

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4668426号
(P4668426)

(45) 発行日 平成23年4月13日(2011.4.13)

(24) 登録日 平成23年1月21日(2011.1.21)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 1

請求項の数 12 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-609551 (P2000-609551)
 (86) (22) 出願日 平成12年3月28日 (2000.3.28)
 (65) 公表番号 特表2002-540785 (P2002-540785A)
 (43) 公表日 平成14年12月3日 (2002.12.3)
 (86) 國際出願番号 PCT/DK2000/000148
 (87) 國際公開番号 WO2000/060059
 (87) 國際公開日 平成12年10月12日 (2000.10.12)
 審査請求日 平成19年3月27日 (2007.3.27)
 (31) 優先権主張番号 PA 1999 00437
 (32) 優先日 平成11年3月30日 (1999.3.30)
 (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ブ
 デンマーク国, デーコー-2880 バグ
 スバエルト, クロシェイバイ 36
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
 (74) 代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74) 代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也
 (74) 代理人 100081330
 弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α -アミラーゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L + G 1 0 7 A , G 1 0 7 A , T 4 9 V + G 1 0 7 A , T 4 9 Y + G 1 0 7 A , T 4 9 N + G 1 0 7 A , T 4 9 I + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 S + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 T + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 F + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 L + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 I + G 1 0 7 A 及び T 4 9 L + A 5 2 V + G 1 0 7 A からなる群から選択される変異を含む、親 Termamyl (登録商標) 様 - アミラーゼの変異体であって、

(a) 前記変異体が - アミラーゼ活性を有し、そして

(b) 各々の変異が配列番号：4 のアミノ酸配列を有する親 Termamyl (登録商標) 様 - アミラーゼのアミノ酸配列の変異に対応する変異体。

【請求項 2】

親 Termamyl (登録商標) 様 - アミラーゼが、バチルス (Bacillus) 属由来である、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 3】

親 Termamyl (登録商標) 様 - アミラーゼが、バチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) 由来である、請求項 2 に記載の変異体。

【請求項 4】

前記変異体が、親 Termamyl (登録商標) 様 - アミラーゼと比べて、分枝点に

近いオリゴサッカライド基質を開裂する能力が低い請求項1～3のいずれかに記載の変異体。

【請求項5】

親Termamyl（登録商標）様 - アミラーゼに対して、改良された基質特異性及び/又は改良された比活性を更に示す請求項1～4のいずれかに記載の変異体。

【請求項6】

親Termamyl（登録商標）様 - アミラーゼが配列番号：4及び配列番号：6のハイブリッドTermamyl（登録商標）様 - アミラーゼである請求項1～5のいずれかに記載の変異体。

【請求項7】

前記親ハイブリッドTermamyl（登録商標）様 - アミラーゼが、配列番号：4に示すB.リケニホルミス（*B. licheniformis*） - アミラーゼの445C - 末端アミノ酸残基及び配列番号：6に示すB.アミロリクエファシエンス（*B. amyloliquefaciens*）由来の - アミラーゼの37N - 末端アミノ酸残基を含むハイブリッド - アミラーゼである請求項6に記載の変異体。

【請求項8】

請求項1～7のいずれかに記載の - アミラーゼ変異体をコードするDNA配列を含むDNA構成物。

【請求項9】

請求項8に記載のDNA構成物を有する組換え発現ベクター。

10

【請求項10】

請求項8に記載のDNA構成物又は請求項9に記載のベクターで形質転換された細胞。

【請求項11】

細菌、真菌、グラム陽性細菌、バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）、バチルス・リケニホルミス（*Bacillus licheniformis*）、バチルス・レントウス（*Bacillus lentus*）、バチルス・ブレビス（*Bacillus brevis*）、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）、バチルス・アルカロフィルス（*Bacillus alkalophilus*）、バチルス・アミロリクエファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）、バチルス・コアギュランス（*Bacillus coagulans*）、バチルス・サーキュランス（*Bacillus circulans*）、バチルス・ラウトゥス（*Bacillus lautus*）又はバチルス・ツリンギエンシス（*Bacillus thuringiensis*）の中から選定される微生物である請求項10に記載の細胞。

20

【請求項12】

デンプン液化；洗剤組成物；洗濯、皿洗い及び硬質表面洗浄組成物；エタノール生産；燃料、飲用及び工業用エタノール生産；織物、布帛又は衣類のデザイニングのための、請求項1～7のいずれかに記載の - アミラーゼ変異体の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、とりわけ、親Termamyl様 - アミラーゼの新規変異体、顕著には、変化した特性、特に変異体の適用、特に工業的デンプン処理（例えばデンプン液化又は糖化）に関する有利である（親に対して）変化した開裂パターンを示す変異体に関する。

40

【0002】

発明の背景

- アミラーゼ（-1,4-グルカン-4-グルカノヒドロラーゼ、EC 3.2.1.1）はデンプン並びに他の直鎖及び分枝鎖1,4-グルコシド結合オリゴ及びポリサッカライドの加水分解を触媒する酵素のグループを構成する。

【0003】

極めて広範で多数のこの酵素の極めて重要なクラスに関する特許及び科学文献が存在する。いくつかの - アミラーゼ、例えばTermamyl様 - アミラーゼ変異体が、例えばWO90/11352, WO95/10603, WO95/26397, WO96/2

50

3 8 7 3 , W O 9 6 / 2 3 8 7 9 及び W O 9 7 / 4 1 2 1 3 から知られている。

【 0 0 0 4 】

- アミラーゼに関する現在の開示の中で、 W O 9 6 / 2 3 8 7 4 は、 B A 2 と呼ぶ T e r m a m y 1 様の - アミラーゼについての 3 次元 X 線結晶構造データを供し、それは、その中で配列番号 : 6 に示すアミノ酸配列を含む B . a m y l o l i q u e f a c i e n s - アミラーゼの 3 0 0 N 末端アミノ酸残基及びその中で配列番号 : 4 に示すアミノ酸配列を含む B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼの C 末端のアミノ酸 3 0 1 ~ 4 8 3 からなり、これにより、工業的に重要な B a c i l l u s - アミラーゼに密接に関連する（本文脈において、用語“ T e r m a m y 1 様 - アミラーゼ”の意味に包含され、とりわけ、 B . l i c h e n i f o r m i s , B . a m y l o l i q u e f a c i e n s 及び B . s t e a r o t h e r m o p h i l u s - アミラーゼを含む）。 W O 9 6 / 2 3 8 7 4 は、親 T e r m a m y 1 様 - アミラーゼの構造の分析に基づいて、その親に対して変化した特性を示す親 T e r m a m y 1 様 - アミラーゼの変異体をデザインするための方法を更に記述する。

【 0 0 0 5 】

W O 9 6 / 2 3 8 7 4 及び W O 9 7 / 4 1 2 1 3 (N o v o N o r d i s k) は、その中の配列番号 : 4 に示す配列のアミノ酸残基 V 5 4 , D 5 3 , Y 5 6 , Q 3 3 3 , G 5 7 及び A 5 2 に変異を含む変化した開裂パターンを有する T e r m a m y 1 様 - アミラーゼ変異体を開示する。

【 0 0 0 6 】

発明の簡単な開示

本発明は、 T e r m a m y 1 様 - アミラーゼの新規 - デンプン分解変異体、特に、デンプンの工業的処理（デンプン液化、糖化等）に関して有利である（親に対して）変化した開裂パターンを示す変異体に関する。

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、驚くことに、変化した特性、特に分枝点の近くで基質を開裂する改良された削減された能力を有し、更に、その中の配列番号 : 4 に示される配列のアミノ酸残基 V 5 4 , D 5 3 , Y 5 6 , Q 3 3 3 , G 5 7 及び A 5 2 に変異を含む変化した開裂パターンを有する W O 9 6 / 2 3 8 7 4 及び W O 9 7 / 4 1 2 1 3 (N o v o N o r d i s k) に開示される T e r m a m y 1 様 - アミラーゼ変異体と比較して、改良された基質特異性及び / 又は改良された比活性を有する変化した開裂パターンを有する変異体を見い出した。

【 0 0 0 8 】

本発明は、更に、本発明の変異体をコードする D N A 構成物に、本発明の変異体を含む組成物に、本発明の変異体を調製するための方法に、並びに種々の工業プロセス、例えばデンプン液化における、及び洗剤組成物、例えば洗濯、皿洗い及び硬質表面洗浄組成物；エタノール生産、例えば燃料、飲料及び工業用エタノール生産；織物、布帛又は依類のデザイジング等における、単独で又は他の - デンプン分解酵素と組み合わせての本発明の変異体及び組成物の使用に関する。

【 0 0 0 9 】

命名法

本記載及び請求の範囲において、アミノ酸残基についての慣用的な 1 文字及び 3 文字コードを用いる。引用を容易にするため、本発明の - アミラーゼ変異体は以下の命名法を用いて記述する：

もとのアミノ酸：位置：置換されるアミノ酸

この命名法によれば、例えば、位置 3 0 でのアラニンのアスパラギンへの置換は、

A 1 a 3 0 A s n 又は A 3 0 N

として示す。同じ位置でのアラニンの欠失は：

A 1 a 3 0 * 又は A 3 0 *

として示し、更なるアミノ酸残基、例えばリシンの挿入は：

10

20

30

40

50

* 30 a L y s 又は * 30 a K
として示す。

【0010】

アミノ酸残基の連続的ストレッチ、例えばアミノ酸残基 30 ~ 33 の削除は、(30 - 33) * 又は (A 30 - N 33) 又はデルタ (A 30 - N 33) として示す。

【0011】

特定の - アミラーゼが他の - アミラーゼと比べて“欠失”を含み、その位置に挿入が行われる場合、これは、位置 36 でのアスパラギン酸の挿入について：

* 36 a A s p 又は * 36 a D
として示す。

10

【0012】

複数の変異は + の印で分離され、即ち：

A 1 a 3 0 A s p + G 1 u 3 4 S e r 又は A 3 0 N + E 3 4 S

は位置 30 及び 34 で、アラニン及びグルタミン酸を各々アスパラギン及びセリンで置換する変異を示す。複数の変異は、+ の印と同じ意味で以下の通り分離され得る：

A 1 a 3 0 A s p / G 1 u 3 4 S e r 又は A 3 0 N / E 3 4 S

1 又は複数の別のアミノ酸残基を所定の位置に挿入できる場合、それは

A 3 0 N , E 又は

A 3 0 N 又は A 3 0 E

として示す。

20

【0013】

更に、改変のために適した位置がいずれの特定の改変も示唆されずにここで同定される場合、又は A 30 X の場合、その位置に存在するアミノ酸残基のかわりにいずれのアミノ酸残基も置換することができると理解される。これにより、例えば、位置 30 のアラニンの改変が言及されるが、特定されないか又は“X”として特定される場合、そのアラニンは、削除されるか、又はいずれかの他のアミノ酸、即ち R , N , D , C ; Q , E , G , H , I , L , K , M , F , P , S , T , W , Y , V のいずれか 1 つで置換され得ると理解される。

【0014】

発明の詳細な開示

30

T e r m a m y 1 様 - アミラーゼ

B a c i l l u s s p p . により生産されるいくつかの - アミラーゼはアミノ酸レベルで高度に相同意であることが公知である。例えば、(T e r m a m y 1 TMとして市販される) 配列番号：4 に示すアミノ酸配列を含む B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼは、配列番号：6 に示すアミノ酸配列を含む B . a m y l o l i q u e f a c i e n s - アミラーゼと約 89 % の相同意、及び配列番号：8 に示すアミノ酸配列を含む B . s t e a r o t h e r m o p h i l u s - アミラーゼと約 79 % の相同意であることが見い出されている。更なる相同意 - アミラーゼには、全てが W O 9 5 / 2 6 3 9 7 に詳細に記載される、B a c i l l u s s p . N C I B 1 2 2 8 9 , N C I B 1 2 5 1 2 , N C I B 1 2 5 1 3 又は D S M 9 3 7 5 の株から得られる - アミラーゼ、並びに T s u k a m o t o et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), p p. 25-31 に記載される # 7 0 7 - アミラーゼがある。

40

【0015】

なお更なる相同意 - アミラーゼには、E P 0 2 5 2 6 6 6 に記載される B . l i c h e n i f o r m i s 株 (A T C C 2 7 8 1 1) により生産される - アミラーゼ、並びに W O 9 1 / 0 0 3 5 3 及び W O 9 4 / 1 8 3 1 4 に同定される - アミラーゼがある。他の商用 T e r m a m y 1 様 B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼは O p t i t h e r m TM 及び T a k a t h e r m TM (S o l v a y から市販) 、 M a x a m y 1 TM (G i s t - b r o c a d e s / G e n e n c o r から市販) 、 S p e z y m A A TM 及び S p e z y m e D e l t a A A TM (G e n e n c o r から市販) 、及び K e i s t a s e TM

50

(Daiwaから市販)である。

【0016】

これらの-Termamyl様-アミラーゼ間に見い出される実質的な相同性のため、それらは-Termamyl-アミラーゼの同じクラス、即ち“Termamyl様-Termamyl-アミラーゼ”のクラスに属すると考えられる。

【0017】

従って、本文脈において、用語“Termamyl様-Termamyl-アミラーゼ”は、アミノ酸レベルでTermamylTM、即ち本明細書に配列番号：4で示すアミノ酸配列を有するB.licheniformis-Termamyl-アミラーゼと実質的な相同性を示す-Termamyl-アミラーゼを示すことを意図する。換言すれば、Termamyl様-Termamyl-アミラーゼは、本明細書の配列番号：2, 4, 6、又は8に示すアミノ酸配列、及びWO95/26397の配列番号：1もしくは2に又はTsukamoto et al., 1988に示すアミノ酸配列を有するか、又はi)前記アミノ酸配列の少くとも1つと少くとも60%、好ましくは少くとも70%、より好ましくは少くとも75%、更により好ましくは少くとも80%、特に少くとも85%、特に好ましくは少くとも90%、更に特により好ましくは少くとも95%の相同性、より好ましくは少くとも97%、より好ましくは少くとも99%の相同性を示し、及び/又はii)前記-Termamyl-アミラーゼの少くとも1つに対して生ずる抗体と免疫学的な交差反応を示し、及び/又はiii)本願の配列番号：1, 3, 5及び7並びにWO95/26397の配列番号：4及び5から各々明らかな先に特定される-Termamyl-アミラーゼをコードするDNA配列とハイブリダイズするDNA配列によりコードされる-Termamyl-アミラーゼである。

10

20

【0018】

特定i)に関連して、“相同性”は、いずれかの慣用的なアルゴリズムの使用により、好ましくは3.0のGAPクリエーションペナルティ及び0.1のGAPエクステンションペナルティである。GAPペナルティについてのデフォルト値を用いてGCGパッケージバージョン7.3(June 1993)からのGAPプログラムの使用により決定することができる(Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)。

【0019】

TermamylとTermamyl様-Termamyl-アミラーゼとの間の構造的アラインメントは、他のTermamyl様-Termamyl-アミラーゼにおいて等価の/対応する位置を同定するのに用いることができる。その構造アラインメントを得る1つの方法は、ギャップペナルティのデフォルト値、即ち3.0のギャップクリエーションペナルティ及び0.1のギャップエクステンションペナルティを用いて、GCGパッケージからのPileUpプログラムを用いることである。他の構造アラインメント法には、疎水性クラスター分析(Gaboriaud et al., (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155)及びリバーススレッディング(Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 pp. 142-149 (1998))がある。

30

-アミラーゼの特性ii)、即ち免疫学的交差反応は、関連するTermamyl様-Termamyl-アミラーゼの少くとも1つのエピトープに対して生じた、又はそれと反応性の抗体を用いてアッセイすることができる。モノクローナル又はポリクローナルであり得る抗体は、例えばHudson et al., Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publicationsに記載されるように、当業界で知られた方法により生産することができる。免疫学的交差反応は、当業界で知られたアッセイを用いて決定することができ、その例は、例えばHudson et al., 1989に記載されるような、Western Blotting又は放射状免疫拡散アッセイである。これに関して、各々アミノ酸配列、配列番号：2, 4, 6又は8を有する-Termamyl-アミラーゼが見い出されている。

40

【0020】

先の特性iii)に従ってTermamyl様-Termamyl-アミラーゼのキャラクタリゼーションに用いるオリゴヌクレオチドプローブは、好適には、問題の-Termamyl-アミラーゼの全部又は部分的ヌクレオチド又はアミノ酸配列に基づいて調製することができる。

【0021】

50

ハイブリダイゼーションをテストするための好適な条件は、 $5 \times SSC$ にプレソーキングし、そして 1 時間、約 40 度、20% ホルムアミド、 $5 \times Denhardt's$ 溶液、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.8、及び 50 mg の変性超音波処理化ウシ胸腺 DNA 中でプレハイブリダイズし、次に 100 mM ATP を補給した同じ溶液中で 18 時間、-40 度ハイブリダイゼーションを行い、次に、 $2 \times SSC$ 、0.2% SDS 中で 40 度 30 分（低ストリンジエンシー）、好ましくは 50（中ストリンジエンシー）、より好ましくは 65（高ストリンジエンシー）、更により好ましくは約 75（極高ストリンジエンシー）で、フィルターを 3 回、洗浄することに関する。ハイブリダイゼーション法についてより詳しくは、Sambrook et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989) に見い出すことができる。

10

【0022】

本文脈において用語“由来（から得られる）”は、問題の生物の株により生産され又は生産され得る - アミラーゼを示すばかりでなく、このような株から単離された DNA 配列によりコードされ、その DNA 配列で形質転換された宿主生物で生産される - アミラーゼも示すことを意図する。最後に、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、問題の - アミラーゼの同定特性を有する - アミラーゼを示すことを意図する。その用語は、親 - アミラーゼは、天然の - アミラーゼの 1 又は複数のアミノ酸残基の改変（挿入、置換、欠失）の結果である天然の - アミラーゼの変異体であり得ることを示すことを意図する。

【0023】

20

親ハイブリッド - アミラーゼ

親 - アミラーゼは、ハイブリッド - アミラーゼ、即ち少くとも 2 つの - アミラーゼから得られる部分的アミノ酸配列の組合せを含む - アミラーゼであり得る。

【0024】

親ハイブリッド - アミラーゼは、（先に定義されるように）アミノ酸相同性及び / 又は免疫学的交差反応性及び / 又は DNA ハイブリダイゼーションに基づき、Termamy 1 様 - アミラーゼファミリーに属すると決定することができるものであり得る。この場合、ハイブリッド - アミラーゼは、典型的には、Termamy 1 様 - アミラーゼの少くとも一部と微生物（細菌又は真菌）及び / 又は哺乳動物源の Termamy 1 様 - アミラーゼ又は非 Termamy 1 様 - アミラーゼから選択される 1 又は複数の他の - アミラーゼの 1 又は複数の部分から構成される。

30

【0025】

これにより、親ハイブリッド - アミラーゼは、少くとも 2 つの Termamy 1 様 - アミラーゼから、又は少くとも 1 の Termamy 1 様及び少くとも 1 の非 Termamy 1 様細菌 - アミラーゼから、又は少くとも 1 の Termamy 1 様及び少くとも 1 の真菌 - アミラーゼから得られる部分アミノ酸配列の組合せを含み得る。部分的アミノ酸配列をそこから得ることができる Termamy 1 様 - アミラーゼは、例えば、本明細書に言及されるこれらの特定の Termamy 1 様 - アミラーゼのいずれかであり得る。

【0026】

40

例えば、親 - アミラーゼは、*B. licheniformis* の株から得られる - アミラーゼの C 末端部分及び *B. amyloliquefaciens* の株から又は *B. stearothermophilus* の株から得られる - アミラーゼの N 末端部分を含み得る。例えば、親 - アミラーゼは、*B. licheniformis* - アミラーゼの C 末端部分の少なくとも 430 アミノ酸残基を含み得、そして例えば、a) 配列番号 : 6 に示すアミノ酸配列を有する *B. amyloliquefaciens* - アミラーゼの 37 N 末端アミノ酸残基に対応するアミノ酸セグメント及び配列番号 : 4 に示すアミノ酸配列を有する *B. licheniformis* - アミラーゼの 445 C 末端アミノ酸残基に対応するアミノ酸セグメント、又は b) 配列番号 : 8 に示すアミノ酸配列を有する *B. stearothermophilus* - アミラーゼの 68 N 末端アミノ酸

50

残基に対応するアミノ酸セグメント及び配列番号：4に示すアミノ酸配列を有するB. licheniformis - アミラーゼの415 C末端アミノ酸残基に対応するアミノ酸セグメントを含み得る。

【0027】

好ましい実施形態において、親Termamyl様 - アミラーゼは、その（成熟タンパク質の）N末端の35アミノ酸残基が配列番号：6に示すBacillus amyloliquefaciens - アミラーゼ（BAN）の成熟タンパク質のN末端33アミノ酸残基で置換されていることを除いて、配列番号：4に示すBacillus licheniformis - アミラーゼと同一のハイブリッドTermamyl様 - アミラーゼである。そのハイブリッドは、LE174と呼ぶ（配列番号：4のナンバリングを用いて）次の変異：H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264Sを更に有し得る。 10

【0028】

別の好ましい親ハイブリッド - アミラーゼは配列番号：2に示すLE429である。

【0029】

非Termamyl様 - アミラーゼは、例えば、真菌 - アミラーゼ、哺乳動物又は植物 - アミラーゼ又は細菌 - アミラーゼ（Termamyl様 - アミラーゼと異なる）であり得る。このような - アミラーゼの特定の例には、Aspergillus oryzae TAKA - アミラーゼ、A. niger 酸 - アミラーゼ、Bacillus subtilis - アミラーゼ、ブタ臍臍 - アミラーゼ及びオオムギ - アミラーゼがある。これらの - アミラーゼの全は、解明された構造を有し、それらは本明細書で引用されるような典型的なTermamyl様 - アミラーゼの構造と顕著に異なる。 20

【0030】

上述の真菌 - アミラーゼ、即ちA. niger 及びA. oryzae から得られるものは、アミノ酸レベルにおいて高度に相同意であり、一般に、 - アミラーゼの同じファミリーに属すると考えられる。Aspergillus oryzae由来の真菌 - アミラーゼは商標FungemylTMで市販されている。

【0031】

更に、Termamyl様 - アミラーゼの特定の変異体（本発明の変異体）が、特定のTermamyl様 - アミラーゼのアミノ酸配列中の特定のアミノ酸残基の改変（例えば欠失又は置換）を引用することにより慣用的な様式で、言及される場合、（各々のアミノ酸配列間の最も可能なアミノ酸配列アラインメントから決定して）等価な位置で改変された別のTermamyl様 - アミラーゼの変異体がそれにより包含されると理解される。 30

【0032】

本発明の変異体の好ましい実施形態は、（親Termamyl様 - アミラーゼとして）B. licheniformis - アミラーゼ由来のもの、例えば上述のものの1つ、例えば配列番号：4に示すアミノ酸配列を有するB. licheniformis - アミラーゼである。 40

【0033】

本発明の変異体の作製

問題の変異体の作製は、その変異体をコードするDNA配列を含む微生物を、その変異体を生産するために資する条件下で培養することにより行うことができる。次にその変異体は、得られた培養プロセスから回収することができる。これは、以下に更に詳細に記載される。

【0034】

特性の変化

以下に、本発明の変異体に存在し得る変異、及びそれから生じ得る（親Termamyl様 - アミラーゼのものに対する）特性の要求される変化の間の関係を議論する。 50

【0035】

第1の態様において、本発明は、W13, G48, T49, S50, Q51, A52, D53, V54, G57, G107, G108, A111, S168, M197の群から選択される1又は複数の位置に変異を含む、親Termamyl様 - アミラーゼの変異体であって、

(a) 前記変異が、独立して、
 (i) 前記位置を占有するアミノ酸の下流へのアミノ酸の挿入、
 (ii) 前記位置を占有するアミノ酸の欠失、又は
 (iii) 前記位置を占有するアミノ酸の異なるアミノ酸での置換

であり、

(b) 前記変異体が - アミラーゼ活性を有し、そして

(c) 各々の位置が配列番号：4のアミノ酸配列を有する親Termamyl様 - アミラーゼのアミノ酸配列の位置に対応する変異体に関する。

【0036】

好みしい実施形態において、上述の本発明の変異体は、配列番号：4に示すアミノ酸配列中で、次の変異：

V54N, A52S, A52S + V54N, T49L, T49 + G107A, A52S + V54N + T49L + G107A, A52S + V54N + T49L, G107A, Q51R, Q51R + A52S, A52N；又は

T49F + G107A, T49V + G107A, T49D + G107A, T49Y + G107A, T49S + G107A, T49N + G107A, T49I + G107A, T49L + A52S + G107A, T49L + A52T + G107A, T49L + A52F + G107A, T49L + A52L + G107A, T49L + A52I + G107A, T49L + A52V + G107A；又は
 T49V, T49I, T49D, T49N, T49S, T49Y, T49F, T49W, T49M, T49E, T49Q, T49K, T49R, A52T, A52L, A52I, A52V, A52M, A52F, A52Y, A52W, V54M, G107V, G07I, G107L, G107C

の少くとも1つに対応する位置での変異を含む。

【0037】

好みしい実施形態において、本発明の変異体は、配列番号：4に示すアミノ酸配列中で、次の変異：

W13F, L, I, V, Y, A；

G48A, V, S, T, I, L；

*48aD又は*48aY(即ちD又はYの挿入)；

T49X；

*49aX(即ちいずれかのアミノ酸残基の挿入)

S50X, 特にD, Y, L, T, V, I；

Q51R, K；

A52X, 特にA52S, N, T, F, L, I, V；

D53E, Q, Y, I, N, S, T, V, L；

V54X, 特にV54I, N, W, Y, F, L；

G57S, A, V, L, I, F, Y, T；

G107X, 特にG107A, V, S, T, I, L, C；

G108X, 特にG108A, V, S, T, I, L；

A111V, I, L；

S168Y；

M197X, 特にY, F, L, I, T, A, G.

の少くとも1つに対応する位置での変異を含む。

10

20

30

40

50

【0038】

好ましい実施形態において、本発明の変異体は、配列番号：4に示すアミノ酸配列中で、次の変異：

T 4 9 X + A 5 2 X + V 5 4 N / I / L / Y / F / W + G 1 0 7 A

に対応する変異を含み、そして更にG 1 0 8 Aを含み得る。

【0039】

好ましい実施形態において、本発明の変異体は、配列番号：4に示すアミノ酸配列中で、次の変異：

T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

T 4 9 L + G 1 0 7 A + V 5 4 I ;

T 4 9 I + G 1 0 7 A + V 5 4 I ;

A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + V 5 4 I + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

A 5 2 T + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + V 5 4 I + T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

T 4 9 L + G 1 0 8 A ;

T 4 9 I + G 1 0 8 A ;

T 4 9 L + G 1 0 8 A + V 5 4 I ;

T 4 9 I + G 1 0 8 A + V 5 4 I .

に対応する少くとも1つの変異を含む。

【0040】

上述の本発明の変異体の全ては、変化した特性（増加又は減少した特性を意味する）、特に以下の親 - アミラーゼに対する特性：分枝点の近くで基質を開裂する能力の減少、改良された基質特異性及び/又は改良された比活性、変化した基質結合、変化した熱安定性、変化したpH/活性プロフィール、変化したpH/安定性プロフィール、酸化に対する変化した安定性、変化したCa²⁺依存性の少くとも1つを有する。

【0041】

安定性

本発明の文脈において、変化した安定性、特に改良された安定性（即ちより高い又は低い）を、特に低いpH（即ちpH 4 ~ 6）で行うことに関して重要な（アミノ酸置換及び/又は欠失を含む）変異には、上記“特性の変化”セクションに列記した変異のいずれか及び後述の変異体がある。

【0042】

（B A N、即ち配列番号：6のナンバリングを用いて）次の変異体：Q 3 6 0 A , K ; N 1 0 2 A , N 3 2 6 A , L , N 1 9 0 G , N 1 9 0 K ; Y 2 6 2 A , K , E もpH安定性についてテストした。好ましい親 - アミラーゼは、上述のB A Zであり得る。pH安定性は“材料及び方法”セクションに記載されるように決定した。

【0043】

Ca²⁺安定性

変化したCa²⁺安定性は、Ca²⁺枯渇下での酵素の安定性が改良されている、即ちより高い又はより低い安定性を意味する。本発明の文脈において、変化したCa²⁺安定性、特に改良されたCa²⁺安定性、即ちより高い又はより低い安定性を、特に低いpH（即ちpH 4 ~ 6）で達成することに関して重要な（アミノ酸置換を含む）変異には、上述の“特性の変化”に列記される変異のいずれかがある。

【0044】

比活性

10

20

30

40

50

本発明の更なる態様において、変化した比活性、特に増加又は減少した比活性を、特に 60 ~ 100 、好ましくは 70 ~ 95 、特に 80 ~ 90 の温度で示す変異体を得ることに關して重要な変異には、上述の“特性の変化”セクションに列記される変異のいずれかがある。 L E 174 及び L E 429 の比活性は、“材料及び方法”セクションに記載される Phadebas (登録商標) アッセイを用いて、16,000NU/mg と決定された。

【 0045 】

開裂パターンの変化

デンプン液化過程において、(慣用的な Termamyl 様 - アミラーゼのように) より短い分枝したオリゴサッカライドを形成する - アミラーゼより、長く分枝したオリゴサッカライドにデンプン分子を分解することができる - アミラーゼを用いることが要求される。短く分枝したオリゴサッカライド(パノース前駆体)は、液化過程において - アミラーゼ処理の前に、又は糖化アミログルコシダーゼ(グルコアミラーゼ)と同時に、又は糖化アミログルコシダーゼ(グルコアミラーゼ)を加える前に用いられる。プルラナーゼにより満足いく程、加水分解されない。これにより、パノース前駆体の存在下において、グルコアミラーゼ処理後に存在する産物混合物は、有意な割合の短く分枝したいわゆる限界デキストリン、すなわち、トリサッカライドパノースを含む。

【 0046 】

以前に(米国特許第 5,234,823)、グルコアミラーゼ及びプルラナーゼで糖化する場合、液化過程から生ずる残存 - アミラーゼ活性の存在は、糖化段階の前に - アミラーゼが不活性化されないなら、グルコースのより低い収率を導き得る。この不活性化は、典型的には、糖化のために 60 に温度を下げる前に、95 で 4.7 末端の pH に調節することにより行うことができる。

【 0047 】

このグルコース収率への負の効果の理由は十分に理解されていないが、液化 - アミラーゼ(例えば B. licheniformis からの Termamyl 120L)が、アミロペクチン内の分枝点の近くの両方の側での 1,4- グリコシド結合を加水分解することにより、(プルラナーゼのための乏しい基質である)“限界デキストリン”を形成すると想定される。これらのグルコアミラーゼによるこれらの限界デキストリンの加水分解はトリサッカライドパノースの蓄積を導き、それはグルコアミラーゼによりゆっくりとしか加水分解されない。

【 0048 】

この欠点を受けない熱安定性 - アミラーゼの開発は、別個の不活性化ステップが要求されないのであろうので、有意な改良であろう。

【 0049 】

これにより、本発明の目的は、好適に改変されたデンプン分解特性を有するが、親 Termamyl 様 - アミラーゼの熱安定性を保持する変異体 - アミラーゼに到達することである。

【 0050 】

従って、本発明は、分枝点近くで基質を開裂する改良された減少した能力を有し、そして更に、改良された基質特異性及び / 又は改良された比活性を有する Termamyl 様 - アミラーゼの変異体に関する。

【 0051 】

特に関心あるものは、アミロペクチン基質を、その還元端から、その分枝点から 1 超のグルコース単位、好ましくは分枝点から 2 又は 3 超のグルコース単位で、即ち野生型 B. licheniformis - アミラーゼの使用により得られるより分枝点から更に離れた距離で開裂する変異体である。

【 0052 】

WO 96/23874 に従って、以下の変異の少くとも 1 つを含む変異体が分枝点の近くでの開裂を防ぐと予想されることがここで言及され得る。

10

20

30

40

50

【0053】

V 5 4 L , I , F , Y , W , R , K , H , E , Q ;

D 5 3 L , I , F , Y , W ;

Y 5 6 W

Q 3 3 3 W ;

G 5 7 、全ての可能なアミノ酸残基；

A 5 2 , A より長いアミノ酸残基、例えば A 5 2 W , Y , L , F , I 分枝点近くで基質を開裂する改良された減少した能力を有し、そして改良された基質特異性及び / 又は改良された比活性を有する本発明による変異体を得ることに関連する特に関心ある変異体は、B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼ、配列番号：4 中の次の位置：

10

H 1 5 6 , A 1 8 1 , N 1 9 0 , A 2 0 9 , Q 2 6 4 及び I 2 0 1

に突然変異を含む。

【0054】

用いることができるは以下に特に言及される T e r m a m y 1 様 - アミラーゼだけではないことが強調されるべきである。他の商用 T e r m a m y 1 様 - アミラーゼも用いることができる。このような - アミラーゼの非排他的リストは次の通りである： E P 0 2 5 2 6 6 6 に記載される B . l i c h e n i f o r m i s 株 (A T C C 2 7 8 1 1) により生産される - アミラーゼ、並びに W O 9 1 / 0 0 3 5 3 及び W O 9 4 / 1 8 3 1 4 に同定される - アミラーゼ。他の商用 T e r m a m y 1 様 B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼは O p t i t h e r m TM 及び T a k a t h e r m TM (S o l v a y から市販) 、 M a x a m y 1 TM (G i s t - b r o c a d e s / G e n e n c o r から市販) 、 S p e z y m A A TM 酵素デルタ A A TM (G e n e n c o r から市販) 、及び K e i s t a s e TM (D a i w a から市販) である。

20

【0055】

全ての T e r m a m y 1 様 - アミラーゼは、好適には、本発明の変異体を調製するための骨格として用いることができる。

【0056】

本発明の好ましい実施形態において、親 T e r m a m y 1 様 - アミラーゼは各々配列番号：4 及び配列番号：6 のハイブリッドアミラーゼである。特に、親ハイブリッド T e r m a m y 1 様 - アミラーゼは、配列番号：4 に示す B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼの 4 4 5 C 末端アミノ酸残基及び配列番号：6 に示す B . a m y l o l i que f a c i e n s 由来の成熟 - アミラーゼの 3 7 N 末端アミノ酸残基を含むハイブリッド - アミラーゼであり得、それは、好適には、(配列番号：4 のナンバリングを用いて) 次の変異：H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S を更に有し得る。このハイブリッドは L E 1 7 4 と呼ばれる。L E 1 7 4 ハイブリッドは、更なる変異 I 2 0 1 F と組み合わせて、(ナンバリングについて配列番号：4 を用いて) 次の変異：H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + I 2 0 1 F を有する親ハイブリッド T e r m a m y 1 様 - アミラーゼを形成することができる。このハイブリッド変異体は配列番号：2 に示され、以下の例に用いられ、L E 4 2 9 と呼ばれる。

30

【0057】

また、以下の変異の 1 又は複数を含む L E 1 7 4 又は L E 4 2 9 (配列番号：2) 又は配列番号：4 に示す B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼを (変異のナンバリングについて配列番号：4 を用いて) 骨格として用いることができる：

E 1 1 9 C ;

S 1 3 0 C ;

D 1 2 4 C ;

R 1 2 7 C ;

A 5 2 全ての可能なアミノ酸残基；

S 8 5 全ての可能なアミノ酸残基；

40

50

N 9 6 全ての可能なアミノ酸残基；
 V 1 2 9 全ての可能なアミノ酸残基；
 A 2 6 9 全ての可能なアミノ酸残基；
 A 3 7 8 全ての可能なアミノ酸残基；
 S 1 4 8 全ての可能なアミノ酸残基、特に S 1 4 8 N；
 E 2 1 1 全ての可能なアミノ酸残基、特に E 2 1 1 Q；
 N 1 8 8 全ての可能なアミノ酸残基、特に N 1 8 8 S, N 1 8 8 P
 M 1 9 7 全ての可能なアミノ酸残基、特に M 1 9 7 T, M 1 9 7 A, M 1 9 7 G, M 1 9
 7 I, M 1 9 7 L, M 1 9 7 Y, M 1 9 7 F, M 1 9 7 I；
 W 1 3 8 全ての可能なアミノ酸残基、特に W 1 3 8 Y； 10
 D 2 0 7 全ての可能なアミノ酸残基、特に D 2 0 7 Y；
 H 1 3 3 全ての可能なアミノ酸残基、特に H 1 3 3 Y；
 H 2 0 5 全ての可能なアミノ酸残基、特に H 2 0 5 H, H 2 0 5 C, H 2 0 5 R；
 S 1 8 7 全ての可能なアミノ酸残基、特に S 1 8 7 D；
 A 2 1 0 全ての可能なアミノ酸残基、特に A 2 1 0 S, A 2 1 0 T；
 H 4 0 5 全ての可能なアミノ酸残基、特に H 4 0 5 D；
 K 1 7 6 全ての可能なアミノ酸残基、特に K 1 7 6 R；
 F 2 7 9 全ての可能なアミノ酸残基、特に F 2 7 9 Y；
 Q 2 9 8 全ての可能なアミノ酸残基、特に Q 2 9 8 H；
 G 2 9 9 全ての可能なアミノ酸残基、特に G 2 9 9 R； 20
 L 3 0 8 全ての可能なアミノ酸残基、特に L 3 0 8 F；
 T 4 1 2 全ての可能なアミノ酸残基、特に T 4 1 2 A；
 更に、以下の変異の少くとも 1 つを含む配列番号：4 に示す B. licheniformis - アミラーゼを骨格として用いることができる：
 M 1 5 全ての可能なアミノ酸残基；
 A 3 3 全ての可能なアミノ酸残基；
 L E 1 7 4 を変異 I 2 0 1 F (配列番号：4 ナンバリング) と組み合わせることにより骨
 格として (即ち親 T e r m a m y 1 様 - アミラーゼとして) (配列番号：2 に示される)
) L E 4 2 9 を用いる場合、突然変異 / 変換、特に置換、欠失及び挿入は、本発明に従つ
 て、以下の位置の 1 又は複数で、分枝点近くで基質を開裂する削減された能力を改良する
 ため並びに基質特異性を改良するため及び / 又は比活性を改良するために行うことができる
 : W 1 3, G 4 8, T 4 9, S 5 0, Q 5 1, A 5 2, D 5 3, V 5 4, G 5 7, G 1
 0 7, G 1 0 8, A 1 1 1, S 1 6 8, M 1 9 7 (配列番号：4 のナンバリングを用いる
)。 30

【0058】

ここで、(a) 変換は、独立して、
 (i) その位置を占めるアミノ酸の下流へのアミノ酸の挿入、
 (ii) その位置を占めるアミノ酸の欠失、又は
 (iii) その位置のアミノ酸の異なるアミノ酸での置換

であり、 40
 (b) その変異体は、 - アミラーゼ活性を有し、そして (c) 各々の位置は配列番号：4 のアミノ酸配列を有する親 T e r m a m y 1 様 - アミラーゼのアミノ酸配列の位置に
 対応する。

【0059】

好ましい実施形態において、本発明の変異体は、配列番号：4 に示すアミノ酸配列中に以
 下の変異に対応する位置に少くとも 1 の変異を含む：

V 5 4 N, A 5 2 S, A 5 2 S + V 5 4 N, T 4 9 L, T 4 9 + G 1 0 7 A, A 5 2 S +
 V 5 4 N + T 4 9 L + G 1 0 7 A, A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L, G 1 0 7 A, Q 5 1
 R, Q 5 1 R + A 5 2 S, A 5 2 N；又は
 T 4 9 F + G 1 0 7 A, T 4 9 V + G 1 0 7 A, T 4 9 D + G 1 0 7 A, T 4 9 Y + G 1 50

0 7 A , T 4 9 S + G 1 0 7 A , T 4 9 N + G 1 0 7 A , T 4 9 I + G 1 0 7 A , T 4 9
 L + A 5 2 S + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 T + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 F + G
 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 L + G 1 0 7 A , T 4 9 L + A 5 2 I + G 1 0 7 A , T 4 9
 L + A 5 2 V + G 1 0 7 A ; 又は
 T 4 9 V , T 4 9 I , T 4 9 D , T 4 9 N , T 4 9 S , T 4 9 Y , T 4 9 F , T 4 9 W ,
 T 4 9 M , T 4 9 E , T 4 9 Q , T 4 9 K , T 4 9 R , A 5 2 T , A 5 2 L , A 5 2 I ,
 A 5 2 V , A 5 2 M , A 5 2 F , A 5 2 Y , A 5 2 W , V 5 4 M , G 1 0 7 V , G 0 7 I
 , G 1 0 7 L , G 1 0 7 C .

好ましい実施形態において、本発明の変異体は、配列番号：4に示すアミノ酸配列内に次の変異に対応する位置内に少くとも1の変異を含む：

10

W 1 3 F , L , I , V , Y , A ;

G 4 8 A , V , S , T , I , L ;

* 4 8 a D 又は * 4 8 a Y (即ちD又はYの挿入) ;

T 4 9 X ;

* 4 9 a X (即ちいずれかのアミノ酸残基の挿入)

S 5 0 X , 特にD , Y , L , T , V , I ;

Q 5 1 R , K ;

A 5 2 X , 特にA 5 2 S , N , T , F , L , I , V ;

D 5 3 E , Q , Y , I , N , S , T , V , L ;

V 5 4 X , 特にV 5 4 I , N , W , Y , F , L ;

20

G 5 7 S , A , V , L , I , F , Y , T ;

G 1 0 7 X , 特にG 1 0 7 A , V , S , T , I , L , C ;

G 1 0 8 X , 特にG 1 0 8 A , V , S , T , I , L ;

A 1 1 1 V , I , L ;

S 1 6 8 Y ;

M 1 9 7 X , 特にY , F , L , I , T , A , G .

好ましい実施形態において、本発明の変異体は、配列番号：4に示すアミノ酸配列内に次の変異に対応する位置に少くとも1の変異を含み：

T 4 9 X + A 5 2 X + V 5 4 N / I / L / Y / F / W + G 1 0 7 A

そして更にG 1 0 8 A を含み得る。

30

【0060】

好ましい実施形態において、本発明の変異体は、配列番号：4に示すアミノ酸配列中に次の変異に対応する位置に少くとも1の変異を含む：

T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

T 4 9 L + G 1 0 7 A + V 5 4 I ;

T 4 9 I + G 1 0 7 A + V 5 4 I ;

A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + V 5 4 I + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

40

A 5 2 T + T 4 9 L + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + V 5 4 I + T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

A 5 2 S + T 4 9 I + G 1 0 7 A ;

T 4 9 L + G 1 0 8 A ;

T 4 9 I + G 1 0 8 A ;

T 4 9 L + G 1 0 8 A + V 5 4 I ;

T 4 9 I + G 1 0 8 A + V 5 4 I .

本発明の変異体における一般的な変異

本発明の変異体は先に概説されるものに加えて、1又は複数の改変を含む。これにより、

50

改変された - アミラーゼ変異体の部分中に存在する 1 又は複数のプロリン残基が可能な天然非プロリン残基のいずれであり得る。好ましくはアラニン、グリシン、セリン、トレオニン、バリン又はロイシンである非プロリン残基で置換されることが有利であり得る。

【 0 0 6 1 】

同様に、親 - アミラーゼから改変されているアミノ酸残基中に存在する 1 又は複数のシステイン残基を、非システイン残基、例えばセリン、アラニン、トレオニン、グリシン、バリン又はロイシンで置換することが好ましい。

【 0 0 6 2 】

更に、本発明の変異体は、唯一の改変として、又は先に概説される改変のいずれかの組合せにおいて、配列番号：4 のアミノ酸フラグメント 185～209 に対応するアミノ酸フラグメント中に存在する 1 又は複数の Asp 及び / 又は Glu を各々 Asn 及び / 又は Gln で置換するように改変することができる。Termamyl 様 - アミラーゼ中で、配列番号：4 のアミノ酸フラグメント 185～209 に対応するアミノ酸フラグメント中に存在する 1 又は複数の Lys 残基の、Arg での置換も関心がある。

10

【 0 0 6 3 】

本発明は、先に概説される改変の 2 又はそれ超を組み込む変異体も包含する。

【 0 0 6 4 】

更に、本明細書に記載される変異体のいずれかにおいて点変異を導入することが有利であり得る。

【 0 0 6 5 】

20

- アミラーゼ変異体を調製するための方法

遺伝子に変異を導入するためのいくつかの方法が当業界で知られている。 - アミラーゼコーディングDNA配列のクローニングの短い議論の後、 - アミラーゼコーディング配列内の特定、部位に変異を形成するための方法が議論されよう。

【 0 0 6 6 】

- アミラーゼをコードするDNA配列のクローニング

親 - アミラーゼをコードするDNA配列は、当業界で公知の種々の方法を用いて、問題の - アミラーゼを生産するいずれかの細胞又は微生物から単離することができる。第1に、ゲノムDNA及び / 又は cDNAライブラリーは、研究すべき - アミラーゼを生産する生物からの染色体DNA又はメッセンジャーRNAを用いて作製するべきである。次にその - アミラーゼのアミノ酸配列が知られているなら、相同な、標識されたオリゴヌクレオチドプローブを合成して、問題の生物から調製したゲノムライブラリーから - アミラーゼコーディングクローニングを同定するのに用いることができる。あるいは、既知の - アミラーゼに相同な配列を含む標識されたオリゴヌクレオチドプローブは、低ストリングエンシーのハイブリダイゼーション及び洗浄条件を用いて、 - アミラーゼコーディングクローニングを同定するためのプローブとして用いることができよう。

30

【 0 0 6 7 】

- アミラーゼコーディングクローニングを同定するための更に別の方法は、ゲノムDNAのフラグメントを発現ベクター、例えばプラスミドに挿入し、得られたゲノムDNAライブラリーで - アミラーゼ陰性細菌を形質転換し、そして次に、その形質転換された細菌を - アミラーゼのための基質を含む寒天にプレートし、それにより - アミラーゼを発現するクローニングを同定することに関する。

40

【 0 0 6 8 】

あるいは、酵素をコードするDNA配列は、確立された標準的方法、例えば S.L. Beaucage 及び M.H. Caruthers (1981) に記載されるホスホロアミジト法又は Matthes et al. (1984) により記載される方法により合成的に調製することができる。ホスホロアミジト法において、オリゴヌクレオチドは、例えば自動DNAシンセサイザーにおいて合成され、精製され、アニーリングされ、連結され、そして好適なベクターにおいてクローニングされた。

【 0 0 6 9 】

50

最後に、DNA配列は、標準的な技術に従って、合成、ゲノム又はcDNA起源のフラグメント（好適なら、全体のDNA配列の種々の部分に対応するフラグメント）を連結することにより調製される、ゲノム及び合成起源の混合、合成及びcDNA起源の混合又はゲノム及びcDNA起源の混合のものであり得る。そのDNA配列は例えばU S 4, 6 8 3, 2 0 2 又はR.K. Saiki et al. (1988) に記載されるように、特定のプライマーを用いてポリメラーゼ鎖反応（PCR）により調製することもできる。

【0070】

部位特異的変異誘発

- アミラーゼコーディングDNA配列が単離され、変異のための要求される部位が同定されたら、変異は、合成オリゴヌクレオチドを用いて導入することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、要求される変異部位に隣接するヌクレオチド配列を含み；変異体又クレオチドはオリゴヌクレオチド合成の間に挿入される。特定の方法において、-アミラーゼコーディング配列に橋をかけるDNAの一本鎖ギャップが-アミラーゼ遺伝子を有するベクター内に形成される。次に、要求される変異を有する合成ヌクレオチドは一本鎖DNAの相同部分とアニーリングされる。次に残りのギャップがDNAポリメラーゼI（Klenowフラグメント）でフィル・インされ、その構成物はT4リガーゼを用いて連結される。この方法の特定の例はMorinaga et al (1984) に記載される。U S 4, 7 6 0, 0 2 5 は、そのカセットの小さな変換を行うことにより多重変異をコードするオリゴヌクレオチドの導入を開示する。しかしながら、更により多くの多様な変異をMorinagaの方法によりいずれか一回で導入することができる。これは、種々の長さの複数のオリゴヌクレオチドを導入することができるからである。

【0071】

- アミラーゼコーディングDNAに変異を導入するための別の方法は、Nelson及びLong (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り導入される要求される変異を含むPCRフラグメントの3ステップ生成に関する。PCR生成フラグメントから、その変異を有するDNAフラグメントは、制限エンドヌクレアーゼでの開裂により単離し、発現プラスミドに挿入されることができる。

【0072】

ランダム変異誘発

ランダム変異誘発は、好適には、問題の示されるアミノ酸配列に翻訳される遺伝子の少くとも3つの部分において、又は全体の遺伝子内で、局所化又は領域特異的ランダム変異誘発のいずれかとして行われる。

【0073】

親 -アミラーゼをコードするDNA配列のランダム変異誘発は、便利には、当業界で知られたいずれかの方法の使用により行うことができる。

【0074】

上記に関連して、本発明の更なる態様は、親 -アミラーゼの変異体を生成するための方法であつて、例えばその変異体は分枝点近くでオリゴサッカライド基質を開裂する削減された能力を示し、そして更に、親に対して改良された基質特異性及び/又は改良された比活性を更に示し、その方法が、

(a) 親 -アミラーゼをコードするDNA配列をランダム変異誘発にかけ、
 (b) 宿主細胞内で、ステップ(a)で得られた変異したDNA配列を発現させ、そして
 (c) 親 -アミラーゼに対して変化した特性（即ち熱安定性）を有する -アミラーゼ変異体を発現する宿主細胞についてスクリーニングすることを含む。

【0075】

上述の本発明の方法のステップ(a)は、好ましくは、ドープ化（doped）プライマーを用いて行われる。例えば、ランダム変異誘発は、好適な物理的又は化学的変異誘発剤の使用により、好適なオリゴヌクレオチドの使用により、又はDNA配列をPCR生成変

10

20

20

30

40

50

異誘発にかけることにより行うことができる。更に、ランダム変異誘発は、これらの変異誘発剤のいずれかの組合せの使用により行うことができる。変異誘発剤は、例えば、転移、トランスバージョン、反転、スクランブリング；欠失及び/又は挿入を誘導するものであり得る。

【 0 0 7 6 】

本目的のために適した物理的又は化学的変異誘発剤の例には、紫外(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(MNNNG)、O-メチルヒドロキシルアミン、亜硝酸、エチルメチルスルホネート(EMS)、重亜硫酸ナトリウム、ギ酸、及びヌクレオチドアナログがある。このような剤を用いる場合、変異誘発は、典型的には、変異誘発すべき親酵素をコードするDNA配列を選択された変異誘発剤の存在下で、変異誘発があこるのに適した条件下でインキュベートし、そして要求される特性を有する変異されたDNAについて選択することにより行われる。変異誘発をオリゴヌクレオチドの使用により行う場合、そのオリゴヌクレオチドは、変化されるべき位置でオリゴヌクレオチドの合成の間、3つの非親ヌクレオチドでドープ化又はスパイクされ得る。ドーピング又はスパイキングは、不要なアミノ酸についてのコドンが避けられるように行うことができる。ドープ化又はスパイク化オリゴヌクレオチドは、いずれかの公開されている技術により、例えばPCR、LCR又は好適ならいざれかのDNAポリメラーゼ及びリガーゼを用いて、-アミラーゼ酵素をコードするDNAに組み込むことができる。好ましくは、ドーピングは、各々の位置での野生型及び変異のパーセンテージが予め規定される“コンスタントランダムドーピング”を用いて行われる。更に、ドーピングは、特定のヌクレオチドの導入についての選択、及びこれにより1又は複数の特定のアミノ酸残基の導入についての選択に対して行うことができる。ドーピングは、例えば各々の位置への90%の野生型及び10%の変異の導入を許容するように行うことができる。ドーピングスキームの選択における更なる考慮事項は遺伝子及びタンパク質構造連続に基づく。ドーピングスキームは、とりわけ終止コドンの導入が避けられるのを確実にするDOP-Eプログラムを用いることにより行うことができる。PCR生成変異誘発を用いる場合、化学的に処理され又は非処理の親-アミラーゼをコードする遺伝子がヌクレオチドの誤った組み込みを増加させる条件下でPCRにかけられる(Deshler 1992; Levng et al., Technique, Vol. 1, 1989, pp. 11-15)。大腸菌のミューテーター株(Fowler et al., Molec. Gen. Genet., 133, 1974, pp. 179-191), S. cerevisiae又はいざれかの他の微生物を、-アミラーゼをコードするDNAのランダム変異誘発のために、例えば親グリコシラーゼを含むプラスミドをそのミューテーター株に形質転換し、そのミューテーター株をプラスミドと共に増殖させ、そしてそのミューテーター株から変換したプラスミドを単離することにより用いることができる。変異したプラスミドは、次に、発現生物に形質転換することができる。変異誘発すべきDNA配列は、慣用的には、親-アミラーゼを発現する生物から調製したゲノム又はcDNAライブラリーに存在し得る。あるいは、DNA配列は、好適なベクター、例えばプラスミド又はバクテリオファージ上に存在し得、それは、更に、変異誘発剤と共にインキュベートされるか、又はそれに露出され得る。変異誘発すべきDNAは、前記細胞のゲノム内に組み込むことにより、又は細胞内に保持されたベクター上に存在することにより宿主細胞中に存在してもよい。最後に、変異誘発すべきDNAは、単離された形態であり得る。ランダム変異誘発にかけるべきDNA配列は、好ましくは、cDNA又はゲノムDNAである。特定の場合、発現ステップb)又はスクリーニングステップc)を行う前にその変異したDNA配列を増幅するのが便利である。このような方法は当業界で知られた方法に従って行うことができ、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したオリゴヌクレオチドを用いるPCR生成増幅である。変異誘発剤とのインキュベーション又はそれへの露出の次に、変異されたDNAは、発現があこるのを許容する条件下でDNA配列を有する好適な宿主細胞を培養することにより発現される。この目的のために用いる宿主細胞は、任意にベクター上に存在する、変異されたDNA配列で形質転換されているもの、又は変異誘発処理の間に親酵素をコードするDNA配列を有するものであり得る。好適な宿主細胞の例は、次

10

20

30

40

50

のものである：グラム陽性細菌、例えば *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* or *Streptomyces murinus*; 及びグラム陰性細菌、例えば大腸菌である。その変異されたDNA配列は、その変異誘発されたDNA配列の発現を許容する機能をコードするDNA配列を更に含み得る。

10

【0077】

局所化ランダム変異誘発

ランダム変異誘発は、有利には、問題の親 - アミラーゼの一部に局在化され得る。これは、例えば酵素の特定の領域がその酵素の所定の特性のために特に重要であると同定されている場合に有利であり得、改変した場合に改良された特性を有する変異体を生ずることが予想される。このような領域は、通常、親酵素の3次構造が解明されて、酵素の機能に関連している場合に同定することができる。

【0078】

局在化又は領域特異的ランダム変異誘発は、便利には、上述のPCR生成変異誘発技術又は当業界で知られているいづれかの他の好適な技術の使用により行われる。あるいは、改変すべきDNA配列の部分をコードするDNA配列は、例えば好適なベクターへの挿入により単離することができる。その部分は、次に、先に議論した変異誘発法のいづれかの使用により変異誘発にかけられ得る。

20

【0079】

- アミラーゼ変異体を供する別 の方法

本発明の変異体を供するための別 の方法には、例えばWO95/22625 (Affymax Technologies N.V.) 及びWO96/00343 (Novo Nordisk A/S) に記載される方法を含む、当業界で知られた遺伝子シャッフリング法がある。

【0080】

30

- アミラーゼ変異体の発現

本発明によれば、上述の方法により、又は当業界で知られたいづれかの別 の方法により生産された変異体をコードするDNA配列は、酵素形態で、典型的にはプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル、及び任意にレプレッカー遺伝子又は種々のアクティベーター遺伝子をコードする調節配列を含む発現ベクターを用いて発現させることができる。

【0081】

本発明の - アミラーゼ変異体をコードするDNA配列を有する組換え発現ベクターは、便利には組換えDNA手順にかけることができるいづれかのベクターであってもよく、ベクターの選択は、しばしば、導入すべき宿主細胞に依存するであろう。これにより、ベクターは、自己複製ベクター、即ち染色体外存在物として存在するベクターであってその複製が染色体複製と独立しているもの、例えばプラスミド、バクテリオファージ又は染色体外要素、ミニクロソーム又は人工染色体であり得る。あるいはベクターは、宿主細胞に導入した時に宿主細胞ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれている染色体と一緒に複製されるものであり得る。

40

【0082】

ベクターにおいて、DNA配列は好適なプロモーター配列に作用可能に連結されるべきである。プロモーターは、選択された宿主細胞内で転写活性を示し、宿主細胞に対して同種又は異種のいづれかのタンパク質をコードする遺伝子から得られ得るいづれのDNA配列であってもよい。本発明の - アミラーゼ変異体をコードするDNA配列の転写を、特に

50

細菌細胞内で駆動するための好適なプロモーターの例は、大腸菌の lac オペロンのプロモーター、 *Streptomyces coelicolor* アガロース遺伝子 *dagA* プロモーター、 *Bacillus licheniformis* - アミラーゼ遺伝子のプロモーター (*amyL*)、 *Bacillus stearothermophilus* マルトジエニックアミラーゼ遺伝子のプロモーター (*amyM*)、 *Bacillus amyloliquefaciens* - アミラーゼのプロモーター (*amyQ*)、 *Bacillus subtilis* \times *y1A* 及び *y1B* 遺伝子のプロモーター等である。真菌宿主における転写のために、有用なプロモーターの例は、 *A. oryzae* TAK A アミラーゼ、 *Rhizomucor miehei* アスパラチックプロテイナーゼ、 *A. niger* 中性 - アミラーゼ、 *A. niger* 酸安定 - アミラーゼ、 *A. niger* グルコアミラーゼ、 *Rhizomucor miehei* リパーゼ、 *A. oryzae* アルカリプロテアーゼ、 *A. oryzae* トリオースホスフェートイソメラーゼ又は *A. nidulans* アセトアミダーゼをコードする遺伝子由来のものである。
10

【0083】

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

【0084】

ベクターは、ベクターが問題の宿主細胞内で複製するのを可能にする DNA 配列を更に含み得る。このような配列の例は、プラスミド *pUC19*, *pACYC177*, *pUB110*, *pE194*, *pAMB1* 及び *pIJ702* の複製の起点である。
20

【0085】

ベクターは、選択マーカー、例えばその産物が宿主細胞内の欠損を補う遺伝子、例えば *B. subtilis* もしくは *B. licheniformis* からの *dal* 遺伝子、又は抗生素耐性を与えるもの、例えばアンピシリン、カナマイシン、クロランフェニコール又はテトラサイクリン耐性を与えるものも含み得る。更に、ベクターは、 *Aspergillus* 選択マーカー、例えば *amds*, *argB*, *niaD* 及び *sC*、ヒグロマイシン耐性を生じてマーカーを含み得るか、又は選択は、例えば WO 91/17243 に記載されるように、同時形質転換により行うことができる。
30

【0086】

細胞内発現は、特定の場合、例えば宿主細胞として特定の細菌を用いる場合に有利であり得るが、発現は細胞外であることが一般に好ましい。一般に、本明細書に言及される。 *Bacillus* - アミラーゼは発現されたプロテアーゼの培養培地への分泌を許容するプレ領域を含む。必要に応じて、このプレ領域は、異なるプレ領域又はシグナル配列により置換され得、便利には、各々のプレ領域をコードする DNA 配列の置換により行うことができる。

【0087】

- アミラーゼ変異体、プロモーター、ターミネーター及び他の要素各々をコードする DNA 構成物を連結するため及びそれらを複製のために必要な情報を含む好適なベクターに挿入するために用いる手順は、当業者に公知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989）。
40

【0088】

上述の本発明の DNA 構成物又は発現ベクターのいずれかを含む本発明の細胞は、有利には、本発明の - アミラーゼ変異体の組換え生産において宿主細胞として用いられる。その細胞は、便利には、（1又は複数のコピーにおける）DNA 構成物を宿主染色体に組み込むことにより、変異体をコードする本発明の DNA 構成物で形質転換することができる。この組み込みは、一般に、DNA 配列が細胞内でより安定に維持されるので有利であると考えられる。DNA 構成物の宿主染色体への組み込みは、例えば相同的又は非相同的組換えにより、慣用的な方法に従って行うことができる。あるいは、その細胞は、異なる型
50

の宿主細胞と組み合わせて、上述の通り発現ベクターで形質転換することができる。

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

イースト生物は、好ましくは、*Saccharomyces* 又は *Schizosaccharomyces*、例えば *Saccharomyces cerevisiae* から選択することができる。糸状菌は、有利には、*Aspergillus* の種、例えば *Aspergillus oryzae* 又は *Aspergillus niger* に属し得る。真菌細胞は、プロトプラスト形成及びプロトプラストの形質転換、次のそれ自体知られた様式での細胞壁の再生に関する方法により形質転換することができる。 *Aspergillus* 宿主細胞の形質転換のための好適な手順は EP 238023 に記載される。

【0092】

なお更なる態様において、本発明は、本発明の - アミラーゼ変異体を生産する方法であって、上述の宿主細胞を、変異体の生産に資する条件下で培養し、そして細胞及び/又は培養培地からその変異体を回収することを含む。

【0093】

細胞を培養するために用いる培地は、問題の宿主細胞を増殖させ、そして本発明の - アミラーゼ変異体の発現を得るために適したいずれの慣用的な培地であってもよい。好適な培地は、商用的供給元から利用でき、又は公開されている方法（例えば *American Type Culture collection* のカタログに記載）に従って調製することができる。

【0094】

宿主細胞から分泌される - アミラーゼ変異体は、便利には、遠心又はろ過により培地から細胞を分離し、そして塩、例えば硫酸アンモニウムを利用して培地のタンパク質成分を沈殿させ、そして次に、クロマトグラフィー手順、例えばイオン交換、アフィニティーコロマトグラフィー等を用いることを含む公知の手順により培養培地から回収することができる。

【0095】

工業的適用

本発明の - アミラーゼ変異体は、種々の工業的適用を許容する価値ある特性を有する。特に、本発明の酵素変異体は、洗浄、皿洗い及び硬質表面洗浄洗剤組成物中の成分として適用できる。多数の変異体が、デンプンからの甘味料及びエタノール、例えば燃料、飲料又は工業エタノールの生産に、及び/又は織物デサイジングのために特に役立つ。デンプン液化及び/又は糖化過程を含む、慣用的なデンプン変換過程のための条件は例えば U.S. 3,912,590 及び EP 特許公報第 252730 及び 63909 に記載される。

【0096】

デンプンからの甘味料の生産

10

20

30

40

50

デンプンのフルクトースシロップへの変換のための“伝統的な”方法は、通常、3つの連続的酵素過程、即ち液化過程、次の糖化過程、及び異性化過程からなる。液化過程の間、デンプンは、5.5～6.2のpH値で95°～160°の温度で、約2時間、-アミラーゼ（例えばTermamylTM）によりデキストリンに分解される。これらの条件下での至適酵素安定性を確実にするために、1mMのカルシウムを加える（40ppm遊離カルシウムイオン）。

【0097】

液化過程の後、デキストリンはグルコアミラーゼ（例えばAMGTM）及び脱分枝酵素、例えばイソアミラーゼ又はブルラナーゼ（例えばPromozyme^{TN}）の添加によりデキストロースに変換される。このステップの前に、pHは4.5未満の値に下げ、高温（95°超）に維持し、液化-アミラーゼ活性を変性させる。温度を60°に下げ、グルコアミラーゼ及び脱分枝酵素を加える。糖化過程を24～72時間、進行させる。

10

【0098】

糖化過程の後、pHを6～8の範囲、好ましいpH7.5の値に増加させ、カルシウムをイオン交換により除去する。次にデキストロースシロップを例えば固定化グルコースイソメラーゼ（例えばSweetzymeTM）を用いて高フルクトースシロップに変換する。

【0099】

この過程の少くとも1の酵素的改良が考えられる：液化-アミラーゼのカルシウム依存性の削減。遊離カルシウムの添加は、-アミラーゼの適度に高い安定性を確実にするために要求されるが、遊離カルシウムはグルコースイソメラーゼの活性を強力に阻害し、更なるユニット作業を用いて遊離カルシウムのレベルを3～5ppmに下げる程度まで除去する必要がある。このような作業を避けることができ、液化過程を遊離カルシウムイオンの添加なしに行うことができるなら、費用が節約できるであろう。

20

【0100】

これを達成するためには、低濃度の遊離カルシウム（<40ppm）で安定でかつ高度に活性であるより低いカルシウム依存性のTermamyl様-アミラーゼが要求される。Termamyl様-アミラーゼは4.5～6.5の範囲、好ましくは4.5～5.5の範囲のpHでpH至適性を有するべきである。

【0101】

本発明は、（親Termamyl様-アミラーゼとして）配列番号：8に示す配列を有するB.stearothermophilus-アミラーゼ由来の本発明の1又は複数の変異体及び配列番号：4に示す配列を有するB.licheniformis由来のTermamyl様-アミラーゼの混合物を含む組成物にも関する。

30

【0102】

更に、本発明は、（親Termamyl様-アミラーゼとして）配列番号：8に示す配列を有するB.stearothermophilus-アミラーゼ由来の本発明による1又は複数の変異体並びに配列番号：6に示すB.amyloliquefaciens-アミラーゼの一部及び配列番号：4に示すB.licheniformis-アミラーゼの一部を含むハイブリッド-アミラーゼの混合物を含む組成物にも関する。後者のハイブリッドTermamyl様-アミラーゼは、配列番号：4に示すB.licheniformis-アミラーゼの445C末端アミノ酸残基及び配列番号：6に示すB.amyloliquefaciens由来の-アミラーゼの37N末端アミノ酸残基を含む。後者のハイブリッド-アミラーゼは、好適には、（配列番号：4のナンバリングを用いて）次の変異：H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264Sを含み得る。好ましくは、後者のハイブリッド-アミラーゼは、好適には、（配列番号：4+ナンバリングを用いて）H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201Fを含む。以下の例において、（配列番号：2に示す）LE429と呼ぶ最後に言及した親ハイブリッドTermamyl様-アミラーゼは、本発明の変異体を調製するために用いられる。その変異体は、本発明の組成物中に用いることができる。

40

50

【0103】

本発明の - アミラーゼ変異体又は本発明の組成物は、本発明の一態様において、デンプン液化のため、洗剤組成物、例えば洗濯、皿洗い組成物及び硬質表面洗浄、エタノール生産、例えば燃料、飲料及び工業用エタノール生産、織物、布帛及び依類のデサイジングに用いることができる。

【0104】

材料及び方法

酵素：

L E 1 7 4 : ハイブリッド - アミラーゼ変異体：

L E 1 7 4 は、(成熟タンパク質の) N 末端 3 5 アミノ酸残基が B A N (成熟タンパク質)、即ち次の変異: H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S (配列番号: 4) を更に有する配列番号: 6 に示す B a c i l l u s a m y l o l i q u e f a c i e n s - アミラーゼの N 末端 3 3 残基により置換されていることを除き、 T e r m a m y 1 配列、即ち配列番号: 4 に示す B a c i l l u s l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼと同一であるハイブリッド T e r m a m y 1 様 - アミラーゼである。

【0105】

L E 4 2 9 : ハイブリッド - アミラーゼ変異体：

L E 4 2 9 は、(成熟タンパク質の) N 末端 3 5 アミノ酸残基が B A N (成熟タンパク質)、即ち次の変異: H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + I 2 0 1 F (配列番号: 4) を更に有する配列番号: 6 に示す B a c i l l u s a m y l o l i q u e f a c i e n s - アミラーゼの N 末端 3 3 残基により置換されていることを除き、 T e r m a m y 1 配列、即ち配列番号: 4 に示す B a c i l l u s l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼと同一であるハイブリッド T e r m a m y 1 様 - アミラーゼである。L E 4 2 9 は配列番号: 2 に示し、 S O E - P C R (Higuchi et al., 1988, Nucleic Acids Research 16 : 7351) により作製した。

【0106】

D e x t r o z y m e TM E : グルコアミラーゼ (A M G) 並びに A s p e r g i l l u s n i g e r 及び B a c i l l u s d e r a m i f i c a n s の選択された株から得ることができるプルラナーゼ (N o v o N o r d i s k A / S から市販) の平衡化混合物。

【0107】

- アミラーゼ変異体の発酵及び精製

関連する発現プラスミドを有する B . s u b t i l i s 株を - 8 0 ストックから 1 0 マイクロ g / mL カナマイシンを伴う L B - 寒天プレート上にストリーキングし、 3 7 で一晩、増殖させる。そのコロニーを、 5 0 0 mL 振とうフラスコ中の 1 0 マイクロ g / mL カナマイシンを補給した 1 0 0 mL B P X 培地に移す。B P X 培地の組成は次の通りである：

ポテトデンプン	1 0 0 g / L
オオムギ粉	5 0 g / L
B A N 5 0 0 0 S K B	0 . 1 g / L
ナトリウムカゼイネート	1 0 g / L
ダイズミール	2 0 g / L
N a ₂ H P O ₄ , 1 2 H ₂ O	9 g / L
P l u r o n i c TM	0 . 1 g / L

その培養物を 3 7 で 2 7 0 rpm で 5 日間、振とうする。

【0108】

細胞及び細胞デbrisを 2 0 ~ 2 5 分の 4 5 0 0 rpm での遠心により発酵プロセスから除去する。その後、上清をろ過して完全に透明な溶液を得る。そのろ液を濃縮し、 U F - フィルター (1 0 0 0 0 カットオフ膜) で洗い、その緩衝液を 2 0 mM アセテート pH 5 . 5 に変える。その U F - ろ液を S - セファロース F . F . に適用し、溶出を同じ緩衝液中 0 . 2

10

20

30

40

50

M NaClでのステップ溶出により行う。その溶出液を10mM Tris, pH9.0に対して透析し、Q-セファロースF.F.に適用し、6カラム容量にわたり0~0.3M NaClの直線勾配で溶出する。(Phadebasアッセイにより測定した)活性を含む画分をプールし、pHを7.5に調節し、残っている色を5分、0.5%w/volの活性石灰での処理により除去した。

【0109】

活性測定 - (KNU)

1キロ - アミラーゼ単位(1KNU)は、次の条件:

基質	可溶性デンプン	
溶媒中のカルシウム含有量	0.0043M	10
反応時間	7~20分	
温度	37	
pH	5.6	

に基づき - アミラーゼの測定のためのNovo Nordiskの標準的方法において1時間当たりに5.26gのデンプン(Merck, Amylum Soluble, Erg. B6, Batch 9947275)を分解する酵素の量である。

【0110】

Novo Nordiskの分析法(AF9)の詳細な記載は要求により利用できる。

【0111】

- アミラーゼ活性についてのアッセイ

20

- アミラーゼ活性は、基質としてPhadebas(登録商標)錠剤を用いる方法により測定される。Phadebas錠剤(Pharmacia Diagnostic)により供されるPhadebas(登録商標)Amylast Testは、ウシ血清アルブミン及び緩衝物質と混合され、錠剤化された架橋化不溶性青色デンプンポリマーを含む。

【0112】

各々の一回の測定のために、1つの錠剤を5mLの50mM Britton-Robinson緩衝液(50mM酢酸、50mMリン酸、50mMホウ酸、0.1mM CaCl₂, pHをNaOHで問題の値に調節)を含むチューブに懸濁する。そのテストは問題の温度で水浴中で行う。テストすべき - アミラーゼは、50mM Britton-Robinson緩衝液XmLに希釈する。この - アミラーゼ溶液1mLを5mLの50mM Britton-Robinson緩衝液に加える。デンプンを - アミラーゼにより加水分解して可溶性の青色フラグメントを供する。620nmで分光光度測定で測定される得られる青色溶液の吸光度は - アミラーゼ活性の関数である。

30

【0113】

10分又は15分のインキュベーション(テスト時間)の後の測定された620nmの吸光度は620nmで0.2~2.0吸光度単位の範囲であることが重要である。この吸光度範囲において、活性と吸光度との間の直線性がある(Lumbeert-Beerの法則)。それゆえ、酵素の希釈はこの基準に適合するよう調節しなければならない。特定の条件のセット(温度、pH、反応時間、緩衝条件)下で、所定の - アミラーゼ1mgは特定量の基質を加水分解するであろうし、青色が形成されるであろう。色の強度は620nmで測定される。その測定された吸光度は所定の条件のセットの下で問題の - アミラーゼの比活性(活性/純粋な - アミラーゼタンパク質のmg)に直接、比例する。

40

【0114】

比活性の測定

比活性は活性/mg酵素としてPhadebasアッセイ(Pharmacia)を用いて測定される。

【0115】

pH活性プロフィール(pH安定性)の測定

変異体を20mM TRIS pH7.5、0.1mM、CaCl₂中に保存し、30、50

50

mM Britton-Robinson、0.1mM CaCl₂でテストする。pH活性は、上述のPhadebasアッセイを用いて、pH4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.5, 9.5, 10、及び10.5で測定する。

【0116】

AGU活性の及びAGU/mgとしての測定

1Novo Amyloglucosidase Unit (AGU)は37、pH4.3で1分当たりに1マイクロモルのマルトースを加水分解する酵素の量として定義する。分析法 (AEL-SM-0131) の詳細な記載は要求によりNovo Nordiskから利用できる。

【0117】

活性は、Boehringer Mannheim, 124036, Standard: AMG-standard, batch 7-1195, 195AGU/mLからのGlucose GOD-Periodキットを用いて、後に改変する方法 (AEL-SM-0131)によりAGU/mLとして測定する。

【0118】

375 μL基質 (50mM酢酸ナトリウム、pH4.3中1%マルトース)を5分、37でインキュベートする。酢酸ナトリウムに希釈した25 μLの酵素を加える。その反応を、100 μLの0.25M NaOHを加えることにより10分後に停止させる。20 μLを96ウェルマイクロタイタープレートに移し、200 μLのGOD-Period溶液を加える。室温で30分の後、吸光度を650nmで測定し、活性をAMG-標準からAGU/mLで計算する。

【0119】

次にAGU/mgの比活性を、タンパク質濃度 (mg/mL)で割った活性 (AGU/mL)から計算する。

【0120】

実施例

実施例 1

本発明によるTermamyl変異体の作製

Termamyl (B.licheniformis - アミラーゼ配列番号: 4)を、pDN1528と呼ぶプラスミドからB. subtilis中で発現させる。このプラスミドはTermamylをコードする完全な遺伝子、amyLを含み、その発現はそれ自身のプロモーターにより駆動される。更に、そのプラスミドはプラスミドpUB110からの複製の起点、ori及びクロランフェニコールに対する耐性を与えるプラスミドpC194からのcat遺伝子を含む。pDN1528はWO96/23874のFig. 9に示される。配列番号: 3のコーディング領域の主要部分を含む特定の変異誘発ベクターを調製した。pJEN1と呼ぶこのベクターの重要な特徴は、pUCプラスミド由來の複製の起点、クロランフェニコールに対する耐性を与えるcat遺伝子、及びbla遺伝子のフレームシフト含有型を含む。この野生型は、通常、アンピシリンに対する耐性を与える(amp^R)。この変異型はamp^S表現型を生ずる。そのプラスミドpJEN1をWO96/23874のFig. 10に示し、複製の大腸菌の起点、ori, bla, cat, Termamylアミラーゼ遺伝子の5'-トランケート型、及び選択された制限部位をプラスミド上に示す。

【0121】

突然変異を、Deng及びNickoloffにより概説される制限酵素消化による選択を用いるかわりに、組み込まれた“選択プライマー”(プライマー#6616;以下を参照)を、修復されたbla遺伝子を伴うプラスミドを有する形質転換された大腸菌細胞のamp^R表現型に基づき選択したことを除いて、Deng及びNickoloff (1992, Anal. Biochem. 200, pp. 81-88)により記載される方法によりamyLに導入する。変異誘発のために用いる化学物質及び酵素は、Stratagene (カタログ番号200509)からのChemelene on O変異誘発キットから得た。

10

20

30

40

50

【0122】

変異体プラスミド中のDNA配列の確認の後、要求される変化を含むトランケートされた遺伝子をPstI-EcoRIフラグメントとしてpDN1528にサブクローン化し、変異体酵素を発現させるためにプロテアーゼ-及びアシラーゼ涸渴化Bacillus subtilis株SHA273に形質転換する。

【0123】

Termamyl変異体V54Wは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CGC TTG (配列番号：9)

Termamyl変異体A52W+V54Wは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CCA TTG GCT CG (配列番号：10)

プライマー#6616(5から3を左から右に記載；Pは5ホスフェートを示す)：

P CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C (配列番号：11)

Termamyl変異体V54Eは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC TCA TCC GCT TG (配列番号：12)

Termamyl変異体V54Mは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC ATA TCC GCT TG (配列番号：13)

Termamyl変異体V54Iは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCA ATA TCC GCT TG (配列番号：14)

Termamyl変異体Y290E及びY290Kは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PGC AGC ATG GAA CTG CTY ATG AAG AGG CAC GTC AAA C (配列番号：15)

YはC及びTの等量混合物を示す。位置290のグルタミン又はリシンをコードするコドンの存在はDNA配列決定により確認した。

【0124】

30

Termamyl変異体N190Fは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PCA TAG TTG CCG AAT TCA TTG GAA ACT TCC C (配列番号：16)

Termamyl変異体N188P+N190Fは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PCA TAG TTG CCG AAT TCA GGG GAA ACT TCC CAA TC (配列番号：17)

Termamyl変異体H140K+H142Dは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PCC GCG CCC CGG GAA ATC AAA TTT TGT CCA GGC TTT AAT TAG (配列番号：18)

Termamyl変異体H156Yは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PCA AAA TGG TAC CAA TAC CAC TTA AAA TCG CTG (配列番号：19)

Termamyl変異体A181Tは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PCT TCC CAA TCC CAA GTC TTC CCT TGA AAC (配列番号：20)

Termamyl変異体A209Vは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PCTT AAT TTC TGC TAC GAC GTC AGG ATG GTC ATA ATC (配列番号：21)

Termamyl変異体Q264Sは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

40

50

PCG CCC AAG TCA TTC GAC CAG TAC TCA GCT ACC GTA AAC (配列番号：22)

Termamyl変異体S187Dは以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PGC CGT TTT CAT TGT CGA CTT CCC AAT CCC (配列番号：23)

Termamyl変異体DELTA (K370 - G371 - D372) (即ち、アミノ酸番号：370、371及び372を削除)は以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PGG AAT TTC GCG CTG ACT AGT CCC GTA CAT ATC CCC (配列番号：24)

Termamyl変異体DELTA (D372 - S373 - Q374)は以下の変異誘発プライマーを用いることにより作製した(5から3を左から右に記載)：

PGG CAG GAA TTT CGC GAC CTT TCG TCC CGT ACA TAT C (配列番号：25)

Termamyl変異体A181T及びA209Vを、A181T含有pDN1528様プラスミド(即ちA181T変異を生ずるamyL内に変異を含むpPN1528)及びA209V含有pDN1528様プラスミド(即ちA209V変異を生ずるamyL内に変異を含むpDN1528)を、pDN1528様プラスミドを2回切断する制限酵素ClaIで消化して、1116bpのフラグメント及び3850bpのベクター部分(即ち複製のプラスミド起点を含むもの)を作ることによりA181T+A209Vに組み合わせた。A209V変異を含むフラグメント及びA181T変異を含むベクター部分を、アガロースゲルでの分離の後に、(QIAGENから購入した)QIAquickにゲル抽出キットにより精製した。そのフラグメント及びベクターを連結し、上述のプロテアーゼ及びアミラーゼ涸渴化Bacillus subtilis株に形質転換した。amy+からのプラスミド(デンプン含有寒天プレート上の透明をゾーン)及びクロランフェニコール耐性形質転換体を、プラスミド上の両方の変異の存在について分析した。

【0125】

先と同様に、H156Y及びA209Vを制限エンドヌクレアーゼAcc65I及びEcoRIを利用して組み合わせてH156Y+A209Vを供した。

【0126】

H156Y+A209V及びA181T+A209Vを、制限エンドヌクレアーゼAcc65I及びHindIIIの使用によりH156Y+A181T+A209Vに組み合わせた。

【0127】

Termamyl変異体H156Y+A181T+A209Vの成熟部分の35N末端残基を、以下の通りSOE-PCRアプローチ(Higuchi et al. 1988, Nucleic Acids Research 16:7351)により、(本文脈でBANと呼ぶ)Bamyloliquefaciens-アミラーゼ(配列番号：4)の33N末端残基により置換した：

プライマー-19364(配列5-3)：CCT CAT TCT GCA GCA GCA GCC GTA AAT GGC ACG CTG (配列番号：26)

プライマー-19362：CCA GAC GGC AGT AAT ACC GAT ATC CGA TAA ATG TTC CG (配列番号：27)

プライマー-19363：CGG ATA TCG GTA TTA CTG CCG TCT GGA TTC (配列番号：28)

プライマー-1C：CTC GTC CCA ATC GGT TCC GTC (配列番号：29)

標準的PCR、ポリメラーゼ鎖反応を製造元の説明書及び温度サイクル：94で5分、(94で30秒、50で45秒、72で1分)の25サイクル、72で10分に従ってPwo熱安定性ポリメラーゼを用いて行った。

【0128】

約130bpのフラグメントを、Bamyloliquefaciens-アミラーゼをコードする遺伝子を含むDNAフラグメントに基づきプライマー-19364及び19362でPCR1と呼ぶ最初のPCRにおいて増幅した。

【0129】

約400bpのフラグメントをテンプレートpDN1528に基づきプライマー-19363

10

20

30

40

50

及び 1 C での P C R 2 と呼ぶ別の P C R において増幅した。

【 0 1 3 0 】

P C R 1 及び P C R 2 をアガロースゲルから精製し、プライマー 1 9 3 6 4 及び 1 C と共に、P C R 3 におけるテンプレートとして用い、約 5 2 0 bp のフラグメントを作った。これにより、このフラグメントは 3 5 番目のアミノ酸からの T e r m a m y 1 をコードする D N A の一部に融合された B A N からの N 末端をコードする D N A の一部を含む。

【 0 1 3 1 】

その 5 2 0 bp フラグメントを (T e r m a m y 1 変異体 H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V を含む p D N 1 5 2 8 様プラスミドに、上述のように、制限エンドヌクレアーゼ P s t I 及び S a c I I での消化、連結及び B . s u b t i l i s 株の形質転換によりサブクロ 10 ーン化した。制限部位 P s t I 及び S a c I I の間の D N A 配列を a m y + 及びクロランフエニコール耐性形質転換からの抽出されたプラスミドにおいて D N A 配列決定により確認した。

【 0 1 3 2 】

B A N 及び H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V からの正確な N 末端を含む最終的な構成物を B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V と呼んだ。

【 0 1 3 3 】

N 1 9 0 F を B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V と組み合わせて、p J e E N 1 中の a m y L の配列を T e r m a m y 1 変異体 B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V をコードする D N A 配列により置換したことを除いて上 20 述の通り変異誘発を行うことにより、B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V を供した。

【 0 1 3 4 】

Q 2 6 4 S を B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V と組み合わせて、p J e E N 中の a m y L の配列を T e r m a m y 1 変異体 B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V をコードする D N A 配列により置換したことを除いて上 20 述の通り変異誘発を行うことにより、B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S を供した。

【 0 1 3 5 】

B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S 及び B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V を組み合わせて、制限エンドヌクレアーゼ B s a H I (B s a H I 部位を A 2 0 9 変異近くに導入した) 及び P s t I を利用して、B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S にした。 30

【 0 1 3 6 】

I 2 0 1 F を B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S と組み合わせて、上述の通り変異誘発を行うことにより B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + I 2 0 1 F (配列番号 : 2) を供した。変異誘発プライマー A M 1 0 0 を用い、I 2 0 1 F 置換を導入し、そして同時に C l a I 制限部位を除去して、変異体の容易なビン・ポインティングを容易にした。 40

【 0 1 3 7 】

プライマー A M 1 0 0 :

5' GATGTATGCCGACTTCGATTATGACC 3' (配列番号 : 3 0)

実施例 2

本発明による変化した開裂パターンを有する T e r m a m y 1 様 - アミラーゼ変異体の作製

配列番号 : 4 に示す B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼの 4 4 5 C 末端アミノ酸残基及び配列番号 : 6 に示す B . a m y l o l i q u e f a c i e n s 由来の - アミラーゼの 3 7 N 末端アミノ酸残基を含み、更に次の変異 : H 1 5 6 Y + A 1 8 1 50

T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + I 2 0 1 F を含む熱安定性 B . l i c h e n i f o r m i s - アミラーゼの変異体（この変異体の作製は実施例 1 に記載し、そのアミノ酸配列は配列番号： 2 に示す）は分枝点近くで基質を開裂する削減された能力を有する。

【 0 1 3 8 】

その - アミラーゼ変異体の分枝点近くで基質を開裂する削減された能力を更に改良する試みにおいて、定方向突然変異誘発を、Sarkar 及び Sommer, 1990 (BioTechniques 8 : 40 4-407) に記載されるように M e g a - プライマー法を用いて行った：

L E 3 1 3 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + V 5 4 N の作製

10

遺伝子特異的プライマー 2 7 2 7 4 及び変異誘発プライマー A M 1 1 5 を用いて P C R により（配列番号： 4 からのアミラーゼをコードする遺伝子中に B A N (1 - 3 5) + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + I 2 0 1 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S を有する） p D N 1 5 2 8 様プラスミドから約 4 4 0 bp D N A フラグメントを増幅した。

【 0 1 3 9 】

その 4 4 0 bp フラグメントをアガロースゲルから精製し、同じテンプレートで行った第 2 の P C R においてプライマー 1 1 3 7 1 1 と一緒に M e g a - プライマーとして用いる。

【 0 1 4 0 】

得られた約 6 3 0 bp フラグメントを制限酵素 E c o R V 及び A c c 6 5 I で消化し、得られた約 3 7 0 bp D N A フラグメントを精製し、同じ酵素で消化した p D N 1 5 2 8 様プラスミドに連結した。コンピテント B a c i l l u s s u b t i l i s S H A 2 7 3 (アミラーゼ及びプロテアーゼが低い) 細胞を、その連結体で形質転換し、クロランフェニコール耐性形質転換体を D N A 配列決定によりチェックしてプラスミド上の正確な変異の存在を確認した。

20

【 0 1 4 1 】

プライマー 2 7 2 7 4 :

5' C A T A G T T G C C G A A T T C A T T G G A A C T T C C C 3' (配列番号： 3 1)

プライマー 1 B :

5' C C G A T T G C T G A C G C T G T T A T T G C 3' (配列番号： 3 2)

30

プライマー A M 1 1 5 :

5' G C C A A G C G G A T A A C G G C T A C G G T G C 3' (配列番号： 3 3)

L E 3 1 4 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + A 5 2 S は変異誘発プライマー A M 1 1 6 を用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 4 2 】

A M 1 1 6 :

5' G A A C G A G C C A A T C G G A C G T G G G C T A C G G 3' (配列番号： 3 4)

L E 3 1 5 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + A 5 2 S + V 5 4 N は、変異誘発プライマー A M 1 1 7 を用いることを除いて同様に行う。

40

【 0 1 4 3 】

A M 1 1 7 :

5' G G A A C G A G C C A A T C G G A T A A C G G C T A C G G T G C 3' (配列番号： 3 5)

L E 3 1 6 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + T 4 9 L は変異誘発プライマー A M 1 1 8 を用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 4 4 】

A M 1 1 8 :

5' G C A T A T A A G G G A C T G A G C C A A G C G G 3' (配列番号： 3 6)

L E 3 1 7 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T +

50

N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + T 4 9 L + G 1 0 7 A は、変異誘発プライマー A M 1 1 8 及び変異誘発プライマー A M 1 1 9 を同時に用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 4 5 】

A M 1 1 9 :

5' CAACCACAAAGCCGGCGCTGATGCG 3' (配列番号 : 3 7)

L E 3 1 8 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L + G 1 0 7 A は、変異誘発プライマー A M 1 2 0 及び変異誘発プライマー A M 1 1 9 を同時に用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 4 6 】

A M 1 2 0 :

5' GCATATAAGGGACTGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (配列番号 : 3 8)

L E 3 1 9 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L は変異誘発プライマー A M 1 2 0 を用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 4 7 】

L E 3 2 0 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + G 1 0 7 A は変異誘発プライマー A M 1 1 9 を用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 4 8 】

L E 3 2 2 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + Q 5 1 R + A 5 2 S は変異誘発プライマー A M 1 2 1 を用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 4 9 】

A M 1 2 1 :

5' GAACGAGCCGATCGGACGTGGGCTACGG 3' (配列番号 : 3 9)

L E 3 2 3 の作製 : B A N / T e r m a m y 1 ハイブリッド + H 1 5 6 Y + A 1 8 1 T + N 1 9 0 F + A 2 0 9 V + Q 2 6 4 S + A 5 2 N は変異誘発プライマー A M 1 2 2 を用いることを除いて同様に行う。

【 0 1 5 0 】

A M 1 2 2 :

5' GAACGAGCCAAAACGACGTGGGCTACGG 3' (配列番号 : 4 0)

実施例 3

L E 4 2 9 変異体のテスト (糖化)

標準反応条件は次の通りであった :

基質濃度 3 0 % w / w

温度 6 0

開始pH (6 0) 5 . 5

酵素投与量

グハコアミラーゼ 0 . 1 8 A G U / g D S

ブルラナーゼ 0 . 0 6 P U N / g D S

- アミラーゼ 1 0 μ g 酵素 / g D S

D e x t r o z y m e TM E を用いてグルコアミラーゼ及びブルラナーゼ活性を供した。

【 0 1 5 1 】

糖化のための基質は、脱イオン水中に一般的なコーンデンプンを溶かし、その乾燥基質を約 3 0 % w / w に調節することにより調製した。そのpHは (6 0 で測定して) 5 . 5 に調節し、1 0 g の乾燥重量に相当する基質のアリコートをブルーキャップガラスフラスコに移した。

【 0 1 5 2 】

次にそのフラスコを 6 0 で平衡化した振とう水溶に入れ、酵素を加えた。そのpHを必要

10

20

30

40

50

に応じて 5 . 5 に再調節した。そのサンプルを 4 8 時間の糖化の後にとり；そのpHを約 3 . 0 に調節し、次に 1 5 分、煮沸水浴中で加熱して、酵素を不活性化した。冷却した後、サンプルをロータリーミキサー上で 3 0 分、約 0 . 1 g の混合床イオン交換樹脂 (B I O - R A D 5 0 1 × 8 (D)) で処理して塩及び可溶性 N を除去した。ろ過の後、炭水化物組成を H P L C により測定した。以下の結果を得た：

変異体についての親 - アミラーゼは L E 4 2 9 である。

【 0 1 5 3 】

【表 1 】

添加した α -アミラーゼ変異体	D P ₁	D P ₂	D P ₃	比活性 (NU/mg)
V 5 4 N	96. 1	1. 75	1. 18	8200
A 5 2 S	95. 9	1. 80	1. 11	18800
A 5 2 S + V 5 4 N	96. 3	1. 84	1. 08	10000
T 4 9 L	96. 3	1. 77	1. 11	12300
T 4 9 L + G 1 0 7 A	96. 4	1. 87	0. 72	13600
A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L + G 1 0 7 A	80. 5	2. 55	0. 43	10000
A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L	95. 8	1. 76	0. 84	8400
G 1 0 7 A	94. 4	1. 89	1. 04	19600
Q 5 1 R + A 5 2 S	95. 9	1. 77	1. 27	16500
A 5 2 N	95. 5	1. 89	1. 56	17600
L E 1 7 4 (コントロール)	95. 9/ 95. 8	1. 87/ 1. 83	1. 17/ 1. 35	16000

10

20

30

【 0 1 5 4 】

コントロールと比べて、液化の間の本発明の活性を - アミラーゼ変異体の存在はパノースレベル (D P 3) を減少させる。

40

【 0 1 5 5 】

特に、L E 4 2 9 の T 4 9 L + G 1 0 7 A 変異体及び L E 4 2 9 の A 5 2 S + V 5 4 N + T 4 9 L 変異体各々はパノースレベル (D P 3) を劇的に減少させる。これらの - アミラーゼ変異体をデンプン液化のために用いる場合、糖化の開始前に酵素を不活性化することは必要ないであろう。

【 0 1 5 6 】

実施例 4

L E 4 2 9 変異体の液化及び糖化

実施例 3 の実験を同じ条件下でいくつかの他の L E 4 2 9 変異体についてくり返した。

50

【0157】

結果を以下に示す：

【0158】

【表2】

変異体／糖プロフィール	DP1	DP2	DP3	DP4+	
T49V+G107A	95.9%	1.72%	1.27%	1.11%	10
T49Y+G107A	95.3%	1.73%	1.29%	1.65%	
T49N+G107A	95.7%	1.64%	1.51%	1.18%	
T49L+A52S+G107A	95.7%	1.73%	0.95%	1.67%	
T49L+A52T+G107A	95.8%	1.66%	1.03%	1.48%	
T49L+A52F+G107A	95.7%	1.69%	1.16%	1.42%	
T49L+A52L+G107A	95.5%	1.70%	1.40%	1.38%	
T49L+A52I+G107A	95.9%	1.72%	1.31%	1.07%	
T49L+A52V+G107A	94.7%	1.69%	1.16%	2.44%	
T49L+A52V+G107A+A111V	94.5%	1.75%	0.72%	2.99%	
LE429	94.9%	1.71%	1.85%	1.51%	

【0159】

実施例5

実施例3の実験を、液化を9.5、pH 6.0で行い、糖化を6.0、pH 4.5、4.0 ppm、CaCl₂で行い、次に不活性化したことを除いていくつかのLE429変異体についてくり返した。以下に示す変異体はLE429変異体である。見い出された結果は以下の通りである：

【0160】

【表3】

変異体／糖プロフィール	DP4+	DP3	DP2	DP1	
T49F	1.15	0.92	1.83	96.12	40
T49D+G107A	0.84	1.03	1.82	96.3	
T49I+G107A	0.97	0.64	1.84	96.55	
T49L+G107A	0.96	0.81	1.82	96.42	
T49L+A52S+G107A	1.37	0.75	1.88	96.01	
T49L+A52T+G107A	0.87	0.81	1.8	96.52	
T49L+A52F+G107A	0.98	0.83	1.87	96.31	
T49V+G107A	0.65	0.8	2.13	96.43	
T49Y+G107A	0.83	0.94	1.89	96.35	
LE429	1.16	1.21	1.77	95.87	

【0161】

【表4】

引用文献

- Klein, C., et al., *Biochemistry* 1992, 31, 8740-8746,
 Mizuno, H., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 234, 1282-1283,
 Chang, C., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 229, 235-238,
 Larson, S.B., *J. Mol. Biol.* (1994) 235, 1560-1584,
 Lawson, C.L., *J. Mol. Biol.* (1994) 236, 590-600, 10
 Qian, M., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 231, 785-799,
 Brady, R.L., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 527-535,
 Swift, H.J., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 535-544
 A. Kadziola, Ph.D. Thesis: "An alpha-amylase from Barley and its
 Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray
 Crystallography", Department of Chemistry University of
 Copenhagen 1993
 MacGregor, E.A., *Food Hydrocolloids*, 1987, Vol.1, No. 5-6, p.
 B. Diderichsen and L. Christiansen, Cloning of a maltogenic
 amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS Microbiol. let-*
ters: 56: pp. 53-60 (1988) 20
 Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition (1989),
 Blackwell Scientific Publications,
 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd
 Ed., Cold Spring Harbor, 1989
 S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981,
 pp. 1859-1869
 Matthes et al., The EMBO J. 3, 1984, pp. 801-805.
 R.K. Saiki et al., Science 239, 1988, pp. 487-491.
 Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2:646-639) 30
 Nelson and Long, Analytical Biochemistry 180, 1989, pp. 147-151
 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 frag-
 ments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.*
 16:7351-7367.
 Dubnau et al., 1971, J. Mol. Biol. 56, pp. 209-221.
 Gryczan et al., 1978, J. Bacteriol. 134, pp. 318-329.
 S.D. Erlich, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, pp. 1680-1682.
 Boel et al., 1990, Biochemistry 29, pp. 6244-6249. 40
 Sarkar and Sommer, 1990, BioTechniques 8, pp. 404-407.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novo Nordisk A/S

<120>

<130>

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1443

<212> DNA

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1443)

<400> 1

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac	48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp	
1 5 10 15	

ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat	96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp	
20 25 30	

atc ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga acg agc	144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser	
35 40 45	

caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta ggg gag	192
Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu	
50 55 60	

ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa gga gag	240
Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu	
65 70 75 80	

ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac gtt tac	288
Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr	
85 90 95	

ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc gaa gat	336
Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp	
100 105 110	

gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta att tca	384
Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser	
115 120 125	

30

gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg ggg cgc	432
Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg	
130 135 140	

ggc agc aca tac agc gat ttt aag tgg tat tgg tac cat ttt gac gga	480
Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly	
145 150 155 160	

acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag ttt caa	528
Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gin	
165 170 175	

ggg aag act tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa ttc ggc aac tat gat Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp 180 185 190	576	
tat ttg atg tat gcc gac ttt gat tat gac cat cct gat gtc gta gca Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala 195 200 205	624	
gag att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa ttg gac Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp 210 215 220	672	
ggc ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt ttg cgg Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg 225 230 235 240	720	
gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg ttt acg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr 245 250 255	768	10
gta gct gag tac tgg tcg aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac tat ttg Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu 260 265 270	816	
aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt cat tat Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr 275 280 285	864	
cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys 290 295 300	912	
ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg gtt aca Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr 305 310 315 320	960	20
ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag tcg act Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr 325 330 335	1008	
gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct gtt ttt att ctc aca agg Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg 340 345 350	1056	
gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys 355 360 365	1104	
gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro 370 375 380	1152	
atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr 385 390 395 400	1200	30
ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg Phe Asp His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser 405 410 415	1248	
gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly 420 425 430	1296	
gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His 435 440 445	1344	

gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtc atc aat tcg gaa ggc 1392
 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460

tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat gtt caa 1440
 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
 465 470 475 480

aga 1443
 Arg

<210> 2
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 2 10
 Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1 5 10 15

Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
 20 25 30

Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
 35 40 45

Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
 50 55 60

Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
 85 90 95

Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
 100 105 110

Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
 115 120 125

Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Pro Gly Arg
 130 135 140

Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly
 145 150 155 160

Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln
 165 170 175

Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp
 180 185 190

Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala
 195 200 205

Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp
 210 215 220

Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg
 225 230 235 240

Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr
 245 250 255

Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu
 260 265 270
 Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr
 275 280 285
 Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys
 290 295 300
 Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr
 305 310 315 320
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
 325 330 335
 Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
 340 345 350
 Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
 355 360 365
 Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
 370 375 380
 Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
 405 410 415
 Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
 435 440 445
 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460
 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
 465 470 475 480

Arg

<210> 3
 <211> 1920
 <212> DNA
 <213> *Bacillus licheniformis*

<220>
 <221> CDS
 <222> (421)..(1872)

<400> 3
 cggaaaggatg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg 60
 gagacggaaa aatcgcttta atgcacgata tttatgcaac gttcgcatg gctgctgaag 120
 agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaattgggt aactgtatct cagtttgaag 180
 aagtgaagaa gcagagagggc tatttataaa atgagtttagaa ggcctatc ggcgttttc 240
 ttttggaaaga aataataggg aaaaatggtagtac ttgttaaaaa ttccggaaatat ttatataacaaca 300

10

20

30

tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc 360
 cgattgctga cgctgttatt tgcgctatc ttcttgcgc ctcattctgc agcagccgc 420
 gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 468
 Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1 5 10 15
 aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg 516
 Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
 20 25 30
 gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga 564
 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45
 acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta 612 10
 Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50 55 60
 ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa 660
 Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac 708
 Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
 85 90 95
 gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc 756
 Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
 100 105 110
 gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta 804
 Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
 115 120 125
 att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccc 852
 Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
 130 135 140
 ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt 900
 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
 145 150 155 160
 gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag 948
 Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
 165 170 175
 ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac 996
 Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
 180 185 190
 tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc 1044
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa 1092
 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220
 ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt 1140
 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg 1188
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255

ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn 260 265 270	1236	
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu 275 280 285	1284	
cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met 290 295 300	1332	
agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser 305 310 315 320	1380	
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu 325 330 335	1428	10
tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu 340 345 350	1476	
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly 355 360 365	1524	
acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile 370 375 380	1572	
gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His 385 390 395 400	1620	20
gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp 405 410 415	1668	
agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro 420 425 430	1716	
ggg ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr 435 440 445	1764	
tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser 450 455 460	1812	
gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr 465 470 475 480	1860	30
gtt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tcctgaagga aatccgtttt Val Gin Arg	1912	
tttatttt	1920	

<210> 4
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis*

<400> 4
 Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gin Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1 5 10 15
 Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
 20 25 30
 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45
 Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50 55 60
 Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
 85 90 95 10
 Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
 100 105 110
 Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
 115 120 125
 Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
 130 135 140
 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
 145 150 155 160
 Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
 165 170 175
 Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
 180 185 190 20
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220
 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285 30
 His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350

Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365

Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380

Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400

Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415

Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430

Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445

Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460

Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480

Val Gln Arg

<210> 5
 <211> 2604
 <212> DNA
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<220>
 <221> -10_signal
 <222> (707)..(712)

<220>
 <221> -35_signal
 <222> (729)..(734)

<220>
 <221> RBS
 <222> (759)..(762)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (770)..(862)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (863)..(2314)

<220>
 <221> terminator
 <222> (2321)..(2376)

<220>
 <221> CDS
 <222> (863)..(2314)

<400> 5
 aagcttcaag cggtaatcg gaatgtgcat ctcgcttcat acttaggttt tcaccggcat 60
 attaaggcagg cgtttttgaa ccgtgtgaca gaagctgttc gaaaccccg 120

10

20

30

gatttaagg ggggacagta tgctgcctct tcacattaat ctcagcggaa aaagaatcat 180
 cattgtggc gggggcaatg ttgcattaag aaggctgaaa cggtgtttcc ggaaggcgct 240
 gatattaccg tgcgtcgct gaaattaaaa agctggcggg tgaaggacgc 300
 atccgctgga ttccccggag aattgaaatg aaagatctca agcccgcttt ttccattatt 360
 gcccgcgacaa atgaccgagg cgtgaatcg gagatagccg caaacgcctc tgaaacgcag 420
 ctggctcaact gtgtaaacaa ggctgaacaa ggcaagctat atatgccgaa gatcatccgc 480
 aaaggcgca ttcaagtatc agtataaca a gcccgcaca tacgaaaaga 540
 ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg ctgaagaagt ggatcgattg 600
 tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc atcagacagg gtatttta 660
 10
 tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa ggggggttgt tattatTTA 720
 ctgatatgtt aatataatt tgtataagaa aatgagaggg agaggaaaca tgattaaaa 780
 acgaaaagcgg acagttcgt tcagacttgt gcttatgtgc acgctgttat ttgtcagttt 840
 gccgattaca aaaacatcag cc gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa 892
 Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu
 1 5 10
 tgg tat acg ccg aac gac ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat 940
 Trp Tyr Thr Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp
 15 20 25
 20
 gcg gaa cat tta tcg gat atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc 988
 Ala Glu His Leu Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro
 30 35 40
 gca tac aaa gga ttg agc caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat 1036
 Ala Tyr Lys Gly Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp
 45 50 55
 ttg tat gat tta gga gaa ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa 1084
 Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys
 60 65 70
 tac ggc aca aaa tca gag ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc 1132
 Tyr Gly Thr Lys Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser
 75 80 85 90
 30
 cgg aac gtc caa gta tac gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt 1180
 Arg Asn Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly
 95 100 105
 gct gat gca aca gaa gat gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat 1228
 Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn
 110 115 120
 aga aat cag gaa act tcg gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat 1276
 Arg Asn Gln Glu Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp
 125 130 135
 ttt cgt ttt ccg ggc cgt gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat 1324
 Phe Arg Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His
 140 145 150
 1372
 tgg tat cat ttc gac gga gcg gac tgg gat gaa tcc cgg aag atc agc
 Trp Tyr His Phe Asp Gly Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser
 155 160 165 170

cgc atc ttt aag ttt cgt ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta Arg Ile Phe Lys Phe Arg Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val 175 180 185	1420	
tca agt gaa aac ggc aac tat gac tat tta atg tat gct gat gtt gac Ser Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp 190 195 200	1468	
tac gac cac cct gat gtc gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp 205 210 215	1516	
tat gcg aat gaa ctg tca tta gac ggc ttc cgt att gat gcc gcc aaa Tyr Ala Asn Glu Leu Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys 220 225 230	1564	
cat att aaa ttt tca ttt ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln 235 240 245 250	1612	10
gcg acg gga aaa gaa atg ttt acg gtt gcg gag tat tgg cag aat aat Ala Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn 255 260 265	1660	
gcc ggg aaa ctc gaa aac tac ttg aat aaa aca agc ttt aat caa tcc Ala Gly Lys Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser 270 275 280	1708	
gtg ttt gat gtt ccg ctt cat ttc aat tta cag gcg gct tcc tca caa Val Phe Asp Val Pro Leu His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln 285 290 295	1756	
gga ggc gga tat gat atg agg cgt ttg ctg gac ggt acc gtt gtg tcc Gly Gly Tyr Asp Met Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser 300 305 310	1804	20
agg cat ccg gaa sag gcg gtt aca ttt gtt gaa aat cat gac aca cag Arg His Pro Glu Lys Ala Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln 315 320 325 330	1852	
ccg gga cag tca ttg gaa tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu 335 340 345	1900	
gca tac gcc ttt att ttg aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe 350 355 360	1948	
tat ggg gat atg tac ggg aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro 365 370 375	1996	
tca ctg aaa gat aat ata gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac Ser Leu Lys Asp Asn Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr 380 385 390	2044	30
gca tac ggg ccc cag cac gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga Ala Tyr Gly Pro Gln His Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly 395 400 405 410	2092	
tgg acg agg gaa ggt gac agc tcc gcc gca aaa tca ggt ttg gcc gct Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala 415 420 425	2140	
tta atc acg gac gga ccc ggc gga tca aag cgg atg tat gcc ggc ctg Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu	2188	

430	435	440	
aaa aat gcc ggc gag aca tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat Lys Asn Ala Gly Glu Thr Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp 445 450 455			2236
act gta aaa atc gga tct gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat Thr Val Lys Ile Gly Ser Asp Gly Trp Gly Glu His Val Asn Asp 460 465 470			2284
ggg tcc gtc tcc att tat gtt cag aaa taa ggtaataaaa aaacacccctcc Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Lys 475 480			2334
aagctgagtg cgggtatcag cttggaggtg cgtttatttt ttcagccgta tgacaaggc 2394			
ggcatcagg tgcacaaata cggatgtcg gctgtcatag gtgacaaatc cgggtttgc 2454			10
ggcgtttggc ttttacat gctgatttt tgtataatca acaggcacgg agccgaaatc 2514			
tttcgccttg gaaaaataag cggcgatcgt agctgcttcc aatatggatt gttcatcg 2574			
atcgctgctt ttaatcacaa cgtgggatcc			2604
 <210> 6			
<211> 483			
<212> PRT			
<213> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			
 <400> 6			
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp 1 5 10 15			
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp 20 25 30			20
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser 35 40 45			
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu 50 55 60			
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu 65 70 75 80			
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr 85 90 95			
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp 100 105 110			
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser 115 120 125			30
Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg 130 135 140			
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly 145 150 155 160			
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg 165 170 175			
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn 180 185 190			

Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val			
195	200	205	
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser			
210	215	220	
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe			
225	230	235	240
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met			
245	250	255	
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn			
260	265	270	
Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu			
275	280	285	10
His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met			
290	295	300	
Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala			
305	310	315	320
Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu			
325	330	335	
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu			
340	345	350	
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly			
355	360	365	
Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile			
370	375	380	20
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His			
385	390	395	400
Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp			
405	410	415	
Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro			
420	425	430	
Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr			
435	440	445	
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser			
450	455	460	
Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr			
465	470	475	480
Val Gln Lys			30

<210> 7
 <211> 1548
 <212> DNA
 <213> *Bacillus stearothermophilus*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1548)

<400> 7
 gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg 48
 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
 1 5 10 15

ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtc gcc aat gaa gcc aac aac 96
 Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
 20 25 30

tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct tac aaa 144
 Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
 35 40 45

gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac 192
 Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
 50 55 60

ctc ggc gaa ttc aat caa aas ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga aca 240
 Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
 65 70 75 80

aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc ccc gac gct gga atg 288
 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
 85 90 95

caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc 336
 Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
 100 105 110

acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa 384
 Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
 115 120 125

gaa atc tcg ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt gat ttt 432
 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
 130 135 140

ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat 480
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
 145 150 155 160

ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac 528
 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175

aaa ttc cgc ggc atc ggc aaa gcg tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa 576
 Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
 180 185 190

aac gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat 624
 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
 195 200 205

ccc gaa gtc gtg acc gag ctg aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac 672
 Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
 210 215 220

aca acg aac att gat ggg ttc cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag 720
 Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys
 225 230 235 240

ttc agt ttt ttt cct gat tgg ttg tcg tat gtg cgt tct cag act ggc 768
 Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly
 245 250 255

aag ccg cta ttt acc gtc ggg gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag 816
 Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys

260	265	270	
ttg cac aat tac att acg aaa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp 275 280 285			864
gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc gct tcc aaa tca ggg ggc gca Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala 290 295 300			912
ttt gat atg cgc acg tta atg acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro 305 310 315 320			960
aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln 325 330 335			1008
gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gcc Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala 340 345 350			1056
ttt att cta act cgg cag gaa gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp 355 360 365			1104
tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tcg ctg aaa agc aaa atc Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile 370 375 380			1152
gat ccg ctc ctc atc gcg cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His 385 390 395 400			1200
gat tat ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly 405 410 415			1248
act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro 420 425 430			1296
gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val 435 440 445			1344
tcc tat gac ctt acc ggc aac ccg agt gac acc gtc acc atc aac agt Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser 450 455 460			1392
gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Ser Val Ser Val Trp 465 470 475 480			1440
gtt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc gct ccg ccg atc aca acc Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr 485 490 495			1488
cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca ccg ttg gtg Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val 500 505 510			1536
gca tgg cct tga Ala Trp Pro 515			1548

<210> 8
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> *Bacillus stearothermophilus*

<400> 8
 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
 1 5 10 15

Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
 20 25 30

Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
 35 40 45

Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
 50 55 60

Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
 65 70 75 80

Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
 85 90 95

Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
 100 105 110

Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
 115 120 125

Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
 130 135 140

Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
 145 150 155 160

Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175

Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
 180 185 190

Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
 195 200 205

Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
 210 215 220

Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys
 225 230 235 240

Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly
 245 250 255

Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys
 260 265 270

Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp
 275 280 285

Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala
 290 295 300

Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro
 305 310 315 320

Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln

325	330	335	
Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala			
340	345	350	
Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp			
355	360	365	
Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile			
370	375	380	
Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His			
385	390	395	400
Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly			
405	410	415	
Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro			
420	425	430	
Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val			
435	440	445	
Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser			
450	455	460	
Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp			
465	470	475	480
Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr			
485	490	495	
Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val			
500	505	510	
Ala Trp Pro			
515			

<210> 9
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 9
 ggtcgttaggc accgttagccc caatccgctt g

31

<210> 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10
 ggtcgttaggc accgttagccc caatcccatt ggctcg

36

<210> 11
 <211> 28

10

20

30

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11
ctgtgactgg tgagtactca accaagtgc 28

<210> 12
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer 10

<400> 12
ggtcgttaggc accgttagccc tcatccgctt g 31

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13
ggtcgttaggc accgttagccc atatccgctt g 31

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer 20

<400> 14
ggtcgttaggc accgttagcca atatccgctt g 31

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer 30

<400> 15
gcagcatgga actgctyatg aagaggcactg tcaaac 36

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16

catatggcc gaattcattg gaaacttccc	30
<210> 17	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Primer	
<400> 17	
catatggcc gaattcaggg gaaacttccc aatc	34
<210> 18	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	10
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Primer	
<400> 18	
cgcgcgcggc ggaaatcaa ttttgtccag gctttaatta g	41
<210> 19	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Primer	20
<400> 19	
caaaatggta ccaataccac ttaaaatcgc tg	32
<210> 20	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Primer	
<400> 20	
cttcccaatc ccaagtcttc ccttggaaac	29
<210> 21	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	30
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Primer	
<400> 21	
cttaatttct gctacgacgt caggatggtc ataatc	36
<210> 22	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 22
cgcccaagtc attcgaccag tactcagcta ccgtaaac 38

<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 23
gccgtttca ttgtcgactt cccaaatccc 29 10

<210> 24
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 24
ggaatttcgc gctgactagt cccgtacata tcccc 35

<210> 25
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 25
ggcaggaatt tcgcgacatt tcgtcccgta catatc 36

<210> 26
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 26
cctcattctg cagcagcagc cgtaaatggc acgctg 36 30

<210> 27
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 27
ccagacggca gtaataccga tatccgataa atgttccg 38

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 28
cgatatatcg tattactgcc gtctggattc 30

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 29
ctcgccccaa tcgggtccgt c 21

<210> 30
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 30
gatgtatgcc gacttcgatt atgacc 26 20

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 31
catagttgcc gaattcatgt gaaacttccc 30

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 32
ccgatgtctg acgctgttat ttgc 24

<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 33
 gccaaggcgga taacggctac ggtgc 25

<210> 34
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 34
 gaacgagcca atcggacgtg ggctacgg 28
 10

<210> 35
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 35
 ggaacgagcc aatcgatataa cggctacggt gc 32
 20

<210> 36
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 36
 gcatataaagg gactgagcca agcgg 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 37
 caaccacaaa gcccggcgctg atgcg 25
 30

<210> 38
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 38
 gcatataaagg gactgagcca atcgatataa c ggctacgg 41

<210> 39
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 39
 gaacgagccg atcggacgtg ggctacgg 28

<210> 40
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 40
 gaaacgagcca aaacgacgtg ggctacgg 28
 50

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	9/28	(2006.01) C 1 2 N 9/28
C 1 2 P	7/06	(2006.01) C 1 2 P 7/06
C 1 2 P	19/14	(2006.01) C 1 2 P 19/14 Z
C 1 1 D	3/386	(2006.01) C 1 1 D 3/386
C 1 2 S	11/00	(2006.01) C 1 2 S 11/00
C 1 2 R	1/07	(2006.01) C 1 2 N 9/28
C 1 2 R	1/10	(2006.01) C 1 2 R 1:07
C 1 2 R	1/125	(2006.01) C 1 2 N 9/28 C 1 2 R 1:10 C 1 2 N 9/28 C 1 2 R 1:125

(72)発明者 アンデルセン , カルステン

デンマーク国, デーコー - 3 5 0 0 バエルレーセ, ヘーイエロフト ベンゲ 1 6 2

(72)発明者 イエールゲンセン , クリストル テー

デンマーク国, デーコー - 2 1 0 0 コペンハーゲン エー, 4 . テーホー リブイエゲルガーデ
4 1

(72)発明者 ピスゴールト - フランツェン , ヘンリク

デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト , エルメベンゲト 8 ベー

(72)発明者 スベンセン , アラン

デンマーク国, デーコー - 3 4 6 0 ビルケレード , バッケレデト 2 8

(72)発明者 クイエルウルフ , セーレン

デンマーク国, デーコー - 2 7 2 0 バンレーセ , コンスダルスバイ 4 7

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表平09-503916 (JP, A)

特表平11-500003 (JP, A)

国際公開第97/041213 (WO, A1)

特表平08-506491 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-90

BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed