

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4995397号
(P4995397)

(45) 発行日 平成24年8月8日(2012.8.8)

(24) 登録日 平成24年5月18日(2012.5.18)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N	9/42	(2006.01)	C 1 2 N 9/42
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 17 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-517753 (P2002-517753)	(73) 特許権者	398056506
(86) (22) 出願日	平成13年7月31日 (2001.7.31)		ダニスコ・ユーエス・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2004-519212 (P2004-519212A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成16年7月2日 (2004.7.2)		304-1013 パロアルト ペイジ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/023946		ミルロード 925
(87) 国際公開番号	W02002/012462	(74) 代理人	100075270
(87) 国際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)		弁理士 小林 泰
審査請求日	平成20年7月23日 (2008.7.23)	(74) 代理人	100080137
(31) 優先権主張番号	09/632, 570		弁理士 千葉 昭男
(32) 優先日	平成12年8月4日 (2000.8.4)	(74) 代理人	100096013
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 富田 博行
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規変種EG111様セルラーゼ組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：1のV210に置換を含む、セルラーゼ。

【請求項2】

V210Cの置換を含む、請求項1記載のセルラーゼ。

【請求項3】

P201C及びV210Cの置換を含む、請求項1記載のセルラーゼ。

【請求項4】

配列番号：9のC205G/S, C236S/P及びC246S/Vの置換を含む、セルラーゼ。

【請求項5】

請求項1記載のセルラーゼをコードするDNA。

【請求項6】

請求項5記載のDNAを含むベクター。

【請求項7】

請求項6記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項8】

工程：

(a) セルラーゼを生成するのに適した条件下で適当な培養培地中で請求項7記載の宿主細胞を培養し；そして

(b) 生成されたセルラーゼを得ることを含む、セルラーゼを生成する方法。

【請求項 9】

界面活性剤及びセルラーゼを含む洗浄剤組成物であって、上記セルラーゼが請求項 1 記載のセルラーゼを含む、洗浄剤組成物。

【請求項 10】

セルラーゼが請求項 2 又は 3 記載のセルラーゼである、請求項 9 記載の洗浄剤組成物。

【請求項 11】

洗浄剤がランドリー用洗浄剤である、請求項 10 記載の洗浄剤組成物。

【請求項 12】

洗浄剤が皿洗い用洗浄剤である、請求項 10 記載の洗浄剤組成物。

【請求項 13】

セルロース含有織物の処理における、請求項 1 記載のセルラーゼの使用。

【請求項 14】

インディゴ染色されたデニムのストーンウォッシングにおける、請求項 13 記載のセルラーゼの使用。

【請求項 15】

飼料付加物としての、請求項 1 記載のセルラーゼの使用。

【請求項 16】

ウッドパルプ処理における、請求項 1 記載のセルラーゼの使用。

【請求項 17】

バイオマスのグルコースへの還元における、請求項 1 記載のセルラーゼの使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

政府後援の研究及び開発

適用外。

【0002】

発明の背景

セルラーゼは、セルロース中の β -D-グルコシド結合の加水分解が可能な酵素である。セルロース分解酵素は伝統的に 3 つの主要なクラスに分類されてきた：エンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼ又はセロビオヒドラーゼ及び β -グルコシダーゼであり (Knowles, J. et al., (1987), TIBTECH 5, 255-261); 多数の細菌、酵母及び真菌により製造されることが知られている。

【0003】

セルラーゼはウッドパルプ及び動物用飼料を分解するのに用いられるが、セルラーゼは主に織物の処理、例えば泥又は灰色傾向の除去の補助のための界面活性剤組成物において (例えば、大英帝国出願番号 2,075,028、2,095,275 及び 2,094,826 を参照) 又は織物の感触及び外観を改良するための販売前の織物の処理において使用される。即ち、大英帝国出願番号 1,358,599 は、コットンを含む織物のざらつきを軽減するために界面活性剤中のセルラーゼの使用を例示する。

【0004】

セルラーゼは、織物の色をより活気あるものにするにより使用された織物を改良するために織物の処理においても使用されてきた (The Shizuoka Prefectural Hamamatsu Textile Industrial Research Institute Report 24:54-61 (1986))。コットンを含む織物の繰り返しの洗浄は織物に灰色傾向をもたすが、破壊されて不規則になった繊維によると信じられ、ときどき機械の作用による「毛玉 (pills)」と呼ばれる。この灰色傾向は色付きの織物において特に目立つ。結果として、織物の不規則な上部層を除去して即ち織物の全体の外観を改良することにおけるセルラーゼの能力は価値がある。

【0005】

10

20

30

40

50

多くの工業上のプロセスにおけるその有用性のため、ひとつ又は複数の特定の応用に関して特に有効な性能特性を有する特定のセルラーゼ組成物 (compositions) 又は成分 (components) を研究する分野において時代の風潮があった。セルラーゼの可能な源として、実務家は真菌及び細菌に焦点を合わせた。例えば、特定の真菌、例えば *Trichoderma* 種 (特に、*Trichoderma reesei*) により生産されるセルラーゼは大いに注目されたが、何故ならばセルロースの結晶形態を分解することができる完全なセルラーゼが発酵の手法により大量に容易に提供されるからである。この特定のセルロース複合体を広く分析することにより、その特定の成分の性質及びそれらの成分が工業上のプロセスにおいて機能する能力を測定した (Wood et al., "Methods in Enzymology", 160, 25, pages 234, 及び次参照 (1988))。米国特許番号 5, 475, 101 (Ward et al.) は、*Trichoderma reesei* 由来のエンドグルカナーゼ III (EGIII) と呼ばれる一つの特に有用な酵素の精製及び分子クローニングを開示する。

10

【0006】

PCT公開番号 WO94/14953 は、各20ヌクレアーゼ有する一連のDNA配列の何れか一つを含む核酸によりコードされるエンドグルカナーゼを開示する。

【0007】

Ooi, et al., Curr. Genet. 18: 217-222 (1990) は、アミノ酸ストリングス NNLWG, ELMIW 及び GTEPFT を含む *Aspergillus aculeatus* により生産されるエンドグルカナーゼ EF1-CMC をコードする cDNA 配列を開示する。Sakamoto, et al., Curr. Genet. 27: 435-439 (1995) は、アミノ酸ストリングス ELMIW 及び GTEPFT を含む *Aspergillus kawachii* 由来のエンドグルカナーゼ CMCase-1 をコードする cDNA 配列を開示する。Ward, et al., は、アミノ酸ストリングス NNLWG, ELMIW 及び GTEPFT を有する EGIII の配列を開示する。さらに、2つのセルラーゼ配列、一方が *Erwinia carotovora* そして *Rhodothermus marinus* が、Saarilahti, et al., Gene 90: 9-14 (1990) 及び Hreggvidsson, et al., Appl. Environ. Microb. 62: 3047-3049 (1996) に開示されており、アミノ酸ストリングス ELMIW を含む。

20

30

【0008】

上記のエリアの幾つか又は全てにおいて応用性を有する多くのセルラーゼ組成物に関する業界の知見に拘わらず、セルラーゼが有用な応用において存在する条件下で改良された安定性を有する新規のセルラーゼ組成物、例えば家庭の界面活性剤及びランドリーの界面活性剤及び織物処理用の組成物に関する継続する要求が存在する。

【0009】

発明の概要

本発明によれば、変種 (variant) の EGIII 又は EGIII 様セルラーゼが提供され、一つ又は複数のアミノ酸が修飾されるか又は欠失していることにより、改善された性能を授与するが、熱及び/又は界面活性剤媒介ストレス存在下での安定性を含む。発明の別の態様において、EGIII 様セルラーゼの安定性に必須の残基が同定される。

40

【0010】

好ましい態様において、変種 EGIII 又は EGIII 様セルラーゼは、*Trichoderma reesei* 由来の EGIII 中の残基 P201, G170 及び/又は V210 の一つ又は複数に対応する位置において置換又は欠失を含む。

【0011】

発明のこの側面のより好ましい態様において、変種は、EGIII 中の残基 P201C, G170C 及び/又は V210C の一つ又は複数に対応する位置において置換又は欠失を含む。

【0012】

50

別の態様において、この発明のEGIII様セルラーゼは、*H. grisea*の残基C190G/S, C221S/P及び/又はC231S/Vの一つ又は複数に対応する位置において置換又は欠失を含む。

【0013】

この態様の別の側面において、EGIII様セルラーゼは、真菌、細菌又は放線菌に由来する。好ましい側面において、セルラーゼは真菌に由来する。より好ましい側面において、繊維状真菌である。もっとも好ましい側面において、繊維状真菌は、*Euascomyce*te, 特に*Aspergillus*種、*Gliocladium*種、*Fusarium*種、*Acremonium*種、*Myceliophthora*種、*Verticillium*種、*Myrothecium*種又は*Penicillium*種に属する。

10

【0014】

別の態様において、この発明のEGIII様セルラーゼはエンドグルカナーゼである。この発明のまた別の態様において、EGIII様セルラーゼをコードするDNAが提供される。この態様の一つの側面において、DNAはベクター中にある。この態様の別の側面において、上記DNAは上記ベクターにより形質転換された宿主細胞中にある。

【0015】

さらなる態様において、この発明のEGIII様セルラーゼを生産する方法が提供される。特に、セルラーゼを生産するために適した条件下で適な培養培地中で宿主細胞を培養し、そして生産されたセルラーゼを得る工程を含む方法が提供される。

【0016】

また別の態様において、界面活性剤及び*Trichoderma reesei*由来のEGIII中の残基P201, G170及び/又はV210の一つ又は複数に対応する位置において置換又は欠失を含む変種EGIIIセルラーゼを含む洗浄剤組成物が提供される。この態様の好ましい側面において、変種は、EGIII中の残基P201C, G170C及び/又はV210Cの一つ又は複数に対応する位置において置換又は欠失を含む。この態様の別の側面において、洗浄剤はランドリー用洗浄剤である。さらに別の側面において、洗浄剤は皿用洗浄剤である。

20

【0017】

以下に詳細に示すとおり、本明細書において同定された置換はEGIII及びEGIII様セルラーゼの安定性に、特に熱ストレス下において重要である。従って、EGIII又はEGIII様酵素を、織物の処理、例えば、ランドリーの洗浄剤又はストーンウォッシング組成物において、バイオマスの還元、飼料添加物の生産又は飼料の処理、紙又はパルプに基づく生成物のウッドパルプの処理において、及びグルコース、高フルクトースコーンシロップ及び/又はアルコールの生産を促進させる穀類湿潤製粉又は乾燥製粉の間の澱粉の処理における使用は、本発明の範囲内である。

30

【0018】

発明の詳細な説明

出願人は、*Trichoderma reesei*由来のEGIIIに相同性を有するセルラーゼのファミリーの新規なメンバーを単離した。これらのセルラーゼの分析は、有意な相同性にも拘わらず、セルラーゼの間で異なる性能をもたらした。特に、*Humicola grisea*由来のEGIII様セルラーゼは熱ストレス下の条件において優秀な性能を有することが発見された。これらのEGIII様セルラーゼをEGIIIのそれと整列化することにより、熱に対してより安定なセルラーゼとEGIIIの間の残基の差異を同定して、即ちEGIII様セルラーゼの熱安定性を改善するのに重要な残基を同定することが可能である。従って、EGIII内並びにEGIII様セルラーゼ内で同定された残基を最適化することにより、EGIII及びEGIII様セルラーゼの両方の熱安定性をさらに改善することが可能である。逆に、安定性の低い酵素からの、安定性に必須の残基を補充することにより、EGIII様セルラーゼの熱安定性を低下させることができる。

40

【0019】

50

本発明は、即ち、EGIII様セルラーゼのアミノ酸配列比較を通して同定されたそのような全ての修飾を包含する。酵素の熱アミノ酸の変化をもたらすそれらの修飾に対して特に注意が引かれる。

【0020】

好ましい態様において、H. griseaのEGIII様セルラーゼの中に存在するシステインをT. reeseiからのEGIIIにおいて補充する。もっとも好ましい態様において、システインは成熟T. reeseiの170, 201, 及び210位において置換する。

【0021】

本発明によるこの改善された蛋白質は、前駆体蛋白質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含む。前駆体蛋白質は天然に生じる蛋白質又は組換え蛋白質であってよい。改善された蛋白質のアミノ酸配列は、前駆体アミノ酸配列の一つ又は複数のアミノ酸の置換、欠失又は挿入により前駆体蛋白質のアミノ酸配列に由来する。そのような修飾は、前駆体蛋白質自体の操作よりもむしろ前駆体蛋白質のアミノ酸配列をコードする前駆体DNA配列に一般的である。前駆体DNA配列のそのような修飾の適切な方法は、本明細書及び引用により編入される、共通の譲受人の米国特許第4,760,025号、第5,185,258号に開示された方法を含む。

【0022】

配列の整列化は、別のEGIII様セルラーゼを用いて生じさせてよく、そして配列の数及び相同性の程度しだいで、一つの整列化とその他がわずかに異なってよい。適切な修飾を決定するための適切な実験は、本開示に関連して当業者には日常的である。

【0023】

明細書内では、特定の用語を以下のように定義して、特許請求の範囲の発明の性質を明らかにする。

「セルラーゼ」は、当業界においてよく分類されているカテゴリーの酵素であり、セルロースポリマーを短いα-オリゴサッカライドオリゴマー、セロビオース及び/又はグルコースに加水分解できる酵素を含む。セロビオース酵素の共通の例は、セロビオヒドロラーゼ類及びエンドグルカナーゼ類であり、そしてセルロース分解性生物の多くの種から得ることができ、特に真菌及び細菌を含む。

【0024】

「EGIII」セルラーゼは、米国特許第5,475,101号及びProceedings on the Second TRICEL Symposium on Trichoderma Reesei Cellulases And Other Hydrolases, Suominen & Reinikainen eds., Espo Finland (1993), pp. 153-158 (Foundation for Biotechnological and Industrial Fermentation Research, Vol. 8)に記載されたエンドグルカナーゼ成分を意味する。本明細書において議論されるとおり、EGIIIはTrichoderma reeseiに由来し、そして約5.8の至適pH、約7.4の等電点(pI)及び約25kDの分子量により特徴付けられる。Trichoderma reesei由来のEGIIと一般に呼ばれる酵素は、文献において数人の著者らにより名称EGIIIと呼ばれたが、その酵素は分子量、pI及び至適pHに関して本明細書中のEGIIIと定義した酵素とは実質的に異なる。

【0025】

本発明による「EGIII様酵素」、「EGIII様蛋白質」又は「EGIII様セルラーゼ」は、EGIIIと共通の特定のアミノ酸ストリングスを有することによりEGIIIに関連する酵素を意味する。本明細書にて使用されるとおり、EGIII様セルラーゼはTrichoderma reesei由来のEGIIIを包含することも意図する。即ち、EGIII様セルラーゼは、

【0026】

10

20

30

40

50

【化1】

- 1) Asn-Asn-(Leu/Phe/Lys/Ile)-Trp-Gly (SEQ ID NO:25)
- 2) Glu-(Leu/Phe/Ile)-Met-Ile-Trp (SEQ ID NO:26)
- 3) Gly-Thr-Glu-Pro-Phe-Thr (SEQ ID NO:27);
- 4) (Ser/Tyr/Cys/Trp/Thr/Asn/Lys/Arg)-(Val/Pro)-(Lys/Ala)-(Ser/Ala)-(Tyr/Phe) (SEQ ID NO:28); 及び
- 5) Lys-Asn-Phe-Phe-Asn-Tyr (SEQ ID NO:29).

10

【0027】

の一つ又は複数からなる群から選択されるアミノ酸ストリングスの中に含むアミノ酸配列を含む、セルロース溶解活性を有する酵素を含む。

一つの態様において、発明の酵素は、さらに、EGIIIに対して有意な構造上及び/又は配列上の相同性を有する。即ち、発明のこの態様の一つの側面において、上記酵素はEGIIIに対して少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、そしてもっとも好ましくは少なくとも60%のアミノ酸同一性を有する。しかしながら、相同性のみでは、本明細書に記載された方法により同定された特定の酵素がEGIII様セルラーゼを代表するか否かの適切な尺度には多くの場合ならないことを認識すべきである。相同性が低いか否かに拘わらず類似の酵素機能がEGIII様セルラーゼを同定するかもしれない。従って、相同な酵素が本明細書に記載されて例示された方法により実際に検出されるが、相同の程度は発明の範囲を限定するものとして見なすべきではない。

20

【0028】

発明のEGIII様セルラーゼはセルラーゼを生産する多くの生物において見いだされるかもしれないと予期される。しかしながら、ありそうなこととして、EGIII様セルラーゼの源は、細菌又は真菌、より好ましくは放線菌、桿菌又は繊維状真菌に由来するものを含む。好ましい態様において、セルラーゼは、繊維状真菌ファミリーの後生動物、好ましくはEuascomycetesに由来する。後生動物において、EGIII様セルラーゼを生産する真菌の系統発生上の分類は、栄養胞子Pyrenomyces (Acromoniumを含む), Sordariales (Thielaviaを含む), Hypocreales (Nectriaceae、例えばFusarium, Nectria, Verticillium, Myrothecium及びGliocladium; 及びHypocreaを含む) 及びEurotiales (栄養胞子Trichocomaceae、例えばAspergillus及びPenicilliumを含む)を含む。

30

【0029】

Euascomyceteは、好ましくは、Diaporthales, Halospherales, Microascales, Ophiostomatales, Phyllachorales, Sordariales又はXylarialesに属する。また、好ましくは、Euascomyceteは、Clavicipitaceae, Melanosporaceae, Nectriaceae, Niessliaceae又はMitosporitic Hypocrealesを含むHypocrealesに属する。さらに好ましくは、Euascomyceteは、Trichodermaを含まないHypocreaceaeに属する。もっとも好ましくは、Euascomyceteは、Gliocladium種、Fusarium種、Acromonium種、Myceliophthora種、Verticillium種、Myrothecium種、Penicillium種、Chaetomium種、Emercella種及びPhanerochaete種である。Emercella様セルラーゼを所有するものと

40

50

して予期される特定の生物は、Chaetomium Thermophilum var. therm., Chaetomium atrobrunneum, Chaetomium brasiliense, Chaetomium globosum, Chaetomium vitellium, Paecilomyces lilacinus, Chaetomium thermophilum var. dissitum, Humicola insolens, Humicola brevis, Memnoniella echinata, Fusarium equiseti, Fusarium oxysporum, Fusarium stilboides, Myceliophthora, Fusarium javanicum, Humicola grisea, var. thermoidea, Stibella thermophila, Melanocarpus albomyces, Arthrobotrys superba, Myceliophthora hinunilea, Chaetomium pachypodiodes, Myrothecium verrucaria, Penicillium crysogenum, Malbranchea sulfurea, Lunulospora curvula, Emericella desertorum, Acromonium strictum, Cylindrocarpon heteronema, 及び Ulocladium chartarum を含む。放線菌の中で、Streptomyces は E G I I I 様セルラーゼを所有しているらしい。

10

【0030】

本発明による E G I I I 様セルラーゼは以下の方法に従い得てよい。縮重 DNA プライマーを、

20

【0031】

【化2】

- 1) Asn-Asn-(Leu/Phe/Lys/Ile)-Trp-Gly (SEQ ID NO:25)
- 2) Glu-(Leu/Phe/Ile)-Met-Ile-Trp (SEQ ID NO:26)
- 3) Gly-Thr-Glu-Pro-Phe-Thr (SEQ ID NO:27);
- 4) (Ser/Tyr/Cys/Trp/Thr/Asn/Lys/Arg)-(Val/Pro)-(Lys/Ala)-(Ser/Ala)-(Tyr/Phe) (SEQ ID NO:28); 及び
- 5) Lys-Asn-Phe-Phe-Asn-Tyr (SEQ ID NO:29)

30

【0032】

の一つ又は複数からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするように構築し、そして確立された方法によりセルロース溶解活性を有する酵素をコードする DNA 及び遺伝子をクローン化するのに使用される。縮重プライマーを用いて DNA を得る技術は当業者の範囲内であり、Sambrook, et al. においてか又は CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY - A LABORATORY MANUAL (第2版) 1-3巻、Cold Spring Harbor Publishing (1989) (「Sambrook」); 及び CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, et al., (編纂), Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing and Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1997補遺) (「Ausubel」) に見いだすことができる。さらに、発明の E G I I I は、分子生

40

50

物学の慣用の方法、例えば、標識プローブを用いたライブラリースクリーニング、発現スクリーニング及び *Penicillium* クローン化により、本明細書において E G I I 様セルラーゼとして同定されたセルラーゼバックボーンの一つを用いて、得てよい。

【0033】

縮重プライマーは、与えられた断片が標的生物中で類似の配列に相関するか否かを分析するために、標的生物から得られたゲノミックライブラリーに対してハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。有用なハイブリダイゼーションアッセイは以下のとおりである：特定の標的源からのゲノミックDNAを制限酵素：例えば *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *ClaI*, *KpnI*, *MluI*, *SpeI*, *BglII*, *NcoI*, *XbaI*, *XhoI* 及び *XmaI* (New England Biolabs, Inv., Beverly, MA and Boeringer Mannheim により供給された) による、製造者の指示書に従った消化により断片化する。次に、サンプルをアガロースゲルを通して電気泳動して(例えば、0.7%アガロースのような)、DNA断片の分離がサイズにより可視化できる。ゲルを簡単に蒸留水中で洗い、そして次に適切な溶液(例えば、0.25M HClのような)中でゆるやかな攪拌により脱プリン化し、そして30分間変性させる(例えば0.4M NaOH中で)。再生の工程は、ゲルを1.5M NaCl, 1M Tris, pH7.0の中においてゆるやかに30分間攪拌する。次に、DNAを適切な陽性電荷膜、例えば Maximum Strength Nytran Plus 膜 (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.) に、転写溶液(例えば、6XSSC (900mM NaCl, 90mM) クエン酸3ナトリウムのような)を用いて転写する。転写後に、ゆるやかに2時間またはそれ以上、膜を洗浄して(例えば、2XSSC [2XSSC = 300mM NaCl, 30mM クエン酸3ナトリウム] 中で)、室温において空気乾燥する。次に、膜を再度ハイブリダイズさせる(約2時間またはそれ以上)が、適切な再ハイブリダイゼーション溶液(例えば、100mLあたり：30-50mLホルムアミド、25mLの20XSSPE (1XSSPE = 0.18M NaCl, 1mM EDTA, 10mM NaH₂PO₄, pH7.7), 2.5mLの20%SDS、及び1mLの10mg/ml 専断ニシン精子DNAを含む水溶液のような)中においてである。

【0034】

上記プライマー配列に相当するDNAプローブをアガロースゲル中で単離して、断片をゲルから切り出して、そして切り出したゲルから回収する。この精製されたDNA断片を次に標識する(例えば、製造者の指示書に従い Megaprime 標識システムを用いることにより P³² をDNAに取り込む (Amersham International PLC, Buckinghamshire, 英国))。標識されたプローブを95において5分間変性させ、そしてすぐに上記膜を含む再ハイブリダイゼーション溶液に加える。ハイブリダイゼーション反応は適切な時間の間、適切な条件下で進行するべきであり、例えば、18時間37にてゆるやかに攪拌する。上記膜を洗浄し(例えば、2XSSC/0.3%SDS中)、次に適切な洗浄溶液を用いて洗浄して、ゆるやかに攪拌する。所望のストリンジェンシーが、膜(フィルター)を洗浄する条件の反映になる。

【0035】

特定すれば、与えられた反応のストリンジェンシー(即ち、ハイブリダイゼーションの成功に必要な相同性の程度)は、サザンプロットからのフィルターがハイブリダイゼーション後に供される洗浄条件に大きく依存する。本明細書にて定義される「低ストリンジェンシー」条件は、0.2XSSC/0.1%SDSの溶液を用いた20における15分間のサザンプロットからのフィルターを洗浄することを含む。標準のストリンジェンシー条件は、0.2XSSC/0.1%SDSの溶液を用いた37における30分間の2回目のサザンプロットからのフィルターの洗浄を含む洗浄工程をさらに含む。

【0036】

発明のこの側面による好ましい態様において、縮重プライマーは、一つ又は複数の上記ペプチドに対応して調製される。上記プライマーを標準反応を開始するのに適した条件下で

標的生物（即ち、EGIII様セルラーゼを検索した生物）からのゲノミックDNAと混合する。この態様において、(c)及び/又は(e)に対応するペプチド(a)及び/又は(d)プラスプライマーに相当する縮重プライマーを選択して、それらのプライマーを用いてDNAを増幅するのが有利である。PCR反応を実行後に、結果のDNAをポリアクリルアミドゲル上を移動させ、(c)及び/又は(e)に加えて、ペプチド(a)及び/又は(d)を含むEGIII断片にサイズが相当するバンド、即ち400 - 1000塩基対の範囲のバンドを選択する。これらの断片をプールして、ペプチド(b)に相当するペプチド(a)及び/又は(d)プラスプライマーに相当するプライマーを用いるかあるいはペプチド(b)に相当するペプチド(c)及び/又は(e)プラスプライマーに相当するプライマーを用いて再度増幅する。予測されたサイズの強いバンド(EGIII様セルラーゼの場合、バンドは約250 - 500塩基対に相当する)を切り出し、そして配列決定する。単離された配列を次にプライマーのデザインに用いて、これらのプライマーを、例えばゲノミックDNAの末端の迅速な増幅(RAGE)を通して用いることにより、完全長の遺伝子を得る。例えば、Mizobuchi, et al., BioTechniques 15: 215 - 216 (1993)を参照。

10

【0037】

上記概要のDNAプライマーとハイブリダイズするDNA、即ち対応するEGIIIコーディング遺伝子をこの方法により同定したDNAを、日常的な方法により単離して、日常的な技術に従い対応するEGIII様セルラーゼを発現させるために使用してよい。クローン化された遺伝子を得る際、適切な宿主細胞を次に形質転換可能なベクターに上記DNAを挿入するための日常的な方法を用いる。適切な条件下で形質転換された宿主細胞を培養することは、必要に応じて特定の応用のために得ることができて、精製できてかつ調製できるEGIII様セルラーゼの生産をもたらす。

20

【0038】

発明のEGIII様セルラーゼは単離するか又は精製するのが好ましい。本発明のコンテキストにおいて、精製又は単離は一般的に、EGIII様セルラーゼを、天然において、例えば源生物において付随する天然に生じる置換体のいくつか又は全て、例えばEGIIIセルラーゼに関連して源生物から発現される他のセルラーゼ又は酵素から分離する目的で、EGIII様セルラーゼをその天然状態から変更させることを意味する。同様に、発明のEGIII様セルラーゼは天然状態において天然に存在しない他の成分と化合してよい。単離又は精製は、当業界において認識される分離技術、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、疎水性分離、透析、プロテアーゼ処理、硫酸アンモニウム沈殿又は他の蛋白質塩沈殿技術、遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィー、濾過、マイクロ濾過、ゲル電気泳動又は勾配上の分離により、最終の組成物中において不所望な細胞、細胞残渣、不純物、無関係な蛋白質、又は酵素を除去してよい。

30

【0039】

EGIII内に存在する残基に「相当する」か又は「均等な」EGIII様セルラーゼ中の残基は、一次配列相同性、三次構造相同性（例えば、結晶構造又はコンピューターモデリングにより示される）又は機能均等性により示されるとおり、EGIII中のその均等な位置に存在する残基を意味する。変種EGIII様セルラーゼは、前駆体EGIII様セルラーゼのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を有する。前駆体セルラーゼは天然のセルラーゼ及び組換えセルラーゼを含む（本明細書において定義される）。EGIII様セルラーゼのアミノ酸配列は、前駆体アミノ酸配列の一つ又は複数のアミノ酸の置換、欠失又は挿入により前駆体EGIII様セルラーゼアミノ酸配列に由来する。そのような修飾は、前駆体セルラーゼ酵素自体の操作よりむしろ前駆体セルラーゼのアミノ酸配列をコードする前駆体DNA配列の修飾である。前駆体DNA配列のそのような操作のための適切な方法は、本明細書そして権利者が同じ米国特許第4,760,025号及び第5,185,258号に開示された方法を含む。界面活性剤の存在下で不安定性に必須の位置に相当する特定の残基が置換又は欠失に関して本明細書に同定される。アミノ酸の数（例えば、+35）は、図1に示す成熟*Trichoderma reesei*のEGIII

40

50

配列に付された番号を意味する。発明は、*Trichoderma reesei*のEGIII中で特に同定された残基に均等な位置のアミノ酸残基を含むEGIII様セルラーゼの変異に向けられる。前駆体セルラーゼの残基（アミノ酸）は、それが*Trichoderma reesei*のEGIII中の特定の残基又は残基の位置に相同であるか（即ち、一次又は三次構造の何れかの位置に相当する）又は機能上類似である（即ち、同じか又は類似の、化学上又は構造上、結合、反応又は相互作用する能力を有する）なら、*Trichoderma reesei*のEGIIIの残基に均等である。本明細書にて使用されるとおり、ナンバリングは図2に示した成熟EGIIIアミノ酸配列のそれに対応することを意図する。

【0040】

*T. reesei*以外の生物からEGIII様セルラーゼの相当する残基を決定するため、配列整列化をEGIII様セルラーゼと共に上記のとおりに生じさせる。*T. reesei*中の既知の位置の残基を上記整列化上で同定して位置決定する。他のEGIII様セルラーゼの相当する残基を決定することができる。例えば、配列整列化を図3に示す。成熟EGIIIの35位のアラニンは、上記配列整列化の81位に相当する。*H. grisea*由来の相当する残基はアスパラギン酸である。

【0041】

相同性蛋白質は、「配列比較計算式」を用いて決定することもできる。比較のための配列の最適な整列化は、例えば、Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)の局所相同性計算式によるか、Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970)の相同性整列化計算式によるか、Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988)の類似性検索法によるか、これらの計算式のコンピューター化の実行によるか（ウイスコンシンジェネティクスソフトウェア、ジェネティクスコンピューターグループ、575サイエンス Dr., Madison, WIのGAP, BESTFIT, FASTA及びTFASTA）、又は可視点検により行うことができる。

【0042】

配列類似性を決定するために適した計算式の例はBLAST計算式であり、Altschul, et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)に記載される。BLAST計算式の実行するためのソフトウェアは、バイオテクノロジー情報国立センター（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）を通して公的に利用可能である。この計算式は、データベース配列中の同じ長さの言葉と整列化したときに、いくつかの陽性評価された閾値スコアに適合するか又は満足する質問配列中の長さWの短い言葉を同定することにより、高いスコアの配列対（HSPs）を最初に同定することを含む。これらの初期の隣接する言葉のヒットはそれらを含む長いHSPsを発見するための開始ポイントとして作用する。言葉のヒットは、蓄積する整列化のスコアが増加し得る限り、2つの配列の各々が比較される両方向に沿って伸長する。言葉のヒットの伸長は、蓄積する整列化スコアが達成された最大値からの量Xにより低下する場合；蓄積スコアがゼロ又はそれ以下になる場合；又は何れかの配列の末端が延びる（reached）場合に停止する。BLAST計算式のパラメーターW、T及びXは整列化の感度と速度を決定する。BLASTプログラムは欠点としてワード長（W）11、BLOSUM&2スコアリングマトリックス（Henikoff & Henikoff, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)を参照）整列化（B）50、気体（E）10、M'5、N'-4、及び両鎖の比較を用いる。

【0043】

BLAST計算式は次に、2つの配列間の類似性の統計分析を実施する（例えば、Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877 (1993)を参照）。BLAST計算式により提供される類似性の一つの測定は最少合計確率（P(N））であり2つのヌクレオチド又は間の配列の間

10

20

30

40

50

の適合が偶然起こる確率の指標を提供する。例えば、プロテアーゼアミノ酸配列に対する試験アミノ酸配列の比較における最少合計確率が約 0.1 未満、より好ましくは約 0.01 未満、そしてもっとも好ましくは約 0.001 未満ならば、アミノ酸配列はプロテアーゼに類似であると考えられる。

【0044】

「均等な残基」は、x線結晶解析によりその三次構造が決定された前駆体プロテアーゼに関する三次構造のレベルにおいて相同性を決定することにより定義してもよい。均等な残基は *H. schweinitzii* 及び *T. reesei* からの EGI II 相同物の特定のアミノ酸残基の主鎖の 2 つ又は複数の原子の原子配位結合 (N 上の N、CA 上の CA、C 上の C、O 上の O) が整列化後に 0.13 nm 及び好ましくは 0.1 nm の範囲であるものとして定義される。整列化は、最良のモデルが並べられて配置されることにより、*T. reesei* の EGI II に対して問題の EGI II 相同物の非水素蛋白質原子の原子配位結合の最大のオーバーラップを提供した後に達成される。最良のモデルはもっとも高い解析において実験上異なるデータに関するもっとも低い R 因子を利用可能にさせる結晶解析モデルである。

【0045】

【数 1】

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

【0046】

T. reesei の EGI II の特定の残基に機能上類似する均等な残基は、それらが *T. reesei* の EGI II の特定の残基に対して定義され且つ原因とされるような様式にて蛋白質の構造、基質結合又は触媒性を変更するか又は修飾するか、又は一因となるコンフォメーションを採用してよい、セルラーゼのアミノ酸として定義される。さらに、それらは、与えられた残基の主鎖原子が相同の位置を占めることに基づいて均等の基準を満たさないかもしれないが、残基の側鎖原子の少なくとも 2 つの原子配位結合が *T. reesei* の EGI II の対応する側鎖原子の 0.13 nm に位置する範囲に類似の位置を占めるセルラーゼの残基 (x線結晶解析により得られた三次構造に関して) である。

【0047】

T. reesei の EGI II の結晶構造は、The Protein Society, Fourteenth Symposium, San Diego, CA, 2000 年 8 月 5 - 9 日に存在し、その開示は全体を引用により編入する。ファミリー 12 のグリコシルヒドロラーゼの相同メンバーである、*Streptomyces lividans* の Cell B の配位結合は、Sulzenbacher, et al., Biochemistry 36: 6032 (1997) 及び Sulzenbacher, et al., Biochemistry 38: 4826 (1999) に提供される。

【0048】

「変種」は、C - 末端及び N - 末端のいずれか又は両方への一つ又は複数のアミノ酸の追加、アミノ酸配列中の一つ又は複数の異なる部位における一つ又は複数のアミノ酸の置換、蛋白質の一方又は両方の末端か又はアミノ酸配列中の一つ又は複数の部位における一つ又は複数のアミノ酸の欠失、又はアミノ酸配列中の一つ又は複数の部位における一つ又は複数のアミノ酸の挿入により、前駆体蛋白質 (例えば、天然蛋白質) から誘導される蛋白質を意味する。酵素の変種の調製は、好ましくは、天然蛋白質をコードする DNA 配列を修飾し、その DNA 配列による適当な宿主の形質転換、及び修飾された DNA 配列の発現による変種酵素の形成により達成する。発明の変種 EGI II 様酵素は、前駆体アミノ酸配列との比較の上で変更されたアミノ酸配列を含むペプチドを含み、但し、当該変種 EGI II 様酵素は前駆体酵素の特徴的な酵素の特徴的なセルロース溶解性は保持するが、い

くつかの特定の側面において変更された特性を有してよい。例えば、変種 E G I I I 様酵素は増加した至適 pH 又は増加した温度安定性又は酸化安定性を有してよいが、その特徴的なセルロース溶解活性は保持する。本発明による変種は、発現されたセルラーゼ誘導体の機能活性が保持されたセルラーゼ変種 E G I I I 様酵素をコードする DNA 断片に由来してよいことが意図される。例えば、セルラーゼをコードする DNA 断片は、コードされたセルラーゼの機能活性が保持されるように、5' 又は 3' の何れかにおいてセルラーゼ DNA 配列に連結したヒンジ又はリンカーをコードする DNA 配列又はその一部をさらに含んでよい。

【 0 0 4 9 】

「発現ベクター」は、適切な宿主において上記 DNA の発現を作用させ得る適切な制御配列に作動可能のように連結させた DNA 配列を含む DNA 構築物を意味する。そのような制御配列は、転写を作用させるためのプロモーター、転写を制御するための追加のオペレーター配列、mRNA 上の適切なりボソーム結合部位をコードする配列、及び転写及び翻訳の停止を制御する配列を含んでよい。別の細胞種が別の発現ベクターと共に使用されるのが好ましい。Bacillus subtilis において使用されるベクターのための好ましいプロモーターは AprE プロモーターであり；E. coli において使用される好ましいプロモーターは Lac プロモーターであり、Saccharomyces cerevisiae において使用される好ましいプロモーターは PGK1 であり、Aspergillus niger において使用される好ましいプロモーターは glaA であり、そして Trichoderma reesei のための好ましいプロモーターは cbhI である。ベクターはプラスミド、ファージ又は単純に有力なゲノミック挿入物であってよい。適切な宿主細胞を形質転換したら、ベクターを宿主のゲノムと独立に複製させて機能させてよく、あるいは適切な条件下でゲノム自体に組み込んでよい。本明細書においては、プラスミド及びベクターを時々交換可能に使用する。しかしながら、発明は、均等な機能を担う発現ベクターの他の形態を含むことを意図し、そして当業界にて公知であるか又は公知になる。即ち、様々な宿主/発現ベクターの組み合わせをこの発明の DNA 配列を発現させるために用いてよい。有用な発現ベクターは、例えば、染色体のセグメント、非染色体及び合成 DNA 配列、例えば SV40 の様々な公知の誘導体及び公知の細菌プラスミド、例えば colE1, pCR1, pBR322, pMb9, pUC19 及びそれらの誘導体を含む E. coli 由来のプラスミド、ホストレンジの広いプラスミド、例えば RP4, ファージ DNA、例えばファージの多数の誘導体、例えば NM989 及び他の DNA ファージ、例えば M13 繊維状一本鎖 DNA ファージ、酵母プラスミド例えば 2µ プラスミド又はそれらの誘導体、真核生物において有用なベクター、例えば動物細胞において有用なベクター及びプラスミド DNA とファージの DNA の組み合わせに由来するベクター、例えばファージ DNA 又は他の発現制御配列を用いるように修飾されたプラスミドからなるとよい。本発明の発現ベクターを用いる発現技術は当業界公知であり、そして一般的には、例えば、Sambrook に記載される。しばしば、発明の DNA 配列を含むそのような発現ベクターは、組み込み事象を通して特定の種のゲノムに直接挿入することにより単細胞生物を形質転換する（例えば、Bennett & Lasure, MORE GENE MANIPULATION IN FUNGI, Academic Press, San Diego, pp. 70 - 76 (1991) 及び真菌宿主における標的化ゲノミック挿入を記載するその中で引用された文献を参照、引用により本明細書に編入される）。

【 0 0 5 0 】

「宿主株」又は「宿主細胞」は、本発明による DNA を含む発現ベクターに適した宿主を意味する。本発明において有用な宿主細胞は一般的に原核生物宿主及び真核生物宿主であり、発現を達成できるあらゆる形質転換可能な微生物を含む。好ましい宿主株は、限定ではないが、Bacillus subtilis, Escherichia coli, Trichoderma reesei (r), Saccharomyces cerevisiae 又は Aspergillus niger を含む。もっとも好ましい宿主は

10

20

30

40

50

*A. niger*である。宿主細胞、組換えDNA技術を用いて構築ベクターにより形質転換されるか又はトランスフェクトされる。そのような形質転換された宿主細胞は、変種EGIII様セルラーゼをコードするベクターを複製することができるか又は所望のペプチド生成物を発現できる。

【0051】

「シグナル配列」は、細胞外への蛋白質の成熟形態の分泌を促進する蛋白質のN-末端部分に結合したアミノ酸の配列を意味する。シグナル配列のこの定義は機能性配列である。成熟形態の細胞外蛋白質は分泌プロセスの間に分断されるシグナル配列を欠く。

【0052】

「DNAベクター」は、上で記載されたEGIII様セルラーゼ又は変種をコードする一つ又は複数のDNA断片又はDNA変種断片を含むヌクレオチド配列を意味し、変種EGIII様セルラーゼの発現を誘導するために適切な宿主細胞を形質転換することに際して使用され得る。

【0053】

「機能的に結合させた」は、制御領域、例えばプロモーター、ターミネーター、分泌シグナル又は増強領域が構造遺伝子に連結されてその遺伝子の発現を制御することを意味する。

【0054】

本発明は、変種EGIII様セルラーゼの発現、生成及び/又は単離及び使用に関する。これらの酵素は、以下に記載される方法に従い同定及び単離された遺伝子を利用する組換え方法により調製するのが好ましい。しかしながら、本発明における使用のための酵素は他の当業界で認識される手段、例えば天然単離物からの精製により得てよい。

【0055】

本発明に従いEGIII様セルラーゼを発現させるために形質転換される微生物は、*Trichoderma reesei*種由来の株を含むのが有利であるかもしれない。即ち、本発明に従いEGIII様セルラーゼを製造するための好ましい様式は、上記のとおりを検出されたEGIII様セルラーゼの一部又は全部をコードするDNAの断片を少なくとも含むDNA構築物により*Trichoderma*種の宿主細胞を形質転換することを含む。当該DNA構築物はプロモーターに機能するように結合させるのが一般的である。形質転換された宿主細胞は、次に、所望の蛋白質を発現する条件下にて生育させる。次に、所望の蛋白質生成物を実質均一までに精製する。

【0056】

別の態様において、*Aspergillus niger*を発現媒体に用いることができる。*A. niger*による形質転換技術の記載に関しては、その全体の引用によりその開示を編入する、WO 98/31821を参照されたい。

【0057】

一つの態様において、株は過剰発現された蛋白質を得るための有用な株である*T. reesei* (*reesei*)を含む。例えば、Sheir-Neiss, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:46-53 (1984)により記載されたRL-P37は上昇量のセルラーゼ酵素を分泌することが知られている。RL-P37の機能上の均等物は、*Trichoderma reesei* (*reesei*)株RUT-C30 (ATCC No. 56765)及び株QM9414 (ATCC No. 26921)を含む。これらの株は変種EGIIIを過剰発現するためにも有用なはずであることが予期される。

【0058】

潜在的に有害な天然のセルロース溶解活性の不在下で変種EGIIIを得ることが望まれる場合、変種EGIIIをコードするDNA断片を含むDNA構築物又はプラスミドの導入前に欠損させた一つ又は複数のセルラーゼ遺伝子を有していた*Trichoderma*宿主細胞株を得るために有用である。そのような株は、引用により編入される、米国特許第5,246,853号及びWO 92/06209に開示された方法により調製してよ

10

20

30

40

50

い。一つ又は複数のセルラーゼ遺伝子を欠落している宿主微生物中で変種 E G I I I を発現させることにより、同定及び次の精製の手法を単純化させる。クローン化された *Trichoderma* 種からの何れの遺伝子も欠損させることができ、例えば、*cbh1*、*cbh2*、及び *egl3* 遺伝子並びに E G I I I 及び / 又は E G V 蛋白質をコードするものである（例えば、それぞれ、米国特許第 5,475,101 号及び WO 94/28117）。

【0059】

遺伝子の欠損は、欠損されるか又は破壊されるべき所望の遺伝子の形態を当業界公知の方法によりプラスミドに挿入することにより達成してよい。欠損したプラスミドは次に適当な制限酵素部位において所望の遺伝子コーディング領域内部で切断されて、そして遺伝子コーディング配列又はその一部を選択マーカーで置き換える。欠損させるか又は破壊する遺伝子の位置の周辺の DNA 配列は、好ましくは約 0.5 から 2.0 kb であり、選択可能なマーカー遺伝子の何れかのサイド上に保持される。適当な欠損プラスミドはその中に存在する唯一の制限酵素部位を有することにより、欠損遺伝子を含む断片、周辺 DNA 配列、及び選択可能なマーカー遺伝子が単一の直鎖片として除去されることを可能にさせる。

【0060】

選択可能なマーカーは、形質転換された微生物の欠損を可能にさせるように選択されなければならない。選択された微生物において発現されるあらゆる選択可能なマーカー遺伝子が適することになる。例えば、*Trichoderma* 種に関しては、選択可能なマーカーは形質転換体において選択可能なマーカーの存在が上記真菌の特性に顕著に影響しないように選択される。そのような選択可能なマーカーはアッセイ可能な生成物をコードする遺伝子であってよい。例えば、*Trichoderma* 種の遺伝子の機能性コピーを使用してよく、宿主内で欠損しているなら、栄養要求性表現型を表す宿主株をもたらす。

【0061】

好ましい態様において、*Trichoderma* 種の *pyr4*⁻ 誘導株は機能性 *pyr4* 遺伝子により形質転換されて、即ち、形質転換のための選択可能なマーカーを提供する。*pyr4*⁻ 誘導株は、フルオロオロティック酸 (FOA) に耐性の *Trichoderma* 種の株の選択により得てよい。*pyr4* 遺伝子はオロチジン - 5'-モノホスフェートデカルボキシラーゼをコードし、ウリジンの生合成に必要な酵素である。完全な *pyr4* 遺伝子を含む株はウリジン欠損培地中で生育するが、フルオロオロティック酸には感受性である。機能性のオロチジンモノホスフェートデカルボキシラーゼ酵素を欠く *pyr4*⁻ 誘導株を選択して、FOA 耐性に関して選択することにより、生育のためにウリジンを要求することは可能である。FOA 選択技術を用いることにより、機能性オロチレートピロホスホリボシルトランスフェラーゼを欠くウリジン要求株を得ることも可能である。この酵素をコードする遺伝子の機能するコピーによりこれらの細胞を形質転換することができる (Berges & Barreau, Curr. Genet. 19:359-365 (1991))。誘導株の選択は上で言及された FOA 耐性技術を用いて容易に実施され、即ち、*pyr4* 遺伝子は選択可能なマーカーとして好ましく用いられる。

【0062】

一つ又は複数のセルラーゼ遺伝子を発現することに関する能力を欠如させるために *pyr4*⁻ *Trichoderma* 種を形質転換するため、破壊されたか又は欠損させたセルラーゼ遺伝子を含む単一の DNA 断片を次に欠損プラスミドから単離して、適当な *pyr4*⁻ *Trichoderma* 宿主を形質転換するのに用いた。次に、*pyr4* 遺伝子産物を発現させて即ち宿主株のウリジン栄養要求性を相補するそれらの能力に基づいて、形質転換体を同定及び選択する。サザンブロット分析を次に結果の形質転換体を実施することにより、欠損させた遺伝子のゲノミックコピーのコード領域の一部又は全てを *pyr4* 選択可能なマーカーにより置き換える二重クロスオーバー組み込み事象を確認 (identify) 及び確認 (confirm) する。

【0063】

10

20

30

40

50

上記の特定のプラスミドベクターは pyr 形質転換体の製造に関するが、本発明はこれらのベクターに限定されない。様々な遺伝子を上記技術を用いて *Trichoderma* 種において欠損及び置換させることができる。さらに、何れかの利用可能な選択可能なマーカーを上記のとおり用いることができる。事実、クローン化されて即ち同定された何れの *Trichoderma* 種の遺伝子も上記の戦略を用いてゲノムから欠損させることができる。

【0064】

上記のとおり、用いられた宿主株は、非機能性遺伝子又は選択された選択可能なマーカーに相当する遺伝子を欠くか又は有する *Trichoderma* 種の誘導体である。例えば、pyr4の選択可能なマーカーを選択したら、次に、特定のpyr4⁻誘導株を形質転換法においてレシピエントとして用い。同様に、*Aspergillus nidulans*の遺伝子amdS, argS, argB, trpC, niaDに均等な*Trichoderma*種遺伝子を含む選択可能なマーカーを用いてよい。対応するレシピエント株は、よって、誘導株、例えばそれぞれargB⁻, trpC⁻, niaD⁻でなければならない。

10

【0065】

次に、適当な微生物への挿入のために、変種EGIIIセルラーゼをコードするDNAを調製する。本発明によれば、変種EGIIIセルラーゼをコードするDNAは、機能するセルロース溶解活性を有する蛋白質をコードするのに必要なDNAを含む。変種EGIIIセルラーゼ又は誘導体をコードするDNA変種断片は、真菌のプロモーター配列、例えばcbh1又はegl1遺伝子のプロモーターに機能するように連結されてよい。

20

【0066】

EGIII様セルラーゼをコードするDNAの一つより多いコピーを株の中で組換えることにより過剰発現を促進することも意図される。EGIII様セルラーゼをコードするDNAは、セルラーゼをコードするDNAを有する発現ベクターの構築により製造してよい。EGIII様セルラーゼをコードする挿入されたDNA断片を有する発現ベクターは、所定の宿主生物内で自律複製可能であるか、又は宿主のDNAに組み込み可能であるあらゆるベクターであってよく、典型的にはプラスミドである。好ましい態様において、遺伝子発現を得るための2種類の発現ベクターが意図される。第1は、プロモーター、遺伝子コード領域、及びターミネーター配列の全てが発現される遺伝子起源である、DNA配列を含む。遺伝子の末端削除は、不所望のDNA配列（例えば、望まないドメインをコードする配列）を欠損させることにより、それ自身の転写及び翻訳制御配列の制御下で発現されるドメインを残すことが望まれる場合に、得てよい。選択可能なマーカーも当該ベクター上に含まれることにより、新規の遺伝子配列の複数コピーの宿主への組み込みのための選択を可能にさせる。

30

【0067】

第2の種類の発現ベクターは予め集合させ、そして高いレベルの転写に必要な配列及び選択可能なマーカーを含む。遺伝子又はその一部のコード領域をこの一般的な目的の発現ベクターに発現カセットプロモーター及びターミネーター配列の転写制御下に挿入できることが意図される。例えば、pTEXはそのような一般的な目的の発現ベクターである。遺伝子又はその一部は強いcbh1プロモーターの下流に挿入することができる。

40

【0068】

上記ベクター中では、本発明のEGIII様セルラーゼをコードするDNAを転写及び翻訳配列、即ち適当なプロモーター配列及びシグナル配列に作動可能なように構造遺伝子とインフレームにて連結させるべきである。プロモーターは、宿主細胞中で転写活性を示す如何なるDNA配列でもよく、そして宿主細胞に対して同種又は異種の何れかの蛋白質をコードする遺伝子に由来してよい。上記シグナルペプチドは、EGIII様セルラーゼ又はその誘導体の細胞外生産を提供する。シグナル配列をコードするDNA配列は発現される遺伝子に天然では付随しているのが好ましいが、しかしながら、あらゆる適当な源、例えば*Trichoderma*由来のエキソセロピオヒドラーゼ又はエンドグルカナーゼか

50

らのシグナル配列が本発明において意図される。

【0069】

本発明のE G I I I様セルラーゼをコードするDNA配列のプロモーターとの連結及び適当なベクターへの挿入に用いられる手法は、当業界においてよく知られている。

【0070】

上記のDNAベクター又は構築物は、公知の技術、例えば形質転換、トランスフェクション、マイクロインジェクション、マイクロポレーション、バイオリスティック砲撃等により宿主細胞に導入してよい。

【0071】

好ましい形質転換技術において、Trichoderma種内のDNAへの細胞壁の透過性が極めて低いことを考慮しなければならない。従って、所望のDNA配列、遺伝子又は遺伝子断片の取り込みはせいぜい最少である。形質転換プロセスの前に、誘導株（即ち、使用した選択可能なマーカーに相当する機能性遺伝子を欠く）内のTrichoderma種の細胞壁の透過性を増加させるための多数の方法が存在する。

10

【0072】

形質転換のためにTrichoderma種を製造するために本発明において好ましい方法は、真菌の菌糸体からのプロトプラストの調製を含む。菌糸体は出芽した生長性胞子から得ることができる。菌糸体を、細胞壁を消化する酵素により処理することにより、プロトプラストをもたらす。次に、プロトプラストを懸濁媒質中で浸透圧スタビライザーの存在により保護する。これらのスタビライザーはソルビトール、マニトール、塩化カリウム、硫酸マグネシウム等を含む。通常、これらのスタビライザーの濃度は0.8Mと1.2Mの間で変動する。懸濁媒質中で約1.2Mのソルビトール溶液を用いることが好ましい。

20

【0073】

宿主Trichoderma種株へのDNAの取り込みはカルシウムイオン濃度に依存する。通常、約10mM CaCl₂と50mM CaCl₂の間が取り込み溶液において用いられる。取り込み溶液におけるカルシウムイオンに関する要求のほかにも、通常含まれる他のアイテムは緩衝系、例えばTEバッファー（10mM Tris, pH 7.4; 1mM EDTA）又は10mM MOPS, pH 6.0バッファー（モルフォリンプロパンスルフォニック酸）及びポリエチレングリコール（PEG）である。ポリエチレングリコールは細胞膜を融合させて、即ち媒質の含有物がTrichoderma種の細胞質へ送達されることを許容して、そしてプラスミドDNAが核に移送されると信じられる。この融合は、宿主染色体へ優しく（tenderly）組み込まれたプラスミドDNAの複数コピーをしばしば残す。

30

【0074】

通常、10⁸から10⁹/ml、好ましくは2×10⁸/mlの密度にて透過性処理に供されたTrichoderma種のプロトプラスト又は細胞を含む懸濁液を形質転換に用いる。適当な溶液（例えば、1.2Mソルビトール; 50mM CaCl₂）中のこれらのプロトプラスト又は細胞の100マイクロリットル容量を所望のDNAと混合する。通常、高濃度のPEGを取り込み溶液に加える。0.1から1容量の25% PEG 4000をプロトプラスト懸濁液に加えることができる。しかしながら、プロトプラスト懸濁液に約0.25容量を加えるのが好ましい。付加物、例えばジメチルスルフォキシド、ヘパリン、スペルミジン、塩化カリウム等も取り込み溶液に加えて、形質転換を補助してよい。

40

【0075】

通常、上記混合物を10分から30分の間0においてインキュベートする。追加のPEGを次に混合物に加えることにより、所望の遺伝子又はDNA配列のとりこみをさらに増強する。25% PEG 4000を通常は形質転換混合物の容量の5から15倍の容量にて加える；しかしながら、より高いか又はより低い容量が適当かもしれない。25% PEG 4000は形質転換混合物の容量の約10倍が好ましい。PEGを加えた後に、形質

50

転換混合物を次に室温においてソルビトールとCaCl₂溶液の添加前にインキュベートする。プロトプラスト懸濁液を次にさらに加えることにより生育培地のアリコート溶解する。この生育培地は形質転換体の生育のみを許容する。所望の形質転換体を生育させるのに適した如何なる生育培地も本発明において使用できる。しかしながら、Py^r+形質転換体が選択されるなら、ウリジンを含まない生育培地を用いることが好ましい。次のコロニーをウリジン枯渇生育培地上に移して精製する。

【0076】

この段階において、ウリジンを欠く固形培養培地上でのそれらの早い生育及び不規則な輪郭よりむしろスムーズな環状コロニーの形成により、安定な形質転換体を不安定な形質転換体から識別してよい。さらに、いくつかの場合、安定性に関するさらなる試験を、固形
10
の非選択培地上で形質転換体を生育させ（即ちウリジンを含む）、この培養培地から胞子を回収し、そしてウリジンを欠く選択培地上でのちに出芽及び生育するこれらの胞子のパーセンテージを測定することにより行ってよい。

【0077】

上記の方法の特定の態様において、EGIII様セルラーゼ又はその誘導体は、新規なEGIII様セルラーゼ又はその誘導体の適切な後翻訳プロセスの結果として、液体培地中
10
で生育させた後に宿主細胞から活性形態で回収される。

【0078】

発現されたEGIII様セルラーゼは、遠心分離、濾過及び塩、例えば硫酸アンモニウムによる上清又は濾過物中の蛋白質の沈殿により培地からの細胞の分離を含む慣用技術により培地が回収してよい。さらに、クロマトグラフィー手法、例えばイオン交換クロマトグラフィー又は親和性クロマトグラフィーを使用してよい。抗体（ポリクローナル又はモノクローナル）を天然の精製されたEGIII様セルラーゼに対して生じさせてよく、あるいは合成ペプチドをEGIII様セルラーゼ分子の一部から製造して、ポリクローナル抗体を生じさせるために用いてよい。
20

【0079】

より熱に安定なEGIII様セルラーゼからの残基のEGIIIセルラーゼへの置換はより安定なEGIIIをもたらしことは好ましいが、それはほんの起こり得る有用な結果ではない。当業者にとって、安定性の低いEGIIIセルラーゼをもたらし置換は、例えば、デリケートな織物を処理するのに用いる組成物において、及び活性なEGIIIの存在
30
の延期が望ましくない他の応用においても有用であることも明らかになる。さらに、当業者は、逆置換（converse substitutions）が有用であることを認識する。例えば、より熱安定性の低いEGIIIからの残基をより安定性の高いEGIII様セルラーゼに置換することにより、安定性の低い（か又は高い）EGIII相同体を作成することができる。再び、低い安定性の相同体は活性なセルラーゼの存在が延期される必要がない場合に、使用することができる。

【0080】

本発明による織物の処理は、セルラーゼを含む織物の加工又は洗浄を意図する。そのような処理は、限定ではないが、ストーンウォッシュ、セルロース含有織物の手ざわり、質感及び/又は外観を修飾すること又はセルロース含有織物の製造、洗濯/修理の間に使用される他の技術を含む。さらに、この発明のコンテキスト内での処理は、セルロース編み糸又は繊維製品からの「未成熟な」又は「死んだ」コットンの除去を意図する。未成熟なコットンは成熟コットンよりも顕著に無定形であり、そして例えば平行でない乾燥により存在する場合に質の低い織物をもたらし。本発明において意図される組成物は、さらに、よ
40
ごして製造されたセルロース含有織物の洗浄における使用のためのセルラーゼ成分を含む。例えば、セルラーゼは洗濯ランドリーのための界面活性剤組成物中で使用してよい。本発明により有用な界面活性剤組成物は、特定の製剤、例えば、洗浄前の、前以て浸す、そしてホームユースの色再生組成物を含む。本明細書において記載されるそのような処理組成物は、希釈を必要とする濃縮物の形態又は希釈溶液の形態又はセルロース含有織物に直接適用できる形態であってよい。織物のセルラーゼ処理の一般的な処理技術は、例えば、
50

E P 公開番号 2 2 0 0 1 6 及び G B 出願番号 Nos . 1 , 3 6 8 , 5 9 9 号及び 2 , 0 9 5 , 2 7 5 号に記載される。

【 0 0 8 1 】

本発明によるセルロース溶解物質の処理は、さらに、動物用飼料、パルプ及び/又は紙、当業界公知の食品及び穀類の処理を意図する。例えば、セルラーゼは動物飼料の有用性を高め、ウッドパルプの排水性 (drainability) を改善し、食品を増強し、そして穀類の湿潤製粉プロセス又は乾燥製粉プロセスの間に穀類中の繊維を減少させることが知られている。

【 0 0 8 2 】

本発明による処理は、有効量のセルラーゼ並びに他の任意の成分、例えばバッファー、界面活性剤、及び/又は研磨剤を包含する成分を含む水性溶液を含む。有効量のセルラーゼ酵素組成物はその意図される目的のために十分なセルラーゼ酵素の濃度である。即ち、例えば、本発明によるストーンウォッシング組成物中の「有効量の」セルラーゼは、例えば使い古されて色あせた外観を縫い目の中及び織物パネル中に生じさせる所望の効果を提供することになる量である。同様に、セルロース含有織物の質感及び/又は外観を改善することを意図した組成物中の「有効な量の」セルラーゼは、質感における測定可能な改善、例えば織物のスムーズさを改善すること、又は外観を改善すること、例えば織物の外観において鋭さを低下させる傾向がある毛玉 (pills) 及び原繊維 (fibrils) を除去する量である。用いられるセルラーゼの量は、用いられる装置、用いられるプロセスパラメーター (セルラーゼ処理溶液の温度、セルラーゼ溶液への暴露時間等)、及びセルラーゼの活性 (例えば、活性の低いセルラーゼ組成物に比較してより活性の高いセルラーゼ組成物を用いる場合、特定の溶液が低濃度のセルラーゼに必要となる) にも依存する。織物が処理される水性処理溶液中のセルラーゼの正確な濃度は、上記因子並びに所望の結果に基づいて当業者により容易に決定することができる。ストーンウォッシングプロセスにおいては、セルラーゼを約 0 . 5 から 5 , 0 0 0 p p m、もっとも好ましくは約 1 0 から 2 0 0 p p m 全蛋白質の濃度にて水性処理溶液中に存在させることが一般的には好ましかった。セルロース含有織物の質感及び/又は外観の改善のための組成物においては、約 0 . 1 から 2 0 0 0 p p m、もっとも好ましくは約 0 . 5 から 2 0 0 p p m 全蛋白質の濃度にてセルラーゼが水性処理溶液中に存在することが一般的に好ましいとされてきた。

【 0 0 8 3 】

好ましい処理態様において、バッファーは、用いられたセルラーゼが活性を呈し、そして今度は用いられたセルラーゼの性質に依存する範囲内で溶液の pH を保持するのにバッファーの濃度が十分であるように、処理用組成物中に存在するように用いる。用いられるバッファーの正確な濃度は、当業者が容易に参酌できるいくつかの因子に依存することになる。例えば、好ましい態様において、バッファー、並びにバッファー濃度は、最適なセルラーゼ活性に必要な pH 範囲内で最終セルラーゼ溶液の pH を維持するように選択される。発明のセルラーゼの最適な pH 範囲の測定はよく知られた技術に従い確かめることができる。上記セルラーゼの活性範囲内の pH における適切なバッファーは、当業者によく知られている。

【 0 0 8 4 】

セルラーゼ及びバッファーに加えて、処理組成物は任意に界面活性剤を含んでよい。適当な界面活性剤は、上記セルラーゼ及び織物に適合可能な何れの界面活性剤も含み、例えばアニオン性、非イオン性及び両性の界面活性剤を含む。本明細書中の使用のための適当なアニオン性界面活性剤は、直鎖又は分枝のアルキルベンゼンスルフォネート；直鎖又は分枝アルキル基又はアルケニル基を有するアルキル又はアルケニルエーテルスルフェート；アルキル又はアルケニルエーテルスルフェート；オレフィンスルフォネート；アルカンスルフォネート等を含む。アニオン性界面活性剤のための適当なカウンターイオンは、アルカリ金属イオン、例えばナトリウム及びカリウム；アルカリ土類金属イオン、例えばカルシウム及びマグネシウム；アンモニウムイオン；及び炭素数 2 又は 3 の 1 から 3 のアルカノール基を有するアルカノールアミンを含む。両性界面活性剤は、第四級スルホン酸アン

10

20

30

40

50

モニウム、及びベタインタイプの両性界面活性剤を含む。そのような両性界面活性剤は、同じ分子中に陽性荷電基と陰性荷電基の両方を有する。非イオン性界面活性剤は一般的に、ポリオキシアルキレンエーテル、並びに高脂肪酸アルカノールアミド又はそのアルキレンオキシド付加物、及び脂肪酸グリセリンモノエステルを含む。界面活性剤の混合物は、当業者に知られている様式にて用いられることもできる。

【0085】

濃縮されたセルラーゼ組成物は本明細書に記載される方法における使用のために調製することができる。そのような濃縮物は、濃縮された量の上記セルラーゼ組成物、バッファー及び界面活性剤を、好ましくは水性溶液中に含む。そうして製剤化された場合、セルラーゼ濃縮物を水により希釈することにより、必要な濃度の各成分を有するセルラーゼ調製物を迅速かつ正確に調製することができる。水性濃縮物を製剤化する場合、これらの濃縮物を希釈することにより、上で示された通りに必要な濃度の成分をセルラーゼ溶液中にて達することができる。容易に明白なとおり、そのようなセルラーゼ濃縮物はセルラーゼ溶液の容易な製剤化を許容し、並びにそれが使用されることになる位置への上記組成物の便利な運搬を許容する。処理用濃縮物は当業界において認識された形態、例えば液体、エマルジョン、ゲル又はペーストであり得る。そのような形態は当業者によく知られている。

10

【0086】

固形のセルラーゼ濃縮物を使用する場合、セルラーゼ組成物は顆粒、粉末、塊又は固形ディスクであってよい。顆粒を製剤化することにより、洗浄媒質への顆粒の溶解速度を減じる物質を含ませることができる。そのような物質及び顆粒は、米国特許第5,254,283号に記載されており、その全体を引用により本明細書に編入する。

20

【0087】

他の物質も所望であれば本発明のセルラーゼ組成物と共にか又は代わりに用いることができ、石、軽石、充填剤、溶剤、酵素活性化剤、及び抗-再貯蔵(anti-redeposition)剤を含み、上記組成物の最後の用途に依存する。

【0088】

例示の目的で、ストーンウオッシング法を詳細に記載するが、しかし、記載されたパラメーターは、他の応用のために、例えば織物の質感及び/又は外観の改善のために当業者により容易に修飾される。セルロース含有織物を有効量のセルラーゼを含むセルラーゼ含有ストーンウオッシング組成物と接触させるが、処理された組成物とストーンウオッシング組成物とを混ぜ合わせて、そして即ちセルラーゼ酵素を織物に近接させることによる。次に、セルラーゼを含む水性溶液と織物を攪拌する。処理組成物が水性溶液ならば、織物は直接上記溶液中に浸してよい。同様に、ストーンウオッシング組成物が濃縮物であれば、当該濃縮物をセルラーゼ含有織物を含む水浴中に希釈する。ストーンウオッシング組成物が固体の形態、例えば洗濯前のゲル又は固形スティックの形態の場合、ストーンウオッシング組成物を直接に織物又は洗浄液体にかけることにより当該組成物を接触させてよい。

30

【0089】

セルラーゼ含有織物にストーンウオッシュの外観を授与させるような酵素の作用を可能にさせる条件下で、セルラーゼ含有織物をストーンウオッシング溶液とインキュベートさせる。例えば、ストーンウオッシュの間、pH、液体比率、温度及び反応時間を調節することにより、ストーンウオッシング組成物が作用する条件を最適にしてよい。「有効な条件」は必然的に、セルラーゼ酵素が、セルラーゼ含有織物と有効に反応すること、この場合にはストーンウオッシュ効果を生じさせることを可能にさせるpH、液体比率、及び温度を意味する。しかしながら、そのような条件は、当業者により容易に確かめられ得る。本発明のストーンウオッシング組成物に有効な反応条件は、対応する従来技術のセルラーゼ組成物により用いられた公知の方法に実質類似である。従って、本発明に従いストーンウオッシング組成物を使用するための条件を最大にすることは当業者の範囲内である。

40

【0090】

ストーンウオッシュの間の液体の比率、即ち織物の重量に対する、ウオッシング組成物溶液(即ち、洗浄液体)の重量比率は、本明細書で用いる場合、一般的に、デニムの織物に

50

において所望のストーンウォッシュ効果を達成するのに十分な量であり、使用されるプロセスに依存する。好ましくは、液体の比率は約 4 : 1 から約 50 : 1、より好ましくは約 5 : 1 から約 20 : 1、そしてもっとも好ましくは約 10 : 1 から約 15 : 1 である。

【0091】

本発明のストーンウォッシング組成物によるストーンウォッシュの間の反応温度は2つの競合因子により支配される。第1に、高い温度は、増強された反応キネティクス、即ち速い反応に一般的には対応し、低温において必要な反応時間に比較して反応時間の減少を可能にさせる。従って、セルラーゼは所定の反応温度を越えて活性を損失する蛋白質であって、その温度は使用されるセルラーゼの性質に依存する。即ち、反応温度があまりに高くなるまで許容すればセルロース溶解活性はセルラーゼの変性の結果として損失する。当業界におけるセルラーゼ使用のための標準温度は一般的に35 から65 の範囲内であり、その条件は発明のセルラーゼに適していると予測されるはずでもあるから、最適な温度条件は、使用される特定のセルラーゼに関してよく知られた技術に従い確認するべきである。

10

【0092】

反応時間はストーンウォッシュが起こる特定の条件に依存する。例えば、セルラーゼの pH、温度及び濃度はすべて最適反応時間に影響することになる。一般的に、反応時間は約5分から約5時間、好ましくは約10分から約3時間、そしてより好ましくは約20分から約1時間である。

【0093】

本発明のまた別の好ましい態様によると、発明のセルラーゼは洗浄剤組成物中に用いてよい。本発明による洗浄剤組成物は前洗浄剤組成物、前浸潤組成物として、又は通常の洗浄又はリンスサイクルの間の洗浄のために有用である。好ましくは、本発明の洗浄剤組成物は、有効量のセルラーゼ、界面活性剤を含み、そして任意に以下に記載される他の成分を含む。

20

【0094】

この発明の洗浄剤組成物の中に用いられる有効量のセルラーゼは、例えば、毛玉除去 (depilling)、軟化、抗 - 毛玉化、表面繊維除去、抗 - 灰色化及び洗浄を含む、セルラーゼ含有織物上でセルラーゼにより生じることが知られている所望の効果を授与するのに十分な量である。好ましくは、上記洗浄剤組成物中のセルラーゼは約 10 ppm から約 20,000 ppm の洗浄剤の濃度にて用いられる。

30

【0095】

洗浄剤組成物中に用いられるセルラーゼ酵素の濃度は、洗浄媒質への希釈に際してセルラーゼ酵素の濃度が約 0.01 から約 1000 ppm、好ましくは約 0.02 ppm から約 500 ppm、そしてもっとも好ましくは約 0.5 ppm から約 250 ppm 全蛋白質の範囲にあるように、選択されるのが好ましい。洗浄剤組成物中に用いられるセルラーゼ酵素の量は、洗浄剤が水への添加により希釈されて洗浄溶液を形成する程度に依存する。

【0096】

本発明の洗浄剤組成物は、当業界において認識されている形態、例えば液体中、顆粒中、エマルジョン中、ゲル中、又はペースト中であってよい。そのような形態は当業者によく知られている。固形の洗浄剤組成物を用いる場合、セルラーゼは顆粒として用いるのが好ましい。好ましくは、顆粒を製剤化することにより、セルラーゼ保護剤を追加して含ませることができる。顆粒を製剤化することにより、洗浄媒質への顆粒の溶解速度を低下させるための物質を含ませることができる。そのような物質及び顆粒は米国特許第 5,254,283 号に記載されており、その全体を引用により本明細書に編入する。

40

【0097】

この発明の洗浄剤組成物は表面活性化剤、例えば界面活性剤を用い、洗浄剤組成物中でのそれらの使用に関してよく知られた、アニオン性、非イオン性及び量性界面活性剤を含む。本発明の洗浄剤組成物は酸性からアルカリ性の pH にわたる広い pH 範囲において使用することができる。好ましい態様において、本発明の洗浄剤組成物は、5 から上で、12 を

50

越えない pH を有する弱酸性 (mildly acidic)、中性又はアルカリ性の洗浄剤洗浄媒質中で使用することができる。

【0098】

上記の成分とは別に、香料、バッファー、保存剤、染料等を、所望ならばこの発明の洗浄剤組成物と共に使用することができる。そのような組成物は当業界においてこれまで用いられた量にて慣用的に用いられる。

【0099】

発明のセルラーゼの使用は、飼料の添加物及びパルプ及び上の加工において特に有用であるかもしれない。これらの追加の工業上の応用は、例えばそれぞれ、PCT 公開番号 95 / 16360 及び終了した許可された特許番号 87372 に記載される。

10

【0100】

本発明及びその利点をさらに例示するために、以下の特定の実施例を、本発明を例示するために提供されるという理解のもとに提供するが、如何なる様式においてもその範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0101】

実施例

実施例 1 : E G I I I 様セルラーゼをコードするゲノミック DNA の調製

E G I I I 様セルラーゼが特定の生物の DNA によりコードされているか否かを決定するために PCR 反応に着手する目的で、いくつかの異なる微生物に関してゲノミック DNA を調製した。

20

【0102】

ゲノミック DNA は、*Acremonium brachyphenium* 寄託番号 CBS 866.73 ; *Chaetomium brasiliense* 寄託番号 CBS 140.50 ; *Chaetomium vitellium* 寄託番号 CBS 250.85 ; *Emericella desertoru* 寄託番号 CBS 653.73 ; *Fusarium equiseti* 寄託番号 CBS 185.34 ; *Gliocladium roseum* 寄託番号 CBS 443.65 ; *Humicola grisea var. thermoidia* 寄託番号 CBS 225.63 ; *Myceliophthora thermophila* 寄託番号 ATCC 48103-48104 ; *Penicillium notatum* 寄託番号 ATCC 9178, 9179 ; 及び *Phanerochaete chrysosporium* 寄託番号 ATCC 28326 から得て、標準の方法に従い単離した。

30

【0103】

PCR は、MJ リサーチ社の PCT-150 MicroCycler のような標準の PCR マシン上で、以下の条件下において実施した :

- 1) 1 分間、98 °C、1 サイクル ;
- 2) 1 分間、94 °C、90 秒間、40 °C、1 分間、72 °C ;
- 3) 工程 2 を 30 サイクル繰り返す、
- 4) 7 分間、72 °C、1 サイクル、及び
- 5) 低温から 15 °C にて貯蔵及び次の分析。

40

【0104】

以下の DNA プライマーを、様々な微生物から構築されたライブラリーからの E G I I I 遺伝子の増幅における使用のために構築した。蛋白質及び DNA の配列に関する本明細書中の全てのシンボルは、IUPAC IUB Biochemical Nomenclature Commission コードに対応する。

【0105】

【化 3】

BOX 1 : (N/Q)NLWG (SEQ ID NO:30) をコードする

フォワードプライマー FRG001: AAY AAY YTN TGG GG (SEQ ID NO:31)

フォワードプライマー FRG002: CAR AAY YTN TGG GG (SEQ ID NO:32)

BOX 1' : NNN(F/L/Y/I/L/N/K)WG (SEQ ID NO:33) をコードする

フォワードプライマー FRG010: AAY AAY AAY HWI TGG GG (SEQ ID NO:34)

10

BOX 2 : ELMIW(SEQ ID NO:35) をコードする

フォワードプライマー FRG003: GAR YTN ATG ATH TGG (SEQ ID NO:36)

リバースプライマー FRG004: CCA DAT CAT NAR YTC (SEQ ID NO:37)

BOX 2' : YELMIW (SEQ ID NO:38) をコードする

フォワードプライマー FRG011: TAY GAR YTI ATG ATH TGG (SEQ ID NO:39)

リバースプライマー FRG012: CCA DAT CAT IAR YTC RTA (SEQ ID NO:40)

20

BOX 3 : GTE(P/C)FT (SEQ ID NO:41) をコードする

リバースプライマー FRG005: GTR AAN GGY TCR GTR CC (SEQ ID NO:42)

リバースプライマー FRG006: GTR AAN GGY TCR GTY CC (SEQ ID NO:43)

リバースプライマー FRG007: GTR AAN GGY TCY GTR CC (SEQ ID NO:44)

リバースプライマー FRG008: GTR AAN GGY TCY GTY CC (SEQ ID NO:45)

リバースプライマー FRG009: GTR AAR CAY TCN GTN CC (SEQ ID NO:46)

30

【0106】

PCR条件は以下のとおりであった：10 μ Lの10X反応バッファー（100 mM Tris HCl, pH 8 - 8.5；250 mM KCl；50 mM (NH₄)₂SO₄；20 mM MgSO₄を含む10X反応バッファー）；0.2 mMの各dATP, dTTP, dGTP, dCTP（最終濃度）；1 μ Lの100 ng/ μ LのゲノミックDNA；1 μ LのPWOポリメラーゼ（ベーリンガーマンハイム、カタログ番号1644-947）を μ Lあたり1ユニット；500 mMのプライマー（最終濃度）及び水を100 μ Lまで。上記溶液にミネラルオイルを重層した。

【0107】

PCRの戦略は以下のとおりであった：BOX 1（それぞれ、SEQ ID NO：31及び32）及びBOX 2（SEQ ID NO：34）のフォワードプライマーを、BOX 3（SEQ ID NO：42 - 46）からのリバースプライマーと、所望のゲノミックDNAサンプルと共に混合し、そして400 - 1000塩基対の範囲の断片を得るためゲル上を移動させた。そうして得られた断片をプールして、当該プールを2つのおおよそ等しい部分に分割した（split）。第1のプールを、BOX 1（それぞれ、SEQ ID NO：31及び32）及びBOX 1'（SEQ ID NO：34）からのフォワードプライマーと、BOX 2（SEQ ID NO：37）からのリバースプライマーと共に、混合した。第2のプールを、BOX 2（SEQ ID NO：36）と、BOX 3（SEQ ID NO：42 - 46）からのリバースプライマーと共に、混合した。上記遺伝子内のプライマーの位置を考慮してEGIII様セルラーゼに比較して近似のサイ

40

50

ズを有する断片、この場合約250 - 500塩基対に相当する断片を単離して配列決定した。

【0108】

配列決定した断片から、完全長の遺伝子の配列を迅速に得るために、RAGE技術(ゲノミックの末端の迅速な増幅)を使用することが可能であった。完全長の遺伝子を得て、図3のいくつかの追加のEGIII様セルラーゼを提供する。図3に示すとおり、*Hypocrea schweinitzii* (SEQ ID NO:4)、*Aspergillus aculeatus* (SEQ ID NO:5)、*Aspergillus kawachii* (1) (SEQ ID NO:6)、*Aspergillus kawachii* (2) (SEQ ID NO:7)、*Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO:8)、*Humicola grisea* (SEQ ID NO:9)、*Humicola insolens* (SEQ ID NO:10)、*Chaetomium brasiliense* (SEQ ID NO:11)、*Fusarium equiseti* (SEQ ID NO:12)、*Fusarium javanicum* (1) (SEQ ID NO:13)、*Fusarium javanicum* (2) (SEQ ID NO:14)、*Gliocladium roseum* (1) (SEQ ID NO:15)、*Gliocladium roseum* (2) (SEQ ID NO:16)、*Gliocladium roseum* (3) (SEQ ID NO:17)、*Gliocladium roseum* (4) (SEQ ID NO:18)、*Memnoniella echinata* (SEQ ID NO:19)、*Emmericella desertoru* (SEQ ID NO:20)、*Actinomyces 11AG8* (SEQ ID NO:21)、*Streptomyces lividans CelB* (SEQ ID NO:22)、*Rhodothermus marinus* (SEQ ID NO:23)、及び*Erwinia carotovara* (SEQ ID NO:24)から単離された全部が、*Trichoderma reesei*由来のEGIIIに有意な相同性を含んだ。

実施例2：EGIII及びEGIII様セルラーゼの温度安定性試験

Humicola insolens、*Emmericella desertoru*、*Fusarium javanicum*及び*Memnoniella echinata*由来のEGIII及びEGIII様セルラーゼを、温度ストレス下のそれらの安定性を測定するために試験した。

【0109】

安定性は、固定された高い温度においてインキュベーションの際の活性の損失の速度をたどることによりアッセイした：50mMクエン酸/リン酸バッファーpH8.0中に置いて0.1mg/mlと0.5mg/mlの間のEGIII及びEGIII様セルラーゼの溶液を水浴中で48°Cにおいてインキュベートした。測定された時間において、100µlアリコートを取り出して、素早く冷やした(又は冷凍した)。これらのアリコート中の残りの活性は以下に詳細なとおりにアッセイされた。不可逆な熱不活性化曲線が残存活性対時間をプロットすることにより生じ、そしてデータは単一の対数減衰にフィットした。この対数減衰のハーフタイムを熱安定性の測定値として決定した。

【0110】

活性のアッセイは以下のとおりに実施した：96ウエルマイクロタイタープレートのウエル中において、10µLの酵素サンプルを50mMリン酸カリウム、pH6.7中の120µLの基質(4.2mg/ml o-ニトロフェニルセロピオシド)に加えた。次に、プレートを10分間40°Cにおいてインキュベートして、反応を70µLの0.2Mグリシンにより停止させた。410nmにおける吸光をマイクロタイタープレートリーダー中で測定した。このエンドポイントの410nmの読みは、上記酵素サンプル中のセルラーゼ活性に比例した。

【0111】

安定性試験の結果を表1に示す。

【 0 1 1 2 】

【表 1】

表 1

EGIII様セルラーゼ	ハーフタイム(分)
<i>H. grisea</i>	安定*
<i>H. insolens</i>	安定*
<i>E. desertoru</i>	200
<i>F. javanicum</i>	93
<i>M. echinata</i>	192
<i>T. reesei</i> (EGIII)	23

10

*「安定」は200分間で20%未満の活性損失を示す

上記の結果から認識し得るとおり、EGIII様セルラーゼは*T. reesei*由来のEGIIIに対して相対的に相同であるにも拘わらず、有意に改善された安定性を有した。従って、より安定な相同体において異なる残基がEGIII様セルラーゼの改善された安定性に必須であり、そしてそのようにして、これらの残基を修飾することによりEGIII様セルラーゼ及びEGIII自体のさらなる改善がEGIII及びEGIII様セルラーゼの安定性の追加の改善をもたらすことは明らかである。

実施例3：*T. reesei*及び*H. grisea*の変種EGIIIセルラーゼの安定性部位特異的変異導入を実施して、*T. reesei*のEGIIIにアミノ酸置換を取り込んだ。EGIIIへのアミノ酸の置換は、*H. grisea*の相同体の中の相同位置におけるものであった。

20

【 0 1 1 3 】

以下のプライマーを用いて、*T. reesei*由来のEGIII及び*H. grisea*由来のEGIII様セルラーゼの中のシステイン置換を生じさせた。PCRは公知の技術に従い実施した。

【 0 1 1 4 】

【表 2】

表 2 : PCRプライマー

30

EGIII- 様 セルラーゼ	変種	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>T. reesei</i>	V210C	GGA ACT CTG AAC TGC GCA TGG TGG ACC (SEQ ID NO:47)	GGT CCA GGA TGC GCA GTT CAG AGT TCC (SEQ ID NO:48)
	G170C	CCA ACT ACA GCT GTG ATG TCA AGA AC (SEQ ID NO:49)	GTT CTT GAC ATC ACA GCT GTA GTT GG (SEQ ID NO:50)
	P201C	CCA ATT TGG TAC CGA GTG CTT CAC GGG CAG TG (SEQ ID NO:51)	CAC TGC CCG TGA AGC ACT CGG TAC CAA ATT GG (SEQ ID NO:52)
<i>H. grisea</i>	C231V	CCA GGT TCA CGG TCA GGG ACT TCA GG (SEQ ID NO:53)	CCT GAA GTC CCT GAC CGT GAA CCT GG (SEQ ID NO:54)
	C190G	CGT GAC TTC AGC GGT GAC ATC AAG GAC (SEQ ID NO:55)	GTC CTT GAT GTC ACC GCT GAA GTC ACG (SEQ ID NO:56)
	C221S	GTC GGA ACA GAG TCC TTC ACA GGC GGT C (SEQ ID NO:57)	GAC CGC CTG TGA AGG ACT CTG TTC CGA C (SEQ ID NO:58)
	C221P	GTC GGA ACA GAG CCC TTC ACA GGC GGT C (SEQ ID NO:59)	GAC CGC CTG TGA AGG GCT CTG TTC CGA C (SEQ ID NO:60)
	C231S	CCA GGT TCA CGA GCA GGG ACT TCA GG (SEQ ID NO:61)	CCT GAA GTC CCT GCT CGT GAA CCT GG (SEQ ID NO:62)
	C190S	CGT GAC TTC AGC AGT GAC ATC AAG GAC (SEQ ID NO:63)	GTC CTT GAT GTC ACT GCT GAA GTC ACG (SEQ ID NO:64)

40

【 0 1 1 5 】

50

簡単に云うと、*T. reesei*又は*H. grisea*のEGIII様セルラーゼをコードするDNAをcDNAクローンから(Ward, et al., Proc. of the Tricel Symposium on "Trichoderma reesei cellulases and other hydrolases." Espoo, Finland 1993 Ed. Souminen, P. and Reinikanen, T. Foundation for Biotechnical and Industrial Research. 8, pp153 - 158; 米国特許第5,475,101号)、*egl3*遺伝子の5'末端にBglII制限エンドヌクレアーゼ部位(最初のATGコドンのすぐ上流)及び3'末端にXbaI部位を導入した(「停止」コドンのすぐ下流)PCRプライマーを用いて、増幅した。増幅された断片は、次に、BglII及びXbaIにより消化し、そしてBglII及びXbaIにより消化されたpUC19に連結した。

10

【0116】

変種はこのプロトプラスト中においてQuickChange(登録商標)変異導入法(Stratagene)を用いて作成した。変種遺伝子を次に*Aspergillus*の発現ベクターpGAPT-pyrGにサブクローン化した。これは、必須でないDNAが切り出されているPGPT-pyrG(Berka and Barnett, Biotech, Adv. 7:127(1989))の変種である。変種遺伝子を有するベクターにより次に*A. niger* var: awamorを形質転換して、その結果の株を攪拌フラスコ培養にて成育させた(WO 98/31821)。

20

【0117】

EGIII及びEGIII様セルラーゼ変種を次にこれらの培養物の細胞不含上清からカラムクロマトグラフィーにより精製した。簡単に云えば、10mgのEGIIIあたり、約1mLのPharmacia Butyl Sepharose(高速流)樹脂を0.5M硫酸アンモニウムを含む使い捨てドリッパカラムに負荷した。当該カラムを次に0.5M硫酸アンモニウムを用いて0.05MのBis Tris Propane及び0.05M酢酸アンモニウム、pH8により平衡化した。

【0118】

EGIII様セルラーゼを含む上清を一晩0.18mg/mLのエンドグルカナーゼHにより37において処理した。硫酸アンモニウムを処理上清に約0.5Mの最終濃度まで加えた。遠心分離後に、上清を上記カラムに負荷した。当該カラムを次に3容量の平衡化バッファーにより洗浄して、次に2x1容量の0.05M Bis Tris Propane及び0.05M酢酸アンモニウムによりpH8にて溶出した。フロースルーの各容量を別々の画分として回収したところ、EGIII様セルラーゼは第2の画分に出現した。

30

【0119】

平衡CD実験を、Avivにより供給された5位の熱電気セルホルダーを備えたAviv 62DS又は62ADS分光光度計により実施した。バッファー条件は酢酸によりpH8.0に調節された50mM bis-trisプロパン及び50mM酢酸アンモニウムであった。各実験に関する最終蛋白質濃度は、5-30µMの範囲であった。データを0.1cmのパスの長さのセルに回収した。

40

【0120】

スペクトルを265~210nmにおいて回収した。熱変性は217nmにおいて30から90において実施して、データを2おきに回収した。各温度における平衡時間は0.1分であり、そしてデータはサンプルあたり4秒間回収した。

【0121】

pH8.0サンプルの残りを5x400µLアリコートに分割した。2つのサンプルを酢酸によりpH5から7に調節して、2つのその他を水酸化ナトリウムによりpH9及び10に調節した。全5サンプルの熱変性は上記のとおり同時に実施した。融点を、Luo, et al., Biochemistry 34:10669及びGloss, et a

50

1. , Biochemistry 36 : 5612 の方法により測定した。

【0122】

【表3】

表3 : E G I I I 様セルラーゼの熱安定性

	EG III 残基置換	ΔT_m	T_m °C	フィット エラー	平均温度 (標準偏差)	平均フィット エラー (標準偏差)
<i>T. reesei</i>	WT	0.00	54.60	0.18	54.43(0.21)	0.20(0.02)
	P201C	3.9	58.3	0.15		
		17.4	71.8	0.23		
	G170C	2.07	56.50	0.22		
	V210C		70.60	0.47	70.80 (0.72)	0.31 (0.20)
		16.37	71.60	0.38		
		70.20	0.09			
	G170C/P201C	0.67	55.1	0.11		
	P201C/V210C	0.69	55.12	0.09		
<i>H. grisea</i>	WT	0.00	68.69	0.33		
	C231V	0.78	69.47	0.33		
	C190G	1.28	69.97	0.19		
	C221S	-5.43	63.26	0.12		
	C221P	-9.14	59.55	0.19		
	C231S	-5.55	63.14	0.18		
	C190S	0.22	68.91	0.76		

10

20

【0123】

認識し得るとおり、*H. grisea* の E G I I I 様セルラーゼ由来のシステインの *T. reesei* への補充は、野生型に比較して、変種 E G I I I 様セルラーゼの熱安定性を増大させた。予測されたとおり、E G I I I 又は他の E G I I I 様セルラーゼから *H. grisea* の E G I I I 様セルラーゼへの残基の補充は、*H. grisea* の変種 E G I I I 様セルラーゼの熱安定性を低下させたか又は効果がなかった。

30

実施例4 : 変種 E G I I I 様セルラーゼの比活性

比活性をアッセイするため、NPC の加水分解アッセイを用いた。マイクロタイタープレート中で、100 μ l の 50 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.5 及び 20 μ l の 25 mg / mL o - NPC (o - ニトロフェニル o - D - セロピオシド (シグマン 4764)) をアッセイバッファー中で加えた。プレートを 10 分間 40 °C においてインキュベートした。

【0124】

平衡化したら、10 μ l の E G I I I 様セルラーゼを加えて、プレートを 40 °C においてさらに 10 分間インキュベートした。加水分解を消滅させて反応を停止するため、70 μ l の 0.2 M グリシン、pH 10.0 を加えた。次に、プレートをマイクロタイターリーダー中で 410 nm において読んだ。規準として、*T. reesei* の E G I I I の 10 μ l の 0.1 mg / ml 溶液は約 0.3 付近の OD を提供した。

40

【0125】

E G I I I 様セルラーゼの濃度を 280 nm における吸光により測定したが、減衰定数は Pace, et al., Pro. Sci. 4 : 2411 (1995) に記載された Edelhoch の方法により実験上測定された 78711 $M^{-1}cm^{-1}$ 又は 3.352 g / L⁻¹ であった。

【0126】

【表4】

表4：EGIII様セルラーゼの比活性

	EGIII- 様セルラーゼ	Tm (°C)	比活性 (野生型に 対する)	標準偏差
<i>T. reesei</i>	野生型	54.43	1.00	
	P201C	58.3/71.8	0.21	
	G170C	56.5	0.68	
	V210C	70.8	0.13	
<i>H. grisea</i>	WT	68.7	1.00	0.032
	C231V	69.5	0.68	0.031
	C190G	70.0	0.65	0.134
	C221S	63.3	1.54	0.047
	C221P	59.6	0.91	0.040
	C231S	63.3	0.64	0.72
	C190S	68.5	0.02	

【0127】

表4から認識し得るとおり、EGIII由来のEGIII様セルラーゼを安定化させる変異を有する変種は活性を損失する。しかしながら、他の変異は活性を回復して、EGIII様セルラーゼの熱安定性を増大させて保持する。

【0128】

興味を引くのは、EGIII残基の補充に際してもっとも高い熱安定性を損失した*H. grisea*由来のEGIII様セルラーゼは比活性を保持し、そして例えば上記変異はEGIII様セルラーゼの比活性を増大させた。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Gualfetti, Peter
Mitchinson, Colin
Phillips, Jay Ian

<120> Novel Variant EGIII-Like Cellulase
Compositions

<130> GC631

<140> US 09/632,570

<141> 2000-08-04

<160> 64

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

10

20

30

40

50

<213> Trichoderma reesei

<400> 1

Gln Thr Ser Cys Asp Gln Trp Ala Thr Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Thr
1 5 10 15
Val Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Cys
20 25 30
Val Thr Ala Val Ser Leu Ser Gly Gly Ala Ser Trp His Ala Asp Trp
35 40 45
Gln Trp Ser Gly Gly Gln Asn Asn Val Lys Ser Tyr Gln Asn Ser Gln 10
50 55 60
Ile Ala Ile Pro Gln Lys Arg Thr Val Asn Ser Ile Ser Ser Met Pro
65 70 75 80
Thr Thr Ala Ser Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ile Arg Ala Asn Val
85 90 95
Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Val Thr Tyr Ser
100 105 110
Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Asp Ile Gly
115 120 125
Pro Ile Gly Ser Ser Gln Gly Thr Val Asn Val Gly Gly Gln Ser Trp 20
130 135 140
Thr Leu Tyr Tyr Gly Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe Val
145 150 155 160
Ala Gln Thr Asn Thr Thr Asn Tyr Ser Gly Asp Val Lys Asn Phe Phe
165 170 175
Asn Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gln Tyr Val
180 185 190
Leu Ser Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gly Thr Leu
195 200 205
Asn Val Ala Ser Trp Thr Ala Ser Ile Asn 30
210 215

<210> 2

<211> 702

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<400> 2

atgaagttcc ttcaagtcct ccctgccctc ataccggccg ccctggccca aaccagctgt 60
gaccagtggg caaccttcac tggcaacggc tacacagtca gcaacaacct ttggggagca 120 40
tcagccggct ctggatttgg ctgctgacg gcggtatcgc tcagcggcgg ggcctcctgg 180
cacgcagact ggcagtggtc cggcggccag aacaacgtca agtcgtacca gaactctcag 240
attgccattc cccagaagag gaccgtcaac agcatcagca gcatgccac cactgccagc 300
tggagctaca gcgggagcaa catccgcgct aatgttgcgt atgacttggt caccgcagcc 360
aaccgaatc atgtcacgta ctcgggagac tacgaactca tgatctggct tggcaatac 420
ggcgatattg ggccgattgg gtccctcacag ggaacagtca acgtcgggtg ccagagctgg 480
acgctctact atggctacaa cggagccatg caagtctatt cctttgtggc ccagaccaac 540
actaccaact acagcggaga tgtcaagaac ttcttcaatt atctccgaga caataaagga 600
tacaacgtg caggccaata tgttcttagc taccaattg gtaccgagcc cttcacgggc 660
agtggaactc tgaacgtcgc atcctggacc gcatctatca ac 702 50

<210> 3

<211> 234

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 3

Met Lys Phe Leu Gln Val Leu Pro Ala Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gln Thr Ser Cys Asp Gln Trp Ala Thr Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Thr 10
 20 25 30
 Val Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Cys
 35 40 45
 Val Thr Ala Val Ser Leu Ser Gly Gly Ala Ser Trp His Ala Asp Trp
 50 55 60
 Gln Trp Ser Gly Gly Gln Asn Asn Val Lys Ser Tyr Gln Asn Ser Gln
 65 70 75 80
 Ile Ala Ile Pro Gln Lys Arg Thr Val Asn Ser Ile Ser Ser Met Pro
 85 90 95
 Thr Thr Ala Ser Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ile Arg Ala Asn Val 20
 100 105 110
 Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Val Thr Tyr Ser
 115 120 125
 Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Asp Ile Gly
 130 135 140
 Pro Ile Gly Ser Ser Gln Gly Thr Val Asn Val Gly Gly Gln Ser Trp
 145 150 155 160
 Thr Leu Tyr Tyr Gly Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe Val
 165 170 175
 Ala Gln Thr Asn Thr Thr Asn Tyr Ser Gly Asp Val Lys Asn Phe Phe 30
 180 185 190
 Asn Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gln Tyr Val
 195 200 205
 Leu Ser Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gly Thr Leu
 210 215 220
 Asn Val Ala Ser Trp Thr Ala Ser Ile Asn
 225 230

<210> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> *Hypocrea schweinitzii*

<400> 4

Met Lys Phe Leu Gln Val Leu Pro Ala Ile Leu Pro Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gln Thr Ser Cys Asp Gln Tyr Ala Thr Phe Ser Gly Asn Gly Tyr Ile 40
 20 25 30
 Val Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Cys
 35 40 45 50

Val Thr Ser Val Ser Leu Asn Gly Ala Ala Ser Trp His Ala Asp Trp
50 55 60
Gln Trp Ser Gly Gly Gln Asn Asn Val Lys Ser Tyr Gln Asn Val Gln
65 70 75 80
Ile Asn Ile Pro Gln Lys Arg Thr Val Asn Ser Ile Gly Ser Met Pro
85 90 95
Thr Thr Ala Ser Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Ile Arg Ala Asn Val
100 105 110
Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Val Thr Tyr Ser
115 120 125
Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Asp Ile Gly
130 135 140
Pro Ile Gly Ser Ser Gln Gly Thr Val Asn Val Gly Gly Gln Thr Trp
145 150 155 160
Thr Leu Tyr Tyr Gly Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe Val
165 170 175
Ala Gln Ser Asn Thr Thr Ser Tyr Ser Gly Asp Val Lys Asn Phe Phe
180 185 190
Asn Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Gly Tyr Asn Ala Gly Gly Gln Tyr Val
195 200 205
Leu Ser Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gly Thr Leu
210 215 220
Asn Val Ala Ser Trp Thr Ala Ser Ile Asn
225 230

10

20

<210> 5
<211> 259
<212> PRT
<213> *Aspergillus aculeatus*

30

<400> 5
Met Lys Ala Phe His Leu Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ala Val Ala
1 5 10 15
Gln Gln Ala Gln Leu Cys Asp Gln Tyr Ala Thr Tyr Thr Gly Gly Val
20 25 30
Tyr Thr Ile Asn Asn Asn Leu Trp Gly Lys Asp Ala Gly Ser Gly Ser
35 40 45
Gln Cys Thr Thr Val Asn Ser Ala Ser Ser Ala Gly Thr Ser Trp Ser
50 55 60
Thr Lys Trp Asn Trp Ser Gly Gly Glu Asn Ser Val Lys Ser Tyr Ala
65 70 75 80
Asn Ser Gly Leu Thr Phe Asn Lys Lys Leu Val Ser Gln Ile Ser Gln
85 90 95
Ile Pro Thr Thr Ala Arg Trp Ser Tyr Asp Asn Thr Gly Ile Arg Ala
100 105 110
Asp Val Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr
115 120 125
Trp Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Ala Arg Tyr Gly Gly
130 135 140
Val Gln Pro Ile Gly Ser Gln Ile Ala Thr Ala Thr Val Asp Gly Gln

40

50

Gly Pro Ala Thr Phe Thr Val Asp Asn Trp Thr Ala Ser Val Asn
 225 230 235

<210> 7

<211> 239

<212> PRT

<213> *Aspergillus kawachii* (2)

<400> 7

Met Lys Ala Phe His Leu Leu Ala Ala Leu Ser Gly Ala Ala Val Ala 10
 1 5 10 15
 Gln Gln Ala Gln Leu Cys Asp Gln Tyr Ala Thr Tyr Thr Gly Gly Val
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Asn Asn Asn Leu Trp Gly Lys Asp Ala Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gln Cys Thr Thr Val Asn Ser Ala Ser Ser Ala Gly Thr Ser Trp Ser
 50 55 60
 Thr Lys Trp Asn Trp Ser Gly Gly Glu Asn Ser Val Lys Ser Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Leu Ser Phe Asn Lys Lys Leu Val Ser Gln Ile Ser His 20
 85 90 95
 Ile Pro Thr Ala Ala Arg Trp Ser Tyr Asp Asn Thr Cys Ile Arg Arg
 100 105 110
 Gly Arg Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr
 115 120 125
 Trp Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Ala Arg Tyr Gly Gly
 130 135 140
 Val Gln Pro Leu Gly Ser Gln Ile Ala Thr Ala Thr Val Glu Gly Gln
 145 150 155 160
 Thr Trp Glu Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly Ala Gln Lys Thr Tyr Ser 30
 165 170 175
 Phe Val Ala Ala Asn Pro Ile Thr Ser Phe Gln Gly Asp Ile Asn Asp
 180 185 190
 Phe Phe Lys Tyr Leu Thr Gln Asn His Gly Phe Pro Ala Ser Ser Gln
 195 200 205
 Tyr Leu Ile Ile Leu Ala Leu Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly
 210 215 220
 Gly Pro Ala Thr Leu Asn Val Ala Asp Trp Ser Ala Ser Val Gln
 225 230 235

<210> 8

<211> 247

<212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 8

Met Lys Leu Ser Leu Ala Leu Ala Thr Leu Val Ala Thr Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 Gln Glu Leu Cys Ala Gln Tyr Asp Ser Ala Ser Ser Pro Pro Tyr Ser
 20 25 30 50

115	120	125		
Asn Val Ala Tyr Asp Val Phe Thr Ala Arg Asp Pro Asp His Pro Asn				
130	135	140		
Trp Gly Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Ala Arg Tyr Gly Gly				
145	150	155	160	
Ile Tyr Pro Ile Gly Thr Phe His Ser Gln Val Asn Leu Ala Gly Arg				
165	170	175		
Thr Trp Asp Leu Trp Thr Gly Tyr Asn Gly Asn Met Arg Val Tyr Ser				
180	185	190		
Phe Leu Pro Pro Ser Gly Asp Ile Arg Asp Phe Ser Cys Asp Ile Lys				10
195	200	205		
Asp Phe Phe Asn Tyr Leu Glu Arg Asn His Gly Tyr Pro Ala Arg Glu				
210	215	220		
Gln Asn Leu Ile Val Tyr Gln Val Gly Thr Glu Cys Phe Thr Gly Gly				
225	230	235	240	
Pro Ala Arg Phe Thr Cys Arg Asp Phe Arg Ala Asp Leu Trp				
245	250			
<210> 10				
<211> 254				20
<212> PRT				
<213> Humicola insolens				
<400> 10				
Met Leu Lys Ser Ala Leu Leu Leu Gly Pro Ala Ala Val Ser Val Gln				
1	5	10	15	
Ser Ala Ser Ile Pro Thr Ile Pro Ala Asn Leu Glu Pro Arg Gln Ile				
20	25	30		
Arg Ser Leu Cys Glu Leu Tyr Gly Tyr Trp Ser Gly Asn Gly Tyr Glu				
35	40	45		30
Leu Leu Asn Asn Leu Trp Gly Lys Asp Thr Ala Thr Ser Gly Trp Gln				
50	55	60		
Cys Thr Tyr Leu Asp Gly Thr Asn Asn Gly Gly Ile Gln Trp Ser Thr				
65	70	75	80	
Ala Trp Glu Trp Gln Gly Ala Pro Asp Asn Val Lys Ser Tyr Pro Tyr				
85	90	95		
Val Gly Lys Gln Ile Gln Arg Gly Arg Lys Ile Ser Asp Ile Asn Ser				
100	105	110		
Met Arg Thr Ser Val Ser Trp Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Ile Arg Ala				
115	120	125		40
Asn Val Ala Tyr Asp Val Phe Thr Ala Arg Asp Pro Asp His Pro Asn				
130	135	140		
Trp Gly Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Ala Arg Tyr Gly Gly				
145	150	155	160	
Ile Tyr Pro Ile Gly Thr Phe His Ser Gln Val Asn Leu Ala Gly Arg				
165	170	175		
Thr Trp Asp Leu Trp Thr Gly Tyr Asn Gly Asn Met Arg Val Tyr Ser				
180	185	190		
Phe Leu Pro Pro Ser Gly Asp Ile Arg Asp Phe Ser Cys Asp Ile Lys				
195	200	205		50

Asp Phe Phe Asn Tyr Leu Glu Arg Asn His Gly Tyr Pro Ala Arg Glu
 210 215 220
 Gln Asn Leu Ile Val Tyr Gln Val Gly Thr Glu Cys Phe Thr Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ala Arg Phe Thr Cys Arg Asp Phe Arg Ala Asp Leu Trp
 245 250

<210> 11

<211> 247

<212> PRT

<213> *Chaetomium brasiliense*

10

<400> 11

Met Lys Leu Thr Leu Val Leu Phe Val Ser Ser Leu Ala Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Gly Trp Arg Glu Arg Gln Gln Gln Val Ser Leu Cys Gly Gln
 20 25 30
 Ser Ser Ser Trp Ser Gly Asn Gly Tyr Gln Leu Asn Asn Asn Leu Trp
 35 40 45
 Gly Gln Ser Arg Ala Thr Ser Gly Ser Gln Cys Thr Tyr Leu Asp Ser
 50 55 60
 Ser Ser Asn Ser Gly Ile His Trp His Thr Thr Trp Thr Trp Glu Gly
 65 70 75 80
 Gly Glu Gly Glu Val Lys Ser Tyr Ala Tyr Ser Gly Arg Gln Val Ser
 85 90 95
 Thr Gly Leu Thr Ile Ala Ser Ile Asp Ser Met Gln Thr Ser Val Ser
 100 105 110
 Trp Glu Tyr Asn Thr Thr Asp Ile Gln Ala Asn Val Ala Tyr Asp Ile
 115 120 125
 Phe Thr Ala Glu Asp Pro Asp His Glu His Ser Ser Gly Asp Tyr Glu
 130 135 140
 Leu Met Ile Trp Leu Ala Arg Tyr Asn Asn Val Ser Pro Ile Gly Ser
 145 150 155 160
 Ser Val Ala Thr Ala Thr Val Gly Gly Asp Thr Trp Asp Leu Phe Ala
 165 170 175
 Gly Ala Asn Gly Asp Met Glu Val Tyr Ser Phe Val Ala Glu Asn Thr
 180 185 190
 Met Asn Ser Phe Ser Gly Asp Val Lys Asp Phe Phe Asp Tyr Leu Glu
 195 200 205
 Gln Asn Val Gly Phe Pro Val Asp Asp Gln Tyr Leu Leu Val Phe Glu
 210 215 220
 Leu Gly Ser Glu Ala Phe Thr Gly Gly Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser
 225 230 235 240
 Gln Phe Ser Ala Asn Ile Ala
 245

20

30

40

<210> 12

<211> 238

<212> PRT

<213> *Fusarium equiseti*

50

<400> 12

Met Lys Ser Thr Leu Leu Ala Gly Ala Phe Ala Pro Leu Ala Phe
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Leu Cys Glu Gln Tyr Gly Tyr Leu Ser Ser Asp Gly Tyr
 20 25 30
 Ser Leu Asn Asn Asn Val Trp Gly Lys Asp Ser Gly Thr Gly Asp Gln
 35 40 45
 Cys Thr His Val Asn Trp Asn Asn Ala Asn Gly Ala Gly Trp Asp Val
 50 55 60
 Glu Trp Asn Trp Ser Gly Gly Lys Asp Asn Val Lys Ser Tyr Pro Asn
 65 70 75 80
 Ser Ala Leu Leu Ile Gly Glu Asp Lys Lys Thr Ile Ser Ser Ile Thr
 85 90 95
 Asn Met Gln Ser Thr Ala Glu Trp Lys Tyr Ser Gly Asp Asn Leu Arg
 100 105 110
 Ala Asp Val Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Pro Asn His Glu
 115 120 125
 Thr Ser Ser Gly Glu Tyr Glu Leu Met Val Trp Leu Ala Arg Ile Gly
 130 135 140
 Gly Val Gln Pro Ile Gly Ser Leu Gln Thr Ser Val Thr Ile Glu Gly
 145 150 155 160
 His Thr Trp Glu Leu Trp Val Gly Met Asn Gly Ser Met Lys Val Phe
 165 170 175
 Ser Phe Val Ala Pro Thr Pro Val Asn Asn Phe Asn Ala Asp Ile Lys
 180 185 190
 Gln Phe Trp Asp Tyr Leu Thr Lys Ser Gln Asn Phe Pro Ala Asp Asn
 195 200 205
 Gln Tyr Leu Leu Thr Phe Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Phe Thr Val Thr Asn Phe Asn Ala His Leu Lys
 225 230 235

10

20

30

<210> 13

<211> 244

<212> PRT

<213> *Fusarium javanicum* (1)

<400> 13

Met Lys Ser Ala Ile Val Ala Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Thr Arg Leu Ile Pro Arg Gly Gln Phe Cys Gly Gln Trp Asp Ser
 20 25 30
 Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Tyr Asn Asn Leu Trp Gly Lys Asp
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Gly Glu Gln Cys Thr Thr Asn Ser Gly Glu Gln Ser
 50 55 60
 Asp Gly Ser Ile Ala Trp Ser Val Glu Trp Ser Trp Thr Gly Gly Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln Val Lys Ser Tyr Pro Asn Ala Val Val Glu Ile Glu Lys Lys

40

50

				85						90					95					
Thr	Leu	Gly	Glu	Val	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Ala	Trp	Asp	Trp	Thr	Tyr					
				100						105					110					
Thr	Gly	Asn	Gly	Ile	Ile	Ala	Asn	Val	Ala	Tyr	Asp	Leu	Phe	Thr	Ser					
		115								120					125					
Ser	Thr	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Glu	Tyr	Glu	Phe	Met	Ile	Trp	Leu	Ser					
		130								135					140					
Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Asn	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Ala					
145						150					155				160					
Thr	Ala	Glu	Leu	Ala	Gly	Thr	Ser	Trp	Lys	Leu	Tyr	Gln	Gly	Lys	Asn					10
				165						170					175					
Asn	Gln	Met	Thr	Val	Phe	Ser	Phe	Val	Ala	Glu	Ser	Asp	Val	Asn	Asn					
			180							185					190					
Phe	Cys	Gly	Asp	Leu	Ala	Asp	Phe	Thr	Asp	Tyr	Leu	Val	Asp	Asn	His					
		195								200					205					
Gly	Val	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Leu	Gln	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	Thr	Glu					
		210								215					220					
Pro	Phe	Glu	Gly	Thr	Asn	Ala	Val	Phe	Thr	Thr	Asn	Asn	Tyr	His	Ala					
225						230					235				240					
Asp	Val	Glu	Tyr																	20

<210> 14

<211> 250

<212> PRT

<213> Fusarium javanicum (2)

<400> 14

Met	Lys	Phe	Phe	Gly	Val	Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Thr	Ala	Val					
1				5						10					15					30
Ala	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Glu	Thr	Ile	Glu	Lys	Arg	Asp	Thr	Thr					
				20						25					30					
Trp	Cys	Asp	Ala	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Val	Tyr					
		35								40					45					
His	Asn	Asn	Trp	Gly	Lys	Gly	Asp	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Gln	Cys	Thr					
		50								55					60					
Thr	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Asn	Asn	Asn	Phe	Val	Trp	Ser	Thr	Ser	Trp					
65						70					75				80					
Thr	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Lys	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Asn	Val	Ala					
				85						90					95					40
Leu	Glu	Lys	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile	Ser	Asp	Ile	Lys	Ser	Val	Ser	Thr					
				100						105					110					
Arg	Trp	Ile	Trp	Arg	Tyr	Thr	Gly	Thr	Lys	Met	Ile	Ala	Asn	Val	Ser					
		115								120					125					
Tyr	Asp	Leu	Trp	Phe	Ala	Pro	Thr	Ala	Ser	Ser	Asn	Asn	Ala	Tyr	Glu					
		130								135					140					
Ile	Met	Ile	Trp	Val	Gly	Ala	Tyr	Gly	Gly	Ala	Leu	Pro	Ile	Ser	Thr					
145						150					155				160					
Pro	Gly	Lys	Gly	Val	Ile	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	Ala	Gly	Ile	Pro	Trp					
				165						170					175					50

Asp Val Tyr Lys Gly Pro Asn Gly Asp Val Thr Val Ile Ser Phe Val
 180 185 190
 Ala Ser Ser Asn Gln Gly Asn Phe Gln Ala Asp Leu Lys Glu Phe Leu
 195 200 205
 Asn Tyr Leu Thr Ser Lys Gln Gly Leu Pro Ser Asn Tyr Val Ala Thr
 210 215 220
 Ser Phe Gln Ala Gly Thr Glu Pro Phe Glu Gly Thr Asn Ala Val Leu
 225 230 235 240
 Lys Thr Ser Ala Tyr Thr Ile Ser Val Asn
 245 250

10

<210> 15
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Gliocladium roseum (1)

<400> 15
 Met Lys Ala Asn Ile Val Ile Leu Ser Leu Phe Ala Pro Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Gln Thr Leu Cys Gly Gln Tyr Ser Ser Asn Thr Gln Gly Gly
 20 25 30
 Tyr Ile Phe Asn Asn Asn Met Trp Gly Met Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gln Cys Thr Tyr Val Asp Lys Val Trp Ala Glu Gly Val Ala Trp His
 50 55 60
 Thr Asp Trp Ser Trp Ser Gly Gly Asp Asn Asn Val Lys Ser Tyr Pro
 65 70 75 80
 Tyr Ser Gly Arg Glu Leu Gly Thr Lys Arg Ile Val Ser Ser Ile Lys
 85 90 95
 Ser Ile Ser Ser Gly Ala Asp Trp Asp Tyr Thr Gly Ser Asn Leu Arg
 100 105 110
 Ala Asn Ala Ala Tyr Asp Ile Phe Thr Ser Ala Asn Pro Asn His Ala
 115 120 125
 Thr Ser Ser Gly Asp Tyr Glu Val Met Ile Trp Leu Ala Asn Leu Gly
 130 135 140
 Gly Leu Thr Pro Ile Gly Ser Pro Ile Gly Thr Val Lys Ala Ala Gly
 145 150 155 160
 Arg Asp Trp Glu Leu Trp Asp Gly Tyr Asn Gly Ala Met Arg Val Tyr
 165 170 175
 Ser Phe Val Ala Pro Ser Gln Leu Asn Ser Phe Asp Gly Glu Ile Met
 180 185 190
 Asp Phe Phe Tyr Val Val Lys Asp Met Arg Gly Phe Pro Ala Asp Ser
 195 200 205
 Gln His Leu Leu Thr Val Gln Phe Gly Thr Glu Pro Ile Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Ala Lys Phe Ser Val Ser His Trp Ser Ala Lys Leu Gly
 225 230 235

20

30

40

<210> 16
 <211> 348

50

<212> PRT

<213> Gliocladium roseum (2)

<400> 16

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

10

20

30

40

<210> 17

50

<211> 236

<212> PRT

<213> Gliocladium roseum (3)

<400> 17

Met Lys Phe Gln Leu Leu Ser Leu Thr Ala Phe Ala Pro Leu Ser Leu
1 5 10 15
Ala Ala Leu Cys Gly Gln Tyr Gln Ser Gln Ser Gln Gly Gly Tyr Ile
 20 25 30
Phe Asn Asn Asn Lys Trp Gly Gln Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gln Cys
 35 40 45
Leu Thr Ile Asp Lys Thr Trp Asp Ser Asn Val Ala Phe His Ala Asp
 50 55 60
Trp Ser Trp Ser Gly Gly Thr Asn Asn Val Lys Ser Tyr Pro Asn Ala
65 70 75 80
Gly Leu Glu Phe Ser Arg Gly Lys Lys Val Ser Ser Ile Gly Thr Ile
 85 90 95
Asn Gly Gly Ala Asp Trp Asp Tyr Ser Gly Ser Asn Ile Arg Ala Asn
 100 105 110
Val Ala Tyr Asp Ile Phe Thr Ser Ala Asp Pro Asn His Val Thr Ser
 115 120 125
Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Leu Gly Asp Ile
 130 135 140
Tyr Pro Ile Gly Asn Ser Ile Gly Arg Val Lys Ala Ala Asn Arg Glu
145 150 155 160
Trp Asp Leu His Val Gly Tyr Asn Gly Ala Met Lys Val Phe Ser Phe
 165 170 175
Val Ala Pro Ser Pro Val Thr Arg Phe Asp Gly Asn Ile Met Asp Phe
 180 185 190
Phe Tyr Val Met Arg Asp Met Gln Gly Tyr Pro Met Asp Lys Gln Tyr
 195 200 205
Leu Leu Ser Leu Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Asn Ala
 210 215 220
Lys Phe Ser Cys Trp Tyr Phe Gly Ala Lys Ile Lys
225 230 235

10

20

30

<210> 18

<211> 237

<212> PRT

<213> Gliocladium roseum (4)

<400> 18

Met Lys Thr Gly Ile Ala Tyr Leu Ala Ala Val Leu Pro Leu Ala Met
1 5 10 15
Ala Glu Ser Leu Cys Asp Gln Tyr Ala Tyr Leu Ser Arg Asp Gly Tyr
 20 25 30
Asn Phe Asn Asn Asn Glu Trp Gly Ala Ala Thr Gly Thr Gly Asp Gln
 35 40 45
Cys Thr Tyr Val Asp Ser Thr Ser Ser Gly Gly Val Ser Trp His Ser
50 55 60

40

50

Asp Trp Thr Trp Ser Gly Ser Glu Ser Glu Ile Lys Ser Tyr Pro Tyr	
65	70 75 80
Ser Gly Leu Asp Leu Pro Glu Lys Lys Ile Val Thr Ser Ile Gly Ser	
	85 90 95
Ile Ser Thr Gly Ala Glu Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Ile Arg Ala	
	100 105 110
Asp Val Ala Tyr Asp Thr Phe Thr Ala Ala Asp Pro Asn His Ala Thr	
	115 120 125
Ser Ser Gly Asp Tyr Glu Val Met Ile Trp Leu Ala Asn Leu Gly Gly	
	130 135 140
Leu Thr Pro Ile Gly Ser Pro Ile Gly Thr Val Lys Ala Ala Gly Arg	
145	150 155 160
Asp Trp Glu Leu Trp Asp Gly Tyr Asn Gly Ala Met Arg Val Tyr Ser	
	165 170 175
Phe Val Ala Pro Ser Gln Leu Asn Ser Phe Asp Gly Glu Ile Met Asp	
	180 185 190
Phe Phe Tyr Val Val Lys Asp Met Arg Gly Phe Pro Ala Asp Ser Gln	
	195 200 205
His Leu Leu Thr Val Gln Phe Gly Thr Glu Pro Ile Ser Gly Ser Gly	
	210 215 220
Ala Lys Phe Ser Val Ser His Trp Ser Ala Lys Leu Gly	
225	230 235
<210> 19	
<211> 237	
<212> PRT	
<213> Memnoniella echinata	
<400> 19	
Met Lys Val Ala Ala Leu Leu Val Ala Leu Ser Pro Leu Ala Phe Ala	
1	5 10 15
Gln Ser Leu Cys Asp Gln Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ser Asn Gly Tyr Glu	
	20 25 30
Phe Asn Asn Asn Met Trp Gly Arg Asn Ser Gly Gln Gly Asn Gln Cys	
	35 40 45
Thr Tyr Val Asp Tyr Ser Ser Pro Asn Gly Val Gly Trp Arg Val Asn	
	50 55 60
Trp Asn Trp Ser Gly Gly Asp Asn Asn Val Lys Ser Tyr Pro Tyr Ser	
65	70 75 80
Gly Arg Gln Leu Pro Thr Lys Arg Ile Val Ser Trp Ile Gly Ser Leu	
	85 90 95
Pro Thr Thr Val Ser Trp Asn Tyr Gln Gly Asn Asn Leu Arg Ala Asn	
	100 105 110
Val Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Pro Asn Ser	
	115 120 125
Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Arg Leu Gly Asn Val	
	130 135 140
Tyr Pro Ile Gly Asn Gln Val Ala Thr Val Asn Ile Ala Gly Gln Gln	
145	150 155 160
Trp Asn Leu Tyr Tyr Gly Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe	

10

20

30

40

50

165 170 175
 Val Ser Pro Asn Gln Leu Asn Tyr Phe Ser Gly Asn Val Lys Asp Phe
 180 185 190
 Phe Thr Tyr Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Tyr Pro Ala Asp Ser Gln Tyr
 195 200 205
 Leu Ile Thr Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Gln Asn Ala
 210 215 220
 Val Phe Thr Val Ser Asn Trp Ser Ala Gln Gln Asn Asn
 225 230 235

10

<210> 20
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Emericella desertoru

<400> 20
 Met Lys Leu Leu Ala Leu Ser Leu Val Ser Leu Ala Ser Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asn Thr Phe Thr Arg Arg Ser Asp Phe Cys
 20 25 30
 Gly Gln Trp Asp Thr Ala Thr Val Gly Asn Phe Ile Val Tyr Asn Asn
 35 40 45
 Leu Trp Gly Gln Asp Asn Ala Asp Ser Gly Ser Gln Thr Gly Val Asp
 50 55 60
 Ser Ala Asn Gly Asn Ser Ile Ser Trp His Thr Thr Trp Ser Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Ser Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Ala Tyr Gln Phe
 85 90 95
 Thr Ser Thr Lys Leu Asn Ser Leu Ser Ser Ile Pro Thr Ser Trp Lys
 100 105 110
 Trp Gln Tyr Ser Thr Thr Asp Ile Val Ala Asn Val Ala Tyr Asp Leu
 115 120 125
 Phe Thr Ser Ser Ser Ala Gly Gly Asp Ser Glu Tyr Glu Ile Met Ile
 130 135 140
 Trp Leu Ala Ala Leu Gly Gly Ala Gly Pro Ile Ser Ser Thr Gly Ser
 145 150 155 160
 Ser Ile Ala Thr Val Thr Leu Gly Gly Val Thr Trp Ser Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Pro Asn Gly Ser Met Gln Val Tyr Ser Phe Val Ala Ser Ser Thr
 180 185 190
 Thr Glu Ser Phe Ser Ala Asp Leu Met Asp Phe Ile Asn Tyr Leu Ala
 195 200 205
 Glu Asn Gln Gly Leu Ser Ser Ser Gln Tyr Leu Thr His Val Gln Ala
 210 215 220
 Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Tyr Ser Val Ser Val Ser
 245

20

30

40

<210> 21

50

<210> 24
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Erwinia carotovara

<400> 24
 Met Gln Thr Val Asn Thr Gln Pro His Arg Ile Phe Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Ala Val Phe Ser Ser Leu Leu Leu Ser Ser Leu Thr Val Ser Ala
 20 25 30 10
 Ala Ser Ser Ser Asn Asp Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Gly Asn Asn Lys
 35 40 45
 Tyr Tyr Leu Phe Asn Asn Val Trp Gly Lys Asp Glu Ile Lys Gly Trp
 50 55 60
 Gln Gln Thr Ile Phe Tyr Asn Ser Pro Ile Ser Met Gly Trp Asn Trp
 65 70 75 80
 His Trp Pro Ser Ser Thr His Ser Val Lys Ala Tyr Pro Ser Leu Val
 85 90 95
 Ser Gly Trp His Trp Thr Ala Gly Tyr Thr Glu Asn Ser Gly Leu Pro
 100 105 110 20
 Ile Gln Leu Ser Ser Asn Lys Ser Ile Thr Ser Asn Val Thr Tyr Ser
 115 120 125
 Ile Lys Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Ala Ala Tyr Asp Ile Trp Phe His
 130 135 140
 Thr Thr Asp Lys Ala Asn Trp Asp Ser Ser Pro Thr Asp Glu Leu Met
 145 150 155 160
 Ile Trp Leu Asn Asp Thr Asn Ala Gly Pro Ala Gly Asp Tyr Ile Glu
 165 170 175
 Thr Val Phe Leu Gly Asp Ser Ser Trp Asn Val Phe Lys Gly Trp Ile
 180 185 190 30
 Asn Ala Asp Asn Gly Gly Gly Trp Asn Val Phe Ser Phe Val His Thr
 195 200 205
 Ser Gly Thr Asn Ser Ala Ser Leu Asn Ile Arg His Phe Thr Asp Tyr
 210 215 220
 Leu Val Gln Thr Lys Gln Trp Met Ser Asp Glu Lys Tyr Ile Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Glu Phe Gly Thr Glu Ile Phe Gly Gly Asp Gly Gln Ile Asp Ile
 245 250 255
 Thr Glu Trp Arg Val Asp Val Lys
 260 40

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(5)
 <223> Xaa = Leu, Phe, Lys or Ile

<223> EGIII-like cellulase amino acid string

<400> 25

Asn Asn Xaa Trp Gly

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(5)

<223> Xaa = Leu, Phe or Ile

<223> EGIII-like cellulase amino acid string

<400> 26

Glu Xaa Met Ile Trp

1 5

20

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGIII-like cellulase amino acid string

30

<400> 27

Gly Thr Glu Pro Phe Thr

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ser, Tyr, Cys, Trp, Thr, Asn, Lys or Arg

<223> EGIII-like cellulase amino acid string

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Val or Pro

50

<221> VARIANT
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Lys or Ala

<221> VARIANT
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Ser or Ala

<221> VARIANT 10
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Tyr or Phe

<400> 28
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 29
 <211> 6
 <212> PRT 20
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> EGIII-like cellulase amino acid string

<400> 29
 Lys Asn Phe Phe Asn Tyr
 1 5

<210> 30 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(5)
 <223> Xaa = Asn or Gln

<223> BOX1 40

<400> 30
 Xaa Asn Leu Trp Gly
 1 5

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(14)
 <223> n = A,T,C or G

 <223> primer

 <400> 31
 aayaaytnt gggg 14 10

 <210> 32
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(14)
 <223> n = A,T,C or G 20

 <223> primer

 <400> 32
 caraaytnt gggg 14

 <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(6)
 <223> Xaa = Phe, Leu, Tyr, Ile, Asn or Lys

 <223> BOX1'

 <400> 33
 Asn Asn Asn Xaa Trp Gly 40
 1 5

 <210> 34
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> primer

 <221> misc_feature 50

<222> (1)...(17)

<223> n = inosine

<400> 34

aayaayaayh wntgggg

17

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> BOX2

<400> 35

Glu Leu Met Ile Trp

1

5

<210> 36

<211> 15

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(15)

<223> n = A,T,C or G

<223> primer

30

<400> 36

garytnatga thtgg

15

<210> 37

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

40

<222> (1)...(15)

<223> n = A,T,C or G

<223> primer

<400> 37

ccadatcatn arytc

15

<210> 38

<211> 6

50

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BOX2'

<400> 38
 Tyr Glu Leu Met Ile Trp
 1 5

10

<210> 39
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<221> misc_feature
 <222> (1)...(18)
 <223> n = inosine

20

<400> 39
 taygarytna tgathtgg

18

<210> 40
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> primer

<221> misc_feature
 <222> (1)...(18)
 <223> n = inosine

<400> 40
 ccadatcatn arytcrta

18

40

<210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(6)
 <223> Xaa = Pro or Cys

50

<223> BOX3

<400> 41

Gly Thr Glu Xaa Phe Thr
1 5

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(17)

<223> n = A,T,C or G

<223> primer

<400> 42

gtraanggyt crgtrcc

17

20

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(17)

<223> n = A,T,C or G

30

<223> primer

<400> 43

gtraanggyt crgtycc

17

<210> 44

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(17)

<223> n = A,T,C or G

<223> primer

<400> 44

gtraanggyt cygtrcc

17

50

<210> 45
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(17)
 <223> n = A,T,C or G 10

<223> primer

<400> 45
 gtraanggyt cygtycc 17

<210> 46
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(17)
 <223> n = A,T,C or G

<223> primer

<400> 46
 gtraarcayt cngtncc 17 30

<210> 47
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 47
 ggaactctga actgcgcatg gtggacc 27 40

<210> 48
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer 50

<400> 48 ggtccaggat ggcgagttca gaggttcc	27	
<210> 49 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> primer		10
<400> 49 ccaactacag ctgtgatgtc aagaac	26	
<210> 50 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> primer		20
<400> 50 ggtcttgaca tcacagctgt agttgg	26	
<210> 51 <211> 32 <212> DNA <213> Artificial Sequence		30
<220> <223> primer		
<400> 51 ccaatttggg accgagtgct tcacgggcag tg	32	
<210> 52 <211> 32 <212> DNA <213> Artificial Sequence		40
<220> <223> primer		
<400> 52 cactgcccgt gaagcactcg gtaccaaatt gg	32	
<210> 53 <211> 26 <212> DNA		50

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 53

ccaggttcac ggtcagggac ttcagg

26

<210> 54

<211> 26

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 54

cctgaagtcc ctgaccgtga acctgg

26

<210> 55

20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 55

cgtgacttca gcggtgacat caaggac

27

30

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 56

gtccttgatg tcaccgctga agtcacg

27

40

<210> 57

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 57

50

gtcggaacag agtccttcac aggcggtc	28	
<210> 58		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		10
<400> 58		
gaccgcctgt gaaggactct gttccgac	28	
<210> 59		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		20
<400> 59		
gtcggaacag agcccttcac aggcggtc	28	
<210> 60		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> primer		
<400> 60		
gaccgcctgt gaagggctct gttccgac	28	
<210> 61		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> primer		
<400> 61		
ccaggttcac gagcaggac ttcagg	26	
<210> 62		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		50

<220>

<223> primer

<400> 62

cctgaagtcc ctgctcgtga acctgg

26

<210> 63

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> primer

<400> 63

cgtgacttca gcagtgacat caaggac

27

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> primer

<400> 64

gtccttgatg tcaactgctga agtcacg

27

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明により記載された残基を示す *Trichoderma reesei* の成熟EGIII蛋白質のアミノ酸配列を示す (SEQ ID NO: 1)。

30

【図2】 図2は、イントロンを除いた *Trichoderma reesei* のEGIIIのDNA配列を示す (SEQ ID NO: 2)。

【図3】 図3は、20のEGIII様セルラーゼの完全長のEGIIIの整列化における整列化を示し、一次配列モデリングに基づいた均等残基を示し、*Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 3), *Hypocrea schweinitzii* (SEQ ID NO: 4), *Aspergillus aculeatus* (SEQ ID NO: 5), *Aspergillus kawachii* (1) (SEQ ID NO: 6), *Aspergillus kawachii* (2) (SEQ ID NO: 7), *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 8), *Humicola grisea* (SEQ ID NO: 9), *Humicola insolens* (SEQ ID NO: 10), *Chaetomium brasiliense* (SEQ ID NO: 11), *Fusarium equiseti* (SEQ ID NO: 12), *Fusarium javanicum* (1) (SEQ ID NO: 13), *Fusarium javanicum* (2) (SEQ ID NO: 14), *Gliocladium roseum* (1) (SEQ ID NO: 15), *Gliocladium roseum* (2) (SEQ ID NO: 16), *Gliocladium roseum* (3) (SEQ ID NO: 17), *Gliocladium roseum* (4) (SEQ ID NO: 18), *Memnoniella echinata* (SEQ ID NO: 19), *Emericella desertoru*

40

50

(SEQ ID NO:20), Actinomycete 11AG8 (SEQ ID NO:21), Streptomyces lividans CelB (SEQ ID NO:22), Rhodothermus marinus (SEQ ID NO:23), 及び Erwinia carotovara (SEQ ID NO:24) を含む。

【図1】

図1:成熟EGIII蛋白質のアミノ酸配列

QTSCDQWATFTGNGYTVSNLWASAGSGPGCVTAVLSGGASWHADWQWSGGQNNVKS 60
QMSQIATPKRRTVNSISSMPTTASWSYSGSNIRANVAYDLPTAANPHVTVSGDYELMLW 120
LGKYGDIGPIGSSQGTWNVGGQSWTLYYNGAMQVYSFVAQTNTTNSGVDKRNFFNYLR 180
DNKGYNAAGQVLSYQFTEPTGSGTLNVASWTASIN 218

【図2】

イントロンのないEGIIIのDNA配列

ATGAAATTCCTCAAGTCCCTCCCTGCCTCATACCGCCGCCCTTGGC
CCAAACACAGCTGTGACCAAGTGGGCAACCTTCACTGGCAACGGCTAC
ACAGTCAGCAACAACCTTTGGGGAGCATCAGCCGGCTCTGGATTG
GCTCGGTGACGCGGCTATCGCTCAGCGCGGGGCTCTTGGCACGC
AGACTGGCAGTGGTCCGGCGGCCAGAACACCTCAAGTCGTAACA
GAATCTCAGATTGCCATTCACAGAGAGGACCGCTCAACAGCATC
AGCAGCATGCCACCACTGCCAGCTGGAAGCTACAGCGGGAGCAACA
TCCGGCTAATGTTGCGTATGACTTGTCCACCGCAGCCAAACCGAAT
CATGTACAGTACTCGGGAGACTACGAATCATGATCTGGCTTGGCAA
ATACGGCGATATTGGGCGGATTGGTCTCACAGGGAACAGTCAAC
GTGGTGGCCAGAGCTGGACCGCTCTACTATGGCTACACGGAGCCA
TGCAAGTCTATTCTTGTGGCCAGACCAACTACCAACTACAGC
GGAGATGTCAAGAACTTCTCAATATCTCCGAGACAATAAAGGATA
CAACCGCTCAGGCCAATATGTTCTAGTACCAAAITTTGGTACCGCAT
CCTTACCGGCAAGTGGAACTCTGAACGCTCCCACTCGGACCGCATC
ATCAAC

【図3】

FIGURE 3

1 60
T_reesei M.....KF.LQVLPALPALAAGTS.....CDNATPFGNG..VTV
H_schweinitzii M.....KF.LQVLPALPALAAGTS.....CDNATPFGNG..VTV
A_schleutianus M.....KAFH.LDALAGAAVAGQAG.....LQDQVATYGGV..VTI
A_kawachii_1 M.....KLSHT.LALPAPATMGQT.....MCRQDASSEFP..VSV
A_kawachii_2 M.....KATFL.DAALGDAAVAGQAG.....LQDQVATYGGV..VTI
A_oryzae M.....KLSLA.LACTVATPAGS.....LQDQDASSEFP..VSV
H_grisei M.....LQSLALGAAVAVGSGSIFPTTANRAGQPR.SLCCDLYVWGGQ..VSL
Chaetomium_brasiliense M.....LQSLALGAAVAVGSGSIFPTTANRAGQPR.SLCCDLYVWGGQ..VSL
F_ajacium_1 M.....KSAIYA.ALMLAALASPTRIIPRQD.....FQDQDSTAGA..VTI
F_ajacium_2 M.....K.FTQVQALAACTATTTPTTETREKVVYVQDASSTAGQ..VTV
G_roseum_R_1 M.....KAFVLELGLPAAVAGT.....LQDQSSVYQDQ..VTP
G_roseum_R_2 M.....KSLSPFLATLVAAPSPQNTPTQLASRATLQDQDASVTEGQ..VTI
G_roseum_PA_1 M.....K.FKGLSLGAPATLAAK.....LQDQSSVYQDQ..VTP
G_roseum_R_3 M.....KSTIAYAAVLEPA.MSES.....LQDQVATYGGV..VNF
Memorabilia_schindleri M.....K.FKGLSLGAPATLAAK.....LQDQSSVYQDQ..VTP
Emericella_desertorum M.....K.LMALSHVLAALAAASLIL.SMTPTIRSD.FQDQDQVLCVH..PVT
Actinomyces_l108 M.....KPEE.ATM.TYVVAASGSLGSLAASGAAQVQIQRGCTTTCG.RVV
S_lividans_CelB M.....KSTIAYAAVLEPA.MSES.....LQDQVATYGGV..VNF
Rhodothermus_marinus M.....AVIYVLSLALLPQVLM.FFQDQNGKPEESSEPTVQLQWRDAAVAGGVV
Erwinia_carot_ M.....KQVTPQELIPVLLAVVPSLSELSLLETTASASSRKAQDVF.....GNYVY
61 120
T_reesei M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
H_schweinitzii M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
A_schleutianus M.....KQNLACVYQDTS.SQCTVYKLSLSSG.ASDHTPTMRESGSSTVYKYSNS.....
A_kawachii_1 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
A_kawachii_2 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
A_oryzae M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
H_grisei M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
Chaetomium_brasiliense M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
F_ajacium_1 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
F_ajacium_2 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
G_roseum_R_1 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
G_roseum_R_2 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
G_roseum_PA_1 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
G_roseum_R_3 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
Memorabilia_schindleri M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
Emericella_desertorum M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
Actinomyces_l108 M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
S_lividans_CelB M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
Rhodothermus_marinus M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
Erwinia_carot_ M.....SNNLWASAGSGP..GCY.TAVLSGG.SAVDLDWQWSGGQNNVKSQNS.....
121 180
T_reesei M.....GLIIP.QKRTVNSISSMPTTASWSYSGSNIRANVAYDLPTAANPHVTVSGDYELMLW 180
H_schweinitzii M.....GLIIP.QKRTVNSISSMPTTASWSYSGSNIRANVAYDLPTAANPHVTVSGDYELMLW 180
A_schleutianus M.....GLIF.DKDLVYVSSIFPVM.SGP.VMVAQVAVYDL.FAALADLHATSSGVEI
A_kawachii_1 M.....GLAF.MKLVQYSHIPIAAK.S.YMTCIERRAVYD.FAALADLHATSSGVEI
A_kawachii_2 M.....GLIF.DKDLVYVSSIFPVM.SGP.VMVAQVAVYDL.FAALADLHATSSGVEI
A_oryzae M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
H_grisei M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
Chaetomium_brasiliense M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
F_ajacium_1 M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
F_ajacium_2 M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
G_roseum_R_1 M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
G_roseum_R_2 M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
G_roseum_PA_1 M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
G_roseum_R_3 M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
Memorabilia_schindleri M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
Emericella_desertorum M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
Actinomyces_l108 M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
S_lividans_CelB M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
Rhodothermus_marinus M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI
Erwinia_carot_ M.....GLQFGRK.IEDDSMKEVSM..FYRQDILANVAVYD.FAALADLHATSSGVEI

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00 1 0 1
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 1/885 (2006.01)		C 1 2 N 9/42
		C 1 2 R 1:885

(72)発明者 ミッチンソン, コリン
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 1 9 , ハーフ・ムーン・ベイ, マートル・ストリート 3
 8 1

(72)発明者 ガルフェッティ, ピーター
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 0 9 , サン・フランシスコ, ポスト・ストリート 8 4 0
 , アパートメント 6 1 0

(72)発明者 フィリップス, ジェイ・アイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 , パロ・アルト, バーロン・アベニュー 7 8 5

審査官 神谷 昌男

(56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 3 7 6 1 4 (W O , A 2)
 国際公開第 0 0 / 0 1 4 2 0 6 (W O , A 2)
 国際公開第 9 9 / 0 3 1 2 5 5 (W O , A 2)
 特表平 0 8 - 5 0 7 6 9 5 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C12N15/00-15/90
 C12N 9/00-9/99
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 PubMed