗再付着ポリマー	3
酵素、脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1

## 組成物20

下記成分を含んで成る、水性液体洗剤として配合される洗剤組成物：

デシリー又はドデシリデントリグリセロール	25	0
デシリー又はドデシリデンジグリセロール	0	12.5
C <sub>10-15</sub> EO 7、エトキシレート	0	12.5
脂肪酸	4.5	4.5
水酸化カリウム	10	10
ゼオライト	15	15
クエン酸	8	8
グリセロール	2	2
ホウ砂	1.5	1.5
ポリマー	1	1
シリコーン油	0.3	0.3
香料	0.5	0.5
酵素、たとえば脂肪分解酵素 （純粋な酵素タンパク質として計算される）	0.0001-0.1	
水	100%まで	

## 組成物21

10

20

30

40

50

下記成分を含んで成る液体洗剤組成物：

ナトリウムC <sub>11-15</sub> アルキルベンゼン スルホネート	8	17	10			7
アルコールエトキシスルフェート (C <sub>12-14</sub> 、60重量%の酸化エチレン)	12		6			1
アルコールエトキシレート (C <sub>12-14</sub> アルコールエトキシレート)	8	7	8	16	8	4
アルキルポリグリコシド					16	15
クエン酸三ナトリウム	0-15	0-15	0-10	0-20	10	10
カルボキシメチレンオキシスクシネート、 三ナトリウム					10	0-20
オキシスクシネートー四ナトリウム						6
MA/AA/疎水性ターポリマー*	5-15	2-20	2-15	1-10	5	2-15
モノエタノールアミン	1	2	2	0-4		2
トリエタノールアミン			2		4	4
炭酸ナトリウム						1
ホウ砂五水和物			3.5		4	4
グリセロール			4		6	5
プロピレングリコール	10			10	2	5
蟻酸	1			1		1
塩化カルシウム	1		1	1	1	1
第四アミン				2		
エトキシ化されたアミン	1			2	1	
アルキルジメチルアミンオキシド				1.5		
Naキシレンスルホネート	3	6	3	2		3
エタノール	10		2	8	3	3
蛍光剤	0.25	0.2	0.25	0.25	0.2	0.15
香料	0.2	0.15	0.1- 0.3	0.2	0.25	0.1- 0.25
酵素、たとえば脂肪分解酵素（純粋な 酵素タンパク質として計算される）	0.0001 - 0.1					
硫酸ナトリウム	100%まで					

\* ：アメリカ特許第5,308,530号に記載されるような。

#### 組成物22

下記成分を含んで成る水性液体洗剤組成物：

シリコーン消泡剤	0.3
クエン酸	8
グリセロール	2
ホウ砂	2
KOH	10
ゼオライト4A	8
ポリマー：ヨーロッパ特許第346,995号における ポリマーA11のような化学構造の解凝集ポリマー	1.0
QCC200：ベントナイトクレー	8
オレイン酸	5
LAS－酸	17
Synporonic A3	5
Synporonic A7	5
PVP	0.3
香料	0.5
酵素、たとえば脂肪分解酵素 (純粋な酵素タンパク質として計算される)	0.0001-0.1
水	100%まで

#### 皿洗いの組成物

皿洗い洗剤組成物は、アニオン性、非イオン性、カチオン性、両性又はそれらのタイプの混合物であり得る界面活性剤を含んで成る。前記洗剤は、0～90%の非イオン性界面活性剤、たとえば低い～非発泡性のエトキシ化されたプロポキシ化直鎖アルコールを含むであろう。

洗剤組成物は、無機及び/又は有機タイプの洗剤ビルダー塩を含むことができる。洗剤ビルダーは、リン含有及び非リン含有タイプに細分され得る。洗剤組成物は通常、1～90%の洗剤ビルダーを含む。

リン含有無機アルカリ洗剤ビルダーの例は、存在するなら、水溶性塩、特にアルカリ金属のピロリン酸塩、カルトリン酸塩、ポリリン酸塩及びホスホン酸塩を包含する。非リン含有無機ビルダーの例は、存在するなら、水溶性アルカリ金属炭酸塩、硼酸塩及び珪酸塩、並びに種々のタイプの水不溶性結晶性又は非晶性アルミノ珪酸塩（このゼオライトは最良の知られている保存剤である）を包含する。

適切な有機ビルダーの例は、アルカリ金属、アンモニウム及び置換されたアンモニウムのクエン酸塩、琥珀酸塩、マロン酸塩、脂肪酸スルホン酸塩、カルボキシメトキシ琥珀酸塩、アンモニウムポリ酢酸塩、カルボン酸塩、ポリカルボン酸塩、アミノポリカルボン酸塩、ポリアセチルカルボン酸塩及びポリヒドロキシスルホン酸塩を包含する。

他の適切な有機ビルダーは、ビルダー性質を有することが知られている高分子量ポリマー及びコポリマー、たとえば適切なポリアクリル酸、ポリマレイン酸及びポリアクリル酸/ポリマレイン酸のコポリマー及びそれらの塩を包含する。

皿洗い洗剤組成物は、塩素／臭素型又は酸素型の漂白剤を含むことができる。無機塩素／臭素型漂白剤の例は、ナトリウム又はカルシウム次亜塩素酸塩、及び塩素化されたリン酸三ナトリウムである。有機塩素／臭素タイプの漂白剤の例は、複素環式N - ブロモ及びN - クロロイミド、たとえばトリクロロイソメシアヌル酸、トリプロモハソシアヌル酸、ジプロモイソシアヌル酸及びジクロロイソシアヌル酸、及び水溶性カチオン、たとえばカリウム及びナトリウムとのそれらの塩である。ヒダントイン化合物もまた適切である。

酸素漂白剤は、たとえば無機過酸塩の形で、好ましくは漂白剤前駆体と共に又はペルオキシ酸化合物として好ましい。適切なペルオキシ漂白化合物の典型的な例は、アルカリ金属の過硼酸塩（四及び一水和物）、アルカリ金属の過炭酸塩、過珪酸塩及び過リン酸塩である。好ましい活性剤材料は、TAED及びグリセロールトリアセテートである。

本発明の皿洗い洗剤組成物は、酵素のための従来の安定剤、たとえばポリオール、たとえばプロピレングリコール、糖又は糖アルコール、乳酸、硼酸、又は硼酸誘導体、たとえば芳香族硼酸エステルを用いて安定化され得る。

皿洗い洗剤組成物はまた、他の酵素、特にアミラーゼ、プロテアーゼ及び／又はセルラーゼも含むことができる。

本発明の皿洗い洗剤組成物はまた、他の従来の洗剤成分、解凝集材料、充填剤材料、泡抑制剤、耐腐蝕剤、土壌 - 懸濁剤、金属イオン封鎖剤、抗 - 土壌再付着剤、脱水剤、染色、殺菌剤、蛍光剤、増粘剤、及び香料を含むことができる。

本発明の最初の洗浄脂肪分解酵素は、洗剤において従来使用される濃度で導入され得る。

本発明の洗剤組成物においては、脂肪分解酵素は、洗浄液体 1 l 当たり脂肪分解酵素 0.0001 ~ 1 mg（純粋な酵素タンパク質として計算される）に対応する量で添加され得る。

下記に、特に好ましい皿洗い組成物が例示される：

1) 粉末自動皿洗い組成物：

非イオン性界面活性剤	0.4 - 2.5%
ナトリウムメタシリケート	0 - 20%
ナトリウムジシリケート	3 - 20%
ナトリウムトリホスフェート	20 - 40%
炭酸ナトリウム	0 - 20%
過硼酸ナトリウム	2 - 9%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	1 - 4%
硼酸ナトリウム	5 - 33%
酵素	0.0001 - 0.1%

2) 粉末自動皿洗い組成物

10

20

30

40

非イオン性界面活性剤 (たとえばアルコールエトキシレート)	1 - 2%
ナトリウムジシリケート	2 - 30%
炭酸ナトリウム	10 - 50%
リン酸ナトリウム	0 - 5%
クエン酸三ナトリウム二水和物	9 - 30%
酢酸ニトリロ三ナトリウム (NTA)	0 - 20%
過硼酸ナトリウム一水和物	5 - 10%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	1 - 2%
ポリアクリレートポリマー (たとえば、 マレイン酸／アクリル酸コポリマー)	6 - 25%
酵素	0.0001 - 0.1%
香料	0.1 - 0.5%
水	5 - 10%

10

20

## 3) 粉末自動皿洗い組成物:

非イオン性界面活性剤	0.5 - 2.0%
ナトリウムジシリケート	25 - 40%
クエン酸ナトリウム	30 - 55%
炭酸ナトリウム	0 - 29%
炭酸水素ナトリウム	0 - 20%
過硼酸ナトリウム一水和物	0 - 15%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	0 - 6%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	0 - 5%
クレー	1 - 3%
ポリアミノ酸	0 - 20%
ナトリウムポリアクリレート	0 - 8%
酵素	0.0001 - 0.1%

30

40

## 4) 粉末自動皿洗い組成物:

非イオン性界面活性剤	1 - 2%
ゼオライトMAP	15 - 42%
ナトリウムジシリケート	30 - 34%
クエン酸ナトリウム	0 - 12%
炭酸ナトリウム	0 - 20%
過硼酸ナトリウム一水和物	7 - 15%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	0 - 3%
ポリマー	0 - 4%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	0 - 5%
有機リン酸塩	0 - 4%
クレー	1 - 2%
酵素	0.0001 - 0.1%
硫酸ナトリウム	100%まで

10

20

## 5) 粉末自動皿洗い組成物：

非イオン性界面活性剤	1 - 7%
ナトリウムジシリケート	18 - 30%
クエン酸三ナトリウム	10 - 24%
炭酸ナトリウム	12 - 20%
モノペルスルフェート ( $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ )	15 - 21%
漂白剤安定	0.1 - 2%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	0 - 6%
ジエチレントリアミンペンタアセテート、 五ナトリウム塩	0 - 2.5%
酵素	0.0001 - 0.1%
硫酸ナトリウム、水	100%まで

30

40

## 6) 洗浄界面活性剤システムを含む粉末及び液体皿洗い組成物：



非イオン性界面活性剤	0 - 1.5 %	
オクタデシルジメチルアミンN-オキシド二水和物	0 - 5%	
オクタデシルジメチルアミンN-オキシド二水和物及びヘキサデシルジメチルアミンN-オキシド二水和物の80:20wt. C18/C16ブレンド	0 - 4%	
オクタデシルジス(ヒドロキシエチル)アミンN-オキシド無水物及びヘキサデシルビス(ヒドロキシエチル)アミンN-オキシド無水物の70:30wt. C18/C16ブレンド	0 - 5%	10
平均3のエトキシ化の程度を有するC <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> アルキルエトキシスルフェート	0 - 10%	
平均12のエトキシ化の程度を有するC <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> アルキルエトキシスルフェート	0 - 5%	
平均12のエトキシ化の程度を有するC <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> アルキルエトキシスルフェート	0 - 5%	20
平均9のエトキシ化の程度を有するC <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> のエトキシ化されたアルコールのブレンド	0 - 6.5%	
平均30のエトキシ化の程度を有するC <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> のエトキシ化されたアルコールのブレンド	0 - 4%	
ナトリウムジシリケート	0 - 33%	
ナトリウムトリポリホスフェート	0 - 46%	
クエン酸ナトリウム	0 - 28%	30
クエン酸	0 - 29%	
炭酸ナトリウム	0 - 20%	
過硼酸ナトリウム一水和物	0 - 11.5%	
テトラアセチルエチレンジアミン(TAED)	0 - 4%	
マレイン酸/アクリル酸コポリマー	0 - 7.5%	40
硫酸ナトリウム	0 - 12.5%	
酵素	0.0001-0.1%	

## 7) 非水性液体自動皿洗い組成物

液体非イオン性界面活性剤 (たとえばアルコールエトキシレート)	2.0 - 10.0%
アルカリ金属の珪酸塩	3.0 - 15.0%
アルカリ金属のリン酸塩	20.0 - 40.0%
グリコール、ポリグリコール、ポリオキシド、 グリコールエーテルから選択された液体キャリアー	25.0 - 45.0%
安定剤 (たとえば、ホスホン酸及び C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> アルカノールの部分エステル)	0.5 - 7.0%
抑泡剤 (たとえば、シリコーン)	0 - 1.5%
酵素	0.0001-0.1%

10

## 8) 非水性液体皿洗い組成物:

液体非イオン性界面活性剤 (たとえばアルコールエトキシレート)	2.0 - 10.0%
珪酸ナトリウム	3.0 - 15.0%
アルカリ金属の炭酸塩	7.0 - 20.0%
クエン酸ナトリウム	0.0 - 1.5%
安定化システム (たとえば、細かく分割された シリコーン及び低分子量ジアルキルポリグリコ ールエーテルの混合物)	0.5 - 7.0%
低分子量ポリアクリレートポリマー	5.0 - 15.0%
クレーゲル増粘剤 (たとえば、ベントナイト)	0.0 - 10.0%
ヒドロキシプロピルセルロースポリマー	0.0 - 0.6%
酵素	0.0001-0.1%
グリコール、ポリグリコール、ポリオキシド及 びグリコールエーテルから選択された液体キャ リヤー	100%まで

20

30

40

## 9) チキソトロープ液体自動皿洗い組成物:

C <sub>12</sub> - C <sub>14</sub> 脂肪酸	0 - 0.5%
ブロックコポリマー界面活性剤	1.5 - 15.0%
クエン酸ナトリウム	0 - 12%
トリポリリン酸ナトリウム	0 - 15%
炭酸ナトリウム	0 - 8%
アルミニウムトリステアレート	0 - 0.1%
ナトリウムクメンスルホネート	0 - 1.7%
ポリアクリレート増粘剤	1.32 - 2.5%
ポリアクリル酸ナトリウム	2.4 - 6.0%
硼酸	0 - 4.0%
蟻酸ナトリウム	0 - 0.45%
蟻酸カルシウム	0 - 0.2%
ナトリウム n - デシジフェニルオキシドジスルホネート	0 - 4.0%
モノエタノールアミン(MEA)	0 - 1.86%
水酸化ナトリウム (50%)	1.9 - 9.3%
1, 2 - プロパンジオール	0 - 9.4%
酵素	0.0001 - 0.1%
泡抑制剤、染料、香料、水	100% まで

10) 液体自動皿洗い組成物:

10

20

30

アルコールエトキシレート	0 - 20%
脂肪酸エステルスルホネート	0 - 30%
ドデシル硫酸ナトリウム	0 - 20%
アルキルポリグリコシド	0 - 21%
オレイン酸	0 - 10%
ナトリウムジシリケート一水和物	18 - 33%
クエン酸ナトリウム二水和物	18 - 33%
ステアリン酸ナトリウム	0 - 2.5%
過硼酸ナトリウム一水和物	0 - 13%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	0 - 8%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	4 - 8%
酵素	0.0001-0.1%

11) 保護された漂白剤粒子を含む液体自動皿洗い組成物：

珪酸ナトリウム	5 - 10%
ピロリン酸四カリウム	15 - 25%
ナトリウムトリホスフェート	0 - 2%
炭酸カリウム	4 - 8%
保護された漂白剤粒子、たとえば塩素	5 - 10%
ポリマー性増粘剤	0.7 - 1.5%
水酸化カリウム	0 - 2%
酵素	0.0001-0.1%
水	100%まで

11) 1), 2), 3), 4), 6) 及び10) に記載されるような自動皿洗い組成物（ここで、過硼酸塩が過炭酸塩により置換されている）。

12) 1) ~ 6) に記載されるような自動皿洗い組成物（ここで、さらにマンガン触媒が含まれる）。前記マンガン組成物は、“Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching”, *Nature* 369, 1994, pp.637-639に記載される化合物の1つであり得る。

さらに、本発明の第1の洗浄脂肪分解酵素は、軟化組成物に使用され得る。

本発明の脂肪分解酵素は、Surfactant and Consumer Products, Ed, by J. Falbe, 1987, pp.295-296; Tenside Surfactants Detergents, 30 (1993), 6, pp.394-399; JAOCs, Vol. 61 (1984), 2, pp.367-376; ヨーロッパ特許第517762号; ヨーロッパ特許第123400

10

20

30

40

50

号；WO 92 / 19714；WO 93 / 19147；アメリカ特許第5,082,578号；ヨーロッパ特許第494769号；ヨーロッパ特許第544493号；ヨーロッパ特許第543562号；アメリカ特許第5,235,082号；ヨーロッパ特許第568297号；ヨーロッパ特許第570237号に記載されるように、布用軟化剤に使用され得る。

#### 材料及び方法

##### 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、グリセリントリブチレート (MERCK) を乳化することによって調製された。リパーゼ活性はpH安定方法を用いて、pH 7でアッセイされる。1単位のリパーゼ活性 (LU) は、1分当たり 1  $\mu$ m の脂肪酸を生成するために必要とされる量として定義される。

10

##### 菌株及びプラスミド

ヒュミコラ・ラヌギノサDSM4109: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3302 Braunschweig, Federal Republic of Germany から入手できる (ヨーロッパ特許第305,216号)、

サッカロミセス・セレビスシアエYNG318: MATa Dpep4 [cir<sup>+</sup>] ura3-52, Leu2-72, his4-539、

アスベルギラス・オリザエIFO4177、

A . オリザエA1560-T40: A . オリザエIFO4177 (WO 91 / 17243) のプロテアーゼ欠失誘導体、

A . オリザエJaL125: A . オリザエpyrG遺伝子をマーカーとして用いて、1段階遺伝子置換法 (G. May, "Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi" (1992), p.1-25, Eds. J.R. Kinghorn and G. Turner; Blackie Academic and Professionalにより記載される) により欠失された "alp" (Murakami Kなど., (1991), Agric. Biol. Chem. 55, p.2807-2811により記載される) と称するアルカリプロテアーゼ遺伝子を有する、Institute for Fermentation, Osaka; 17-25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawa-Ku, Osaka, Japanから入手できるアスベルギラス・オリザエIFO4177、

20

アビシジア・レフレキサATTC44896は、アビシジア・レフレキサATTC44896としてATCC (American Type Culture Collection, 12301, Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA) から、及びWO 96 / 113578 (Novo Nordisk A/S) に記載されるようにアビシジア・レフレキサIFO5874としてIFO (Institute for Fermentation, 17-85 Juso-horrmachi 2-c home, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan) から入手できる、

30

酵母細胞YPH499 (Stratagene)、

E . コリDH10B (Gibco)、

pTiK04: リパーゼ遺伝子の開始の上流の拡張部分をコードするSPIRRを有する成熟AbレフレキサNL127リパーゼ遺伝子を含むpJS037から構成される、

pTiK05: SPIRR拡張部分を有さないpTiK04、

pTiK06: MF 1シグナル配列を有するpTiK04、

pTiK07: MF 1シグナル配列を有するpTiK05、

pYESHLは、酵母において低レベルのH . ラヌギノサ脂肪分解酵素を発現し、そして分泌する酵母 / E . コリシャトルベクターである。より特定には、pYESHLはpYESZの誘導体であり、ここでGAL 1プロモーターは切断され、そしてH . ラヌギノサ脂肪分解酵素遺伝子及びS . セレビスシアエからのTPI (トリホスホスフェートイソメラーゼ) プロモーター (Alber, T. and Kawasaki, G., J. Mol. Appl. Genet 1, 419-434 (1982)) がSph I部位とXba I部位との間にクローン化されている。pYESHLの制限地図は、図1に示される。

40

DJS037 (S . セレビスシアエ発現プラスミド) (J.S. Okkels, (1996) "pYESにおけるURA 3 - プロモーター欠失は、サッカロミセス・セレビスシアエにおける菌類リパーゼの発現レベルを高める", Recombinant DNA Biotechnology: The Integration of Biological and Engineering Sciences, vol. 782, Annals of the New York Academy of Sciences)。より特定には、発現プラスミドpJS037は、pYES2.0の誘発性GAL 1 - プロモーターを、サッカロミセス・セレビスシアエからの構成的に発現されたTPI (トリホスホスフェート・イソ

50

メラゼ) - プロモーター (Albert and Karwasaki, (1982), J. Mol. Appl. Genet., 1, 419-434) により置換し、そしてURA 3 プロモーターを欠失することによって、pYES2.0 から誘導される。pJS037の制限地図は、図 6 に示される、  
 pYES2.0 (Invitrogen Corp., UK)、  
 p960 A . オリザエ発現プラスミド (ヨーロッパ特許第305216号に記載される)、  
 pUC19 (Yanish-Perronなど., (1985) Gene 33, 103-119)、  
 pHD414 (アスペルギラス発現ベクターは、ヨーロッパ特許第238023号に記載されるプラスミドp775の誘導体である。pHD414の構成はWO 93 / 11249にさらに記載されている)。  
 pJVi245 (図 8 を参照のこと)、  
 pCaHj383 (図 8 を参照のこと)、  
 pCaHj385 (図 8 を参照のこと)、  
 低カルシウムフィルターアッセイ

10

#### 方法

- 1) 第 1 のタンパク質結合フィルター (ナイロン膜) 及びその上部に第 2 の低いタンパク質結合フィルター (酢酸セルロース) を有するSC Uraレプリカプレート (発現ベクターを担持する株を選択するために有用な) を供給し、
- 2) 二重フィルター上に親脂肪分解酵素遺伝子又は問題の突然変異誘発された脂肪分解酵素を含む酵母細胞を広げ、そして30 で 2 又は 3 日間インキュベートし、
- 3) 上部フィルターを新規のプレートに移すことによってその上部フィルター上にコロニーを維持し、
- 4) タンパク質結合フィルターを空のペトリ皿に除き、
- 5) オリーブ油エマルジョン (2 % P.V.A. : オリーブ油 = 3 : 1)、ブリリアントグリーン (インジケーター、0.004%)、100mMのトリス緩衝液pH 9 及びEGTA (最終濃度 5 mM) を含んで成るアガロース溶液を、底部のフィルター上に注ぎ、脂肪分解活性を発現するコロニーを、ブルーグリーンスポットの形で同定し、
- 6) 親脂肪分解酵素に比較して低められたカルシウム依存性を有する段階 5) で見出されたコロニーを同定する。

20

#### Dobanol<sup>R</sup> 25-7フィルターアッセイ

洗剤成分に対する限定された耐性についてのスクリーニングが、上記アッセイに対応するフィルターアッセイの使用により行なわれる。但し、5) で定義された溶液は、さらに0.02%のDobanol<sup>R</sup> 25-7を含んで成る。

30

他のスクリーニングアッセイは次の通りである：

- 1) 第 1 のタンパク質結合フィルター (たとえば、ナイロン)、続いてその上部に非タンパク質結合フィルター (たとえば、酢酸セルロースを有するSC Ura - プレート (発現ベクターを担持する株を選択するために有用な) を供給し、
- 2) フィルター上に、親リパーゼ遺伝子又は突然変異誘発されたリパーゼ遺伝子を含む酵母細胞を広げ、そして30 で 3 又は 4 日間インキュベートし、
- 3) 上部フィルターを、新しいプレートに移すことによってその上部フィルター上にコロニーを維持し、
- 4) タンパク質結合フィルターを、オリーブ油エマルジョン (2 % P.V.A. : オリーブ油 = 2 : 1)、ブリリアントグリーン (インジケーター、0.004%) 100mMのトリス緩衝液pH10 及び洗剤又は洗剤成分を含んで成るアガロース溶液を含むペトリ皿に除く。タンパク質結合フィルターは、スクリーニングプレートに面するコロニー側に有するべきである。
- 5) 段階 4) で見出されたブルーグリーンスポットの形で、リパーゼ活性を発現するコロニーを同定する。

40

他方では、酵母コロニーを担持する非タンパク質結合フィルター (又はタンパク質結合フィルター) がスクリーニングプレート上に直接的に使用され得る。

ランダム突然変異誘発されたライブラリーの構成

a) ランダム突然変異誘発されたライブラリーの企画の背後の原理及び数学

ランダム突然変異誘発についての全体の原理は、低い連続した突然変異誘発が、次にさら

50

に突然変異誘発される良好な突然変異体について連続した選択に連続される性質の進化を模倣することである。同様に、文献に記載される最近のインビトロ進化の研究が、高まる選択圧力による連続した突然変異誘発により行なわれて来た（レビューのためには、Joyce, 1992を参照のこと）。本発明者は、第1回目の突然変異誘発にwt遺伝子を用いることによってこれを適合せしめた。次に、改良された変異体が次の回の突然変異誘発に使用される（小さな段階により改良するために）。本発明者は、wt酵素活性又は改良された変異体活性を破壊するのにまさしく十分である洗浄関連の条件下でスクリーンした。これは、本発明者が、ますます良好な変異体が単離される場合、スクリーニングの緊縮性を高めることを意味する。

交換の数を高め、そして改良された変異体の発見の可能性を高めるために、局在化されたランダム突然変異誘発がまた、行なわれた。リポラーゼ（Lipolase）の構造及び特定部位突然変異誘発からの結果から推定される重要な領域が選択された。たとえば、全体の脂質接触領域、特にリッド領域及びリットー接触領域は、改良のために重要であるものとして見なされた。脂質接触領域は、突然変異誘発された遺伝子上の7つの領域に対応する。それらの領域の組合せがまた行なわれた。

#### b) 完全な脂肪分解酵素コード領域のランダム突然変異誘発

プラスミドpYESHLを、12Mの蟻酸により室温で20分間、処理する。得られる脂肪分解酵素コード遺伝子を、突然変異誘発条件（0.5mMのMnCl<sub>2</sub>及び1/5の通常の量のATP；たとえばLeungなど、1989を参照のこと）下でPCRを用いて前記蟻酸処理されたプラスミドから増幅する。この処理は、蟻酸が主にトランスバージョン及びPCR生成の突然変異、主にトランジションを付与するので、広範囲の突然変異を付与することが予期される。

得られるPCRフラグメントを、シャトルベクター中へのインビボでの二重組換え、又はシャトルベクターの消化及びそれへの連結、及びE. コリの形質転換のいずれかによりクローニングする。

8個のランダムに採取されたクローンを配列決定し、そして平均して2～3の突然変異（トランスバージョン及びトランジションの両者）を含むことを見出した。

この方法の使用により、10,000～140,000個のクローンを含む、7種のライブラリーが製造された。

#### c) 局在化されたランダム突然変異誘発

突然変異誘発されるべきアミノ酸コドンに対応するヌクレオチドを除く、突然変異誘発されるべきDNA配列の一部に対応する突然変異誘発プライマー（オリゴヌクレオチド）が合成される。続いて、その得られる突然変異誘発プライマーは、適切な反対のプライマーとのPCR反応に使用される。その得られるPCRフラグメントが精製され、そして消化され、そしてシャトルベクター中にクローニングされる。他方では及び必要なら、その得られるPCRフラグメントは、突然変異誘発された領域の消化及びシャトルベクター中へのその領域のクローニングを可能にするために第2の適切な反対のプライマーとのプライマーとしての第2のPCR反応に使用される。PCR反応は通常の条件下で行なわれる。

局在化されたランダム突然変異誘発のために使用されるオリゴヌクレオチドを合成する場合、ドーピングレベルの計算が、突然変異誘発頻度を評価するために重要である。ヌクレオチド交換の頻度は、下記の二項分布式を用いて計算され得る：

$$\frac{N!}{i!(N-i)!}$$

$$P(i) = \frac{N!}{i!(N-i)!} \times p^i \times (1-p)^{N-i}$$

式中、Nはドーピングされたオリゴヌクレオチドの数であり；pは非wtヌクレオチドの画分であり；iはヌクレオチド交換の数であり；P(i)はi番目の交換の確立である。ヌクレオチド交換の数からaa交換の正確な数を計算することは、ほとんどのaaのためのコドンにおける第3位置がそのaaの変更を有さない2個又はすべての4個のヌクレオチドであり得るので、困難である。その同じことが、6個のコドンを有する3個のaaのための第1又は第2位置に関して事実である。aa交換の数を評価するためには、モンテカルロ刺激がより適切である。たとえば、RAMHAと呼ばれるプログラムがそのような刺激を行なう（Sid

10

20

30

40

50

erovski and Mak 1993に記載される)。このプログラムは、所望するドーピングを有する、たとえば10,000個のオリゴヌクレオチドの合成を刺激し、そして0～n個のaa交換の頻度を計算する。

ドーピングの例

13個のコドンの領域におけるドーピングとaa交換との間の関係は、次の通りである（モンテカルロ刺激を用いて計算される）：

%ドーピング	0	1	2	3	4	5	6	7
5%	0.2	0.35	0.27	0.13	0.05	0	0	0
10%	0.04	0.13	0.24	0.25	0.19	0.11	0.05	0
15%	0.005	0.03	0.10	0.20	0.24	0.23	0.13	0.07

10

13個のaaのためのaa交換の組合せの可能な数は、下記式を用いて計算され得る：

$$N = \frac{y!}{x!(y-x)!} 20^x \quad y = \text{突然変異誘発されるaaの数}$$

$$x = \text{aa交換の数}$$

13個のaaにおける1つのaa交換 = 260 の可能な交換  
 13個のaaにおける2つのaa交換 = 31200 の可能な組合せ  
 13個のaaにおける3つのaa交換 =  $2.3 \times 10^6$  の可能な組合せ

20

これから、ドーピングされたライブラリーの100,000のコロニーをスクリーニングする場合、上記表に示される分布を付与する13個のコドンにおける10%は、1つのaa交換を伴った約13,000のコロニーのスクリーニングを意味する（13%）ことが示される。しかしながら、わずか260の可能な1つのaa交換が存在し、その結果、多数の同じ1つのaa交換がスクリーンされる。たとえば15%（上記表における）のより高いドーピングは、より少ない1つのaa交換を付与する（約3%）が、しかしながら、2つのaa交換はまた、約100,000のスクリーニング能力を有する31200の可能な組合せのスクリーニングを可能にしないであろう程度（10%）に低められるであろう。

最終的に、aa交換は、wtアミノ酸の起点により偏向される。たとえば、GluをAlaに変更するためには、わずか1つのヌクレオチド交換を取るが、しかしGluからPheへの変更のためには3個のヌクレオチド交換を取る。これは、確立が1つのヌクレオチド交換を必要とするaa交換のためによりも、2又は3個のヌクレオチド交換を必要とするaa交換のために低いことを意味する。本発明者は、4又は6個のコドンに有するコドンの第3位置でG/Cを常を選択している。これは、wtコドンの偏向を低め、そしてまた、停止コドンの見込みも低める（完全にスクランブルされる場、4.7%から3.1%に）。与えられたプールサイズが最も有望な及び最少に有望な置換変異体を含むかどうかの確立を計算するためには、Palzkillなど。1994を参照のこと。

30

増幅されたライブラリーのスクリーニングにおける集団分布の計算

他の考慮が行なわれ得る。本明細書に示されるほとんどのライブラリーは、それらが酵母中に形質転換される前、E. コリにおいて増幅される。これは、同じ増幅されたクローンを1度以上、スクリーニングするための確立が存在することを意味する - ボックスIを参照のこと。

40



---

## ボックス I

---

たとえば100,000 の異なったクローンの増幅された、突然変異誘発されたライブラリーのスクリーニング：

ライブラリーの64%が、100,000 のコロニーがスクリーンされる場合にスクリーンされる。

ライブラリーの90%が、230,000 のコロニーがスクリーンされる場合にスクリーンされる。

ライブラリーの95%が、300,000 のコロニーがスクリーンされる場合にスクリーンされる。

これは、すべての100,000 のクローンが均等に増幅されることを仮定する。

次の式は、これを計算するために使用され得る：

$$N = \frac{\ell_n (1 - P)}{\ell_n (1 - 1/D)}$$

式中、Nはスクリーンされたクローンの数であり、Pはスクリーンされる異なったクローンの画分であり、そしてDは異なったクローンの合計数である。

---

### 抗 - 終結法

切断された早熟タンパク質を回避するためには、ナンセンス突然変異が停止コドンを形成するための潜在能力を有するコドンにおいて回避されるべきである。停止コドンを形成するための潜在能力を有さない他のコドンにより置換され得るコダンのためには、次の方策が使用され得る：

Gly: GGA	GG(G,C,T)
Leu: TT(A,G)	CTN
Arg: (A,C)GA	(A,C)GG 又は CG(C,T)
Ser: TC(A,G)	TC(C,T) 又は AG(C,T)

しかしながら、次のaaは、停止コドン能力を示すコドンにより単に特定され得る：Cys, Glu, Lys, Glu, Trp及びTyr。従って、ドーピングのみが、停止コドンを生成するヌクレオチドのランダム置換を回避するために企画され得る。たとえば、下記の通りである：

Glu (Lys及びGlnのために類似する): (90%G/5%C,A) (90%A/3.3%C,G,T)

(90%A/3.3%C,G,T). TAA又はTAGは存在しない = STOP.

Tyr (Cysのために類似する): (90%T/3.3%A,C,G) (90%A/3.3%C,G,T) (90%C/10%T).

TAG 又は TAA は存在しない = STOP.

Trp: (90%T/3.3%A,C,G) (90%G/5%C,T) (90%G/5%C,T). TGA 又は TAG は存在しない

= STOP.

そのような方策は、もちろん一定のaa交換を廃止するであろう。その方策を用いれば、  
切断された早熟タンパク質の数は劇的に低められるであろう。

ヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼ変異体のインピボ組換え（遺伝子シャフリング）  
多くのヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼ変異体のDNA配列が、同じ混合物においてイン  
ピボ組換えされ得る。

ベクターが、酵母発現ベクターpJS037中への連結によりリパーゼ変異体から調製される。  
すべてのベクターは、NruIにより切断開環される。

すべての相同DNA配列のDNAフラグメントは、標準の方法を用いてPCR増幅により調製され  
る。

前記DNAフラグメント及び開環されたベクターが混合され、そして標準の技法により、酵  
母サッカロミセス・セレビスシアエYNG318が形質転換される。その形質転換宿主細胞が、上  
記のようにして培養され、そしてスクリーンされる。出現する形質転換体が単離され、そ  
して上記のフィルターアッセイ法の1つを用いて、改良された洗浄性能について試験され  
る。

陽性の形質転換体は、相同DNA配列の遺伝子シャフリングに起因する改良された洗浄性能  
を有する変異体である。

脂肪分解酵素遺伝子のインピドロ特定部位突然変異誘発

脂肪分解酵素遺伝子中に突然変異を導入するために使用され得る1つのアプローチは、Ne  
lson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989)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されたDNA鎖を用いることによ  
って導入された所望する突然変異を含むPCR（ポリメラーゼ鎖反応）フラグメントの3段階  
生成を包含する。PCRフラグメントの構成は、当業界において知られている方法に従っ  
て行なわれ得る。PCR生成されたフラグメントから、突然変異を担持するDNAフラグメントが  
、制限酵素による切断により単離され、そして発現プラスミド中に再挿入され得る。図4  
及び5において、前記方法はさらに概略されている。

H・ラヌギノサ脂肪分解酵素の変異体の構成のためのもう1つの方法は、市販のキット、  
すなわち製造業者の説明書に従ってのChemeleon二重鎖特定部位突然変異誘発キットの使  
用を包含する。

問題の脂肪分解酵素をコードする遺伝子は、プラスミドpHD414中に挿入される。製造業者  
の説明書に従って、pHD414のアンピシリン遺伝子のSca I 部位が、次のプライマーの使用  
によりMlu I 部位に変更される：

**プライマー 3 : AGAAATCGGGTATCCTTTCAG**

次に、問題の脂肪分解酵素を含んで成るpHD414ベクターが、DNAポリメラーゼ及びオリゴ  
258及び7770のための鋳型として使用され、そしてそれらの配列はこの後の例に開示され  
る。所望する突然変異（たとえば、脂肪分解遺伝子のN - 末端において）は、その所望す  
る突然変異を含んで成る適切なオリゴの付加により、問題の脂肪分解遺伝子中に導入され  
る。N - 末端ペプチド付加が適用される場合、これは、特定の脂肪分解酵素のプロ - 又は  
プレプロ部分をコードするDNA配列のコドン我突然誘発することによって達成され得る。

PCR反応は、製造業者の推薦に従って行なわれる。

DNA配列決定は、ABI Dye Terminator Cycle Sequencingキットにおけるプロトコールに従  
って、Applied Biosystems ABI DNA配列モデル373Aを用いて行なわれた。

アスペルギラス・オリザエにおけるヒュミコラ・ラヌギノサ脂肪分解酵素の発現  
H. ラヌギノサ脂肪分解酵素のクローニングは、ヨーロッパ特許第305216号に記載される。  
それはまた、A. オリザエにおける前記酵素の発現及び特徴化も記載する。使用される  
発現プラスミドは、p960と命名される。

本出願に使用される発現プラスミドはp960と同一であるが、但し、ちょうど3側のリ  
パーゼコード領域にマイナーな変性が存在する。この変性は次の手段で製造された：p96  
0がNru I 及びBamH I 制限酵素により消化された。それらの2つの部位間に、Nhe I フラグ  
メントがクレノウポリメラーゼによりフィルインされている、プラスミドpBR322からのBa  
mH I / Nhe I フラグメントがフローン化され、それにより、ユニークBamH I 及びNhe I 部位  
を含むプラスミドpA01 (図2) が創造された。それらのユニーク部位間に、p960からのB  
amH I / Xho I フラグメントがクローン化され、pAHL (図3) が得られた。

#### アスペルギラス・オリザエの形質転換 (一般的な方法)

100mlのYPD (Shermanなど., (1981), Methbds in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor  
Laboratory) を、A. オリザエの胞子により接種し、そして約24時間、振盪しながらイ  
ンキュベートする。菌糸体を、マイクロクロスを通しての濾過により収穫し、そして0.6  
MのMgSO<sub>4</sub> 200mlにより洗浄する。菌糸体を、1.2MのMgSO<sub>4</sub>, 10mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH5.8の溶  
液15mlに懸濁する。その懸濁液を氷上で冷却し、そして120mgのNovozyme234、バッチ1687  
を含む緩衝液1mlを添加する。5分後、12mg/mlのBSA (SigmaタイプH25) 1mlを添加し  
、そして37℃で1.5~2.5時間、軽く攪拌しながらインキュベーションを、多数のプロトプ  
ラストが顕微鏡下で観察されるサンプルに見えるまで、続ける。

懸濁液をマイクロクロスを通して濾過し、濾液を無菌管に移し、そして0.6Mのソルビト  
ール、100mMのトリス-HCl, pH7.0の溶液5mlにより被覆する。遠心分離を1000gで15分  
間、行ない、そしてプロトプラストをMgSO<sub>4</sub> クッションの上部から集める。2体積のSTC (1.2Mのソルビトール、10mMのトリス-HCl, 10mMのCaCl<sub>2</sub>) を、前記プロトプラスト懸濁  
液に添加し、そしてその混合物を1000gで5分間、遠心分離する。プロトプラストのペレ  
ットをSTC 3mlに再懸濁し、そして再ペレット化する。これをくり返す。最終的に、プロ  
トプラストを、STC 0.2~1mlに再懸濁する。

100µlのプロトプラスト懸濁液を、STC 10µl中、5~25µgのp3SR2 (Hynesなど., Mo  
l. and Cel. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430-1439, Arg. 1983に記載されるプラスミドを担  
持するA. ニジユランスamdS遺伝子) と共に混合する。その混合物を室温で25分間、放置  
する。60%のPEG4000 (BDH29576)、10mMのCaCl<sub>2</sub>及び10mMのトリス-HCl, pH7.5の溶液0.  
2mlを注意して混合し(2度)、そして最終的に、その同じ溶液0.85mlを添加し、そして  
注意して混合する。その混合物を室温で25分間、放置し、2,500gで15分間、回転せしめ  
、そしてペレットを1.2Mのソルビトール2mlに再懸濁する。もう1回の沈降下の後、プ  
ロトプラストを、1.0Mのスクロース、pH7.0、窒素源として10mMのアセトアミド及び20mM  
のCsClを含む最少プレート (Core, (1996), Biochem. Biophys. Acta 113, 51-56) 上に  
広げ、バックグラウンド増殖も阻害する。37℃で4~7日間のインキュベーションの後、  
胞子を取り、無菌水に懸濁し、そして単一のコロニーを広げる。この方法をくり返し、そ  
して2回目の再単離の後、単一のコロニーの胞子を、定義された形質転換体として貯蔵す  
る。

#### A. オリザエA1560-T40の形質転換

本発明の変異体をコードするDNA配列を担持するプラスミドを、PUC19ベクター (Yannisch  
-Perronなど., (1985), GENE33, 103-119) 上に、2.7kbのXba I フラグメント (Corrick  
など., (1987), GENE33, 63-71) としてA. ニジユランスからのamdS遺伝子を有するpToC  
90による同時形質転換によるアセトアミド上での選択を用いて、アスペルギラス・オリザ  
エA1560-T40、すなわちA. オリザエIFO4177のプロテアーゼ欠失誘導体中に形質転換する  
。形質転換は、ヨーロッパ特許第238023号に記載されるように行なわれる。

#### 供給バッチ発酵

供給バッチ発酵を、炭素源としてマルトデキストリン、窒素源として尿素、及び酵母抽出  
物を含んで成る培地において行なう。供給バッチ発酵を、炭素源3.5%及び窒素源0.5%を

10

20

30

40

50

含んで成る培地中に問題の A . オリザエ宿主細胞の振盪フラスコ培養物を接種することによって行なう。pH5.0及び34 での24時間の培養の後、追加の炭素及び窒素源の連続した供給を開始する。炭素源を制限因子として維持し、そして酸素が過剰に存在することを確認する。供給バッチ培養を4日間続け、その後、酵素を、遠心分離、限外濾過、透明濾過及び細菌濾過により回収することができる。さらなる精製は、当業界において知られているアニオン交換クロマトグラフィー法により行なわれ得る。

#### S . セレピシアエに発現される H . ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体の精製

発酵ブイオンを無菌濾過し、そして酢酸アンモニウム (92 g ) を濾液 (1400ml ) に添加し、酢酸アンモニウムの0.8M溶液を付与する。その溶液を、Toyopearl Butylカラム (XK16 / 10) 上に添加する。カラムを、0.8Mの酢酸アンモニウムにより洗浄し、そして脂肪分解酵素を5 ml / 分の流速でH<sub>2</sub>Oに溶離する。10mlの画分を集め、そして脂肪分解酵素を含む画分を、標準のリパーゼ滴定アッセイにおける活性に従ってプールする。リパーゼ含有プールを濾過し、そしてそのpHをpH8.5に調整し、そしてQ. Sepharoseカラム (HPQXK26 / 10) 上に添加する。カラムを0.1Mのトリス - HCl、pH8.5の溶液200mlにより洗浄し、そして脂肪分解酵素を、5 ml / 分の流速で、0.1Mのトリス - HCl (pH8.5) 400ml中、0 ~ 0.3 MのNaClの線状グラジエントに溶離する。10mlの画分を集め、そしてリパーゼ含有画分を、標準のリパーゼ滴定アッセイにおける活性に従ってプールする。リパーゼ活性及び1.7よりも高い吸光度 A 280 / A 260nmを有する画分をプールする。

#### ペプチド付加物及び発現された A . オリザエを有さない H . ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体の精製

A . オリザエ培養物からの発酵上清液を遠心分離し、そして細胞残髄を捨てる。上清液を、0.45 μミルの孔サイズのフィルターを通して濾過する。次に、それを、60%飽和された硫酸アンモニウムにより沈殿せしめる。沈殿物を水に溶解し、そして固体酢酸アンモニウムを添加し、0.8Mの最終濃度にする。その溶液を、0.8Mの酢酸アンモニウムにより予備平衡化されたButyl Toyopearlカラム上に適用する。結合された酵素を、溶離剤として水及び50%エタノールを用いて、グラジエントにより溶離する。

次に、酵素活性を含む画分をプールし、そして電導度を5 mSi以下に調節し、そしてpHを8.5に調節する。

次に、活性を含むプールを、25mMのトリス - アセテート緩衝液 (pH8.5) により予備平衡化されたアニオン交換カラム (たとえば、高性能Q Sepharose<sup>R</sup>) 上に適用する。結合された活性を、同じ緩衝液及び0.5Mの塩化ナトリウムを用いて線状塩グラジエントにより溶離する。高い脂肪分解酵素活性を含む画分をプールする。リパーゼ活性及び1.7以上の吸光度 A 280 / A 260を含む画分をプールする。

#### 第1の洗浄効果の試験についてのアッセイ

脂肪分解酵素の洗浄性能を、温度調節されたTerg-0-Tometer (TOM) において実施され、続いて物干し網上で乾燥せしめられる1サイクル洗浄試験において試験した。

実験条件は次の通りであった：

洗液：ピーカー当たり1000ml、

布ぎれ：ピーカー当たり7枚の綿の布ぎれ (9 × 9 cm)、

染料：スーダンレッド (Sigma) により着色されたラード (0.75mgのスーダンレッド / 1 g のラード)。70 に加熱されたラード / スーダンレッド50 μ l を、個々の布ぎれの中央に適用した。染料の適用の後、布ぎれを、75 で25分間、オープンにおいて加熱した。室温で一晩、貯蔵された。

水：3.2mMのCa<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup> (5 : 1 の比)、

洗剤：5 g / l の洗剤組成物 A 又は洗剤 B、pHは、NaOHにより10に人工的に調節されている。

#### 洗剤組成物 A：

0.300 g / l のアルキルスルフェート (AS ; C<sub>14-16</sub>)

0.650 g / l のアルコールエトキシレート (AEO ; C<sub>12-14</sub> , 6 EO)

1.750 g / l のゼオライト P

0.145 g / l の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

0.020 g / l の Sokalan CP 5

0.050 g / l の CMC (カルボキシ - メチル - セルロース)

Milli-Q 水 (pH10.2) 中、3.2mM の  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  (5 : 1) において混合される。

#### 洗剤組成物 B :

洗剤組成物 A の通りであるが、但しさらに、次の漂白剤を含む :

0.900 g / l の炭酸ナトリウムペルオキシヒドレート

0.300 g / l の TAED (テトラ - アセチル - エチレン - ジアミン)

脂肪分解酵素の濃度 (洗剤組成物 A 及び B における) : 0 及び 1250 又は 12500 LU / l。

洗浄時間 : 20分

洗浄温度 : 30

すすぎ : 水道水において15分間、

乾燥 : 室温 (約 20、30 ~ 40% の RH) で一晚

評価 : 反射率を 460nm で測定した。この後、脂肪物質を、Soxhlet 抽出装置においてクロロホルムにより布ぎれから抽出し、溶媒を蒸留し、そして布ぎれ上に残る脂肪物質の量を重力分析的に決定した。他方では、脂肪物質の量は、薄層クロマトグラフィー (TLC) / [Flame Ionization Detector (FID)] を用いて決定され得る。

除去されるラードの % は、次の通りにして決定される :

1) 下記のように定義される % 除去率 :

( (脂肪分解酵素を有さない洗剤により洗浄される布ぎれ上での残存する脂肪) - (脂肪分解酵素を有する洗剤により洗浄される布ぎれ上での残存する脂肪) ) / (脂肪分解酵素を有さない洗剤により洗浄される布ぎれ上での残存する脂肪)  $\times$  100%、又は

2) 下記のように定義されるデルタ反射率 (dR) :

R (リパーゼを有する洗剤により洗浄された布ぎれ) - R (リパーゼを有さない洗剤により洗浄された布ぎれ)。反射率 (また、規約反射率とも称せられる) は、2 キセノン・ブリッラム (blitzlambs) によりサンプルを照射し、そして反射された光の量を測定し、その結果、完全な白色光は 100% 反射率に対応し、そして完全な黒色光は 0% 反射率に対応する、Datacolor からの Elrepho 2000 装置上で測定される。

#### 培地及び基質 :

YPD : 10 g の酵母抽出物、20 g のペプトン、全体を水により 810ml にする。オートクレーブされた 20% グルコース (無菌濾過された) 90ml を添加する。

LB - 培地 : 水 1 l 中、10 g の Bacto - トリプトン、5 g の Bacto 酵母抽出物、10 g の NaCl。

FG 4 培地 : 3% ダイズ粗びき粉、3% マルトデキストリン、1% ペプトン、pH は 4 M の NaOH により 7.0 に調節される。

SC Ura - プレート : アミノ酸を有さない 10% の 10x 基本的塩 : 0.5% の カザミノ酸、0.02% のトレオニン、0.01% のトリプトファン、2% グルコース、1.5% の寒天。アミノ酸を有さない 10x 基本的塩 : 水 1 l 中、60 g の NaOH、アミノ酸を有さない酵母窒素塩基 (Difco) 66.8 g、及び 100 g の琥珀酸。

Litex Agarose HSB2000 (カタログ番号 : F 90472)。

BG - 試薬 : 水に溶解された 4 mg / ml のプリリアントグリーン (BG)。

#### 基質 1 :

10ml のオリーブ油 (Sigma カタログ番号 : 0 - 1500)

20ml の 2% ポリビニルアルコール (PVA)

基質は、15 ~ 20 分間、均質化される。

#### PCS 洗剤 :

10 g / l :

SDS 0.52 g

Dobanol 25-3 0.60 g

Dobanol 25-1 0.58 g

$\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$  1.50 g

10

20

30

40

50

1 l の0.1M トリス緩衝液 (pH 9) を添加し、そしてPCSプレート上での所望する濃度の2倍の濃度にトリス緩衝液によりさらに希釈する。

#### PCSプレート：

PCSプレートを製造するための溶液：

ブリリアントグリーン (BG - 試薬)	10ml
基質 1	24ml
PCS洗剤	500ml
2 % アガロース (トリス緩衝液 (pH 9) における)	500ml
リパーゼ基質 (Sigmaカタログ番号800-1)	
ブリリアントグリーン (Merck、技術番号1.01310)	

10

#### 実施例

##### 実施例 1

##### ランダム脂肪分解酵素変異体の構成

完全なH. ラヌギノサ脂肪分解酵素遺伝子及びそのアミノ酸 (aa) 91 - 97及び206 - 211のランダム突然変異されたライブラリーを、上記の材料及び方法に記載されるようにして調製した。

アミノ酸領域91 - 97及び206 - 211を、それらの領域は洗浄性能のために重要であることが見出されているので、第1回目の局在化された突然変異誘発のために選択した。領域91 - 97は酵素のリッド領域の部分であり、そして領域206 - 211は酵素の疎水性割れ目の部分を構成する。

20

1つのオリゴヌクレオチドを、93%の野生型ヌクレオチド及び2.33%の個々の他の3個のヌクレオチドを、突然変異誘発されることが所望されるアミノ酸コドンで含んで成るそれらの領域の個々のために合成した。アミノ酸の変更を伴わないで可能な場合、コドンにおける第3ヌクレオチド (wobble塩基) を、50% G / 50% Cで合成し、1又は2つのコドンを有するアミノ酸への変更のためにより大きな見込みを付与する。領域91 - 97の突然変異誘発オリゴヌクレオチドの組成は、表1に示される。

このオリゴヌクレオチドの使用により、約65~70%の計算された突然変異頻度が、親脂肪分解酵素に導入されている1つのアミノ酸変更のためのライブラリーにおいて得られる。導入されている複数のアミノ酸変更のための突然変異頻度は、35%以下である。この低い突然変異頻度は、陽性クローンにおける観察されるアミノ酸変更が酵素の改良に関連され、そして高い突然変異頻度のために、まさに“中性”変更ではないことを確保するために選択される。

30

突然変異誘発プライマーは、適切な反対のプライマーとのPCR反応において使用された。得られるPCRフラグメントを精製し、そして領域206 - 211の場合、消化し、そしてシャトルベクター中にクローン化した。領域91 - 97の場合、その得られるPCRフラグメントが、第2の適切な反対のプライマーとのプライマーとしての第2のPCR反応に使用された。この段階は、突然変異誘発された領域を消化し、そしてそれをシャトルベクター中にクローン化できるように必要とされた。

10,000~80,000のクローン/ライブラリーを含む、領域91 - 97及び領域206 - 211のライブラリーを調製した。親リパーゼが陽性であり、すなわちリパーゼ活性を示す条件下で調べられる場合、ほとんどのコロニーは陽性であった (90%以上)。その陽性反応は、2.5mMのCa (5mMのEGTAの代わりに) によるフィルターアッセイにおいて決定された。

40

450,000のコロニーを、上記の材料及び方法に記載されるDobanol<sup>R</sup> 25-7及び低カルシウムアッセイを用いて異なったライブラリーからスクリーンした。aa91 - 97ライブラリー (リッド領域) からの25の低カルシウム陽性及び完全な遺伝子ライブラリーからの12のDobanol<sup>R</sup> 25-7陽性を単離した。aa91 - 97の突然変異誘発からの14の低カルシウム陽性を配列決定した。

突然変異誘発された領域外の3種の他の突然変異 (コドン83, 103, 145における) は、PCRの誤った組込みにより説明され得るが、但し、S83Tの突然変異は、PCRの誤った組込みのためにはまったくの異常であるトランスバージョンである。

50

表 1

配列：

5'	5	C	G	
T	5	C	3'	
T	7	A		
A	8	G	ボトル 5: 93% A; 2.33% C; 2.33% G 及び 2.33% T	
T	8	T		10
T	A/C	T		
T	5	C		
C	7	T		
T	5	C	ボトル 6: 93% C; 2.33% A; 2.33% G 及び 2.33% T	
T	8	T		
T	8	A		
6	C/G	T		
5	6	G	ボトル 7: 93% G; 2.33% A; 2.33% C 及び 2.33% T	
5	6	G		
7	G	A		
8	AA	A		20
6	T	C	ボトル 8: 93% T; 2.33% A; 2.33% C 及び 2.33% G	
7				

表 1：H. ラヌギノサ脂肪分解酵素のアミノ酸91 - 97の局在化されたランダム突然変異誘発のために使用されるオリゴヌクレオチド（配列番号4）の構成の例示。配列に示される番号は、配列の右に出現する組成をボトルに言及する。

表 2

菌株  
番号

変異体型

59	I		G91A	N94K	D96A	30
60	II	S83T		N94K	D96N	
61	II	S83T		N94K	D96N	
62	III		E87K		D96V	
63	IV		E87K	G91A	D96V	
64	II	S83T		N94K	D96N	
65	III		E87K		D96V	
67	V			N94K	F95L	D96H
69	V			N94K	F95L	D96H
71	III		E87K		D96V	
72	II	S83T		N94K	D96N	40

表 2：菌株番号はアスペルギラス発現ベクター-pAHL中にクローン化された初めに取られたクローンを言及する。変異体型は同一のクローンを言及し、これはたぶん、ランダム突然変異誘発されたライブラリーの増幅の間に発生したものである。変異体型I及びIIは、0.01%のDobanol<sup>R</sup> 25-7において活性的であるが、残りは、野生型のように不活性である。

表 3

菌株 番号	変異体型	DNA 配列 (配列上のアミノ酸の番号)										
		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
wt		GGC	TCT	CGT	TCC	ATA	GAG	AAC	TGG	ATC	GGG	AAT
59	I										C	
60	II		A								C	
61	II		A								C	
62	III						A				C	
63	IV						A				C	
64	II		A								C	
65	III						A				C	
67	V										C	
52/68	wt											
53	wt											
69	V										C	
71	III						A				C	
72	II		A								C	
73	VI											

wt		93	94	95	96	97	98	99	100	-103	-145
		CTT	AAC	TTC	GAC	TTG	AAA	GAA	ATA	-ATT	-CAT
59	I	G	G		C						
60	II	G	G		A						
61	II	G	G		A						
62	III				T						
63	IV				C						
64	II	G	G		A					C	C
65	III	G			T						
67	V		A	C	A	C					
52/68	wt										
53	wt										
69	V		A	C	A	C					
71	III	G			T						
72	II	G	A		A						
73	VI				A	?					

表 3：野生型配列は、上部で示される。wtで異なるヌクレオチドのみが変異体配列で書かれている。コドン91及び93の塩基は、それぞれ1：1のC / T及びT / Gによりドーピングされた。他方では、コドン91 - 97でのヌクレオチドは、93重量%及び2.33重量%の3種の他のヌクレオチドを用いてドーピングされた。

aa91 - 97のランダム突然変異誘発からの陽性から得られた結果に基づいての、ドーピングによるaa85 - 99 (リッド領域) のランダム突然変異誘発されたライブラリーのスクリーニングからの結果。

ランダム突然変異誘発されたライブラリーの構成  
背景

5種の異なった型の強い陽性突然変異体を、リッド領域 (aa91 - 97、前の例を参照のこと) の第1ライブラリーのスクリーニングにおいて見出した。D96をA, V, N又はHに変え、そしてアミノ酸変更E87K, G91A及びN94Kが、Lipolaseのカルシウム独立性のためにそれらの重要性を示すD96の変更と組合して、2～3種の独立した突然変異体に見出された。それらの突然変異は、いくつかのアッセイにおけるwtに比較して、低カルシウム / Dobanol活性に関して改良されているので、それらは完全なリッド領域の第2のランダム突然変異誘発における開始点として使用された。

局在化されたランダム突然変異誘発



アミノ酸領域aa85 - 99 + 83 S / Tを、次のようにしてランダム突然変異誘発せしめた。ドーピングスキーム：S 83 - 50 % S / 50 % T；E 87 - 93 % K / 7 % X；G 91 - 93 % A / 7 % X；N 94 - 50 % K / 50 % N；D 96 - 100 % X；残りは93重量 % / 7 % Xであった（百分率はヌクレオチドレベルでのコドンのドーピングを言及する（オリゴの配列を参照のこと））。それらのドーピングに起因する種々のアミノ酸コドンの理論的な百分率は、コンピュータプログラムを用いて計算され得る。アミノ酸の変更を伴わないで可能な場合、コドンにおける第3のヌクレオチド（wobble塩基）が50 % G / 50 % Cで合成され、わずか1又は2個のコドンを有するアミノ酸への変更のための大きな見込みを付与する。突然変異誘発オリゴヌクレオチドの組成は、配列番号オリゴ2（配列番号6）に示される。突然変異誘発されていないヌクレオチド領域を、安定性及び二次構造の不在について最適化するオリゴプログラムを用いて選択した。

10

この突然変異誘発は、ライブラリーにおける開始点の約93 %の変更率（S 83，N 94及びD 96を包含しない）の計算された頻度を付与する。これは、リッド領域の主要変更の機会を付与するひじょうに高い突然変異頻度である。

突然変異誘発プライマーは、適切な反対のプライマーとのPCR反応に使用された。得られるPCRフラグメントは、第2の適切な反対のプライマーとのプライマーとしての第2のPCR反応に使用された。この段階は、突然変異誘発された領域を消化し、そしてそれを酵母発現ベクターpYESHL中にクローン化するために必要であった。そのような2段階PCR方法のための突然変異誘発プライマーを企画する場合、TaqポリメラーゼによりPCRフラグメントの3'端に付加されるAを考慮することは重要である。

20

この場合、領域aa85 - 99 + 83 S / Tのランダム突然変異誘発されたライブラリーが調製された。

#### スクリーニング

低カルシウムフィルターアッセイを、Dobanol及びLASと共に使用した。リッド2ライブラリーのスクリーニングを、5 mMのEGTA，0.01 %のDobanol及び0.006 %のLASにより行なった。いくつかの陽性体を検出し、そして単離し、配列決定し、アスペルギラスを形質転換し、精製し、そして洗浄試験において試験した。

選択された陽性体の配列及び洗浄結果

下線部分は、フィルターアッセイに使用される条件を示す。IF = 3 - サイクル洗浄における改良因子。

30

5 mM EGTA, 0.01 % Dobanol, 0.006 % LAS

E87K, G91A, L93I, N94K, D96A. IF = 1.3

5 mM EGTA, 0.02 % Dobanol

N73D, S85T, E87K, G91A, N94K, D96A. IF = 1.1

S83T, E87K, W89G, G91A, N94K, D96V. IF = 0.8

E87K, G91A, D96R, I100V. IF = 5.2

40

S83T, E87K, Q249R

2g/l PCS

E87K, G91A. IF = 5.0

オリゴ - リッド2の配列（配列番号6）：

5'-C ATT TAT 886 { 88 655 (C/G)(A/C/G/T)(A/C/G/T) 755 (C/G)88 (A/C)57 588  
(C/G)76 (7/8)58 665 788 688 (8/7)58 775 ACG AG(A/T) GCC ACG-3'

フラスコ5: 93% A; 2,33% C; 2,33% G og 2,33 % T.

フラスコ6: 93% C; 2,33% A; 2,33% G og 2,33 % T.

フラスコ7: 93% G; 2,33% A; 2,33% C og 2,33 % T.

フラスコ8: 93% T; 2,33% A; 2,33% C og 2,33 % G.

2種の領域に対して同時に行なわれる局所的なランダム突然変異誘発

10

aa領域56 - 64及び81 - 99 + 102のランダム突然変異誘発されたライブラリーを、PCR反応における表4に示されるような2種のオリゴヌクレオチド004及び005を用いて、材料及び方法のセクションに記載されるようにして調製した。オリゴ004は、個々の位置に93重量%のヌクレオチド及び2.33%の他の3種のヌクレオチドの個々を有するaa領域81 - 99 + 102のために合成された(但し、50% S / 50% Tを付与するようドーピングされたS 83コドンを除く)(表4を参照のこと)。4又は6個のコドンに有するaaのためには、G / C又はA / Cの50% / 50%の混合物が第3の塩基のために使用された(表4を参照のこと)。Ileコドンの第3の塩基のためには、ボトル7及び8の50% / 50%混合物が使用された。D 96 Lは、前の良好な実施変異体に見出されているので、ランダム突然変異誘発における開始点として使用された。オリゴ005は、個々の位置に93重量%のヌクレオチド及び2.33%の  
20 個々の他の3種のヌクレオチドを有するaa領域56 - 64のために合成された。位置56, 57及び62のためには、他の中で、正に荷電されたaaの偏向が導入された(表4を参照のこと)。4又は6個のコドンに有するaaのためには、G / C又はG / Tの50% / 50%混合物が、その第3の塩基のために使用された。一般的に、PCR反応は、好都合であるドーピングされた領域外に突然変異を導入することができる。なぜならば、そのような突然変異は変異体の性質のためになることができるからである。

オリゴ004はまた、領域81 - 99 + 102及び領域248 - 257, 259, 263 - 269を包含するライブラリーをもたらし二重PCR反応によりクローン化されたオリゴ006(表4を参照のこと)を組合しても使用された。オリゴ006は、個々の位置において93重量%のヌクレオチド及び2.33%の個々の他の3種のヌクレオチドを有するaa領域248 - 257, 259, 263 - 269のために  
30 合成された。4又は6個のコドンに有するaaのためには、G / C又はA / Cの50% / 50%混合物が、その第3の塩基のために使用された(表4を参照のこと)。Ileコドンの第3の塩基のためには、ボトル7及び8の50% / 50%混合物が使用された。

オリゴ005及び006はまた、鋳型としてリッド領域における陽性体を用いて、ランダム突然変異誘発されたライブラリーの構成のためにも使用された。

表 4 :

オリゴ 004	102:	T	C	A	
リッド3		C	T	G	
(アンチセンス)	5'-	C	G	C	
aa 81-99,	G	C	C	C	
G	G	5	6	A/C	
G	C	C?G	5	6	
A	A	5	7	7	
	A	7	8	G	10
	A	7	8	A	
	T	5	6	A	
	7	5	8	A	
	8	C/G	6	G	
	6	8	7/8	-3'	
	A	8	5	ボトル5 : 93% A;	
	T	A/C	8	2,33% C; 2,33% G	
	T	5	C/G	og 2,33 % T.	
	T	7	7	ボトル6 : 93% C;	
	A	5	5	2,33% A; 2,33% G	
	T	8	A/C	og 2,33 % T.	20
	8	8	6	ボトル7 : 93% G;	
	8	C/G	7	2,33% A; 2,33% C	
	6	6	A	og 2,33 % T.	
	8	6	G	ボトル8 : 93% T;	
	8	7/8	A/T	2,33% A; 2,33% C	
	8	5	C/G	og 2,33 % G.	
	6	8	6		
	5	6	6		
				オリゴ005リッドー接触	
				aa 56-64:	30
				5'-	
				G	
				A	
				A	
				A	
				T	
				G	
				C	
				A	
				T	40
				G	
				C	
				C	

			C	
			C	
			G	
A	5/7	8	G	
G	6/8	6	G	
G		T/G	C	
T		7	T	
A		7	T	
G		G/T	C	
A		7	3'	10
G		8		
A		G/C	<u>ボトル5 :</u>	
A		7	93% A;	
G		7	2,33% C;	
G		G/C	2,33% G og	
C		6/7	2,33 % T.	
G		5/7	<u>ボトル6 :</u>	
G		6/8	93% C;	
A		7	2,33% A;	
T		8	2,33% G og	20
G		G/C	2,33 % T.	
C		5	<u>ボトル7 :</u>	
A		6	93% G;	
A		G/C	2,33% A;	
C			2,33% C og	
G			2,33 % T.	
T			<u>ボトル8 :</u>	
T			93% T;	
T			2,33% A;	
C			2,33% C og	30
T			2,33 % G.	
C				
T				
A				
C				
T				
C				
G				
T				
T				
T				40
7/5				
7/5				
7/5				
6/7				

オリゴ 006	6	A	C/G	G
C-末端	5	C	7	C
aa 248-	A/C	C	7	C
257,259,	7	A	5/8	-3'
263-269	8	A/C	5	ボトル 5: 93% A;
	C/G	5	8	2,33% C; 2,33% G
5'-	6	7	7	og 2,33 % T.
G	6	G	8	ボトル 6: 93% C;
C	5/8	T	8	2,33% A; 2,33% G
C	5	G	A/C	og 2,33 % T.
C	8	C/G	7	ボトル 7: 93% G;
T	A/C	7	7	2,33% A; 2,33% C
C	5	6	6	og 2,33 % T.
T	7	A/C	8	ボトル 8: 93% T;
A	C/G	7	7	2,33% A; 2,33% C
G	6	7	7	og 2,33 % G.
A	6	7/8	8	
C	G	5	8	
T	A	8	A	
A	A	5	T	
A/C	G	8	T	
5	T	6		
7				
5				

10

20

洗剤含有プレート上でのそれらのライブラリーをスクリーンすることから得られる陽性体のいくつかを、下記に示す：

E56R+D57L+I90F+D96L+E99K

E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E

D57G+N94K+D96L+L97M

E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q

30

E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I

A47V+D62G+D96L+A121T

E56G+D57G+V60E+D62G+N94K+D96L。

次の変異体を、完全な遺伝子のみのランダム突然変異から得（材料及び方法のセクションに記載されるようなPCR又はPCR + 蟻酸により）、そして洗剤含有プレート上でスクリーンした：

I34V+S54P+F80L+S85T+D96G+R108W+G109V+D111G+S116P+L124S+V132

M+V140Q+

40

V141A+F142S+H145R+N162T+I166V+F181P+F183S+R205G+A243T+D254G+F262L

A19T+D167G+E210V+W221L

（D167 G + E210 V に基づいてのランダム突然変異誘発）

A49P+D167G+E210V

（D167 G + E210 V に基づいてのランダム突然変異誘発）

実施例 2

H. ラヌギノサ脂肪分解酵素の第 1 の洗浄変異体の構成

1. 組換え及びスクリーニングによるドメインシャフリング

50

ひじょうに良好な洗浄性能（種々の洗浄関連試験において評価されるような）を有する20のH・ラヌジノサ脂肪分解酵素変異体（それらのいくつかは、例1に従って構成されている）を、本明細書における材料及び方法のセクションに記載されるように、S・セレピシアエYNG318におけるインピボ組換えによる組換えを可能にせしめた。使用される脂肪分解酵素変異体は、表1から明らかである。それらの変異体のほとんどは、材料及び方法のセクションに記載されるようなランダム又は局在化されたランダム突然変異により、及び低められたカルシウム依存性及び洗剤成分Dobanol 25-7に対する改良された耐性についてスクリーニングすることにより（上記の材料及び方法を参照のこと）、構成された。変異体のいくつかは、複数回の連続した回数の突然変異誘発及びスクリーニングの結果である。

下記表から明らかであり、且つ材料及び方法のセクションにおいて、さらに論じられている、制限酵素開環されたベクター及びPCRフラグメントは、約1：1のモル比で混合され、そして成分S・セレピシアエ細胞の形質転換のために使用された（Current Protocols in Molecular Biology, eds. F.M. Ausubelなど., chapter 13. 7, John Wiley & Sons, Inc., USA. に記載されるような酢酸リチウム方法により製造された）。形質転換された細胞を、フィルター上にプレートし、そして上記の材料及び方法に記載されるフィルターアッセイを用いて、減じられたカルシウム依存性及び高められた洗剤耐性についてスクリーンした。

陽性シグナルを付与するコロニーを、新規プレート及びフィルター上に単一コロニーとして画線培養し、そして再スクリーンした。2～4回の再スクリーニングの後、陽性コロニーを、次の通りに発酵せしめた：

#### 酵母におけるH・ラヌジノサ脂肪分解酵素及び変異体の発酵

10mlのSC-ura培地を、S・セレピシアエコロニーにより接種し、そして30℃で2日間、増殖せしめる。前記10mlを、300mlのSC-ura培地を接種するために使用し、この接種の後、30℃で3日間、成長せしめる。前記300mlを、次のG-基質5 lの接種のために使用する：

400 g	アミカーゼ (Amicase)
6.7 g	酵母抽出物 (Difco)
12.5 g	L - ロイシン (Fluka)
6.7 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10 g	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
17 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10ml	微量化合物、下記を参照のこと
5 ml	ビタミン溶液、下記を参照のこと
6.7ml	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
25ml	20% Pluronic (消泡剤)

5000mlの合計体積における。

微量化合物：

6.8 g	ZnCl <sub>2</sub>
54.0 g	FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O
19.1 g	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O
2.2 g	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O
2.58 g	CoCl <sub>2</sub>
0.62 g	HsBO <sub>3</sub>
0.024 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mn <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O
0.2 g	KI
100ml	HCl (濃縮された)

1 lの合計体積における。

ビタミン溶液：

250mg	ビオチン
3 g	チアミン
10 g	D - カルシウムパントテネート

100 g Myo - イノシトール  
 50 g コリンクロリド  
 1.6 g ビリドキシン  
 1.2 g ナイアシンアミド  
 0.4 g 葉酸  
 0.4 g リボフラビン

1 l の合計体積における。

酵母細胞を、5000mlの培地において、30℃で5日間、発酵せしめた。グルコースを、100mlの開始用量の70%グルコースと共に、発酵器に供給し、そして1日当たり70%グルコース400mlを添加した。発酵ブイヨンのpHを、10% NH<sub>3</sub>溶液の調節された添加によりpH5.0で維持した。

10

攪拌を、最初の22時間、300rpmで、続いて残りの発酵期間、900rpmで行なった。空気を、1 l の空気 / l / 分で最初の22時間、続いて残りの発酵期間、1.5 l の空気 / l / 分で与えた。

精製の後、ラードを除去する変異体の能力を、上記の材料及び方法のセクションに記載される1サイクル洗浄アッセイにおいて試験した。その結果は、下記例2及び3に与えられた。

表1：組換えのために使用される変異体

インビボ組換え（遺伝子シャフリング）のためのベクター（Nrn I により開環されている）を調製するために使用されるヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼ変異体

20

E56R,D57L,I90F,D96L,E99K

E56R,D57L,V60M,D62N,S83T,D96P,D102E

D57G,N94K,D96L,L97M

30

E87K,G91A,D96R,I100V,E129K,K237M,I252L,P256T,G263A,L264Q

E56R,D57G,S58F,D62C,T64R,E87G,G91A,F95L,D96P,K98I,(K237M)

E210K

インビボ組換え（遺伝子シャフリング）のためのDNAフラグメントを調製するために使用されるヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼ変異体（前記変異体を含むプラスミドからの完全な遺伝子の標準PCR増幅による）

S83T,N94K,D96N

E87K,D96V

N94K,D96A

E87K,G91A,D96A

D167G,E210V

S83T,G91A,Q249R

E87K,G91A

S83T,E87K,G91A,N94K,D96N,D111N.

N73D,E87K,G91A,N94I,D96G.

L67P,I76V,S83T,E87N,I90N,G91A,D96A,K98R.

E210K

S83T,E87K,G91A,N92H,N94K,D96M

S85P,E87K,G91A,D96L,L97V.

E87K,I90N,G91A,N94S,D96N,I100T.

I34V,S54P,F80L,S85T,D96G,R108W,G109V,D111G,S116P,L124S,V132M,V140Q,V141A,F142S,H145R,N162T,I166V,F181P,F183S,R205G,A243T,D254G,F262L.

E56R,D57L,I90F,D96L,E99K

E56R,D57L,V60M,D62N,S83T,D96P,D102E

D57G,N94K,D96L,L97M

E87K,G91A,D96R,I100V,E129K,K237M,I252L,P256T,G263A,L264Q

E56R,D57G,S58F,D62C,T64R,E87G,G91A,F95L,D96P,K98I,(K237M)

2. 2つの陽性体の従来のクローニングによるドメインシャフリング・ヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼ変異体(D57G + N94K + D96L + L97M)をコードするDNA配列を含むアスベルギラス発現ベクターpHD414を、制限酵素Nar I 及びXba I により消化し、2種のフラグメントをもたらした。それらのフラグメントをアガロースゲル電気泳動により分離し、そして最大のフラグメントをそのアガロースゲルから単離した。このフラグメントを、Nar I 及びXba I による変異体(S83T + G91A + Q249R)の消化からの最小フラグメントに連結した。この連結物を用いてE. コリを形質転換し、そして得られるプラスミド構成体を形質転換体の1つから単離し、そして配列決定し、正しいアセンブリーについて試験した。そのプラスミドを用いて、アスベルギラス・オリザエを形質転換し、材料及び方法のセクションに記載されるようにして発酵し、そして精製した。この変異体は次の突然変異D57G + N94K + D96L + L97M + Q249Rを含んだ。

10

20

30

40

50



## 実施例 3

アスベルギラス・オリザエJaL125におけるH・ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体HL9の構成及び発現

変異体HL9は成熟部分において次の突然変異を含む：E 1 P + D 57 G + N 94 K + D 96 L + Q 249 R、及びE 1 Pに融合されるN - 末端ペプチド付加SPIRPR（全体のN - 末端ペプチド付加物SPIRPRPをもたらず）。N - 末端ペプチド付加を、ヨーロッパ特許第305216号から明らかなアミノ酸及びDNA配列をそれぞれ有し、そしてさらに、前記DNA配列（ヨーロッパ特許第305216号）におけるその成熟部分に次の突然変異：D 57 G + N 94 K + D 96 L + Q 249 R（従来の特定部位突然変異誘発により挿入されている）を担持する親H・ラヌギノサ（D SM 4109）脂肪分解酵素に適用した。ペプチド付加SPIRPRPを次のようにして親酵素のN - 末端に適用した。

10

pIVI220の構成：

前記プラスミドを、記載されるプロトコールに従って、StratageneからのChameleon二本鎖部位特異的突然変異誘発キットを用いて構成した。

pHL296を、プラスミド鋳型として使用した。前記プラスミドは、pHD414中にクローン化された上記突然変異（D 57 G + N 94 K + D 96 L + L 97 M + Q 249 R）と共に、H・ラヌギノサ脂肪分解酵素をコードする遺伝子を含む。

プライマー番号7258が、選択プライマーとして使用された。

**7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3'**

（従って、耐アンピシリン性遺伝子に見出され、そして切断のために使用されるSca I 部位をMlu I 部位に変更する）。

20

プライマー番号7770が、選択プライマーとして使用された。

**7770: 5'p tct agc cca gaa tac tgg atc aaa tc 3'**

（アミノ酸配列を変更しないで、H・ラヌギノサ・リパーゼ遺伝子に見出されるSca I 部位を変更する）。

プライマー番号8479が、突然変異誘発プライマーとして使用された。

**8479: 5'p gcg tgg acg gcc tgg gct agc cct att cgt cct cga ccg gtc tcg cag gat ctg 3**

（親H・ラヌギノサ酵素のプロペプチド及びN - 末端E 1を置換する（SPIRPRPによりSPIRREを））。

pIVI245の構成：

30

前記プラスミドを、記載されるプロトコールに従って、StratageneからのChameleon二本鎖部位特異的突然変異誘発キット（カタログ番号200509）を用いて構成した。

pIVI220をプラスミド鋳型として使用し、そしてプライマー番号7887を選択プライマーとして使用した（耐アンピシリン遺伝子に見出され、そして切断のために使用される、導入されたMlu I 部位をSca I 部位に変更する）。

**7887: 5'p-gaa tga ctt ggt tga gta ctc acc agt cac 3'**

プライマー番号8932を突然変異誘発プライマーとして使用した

**8932: 5'p-g aac tgg ata gga aat ttg aag ttc ctg ttg aaa gaa ata aat gac 3'**

（従って、野生型としてM 97をL 97に変更し、そして2つの突然変異N 94 K 及びD 96 Lを保存する）。

40

## 2. A・オリザエ発現プラスミドpCaHj483の構成

pCaHj483は図9に示されている。それを、次のフラグメントから構築する：

a) EcoR I 及びXba I により切断されたベクターのpToC65 (WO 91 / 17243)。

b) amdS遺伝子を担持する、A・ニジランスからの2.7kbのXba I フラグメント（C.M. Corrickなど., (1987), Gene 53, p.63-71）。amdS遺伝子は、菌類の形質転換における選択マーカーとして使用される。amdS遺伝子が変性され、その結果、その遺伝子に通常存在するBamH I 部位が破壊された。これは、サイレント点突然変異を、

**プライマー 3 : AGAAATCGGGTATCCTTTCAG**

（配列番号1）を用いて導入することによって行なわれた。

c) A・ニジランスtpi遺伝子のmRNAの5' 末翻訳端をコードする配列の60bp DNAフラグ

50

メントに融合される A . ニガー NA 2 プロモーターを担持する 0.6kb の EcoR I / BamH I フラグメント。NA 2 プロモーターを、プラスミド pNA 2 (ヨーロッパ特許第 383779 号) から単離し、そして PCR により 60bp の tpi 配列に融合した。60bp の tpi 配列をコードするプライマー (プライマー 4 : 配列番号 7) は、次の配列を有した :

5'-

GCTCCTCATGGTGGATCCCCAGTTGTGTATATAGAGGATTGAGGAAGGAAGAG  
AAGTGTGGATAGAGGTAAATTGAGTTGGAAACTCCAAGCATGGCATCCTTGC -  
3'。

10

d) A . ニガー グルコアミラーゼ転写ターミネーターを担持する 675bp の Xba I フラグメント。このフラグメントは、プラスミド pICAMG / Term (ヨーロッパ特許第 238023 号) から単離された。

フラグメント c) の BamH I 部位を、pIC19R リンカーを通して、フラグメント d) 上の転写ターミネーターの前の Xba I 部位に連結した (Xba I に対して BamH I)。

#### HL 9 発現プラスミド pCaHj485 の構成

プラスミド pJVi245 を BamH I 及び Sal I により消化し、そして HL 9 脂肪分解酵素をコードするその得られる 904bp フラグメントを単離した。pCaHj483 を BamH I 及び Sal I により消化し、そして大きなベクターフラグメント (6757) を、その HL 9 フラグメントに連結した。その連結混合物を用いて、E . コリ DH 5 細胞を形質転換し、そして予測されるプラスミドを有する形質転換体を単離した。そのプラスミドを、pCaHj485 として命名した。

20

#### 3 . JaL125 中への pCaHj485 の形質転換

アスペルギラス・オリザエ JaL125 を、ヨーロッパ特許第 0531372 号に記載されるようにして、アセトアミドに基づく選択を用いて、pCaHj485 により形質転換した。形質転換体を 2 度、孢子再単離した。個々の形質転換体の 2 回目の再単離からの孢子を用いて、96 ウェルマイクロタイター皿における 200  $\mu$  l の YPM (1 % の酵母抽出物、2 % のペプトン、2 % のマルトース) を接種した。YPM 培養物を 34  $^{\circ}$ C で 4 日間、増殖せしめ、そして最高の生成体を、p - ニトロフェニルブチレートアッセイを用いて選択した :

原溶液 : 18  $\mu$  l の p - ニトロフェニルブチレートを、1 ml のイソプロパノールに溶解した。

30

実施溶液 : 0.1 ml の原溶液を、50 mM のトリス / HCl , pH 7.5 , 10 mM の CaCl<sub>2</sub> の溶液 10 ml と共に混合した。

アッセイ : YPM 上清液 1  $\mu$  l を、96 ウェルマイクロタイター皿 + において、実施溶液 200  $\mu$  l と共に混合し、そして色彩の進行を、ELISA 読取り機を用いて 450 nm で測定した。

1 つの形質転換体を、タンク発酵のために選択した。

#### 4 . JaL125 / pCaHj485 のタンク形質転換

発酵を、34  $^{\circ}$ C の一定の培地温度及び 1.2 l の開始体積を用いて供給 - バッチ発酵として行なった。培地の初期 pH を 6.5 に設定した。pH が 7.0 に上昇したらすぐに、この値を 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> の添加により維持した。培地における溶解された酸素のレベルを、攪拌速度を変え、そして 1 l の空気 / 培地 1 l / 分の固定されたエアレーション速度を用いることによって調節した。供給物添加速度は、全供給 - バッチ相の間、一定レベルで維持された。

40

バッチ培地は、炭素源としてマルトースシロップ、窒素源として尿素及び酵母抽出物、及び微量金属及び塩の混合物を含んだ。供給 - バッチ相の間、連続して添加される供給物は、炭素源としてマルトースシロップを含み、そして酵母抽出物及び尿素は、窒素の十分な供給を確保するために添加された。

#### 5 . 脂肪分解酵素の精製

1) 発酵上清液を、フィルターカタログ番号 AP2504700 フィルタータイプ AP25 を通して濾過した。

2) 発酵上清液を、Millipore 膜タイプ GS (0.22 ミクロン) からの無菌フィルターを通してもう 1 度、濾過した。

50

3) 次に、発酵上清液を、固体酢酸アンモニウムを添加することによって、0.8Mの酢酸アンモニウムに調整した。

4) TSKゲルButyl-Toyopearl 650に基づく疎水性クロマトグラフィー。50mlのカラムを、Butyl-Toyopearlマトリックスにより充填した。カラムを0.8Mの酢酸アンモニウムにより洗浄し、そして平衡化した。酢酸アンモニウムにより調節された1 lの発酵上清液を、Butylカラム上に適用した。カラムを、すべての未結合材料が洗浄されるまで、0.8Mの酢酸アンモニウムにより洗浄した。次に、結合された材料を、水及び50%エタノールにより連続して溶離した。画分を集め、そして標準のLOアッセイを用いて、リパーゼ活性について分析した。リパーゼ活性を含む画分をプールし、そして希釈し、4 mSi以下にプールの電導性を調節し、そしてpHを8.5に調節した。

10

5) High Performance Q Sepharose (Pharmacia、コード番号17-1014-01)に基づくアニオン交換クロマトグラフィー。50mlのカラムを50mMの硼酸緩衝液(pH8.5)により充填し、そして洗浄した。次に、脂肪分解酵素を含むプールを、High Performance Q Sepharoseカラム上に適用した。未結合材料を、硼酸緩衝液(pH8.5)により洗浄した。結合された活性を、1 Mの塩化ナトリウムを含む硼酸緩衝液(pH8.5)を用いて線状グラジエントにより溶離した。画分を集め、そしてリパーゼ活性についてアッセイした。A 280及びA 260で1.7以上のUV吸光度の割合を有するリパーゼ活性を含む画分をプールする。

#### 実施例 4

##### ランダム突然変異誘発によるN - 末端付加物の構成

成熟H・ラヌギノサ脂肪分解酵素(DSM4109から得られる)の初めのアミノ酸残基に付加されるN - 末端付加物SPIRPRPをコードし、そしてその成熟部分に次の追加の突然変異：D 57 G + N 94 K + D 96 L + L 97 M + G 249 Rを含むDNA配列の部分のランダム突然変異誘発を行なった。親脂肪分解酵素の成熟部分の突然変異は、WO 95 / 26215に記載される方法を用いて、適切なプライマー配列を用いてのPCR駆動された特定部位突然変異誘発により行なわれた。そのペプチド付加物SPIRPRPは例3に記載されるようにして適用された(すなわち、最後のPはE 1を置換する)。

20

SPIRPRPコドンのヌクレオチド・ドーピングスキームは次の通りであった：

オリゴ 1: 5'- GCG TGG ACG GCC TTG GCC 86(T/A) 66(A/T) 58(T/A) 67(T/A)

66(T/A) 575 66(T/A) GAG GTC TCG CAG GAT CTG -3' (57-マー)(配列番号11)。

30

数字は、使用される次のフラスコの番号を言及する。

フラスコ5 : 80% A; 6.66% C; 6.66% G og 6.66 % T.

フラスコ6 : 80% C; 6.66% A; 6.66% G og 6.66 % T.

フラスコ7 : 80% G; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % T.

フラスコ8 : 80% T; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % G.

2段階PCR反応プロトコールが使用された：5 プライマーとして上記プライマー及び3 プライマーとしてプライマー2056 ( 5 gca cgt aat gtt tgt acc 3 )を有する第1段階は、プラスミド鋳型としてPHL296を用いて行なわれた。第1回目のPCRの生成物が、5 プライマー (BamH I 部位及びコード配列の最初の部分を導入するための) として4699 ( 5 cgg tac ccg ggg atc cac 3 )及び3 プライマーとしてPCR生成物を有する新規のPCRに使用された。得られる生成物を、Spin 100 (Clonetechn Lab., Inc.からの) 上で精製し、そしてBamH I 及びPvuIIにより切断した。得られるDNAフラグメントを、Spin X (Costar) によりアガロースゲルから精製し、そしてBamH I 及びPvuIIにより切断されたBamH I - Xba I フラグメントとしてクローン化されたpHL296からのH・ラヌギノサ脂肪分解酵素遺伝子を含む酵母発現ベクターpJS037中に連結した。その得られるDNAを用いて、従来の技法により、DH10 / DH12 E・コリ細胞 (Gibco / BRG Lifetechnologies) を電気形質転換した。

40

E・コリの性質転換及び増幅の後、プラスミドを精製し、そしてS・セレピシアEYNG318

50

を形質転換した。得られる S . セレピシアエ細胞を、洗剤 ( 3 g / l の PCS ) を含む他のリパーゼフィルターアッセイにおける良好な実施体についてスクリーンした。陽性体を配列決定し、そして次のペプチド付加物を含むことが見出された : GPIRPRP , SHSRHNA , TAIRPRK , SALRRRP , STRRPRP , SPRRPRT , SPIPPGP , LPFRQRP , SPFRPKL 及び SALRRP ( HL10s1-10 としてそれぞれ呼ばれる ) 。

個々の HL10s1-6 の 1 サイクル洗浄性能を、30 の温度で及び 5 g / l の酵素不活性化された Ariel Future を洗剤として用いて、上記の材料及び方法セクション ( 第 1 の洗浄効果の試験についてのアッセイ ) に記載されるようにして試験した。個々の変性された酵素により除去される脂肪材料の量が、下記に示される :

リパーゼ 変異体	低用量	除去された % ラード率	高用量	除去された % ラード率
HLv10s1	1250 LU/l	26	12500 LU/l	54
HLv10s2	1250 LU/l	22	12500 LU/l	53
HLv10s3	1250 LU/l	34	12500 LU/l	55
HLv10s4	1250 LU/l	33	12500 LU/l	55
HLv10s5	1250 LU/l	23	12500 LU/l	47
HLv10s6	1250 LU/l	30	12500 LU/l	53

良好な実施体がその N - 末端付加物により正に荷電されたアミノ酸を有する傾向が存在した。

同様に、H . ラヌギノサ・リパーゼ変異体 E 1 \* + D 57 G + N 94 K + D 96 L + L 97 M + Q 2 49 R 及び他の変異体に付加される N - 末端付加物 RPRPRPRP のランダム突然変異誘発を行なった。RPRPRPRP コドンのヌクレオチド ドーピングスキームは、次の通りである。

オリゴ 2: 5'-GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG GCG GCG CCA CCT CCA 67(T/A)

66(T/A) 575 66(T/A) 67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) (6/7)(7/8)(C/G) 57(C/G) C57

(5/7)5(C/G) CTG TTT AAC CAG TTC AAT CTC-3' (93-マー)

77575: 80% A; 6.66% C; 6.66% G og 6.66 % T.

77576: 80% C; 6.66% A; 6.66% G og 6.66 % T.

77577: 80% G; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % T.

77578: 80% T; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % G.

APPP を、N - 末端付加物のタンパク質分解に対して保護するために、ランダム突然変異誘発された RPRPRPRP の N - 末端に及びシグナルペプチドの前に付加する。これは必要とされなくても良い。E 1 を、1 つの負に荷電されたアミノ酸を除去するために欠失せしめた。成熟 H . ラヌギノサ・リパーゼ配列の位置 2 ~ 5 におけるアミノ酸をまた、リパーゼのこの非構造部分における改良された変異体を見出すために、突然変異誘発した。他方、この方法は、SPIRPRP のランダム突然変異誘発について上記で言及された通りであった。次の N - 末端ペプチド付加物を得た :

Alu-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser ( APPPRPRLLPIS ) ( 欠失された E 1 残基の他に、この変異体は、成熟酵素のその非構造 N - 末端部分に追加の突然変異 D 5 E を担持する ) 。

**Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro( APPPTRQRQSP )**

( 欠失された E 1 残基の他に、この変異体は、成熟酵素のその非構造 N - 末端部分に追加の突然変異 V 2 L , S 3 T 及び D 5 V を担持する ) 。

**Ala-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro( APPPRTIPRSSP)**

( 欠失された E 1 残基の他に、この変異体は、成熟酵素のその非構造 N - 末端部分に追加の突然変異 V 2 L , S 3 R 及び D 5 E を担持する ) 。

**Ala-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP)**

( 欠失された E 1 残基の他に、この変異体は、成熟酵素のその非構造 N - 末端部分に追加の突然変異 V 2 G 及び D 5 E を担持する ) 。

**Ala-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS)**

( 欠失された E 1 残基の他に、この変異体は、成熟酵素のその非構造部分に追加の突然変異 V 2 GL , S 3 T , G 4 P 及び D 5 E を担持する ) 。

**Ala-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro (APPPKASPRQRP)**

( 欠失された E 1 残基の他に、この変異体は、成熟酵素のその非構造部分に追加の突然変異 V 2 GL , D 5 Q 及び L 6 M を担持する ) 。

**実施例 5**

本発明の脂肪分解酵素の第 1 の洗浄活性

脂肪分解酵素の第 1 の洗浄活性を、洗剤組成物 A 又は B について上記の材料及び方法のセクションに記載される “ 第 1 の洗浄効果の試験についてのアッセイ ” を用いて試験した。少数の新規第 1 の洗浄リパーゼを、洗剤のための脂肪分解酵素内の本発明の技術状態であるものとして見なされるものに比較する。

注：口：例 2 に記載されるようにアスペルギラス・オリザエにおい

て生成される

\*：例 4 に記載されるように酵母において生成される。

洗剤組成物 A		
脂肪分解酵素	1250 LU/l での % 除去率	12500 LU/l での % 除去率
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+ Q249R	15%	49%
Lumafast™ (Ps. メンドシナ)	0%	2%
Lipomax™ (Ps. プソイドアルカリゲネス L21M)	0%	9%
フサリウム・ソラニ・ピシ	0%	0%
Lipolase	0%	0%
Lipolase Ultra	0%	0%

洗剤組成物 B		
脂肪分解酵素	1250 LU/l での % 除去率	12500 LU/l での % 除去率
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+ Q249R	15%	46%
Lumafast™ (Ps. メンドシナ)	6%	6%
Lipomax™ (Ps. プソイドアルカリゲネス L21M)	0%	0%
Liposam™	4%	7%
フサリウム・ソラニ・ピシ	2%	5%
Lipolase	5%	6%
Lipolase Ultra	6%	0%

さらなる例：

洗剤組成物 A	
脂肪分解酵素	12500 LU/l での % 除去率
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P+S1 70P+Q249R *	42%
SPIRR+A49P+D167G+E210V *	44%
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+D96L+D10 2Y+E210K *	36%
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+D234Y+I 252L+P256T+G263A+L264Q *	41%

#### 実施例 6

洗剤における活性 (Activity-in-Detergent) (AiD) アッセイ AiD アッセイは、本明細書に記載されるように第 1 の洗浄脂肪分解酵素の構成に使用されるべき親脂肪分解酵素を選択するために有用である分析アッセイである。

装置：150ml のビーカーを含む水槽。攪拌は、攪拌機により得られる。

脂肪分解酵素の用量：12500LU / l。

基質：1 回の試験に関して、6 μ l のオリーブ油を含む 6 枚 (3.5 × 3.5cm) の綿。

洗剤：ビーカー当たり 100ml の pH10 に調節された、36mM の  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  (5 : 1) に溶解された 0.5 g / l のモデル液体洗剤\*。

サンプルを 30 で 60 分間、攪拌した後、布ぎれ上の残存する洗剤を、15 分間、水道水を流すことにより除去する。それらの布ぎれを、10ml のテトラヒドロフラン及び 4 M の HCl 6.25ml を含むフラスコ中に入れ、そして一晩、蒸発し、その後、サンプルをテトラヒドロフランに再溶解する。脂肪組成を TLC / FID により決定し、そして %FFA (遊離脂肪酸) の量

を用いて、脂肪分解酵素間を区別する。

\*：下記の洗剤配合物

注：□：実施例 2 に記載されるようにアスペルギラス・オリザエ  
において生成される。

\*：すべての変異体は、実施例 4 に記載されるように酵母に  
において生成される。

10

AiD アッセイ	
脂肪分解酵素	% FFA
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P+S170P+Q249R *	20%
SPIRR+A49P+D167G+E210V *	25%
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+D96L+D102Y+E210K *	25%
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+D234Y+I252L+P256T+G263A+L264Q *	20%
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	27%
Lumafast™ (Ps. メンドシナ)	5%
Lipomax™Cos (Ps. プソイドアルカリゲネス)	31%
フサリウム・ソラニ・ピシ	6%
Lipolase	5%
Lipolase Ultra	5%

20

30

モデル液体洗剤：	
成分	% w/w
LAS	17.50
AEO	14.40
DTSA	10.00
オレイン酸	3.00
ヤシ油	5.00
MEA	14.50
MPG	10.70
エタノール	1.40
ホスホネート	1.00
硼酸	0.80
クエン酸	3.90
塩化ナトリウム	0.13
塩化カリウム	0.38
塩酸 4 M	6.00
水	9.7

10

20

30

#### 実施例 7

多数の可能性ある第 1 の洗浄脂肪分解酵素の第 1 の洗浄活性を、特定の市販の洗剤 - Arie I Futur (市販のバッチ番号 4279 B 23 : 35) について上記の材料及び方法のセクションに記載される “第 1 の洗浄効果の試験についてのアッセイ” を用いて試験した。洗剤にすでに存在する酵素は、洗浄の前、加熱 (マイクロオープンにおいて 85 で 4 分間) により不活性化された。

40

最初の表は、実施例 5 及び 6 に比較するために使用され得る。結果は、次の通りに分けられる：



a) LU-単位（定義のためには方法&材料を参照のこと）の後、  
投与する場合の%除去率、

b) 純粋酵素タンパク質mgの後、投与する場合の%除去率、

c) LU-単位（定義のためには方法&材料を参照のこと）の後、  
投与する場合のデルタ反射率、

d) 純粋酵素タンパク質mgの後、投与する場合のデルタ反射率。

10

注：□：実施例2に記載されるようにアスペルギラス・オリザエ  
において生成される。

\*：実施例4に記載されるように酵母において生成される。

次の結果が得られた：

酵素活性化された市販のヨーロッパの洗剤		
脂肪分解酵素	%除去率	
	1250 LU/l	12500 LU/l
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P+S170P+Q249R *	12%	37%
SPIRR+A49P+D167G+E210V *	8%	38%
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+D96L+D102Y+E210K *	8%	34%
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+D234Y+L252L+P256T+G263A+L264Q *	11%	37%
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	27%	53%
Lumafast™ (Ps.メンドシナ)	3%	3%
Lipomax™ (Ps.プソイドアルカリゲネス L21M)	1%	0%
フサリウム・ソラニ・ピシ	0%	1%
Lipolase	0%	0%

20

30

40

a) 酵素不活性化された市販のヨーロッパの洗剤			
脂肪分解酵素	%除去率		
	1250 LU/l	2500 LU/l	12500 LU/l
SPIRR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R *	12%	n.d.	38%
SPIRR+N94K+D96L+Q249R*	13%	n.d.	45%
SPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A*	n.d.	27%	48%
SPIRR+D137G+D167G+D210V+W221L*	13%	n.d.	47%
SHSRHNA+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	n.d.	22%	53%
GPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	n.d.	26%	54%
TAIRPRK+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	n.d.	34%	55%

10

b) 酵素不活性化された市販のヨーロッパの洗剤		
脂肪分解酵素	%除去率	
	0.25 mg/l	2.50 mg/l
I90F+D96L+E99K+V187A□	1%	26%
E1PSPIRPR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	21%	51%

20

c) 酵素不活性化された市販のヨーロッパの洗剤			
脂肪分解酵素	デルタ反射率 (dR)		
	1250 LU/l	5000 LU/l	12500 LU/l
A47V+D92G+D96L+A121T□	1	n.d.	2
D57G+N94K+D96L+P256T□	0	n.d.	2
N94K+D96A+Q249R□	0	n.d.	2
SPIRR+Lipolase <sup>TM</sup> *	n.d.	n.d.	3
D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P□	1	n.d.	3
D57G+N94K+D96L+L97M+D167G+E210V□	1	n.d.	3
QPIRR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	1	n.d.	3
SPIR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	n.d.	n.d.	4
SHWQQ+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	1	n.d.	4
I90F+D96L+E99K+V187A+D234Y□	1	4	n.d.
E1AWWPSPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	2	6	n.d.
SPIRR+A19T+D167G+E210V+W221L*	1	n.d.	6
SPIRR+D57G+N94K+D96L+P256T*	1	n.d.	6
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+D96L+D102Y+E210K*	4	n.d.	11
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+D234Y+Y252L+P256T+G263A+L264Q*	4	n.d.	11
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P+S170P+Q249R*	5	n.d.	11
SPIRR+A49P+D167G+E210V*	3	n.d.	12
SPIRR+N94K+D96L+Q249R*	4	n.d.	13
SPIRR+D137G+D167G+E210V+W221L*	5	n.d.	13
SPIRR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	6	n.d.	13
SPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A*	6	n.d.	15

10

20

30

40

d) 酵素不活性化された市販のヨーロッパの洗剤			
脂肪分解酵素	デルタ反射率 (dR)		
	0.25 mg/l	1.00 mg/l	2.50 mg/l
D57G+N94K+D96L+L97M+D167G+E210V□	1	n.d.	3
S3R.D137G+D167G+E210V+W221L□	0	2	2
D57G+N94K+D96L+L97M+E210K□	n.d.	n.d.	3
E1SPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+D167G+V187A+Q249R□	n.d.	4	n.d.
E87K+G91A+D167G+E210V□	n.d.	n.d.	4
E87K+G91A+E210K□	1	n.d.	4
I90F+D96L+E99K□	0	2	5
APPPRTRPRPRPR+E1S+V2G+S3T+Q4P+D5E+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	0	2	n.d.
N94K+D96L+L97M+N233R+Q249R□	0	3	n.d.
SPIRKSPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A□	1	3	5
D137G+D167G+E210V+W221L+N233R□	1	3	5
SPIRRSPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A□	1	3	6
D167G+E210V+N233R+Q249R□	1	3	n.d.
E1W+V2P+N94K+D96L+Q249R□	1	3	n.d.
D96L+E99K+V187A□	1	3	n.d.
E1SPPWWPRW+N94K+D96L+Q249R□	2	3	n.d.
N94K□	2	3	n.d.
D96L+D137G+D167G+E210V□	2	3	n.d.
E1SQRIKQRIK+I90F+D96L+E99K+V187A□	0	4	n.d.
E1SPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+D167G+V187A+Q249R□	0	4	n.d.
I90F+D96L+E99K+V187A+D234Y+Q249R□	0	4	n.d.
I90F.D96L+E99K+V187A+N233R□	1	4	n.d.
E1A+S3R+N94K+D96L+Q249R□	1	4	n.d.

10

20

30

40

d) 酵素不活性化された市販のヨーロッパの洗剤			
脂肪分解酵素	デルタ反射率 (dR)		
	0.25 mg/l	1.00 mg/l	2.50 mg/l
S3R+I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R□	1	4	n.d
E1A+I90F+D96L+E99K+V187A□	1	4	7
I90F+D96L+E99K+V187A□	1	4	8
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L□	2	4	n.d.
E1SPPWWP.N94K+D96L+Q249R□	2	4	n.d.
SPIRK+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	4	10
SPIRRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	n.d.	11
I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R□	1	5	8
I90F+D96L+E99K+V187A+T231R□	2	5	n.d.
E1SPPRWP+N94K+D96L+Q249R□	2	5	n.d.
E1SPPRWWR+N94K+D96L+Q249R□	2	5	n.d.
N94K+D96L+E99K□	2	5	n.d.
E1A+I90F+D96L+E99K+Q249R*	1	6	n.d.
E1K+D96L+D167G+E210V+N233R+Q249R□	2	6	n.d.
E1SPIRKPRIK+I90F+D96L+E99K+V187A□	2	6	n.d.
SHWRK++D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	6	n.d.
SPIRKAWWP+I90F+D96L+E99K+V187A□	2	7	10
N94K+D96L+E99K+Q249R□	2	7	n+d.
E1SPPWRPRR+N94K+D96L+Q249R□	2	7	n.d.
E1SPPRWPRR+N94K+D96L+Q249R□	2	7	n.d.
D137G+D167G+E210V+W221L+D234R□	2	7	n.d.
P-4C+N94K+D96L+E239C+Q249R□	3	7	n.d.
E1SPIRPRPSPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	7	n.d.
E1APPPRPRPRPRP+V2G+D5E+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	4	7	n.d.

10

20

30

40

d) 酵素不活性化された市販のヨーロッパの洗剤			
脂肪分解酵素	デルタ反射率 (dR)		
	0.25 mg/l	1.00 mg/l	2.50 mg/l
E1SPFWPRRP+N94K+D96L+Q249R□	2	8	n.d.
E1SPKRKPRP+D137G+D167G+E210V+W221L□	3	8	n.d.
E1SPPRRP+D96L+E99K+D137G+D167G+ V187A+Q249R□	4	8	n.d.
E1SPPRRP+D57G+N94K+D96L+Q249R□	4	9	11
E1SPIRPRP+N94K+D96A+Q249R□	4	9	n.d.
E1SPPRRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	5	9	n.d.
E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A□	5	9	n.d.
E1SPPRRP+Y53C+D57G+N94K+D96L+K127C+ Q249R□	5	9	n.d.
E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A+ Q249R□	4	10	n.d.
E1SPPRRP+N94K+D96L+Q249R□	5	10	n.d.
E1SPPRRP+N94K+D96L+E99K□	5	10	n.d.
E1SPPRRP+N94K+D96L+E99K+Q249R□	5	10	n.d.
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+Q249R□	6	10	13
E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+V187A□	6	10	15
E1SPIRPRP+N94K+D96L+L97M+Q249R□	6	10	n.d.
E1SPPRRP+N94K+D96L+Q249R□	6	10	n.d.
APPPRPRLLPIS+D5E+D57G+N94K+D96L+ L97M+Q249R*	6	10	n.d.
E1SPIRPRP+D137G+D167G+E210V+W221L□	7	10	13
E1SPPRRP+N94K+D96L+L97M+Q249R□	7	10	n.d.
E1SPIRPRP+N94K+D96L+Q249R□	7	11	n.d.
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	7	13	16

## 実施例 8

第 1 の洗浄脂肪分解酵素の第 1 の洗浄活性を、一連の市販の洗剤について、上記の材料及び方法に記載される“第 1 の洗浄効果の試験についてのアッセイ”を用いて試験した。洗剤にすでに存在する酵素は、洗浄の前、加熱（マイクロオープンにおいて 85 で 4 分間）により不活性化された。

例 2 に記載されるようにアスペルギラス・オリザエにおいて生成された Lipolase 変異体 E1 SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R を用いた。

次の異なった地理学的条件が使用された：

ヨーロッパ： 時間：20分

温度：30℃

光の硬度：3.2mMの $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ （5：1）約18° dH

アメリカ： 時間：10分

温度：30℃

光の硬度：1.07mMの $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ （5：1）約6° dH

10

E1SPIRPRP+D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R□		
アメリカの洗剤における：		
Detergent	0.25mg/l でのdR	1.00 mg/l でのdR
Wisk HDL (2 g/l)	3	5
Wisk w. 漂白剤 (1 g/l)	3	7
Surf w. 漂白剤 (1 g/l)	1	4
Tide HDL (2 g/l)	1	4
Tide w. 漂白剤 (1 g/l)	2	5

20

E1SPIRPRP+D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R ヨーロッパの洗剤における：		
洗剤	0.25mg/l でのdR	1.00 mg/l でのdR
Ariel Futur (5 g/l) UBA 06731122	6	12
Ariel Futur color (5 g/l) UBA 06730101	7	11
Tandil Ultra Plus (5 g/l) UBA 02500191	4	12
Tandil Ultra Plus Color (5g/l) UBA 05761612	5	13
Sunil Aktiv (5.5 g/l) UBA 05580168	4	15
Sunil Aktiv Citrus (5.5 g/l) UBA 05580168	3	13
Sunil Aktiv Color (5.5 g/l) UBA 05580169	4	13
Persil Megapearls (5 g/l) UBA 04163661	2	12
Persil Megapearls Color (5 g/l) UBA 04163662	3	16

## 実施例 9

F. グラミネアラムにおける第1の洗浄リパーゼの生成

菌株及び培地

出発菌株は、フラリウム・グラミネアラム A 3 / 5 (ATCC 20334) である。

COVEプレートは、1 l 当たり、343.3 g のスクロース、20ml のCOVE塩溶液、10ml の1 M アセトアミド、10ml の3 M CsCl 及び25 g のNoble寒天から構成される。COVE塩 (SOX) 溶液は、26 g のKCl、26 g のMgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、76 g のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 及び50ml のCOVE微量金属溶液から成る。COVE微量金属溶液は、1 l 当たり、0.04 g のNaB<sub>10</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O、0.040 g のCuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O、0.70 g のFeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、0.80 g のNa<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 及び10 g のZnSO<sub>4</sub> から成る。

M400Da培地は、1 l 当たり、50 g のマルトデキストリン、2.0 g のMgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、2.0 g のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4.0 g のクエン酸、8.0 g の酵母抽出物、2.0 g の尿素、及び0.5ml の微量金属溶液から成る。微量金属溶液は、1 l 当たり、14.3 g のZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、2.5 g のCuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O、0.5 g のNiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O、13.8 g のFeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、8.5 g のMnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 及び3.0 g のクエン酸から成る。

フサリウム・グラミネアラムのためのH. ラヌギノサ脂肪分解酵素変異体HLA (E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R) 発現プラスミドの構成

フサリウム・グラミネアラムのための発現プラスミドの構成は、図7に概略される。

特に、フサリウム・グラミネアラム発現カセットは、1.1kbのフサリウム・オキシスポラム・トリプシン・ターミネーターに1.24kbのフサリウム・オキシスポラム・トリプシン・プロモーターを融合するために、オーバーラッピングPCRの技法 (Higuchi, R., In Innis, M.A., Gelfond, D.H., Sninsky, J.J., 及びWhite, T.J., editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990) を用いて作成される。

10

20

30

40

50



ide to Methods and Applications, pages 177-183, Academic Press, Inc., New York) を用いて製造される。(Royerなど., 1995 Bio/Technology 13:1479-1483)。Swa I, Kpn I 及びPac I 制限部位を含むポリリンカー領域を、オーバーラッピングPCR反応の一部として、プロモーターとターミネーターとの間に挿入する。プロモーターの 5' 端で、Xho I 部位を付加し、そして生来のEcoR I 部位を保存する。ターミネーターの 3' 端で、EcoR I, HindIII 及びNsi I 部位を、PCR反応により組込む。

フサリウム・オキシスポラム・トリプシン・プロモーターの -1208 ~ -1 及び25bpのポリリンカーを含むPCRフラグメントを、次のプロモーターを用いて、プラスミドpJRoy20 (Royerなど., 1995、前記) から生成する：

*XhoI*   *EcoRI*                      プロモーターの 5' 端

10

前方向プライマー 1 : 5'-gagctcgagGAATTCTTACAAACCTTCAAC-3'

*PacI*   *KpnI*   *SwaI*                      プロモーターの 3' 端

逆方向プライマー 2 : 5'-

ttaattaaggtacctgaatttaaatGGTGAAGAGATAGATATCCAAG-3'

上方ケースの文字は、フサリウム・オキシスポラム・トリプシンプロモーターの生来の配列である。

20

使用されるPCR条件は、95℃で3分間、続いて、それぞれ95℃で30秒、50℃で1分及び72℃で1分での25回のサイクルである。最終拡張サイクルは、72℃で5分間である。Pwo DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.) が、製造業者の供給緩衝液と共に使用される。

フサリウム・オキシスポラム・トリプシン・プロモーターの -5 ~ -1, 25bpのポリリンカー及びフサリウム・オキシスポラム・トリプシン遺伝子の1060bpの 3' 未翻訳領域 (ターミネーター領域) を含むPCRフラグメントを、次のプライマーを用いて、プラスミドpJRoy20から生成する：

プロモーター   *SwaI*   *KpnI*   *PacI*                      プロモーターの 5' 端

30

前方向プライマー 3 :

5'-TCACCatttaaattcaggtacctaattaaATTCCTTGTTGGAAGCGTCGA-

3'

*NsiI*   *HindIII*   *EcoRI*                      ターミネーターの 3' 端

逆方向プライマー 4 : 5'-tggtatgcataagcttgaattcAGGTAAACAAGATATAATTT-3'

上方ケースの文字は、フサリウム・オキシスポラム・トリプシン・プロモーター及びターミネーターの生来の配列である。使用されるPCR条件は、上記の通りである。

40

フサリウム・オキシスポラム・トリプシン・プロモーターの -1208 ~ -1, 25bpのポリリンカー及び1060bpのフサリウム・オキシスポラム・トリプシン・ターミネーターを含む最終の2.3kbのオーバーラッピングPCRフラグメントを、鋳型としての0.2µlの第1のPCR (プロモーター) 反応及び3µlの第2のPCR (ターミネーター) 反応、及びプライマー番号1及び4も用いて製造する。使用される、PCR条件は、95℃で3分間、続いて、それぞれ95℃で30秒間、62℃で1分間、及び72℃で3分間の30回のサイクルである。最終拡張サイクルは、72℃で5分である。Pwo DNAポリメラーゼをまた、この反応のために使用する。

得られる2.3kbのバンドを、Xho I 及びNsi I により消化し、そしてNsi I により一部消化され、そしてSal I により完結されているプラスミドpBaNe6中にクローン化する。実質的に

50

は、pBaNe6のアスペルギラスプロモーター及びターミネーター配列が、フサリウム・オキシスポラム・トリプシン・プロモーター及びターミネーター配列により置換される。得られる構造体 (pDM174.3) を、Swa I 及びPac I により消化する。

下記に示されるDNAプライマー-HLIP-A及びHLIP-Bが、プラスミドpJVi220からのHLAリパーゼ遺伝子を増幅するためにPCR反応に使用される：

**HLIP-A (プライマー5)：** 5'-cccatttaaatATGAGGAGCTCCCTTGTGCTG-3'

**HLIP-B (プライマー6)：** 5'-cccttaattaaCTAAAGACATGTCCCAATTAA-3'

上方ケースの文字は、リパーゼ遺伝子における配列を示す。

PCRを、約50ngのpHLA、0.05mMの個々のdATP、dTTP、dGTP、dCTP、100 pモルの個々のHLIP-A及びHLIP-B、1 XのPwo I 緩衝液 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 及び2.5単位のPwo I (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) を含む50 µlの反応において行なう。PCR条件は、95 で3分間、それぞれ、95 で1分間、60 で1分間の3回のサイクル；及び72 で1.5分間、及び続いて、72 で5分間である。PCR反応混合物を、アガロースゲル上で試験し、そして約0.9kbのHLA DNAバンドを切り出す。DNAを、3体積のQia-ex溶解緩衝液 (Qiagen, Los Angeles, CA) によるアガロースの可溶化、続いて製造業者の説明書に従ってのQiaquick PCR回転カラム (Qiagen, Los Angeles, CA) 処理により精製する。20 µl アリコートのDNAを、製造業者により示唆されるようにして、1 Xの制限酵素緩衝液及び制限酵素Pac I 及びSwa I を含む25 µlの最終体積の溶液において切断する。次に、反応混合物を80 で10分間、加熱する。1 µlのPac I / Swa I 切断されたHLAリパーゼ遺伝子を、Pac I / Swa I 切断されたプラスミドpBaNe 6 中に連結する。その連結混合物を用いて、E. コリ株DH 5 を形質転換する。pBaNe 6 及びHLA配列を含むプラスミドを、pJeRS33と命名する。

pJeRS33からの0.9kbのSwa I /Pac I HLAフラグメントを、Swa I / Pac I 消化されたpDM174.3ベクター中にクローン化し、プラスミドpDM177を創造する。

フサリウム・グラミネアラムの形質転換

F. グラミネアラム株 A 3 / 5 (ATCC20334) を、Vogels培地 (Vogel, 1964, Am. Nature 98 : 435-446)、及び1.5%のグルコース及び寒天を含む10 x 15mmのペトリ皿上で、25

で3週間、増殖せしめる。分生子 (プレート当たり約10<sup>8</sup>個) を、トランスファーループを用いて、10mlの無菌水に取り除き、そして4層のチーズクロスを通して、及び最終的に、1層のMiraclothを通しての濾過により精製する。分生子懸濁液を遠心分離により濃縮

する。1%酵母抽出物、2%バクトペプトン及び2%グルコースから成るYPG培地50mlを、約100個の分生子により接種し、そして24 で14時間、150rpmで撹拌しながらインキュベートする。得られる菌糸を、無菌の0.4mmフィルター上に取り、そして無菌蒸留水及び1

.0MのMgSO<sub>4</sub>により連続的に洗浄する。菌糸を、10mlのNOVOZYM234<sup>TM</sup> (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) 溶液に再懸濁し (1.0MのMgSO<sub>4</sub>中、2 ~ 10mg / ml)、そして80rpm

で撹拌しながら、34 で15 ~ 30分間、消化する。消化されていない菌糸材料を、4層のチーズクロス及び1層のMiraclothを通しての連続的な濾過により、その得られるプロトプラスト懸濁液から除去する。1 Mのソルビトール20mlを、チーズクロス及びMiraclothに通し、そしてプロトプラスト溶液を組合す。混合した後、プロトプラスト (約 5 × 10<sup>8</sup>個

) を遠心分離によりペレット化し、そして1 Mのソルビトール20ml及びSTC (0.8 Mのソルビトール、0.05 Mのトリス、pH8.0、0.05 MのCaCl<sub>2</sub>) 20mlにおける連続的な再懸濁及び遠心分離により洗浄する。洗浄されたプロトプラストを、1 ~ 2 × 10<sup>8</sup> / mlの濃度で、4部

のSTC及び1部のSPTC (0.8 Mのソルビトール、40% PEG4000、0.05 Mのトリス、pH8.0、0.05 MのCaCl<sub>2</sub>) に再懸濁する。100 µlのプロトプラスト懸濁液を、ポリプロピレン管 (17 x 100mm) における 3 µg のpDM177 DNA及び5 µlのヘパリン (STC中、5 mg / ml) に添加し、そして氷上で、30分間インキュベートする。1 mlのSPTCをプロトプラスト懸濁液中に軽く混合し、そしてインキュベーションを室温で20分間、続ける。COVE塩、0.8 Mのスクロース及び1%の低溶融アガロース (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) から

成る溶融溶液 (40 に冷却された) 15mlを前記プロトプラストと共に混合し、そして次に

成る溶融溶液 (40 に冷却された) 15mlを前記プロトプラストと共に混合し、そして次に

、COVE寒天を含む150mmのペトリ皿上にプレートする。インキュベーションを室温で10～14日間、続ける。

リパーゼ活性の発現

フサリウム・グラミネアラム A 3 / 5 の 5 種のpDM177形質転換体を、振盪フラスコにおける M400 Da培地上で30 で7日間、培養する。対照培養物として、フサリウム・オキシスポラム・トリプシン・プロモーターとターミネーターとの間に挿入される野生型ヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼを含む、プラスミドpDM155 (Royerなど., 1995 Bio/Technology 13 : 1479-1483) の A 3 / 5 形質転換体を、同じ条件下で同時に増殖せしめる。

HLAの第1の洗浄活性

上記生成されたリパーゼ及びその類似するリパーゼ(同じ突然変異を担持するが、しかし A・オリザエにおいて生成される)を、酵素不活性化されたAriel Futurを用いて、本明細書に記載される“第1の洗浄効果の試験についてのアッセイ”において試験した。次の結果が得られた：

下記微生物におけるE1SPIRPRP + 下記濃度でのdR

D 57 G + N 94 K + D 96 L + L 97 M +

Q 249 R

1250LU／ℓ 12500LU／ℓ

A. オリザエ

8

15

F. グラミネアラム

9

14

実施例10

アブシジア・レフレキサ変異体の構成

材料及び方法

菌株及びプラスミドは、前記の材料及び方法のセクションに列挙される。

プライマー：プライマー-TiK57、プライマー-TiK58、プライマー-TiK59、プライマー-TiK60、プライマー-TiK61、プライマー-TiK62、プライマー-TiK64、プライマー-TiK66、プライマー-TiK72、プライマー-TiK74、プライマー-TiK75、プライマー-TiK76。

キット、溶液、培地及び同様のもの：

Taq-DNAポリメラーゼ (Promega)、100 µg / mlのアンピシリンにより補充されたLB培地、DNA Maxi-Prepキット (QIAGEN)、ポリエチレングリコール / LiOAc酵母形質転換キット (Yeastmaker, Clontech)、酵母室素塩基 W / O アミノ酸 (Difco 0919-15-3)、カサミノ酸 (Difco 0230-01-1)、Bacto - 寒天 (Difco)、YPG - 培地 (20 g のカゼイン - ペプトン及び10 g の酵母抽出物 (Difco))、100 µg / mlのアンピシリンにより補充されたLB培地。

装置：

Applied Biosystems 373 DNA Sequencer、酢酸セルロース・フィルター (Schleicher-Schill)。

SYC - プレート：

13.6 g のNaOH及び22.6 g の蟻酸を、500mlの水、15 g の酵母室素塩基 W / O アミノ酸 (Difco 0919-15-3)、10 g のカザミノ酸 (Difco 0230-01-1) に完全に溶解する。20mlの2 % トレオニン溶液及び20mlの1 % トリプトファン溶液を添加する。その溶液を水により全体を1 lとし、無菌濾過し、そして4 で貯蔵する。液体培地調製のためには、1 lのSYCを、20 % グルコース溶液200ml及び水800mlを添加することによって希釈する。寒天プレートの調製のためには、1 lのSYCを、800mlのBacto - 寒天 (1 lの) 水に溶解された37.5 g のBacto - 寒天 (Difco) 及び200mlの20 % グルコース溶液により60 で希釈する。

ブリリアント・グリーン・アッセイ：

BG - 寒天プレートの調製のためには、10 g のアガロースを、100mMのトリス - HCl緩衝液 (

10

20

30

40

50

pH9.0) 500mlにおいて加熱することによって溶解する。このアガロース溶液を、オリーブ油エマルジョン (8mlのオリーブ油 (Sigma) 24mlと共に60 で混合し、そして水中、2 %のポリビニルアルコール (Sigma) 溶液16mlを混合し、そしてUltra-Turrax T25、ブリリアント・グリーン原液 (4 mg / ml水) 10ml、洗剤6.45 gを含む100mMのトリス - Cl緩衝液 (pH9.0) 465ml、及び250mMのCaCl<sub>2</sub>溶液1.4mlと共に、氷上で十分に均質化する。

形質転換された酵母コロニーを、SYC - 寒天プレート上の無菌酢酸セルロース・フィルター (Schleicher-Schiell) 上で、30 で3日間、増殖せしめる。次に、フィルターを、BG - 寒天プレートに移し、そして37 で2 ~ 8時間インキュベートする。寒天に緑色のスポットを生成するコロニーを、陽性として判断する。

突然変異ライブラリーの制限酵素分析及び配列決定

回収されたプラスミドDNAを、Nco I - 消化にゆだねる。正しいクローンは、2.9及び3.1kbの2種のフラグメントを生成する。プラスミドDNAを、続いて、色素 - ターミネーターPCRサイクル配列決定し、又はApplied Biosystems 373 DNA Sequencer上で配列決定した。ライブラリー3及び4から単離されたクローンの場合 (表1)、オリゴヌクレオチドTiK61及びTiK66が二本鎖配列決定のために使用され、そしてライブラリー7及び8に関しては、TiK62及びTiK72が適用された。

実施例10 A

アブシジア・レフレキサ ATTC44896リパーゼ発現ベクターの構成

2種のベクターを、サッカロミセス・セレビシアエにおける野生型アブシジア・レフレキサ ATTC44896リパーゼ (SPIRRペプチド拡張部分を有するか又は有さない) の発現のために構成した。

成熟アブシジア・レフレキサ ATTC44896リパーゼをコードするcDNAクローン (配列番号13及び図1) を、プライマー対TiK57 / 59 (N - 末端SPIRR拡張部分を供給する) 又はプライマー対TiK58 / 59 (SPIRR拡張部分を有さない) のいずれかを用いて、PCR増幅した (Ta = 50 、25サイクル、5単位のTaq-DNAポリメラーゼ)。PCRフラグメントを、元のBamH I / Xba I クローニング部位に活性H・ラヌギノサ・リパーゼをコードする領域を有する酵母発現ベクターpJS037 (シグナルペプチドの下流に導入されたNhe I 部位を有する) 中に、Nhe I / Xba I 部位を通して連結した。

活性H・ラヌギノサ・リパーゼをコードする遺伝子を、BamH I 部位の下流へのNhe I - 部位の導入によりわずかに変性した (図2を参照のこと)。Nhe I - 及びXba I - 部位は適合できるので、ベクターを、連結の前、アルカリホスファターゼにより処理した。最終的に、次の2種のベクター構造体を得られた: 成熟リパーゼ遺伝子の開始のちょうど上流にSPIRR拡張部分を含むpTiK04、及びSPIRR拡張部分をコードする部位を含まないpTiK05。両者の場合、ヒュミコラ・ラヌギノサ・リパーゼからの元のシグナル配列は、BamH I とNhe I 部位との間に一定して維持された。

MF 1シグナル配列構造体

H・ラヌギノサ・リパーゼ・シグナル配列を、適合する因子 1シグナルにより置換した。

酵母株YPH499 (Stratagene) のゲノムDNAを、標準のプロトコル (Ausubelなど., (1995) ,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons) に従って調製した。1 µgのゲノムDNAを、プライマー対TiK74 / 75によるPCR (Ta = 50 、25サイクル、5単位のTaq-DNAポリメラーゼ) にゆだねた。増幅されたMF 1シグナル配列フラグメント (図3) を、それぞれBamH I 及びNhe I 部位を通してpTiK04及びpTiK05中に挿入し、pTiK06及びpTiK07を生成した。

実施例10 B

ドーピングされたオリゴヌクレオチドによる突然変異誘発によるアブシジア・レフレキサ ATTC44896リパーゼ変異体の構成

4種のライブラリーを、ドーピングされたオリゴヌクレオチドにより構成した。ライブラリーA及びB (下記表1を参照のこと) においては、ランダム突然変異誘発を、アブシジア・レフレキサ ATTC44896リパーゼの推定上のリッド領域に導入した。ライブ

10

20

30

40

50

ライリー A においては、SPIRR配列が一定して維持され、ライブラリー B においては、それは排除された。

ライブラリー C 及び D を、アブシジア・レフレキサ ATTC44896 の N - 末端における 2 種の推定上の脂質接触領域における突然変異により構成した。ライブラリー C においては、SPIRR配列が再び一定に維持された。

アブシジア・レフレキサ ATTC44896 リパーゼ遺伝子の推定上のリッド領域の突然変異誘発（アミノ酸位置 82-99）を、鋳型として pTiK05 を用いて、 $T_a = 50$  及び 25 サイクルで、プライマー対 TiK60 / TiK64 による、5 単位の Taq-DNA ポリメラーゼを包含する標準の PCR（Sambrook など., (1989), Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）により行なった。

10

プライマー TiK62 及び第 1 回目の PCR において生成されたアガロースゲル精製された DNA フラグメントを用いての第 2 回目の標準の PCR においては、完全なアブシジア・レフレキサ ATTC44896 リパーゼ遺伝子が、第 1 回目の PCR のための条件と同じ増幅条件を用いて回復された。第 1 回目の PCR と比較して、pTiK04 又は pTiK05 が鋳型として選択され、その結果、ライブラリー（SPIRR N - 末端拡張部分を有する / 有さない）が得られた。

アミノ酸位置 30 - 45 の突然変異誘発に関しては、プライマー TiK76 及び TiK64 が第 1 回目の PCR のために使用された。第 2 回目の PCR は、原則的に上記 PCR と同一であった。

得られた PCR フラグメントを、BamH I / Xba I - 部位を通して pJS037 中に連結した。E . コリの形質転換及び続く、コンピテント YNG318 酵母細胞の形質転換は、上記のようにして行なわれた。

20

表1. 構成され、そしてスクリーニングされたアブシジア・レフレキサ ATTC44896変異体ライブラリーの要約

番 号	解説及び突然変異 誘発された領域	E. コリにお けるライブラ リーサイズ	スクリーニングされ た S. セレビス コロニー	X g / ℓ の洗剤 でのBG-アッセイ における陽性体	X g / ℓ の洗剤での BG-アッセイにおけ る陽性体 (2回目)	制限 酵素 分析
A	リッド (位置82- 99 (C. SPIR))	$8 \times 10^6$	180000	3 g / ℓ で21	3 g / ℓ で9	6
B	リッド (位置82- 99)	$7 \times 10^6$	200000	6 g / ℓ で1 3 g / ℓ で5	6 g / ℓ で0 3 g / ℓ で3	— 2
C	位置30-45 (C. SPIR)	$1 \times 10^6$	160000	3 g / ℓ で38	3 g / ℓ で4	3
D	位置30-45	$6 \times 10^6$	170000	3 g / ℓ で27	3 g / ℓ で2	1

## 実施例10C

アブシジア・レフレキサ ATTC44896リパーゼ変異体ライブラリーのスクリーニング及び  
陽性コロニーからのプラスミドの回収

実施例10Bに記載されるようにして得られた、形質転換された酵母細胞を、14cmのSYC - 寒天プレート上の酢酸セルロースフィルター上に広げた。形質転換体の選択的増殖及びBG - 寒天プレートへのフィルターの移行の後、陽性コロニーを取り、水に再懸濁し、そしてSYC - 寒天プレート上の酢酸セルロースフィルター上に再び広げ、2回目のBG - アッセイを確実にする (材料及び方法のセクションを参照のこと)。2回目のアッセイからの陽性クローンを、20mlのSYC - 培地に移し、そして30 ℃ で2日間、振盪した。プラスミドDNAを

10

20

30

40

50

、この飽和酵母培養物1.5mlから標準のフェノール／ガラスビーズ方法（Ansubelなど、（1995）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons）に従って調製した。プラスミド調製物のアリコートをし、E. コリ DH10B細胞中にエレクトロポレートし、次に100  $\mu$ g/mlのアンプシリンにより補充されたLB - 寒天プレート上にプレートした。コロニーのDNAを単離し、そして上記の材料及び方法に記載されるようにして、制限酵素分析及び配列決定に適用した。

ライブラリー A 及び B における15のランダムに採取されたクローンの配列決定は、10%の選択されたドーピングレベルが最終的に次のことをもたらすことを示した：

20%が野生型であり、

13%が1つのアミノ酸交換を有し、

20%が2つのアミノ酸交換を有し、

13%が3つのアミノ酸交換を有し、

20%が4つのアミノ酸交換を有し、

0%が5つのアミノ酸交換を有し、そして

13%が6つのアミノ酸交換を有する（分子当たり）。

ライブラリー A から、3 g / l の洗剤で $1.8 \times 10^5$ 個のスクリーンされたコロニーのうち6個のクローンがBG - アッセイにおいて単離され（個々の $3 \times 10^4$ 個のスクリーンされたコロニー当たり1つのクローン）、そしてライブラリー B から、2個の陽性クローンが $2.0 \times 10^5$ 個のスクリーンされたコロニーから単離された（個々の $1.0 \times 10^5$ 個のスクリーンされたコロニー当たり1つのクローン、表1）。それらの8個のクローンの注目される配列の差異は、下記表2に示される。

上記のように、ライブラリー C 及び D を、アビシジア・レフレキサ ATTC44896リパーゼのN - 末端における2つの推定上の脂質接触領域における突然変異により構成した。13個のランダムに採取されたクローンの配列決定は、10%の選択されたドーピングレベルが次のことをもたらすことを示した：

8%が野生型であり、

15%が1つのアミノ酸交換を有し、

46%が2つのアミノ酸交換を有し、

15%が3つのアミノ酸交換を有し、そして

15%が4つのアミノ酸交換を有する（分子当たり）。

ライブラリー C は、BGアッセイにおいて3 g / l の洗剤で $1.6 \times 10^5$ 個のスクリーンされたコロニーから3個のクローンを生成し（個々の53333個のスクリーンされたコロニー当たり1つの陽性体）、そしてライブラリー D から、1つの陽性クローンが $1.7 \times 10^5$ 個のコロニーから単離され得た（表1）。それらの4個のクローンの配列はまた、表2にも示される。

10

20

30

標的配列：

		標的配列:																	
		82												99					
ライブラリークローン数		T	S	S	I	R	N	A	I	A	D	I	V	F	V	P	V	N	Y
A	303								W				T						
	309					H		T											
	312	S							S										
	315				V			T	W	L	-N					L		..	
H133R	318			C				W		K				L	S			I..V102F	
	321							S			E								
B	401	S						S						A					
	402																	..Y136H.K137H	
		<div><div>30</div><div>45</div></div> <u>R T V I P G G R W S C P H C G</u> V																	
C	701	W	N																
	702	W	N																
	703							C											
D	...Q4R																		
	801																		
		...V95E																	

### 实施例 10 D

## アビシジア・レフレキサATTC44896変異体の発現及びリパーゼ単位の測定

ライブラリー A から同定された 4 個の改良された変異体を、培養培地に分泌される LU の測定及び粗シトソール / 膜画分の LU 測定にゆだねた。

YPG - 培地10mlを、水900mlに溶解し、オートクレープし、そして添加される20%グルコース溶液100mlを、SYC - 培地における飽和された酵母培養物 1mlにより接種した。その培養物を30℃で2日間、振盪した。細胞を遠心分離（4000 gで5分間）により収穫し、そして上清液をLU測定のために氷上で貯蔵した。細胞ペレットを、スフェロプラスト調製のためにNovozym™ 234により処理し、そしてガラスビーズ法（Ausubelなど.,（1995）, Current Protocols in Molecular Biology, Joh Wiley and Sons）を用いて溶解した。膜画分も含む、その得られた粗シトソール画分を、タンパク質分解性劣化を最少にするために、すぐにLU測定（材料及び方法のセクションを参照のこと）に適用した。

結果は表3に示される。4個のクローンは、シトソール/膜画分において弱い、しかし実質的なLUを示した。さらに、それらの4個のクローンのうち2個のクローンから、弱いLUシグナルが記録された。0.0LU/mlとは異なるすべてのデータは、反復された測定により確かめられるように、有意な酵素活性を示す。



表 3. ライブラリー A からの ATTC44896 変異体のシトソール画分から培地に分泌され、又はその画分から測定される、得られたリパーゼ単位の要約

サンプル	上清液における リパーゼ単位 (LU/ml)	シトソールにお けるリパーゼ単 位 (LU/ml)
YNG318 (負の対照)	0.0	0.0
303	0.0	1.0
309	0.0	0.5
312	1.7	0.6
321	0.6	1.0

10

#### 実施例12

20

##### 脂肪分解酵素の基質親和性

アルカリ性 pH (pH9.0) で及び非イオン性界面活性剤 Dobanol 25-7 (100ppm) (すなわち、基質親和性についての測定) の存在下で、基質相 (オリーブ油、たとえば FFA) に蒸積する脂肪分解酵素の能力の単純な比較のための方法が開発された。

##### 方法:

1. 2 種の同一の緩衝溶液 (5 ml) を、20ml の密封できるバイアルにおいて調製する (“サンプル” (s) 及び “対照” (r))。
2. 酵素を、“サンプル” 及び “対照” 中に添加し、そしてリパーゼ濃度を決定する ( $\times$  LU/ml)。
3. オリーブ油を “サンプル” 上に添加し、そして両リパーゼ溶液を激しく振盪する。4 での一晩のインキュベーション。
4. 水性相における残るリパーゼ濃度を、インキュベーションの後に測定する ( $Y_i$  LU/ml;  $i = r, s$ )。

30

##### インキュベーション条件の要約:

緩衝液: 100mM のグリセリン (5 ml)  
 pH: 9.0  
 基質: オリーブ油 (5 ml)  
 Dobanol 25-7: 100ppm  
 T: 4  
 リパーゼ: 5 ~ 10 LU/ml  
 インキュベーション: 一晩 (24 ~ 26 時間)

40

##### データの評価:

実験後の結果は、オリーブ油と接触しての水性相におけるインキュベーションに基づく活性損失と、オリーブ油の不在下での水性相における活性損失とを比較することによって計算される:

$$= Y_s / Y_r \text{ (上記を参照のこと)}$$

結果:

表 11 :

リパーゼ	$\alpha$ (%)
Lipolase™	95 %
D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R	65 %
SPIRPR+E1P+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R	45 %
SALRPRK+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R	25 %
SPIRPR+E1P+D137G+D167G+E210V+W221L	50%

10

実施例 5 ~ 8 に開示される洗浄データへの上記結果の比較は、高められた第 1 の洗浄性能を有するLipolase変異体が一般的に、Lipolaseに比較して、高められた基質親和性を有することを明確に示唆する。

#### 実施例 13

##### シュードモナスsp. リパーゼ (Liposam) の局在化されたランダム突然変異誘発

上記リパーゼの第 1 の洗浄活性を導びくことが企画された突然変異を導入するために使用される適切なドーピングスキームは、次の 1 又は複数の領域のすべて又は一部における局在化されたランダム突然変異誘発を含んで成る。93重量% / 7%のランダムとは、それぞれのコドンがランダム突然変異誘発されたライブラリーを構成するために使用されるオリゴヌクレオチドにおいて93重量%のヌクレオチド及び7%の他の3個ヌクレオチドを伴って、合成されることを意味する。90重量% / 10%ランダムに関しても、同様である。

20

アミノ酸領域17 - 37において：

アミノ酸位置17 - 18 + 20 - 24 + 26 - 29 + 32 - 37：93重量% / 7%ランダム M19：選択的に L, I, F を付与するためにドーピングされる。

アミノ酸領域109 - 161において：

アミノ酸位置109 - 118：93重量% / 7%ランダム

アミノ酸位置120 - 123 - 137 + 139 - 161：90重量% / 10%ランダム

30

アミノ酸領域208 - 239において：

アミノ酸位置208 - 212 + 214 - 215 + 217 + 231 + 233 - 239：90重量% / 10%ランダム

アミノ酸領域235 - 271において：

アミノ酸位置253 + 255 + 259 - 268 + 270 - 271：90重量% / 10%ランダム、V 258：90重量% / 10%ランダム、但し、正の荷電されたアミノ酸でないようにドーピングされる。

局在化されたランダム突然変異誘発は、材料及び方法のセクション及び例 1 に記載のようにして実施され、そして得られる変異体は、減じられたカルシウム依存性及び / 又は洗剤又は洗剤成分に対する高められた耐性及び第 1 の洗浄活性についてスクリーンされ得る。従って、及び必要なら、得られる変異体の局在化されたランダム突然変異誘発が反復され得、そして / 又は遺伝子が本明細書に開示されるように遺伝子シャフリングにゆだねられ得る。

40

## 明細書に引用される文献

- Muhlrad et al., 1992, *Yeast*, Vol. 8, 79-82
- Shimada. Y, et al. (1989), cDNA Molecular Cloning of *Geotrichum candidum* Lipase, *J. Biochem.*, 106, 383-388,
- Hunkapiller et al., 1984, *Nature* 310:105-111
- R. Higuchi, B. Krummel, and R.K. Saiki (1988), A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, *Nucl. Acids Res.* 16:7351-7367, 10
- Yamaguchi. S, et al. (1991), Cloning and structure of the mono- and diglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150, *Gene* 103, 61-67,
- Hass. M.J. et al. (1991), Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*, *Gene* 109. 107-113,
- Kugimiya. W. et al. (1992), Cloning and Sequences Analysis of DNA encoding *Rhizopus niveus* Lipase, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 716-719. 20
- Dartois. V. et al. (1993), Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168, *Biochemica et Biophysica acta* 1131, 253-260,
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989,
- R.K. Saiki et al., *Science* 239, pp. 487-491, 1988,
- Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, pp. 1859-1869, 1981,
- Matthes et al., *The EMBO J*, 3, pp. 801-805, 1984, 30
- J.O. Deshler, (1992) A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction, *GATA* 9(4): 103-106
- Leung et al., *Technique*, Vol. 1, No. 1, pp. 11-15, 1989
- Fowler et al., *Molec. gen. Genet.*, 133, pp. 179-191, 1974,
- Brady et al., "A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase", *Nature* 343, 1990, pp. 767-770, 1990,
- Tilbeyrgh. H, van Egloff, M.-P., Martinez.C., Rugani.N., Verger.R. and Cambillau (1993) 40
- Nature* 362, p. 814-820, Interfacial activation of the lipase-prolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography.

- Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition, Blackwell Scientific Publications, 1989
- Alber. T. and Kawasaki, G., *J.Mol.Appl. Genet* **1**, 419-434 (1982)
- Joyce, G. F.: Directed Molecular Evolution. *Scientific American* December 1992, pp. 48-55.
- Siderovski, D. P., and Mak T. W.: RAMHA: A pc-based monte-carlo simulation of random saturation mutagenesis. *Comput. Biol. Med.* **23**(6), pp. 463-474, 1993.
- Palzkill T., Le Q.-Q., Venkatachalam K. V., LaRocco M., and Ocera H.: Evolution of antibiotic resistance: several different amino acid substitutions in an active site loop alter substrate profile of b-lactamase. *Molecular Microbiology* **12**(2), pp. 217-229, 1994.
- Ollis, D.L. et al (1992) *Prot. Eng.* **5**, p. 197.
- Svendsen, A. et al. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* **1259**, p. 9.
- Grochulski, P. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, p. 12843.

## 配列表

( 1 ) 一般情報 :

( i ) 出願人 :

( A ) 名称 : Novo Nordisk A/S

( B ) 通り : Novo Alle

( C ) 市 : Bagsvaerd

( E ) 国 : デンマーク

( F ) 郵便番号 ( ZIP ) : DK-2880

( G ) 電話 : + 45 4444 8888

( H ) テレファックス : + 45 4449 3256

( ii ) 発明の名称 : 新規の脂肪分解酵素

( iii ) 配列の数 : 100

( iv ) コンピューター読み取り形 :

( A ) 媒体型 : フロッピーディスク

( B ) コンピューター : IBM PC compatible

( C ) 操作システム : PC-DOS / MS-DOS

( D ) ソフトウェア : PatentIn Release #1.0, Version #1.30 B ( EPO )

( 2 ) 配列番号 1 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 21個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = " プライマー 3 "

( xi ) 配列 : 配列番号 1 :

**AGAAATCGGG TATCCTTTCA G**

( 2 ) 配列番号 2 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 30個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = " プライマー 7258 "

21

10

20

30

40

50

(xi) 配列：配列番号 2：

**gaatgacttg gttgacgcgt caccagtcac** 30

(2) 配列番号 3 についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：/desc = “プライマー7770”

10

(xi) 配列：配列番号 3：

**tctagcccag aatactggat caaatc** 26

(2) 配列番号 4 についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：53個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：/desc = “randon 1”

20

(B)

ボトル5： 93% A; 2.33% C; 2.33% G 及び 2.33% T  
 ボトル6： 93% C; 2.33% A; 2.33% G 及び 2.33% T  
 ボトル7： 93% G; 2.33% A; 2.33% C 及び 2.33% T  
 ボトル8： 93% T; 2.33% A; 2.33% C 及び 2.33% G

(xi) 配列：配列番号 4：

5'	5	C	G
T	5	C	3'
T	7	A	
A	8	G	
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	
5	6	G	
7	G	A	
8	AA	A	
6	T	C	
7			

30

(2) 配列番号 5 についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：93個の塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：/desc = “オリゴ2”

40

フラスコ 5: 80% A; 6,66% C; 6,66% G og 6,66 % T.  
 フラスコ 6: 80% C; 6,66% A; 6,66% G og 6,66 % T.  
 フラスコ 7: 80% G; 6,66% A; 6,66% C og 6,66 % T.  
 フラスコ 8: 80% T; 6,66% A; 6,66% C og 6,66 % G.

(xi) 配列: 配列番号 5 :  
**GTCTCTGCGT GGACGGCCTT GCGGCGCCA CCTCCA67(T/A)**  
**66(T/A) 575 66(T/A) 67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) (6/7) (7/8) (C/G)**  
**57(C/G) C57 (5/7) 5(C/G) CTGT TTAACCAGTT CAATCTC 93**

(2) 配列番号 6 についての情報:

10

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 64個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジ: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 説明: /desc = "オリゴリッド 2"

**(A) DESCRIPTION: /desc = "Oligo lid2"**

フラスコ 5: 93% A; 2,33% C; 2,33% G og 2,33 % T.  
 フラスコ 6: 93% C; 2,33% A; 2,33% G og 2,33 % T.  
 フラスコ 7: 93% G; 2,33% A; 2,33% C og 2,33 % T.  
 フラスコ 8: 93% T; 2,33% A; 2,33% C og 2,33 % G.

20

(xi) 配列: 配列番号 6 :

**CATTTAT886 888655(C/G) (A/C/G/T) (A/C/G/T) 7 55(C/G) 88(A/C) 5758**  
**8(C/G) 76(7/8) 58665 788688(8/7) 587 75ACGAG(A/T) GC CACG 64**

(2) 配列番号 7 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 105個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジ: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 説明: /desc = "プライマー 4"

(xi) 配列: 配列番号 7 :

**GCTCCTCATG GTGGATCCCC AGTTGTGTAT ATAGAGGATT**  
**GAGGAAGGAA GAGAAGTGTG GATAGAGGTA AATTGAGTTG**  
**GAAACTCCAA GCATGGCATC CTTGC 105**

(2) 配列番号 8 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 54個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジ: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 説明: /desc = "プライマー 8479"

(xi) 配列: 配列番号 8 :

**GCGTGGACGG CCTTGGCTAG CCCTATTCGT CCTCGACCGG TCTCGCAGGA TCTG 54**

(2) 配列番号 9 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 30個の塩基対

(B) 型: 核酸

50

( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類：他の核酸  
 ( A ) 説明： / desc = “ プライマー7887 ”  
 ( xi ) 配列：配列番号9：

**GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC** 30

( 2 ) 配列番号10についての情報：

( i ) 配列の特徴：

( A ) 長さ：46個の塩基対

( B ) 型：核酸

10

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ii ) 配列の種類：他の核酸

( A ) 説明： / desc = “ プライマー8932 ”

( xi ) 配列：配列番号10：

**GAACTGGATA GGAAATTTGA AGTTCCTGTT GAAAGAAATA AATGAC** 46

( 2 ) 配列番号11についての情報：

( i ) 配列の特徴：

( A ) 長さ：57個の塩基対

( B ) 型：核酸

20

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ii ) 配列の種類：他の核酸

( A ) 説明： / desc = “ オリゴ1 ”

フラスコ 5: 80% A; 6.66% C; 6.66% G og 6.66 % T.

フラスコ 6: 80% C; 6.66% A; 6.66% G og 6.66 % T.

フラスコ 7: 80% G; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % T.

フラスコ 8: 80% T; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % G.

( xi ) 配列：配列番号11：

**GCGTGGACGG CCTTGGCC86(T/A) 66(A/T) 58(T/A) 67(T/A) 66(T/A)** 30

**575 66(T/A) GAGGTC TCG CAGGATC TG** 57

( 2 ) 配列番号12についての情報：

( i ) 配列の特徴：

( A ) 長さ：18個の塩基対

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ii ) 配列の種類：他の核酸

( A ) 説明： / desc = “ プライマー2056 ”

( xi ) 配列：配列番号12：

**GCACGTAATG TTTGTACC** 40

( 2 ) 配列番号13についての情報：

( i ) 配列の特徴：

( A ) 長さ：18個の塩基対

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ii ) 配列の種類：他の核酸

( A ) 説明： / desc = “ プライマー4699 ”

( xi ) 配列：配列番号13：

50

18

**CGGTACCCGG GGATCCAC**

18

( 2 ) 配列番号14についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 30個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ 前方向プライマー 1 ”

( xi ) 配列 : 配列番号14 :

**GAGCTCGAGG AATTCTTACA AACCTTCAAC**

30

( 2 ) 配列番号15についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 47個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ 逆方向プライマー 2 ”

( xi ) 配列 : 配列番号15 :

**TTAATTAAGG TACCTGAATT TAAATGGTGA AGAGATAGAT ATCCAAG**

47

( 2 ) 配列番号16についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 51個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ 前方向プライマー 3 ”

( xi ) 配列 : 配列番号16 :

**TCACCATTTA AATTCAGGTA CCTTAATTAA ATTCCTTGTT GGAAGCGTCG A**

51

( 2 ) 配列番号17についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 42個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ 逆方向プライマー 4 ”

( xi ) 配列 : 配列番号17 :

**TGGTATGCAT AAGCTTGAAT TCAGGTAAAC AAGATATAAT TT**

42

( 2 ) 配列番号18についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 32個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ HLIP-Aプライマー 5 ”

( xi ) 配列 : 配列番号18 :

10

20

30

40

50



**CCCATTTAAA TATGAGGAGC TCCCTTGTGC TG**

32

( 2 ) 配列番号19についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 32個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ HLIP-Bプライマー 6 ”

( xi ) 配列 : 配列番号19 :

10

**CCCTTAATTA ACTAAAGACA TGTCCCAATT AA**

32

( 2 ) 配列番号20についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号20 :

**Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp**

6

5

20

( 2 ) 配列番号21についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号21 :

**Ser-Pro-Ile-Arg-Met**

5

5

( 2 ) 配列番号22についての情報 :

30

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号22 :

**Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg**

6

5

( 2 ) 配列番号23についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

40

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号23 :

**Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg**

6

5

( 2 ) 配列番号24についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

50

( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号24 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg</b>	6
5	
( 2 ) 配列番号25についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	10
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号25 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Lys</b>	5
5	
( 2 ) 配列番号26についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	20
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号26 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Lys-Lys</b>	5
5	
( 2 ) 配列番号27についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	30
( xi ) 配列 : 配列番号27 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro</b>	6
5	
( 2 ) 配列番号28についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	40
( xi ) 配列 : 配列番号28 :	
<b>Ser-Pro-Pro-Arg-Arg</b>	5
5	
( 2 ) 配列番号29についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	50

( xi ) 配列 : 配列番号29 :		
<b>Ser-Pro-Iso-Pro-Arg</b>	5	
5		
( 2 ) 配列番号30についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号30 :		10
<b>Ser-Pro-Arg-Pro-Arg</b>	5	
5		
( 2 ) 配列番号31についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 4 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号31 :		
<b>Ser-Pro-Ile-Arg</b>	4	20
( 2 ) 配列番号32についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号32 :		
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Arg</b>	5	
5		
( 2 ) 配列番号33についての情報 :		30
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 4 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号33 :		
<b>Ser-Cys-Ile-Arg-Arg</b>	5	
5		
( 2 ) 配列番号34についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		40
( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号34 :		
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro</b>	7	
5		
( 2 ) 配列番号35についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸		50

( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号35 :	
<b>Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro</b>	7
5	
( 2 ) 配列番号36についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	10
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号36 :	
<b>Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr</b>	7
5	
( 2 ) 配列番号37についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	20
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号37 :	
<b>Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu</b>	7
5	
( 2 ) 配列番号38についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	30
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号38 :	
<b>Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro</b>	6
5	
( 2 ) 配列番号39についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	40
( xi ) 配列 : 配列番号39 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu</b>	6
5	
( 2 ) 配列番号40についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号40 :	50

**Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro**

6

5

( 2 ) 配列番号41についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号41 :

**Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg**

6

10

5

( 2 ) 配列番号42についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号42 :

**Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro**

6

20

5

( 2 ) 配列番号43についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号43 :

**Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro**

6

5

( 2 ) 配列番号44についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号44 :

**Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro**

6

5

( 2 ) 配列番号45についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号45 :

**Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro**

6

5

( 2 ) 配列番号46についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸

50

( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物  
 ( xi ) 配列 : 配列番号46 :

6

**Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp**

5

( 2 ) 配列番号47についての情報 :  
 ( i ) 配列の種類 :  
 ( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物  
 ( xi ) 配列 : 配列番号47 :

10

**Ser-His-Trp-Arg-Lys**

5

5

( 2 ) 配列番号48についての情報 :  
 ( i ) 配列の種類 :  
 ( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物  
 ( xi ) 配列 : 配列番号48 :

20

**Ser-His-Trp-Arg-Arg**

5

5

( 2 ) 配列番号49についての情報 :  
 ( i ) 配列の種類 :  
 ( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物  
 ( xi ) 配列 : 配列番号49 :

30

**Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys**

7

5

( 2 ) 配列番号50についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物  
 ( xi ) 配列 : 配列番号50 :

40

**Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro**

7

5

( 2 ) 配列番号51についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物  
 ( xi ) 配列 : 配列番号51 :

50

**Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro**

7

5

( 2 ) 配列番号52についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号52 :

10

**Leu-Pro-Phe-Arg-Glu-Arg-Pro**

7

5

( 2 ) 配列番号53についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号53 :

**Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asp-Ala**

7

20

5

( 2 ) 配列番号54についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号54 :

**Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg**

7

30

5

( 2 ) 配列番号55についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号55 :

**Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro**

7

5

( 2 ) 配列番号56についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号56 :

40

**Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys**

7

5

( 2 ) 配列番号57についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

50

( A ) 長さ : 6 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号57 :	
<b>Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-Arg</b>	6
5	
( 2 ) 配列番号58についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸	10
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号58 :	
<b>Glu-Pro-Ile-Arg-Arg</b>	5
5	
( 2 ) 配列番号59についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 5 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	20
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号59 :	
<b>Ser-His-Trp-Glu-Glu</b>	5
5	
( 2 ) 配列番号60についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	30
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号60 :	
<b>Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro</b>	8
5	
( 2 ) 配列番号61についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 11個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	40
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号61 :	
<b>Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys</b>	11
5	10
( 2 ) 配列番号62についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 11個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	50



( xi ) 配列 : 配列番号62 :		
<b>Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro</b>	11	
5 10		
( 2 ) 配列番号63についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 12個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号63 :		
<b>Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro</b>	12	10
5 10		
( 2 ) 配列番号64についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 12個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号64 :		
<b>Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser</b>	12	20
5 10		
( 2 ) 配列番号65についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号65 :		
<b>Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro</b>	8	
5		30
( 2 ) 配列番号66についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 9 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号66 :		
<b>Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys</b>	9	
5		
( 2 ) 配列番号67についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号67 :		
<b>Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro</b>	8	
5		
( 2 ) 配列番号68についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		

( A ) 長さ : 10個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号68 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg</b>	10
5 10	
( 2 ) 配列番号69についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 9 個のアミノ酸	10
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号69 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro</b>	9
5	
( 2 ) 配列番号70についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 12個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	20
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号70 :	
<b>Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro</b>	12
5 10	
( 2 ) 配列番号71についての情報 :	
( i ) 配列の特徴 :	
( A ) 長さ : 15個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	30
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	
( xi ) 配列 : 配列番号71 :	
<b>Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg</b>	15
5 10 15	
( 2 ) 配列番号72についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	40
( xi ) 配列 : 配列番号72 :	
<b>Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg</b>	8
5	
( 2 ) 配列番号73についての情報 :	
( i ) 配列の種類 :	
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸	
( B ) 型 : アミノ酸	
( D ) トポロジー : 直鎖状	
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物	50

( xi ) 配列 : 配列番号73 :		
<b>Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp</b>	8	
5		
( 2 ) 配列番号74についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号74 :		10
<b>Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg</b>	8	
5		
( 2 ) 配列番号75についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号75 :		20
<b>Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg</b>	8	
5		
( 2 ) 配列番号76についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号76 :		30
<b>Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp</b>	8	
5		
( 2 ) 配列番号77についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号77 :		
<b>Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg</b>	8	40
5		
( 2 ) 配列番号78についての情報 :		
( i ) 配列の種類 :		
( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 直鎖状		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物		
( xi ) 配列 : 配列番号78 :		
<b>Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp</b>	8	
5		50

( 2 ) 配列番号79についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号79 :

**Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro**  
5

8

( 2 ) 配列番号80についての情報 :

10

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド付加物

( xi ) 配列 : 配列番号80 :

**Ser -Ser- Lys-Gln- Asp- Tyr- Arg**  
5

7

( 2 ) 配列番号81についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

20

( A ) 長さ : 42個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ プライマーTiK57 ”

( xi ) 配列 : 配列番号81 :

**CTTGGCTAGC CCTATACGTA GATCATCCAC ACAAGATTAT CG**

42

( 2 ) 配列番号82についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

30

( A ) 長さ : 32個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ プライマーTiK58 ”

( xi ) 配列 : 配列番号82 :

**CTTGGCTAGC TCCACACAAG ATTATCGTAT TG**

32

( 2 ) 配列番号83についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

40

( A ) 長さ : 32個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ プライマーTiK59 ”

( xi ) 配列 : 配列番号83 :

**GCCCTCTAGA CTATAAACAG AGACCAGTGT TC**

32

( 2 ) 配列番号84についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

50

( A ) 長さ : 83個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : 他の核酸  
 ( A ) 説明 : / desc = “ プライマー-TiK60 ”  
 ( B ) 5: 90% A 及び 3.33% の個々の C, G, T.  
 6: 90% C 及び 3.33% の個々の A, G, T.  
 7: 90% G 及び 3.33% の個々の A, C, T.  
 8: 90% T 及び 3.33% の個々の A, C, G.

10

( xi ) 配列 : 配列番号84 :  
**GTAGTTTTTC GTGGT5CA57 (C/G)TCA58 (5/8) 67 (C/G)**  
**556 (7/8) (6/7) (C/G) 58 (5/8) 7 6 (T/G) 75658 (5/8) 78**  
**(T/G) 88878 (T/G) 66 (G/C) 78 (C/G) 55885TC CACCTGTTAA TGG** 83

( 2 ) 配列番号85についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 17個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : 他の核酸  
 ( A ) 説明 : / desc = “ プライマー-TiK61 ”  
 ( xi ) 配列 : 配列番号85 :  
**AGAACAGCTG TTGCACC** 17

20

( 2 ) 配列番号86についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 19個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : 他の核酸  
 ( A ) 説明 : / desc = “ プライマー-TiK62 ”  
 ( xi ) 配列 : 配列番号86 :  
**CCGGGGA TCCACCATG** 19

30

( 2 ) 配列番号87についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 20個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : 他の核酸  
 ( A ) 説明 : / desc = “ プライマー-TiK64 ”  
 ( xi ) 配列 : 配列番号87 :  
**GCCCTCTAGA CTATAAACAG** 20

40

( 2 ) 配列番号88についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 17個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸

50

( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類：他の核酸  
 ( A ) 説明： / desc = “ プライマー-TiK66 ”  
 ( xi ) 配列：配列番号88：

17

**CTGCAGAACT GTCATTTC**

( 2 ) 配列番号89についての情報：

( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：16個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類：他の核酸  
 ( A ) 説明： / desc = “ プライマー-TiK72 ”  
 ( xi ) 配列：配列番号89：

10

**TTGAGCTTGT ACCACG**

16

( 2 ) 配列番号90についての情報：

( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：36個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類：他の核酸  
 ( A ) 説明： / desc = “ プライマー-TiK74 ”  
 ( xi ) 配列：配列番号90：

20

**CCGGGGATCC ACCATGAGAT TTCCTTCTAT TTTTAC**

36

( 2 ) 配列番号91についての情報：

( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：31個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類：他の核酸  
 ( A ) 説明： / desc = “ プライマー-TiK75 ”  
 ( xi ) 配列：配列番号91：

30

**TGGAGCTAGC TCTTTTATCC AAAGAAACAC C**

31

( 2 ) 配列番号92についての情報：

( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：85個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類：他の核酸  
 ( A ) 説明： / desc = “ プライマー-TiK76 ”  
 ( B ) 5: 90% G 及び 3.33% の個々の C, G, T.

40

6: 90% A 及び 3.33% の個々の A, G, T.

7: 90% T 及び 3.33% の個々の A, C, T.

8: 90% C 及び 3.33% の個々の A, C, G.

( xi ) 配列：配列番号92：

50

CAGCCAATGC ATACTGC655 6885776778 8755755765  
575565875T 88786775T5 57577GCATC CAATTTGCAA

## ATTAC

85

( 2 ) 配列番号93についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1115個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

10

( vi ) 起源 :

( B ) 株名 : アブシジア・レフレキサATTC 44896

( xi ) 配列 : 配列番号93 :

AAAGGCATTC TCATTTTGTG GTCTTATTGC TAGCAGTATT CATCTGCATG TGCTCTGTAT	60	
CGGGTGTGCC ACTGCAAATT GATCCACGCG ATGACAAGAG CTATGTTCCCT GAACAATATC	120	
CTTTGAAGGT GAATGGTCCT TTGCCAGAAG GTGTAAGCGT GATCCAAGGC TATTGTGAAA	180	
ACTGTACCAT GTATCCTGAA AAAAATAGTG TATCGGCATT CTCGTCATCA TCCACACAAG	240	
ATTATCGTAT TGCAAGCGAG GCAGAGATTA AGGCACACAC ATTTTACACA GCATTGTCAG	300	20
CCAATGCATA CTGCAGAACT GTCATTCCCTG GTGGTTCGATG GAGCTGTCCC CACTGTGGTG	360	
TTGCATCCAA TTTGCAAATT ACCAAGACTT TCAGCACCTT AATCACTGAT ACTAATGTCT	420	
TGGTGGCTGT TGGCGAAAAG GAGAAGACCA TCTATGTAGT TTTTCGTGGT ACAAGCTCAA	480	
TTGCAACGC CATTGCTGAC ATTGTTTTTG TACCAGTGAA TTATCCACCT GTTAATGGAG	540	
CCAAAGTACA CAAAGGATTT CTTGATAGCT ATAACGAAGT CCAGGATAAA CTTGTTGCTG	600	
AAGTCAAGGC ACAACTTGAT CGTCATCCAG GATACAAGAT CGTCGTCACT GGACATTCCT	660	
TGGGAGGTGC AACAGCTGTT CTCAGTGCAC TTGACCTTTA TCACCATGGC CATGCCAATA	720	30
TCGAAATCTA TACTCAAGGT CAGCCACGTA TAGGTACTCC AGCATTTGCA AACTATGTGA	780	
TAGGCACCAA GATTCCATAC CAACGTCTTG TCCATGAGCG TGACATTGTT CCTCACCTTC	840	
CACCTGGTGC ATTTGGTTTC TTGCATGCTG GTGAAGAGTT TTGGATCATG AAAGATAGCT	900	
CGTTGCGCGT ATGTCCAAAT GGCATTGAAA CTGACAACCTG CAGCAACTCC ATTGTTCCCT	960	
TCAGTAGTGT CATTGACCAT TTAAGCTATC TTGACATGAA CACTGGTCTC TGTTTATAAT	1020	
CTTTAGTATC ATCCACTCCT CCTCTTTAAT GCAATACTTT TTAAGATAAA TCACAAGTAT	1080	
ACTTTGTACA AAACCAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	1115	40

( 2 ) 配列番号94についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1020個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 環状

( ii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 説明 : / desc = “ 酵母発現ベクターpTiK05 ”

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : CDS

50

( B ) 位置 : 3..1020

( xi ) 配列 : 配列番号94 :

CA CAT ACA GGA ATT CAT TCA AGA ATA GTT CAA ACA AGA AGA TTA CAA	47	
His Thr Gly Ile His Ser Arg Ile Val Gln Thr Arg Arg Leu Gln		
1 5 10 15		
ACT ATC AAT TTC ATA CAC AAT ATA AAC GAC GGT ACC CGG GGA TCC ACC	95	
Thr Ile Asn Phe Ile His Asn Ile Asn Asp Gly Thr Arg Gly Ser Thr		
20 25 30		
ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG	143	
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu		
35 40 45		10
GCT AGC TCC ACA CAA GAT TAT CGT ATT GCA AGC GAG GCA GAG ATT AAG	191	
Ala Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys		
50 55 60		
GCA CAC ACA TTT TAC ACA GCA TTG TCA GCC AAT GCA TAC TGC AGA ACT	239	
Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr		
65 70 75		
GTC ATT CCT GGT GGT CGA TGG AGC TGT CCC CAC TGT GGT GTT GCA TCC	287	
Val Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala Ser		
80 85 90 95		
AAT TTG CAA ATT ACC AAG ACT TTC AGC ACC TTA ATC ACT GAT ACT AAT	335	20
Asn Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn		
100 105 110		
GTC TTG GTG GCT GTT GGC GAA AAG GTT GTT TTT GTA CCA GTG AAT TAT	383	
Val Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Val Val Phe Val Pro Val Asn Tyr		
115 120 125		



CCA CCT GTT AAT GGA GCC AAA GTA CAC AAA GGA TTT CTT GAT AGC TAT	431	
Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly Phe Leu Asp Ser Tyr		
130 135 140		
AAC GAA GTC CAG GAT AAA CTT GTT GCT GAA GTC AAG GCA CAA CTT GAT	479	
Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val Lys Ala Gln Leu Asp		
145 150 155		
CGT CAT CCA GGA TAC AAG ATC GTC GTC ACT GGA CAT TCC TTG GGA GGT	527	
Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly His Ser Leu Gly Gly		
160 165 170 175		
GCA ACA GCT GTT CTC AGT GCA CTT GAC CTT TAT CAC CAT GGC CAT GCC	575	10
Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr His His Gly His Ala		
180 185 190		
AAT ATC GAA ATC TAT ACT CAA GGT CAG CCA CGT ATA GGT ACT CCA GCA	623	
Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg Ile Gly Thr Pro Ala		
195 200 205		
TTT GCA AAC TAT GTG ATT GGC ACC AAG ATT CCA TAC CAA CGT CTT GTC	671	
Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro Tyr Gln Arg Leu Val		
210 215 220		
CAT GAG CGT GAC ATT GTT CCT CAC CTT CCA CCT GGT GCA TTT GGT TTC	719	
His Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro Gly Ala Phe Gly Phe		20
225 230 235		
TTG CAT GCT GGT GAA GAG TTT TGG ATC ATG AAA GAT AGC TCG TTG CGC	767	
Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys Asp Ser Ser Leu Arg		
240 245 250 255		
GTA TGT CCA AAT GGC ATT GAA ACT GAC AAC TGC AGC AAC TCC ATT GTT	815	
Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys Ser Asn Ser Ile Val		
260 265 270		
CCC TTC ACT AGT GTC ATT GAC CAT TTA AGC TAT CTT GAC ATG AAC ACT	863	
Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr Leu Asp Met Asn Thr		
275 280 285		
GGT CTC TGT TTA TAG TCT AGA GGG CCG CAT GAT GTA ATT AGT TAT GTC	911	30
Gly Leu Cys Leu * Ser Arg Gly Pro His Asp Val Ile Ser Tyr Val		
290 295 300		
ACG CTT ACA TTC ACG CCC TCC CCC CAC ATC CGC TCT AAC CGA AAA GGA	959	
Thr Leu Thr Phe Thr Pro Ser Pro His Ile Arg Ser Asn Arg Lys Gly		
305 310 315		
AGG AGT TAG ACA ACC TGA AGT CTA GGT CCC TAT TTA TTT TTT TAT AGT	1007	
Arg Ser * Thr Thr * Ser Leu Gly Pro Tyr Leu Phe Phe Tyr Ser		
320 325 330 335		

TAT GTT AGT ATT A  
Tyr Val Ser Ile

1020

( 2 ) 配列番号95についての情報 :

40

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 339個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( xi ) 配列 : 配列番号95 :

His Thr Gly Ile His Ser Arg Ile Val Gln Thr Arg Arg Leu Gln Thr  
 1 5 10 15  
 Ile Asn Phe Ile His Asn Ile Asn Asp Gly Thr Arg Gly Ser Thr Met  
 20 25 30  
 Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu Ala  
 35 40 45  
 Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys Ala  
 50 55 60  
 His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr Val  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn Val  
 100 105 110  
 Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Val Val Phe Val Pro Val Asn Tyr Pro  
 115 120 125  
 Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly Phe Leu Asp Ser Tyr Asn  
 130 135 140  
 Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val Lys Ala Gln Leu Asp Arg  
 145 150 155 160  
 His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala  
 165 170 175  
 Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr His His Gly His Ala Asn  
 180 185 190  
 Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg Ile Gly Thr Pro Ala Phe  
 195 200 205  
 Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro Tyr Gln Arg Leu Val His  
 210 215 220  
 Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro Gly Ala Phe Gly Phe Leu  
 225 230 235 240  
 His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys Asp Ser Ser Leu Arg Val  
 245 250 255  
 Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro  
 260 265 270  
 Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr Leu Asp Met Asn Thr Gly  
 275 280 285  
 Leu Cys Leu \* Ser Arg Gly Pro His Asp Val Ile Ser Tyr Val Thr  
 290 295 300  
 Leu Thr Phe Thr Pro Ser Pro His Ile Arg Ser Asn Arg Lys Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Ser \* Thr Thr \* Ser Leu Gly Pro Tyr Leu Phe Phe Tyr Ser Tyr  
 325 330 335

Val Ser Ile

( 2 ) 配列番号96についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 255個の塩基対

10

20

30

40

50

( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
 ( vi ) 起源 :  
 ( A ) 生物名 : MFdシグナル配列 ( 対合因子 )

( B ) 株名 : 酵母株 YPH499

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : sig - ペプチド

( B ) 位置 : 1..255

10

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : CDS

( B ) 位置 : 1.255

( xi ) 配列 : 配列番号96 :

ATG AGA TTT CCT TCT ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCT GCT TCC TCC	48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	
1 5 10 15	

GCT TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACC ACT GAA GAT GAA ACG GCT CAA	96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	
20 25 30	

20

ATT CCA GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC CTT GAT TTA GAA GGT GAT TTC	144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
35 40 45	

GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC TCC ACC AAT AAC GGT TTA TTG	192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	
50 55 60	

TTT ATC AAT ACT ACT ATT GCC TCC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGT GTT	240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	
65 70 75 80	

TCT TTG GAT AAA AGA		
Ser Leu Asp Lys Arg	255	30
85		

( 2 ) 配列番号97についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 85個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( xi ) 配列 : 配列番号97 :

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
 20 25 30  
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
 35 40 45  
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
 50 55 60  
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Asp Lys Arg  
 85

10

( 2 ) 配列番号98についての情報 :

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : ? 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( xi ) 配列 : 配列番号98 :

20

MRFYSVVSLAVSICTYGVSGVPVQIGPRDKSYVPEQ YPLKMNGLPEGVSVIQGYCENCTMYPEENS-  
 VTALSSSKQDYRTASETEIQAHTFYTALSANAYCRNVIPGGRWSCPHCDVTSNLKITKTFTSTLITDTNVAVAV  
 GEKEKTIYIVFRGTNSIRNAIADIVFVPVDYPPVDGAKVHKGFILDSYNEVDQLVAEVKKQLDNHHPGYKIVVA  
 GHSLGGATAVLCALDLYHHGHHNIEIYTQGGPRVGTAPAFKYVIGTKIPYQRLVNERDIVPHLPFGAFGLHA  
 GEEFWIMKDSSLRVCNPIETDDCSNSIVPFTSVIDHLSYLDMNTGLCL\*

( 2 ) 配列番号99についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 864個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

30

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( vi ) 起源 :

( B ) 株名 : シュードモナスsp.

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : mat - ペプチド

( B ) 位置 : 1..864

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : CDS

( B ) 位置 : 1..864

( xi ) 配列 : 配列番号99 :

40

TTC GGC TCC TCG AAC TAC ACC AAG ACC CAG TAC CCG ATC GTC CTG ACC Phe Gly Ser Ser Asn Tyr Thr Lys Thr Gln Tyr Pro Ile Val Leu Thr 1 5 10 15	48	
CAC GGC ATG CTC GGT TTC GAC AGC CTG CTT GGA GTC GAC TAC TGG TAC His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Leu Leu Gly Val Asp Tyr Trp Tyr 20 25 30	96	
GGC ATT CCC TCA GCC CTG CGT AAA GAC GGC GCC ACC GTC TAC GTC ACC Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Lys Asp Gly Ala Thr Val Tyr Val Thr 35 40 45	144	
GAA GTC AGC CAG CTC GAC ACC TCC GAA GCC CGA GGT GAG CAA CTG CTG Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Ala Arg Gly Glu Gln Leu Leu 50 55 60	192	10
ACC CAA GTC GAG GAA ATC GTG GCC ATC AGC GGC AAG CCC AAG GTC AAC Thr Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Ile Ser Gly Lys Pro Lys Val Asn 65 70 75 80	240	
CTG TTC GGC CAC AGC CAT GGC GGG CCT ACC ATC CGC TAC GTT GCC GCC Leu Phe Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala 85 90 95	288	
GTG CGC CCG GAT CTG GTC GCC TCG GTC ACC AGC ATT GGC GCG CCG CAC Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Ile Gly Ala Pro His 100 105 110	336	
AAG GGT TCG GCC ACC GCC GAC TTC ATC CGC CAG GTG CCG GAA GGA TCG Lys Gly Ser Ala Thr Ala Asp Phe Ile Arg Gln Val Pro Glu Gly Ser 115 120 125	384	20
GCC AGC GAA GCG ATT CTG GCC GGG ATC GTC AAT GGT CTG GGT GCG CTG Ala Ser Glu Ala Ile Leu Ala Gly Ile Val Asn Gly Leu Gly Ala Leu 130 135 140	432	
ATC AAC TTC CTT TCC GGC AGC AGT TCG GAC ACC CCA CAG AAC TCG CTG Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Pro Gln Asn Ser Leu 145 150 155 160	480	
GGC ACG CTG GAG TCA CTG AAC TCC GAA GGC GCC GCA CGG TTT AAC GCC Gly Thr Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala 165 170 175	528	30
CGC TTC CCC CAG GGG GTA CCA ACC AGC GCC TGC GGC GAG GGC GAT TAC Arg Phe Pro Gln Gly Val Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Asp Tyr 180 185 190	576	
GTG GTC AAT GGC GTG CGC TAT TAC TCC TGG AGG GGC ACC AGC CCG CTG Val Val Asn Gly Val Arg Tyr Tyr Ser Trp Arg Gly Thr Ser Pro Leu 195 200 205	624	
ACC AAC GTA CTC GAC CCC TCC GAC CTG CTG CTC GGC GCC ACC TCC CTG Thr Asn Val Leu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Leu Gly Ala Thr Ser Leu 210 215 220	672	
ACC TTC GGT TTC GAG GCC AAC GAT GGT CTG GTC GGA CGC TGC AGC TCC Thr Phe Gly Phe Glu Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Arg Cys Ser Ser 225 230 235 240	720	40
CGG CTG GGT ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC Arg Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp 245 250 255	768	
GAG GTG AAC CAG ACC TTC GGG CTG ACC AGC ATC TTC GAG ACC AGC CCG Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ser Pro 260 265 270	816	
GTA TCG GTC TAT CGC CAG CAA GCC AAT CGC CTG AAG AAC GCC GGG CTC Val Ser Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Gly Leu 275 280 285	864	

( 2 ) 配列番号100についての情報 :

50

( i ) 配列の種類 :

( A ) 長さ : 288個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジ : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( xi ) 配列 : 配列番号100 :

Phe	Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr	Thr	Lys	Thr	Gln	Tyr	Pro	Ile	Val	Leu	Thr	
1				5					10					15		
His	Gly	Met	Leu	Gly	Phe	Asp	Ser	Leu	Leu	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Ile	Pro	Ser	Ala	Leu	Arg	Lys	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Thr	
		35					40					45				
Glu	Val	Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Ser	Glu	Ala	Arg	Gly	Glu	Gln	Leu	Leu	
	50					55					60					
Thr	Gln	Val	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Ile	Ser	Gly	Lys	Pro	Lys	Val	Asn	
	65				70					75					80	
Leu	Phe	Gly	His	Ser	His	Gly	Gly	Pro	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Ala	Ala	
				85					90					95		
Val	Arg	Pro	Asp	Leu	Val	Ala	Ser	Val	Thr	Ser	Ile	Gly	Ala	Pro	His	
			100					105					110			
Lys	Gly	Ser	Ala	Thr	Ala	Asp	Phe	Ile	Arg	Gln	Val	Pro	Glu	Gly	Ser	
		115					120					125				
Ala	Ser	Glu	Ala	Ile	Leu	Ala	Gly	Ile	Val	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Leu	
	130					135					140					
Ile	Asn	Phe	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Thr	Pro	Gln	Asn	Ser	Leu	
	145				150					155					160	
Gly	Thr	Leu	Glu	Ser	Leu	Asn	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Ala	
			165						170					175		
Arg	Phe	Pro	Gln	Gly	Val	Pro	Thr	Ser	Ala	Cys	Gly	Glu	Gly	Asp	Tyr	
			180					185					190			
Val	Val	Asn	Gly	Val	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Arg	Gly	Thr	Ser	Pro	Leu	
		195						200				205				
Thr	Asn	Val	Leu	Asp	Pro	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	
	210					215					220					
Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Ala	Asn	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	
	225				230					235				240		
Arg	Leu	Gly	Met	Val	Ile	Arg	Asp	Asn	Tyr	Arg	Met	Asn	His	Leu	Asp	
			245						250					255		
Glu	Val	Asn	Gln	Thr	Phe	Gly	Leu	Thr	Ser	Ile	Phe	Glu	Thr	Ser	Pro	
		260						265					270			
Val	Ser	Val	Tyr	Arg	Gln	Gln	Ala	Asn	Arg	Leu	Lys	Asn	Ala	Gly	Leu	
		275					280					285				

10

20

30

40



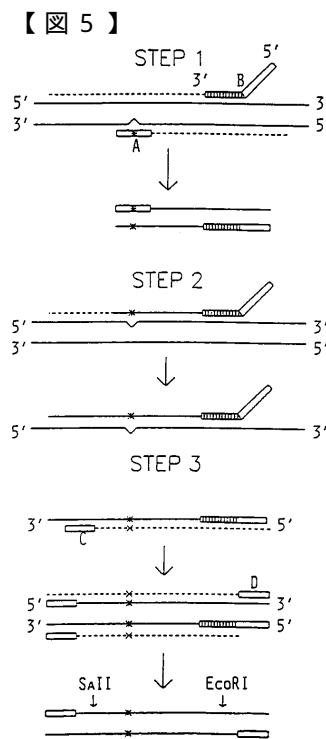


Fig. 5

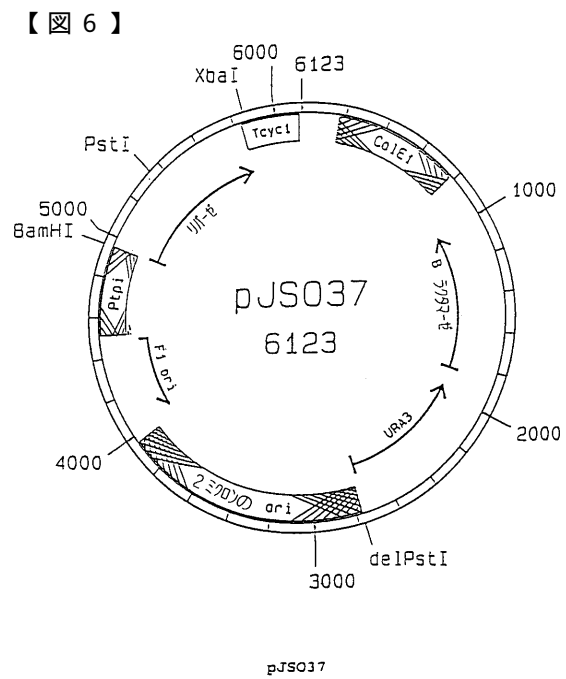


Fig. 6

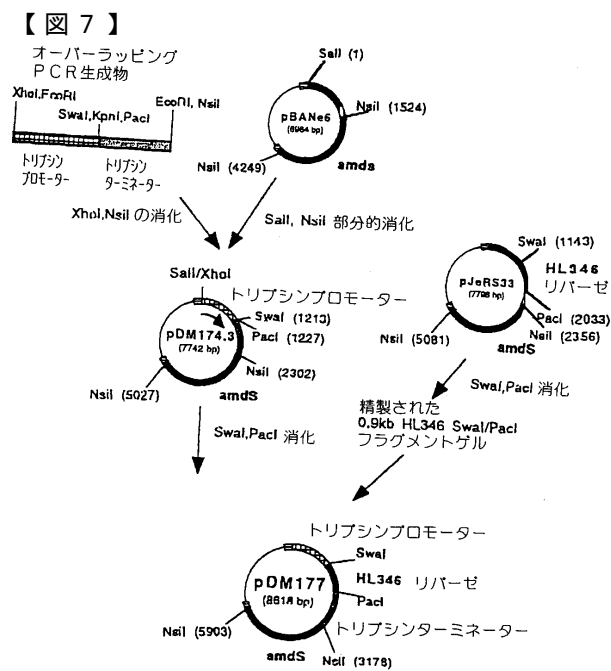


Fig. 7

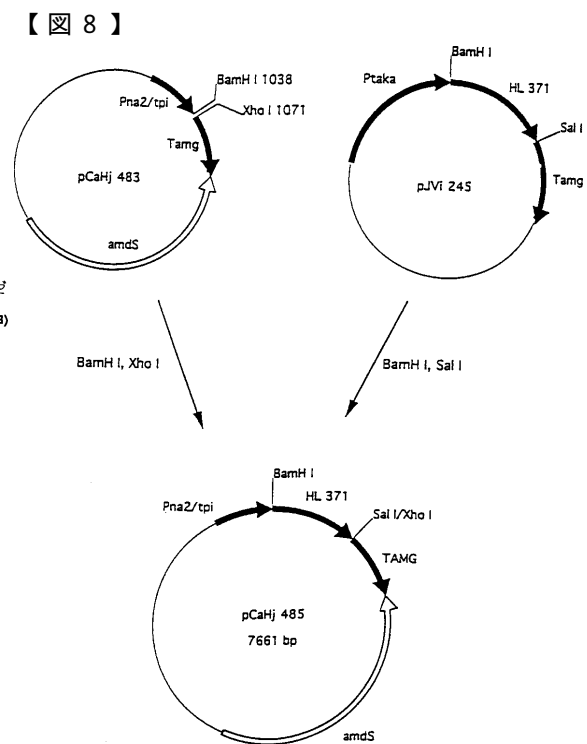


Fig. 8



## 長さ：1115

Fig. 9

[illegible]

Fig. 10

Fig. 10 (cont.)

[illegible]

Fig. 10 (cont.)

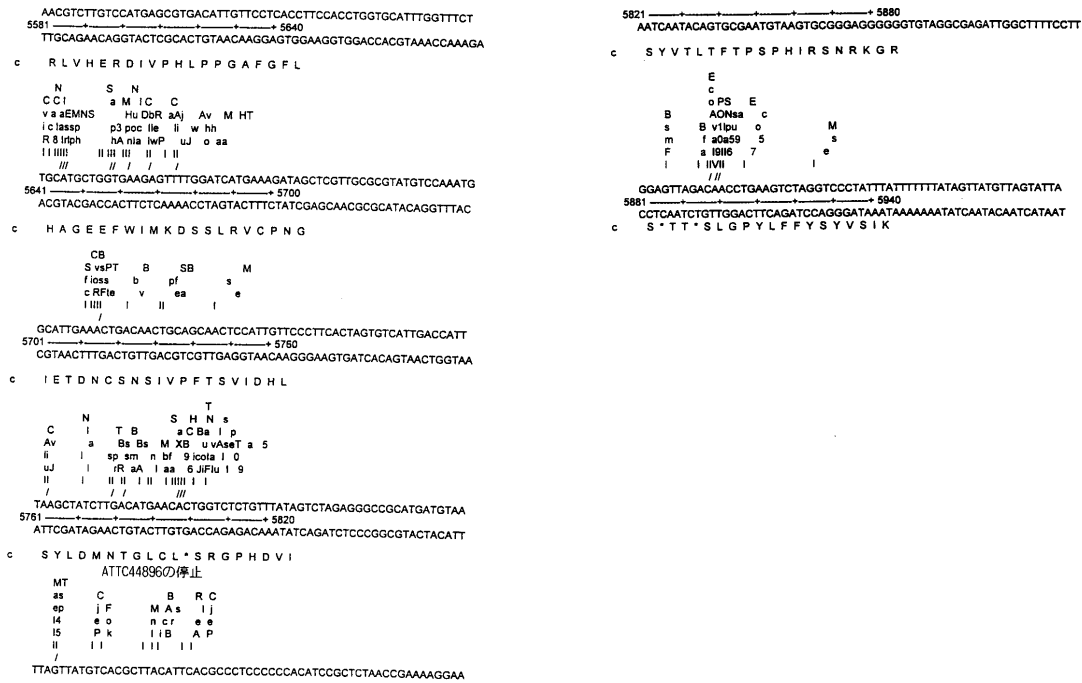


Fig. 10 (cont.)

Fig. 10 (cont.)

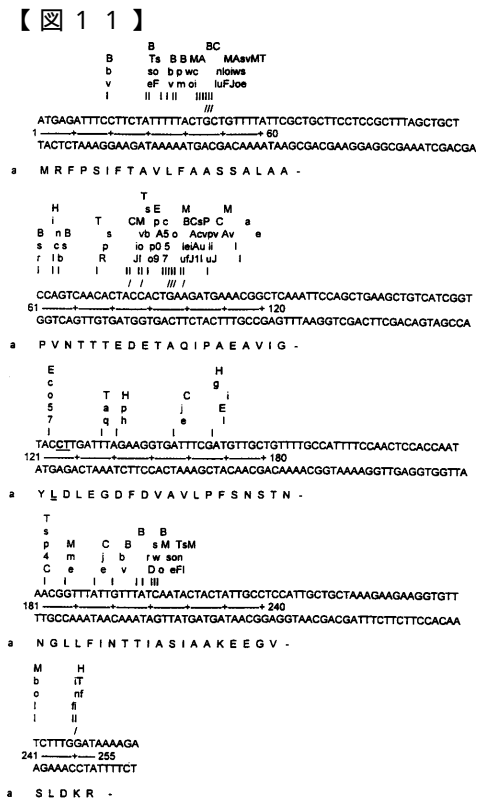


Fig. 11

## フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/011,627  
 (32)優先日 平成8年2月14日(1996.2.14)  
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 0374/96  
 (32)優先日 平成8年4月1日(1996.4.1)  
 (33)優先権主張国 デンマーク(DK)
- (31)優先権主張番号 60/016,754  
 (32)優先日 平成8年5月7日(1996.5.7)  
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (72)発明者 オケルス, ジェンス シゲルデ  
 デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
 ィーゼルスカブ
- (72)発明者 スベネセン, アラン  
 デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
 ィーゼルスカブ
- (72)発明者 ボエルシェ, キム  
 デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
 ィーゼルスカブ
- (72)発明者 デレルセン, マリアンヌ  
 デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
 ィーゼルスカブ
- (72)発明者 パテカル, ジェムコン アナン  
 デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
 ィーゼルスカブ
- (72)発明者 ペテルセン, ドエルテ アーベイ  
 デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
 ィーゼルスカブ
- (72)発明者 ロイヤー, ジョン シー.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 1 6, デイビス, ドルー アベニュー 1 4 4 5, ノボ  
 ノルディスク バイオテック インコーポレイティド
- (72)発明者 クレッツチェイメル, ティウス  
 デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
 ィーゼルスカブ

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 特開平01-157383(JP, A)  
 国際公開第94/025577(WO, A1)  
 特表平06-501153(JP, A)  
 特開平06-113845(JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 90  
 BIOSIS/WPIDS(STN)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 SwissProt/PIR/Geneseq  
 PubMed