(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4246386号
(P4246386)

(45)発行日　平成21年4月2日(2009.4.2)　(24)登録日　平成21年1月16日(2009.1.16)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 9/88	(2006.01)	C12N	9/88	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 22　(全 72 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-522226 (P2000-522226)
(86)(22)出願日　平成10年11月24日 (1998.11.24)
(65)公表番号　特表2001-526022 (P2001-526022A)
(43)公表日　平成13年12月18日 (2001.12.18)
(86)国際出願番号　PCT/DK1998/000515
(87)国際公開番号　WO1999/027084
(87)国際公開日　平成11年6月3日 (1999.6.3)
審査請求日　平成16年7月6日 (2004.7.6)
(31)優先権主張番号　1343/97
(32)優先日　平成9年11月24日 (1997.11.24)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号　1344/97
(32)優先日　平成9年11月24日 (1997.11.24)
(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　100087871
弁理士　福本　積
(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】新規なペクチン酸リアーゼ

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ）配列番号:４の位置28－341 に示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；
ii）配列番号:４の位置28－341 に示すアミノ酸配列と少なくとも90％同一であるポリペプチド；
iii ）１または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によりｉ）に記載のポリペプチドから誘導され、ただし位置233 におけるアルギニンが保存されているポリペプチド；あるいは
iv）配列番号:３に示すヌクレオチド82～ヌクレオチド1026のヌクレオチド配列のポリヌクレオチドに対して高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド；
であるペクチン酸リアーゼ。
【請求項２】
ａ）配列番号:３に示すヌクレオチド82～ヌクレオチド1026のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド分子；
ｂ）配列番号:４のアミノ酸残基28～アミノ酸残基341 のアミノ酸配列に対して少なくとも90％同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
ｃ）配列番号:３に示すヌクレオチド82～ヌクレオチド1026のヌクレオチド配列のポリヌクレオチドに対して高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子；および

ｄ）上記ａ）の縮重ヌクレオチド配列；
から成る群より選択される、ペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド分子。
【請求項３】
ポリヌクレオチドがDNA である、請求項２に記載のポリヌクレオチド分子。
【請求項４】
下記の作用可能に連鎖された因子：
転写プロモーター；
ａ）配列番号:３に示すヌクレオチド82～ヌクレオチド1026のヌクレオチド配列もしくは当該ヌクレオチド配列に対して高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る、ペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；又は
ｂ）配列番号:4のアミノ酸残基28～アミノ酸残基341 のアミノ酸配列に対して少なくとも90％同一であるペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；並びに
転写ターミネーター；
を含んでなる発現ベクター。
【請求項５】
請求項４に記載の発現ベクターが導入されており、DNA セグメントによりコードされるポリペプチドを発現する、培養細胞。
【請求項６】
ａ）ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:４に示す残基28～残基241 のアミノ酸を含んでなるポリペプチド分子；並びに
ｂ）ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:４のアミノ酸残基28～アミノ酸残基341 のアミノ酸に少なくとも90％同一であるポリペプチド分子；
から成る群より選択される単離されたポリペプチド。
【請求項７】
請求項１に記載のペクチン酸リアーゼまたは請求項６に記載のポリペプチドを含んでなる酵素調製物。
【請求項８】
請求項４に記載の発現ベクターが導入された細胞を培養し、これにより前記細胞はDNA セグメントによりコードされるポリペプチドを発現し、そしてポリペプチドを回収する、ことを含んでなる、ペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドを製造する方法。
【請求項９】
酵素が（ｉ）同種性不純物を含有せず、かつ（ii）請求項８に記載の方法により製造される、ペクチン酸リアーゼ活性を有する酵素。
【請求項１０】
プロテアーゼ、セルラーゼ（エンドグルカナーゼ）、β-
グルカナーゼ、ヘミセルラーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、α- アミラーゼ、グルコアミラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、アラビノシダーゼ、マンナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ポリガラクツロナーゼ、ラムノガラクツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクチンリアーゼ、他のペクチン酸リアーゼ、ポリガラクツロナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セルロバイオヒドロラーゼ、トランスグルタアミナーゼ；またはそれらの混合物から成る群より選択される１または複数の酵素をさらに含む、請求項７に記載の酵素調製物。
【請求項１１】
ポリペプチド部分が１または複数のセルロース結合ドメイン(CBD) に結合した請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド又は請求項９に記載の酵素である、ペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチド。

【請求項１２】
CBD がクロストリジウム・テルモセルム(Clostridium termocellum)YS 株から得られる、請求項11に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
配列番号:12 のアミノ酸配列を有する請求項11に記載のポリペプチド、あるいはペクチン酸リアーゼ活性を有するその変異型、ただし位置206 および211 におけるアルギニンが保存されており、そして変異型は配列番号：12のポリペプチドと少なくとも90％同一である。
【請求項１４】
請求項７又は10に記載の酵素調製物、或いは請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド、請求項９に記載の酵素、又は請求項11、12若しくは13に記載のポリペプチドと、界面活性剤とを含んでなる洗浄組成物。
【請求項１５】
硬質表面を請求項７又は10に記載の酵素調製物、或いは請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド、請求項９に記載の酵素、又は請求項12若しくは13に記載のポリペプチドを含有するクリーニング溶液で処理することを含んでなる、硬質表面をクリーニングする方法。
【請求項１６】
機械的洗浄プロセスの洗浄サイクルの間に、請求項７又は10に記載の酵素調製物、或いは請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド、請求項９に記載の酵素、又は請求項11、12若しくは13に記載のポリペプチドを含有する洗浄溶液で布帛を処理することを含んでなる、布帛を機械的に処理する方法。
【請求項１７】
有効量の請求項７又は10に記載の酵素調製物、或いは請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド、請求項９に記載の酵素、又は請求項11、12若しくは13に記載のポリペプチドでセルロースの繊維、糸または織布もしくは不織布を処理することを含んでなる、セルロースの繊維、糸または織布もしくは不織布の性質を改良する方法。
【請求項１８】
酵素調製物または酵素を精練プロセスの工程において使用する、請求項17に記載の方法。
【請求項１９】
植物材料を有効量の請求項７又は10に記載の酵素調製物、或いは請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド、請求項９に記載の酵素、又は請求項11、12若しくは13に記載のポリペプチドで処理することを含んでなる、植物材料を分解または変性する方法。
【請求項２０】
植物材料が柔軟化プロセスに付された再循環された廃棄物の紙、機械的製紙用パルプまたは繊維である、請求項19に記載の方法。
【請求項２１】
有効量の請求項７又は10に記載の酵素調製物、或いは請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド、請求項９に記載の酵素、又は請求項11、12若しくは13に記載のポリペプチドを動物飼料として慣用の動物飼料成分に添加することを含んでなる、動物飼料を製造する方法。
【請求項２２】
ワインまたはジュースを有効量の請求項７又は10に記載の酵素調製物、或いは有効量の請求項１に記載のペクチン酸リアーゼ、請求項６に記載のポリペプチド、請求項９に記載の酵素、又は請求項11、12若しくは13に記載のポリペプチドで処理することを含んでなる、ワインまたはジュースをプロセシングする方法。
【発明の詳細な説明】

【０００１】
本発明は、微生物のペクチン酸リアーゼ（pectate lyases）、さらに詳しくは、中性およびアルカリ性のpH範囲において、それらの主要な酵素活性としてペクチン酸リアーゼ活性を示す微生物の酵素、並びに繊維材料、洗剤およびセルロース繊維のプロセシング工業において、このような酵素を使用する方法に関する。
【０００２】
発明の背景
ペクチンポリマーは植物細胞壁の重要な構成成分である。ペクチンは、交互するホモガラクツロナン（平滑領域）とランダムガラクツロナン（毛状領域）とから構成された主鎖を有する、ヘテロ多糖である。平滑領域は1,4-結合したアルファ-D- ガラクツロン酸の線状ポリマーである。ガラクツロン酸残基は、通常非ランダム方式で、変化する程度にカルボキシル基上でメチルエステル化されることができ、ポリガラクツロン酸のブロックが完全にメチルエステル化されている。
【０００３】
ペクチナーゼは、それらの優先的基質、高度にメチルエステル化されたペクチンまたは低度にメチルエステル化されたペクチンおよびポリガラクツロン酸（ペクテート）、およびそれらの反応メカニズムであるベーター排除または加水分解、に従って分類することができる。ペクチナーゼは主としてエンド－作用性であり、鎖内のランダム部位においてポリマーを切断してオリゴマーの混合物を形成することができるか、あるいはそれらはエキソ－作用性であり、ポリマーの１端から攻撃し、モノマーまたは二量体を生成する。ペクチンの平滑領域に作用する、いくつかのペクチナーゼ活性、例えば、ペクテートリアーゼ(EC 4,2,2,2)、ペクチンリアーゼ(EC 4,2,2,10) 、ポリガラクツロナーゼ(EC 3.2.1.15) 、エキソ－ポリガラクツロネートリアーゼ(EC 4.2.2.9)およびエキソ－アルファ－ガラクツロノシダーゼ(EC 3.2.1.82) は、酵素の命名法（1992）により提供される酵素の分類の中に含められる。
【０００４】
ペクチン酸リアーゼは、異なる細菌属、例えば、エルウィニア(Erwinia) 、シュードモナス(Pseudomonas) 、クレブシエラ(Klebsiella)およびザントモナス(Xanthomonas) からクローニングされてきている。また、バシラス・サチリス(Bacillus subtilis)(Nasser et al.(1993)FEBS 335:319-326)およびバシラス（Bacillus）種YA-14(Kim et al.(1994)Biosci.Biotechnol.Biochem.58:947-949) からのペクチン酸リアーゼのクローニングが記載された。
【０００５】
バシラス・プミラス(Bacillus pumilus)(Dave およびVaughn(1971)J.Bacteriol.108:166-174)、バシラス・ポリミクサ（Bacillus polymyxa ）(NagelおよびVaughn(1961)Arch.Biochem.Biophys.93:344-352)、バシラス・ステアロサーモフィラス(Bacillus stearothermophilus)(KarbassiおよびVaughn(1980)Can J.Microbiol.26:377-384) 、バシラス（Bacillus）種(Hasegawa およびNagel(1966)J.Food Sci.31:838-845) およびバシラス（Bacillus）種PK9(Kelly およびFogarty(1978)Can J.Microbiol.24:1164-1172)により産生される、８－10のpH範囲の最大活性を有するペクチン酸リアーゼの精製が報告されたが、これらの生物からの遺伝子をコードするペクチン酸リアーゼのクローニングについての刊行物は見出されなかった。
【０００６】
記載されたすべてのペクチン酸リアーゼは最大の活性のために2 価のカチオンを必要とし、カルシウムイオンは最も刺激性が強い。
ＷＯ98/45393号明細書には、泥の汚れに対して顕著な洗浄性を有するプロトペプチナーゼを含有する洗浄組成物が開示されている。
一般に、ペクチナーゼ産生微生物は、広い範囲のペクチン分解または変性酵素を示す。しばしば、微生物はまたセルラーゼおよび／またはヘミセルラーゼを産生し、そしてこのような微生物からの複雑な多成分酵素調製物は種々の用途のために最適化することが困難で

あることがあり、有害作用を有する酵素を含有することさえある。こうして、本発明の目的は、例えば、洗剤または異なる工業的方法において、所望の作用のみを示すペクチン分解酵素を提供することである。

【０００７】

発明の要約

本発明者らは、種々の工業的プロセスにおいて中性またはアルカリ性条件下にきわめてすぐれた性能を示す、実質的にペクチン酸リアーゼ活性を有する、いくつかの新規な酵素を今回発見し、同定し、そしてこのような酵素をコードするDNA 配列を同定することに成功した。これらの酵素は、同一の部分的アミノ酸配列を有する、少なくとも２つの保存された領域をもつペクチン酸リアーゼの新規なクラスを形成する。

【０００８】

したがって、第1 の面において、本発明は、次の配列：Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro （NLNSRVP ）を有する7 個のアミノ酸残基から成る第１アミノ酸配列を含んでなるペクチン酸リアーゼに関する。それ以上の態様において、ペクチン酸リアーゼは次の配列：Trp Val Asp His Asn Glu （WVDHNE）およびTrp Ile Asp His Asn Glu （WIDHNE）から成る群より選択される６個のアミノ酸残基から成る第２アミノ酸配列をさらに保持することができ、そしてさらにペクチン酸リアーゼは必要に応じてまた次の配列：Ser Trp Asn （SWN ）を有する３個のアミノ酸残基から成る第３アミノ酸配列を保持することができる。

【０００９】

本発明の５つのペクチン酸リアーゼのDNA 配列は、それぞれ、配列番号：１、３、５、７および９に列挙される配列であり、そして推定されたアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号：２、４、６、８および10に列挙される配列である。新規な酵素は酵素の命名法に従い酵素のクラスEC 4.2.2.2の中に分類されると考えられる。しかしながら、本発明は、また、従来EC 4.2.2.2に属する酵素に帰属されるペクテートおよびポリガラクトウロニドに対する活性の外にペクチン（これはエステル化されていてもよい）に対して触媒活性を示す。

【００１０】

第２の面において、本発明は、

i)バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)NCIMB 40482 もしくはDSM 8721により産生されるポリペプチド；

ii) 配列番号:2の位置27－359 に示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；

iii)前記ポリペプチドと少なくとも45％相同性であるi)もしくはii) において定義されたポリペプチドのアナローグ；

iv)1または複数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により前記ポリペプチドから誘導され、ただし位置240 におけるアルギニン、および必要に応じてさらに、位置245 におけるアルギニンが保存され、かつ誘導されたポリペプチドが前記ポリペプチドに対して少なくとも42％相同性であるかポリペプチド；あるいは

v)精製された形態の前記ポリペプチドに対して発生させたポリクローナル抗体と免疫学的に反応性であるポリペプチド；

であるペクチン酸リアーゼに関する。

【００１１】

１つの面において、本発明は、

(a) ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:1に示すヌクレオチド79～ヌクレオチド1077のヌクレオチド配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；

(b) 上記(a) の種の相同体；

(c) 配列番号:2のアミノ酸残基27～アミノ酸残基359 のアミノ酸配列に対して少なくとも45％同一であるペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；

(d) 上記(a) 、(b) もしくは(c) に対して相補的な分子；および

(e) 上記(a) 、(b) 、(c) もしくは(d) の縮重ヌクレオチド配列；

から成る群より選択される、単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。
【００１２】
本発明のペクチン酸リアーゼをコードするポリヌクレオチド分子（DNA 配列）を含んでなるプラスミドpSJ1678 は、大腸菌(Escherichia coli)の株の中に形質転換された。この菌株は、特許手続きの目的のための微生物の寄託の国際的承認についてのブダペスト条約の規定に従い、DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Fedral Republic of Germany)に受託番号DSM 11788 で1997年９月25日に、本発明者らにより寄託された。
【００１３】
第３の面において、本発明は、
i)バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)ATCC 14580により産生されるポリペプチド；
ii) 配列番号:4の位置28－341 に示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；
iii)前記ポリペプチドと少なくとも45％相同性であるi)もしくはii) において定義されたポリペプチドのアナローグ；
iv)1または複数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により前記ポリペプチドから誘導され、ただし位置233 におけるアルギニン、および必要に応じてさらに、位置238 におけるアルギニンが保存され、かつ誘導されたポリペプチドが前記ポリペプチドに対して少なくとも42％相同性であるポリペプチドか；あるいは
v)精製された形態の前記ポリペプチドに対して発生させたポリクローナル抗体と免疫学的に反応性であるポリペプチド；
であるペクチン酸リアーゼに関する。
【００１４】
１つの面において、本発明は、
(a) ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:3に示すヌクレオチド82～ヌクレオチド1026のヌクレオチド配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
(b) 上記(a) の種の相同体；
(c) 配列番号:4のアミノ酸残基28～アミノ酸残基341 のアミノ酸配列に対して少なくとも45％同一であるペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
(d) 上記(a) 、(b) もしくは(c) に対して相補的な分子；および
(e) 上記(a) 、(b) 、(c) もしくは(d) の縮重ヌクレオチド配列；
から成る群より選択される、単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。
【００１５】
本発明のペクチン酸リアーゼをコードするポリヌクレオチド分子（DNA 配列）を含んでなるプラスミドpSJ1678 は、大腸菌(Escherichia coli)の株の中に形質転換された。この菌株は、特許手続きの目的のための微生物の寄託の国際的承認についてのブダペスト条約の規定に従い、DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Fedral Republic of Germany)に受託番号DSM 11789 で1997年９月25日に、本発明者らにより寄託された。
【００１６】
第４の面において、本発明は、
i)配列番号:14 の16S rDNA配列を有するバシラス（Bacillus）種により産生されるか、または配列番号:14 に対して97.3％より高い16S rDNA配列の相同性を有するバシラス（Bacillus）属の種により産生されるポリペプチド；
ii) 配列番号:6の位置181 －509 に示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；
iii)前記ポリペプチドと少なくとも50％相同性であるi)もしくはii) において定義されたポリペプチドのアナローグ；
iv)1または複数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により前記ポリペプチドから誘導され、ただし位置390 におけるアルギニン、および必要に応じてさらに、位置395 における

アルギニンが保存され、かつ誘導されたポリペプチドが前記ポリペプチドに対して少なくとも44％相同性であるポリペプチド；あるいは
v)精製された形態の前記ポリペプチドに対して発生させたポリクローナル抗体と免疫学的に反応性であるポリペプチド；
であるペクチン酸リアーゼに関する。
【００１７】
１つの面において、本発明は、
(a) ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:5に示すヌクレオチド541 ～ヌクレオチド1530のヌクレオチド配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
(b) 上記(a) の種の相同体；
(c) アミノ酸残基181 ～アミノ酸残基509 の配列番号:6のアミノ酸配列に対して少なくとも50％同一であるペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
(d) 上記(a) 、(b) もしくは(c) に対して相補的な分子；および
(e) 上記(a) 、(b) 、(c) もしくは(d) の縮重ヌクレオチド配列；
から成る群より選択される、単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。
【００１８】
本発明のペクチン酸リアーゼをコードするポリヌクレオチド分子（DNA 配列）を含んでなるプラスミドpSJ1678 は、大腸菌(Escherichia coli)の株の中に形質転換された。この菌株は、特許手続きの目的のための微生物の寄託の国際的承認についてのブダペスト条約の規定に従い、DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Fedral Republic of Germany)に受託番号DSM 12403 で1998年9 月8 日に、本発明者らにより寄託された。
【００１９】
第５の面において、本発明は、
i)バシラス・ハロヅランス（Bacillus haloduranns）種、好ましくはバシラス（Bacillus）スペーシス、KJ59、DSM 12419 の株により産生されるポリペプチド；
ii) 配列番号:8の位置42－348 に示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；
iii)前記ポリペプチドと少なくとも45％相同性であるi)またはii) において定義されたポリペプチドのアナローグ；
iv)1または複数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により前記ポリペプチドから誘導され、ただし位置240 におけるアルギニン、および必要に応じてさらに、位置245 におけるアルギニンが保存され、かつ誘導されたポリペプチドが前記ポリペプチドに対して少なくとも40％相同性であるポリペプチド；あるいは
v)精製された形態の前記ポリペプチドに対して発生させたポリクローナル抗体と免疫学的に反応性であるポリペプチド；
であるペクチン酸リアーゼに関する。
【００２０】
バシラス（Bacillus）種 KJ59 は、既知のバシラス・ハロヅランス（Bacillus haloduranns）種に属するか、あるいはそれに少なくとも非常に密接に関係し、特許手続きの目的のための微生物の寄託の国際的承認についてのブダペスト条約の規定に従い、DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Fedral Republic of Germany)に受託番号DSM 12419 として1997年９月21日に、本発明者らにより寄託された。
【００２１】
１つの面において、本発明は、
(a) ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:7に示すヌクレオチド124 ～ヌクレオチド1047のヌクレオチド配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；

(b) 上記(a) の種の相同体；
(c) 配列番号:8のアミノ酸残基42～アミノ酸残基348 のアミノ酸配列に対して少なくとも45%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
(d) 上記(a) 、(b) または(c) に対して相補的な分子；および
(e) 上記(a) 、(b) 、(c) または(d) の縮重ヌクレオチド配列；
から成る群より選択される、単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

【００２２】

第６の面において、本発明は、
i)配列番号:13 の16S rDNA配列を有するバシラス（Bacillus）種により産生されるか、または配列番号:13 に対して98.1%より高い16S rDNA配列の相同性を有するバシラス（Bacillus）属の種により産生されるポリペプチド；
ii) 配列番号:10 の位置25－335 に示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；
iii)前記ポリペプチドと少なくとも45%相同性であるi)またはii) において定義されたポリペプチドのアナローグ；
iv)1または複数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により前記ポリペプチドから誘導され、ただし位置227 におけるアルギニン、および必要に応じてさらに、位置232 におけるアルギニンが保存され、かつ誘導されたポリペプチドが前記ポリペプチドに対して少なくとも41%相同性であるポリペプチド；あるいは
v)精製された形態の前記ポリペプチドに対して発生させたポリクローナル抗体と免疫学的に反応性であるポリペプチド；
である、ペクチン酸リアーゼに関する。

【００２３】

１つの面において、本発明は、
(a) ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:9に示すヌクレオチド73～ヌクレオチド1008のヌクレオチド配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
(b) 上記(a) の種の相同体；
(c) 配列番号:10 のアミノ酸残基25～アミノ酸残基335 のアミノ酸配列に対して少なくとも45%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；
(d) 上記(a) 、(b) または(c) に対して相補的な分子；および
(e) 上記(a) 、(b) 、(c) または(d) の縮重ヌクレオチド配列；
から成る群より選択される、単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

【００２４】

本発明のペクチン酸リアーゼをコードするポリヌクレオチド分子（DNA 配列）を含んでなるプラスミドpSJ1678 は、大腸菌(Escherichia coli)の株の中に形質転換された。この菌株は、特許手続きの目的のための微生物の寄託の国際的承認についてのブダペスト条約の規定に従い、DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Fedral Republic of Germany)に受託番号DSM 12404 として1998年９月８日に、本発明者らにより寄託された。

【００２５】

本発明の他の面において、下記の作用可能に連鎖された因子：
転写プロモーター；
a) 配列番号:1に示すヌクレオチド79～ヌクレオチド1077のヌクレオチド配列、配列番号:3に示すヌクレオチド82～ヌクレオチド1026のヌクレオチド配列、配列番号:5に示すヌクレオチド541 ～ヌクレオチド1530のヌクレオチド配列、配列番号:7に示すヌクレオチド124 ～ヌクレオチド1047のヌクレオチド配列または配列番号:9に示すヌクレオチド73～ヌクレオチド1008のヌクレオチド配列を含んでなる、ペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；b) 配列番号:2のアミノ酸残基27～アミノ酸残基359 、配列番号:4のアミノ酸残基28～アミノ酸残基341 、配列番号:6のアミノ酸残基181 ～アミノ酸残基509 、配列番号:8のアミノ酸残基42～アミノ酸残基348 または配列番号:10 のアミノ酸残基25～アミノ酸残基335 のアミノ酸配列に対して少なくとも50%同一

であるペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子；あるいはc)上記 (a)または(b) の縮重ヌクレオチド配列；並びに
転写ターミネーター；
を含んでなる発現ベクターが提供される。
【００２６】
本発明のなお他の面において、上に開示された発現ベクターが導入されており、DNA セグメントによりコードされるポリペプチドを発現する、培養した細胞が提供される。
本発明のそれ以上の面は、
a)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:2に示す残基27～残基359 のアミノ酸を含んでなるポリペプチド分子；
b)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:2のアミノ酸残基27～アミノ酸残基359 のアミノ酸に少なくとも45%同一であるポリペプチド分子；
c)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:4に示す残基28～残基241 のアミノ酸を含んでなるポリペプチド分子；
d)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:4のアミノ酸残基28～アミノ酸残基341 のアミノ酸に少なくとも45%同一であるポリペプチド分子；
e)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:6に示す残基181 ～残基509 のアミノ酸を含んでなるポリペプチド分子；
f)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:6のアミノ酸残基181 ～アミノ酸残基509 のアミノ酸に少なくとも50%同一であるポリペプチド分子；
g)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:8に示す残基42～残基348 のアミノ酸を含んでなるポリペプチド分子；
h)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:8のアミノ酸残基42～アミノ酸残基348 のアミノ酸に少なくとも45%同一であるポリペプチド分子；
i)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:10 に示す残基25～残基335 のアミノ酸を含んでなるポリペプチド分子；
k)ペクチン酸リアーゼ活性を有しかつ配列番号:10 のアミノ酸残基25～アミノ酸残基335 のアミノ酸に少なくとも45%同一であるポリペプチド分子；並びに
l)上記a)、b)、c)、d)、e)、f)、g)、h)、i)およびk)の種相同体；
から成る群より選択される単離されたポリペプチドを提供する。
【００２７】
本発明の他の面において、本発明による精製されたペクチン酸リアーゼおよび酵素活性を有する他のポリペプチドとの組合わせからなる組成物が提供される。
本発明の他の面において、上に開示された発現ベクターが導入された細胞を培養し、これにより前記細胞はDNA セグメントによりコードされるポリペプチドを発現し、そしてポリペプチドを回収する、ことからなる、本発明によるペクチン酸リアーゼを製造する方法が提供される。
【００２８】
本発明の新規なペクチン酸リアーゼ酵素は、セルロース材料、特にセルロースを含有する繊維、糸、織布または不織布の処理、機械的製紙用パルプまたは再循環廃棄物紙の処理、および繊維の加湿柔軟化のために有用である。処理はセルロース材料を被服の製作または布帛の製作に利用される材料にプロセシングする間に、例えば、糊抜きまたは精練工程において、あるいはこのような布帛または被服の工業的または家庭における洗濯の間に実施することができる。
したがって、それ以上の面において、本発明は、実質的にペクチン酸リアーゼ活性を有する酵素を含んでなる洗浄組成物；およびセルロースを含有する繊維、糸、織布または不織布を処理するための本発明の酵素の使用を提供する。
【００２９】
本発明のペクチン酸リアーゼは、セルロース材料の製造における酵素精練において、例えば、引き続く染色操作における応答を適切するために、使用するとき特に有効である。さ

らに、新規なペクチン酸リアーゼからなる洗浄組成物は洗濯物上に存在する、ある種の汚染または汚れ、特にガラクタンまたはアラビノガラクタンを含有する食物、植物、およびその他から生ずる汚れおよびスポットを除去または漂白することができることが考えられる。また、新規な酵素からなる洗浄組成物を使用する処理は、ある種の汚れがセルロース材料に結合するのを防止できることが考えられる。本発明の酵素は、また、クリーニングを必要とする硬質表面からある種の汚染または汚れを除去する効果または除去を促進する効果を有する，硬質表面のクリーニング組成物における成分として有用である。

【００３０】

定義

本発明をさらに詳細に説明する前に、下記の用語をまず定義する。

用語「オーソログ」（ortholog）（または「種の相同体」（species homolog ））は、異なる種からの類似のポリペプチドまたはタンパク質に対する相同性を有する１つの種から得られたポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

用語「パラログ」（paralog ）は、同一種からの別個のポリペプチドまたはタンパク質に対する相同性を有する、所定の種から得られたポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

【００３１】

用語「発現ベクター」は、注目のポリペプチドの転写を提供する追加のセグメントに作用可能に連鎖された、注目のポリペプチドをコードするセグメントを含んでなる、線状または環状のDNA 分子を意味する。このような追加のセグメントは、プロモーターおよびターミネーターの配列を含むことができ、そして必要に応じて１またはそれ以上の複製領域、１またはそれ以上の選択可能なマーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、およびその他を含むことができる。発現ベクターは一般にプラスミドまたはウイルスDNA から誘導されるか、あるいは双方の因子を含有することができる。

【００３２】

本発明の発現ベクターは、組換えDNA 手法に好都合に付される発現ベクターであることができ、そしてベクターの選択はベクターを導入すべき宿主細胞に依存するであろう。こうして、ベクターは自律的に複製するベクター、すなわち、染色体実在物として存在するベクター、であることができ、その複製は染色体の複製に対して独立であり、例えば、プラスミドである。あるいは、ベクターは、宿主細胞の中に導入されるとき、宿主細胞の中に組込まれ、それが組込られた１またはそれ以上の染色体と一緒に複製するベクターであることができる。

【００３３】

ポリペプチドまたはタンパク質の発現と組み合わせて本発明において使用される、用語「発現された組換え体」または「組換え的に発現された」は、この分野における定義に従い定義される。タンパク質の組換え的発現は、一般に、直ぐ上に記載した発現ベクターを使用することによって実施される。

【００３４】

用語「単離された」は、ポリヌクレオチド分子に適用するとき、ポリヌクレオチドがその天然の遺伝的環境から除去され、こうして他の外来のまたは望ましくないコーディング配列を含まず、そして遺伝子操作されたタンパク質の産生系において使用するために適当な形態にあることを意味する。このような単離された分子は、それらの天然の環境から分離された分子であり、そしてcDNAおよびゲノムクローンを包含する。本発明の単離されたDNA 分子は、それらが本来関連する他の遺伝子を含まないが、天然に存在する5'および3'非翻訳領域、例えば、プロモーターおよびターミネーターを含むことができる。関連する領域の同定は当業者にとって明らかであろう（例えば、Dynan およびTijan 、Nature 316:774-78 、1985参照）。

【００３５】

タンパク質／ポリペプチドに適用するとき、用語「単離された」はタンパク質がその天然の環境以外の条件下に見出されることを意味する。好ましい形態において、単離されたタ

ンパク質は他のタンパク質、特に他の相同的タンパク質(すなわち、「同種性不純物」(homologous impurities) (下文参照))を実質的に含まない。40％より高い、より好ましくは60％より高い純度の形態でタンパク質を提供することが好ましい。
なおより好ましくは、SDS-PAGEにより測定して、高度に精製された形態、すなわち、80％より高い、より好ましくは95％より高い、なおより好ましくは99％より高い純度の形態でタンパク質を提供することが好ましい。

【００３６】

用語「単離されたタンパク質／ポリペプチド」は互換的に「精製されたタンパク質／ポリペプチド」と呼ぶことができる。
用語「同種性不純物」（homologous impurities ）は、本発明のポリペプチドが本来得られた同種細胞（homologous cell ）に由来する不純物（例えば、本発明のポリペプチド以外の、任意の不純物を意味する。
用語「から得られた」は、特定の微生物源と組み合わせて本明細書において使用するとき、ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドが特定の源により産生される、あるいは前記源からの遺伝子が挿入された細胞により産生されたことを意味する。

【００３７】

用語「に対して内因性」は、特定の微生物源と組み合わせて本明細書において使用するとき、天然の遺伝子、すなわち、前記源の細胞の中に組換え的に挿入されなかったが、天然に存在する遺伝子、の源の中に存在するために、ポリペプチドが特定の源により産生されることを意味する。
用語「作用可能に連鎖された」は、DNA セグメントについて言及するとき、セグメントがそれらの意図する目的に協力して機能するように、例えば、転写がプロモーター中で開始し、コーディングセグメントを通してターミネーターまで進行するように、セグメントが配置されていることを意味する。

【００３８】

用語「ポリヌクレオチド」は、5'から3'末端に読んでデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖のポリマーを意味する。ポリヌクレオチドはRNA およびDNA を包含し、そして天然源から単離し、in vitroで合成するか、あるいは天然および合成の分子の組合わせから製造することができる。

【００３９】

用語「ポリヌクレオチド分子の相補体」は、参照配列に比較して相補的塩基配列および逆方向を有するポリヌクレオチド分子を意味する。例えば、配列5' ATGCACGGG 3' は5' CCCGTGCAT 3' に対して相補的である。
用語「縮重ヌクレオチド配列」は、１またはそれ以上の縮重コドンを含むヌクレオチド配列を意味する（ポリペプチドをコードする参照ポリヌクレオチド分子に比較して）。縮重コドンはヌクレオチドの異なるトリプレットを含有するが、同一アミノ酸残基をコードする（すなわち、GAU およびGAC の各々はＡｓｐをコードする）。

【００４０】

用語「プロモーター」は、RNA ポリメラーゼの結合および転写の開始を提供するDNA 配列を含有する遺伝子の部分を意味する。プロモーター配列は、常にではないが、普通に、遺伝子の5'非コーディング領域において見出される。
用語「分泌シグナル配列」は、より大きいポリペプチドの１成分として、より大きいポリペプチドをそれが合成される細胞の分泌経路を通して向ける、ポリペプチド（「分泌ペプチド」）をコードするDNA 配列である。より大きいペプチドは、分泌経路を通る移行の間に、普通に切断されて分泌ペプチドが除去される。

【００４１】

用語「ペクチン」は、ペクテート、ポリガラクツロン酸、およびより高いまたは低い程度にエステル化することができるペクチンを意味する。
用語「ペクチナーゼ」は、この技術に従い定義されるペクチナーゼ酵素を意味し、ここでペクチナーゼはペクチン物質、主としてポリ（1,4-アルファ-d- ガラクツロニドおよびそ

の誘導体のグリコシド結合を切断する酵素のグループである（参考文献Saki et al., Pectin,pectinase and protopectnase:production,propeties and application,pp 213-294: Advaces in Applied Microbiology vol:39, 1993参照）。

【００４２】

好ましくは、本発明のペクチナーゼは、ペクチン酸（また、ポリガラクツロン酸と呼ばれる）中のアルファ-1,4- グリオシド結合のトランス脱離によるランダム切断を触媒するペクチナーゼ酵素、例えば、酵素のクラス、ポリガラクツロネートリアーゼ（EC 4.2.2.2)(PGL)（また、ポリ（1,4-アルファ-d- ガラクツロニド）リアーゼとして知られている、これは、また、ペクチン酸リアーゼとして知られている）である。

【００４３】

発明の詳細な説明

他の関係する配列を得るための本発明の配列の使用方法：本発明のペクチン酸リアーゼをコードするポリヌクレオチド配列に関係する、本明細書において開示する配列の情報を、他の相同的ペクチン酸リアーゼを同定する道具として使用することができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR) を使用して、種々の微生物源、特に異なるバシラス（Bacillus）種からの他の相同的ペクチン酸リアーゼをコードする配列を増幅することができる。

【００４４】

ポリヌクレオチド：

本発明の好ましい態様において、本発明は、それぞれ、配列番号：１、３、５、７または９の同様な大きさの領域に、少なくとも中程度のストリンジェンシイ条件下に、ハイブリダイズするであろう本発明の単離されたポリヌクレオチド、またはそれらに対して相補的な配列に関する。

【００４５】

特に、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号:1の位置79－1077、配列番号:3の位置82－1026、配列番号:5の位置541 －1530、配列番号:7の位置124 －1047または配列番号:9の位置73－1008に示す完全な配列（ポリペプチドの成熟部分をコードする）からなる変性された二本鎖DNA プローブ、あるいは配列番号：１、３、５、７または９のサブ配列からなるプローブ、あるいは少なくとも約100 塩基対の長さを有する配列番号：１、３、５、７または９のサブ配列からなるプローブに、少なくとも中程度のストリンジェンシイ条件下に、好ましくは高いストリンジェンシイ条件下に、後述するように、ハイブリダイゼーションするであろう。

【００４６】

ヌクレオチドプローブと、相同的DNA またはRNA 配列との間の中程度または高いストリンジェンシイを決定するために適当な実験条件は、DNA フラグメントまたはRNA を含有するフィルターを５×SSC （塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム、Sambrook et al., 1989)中で１０分間前浸漬してハイブリダイズさせ、フィルターを５×SSC 、５×デンハルト溶液（Sambrook et al. 、1989）、0.5 %のSDS および100 μg/mlの変性し超音波処理したサケ精子DNA （Sambrook et al., 1989)の溶液中でプレハイブリダイゼーションし、次いで10ng/ml の濃度のランダムプライムド(Feinberg, A.P. およびVogelstein, B.(1983)Anal.Biochem.132:6-13), ^{32}P-dCTP標識化（１×10^9cpm/ μg より高い比活性）プローブを含有する同一溶液中で約45℃において１２時間ハイブリダイゼーションすることを含む。次いで、フィルターを２×SSC 、0.5 %のSDS 中で少なくとも60℃（中程度のストリンジェンシイ）、なおより好ましくは少なくとも65℃（中程度の／高いストリンジェンシイ）、さらにより好ましくは少なくとも70℃（高いストリンジェンシイ）、なおさらにより好ましくは75℃（非常に高いストリンジェンシイ）において30分間２回洗浄する。オリゴヌクレオチドのプライマーがこれらの条件下にハイブリダイゼーションする分子は、Ｘ線フィルムを使用して検出される。

【００４７】

前述したように、本発明の単離されたポリヌクレオチドはDNA およびRNA を包含する。DNA およびRNA を単離する方法はこの分野においてよく知られている。問題の遺伝子をコー

ドするDNA およびRNA は、この分野において知られている方法により遺伝子バンクまたはDNA ライブラリーにおいてクローニングすることができる。次いで、本発明のペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、例えば、ハイブリダイゼーションまたはPCR により、同定し、単離する。
本発明は、異なる細菌の株からの対応物のポリペプチドおよびポリヌクレオチド（オーソログまたはパラログ）を提供する。バシラス（Bacillus）属の種を包含する、グラム陽性好アルカリ性株からのペクチン酸リアーゼのポリペプチドは特に重要である。
【００４８】
本発明により提供される情報および組成物を慣用のクローニング技術と組合わせて使用して、本発明のペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドの種の相同体をクローニングすることができる。例えば、タンパク質を発現する細胞の型から得られた染色体DNA を使用して、DNA をクローニングすることができる。本明細書に開示する配列から設計されたプローブでノザンブロットをプロービングすることによって、適当なDNA 源を同定することができる。
【００４９】
次いで、陽性の細胞系統の染色体DNA から、ライブラリーを調製する。次いで、種々の方法により、例えば、完全なまたは部分的DNA で、あるいは開示した配列をベースとするデジェネレイトプローブの１またはそれ以上の組でプロービングすることによって、本発明のペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA を単離することができる。また、本明細書に開示する配列から設計したプロモーターを使用するポリメラーゼ連鎖反応、すなわち、PCR （Mullis、 米国特許第4,683,202 号）を使用して、DNA をクローニングすることができる。
【００５０】
追加の方法において、DNA ライブラリーを使用して宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトし、そしてバシラス・リヘニフォルミス(B.licheniformis) 、ATCC 14580からクローニングしたペクチン酸リアーゼ、バシラス・アガラドヘレンス(B.agaradhaerens) 、NCIMB 40482 からクローニングしたペクチン酸リアーゼ、または配列番号:14 中に列挙するその16S rDNA配列により同定されるバシラス（Bacillus）種 AAI12からクローニングしたペクチン酸リアーゼ、またはバシラス（Bacillus）種 KJ59 、
【００５１】
DSM 12419 からクローニングしたペクチン酸リアーゼ、または配列番号:13 中に列挙するその16S rDNA配列により同定されるバシラス（Bacillus）種 I534 からクローニングしたペクチン酸リアーゼ(それらのすべては材料および方法および酵素に記載されているように発現させ、精製される）に対して発生させた抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）を使用するか、あるいはペクチン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドに関する活性試験により、問題のDNA の発現を検出することができる。また、同様な技術をゲノムのクローンの単離に適用することができる。
【００５２】
ペクチン酸リアーゼ酵素を産生する、細菌のバシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)種の株、好ましくはATCC 14580株、または本明細書において記載する他のまたは関係する微生物から、大腸菌(Escherichia coli)DSM 11789 の中に存在するpSJ1678 の中にクローニングされたDNA 配列のポリペプチドをコードする部分および／または本発明のアナローグのDNA 配列をクローニングすることができる。
【００５３】
同様に、ペクチン酸リアーゼ酵素を産生する型のDSM 8721により代表される細菌のバシラス・アガラドヘレンス（Bacillus agaradhaerens）種の株、または本明細書において記載する他のまたは関係する微生物から、大腸菌(Escherichia coli)DSM 11789 の中に存在するpSJ1678 の中にクローニングされたDNA 配列のポリペプチドをコードする部分および／または本発明のアナローグのDNA 配列をクローニングすることができる。
【００５４】

また、ペクチン酸リアーゼ酵素を産生する、バシラス（Bacillus）種 AAI12、バシラス（Bacillus）種 KJ59 、DSM 12419 、またはバシラス（Bacillus）種 I534 の株、または本明細書において記載する他のまたは関係する微生物から、それぞれ、大腸菌(Escherichia coli)DSM 12403 および12404 の中に存在するpSJ1678 の中にクローニングされたDNA 配列のポリペプチドをコードする部分および／または本発明のアナローグのDNA 配列をクローニングすることができる。

【００５５】

あるいは、大腸菌(Escherichia coli)DSM 11788 、11789 、DSM 12403 および12404 の中に存在するプラスミドから得ることができる配列、例えば、そのサブ配列をベースとして、および／またはDNA 配列によりコードされるペクチン酸リアーゼの他のアミノ酸配列を発生させないが、酵素の産生に意図される宿主微生物のコドンの使用に対応するヌクレオチドの置換の導入によるか、あるいは異なるアミノ酸配列（すなわち、本発明のペクチン酸リアーゼの変異型）を発生させることができるヌクレオチドの置換の導入により、類似の配列を構築することができる。本明細書に開示する配列の情報に基づいて、本発明のペクチナーゼをコードしかつ、それぞれ、配列番号：１、３、５、７または９に示すDNA 配列からなる、全長のDNA 配列をクローニングすることができる。

【００５６】

クローニングはこの分野において知られている標準的手順により、例えば、次のようにして実施される：バシラス（Bacillus）種からゲノムライブラリーを調製し；このようなライブラリーを適当な基質のプレート上にプレートし；それぞれ、配列番号：１、３、５、７または９をベースとするプローブを使用して標準的ハイブリダイゼーション技術により本発明のポリヌクレオチド配列からなるクローンを同定するか、あるいは、それぞれ、配列番号：１、３、５、７または９からの配列の情報をベースとするプライマーを使用して逆ＰＣＲ戦略により、例えば、バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)ATCC 14580またはバシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)DSM 8721または高度に関係するバシラス（Bacillus）ゲノムライブラリーからクローンを同定する。逆ＰＣＲに関するそれ以上の詳細については、M.J.MCPherson et al.(″PCR A practical approach″ Infomation Press Ltd、 Oxford England)を参照のこと。

【００５７】

本明細書に開示する配列の情報（配列番号: １、２ 、３ 、４ 、５ 、６ 、７ 、８ 、９ および10）に基づいて、当業者は関係する微生物からのゲノムライブラリー、特にバシラス（Bacillus）属の他の株、例えば、バシラス・サチリス(Bacillus subtilis) からのゲノムライブラリーを使用して、同様な戦略により、本発明の相同的ペクチナーゼをコードするポリヌクレオチド配列を日常的に単離することができる。

【００５８】

あるいは、本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA は、よく知られている手順に従い、適当な源、例えば、後述する微生物の任意のものから、大腸菌(Escherichia coli)DSM 11788 、DSM 11789 、DSM 12403 またはDSM 12404 の中に存在するプラスミドから得ることができるDNA 配列をベースとして製造された合成オリゴヌクレオチドのプローブを使用して、好都合にクローニングすることができる。

【００５９】

したがって、大腸菌(Escherichia coli)、DSM 11788 、DSM 11789 、DSM 12403 またはDSM 12404 （ここで前述したようにクローニングにより得られたプラスミドの各々は寄託された）から、本発明のポリヌクレオチド分子を単離することができる。また、本発明は、それぞれ、大腸菌(Escherichia coli)株、DSM 11788 、DSM 11789 、DSM 12403 またはDSM 12404 の各々の単離された、実質的に純粋な生物学的培養物に関する。

【００６０】

ポリペプチド：

配列番号:2のアミノ酸No.27 －359 の配列は成熟ペクチン酸リアーゼ配列である；位置１－26はプロペプチドである。配列番号:4のアミノ酸No.28 －341 の配列は成熟ペクチン酸

リアーゼ配列である；位置1 －27はプロペプチドである。配列番号:6のアミノ酸No.181－509 の配列は成熟ペクチン酸リアーゼ配列である；位置１－31はトランシットペプチドである；位置32－86は第１レクチンドメインである；位置87－134 は第２レクチンドメインである；位置135 －180 は第３レクチンドメインである。

【００６１】

配列番号:8のアミノ酸No.42 －348 の配列は成熟ペクチン酸リアーゼ配列である；位置1 －41はプロペプチドである。配列番号:10 のアミノ酸No.25 －335 の配列は成熟ペクチン酸リアーゼ配列である；位置1 －24はプロペプチドである。本発明のペクチン酸リアーゼは多糖リアーゼのファミリー1 に属すると考えられる。

【００６２】

本発明は、また、配列番号：２、４、６、８および10の成熟ポリペプチドに対して実質的に相同的であるペクチン酸リアーゼのポリペプチドおよびそれらの種の相同体（パラログまたはオーソログ）を提供する。用語「実質的に相同的」は、配列番号：２、４、６、８および10に示す配列に対して少なくとも45%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%の配列の同一性を有するポリペプチド、またはそれらのオーソログまたはパラログを意味するために本明細書において使用される。

【００６３】

このようなポリペプチドは、配列番号：２、４、６、８および10に示す配列に対してより好ましくは少なくとも95%同一であり、最も好ましくは少なくとも98%同一であり、またはそれらのオーソログまたはパラログであろう。配列の同一性の百分率は、慣用法により、この分野において知られているコンピュータープログラム、例えば、下記の文献に記載されているGSG プログラムパッケージ（Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)の中に提供されているGAP を使用して決定される：Journal of Molecular Biology, 48, 443-453(これは引用することによって本明細書の一部とされる）。GAP は下記のポリペプチドの配列の比較の設定で使用される：3.0 のGAP 発生のペナルティーおよび0.1 のGAP エクステンションのペナルティー。

【００６４】

ポリヌクレオチド分子の配列の同一性は、同様な方法により、下記のDNA 配列の比較のための設定とともにGAP を使用して決定される：5.0 のGAP 発生のペナルティーおよび0.3 のGAP エクステンションのペナルティー。

ユニークな第1 アミノ酸配列NLNSRVP （これはユニークであると考えられ、これにより工業的プロセス、例えば、繊維材料の処理および洗濯においてきわめてすぐれた性能を有する本発明のペクチン酸リアーゼのこの新規なグループに属する、新規なペクチン酸リアーゼを同定するために十分である）からなる本発明のペクチン酸リアーゼは、好ましくは下記の微生物に由来する：

【００６５】

好ましくは細菌、始原菌(arhea) または真菌、特に細菌、例えば、バシラス（Bacillus）、好ましくは好アルカリ性バシラス（Bacillus）種に属する細菌、これらは下記のものから成る群より選択される：バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)種、バシラス・ハロヅランス（Bacillus haloduranns）およびバシラス（Bacillus）種 I534 およびAAI12(それぞれ、配列番号:13 または14として記載する16S rDNA配列により同定される）、およびにより証明されるように整列された16S rDNA配列をベースとする、これらの種の任意のもの、好ましくはこれらの種の各々に対して少なくとも97%、なおより好ましくは少なくとも98%、相同的である種。

【００６６】

これらの高度に関係するバシラス（Bacillus）属の種は、ARB 配列のデータベース（http://www.biol.chemie.tumuenchen.de/pub/ARB/data/において入手可能な04-Mar-97 からリリースされる）を通して入手可能な整列された発表された16S rDNA配列を使用して、同定

された系統発生的関係に基づいて見出される。ARB プログラムパッケージ（Stunck、O.およびLudwig、W.1995。

【００６７】

ARB-配列のデータのソフトウェアの環境。Department of Microbiology, University of Munich, Munich, Germany, email arb(a)mikro.biologie.tu-muenchen.de. 、またはwww.at http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/data/を介して入手可能）を使用して、配列の解析を実施した。整列は二次構造に基づき、そしてマニュアル評価を含むARB整列（ARB __EDIT4)の自動的整列機能（バージョン2.0)を使用して実施した。

【００６８】

ARB プログラムパッケージの中に組込まれたフィリップ・ディスタンス・マトリックス（Phylip Dsitance Mtrix ）オプション（デフォルト値を設定して、すなわち、補正せずに）を使用して、距離を配列の類似性の百分率に変換することによって、配列の類似性を確立した。したがって、バシラス・リヘニフォルミス(B.licheniformis) 、ATCC 14580に最も密接に関係する種はバシラス・サチリス(B.subtilis)である；

【００６９】

バシラス（Bacillus）種 KJ59 、DSM 12419 に最も密接に関係する種はバシラス・ハロヅランス（B.haloduranns ）、DSM 11788(16S データX76442) （これは非常に密接するので、KJ59株はこの種の１つの株であると考えられる）である；バシラス（Bacillus）種 AAI12に最も密接に関係する種はバシラス・アガラドヘレンス(B.agaradhaerens) 、DSM 485(これは97.3%の16S の相同性を示す）である；そしてバシラス（Bacillus）種 I534 に最も密接に関係する種はバシラス（Bacillus）種、PN1 、DSM 8714(16SデータX76438)(これは98.1%の16S の相同性を示す）である。

【００７０】

ARB プログラムを使用し、最尤法（G.J.Olsen 、H.Matsuda 、T.Hagstrom、およびR.Overbeek.fastDNAmlからのFastDnaML アルゴリズム：最大確度を使用するDNA 配列の系統樹の構築のための道具。Comput.Appl.Biosci.10(1):41-48、1994) によりデフォルト値設定）フィルターなしかつ加重マスクなし）を使用して、系統樹を計算した。

【００７１】

実質的に相同的なタンパク質およびポリペプチドは、１または複数のアミノ酸配列の置換、欠失または付加を有するとして特徴づけられる。これらの変化は好ましくは最小の特質、すなわち、下記の特質を有する：保存的アミノ酸の置換（表2 参照）およびタンパク質またはポリペプチドのフォルディングまたは活性に実質的に影響を与えるない他の置換；小さい、典型的には１～約30アミノ酸の欠失；および小さいアミノ- またはカルボキシル- 末端のエクステンション、例えば、アミノ末端のメチオニン残基、約20－25残基までの小さいリンカーペプチド、または精製を促進する小さいエクステンション（親和標識）、例えば、ポリ- ヒスチジントラクト、プロテインA(Nilsson et al.、EMBO J. 4:1075、1985;Nilsson et al. 、Meth.Enzymol. 198:3 、1991。

【００７２】

一般に、下記の文献を参照のこと：Protein Expression and Purification 2:95-107、1991、これは引用することによって本明細書の一部とされる。親和標識をコードするDNA は商業的供給会社から入手可能である(例えば、Pharmacia Biotech.、ニュージャージイ州ピスカタウェイ；New England Biolabs 、マサチュセッツ州ベバーリイ）。

【００７３】

しかしながら、前述の変化は好ましくは小さい特質であるが、このような変化は、また、より大きい特質を有し、例えば、本発明のペクチン酸リアーゼポリペプチドに対するアミノ- またはカルボキシル- 末端の双方のエクステンションとして300 またはそれ多いアミノ酸までのより大きいポリペプチドの融合物であることができる。

【００７４】

【表１】

表１

保存的アミノ酸の置換

塩基性：	アルギニン
	リジン
	ヒスチジン
酸性：	グルタミン酸
	アスパラギン酸
極性：	グルタミン
	アスパラギン
疎水性：	ロイシン
	イソロイシン
	バリン
芳香族：	フェニルアラニン
	トリプトファン
	チロシン
小さい：	グリシン
	アラニン
	セリン
	スレオニン
	メチオニン

【００７５】
20の標準的アミノ酸に加えて、非標準的アミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリンおよびα- メチルセリン）を本発明によるアミノ酸残基と置換することができる。制限された数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によりコードされないアミノ酸、および天然に見出されされないアミノ酸をアミノ酸残基と置換することができる。

【００７６】
「天然に見出されされないアミノ酸」は、タンパク質合成後に変性されており、および／または標準的アミノ酸のそれと異なる、それらの１またはそれ以上の側鎖の化学的構造を有する。天然に見出されされないアミノ酸は化学的に合成することができるか、あるいは好ましくは商業的に入手可能であり、そしてピペコリン酸、チアゾリンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-および4-メチルプロリン、および3,3-ジメチルプロリンを包含する。

【００７７】
本発明のペクチン酸リアーゼのポリペプチド中の必須アミノ酸は、この分野において知られている手法、例えば、部位特異的突然変異誘発またはアラニン走査突然変異誘発に従い同定することができる（CunninghamおよびWells 、Science 244:1081-1085 、1989）。後者の技術において、単一のアラニンの突然変異を分子中の残基毎に導入し、生ずる分子を

生物学的活性（すなわち、ペクチン酸リアーゼ活性）について試験して、分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定する。

【００７８】

また、Hilton et al. 、J.Biol.Chem. 271:4699-4708、1996参照。また、推定上の接触部位のアミノ酸の突然変異と組み合わせた、核磁気共鳴、結晶学、電子回折またはフォトアフィニティー標識化のような技術により決定された、構造の物理的分析により、酵素の活性部位または他の生物学的を決定することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：de Vos et al., Science 255:306-312, 1992;Smith et al., J.Mol.Biol. 224:899-904, 1992;Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992。また、本発明によるポリペプチドに関係するポリペプチドとの相同性の分析から、必須アミノ酸の同一性を推定することができる。

【００７９】

突然変異誘発、組換えおよび／またはシャフリングの既知の方法および引き続く関係するスクリーニング手法、例えば、Reidhaar-OlsonおよびSauer(Science 241:53-57, 1998), Bowie およびSauer(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2152-2156 , 1989), WO95/17413 号、またはWO95/22625号により開示される手法を使用して、多数のアミノ酸置換を作り、試験することができる。

【００８０】

簡単に述べると、これらの著者らは、ポリペプチド中の２またはそれ以上の位置を同時にランダム化するか、あるいは異なる突然変異を組換え／シャフリングし（WO95/17413号、WO95/22625号）、次いでポリペプチドを機能性について選択し、次いで突然変異化して、各位置における許容可能な置換のスペクトルを決定する方法を開示している。使用できる他の方法は、ファージディスプレイ（例えば、Lowman et al., Biochem. 30:10832-10837, 1991;Ladner et al., 米国特許第5,223,409 号;Huse, WIPO 公開WO92/06204号）および領域特異的突然変異誘発(Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986;Ner et al., DNA 7:127, 1988)を包含する。

【００８１】

前述した突然変異誘発／シャフリング法を高い処理量の、自動化されたスクリーニング法と組み合わせて、宿主細胞中のクローニングし、突然変異誘発したポリペプチドの活性を検出することができる。活性なポリペプチドをコードする突然変異誘発したDNA 分子を宿主細胞から回収し、現代的装置により急速に配列決定することができる。これらの方法は問題のポリペプチド中の個々のアミノ酸残基の重要性の急速な決定を可能とし、そして未知の構造のポリペプチドに適用することができる。

【００８２】

前述の方法を使用して、配列番号:2の残基の残基27－359 、配列番号:4の残基28－341 、配列番号:6の残基181 －509 、配列番号:8の残基42－348 、および配列番号:10 の残基25－335 に対して実質的に相同性でありかつ野生型タンパク質のペクチン酸リアーゼ活性を保持する、種々のポリペプチドを同定しおよび／または製造することができる。

【００８３】

本発明のこのような変異型は、図１の配列の整列中のナンバリングに関して位置223 に、アミノ酸残基のアルギニンを有するペクチン酸リアーゼである。好ましい態様において、このような変異型はまた、第１図の配列の整列中のナンバリングに関して位置228 に、保存されたアルギニンを保持する。したがって、本発明は、配列番号：２、４、６、８および10の任意のアミノ酸配列から、１または複数のアミノ酸残基の欠失、置換または付加（以後、突然変異と呼ぶ）により、誘導されるアミノ酸配列を有するペクチン酸リアーゼに関し、ただしペクチン酸リアーゼ活性は奪活されておらず、そして突然変異は第１図の整列中の配列のナンバリングの第223 位置およびさらに、必要に応じて第228 位置におけるアルギニンを保存する。

【００８４】

これらの位置は、配列番号:2の第240 位置および第245 位置におけるアルギニン(R) 、配

列番号:4中の位置233 および238 、配列番号:6中の位置390 および395 、配列番号:8中の位置240 および245 、および配列番号:10 中の位置227 および232 に対応する。

【００８５】

さらに、前述の保存されたアルギニンに加えて、突然変異は第１図の整列中の配列のナンバリングの第169 位置にアスパラギン酸(D) および／または第173 位置にアスパラギン酸(D) および／または第193 位置にリジン(K) を保存することが好ましい。これらの位置は、配列番号:2の第186 位置および第190 位置におけるアスパラギン酸(D) および第210 位置におけるリジン(K);配列番号:4中の位置D180、D184およびK204；配列番号:6中の位置D336、 D340 およびK360; 配列番号:8中の位置D187、D191およびK211、および配列番号:10中の位置D174、 D178 およびK198に対応する。

【００８６】

本発明のそれ以上の態様において、配列番号：２、４、６、８および10に記載する任意の配列の親成熟ポリペプチドが提供され、突然変異体は、グルタミン酸(E) 、セリン(S) およびスレオニン(T) から成る群より選択されるアミノ酸残基で置換された上に特定した位置にアスパラギン酸、すなわち、下記の突然変異、を有する活性ペクチン酸リアーゼである：D169E 、D169S 、D169T 、D173E 、D173S 、D173T （第１図の整列のナンバリング）。

【００８７】

また、突然変異の程度は特に制限されないが、ただし第223 位置における前述のアルギニンは保存されている。好ましくは、配列番号：２、４、６、８および10の任意の配列について計算して、天然または親のペクチン酸リアーゼ酵素のこのような突然変異変異型の間に40％またはそれより高い相同性が存在する；配列番号:2のアミノ酸位置39および359 と配列番号:4のアミノ酸位置46および341 との間に42％またはそれより高い相同性が存在する；配列番号:6のアミノ酸位置187 および509 の間に44％またはそれより高い相同性が存在する；配列番号:8のアミノ酸位置50および348 の間に40％またはそれより高い相同性が存在する；そして配列番号:10 のアミノ酸位置40および335 の間に41％またはそれより高い相同性が存在する。

【００８８】

好ましくは、相同性は少なくとも45％であり、好ましくは少なくとも50％であり、より好ましくは少なくとも55％であり、より好ましくは少なくとも60％であり、なおより好ましくは少なくとも70％であり、なおより好ましくは少なくとも75％であり、なおより好ましくは少なくとも80％であり、なおより好ましくは少なくとも85％であり、なおより好ましくは少なくとも90％であり、なおより好ましくは少なくとも95％であり、特に少なくとも98％である。

【００８９】

本発明のペクチン酸リアーゼは、触媒的ドメインからなる酵素コアに加えて、また、セルロース結合ドメイン(CBD) を含み、酵素のセルロース結合ドメインおよび酵素コア（触媒的に活性なドメイン）は作用可能に連鎖されている。セルロース結合ドメイン(CBD) はコード化された酵素の組込まれた部分として存在するか、あるいは他の起源からのCBD はペクチン分解酵素の中に導入され、こうして酵素のハイブリッドをつくる。

【００９０】

これに関して、用語「セルロース結合ドメイン」は、下記の文献において定義されたように理解されることを意図する：Peter Tomme et al., "Cellulose-Binding Domains:Classification and Properties "in"Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates", John N.Saddler and Michael H.Penner(編) , ACS Symposium Series, No.618, 1996。この定義は120 より多いセルロース結合ドメインを10のファミリー(I～X)に分類し、そしてCBD が種々の酵素、例えば、セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、アセチルエステラーゼおよびクチナーゼの中に見出される。

【００９１】

CBD は、また、藻類、例えば、紅藻（Porphyra purpurea)の中に非加水分解的多糖結合タ

ンパク質として見出されたる；Tomme et al., op.cit. 参照。しかしながら、CBD の大部分はセルラーゼおよびキシラナーゼからのものであり、CBD はタンパク質のN 末端またはC 末端に見出されるか、あるいは内部に見出される。酵素のハイブリッドは、この分野において知られており、例えば、WO90/00609号およびWO95/16782号参照、そしてDNA 構築物を宿主細胞の中に形質転換し、ここでDNA 構築物はペクチン分解酵素をコードするDNA 配列に、リンカーを使用するか、または使用しないで、結合されたセルロース結合ドメインをコードするDNA のフラグメントから少なくともなり、そして宿主細胞を成長させて融合した遺伝子を発現させることによって製造することができる。

【００９２】

酵素のハイブリッドは、下記式により記載することができる：

CBD-MR-X

ここでCBD は少なくともセルロース結合ドメインに相当するアミノ酸配列のN 末端またはC 末端の領域であり；MRは中央領域（リンカー）であり、そして結合であるか、あるいは好ましくは約２～100 個の炭素原子、より好ましくは約２～20個の炭素原子の短い結合基であるか、あるいは好ましくは約２～100 個のアミノ酸、より好ましくは約２～20個のアミノ酸であり、そしてX は本発明のペクチン分解酵素のＮ末端またはＣ末端の領域である。

【００９３】

好ましくは、本発明の酵素は少なくとも８、より好ましくは8.5 より高い、より好ましくは９より高い、より好ましくは9.5 より高い、より好ましくは10より高い、なおより好ましくは10.5より高い、特に11より高いpHにおいて、最大の触媒活性を有し、そして好ましくは酵素の最大の活性は少なくとも50℃、より好ましくは少なくとも55℃の温度において得られる。

【００９４】

タンパク質の製造

全長のタンパク質、それらのフラグメントおよび融合タンパク質を包含する、本発明のポリペプチドは、慣用技術に従い遺伝子操作された宿主細胞において製造することができる。適当な宿主細胞は外因的DNA で形質転換またはトランスフェクトし、培養で成長させることができる型の細胞であり、そして細菌、菌類の細胞、および培養した高等真核細胞を包含する。細菌細胞、特にグラム陽性微生物の培養した細胞は好ましい。

【００９５】

バシラス（Bacillus）属からのグラム陽性細胞、例えば、バシラス・サチリス(Bacillus subtilis)、バシラス・レンツス（Bacillus lentus ）、バシラス・ブレビス（Bacillus brebis ）、バシラス・ステアロサーモフィラス(Bacillus stearothermophilus)、バシラス・アルカロフィルス（Bacillus alkalophilus 、バシラス・アミロリクファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)、バシラス・コアギュランス(Bacillus coagulans)、バシラス・サーキュランス(Bacillus circulans)、バシラス・ラウツス（Bacillus lautus ）、バシラス・スリンジエンシス(Bacillus thuringiensis)、バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)またはバシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)は特に好ましい。

【００９６】

クローニングしたDNA 分子を操作し、外因的DNA を種々の宿主細胞の中に導入する技術は下記の文献に記載されている：Sambrook et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989;Ausubel et al.（編）, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons,Inc., NY, 1987; および(Bacillus subtilis and Oter Gram-Positive Bacteria, Sonensheim et al., 1993, American Society for Microbiology, ワシントンDC)(これらは引用することによって本明細書の一部とされる）。

【００９７】

一般に、本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列はその発現に必要な他の遺伝

的因子、例えば、一般に発現ベクター内のプロモーターおよびターミネーターに作用可能に連鎖されている。ベクターは、また、１または複数の選択マーカーおよび１または複数の複製起点を含有するが、当業者は認識するように、ある種の系内に、選択可能なマーカーを別のベクター上に設けることができ、そして外因的DNA は宿主細胞のゲノムの中への組込みにより準備することができる。プロモーター、ターミネーター、選択可能なマーカー、ベクターおよび他の因子の選択は当業者のレベル内の日常的設計事項である。多数のこのような因子は文献に記載されており、商業的供給会社を通して入手可能である。

【００９８】

ポリペプチドを宿主細胞の分泌経路の中に向けるために、分泌シグナル配列（また、洗濯配列、プレプロ配列または前配列として知られている）を発現ベクターの中に設ける。分泌シグナル配列はポリペプチドのそれであるか、あるいは他の分泌されたタンパク質から誘導させるか、あるいは新たに合成することができる。多数の適当な分泌シグナル配列はこの分野において知られており、そして特にバシラス（Bacillus）宿主細胞中の分泌のために適当な分泌シグナル配列のそれ以上の説明については下記の文献を参照のこと：Bacillus subtilis and Oter Gram-Positive Bacteria, Sonensheim et al., 1993, American Society for Microbiology,ワシントンDC；およびCutting, S.M. （編）″Molecular Biological Methods for Bacillus ″, John Wiley and Sons, 1990 。

【００９９】

分泌シグナル配列をDNA 配列に正しいリーディングフレームで結合する。分泌シグナル配列は通常問題のポリペプチドをコードするDNA 配列に対して5'に位置するが、ある種の分泌シグナル配列は問題のDNA 配列の中のどこかに位置することができる(例えば、Welch et al., 米国特許第5,037,743 号;Holland et al.,米国特許第5,143,830 号参照）。

【０１００】

慣用手法に従い、栄養素および選択した宿主細胞の成長に必要な他の成分を含有する培地中で、形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を培養する。規定した培地および複雑な培地を包含する、種々の適当な培地はこの分野において知られており、そして一般に炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよび無機質を包含する。また、培地は、成長因子または血清のような成分を必要に応じて含有する。成長培地は、例えば、発現ベクター上に担持されるか、あるいは宿主細胞の中に共トランスフェクトされた選択可能なマーカーにより補足される必須栄養素の欠乏または薬剤選択により、外因的に添加されたDNA を含有する細胞のために、一般に選択されるであろう。

【０１０１】

本発明のポリペプチドは、また、バシラス（Bacillus）属に属する野生型株、好ましくはバシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)種およびバシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)およびバシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)種および高度に関係するバシラス（Bacillus）種（ここですべての種は整列された16S rDNA配列に基づいてバシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)に対して少なくとも95％相同的である）から成る群より選択することができる株を発酵させることによって、製造することができる。特別に、高度に好ましい例は、バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)、ATCC 14580、およびバシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)、DSM 8721である。

【０１０２】

さらに、本発明のポリペプチドは、前述の株から誘導された突然変異体または変異型を発酵させることによって製造することができる。このような突然変異体は、例えば、下記の文献に記載されているように、慣用の突然変異誘発に従い、問題の株を突然変異原（例えば、NTG(n-メチル-N- ニトロ-N- ニトロスクアニジン）で処理するか、あるいは紫外線に暴露することによって得ることができる。この突然変異誘発は株の突然変異を刺激するために実施される。突然変異誘発後、慣用のプレートアッセイまたは液体アッセイを使用して、できるだけ高いペクチナーゼの収率を与える突然変異体についてスクリーニングすることができる。

【０１０３】
発酵は炭素源および窒素源ならびに他の必須栄養素を含有する栄養培地中の好気性条件下に菌株を培養することによって実施することができ、培地は既知の技術の原理に従い構成される。培地は複合の富んだ培地または最小培地であることができる。窒素源は無機および／または有機の特質を有することができる。適当な無機窒素源が硝酸塩およびアンモニウム塩である。
【０１０４】
有機窒素源の中で、発酵において多数のものは規則的に使用されている。例は大豆かす、カゼイン、トウモロコシ、コーンスティープリカー、酵母エキス、尿素およびアルブミンである。適当な炭素源は炭水化物または炭水化物含有物質である。好ましくは、栄養培地はペクテート、ポリガラクツロン酸および／またはより高いまたはより低い程度にエステル化されたペクチンを炭素源および／またはペクチナーゼ産生の誘導因子として含有する。あるいは、培地はペクチンに富んだ物質、例えば、大豆かす、リンゴパルプまたは柑橘類果皮を含有する。
【０１０５】
本発明のバシラス（Bacillus）属の種は好アルカリ性であるので、培養アルカリ性pH値、例えば、少なくともpH８または少なくともpH９において実施されることが好ましく、このpH値は、成長培地の滅菌後、適当な緩衝剤、例えば、炭酸ナトリウムまたは炭酸ナトリウムと重炭酸ナトリウムとの混合物の添加により得ることができる。
適当な培地中の野生型株または突然変異体の発酵は、少なくとも0.5gのペクチナーゼタンパク質／リットルの培養ブロスまたはさらに少なくとも1g/lまたは2g/lの収量を生ずることができる。
【０１０６】
タンパク質単離：
発現された組換えポリペプチドが分泌されるとき、ポリペプチドを成長培地から精製することができる。好ましくは、各宿主細胞を培地から除去した後、ポリペプチドを精製する（例えば、遠心により）。
発現された組換えポリペプチドが分泌されないとき、宿主細胞を好ましくは崩壊させ、ポリペプチドを水性「抽出物」の中に解放させ、これはこのような精製技術の第１段階である。好ましくは、発現宿主細胞を培地から取出した後、細胞を崩壊させる（例えば、遠心により）。
【０１０７】
細胞の崩壊は慣用の技術、例えば、リゾチームの消化によるか、あるいは細胞を高圧にすることによって実施することができる。このような細胞の崩壊技術のそれ以上の説明については、下記の文献を参照のこと：Robert K.Scobes, Protein Purification, Second edition, Springer-Verlag。
発現された組換えポリペプチド（キメラポリペプチド）が分泌されるか、あるいはされないかにかかわらず、それは分画および／または慣用の精製方法および媒質を使用して精製することができる。
【０１０８】
硫酸アンモニウム沈降および酸またはカオトロープ抽出を試料の精製に使用することができる。典型的な精製工程は、ヒドロキシアパタイト、大きさ抽出、FPLCおよび逆相高性能液体クロマトグラフィーを包含することができる。適当なアニオン交換媒質は、誘導化デキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特製シリカ、およびその他を包含する。PEI 、DEAE、QAE およびQ 誘導体は好ましく、DEAEファスースト- フローセファローズ(Pharmacia、ニュージャージイ州ピスカタウェイ）は特に好ましい。典型的なクロマトグラフィーの媒質は、フェニル、ブチル、またはオクチル基で誘導化された媒質、例えば、Phenyl-Sepharose FF(Pharmacia), Toyopearl butyl 650(Toso Haas,ペンシルベニア州モントゴメリヴィレ）, Octyl-Sepharose(Pharmacia)およびその他；またはポリアクリル酸樹脂、例えば、Amberchrom CG 71(Toso Haas) およびその他を包含する。

【０１０９】
適当な固体の支持体は、ガラスビーズ、シリカをベースとする樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋したアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋したポリアクリルアミド樹脂およびその他を包含し、これらはそれらを使用する条件下で不溶性である。アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基および／または炭水化物部分によるタンパク質への結合を可能とする反応性基で、これらの支持体を変性することができる。
【０１１０】
カップリングの化学の例は、臭化シアンの活性化、N-ヒドロキシスクシンイミドの活性化、エポキシドのの活性化、スルフヒドリルの活性化、ヒドラジドの活性化、およびカーボジイミドカップリングの化学のためのカルボキシルおよびアミノ誘導体を包含する。これらおよび他の固体の媒質はこの分野においてよく知られかつ広く使用されており、そして商業的供給会社から入手可能である。
【０１１１】
特定の方法の選択は、日常的設計の事柄であり、そして一部分選択した支持体の性質により決定される。例えば、Affinity Chromatogrphy:Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology、スイス国ウップサラ、1988、参照。
本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントは、また、化学的合成により製造することができる。本発明のポリペプチドは、モノマーまたはマルチマーであることができ、グリコシル化するか、あるいはしないことができ、ペギル化(pegylate)するか、あるいはしないことができ、そして初期のメチオニンアミノ酸残基を含むか、あるいは含まないことができる。
【０１１２】
トランスジェニック植物
本発明は、また、本発明のペクチン分解酵素を回収可能な量で発現しかつ産生するように、この酵素をコードする配列で形質転換された、トランスジェニック植物、植物の部分または植物細胞に関する。この酵素を植物または植物の部分から回収することができる。組換え酵素を含有する植物または植物の部分をそのまま使用することができる。
【０１１３】
トランスジェニック植物は双子葉植物または単子葉植物、略して双子葉または単子葉、であることができる。単子葉植物は、イネ科植物、例えば、ナカハグサ(イチゴツナギ、Poa)、飼料のイネ科植物、例えば、フェスツカ(festuca) 、ロリウム(lolium)、温帯のイネ科植物、例えば、アグロスチス(Agrostis)、および穀物、例えば、コムギ、カラスムギ、ライムギ、オオムギ、イネ、モロコシおよびトウモロコシ（コーン）である。
【０１１４】
双子葉植物の例は、タバコ、マメ科の植物、例えば、ハウチワマメ、ジャガイモ、テンサイ、エンドウ豆、マメおよび大豆、およびアブラナ科(Brassicaceae のファミリー) 、例えば、カリフラワー、アマナズナ、セイヨウアブラナおよび密接に関係するモデルの微生物アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana)である。
植物の部分の例は、幹、カルス、葉、根、果実、種子、および塊茎である。本発明の関係において、また、特定の植物の組織、例えば、葉緑体、アポプラスト、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシソームおよび細胞質は植物の部分であると考えられる。さらに、組織の由来が何であっても、任意の植物細胞は植物の部分であると考えられる。
【０１１５】
また、このような植物、植物の部分および植物細胞の子孫は本発明の範囲内に入る。
本発明の酵素を発現するトランスジェニック植物または植物細胞は、この分野において知られている方法に従い構築することができる。要約すると、本発明の酵素をコードする１または２以上の発現ベクターを植物宿主のゲノムの中に組込み、そして生ずる修飾されたトランスジェニック植物または植物細胞トランスジェニック植物または植物細胞に増殖させることによって、トランスジェニック植物または植物細胞は構築される。

【０１１６】
好都合には、発現構築物は、選択した植物または植物の部分中の遺伝子の発現に要求される適当な調節配列と作用可能なアソシエーションで、本発明の酵素をコードする遺伝子からなるDNA 構築物である。さらに、発現構築物は、それが組込まれた宿主細胞の同定に有用な選択可能なマーカー、および問題の植物の中に構築物を導入するために必要なDNA 配列を含むことができる。
【０１１７】
調節配列、例えば、プロモーターおよびターミネーターおよび必要に応じてシグナルまたはトランシット配列は、例えば、酵素を発現させる時間、場合および方法に基づいて決定される。例えば、本発明の酵素をコードする遺伝子の発現は構成的または誘導可能であるか、あるいは発生、段階または組織特異的であることができ、そして遺伝子産物を特定の組織または植物の部分、例えば、種子または葉にターゲッティングすることができる。調節配列は、例えば、Taque et al.、Plant 、Phys. 、86:506、1988に記載されている。
【０１１８】
構成的発現のために、35S-CaMVプロモーターを使用することができる(Frank et al. 、1980、Cell 21:285-294)。器官特異的プロモーターは、貯蔵シンク組織、例えば、種子、ジャガイモ塊茎、および果実からのプロモーター(Edwards & Coruzzi、1990、Annu.Rev.Genet.24:275-303)、または代謝シンク組織、例えば、分裂組織からのプロモーター(Ito et al., 1994, Plant Mol.Biol.24:863-878) 、種子特異的プロモーター、例えば、イネからのグルテリン、プロラミン、グロブリンまたはアルブミンのプロモーター(Wu et al., Plant and Cell Physiology Vol.39, No.8 pp.885-889(1998))、
【０１１９】
レグミンB4からのソラマメ・ ナンテンハギ(Vicia faba)のプロモーターおよびソラマメ・ ナンテンハギ(Vicia faba)からの未知の種子のタンパク質遺伝子(Conrad U. et al., Journal of Plant Physiology Vol.152, No.6 pp.708-711(1988))、種子の油体タンパク質からのプロモーター(Chen et al., Plant and Cell Physiology Vol.39, No.9 pp.935-941(1998))、ブラシカ・ナプス(Brassica napus)からの貯蔵タンパク質napAのプロモーター、またはこの分野において知られている他の種子特異的プロモーター、例えば、WO91/14772号に記載されているプロモーターであることができる。
【０１２０】
さらに、プロモーターは葉特異的プロモーター、例えば、イネまたはトマトからのrbcsプロモーター(Kyozuka et al., Plant Physiology Vol.102, No.3 pp.991-1000(1993))、クロレラウイルスのアデニンメチルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター(Mitra, A.およびHiggins, DW, Plant Molecular Biology Vol.26, No.1 pp.85-93(1994)) 、またはイネからのaldP遺伝子のプロモーター(Kagaya et al., Molecular and General Genetics Vol.248, No.6 pp.668-674(1995))、または創傷誘導可能なプロモーター、例えば、ジャガイモpin2プロモーター(Xu et al.、Plant Mol.Biol.Vol.22, No.4 pp.573-588(1993)) であることができる。
【０１２１】
プロモーターエンハンサー因子を使用して、植物における酵素のより高い発現を達成することができる。例えば、プロモーターエンハンサー因子は、プロモーターと酵素をコードするヌクレオチド配列との間に位置するイントロンであることができる。例えば、Xu et al., op cit には、イネのアクチン1 遺伝子の第1 イントロンを使用して発現を増強することが開示されている。
選択マーカーの遺伝子および発現構築物の任意の他の部分は、この分野において入手可能なものから選択することができる。
【０１２２】
この分野において知られている慣用技術、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)仲介形質転換、ウイルス仲介形質転換、マイクロインジェクション、粒子衝撃、生物分解形質転換、およびエレクトロポレーションに従い、植物ゲノムの中にDNA 構築物を組込む

(Gasser et al., Science, 244, 1293;Potrykus, Bio/Techn.8, 535, 1990;Shimamoto et al., Nature, 338, 274, 1989)。

【０１２３】

現在、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens) 培地遺伝子の転移は、トランスジェニック双子葉植物を発生させるために選択されている方法であり（概観については下記の文献を参照のこと：Hooykas & Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol.19:15-18)、それはまた単子葉植物の形質転換のために使用されるが、他の形質転換法はこれらの植物のために一般に好ましい。

【０１２４】

現在、トランスジェニック単子葉植物を発生させるために選択される方法は、胚のカルスまたは発生する胚の粒子衝撃（形質転換性DNA でコーティングされた微視的金またはタングステン）である(Christou, 1992, Plant J.2:275-281;Shimamoto, 1994, Cur.Opin.Biotechnol.5:158-162;Vasil et al.、1992、Bio/Technology 10:667-674)。単子葉植物を形質転換する別の方法は、下記の文献に記載されているプロトプラストの形質転換をベースとする：Omirulleh S, et al., Plant Molecular Biology Vol.21, No.3 pp.415-428(1993)。

形質転換後、この分野においてよく知られている方法に従い、発現構築物を組込んだ形質転換体を選択し、全植物に再生させる。

【０１２５】

酵素調製物

本発明の関係において、用語「酵素調製物」は下記のものを意味することを意図する：微生物の単一の種から、可能ならば単離および精製された、普通の酵素の発酵産物（このような調製物は通常多数の異なる酵素活性からなる）；または１成分の酵素、好ましくは細菌または菌類の種から、慣用の組換え技術に従い、誘導された酵素の混合物（これらの酵素は発酵させ、可能ならば別々に単離および精製されており、そして異なる種、好ましくは菌類または細菌の種から由来することができる）；または組換えペクチン酸リアーゼの発現のための宿主細胞として作用するが、他の酵素、例えば、ペクチンリアーゼ、プロテアーゼ、またはセルラーゼを同時に産生する微生物の発酵産物（これは微生物の天然に存在する発酵産物、すなわち、対応する天然に存在する微生物により好都合に産生される酵素複合体である）。

【０１２６】

本発明のペクチン酸リアーゼ調製物は、下記の酵素から成る群より選択される１または２以上の酵素をさらに含むことができる：プロテアーゼ、セルラーゼ（エンド- β-1,4- グルカナーゼ）、β- グルカナーゼ（エンド- β-1,3(4)-グルカナーゼ）、リパーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、

【０１２７】

ラムノガラクツロナンアセチルエステラーゼ、ポリガラクトウロナーゼ、ラムノガラクトウロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクチンリアーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セルロバイオヒドロラーゼ、トランスグルタアミナーゼ；またはそれらの混合物。好ましい態様において、調製物中の１または２以上またはすべての酵素は組換え技術により製造される、すなわち、１または２以上の酵素は、１または２以上の他の酵素と混合させて、所望の酵素のブレンドを有する酵素調製物を形成する、１または２以上の単一成分の酵素である。

【０１２８】

免疫学的交差反応性

精製されたペクチン酸リアーゼ酵素を使用することによって、免疫学的交差反応性の決定において使用すべきポリクローナル抗体（これらは所定の酵素タンパク質に対して単一特

異性である）を製造することができる。さらに詳しくは、下記の文献に記載されている手順に従い、ウサギを免疫化することによって、本発明のペクチン酸リアーゼに対する抗血清を発生させることができる：N.Axelsen et al., in:A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publcations, 1973, Chapter 23 、またはA.Johnstone およびR.Thorpe、Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publcations, 1982 （さらに詳しくは、p.27-31)。

【０１２９】

例えば、塩沈降((NH4)2SO4) 、次いで透析および、例えば、DEAE- セファデックス上の、イオン交換クロマトグラフィーにより、抗血清から精製された免疫グロブリンを得ることができる。Outcherlony の二重拡散分析(O.Ouchterlony in:Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir, 編）, Blackwell Scientific Publcations, 1967, pp.655-706) により、交差免疫電気泳動(N.Axelsen et al., supra, Chapter 3 および4)によるか、あるいはロケット免疫電気泳動(N.Axelsen et al. 、Chapter 2)により、タンパク質の免疫化学的特性決定を実施することができる。

【０１３０】

洗剤またはクリーニング工業における使用

それ以上の面において、本発明は、本発明のペクチン酸リアーゼ酵素または酵素調製物からなる洗浄組成物、本発明のペクチン酸リアーゼ酵素または酵素調製物からなる洗濯溶液を使用する機械的洗濯プロセスの洗濯サイクルの間に布帛を処理することからなる布帛の機械的処理の方法、およびよりすぐれたクリーニング性能、すなわち、よりすぐれた汚染除去を提供する、本発明のペクチン酸リアーゼ酵素または酵素調製物からなるクリーニング組成物、例えば、洗濯、硬質表面のクリーナー、個人用クリーニングおよび口腔／歯の組成物に関する。

【０１３１】

理論により拘束されないで、本発明のマンナーゼはガラクトマンナンを含有する汚れまたはスポットを効果的に分解または加水分解することができ、したがって、このような汚れまたはスポットを含む洗濯物をクリーニングすることができる。

本発明のクリーニング組成物は、少なくとも１種の追加の洗剤成分を含有しなくてはならない。これらの洗剤成分の正確な特質、およびそれらの混入レベルは、組成物の物理的形態、およびそれを使用すべきクリーニング操作の特質に依存するであろう。

【０１３２】

本発明のクリーニング組成物は、選択された界面活性剤、他の酵素、ビルダーおよび／または漂白系から成る群より選択される洗剤成分をさらに含むことが好ましい。

本発明によるクリーニング組成物は、液体、ペースト、ゲル、棒状製品、タブレット、スプレー、フォーム、粉末または粒子であることができる。粒状組成物はまた「コンパクトな」形態であることができ、そして液状組成物はまた「濃厚な」形態であることができる。

【０１３３】

本発明の組成物は、例えば、手および機械による皿洗浄組成物、手および機械による洗濯洗浄組成物、例えば、洗濯添加剤組成物および汚れた布帛のソーキングおよび／または前処理において使用するために適当な組成物、すすぎ添加用布帛柔軟剤組成物、および一般的家庭用硬質表面クリーニング操作において使用するための組成物として配合することができる。このようなカルボヒドラーゼを含有する組成物は、また、衛生化製品、コンタクトレンズのクレンザー、および健康および美容ケアー製品、例えば、口腔／歯のケアーおよび個人用クリーニング組成物として配合することができる。

【０１３４】

手による皿洗浄法において使用するための組成物として配合するとき、本発明の組成物は好ましくは界面活性剤および好ましくは有機ポリマー化合物、泡増強剤、第II族金属イオン、溶剤、ハイドロトロープおよび追加の酵素から成る群より選択される他の洗剤化合物を含有する。

【０１３５】
洗濯機械洗濯法において使用するための組成物として配合するとき、本発明の組成物は好ましくは界面活性剤およびビルダー化合物の双方を含有し、そしてさらに好ましくは有機ポリマー化合物、漂白剤、追加の酵素、泡抑制剤、分散剤、石灰石鹸分散剤、汚れ懸濁剤および再付着防止剤および腐蝕抑制剤から成る群より選択される１またはそれ以上の洗剤成分を含有する。洗濯組成物は、また、追加の洗剤成分として、柔軟剤を含有することができる。このようなカルボヒドラーゼを含有する組成物は、洗濯洗剤組成物として配合するとき、布帛クリーニング、汚染の除去、白色度の維持、柔軟化、色の外観、染料移動阻止および衛生化を提供することができる。
【０１３６】
本発明の組成物は、また、固体または液体の形態の洗剤添加剤製品として使用することができる。このような添加剤製品は、慣用の洗浄組成物の性能を補助または増強することを意図し、そしてクリーニングプロセスの任意の段階において添加することができる。
必要に応じて、本発明における洗濯洗剤組成物の密度は、20℃において測定して、400 ～1200g/l 、好ましくは500 ～950g/lの組成物の範囲である。
【０１３７】
本発明における組成物の「コンパクトな」形態は、密度により、そして、組成物に関して、無機充填剤の塩の量により最良に反映される；無機充填剤の塩は粉末の形態の洗浄組成物の慣用の成分である；慣用の洗浄組成物において、充填剤の塩は実質的な量で、典型的には全体の組成物の17～3 重量％で存在する。コンパクトな組成物において、充填剤の塩は全体の組成物の15％を超えない、好ましくは10％を超えない、最も好ましくは5 ％を超えない量で存在する。無機の充填剤の塩、例えば、本発明の組成物において意味するものは、アルカリ金属およびアルカリ土類金属の硫酸塩および塩化物から選択される。好ましい充填剤の塩は硫酸ナトリウムである。
【０１３８】
本発明による液状洗剤組成物は、また、「濃厚な形態」であることができ、このような場合において、本発明による液状洗剤組成物は、普通の液状洗剤に比較して、少量の水を含有するであろう。典型的には、濃厚な液状洗剤の水分は好ましくは40％より低く、より好ましくは30％より低く、最も好ましくは20％より低い。
本発明において使用するために適当な特定の洗剤化合物は、WO97/01629号（これは引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されているような特定の化合物から成る群より選択される。
マンナーゼを本発明によるクリーニング組成物の中に好ましくは組成物の重量の0.0001％～2 ％、より好ましくは0.0005％～0.5 ％、最も好ましくは0.001 ％～0.1 ％の純粋な酵素のレベルで添加する。
【０１３９】
本発明における使用可能なセルラーゼは、細菌または菌類の双方のセルラーゼを包含する。好ましくは、それらは5 ～12のpH最適条件および50以上のCEVU/mg(セルロース粘度単位）の比活性を有するであろう。適当なセルラーゼは米国特許第4,435,307 号、J61078384号およびWO96/00000号に開示されており、これらの明細書には、それぞれ、フミコラ・インソレンス(Humicola insolens) 、チエラビア(Thielavia) およびスポロトリクム(Sporotrichum)が開示されている。EP739,982 号明細書には、新規なバシラス（Bacillus）種から単離されたセルラーゼが記載されている。適当なセルラーゼは、また、GB-A-2075028号;GB-A-2095275 号;DE-OS-22 47 832号およびWO95/26398号に開示されている。
【０１４０】
このようなセルラーゼの例は、フミコラ・インソレンス(Humicola insolens) （Humicola grisea var.thermoidea) の株、フミコラ・インソレンス(Humicola insolens) 、DSM 1800株により産生されたセルラーゼである。他の適当なセルラーゼは、約50kDの分子量、5.5 の等電点を有しかつ415 アミノ酸を含有するフミコラ・インソレンス(Humicola insolens) から由来するセルラーゼ；およびフミコラ・インソレンス(Humicola insolens) 、DS

M 1800に由来する約43kDのエンド- ベータ-1,4- グルカナーゼである；好ましいセルラーゼはPCT 特許出願No.WO91/17243 号に開示されているアミノ酸配列を有する。

【０１４１】

また、適当なセルラーゼはWO94/21801号に記載されているトリコデルマ・ロンギブラキアツム(Trichoderma longibrachiatum) からのEGIII セルラーゼである。特に適当なセルラーゼは色ケアー利点を有するセルラーゼである。このようなセルラーゼの例は、WO96/29397号、EP-A-0495257号、WO91/17243号、WO91/17244号およびWO91/21801号に記載されているセルラーゼである。布帛のケアーおよび／またはクローニング性質に適当な他のセルラーゼは、WO96/34092号、WO96/17994号およびWO95/24471号に記載されている。

【０１４２】

前記セルラーゼは、通常、洗浄組成物の重量の0.0001％～2 ％のレベルで洗浄組成物の中に混入される。

本発明の目的のために好ましいセルラーゼは、アルカリ性セルラーゼ、すなわち、7 ～12のpH範囲においてそれらの最大活性の少なくとも25％、より好ましくは少なくとも40％を有する酵素である。より好ましいセルラーゼは7 ～12のpH範囲においてそれらの最大活性を有する酵素である。好ましいアルカリ性セルラーゼは、商品名CarezymeR1(Novo Nordisk A/S)で販売されているセルラーゼである。

【０１４３】

アミラーゼ（αおよび／またはβ）は、炭水化物に基づく汚染の除去のために添加することができる。WO94/02597号明細書(Novo Nordisk A/S 、1994年２月３日発行）には、突然変異体のアミラーゼを含むクリーニング組成物が記載されている。また、WO95/10603号明細書(Novo Nordisk A/S 、1995年４月20日発行）参照。クリーニング組成物において使用するための既知の他のアミラーゼは、α- およびβ- アミラーゼの双方を包含する。α-アミラーゼはこの分野において知られており、そして米国特許第5,003,257 号、ＥＰ252,666 号、WO/91/00353 号、FR2,676,456 号、EP285,123 号、EP525,610 号、EP368/341 号、および英国特許明細書第1,296,839 号(Novo)に開示されているものを包含する。

【０１４４】

他の適当なアミラーゼは、WO94/18314号（1994年8 月18日発行）およびWO96/05295号(Genencor 、1996年2 月22日発行）に記載されている安定性が増強されたアミラーゼおよびノボ・ノルディクス社(Novo Nordisk A/S)から入手可能であり、WO95/10603号（1995年4 月発行）に開示されている直接の親において追加の修飾を有するアミラーゼ変異型である。また、EP277,216 号、 WO95/26397 号およびWO96/23873号(すべてはNovo Nordiskによる）に記載されているアミラーゼは適当である。

【０１４５】

商業的α- アミラーゼ製品の例は、Purafact Ox AmR(Genencorから）およびTermamylR 、BanR、FungamylR およびDuramylR（これらのすべてはNovo Nordisk A/S、デンマーク国、から入手可能である）である。WO95/26937号明細書には、他の適当なアミラーゼが記載されている：PhadebasR α- アミラーゼ活性のアッセイにより測定して、25℃～55℃の温度範囲および8 ～10の範囲のpH値においてTermamylR の比活性よりも少なくとも25％高い比活性を有することによって特徴づけられるα- アミラーゼ。WO96/23873号(Novo Nordisk)に記載されている、上記酵素の変異型は適当である。活性レベルに関して改良された性質および熱安定性とより高い活性レベルとの組合わせを有する他のデンプン分解酵素は、WO95/35382号明細書に記載されている。

【０１４６】

本発明の目的に対して好ましいアミラーゼは、商品名Termamyl、Duramyl およびMaxamylで販売されているアミラーゼおよび／またはWO96/23873号において配列番号:2として開示された、増加した熱安定性配列α- アミラーゼ変異型である。特定の用途のために好ましいアミラーゼは、アルカリ性アミラーゼ、すなわち、7 ～12のpH範囲においてそれらの最大活性の少なくとも10％、好ましくは少なくとも25％、より好ましくは少なくとも40％の酵素活性を有する酵素である。より好ましいアミラーゼは7 ～12のpH範囲においてそれら

の最大活性を有する酵素である。デンプン分解酵素は、本発明によるクリーニング組成物の中に、組成物の重量の0.0001％～2 ％、好ましくは0.00018 ％～0.06％、より好ましくは0.00024 ％～0.048 ％の純粋な酵素のレベルで添加される。

【０１４７】

キシログルカナーゼという用語は、ワゲニンゲン大学(Wageningenn University)のVincken およびVoragen[Vincken et al., Plant Physiol., 104:99-107] により記載された酵素の族を包含し、そしてこの酵素はHayashi et al.(1989)Plant Physiol.Plant Mo.Biol., 40:139-168に記載されているようにキシログルカンを分解することができる。Vincken et al.は、トリコデルマ・ビリデ(Trichoderma viride)（エンド-IV-グルカナーゼ）から精製されたキシログルカナーゼによる単離されたリンゴ細胞壁のセルラーゼからのキシログルカンのコーティングの除去を証明した。この酵素は、細胞壁が埋め込んだセルロースの酵素的分解を増強し、そしてペクチン酵素と相乗的に働く。ギスト- ブロカデス(Gist-Brocades) からのラピダーゼLIQ+はキシログルカナーゼ活性を含有する。

【０１４８】

このキシログルカナーゼは、本発明によるクリーニング組成物の中に、組成物の重量の好ましくは0.0001％～2 ％、より好ましくは0.0005％～0.5 ％、最も好ましくは0.001 ％～0.1 ％の純粋な酵素のレベルで添加される。

特定の用途のために好ましいキシログルカナーゼは、アルカリ性キシログルカナーゼ、すなわち、7 ～12のpH範囲においてそれらの最大活性の少なくとも10％、好ましくは少なくとも25％、より好ましくは少なくとも40％の酵素活性を有する酵素である。より好ましいキシログルカナーゼは7 ～12のpH範囲においてそれらの最大活性を有する酵素である。

【０１４９】

前述の酵素は任意の適当な起源、例えば、植物、動物、細菌、菌類および酵母の起源であることができる。起源はさらに中温生物または好極限性細菌（好冷生物、向寒冷生物、好熱性生物、好圧力菌、好アルカリ性生物、好酸性生物、好塩性生物、およびその他）であることができる。これらの酵素の精製された形態または非精製形態を使用することができる。現今、本発明のクリーニング組成物における性能効率を最適化するために、タンパク質または遺伝子工学技術により野生型酵素を修飾することが一般に行われている。例えば、このような組成物の普通に直面する成分に対する酵素の適合性を増加するように、変異型を設計することができる。

【０１５０】

あるいは、酵素変異型の最適pH、漂白剤またはキレート化剤の安定性、触媒活性およびその他が特定のクリーニングの用途に適合するように調整されるように、バレリン酸を設計することができる。特に、漂白剤の安定性の場合において酸化に対するアミノ酸の感受性および界面活性剤の適合性についての表面の変化に、注目を集中すべきである。このような酵素の等電点はある帯電したアミノ酸の置換により変更することができ、例えば、等電点を増加させると、アニオン界面活性剤との適合性の改良を促進することができる。酵素の安定性は、例えば、追加の塩の架橋を形成し、そして金属結合部位がキレート化剤の安定性を増加するようにさせることによって、さらに増加することができる。

【０１５１】

繊維材料およびセルロース繊維のプロセシング工業における使用

繊維の生物調製または洗剤と組合わせたクリーニングのために、本発明のペクチン酸リアーゼを他の炭水化物分解酵素（例えば、アラビナーゼ、キシログルカナーゼ、ペクチナーゼ）と組合わせて使用することができる。綿繊維は、ペクチンを含有する一次細胞壁層および主としてセルロースを含有する二次層から成る。綿の調製または綿の精製下に、一次細胞壁の一部分は除去されるであろう。本発明は、一次細胞壁の除去による綿の精製の間に、あるいは綿のクリーニングの間に、残留ペクチン物質の除去および繊維材料の灰色化の防止の促進に関する。

【０１５２】

本発明の関係において、用語「セルロース材料」は、綿、綿のブレンドまたは天然または

人工のセルロース（例えば、キシラン含有セルロース繊維、例えば、木材パルプに由来する）またはそれらのブレンドから作られた、繊維、縫製および非縫製布帛、例えば、編物、織布、デニム、糸、およびタオルを意味することを意図する。ブレンドの例は、綿またはレーヨン／ビスコースと、1 またはそれ以上の随伴材料、例えば、羊毛、合成繊維（例えば、ポリアミド繊維、アクリル繊維、ポリエステル繊維、ポリビニルアルコール繊維、ポリ塩化ビニル繊維、ポリ塩化ビニリデン繊維、ポリウレタン繊維、ポリ尿素、アラミド繊維）、およびセルロース含有繊維（例えば、レーヨン／ビスコース、ラミー、大麻、亜麻／リネン、ジュート、酢酸セルロース繊維、リオセル）とのブレンドである。

【０１５３】

本発明の調製物は、大麻、亜麻またはリネンの前処理または加湿柔軟化(retting) のためのセルロース繊維の工業において有用である。

繊維材料工業のためのセルロース材料、例えば、綿繊維の被服の製作用材料へのプロセシングはいくつかの工程を含む：糸への繊維の紡糸；糸からの織布または編物の構成および引き続く調製、染色および仕上げの操作。織製製品は、１系列のたて糸の間でよこ糸の製織により構成される；糸は2 つの異なる型であることができる。編成製品は、１本の連続の糸からのインターロックするループの網状構造を形成することによって構成される。また、セルロース繊維は不織布に使用することができる。

【０１５４】

調製プロセスにおいて、染色操作において適切な応答するように繊維材料を調製する。調製に含まれる下位の工程は次の通りである：

a. 製織前に、ポリマーの糊剤、例えば、澱粉、CMC またはPVA を使用する糊抜き剤（織製製品について）を添加して、たて糸の速度を増加させる；この物質はさらにプロセシング前に除去しなくてはならない；

【０１５５】

b. 精練、その目的は綿繊維からNLNSRVP セルロース材料、特にクチクラ（主として蝋から成る）および一次細胞壁（主としてペクチン、タンパク質およびキシログルカンから成る）を除去することである。適切な蝋の除去は高い湿潤性を得るために必要であり、すぐれた染色を得るための測度である。一次細胞壁- 特にペクチン- のトランスジェニック単子葉植物は蝋の除去を改良し、いっそう均一な染色を保証する。さらに、これは漂白プロセスにおける白色度を改良する。精練において使用される主要な化学物質は、70g/kgまでの、高い濃度および高い温度、80～95℃、における水酸化ナトリウムである；および

【０１５６】

c. 漂白；通常、精練に引き続いて、酸化剤として過酸化水素を使用する漂白を実施して、完全に漂白された（白色）布帛を得るか、あるいは染料の鮮やかな色彩を保証する。

また、この工業において、１工程の組合わせた精練／漂白のプロセスが使用されている。調製プロセスは布帛の状態で最も普通に使用されている；また、精練、漂白および染色操作を繊維または糸の段階において実施することができる。

【０１５７】

プロセシングはバッチ式または連続的であることができ、布帛を解放幅またはロープの形態で液体のプロセシング流れと接触させる。一般に、連続的操作において、サチュレーターを使用し、これによりほぼ等しい重量の化学浴／重量の布帛を布帛を適用し、次いで加熱された一時停止チャンバーにおいて、化学反応を起こす。次いで洗濯区画において、次のプロセシング工程のために布帛を調製する。バッチ式プロセシングは一般に１つのプロセシング浴において実施し、これにより布帛をほぼ8 ～15倍の重量の化学浴と接触させる。

【０１５８】

反応後、化学物質を排出し、布帛をすすぎ、次の化学物質を適用する。不連続のパッドー バッチ式プロセシングはサチュレーターを含み、これによりほぼ等しい重量の化学浴／重量の布帛を布帛を適用し、次いで一時停止期間を置き、これは常温パッド- バッチ式の場合において１日またはそれ以上の日数であることができる。

【０１５９】
織製製品は繊維材料の布帛の構成の流行する形態である。製織プロセスにおいて、たて糸の摩耗を防止するために、「糊付け」を必要とする。澱粉、ポリビニルアルコール(PVA)、カルボキシメチルセルロース、蝋およびアクリル結合剤は、入手可能性およびコストのために、典型的な糊付け化学物質である。製織プロセス後、織布製品の調製における第１工程として、糊剤を除去しなくてはならない。ロープまたは解放幅の糊付け布帛を、糊抜剤を含有するプロセシング液と接触させる。使用する糊抜剤は除去すべき糊剤の種類に依存する。PVA 糊剤について、熱水または酸化的プロセスがしばしば使用される。綿布帛のための最も普通の糊剤は澱粉をベースとする。
【０１６０】
したがって、最もしばしば、綿織布は熱水、澱粉を加水分解するための酵素のα- アミラーゼおよび湿潤剤または界面活性剤の組合わせにより糊抜きされる。糊抜きを達成するために十分に長い「保持期間」の間、セルロース材料を糊抜き化学物質とともに放置する。保持期間はプロセシングの型および温度に依存し、そして15分～２時間、あるいはある場合において、数日の間で変化することができる。典型的には、糊抜き化学物質はサチュレーター浴において適用され、この浴はの約15℃～約55℃の範囲である。次いで布帛を「Jボックス」のような装置中で保持し、この装置は糊抜剤の活性を増強するために十分な熱通常約55℃～約100 ℃を提供する。除去された糊剤を含む化学物質は、保持期間の終わりにおいて布帛から洗浄除去される。
【０１６１】
高い白色度またはすぐれた湿潤性および生ずる染色性を保証するために、糊剤および他の適用した化学物質を完全に除去しなくてはならない。一般に、効率よい糊抜きは下記の調製プロセスのために非常に重要である：精練および漂白。
【０１６２】
精練プロセスは綿において自然に見出される非セルロース化合物の大部分を除去する。自然の非セルロース不純物に加えて、精練はほこり、固体および残留する製作中に導入された物質、例えば、紡糸、コーニングまたは糊付けの油剤を除去することができる。精練プロセスにおいて、水酸化ナトリウムまたは関係する苛性化剤、例えば、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムまたはそれらの混合物が使用される。一般に、アルカリ安定性界面活性剤をこのプロセスに添加して、疎水性化合物の可溶化を増強し、および／または布帛上へのそれらの再付着を防止する。処理は一般に高い温度、80℃～100 ℃において、pH13～14の強アルカリ性溶液中で精練剤を使用して実施される。
【０１６３】
化学的プロセスの非特異的特質のために、不純物ばかりでなく、かつまたセルロースそれ自体が攻撃され、強度または他の所望の布帛の性質が損傷される。セルロース布帛の柔軟性は残留する天然の綿の蝋の関数である。高温の強くアルカリ性の精練プロセスの非特異的特質は、所望の天然の綿の油剤と製作で導入される油剤とを区別することができない。さらに、慣用の精練プロセスは、これらのプロセスからの高度にアルカリ性の流出液のために、環境的問題を引き起こすことがある。精練段階において、布帛は漂白において最適な応答をするように調製される。不適切に精練された布帛は、引き続く漂白段階においてより高いレベルの漂白剤を必要とするであろう。
【０１６４】
漂白工程において、天然の綿顔料は変色し、ジニング、カーディングまたは精練の間に完全には除去されない、残留する天然の木質の綿のくず成分が除去される。今日使用されている主要なプロセスは、アルカリ性過酸化水素の漂白である。多くの場合において、非常に高い白色度が特に必要でないとき、漂白を精練と組合わせることができる。
【０１６５】
下記の実施例において、精練工程は、本発明のペクチン酸リアーゼまたはペクチン酸リアーゼ調製物を使用して、約50℃～80℃の温度およびpH約7 ～11において実施し、こうして高度に苛性化剤を代替するか、あるいはそれを補助することができることが示された。最

適化された酵素的プロセスは高いペクチンの除去および完全な湿潤性を保証する。
【０１６６】
植物材料の分解または変性
本発明による酵素または酵素調製物は、本発明のペクチン酸リアーゼの高い植物細胞壁分解活性のために、植物細胞壁または植物細胞壁に由来するペクチン含有物質の分解剤または変性剤として好ましく使用される。
本発明のペクチン酸リアーゼを単独で、あるいは他の酵素、例えば、グルカナーゼ、ペクチナーゼおよび／またはヘミセルラーゼと組合わせて使用して、油に富んだ植物材料からの油の抽出、例えば、大豆からの大豆油、オリーブからのオリーブ油、ナタネからのナタネ油またはヒマワリからのヒマワリ油の抽出を改良することができる。
【０１６７】
本発明のペクチン酸リアーゼは、植物細胞材料の成分の分離に使用することができる。糖または澱粉に富んだ植物材料をかなり商業的に重要な成分（例えば、テンサイからスクロースまたはジャガイモから澱粉）および重要性が低い成分（例えば、パルプまたは殻の画分）に分離することは特に重要である。また、タンパク質または油に富んだ作物を価値があるタンパク質および油と価値が低い殻の画分に分離することは特に重要である。分離プロセスはこの分野において知られている方法に従い実施される。
【０１６８】
本発明のペクチン酸リアーゼは、また、果実または野菜ジュースの製造において使用して収量を増加し、そして、例えば、ワインまたはジュースの製造からの、種々の植物細胞壁に由来する物質または不用な物質、または農業残留物、例えば、野菜の殻、マメの殻、テンサイのパルプ、オリーブのパルプ、ジャガイモのジャガイモ、およびその他の酵素的加水分解において使用することができる。
植物材料を分解して異なる種類のプロセシングを改良し、ガラクタン以外の他の成分の精製または抽出、例えば、柑橘類からのペクチンの精製を促進し、飼料の価値を改良し、水結合能力を減少させ、排水プラントにおける分解を改良し、植物材料の貯蔵生牧草への変換を改良する、およびその他を実行することができる。
【０１６９】
本発明の酵素調製物により、プロセシングした果実または野菜のコンシステンシーおよび外観を調節することができる。コンシステンシーおよび外観は、プロセシングに使用する得の実際の組合わせの産物、すなわち、本発明のペクチン酸リアーゼを組合わせる酵素の特異的であることが示された。例は、例えば、リンゴ、セイヨウナシまたはベリーからの透明なジュース；例えば、リンゴ、セイヨウナシ、ベリー、柑橘類またはトマトからの曇った安定なジュース；および例えば、ニンジンまたはトマトからの黄色顔料；の製造を包含する。
【０１７０】
本発明のペクチン酸リアーゼは、植物細胞壁由来の材料の粘度の変更するために使用することができる。例えば、ペクチン酸リアーゼを使用して、ガラクタンを含有する飼料の粘度を減少させ、そして粘性のガラクタン含有材料のプロセシングを促進することができる。ガラクタン含有植物材料を本発明の酵素調製物で、ガラクタン含有材料の完全なまたは部分的分解に適当な条件下に、処理することによって、粘度を減少させることができる。
【０１７１】
ペクチン酸リアーゼを、例えば、他の酵素と組み合わせて使用して、植物繊維からペクチン物質を除去することができる。この除去は、例えば、繊維材料の繊維または他のセルロース材料の製造において、必須である。この目的のために、植物繊維材料に関連するペクチン物質の完全なまたは部分的分解に適当な条件下に、繊維材料を適当な量の本発明のペクチン酸リアーゼで処理する。
【０１７２】
動物飼料の添加剤
本発明のペクチン酸リアーゼは動物飼料の変性に使用し、そしてin vitro（飼料の成分の

変性により）またはin vivo でそれらの作用を発揮することができる。ペクチン酸リアーゼは、高い量のアラビノガラクタンまたはガラクタンを含有する動物飼料の成分、例えば、大豆、ナタネ、ハウチワマメ、およびその他からの植物材料を含有する飼料への添加に特に適する。飼料に添加するとき、ペクチン酸リアーゼは植物細胞壁材料のin vivo の破壊を有意に改良し、これにより動物による植物栄養の利用が改善される。

【０１７３】

これにより、動物の成長速度および／または飼料の変換比（すなわち、摂取した飼料の重量／体重増加）が改良される。例えば、摂取可能なガラクタンは、ペクチン酸リアーゼを、例えば、β－ガラクトシダーゼと組み合わせて、使用して、ガラクトースまたはガラクトオリゴマーに分解され、これらは動物により消化され、こうして飼料の有効エネルギーに寄与される。また、ガラクタンの分解により、ペクチン酸リアーゼは非炭水化物の飼料成分、例えば、タンパク質、脂肪および無機質の消化および吸収を改良することができる。

それ以上の説明については、PCT/DK96/00443号およびその中の実施例を参照のこと。

【０１７４】

ワインおよびジュースの処理

本発明の酵素または酵素調製物は、野菜または果実のジュース、特にリンゴまたはセイヨウナシのジュースの脱ペクチンおよび粘度の減少のために使用することができる。これは果実または野菜のジュースの中に含有されるペクチン含有物質を分解するために有効な量の本発明の酵素または酵素調製物で、果実または野菜のジュースを処理することによって達成される。

【０１７５】

果実または野菜からのマッシュを処理して、マッシュの抽出性または分解性を改良するために、酵素または酵素調製物を使用することができる。例えば、酵素調製物はジュースの製造のためのリンゴおよびセイヨウナシのマッシュの処理、およびワインの製造のためのブドウのマッシュの処理において使用することができる。

【０１７６】

ペクチン酸リアーゼの触媒活性の測定

粘度のアッセイAPSU

APSU単位：APSU単位のアッセイは、カルシウムを添加しないで基質のポリガラクツロン酸を使用する粘度の測定である。

基質の5 %のポリガラクツロン酸ナトリウム塩(Sigma P-1879)を、0.1Mのグリシン緩衝液pH10中に溶解する。4ml の基質を40℃において５分間前インキュベートする。酵素を添加し（250 μl の体積）ミキサー中で最大速度において10秒間混合し、次いで40℃において20分間インキュベートする。標準的曲線のために、5APSU/ml～100APSU/ml以上の領域の酵素濃度の二重測定を10～60APSU/ml の最少4 濃度で実施する。会社ソフラサー（Sofraser, 45700 Villemandeur, France）からのMIVI 600を使用して、粘度を測定する。粘度を10秒後mVとして測定する。

【０１７７】

APSU単位を計算するために、前述したように酵素標準的希釈を使用して標準的曲線を得た：

APSU/ml	mV
0.00	300
4.00	276
9.00	249
14.00	227
19.00	206
24.00	188
34.00	177
49.00	163
99.00	168

【０１７８】
プラトーをもつ１相指数的減衰との非線形適合を使用する、グラフパッド・プリズム(GrafPad Prism) プログラムを計算に使用した。プラトー＋スパンは酵素を使用しないで得られたmVである。プラトーは100APSU より大きいmVであり、そして双方の実施例における粘度の半分の減少は12APSU単位であり、標準誤差は1.5APSU である。
【０１７９】
リアーゼアッセイ（235nm において）
β- 離脱を測定するために、0.1Mのグリシン緩衝液pH10中に溶解した基質の0.1 %ののポリガラクツロン酸ナトリウム塩(Sigma P-1879)を使用して、235nm における吸収の増加を測定するアッセイを実施した。触媒速度を測定するために、235nm における5.2 吸収単位／分は１μmol の不飽和生成物の生成に対応する(Nasuna およびStarr(1966)J.Biol.Chem.Vol.241, pp.5298-5306; およびBartling, Wegener およびOlsen(1955)Microbiology Vol.141, pp.873-881)。
【０１８０】
235nm における吸収の連続的測定を用いる、温度制御のクベットホルダー中のHPダイオード列の分光光度計上で1cm の光路の0.5ml のクベットを使用する定常状態の条件。定常状態について、少なくとも200 秒間の直線増加を使用して速度を計算した。それを生成μmol ／分の生成物に変換した。
【０１８１】
寒天アッセイ
0.7 %w/v のポリガラクツロン酸ナトリウム(Sigma P 1879)を含有する寒天プレート（例えば、LB寒天）の中に打抜いた4mm の孔に被験溶液を適用することによって、ペクチン酸リアーゼ活性を測定した。次いでプレートを特定の温度（例えば、75℃）において6 時間インキュベートした。
【０１８２】
次いでプレートを(i)1M のCaCl2 中で0.5 時間または(ii)１%の混合アルキルトリメチルアンモニウムBr (MTAB、Sigma M-7635) 中で１時間ソーキングした。これらの手順の双方は寒天内にポリガラクツロン酸塩を沈澱させる。沈澱したポリガラクツロン酸塩のバックグラウンド内の透明なゾーンの出現により、ペクチン酸リアーゼ活性を検出することができる。ペクチン酸リアーゼの標準的調製物の希釈物を使用して、このアッセイの感度を目盛定めされる。
【０１８３】
終点の分析－ペクチン酸リアーゼについての235nm におけるトランス脱離（高いカルシウム法：最終インキュベーション混合物中の1mM のカルシウム）
この方法において、基質および酵素を37℃において20分間インキュベートし、次いで235nm において二重結合の形成を測定する。最後に、トランス単位によりモル吸光係数に基づいて、分解速度を計算する。
【０１８４】
手順：
0.5ml の希釈物を0.5ml の２×基質溶液と混合する。

基質：ポリガラクツロン酸(Sigma P-1879 ロット77H3784)
緩衝液２×：0.1Mのグリシン＋2.0mmol のCaCl$_2$
停止試薬：0.02M のH$_3$PO$_4$
インキュベーション温度：37℃
反応時間：20分
トランス脱離の吸光係数：0.0052μmol/cm

【０１８５】
酵素をイオンを含有しない水中で0.5 ～5APSU/mlに希釈する。二重反復実験における主要な値は0.5ml である。２×緩衝液中の２%w/v の基質を0.5ml の希釈した酵素と混合する。双方を37℃の水浴上で５分間前インキュベートする。20分間インキュベートする。5mlの停止試薬を使用して停止させ、混合する。ブランクを酵素と混合し、まず停止試薬を添加し、次いですべての基質を同一体積で添加する。

【０１８６】
酵素　　0.5ml
基質　　0.5ml
停止試薬　　5ml
合計の体積　　6ml
1cm のクベット中で235nm において吸収を測定する。
0.0052μmol/cmの吸光係数を使用して、トランス脱離の生成／分を計算する。
計算：［（主要＋主要）/2－ブランク］0.0052×６×２×酵素希釈/20 分/1000ml ＝μmol/分

【０１８７】
材料および方法
株およびドナー微生物
バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)、ATCC 14580は、配列番号:3で表わされるペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列からなる。
バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)、NCIMB 40482 またはDSM 8721は、配列番号:1で表わされるペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列からなる。
バシラス（Bacillus）スペーシス AAI12は、配列番号:5で表わされるペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列からなる。

【０１８８】
バシラス（Bacillus）スペーシス KJ59 、DSM 12419 は、配列番号:7で表わされるペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列からなる。
バシラス（Bacillus）スペーシス I534 は、配列番号:9で表わされるペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列からなる。
大腸菌(E.coli)DSM 12403 は、配列番号:5で表わされる本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列を含有するプラスミドからなる。

【０１８９】
大腸菌(E.coli)DSM 12404 は、配列番号:9で表わされる本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列を含有するプラスミドからなる。
大腸菌(E.coli)DSM 11789 は、配列番号:3で表わされる本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列を含有するプラスミドからなる。
大腸菌(E.coli)DSM 11788 は、配列番号:1で表わされる本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列を含有するプラスミドからなる。

【０１９０】
バシラス（Bacillus）種PL2306。この株は崩壊したapr およびnpr 遺伝子をもつバシラス・サチリス(B.subtilis)DN1885であり(Diderichasen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B.R., Sj holm, C.(1990)Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase,an exoenzyme from Bacillus brevis.J.Bacteriol.172:4315-4321)転写

単位において既知のバシラス・サチリス(Bacillus subtilis) セルラーゼ遺伝子を崩壊させ、セルラーゼ陰性細胞を生じた。

【０１９１】

崩壊は本質的に記載されているように実施された(A.L.Sonenshein, J.A.Hoch およびRichard Losick(1993)Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria, American Society for microbiology, p.618) 。下記の文献に記載されているように、コンピテント細胞を調製し、形質転換させた：Yasbin、R.E.、Wilson,G.A. およびYoung, F.E.(1975)Transformation and transfection in lysogenic strains of Bacillus subtilis:evidence for selective induction of prophage in competent cells。J.Bacteriol.121:296-304 。

【０１９２】

大腸菌(E.coli)：SJ2(Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaaard, L., Jensen, B.R., Sj holm, C.(1990)Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase ,an exoenzyme from Bacillus brevis.J.Bacteriol.172:4315-4321) 。Bio-Rad GenePulserTMを製造業者が推奨するように使用して、エレクトロコンピテント細胞を調製し、形質転換した。

【０１９３】

プラスミド

pBK-CAMV(Stratagene 、カリフォルニア州ラジョラ)

pSJ1678(WO94/19454号、これは引用することによって本明細書の一部とされる、参照)

pMOL944 ：

このプラスミドは、バシラス・サチリス(Bacillus subtilis) 中で増殖可能なプラスミドを作る因子、カナマイシン耐性遺伝子本質的含有し、バシラス・リヘニフォルミス(B.licheniformis) 、ATCC 14580のamyL遺伝子からクローニングされた強いプロモーターおよびシグナルペプチドを有するpUB110誘導体である。シグナルペプチドは、それと融合するタンパク質の成熟部分をコードするDNA を好都合にクローニングさせるSacII 部位を含有する。これは細胞の外部に向けられたプレタンパク質を発現させる。

【０１９４】

プラスミドは、下記に簡単に説明されている慣用の遺伝子工学技術により構築された。

pMOL944 の構築：

pUB110プラスミド(McKenzie 、T.et al.、1986、Plasmid 15:93-103)を、ユニーク制限酵素NciIで消化した。プラスミドpDN1981 上にコード化されたamyLから増幅されたPCR フラグメント(P.L.J rgensen et al. 、1990、Gene 96:37-41)をNciIで消化し、NciI消化pUB110の中に挿入してプラスミドpSJ2624 を形成した。

【０１９５】

使用した2 つのPCR プライマーは下記の配列を有する：

LWN5494 5'-GTCGCCGGGGCGGCCGCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC -3'

LWN5495 5'-GTCGCCCGGGAGCTCTGATCAGGTACCAAGCTTGTCGACCTGCAGAA
TGAGGCAGCAAGAAGAT -3'

プライマー#LWN5494はプラスミドの中にNotI部位を挿入する。

次いでプライマーpSJ2624 をSacIおよびNotIで消化し、そしてpDN1981 上にコード化されたamyLから増幅された新しいPCR フラグメントをSacIおよびNotIで消化し、このDNA フラグメントをSacI-NotI 消化pSJ2624 の中に挿入してプラスミドpSJ2670 を形成した。

【０１９６】

このクローニングは第1amyL プロモーターのクローニングを同一プロモーターで置換するが、向きは反対である。PCR 増幅のために使用した２つのPCR プライマーは下記の配列を有する：

LWN5938 5'-GTCGGCGGCCGCTGATCACGTACCAAGCTTGTCGACCTGCAGAATG
AGGCAGCAAGAAGAT -3'

LWN5939 5'-GTCGGAGCTCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC -3'

【０１９７】
プライマーpSJ2670 を制限酵素PstIおよびBclIで消化し、そしてアルカリ性アミラーゼSP722 （WO95/26397号として公開された国際特許出願に開示されている、これはその全体において引用することによって本明細書の一部とされる）をコードするクローニングされたDNA 配列をPstIおよびBclIで消化し、挿入してpMOL944 を形成する。PCR 増幅のために使用した２つのPCR プライマーは下記の配列を有する：
LWN7864 5'-AACAGCTGATCACGACTGATCTTTTAGCTTGGCAC -3'
LWN7901 5'-AACTGCAGCCGCGGCACATCATAATGGGACAAATGGG -3'
プライマー#LWN7901はプラスミドの中にSacII 部位を挿入する。

【０１９８】
一般的微生物学的方法
特記しない限り、微生物学の標準的方法を使用して、DNA 操作および形質転換を実施した(Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;Ausubel, F.M.et al. （編）"Current Protocols in Molecular Biology"、John Wiley and Sons 、1995;Hardwood, C.R.,およびCutting, S.M. （編）"Molecular Biological Methods for Bacillus "，John Wiley and Sons, 1990)。
DNA 操作のための酵素を供給会社の規格書に従い使用した（例えば、制限エンドヌクレアーゼ、リパーゼおよびその他はNew England Biolabs Inc.から入手される）。

【０１９９】
ドナー株の増殖
バシラス・リヘニフォルミス(B.licheniformis) 株ATCC 14580を、ATCC (American Type Culture Collection, USA)により特定されているように、液状媒質3 中で増殖させた。37℃および300rpmにおいて18時間インキュベートした後、細胞を収集し、ゲノムDNA を後述する方法により単離した。
バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)NCIMB 40482 、バシラス（Bacillus）種 AAI12、バシラス（Bacillus）スペーシス KJ59 、DSM 12419 、およびバシラス（Bacillus）種 I534 のすべては、ほぼpH9.7 に調節したpHにおいてTY中で、50mlの1Mのナトリウム- セスキカルボナト(Sodium-Sesquicarbonat)/500ml のTYの添加により生長させた。30℃および300rpmにおいて24時間インキュベートした後、細胞を収集し、ゲノムDNA を後述する方法により単離した。

【０２００】
ゲノムDNA 調製物
ドナー微生物として前述のバシラス（Bacillus）属の種を、前述したように液状培地中で増殖させた。Pitcher et al.が記載する方法により、細胞を収集し、ゲノムDNA を単離した：Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J.;Rapid extaction of Bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate;Lett.Appl.Microbiol.1989, 8:151-156 。

【０２０１】
アルカリ耐性バシラス（Bacillus）種からのバクテリオファージラムダのライブラリーの発生
インジケーター培地上のプラークとしてカルボヒドラーゼについてスクリーニングできるようにするために、LamdaZAP発現クローニングキットを選択し、ストラタジーン(Stratagene)からのBspHI 消化し、脱リン酸化したアームを使用した。バシラス（Bacillus）DNA をPitcher et al.、1989の方法により単離した。単離されたDNA をSau3A で部分的に消化し、１％DNA アガロースゲル上でサイズ分画した。

【０２０２】
DNA をアガロースゲルから2 ～6Kb の間において切除し、Quiaspin DNAフラグメント精製手順(Qiagen GnBH) に従い精製した。100ng の精製した、分画したDNA を１μｇ のBspHI 脱リン酸化ZAP 発現ベクターのアームと結合した（４℃、一夜）。結合反応をGigaPackII

I Goldで製造業者の使用説明書に従い(Stratagene)直接パッケージした。ファージのライブラリーをXL1blue mrf-(Stratagene)で力価測定した。

【０２０３】

一次ファージライブラリーに由来するプラスミドバンクの発生

アルカリバシラス（Bacillus）ZAPexpressライブラリーからのファージミドバンクの切除：

XL1-blue細胞(Stratagene,カリフォルニア州ラジョラ）を、Stratagene ZAPexpress ハンドブック中の質量切除プロトコールにおいて推奨されているように、調製し、10mMのMgSO4 の中に再懸濁させた。各ライブラリーからの40,000プラーク形成単位をFalcon 2059 管の中に入れた。試料を400 μｌ のXL1-blue細胞および>1010pfus/mlのEXassist M13ヘルパーファージ(Stratagene)と37℃において１５分間インキュベートした。

【０２０４】

6ml のNZY ブロスを各管に添加し、次いで管を37℃において2.5 時間撹拌した。次いで試料を65℃に20分間加熱して大腸菌(E.coli)細胞およびバクテリオファージラムダを殺した；ファージミドは加熱に対して耐性である。試料を3000g において回転して細胞デブリを除去し、きれいなFalcon 2059 管の中にデカントした。一本鎖ファージミドのライブラリーを10％グリセロール（cryopreservent）に調節し、Stratageneプロトコールに従い力価測定した。本質的に、10μｌの処理した上清の1/10した上清を使用して、200 μｌのXLOLR 細胞(10ml のMgSO4 中の細胞）を感染させた。試料を37℃のインキュベーターの中に15分間入れた。50μｌ の５×NZY ブロスを試料に添加し、それらを37℃において45分間撹拌した。

【０２０５】

100 μｌ の試料をLBカナマイシンプレート上に配置し、一夜インキュベートした。力価が得られた後、各ライブラリーについて、10,000コロニー形成単位を400 μｌ のXLOLR 細胞と混合し、室温において撹拌せずに20分間インキュベートした。XLOLR 細胞はStratagene ZAPexpress マニュアル(Stratagene Inc.、カリフォルニア州ラジョラ）に記載されているように製造された。20分後、200 μｌ の5 ×NZY 培地、3ml の１×NZY 培地を試料に添加した。試料を200rpm、37℃において90分間撹拌した。グリセロールを10％の最終濃度に添加し、細胞をアリコートで-80XLOLR細胞においてさらに使用するために凍結させた。

【０２０６】

ライブラリーのスクリーニング

LB寒天平板上のペクチナーゼの標準的スクリーニングを次のようにして実施した：XLOLR 大腸菌(E.coli)細胞中のプラスミドライブラリーを、5000コロニー形成単位／140mm の直径のペトリプレートの密度でLBカナマイシンプレート上に配置した。プレートを37℃において一夜インキュベートし、次いで1 ％ペクチンDE35％またはDE75％および１％アガロースをオーバーレイした。プレートを37℃において一夜インキュベートした後、１％のMTAB溶液をオーバーレイした。２時間後、MTABを注ぎ出し、陽性の組換え体のクローンがコロニーの回りの透明なゾーンにより同定された。陽性の単離物を新鮮なLB培地上でストリーキングし、再び試験することによって再確証した。

【０２０７】

培地

TY(Ausubel F.M.et al.(編) ＂Current Protocols in Molecular Biology＂, John Wiley and Sons, 1995 に記載されているような）。

LB寒天(Ausubel F.M.et al.(編) ＂Current Protocols in Molecular Biology＂、John Wiley and Sons, 1995 に記載されているような）。

LBPGは0.5 ％グルコースおよび0.05M のリン酸カリウム、pH7.0 を補充したLB寒天である。

BPX 培地はEP0 506 780 号(WO91/09129 号）に記載されている。

【０２０８】

下記の実施例により、本発明を説明する。

実施例１．バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)からのペクチン酸リアーゼのクローニング、発現、精製および特性決定

本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列の単離

配列番号:1に示すDNA 配列からなりかつ本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列は、寄託された大腸菌(E.coli)、DSM 11788 から、この分野において知られている方法に従うプラスミドDNA の抽出により得ることができる(Sambrook et al.(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY) 。

【０２０９】

バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)のゲノムライブラリーの構築

バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)NCIMB 40482 のゲノムDNA を制限酵素Sau3A で部分的消化し、0.7 %アガロースゲル上の電気泳動によりサイズ分画した。2 ～7kb の大きさのフラグメントをDEAE- セルロース紙上への電気泳動により単離した(Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P.(1981)A reliable method for the recovery of DNA fragment from agarose and acrylamide gels.Anal.Biochem., 112:295-298)。

【０２１０】

単離されたDNA フラグメントをBspHI 消化pSJ1678 プラスミドＤＮＡに結合し、結合混合物を使用して大腸菌(E.coli)SJ2 を形質転換した。バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)NCIMB 40482 のゲノムライブラリーからの形質転換された細胞を、10μg/mlのクロラムフェニコールおよび0.7 %ポリガラクツロン酸ナトリウム(SIGMA P-1879)を含有するＬＢ寒天平板上にプレートした。

【０２１１】

プレートした細胞を37℃において16時間インキュベートした。10μg/mlのクロラムフェニコールおよび0.7 %ポリガラクツロン酸ナトリウム(SIGMA P-1879)を含有する新鮮なＬＢ寒天平板上にコロニーをレプリカプレートし、これらのプレートを37℃において８時間インキュベートした。もとのマスタープレートを5ml の1M $CaCl_2$で充満させ、５～30分後、推定上のポリガラクツロン酸塩分解クローンの回りに明確な曇ったハローが出現した。

【０２１２】

対応するマスタープレートのクローンをそれ以上の特性決定のために取り上げた。大腸菌(E.coli)のクローンの一夜の30XLOLR 細胞の液状TY培養物からプラスミドＤＮＡを調製し、Qiagen Qiaspin Prep Kit を製造業者(Qiagen,ドイツ国) に従い使用してプラスミドＤＮＡを調製することによって、これらのクローンをさらに特性決定した。

【０２１３】

バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)NCIMB 40482 の遺伝子のライブラリーのペクチン酸リアーゼ陽性クローンは、DSM 11788 として受託された。大腸菌(E.coli)DSM 11788 のプラスミド上のプライマーのウォーキング後、バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)NCIMB No.40482からのペクチン酸リアーゼをコードするDNA の配列番号:1が同定された。

【０２１４】

活性による陽性のクローンの同定

プレート上でインキュベートした後、コロニーを１組のLB+6CAM 寒天平板上にレプリカプレートし、次いで37℃においてほぼ20時間さらにインキュベートした。適当な緩衝液中に１%HSB アガロース、0.7 %ポリガラクツロン酸ナトリウムを含有するオーバーレイをレプリカプレート上に注ぎ、40℃においてほぼ20時間インキュベートした。MTA3で沈降させた後、ペクチン酸リアーゼ陽性コロニーが存在する位置における明瞭なハローの出現により、ペクチン酸リアーゼ陽性コロニーが同定された。

ペクチン酸リアーゼ陽性コロニーからの細胞を寒天上の単一のコロニー単離のために広げ、同定されたペクチン酸リアーゼ産生コロニーの各々について、ペクチン酸リアーゼを産生する単一のコロニーを選択した。

【０２１５】
陽性クローンの特性決定
再ストリーキングプレートから、ペクチナーゼ陽性クローンが単一のコロニーとして得られ、そしてQiagen Plasmd Prepを製造業者(Qiagen 、ドイツ国) による示されるように使用して、プラスミドを抽出した。表現型が大腸菌(E.coli)SJ2 の再形質転換により確証され、そしてプラスミドを制限消化により特性決定した。
【０２１６】
ペクチン酸リアーゼをコードするクローニングされた遺伝子のバシラス・サチリス(Bacillus subtilis) の発現
pSJ1678 （大腸菌(E.coli)／バシラス・サチリス(B.subtilis)シャトルベクター）上のクローニングされた遺伝子を含有する、大腸菌(E.coli)DSM 11788 のプラスミドプレプを使用して、バシラス・サチリス(B.subtilis)PL2306を形質転換した。Yasbin et al. が記載するように、コンピテント細胞を調製し、形質転換した(Yasbin R.E.、 Wilson G.A.& Young F.E.;Transformation and transfection in lysogenic strains of Bacillus subtilis:evidence for selective induction of prophage in cmpetent cells;J.Bacteriology 1975 121:296-304)。
【０２１７】
バシラス・サチリス(Bacillus subtilis) の形質転換体の単離および試験
6mg/mlクロラムフェニコール、0.4 %グルコース、10mM KH2PO4 を含有するＬＢ寒天平板上に形質転換された細胞をプレートし、37℃において18時間インキュベートした。大腸菌(E.coli)を使用して前述したように、ペクチン酸リアーゼ陽性コロニーを同定した。
6mg/mlクロラムフェニコールを含有する10mlのTY培地中に、陽性形質転換体の各々を接種した。37℃において１日インキュベートし、250rpmにおいて震盪した後、50μｌ の上清を取出した。0.7 %のポリペクチン酸ナトリウム(Sigma、US) を含有するLB寒天平板の寒天の中に打抜かれた孔に10μｌ の上清を添加した後、ペクチン酸リアーゼ活性を同定した。
【０２１８】
37℃において16時間インキュベートした後、プレートを1M CaCl2中で5 ～30分間ソーキングした。明確な曇ったハローが出現し、ここで上清はペクチン酸リアーゼを発現するクローンからのペクチン酸リアーゼを含有した。１つのこのようなクローンをMB464 と呼んだ。
細胞を遠心により除去し、残りの上清をペクチン酸リアーゼを精製するための源として使用した。
【０２１９】
精製および特性決定
前述したようにして得られたバシラス・サチリス(B.subtilis)形質転換体を、6mg/mlのクロラムフェニコールを含有する100ml のTY中でインキュベートした。一夜37℃においてインキュベートかつ250rpmにおいて撹拌した後、100ml の複合成長培地を含有する１リットルの震盪フラスコにおいて、培養物を接種物として使用した(米国特許第5,371,198 号、実施例１、これは引用することによって本明細書の一部とされる）。
培養物の1ml は接種体積であり、培養物を４日間37℃においてインキュベートかつ250rpmにおいて撹拌した。
【０２２０】
発酵培地をNaOHでpH7.5 に調節し、カチオン凝集剤C521(10 %溶液) およびアニオン剤A130の0.1 %溶液で凝集させた。室温において、6500mlの発酵培地に306ml のC521(10 %) および同時に608ml のA130を撹拌しながら添加した。Sorval RC3B 遠心機を使用して10,000rpm において30分間遠心することによって、凝集した物質を分離した。上清をワットマン(Whatman) ガラスフィルターNo.Fで清浄化した。合計7200mlの透明な溶液が得られた。
【０２２１】
10kDa の分子量カットオフのフィルトロン限外濾過により、液体を、それぞれ、500ml および840ml の部分に濃縮した。

pHを酢酸で5.3 に調節し、50mMの酢酸ナトリウム緩衝液pH5.3 と平衡化したS-セファローズカラムに濃厚物を適用した。２リットルの直線の勾配を使用して最終濃度0.5MのNaClで、本発明のペクチン酸リアーゼ(B.agaradhaerens) を溶離した。バシラス・サチリス(Bacillus subtilis) からのペクチン酸リアーゼはまたこのpHにおいてセファローズに結合するが、より高いpI(7.6/6.0) を有する。クローニングされた本発明のペクチン酸リアーゼは最初に溶出するので、画分をAPSUおよびバシラス・サチリス(Bacillus subtilis) のペクチン酸リアーゼに対して発生させた抗血清に対する反応について分析した。

【０２２２】

20kDa の分子量カットオフのGR61膜をもつアミコン(Amicon)限外濾過セルを使用して、バシラス・アガラドヘレンス(Bacillus agaradhaerens)のペクチン酸リアーゼを濃縮した。合計90,000APSU単位が得られた。バシラス・サチリス(Bacillus subtilis) のペクチン酸リアーゼに対して発生させた抗血清を使用して測定して、この試料はプロテアーゼおよびバシラス・サチリス(Bacillus subtilis) のペクチン酸リアーゼを含有しない。

【０２２３】

本発明のペクチン酸リアーゼは、SDS-PAGEにおいて36kDa の分子量をもつバンドとして容易に見ることができた。このバンドのエレクトロブロッティング後、Ｎ末端は次のように決定された：Ser-Asn-Gly-Pro-Gln-Gly-Tyr-Ala-Ser-Met-Asn-Gly-Gly-Thr

これは、33アミノ酸のプロ配列と共に配列番号：１に示されるDNA配列から推定される配列番号：２で示されるアミノ酸配列と一致する。推定される配列から計算されるMWは36kDaであり、計算されるpIは６であった。280nmにおけるモル吸光係数は48,930であった。

異なるpHにおけるβ- トランス脱離活性（235nm におけるリアーゼアッセイを使用する）を、40℃における定常状態反応速度論として測定した。相対速度を最適な活性の百分率として計算し、下記の結果が得られた：

【０２２４】

pH	活性%
6.5	0
7	5
7.5	8
8	21
8.5	32
9	38
9.5	39
10	52
10.5	47
11	100
11.2	66
11.5	3

【０２２５】

下記の緩衝液を使用して、pHのプロファイルを測定した：

pH6.0: Na-MES 0.1M
pH6.5 、7.0 および7.5: Na-MOPS 0.1M
pH8.0 および8.5: Tris 0.1M
pH9.0 、9.5 、10.0および10.5: Na- グリシン 0.1M
pH11～11.5: Na- 炭酸塩 0.1M

MES は2ー[N- モルホリノ] エタンスルホン酸(SIGMA、 No.M-8250) である。
MOPSは3-[N- モルホリノ] プロパンスルホン酸(SIGMA、 No.M-1254) である。
Tris(Merck No.1.08382)。
グリシン(Merck) 。
炭酸ナトリウム(Merck No.6392) 。

【０２２６】

相応して、異なる温度（pH10）における相対活性が見出された：

温度℃	活性%
40	69
50	100
55	97
60	68
65	71

【０２２７】

バシラス・サチリス(B.subtilis)のサブクローニング

これらの２つのオリゴヌクレオチドから成るPCR プライマーの組を使用して、本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列（配列番号:1）をPCR 増幅した：

【化１】

Pecl.B.aga. 上 SacII
5′-CTG CAG CCG CGG CAG CTG CTT CAA ATC AGC CAA CTT C-3′

Pecl.B.aga. 下 NotI
5′-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT TTA CTC TGC ACA CAG GCA GAG C-3′.

制限部位SacII およびNotIに下線が引かれている。

【０２２８】

前述したようにバシラス・アガラドヘレンス(B.agaradhaerens)NCIMB 40482から単離された染色体DNA を、Amplitaq DNA Polymerase(Perkin Elmer) を製造業者の使用説明書に従い使用するPCR 反応において鋳型として使用した。PCR 反応は、200 μM の各dNTP、2.5単位のAmplitaqポリメラーゼ(Perkin Elmer,Cetus 、USA)および100pmol の各プライマーを含有するPCR 緩衝液(10mM のTris-HCl、pH8.3 、50mMのKCl 、1.5mM のMgCl2 、0.01% w/v のゼラチン) 中で構成した。

【０２２９】

DNA サーマルサークラー(Landgraf 、ドイツ国）を使用して、PCR 反応を実施した。94℃において１分間インキュベートし、次いで下記の環状のプロファイルを使用して30環状のPCR を実施した：94℃において30秒間の変性、60℃において１分間のアニーリング、および72℃において2 分間のエクステンション。0.7 %のアガロースゲル(NuSieve、 FMC) 中の電気泳動により、増幅生成物の５μl のアリコートを分析した。DNA フラグメントのサイズ1.0kb の出現は、遺伝子セグメントの適切な増幅を示した。

【０２３０】

PCR フラグメントのサブクローニング

QIAquick PCR精製キット(Qiagen 、USA)を製造業者の使用説明書に従い使用して、前述したように発生したPCR 生成物の55μl のアリコートを精製した。精製されたDNA を50μl の10mMのTris-HCl、pH8.5 中で溶離した。5 μg のpMOL944 および25μl の精製されたPCR フラグメントをSacII およびNotIで消化し、0.8 %の低いゲル化温度のアガロース(Sea Plaque GTG、FMC)ゲル中で電気泳動させ、関係するフラグメントをゲルから切除し、そしてQIAquick Gel抽出キット(Qiagen 、USA)を製造業者の使用説明書に従い使用して精製した。次いで単離されたPCR DNA フラグメントをSacII-NotI消化し、精製したpMOL944 に結合させた。16℃において0.5 μg の各DNA フラグメント、1UのDNA リガーゼおよびT4リガーゼ緩衝液(Boehringer-Mannheim、Germany)を使用して、結合を一夜実施した。

【０２３１】

結合混合物を使用して、コンピテントバシラス・サチリス(B.subtilis)PL2306を形質転換

した。形質転換した細胞をLBPG-10 μg/mlのカナマイシンプレート上にプレートした。37℃において18時間インキュベートした後、いくつかのクローンを新鮮な寒天平板上に再ストリーキングし、また、10μg/mlのカナマイシンを含む液状TY培養物中で生長させ、そして37℃において一夜インキュベートした。次の日に、バシラス・サチリス(B.subtilis)プラスミド調製物についての製造業者の推奨に従いQuiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit #27106USGを使用して、1ml の細胞を使用してプラスミドを細胞から単離した。このプラスミドＤＮＡをDNA 配列決定のための鋳型として使用した。

【０２３２】

ペクチン酸リアーゼを含有する１つのクローンを保持し、このクローンをMB504 と命名した。

Taq デオキシ- 末端のサイクル配列決定キット(Perkin Elmer 、USA)、蛍光標識化ターミネーターおよびプライマーとして適当なオリゴヌクレオチドを使用して、プライマーウォーキングによるDNA 配列決定により、ペクチン酸リアーゼの成熟部分に対応するDNA を特性決定した。

Devereux et al.(1984)Nucleic Acids Res.12:387-395 に従い、配列のデータの解析を実施した。クローニングしたDNA 配列はバシラス・サチリス(B.subtilis)において発現され、そして上清中に出現したタンパク質は配列番号:2の成熟タンパク質で表わされる成熟タンパク質に対応した。

【０２３３】

精製および特性決定

前述したように得られたバシラス・サチリス(B.subtilis)の形質転換体(MB504) の5000mlの培養流体を125ml の10％521(カチオン）および200ml の0.1 ％（アニオン）でpH7.5 において凝集させ、次いで遠心し、濾過した。透明な上清を10kDa のカットオフのフィルトロンUF膜上で720ml の最終体積に濃縮した。

【０２３４】

高度に純粋な酵素を得るために、40mlをNaOHでpH8.0 に調節し、次いで25mMのTris-HCl、pH8.0と平衡化した50mlのQ-セファローズカラムに適用した。ペクチン酸リアーゼをカラムをNaCl勾配で溶離した。10kDa の分子量カットオフの膜をもつアミコン(Amicon)限外濾過セルを使用して、溶離されたペクチン酸リアーゼ（合計150ml)を濃縮した。濃縮物をセファデックス200 カラムに適用し、約6.1 等電点を有する分子量38kDa の純粋なペクチン酸リアーゼが得られた。

【０２３５】

純粋な酵素をEDTAに対してpH8.0 （20mMのトリスpH8.0 ）およびpH10(20mM のグリシンpH10）において透析し、円偏光二色性により分析した：EDTAの存在および非存在において、差は見られなかった。

4 つの試料の差動走査熱量測定DSC において、酵素はpH8.0 において最も安定であり、Tris pH8.0中の約61℃およびEDTAに対して透析後約62℃の融点を有することが示された。pH10において、酵素はEDTAの存在および非存在において59℃において溶融した。

触媒活性は基質とのインキュベーションの間のEDTAの存在により阻害されるが、基質とのインキュベーションの間にEDTAを省略した場合、EDTAに対して透析した酵素はなお活性であった。２価のカチオン、例えば、Fe^{++}、Li^{++}、Mg^{++}、Cu^{++}、Mn^{++}は触媒活性に対して効果をもたなかった。

【０２３６】

洗剤中の活性

緩衝剤の代わりに商用洗剤を使用し、40℃においてポリガラクツロン酸ナトリウム(Sigma P-1879)と20分間インキュベートし、次いで還元性糖を定量すると、グリシン緩衝液中で測定した活性に対して37％の相対活性をもつ商業的に入手可能なヨーロッパの粉末状洗濯洗剤Ariel FuturTM 中で、58％の相対活性をもつ商業的に入手可能な米国の粉末状洗濯洗剤TideTM中で、および37％の相対活性をもつ商業的に入手可能な米国の液状洗剤TideTM中で、酵素は活性であった。洗剤濃度は家庭用の洗剤パッケージについて推奨される濃度に

等しく、そして使用した水道水は18度のドイツ硬度（ヨーロッパの洗剤／ヨーロッパの条件）および9 度のドイツ硬度（米国の洗剤／米国の条件）を有した。

【０２３７】

免疫学的性質

デンマーク国の会社DAKOにおいて、慣用技術を使用して前述したように、高度に精製されたペクチン酸リアーゼに対して、ウサギポリクローナル単一特異性血清を発生させた。血清はアガロースゲル中の本発明のバシラス・アガラドヘレンス(B.agaradhaerens) のペクチン酸リアーゼで見事な単一の沈澱を形成した。

【０２３８】

実施例２．バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)からのペクチン酸リアーゼのクローニング、発現、精製および特性決定

バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)、ATCC 14580のゲノムライブラリーの構築を、バシラス・アガラドヘレンス(B.agaradhaerens) について実施例１に記載するように実施した。バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)ATCC 14580遺伝子ライブラリーのペクチン酸リアーゼ陽性クローンは、DSM 11789 として受託された。大腸菌(E.coli)DSM 11789 のプラスミド上のプライマーウォーキング後、バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)ATCC 14580からのペクチン酸リアーゼをコードするDNA の配列番号:3が同定された。

【０２３９】

バシラス・サチリス(B.subtilis)のサブクローニング

これらの２つのオリゴヌクレオチドから成るPCR プライマーの組を使用して、本発明のペクチン酸リアーゼをコードするDNA 配列（配列番号:4で表わされる）をPCR 増幅した：

【化２】

```
Pecl.B.lich. 上 SacII
5′-CTA ACT GCA GCC GCG GCA GCT TCT GCC TTA AAC TCG GGC -3′

Pecl.B.lich. 下 NotI
5′-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT GAA TGC CCC GGA CGT TTC ACC -3′
```

【０２４０】

制限部位SacII およびNotIに下線が引かれている。

前述したようにバシラス・リヘニフォルミス(B.licheniformis)ATCC 14580 から単離された染色体DNA を、実施例1 に記載するように実施したPCR 反応において鋳型として使用した。DNA フラグメントのサイズ1.0kb の出現は、遺伝子セグメントの適切な増幅を示した。

PCR フラグメントのサブクローニングを実施例１に記載するように実施したが、ただし精製したPCR フラグメントをSacII およびNotII で消化した。ペクチン酸リアーゼを含有する１つのクローンを保持し、このクローンをMB541 と命名した。

【０２４１】

Taq デオキシ- 末端のサイクル配列決定キット(Perkin Elmer 、USA)、蛍光標識化ターミネーターおよびプライマーとして適当なオリゴヌクレオチドを使用して、プライマーウォーキングによるDNA 配列決定により、ペクチン酸リアーゼの成熟部分に対応するDNA を特性決定した。

Devereux et al.(1984)Nucleic Acids Res.12:387-395 に従い、配列のデータの解析を実施した。クローニングしたDNA 配列はバシラス・サチリス(B.subtilis)において発現され、そして上清中に出現したタンパク質は配列番号:4の成熟タンパク質で表わされる成熟タンパク質に対応した。

【０２４２】

精製

MB541 を500ml のバッフル付き震盪フラスコにおいて10μg/mlのカナマイシンを含む25×200ml のBPX 培地中で37℃において5 日間生長させ、これにより3500mlの培養ブロスが得られた。pHを酢酸で5.0 に調節し、100ml のカチオン剤(C521)および200ml のアニオン剤(A130)を凝集のための撹拌の間に添加した。Sorval RC3B 遠心機を使用して10000rpm、6℃において30分間遠心して、凝集した物質を分離した。得られる上清は3600mlの合計の体積において370APSU ／mlを含有した。

【０２４３】

上清をワットマン(Whatman) ガラスフィルターGF/DおよびC で清浄化し、最後に10kDa のカットオフのフィルトロンUF膜上で濃縮した。2000mlの合計の体積をpH8.5 に調節した。50g のDEAE A-50 セファデックス(Pharmacia) を2000mlの50mMのトリスpH8.5 中で膨潤させた。過剰の緩衝液を廃棄し、透明な濃縮された酵素溶液をスラリーと15分間混合した。酵素をイオン交換物質からブフナー漏斗上の吸引により分離した。生ずる溶液を10kDa のカットオフのフィルトロン上で800ml の最終体積に濃縮した。

【０２４４】

高度に精製されたペクチン酸リアーゼを得るために、S-セファローズカチオン交換クロマトグラフィーを使用する最終工程を実施した。950APSU/ml(上を参照）の50mlの溶液を酢酸でpH5.0 に調節した。それを50mmolの酢酸ナトリウムpH5.0 の緩衝液と平衡化したS-セファローズ(Pharmacia) を含有する50mlのカラムに適用した。結合したペクチン酸リアーゼを0.5Mの塩化ナトリウムの勾配で溶離した。

【０２４５】

特性決定

純粋な酵素は35kDa のSDS-PAGE中の単一のバンドおよび約6.1 の等電点を与えた。57750 のモル吸光係数を使用して、タンパク質濃度を測定した（配列から推定されたアミノ酸組成に基づく）。

235nm において測定できる二重結合の形成による切断のドメインを検出するアッセイを使用して、下記のデータが得られた：

【０２４６】

1. (条件：pH10；グリシン緩衝剤；カルシウムなし；基質としてポリガラクツロン酸 Sigma P-1879)：1 μmol ／分／mg。

2. (条件：pH10；グリシン緩衝剤；カルシウムなし；基質としてDE 35(35％エステル化ペクチン) ：4 μmol ／分／mg。

純粋な酵素をEDTAに対してpH8.0 （20mMのトリスpH8.0 ）およびpH10(20mM のグリシンpH10）において透析し、円偏光二色性により分析した：EDTAの存在および非存在において、差は見られなかった。

４つの試料の差動走査熱量測定DSC において、酵素はpH8.0 において最も安定であり、Tris pH8.0中の約70℃およびEDTAに対して透析後約75℃の融点を有することが示された。pH10において、酵素はEDTAの存在および非存在において55℃において溶融した。

【０２４７】

ペクチン酸リアーゼの触媒活性は基質とのインキュベーションの間のEDTAの存在により阻害されるが、基質とのインキュベーションの間にEDTAを省略した場合、EDTAに対して透析した酵素はなお活性であった。2 価のカチオン、例えば、Fe++、Li++、Mg++、Cu++、Mn++は触媒活性に対して効果をもたなかった。

異なるpH値におけるβ- トランス脱離活性（235nm においてペクチン酸リアーゼを使用する）を、下記の緩衝液を使用して、40℃において定常状態の反応速度論として測定した：

【０２４８】

pH6.0:	Na-MES 0.1M
pH6.5 、7.0 および7.5:	Na-MOPS 0.1M
pH8.0 および8.5:	Tris 0.1M
pH9.0 、9.5 、10.0および10.5:	Na- グリシン 0.1M

pH11～11.5: Na- 炭酸塩 0.1M
MES ：SIGMA 、No.M-8250 から（2ー[N- モルホリノ] エタンスルホン酸）。
MOPS：SIGMA 、No.M-1254 から（3-[N- モルホリノ] プロパンスルホン酸）。
Tris：Merck No.1.08382から。
グリシン：MERCK からおよび炭酸ナトリウム:Merck No.6392から。
【０２４９】
相対速度を最適な活性の百分率として計算し、下記の結果が得られた：

pH	活性%
6.5	1
7	5
7.5	4
8	4
8.5	4
9	6
9.5	23
10	100
10.5	測定せず
11	52
11.2	0

【０２５０】
相応して、異なる温度における相対活性が見出された（pH10）：

温度℃	活性%
40	65
50	87
55	87
60	100
65	95

【０２５１】
洗剤中の活性
緩衝剤の代わりに商用洗剤を使用し、40℃においてポリガラクツロン酸ナトリウム(Sigma P-1879)と20分間インキュベートし、次いで還元性糖を定量すると、グリシン緩衝液中で測定した活性に対して44%の相対活性をもつヨーロッパの商業的に入手可能な粉末状洗濯洗剤Ariel Futur 、51%の相対活性をもつ米国の商業的に入手可能な粉末状洗濯洗剤Tide、および30%の相対活性をもつ米国の商業的に入手可能な液状洗剤Tide中で、酵素は活性であった。洗剤濃度は使用およびヨロッパの条件下で18度のドイツ硬度および米国の条件下で9 度のドイツ硬度の水道水について推奨されるものであった。
【０２５２】
免疫学的性質
デンマーク国の会社DAKOにおいて、慣用技術を使用して前述したように、高度に精製されたペクチン酸リアーゼに対して、ウサギポリクローナル単一特異性血清を発生させた。血清はアガロースゲル中の本発明のペクチン酸リアーゼで見事な単一の沈澱を形成し、そしてバシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)の粗製産物、例えば、Pulpzyme HC バッチNo.CKF0054またはバッチNo.CKN00009(Novo Nordisk A/Sから）に対してただ1つの沈澱のアーチを形成した。
【０２５３】
実施例３．バシラス（Bacillus）種 KJ59 、DSM 12419 からのペクチン酸リアーゼのクローニング、発現、精製および特性決定
ペクチン酸リアーゼの成熟部分をコードするDNA 配列（配列番号:7）のバシ ラス・サチリス(Bacillus subtilis) 中のサブクローニング
実施例１に記載する手順と正確に同一手順糖、配列番号:7においてコードされるペクチン

酸リアーゼの成熟部分をコードする配列をクローニングし、pMOL944/PL2306発現系中で発現させた。唯一の差は、下記の2 つのPCR プライマーを使用し、そしてバシラス（Bacillus）種 KJ59 、DSM 12419 から単離されたゲノムDNA を代わりに使用した：

【０２５４】

#145375

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AAT ACG CCA AAT TTC AAC TTA CAA G-3'

#145376

5'-CAG CAG TAG CGG CCG CTT ACG GTT GGA TGA CAC CAA CTC-3'

生ずるペクチン酸リアーゼを発現するバシラス・サチリス(B.subtilis)のクローンをMB888 と命名した。クローニングしたDNA 配列はバシラス・サチリス(B.subtilis)において発現され、そして上清中に出現したタンパク質は配列番号:8の成熟タンパク質で表わされる成熟タンパク質に対応した。

【０２５５】

精製

このプラスミド（MB888 ）で形質転換したバシラス・サチリス(Bacillus subtilis) を、カナマイシンを含有するPS培地中で生長させた。

カチオン凝集剤C521(10 %溶液) およびアニオン剤A130の0.1 %溶液を使用して、凝集を実施した。2000mlの発酵培地に、2000mlのイオンを含まない水を添加し、それはpH6.0 を有し、室温において80mlのC521(10 %) および同時に40mlのA130を撹拌しながら添加した。Sorval RC3B 遠心機を使用して10,000rpm において30分間遠心することによって、凝集した物質を分離した。上清をワットマン(Whatman) ガラスフィルターNo.Fで清浄化した。合計40000ml の204,000 トランス単位を含有する透明な溶液が得られた。

【０２５６】

10kDa のカットオフのフィルトロン限外濾過により、液体を濃縮した。25mMのトリスpH8.0 中で30分間平衡化した5gのDEAE A-50 セファデックスで濃縮物を処理し、ペクチン酸リアーゼは結合せず、濾過してイオン交換物質を除去した。濾液をHCl でpH5.0 に調節し、25mMの酢酸ナトリウムpH5.0 と平衡化したS-セファローズカラムに適用した。結合したペクチン酸リアーゼをNaCl勾配を使用して、純粋なタンパク質として溶離した。

【０２５７】

特性決定

純粋な酵素は36kDa の分子量および8.98のpIを有する。

最適温度はpH10において約65℃である。

相対活性は40℃、pH9 ～11において50%より高い。

ペクチン酸リアーゼは、0.1Mの酢酸ナトリウムpH6.0 中でDSC を使用して測定して、74℃の融点を有する。

【０２５８】

実施例４．バシラス（Bacillus）種 I534 からのペクチン酸リアーゼのクローニング、発現、精製および特性決定

ペクチン酸リアーゼの成熟部分をコードするDNA 配列（配列番号:9）のバシラス（Bacillus）種 I534 中のサブクローニング

前述と正確に同一手順を使用して、ペクチン酸リアーゼの成熟部分をコードする配列（配列番号:9）をクローニングし、pMOL944/PL2306発現系中で発現させた。唯一の差は、下記の２つのPCR プライマーを使用し、そしてバシラス（Bacillus）種 I534 から単離されたゲノムDNA を代わりに使用したことである：

【０２５９】

#136558

5'-CCT GCA GCC GCG GCA AAA GGT GAA AGC GAT TCC ACT ATG-3'

#136559

5'-GTT GAG AAA AGC GGC CGC AAC GGA CAC TCG GCT TTA GAG-3'

生ずるペクチン酸リアーゼを発現するバシラス・サチリス(B.subtilis)のクローンをMB74

6 と命名した。クローニングしたDNA 配列はバシラス・サチリス(B.subtilis)において発現され、そして上清中に出現したタンパク質は配列番号:10 の成熟タンパク質で表わされる成熟タンパク質に対応した。

【０２６０】

精製

このプラスミド（MB746 ）で形質転換したバシラス・サチリス(Bacillus subtilis) を、カナマイシンを含有するPS培地中で生長させた。

カチオン凝集剤C521(10 %溶液) およびアニオン剤A130の0.1 %溶液を使用して、凝集を実施した。3700mlの発酵培地に、HCl でpH5.5 に調節し、室温において37mlのC521(10 %) および同時に75mlのA130を撹拌しながら添加した。Sorval RC3B 遠心機を使用して10,000rpm において30分間遠心することによって、凝集した物質を分離した。上清をワットマン(Whatman) ガラスフィルターNo.Fで清浄化した。合計40000ml の1,044,000 トランス単位を含有する透明な溶液が得られた。

【０２６１】

10kDa の分子量カットオフのフィルトロン限外濾過により、液体を550ml に濃縮した。この産物を50%のMPG(バッチ#9831)で安定化した後、適用試験のために使用した。

アニオンクロマトグラフィー（HPQ カラム、pH8.0 、25mMのトリス緩衝液を使用する）により、高度に精製された酵素が得られた；酵素をNaCl勾配により溶離し、最終精製工程をスーパーデックス200 カラム上のサイズクロマトグラフィーにより実施し、0.1Mの酢酸ナトリウム緩衝液中で展開させた。

【０２６２】

特性決定

純粋な酵素は35kDa の分子量および6.2 の等電点（pI）を有する。

最適温度はpH10において70℃以上である。

相対活性は40℃の温度、pH9 ～11において50%より高い。

精製されたペクチン酸リアーゼのN 末端は、アミノ酸配列配列番号:10 の位置25において出発してアミノ酸配列KGESDSTMNAを有する。

【０２６３】

実施例５．バシラス（Bacillus）種 AAI12からのペクチン酸リアーゼのクローニング、発現、精製および特性決定

ペクチン酸リアーゼの成熟部分をコードするDNA 配列（配列番号:5）のバシ ラス（Bacillus）種 AAI12中のサブクローニング

実施例１に記載する手順と正確に同一手順を使用して、ペクチン酸リアーゼの成熟部分をコードする配列（配列番号:5）をクローニングし、pMOL944/PL2306発現系中で発現させた。唯一の差は、下記の2 つのPCR プライマーを使用し、そしてバシラス（Bacillus）種 AAI12から単離されたゲノムDNA を代わりに使用したことである：

【０２６４】

#80501D1C12

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA GCA TCA TTT CAG TCT AAT AAA AAT TAT C-3'

#80501D1B12

5'-GAC GAC GTA CAA GCG GCC GCG CTA CTG TAC AAC CCC TAC ACC-3'

生ずるペクチン酸リアーゼを発現するバシラス・サチリス(B.subtilis)のクローンをMB644 と命名した。クローニングしたDNA 配列はバシラス・サチリス(B.subtilis)において発現され、そして上清中に出現したタンパク質は配列番号:6の成熟タンパク質で表わされる成熟タンパク質に対応した。

【０２６５】

精製および特性決定

このプラスミド（MB644 ）で形質転換したバシラス・サチリス(Bacillus subtilis) を、カナマイシンを含有するPS培地中で生長させた。

この酵素はＮ末端に３つのレクチン結合ドメインを含有することが見出された。

【０２６６】
実施例６．セルロース材料のペクチン酸リアーゼ処理
ペクチンの除去および湿潤性に対する温度の効果
典型的なセルロース材料を代表する、100 %の綿の織製綾織物、脱糊剤した被験布帛＃428Uを、実施例2 のバシラス・リヘニフォルミス(B.licheniformis) のペクチン酸リアーゼからなる水性酵素溶液で処理し、ここで酵素溶液は9APSU/g 布帛でpH9 および15:1の液比で投与した。処理時間は２時間であり、そして温度を35～75℃で変化させた。酵素処理後、布帛をよくすすぎ、乾燥し、次いでルテニウム・レッド(Ruthenium Red) で染色した。染料の吸収を分光光度測定し、そしてこれは繊維上の残留ペクチンの測度である。
【０２６７】
出発物質の染料吸収を100 %残留ペクチンとして、そして完全に化学的に精練、漂白された布帛のそれを０%として使用して、残留ペクチンの百分率を計算した。結果を表２に示す。さらに、湿潤性（ドロップ試験－したたり落ちて布帛に吸収されるようになる水の時間（秒）を測定する）を測定し、無酵素の対照と比較した。結果を表３に示す。
【０２６８】
【表２】

表２（残留ペクチン）

温度℃	35	45	55	65	75
無酵素	100	100	93	90	85
酵　素	52	40	32	28	26

アルカリ精練は典型的には20～25%の残留ペクチンを残す。

【０２６９】
【表３】

表３

温度℃	35	45	55	65	75
無酵素	32	29	29	12	11
酵　素	15	10	7	5	3

湿潤性の目標は典型的には＜5 秒である。
上昇する温度の有益な効果は、双方の応答について明瞭に見られる。
【０２７０】
実施例７．セルロース材料のペクチン酸リアーゼ処理
ペクチン除去に対するpHの効果
典型的なセルロース材料を代表する、100 %の綿の織製綾織物、脱糊剤した被験布帛＃428Uを、実施例２のバシラス・リヘニフォルミス(B.licheniformis) のペクチン酸リアーゼ

からなる水性酵素溶液で処理し、ここで酵素溶液は9APSU/g 布帛で15:1の液比で投与した。処理時間は２時間であり、そして温度を55℃であった。pHを８～11の間で変化させた。酵素処理後、布帛をよくすすぎ、乾燥し、次いでルテニウム・レッド(Ruthenium Red) で染色した。染料の吸収を分光光度測定し、そしてこれは繊維上の残留ペクチンの測度である。出発物質の染料吸収を100 %残留ペクチンとして、そして完全に化学的に精練、漂白された布帛のそれを０%として使用して、残留ペクチンの百分率を計算した。結果を表４に示す。

【０２７１】

【表４】

表４

pH	8	9	10	10.5	11
残留ペクチン	35	32	30	48	61

pH最適値はほぼ9.5 であることが見出されたが、すぐれた活性は非常に広い範囲のアルカリ性の間隔において証明される。

【０２７２】

実施例８．洗剤中の本発明の酵素の使用

実施例２に記載するようにして得られた精製された酵素(バッチ9751) は、慣用の商業的液状洗剤を使用するミニ洗濯試験において1ppmのレベルで試験したとき、改良されたクリーニング性能を示した。この試験は慣用の北アメリカの洗濯条件下に実施した。

【０２７３】

実施例９．バナナで汚れた綿繊維材料に対するカルボヒドラーゼの効果方法

ウルトラ・ツラックス(Ultra Turrax)中で40ｍｌの水で３本のバナナをすりつぶし、均質化した。スタイル(Style)400綿(Testfabtics,Inc.)をこの溶液中でソーキングし、２本ロールの間で絞り、一夜乾燥した。

商業的液状洗剤ブランドのFutur Liquid中で、ヨーロッパの洗濯条件下に、それぞれ、0.1ppm、0.2ppm、1ppmおよび10ppm の実施例２のペクチン酸リアーゼを洗剤液体に添加し、そして10ppm の実施例１のペクチン酸リアーゼを添加して、汚れた綿繊維材料を洗濯した。この試験を反復した。

結果

Ariel 液体：バナナの汚れ除去%（100 %は汚れの完全な除去である）

【０２７４】

【表５】

表５

	試験Ａ	試験Ｂ
酵素なし	26%	32%
10ppm の酵素、実施例2	59%	58%
1ppmの酵素、実施例2	47%	48%
0.1ppmの酵素、実施例2	35%	34%
10ppm の酵素、実施例1	-	45%

【０２７５】

実施例10. ペクチン酸リアーゼとCBD との間の融合タンパク質の構築および発現

クロストリジウム・テルモセルム(Clostridium termocellum)YS 株からのCipB遺伝子のCBD をコードするDNA 配列(Poole D M;Morag E;Lamed R;Bayer EA;Hazlewood GP;Gilbert HJ(1992)Identification of the Cellulose-binding domain of the cellulosome subunit S1 from Clostridium thermocellum YS、Fems Microbiology Letters Vol.78、No.2-3 pp.181-186)を、下記の2 つのオリゴヌクレオチドから成るPCR プライマーの組を使用して、PCR 増幅した：

【０２７６】

【化３】

CIPCBD. 上 PECL.SalI
5′-CGA CAA TGT CGA CAA TGT AAA ATC AAT CGI CAA GCA AAA TGC CGG AGT CGG CAA AAT CCA GCG CAG ACC GCC AAC ACC GAC CCC GAC TTC ACC GCC AAG CGC AAA TAC ACC GGT ATC AGG CAA TTT G -3′

CIPCBD. 下 NotI
5′-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT ATA CCA CAC TGC CAC CGG GTT CTT TAC-3′

【０２７７】

制限部位SalIおよびNciIに下線が引かれている。

CBD をコードする染色体DNA は下記の文献に記載されているように得ることができる：Poole DM;Morag E;Lamed R;Bayer EA;Hazlewood GP;Gilbert HJ(1992)Identification of the Cellulose-binding domain of the cellulosome subunit S1 from Clostridium thermocellum YS、Fems Microbiology Letters Vol.78、No.2-3 pp.181-186 。実施例１に記載するように実施したPCR 反応において、CBD をコードするDNA 試料を鋳型として使用した。0.2kb の近似大きさのDNA フラグメントの出現は、遺伝子セグメントの適切な増幅を示した。

【０２７８】

PCR フラグメントのサブクローニング
サブクローニングを実施例１に記載するように実施したが、ただし精製されたPCR フラグメントをSalIおよびNotIで消化した。一夜の培養ブロスからプラスミドDNA を単離することによって、いくつかのクローンを分析した。
１つのこのようなクローンを上で使用した寒天平板上で数回再ストリーキングし、このクローンをMB914 と呼んだ。
【０２７９】
クローンMB914 を37℃においてTY-10 μg/mlのカナマイシン中で一夜生長させ、次の日に、バシラス・サチリス(B.subtilis)プラスミド調製物についての製造業者の推奨に従いQuiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit #27106 を使用して、1ml の細胞を使用してプラスミドを細胞から単離した。このプラスミドＤＮＡをDNA 配列決定し、そして下記の融合タンパク質に対応するDNA 配列が明らかにされた：配列番号:11 および添付されたタンパク質配列の配列番号:12 に示すペクチン酸リアーゼ- リンカー-cbd。
【０２８０】
ペクチン酸リアーゼ- リンカー-cbd融合タンパク質の発現および検出
MB914 をTY- 培地中の37℃および250rpmにおいて20時間インキュベートした。1ml の無細胞上清を200 μl のMillipore H2O 中の10％のAvicel(Merck、Darmstadt 、Germany)と混合した。この混合物を0 ℃において30分間インキュベートした。このペクチン酸リアーゼ- リンカー-CBD融合タンパク質がAvicelに結合した後、結合したタンパク質を有するAvicelを5000g において５分間回転させた。ペレットを100 μl のSDS-PAGE緩衝液の中に再懸濁させ、95℃において５分間沸騰させ、5000g において５分間回転させ、そして25μl を4 ～20％のLaemmli Tris-Glycine、 SDS-PAGE NOVEX ゲル(Novex、 USA) 上に負荷した。
【０２８１】
試料をXcellTMMini-Cell(Novex、 USA) 中で製造業者が推奨するように電気泳動させ、クーマッシーを使用する染色、脱染および乾燥を含む、ゲルのすべての引き続く取扱いを、製造業者が記載するように実施した。
ほぼ55kDa のタンパク質のバンドの出現は、プラスミドpMB914上にコードされるペクチン酸リアーゼ- リンカー-CBDのバシラス・サチリス(B.subtilis)中の発現を示した。
【０２８２】
実施例11. ペクチン酸リアーゼ（配列番号:10 ）による綿布帛の処理
下記の実験を実施して、繊維材料を精練するための配列番号:10 のペクチン酸リアーゼの使用を評価した。
A. 材料
1) 布帛：織製アーミイカーデッド(army carded) 綿繻子生繊維材料、品質428R(242g/m2) を使用した。
2) 装置：Labomat(Mathis、スイス国）を12.5:1の液比（150ml の緩衝剤／酵素溶液中の12g の布帛）において使用した。
【０２８３】
3) ペクチン酸リアーゼ：実験１において、配列番号:10 に対応するペクチン酸リアーゼを使用し、0.02M のリン酸塩緩衝液および0.4g/lの非イオン界面活性剤(Tergitol 15-S-12 、Union Carbide)を含有する溶液中で配合した。実験2 において、配列番号:4に対応するペクチン酸リアーゼを使用し、0.05M のリン酸塩／ホウ酸塩緩衝液、2.0g/lの非イオン界面活性剤(Tergitol 15-S-12 、Union Carbide)、および1.0g/lを含有する溶液中で配合した。
【０２８４】
B. 手順および結果
実験１において、試験布帛をペクチン酸リアーゼを含有する水溶液と60～80℃の温度および7 ～11の範囲のpHにおいて15分間接触させ、次いで残留ペクチンを定量した。
第３図はpHおよび温度の双方の関数として残留ペクチン％の輪郭プロットを示し、そして第３図は酵素の投与量の関数として残留ペクチン％を示す。ペクチン除去のために最適な

温度は80℃以上である。実験１において、試験布帛をペクチン酸リアーゼを含有する水溶液と600APSU/kg綿において接触させ、ローラーシステム中で絞りして、溶液の取上げを85％とし、そして40～70℃の温度において60分間インキュベートし、次いで残留ペクチンを定量した。残留ペクチン％を温度の関数として下記表に示す。

【０２８５】

【表６】

表６

温度（℃）	残留ペクチン（％）
40℃	35％
55℃	28％
70℃	40％

【０２８６】

参考文献

Lever, M. (1972) A new reaction for colormetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. 47, 273-279。

N.C. CarpitaおよびD.M. Gibeaut (1993) The Plant Journal 3 : 1-30。

Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B.R.,Sjoholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis 。

J. Bacteriol. 172 : 4315-4321 。

【０２８７】

寄託された微生物への言及

寄託当局：Deutshe Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

住所：Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, GERMANY

（１）標示：NN049338

寄託日：1997年９月25日

寄託番号：DSM 11788

（２）標示：NN049399

寄託日：1997年９月25日

寄託番号：DSM 11789

【０２８８】

（３）標示：NN049413

寄託日：1998年９月８日

寄託番号：DSM 12403

（４）標示：NN049414

寄託日：1998年９月８日

寄託番号：DSM 12404

（５）標示：NN017545

寄託日：1998年９月21日

寄託番号：DSM 12419

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、配列番号:2、４ 、６ 、8 および10のアミノ酸配列の成熟部分の配列の整列、整列番号1 ～344 、を示す。整列番号の位置223 は、配列番号:2の位置240 、配列番号:4の位置233 、配列番号:6の位置390 、配列番号:8の位置240 および配列番号:10 の位置227 に対応する。

【図２】　図２は、熱安定性ペクチン酸リアーゼを使用する綿布帛からのペクチンの除去に対するpHおよび温度の効果のグラフの図解である。ペクチンの除去は残留ペクチンの％として表す。ペクチン酸リアーゼは100 mol/分/kg 布帛の使用量で適用した。

【図３】　図３は、綿布帛からのペクチンの除去に対する熱安定性ペクチン酸リアーゼの投与量の効果のグラフの図解である。ペクチンの除去は残留ペクチンの％として表す。ペクチン酸リアーゼは100 mol/分/kg 布帛の投与量で適用した。ペクチンの除去は残留ペクチンの％として表し、そして投与量は mol/ 分/kg 繊維として表す。ペクチン酸リアーゼは布帛にpH9 および80℃において適用した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:
(A) NAME: NOVO NORDISK A/S
(B) STREET: Novo Alle
(C) CITY: Bagsvaerd
(E) COUNTRY: Denmark
(F) POSTAL CODE (ZIP): DK-2880
(G) TELEPHONE: +45 44 44 88 88
(H) TELEFAX: +45 44 49 32 56

(ii) TITLE OF INVENTION: NOVEL PECTATE LYASES

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 14

(iv) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1077 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

ATGACTAAAG TCTTTAAATT GTTACTGGCA TTAGCTCTCG TTTTACCAGT TATCTCATTT 60

AGTTCTCCTG CCTCGCAAGC TGCTTCAAAT CAGCCAACTT CTAACGGACC ACAAGGCTAT 120

GCGTCAATGA ATGGAGGGAC AACCGGTGGT GCAGGCGGCC GTGTCGAATA TGCAAGCACC 180

GGAGCGCAAA TTCAGCAATT GATAGATAAT CGCAGCCGAA GTAATAACCC TGATGAACCA 240

TTAACGATTT ATGTAAACGG AACGATTACA CAAGGAAATT CCCCACAGTC CCTTATAGAT 300

GTTAAAAATC ACCGTGGAAA AGCTCATGAA ATTAAAAACA TCTCTATTAT CGGTGTAGGA 360

ACAAATGGAG AGTTTGATGG CATTGGGATA AGACTATCAA ACGCCCATAA TATCATTATC 420

CAAAATGTAT CAATTCATCA TGTGCGAGAG GGAGAAGGCA CGGCTATTGA AGTGACAGAT 480

GAGAGTAAAA ACGTGTGGAT CGATCACAAC GAGTTTTATA GTGAATTTCC AGGTAATGGA 540

GACTCAGATT ATTACGATGG TCTCGTAGAC ATAAAAAGAA ACGCTGAATA TATTACGGTT 600

TCATGGAATA AGTTTGAGAA TCATTGGAAA ACGATGCTCG TCGGTCATAC TGATAATGCC 660

TCATTAGCGC CAGATAAAAT TACGTACCAT CACAATTATT TTAATAATCT TAATTCACGT 720

GTCCCGCTTA TTCGATACGC TGATGTCCAT ATGTTCAATA ACTATTTTAA AGACATTAAC 780

GATACAGCGA TTAACAGTCG TGTAGGGGCC CGTGTCTTTG TAGAAAACAA CTATTTTGAC 840

AACGTAGGAT CAGGACAAGC TGACCCAACG ACTGGTTTTA TTAAAGGGCC TGTTGGTTGG 900

TTCTATGGAA GTCCGAGTAC TGGATATTGG AATTTACGTG GAAATGTATT TGTTAATACA 960

CCGAATAGTC ATTTAAGCTC TACAACAAAC TTTACACCAC CATATAGTTA CAAAGTCCAA 1020

TCAGCTACCC AAGCTAAGTC GTCGGTTGAA CAACATTCGG GAGTAGGTGT TATCAAC 1077

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 359 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

```
Met Thr Lys Val Phe Lys Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Val Leu Pro
1               5                  10                  15

Val Ile Ser Phe Ser Ser Pro Ala Ser Gln Ala Ala Ser Asn Gln Pro
            20                  25                  30

Thr Ser Asn Gly Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Met Asn Gly Gly Thr Thr
        35                  40                  45

Gly Gly Ala Gly Gly Arg Val Glu Tyr Ala Ser Thr Gly Ala Gln Ile
    50                  55                  60

Gln Gln Leu Ile Asp Asn Arg Ser Arg Ser Asn Asn Pro Asp Glu Pro
65                  70                  75                  80

Leu Thr Ile Tyr Val Asn Gly Thr Ile Thr Gln Gly Asn Ser Pro Gln
                85                  90                  95

Ser Leu Ile Asp Val Lys Asn His Arg Gly Lys Ala His Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Asn Ile Ser Ile Ile Gly Val Gly Thr Asn Gly Glu Phe Asp Gly Ile
        115                 120                 125

Gly Ile Arg Leu Ser Asn Ala His Asn Ile Ile Ile Gln Asn Val Ser
    130                 135                 140

Ile His His Val Arg Glu Gly Glu Gly Thr Ala Ile Glu Val Thr Asp
145                 150                 155                 160

Glu Ser Lys Asn Val Trp Ile Asp His Asn Glu Phe Tyr Ser Glu Phe
                165                 170                 175

Pro Gly Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Val Asp Ile Lys
            180                 185                 190

Arg Asn Ala Glu Tyr Ile Thr Val Ser Trp Asn Lys Phe Glu Asn His
        195                 200                 205

Trp Lys Thr Met Leu Val Gly His Thr Asp Asn Ala Ser Leu Ala Pro
```

```
    210                 215                 220

Asp Lys Ile Thr Tyr His His Asn Tyr Phe Asn Asn Leu Asn Ser Arg
225                 230                 235                 240

Val Pro Leu Ile Arg Tyr Ala Asp Val His Met Phe Asn Asn Tyr Phe
                245                 250                 255

Lys Asp Ile Asn Asp Thr Ala Ile Asn Ser Arg Val Gly Ala Arg Val
            260                 265                 270

Phe Val Glu Asn Asn Tyr Phe Asp Asn Val Gly Ser Gly Gln Ala Asp
        275                 280                 285

Pro Thr Thr Gly Phe Ile Lys Gly Pro Val Gly Trp Phe Tyr Gly Ser
    290                 295                 300

Pro Ser Thr Gly Tyr Trp Asn Leu Arg Gly Asn Val Phe Val Asn Thr
305                 310                 315                 320

Pro Asn Ser His Leu Ser Ser Thr Thr Asn Phe Thr Pro Pro Tyr Ser
                325                 330                 335

Tyr Lys Val Gln Ser Ala Thr Gln Ala Lys Ser Ser Val Glu Gln His
            340                 345                 350

Ser Gly Val Gly Val Ile Asn
        355
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1026 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus licheniformis - ATCC 14580

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

```
ATGAAGAAAT TAATCAGCAT CATCTTTATC TTTGTATTAG GGGTTGTCGG GTCATTGACA      60

GCGGCGGTTT CGGCAGAAGC AGCTTCTGCC TTAAACTCGG GCAAAGTAAA TCCGCTTGCC     120

GACTTCAGCT TAAAAGGCTT TGCCGCACTA AACGGCGGAA CAACGGGCGG AGAAGGCGGT     180

CAGACGGTAA CCGTAACAAC GGGAGATCAG CTGATTGCGG CATTAAAAAA TAAGAATGCA     240

AATACGCCTT TAAAAATTTA TGTCAACGGC ACCATTACAA CATCAAATAC ATCCGCATCA     300

AAGATTGACG TCAAAGACGT GTCAAACGTA TCGATTGTCG GATCAGGGAC CAAAGGGGAA     360

CTCAAAGGGA TCGGCATCAA AATATGGCGG GCCAACAACA TCATCATCCG CAACTTGAAA     420

ATTCACGAGG TCGCCTCAGG CGATAAAGAC GCGATCGGCA TTGAAGGCCC TTCTAAAAAC     480

ATTTGGGTTG ATCATAATGA GCTTTACCAC AGCCTGAACG TTGACAAAGA TTACTATGAC     540

GGATTATTTG ACGTCAAAAG AGATGCGGAA TATATTACAT TCTCTTGGAA CTATGTGCAC     600

GATGGATGGA AATCAATGCT GATGGGTTCA TCGGACAGCG ATAATTACAA CAGGACGATT     660

ACATTCCATC ATAACTGGTT TGAGAATCTG AATTCGCGTG TGCCGTCATT CCGTTTCGGA     720
```

GAAGGCCATA TTTACAACAA CTATTTCAAT AAAATCATCG ACAGCGGAAT TAATTCGAGG 780

ATGGGCGCGC GCATCAGAAT TGAGAACAAC CTCTTTGAAA ACGCCAAAGA TCCGATTGTC 840

TCTTGGTACA GCAGTTCACC GGGCTATTGG CATGTATCCA ACAACAAATT TGTAAACTCT 900

AGGGGCAGTA TGCCGACTAC CTCTACTACA ACCTATAATC CGCCATACAG CTACTCACTC 960

GACAATGTCG ACAATGTAAA ATCAATCGTC AAGCAAAATG CCGGAGTCGG CAAAATCAAT 1020

CCATAA 1026

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 341 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus licheniformis - ATCC 14580

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

```
Met Lys Lys Leu Ile Ser Ile Ile Phe Ile Phe Val Leu Gly Val Val
1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Thr Ala Ala Val Ser Ala Glu Ala Ala Ser Ala Leu Asn
            20                  25                  30

Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Leu Lys Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Glu Gly Gly Gln Thr Val Thr
    50                  55                  60

Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu Ile Ala Ala Leu Lys Asn Lys Asn Ala
65                  70                  75                  80

Asn Thr Pro Leu Lys Ile Tyr Val Asn Gly Thr Ile Thr Thr Ser Asn
                85                  90                  95

Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp Val Lys Asp Val Ser Asn Val Ser Ile
            100                 105                 110

Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly Glu Leu Lys Gly Ile Gly Ile Lys Ile
        115                 120                 125

Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu Lys Ile His Glu Val
    130                 135                 140

Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala Ile Gly Ile Glu Gly Pro Ser Lys Asn
145                 150                 155                 160

Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr His Ser Leu Asn Val Asp Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val Lys Arg Asp Ala Glu Tyr Ile
            180                 185                 190

Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp Gly Trp Lys Ser Met Leu Met
        195                 200                 205

Gly Ser Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Thr Ile Thr Phe His His
    210                 215                 220
```

```
Asn Trp Phe Glu Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro Ser Phe Arg Phe Gly
225                 230                 235                 240

Glu Gly His Ile Tyr Asn Asn Tyr Phe Asn Lys Ile Ile Asp Ser Gly
                245                 250                 255

Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala Arg Ile Arg Ile Glu Asn Asn Leu Phe
            260                 265                 270

Glu Asn Ala Lys Asp Pro Ile Val Ser Trp Tyr Ser Ser Ser Pro Gly
        275                 280                 285

Tyr Trp His Val Ser Asn Asn Lys Phe Val Asn Ser Arg Gly Ser Met
    290                 295                 300

Pro Thr Thr Ser Thr Thr Thr Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Tyr Ser Leu
305                 310                 315                 320

Asp Asn Val Asp Asn Val Lys Ser Ile Val Lys Gln Asn Ala Gly Val
                325                 330                 335

Gly Lys Ile Asn Pro
            340
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1530 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus sp.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

```
ATGATGAAGA TGAGAAAAGC ATTAAGTGTA TTAGTGATTT TCGGATTATT CGTATCTTTT      60
TTTAGTTTTG GTCATCAAGG AGCAGAAGCG GCATCATTTC AGTCTAATAA AAATTATCAT     120
CTAGTGAATG TGAACAGTGG CAAGTACTTA GAAGTGGGGG CTGCCTCAAC AGAGAACGGT     180
GCAAATGTCC AACAATGGGA AAATACGAAT TGTCATTGTC AACAATGGCG ATTGGTGCAA     240
AATCAGGATG GTTATTATGA GATTGTAAAC CGACATAGTG GCAAAGCATT GGATGTATTT     300
GAACGTTCTT CAGCTGATGG AGCGAACATT GTACAATGGG ATTCGAATGG ACGTAGCAAT     360
CAACAATGGA CGATTCAACA AGTGGGTTCC TCTTATAAAA TAGTTAGCAG ACATAGTGGG     420
AAGGCACTCG AAGTATTTAA CCATTCTAAT CAAAATGGAG CAAATGTCGT ACAGTGGCAA     480
GATTTTGGTA ATCCGAATCA ACTTTGGAAT ATCGTCGAGG TTGGTTCAGG ACAAGCTCAC     540
GATTTCAGTA AGCCGTTGGG GTATGCCTCA ATGAATGGCG GGACCACTGG CGGTCAAGGT     600
GGACGAGTCG AATACGCGAG TACTGGCTCT CAACTACAAA AATTAATCGA TGATCGAAGT     660
CGAAGCAATA ATCCCAATCA ACCACTTACC ATTTATGTAA CTGGGAAAAT CACCCTGCAA     720
AACTCCTCTG ATGATAAAAT TGAAGTGAAA AATCATCGTG GACAAGCTCA TGAAATACGT     780
AATCTGTCTA TCATAGGTCA AGGAACAAGA GGAGAGTTTG ATGGCATTGG TTTACGATTA     840
```

ATTAATGCGC ACAATGTCAT TGTGCGTAAT CTCTCCATTC ACCATGTACG AGCTGGTTCA 900

GGTGAAGGTA CATCAATTGA AGTTACTCAA GGAAGTAAGA ATATTTGGAT TGATCATAAC 960

GAATTTTATA GTCAACTGGA TGGGAATAAC AACCCTGATC TGTATGATGG TCTTGTCGAT 1020

ATTAAACGGA ATTCGGAGTA CATTACGGTC TCTTGGAACA AGTTTGAGAA TCATTGGAAA 1080

ACGATGCTCG TCGGCCATAC CGATAACGCA TCATTAGCAC CTGATAAAGT TACGTACCAC 1140

CACAACTTTT TCCACAATCT TAATTCCAGA GTTCCGTTAA TTCGATTCGC AGATGTTCAT 1200

ATGGTTAACA ACTATTTCAA AGATATTAAA GATACAGCAA TTAATAGTCG TATGGGAGCA 1260

AGAGTATTTG TAGAAAATAA CTATTTTGAG AATGTAGGAT CAGGTCAACA AGATCCGACC 1320

ACACGACAAA TTAAAACTGC TGTTGGGTGG TTTTATGGTA GTTCTAGCAC TGGATATTGG 1380

AATTTAAGAG GAAATCAATT TATTAACACA CCATCAAGCC ACTTGTCTTC CACAACGAAT 1440

TTCACACCAC CTTATCAGTT CAACGCCCAA TCCGCTCAAG ATGCAAAGCA AGCCGTTGAA 1500

CAGTTTTCGG GTGTAGGGGT TGTACAGTAG 1530

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 509 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus sp.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

Met Met Lys Met Arg Lys Ala Leu Ser Val Leu Val Ile Phe Gly Leu
1 5 10 15

Phe Val Ser Phe Phe Ser Phe Gly His Gln Gly Ala Glu Ala Ala Ser
20 25 30

Phe Gln Ser Asn Lys Asn Tyr His Leu Val Asn Val Asn Ser Gly Lys
35 40 45

Tyr Leu Glu Val Gly Ala Ala Ser Thr Glu Asn Gly Ala Asn Val Gln
50 55 60

Gln Trp Glu Asn Thr Asn Cys His Cys Gln Gln Trp Arg Leu Val Gln
65 70 75 80

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

Leu Asp Val Phe Glu Arg Ser Ser Ala Asp Gly Ala Asn Ile Val Gln
100 105 110

Trp Asp Ser Asn Gly Arg Ser Asn Gln Gln Trp Thr Ile Gln Gln Val
115 120 125

Gly Ser Ser Tyr Lys Ile Val Ser Arg His Ser Gly Lys Ala Leu Glu
130 135 140

Val Phe Asn His Ser Asn Gln Asn Gly Ala Asn Val Val Gln Trp Gln
145 150 155 160

Asp Phe Gly Asn Pro Asn Gln Leu Trp Asn Ile Val Glu Val Gly Ser
165 170 175

Gly Gln Ala His Asp Phe Ser Lys Pro Leu Gly Tyr Ala Ser Met Asn
180 185 190

Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gln Gly Gly Arg Val Glu Tyr Ala Ser Thr
195 200 205

Gly Ser Gln Leu Gln Lys Leu Ile Asp Asp Arg Ser Arg Ser Asn Asn
210 215 220

Pro Asn Gln Pro Leu Thr Ile Tyr Val Thr Gly Lys Ile Thr Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Ser Asp Asp Lys Ile Glu Val Lys Asn His Arg Gly Gln Ala
245 250 255

His Glu Ile Arg Asn Leu Ser Ile Ile Gly Gln Gly Thr Arg Gly Glu
260 265 270

Phe Asp Gly Ile Gly Leu Arg Leu Ile Asn Ala His Asn Val Ile Val
275 280 285

Arg Asn Leu Ser Ile His His Val Arg Ala Gly Ser Gly Glu Gly Thr
290 295 300

Ser Ile Glu Val Thr Gln Gly Ser Lys Asn Ile Trp Ile Asp His Asn
305 310 315 320

Glu Phe Tyr Ser Gln Leu Asp Gly Asn Asn Asn Pro Asp Leu Tyr Asp
325 330 335

Gly Leu Val Asp Ile Lys Arg Asn Ser Glu Tyr Ile Thr Val Ser Trp
340 345 350

Asn Lys Phe Glu Asn His Trp Lys Thr Met Leu Val Gly His Thr Asp
355 360 365

Asn Ala Ser Leu Ala Pro Asp Lys Val Thr Tyr His His Asn Phe Phe
370 375 380

His Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro Leu Ile Arg Phe Ala Asp Val His
385 390 395 400

Met Val Asn Asn Tyr Phe Lys Asp Ile Lys Asp Thr Ala Ile Asn Ser
405 410 415

Arg Met Gly Ala Arg Val Phe Val Glu Asn Asn Tyr Phe Glu Asn Val
420 425 430

Gly Ser Gly Gln Gln Asp Pro Thr Thr Arg Gln Ile Lys Thr Ala Val
435 440 445

Gly Trp Phe Tyr Gly Ser Ser Ser Thr Gly Tyr Trp Asn Leu Arg Gly
450 455 460

Asn Gln Phe Ile Asn Thr Pro Ser Ser His Leu Ser Ser Thr Thr Asn
465 470 475 480

Phe Thr Pro Pro Tyr Gln Phe Asn Ala Gln Ser Ala Gln Asp Ala Lys
485 490 495

Gln Ala Val Glu Gln Phe Ser Gly Val Gly Val Val Gln
500 505

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1047 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus sp.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

ATGGACAAAC TTTATATTGA AAAAGGAAGT GAGAGTATGA TGAGATCAAG CATCGTCAAA 60
CTAGTTGCTT TCAGTATTGT GTTTATGTTA TGGCTCGGTG TATCCTTTCA AACGGCAGAA 120
GCGAATACGC CAAATTTCAA CTTACAAGGC TTTGCCACGT TAAATGGGGG AACAACTGGT 180
GGCGCTGGTG GAGATGTAGT GACGGTTCGT ACAGGGAATG AGTTAATAAA CGCTTTGAAG 240
TCCAAAAACC CTAATCGGCC GTTAACAATT TATGTTAACG GTACGATAAC GCCTAATAAT 300
ACGTCTGATA GTAAGATCGA CATTAAGGAT GTTTCCAATG TATCGATTTT AGGGGTTGGC 360
ACAAATGGCC GATTAAACGG GATCGGTATT AAAGTATGGC GAGCGAATAA TATCATTATT 420
CGAAACTTGA CAATCCATGA AGTCCATACA GGTGATAAAG ATGCGATTAG CATGATTAGC 480
ATTGAAGGAC CATCTCGAAA CATTTGGGTT GACCATAACG AGCTTTATGC CAGCTTGAAT 540
GTTCATAAAG ATCACTATGA CGGCTTGTTT GACGTAAAGC GCGATGCTTA CAATATTACC 600
TTCTCTTGGA ATTATGTCCA TGATGGCTGG AAAGCGATGC TCATGGGGAA TTCCGATAGT 660
GATAATTATG ACCGAAACAT AACATTCCAC CATAACTACT TCAAAAACTT AAACTCTCGT 720
GTACCTGCGT ACCGTTTTGG AAAGGCGCAC TTGTTTAGCA ATTACTTTGA GAACATTTTA 780
GAAACAGGCA TCAATTCACG GATGGGAGCG GAAATGCTCG TTGAACATAA CGTTTTTGAG 840
AATGCCACCA ACCCGCTAGG ATTCTGGCAT AGCAGTCGAA CAGGTTATTG GAATGTAGCC 900
AATAACCGCT ATATCAATAG CACGGGCAGC ATGCCGACCA CTTCCACGAC CAATTATCGA 960
CCTCCTTACC CCTATACGGT CACACCTGTT GGTGATGTGA AATCAGTTGT CACACGTTAT 1020
GCGGGAGTTG GTGTCATCCA ACCGTAA 1047

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 348 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus sp.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

Met Asp Lys Leu Tyr Ile Glu Lys Gly Ser Glu Ser Met Met Arg Ser
1 5 10 15

```
Ser Ile Val Lys Leu Val Ala Phe Ser Ile Val Phe Met Leu Trp Leu
            20                  25                  30

Gly Val Ser Phe Gln Thr Ala Glu Ala Asn Thr Pro Asn Phe Asn Leu
        35                  40                  45

Gln Gly Phe Ala Thr Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Gly
    50                  55                  60

Asp Val Val Thr Val Arg Thr Gly Asn Glu Leu Ile Asn Ala Leu Lys
65                  70                  75                  80

Ser Lys Asn Pro Asn Arg Pro Leu Thr Ile Tyr Val Asn Gly Thr Ile
                85                  90                  95

Thr Pro Asn Asn Thr Ser Asp Ser Lys Ile Asp Ile Lys Asp Val Ser
            100                 105                 110

Asn Val Ser Ile Leu Gly Val Gly Thr Asn Gly Arg Leu Asn Gly Ile
        115                 120                 125

Gly Ile Lys Val Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu Thr
    130                 135                 140

Ile His Glu Val His Thr Gly Asp Lys Asp Ala Ile Ser Met Ile Ser
145                 150                 155                 160

Ile Glu Gly Pro Ser Arg Asn Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr
                165                 170                 175

Ala Ser Leu Asn Val His Lys Asp His Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val
            180                 185                 190

Lys Arg Asp Ala Tyr Asn Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp
        195                 200                 205

Gly Trp Lys Ala Met Leu Met Gly Asn Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asp
    210                 215                 220

Arg Asn Ile Thr Phe His His Asn Tyr Phe Lys Asn Leu Asn Ser Arg
225                 230                 235                 240

Val Pro Ala Tyr Arg Phe Gly Lys Ala His Leu Phe Ser Asn Tyr Phe
                245                 250                 255

Glu Asn Ile Leu Glu Thr Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala Glu Met
            260                 265                 270

Leu Val Glu His Asn Val Phe Glu Asn Ala Thr Asn Pro Leu Gly Phe
        275                 280                 285

Trp His Ser Ser Arg Thr Gly Tyr Trp Asn Val Ala Asn Asn Arg Tyr
    290                 295                 300

Ile Asn Ser Thr Gly Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Thr Asn Tyr Arg
305                 310                 315                 320

Pro Pro Tyr Pro Tyr Thr Val Thr Pro Val Gly Asp Val Lys Ser Val
                325                 330                 335

Val Thr Arg Tyr Ala Gly Val Gly Val Ile Gln Pro
            340                 345
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1008 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus sp.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

ATGAGAAAAC TCTTATCGAT GATGACTGCG CTTGTACTCA TGTTTGGAAT CATGGTTGTA 60

CCTTCTATAG CCAAAGGTGA AAGCGATTCC ACTATGAATG CTGATTTTTC CATGCAAGGT 120

TTTGCGACAC TTAATGGCGG AACCACAGGA GGAGCCGGCG GGCAAACCGT AACCGTTTCT 180

ACCGGAGACG AACTGCTGGC GGCCTTGAAG AACAAAAACA GCAATACACC CCTGACGATT 240

TATGTAAACG GTACCATAAC GCCATCAAAT ACGTCCGCAA GCAAAATTGA TATTAAAGAC 300

GTAAACGATG TTTCGATCTT AGGTGTTGGC ACTCAAGGCG AATTTAACGG CATTGGCATT 360

AAAGTATGGC GAGCCAATAA CATTATTCTC CGCAACTTGA AAATACATCA CGTCAATACA 420

GGCGACAAAG ATGCCATTAG CATTGAAGGA CCATCCAAAA ACATATGGGT TGACCACAAT 480

GAGCTCTACA ATAGTCTTGA TGTCCATAAG GATTACTACG ATGGTCTTTT TGATGTCAAA 540

CGGGACGCGG ATTACATTAC ATTCTCGTGG AATTATGTTC ATGATAGCTG GAAGAGCATG 600

CTGATGGGAT CTTCTGATTC CGATTCGTAC AACCGAAAAA TCACATTCCA CAATAACTAC 660

TTTGAAAACC TCAATTCACG TGTACCTTCC ATACGCTTTG GCGAAGCCCA CATCTTCAGC 720

AACTACTACA ATGGCATTAA TGAAACCGGC ATCAACTCCC GCATGGGGGC AAAAGTGCGC 780

ATCGAGGAAA ATCTATTTGA ACGCGCAAAC AACCCGATCG TCAGTCGCGA CAGTCGCCAA 840

GTCGGGTATT GGCACTTGAT AAACAATCAC TTTACTCAAT CAACGGGCGA AATTCCAACG 900

ACTTCAACAA TCACATATAA CCCACCTTAT TCCTATCAAG CTACTCCGGT TGGCCAAGTA 960

AAAGATGTGG TTCGTGCGAA TGCTGGTGTT GGCAAAGTAA CACCTTAA 1008

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 335 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Bacillus sp.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

Met Arg Lys Leu Leu Ser Met Met Thr Ala Leu Val Leu Met Phe Gly
1 5 10 15

Ile Met Val Val Pro Ser Ile Ala Lys Gly Glu Ser Asp Ser Thr Met
20 25 30

Asn Ala Asp Phe Ser Met Gln Gly Phe Ala Thr Leu Asn Gly Gly Thr
35 40 45

Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gln Thr Val Thr Val Ser Thr Gly Asp Glu
50 55 60

Leu Leu Ala Ala Leu Lys Asn Lys Asn Ser Asn Thr Pro Leu Thr Ile
65 70 75 80

Tyr Val Asn Gly Thr Ile Thr Pro Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile
85 90 95

Asp Ile Lys Asp Val Asn Asp Val Ser Ile Leu Gly Val Gly Thr Gln
100 105 110

Gly Glu Phe Asn Gly Ile Gly Ile Lys Val Trp Arg Ala Asn Asn Ile
115 120 125

Ile Leu Arg Asn Leu Lys Ile His His Val Asn Thr Gly Asp Lys Asp
130 135 140

Ala Ile Ser Ile Glu Gly Pro Ser Lys Asn Ile Trp Val Asp His Asn
145 150 155 160

Glu Leu Tyr Asn Ser Leu Asp Val His Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu
165 170 175

Phe Asp Val Lys Arg Asp Ala Asp Tyr Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr
180 185 190

Val His Asp Ser Trp Lys Ser Met Leu Met Gly Ser Ser Asp Ser Asp
195 200 205

Ser Tyr Asn Arg Lys Ile Thr Phe His Asn Asn Tyr Phe Glu Asn Leu
210 215 220

Asn Ser Arg Val Pro Ser Ile Arg Phe Gly Glu Ala His Ile Phe Ser
225 230 235 240

Asn Tyr Tyr Asn Gly Ile Asn Glu Thr Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly
245 250 255

Ala Lys Val Arg Ile Glu Glu Asn Leu Phe Glu Arg Ala Asn Asn Pro
260 265 270

Ile Val Ser Arg Asp Ser Arg Gln Val Gly Tyr Trp His Leu Ile Asn
275 280 285

Asn His Phe Thr Gln Ser Thr Gly Glu Ile Pro Thr Thr Ser Thr Ile
290 295 300

Thr Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Tyr Gln Ala Thr Pro Val Gly Gln Val
305 310 315 320

Lys Asp Val Val Arg Ala Asn Ala Gly Val Gly Lys Val Thr Gly
325 330 335

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1482 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

GCTTCTGCCT TAAACTCGGG CAAAGTAAAT CCGCTTGCCG ACTTCAGCTT AAAAGGCTTT 60

GCCGCACTAA ACGGCGGAAC AACGGGCGGA GAAGGCGGTC AGACGGTAAC CGTAACAACG 120

GGAGATCAGC TGATTGCGGC ATTAAAAAAT AAGAATGCAA ATACGCCTTT AAAAATTTAT 180

GTCAACGGCA CCATTACAAC ATCAAATACA TCCGCATCAA AGATTGACGT CAAAGACGTG 240

TCAAACGTAT CGATTGTCGG ATCAGGGACC AAAGGGGAAC TCAAAGGGAT CGGCATCAAA 300

ATATGGCGGG CCAACAACAT CATCATCCGC AACTTGAAAA TTCACGAGGT CGCCTCAGGC 360

GATAAAGACG CGATCGGCAT TGAAGGCCCT TCTAAAAACA TTTGGGTTGA TCATAATGAG 420

CTTTACCACA GCCTGAACGT TGACAAAGAT TACTATGACG GATTATTTGA CGTCAAAAGA 480

GATGCGGAAT ATATTACATT CTCTTGGAAC TATGTGCACG ATGGATGGAA ATCAATGCTG 540

ATGGGTTCAT CGGACAGCGA TAATTACAAC AGGACGATTA CATTCCATCA TAACTGGTTT 600

GAGAATCTGA ATTCGCGTGT GCCGTCATTC CGTTTCGGAG AAGGCCATAT TTACAACAAC 660

TATTTCAATA AAATCATCGA CAGCGGAATT AATTCGAGGA TGGGCGCGCG CATCAGAATT 720

GAGAACAACC TCTTTGAAAA CGCCAAAGAT CCGATTGTCT CTTGGTACAG CAGTTCACCG 780

GGCTATTGGC ATGTATCCAA CAACAAATTT GTAAACTCTA GGGGCAGTAT GCCGACTACC 840

TCTACTACAA CCTATAATCC GCCATACAGC TACTCACTCG ACAATGTCGA CAATGTAAAA 900

TCAATCGTCA AGCAAAATGC CGGAGTCGGC AAAATCCAGC GCAGACCGCC AACACCGACC 960

CCGACTTCAC CGCCAAGCGC AAATACACCG GTATCAGGCA ATTTGAAGGT TGAATTCTAC 1020

AACAGCAATC CTTCAGATAC TACTAACTCA ATCAATCCTC AGTTCAAGGT TACTAATACC 1080

GGAAGCAGTG CAATTGATTT GTCCAAACTC ACATTGAGAT ATTATTATAC AGTAGACGGA 1140

CAGAAAGATC AGACCTTCTG GTGTGACCAT GCTGCAATAA TCGGCAGTAA CGGCAGCTAC 1200

AACGGAATTA CTTCAAATGT AAAAGGAACA TTTGTAAAAA TGAGTTCCTC AACAAATAAC 1260

GCAGACACCT ACCTTGAAAT AAGCTTTACA GGCGGAACTC TTGAACCGGG TGCACATGTT 1320

CAGATACAAG GTAGATTTGC AAAGAATGAC TGGAGTAACT ATACACAGTC AAATGACTAC 1380

TCATTCAAGT CTCGTTCACA GTTTGTTGAA TGGGATCAGG TAACAGCATA CTTGAACGGT 1440

GTTCTTGTAT GGGGTAAAGA ACCCGGTGGC AGTGTAGTAT AG 1482

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 493 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

Ala Ser Ala Leu Asn Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser
1 5 10 15

Leu Lys Gly Phe Ala Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Glu Gly
20 25 30

```
Gly Gln Thr Val Thr Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu Ile Ala Ala Leu
        35                  40                  45

Lys Asn Lys Asn Ala Asn Thr Pro Leu Lys Ile Tyr Val Asn Gly Thr
    50                  55                  60

Ile Thr Thr Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp Val Lys Asp Val
65                  70                  75                  80

Ser Asn Val Ser Ile Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly Glu Leu Lys Gly
                85                  90                  95

Ile Gly Ile Lys Ile Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu
            100                 105                 110

Lys Ile His Glu Val Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala Ile Gly Ile Glu
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Lys Asn Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr His Ser
    130                 135                 140

Leu Asn Val Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val Lys Arg
145                 150                 155                 160

Asp Ala Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp Gly Trp
                165                 170                 175

Lys Ser Met Leu Met Gly Ser Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Thr
            180                 185                 190

Ile Thr Phe His His Asn Trp Phe Glu Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro
        195                 200                 205

Ser Phe Arg Phe Gly Glu Gly His Ile Tyr Asn Asn Tyr Phe Asn Lys
    210                 215                 220

Ile Ile Asp Ser Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala Arg Ile Arg Ile
225                 230                 235                 240

Glu Asn Asn Leu Phe Glu Asn Ala Lys Asp Pro Ile Val Ser Trp Tyr
                245                 250                 255

Ser Ser Ser Pro Gly Tyr Trp His Val Ser Asn Asn Lys Phe Val Asn
            260                 265                 270

Ser Arg Gly Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Thr Thr Tyr Asn Pro Pro
        275                 280                 285

Tyr Ser Tyr Ser Leu Asp Asn Val Asp Asn Val Lys Ser Ile Val Lys
    290                 295                 300

Gln Asn Ala Gly Val Gly Lys Ile Gln Arg Arg Pro Pro Thr Pro Thr
305                 310                 315                 320

Pro Thr Ser Pro Pro Ser Ala Asn Thr Pro Val Ser Gly Asn Leu Lys
                325                 330                 335

Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Pro Ser Asp Thr Thr Asn Ser Ile Asn
            340                 345                 350

Pro Gln Phe Lys Val Thr Asn Thr Gly Ser Ser Ala Ile Asp Leu Ser
        355                 360                 365

Lys Leu Thr Leu Arg Tyr Tyr Tyr Thr Val Asp Gly Gln Lys Asp Gln
    370                 375                 380

Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Ala Ile Ile Gly Ser Asn Gly Ser Tyr
385                 390                 395                 400

Asn Gly Ile Thr Ser Asn Val Lys Gly Thr Phe Val Lys Met Ser Ser
```

405 410 415

Ser Thr Asn Asn Ala Asp Thr Tyr Leu Glu Ile Ser Phe Thr Gly Gly
420 425 430

Thr Leu Glu Pro Gly Ala His Val Gln Ile Gln Gly Arg Phe Ala Lys
435 440 445

Asn Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Lys Ser
450 455 460

Arg Ser Gln Phe Val Glu Trp Asp Gln Val Thr Ala Tyr Leu Asn Gly
465 470 475 480

Val Leu Val Trp Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Val Val
485 490

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1506 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: rRNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

GACGAACGCU GGCGGCGUGC CUAAUACAUG CAAGUCGAGC GGAUUGAAGG GAGCUUGCUC 60

CCGGAUAUUA GCGGCGGACG GGUGAGUAAC ACGUGGGCAA CCUGCCCUUU AGACUGGGAU 120

AACUCCGGGA AACCGGUGCU AAUACCGGAU AACACUUUGA ACCUCCUGGU UCGAAGUUGA 180

AAGAUGGCCU UCGUGCUAUC ACUAAAGGAU GGGCCCGCGG CGCAUUAGCU AGUUGGUAAG 240

GUAAUGGCUU ACCAAGGCAA CGAUGCGUAG CCGACCUGAG AGGGUGAUCG GCCACACUGG 300

GACUGAGACA CGGCCCAGAC UCCUACGGGA GGCAGCAGUA GGGAAUCUUC CGCAAUGGAC 360

GAAAGUCUGA CGGAGCAACG CCGCGUGAGU GAGGAAGGCC UUCGGGUCGU AAAGCUCUGU 420

UGUGAGGGAA GAACAAGUAU CGGUUGAAUA AGCCGGUACC UUGACGGUAC CUCACCAGAA 480

AGCCACGGCU AACUACGUGC CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG 540

AAUUAUUGGG CGUAAAGCGC GCGCAGGCGG CUUCUUAAGU CUGAUGUGAA AUCUCGGGGC 600

UCAACCCCGA GCGGCCAUUG GAAACUGGGG AGCUUGAGUG CAGAAGAGGA GAGUGGAAUU 660

CCACGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUG UGGAGGAACA CCAGUGGCGA AGGCGACUCU 720

CUGGUCUGUA ACUGACGCUG AGGCGCGAAA GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU 780

GGUAGUCCAC GCCGUAAACG AUGAGUGCUA GGUGUUAGGG GUUUCGAUGC CCGUAGUGCC 840

GAAGUAAACA CAUUAAGCAC UCCGCCUGGG GAGUACGACC GCAAGGUUGA AACUCAAAGG 900

AAUUGACGGG GACCCGCACA AGCAGUGGAG CAUGUGGUUU AAUUCGAAGC AACGCGAAGA 960

ACCUUACCAG GUCUUGACAU CCUUUGACCA CUCUGGAGAC AGAGCUUCCC CUUCGGGGGC 1020

AAAGUGACAG GUGGUGCAUG GUUGUCGUCA GCUCGUGUCG UGAGAUGUUG GGUUAAGUCC 1080

CGCAACGAGC GCAACCCUUG AUCUUAGUUG CCAGCAUUUA GUUGGGCACU CUAAGGUGAC 1140

UGCCGGUGAC AAACCGGAGG AAGGUGGGGA CGACGUCAAA UCAUCAUGCC CCUUAUGACC 1200

UGGGCUACAC ACGUGCUACA AUGGAUGGUA CAAAGGGUUG CGAAGCCGCG AGGUGAAGCC 1260

AAUCCCAUAA AGCCAUUCUC AGUUCGGAUU GCAGGCUGCA ACUCGCCUGC AUGAAGCCGG 1320

AAUUGCUAGU AAUCGCGGAU CAGCAUGCCG CGGUGAAUAC GUUCCCGGGU CUUGUACACA 1380

CCGCCCGUCA CACCACGAGA GUUUGUAACA CCCGAAGUCG GUGAGGUAAC CUUUUGGAGC 1440

CAGCCGCCUA AGGUGGGACA AAUGAUUGGG GUGAAGUCGU AACAAGGUAG CCGUAUCGGA 1500

AGGUGC 1506

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1508 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: rRNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

GACGAACGCU GGCGGCGUGC CUAAUACAUG CAAGUCGAGC GGACAUUUAG GAGCUUGCUC 60

CUAAAUGUUA GCGGCGGACG GGUGAGUAAC ACGUGGGCAA CCUGCCCUGU AGACUGGGAU 120

AACAUCGAGA AAUCGGUGCU AAUACCGGAU AAUCUUGAGG AUUGCAUAAU CCUCUUGUAA 180

AAGAUGGCUC CGGCUAUCAC UACGGGAUGG GCCCGCGGCG CAUUAGCUAG UUGGUAAGGU 240

AACGGCUUAC CAAGGCGACG AUGCGUAGCC GACCUGAGAG GGUGAUCGGC CACACUGGGA 300

CUGAGACACG GCCCAGACUC CUACGGGAGG CAGCAGUAGG GAAUCUUCCG CAAUGGACGA 360

AAGUCUGACG GAGCAACGCC GCGUGAGUGA UGAAGGGUUU CGGCUCGUAA AGCUCUGUUG 420

UUAGGGAAGA ACAAGUGCCG UUCAAAUAGG GCGGCACCUU GACGGUACCU AACCAGAAAG 480

CCACGGCUAA CUACGUGCCA GCAGCCGCGG UAAUACGUAG GUGGCAAGCG UUGUCCGGAA 540

UUAUUGGGCG UAAAGCGCGC GCAGGCGGUC UUUUAAGUCU GAUGUGAAAU CUCGGGGCUC 600

AACCCCGAGC GGUCAUUGGA AACUGGGAGA CUUGAGUACA GAAGAGGAGA GUGGAAUUCC 660

ACGUGUAGCG GUGAAAUGCG UAGAUAUGUG GAGGAACACC AGUGGCGAAG GCGACUCUCU 720

GGUCUGUAAC UGACGCUGAG GCGCGAAAGC GUGGGGAGCA AACAGGAUUA GAUACCCUGG 780

UAGUCCACGC CGUAAACGAU GAGUGCUAGG UGUUAGGGGU UUCGAUGCCC UUAGUGCCGA 840

AGUUAACACA UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGACCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGGAA 900

UUGACGGGGG CCCGCACAAG CAGUGGAGCA UGUGGUUUAA UUCGAAGCAA CGCGAAGAAC 960

CUUACCAGGU CUUGACAUCC UUAUGACCUC CCUAGAGAUA GGGAUUUCCC UUCGGGGACA 1020

UAAGUGACAG GUGGUGCAUG GUUGUCGUCA GCUCGUGUCG UGAGAUGUUG GGUUAAGUCC 1080

CGCAACGAGC GCAACCCUUG AUCUUAGUUG CCAGCAUUUA GUUGGGCACU CUAAGGUGAC 1140

UGCCGGUGAU AAACCGGAGG AAGGUGGGGA UGACGUCAAA UCAUCAUGCC CCUUAUGACC 1200

UGGGCUACAC ACGUGCUACA AUGGAUGGUA CAAAGAGCAG CAAAACCGCG AGGUCGAGCC 1260

AAUCUCAUAA AGCCAUUCUC AGUUCGGAUU GUAGGCUGCA ACUCGCCUAC AUGAAGCCGG 1320

AAUUGCUAGU AAUCGCGGAU CAGCAUGCCG CGGUGAAUAC GUUCCCGGGC CUUGUACACA 1380

CCGCCCGUCA CACCACGAGA GUUUGUAACA CCCGAAGUCG GUGGAGUAAC CCUUACGGGA 1440

GCUAGCCGCC UAAGGUGGGA CAGAUGAUUG GGGUGAAGUC GUAACAAGGU AGCCGUAUCG 1500

GAAGGUGC 1508

【図１】

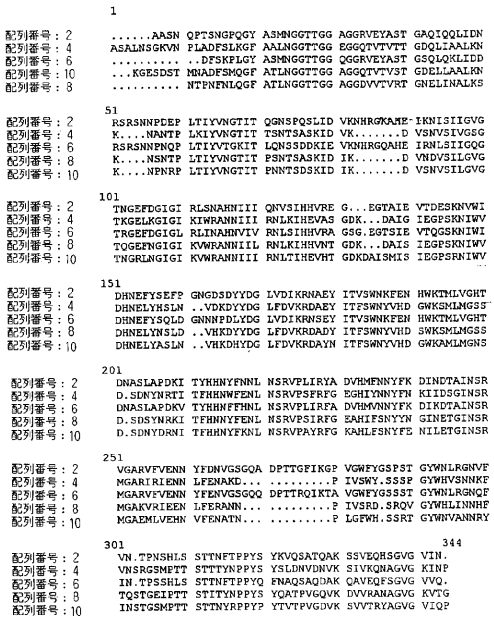


Fig. 1

【図２】

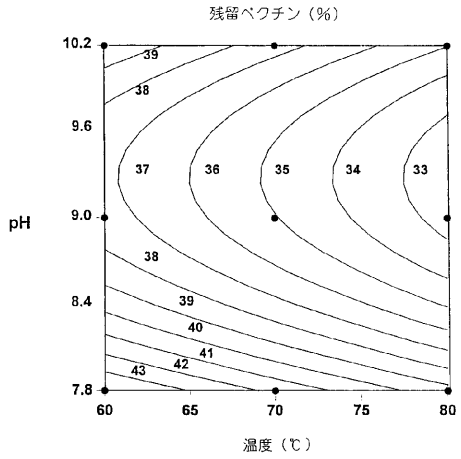


Fig. 2

【図３】

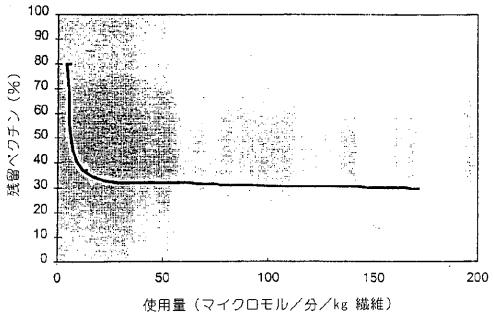


Fig. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	A
C11D	*3/386*	*(2006.01)*	C11D	3/386	
A23L	*2/84*	*(2006.01)*	A23L	2/34	
C12H	*1/12*	*(2006.01)*	C12H	1/12	

(31)優先権主張番号 09/073,684
(32)優先日 平成10年5月6日(1998.5.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 09/184,217
(32)優先日 平成10年11月2日(1998.11.2)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100108110
弁理士 日野 あけみ
(74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(72)発明者 アンデルセン, レネ ノンボエ
デンマーク国, デーコー－３４５０ アレレズ, ラクセバイ １１
(72)発明者 シュレイン, マルティン
デンマーク国, デーコー－２１００ コペンハーゲン エー, ビーデベルツガデ ５１
(72)発明者 ランゲ, ニールズ エリック クレブス
アメリカ合衆国, ノースカロライナ ２７６１５, ローリー, ストーンクリフ ドライブ ７２１２, アパートメント ５
(72)発明者 ビョーンバド, マッズ エスケルント
デンマーク国, デーコー－１９５５ フレデリクスベルウ ３テーホー, ドクトル アビルトガールズ アレ ８
(72)発明者 メラール, セーレン
デンマーク国, デーコー－２８４０ ホルテ, ベド フレセーン ９
(72)発明者 グラド, サンネ オー. シュレーダー
デンマーク国, デーコー－２７５０ バーレルップ, ビゴ バルフェズ アレ ５９
(72)発明者 カウピネン, マルクス サカリ
デンマーク国, デーコー－２２００ コペンハーゲン エン ５, エゲガーデ １０
(72)発明者 シュノール, キルク
デンマーク国, デーコー－２２００ コペンハーゲン エン, １. テーベー. , ネーレブロガーデ ４４アー
(72)発明者 コンスベーク, ラルス
デンマーク国, デーコー－２８４０ ホルテ, バーンゲスティン ２４アー

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 特開昭６０－１４１２８９（ＪＰ, Ａ）
特表２００１－５２４３１０（ＪＰ, Ａ）
Agric.Biol.Chem, １９９１年, 55(1), 25-30

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 9/00-9/99
C12N 15/00-15/90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed