

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-6131

(P2017-6131A)

(43) 公開日 平成29年1月12日(2017.1.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B 0 3 0
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	2 B 1 5 0
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B 0 1 8
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
審査請求 有 請求項の数 39 O L (全 195 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-139166 (P2016-139166)	(71) 出願人	508268621
(22) 出願日	平成28年7月14日 (2016.7.14)		ビーエーエスエフ エンザイムズ エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2015-40690 (P2015-40690) の分割		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州, サンディエゴ, ジョン ホブキンズ コート 3 5 5 0
原出願日	平成16年3月8日 (2004.3.8)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	10/385, 305		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成15年3月6日 (2003.3.6)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	60/459, 014	(74) 代理人	100122389
(32) 優先日	平成15年3月28日 (2003.3.28)		弁理士 新井 栄一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アミラーゼ、それをコードする核酸並びにその製造および使用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 アミラーゼ活性を有するポリペプチド、前記ポリペプチドをコードする核酸、並びに前記核酸及びポリペプチドを製造及び使用する方法を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を有し、アミラーゼ活性を有するポリペプチドまたは前記ポリペプチドをコードする核酸を含む形質転換細胞、非ヒトトランスジェニック動物、トランスジェニック植物またはトランスジェニック種子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号:1; 配列番号:3; 配列番号:5; 配列番号:9; 配列番号:11; 配列番号:13; 配列番号:15; 配列番号:17; 配列番号:19; 配列番号:21; 配列番号:23; 配列番号:25; 配列番号:27; 配列番号:29; 配列番号:31; 配列番号:33; 配列番号:35; 配列番号:37; 配列番号:39; 配列番号:41; 配列番号:43; 配列番号:45; 配列番号:47; 配列番号:49; 配列番号:51; 配列番号:53; 配列番号:55; 配列番号:57; 配列番号:59; 配列番号:61; 配列番号:63; 配列番号:65; 配列番号:67; 配列番号:69; 配列番号:71; 配列番号:73; 配列番号:75; 配列番号:77; 配列番号:79; 配列番号:81; 配列番号:83; 配列番号:85; 配列番号:87; 配列番号:89; 配列番号:91; 配列番号:93; 配列番号:95; 配列番号:97; 配列番号:99; 配列番号:101; 配列番号:103; 配列番号:105; 配列番号:107; 配列番号:109; 配列番号:111; 配列番号:113; 配列番号:115; 配列番号:117; 配列番号:119; 配列番号:121; 配列番号:123; 配列番号:125; 配列番号:127; 配列番号:129; 配列番号:131; 配列番号:133; 配列番号:135; 配列番号:137; 配列番号:139; 配列番号:141; 配列番号:143; 配列番号:145; 配列番号:147; 配列番号:149; 配列番号:151; 配列番号:153; 配列番号:155; 配列番号:157; 配列番号:159; 配列番号:161; 配列番号:163; 配列番号:165; 配列番号:167; 配列番号:189; 配列番号:191; 配列番号:193; 配列番号:203; 配列番号:205; 配列番号:207; 配列番号:209; 配列番号:211; 配列番号:322; 配列番号:324; 配列番号:326; 配列番号:328; 配列番号:330; 配列番号:332; 配列番号:334; 配列番号:336; 配列番号:338; 配列番号:340; 配列番号:342; 配列番号:344; 配列番号:346; 配列番号:348; 配列番号:350; 配列番号:352; 配列番号:354; 配列番号:356; 配列番号:358; 配列番号:360; 配列番号:362; 配列番号:364; 配列番号:366; 配列番号:368; 配列番号:370; 配列番号:372; 配列番号:374; 配列番号:376; 配列番号:378; 配列番号:380; 配列番号:382; 配列番号:384; 配列番号:386; 配列番号:388; 配列番号:390; 配列番号:392; 配列番号:394; 配列番号:396; 配列番号:398; 配列番号:400; 配列番号:402; 配列番号:404; 配列番号:406; 配列番号:408; 配列番号:410; 配列番号:412; 配列番号:414; 配列番号:416; 配列番号:418; 配列番号:420; 配列番号:422; 配列番号:424; 配列番号:426; 配列番号:428; 配列番号:430; 配列番号:432; 配列番号:434; 配列番号:436; 配列番号:438; 配列番号:440; 配列番号:442; 配列番号:444; 配列番号:446; 配列番号:448; 配列番号:450; 配列番号:452; 配列番号:454; 配列番号:456; 配列番号:458; 配列番号:460; 配列番号:462; 配列番号:465; 配列番号:467; 配列番号:473; 配列番号:475; 配列番号:478; 配列番号:480; 配列番号:484; 配列番号:486; 配列番号:492; 配列番号:494; 配列番号:498; 配列番号:500; 配列番号:509; 配列番号:511; 配列番号:515; 配列番号:517; 配列番号:519; 配列番号:522; 配列番号:524; 配列番号:527; 配列番号:529; 配列番号:532; 配列番号:534; 配列番号:539; 配列番号:541; 配列番号:544; 配列番号:546; 配列番号:552; 配列番号:554; 配列番号:558; 配列番号:560; 配列番号:565; 配列番号:567; 配列番号:569; 配列番号:571; 配列番号:573; 配列番号:575; 配列番号:577; 配列番号:579; 配列番号:581; 配列番号:583; 配列番号:585; 配列番号:587; 配列番号:603; 配列番号:605; 配列番号:607; 配列番号:609; 配列番号:611; 配列番号:613; 配列番号:615; 配列番号:619又は配列番号621に記載の配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高い、または完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む単離、合成または組換え核酸であって、アミラーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする、前記単離、合成又は組換え核酸;

(b) 配列番号:2; 配列番号:4; 配列番号:6; 配列番号:10; 配列番号:12; 配列番号:14; 配列番号:16; 配列番号:18; 配列番号:20; 配列番号:22; 配列番号:24; 配列番号:26; 配列番号:28; 配列番号:30; 配列番号:32; 配列番号:34; 配列番号:36; 配列番号:38; 配列番号:40; 配列番号:42; 配列番号:44; 配列番号:46; 配列番号:48; 配列番号:50; 配列番号:52; 配列番号:54; 配列番号:56; 配列番号:58; 配列番号:60; 配列番号:62; 配列番号:64; 配列番号:66; 配列番号:68; 配列番号:70; 配列番号:72; 配列番号:74; 配列番号:76; 配列番号:78; 配列番号:80; 配列番号:82; 配列番号:84; 配列番号:86; 配列番

号:88；配列番号:90；配列番号:92；配列番号:94；配列番号:96；配列番号:98；配列番号:100；配列番号:102；配列番号:104；配列番号:106；配列番号:108；配列番号:110；配列番号:112；配列番号:114；配列番号:116；配列番号:118；配列番号:120；配列番号:122；配列番号:124；配列番号:126；配列番号:128；配列番号:130；配列番号:132；配列番号:134；配列番号:136；配列番号:138；配列番号:140；配列番号:142；配列番号:144；配列番号:146；配列番号:148；配列番号:150；配列番号:152；配列番号:154；配列番号:156；配列番号:158；配列番号:160；配列番号:162；配列番号:164；配列番号:166；配列番号:168；配列番号:190；配列番号:192；配列番号:194；配列番号:204；配列番号:206；配列番号:208；配列番号:210；配列番号:212；配列番号:323；配列番号:325；配列番号:327；配列番号:329；配列番号:331；配列番号:333；配列番号:335；配列番号:337；配列番号:339；配列番号:341；配列番号:343；配列番号:345；配列番号:347；配列番号:349；配列番号:351；配列番号:353；配列番号:355；配列番号:357；配列番号:359；配列番号:361；配列番号:363；配列番号:365；配列番号:367；配列番号:369；配列番号:371；配列番号:373；配列番号:375；配列番号:377；配列番号:379；配列番号:381；配列番号:383；配列番号:385；配列番号:387；配列番号:389；配列番号:391；配列番号:393；配列番号:395；配列番号:397；配列番号:399；配列番号:401；配列番号:403；配列番号:405；配列番号:407；配列番号:409；配列番号:411；配列番号:413；配列番号:415；配列番号:417；配列番号:419；配列番号:421；配列番号:423；配列番号:425；配列番号:427；配列番号:429；配列番号:431；配列番号:433；配列番号:435；配列番号:437；配列番号:439；配列番号:441；配列番号:443；配列番号:445；配列番号:447；配列番号:449；配列番号:451；配列番号:453；配列番号:455；配列番号:457；配列番号:459；配列番号:461；配列番号:463；配列番号:464；配列番号:466；配列番号:468；配列番号:469；配列番号:470；配列番号:471；配列番号:472；配列番号:474；配列番号:476；配列番号:477；配列番号:479；配列番号:481；配列番号:482；配列番号:483；配列番号:485；配列番号:487；配列番号:488；配列番号:489；配列番号:490；配列番号:491；配列番号:493；配列番号:495；配列番号:496；配列番号:497；配列番号:499；配列番号:501；配列番号:502；配列番号:503；配列番号:504；配列番号:505；配列番号:506；配列番号:507；配列番号:508；配列番号:510；配列番号:512；配列番号:513；配列番号:514；配列番号:516；配列番号:518；配列番号:520；配列番号:521；配列番号:523；配列番号:525；配列番号:526；配列番号:528；配列番号:530；配列番号:531；配列番号:533；配列番号:535；配列番号:536；配列番号:537；配列番号:538；配列番号:540；配列番号:542；配列番号:543；配列番号:545；配列番号:547；配列番号:548；配列番号:549；配列番号:550；配列番号:551；配列番号:553；配列番号:555；配列番号:556；配列番号:557；配列番号:559；配列番号:561；配列番号:562；配列番号:563；配列番号:564；配列番号:566；配列番号:568；配列番号:570；配列番号:572；配列番号:574；配列番号:576；配列番号:578；配列番号:580；配列番号:582；配列番号:584；配列番号:586；配列番号:588；配列番号:589；配列番号:590；配列番号:591；配列番号:592；配列番号:604；配列番号:606；配列番号:608；配列番号:610；配列番号:612；配列番号:614；配列番号:616；配列番号:620又は配列番号:622に記載の配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高い、または完全な（100%）配列同一性を有する配列を有する、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離、合成又は組換え核酸；

10

20

30

40

（c）シグナル配列を欠くアミラーゼをコードする、（a）～（b）のいずれかに記載の単離、合成または組換え核酸；

（d）異種配列またはシグナル配列を有するアミラーゼをコードする、（a）～（c）のいずれかに記載の、単離、合成または組換え核酸；

（e）前記（a）～（d）のいずれかに記載の核酸の配列に完全に相補的な核酸配列を含む、単離、合成または組換え核酸。

【請求項2】

（a）請求項1記載の核酸の配列を含む発現カセット、ベクターまたはクローニングベヒクル；

50

(b) クローニングベヒクルがウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含む、(a) 記載の発現カセット、ベクターまたはクローニングベヒクル；または、

(c) ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター又はアデノ付随ウイルスベクターを含む、

または、前記発現カセット、ベクターまたはクローニングベヒクルが細菌の人工染色体 (BAC)、プラスミド、バクテリオファージ P1-由来ベクター (PAC)、酵母人工染色体 (YAC) または哺乳動物人工染色体 (MAC) を含む、(a) 記載の発現カセット、ベクターまたはクローニングベヒクル。

【請求項 3】

(a) 請求項 1 記載の核酸の配列を含む異種核酸を含む形質転換細胞または請求項 2 記載の発現カセット、ベクターまたはクローニングベヒクル、を含む形質転換細胞；または、

(b) 細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は植物細胞である、(a) 記載の形質転換細胞。

【請求項 4】

(a) 請求項 1 記載の核酸の配列または請求項 2 記載の発現カセット、ベクター若しくはクローニングベヒクル、または請求項 3 記載の形質転換細胞を含む非ヒトトランスジェニック動物、トランスジェニック植物またはトランスジェニック種子、

(b) マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、または、乳牛である、(a) に記載の非ヒトトランスジェニック動物、

(c) トウモロコシ、ソルガム、ジャガイモ、トマト、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、イネ、オオムギ、牧草又はタバコである、(a) に記載のトランスジェニック植物、または、

(d) トウモロコシ、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、ヤシ、ヒマワリ、ゴマ、イネ、オオムギ、落花生又はタバコの種子である、(a) に記載のトランスジェニック種子。

【請求項 5】

(a) 配列番号:2；配列番号:4；配列番号:6；配列番号:10；配列番号:12；配列番号:14；配列番号:16；配列番号:18；配列番号:20；配列番号:22；配列番号:24；配列番号:26；配列番号:28；配列番号:30；配列番号:32；配列番号:34；配列番号:36；配列番号:38；配列番号:40；配列番号:42；配列番号:44；配列番号:46；配列番号:48；配列番号:50；配列番号:52；配列番号:54；配列番号:56；配列番号:58；配列番号:60；配列番号:62；配列番号:64；配列番号:66；配列番号:68；配列番号:70；配列番号:72；配列番号:74；配列番号:76；配列番号:78；配列番号:80；配列番号:82；配列番号:84；配列番号:86；配列番号:88；配列番号:90；配列番号:92；配列番号:94；配列番号:96；配列番号:98；配列番号:100；配列番号:102；配列番号:104；配列番号:106；配列番号:108；配列番号:110；配列番号:112；配列番号:114；配列番号:116；配列番号:118；配列番号:120；配列番号:122；配列番号:124；配列番号:126；配列番号:128；配列番号:130；配列番号:132；配列番号:134；配列番号:136；配列番号:138；配列番号:140；配列番号:142；配列番号:144；配列番号:146；配列番号:148；配列番号:150；配列番号:152；配列番号:154；配列番号:156；配列番号:158；配列番号:160；配列番号:162；配列番号:164；配列番号:166；配列番号:168；配列番号:190；配列番号:192；配列番号:194；配列番号:204；配列番号:206；配列番号:208；配列番号:210；配列番号:212；配列番号:323；配列番号:325；配列番号:327；配列番号:329；配列番号:331；配列番号:333；配列番号:335；配列番号:337；配列番号:339；配列番号:341；配列番号:343；配列番号:345；配列番号:347；配列番号:349；配列番号:351；配列番号:353；配列番号:355；配列番号:357；配列番号:359；配列番号:361；配列番号:363；配列番号:365；配列番号:367；配列番号:369；配列番号:371；配列番号:373；配列番号:375；配列番号:377；配列番号:379；配列番号:381；配列番号:383；配列番号:385；配列番号:387；配列番号:389；配列番号:391；配列番号:393；配列番号:395；配列番号:3

10

20

30

40

50

- 97；配列番号:399；配列番号:401；配列番号:403；配列番号:405；配列番号:407；配列番号:409；配列番号:411；配列番号:413；配列番号:415；配列番号:417；配列番号:419；配列番号:421；配列番号:423；配列番号:425；配列番号:427；配列番号:429；配列番号:431；配列番号:433；配列番号:435；配列番号:437；配列番号:439；配列番号:441；配列番号:443；配列番号:445；配列番号:447；配列番号:449；配列番号:451；配列番号:453；配列番号:455；配列番号:457；配列番号:459；配列番号:461；配列番号:463；配列番号:464；配列番号:466；配列番号:468；配列番号:469；配列番号:470；配列番号:471；配列番号:472；配列番号:474；配列番号:476；配列番号:477；配列番号:479；配列番号:481；配列番号:482；配列番号:483；配列番号:485；配列番号:487；配列番号:488；配列番号:489；配列番号:490；配列番号:491；配列番号:493；配列番号:495；配列番号:496；配列番号:497；配列番号:499；配列番号:501；配列番号:502；配列番号:503；配列番号:504；配列番号:505；配列番号:506；配列番号:507；配列番号:508；配列番号:510；配列番号:512；配列番号:513；配列番号:514；配列番号:516；配列番号:518；配列番号:520；配列番号:521；配列番号:523；配列番号:525；配列番号:526；配列番号:528；配列番号:530；配列番号:531；配列番号:533；配列番号:535；配列番号:536；配列番号:537；配列番号:538；配列番号:540；配列番号:542；配列番号:543；配列番号:545；配列番号:547；配列番号:548；配列番号:549；配列番号:550；配列番号:551；配列番号:553；配列番号:555；配列番号:556；配列番号:557；配列番号:559；配列番号:561；配列番号:562；配列番号:563；配列番号:564；配列番号:566；配列番号:568；配列番号:570；配列番号:572；配列番号:574；配列番号:576；配列番号:578；配列番号:580；配列番号:582；配列番号:584；配列番号:586；配列番号:588；配列番号:589；配列番号:590；配列番号:591；配列番号:592；配列番号:604；配列番号:606；配列番号:608；配列番号:610；配列番号:612；配列番号:614；配列番号:616；配列番号:620又は配列番号:622に記載の配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高い、又は完全な（100%）配列同一性を有するアミノ酸配列又は(ii)請求項1記載の核酸によってコードされるアミノ酸配列、を含む、アミラーゼ活性を有する、単離、合成または組換えポリペプチド；
- (b) シグナル配列（シグナルペプチド）を欠く、(a) 記載のポリペプチド；
- (c) 更に異種配列またはシグナル配列を含む、(a) または (b) 記載のポリペプチド；
- (d) 更に多糖を含む、または、グリコシル化されているか、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む (a) ～ (c) のいずれかに記載のポリペプチド、または、
- (e) グリコシル化がN-結合グリコシル化である、または、P. パストリス (pastoris) 若しくはS. ポンベ (pombe) で発現された場合にグリコシル化される、(d) 記載のポリペプチド。
- 【請求項6】
- 請求項5記載のポリペプチドを含むタンパク質調製物であって、液体、固体又はゲルを含む前記タンパク質調製物。
- 【請求項7】
- 請求項5記載のポリペプチド及び第二のドメインを含む融合タンパク質であって、前記第二のドメインがエピトープ又はタグである、前記融合タンパク質。
- 【請求項8】
- (a) 請求項5記載のポリペプチドの配列を含む固定化ポリペプチド、または、
- (b) 細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレイまたはキャピラリー管に固定化されている、(a) 記載の固定化ポリペプチド。
- 【請求項9】
- (a) 請求項5記載のポリペプチドまたは請求項7記載の融合タンパク質を含む食品、飼料、栄養補助食品または飼料添加物、食品原料または食用酵素デリバリーマトリックス；
- (b) ポリペプチドがグリコシル化されている、(a) 記載の飼料、栄養補助食品また

は飼料添加物、食品原料または食用酵素デリバリーマトリックス；

(c) デリバリーマトリックスがペレットを含む、(a) 記載の飼料、栄養補助食品または飼料添加物、食品原料または食用酵素デリバリーマトリックス；または、

(d) (a)～(d) のいずれかに記載の食品、飼料、栄養補助食品または飼料添加物、食品原料または食用酵素デリバリーマトリックス。

【請求項 10】

(a) プロモーターに機能可能に連結された核酸を提供する工程であって、前記核酸が請求項 1 記載の核酸の配列を含む核酸である前記工程；および、

(b) 工程 (a) で提供される核酸をポリペプチドの発現を可能にする条件下で発現させ、それによって組換えポリペプチドを製造する工程、

を含む、組換えポリペプチドを製造する方法、または、

(c) さらに、宿主細胞を工程 (a) で提供される核酸で形質転換し、続いて工程 (a) で提供される核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組換えポリペプチドを製造することを含む、(a)～(b)で規定される組換えポリペプチドを製造する方法。

【請求項 11】

(a) 請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と前記ポリペプチドがデンプンを加水分解、液化または除去する条件下で接触させる工程、

を含む、デンプンを加水分解、液化または組成物からデンプンを除去する方法。

【請求項 12】

請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む洗剤組成物であって、非水性液体組成物、注型成形固体、顆粒形態、球状形態、圧縮錠剤、ゲル形態、ペースト又はスラリー形態として処方される、前記洗剤組成物。

【請求項 13】

以下の工程を含む対象物を洗浄する方法：

(a) 請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物を提供する工程；

(b) 対象物を提供する工程；及び、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の対象物と前記組成物が前記対象物を洗浄することができる条件下で接触させる工程。

【請求項 14】

(a) デンプンを含む飼料原料または食品原料または食品添加物または飼料添加物を提供する工程であって、前記デンプンは請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドによって加水分解することができる、前記工程；

(b) 工程 (a) のポリペプチドを前記飼料原料または食品原料または食品添加物または飼料添加物に、デンプンの加水分解及び処理された前記飼料原料または食品原料または食品添加物または飼料添加物の形成に十分な時間、十分な量で添加し、それによって動物による消費の前に前記飼料原料または食品原料または食品添加物または飼料添加物中のデンプンを加水分解する工程、

を含む、動物による消費に先立って飼料または食品または食品添加物または飼料添加物中のデンプンを加水分解する方法、または、

(c) 飼料または食品または食品添加物または飼料添加物がコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類又はジャガイモを含む、(a)～(b)で規定される方法。

【請求項 15】

請求項 5 記載のポリペプチドまたは請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含む食品添加物または飼料添加物または飼料または食品。

【請求項 16】

請求項 5 記載のポリペプチド、又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプ

10

20

30

40

50

チド、を含む組成物。

【請求項 17】

請求項 5 記載のポリペプチド、又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含む織物。

【請求項 18】

以下の工程を含む織物を処理または脱サイズする方法：

(a) 請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) 織物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の織物と前記ポリペプチドが前記織物を処理または脱サイズすることができる条件下で接触させる工程。

10

【請求項 19】

請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む紙若しくは紙製品又は紙パルプ。

【請求項 20】

(a) 請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) 紙、紙製品、紙パルプ又は繊維を含む組成物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と前記ポリペプチドが前記紙製品、紙パルプ又は繊維を処理することができる条件下で接触させる工程、を含む紙、紙製品、紙パルプ又は繊維を処理する方法、または、

20

(d) 紙製品、紙パルプ又は繊維を脱インクすることを含む、(a)～(c)で規定される方法。

【請求項 21】

(a) 請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) リグノセルロース原材料を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の原材料と前記ポリペプチドが前記原材料を処理してそれによって前記原材料の特性を改善することができる条件下で接触させる工程、

30

を含むリグノセルロース原材料を処理する方法、または、

(d) 原材料が繊維である、(a)～(c)で規定される方法。

【請求項 22】

請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む高マルトース又は高グルコース液若しくはシロップ。

【請求項 23】

(a) 請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と、前記ポリペプチドが前記組成物を加水分解することができる条件下で接触させ、それによって高マルトース又は高グルコースシロップを生成する工程、

40

を含む高マルトース又は高グルコースシロップを製造する方法、または、

(d) デンプンが、コメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類、ジャガイモ又はサツマイモに由来する、(a)～(c)で規定される方法。

【請求項 24】

(a) 請求項 5 に記載のポリペプチド又は請求項 1 に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) デンプンを含む産出流体を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の産出流体と前記ポリペプチドが工程 (b) の

50

産出流体中のデンプンを加水分解することができる条件下で接触させ、それによって前記産出流体の密度を低下させて前記産出流体の流れを改善する工程を含む、デンプン含有産出流体の流れを改善する方法、または、

(d) 産出流体が地下層に由来する、(a)～(c)で規定される方法。

【請求項 25】

以下の工程を含む醸造又はアルコール製造方法：

(a) 請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) デンプンを含み醸造又はアルコール製造に用いられる組成物を提供する工程；および、

(c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) の組成物と、前記ポリペプチドが醸造又はアルコール製造で用いられる組成物中のデンプンを加水分解することができる条件下で一緒にする工程。

【請求項 26】

請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むアルコール飲料。

【請求項 27】

請求項 5 記載のポリペプチド又は請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む徐放性又は制御放出医薬組成物又は口内手入れ製品。

【請求項 28】

組成物をラテックスポリマーコーティングによって被覆することを含む、組成物の徐放性又は制御放出のための方法であって、前記組成物または被覆が請求項 5 に記載のポリペプチドを含む、前記方法。

【請求項 29】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む油田掘削液。

【請求項 30】

(a) 請求項 5 記載のポリペプチドで組成物を処理することを含む、組成物の粘度を変化させる方法、または、

(b) 組成物が土壌を含む、(a) 記載の方法。

【請求項 31】

請求項 5 記載のポリペプチドを含む組成物で掘削泥を処理することを含む、掘削泥の除去を促進する方法。

【請求項 32】

請求項 5 記載のポリペプチドを含むバイオブリーチング溶液。

【請求項 33】

(a) 請求項 5 記載のポリペプチドで組成物を処理することを含む、組成物をバイオブリーチングする方法、または、

(b) 組成物が紙又はパルプ製品である、(a) に記載の方法。

【請求項 34】

以下の工程を含む、食品または飼料を製造する方法：

(a) 請求項 5 記載のポリペプチドまたは請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) 食品または飼料を含む組成物を提供する工程；

(c) 前記核酸を発現させて組換えポリペプチドを発現させる工程；

(d) 前記組換えポリペプチドと前記組成物を混合し、それによって前記組換えポリペプチドを含む食品または飼料を製造する工程。

【請求項 35】

(a) 請求項 5 記載のポリペプチドまたは請求項 1 記載の核酸によってコードされるポリペプチドの使用を含む焼成方法、または、

(b) 更にグルコアミラーゼ活性、 α -アミラーゼ活性または β -アミラーゼ活性を有す

10

20

30

40

50

る第2のポリペプチドまたは他の酵素の使用を含む、(a)記載の焼成方法。

【請求項36】

(a)請求項5記載のポリペプチドまたは請求項1記載の核酸によってコードされるポリペプチドの使用を含むトウモロコシの湿式製粉方法、または、

(b)更にグルコアミラーゼ活性、 α -アミラーゼ活性または β -アミラーゼ活性を有する第2のポリペプチドまたは他の酵素の使用を含む、(a)記載のトウモロコシの湿式製粉方法。

【請求項37】

(a)請求項5記載のポリペプチドまたは請求項1記載の核酸によってコードされるポリペプチドの使用を含む乾式製粉方法、または、

(b)更にグルコアミラーゼ活性、 α -アミラーゼ活性または β -アミラーゼ活性を有する第2のポリペプチドまたは他の酵素の使用を含む、(a)記載の乾式製粉方法。

【請求項38】

(a)請求項5記載のポリペプチドまたは請求項1記載の核酸によってコードされるポリペプチドの使用を含む掘削方法、または、

(b)更にグルコアミラーゼ活性、 α -アミラーゼ活性または β -アミラーゼ活性を有する第2のポリペプチドまたは他の酵素の使用を含む、(a)記載の掘削方法。

【請求項39】

(a)請求項5記載のポリペプチドまたは請求項1記載の核酸によってコードされるポリペプチドの使用を含むアルコール製造方法、

(b)更にグルコアミラーゼ活性、 α -アミラーゼ活性または β -アミラーゼ活性を有する第2のポリペプチドまたは他の酵素の使用を含む、(a)記載のアルコール製造方法、または、

(c)アルコールがエタノールである、(a)または(b)記載のアルコール製造方法

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は分子および細胞生物学並びに生化学に関する。特に本発明は、アミラーゼ酵素、前記酵素をコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドおよびポリペプチドの製造及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

デンプンは人間の食事ではしばしば見出される複雑な炭水化物である。デンプンの構造は、 α -1,4及び α -1,6グルコース結合によって連結されたグルコースポリマーである。アミラーゼは、デンプンから糖への加水分解を触媒する酵素である。アミラーゼは、デンプンの内部 α -1,4-グリコシド結合をほぼランダムに加水分解して、より小さな分子量のマルトデキストリンを生成する。デンプンの分解は消化系及び産業で重要である。アミラーゼは工業的価値が高く、デンプン加工の初期段階（液化）で、トウモロコシ湿式製粉で、アルコール製造で、洗剤マトリックス中の洗浄剤として、繊維工業におけるデンプンの脱サイズ(desizing)のために、製パンでの利用で、飲料工業で、油田での掘削工程で、リサイクル紙のインキングで、さらに動物飼料で用いられる。

アミラーゼは極めて多様な微生物（バチルス及びアスペルギルスを含む）によって産生され、工業的にもっとも重要なアミラーゼは、細菌〔例えばバチルス・リケニホルミス（*Bacillus licheniformis*）、バチルス・アミロリケファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）、バチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）、又はバチルス・ステアロテルモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）〕によって産生される。ここ数年、工業的に使用される酵素は、少なくとも中性及び弱アルカリ性pHにおけるその熱安定性及び性能のためにバチルス・リケニホルミスに由来するものであった。

【0003】

商業的には、グルコアミラーゼは、既に α -アミラーゼで部分的に分解されているコーンスターチをさらに加水分解するために用いられる。前記反応で生成されるグルコースは、続いてグルコースイソメラーゼ酵素によってグルコース及びフルクトースの混合物に変換することができる。この混合物（又はフルクトースに富む混合物）は、世界中で市販されている高フルクトースコーンシロップである。一般的に、デンプンからフルクトースへのプロセッシングは以下の4つの工程からなる：顆粒デンプンの液化、液化デンプンのデキストロースへの糖化、精製及びフルクトースへの異性化。デンプン液化工程の目的は、デンプンポリマー顆粒の濃縮懸濁液を低粘稠性で可溶性の短鎖デキストリンに変換するためである。

もっとも広く利用されるグルコアミラーゼは、真菌のアスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*) から産生される。この酵素の工業的使用に付随する問題の1つは、その比較的低い熱安定性である。他の多数の真菌のグルコアミラーゼ [リゾプス (*Rizopus*)、ティエラビア (*Thielavia*)、テルモアスクス (*Thermoascus*) 及びタラロミセス (*Talaromyces*) を含む] 及び好熱真菌のテルモミセス・ラヌギノズス (*Thermomyces lanuginosus*) 由来のグルコアミラーゼが報告されている。

一般的には、デンプンからフルクトースへのプロセッシングは以下の4つの工程からなる：顆粒デンプンの液化、液化デンプンのデキストロースへの糖化、精製及びフルクトースへの異性化。デンプン液化工程の目的は、デンプンポリマー顆粒の濃縮懸濁液を低粘稠性で可溶性の短鎖デキストリンに変換するためである。前記工程は、標準的装置の簡単な操作及びグルコースから他の糖類への効率的変換のために欠かせないものである。顆粒デンプンの液化のために、顆粒デンプンの温度を約72℃を超えて上昇させることによって前記顆粒をゼラチン化し水溶性のデンプン溶液を生成することが必要である。前記加熱工程は瞬間的に不溶性デンプン顆粒を破壊し、水溶性デンプン溶液を生じる。続いて可溶性デンプン溶液はアミラーゼによって液化される。デンプン顆粒は以下を含む：69–74%のアミロペクチン、26–31%のアミロース、11–14%の水、0.2–0.4%のタンパク質、0.5–0.9%の脂質、0.05–0.1%の灰分、0.02–0.03%のリン、0.1%のペントサン。顆粒の約70%が非晶質で30%が結晶質である。

【0004】

一般的な酵素的液化工程は、水酸化カルシウム、水酸化ナトリウム又は炭酸ナトリウムの添加により顆粒デンプンスラリーのpHを6.0から6.5（バチルス・リケニホルミス由来の α -アミラーゼの至適pH）に調節することを必要とする。水酸化カルシウムの添加は、 α -アミラーゼを不活化に対して安定化させることが知られているカルシウムイオンもまた提供するという利点を有する。 α -アミラーゼの添加に際して、前記懸濁液を噴出蒸気中をポンプで通過させ、瞬間的に80℃から115℃の温度に上昇させる。デンプンは直ちにゼラチン化され、 α -アミラーゼの存在により（1-4）グリコシド結合の前記酵素によるランダムな加水分解を介して液状集合体へと脱ポリマー化されて容易にポンプで押し出される。

液化工程の第二の変型は、 α -アミラーゼをデンプン懸濁液に添加し、前記懸濁液を80–100℃の温度で維持し部分的にデンプン顆粒を加水分解し、前記部分的に加水分解したデンプン懸濁液を105℃より高い温度で噴出蒸気中をポンプで通過させ、残余の顆粒構造の一切を完全にゼラチン化する。前記ゼラチン化デンプンを冷却し、 α -アミラーゼの2回目の添加を実施し、さらに前記デンプンを加水分解することができる。

本方法の第三の変型は、乾式製粉方法と呼ばれる。乾式製粉では、全粒をすり潰し水と混合する。胚芽は浮遊選別又は同等な技術によって場合により除去される。得られた混合物（デンプン、繊維、たんぱく質及び穀粒中の他の成分を含む）を α -アミラーゼを用いて液化する。当業界では乾式製粉方法を用いる場合は一般的には低温での酵素的液化が実施される。デンプンから可溶性デキストリンへ変換する場合、一般的には低温液化は、高温液化よりも効率が悪いと考えられている。

【0005】

典型的には、ゼラチン化した後、デンプン溶液は、10–20のDEが達成されるまで（通常は1–3時間） α -アミラーゼの存在下で高い温度で維持される。デキストロース当量（DE

）は、D-グルコースとして乾燥重量を基準に算出される全還元糖の濃度を測定するための工業的標準である。加水分解されていない顆粒デンプンはDEが実質的に0であり、D-グルコースのDEは100と定義される。

トウモロコシ湿式製粉は、トウモロコシ油、グルテンミール、グルテン飼料及びデンプンを製造する工程である。アルカリアマラーゼはデンプンの液化で用いられ、グルコアマラーゼは糖化で用いられグルコースを製造する。トウモロコシ（その穀粒は外種皮（繊維）、デンプン、デンプン及びグルコースの組合せ並びに内芽（inner germ）からなる）は、4段階工程に付され、前記工程によってデンプンが製造される。トウモロコシを浸漬し、内芽除去、繊維除去し、最後にグルテンを分離する。浸漬工程では可溶物が放出される。可溶物の除去後に残留する生成物の内芽を除去し、トウモロコシ油及びオイルケーキが製造される。後者は浸漬工程から得られた可溶物に添加される。残留生成物の繊維を除去し、繊維固形物をオイルケーキ/可溶物の混合物に添加する。繊維固形物、オイルケーキ及び可溶物の混合物はグルテン飼料を構成する。繊維除去後に残留生成物をグルテン分離に付す。前記分離によってグルテンミール及びデンプンが得られる。続いてデンプンを液化及び糖化に付してグルコースを製造する。

焼成製品（例えばパン）の老化（ステーリング；staling）は、パン製品の製造時と消費時との間の時間が長ければ長いほど大きくなる問題として認識されている。「老化（ステーリング）」という用語は、オープンから取り出した後の消費者にとって好ましくないパン製品の特性の変化を示すために用いられる。前記変化は、例えばパンの肉質部（クラム）の堅さの増加、弾力性の低下、及びパン外皮（クラスト）の変化（堅くなる）である。パンの肉質部の堅さは、さらに保存中に不快とみなされるレベルにまで増加する。消費者は、パンが賞味に適さなくなるずっと前にパンの肉質部の堅さが増したことに気付く（堅さは老化のもっとも重要な特徴とみなされる）。

【0006】

トウモロコシデンプンの工業的液化工程を含む種々の使用に有用なアマラーゼの同定及び最適化が工業的に希求されている。これら第二世代の酸性アマラーゼは、例えばバチルス・リケニホルミス由来の工業的に標準的な酵素に比べて製造特性及び／又は性能の改善を提供するすることができる。

さらにまた、自動食器洗浄（ADW）製品及び洗濯洗剤で有用なアマラーゼの同定及び最適化が希求されている。ADW製品では、前記アマラーゼはpH10-11及び45-60℃でカルシウムキレート剤の存在下及び酸化条件下で機能するであろう。洗濯の場合、適切な洗剤マトリックス中でpH9-10及び40℃での活性が要求されるであろう。アマラーゼはまた、繊維の脱サイズ、醸造工程、紙パルプ工業におけるデンプンの改変、及び当分野で記載される他の処理方法で有用である。

アマラーゼは、デンプン加工の初期段階（液化）で、湿式トウモロコシ製粉で、アルコール製造で、洗剤マトリックス中の洗浄剤として、繊維工業でのデンプン脱サイズで、天火利用分野で、飲料工業で、油田の掘削処理で、リサイクル紙のインキングで、さらに動物の飼料で商業的に用いることができる。アマラーゼはまた、繊維の脱サイズ、醸造工程、紙パルプ工業におけるデンプンの改変及び他の処理で有用である。

本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前の刊行物の開示のためにのみ提供され、本発明が先行発明を理由として前記開示に先行しないと解されるべきではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

ある特徴では、本発明はアマラーゼ活性を有するポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びに前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドを製造及び使用する方法を目的とする。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、アマラーゼとして、例えばアルファアマラーゼ又はグルコアマラーゼとして、デンプンから糖への加水分解を触媒するために用いることができる。ある特徴では、本発明は、熱安定性アマラーゼ活性、例えばアルファアマラーゼ又はグルコアマラーゼ活性（例えば1,4-アルファ-D-グルカ

ングルコヒドラーゼ活性)を有するポリペプチドを目的とする。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、アミラーゼとして、例えばアルファアミラーゼ又はグルコアミラーゼとして、デンプンから糖(例えばグルコース)への加水分解を触媒するために用いることができる。本発明はまた、核酸構築物、ベクター、及び本発明の核酸配列を含む宿主細胞とともに、本発明のポリペプチドを製造するための組換え方法を目的とする。本発明はまた、デンプン変換工程(高フルクトースコーンシロップ(HFCS)、エタノール、デキストロース及びデキストロースシロップの製造を含む)における本発明のアミラーゼの使用を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、本発明の核酸、例えば本発明の例示的な核酸と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む単離または組換え核酸を提供する。ある特徴では、本核酸はアミラーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視精査によって決定される。別の特徴では、本発明は、プローブ、阻害性分子(例えばアンチセンス、iRNA)、転写若しくは翻訳調節などとして用いられる核酸を提供する。本発明の例示的な核酸には、配列番号:1;配列番号:3;配列番号:5;配列番号:9;配列番号:11;配列番号:13;配列番号:15;配列番号:17;配列番号:19;配列番号:21;配列番号:23;配列番号:25;配列番号:27;配列番号:29;配列番号:31;配列番号:33;配列番号:35;配列番号:37;配列番号:39;配列番号:41;配列番号:43;配列番号:45;配列番号:47;配列番号:49;配列番号:51;配列番号:53;配列番号:55;配列番号:57;配列番号:59;配列番号:61;配列番号:63;配列番号:65;配列番号:67;配列番号:69;配列番号:71;配列番号:73;配列番号:75;配列番号:77;配列番号:79;配列番号:81;配列番号:83;配列番号:85;配列番号:87;配列番号:89;配列番号:91;配列番号:93;配列番号:95;配列番号:97;配列番号:99;配列番号:101;配列番号:103;配列番号:105;配列番号:107;配列番号:109;配列番号:111;配列番号:113;配列番号:115;配列番号:117;配列番号:119;配列番号:121;配列番号:123;配列番号:125;配列番号:127;配列番号:129;配列番号:131;配列番号:133;配列番号:135;配列番号:137;配列番号:139;配列番号:141;配列番号:143;配列番号:145;配列番号:147;配列番号:149;配列番号:151;配列番号:153;配列番号:155;配列番号:157;配列番号:159;配列番号:161;配列番号:163;配列番号:165;配列番号:167;配列番号:189;配列番号:191;配列番号:193;配列番号:203;配列番号:205;配列番号:207;配列番号:209;配列番号:211;配列番号:322;配列番号:324;配列番号:326;配列番号:328;配列番号:330;配列番号:332;配列番号:334;配列番号:336;配列番号:338;配列番号:340;配列番号:342;配列番号:344;配列番号:346;配列番号:348;配列番号:350;配列番号:352;配列番号:354;配列番号:356;配列番号:358;配列番号:360;配列番号:362;配列番号:364;配列番号:366;配列番号:368;配列番号:370;配列番号:372;配列番号:374;配列番号:376;配列番号:378;配列番号:380;配列番号:382;配列番号:384;配列番号:386;配列番号:388;配列番号:390;配列番号:392;配列番号:394;配列番号:396;配列番号:398;配列番号:400;配列番号:402;配列番号:404;配列番号:406;配列番号:408;配列番号:410;配列番号:412;配列番号:414;配列番号:416;配列番号:418;配列番号:420;配列番号:422;配列番号:424;配列番号:426;配列番号:428;配列番号:430;配列番号:432;配列番号:434;配列番号:436;配列番号:438;配列番号:440;配列番号:442;配列番号:444;配列番号:446;配列番号:448

10

20

30

40

50

；配列番号:450；配列番号:452；配列番号:454；配列番号:456；配列番号:458；配列番号:460；配列番号:462；配列番号:465；配列番号:467；配列番号:473；配列番号:475；配列番号:478；配列番号:480；配列番号:484；配列番号:486；配列番号:492；配列番号:494；配列番号:498；配列番号:500；配列番号:509；配列番号:511；配列番号:515；配列番号:517；配列番号:519；配列番号:522；配列番号:524；配列番号:527；配列番号:529；配列番号:532；配列番号:534；配列番号:539；配列番号:541；配列番号:544；配列番号:546；配列番号:552；配列番号:554；配列番号:558；配列番号:560；配列番号:565；配列番号:567；配列番号:569；配列番号:571；配列番号:573；配列番号:575；配列番号:577；配列番号:579；配列番号:581；配列番号:583；配列番号:585；配列番号:587；配列番号:593；配列番号:603；配列番号:605；配列番号:607；配列番号:609；配列番号:611；配列番号:613；配列番号:615；配列番号:617；配列番号:619又は配列番号621に記載された核酸配列、及びその部分配列、例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれより多い残基又は遺伝子若しくは転写物の完全長を越えるものが含まれる。

10

【0009】

本発明の例示的な核酸にはまた、本発明のポリペプチド、例えば配列番号:2；配列番号:4；配列番号:6；配列番号:10；配列番号:12；配列番号:14；配列番号:16；配列番号:18；配列番号:20；配列番号:22；配列番号:24；配列番号:26；配列番号:28；配列番号:30；配列番号:32；配列番号:34；配列番号:36；配列番号:38；配列番号:40；配列番号:42；配列番号:44；配列番号:46；配列番号:48；配列番号:50；配列番号:52；配列番号:54；配列番号:56；配列番号:58；配列番号:60；配列番号:62；配列番号:64；配列番号:66；配列番号:68；配列番号:70；配列番号:72；配列番号:74；配列番号:76；配列番号:78；配列番号:80；配列番号:82；配列番号:84；配列番号:86；配列番号:88；配列番号:90；配列番号:92；配列番号:94；配列番号:96；配列番号:98；配列番号:100；配列番号:102；配列番号:104；配列番号:106；配列番号:108；配列番号:110；配列番号:112；配列番号:114；配列番号:116；配列番号:118；配列番号:120；配列番号:122；配列番号:124；配列番号:126；配列番号:128；配列番号:130；配列番号:132；配列番号:134；配列番号:136；配列番号:138；配列番号:140；配列番号:142；配列番号:144；配列番号:146；配列番号:148；配列番号:150；配列番号:152；配列番号:154；配列番号:156；配列番号:158；配列番号:160；配列番号:162；配列番号:164；配列番号:166；配列番号:168；配列番号:190；配列番号:192；配列番号:194；配列番号:204；配列番号:206；配列番号:208；配列番号:210；配列番号:212；配列番号:323；配列番号:325；配列番号:327；配列番号:329；配列番号:331；配列番号:333；配列番号:335；配列番号:337；配列番号:339；配列番号:341；配列番号:343；配列番号:345；配列番号:347；配列番号:349；配列番号:351；配列番号:353；配列番号:355；配列番号:357；配列番号:359；配列番号:361；配列番号:363；配列番号:365；配列番号:367；配列番号:369；配列番号:371；配列番号:373；配列番号:375；配列番号:377；配列番号:379；配列番号:381；配列番号:383；配列番号:385；配列番号:387；配列番号:389；配列番号:391；配列番号:393；配列番号:395；配列番号:397；配列番号:399；配列番号:401；配列番号:403；配列番号:405；配列番号:407；配列番号:409；配列番号:411；配列番号:413；配列番号:415；配列番号:417；配列番号:419；配列番号:421；配列番号:423；配列番号:425；配列番号:427；配列番号:429；配列番号:431；配列番号:433；配列番号:435；配列番号:437；配列番号:439；配列番号:441；配列番号:443；配列番号:445；配列番号:447；配列番号:449；配列番号:451；配列番号:453；配列番号:455；配列番号:457；配列番号:459；配列番号:461；配列番号:463；配列番号:464；配列番号:466；配列番号:468；配列番号:469；配列番号:470；配列番号:471；配列番号:472；配列番号:474；配列番号:476；配列番号:477；配列番号:479；配列番号:481；配列番号:482；配列番号:483；配列番号:485；配列番号:487；配列番号:488；配列番号:489；配列番号:490；配列番号:491；配列番号:493；配列番号:495；配列番号:496；配列番号:497；配列番号:499；配列番号:501；配列番号:502；配列番号:503；配列番号:504；配列番号:505；配列番号:506；配列番号

20

30

40

50

:507；配列番号:508；配列番号:510；配列番号:512；配列番号:513；配列番号:514；配列番号:516；配列番号:518；配列番号:520；配列番号:521；配列番号:523；配列番号:525；配列番号:526；配列番号:528；配列番号:530；配列番号:531；配列番号:533；配列番号:535；配列番号:536；配列番号:537；配列番号:538；配列番号:540；配列番号:542；配列番号:543；配列番号:545；配列番号:547；配列番号:548；配列番号:549；配列番号:550；配列番号:551；配列番号:553；配列番号:555；配列番号:556；配列番号:557；配列番号:559；配列番号:561；配列番号:562；配列番号:563；配列番号:564；配列番号:566；配列番号:568；配列番号:570；配列番号:572；配列番号:574；配列番号:576；配列番号:578；配列番号:580；配列番号:582；配列番号:584；配列番号:586；配列番号:588；配列番号:589；配列番号:590；配列番号:591；配列番号:592；配列番号:594；配列番号:604；配列番号:606；配列番号:608；配列番号:610；配列番号:612；配列番号:614；配列番号:616；配列番号:618；配列番号:620又は配列番号:622に記載の配列を有する典型的なポリペプチド、並びにその部分配列及びその変種、並びに本発明の典型的なポリペプチドと少なくとも約50%の（又は下記で述べるように50%を超える）配列同一性を有するポリペプチドをコードする単離又は組換え核酸が含まれる。ある特徴では、前記ポリペプチドはアミラーゼ活性、例えばアルファアミラーゼ又はグルコアミラーゼ活性（下記でさらに述べる又別のアミラーゼ活性）を有する。ある特徴では前記ポリペプチドは免疫原又はエピトープとして機能する。

【0010】

ある特徴では、本発明はまたアミラーゼをコードする核酸を提供し、前記核酸はそれらが混合培養に由来するという点において共通の新規性を有する。本発明は混合培養から単離されたアミラーゼコード核酸を提供し、前記核酸は、例えば本発明の例示的な核酸と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550又はそれより長い残基領域にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な（100%）配列同一性を有する核酸配列を含み、前記核酸はアミラーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視精査によって決定される。ある特徴では、本発明は混合培養から単離されたアミラーゼコード核酸を提供し、前記核酸は、本発明の核酸（例えば本発明の例示的な核酸、例えば配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:11など）及びその部分配列（例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれより多い残基、又は遺伝子若しくは転写物の完全長にわたる）、又は本発明のポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0011】

ある特徴では、本発明はまたアミラーゼコード核酸を提供し、前記核酸は環境性供給源（例えば混合環境供給源）に由来するという点で共通の新規性を有する。ある特徴では、本発明は環境性供給源（例えば混合環境供給源）から単離されたアミラーゼコード核酸を提供し、前記核酸は、本発明の例示的な核酸と少なくとも約50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550又はそれより多い残基の領域にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な（100%）配列同一性を有する核酸配列を含み、前記核酸はアミラーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視精査によって決定される。ある特徴では、本発明は混合培養から単離されたアミラーゼコード核酸を提供し、前記核酸は、本発明の核酸（例えば本発明の例示的な核酸、例えば配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:11など）及びその部分配列（例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれより多い残基、又は遺伝子若しくは転写物の完全長にわたる）、又は本発明のポリペプチドをコードする核酸を含む。

5%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含み、前記核酸はアミラーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視精査によって決定される。ある特徴では、本発明は環境性供給源(例えば混合環境供給源)から単離されたアミラーゼコード核酸を提供し、前記核酸は、例えば配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:11など、配列番号:583、配列番号:585に示される本発明の例示的な核酸、及びその部分配列(例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれより多い残基又は遺伝子若しくは転写物の完全長にわたる)、又は本発明のポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0012】

ある特徴では、本発明はまた、古細菌源に由来するという共通の新規性をもつアミラーゼ及びアミラーゼコード核酸を提供し、配列番号:80(配列番号:79によってコードされる)、配列番号:82(配列番号:81によってコードされる)、配列番号:116(配列番号:115によってコードされる)、配列番号:323(配列番号:322によってコードされる)、配列番号:570(配列番号:169によってコードされる)の古細菌由来アミラーゼを含む。

ある特徴では、配列比較アルゴリズムはBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、フィルタリング設定はblastall -p blastp -d "nr pataa" -F Fに設定され、他の全てのオプションは規定値に設定される。

本発明のまた別の特徴は、本発明の核酸配列、前記と実質的に同一の配列及び前記と相補的な配列の連続する少なくとも10塩基を含む単離又は組換え核酸である。

ある特徴では、本発明のアミラーゼ活性は、 α -アミラーゼ活性を含み、前記活性は、デンプンの内部 α -1,4-グリコシド結合を加水分解し、より小さな分子量のマルトデキストリンを生成する能力を含む。ある特徴では、 α -アミラーゼ活性はデンプンの内部 α -1,4-グリコシド結合をランダムに加水分解することを含む。本アミラーゼは、 α -アミラーゼ活性、 β -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、1,4- α -D-グルカングルコヒドロラーゼ活性、エキソアミラーゼ活性、グルカン α -マルトテトラヒドロラーゼ活性、マルターゼ活性、イソマルターゼ活性、グルカン1,4- α -グルコシダーゼ活性、 α -グルコシダーゼ活性、スクラーゼ活性又はアガラーゼ活性(例えば β -アガラーゼ活性)を含む。

【0013】

アミラーゼ活性はグルコシド結合の加水分解活性を含むことができる。ある特徴では、前記グルコシド結合は、 α -1,4-グリコシド結合を含む。また別の特徴では、前記グルコシド結合は、 α -1,6-グリコシド結合を含む。ある特徴では、アミラーゼ活性は、デンプン、例えば液化デンプンのグリコシド結合を加水分解する活性を含む。アミラーゼ活性はさらにグリコシド結合をマルトデキストリンに加水分解することを含む。ある特徴では、アミラーゼ活性は、デンプンの非還元末端からマルトース又はD-グルコース単位を切断する活性を含む。

ある特徴では、前記単離または組換え核酸は、熱安定性のアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記ポリペプチドは、約0℃から約37℃、約37℃から約95℃若しくはそれ以上、例えば98℃、100℃若しくはそれ以上；約55℃から約85℃；約70℃から約95℃；又は約90℃から約95℃のいずれかの温度範囲を含む条件下でアミラーゼ活性を維持することができる。例えば、配列番号:437に記載の配列を有する例示的なポリペプチドは熱安定性で、添加カルシウムの非存在下で100℃で25分後に50%の活性を維持する。

別の特徴では、前記単離または組換え核酸は、耐熱性のアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記ポリペプチドは、37℃より高く約95℃までの範囲の温度又は55℃より高く約85℃までの範囲のいずれかの温度に暴露した後アミラーゼ活性を維持することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、pH4.5で90℃より高く約95℃までの範囲の温度に暴露した後アミラーゼ活性を維持することができる。

【0014】

本発明は、本発明の核酸、例えば本発明の例示的な核酸、配列番号:1；配列番号:3；配列番号:5；配列番号:9；配列番号:11；配列番号:13；配列番号:15；配列番号:17；配列番号:19；配列番号:21；配列番号:23；配列番号:25；配列番号:27；配列番号:29；配列番号:31；配列番号:33；配列番号:35；配列番号:37；配列番号:39；配列番号:41；配列番号:43；配列番号:45；配列番号:47；配列番号:49；配列番号:51；配列番号:53；配列番号:55；配列番号:57；配列番号:59；配列番号:61；配列番号:63；配列番号:65；配列番号:67；配列番号:69；配列番号:71；配列番号:73；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:79；配列番号:81；配列番号:83；配列番号:85；配列番号:87；配列番号:89；配列番号:91；配列番号:93；配列番号:95；配列番号:97；配列番号:99；配列番号:101；配列番号:103；配列番号:105；配列番号:107；配列番号:109；配列番号:111；配列番号:113；配列番号:115；配列番号:117；配列番号:119；配列番号:121；配列番号:123；配列番号:125；配列番号:127；配列番号:129；配列番号:131；配列番号:133；配列番号:135；配列番号:137；配列番号:139；配列番号:141；配列番号:143；配列番号:145；配列番号:147；配列番号:149；配列番号:151；配列番号:153；配列番号:155；配列番号:157；配列番号:159；配列番号:161；配列番号:163；配列番号:165；配列番号:167；配列番号:189；配列番号:191；配列番号:193；配列番号:203；配列番号:205；配列番号:207；配列番号:209；配列番号:211；配列番号:322；配列番号:324；配列番号:326；配列番号:328；配列番号:330；配列番号:332；配列番号:334；配列番号:336；配列番号:338；配列番号:340；配列番号:342；配列番号:344；配列番号:346；配列番号:348；配列番号:350；配列番号:352；配列番号:354；配列番号:356；配列番号:358；配列番号:360；配列番号:362；配列番号:364；配列番号:366；配列番号:368；配列番号:370；配列番号:372；配列番号:374；配列番号:376；配列番号:378；配列番号:380；配列番号:382；配列番号:384；配列番号:386；配列番号:388；配列番号:390；配列番号:392；配列番号:394；配列番号:396；配列番号:398；配列番号:400；配列番号:402；配列番号:404；配列番号:406；配列番号:408；配列番号:410；配列番号:412；配列番号:414；配列番号:416；配列番号:418；配列番号:420；配列番号:422；配列番号:424；配列番号:426；配列番号:428；配列番号:430；配列番号:432；配列番号:434；配列番号:436；配列番号:438；配列番号:440；配列番号:442；配列番号:444；配列番号:446；配列番号:448；配列番号:450；配列番号:452；配列番号:454；配列番号:456；配列番号:458；配列番号:460；配列番号:462；配列番号:465；配列番号:467；配列番号:473；配列番号:475；配列番号:478；配列番号:480；配列番号:484；配列番号:486；配列番号:492；配列番号:494；配列番号:498；配列番号:500；配列番号:509；配列番号:511；配列番号:515；配列番号:517；配列番号:519；配列番号:522；配列番号:524；配列番号:527；配列番号:529；配列番号:532；配列番号:534；配列番号:539；配列番号:541；配列番号:544；配列番号:546；配列番号:552；配列番号:554；配列番号:558；配列番号:560；配列番号:565；配列番号:567；配列番号:569；配列番号:571；配列番号:573；配列番号:575；配列番号:577；配列番号:579；配列番号:581；配列番号:583；配列番号:585；配列番号:587；配列番号:593；配列番号:603；配列番号:605；配列番号:607；配列番号:609；配列番号:611；配列番号:613；配列番号:615；配列番号:617；配列番号:619又は配列番号621に記載の配列、又はそのフラグメント若しくは部分配列含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む単離または組換え核酸を提供する。ある特徴では、前記核酸はアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記核酸は、長さが少なくとも約50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500又はそれより多い残基であるか、又は完全長の遺伝子若しくは転写物である。ある特徴では、前記ストリンジェントな条件には、0.2XのSSC中で約65℃の温度で約15分の洗浄を含む洗浄工程が含まれる。

【0015】

本発明は、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブを提供し、ここで前記プローブは、本発明の配列又はそのフラグメント若しく

10

20

30

40

50

は部分配列を含む配列の少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれより多くの連続する塩基を含み、前記プローブは結合又はハイブリダイゼーションにより前記核酸を同定する。前記プローブは、本発明の配列又はそのフラグメントもしくは部分配列を含む配列の少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、又は約60から100の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

本発明は、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブを提供し、ここで前記プローブは、本発明の核酸と少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な(100%)配列同一性を有する、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれより多くの残基の配列を含む核酸を含み、前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視精査によって決定される。

前記プローブは、本発明の核酸配列又はその部分配列の少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、又は約60から100の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【0016】

本発明は、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅させる増幅プライマー配列対を提供し、ここで前記プライマー対は、本発明の配列又はそのフラグメント若しくは部分配列を含む核酸を増幅させることができる。前記増幅プライマー配列対の1つまたは各メンバーは、前記配列の少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

本発明は、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸配列又はそのフラグメントもしくは部分配列を増幅させることができる増幅プライマー配列対による鋳型核酸の増幅を含む。

本発明は、本発明の核酸配列又はその部分配列を含む発現カセットを提供する。ある特徴では、前記発現カセットは、プロモーターに機能可能に連結された前記核酸を含むことができる。前記プロモーターはウイルスプロモーター、細菌プロモーター、哺乳動物プロモーター又は植物プロモーターであり得る。ある特徴では、植物プロモーターは、ジャガイモ、イネ、トウモロコシ、コムギ、タバコまたはオオムギのプロモーターであり得る。前記プロモーターは構成的プロモーターであり得る。前記構成的プロモーターはCaMV35Sを含むことができる。別の特徴では、プロモーターは誘導性プロモーターであり得る。ある特徴では、プロモーターは組織特異的プロモーターまたは環境によって調節されるプロモーターまたは生育に応じて調節されるプロモーターであり得る。したがって、プロモーターは例えば種子特異的、葉特異的、根特異的、茎特異的または器官離脱-誘導プロモーターであり得る。ある特徴では、発現カセットはさらに植物または植物ウイルス発現ベクターを含むことができる。

本発明は、本発明の発現カセット(例えばベクター)または本発明の核酸を含むクローニングベヒクルを提供する。前記クローニングベヒクルはウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体であり得る。前記ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ付随ウイルスベクターを含むことができる。前記クローニングベヒクルは細菌の人工染色体(BAC)、プラスミド、バクテリオファージP1-由来ベクター(PAC)、酵母人工染色体(YAC)または哺乳動物人工染色体(MAC)を含むことができる。

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現カセット(例えばベクター)または本発明

のクローニングベヒクルを含む形質転換細胞を提供する。ある特徴では、前記形質転換細胞は、細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は植物細胞であり得る。ある特徴では、前記植物細胞はジャガイモ、コムギ、コメ、トウモロコシ、タバコまたはオオムギ細胞であり得る。

【0017】

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現カセット(例えばベクター)を含む非ヒトトランスジェニック動物を提供する。ある特徴では、前記動物はマウスである。

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現カセット(例えばベクター)を含むトランスジェニック植物を提供する。前記トランスジェニック植物はトウモロコシ、ジャガイモ、トマト、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、イネ、オオムギまたはタバコであり得る。

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現カセット(例えばベクター)を含むトランスジェニック種子を提供する。前記トランスジェニック種子はトウモロコシ、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、ヤシ、ヒマワリ、ゴマ、落花生またはタバコの種子であり得る。

本発明はアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明の核酸に相補的な核酸配列、または本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明は、細胞内のアミラーゼメッセージの翻訳を阻害する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸に相補的な核酸配列または本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを前記細胞に投与するか、または前記細胞で発現させることを含む。

【0018】

本発明は、本発明の例示的なポリペプチドまたはペプチドと少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくは1550又はそれより多くの残基にわたって、又は前記ポリペプチドの完全長にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な(100%)配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又は組換えポリペプチドを提供し、前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視精査によって決定される。本発明の典型的なポリペプチド又はペプチド配列には、例えば配列番号:2;配列番号:4;配列番号:6;配列番号:10;配列番号:12;配列番号:14;配列番号:16;配列番号:18;配列番号:20;配列番号:22;配列番号:24;配列番号:26;配列番号:28;配列番号:30;配列番号:32;配列番号:34;配列番号:36;配列番号:38;配列番号:40;配列番号:42;配列番号:44;配列番号:46;配列番号:48;配列番号:50;配列番号:52;配列番号:54;配列番号:56;配列番号:58;配列番号:60;配列番号:62;配列番号:64;配列番号:66;配列番号:68;配列番号:70;配列番号:72;配列番号:74;配列番号:76;配列番号:78;配列番号:80;配列番号:82;配列番号:84;配列番号:86;配列番号:88;配列番号:90;配列番号:92;配列番号:94;配列番号:96;配列番号:98;配列番号:100;配列番号:102;配列番号:104;配列番号:106;配列番号:108;配列番号:110;配列番号:112;配列番号:114;配列番号:116;配列番号:118;配列番号:120;配列番号:122;配列番号:124;配列番号:126;配列番号:128;配列番号:130;配列番号:132;配列番号:134;配列番号:136;配列番号:138;配列番号:140;配列番号:142;配列番号:144;配列番号:146;配列番号:148;配列番号:150;配列番号:152;配列番号:154;配列番号:156;配列番号:158;配列番号:160;配列番号:162;配列番号:164;配列番号:166;配列番号:168;配列番号:190;配列番号:192;配列番号:194;配列番号:204;配列番号:206;配列番号:208;配列番号:210;配列番号:212;配列番号:323;配列番号:325;配列番号:327;配列番号:329;配列番号:331;配列番号:333;配列番号:335;配列番号:337;配列番号:339;配列番号:3

41；配列番号:343；配列番号:345；配列番号:347；配列番号:349；配列番号:351；配列番号:353；配列番号:355；配列番号:357；配列番号:359；配列番号:361；配列番号:363；配列番号:365；配列番号:367；配列番号:369；配列番号:371；配列番号:373；配列番号:375；配列番号:377；配列番号:379；配列番号:381；配列番号:383；配列番号:385；配列番号:387；配列番号:389；配列番号:391；配列番号:393；配列番号:395；配列番号:397；配列番号:399；配列番号:401；配列番号:403；配列番号:405；配列番号:407；配列番号:409；配列番号:411；配列番号:413；配列番号:415；配列番号:417；配列番号:419；配列番号:421；配列番号:423；配列番号:425；配列番号:427；配列番号:429；配列番号:431；配列番号:433；配列番号:435；配列番号:437；配列番号:439；配列番号:441；配列番号:443；配列番号:445；配列番号:447；配列番号:449；配列番号:451；配列番号:453；配列番号:455；配列番号:457；配列番号:459；配列番号:461；配列番号:463；配列番号:464；配列番号:466；配列番号:468；配列番号:469；配列番号:470；配列番号:471；配列番号:472；配列番号:474；配列番号:476；配列番号:477；配列番号:479；配列番号:481；配列番号:482；配列番号:483；配列番号:485；配列番号:487；配列番号:488；配列番号:489；配列番号:490；配列番号:491；配列番号:493；配列番号:495；配列番号:496；配列番号:497；配列番号:499；配列番号:501；配列番号:502；配列番号:503；配列番号:504；配列番号:505；配列番号:506；配列番号:507；配列番号:508；配列番号:510；配列番号:512；配列番号:513；配列番号:514；配列番号:516；配列番号:518；配列番号:520；配列番号:521；配列番号:523；配列番号:525；配列番号:526；配列番号:528；配列番号:530；配列番号:531；配列番号:533；配列番号:535；配列番号:536；配列番号:537；配列番号:538；配列番号:540；配列番号:542；配列番号:543；配列番号:545；配列番号:547；配列番号:548；配列番号:549；配列番号:550；配列番号:551；配列番号:553；配列番号:555；配列番号:556；配列番号:557；配列番号:559；配列番号:561；配列番号:562；配列番号:563；配列番号:564；配列番号:566；配列番号:568；配列番号:570；配列番号:572；配列番号:574；配列番号:576；配列番号:578；配列番号:580；配列番号:582；配列番号:584；配列番号:586；配列番号:588；配列番号:589；配列番号:590；配列番号:591；配列番号:592；配列番号:594；配列番号:604；配列番号:606；配列番号:608；配列番号:610；配列番号:612；配列番号:614；配列番号:616；配列番号:618；配列番号:620又は配列番号:622、並びにその部分配列及びその変種、例えば長さが少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500若しくはそれ以上の残基、又は完全長の酵素を含む。本発明の例示的なポリペプチドまたはペプチド配列には本発明の核酸によってコードされる配列が含まれる。本発明の例示的なポリペプチドまたはペプチド配列には、本発明の抗体が特異的に結合するポリペプチド又はペプチドが含まれる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは少なくとも1つのアミラーゼ活性、例えばアルファアミラーゼ活性を有する。

本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドまたはペプチド配列、前記と実質的に同一の配列、及び前記と相補的な配列の連続する少なくとも10塩基を含む単離または組換えポリペプチドまたはペプチドである。

【0019】

ある特徴では、本発明のポリペプチド又はペプチドのアミラーゼ活性は α -アミラーゼ活性を含む。前記 α -アミラーゼ活性は、デンプンの内部 α -1,4-グリコシド結合を加水分解し、より小さな分子量のマルトデキストリンを生成する能力を含む。ある特徴では、前記 α -アミラーゼ活性はデンプンの内部 α -1,4-グリコシド結合をランダムに加水分解することを含む。前記アミラーゼ活性は、グルコアミラーゼ活性、1,4- α -D-グルカングルコヒドロラーゼ活性、 α -アミラーゼ活性、エキソアミラーゼ活性、 β -アミラーゼ活性を含むことができる。前記アミラーゼ活性はグルコシド結合の加水分解を含むことができる。ある特徴では、前記グルコシド結合は、 α -1,4-グルコシド結合を含む。また別の特徴では、前記グルコシド結合は、 α -1,6-グルコシド結合を含む。ある特徴では、前記アミラーゼ活性は、デンプン、例えば液化デンプンのグリコシド結合を加水分解することを含む

。前記アミラーゼ活性はさらにグリコシド結合をマルトデキストリンに加水分解することを含むことができる。ある特徴では、前記アミラーゼ活性は、デンプンの非還元末端からマルトース又はD-グルコース単位を切断することを含む。

【0020】

ある特徴では、本発明のアミラーゼ活性はグルコアミラーゼ活性を含み、前記活性はグルコシド結合の加水分解を触媒することを含むことができる。本発明のグルコアミラーゼ活性は、デンプン又は他の関連するデキストリンの非還元末端から加水分解によるD-グルコースの段階的放出を触媒することを含むことができる。グルコアミラーゼ活性は1,4- α -D-グルカングルコヒドロラーゼ活性を含むことができる。グルコアミラーゼ活性はマルトデキストリンの加水分解を含み、遊離グルコースの生成をもたらすことができる。前記グルコアミラーゼ活性はエキソアミラーゼ活性を含むことができる。グルコアミラーゼ活性は α -アミラーゼ又は β -アミラーゼ活性を含むことができる。加水分解されたグルコシド結合は、 α -1,4グルコシド結合又は α -1,6-グルコシド結合を含むことができる。グルコアミラーゼ活性は、デンプンのグリコシド結合を加水分解することを含むことができる。前記グルコアミラーゼ活性はさらに、デンプンのグリコシド結合を加水分解してマルトデキストリンを生成することを含むことができる。グルコアミラーゼ活性は、デンプンの非還元末端からマルトース又はD-グルコース単位を切断することを含むことができる。

【0021】

ある特徴では、本アミラーゼ活性は熱安定性であり得る。本ポリペプチドは、約37℃から約95℃、約55℃から約85℃、約70℃から約95℃、又は約90℃から約95℃の温度範囲を含む条件下でアミラーゼ活性を維持することができる。ある特徴では、本アミラーゼは熱耐性であり得る。本ポリペプチドは、約37℃より高く約95℃までの範囲の温度、または55℃より高く約85℃までの範囲の温度に暴露した後アミラーゼ活性を維持することができる。ある特徴では、本ポリペプチドは、pH4.5で約90℃より高く約95℃までの範囲の温度に暴露した後アミラーゼ活性を維持することができる。

ある特徴では、本単離又は組換えポリペプチドは、シグナル配列を欠く本発明のポリペプチドを含むことができる。ある特徴では、前記単離又は組換えポリペプチドは、異種シグナル配列、例えば異種アミラーゼのシグナル配列又は非アミラーゼシグナル配列を含む本発明のポリペプチドを含むことができる。

ある特徴では、本発明は、表3に示されるペプチドを含むシグナル配列を提供する。ある特徴では、本発明は表3に示されるペプチドからなるシグナル配列を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列を含む第一のドメインおよび少なくとも1つの第二のドメインを含むキメラタンパク質を提供する。このタンパク質は融合タンパク質であり得る。前記第二のドメインは酵素を含むことができる。前記酵素はアミラーゼ（例えば本発明のアミラーゼ又は別のアミラーゼ）であり得る。

【0022】

ある特徴では、本アミラーゼ活性は、37℃において、タンパク質1ミリグラムにつき約10から10,000、又は約100から約1000ユニットの範囲の比活性を含む。別の特徴では、前記アミラーゼ活性はタンパク質1ミリグラムにつき約500から約750ユニットの比活性を含む。また別には、本アミラーゼ活性は、37℃でタンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニットの範囲の比活性を含む。ある特徴では、前記アミラーゼ活性は、37℃でタンパク質1ミリグラムにつき約750から約1000ユニットの範囲の比活性を含む。また別の特徴では、耐熱性は、上昇温度に加熱した後37℃で前記アミラーゼ比活性の少なくとも半分が維持されることを含む。また別には、前記耐熱性は、上昇温度に加熱した後、37℃でタンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニットの範囲の比活性が維持されることを含む。

【0023】

本発明は、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む本発明の単離または組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、グリコシル化はN-結合グリコシル化であり得る。ある特徴では、前記ポリペプチドは、P. パストリス (pastoris) またはS. ポンベ (pombe)

で発現された場合にグリコシル化され得る。本発明はまた、（翻訳後修飾により又は化学的に）本ポリペプチドをグリコシル化し、前記ポリペプチドの特性（例えばその熱安定性、可溶性、凝集傾向など）を変化させる方法を提供する。

ある特徴では、本ポリペプチドは、約pH6.5、pH6、pH5.5、pH5、pH4.5又はpH4を含む条件下でアミラーゼ活性を維持することができる。別の特徴では、本ポリペプチドは、約pH7、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9、pH9.5、pH10、pH10.5又はpH11を含む条件下でアミラーゼ活性を維持することができる。

本発明は本発明のポリペプチドを含む調製物を提供し、ここで前記調製物は液体、固体又はゲルを含む。

本発明は、本発明のポリペプチド及び第二のドメインを含むヘテロダイマーを提供する。ある特徴では、前記第二のドメインはポリペプチドであり、前記ヘテロダイマーは融合タンパク質でよい。ある特徴では、第二のドメインはエピトープ又はタグであり得る。ある特徴では、本発明は、本発明のポリペプチドを含むホモダイマーを提供する。

【0024】

本発明はアミラーゼ活性を有する固定化ポリペプチドを提供し、ここで、前記ポリペプチドは、本発明のポリペプチド、本発明の核酸によってコードされるポリペプチド、又は本発明のポリペプチド及び第二のドメインを含むポリペプチドを含む。ある特徴では、前記ポリペプチドは細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレイまたはキャピラリー管に固定化することができる。

本発明は、固定化された本発明の核酸を含むアレイを提供する。本発明は本発明の抗体を含むアレイを提供する。

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドと特異的に結合する単離または組換え抗体を提供する。前記抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。本発明は、本発明の抗体、例えば本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドと特異的に結合する抗体を含むハイブリドーマを提供する。

本発明は、本発明のポリペプチド（例えば本発明の核酸によってコードされるポリペプチド）を含む動物用栄養補助食品を提供する。ある特徴では、前記栄養補助食品中のポリペプチドはグリコシル化することができる。本発明は、本発明のポリペプチド（例えば本発明の核酸によってコードされるポリペプチド）を含む食用酵素デリバリーマトリックスを提供する。ある特徴では、前記デリバリーマトリックスはペレットを構成する。ある特徴では前記ポリペプチドはグリコシル化されていてよい。ある特徴では前記アミラーゼ活性は耐熱性である。別の特徴では、前記アミラーゼ活性は熱安定性である。

【0025】

本発明は、以下の工程を含むアミラーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する方法を提供する：（a）本発明の抗体を提供する工程；（b）ポリペプチドを含むサンプルを提供する工程；（c）工程（a）の抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合する条件下で前記抗体と工程（b）のサンプルを接触させ、それによってアミラーゼを単離または同定する工程。

本発明は、以下の工程を含む抗アミラーゼ抗体を製造する方法を提供する：ヒト以外の動物に液性免疫応答を生じさせるために十分な量で本発明の核酸または本発明のポリペプチドまたはその部分配列を投与し、それによって抗アミラーゼ抗体を製造する工程。本発明は、非ヒト動物に免疫応答を生じさせるために十分な量で本発明の核酸または本発明のポリペプチドまたはその部分配列を投与することを含む抗アミラーゼ免疫を生じさせる方法を提供する。

本発明は以下の工程を含む組換えポリペプチドを製造する方法を提供する：（a）プロモーターに機能可能に連結された本発明の核酸を提供する工程；（b）ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程（a）の核酸を発現させ、それによって組換えポリペプチドを製造する工程。ある特徴では、前記方法はさらに、宿主細胞を工程（a）の核酸で形質

転換し、続いて工程（a）の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組換えポリペプチドを製造することを含んでもよい。

【0026】

本発明は、以下の工程を含むアミラーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法を提供する：（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；（b）アミラーゼ基質を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチド又はそのフラグメント又は変種を工程（b）の基質と接触させ、基質の量の減少又は反応生成物の量の増加を検出し、基質の量が減少又は反応生成物の量が増加すればアミラーゼ活性を有するポリペプチドが検出されたとする工程。ある特徴では、前記基質はデンプン、例えば液化デンプンであり得る。

本発明は、以下の工程を含むアミラーゼ基質を同定する方法を提供する：（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；（b）試験基質を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の試験基質と接触させ、基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出し、基質の量が減少または反応生成物の量が増加すれば前記試験基質をアミラーゼ基質として同定する工程。

【0027】

本発明は、試験化合物がポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）核酸または核酸を含むベクターを前記核酸のポリペプチドへの翻訳を許容する条件下で発現させるか（前記核酸は本発明の核酸を含む）、又は本発明のポリペプチドを提供する工程；（b）試験化合物を提供する工程；（c）前記ポリペプチドを前記試験化合物と接触させる工程；および、（d）工程（b）の試験化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程。

本発明は、（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；（b）試験化合物を提供する工程；（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の試験化合物と接触させてアミラーゼの活性を測定する工程を含む、アミラーゼ活性の調節物質を同定する方法であって、試験化合物の非存在下のアミラーゼ活性と比較して試験化合物の存在下で測定されたアミラーゼ活性が変化すれば、前記試験化合物をアミラーゼ活性を調節する物質として同定する、前記方法を提供する。ある特徴では、前記アミラーゼ活性は、アミラーゼ基質を提供し、さらに基質量の減少若しくは反応生成物量の増加、又は基質量の増加若しくは反応生成物量の減少を検出することによって測定することができる。試験化合物非存在下における基質量または反応生成物量と比較して、前記試験化合物存在下において基質の量が減少または反応生成物の量が増加すれば、前記試験化合物はアミラーゼの活性化物質として同定される。試験化合物非存在下における基質または反応生成物量と比較して、前記試験化合物存在下で基質の量が増加または反応生成物の量が減少すれば、前記試験化合物はアミラーゼの阻害物質として同定される。

【0028】

本発明は、プロセッサおよびデータ保存装置を含むコンピュータシステムを提供し、前記データ保存装置には本発明のポリペプチド配列（例えば本発明の核酸によってコードされるポリペプチド）又は本発明の核酸配列が保存されている。

ある特徴では、前記コンピュータシステムはさらに配列比較アルゴリズム、及び少なくとも1つの参照配列が保存された保存装置を含むことができる。別の特徴では、前記配列比較アルゴリズムは多型性を表示するコンピュータプログラムを含む。ある特徴では、前記コンピュータシステムはさらに、前記配列における1つまたは2つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーを含むことができる。本発明はコンピュータ読み出し可能媒体を提供し、前記媒体には、本発明のポリペプチド配列または本発明の核酸配列が保存されている。本発明は、以下の工程を含む配列の特徴を同定する方法を提供する：（a）配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定するコンピュータプログラムを用いて配列を読み取る工程（前記配列は本発明のポリペプチド配列又は本発明の核酸配列を含む）；および、（b）前記コンピュータプログラムにより前記配列の1つ又は2つ以上の特徴を同定する工程。本発明は、以下の工程を含む第一の配列と第二の配列を比較する方法を提供する：（a）配

列を比較するコンピュータプログラムを用いて第一の配列および第二の配列を読み取る工程（前記第一の配列は本発明のポリペプチド配列または本発明の核酸配列を含む）；および、（b）第一の配列と第二の配列間の相違を前記コンピュータプログラムにより決定する工程。第一の配列と第二の配列間の相違を決定する工程はさらに多型性を同定する工程を含むことができる。ある特徴では、前記方法はさらに、配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定するアイデンティファイヤーを含み得る。別の特徴では、前記方法は、コンピュータプログラムを用いて第一の配列を読み取り、さらに前記配列内の1つ又は2つ以上の特徴を同定することを含み得る。

【0029】

本発明は、以下の工程を含む、環境サンプルからアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する方法を提供する：（a）アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー配列を提供する工程（前記プライマー対は本発明の核酸を増幅することができる）；（b）環境サンプルから核酸を単離するか、または前記サンプル内の核酸がハイブリダイゼーションのために前記増幅プライマー対に接近できるように前記環境サンプルを処理する工程；および、（c）工程（b）の核酸を工程（a）の増幅プライマー対と一緒にして前記環境サンプルの核酸を増幅し、それによって前記環境サンプルからアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する工程。前記増幅プライマー配列対の一つまたは各メンバーは、本発明の配列の少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【0030】

本発明は、以下の工程を含む環境サンプルからアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する方法を提供する：（a）本発明の核酸配列またはその部分配列を含むポリヌクレオチドプローブを提供する工程；（b）環境サンプルから核酸を単離するか、または前記サンプル内の核酸がハイブリダイゼーションのために工程（a）のポリヌクレオチドに接近できるように前記環境サンプルを処理する工程；（c）工程（b）の単離された核酸または処理された環境サンプルを工程（a）のポリヌクレオチドプローブと一緒にする工程；および、（d）工程（a）のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離し、それによって前記環境サンプルからアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離または回収する工程。前記環境サンプルは水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプルまたは生物学的サンプルを含むことができる。ある特徴では、前記生物学的サンプルは、細菌細胞、原虫細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞または哺乳動物細胞に由来し得る。

【0031】

本発明は、以下の工程を含むアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の変種を作製する方法を提供する：（a）本発明の核酸を含む鋳型核酸を提供する工程；（b）前記鋳型配列内の1つ又は2つ以上のヌクレオチドの修飾、欠失若しくは付加、又は前記の組合せを実施して前記鋳型核酸の変種を作製する工程。

ある特徴では、前記方法はさらに、変種核酸を発現させて変種アミラーゼポリペプチドを生成することを含むことができる。前記修飾、付加または欠失は、変異性PCR、シャッフルリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセンブリ（SLR）又はそれらの組合せを含む方法により導入することができる。また別の特徴では、前記改変、付加または欠失は、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成、又はそれらの組合せによって導入することができる。

【0032】

ある特徴では、前記方法は、鑄型核酸によってコードされるポリペプチドの活性または安定性とは変異した若しくは異なる活性または変異した若しくは異なる安定性を有するアミラーゼが得られるまで反復することができる。ある特徴では、前記変種アミラーゼ変種は耐熱性であり、上昇温度に暴露された後ある程度の活性を維持する。また別の特徴では、前記変種アミラーゼポリペプチドは、鑄型核酸によってコードされるアミラーゼと比較して高度にグリコシル化されている。あるいは、変種アミラーゼポリペプチドは高温下でアミラーゼ活性を有するが、鑄型核酸によってコードされるアミラーゼは高温下では活性をもたない。ある特徴では、前記方法は、鑄型核酸のコード使用頻度とは異なるコード使用頻度を示すアミラーゼコード配列が得られるまで反復することができる。前記方法は、別の

10

特徴では、鑄型核酸のメッセージ発現レベルまたは安定性レベルより高いまたは低いメッセージ発現レベルを有するアミラーゼ遺伝子が得られるまで前記方法を反復することができる。

本発明は、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞における前記核酸の発現を高める方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする本発明の核酸を提供する工程；および(b) 工程(a)の核酸内の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンに置換し、それによって核酸を変更して宿主細胞内における前記核酸の発現を増加させる工程（前記優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先コドンまたは前記低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示されるコドンである）。

20

本発明は、以下の工程を含む、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更する方法を提供する：(a) 本発明の核酸を提供する工程；および、(b) 工程(a)の核酸のコドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする異なるコドンで置換し、それによってアミラーゼをコードする核酸内のコドンを変更する工程。

【0033】

本発明は、以下の工程を含む、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞における前記核酸の発現を高める方法を提供する：(a) アミラーゼポリペプチドをコードする本発明の核酸を提供する工程；および、(b) 工程(a)の核酸内の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンで置換し（前記優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである）、それによって前記核酸を変更して宿主細胞におけるその発現を高める工程。

30

本発明は、以下の工程を含む、アミラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞における前記核酸の発現を低下させる方法を提供する：(a) 本発明の核酸を提供する工程；および、(b) 工程(a)の核酸内の少なくとも1つの優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする非優先コドンまたは低優先コドンで置換する工程（前記優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度提示されるコドンである）、それによって前記核酸を変更して宿主細胞における前記核酸の発現を低下させる工程。ある特徴では、前記宿主細胞は細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞または哺乳動物細胞であり得る。

40

【0034】

本発明は、複数の変更アミラーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する方法を提供する（前記変更活性部位または基質結合部位は、第一の活

50

性部位または第一の基質結合部位をコードする配列を含む第一の核酸に由来する)。前記方法は以下の工程を含む：(a) 第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする第一の核酸を提供する工程(前記第一の核酸配列は本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、前記核酸はアミラーゼ活性部位またはアミラーゼ基質結合部位をコードする)；(b) 第一の核酸内の複数の標的コドンで天然に存在するアミノ酸変種をコードする一組の変異導入オリゴヌクレオチドを提供する工程；(c) 前記一組の変異導入オリゴヌクレオチドを用いて、変異導入アミノ酸コドンの各々において一連のアミノ酸変種をコードする一組の活性部位コード変種または基質結合部位コード変種核酸を生成し、それによって複数の改変アミラーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する工程。ある特徴では、前記方法は、最適化定方向進化システム、遺伝子部位飽和変異導入(GSSM)、または合成連結再アッセンブリ(SLR)、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入(GSSM)、合成連結再アッセンブリ(SLR)またはそれらの組合せを含む方法によって、工程(a)の第一の核酸に変異導入することを含む。別の特徴では、前記方法は、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成およびそれらの組合せを含む方法によって、工程(a)の第一の核酸または変種に変異導入することを含む。

【0035】

本発明は、以下の工程を含む小分子の製造方法を提供する：(a) 小分子を合成または改変することができる複数の生合成酵素を提供する工程(前記酵素の1つは本発明の核酸によってコードされるアミラーゼ酵素を含む)；(b) 工程(a)の酵素の少なくとも1つに対する基質を提供する工程；および、(c) 複数の生物触媒反応を促進する条件下で工程(b)の基質を前記酵素と反応させて一連の生物触媒反応により小分子を生成する工程。本発明は、以下の工程を含む小分子の改変方法を提供する：(a) アミラーゼ酵素を提供する工程(前記酵素は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む)；(b) 小分子を提供する工程；および、(c) 前記アミラーゼ酵素によって触媒される酵素反応が促進される条件下で工程(a)の酵素を工程(b)の小分子と反応させ、それによってアミラーゼ酵素反応により小分子を改変する工程。ある特徴では、前記方法は、工程(a)の酵素のための複数の小分子基質を提供し、それによってアミラーゼ酵素により触媒される少なくとも1つの酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含むことができる。ある特徴では、前記方法は、前記酵素による複数の生物触媒反応を促進する条件下で複数の酵素を追加して、複数の酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含むことができる。別の特徴では、前記方法はさらに、所望の活性を示す特定の小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために前記ライブラリーを試験する工程を含むことができる。前記ライブラリーの試験工程はさらに、所望の活性をもつ特定の改変小分子の有無について改変小分子の一部分を試験することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の前記一部分を生成するために用いられた生物触媒反応の1つ以外の全てを系統的に排除し、所望の活性をもつ特定の改変小分子を生成する少なくとも1つの特異的な生物触媒反応を特定する工程を含むことができる。

【0036】

本発明は、以下の工程を含むアミラーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法を提供する：(a) アミラーゼ酵素を提供する工程(前記酵素は本発明のポリペプチドを含むまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチド、またはそれらの部分配列を含む)；および、(b) 工程(a)の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、アミラーゼ活性

について残余の配列を試験し、それによってアミラーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程。ある特徴において、このアミラーゼ活性は、アミラーゼ基質を提供し、基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出することによって測定される。

本発明は、リアルタイム代謝フラックス解析によって新規または改変表現型の全細胞操作のための方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a) 細胞の遺伝的構成を改変することによって改変細胞を作製する工程（前記遺伝的構成は本発明の核酸を細胞に導入することによって改変される）；(b) 前記改変細胞を培養して複数の改変細胞を生成する工程；(c) 工程(b)の細胞培養物をリアルタイムでモニターすることによって前記細胞の少なくとも1つの代謝パラメーターを測定する工程；および、(d) 工程(c)のデータを解析して、前記測定されたパラメーターが類似の条件下で未改変細胞での対応する測定値と異なるか否かを決定し、それによって細胞の操作された表現型をリアルタイム代謝フラックス解析により同定する工程。ある特徴では、細胞の遺伝的構成は、細胞内の遺伝子の配列の欠失もしくは改変または遺伝子発現のノックアウトを含む方法によって改変することができる。ある特徴では、前記方法はさらに、新たに操作された表現型を含む細胞の選別を含むことができる。別の特徴では、前記方法は、選別された細胞を培養し、それによって新たに操作された表現型を含む新規な細胞株を作製することを含むことができる。

本発明は以下の工程を含むデンプンを加水分解する方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含む前記工程；(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と前記ポリペプチドがデンプンを加水分解する条件下で接触させる工程。ある特徴では、前記組成物は α -1,4グルコシド結合又は α -1,6-グルコシド結合を含むデンプンを含む。ある特徴では、前記アミラーゼ活性は α -アミラーゼ活性である。ある特徴では、前記 α -アミラーゼ活性はデンプン又は他の多糖類の内部結合を加水分解する。

【0037】

本発明は以下の工程を含む、組成物からデンプンを液化又はデンプンを除去する方法を提供する工程：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と前記ポリペプチドがデンプンを除去又は液化する条件下で接触させる工程。

本発明は、アミラーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高める方法を提供する。前記方法は、アミラーゼポリペプチドをグリコシル化し（前記ポリペプチドは本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドの連続する少なくとも30のアミノ酸を含む）、それによって前記アミラーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高めることを含む。ある特徴では、前記アミラーゼの比活性は約37℃より高く約95℃までの範囲の温度で熱安定性または耐熱性であり得る。

【0038】

本発明は、細胞で組換えアミラーゼポリペプチドを過剰発現させる方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸または本発明の核酸配列（配列の同一性は配列比較アルゴリズムによる解析または目視精査によって決定される）を含むベクターを発現させることを含み、ここで前記過剰発現は、高活性プロモーターの使用、ニシストロンベクターの使用によって、または前記ベクターの遺伝子増幅によって達成される。

本発明は、本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含む洗剤組成物を提供し、ここで前記ポリペプチドはアミラーゼ活性を含む。ある特徴では、前記アミラーゼは非表面活性アミラーゼであり得る。また別の特徴では、前記アミラーゼは表面活性アミラーゼであり得る。

【0039】

本発明は以下の工程を含む対象物の洗浄方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを含む組成物を提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリ

ペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) 対象物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の対象物と前記組成物が前記対象物を洗浄することができる条件下で接触させる工程。

本発明は、(例えば飼料又は食品中の)デンプンを動物による消費の前に加水分解する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a) デンプンを含む組成物(例えば飼料)を提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) 工程(a)のポリペプチドを前記組成物(例えば飼料又は食品)に、デンプンを加水分解させるために十分な時間、十分な量で添加し、それによってデンプンを加水分解する工程。ある特徴では、前記食品又は飼料はコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類又はジャガイモを含み得る。

本発明は以下の工程を含む繊維物を脱サイズする方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) 繊維物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の繊維物と前記アミラーゼが前記繊維物を脱サイズすることができる条件下で接触させる工程。

【0040】

本発明は以下の工程を含む紙又は繊維を脱インクする方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) 紙又は繊維を含む組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と前記ポリペプチドが前記紙又は繊維を脱インクすることができる条件下で接触させる工程。

本発明は以下の工程を含むリグノセルロース繊維を処理する方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) リグノセルロース繊維を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の繊維と前記ポリペプチドが前記繊維を処理してそれによって前記繊維の特性を改善することができる条件下で接触させる工程。

【0041】

本発明は以下の工程を含む高マルトース又は高グルコースシロップを製造する方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明の酵素を含むポリペプチドである、前記工程；(b) デンプンを含む組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記組成物を液化し、それによって可溶性デンプン水解物を生成し、さらに前記可溶性デンプン水解物を糖化することができる条件下で接触させ、それによってシロップを生成する工程。ある特徴では、前記デンプンはコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、豆類、ジャガイモ又はサツマイモに由来し得る。

本発明は以下の工程を含むデンプン含有産出流体(production fluid)の流れを改善する方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含む前記工程；(b) 産出流体を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の産出流体と前記アミラーゼが前記産出流体中のデンプンを加水分解することができる条件下で接触させ、それによって前記産出流体の密度を低下させて前記産出流体の流れを改善する工程。ある特徴では、前記産出流体は地下で生成されるものであり得る。

【0042】

本発明は、本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチドを含む抗老化(アンチステーリング)組成物(anti-staling composition)を提供する

。本発明は、以下の工程を含む焼成製品の老化(staling)を防ぐ方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) 焼成に用いられるデンプンを含む組成物を提供する工程；さらに(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが焼成に用いられる組成物中のデンプンを加水分解することができる条件下で一緒にし、それによって焼成製品の老化を防ぐ工程。

本発明は、以下の工程を含む醸造又はアルコール製造でアミラーゼを使用する方法を提供する：(a) アミラーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが本発明のポリペプチドを含むポリペプチドである、前記工程；(b) デンプンを含み、醸造又はアルコール製造に用いられる組成物を提供する工程；および、(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが醸造又はアルコール製造で用いられる組成物中のデンプンを加水分解することができる条件下で一緒にする工程。ある特徴では、デンプンを含む前記組成物はビールであり得る。

【0043】

本発明は以下の工程を含むトランスジェニック植物の製造方法を提供する：(a) 異種核酸配列を細胞に導入し（前記異種核酸配列は本発明の核酸配列を含む）、それによって形質転換植物細胞を作製する工程；および、(b) 前記形質転換細胞からトランスジェニック植物を生成する工程。ある特徴では、工程(a)はさらに、植物細胞プロトプラストのエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションにより前記異種核酸配列を導入することを含み得る。別の特徴では、工程(a)はさらに、DNA粒子ボンバードメントによって植物組織に直接前記異種核酸配列を導入することを含み得る。また別には、工程(a)はさらに、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) 宿主を用いて植物細胞DNAに前記異種核酸配列を導入することを含み得る。ある特徴では、前記植物細胞はジャガイモ、トウモロコシ、イネ、コムギ、タバコまたはオオムギ細胞であり得る。

本発明は、以下の工程を含む、植物細胞において異種核酸配列を発現させる方法を提供する：(a) プロモーターに機能可能に連結された異種核酸配列で前記植物細胞を形質転換する工程（前記異種核酸配列は本発明の核酸を含む）；(b) 前記異種核酸配列が前記植物細胞で発現する条件下で前記植物を生長させる工程。

【0044】

本発明はまた、本発明のアミラーゼを前記生地にパンの老化を遅らせるために有効な量で添加することを含む、生地又は前記生地から製造される焼成製品を調製する方法を提供する。本発明はまた前記アミラーゼを含む生地及び前記アミラーゼとともに粉を含むプレミックスを提供する。最後に本発明は前記アミラーゼを含む焼成用酵素添加物を提供する。本発明のアミラーゼの使用で、パンの肉質部が堅くなるのが遅いこと、パンの肉質部の弾力性の保持、薄切りし易さの改善（例えばパンの肉質部の減少、粘着性のないパン肉質部）、風味の改善により測定したとき抗老化効果が改善される。

本発明は、ラテックスポリマー（又は等価物）コーティングによって被覆された、所望の成分を含む徐放性（“放出制御”）組成物を提供する。ある特徴では、前記所望される成分は酵素、例えば本発明の酵素を含む。ある特徴では、所望される成分は小分子、薬剤、多糖類、脂質、核酸、ビタミン、抗生物質又は殺虫剤を含む。ある特徴では所望される成分はベレット又はマトリックス、例えば食することが可能な素材（例えば動物の食べ物若しくは飼料又は補助物質又は医薬として）を含むベレット又はマトリックスを構成する。本発明はまた組成物の“制御放出”又は“徐放性放出”のための方法を提供し、ここで前記組成物はラテックスポリマー（又は等価物）コーティングによって被覆される。

ある特徴では、前記ラテックスコーティングはラテックス塗料又は等価物を含む。前記ラテックスポリマーコーティングは、アクリレート、メタクリレート、酢酸ビニル、スチレン、エチレン、塩化ビニル、ブタジエン、塩化ビニリデン、ビニルベルサテート、プロピオン酸ビニル、*t*-ブチルアクリレート、アクリロニトリル、ネオプレン、マリエート、フマレート、前記の等価物、前記の組合せ及び／又は前記の誘導体を含むことができる。

図中の同じ記号は同じ要素を示す。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】コンピュータシステムのブロック図である。

【図2】新規なヌクレオチド又はタンパク質配列とデータベースの配列を比較し、前記新規配列とデータベース配列との間の相同性を決定する方法の1つの特徴を示す流れ図である。

【図3】2つの配列が相同であるか否かを決定するためのコンピュータ処理の1つの特徴を示す流れ図である。

【図4】配列中に特徴が存在するか否かを検出するためのアイデンティファイヤー処理の1つの特徴を示す流れ図である。

【図5】実施例1において90℃で10分加熱した後の種々のアミラーゼの残存活性を示すグラフである。

【図6】漂白剤及びキレート剤を含むADW洗浄試験で種々の酵素濃度に対し除去されたデンプンの正味の百分率を示すグラフである。

【図7】pH8で40℃における親アミラーゼ、55℃におけるADW処方物の活性を示すグラフである。

【図8】実施例4の新規な酵素のH₂O₂耐性に関するデータを示すグラフである。

【図9】特性決定したアミラーゼの選別のためのpH及び温度データのグラフである。図9aはpH8で40℃のデータを示し、図9bはpH10で50℃のデータを示す。

【図10】酵素の再アッセムリー実験で用いられる配列を示す。

【図11】実施例5のアッセイにおけるサンプル標準曲線を示す。

【図12】配列番号:127（中性の至適pHを有する）及び配列番号:211（約10の至適pHを有する）のpH速度プロファイルを示す。

【図13】実施例2で考察されたように市販酵素に対する例示的アミラーゼの安定性を示す。

【図14A-1】実施例8に示した低温性α-アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14aは以下のアミラーゼ配列のアラインメントを示す：配列番号:81＝環境クローン；pyro＝ピロコッカス種（*Pyrococcus* sp.）（KOD1株）、Tachibana (1996) J. Ferment. Bioeng. 82:224-232；pyro2＝ピロコッカス・フリオーサス（*Pyrococcus furiosus*）、Appl. Environ. Microbiol. 63(9):3569-3576；Thermo＝テルモコッカス種（*Thermococcus* sp）Thermo2＝テルモコッカス・ヒドロテルマリス（*Thermococcus hydrothermalis*）、E. Leveque et al. 特許：France 98.0565505-May-1998。

【図14A-2】実施例8に示した低温性α-アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14aは以下のアミラーゼ配列のアラインメントを示す：配列番号:81＝環境クローン；pyro＝ピロコッカス種（*Pyrococcus* sp.）（KOD1株）、Tachibana (1996) J. Ferment. Bioeng. 82:224-232；pyro2＝ピロコッカス・フリオーサス（*Pyrococcus furiosus*）、Appl. Environ. Microbiol. 63(9):3569-3576；Thermo＝テルモコッカス種（*Thermococcus* sp）Thermo2＝テルモコッカス・ヒドロテルマリス（*Thermococcus hydrothermalis*）、E. Leveque et al. 特許：France 98.0565505-May-1998。

【図14B-1】実施例8に示した低温性α-アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14bは、以下の同定された配列のアミノ酸配列アラインメントを示す：配列番号:81；pyro；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；therm2；配列番号:79；thermo；pyro2；クローンA；thrm3。

【図14B-2】実施例8に示した低温性α-アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14bは、以下の同定された配列のアミノ酸配列アラインメントを示す：配列番号:81；pyro；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；therm2；配列番号:79；thermo；pyro2；クローンA；thrm3。

【図14B-3】実施例8に示した低温性α-アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14bは、以下の同定された配列のアミノ酸配列アラインメントを示す：配列番号:81；pyro

10

20

30

40

50

；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；therm2；配列番号:79；thermo；pyro2；クローンA；thrm3。

【図14C-1】実施例8に示した低温性 α -アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14cは図5及び6のポリペプチド配列に対応する核酸配列のアラインメントを示す：配列番号:81；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；配列番号:79；クローンA；及び配列番号:73。

【図14C-2】実施例8に示した低温性 α -アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14cは図5及び6のポリペプチド配列に対応する核酸配列のアラインメントを示す：配列番号:81；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；配列番号:79；クローンA；及び配列番号:73。

10

【図14C-3】実施例8に示した低温性 α -アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14cは図5及び6のポリペプチド配列に対応する核酸配列のアラインメントを示す：配列番号:81；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；配列番号:79；クローンA；及び配列番号:73。

【図14C-4】実施例8に示した低温性 α -アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14cは図5及び6のポリペプチド配列に対応する核酸配列のアラインメントを示す：配列番号:81；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；配列番号:79；クローンA；及び配列番号:73。

【図14C-5】実施例8に示した低温性 α -アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14cは図5及び6のポリペプチド配列に対応する核酸配列のアラインメントを示す：配列番号:81；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；配列番号:79；クローンA；及び配列番号:73。

20

【図14C-6】実施例8に示した低温性 α -アミラーゼの配列アラインメントを示す。図14cは図5及び6のポリペプチド配列に対応する核酸配列のアラインメントを示す：配列番号:81；配列番号:75；配列番号:77；配列番号:83；配列番号:85；配列番号:79；クローンA；及び配列番号:73。

【図15】テルモコッカス目 (Thermococcale) の近隣結合樹である。

【図16A】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16B】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16C】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

30

【図16D】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16E】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16F】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16G】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16H】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16I】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16J】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16K】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16L】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16M】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

40

【図16N】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16O】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16P】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16Q】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16R】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16S】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16T】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16U】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16V】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

【図16W】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。

50

【図 16 U U U】本発明の例示的配列の配列を示す。SEO ID NOは配列番号を意味する。

50

- 【図 1 6 V V V】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 【図 1 6 W W W】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 【図 1 6 X X X】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 【図 1 6 Y Y Y】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 【図 1 6 Z Z Z】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 【図 1 6 A A A A】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 B B B B】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 C C C C】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する 10
- 。 【図 1 6 D D D D】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 E E E E】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 F F F F】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 G G G G】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 H H H H】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する 20
- 。 【図 1 6 I I I I】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 J J J J】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 K K K K】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 L L L L】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する。
- 。 【図 1 6 M M M M】本発明の例示的配列の配列を示す。SEQ ID NOは配列番号を意味する 30
- 。 【図 1 7】上記で詳細に記載した、本発明の液化糖化方法を示す。
- 【図 1 8】実施例 8 に述べたように、本発明の例示的配列の相対的パーセント同一性を列記した表 7 を示す。
- 【図 1 9】実施例 15 で述べたように試験した、本発明のアミラーゼ及び市販の基準酵素の pH プロファイルを示す。
- 【図 2 0】実施例 15 で述べた、本発明の例示的アミラーゼの温度活性プロファイルを示す。
- 。 【図 2 1】実施例 15 で述べた、EDTA 存在下での（本発明の例示的アミラーゼの）酵素活性を示す。 40
- 【図 2 2】実施例 15 で述べた、過酸化水素存在下での（本発明の例示的アミラーゼの）酵素活性を示す。
- 【図 2 3】実施例 15 で述べた、可溶性基質（BODIPY-デンプン）に関する ADW 溶液（蒸留水、硬化溶液、漂白剤、キレート剤、界面活性剤）中における（本発明の例示的アミラーゼの）酵素活性を示す。
- 【図 2 4】実施例 15 で述べた、本発明の例示的アミラーゼによるデンプン被覆スライドを用いた洗浄試験の結果を示す。
- 【図 2 5】（本発明の少なくとも 1 つの酵素を用いる）本発明の例示的なトウモロコシ湿式製粉法を示す。
- 【図 2 6】上記で詳細に記載した、（本発明の少なくとも 1 つの酵素を用いる）本発明の 50

また別の例示的なデンプン処理（デンプン液化工程を含む）を示す。

【図 2 7】上記で詳細に記載した、（本発明の少なくとも1つの酵素を用いる）本発明のまた別の例示的なデンプン処理（デンプン液化工程を含む）を示す。

【図 2 8】上記で詳細に記載した、（本発明の少なくとも1つの酵素を用いる）本発明のまた別の例示的なデンプン処理（デンプン液化工程を含む）を示す。

【図 2 9】上記実施例1で述べたように、配列番号:437のアミラーゼをTERMAMYL(商標)SC (Novozymes A/S, Denmark) アミラーゼとドライミルエタノールプロセッシングで比較して得られた発見のデータのまとめを示す。

【図 3 0】上記実施例16で詳細に述べたように、各pHにおけるグルコアミラーゼの相対速度を決定するために得られた、酢酸緩衝液及びリン酸緩衝液中における本発明の例示的酵素（配列番号:594）のpH活性プロファイルを示す。

【図 3 1】実施例16で詳細に述べた、本発明の例示的酵素（配列番号:594）の酢酸緩衝液での温度活性プロファイルを示す。

【図 3 2】実施例16で詳細に述べた、本発明の例示的酵素（配列番号:594）の温度安定性プロファイルを示す。

【図 3 3】実施例16で詳細に述べたように、デキストリンマルトース（G2）、マルトトリオース（G3）、パノース（Pan）、マルトテトラオース（G4）、及びマルトヘプタオース（G7）を用いた本発明の例示的酵素（配列番号:594）の基質利用性活性プロファイルを示す。

【図 3 4 A】本発明の例示的グルコアミラーゼコード核酸、配列番号:587に示すゲノム配列を示す。コード配列（エクソン）はその下に一文字アミノ酸が示されている。イントロン配列には下線が付されている。

【図 3 4 B】本発明の例示的グルコアミラーゼコード核酸、配列番号:587に示すゲノム配列を示す。コード配列（エクソン）はその下に一文字アミノ酸が示されている。イントロン配列には下線が付されている。

【図 3 4 C】本発明の例示的グルコアミラーゼコード核酸、配列番号:587に示すゲノム配列を示す。コード配列（エクソン）はその下に一文字アミノ酸が示されている。イントロン配列には下線が付されている。

【図 3 4 D】本発明の例示的グルコアミラーゼコード核酸、配列番号:587に示すゲノム配列を示す。コード配列（エクソン）はその下に一文字アミノ酸が示されている。イントロン配列には下線が付されている。

【図 3 4 E】本発明の例示的グルコアミラーゼコード核酸、配列番号:587に示すゲノム配列を示す。コード配列（エクソン）はその下に一文字アミノ酸が示されている。イントロン配列には下線が付されている。

【図 3 5 A】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 B】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 C】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 D】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 E】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 F】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 G】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 H】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

10

20

30

40

50

【図 3 5 I】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 J】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 K】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 L】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 M】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 N】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 O】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 P】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 Q】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 R】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 S】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 T】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 U】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 V】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 W】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 X】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【図 3 5 Y】上記で詳細に述べた、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選別特性を記載した図表である。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本発明の1つまたは2つ以上の実施態様の詳細は添付の図面および下記の説明で示される。本発明のその他の特徴、目的および利点はこれらの記載および図面から、さらに特許請求の範囲から明らかになる。

本明細書に引用した全ての刊行物、特許、特許出願、GenBank配列およびATCC寄託物は引用により本明細書に含まれる。

【0047】

発明の詳細な説明

本発明は、アミラーゼ酵素（例えばアルファアミラーゼ）、前記酵素をコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドおよびポリペプチドの製造及び使用方法を提供する。本発明は、アミラーゼ活性（例えばアルファアミラーゼ活性）を有する新規なポリペプチド、前記をコードする核酸、及び前記と結合する抗体を目的とする。本発明のポリペプチドは多様な診断薬、治療薬及び工業的背景で用いることができる。本発明のポリペプチドは、例えば洗剤の添加物として、食品の加工のために、及び逆反応を利用する化学的合成のために用いることができる。さらにまた、本発明のポリペプチドは織物の処理で、

10

20

30

40

50

アルコール製造で、及び食品又は動物の飼料の添加物として用いることができる。

ある特徴では、本発明のアミラーゼは高及び／又は低温で、又は広範囲にわたる温度で活性を有する。例えば、それらは20℃から90℃、30℃から80℃、又は40℃から70℃の範囲の温度で活性を示すことができる。本発明はまた、アルカリ性pH又は酸性pH（例えば酸性度が低い水）で活性を有するアミラーゼを提供する。また別の特徴では、本発明のアミラーゼは、pH5.0、pH4.5、pH4.0及びpH3.5のような低い酸性pHで活性を示すことができる。

また別に、本発明のアミラーゼは、pH9.5、pH10、pH10.5及びpH11のような高いアルカリ性pHで活性を示すことができる。ある特徴では、本発明のアミラーゼは、水活量が低い（水分含有量が低い）条件下で約40℃から約70℃の範囲の温度で活性を有する。

【0048】

本発明はまた、本発明の例示的なアミラーゼをさらに改変して望ましい特性を有するタンパク質を生成する方法を提供する。例えば、本発明の方法によって生成されたアミラーゼは変異した酵素活性、熱安定性、pH/活性プロファイル〔例えば低pH値（例えばpH<6又はpH<5）における安定性の増加〕、酸化に対する安定性、Ca²⁺依存性、比活性などを有し得る。本発明は、対象となる任意の特性変異を提供する。例えば、前記変異によって、親酵素と比較したとき変異した酵素活性又はpH若しくは温度活性プロファイルをもつ変種が生じ得る。

【0049】

定義

“アミラーゼ”という用語は、多糖類（例えばデンプン）の加水分解を触媒するポリペプチド（例えば酵素）の全てを含む。“アミラーゼ”という用語は、α-アミラーゼ活性、β-アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、1,4-α-D-グルカングルコヒドロラーゼ活性、エキソアミラーゼ活性、グルカンα-マルトテトラヒドロラーゼ活性、マルターゼ活性、イソマルターゼ活性、1,4-α-グルコシダーゼ活性、α-グルコシダーゼ活性、スクラーゼ活性又はアガラーゼ活性（例えばβ-アガラーゼ活性）を有するポリペプチドを含む。例えば、本発明のアミラーゼ活性は、α-アミラーゼ活性を含み、デンプンの内部α-1,4-グルコシド結合を加水分解してより低分子量のマルト-デキストリンを生成する能力を含む。ある特徴では、α-アミラーゼ活性はデンプンの内部α-1,4-グルコシド結合のランダムな加水分解を含む。本発明のアミラーゼ活性は、グルコアミラーゼ活性（例えばα-1,4-及びα-1,6-グルコシド結合によって連結されたグルコースポリマーを加水分解する能力）を有するペプチドを含む。ある特徴では、本発明のポリペプチドはグルコアミラーゼ活性を有し、内部α-1,4-グルコシド結合を加水分解してより低分子量のマルト-デキストリンを生じる。本発明のアミラーゼ活性はまた、グルカン1,4-α-グルコシダーゼ活性（又は1,4-α-D-グルカングルコヒドロラーゼ、一般的にはグルコアミラーゼと称されるがアミログルコシダーゼ及びγ-アミラーゼとも称される）を含み、ある特徴では1,4-α-、1,6-α-及び1,3-α-結合グルカンからβ-D-グルコースを遊離させる。本発明のアミラーゼ活性はまた、エキソアミラーゼ活性を含む。

【0050】

ある特徴では、グルコアミラーゼ活性はグルコシド結合の加水分解の触媒を含む。グルコアミラーゼ活性は、デンプンまたは他の関連デキストリンの非還元末端からD-グルコースの段階的な加水分解による放出を触媒することを含むことができる。グルコアミラーゼ活性は1,4-α-D-グルカングルコヒドロラーゼ活性を含むことができる。グルコアミラーゼ活性は、マルト-デキストリンの加水分解を触媒して遊離グルコースの生成を生じさせることができる。グルコアミラーゼ活性はエキソアミラーゼ活性を含むことができる。グルコアミラーゼ活性はα-アミラーゼ又はβ-アミラーゼ活性を含むことができる。加水分解されたグルコシド結合は、α-1,4-グルコシド結合又はα-1,6-グルコシド結合を含むことができる。グルコアミラーゼ活性はデンプンのグルコシド結合の加水分解を含むことができる。グルコアミラーゼ活性はさらにデンプンのグルコシド結合の加水分解を含み、マルトデキストリンを生成することができる。グルコアミラーゼ活性は、デンプンの非還元末端からマルトース又はD-グルコース単位を切断することを含み得る。

【0051】

本発明のアミラーゼ活性はまた、多糖類（例えばデンプン）を高温、低温、アルカリ性pH及び酸性pHで加水分解することを含む。例えばある特徴では、本発明は、熱安定性のアミラーゼ（例えばグルコアミラーゼ）活性を有するポリペプチド及び前記をコードする核酸を提供する。前記ポリペプチドは、約37℃から約95℃；約55℃から約85℃；約70℃から約95℃；又は約90℃から約95℃の温度範囲を含む条件下でアミラーゼ活性を維持することができる。別の特徴では、本発明のポリペプチドは、耐熱性のグルコアミラーゼ活性を有することができる。前記ポリペプチドは、37℃より高く約95℃までの範囲の温度又は55℃より高く約85℃までの範囲のいずれかの温度に暴露した後アミラーゼ（例えばグルコアミラーゼ）活性を維持することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、pH4.5で90℃より高く約95℃までの範囲の温度に暴露した後アミラーゼ活性を維持する。

10

“アミラーゼ変種”は、“前駆体アミラーゼ”のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含む。前駆体アミラーゼには、天然に存在するアミラーゼ及び組換えアミラーゼが含まれ得る。アミラーゼ変種のアミノ酸配列は、前駆体アミラーゼのアミノ酸配列の1つ又は2つ以上のアミノ酸の置換、欠失又は挿入によって、前駆体アミラーゼのアミノ酸配列から誘導することができる。そのような改変は、前駆体アミラーゼ酵素自体を操作するのではなく、前駆体アミラーゼのアミノ酸配列をコードする“前駆体DNA配列”の改変であろう。前駆体DNA配列のそのような操作のための適切な方法には本明細書に開示された方法とともに当業界で公知の方法が含まれる。

【0052】

20

“抗体”という用語には、1つの免疫グロブリン遺伝子もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子に由来する、またはそれらによってコードされる、またはそれらに基づいて形成されたペプチドまたはポリペプチドであって、抗原またはエピトープに特異的に結合することができるものが含まれる。例えば以下を参照されたい：Fundamental Immunology, Third Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)；Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273；Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97。抗体という用語は、抗原に結合する能力を保持する抗原結合部分、すなわち“抗原結合部位”（例えばフラグメント、部分配列、相補性決定領域（CDR））を含み、(i) Fabフラグメント（VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価のフラグメント）；(ii) F(ab')₂フラグメント（ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント）；(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の1つの腕のVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(v) dAbフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）（VHドメインからなる）；および(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。単鎖抗体もまた関連する場合には“抗体”という用語に含まれる。

30

本明細書で用いられる“アレイ”または“マイクロアレイ”または“バイオチップ”または“チップ”という用語は複数の標的要素であって、各標的要素は、基質表面の一定面積上に固定化された一定量の1つまたは2つ以上のポリペプチドもしくは核酸を含む（更なる詳細は下記に記載される）。

【0053】

40

本明細書で用いられるように、“コンピュータ”、“コンピュータプログラム”および“プロセッサ”は前記のもっとも広い一般的な意味で用いられ、下記で詳細に述べるような装置の全てが含まれる。具体的なポリペプチドまたはタンパク質の“コード配列”または前記を“コードする配列”は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、ポリペプチドまたはタンパク質に転写および翻訳される核酸配列である。

本明細書で用いられる“発現カセット”という用語は、前記のような配列と適合する宿主で構造遺伝子（タンパク質コード配列、例えば本発明のアミラーゼ）の発現を達成することができるヌクレオチド配列を指す。発現カセットは、前記ポリペプチドコード配列（および場合によって他の配列、例えば転写終了シグナル）と機能可能に連結された少なくとも1つのプロモータを含む。発現の実施に必要なまたは有用なさらに別の因子（例えば

50

エンハンサ) もまた用いることができる。したがって、発現カセットはまた、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、任意の形態の組換え“裸のDNA”ベクターなどを含む。

本明細書で用いられる“機能可能に連結される”とは、2つまたは3つ以上の核酸(例えばDNA)セグメント間における機能的関係を指す。典型的には、前記用語は、転写される配列に対する転写調節配列の機能的関係を指す。例えば、プロモータが適切な宿主細胞または他の発現系でコード配列(例えば本発明の核酸)の転写を刺激または調節する場合、前記プロモータは前記コード配列と機能可能に連結されている。一般的には、転写される配列と機能可能に連結されているプロモータ転写調節配列は、前記転写される配列と物理的に連続している。すなわち、それらはcis-作動性である。しかしながら、いくつかの転写調節配列、例えばエンハンサーは、それらが転写を増強しようとするコード配列と物理的に連続していること、または前記と接近して配置されることを必ずしも必要としない。

【0054】

“ベクター”は、細胞に感染、トランスフェクト、一過性もしくは永久的に形質導入することができる核酸を含む。ベクターは、裸の核酸またはタンパク質もしくは脂質と複合体を形成した核酸でもよいことは理解されよう。ベクターは場合によってウイルスまたは細菌の核酸および/またはタンパク質および/または膜(例えば細胞膜、ウイルスの脂質エンベロープなど)を含む。ベクターには、DNAフラグメントが結合し複製できるようになったレプリコン(例えばRNAレプリコン、バクテリオファージ)が含まれるが、ただし前記に限定されない。したがって、ベクターには、自律的自己複製性環状もしくは直鎖状DNAまたはRNA(例えばプラスミド、ウイルスなど、例えば米国特許出願第5,217,879号参照)が含まれ(ただし前記に限定されない)、さらに発現および非発現プラスミドが含まれる。組換え微生物または細胞培養が“発現ベクター”の宿主として記載されている場合は、染色体外環状および直鎖状DNA並びに宿主染色体に取り込まれたDNAの両方が含まれる。ベクターが宿主細胞により維持される場合は、前記ベクターは自律性構造物として有糸分裂時に細胞によって安定的に複製されるか、または宿主のゲノム内に取り込まれてもよい。

【0055】

本明細書で用いられる“プロモータ”という用語には、細胞(例えば植物細胞)内でコード配列の転写を駆動させることができる全ての配列が含まれる。したがって、本発明の構築物で用いられるプロモータには、遺伝子の転写のタイミングおよび/または速度の調節または調整に必要とされるcis-作動性転写制御エレメントおよび調節配列が含まれる。例えば、プロモータは、cis-作動性転写制御エレメント(エンハンサ、プロモータ、転写ターミネータ、複製起点、染色体組み込み配列、5'および3'非翻訳領域またはイントロン配列が含まれ、転写調節に必要である)であり得る。前記のcis-作動性配列は、典型的にはタンパク質または他の生物学的分子と相互作用して転写を実行する(転写のON、OFFの切り替え、調節または調整など)。“構成的”プロモータは、大部分の環境条件下および生育または細胞分化の状態で持続的に発現を駆動するプロモータである。“誘導性”または“調節性”プロモータは環境条件または生育条件の影響下で本発明の核酸の発現を誘導する。例えば誘導性プロモータによって転写に影響を与えることができる環境条件の例には、嫌気的条件、上昇温度、乾燥または光の存在が含まれる。

“組織特異的”プロモータは、例えば植物または動物の特定の細胞または組織または器官でのみ活性を有する転写制御エレメントである。組織特異的調節は、ある組織に特異的なタンパク質をコードする遺伝子の発現を担保するある種の固有の因子によって達成できる。そのような因子は哺乳動物および植物に存在し、特定の組織を発達させることが知られている。

【0056】

“植物”という用語には完全な植物、植物の部分(例えば葉、茎、花、根など)、植物のプロトプラスト、種子および植物細胞並びに前記の子孫が含まれる。本発明の方法で用いることができる植物クラスは、一般的には、形質転換技術を施しやすい高等植物クラス

と同様に広く、裸子植物と同様に被子植物（単子葉および双子葉植物）が含まれる。前記には多様な倍数性レベルを有する植物（倍数体、二倍体、半数体および半接合状態を含む）が含まれる。本明細書で用いられる“トランスジェニック植物”には、異種核酸配列（例えば本発明の核酸および種々の組換え構築物、例えば発現カセット）が挿入された植物または植物細胞が含まれる。

“プラスミド”は、市販もしくは無制限に公開されているか、または公表された方法にしたがって入手可能なプラスミドから構築することができる。本明細書に記載されているプラスミドと同等なプラスミドは当技術分野で公知であり、当業者には明らかであろう。

“遺伝子”という用語には、転写生成物（順次翻訳されたポリペプチド鎖を生じるか、または遺伝子の転写、再生または安定性を調節する）の生成に必要なDNAのセグメントを含む核酸配列が含まれる。遺伝子はコード領域に先行または後続する領域、例えばリーダーおよびトレイラー、プロモータおよびエンハンサ並びに（適用がある場合には）個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含むことができる。

【0057】

“核酸”または“核酸配列”という語句にはオリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドが含まれ、前記のいずれかのフラグメント、ゲノム由来もしくは合成起源のDNAまたはRNA（例えばmRNA、rRNA、tRNA、iRNA）（これらは一本鎖でも二本鎖でもよく、センスまたはアンチセンス鎖を表すことができる）、ペプチド核酸（PNA）または任意のDNA様もしくはRNA様物質、天然もしくは合成起源のリボヌクレオプロテイン（iRNAを含む）（例えば二本鎖iRNA、例えばiRNP）を指す。前記用語は、天然のヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸（すなわちオリゴヌクレオチド）を包含する。前記用語はまた合成骨格をもつ核酸様構造物を包含する（例えば以下を参照されたい：Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698; Sams tag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156）。

“アミノ酸”または“アミノ酸配列”にはオリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列、または前記のいずれかのフラグメント、部分またはサブユニット、並びに天然に存在する分子および合成分子が含まれる。“ポリペプチド”および“タンパク質”という用語には、ペプチド結合または改変ペプチド結合によって互いに結合したアミノ酸、すなわちペプチドイソステアー（同配体）が含まれ、20個の遺伝子によってコードされるアミノ酸以外の改変アミノ酸を含むことができる。“ポリペプチド”という用語にはまたペプチドおよびポリペプチドフラグメント、モチーフなども含まれる。前記用語はまたグリコシル化ポリペプチドを含む。本発明のペプチドおよびポリペプチドにはまた、下記でさらに詳細に記載されるように全ての“模倣体”および“ペプチド模倣体”が含まれる。

【0058】

“単離”という用語は、その本来の環境（物質が天然に存在する場合はその天然の環境）から移された物質を含む。例えば、生きている動物に存在する天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然の系と一緒に存在する物質のいくつかがまたは全てから分離されている前記ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されている。そのようなポリヌクレオチドはベクターの部分であってもよいし、および／またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であってもよく、それでもなおそのようなベクターまたは組成物は前記の天然の環境の一部ではないということで、それらは単離されている。本明細書で用いられるように、単離物質または組成物はまた“精製”された組成物であってもよく、すなわち、完全な純粋性は要求されず、むしろ相対的な定義が意図される。ライブラリーから得られる個々の核酸は電気泳動による均質度まで通常的に精製される。また別の特徴では、本発明は、ライブラリーまたは他の環境中のゲノムDNAもしくは他の配列から少なくとも 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 またはそれ以上に精製された核酸を提供する。

本明細書で用いられるように、“組換え（組換え体）”という用語には、その天然の環境では隣接していない“骨格”核酸に隣接する核酸が含まれ得る。ある特徴では、核酸は

、“骨格分子”核酸集団において核酸挿入物の数の5%またはそれ以上の数を占める。本発明の“骨格分子”には、関心のある核酸挿入物を維持または操作するために用いられる核酸、例えば発現ベクター、自己複製核酸、ウイルス、組み込み核酸、および他のベクターまたは核酸が含まれる。ある特徴では、組換え骨格分子集団において濃縮された核酸は、核酸挿入物の数の50%、51%、52%、53%、54%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれより多くを占める。“組換え”ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術によって製造されたポリペプチドまたはタンパク質、例えば所望のポリペプチドまたはタンパク質をコードする外因性DNA構築物によって形質転換された細胞から製造されたものを指す。“合成”ポリペプチドまたはタンパク質は、下記でさらに詳細に記載されるように化学的合成によって調製されたものである。

【0059】

プロモータ配列は、下記でさらに考察されるように、前記プロモータで転写を開始するRNAポリメラーゼがコード配列のmRNAへの転写を開始する場合には“機能可能に連結”されているであろう。

“オリゴヌクレオチド”には、一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは2本の相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖が含まれ、これらは化学的に合成することができる。そのような合成オリゴヌクレオチドは5'リン酸をもたず、したがってキナーゼの存在下でATPによりリン酸を付加されなければ別のオリゴヌクレオチドに連結されないであろう。合成オリゴヌクレオチドは脱リン酸化されていないフラグメントに連結することができる。

2つの核酸またはポリペプチドの関係で“実質的に同一”という語句は、公知のいずれかの配列比較アルゴリズム（下記で詳細に考察される）を用いるかまたは目視精査により最大一致のための比較およびアラインメントを実施したとき、例えば少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高いヌクレオチドまたはアミノ酸残基（配列）同一性を有する2つまたは3つ以上の配列を指すことができる。また別の特徴では、本発明は、本発明の典型的な配列と、少なくとも約10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000若しくはそれより多い残基にわたって、または前記核酸もしくはポリペプチドの約50残基からその完全長の範囲の領域にわたって実質的な配列同一性を有する核酸およびポリペプチド配列を提供する。本発明の核酸配列は、ポリペプチドコード領域の全長にわたって実質的に同一であり得る。

【0060】

“実質的に同一”なアミノ酸配列にはまた、1つまたは2つ以上の保存的もしくは非保存的アミノ酸置換、欠失または挿入（特にそのような置換が分子の活性をもたない部位で生じ、前記ポリペプチドがその機能的特性を本質的に維持していることを条件として）によって参照配列と異なる配列が含まれ得る。保存的アミノ酸置換は、例えばあるアミノ酸を同じクラスの別のアミノ酸で置換する（例えば疎水性アミノ酸（例えばイソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニン）で別の疎水性アミノ酸を置換、または極性アミノ酸で別のアミノ酸を置換、例えばアルギニンでリジンを置換、グルタミン酸でアスパラギン酸を置換、またはグルタミンでアスパラギンを置換）。1つまたは2つ以上のアミノ酸を例えばアミラーゼから欠失させて、その生物学的活性を顕著に変更することなく、前記ポリペプチドの構造を改変させることができる。例えば、アミラーゼ活性に必要なでないアミノ末端またはカルボキシル末端アミノ酸を除去することができる。

“ハイブリダイゼーション”は、核酸の鎖が相補的な鎖と塩基対形成によって結合する過程を含む。ハイブリダイゼーション反応は鋭敏で選択性があり、低い濃度でしか存在し

ないサンプルにおいてさえ関心のある固有配列を同定することができる。ストリンジェントな条件は、例えば前ハイブリダイゼーション溶液またはハイブリダイゼーション溶液中の塩もしくはホルムアミドの濃度によって、またはハイブリダイゼーション温度によって限定することができ、当業界で周知である。例えば、ストリンジェンシーは、下記で詳細に記載されるように、塩濃度の減少、ホルムアミド濃度の増加、またはハイブリダイゼーション温度の上昇、ハイブリダイゼーション時間の変更によって高めることができる。また別の特徴では、本発明の核酸は、本明細書に示す種々の（例えば高度、中等度および低度の）ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするその能力によって定義される。

【0061】

“変種”には、1つまたは2つ以上の塩基対、コドン、イントロン、エクソンまたはアミノ酸残基において改変され、しかもなお本発明のアミラーゼの生物学的活性を維持する本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドが含まれる。変種は、例えば変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンプリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンプリ、GSSMおよびそれらの任意の組合せを含む手段のいずれかにより作製することができる。例えば、野生型アミラーゼとは異なるpHまたは温度で活性を有する変種アミラーゼを作製する技術は本明細書に含まれている。

“飽和変異導入”または“GSSM（商標）”という用語には、下記に詳細に記載されているように、縮退オリゴヌクレオチドプライマーを用いて点変異をポリヌクレオチドに導入する方法が含まれる。

“最適化定方向進化システム”または“最適化定方向進化”という用語には、関連する核酸配列（例えば関連する遺伝子）のフラグメントを再アッセンプリングする方法が含まれ、下記で詳細に説明される。

“合成連結再アッセンプリ”または“SLR”という用語には、非確率的様式でオリゴヌクレオチドフラグメントを連結する方法が含まれ、下記で詳細に説明される。

【0062】

核酸の作製および操作

ある特徴では、本発明は、本発明の例示的な核酸と少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550若しくはそれより多くの残基の領域にわたって、少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な（100%）配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供する。ある特徴では、前記核酸はアミラーゼ活性（例えばアルファアミラーゼ活性）を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする。

例えば、以下の表は本発明の例示的ないくつかのアミラーゼコード核酸を示す。例えば、本発明は、配列番号:474に記載の配列を有するアミラーゼを提供し、これは配列番号:473に示される例示的なコード配列を有し、ある特徴では、このアミラーゼはイントロン及びエキソンを含む遺伝子によってコードされ、前記遺伝子は配列番号:467に記載の配列を有し、これは配列番号:468、配列番号:469、配列番号:470、配列番号:471及び配列番号:472に記載の配列を有するエキソンを含む、という具合である。

【0063】

アミ ラーゼ	完全長遺伝子 の配列番号(エ キソン及びイ ントロン)	エキソン配列 の配列番号	コード配列の DNA配列の 配列番号(エ キシンのみ)	コード配列の タンパク質配 列の配列番号 (エキソンのみ)	合計
A	460, 461	N/A	460	461	460, 461
B	462	463, 464	465	466	462 - 466
C	467	468 - 472	473	474	467 - 474
D	475	476 - 477	478	479	475 - 479
E	480	481 - 483	484	485	480 - 485
F	486	487 - 491	492	493	486 - 493
G	494	495 - 497	498	499	494 - 499
H	500	501 - 508	509	510	500 - 510
I	511	512 - 514	515	516	511 - 516
J	517, 518	N/A	517	518	517, 518
K	519	520 - 521	522	523	519 - 523
L	524	525 - 526	527	528	524 - 528
M	529	530 - 531	532	533	529 - 533
N	534	535 - 538	539	540	534 - 540
O	541	542 - 543	544	545	541 - 545
P	546	547 - 551	552	553	546 - 553
Q	554	555 - 557	558	559	554 - 559
R	560	561 - 564	565	566	560 - 566
S	587	588 - 592	593	594	587 - 594

10

20

上記に挙げたアミラーゼ（AからSに示したもの）及びそれらをコードする核酸は、それらは最初に真菌源から単離／誘導されたという点で共通の新規性を有する。

【0064】

本発明はまたグルコアミラーゼを提供する。それらは、例えば配列番号:594に記載の配列を有する酵素で、前記配列は、配列番号:587のゲノム配列の4111残基又は配列番号:593の1854残基長のcDNAによってコードされる。前記ゲノム配列、配列番号:587はイントロン及びエキソンを含み、前記エキソンは、配列番号:588、配列番号:589、配列番号:590、配列番号:591、配列番号:592に記載の配列を有するポリペプチドフラグメントをコードすることができる。ある特徴では、配列番号:594の残基32から617からなるプロセッシングされた“成熟”グルコアミラーゼが提供される。

30

本発明は、発現カセット、例えば本発明のポリペプチドをコードする発現ベクターを含む単離及び組換え核酸を提供する。本発明は、本発明の核酸を含む、又は本発明の核酸からなるプローブを提供する。本発明にはまた、本発明の核酸を用いて新規なアミラーゼ配列を発見する方法が含まれる。本発明にはまた、本発明の核酸を用いてアミラーゼ遺伝子、転写物及びポリペプチドの発現を阻害する方法が含まれる。さらに提供されるものは、例えば合成連結再アッセムブリ、最適化定方向進化システム及び／又は遺伝子部位飽和変異導入（GSSM(商標)）によって本発明の核酸を改変する方法である。

40

本発明の核酸は、例えばcDNAライブラリーのクローニング及び発現、メッセージ又はゲノムDNAのPCRによる増幅などによって作製、単離及び／又は操作される。本発明の方法の実施では、相同な遺伝子は本明細書に記載したように鋳型核酸を操作することによって改変することができる。本発明は、学術文献及び特許文献に詳細に記載されている、当業界で公知の任意の方法若しくはプロトコル又は装置を併用して実施することができる。

【0065】

一般技術：本発明の実施に用いられる核酸は、RNA、iRNA、アンチセンス核酸、cDNA、ゲ

50

ノムDNA、ベクター、ウイルス又は前記のハイブリッドのいずれであっても、種々の供給源から単離、遺伝的に操作、増幅、及び／又は組換えにより発現／作製することができる。これらの核酸から作製された組換えポリペプチドは個々に単離またはクローニングし、所望の活性について試験することができる。任意の組換え発現系（細菌、哺乳動物、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含む）を用いることができる。

あるいは、これら核酸は周知の化学的合成技術によってin vitroで合成することができる。前記技術は例えば以下に記載されている：Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; US Patent No. 4,458,066。 10

核酸操作のための技術、例えばサブクローニング、プローブの標識（例えばクレノーポリメラーゼ、ニックトランスレーション、増幅を用いるランダムプライマー標識）、配列決定、ハイブリダイゼーションなどは学術文献および特許文献に詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい：Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vols 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acids Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)。 20

【0066】

本発明の方法の実施に用いられる核酸を入手および操作するために有用なまた別の手段は、ゲノムサンプルからのクローニング、および所望の場合には、例えばゲノムクローンもしくはcDNAクローンから単離または増幅した挿入物のスクリーニングおよび再クローニングである。本発明の方法で用いられる核酸の供給源には、哺乳動物人工染色体（MAC）（例えば米国特許5,721,118号、同6,025,155号を参照されたい）、ヒト人工染色体（Rose nfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、P1人工染色体（Woon (1998) Genomics 50:306-316）、P1由来ベクター（PAC）（Ker n (1997) Biotechniques 23:120-124）、コスミド、組換えウイルス、ファージまたはプラスミドに含まれるゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーが含まれる。 30

ある特徴では、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、翻訳されたポリペプチドまたはそのフラグメントの分泌を誘導することができるリーダー配列とともに適切な局面でアッセムブリングされる。

【0067】

本発明は融合タンパク質およびそれらをコードする核酸を提供する。本発明のポリペプチドは異種ペプチドまたはポリペプチド、例えば所望の特性（例えば安定性増強または精製の簡便化）を付与するN-末端識別ペプチドと融合させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドはまた、より強い免疫原性をもつペプチドを製造するために、組換えにより合成されたペプチドをより容易に単離するために、抗体および抗体発現B細胞を同定および単離するために、その他の同様な目的のために、前記に結合した1つまたは2つ以上の追加のドメインを有する融合タンパク質として合成および発現させることができる。検出および精製を容易にするドメインには、例えば金属キレートペプチド（例えばポリヒスチジン鎖およびヒスチジン-トリプトファンモジュール（固定化金属上での精製を可能にする）、プロテインAドメイン（固定化免疫グロブリン上での精製を可能にする）、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製系（Immune Corp, Seattle WA）で利用されるドメインが含まれる。精製ドメインおよびモチーフ構成ペプチドまたはポリペプチド間の切断可能リンカー配列（例えばXa因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego CA））の挿入は精製を容易にする。例えば、発現ベクターは、6つのヒスチジン残基とそれに続くチオレドキシニン及びエンテロキナーゼ切断部位に連結されたエピトープコード核酸配列を含むことができる（例えば以下を参照されたい：Williams (1995) Biochemistry 34:17 40 50

87-1797; Dobeli (1998) Protein Expr. Purif. 12:404-414)。前記ヒスチジン残基は検出および精製を容易にし、一方、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質の残りの部分からエピトープを精製するための手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクターおよび融合タンパク質の利用に関する技術は学術文献および特許文献に詳しく記載されている（例えば以下を参照されたい：Kroll (1993) DNA Cell. Biol., 12:441-53）。

【0068】

転写および翻訳制御配列：本発明は、RNA合成／発現を誘導または調節するために発現（例えば転写または翻訳）制御配列（例えばプロモータまたはエンハンサー）に機能可能に連結された本発明の核酸（例えばDNA）配列を提供する。前記発現制御配列は発現ベクター内に存在し得る。例示的な細菌プロモータにはlacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPR、PLおよびtrpが含まれる。例示的な真核細胞プロモータにはCMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルスのLTRおよびマウスのメタロチオネインIが含まれる。

細菌でのポリペプチド発現に適したプロモーターには、大腸菌のlacまたはtrpプロモーター、lacIプロモーター、lacZプロモーター、T3プロモーター、T7プロモーター、gptプロモーター、ラムダPRプロモーター、ラムダPLプロモーター、糖分解酵素（例えば3-ホスホグセレートキナーゼ（PGK））をコードするオペロン由来のプロモーターおよび酸性ホスファターゼプロモーターが含まれる。真核細胞プロモーターには、CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、熱ショックプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、レトロウイルスのLTRおよびマウスのメタロチオネインIプロモーターが含まれる。原核細胞または真核細胞またはそれらのウイルスで遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーターもまた用いることができる。

【0069】

組織特異的植物プロモーター：本発明は、組織特異的態様で発現させることができる、例えば組織特異的態様で本発明のアミラーゼを発現させることができる発現カセットを提供する。本発明はまた、本発明のアミラーゼを組織特異的態様で発現する植物または種子を提供する。前記組織特異性は、種子特異的、茎特異的、葉特異的、根特異的、果実特異的などであり得る。

ある特徴では、構成的プロモーター（例えばCaMV35Sプロモーター）を植物若しくは種子の特定の部分又は植物全体での発現に用いることができる。例えば、過剰発現のためには、植物のいくつかの組織または全ての組織（例えば再生植物）で核酸の発現を指令する植物プロモーターフラグメントを用いることができる。そのようなプロモーターは、本明細書では“構成的”プロモーターと称され、ほとんどの環境条件下および生育または細胞分化状態で活性を示す。構成的プロモーターの例には、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35S転写開始領域、アグロバクテリア・ツメファシエンシス（*Agrobacterium tumefaciens*）のT-DNA由来1'-または2'-プロモーター、および当業者に公知の種々の植物遺伝子のその他の転写開始領域が含まれる。そのような遺伝子には、例えばアラビドプシス（*Arabidopsis*）のACT11（Huang (1996) Plant Mol. Biol. 33:125-139）；アラビドプシスのCat3（GenBank No. U43147、Zhong (1996) Mol. Gen. Genet. 251:196-203）；ブラシカ・ナプス（*Brassica napus*）のステアロイル-アシルキャリアタンパク質デサチュラーゼをコードする遺伝子（GenBank No. X74782、Solomon (1994) Plant Physiol. 104:1167-1176）；トウモロコシのGPc1（GenBank No. X15596、Martinez (1989) J. Mol. Biol. 208:551-565）；トウモロコシのGpc2（GenBank No. U45855、Manjunath (1997) Plant Mol. Biol. 33:97-112）；米国特許4,962,028号、同5,633,440号に記載された植物プロモーターが含まれる。

【0070】

本発明は、ウイルス由来の組織特異的または構成的プロモーターを用いる。これらには、例えばトバモウイルスのサブゲノムプロモーター（Kumagai (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1679-1683）；イネのツングロ杆状ウイルス（RTBV）（感染したイネの師部細胞でのみ複製し、強力な師部特異的レポーター遺伝子発現を駆動する）；キャッサバ葉脈

モザイクウイルス (CVMV) プロモーター (管状エレメント、葉の葉肉細胞および根の先端でもっとも強い活性を有する) (Verdaguer (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-1139)

あるいは、植物プロモーターは、特定の組織、器官または細胞タイプでアミラーゼ発現核酸の発現を指令するか (すなわち組織特異的プロモーター)、又はそうでなければより厳密な環境もしくは生育段階制御下に置くか、または誘導性プロモーターの制御下に置くことができる。転写に影響を与えることができる環境条件の例には、嫌気性条件、上昇温度、光の存在、化学物質／ホルモンの噴霧が含まれる。例えば、本発明は、トウモロコシの乾燥誘導プロモーター (Busk (1997) 上掲書) ; ジャガイモの低温、乾燥および高塩誘導プロモーター (Kirch (1997) Plant Mol. Biol. 33:897-909) を取り込んでいる。

10

【0071】

組織特異的プロモーターは、組織内の一定の時間枠内の生育段階内でのみ転写を促進することができる。例えば以下を参照されたい: Blazquez (1998) Plant Cell 10:791-800 (アラビドプシスのLEAFY遺伝子のプロモーターの特性を明らかにする)。さらにまた例えば以下を参照されたい: Cardon (1997) Plant J 12:367-377 (A. サリアナ (thaliana) の花の分裂組織同一性遺伝子AP1のプロモーター領域中の保存配列モチーフを認識する転写因子SPL3について記載している) ; およびMandel (1995) Plant Molecular Biology, vol 29, pp995-1004 (分裂組織プロモーターeIF4について記載している)。特定の組織のライフサイクルの全体を通して活性を有する組織特異的プロモーターを用いることができる。ある特徴では、本発明の核酸は、主としてワタの繊維細胞でのみ活性を示すプロモーターに機能的に連結される。ある特徴では、本発明の核酸は、例えば上掲書 (Rinehart (1996)) に記載されたように、主としてワタの繊維細胞の伸張期間に活性を示すプロモーターに機能的に連結される。核酸は、ワタの繊維細胞で優先的に発現されるようにFb12 A遺伝子プロモーターに機能的に連結することができる (上掲書)。さらに以下を参照されたい: John (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5769-5773 ; John et al., US Patent No. 5,608,148, 5,602,321 (前記にはワタの繊維特異的プロモーターおよびトランスジェニックな綿の木を構築する方法が記載されている)。根特異的プロモーターもまた本発明の核酸の発現に用いられる。根特異的プロモーターの例には、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子由来のプロモーターが含まれる (DeLisle (1990) Int. Rev. Cytol. 123:39-60)。本発明の核酸の発現に用いることができる他のプロモーターには、例えば胚珠特異的、胚特異的、内胚葉特異的、珠皮特異的、種子外皮特異的プロモーター、またはこれらのいくつかの組合せ; 葉特異的プロモーター (例えば以下を参照されたい: Busk (1997) Plant J. 11:1285-1295、前記にはトウモロコシの葉特異的プロモーターが記載されている) ; アグロバクテリウム・リゾゲネス (Agrobacterium rhizogenes) 由来のORF13プロモーター (根で高い活性を示す (上掲書 (Hansen, 1997) を参照されたい)) ; トウモロコシの花粉特異的プロモーター (例えば以下を参照されたい: Guerrero (1990) Mol. Gen. Gnet. 224:161-168) ; 果実成熟時、葉の老化および器官離脱時に活性を示すトマトのプロモーター (前記より低頻度で花のプロモーターも用いることができる) (例えば以下を参照されたい: Blume (1997) Plant J. 12:731-746) ; ジャガイモのSK2遺伝子由来のめしべ特異的プロモーター (例えば以下を参照されたい: Ficker (1997) Plant Mol. Biol. 35:425-431) ; エンドウマメのBlec4遺伝子 (トランスジェニックアルファルファの栄養および生殖茎頂の表皮組織で活性を示し、活発に生長しているシュートまたは繊維の表皮層で外来遺伝子を発現するために有用である) ; 珠皮特異的BEL1遺伝子 (例えば以下を参照されたい: Reiser (1995) Cell 83:735-742, GenBank No. U39944) ; および／または米国特許第5,589,583号 (Klee) (分裂組織および／または急速に分裂している細胞で高レベルの転写を付与することができる植物プロモーターについて記載) のプロモーターが含まれる。

20

30

40

【0072】

あるいは、植物ホルモン (例えばオーキシン) の暴露に際して誘導することができる植物プロモーターを用いて本発明の核酸を発現させる。例えば、本発明は以下を用いること

50

ができる：ダイズ (*Glycine max* L.) のオーキシン応答エレメントE1プロモーターフラグメント (AuxRE) (Liu (1997) *Plant Physiol.* 115:397-407) ; オーキシン応答アラビドプシスGST6プロモーター (サリチル酸および過酸化水素にも反応性である) (Chen (1996) *Plant J.* 10:955-966) ; タバコのオーキシン誘導parCプロモーター (Sakai (1996) 37:906-913) ; 植物ビオチン応答エレメント (Streit (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:933-937) ; およびストレスホルモンアブシジン酸に応答するプロモーター (Sheen (1996) 274:1900-1902) 。

本発明の核酸はまた、植物に適用可能な化学的試薬 (例えば農薬または抗生物質) の暴露に際して誘導することができる植物プロモーターに機能的に連結することもできる。例えば、トウモロコシのIn2-2プロモーター (ベンゼンスルホンアミド農薬の毒性緩和剤によって活性化される) を用いることができる (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577) 。種々の農薬の毒性緩和剤の適用によって、根、排水組織、茎頂分裂組織での発現を含む別個の遺伝子発現パターンが誘導される。コード配列は、例えばテトラサイクリン誘導プロモーター (例えばアヴェナ・サティヴァL. (エンバク) のアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子 (Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473) を含むタバコのトランスジェニック植物で開示されたとおり) 、またはサリチル酸応答エレメント (Stange (1997) *Plant J.* 11:1315-1324) の制御下に置くことができる。化学的に (例えばホルモンまたは殺虫剤によって) 誘導されるプロモーター (すなわち野外でトランスジェニック植物に適用することができる化学物質に対し応答するプロモーター) を用いて、本発明のポリペプチドの発現を植物の生育の特定の段階で誘導することができる。したがって、本発明はまた、その宿主域が標的植物種 (例えば、トウモロコシ、イネ、オオムギ、コムギ、s ジャガイモまたはその他の穀物類) に限定される、作物の任意の生育段階で誘導可能な本発明のポリペプチドをコードする誘導性遺伝子を含むトランスジェニック植物を提供する。

【0073】

当業者には、組織特異的植物プロモーターは標的組織以外の組織で機能できるように連結された配列の発現を駆動することができることは理解されよう。したがって、組織特異的植物プロモーターは、標的組織または細胞タイプで優先的に発現を駆動させることができるが、他の組織でもまた同様にある程度の発現を誘導することができるプロモーターである。

本発明の核酸はまた、化学的試薬に暴露されたときに誘導される植物プロモーターに機能できるように連結することができる。前記の試薬には、例えば農薬、合成オーキシンまたは抗生物質が含まれる。これらはトランスジェニック植物に適用、例えば噴霧することができる。本発明のアミラーゼ生成核酸の誘導性発現によって、栽培者は最適アミラーゼ発現および／または活性を有する植物を選別することができる。植物の部分の発達はしたがって制御可能である。このようにして、本発明は、植物および植物の部分の収穫を促進する手段を提供する。例えば、種々の実施態様では、トウモロコシのIn2-2プロモーター (ベンゼンスルホンアミド農薬の毒性緩和剤によって活性化される) が用いられる (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577) 。種々の農薬の毒性緩和剤の適用によって、根、排水組織、茎頂分裂組織での発現を含む別個の遺伝子発現パターンが誘導される。本発明のコード配列は、例えばテトラサイクリン誘導性プロモーター (例えばアヴェナ・サティヴァL. (エンバク) のアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子 (Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473) を含むタバコのトランスジェニック植物で開示されたとおり) 、またはサリチル酸応答エレメント (Stange (1997) *Plant J.* 11:1315-1324) の制御下にある。

適切なポリペプチド発現が所望される場合には、コード領域の3'末端のポリアデニル化領域を含めるべきである。ポリアデニル化領域は、天然の遺伝子 (種々の他の植物遺伝子に由来する) 、またはアグロバクテリウムのT-DNAの遺伝子から由来しても良い。

【0074】

発現ベクターおよびクローニングベヒクル：本発明は、本発明の核酸、例えば本発明の

アミラーゼをコードする配列を含む発現ベクターおよびクローニングベヒクルを提供する。本発明の発現ベクターおよびクローニングベヒクルは、ウイルス粒子、バキュロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、細菌人工染色体、ウイルスDNA（例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびSV40の誘導體）、P1系人工染色体、酵母プラスミド、酵母人工染色体、および関心のある特定宿主（例えばバチルス、アスペルギルスおよび酵母）に特異的な他の任意のベクターが含まれる。本発明のベクターには染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列が含まれる。多くの適切なベクターが当業者に知られており、市場で入手できる。典型的なベクターには以下が含まれる：細菌系：pQ Eベクター（Qiagen）、pBluescriptプラスミド、pNHベクター、ラムダ-ZAPベクター（Stratagene）、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T（Pharmacia）；真核細胞系：pXT1、pSG5（Stratagene）、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40（Pharmacia）。しかしながら、他の任意のプラスミドまたは他のベクターもまた、それらが宿主内で複製可能でさらに生存可能である限り用いることができる。低コピー数または高コピー数ベクターを本発明に関して用いることができる。

前記発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写終了因子を含むことができる。発現を増幅させるために、ベクターはまた適切な配列を含むことができる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、必要な任意のリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列および5'フランキング非翻訳配列を含むことができる。いくつかの特徴では、SV40スプライシングおよびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いて、必要な非転写遺伝子エレメントを提供することができる。ある特徴では、発現ベクターは1つまたは2つ以上の選別可能なマーカー遺伝子を含み、前記ベクターを含む宿主細胞の選別を可能にする。そのような選別可能マーカーには、真核細胞培養に対してはジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子またはネオマイシン耐性を付与する遺伝子、大腸菌ではテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性を付与する遺伝子、および*S. cerevisiae* (S. cerevisiae) TRP1遺伝子が含まれる。プロモーター領域は、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ（CAT）ベクターまたは選別可能なマーカーを有する他のベクターを用いて、所望される任意の遺伝子から選択できる。

【0075】

真核細胞中でポリペプチドまたはそのフラグメントを発現させるためのベクターはまた発現レベルを高めるためにエンハンサーを含むことができる。エンハンサーはDNAのcis-作動性エレメントであり、通常は長さが約10から約300bpであってプロモーターに作用してその転写を高める。その例には、複製起点の後期側100bpから270bpにあるSV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。

核酸配列は多様な方法によってベクターに挿入することができる。一般的には、前記配列は、適切な制限エンドヌクレアーゼによる挿入物およびベクターの消化に続いてベクター内の所望の位置に連結される。また別には、挿入物とベクターの両方の平滑末端を連結することもできる。多様なクローニング技術が当業界で公知であり、例えばAusubel and Sambrookに記載されている。そのような技術および他の技術は当業者の技術範囲内であろう。

ベクターはプラスミド、ウイルス粒子またはファージの形態を有し得る。他のベクターには染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列、SV40の誘導體、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組合せに由来するベクター、ウイルスDNA、例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルスが含まれる。原核細胞および真核細胞宿主で使用できる多様なクローニングベクターおよび発現ベクターは例えばSambrookによって記載されている。

使用できる具体的な細菌ベクターには、以下の周知のクローニングベクターの遺伝子エレメントを含む市販のプラスミドが含まれる：pBR322（ATCC37017）、pKK223-3（Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden）、GEM1（Promega Biotec, Madison, WI, USA）、

pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pD10、psiX174Bluescript I IKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)、pKK232-8およびpCM7。具体的な真核細胞ベクターには、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (Pharmacia) が含まれる。しかしながら他のベクターのいずれも宿主細胞内で複製可能で生存可能である限り使用することができる。

【0076】

本発明の核酸は、発現カセット、ベクターまたはウイルスで発現させることができ、さらに一過性または安定的に植物細胞および種子で発現させることができる。ある例示的な一過性発現系はエピソーム発現系、例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) のウイルスRNA (スーパーコイルDNAを含むエピソームミニ染色体の転写によって核内で生成される) を用いる (例えば以下を参照されたい: Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1633-1637)。あるいは、コード配列 (すなわち本発明の完全な配列または部分配列) を植物宿主細胞ゲノムに挿入して宿主染色体DNAの組込み部分を形成することができる。センスまたはアンチセンス転写物を前記のようにして発現させることができる。本発明の核酸由来の配列 (例えばプロモーターまたはコード配列) を含むベクターは植物細胞または種子に選別可能な表現型を付与するマーカー遺伝子を含むことができる。例えば、殺菌物質耐性、特に抗生物質耐性 (例えばカナマイシン、G418、ブレオマイシン、ヒグロマイシンに対する耐性)、または農薬耐性 (例えばクロロスルフロンまたはバスタに対する耐性) をコードすることができる。

植物で核酸およびタンパク質を発現することができる発現ベクターは当業界において周知で、例えばアグロバクテリウム種、ジャガイモのウイルスX (例えば以下を参照されたい: Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3648)、タバコモザイクウイルス (例えば以下を参照されたい: Casper (1996) Gene 173:69-73)、トマトのブッシースタントウイルス (例えば以下を参照されたい: Hillman (1989) Virology 169:42-50)、タバコのエッチウイルス (例えば以下を参照されたい: Dolja (1997) Microbiol. Immunol. 37:471-476)、ビーニングールデンモザイクウイルス (例えば、Morinaga(1993) Microbiol Immunol. 37:471-476を参照されたい)、カリフラワーモザイクウイルス (例えば以下を参照されたい: Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:1094-1101)、トウモロコシAc/Ds転移因子 (例えば以下を参照されたい: Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194)、およびトウモロコシサプレッサー - ミューテータ (Spm) 転移因子 (例えば以下を参照されたい: Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725)、並びに前記の誘導体が含まれよう。

【0077】

ある特徴では、発現ベクターは、2つの生物で (例えば、発現のために哺乳動物細胞または昆虫細胞で、クローニングおよび増幅のために原核細胞で) 維持することができるように2つの複製系を含むことができる。さらにまた、発現ベクターを組み込ませるために、発現ベクターは宿主細胞ゲノムと相同な少なくとも1つの配列を含むことができる。発現ベクターは、前記発現構築物にフランキングする2つの相同な配列を含むことができる。組み込みベクターは、ベクター内に含まれる適切な相同配列を選択することによって固有の遺伝子座に誘導することができる。ベクター組み込みのための構築物は当業界で周知である。

本発明の発現ベクターはまた選別可能なマーカー遺伝子を含み、形質転換された細菌株の選別を可能にすることができる。前記遺伝子は、例えば細菌を薬剤 (例えばアンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、ネオマイシンおよびテトラサイクリン) に耐性にする遺伝子である。選別可能マーカーにはまた、生合成遺伝子、例えばヒスチジン、トリプトファンおよびロイシン生合成経路の遺伝子が含まれる。

【0078】

宿主細胞および形質転換細胞: 本発明はまた、本発明の核酸配列、例えば本発明のアミラーゼをコードする配列、または本発明のベクターを含む形質転換細胞を提供する。前記

宿主細胞は、当業者に周知の任意の宿主細胞であって、原核細胞、真核細胞、例えば細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞が含まれ得る。例示的な細菌細胞には、大腸菌、一切のストレプトミセスまたはバチルス（例えばバチルス・セレウス(Bacillus cereus)、バチルス・ズブチリス）、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) 並びにバチルス、ストレプトミセスおよびスタフィロコッカス属の種々の種が含まれる。例示的な昆虫細胞には、ドロソフィラS2およびスポドプテラSf9が含まれる。例示的な動物細胞にはCHO、COSまたはボウズ・メラノーマまたは任意のマウスおよびヒト細胞株が含まれる。適切な宿主を選択することは当業者の技術範囲内である。多様な高等植物種を形質転換する技術は周知で、技術文献および学術文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477；米国特許5,750,870号。

10

ベクターは、多様な任意の技術を用いて前記宿主細胞に導入することができる。前記技術には、形質転換、トランスフェクション、形質導入、ウイルス感染、遺伝子銃またはTi仲介遺伝子伝達が含まれる。具体的な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン仲介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる (L. Davis, M. Digner, I. Battey, Basic Methods in Molecular Biology, (1986))。

【0079】

ある特徴では、本発明の核酸またはベクターはスクリーニングのために細胞に導入される。したがって前記核酸はその後の核酸の発現に適した態様で細胞に導入される。導入方法は、主として標的細胞タイプによって決定される。典型的な方法にはCaPO₄沈殿、リポソーム融合、リポフェクション（例えばLIPOFECTIN（商標））、エレクトロポレーション、ウイルス感染などが含まれる。候補核酸は宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれるか（例えばレトロウイルス導入による）、または細胞質に一過性もしくは安定的に存在することができる（すなわち慣例的なプラスミドを使用し、標準的な調節配列、選別マーカールなどを利用する）。多くの医薬的に重要なスクリーニングではヒトまたはモデル動物細胞の標的が要求されるので、そのような標的にトランスフェクトすることができるレトロウイルスが好ましい。

20

適切な場合には、操作によって生成した宿主細胞は、プロモーターの活性化に適切なように改変した通常の栄養培地で培養し、形質転換体を選別するか、または本発明の遺伝子を増幅することができる。適切な宿主株を形質転換し、さらに適切な細胞密度に前記宿主株を増殖させた後、選択したプロモーターを適切な手段（例えば温度シフトまたは化学的誘導）によって誘導し、さらに追加の期間培養して所望のポリペプチドまたはそのフラグメントを産生させることができる。

30

【0080】

細胞を遠心分離によって採集し、物理的または化学的手段により破壊し、得られた粗抽出物を更なる精製のために維持することができる。タンパク質の発現に用いた微生物細胞は任意の一般的な方法によって破壊することができる。そのような方法には、凍結融解の繰り返し、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用が含まれる。そのような方法は当業者には周知である。発現ポリペプチドまたはそのフラグメントは、組換え細胞培養から以下を含む方法によって回収および精製することができる：硫酸またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用によるクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー。タンパク質の再折りたたみ工程は、ポリペプチドの立体構造の完成に際して必要に応じて用いることができる。所望の場合には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を最終精製工程に用いることができる。

40

【0081】

種々の哺乳動物細胞培養系もまた組換えタンパク質の発現に用いることができる。哺乳動物発現系の例には、サル腎線維芽細胞のCOS-7株および、コンパチブルベクターからタ

50

ンパク質を発現させることができる他の細胞株、例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株が含まれる。

宿主細胞内の構築物を通常の態様で用い、組換え配列によってコードされる遺伝子生成物を産生させることができる。組換え生産方法で用いる宿主細胞にしたがって、ベクターを含む宿主細胞により産生されるポリペプチドをグリコシル化されることも、またグリコシル化されないこともある。本発明のポリペプチドはまた最初のメチオニン残基を含むことも含まないこともある。

無細胞翻訳系もまた本発明のポリペプチドの製造に利用することができる。無細胞翻訳系は、前記ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸に機能可能に連結されたプロモーターを含むDNA構築物から転写されたmRNAを用いることができる。いくつかの10
特徴では、前記DNA構築物は、*in vitro*転写反応実施前に直鎖化することができる。続いて適切な無細胞翻訳抽出物（例えばウサギ網状赤血球抽出物）とともに前記転写mRNAをインキュベートし、所望のポリペプチドまたはそのフラグメントを生成する。

発現ベクターは1つまたは2つ以上の選別可能な遺伝子を含み、形質転換された宿主細胞の選別用表現型特質（真核細胞の場合にはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、大腸菌では例えばテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性）を提供することができる。

【0082】

核酸の増幅：本発明の実施では、本発明の核酸および本発明のポリペプチドをコードする核酸または本発明の改変核酸は増幅によって再生させることができる。増幅はまた本発10
明の核酸のクローニングまたは改変にも用いることができる。したがって、本発明は、本発明の核酸を増幅するための増幅プライマー配列対を提供する。当業者は、これら配列の任意の部分またはその完全長のための増幅プライマー配列対を設計することができる。

増幅反応はまたサンプル中の核酸の量（例えば細胞サンプル中のメッセージの量）の定量、核酸の標識（例えば前記核酸をアレイまたはプロットに適用する）、前記核酸の検出、またはサンプル中の特定の核酸量の定量に用いることができる。本発明のある特徴では、細胞またはcDNAライブラリーから単離したメッセージが増幅される。

【0083】

当業者は適切なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択および設計することができる。増幅方法はまた当業界で周知であり、例えば以下が含まれる：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば以下を参照されたい：PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, ed. Innis, Academic Press, NY (1990); PCR Strategies (1995) ed. Innis, Academic Press, Inc., NY）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば以下を参照されたい：Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117）、転写増幅（例えば以下を参照されたい：Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 86:1173）、およびセルフサステイン配列複製（例えば以下を参照されたい：Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874）、Qベータレプリカーゼ増幅アッセイ（例えば以下を参照されたい：Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271）、自動Q-ベータレプリカーゼ増幅アッセイ（例えば以下を参照されたい：Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271）および他のRNAポリメラーゼ仲介技術（例えば以下を参照されたい：NAS 40
BA, Cangene, Mississauga, Ontario）。さらにまた以下を参照されたい：Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; US Patent Nos. 4,683,195および4,683,202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564。

【0084】

配列同一性の程度の決定

本発明は、本発明の例示的な核酸と少なくとも約50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550またはそれより多くの残基領域にわたって少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72% 50

、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な(100%)配列同一性を有する配列を含む核酸を提供する。本発明は、本発明の典型的なポリペプチドと少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれ以上の、又は完全な(100%)配列同一性を有する配列を含むポリペプチドを提供する。配列同一性(相同性)の程度は、任意のコンピュータプログラムおよび付属のパラメーター(本明細書に記載されたもの、例えばBLAST2.2.2またはFASTA ver. 3.0t78を含む)を規定値パラメーターとともに用いて決定することができる。

【0085】

図35は、本発明の例示的な核酸及びポリペプチドの選択された特徴を記載したチャートである(公開データベースと前記典型的な配列との配列同一性の比較を含む)。図35に記載した全ての配列を2組のデータベースに対してBLAST検索(下記に詳細に記載されている)に付した。第一の組のデータベースはNCBI(National Center for Biotechnology Information)から利用できる。これらデータベースに対する全検索結果は、“NRの説明”(NR Description)、“NRのアクセッションコード”(NR Accession Code)、“NRのE値”(NR E value)、又は“NR生物”(NR Organism)と表記された欄で見出される。“NR”はNCBIによって維持されているノンリダンダントヌクレオチドデータベースを指す。前記データベースは、GenBank、GenBankアップデート及びEMBLアップデートの混合物である。“NRの説明”欄の記載は、与えられた任意のNCBI記録における限定情報を示す(前記記録には配列の説明、例えば生物源、遺伝子の名称/タンパク質の名称、又は配列の機能についての何らかの説明が含まれる)。“NRのアクセッションコード”欄の記載は、配列記録に与えられた固有のアイデンティファイアーを示す。“NRのE値”欄の記載は期待値(E値)を示し、前記期待値は、問い合わせ配列(本発明の配列)とデータベースの配列との間で見出されるアラインメントスコアと同じように良好なスコアが、本BLAST検索で実施された比較と同じ数の比較でランダムな配列間で見出される確率を表す。“NR生物”欄の記載は、もっとも近縁のBLASTヒットとして同定された配列の生物源を示す。第二の組のデータベースはひとまとめにしてGeneseq(商標)データベースとして知られており、Thomson Derwent(Philadelphia, PA)から入手できる。このデータ別に対する検索の全ての結果は、“Geneseqタンパク質の説明”(Geneseq Protein Description)、“Geneseqタンパク質のアクセッションコード”(Geneseq Protein Accession Code)、“Geneseqタンパク質のE値”(Geneseq Protein Evalute)、“Geneseq DNAの説明”(Geneseq DNA Description)、“Geneseq DNAのアクセッションコード”(Geneseq DNA Accession Code)又は“Geneseq DNAのE値”(Geneseq DNA Evalute)と表記された欄で見出される。これらの欄で見出される情報は、それらがNCBIデータベースの代わりにGeneseq(商標)のデータベースに対するBLAST検索から得られたという点を除いて、上記に記載したNR欄で見出される情報に匹敵する。さらにまた、前記の表は“予想EC番号”(Predicted EC No.)欄を含んでいる。EC番号は、国際生化学分子生物学協会(International Union of Biochemistry and Molecular Biology(IU BMB))の命名委員会の酵素委員会によって開発された標準化酵素命名法の方式にしたがって酵素のタイプに割り当てられた番号である。“予想EC番号”欄の結果は、Kegg(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)データベースに対するBLAST検索によって決定される。最高のBLASTマッチングが e^{-6} 以下のE値を有するならば、前記最高マッチングに割り当てられるEC番号が表に入力される。最高のヒットのEC番号が、本発明の配列のEC番号が何であるかの指標として用いられる。“問い合わせDNAの長さ”(Query DNA Length)欄及び“問い合わせタンパク質の長さ”(Query Protein Length)欄は、NCBI又はGeneseqデータベースのどちらかに対して検索又は問い合わせた本発明の配列中のそれぞれヌクレオチド数又はアミノ酸数を指す。“Geneseq又はNR DNAの長さ”(Geneseq or NR DNA Length)

th) 欄及び “ Geneseq又はNRタンパク質の長さ ” (Geneseq or NR Protein Length) 欄は、BLAST検索で最高マッチングを示した配列中のそれぞれヌクレオチド数又はアミノ酸数を指す。これらの欄で提供される結果は、NCBIデータベース又はGeneseqデータベースのどちらかで最低のE値を返した検索のものである。 “ Geneseq又はNRの %IDタンパク質 ” (Geneseq or NR%ID Protein) 欄及び “ Geneseq又はNRの %ID DNA ” (Geneseq or NR %ID DNA) 欄は、本発明の配列と最高のBLASTマッチを示す配列との間のパーセント配列同一性を示す。これらの欄の結果は、NCBIデータベース又はGeneseqデータベースのどちらかで最低のE値を返した検索のものである。

【0086】

相同な配列にはまたRNA配列が含まれる (RNA配列では核酸配列のチミンはウリジンに置換されている)。相同な配列は本明細書に記載されている方法のいずれかを用いて入手できるが、またシーケンシングエラーの修正から得ることができる。本明細書に示される核酸配列は、伝統的な一文字様式 (例えば以下を参照されたい: Lubert Stryer, Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York) または配列内のヌクレオチドの実体を記録する他の任意の様式で表現することができることは理解されよう。

本発明のこの特徴では本明細書で特定した種々の配列比較アルゴリズムが用いられる。タンパク質および/または核酸配列の同一性 (相同性) は、当業界で公知の多様な配列比較アルゴリズムおよびプログラムのいずれかを用いて評価することができる。そのようなアルゴリズムおよびプログラムには、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALWが含まれるが、ただしこれらに限定されない (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993)。

【0087】

相同性または同一性は配列解析ソフト (例えばジネティクスコンピュータグループ (University of Wisconsin Bitechology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705) の配列解析ソフトウェアパッケージ) を用いて測定できる。そのようなソフトは、種々の欠失、置換および他の改変に対して相同性の程度を決めることによって類似の配列を見つける。2つまたは3つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関して “ 相同性 ” および “ 同一性 ” という用語は、比較ウィンドウまたは指定の領域上で、任意の数の配列比較アルゴリズムを使用するかまたは手動アラインメントおよび目視精査による測定にしたがって最大一致を求めて比較およびアラインメントを実施したとき、同じであるかまたは特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチドが同じである2つまたは3つ以上の配列を指す。配列比較の場合、一方の配列は参照配列 (例えば本発明の配列) として機能し、前記に対してテスト配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いるとき、テスト配列および参照配列はコンピュータに入力され、部分配列同等物が必要な場合に指定され、さらに配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。規定値プログラムパラメーターを用いることができるが、また別のパラメーターを指定することもできる。続いて配列比較アルゴリズムは、前記のプログラムパラメーターを基に参照配列に対するテスト配列のパーセント配列同一性を計算する。

【0088】

本明細書で用いられる “ 比較ウィンドウ ” は、任意数の連続残基セグメントに対する参照を含む。例えば本発明の別の特徴では、本発明の典型的なポリペプチドまたは核酸配列の20から完全長の間のいずれかの範囲の連続残基が、同じ数の連続した箇所の参照配列と前記2つの配列を最適にアラインメントした後で比較される。参照配列が本発明の例示的なポリペプチドまたは核酸配列と必要な配列同一性を有するならば、例えば50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い配列同一性を本発明の配列に対して有するならば、前記配列は本発明の範囲に包含される。また別の実施態様では、約20から600、約50から200、および約100から150の範囲の部分配列が、同じ数の連続した箇所の参照配列と前記2つの配列を最適にアラインメントした後で比較される。

【0089】

配列比較のアラインメントを実施する方法は当業界では周知である。配列比較の最適アラインメントは、例えばSmith & Watermanの局所相同性アルゴリズム (Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)) によって、Needleman & Wunschの相同性アラインメントアルゴリズム (J. Mol. Biol. 48:443 (1970)) によって、Pearson & Lipmanの類似性検索方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)) によって、前記アルゴリズムのコンピュータによる実施によって (GAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、または手動アラインメントと目視精査によって実施できる。相同性または同一性決定のための他のアルゴリズムには、BLASTプログラム (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information) の他に、ALIGN、AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences)、AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment)、ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool)、BANDS、BESTSCOR、BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node)、BLIMPS (BLOCKS IMPROVED SEARCHER)、FASTA、Intervals & Points、BMB、CLUSTALV、CLUSTALW、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Watermanアルゴリズム、DARWIN、ラスベガスアルゴリズム、FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool)、フレームアライン、フレームサーチ、DYNAMIC、FILTER、FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package)、GAP (Global Alignment Program)、GENAL、GIBBS、GenQuest、ISSC (Sensitive Sequence Comparison)、LALIGN (Local Sequence Alignment)、LCP (Local Content Program)、MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench)、MAP (Multiple Alignment Program)、MBLKP、MBLKN、PIMA (Pattern-Induced Multi-Sequence Alignment)、SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) およびWHAT-IFが含まれる。前記のようなアラインメントプログラムはまたゲノムデータベースのスクリーニングに用いられ、実質的に同一の配列をもつポリヌクレオチド配列を同定することができる。多数のゲノムデータベースが利用可能で、例えばヒトゲノムの実質的部分がヒトゲノム配列決定プロジェクト (Gibbs, 1995) の一部分として利用可能である。いくつかのゲノムの配列、例えばM. ジェニタリウム (genitalium) (Fraser et al., 1995)、M. ジャナスキイー (jannaschii) (Bult et al., 1996)、H. インフルエンザ (Fleischmann et al. 1995)、大腸菌 (Blattner et al. 1997)、酵母 (S. cerevisiae) (Mewes et al. 1997) およびD.メラノガスター (melanogaster) (Adams et al., 2000) の配列が決定された。顕著な進展がモデル生物 (例えばマウス、C. エレガンス およびアラビドプシス種 (Arabidopsis sp.)) のゲノム配列決定で達成された。いくつかの機能的情報の注釈をもつゲノム情報を含むデータベースが種々の機関で維持されており、インターネットでアクセスすることができる。

【0090】

BLAST、BLAST2.0およびBLAST2.2.2アルゴリズムもまた本発明の実施に用いることができる。前記アルゴリズムは例えば以下に記載されている: Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410。BLAST解析を実施するソフトは、National Center for Biotechnology Informationから公開されている。このアルゴリズムは、問い合わせ配列内の長さがWの短いワードを特定することによって高スコアをもつ配列対 (HSP) をまず初めに特定することを必要とする。前記は、データベース配列中の同じ長さを持つワードとアラインメントを実施したとき、一致するかまたはいくらかの正の値をもつ閾値スコアTの条件を満たす。Tは近傍ワードスコア閾値と称される (Altschul (1990) 上掲書)。これらの最初の近傍ワードヒットはそれらを含むより長いHSPを見つけるための検索開始の種として機能する。前記ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加する限り各配列の両方向に沿って伸長される。累積スコアは、ヌクレオ

チド配列についてはパラメーターM（一致残基対のための褒賞スコア、常に >0 ）を用いて計算される。アミノ酸配列の場合、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアが計算される。各方向のワードヒットの伸長は以下の場合に停止する：累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ下降したとき；累積スコアが、1つまたは2つ以上の負のスコアを与える残基アラインメントの累積のために0またはそれ以下になったとき；またはどちらかの配列の末端に達したとき。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは前記アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、規定値として11のワード長、10の期待値（E）、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、3のワード長および10の期待値（E）、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915）アラインメント（B）50、期待値（E）10、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。BLASTアルゴリズムはまた2つの配列間の類似性の統計的解析を実施する（例えば以下を参照されたい：Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873）。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性測定の1つは最小合計確率（ $P(N)$ ）であり、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然によって生じる確率を示す。例えば、テスト核酸と参照核酸の比較で最小合計確率が約0.2未満、好ましくは約0.01未満、もっとも好ましくは約0.001未満であるならば、前記核酸は参照配列と類似であると考えられる。ある特徴では、タンパク質および核酸配列相同性はベーシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール（Basic Local Alignment Search Tool, “BLAST”）を用いて評価される。例えば、5つの特別なBLASTプログラムを用いて以下のタスクを実施することができる：（1）BLASTPおよびBLAST3はアミノ酸の問い合わせ配列をタンパク質配列データベースと比較する；（2）BLASTNはヌクレオチドの問い合わせ配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；（3）BLASTXは問い合わせヌクレオチド配列（その両方の鎖）の仮想的な6つのフレーム翻訳生成物をタンパク質配列データベースと比較する；（4）TBLASTNは問い合わせベースと比較する；さらに（5）TBLASTXはヌクレオチド問い合わせ配列の6つの読み枠翻訳物をヌクレオチド配列データベースの6つの読み枠翻訳物と比較する。BLASTプログラムは類似のセグメントを同定することによって相同な配列を同定する。前記セグメントは本明細書では問い合わせアミノ酸または核酸配列とテスト配列間の“高スコアセグメントペア”と称され、好ましくはタンパク質または核酸配列データベースから得られる。高スコアセグメントペアは好ましくは、スコアリングマトリックス（その多くは当業界で公知である）によって特定される（すなわちアラインメントが実施される）。好ましくは、使用されるスコアリングマトリックスはBLOSUM62マトリックスである（Gonnet et al., Science 256:1443-1445 (1992); Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61 (1993)）。好ましさは劣るが、PAMまたはPAM250もまた用いることができる（例えば以下を参照されたい：Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation）。

【0091】

本発明のある特徴では、核酸が本発明の範囲内のものであるために必要な配列同一性を有するか否かを決定するためにNCBI BLAST 2.2.2プログラムが用いられる。規定値オプションはblastpである。BLAST 2.2.2プログラムには約38の設定オプションがある。

本発明のこの例示的な特徴では、フィルタリング設定規定値を除いて全ての規定値が用いられる（すなわち全てのパラメーターはフィルタリング（OFFに設定される）を除いて規定値に設定される）。フィルタリングは規定値の代わりに“-FF”設定が用いられ、これはフィルタリングを無効にする。規定値のフィルタリングはしばしば、配列の長さが短いためにKarlin-Altschulバイオレーションを生じる。

本発明のこの例示的な特徴で用いられる規定値には以下が含まれる：

“低複雑度用フィルター：ON

ワードサイズ：3

マトリックス：Blosom62

10

20

30

40

50

ギャップコスト：エグジスタンス：11
エクステンション：1”

他の規定値は以下のとおりである：低複雑度用フィルターはOFF、タンパク質のためのワードサイズは3、BLOSUM62マトリックス、ギャップ存在のペナルティーは-11、およびギャップ伸長のペナルティーは-1。

例示的なNCBI BLAST2.2.2プログラム設定は“-W”オプションの規定値が0である。これは、設定されなければワードサイズの規定値はタンパク質で3、ヌクレオチドで11であることを意味する。

【0092】

コンピュータシステムおよびコンピュータプログラム製品

10

配列同一性、構造的相同性、モチーフなどをコンピュータシステムで決定および同定するために、コンピュータによって読み取りさらにアクセスすることができる任意の媒体上に本発明の配列を保存、記録し、さらに操作することができる。したがって、本発明は、本発明の核酸およびポリペプチド配列を記録または保存させたコンピュータ、コンピュータシステム、コンピュータ読み出し可能媒体、コンピュータプログラム製品などを提供する。本明細書で用いられる“記録”および“保存”という用語はコンピュータ媒体に情報を保存する過程を指す。当業者は、コンピュータ読み出し可能媒体に情報を記録するための任意の公知の方法を容易に利用して、本発明の1つまたは2つ以上の核酸および／またはポリペプチド配列を含む製品を製造することができる。

本発明のまた別の特徴は、本発明の少なくとも1つの核酸および／またはポリペプチド配列が記録されているコンピュータ読み出し可能媒体である。コンピュータ読み出し可能媒体には、磁気により読み出し可能な媒体、光学的に読み出し可能な媒体、電子的に読み出し可能な媒体および磁気/光学媒体が含まれる。例えば前記コンピュータ読み出し可能媒体はハードディスク、フロッピー（登録商標）ディスク、磁気テープ、CD-ROM、多用途デジタルディスク（DVD）、ランダムアクセスメモリー（RAM）、または読み出し専用メモリー（ROM）の他、当業者に公知の他のタイプの媒体であり得る。

20

本発明の特徴には、システム（例えばインターネット使用システム）、特にコンピュータシステムが含まれる。このシステムは本明細書に記載されている配列および配列情報を保存し、これを操作する。コンピュータシステム（100）の一例が図1の組み立て分解図に示されている。本明細書で用いられる“コンピュータシステム”は、本発明のヌクレオチドまたはポリペプチド配列の解析に用いられるハードウェア構成部分、ソフトウェア構成部分およびデータ保存構成部分を指す。コンピュータシステム（100）は、配列データを処理し、これにアクセスし、さらに前記を操作するプロセッサを含むことができる。プロセッサ（105）は周知のタイプの中央演算ユニットのいずれか、例えばインテル社（Intel Corporation）のペンティアムIIIまたはサン（Sun）、モトローラ（Motorola）、コンパック（Compaq）、AMDまたはインターナショナル・ビジネス・マシーン（IBM）の類似のプロセッサでよい。コンピュータシステム（100）は汎用システムであり、プロセッサ（105）および1つまたは2つ以上のデータ保存のための内部データ保存構成部分（110）、および前記データ保存構成部分に保存されたデータを検索するための1つまたは2つ以上のデータ検索装置を含む。従来の利用可能なコンピュータシステムのいずれも適切であることは当業者には理解されよう。

30

40

【0093】

ある特徴では、コンピュータシステム（100）は、バス（メインメモリー（115）（好ましくはRAMとして提供されている）に連結されている）に連結されたプロセッサ（105）、および1つまたは2つ以上の内部データ保存装置（110）（例えばハードドライブおよび／またはそれにデータが記録される他のコンピュータ読み出し可能媒体）を含む。コンピュータシステム（100）はさらに、内部データ保存装置（110）のデータを読み取るための1つまたは2つ以上のデータ検索装置（118）を含む。データ検索装置（118）は、例えばフロッピー（登録商標）ディスクドライブ、コンパクトディスクドライブ、磁気テープドライブ、または遠隔データ保存システムに連結することができる（例えばインターネットを

50

介して) モデムであり得る。いくつかの実施態様では、内部データ保存装置 (110) は取り外し可能なコンピュータ読み出し可能媒体、例えばフロッピー (登録商標) ディスク、コンパクトディスク、磁気テープなどで、制御ロジックおよび/またはそれに記録されたデータを含んでいる。コンピュータシステム (100) は便利には、データ検索装置にいったん挿入されたデータ保存構成部分から前記制御ロジックおよび/またはデータを読み出すための適切なソフトを含むか、または前記ソフトによってプログラムされる。コンピュータシステム (100) は、コンピュータのユーザーに出力結果を表示するために用いられるディスプレイ (120) を含む。コンピュータシステム (100) は他のコンピュータシステム (125a-c) とネットワークまたは広域ネットワークで連結され、コンピュータシステム (100) への中央アクセスを提供することができることは留意されるべきであろう。本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列にアクセスし前記を処理するためのソフトは実行時にはメインメモリー (115) に存在し得る。いくつかの特徴では、コンピュータシステム (100) はさらに本発明の核酸配列を比較するための配列比較アルゴリズムを含むことができる。前記アルゴリズムおよび配列はコンピュータ読み出し可能媒体に保存することができる。“配列比較アルゴリズム”は、データ保存手段内に保存されている他のヌクレオチド配列および/または化合物とヌクレオチド配列を比較するためにコンピュータシステム (100) に (端末または遠隔端末から) 提供される1つまたは2つ以上のプログラムを指す。例えば、配列比較アルゴリズムは、コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている本発明のヌクレオチド配列をコンピュータ読み出し可能媒体に保存されている参照配列と比較し、相同性または構造モチーフを決定することができる。

10

20

【0094】

上記のアルゴリズムとともに用いられるパラメーターは、配列の長さおよび調べられる相同性の程度に応じて適用することができる。いくつかの特徴では、前記パラメーターは、ユーザーの指示がない場合に前記アルゴリズムによって用いられる規定値パラメーターであろう。図2は、新規なヌクレオチドまたはタンパク質配列を配列データベースと比較して、新規な配列とデータベースの配列との間の相同性レベルを決定するためのプロセス (200) の1つの特徴を示すフローチャートである。前記データベースの配列は、コンピュータシステム (100) 内に保存された個人的データベースでも、公的データベース (例えばインターネットを介して利用可能なGENBANK) でもよい。プロセス (200) は開始状態 (201) で始まり、続いて、比較されるべき新規な配列がコンピュータシステム (100) 内のメモリーに保存される状態 (202) に移行する。上記で考察したように、前記メモリーは任意のタイプのメモリー (RAMまたは内部保存装置を含む) であろう。続いてプロセス (200) は状態 (204) に移行し、ここで配列データベースが解析および比較のために開かれる。続いてプロセス (200) は、データベースに保存されている第一の配列がコンピュータのメモリーに読み出される状態 (206) に移行する。続いて比較が状態 (210) で実施され、第一の配列が第二の配列と同じであるか否かが決定される。この工程は、新規な配列とデータベースの第一の配列との間の正確な比較の実施に限定されないことに留意することが重要である。2つのヌクレオチド配列またはタンパク質配列を (たとえそれらが同一ではなくても) 比較する周知の方法を当業者は心得ている。例えばギャップを1つの配列に導入してこれら2つのテスト配列間の相同性レベルを高めることができる。比較時にギャップまたは他の特徴を配列に導入するか否かを制御するパラメーターは通常はコンピュータシステムのユーザーによって入力される。いったん2つの配列の比較が状態 (210) で実施されたら、決定の状態 (210) で前記2つの配列が同じか否かの決定が下される。もちろんのこと、“同じ”という用語は完全に同一である配列に限定されない。ユーザーによって入力された相同性パラメーター内にある配列は、プロセス (200) で“同じ”と示され、プロセス (200) は状態 (214) に移行する (前記状態でデータベース由来の配列の名称がユーザーに表示される)。前記状態はディスプレイされた名称の配列が入力した相同性の特徴を満たすことをユーザーに知らせる。保存配列の名称がいったんユーザーに表示されたら、プロセス (200) は、それ以上の配列がデータベースに存在するか否かの決定が下される決定状態 (218) に移行する。それ以上データベースに配列が存在しない場合

30

40

50

には、プロセス（200）は終了状態（220）で終了する。しかしながらデータベースにさらに配列が存在する場合は、プロセス（200）は状態（224）に移行し、前記状態でポインターは、データベースの次の配列に移動し前記新たな配列と比較することができる。このようにして、新たな配列はアラインメントを実施されデータベースの各配列と比較される。

配列が相同でないという決定が決定状態（212）で下された場合、プロセス（200）は直ちに決定状態（218）に移行し、データベース内に比較されるべき他の配列が存在するかが決定されることは留意されよう。したがって、本発明のある特徴は、プロセッサ、本発明の核酸配列および比較を実施するための配列コンペアラが保存されているデータ保存装置を含むコンピュータシステムである。前記配列コンペアラは、比較される配列間の相同性レベルを示すかまたは構造モチーフを同定することができる。これらはまたこれらの核酸コードまたはポリペプチドコードと比較される配列内の構造モチーフを同定することができる。図3は、2つの配列が相同であるか否かを決定するコンピュータシステムのプロセス（250）のある実施態様を示すフローチャートである。プロセス（250）は開始状態（252）で開始し、続いて比較されるべき第一の配列がメモリーに保存される状態（254）に移行する。続いて比較されるべき第二の配列が状態（256）でメモリーに保存される。続いてプロセス（250）は状態（260）に移行し、前記状態（260）で第一の配列中の第一の記号が読み取られ、続いて状態（262）に移行し、前記状態（262）で第二の配列の第一の記号が読み取られる。前記配列がヌクレオチド配列の場合、前記記号は通常はA、T、C、GまたはUのいずれかであることは理解されよう。前記配列がタンパク質配列の場合は、前記記号は一文字のアミノ酸コードであり、それによって第一および第二の配列は容易に比較することができる、続いて2つの記号が同じものであるか否かの決定が決定状態（264）で下される。それらが同じものである場合、プロセス（250）は状態（268）に移行し、前記状態（268）で第一および第二の配列の次の記号が読み取られる。続いて、前記次の記号が同じものであるか否かの決定が下される。それらが同じものである場合には、プロセス（250）は2つの記号が同じでなくなるまでこのループを繰り返す。次の2つの記号が同じでないという決定が下された場合、プロセス（250）は決定状態（274）に移行して、いずれかの配列に読み取られるべき記号がそれ以上存在するか否かが決定される。

読み取られるべき記号がそれ以上存在しない場合は、プロセス（250）は状態（276）に移行し、第一および第二の配列間の相同性レベルがユーザーに表示される。相同性レベルは、第一の配列内の記号の総数のうち同じであった配列間の記号の割合を計算することによって決定される。したがって、第二の配列の各記号と最初の100ヌクレオチド配列内の各記号のアラインメントが達成された場合、相同性レベルは100%であろう。

【0095】

あるいは、コンピュータプログラムは本発明の配列と参照配列とを比較して、配列が1つまたは2つ以上の位置で異なるか否かを決定することができる。前記プログラムは、参照配列または本発明の配列のいずれかの配列に対して、挿入、欠失または置換されたヌクレオチドまたはアミノ酸残基の長さまたはそれらが何であることを記録することができる。前記コンピュータプログラムは、本発明の配列に対して参照配列が一ヌクレオチド多型性（SNP）を含むか否か、または本発明の配列が公知の配列のSNPを含むか否かを決定するプログラムであり得る。したがって、いくつかの特徴では、前記コンピュータプログラムはSNPを同定するプログラムである。前記方法は上記に述べたコンピュータシステムによって実施することができ、前記方法は図3に示されている。前記方法は、前記コンピュータプログラムを使用することにより本発明の配列および参照配列を読み取り、前記コンピュータプログラムにより相違を同定することによって実施することができる。

他の特徴では、前記コンピュータ使用システムは、本発明の核酸またはポリペプチド内の特徴を同定するアイデンティファイヤーを含む。“アイデンティファイヤー”は、核酸配列内のある種の特徴を同定する1つまたは2つ以上のプログラムを指す。例えば、アイデンティファイヤーは核酸配列内のオープンリーディングフレーム（ORF）を同定するプログラムを含むことができる。図4は、配列内の1つの特徴の存在を検出するためのアイデン

ティファイヤープロセス (300) のある特徴を示す流れ作業図である。プロセス (300) は開始状態 (302) で開始し、続いて状態 (304) に移行し、前記状態 (304) で特徴についてチェックされるべき第一の配列がコンピュータシステム (100) のメモリー (115) に保存される。プロセス (300) は続いて状態 (306) に移行し、前記状態 (306) で配列の特徴のデータベースが開かれる。そのようなデータベースは各特徴の属性リストを前記特徴の名称とともに含み得る。例えば、特徴の名称は“開始コドン”であり、その属性は“ATG”であろう。別の例では、特徴の名称は“TAATAAボックス”であり、特徴の属性は“TAA TAA”であろう。そのようなデータベースの例は、ウィスコンシン大学のGenetics Computer Groupによって作製されている。また別には、前記特徴は構造的なポリペプチドモチーフ例えばアルファヘリックス、ベータシートまたは機能的ポリペプチドモチーフ、例えば酵素活性部位、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフまたは当業者に公知の他のモチーフであろう。特徴のデータベースが状態 (306) で開かれると直ちにプロセス (300) は状態 (308) に移行し、前記状態 (308) で第一の特徴がデータベースから読み取られる。続いて第一の特徴の属性と第一の配列との比較が状態 (310) で実施される。続いて、前記特徴の属性が第一の配列内で見出されるか否かの決定が決定状態 (316) で下される。前記属性が見出された場合、プロセス (300) は状態 (318) に移行し、前記状態 (318) で見出された特徴の名称がユーザーに表示される。続いてプロセス (300) は決定状態 (320) に移行し、前記状態 (320) でそれ以上の特徴がデータベースに存在するか否かの決定が下される。特徴がそれ以上存在しない場合は、プロセス (300) は終了状態 (324) で終了する。しかしながら、それ以上の特徴がデータベースに存在する場合、プロセス (300) は状態 (326) で次の配列特徴を読み取り、状態 (310) に戻り、前記状態で次の特徴の属性が第一の配列に対して比較される。第一の配列で前記特徴の属性が決定状態 (316) で見出されない場合、プロセス (300) は直接決定状態 (320) に移行し、特徴がそれ以上データベースに存在するか否かを決定する。したがって、ある特徴では、本発明はオープンリーディングフレーム (ORF) を同定するコンピュータプログラムを提供する。

【0096】

本発明のポリペプチドまたは核酸配列を、種々のデータプロセッサプログラムで多様な様式で保存し操作することができる。例えば配列は、当業者に周知の多様なデータベースプログラム (例えばDB2、SYBASEまたはORACLE) でワードプロセッシングファイル (例えばマイクロソフトワードまたはワードパーフェクト) のテキストとしてまたはアスキーファイルとして保存することができる。さらに、多くのコンピュータプログラムおよびデータベースを配列比較アルゴリズム、アイデンティファイヤー、または本発明の核酸配列と比較すべき参照ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の供給源として用いることができる。本発明の実施に用いられるプログラムおよびデータベースには以下が含まれる (ただしこれらに限定されない) : MacPattern (EMBL)、DiscoveryBase (Molecular Applications Group)、GeneMine (Molecular Applications Group)、Look (Molecular Applications Group)、MacLook (Molecular Applications Group)、BLASTおよびBLAST2 (NCBI)、BLASTNおよびBLASTX (Alyschul et al. J. Mol. Biol. 215:403, 1990)、FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444, 1988)、FASTDB (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990)、Catalyst (Molecular Simulations Inc.)、Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.)、Cerius2.DBAccess (Molecular Simulations Inc.)、HypoGen (Molecular Simulations Inc.)、Insight II (Molecular Simulations Inc.)、Discover (Molecular Simulations Inc.)、CHARMM (Molecular Simulations Inc.)、Felix (Molecular Simulations Inc.)、DelPhi (Molecular Simulations Inc.)、QuanteMN (Molecular Simulations Inc.)、Homology (Molecular Simulations Inc.)、Modeler (Molecular Simulations Inc.)、ISIS (Molecular Simulations Inc.)、Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.)、WebLab (Molecular Simulations Inc.)、WebLab Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.)、Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.)、SeqFold (Molecular Simulations Inc.)、MDL Available Chemicals Directoryデータベース、MDL Drug Data Reportデータベース

、Comprehensive Medical Chemistryデータベース、Derwent's World Drug Indexデータベース、BioByteMasterFileデータベース、Genbankデータベース。本発明の開示により他の多くのプログラムおよびデータベースも当業者には明白であろう。

上記のプログラムを用いて検出することができるモチーフには、ロイシンジッパーコード配列、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ、グリコシル化部位、ユビキチン化部位、アルファヘリックス、ベータシート、コードされたタンパク質の分泌を誘導するシグナルペプチドをコードするシグナル配列、転写調節に関与する配列（例えばホメオボックス）、酸性ストレッチ、酵素活性部位、基質結合部位および酵素切断部位が含まれる。

【0097】

核酸のハイブリダイゼーション

本発明は、本発明の典型的な配列、又は本発明のポリペプチドをコードする核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離または組換え核酸を提供する。前記ストリンジェントな条件は、高度にストリンジェントな条件、中等度にストリンジェントな条件、低度にストリンジェントな条件であり、本明細書に記載されている高ストリンジェンシー条件および低ストリンジェンシー条件を含む。ある特徴では、下記に考察されるように、ある核酸が本発明の範囲内のものであるか否かを決定する条件を示すのは洗浄条件のストリンジェンシーである。

また別の実施態様では、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される本発明の核酸は、本発明の核酸の約5残基から完全長の間であり得る。例えばそれらは、長さが少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれ以上の残基であろう。完全長より短い核酸もまた含まれる。これらの核酸は、例えばハイブリダイゼーションプローブ、標識プローブ、PCRオリゴヌクレオチドプローブ、iRNA、アンチセンス、または抗体結合ペプチド（エピトープ）、モチーフ、活性部位などをコードする配列として有用である。

ある特徴では、本発明の核酸は、約37℃から42℃で約50%のホルムアミドの条件を含む高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。ある特徴では、本発明の核酸は、約30℃から35℃で約35%から25%のホルムアミドの条件を含む低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。

【0098】

あるいは、本発明の核酸は、42℃の約50%ホルムアミド、5XのSSPE、0.3%SDSおよび反復配列ブロック核酸（例えばcot-1またはサケ精子DNA（例えば200n/mLのせん断変性サケ精子DNA））の条件を含む高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。ある特徴では、本発明の核酸は、35℃の低温で約35%のホルムアミドを含む低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって定義される。

ハイブリダイゼーションの後、フィルターは6XのSSC、0.5%SDSにより50℃で洗浄することができる。前記の条件は、25%を超えるホルムアミドで“中等度”の条件、25%より低いホルムアミドで“低度”の条件と考えられる。“中等度にストリンジェントな”ハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、上記のハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施されるときである。“低度にストリンジェントな”ハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、上記のハイブリダイゼーションが10%のホルムアミドで実施されるときである。

ストリンジェンシーの個々のレベルに対応する温度範囲は関心のある核酸のプリン対ピリミジンの比を計算し、したがって温度を調節することによってさらに狭めることができる。本発明の核酸はまた文献（AusubelおよびSambrook）に示される高度、中等度および低度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするその能力によっても定義される。上記の範囲および条件のヴァリエーションは当業界で周知である。ハイブリダイゼーション条件は下記でさらに考察される。

【0099】

上記の方法は、プローブ配列に対して相同性が低い核酸を同定するために改変することができる。例えば、検出可能なプローブに対して相同性が低い核酸を得るために、ストリンジエンシーが低い条件を用いることができる。例えば、約1Mの Na^+ 濃度を有する緩衝液中でハイブリダイゼーション温度を68℃から42℃まで5℃ずつ下げることができる。ハイブリダイゼーション後に、フィルターをハイブリダイゼーション温度で2XのSSC、0.5%SDSで洗浄することができる。前記の条件は、50℃より上で“中等度”の条件、50℃未満で“低度”の条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが55℃で実施される場合である。“低ストリンジエンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが45℃で実施される場合である。 10

あるいは、ハイブリダイゼーションはホルムアミドを含む緩衝液（例えば6XのSSC）で42℃の温度で実施することができる。この事例では、ハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミドの濃度は50%から0%まで5%ずつ減少させて、プローブとの相同性が低いクロンを同定することができる。ハイブリダイゼーション後に、フィルターを6XのSSC、0.5%SDSで50℃で洗浄することができる。前記の条件は、25%より高いホルムアミドで“中等度”の条件、25%未満のホルムアミドで“低度”の条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施される場合である。“低ストリンジエンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが10%のホルムアミドで実施される場合である。 20

【0100】

しかしながら、ハイブリダイゼーションの様式の選択は決定的なものではなく、ある核酸が本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する条件を示すのは洗浄条件のストリンジエンシーである。本発明に包含される核酸を同定するために用いられる洗浄条件には例えば以下が含まれる：約0.02Mの塩濃度でpH 7、少なくとも約50℃または約55℃から約60℃；または約0.15Mの塩濃度のNaClで72℃で約15分；または約0.2XのSSCの塩濃度で少なくとも約50℃または約55℃から約60℃の温度で約15から20分；またはハイブリダイゼーション複合体を、0.1%のSDSを含む約2XのSSCの塩濃度を有する溶液で室温で15分2回室温で洗浄し、続いて0.1%のSDSを含む約0.1XのSSCで68℃で15分2回室温で洗浄する；または前記と同等な条件。SSC緩衝液および同等な条件に関してはSambrook, TijssenおよびAusubelの著書を参照されたい。 30

これらの方法は本発明の核酸の単離に用いることができる。

【0101】

オリゴヌクレオチドプローブおよびその使用方法

本発明はまた、例えばアミラーゼ活性をもつポリペプチドをコードする核酸もしくはそのフラグメントを同定するか、またはアミラーゼ遺伝子を同定するために用いることができる核酸プローブを提供する。ある特徴では、前記プローブは、本発明の核酸の少なくとも10の連続する塩基を含む。また別には、本発明のプローブは、本発明の核酸で記載の配列の少なくとも約5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150または約10から50、約20から60、約30から70の連続する塩基であり得る。前記プローブは、結合および／またはハイブリダイゼーションによって核酸を同定する。前記プローブは、例えばキャピラリーアレイを含む本発明のアレイ（下記の考察を参照されたい）で用いることができる。本発明のプローブはまた他の核酸またはポリペプチドの単離に用いることができる。 40

本発明のプローブを用いて、生物学的サンプル（例えば土壌サンプル）が、本発明の核酸を有する生物または前記核酸が得られた生物を含むか否かを決定することができる。そのような方法では、前記核酸が単離された生物を潜在的に保有する生物学的サンプルを入手し、前記サンプルから核酸を得る。前記プローブがサンプル中に存在する相補的配列のいずれかと特異的にハイブリダイズすることができる条件下で、前記核酸を前記プローブ 50

と接触させる。必要な場合には、相補性配列を含まないコントロール配列とともに相補性配列を含むことが判明しているサンプルの相補性配列と前記プローブを接触させることによって、前記プローブが特異的にハイブリダイズすることができる条件を決定することができる。ハイブリダイゼーション条件（例えばハイブリダイゼーション緩衝液の塩濃度、ハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミド濃度またはハイブリダイゼーションの温度）を変化させて、前記プローブが相補性核酸と特異的にハイブリダイズすることができる条件を特定することができる（個々のハイブリダイゼーション条件に関しては考察を参照されたい）。

【0102】

前記核酸が単離された生物をサンプルが含む場合、プローブの特異的なハイブリダイゼーションが検出される。ハイブリダイゼーションは、プローブを検出可能な薬剤（例えば放射性同位元素、蛍光染料、または検出可能な生成物の形成を触媒することができる酵素）で標識することによって検出できる。標識プローブを用いてサンプル中の相補性核酸の存在を検出する多くの方法が当業者にはよく知られている。前記方法にはサザンブロット、ノザンブロット、コロニーハイブリダイゼーション法およびドットブロットが含まれる。前記方法の各々のプロトコルは文献（AusubelおよびSambrook）に示されている。

あるいは、2つ以上のプローブ（そのうちの少なくとも1つは核酸サンプルに存在する任意の相補性配列と特異的にハイブリダイズすることができる）を増幅反応で用いて、サンプルが本発明の核酸配列を含む生物（例えば前記核酸が単離された生物）を含むか否かを決定することができる。ある特徴では、前記プローブはオリゴヌクレオチドを含む。ある特徴では、前記増幅反応はPCR反応を含むことができる。PCRプロトコルは文献（AusubelおよびSambrook）に記載されている（増幅反応に関しては考察を参照されたい）。そのような方法では、サンプル中の核酸をプローブと接触させ、増幅反応を実施し、さらに生成された増幅生成物のいずれかを検出する。増幅生成物は、反応生成物のゲル電気泳動を実施し、前記ゲルをインターカレーション試薬（例えば臭化エチジウム）で染色することによって検出することができる。また別には1つまたは2つ以上のプローブを放射性同位元素で標識し、ゲル電気泳動の後で放射性増幅生成物の存在を検出してもよい。

【0103】

本発明の核酸配列の3'または5'末端近くの配列に由来するプローブもまた染色体ウォーキング法で用いて、さらに別の、例えばゲノム配列を含むクローンを特定することができる。そのような方法は、関心のあるさらに別のタンパク質をコードする遺伝子の宿主生物からの単離を可能にする。

ある特徴では、本発明の核酸配列をプローブとして用いて関連核酸が同定および単離される。いくつかの特徴では、そのようにして同定された関連核酸は、本発明の核酸が最初に単離された生物以外の生物に由来するcDNAまたはゲノムDNAであり得る。そのような方法では、核酸サンプルを、プローブが特異的に関連配列とハイブリダイズすることができる条件下で前記プローブと接触させる。続いて、関連生物に由来する核酸とプローブのハイブリダイゼーションが上記に記載した方法のいずれかをを用いて検出される。

【0104】

核酸ハイブリダイゼーション反応では、具体的なストリンジェンシーレベルを達成するために用いられる条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質にしたがって変動するであろう。例えば、核酸のハイブリダイズ領域の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えばGC対AT含有量）および核酸タイプ（例えばRNA対DNA）は、ハイブリダイゼーション条件の選択に考慮することができる。さらに考慮されることは、核酸の1つが例えばフィルターに固定されているか否かである。ハイブリダイゼーションは、低ストリンジェンシー、中等度ストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシーの条件下で実施することができる。核酸のハイブリダイゼーションの例として、固定変性核酸を含むポリマーメンブレンを最初に45℃で30分、以下からなる溶液（0.9MのNaCl、50mMのNaH₂PO₄（pH7.0）、5.0mMのNa₂EDTA、0.5% SDS、10Xのデンハルト溶液および0.5mg/mLのポリリボアデニル酸）中でプレハイブリダイズさせる。約2X10⁷cpm（比活性4-9X10⁸cpm/μg）の³²P末端標識オ

リゴヌクレオチドプローブを続いて溶液に添加する。12-16時間インキュベーションした後で、前記メンブレンを0.5%のSDSを含む1XのSET(150mMのNaCl、20mMトリス塩酸塩(pH7.8)、1mMのNa₂EDTA)中で30分室温(RT)で洗浄し、続いて新しい1XのSET中で30分、オリゴヌクレオチドプローブのためのTm-10℃で洗浄する。続いて、ハイブリダイゼーションシグナルを検出するためにメンブレンでオートラジオグラフィフィルムを感光させる。

【0105】

核酸、例えばcDNAまたはゲノムDNA(検出プローブとハイブリダイズする)の同定に用いられるハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーを変動させることによって、プローブと相同性レベルが異なる核酸を同定し、これを単離することができる。ストリンジエンシーは、プローブの融解温度より低い種々の温度でハイブリダイゼーションを実施することによって変動させることができる。融解温度(T_m)は、(所定のイオン強度およびpHの下で)標的配列の50%が完全に相補性のプローブとハイブリダイズする温度である。非常にストリンジェントな条件は、個々のプローブのT_mに等しいかまたはそれより約5℃低くなるように選択される。プローブの融解温度は以下の等式を用いて計算できる。長さが14から70ヌクレオチドのプローブの場合、融解温度(T_m)は下記式を用いて計算される： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log[Na^+]) + 0.41 (G+C \text{ の割合}) - (600/N)$ 、式中Nはプローブの長さである。ハイブリダイゼーションがホルムアミド含有溶液中で実施される場合、融解温度は以下の等式を用いて計算できる： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log[Na^+]) + 0.41 (G+C \text{ の割合}) - (0.63\% \text{ ホルムアミド}) - (600/N)$ 、式中Nはプローブの長さである。プレハイブリダイゼーションは、6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5%SDS、100 μgの変性フラグメント化サケ精子DNA、または6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5%SDS、100 μgの変性フラグメント化サケ精子DNA、50%ホルムアミド中で実施することができる。SSCおよびデンハルト試薬ならびに他の溶液のための組成は例えば上掲書(Sambrook)に挙げられている。

【0106】

ハイブリダイゼーションは、検出プローブを上記に挙げたプレハイブリダイゼーション溶液に添加することによって実施される。プローブが二本鎖DNAを含む場合、ハイブリダイゼーション溶液に添加する前にこれを変性させる。前記プローブが、それと相補的または相同な配列を含むcDNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズできるように十分な時間前記ハイブリダイゼーション溶液とフィルターを接触させる。長さが200ヌクレオチドを超えるプローブの場合、ハイブリダイゼーションはT_mより15-25℃下で実施できる。より短いプローブの場合(例えばオリゴヌクレオチドプローブ)、ハイブリダイゼーションはT_mより5-10℃下で実施できる。ある特徴では、6XのSSC中でのハイブリダイゼーションが約68℃で実施される。ある特徴では、50%ホルムアミド含有溶液中でハイブリダイゼーションが約42℃で実施される。前述のハイブリダイゼーションの全ては高ストリンジエンシー条件下であると考えられよう。

【0107】

ハイブリダイゼーションの後で、フィルターを洗浄して非特異的に結合した一切の検出プローブを除去する。フィルターの洗浄に用いられるストリンジエンシーは、ハイブリダイズされる核酸の性質、ハイブリダイズされる核酸の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成(例えばGC対AT含量)および核酸のタイプ(例えばRNAであるかDNAであるか)にしたがって変動するであろう。だんだんと高くなるストリンジエンシー洗浄条件の例は以下のとおりである：2XのSSC、0.1%SDS、室温で15分(低ストリンジエンシー)；0.1XのSSC、0.5%SDS、室温で30分(中等度ストリンジエンシー)；0.1XのSSC、0.5%SDS、ハイブリダイゼーションの温度から68℃の間で15から30分(高ストリンジエンシー)；0.15MのNaCl、72℃で15分(非常に高いストリンジエンシー)。最後の低ストリンジエンシー洗浄は、0.1XのSSCで室温で実施することができる。上記の例は、フィルター洗浄に用いることができる条件セットの単なる例示である。当業者には種々のストリンジエンシーのために多くの洗浄レシピが存在することは理解されよう。

【0108】

プローブにハイブリダイズした核酸はオートラジオグラフィーまたは他の一般的な技術によって同定できる。上記の方法は、プローブ配列と相同性レベルが低い核酸を同定するために改変することができる。例えば、検出プローブと相同性が低い核酸を得るためには、より低いストリンジエンシー条件を用いることができる。例えばハイブリダイゼーション温度は、 Na^+ 濃度が約1Mのハイブリダイゼーション緩衝液で68℃から42℃まで5℃ずつ下げることができる。ハイブリダイゼーションの後で、フィルターはハイブリダイゼーション温度で2XのSSC、0.5% SDSで洗浄することができる。これらの条件は、50℃より上で“中等度”の条件、50℃より下で“低ストリンジエンシー”条件と考えられる。“中等度”ハイブリダイゼーション条件の例は、上記ハイブリダイゼーションが55℃で実施されるときである。“低ストリンジエンシー”ハイブリダイゼーション条件の例は、上記のハイブリダイゼーションが45℃で実施されるときである。

10

【0109】

あるいは、ハイブリダイゼーションは、緩衝液（例えばホルムアミド含有6XのSSC）中で42℃の温度で実施できる。この事例では、ハイブリダイゼーション緩衝液中のホルムアミドの濃度は、プローブと相同性レベルの低いクローンを同定するために50%から0%まで5%ずつ減少させることができる。ハイブリダイゼーションの後で、フィルターを6XのSSC、0.5%のSDSで50℃にて洗浄することができる。これらの条件は、25%より高いホルムアミドで“中等度”の条件、25%より低いホルムアミドで“低”ストリンジエンシー条件と考えられる。“中等度”ハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施されるときである。“低ストリンジエンシー”ハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが10%のホルムアミドで実施されるときである。

20

【0110】

本発明のこれらプローブおよび方法を用いて、その少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000またはそれより多くの連続する塩基を含む本発明の核酸配列と少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性（“相同性”）を有する配列をもつ核酸を単離することができる。相同性は、本明細書で考察したようなアラインメントアルゴリズムを用いて測定できる。例えば、相同なポリヌクレオチドは、本明細書に記載されたコード配列の1つの天然に存在する対立遺伝子座変種のコード配列を有するであろう。そのような対立遺伝子座変種は、本発明の核酸と比較したとき1つまたは2つ以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有するであろう。

30

【0111】

さらにまた、本発明のプローブおよび方法を用いて、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸を含む本発明のポリペプチドと、配列アラインメントアルゴリズムを用いて決定したとき、少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性（“相同性”）を有するポリペプチドをコードする核酸を単離することができる（前記配列アラインメントアルゴリズムは、例えばFASTAバージョン3.0t78アルゴリズム（規定値を用いる）またはBLAST2.2.2プログラム（本明細書に示される典型的な設定を用いる）である）。

40

【0112】

アミラーゼの発現阻害

本発明は、本発明の核酸と相補的な核酸（例えばアンチセンス配列）を提供する。アン

50

チセンス配列は、アミラーゼコード遺伝子の輸送、スプライシングまたは転写を阻害することができる。前記阻害は、ゲノムDNAまたはメッセンジャーRNAを標的とすることにより達成することができる。標的とされた核酸の転写または機能は、例えばハイブリダイゼーションおよび／または切断によって阻害することができる。本発明によって提供される特に有用な阻害物質セットには、アミラーゼ遺伝子またはメッセンジャーに結合する（いずれの事例でもアミラーゼの生成もしくは機能を防止または抑制する）ことができるオリゴヌクレオチドが含まれる。前記の結合は配列特異的ハイブリダイゼーションによるであろう。別の有用な阻害物質の種類にはアミラーゼメッセージの不活化または切断をもたらすオリゴヌクレオチドが含まれる。前記オリゴヌクレオチドはそのような切断を惹起する酵素活性を有することができる（例えばリボザイム）。オリゴヌクレオチドは化学的に改変するか、または相補性核酸を切断することができる酵素もしくは組成物と結合させることができる。種々の前記のようなオリゴヌクレオチドの多数を含むプールを所望の活性を有するものについてスクリーニングすることができる。

10

【0113】

アンチセンスオリゴヌクレオチド：本発明は、アミラーゼメッセージと結合することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する方法は学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬を用いてそのようなアミラーゼオリゴヌクレオチドを設計することができる。例えば、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングするためのジーンウォーキング／RNAマッピングプロトコルは当業界で周知である。例えば以下を参照されたい：Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183。この文献はRNAマッピングアッセイを記載し、前記アッセイは標準的な分子技術を基にし、強力なアンチセンス配列選別のための簡単に信頼できる方法を提供する。さらにまた以下を参照されたい：Smith (2000) *Eur. J. Phar. Sci.* 11:191-198。

20

天然に存在する核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いられる。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の長さでよい。例えば、また別の特徴では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは約5から100、約10から80、約15から60、約18から40である。最適な長さは日常的なスクリーニングによって決定できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の濃度で存在してよい。最適濃度は日常的なスクリーニングによって決定できる。この潜在的課題に用いることができる広範囲の合成された天然に存在しないヌクレオチドおよび核酸類似体が知られている。例えば、非イオン性骨格（例えばN-（2-アミノエチル）グリシンユニット）を含むペプチド核酸（PNA）を用いることができる。ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた用いることができる（以下に記載されている：W097/03211; W096/39154; Mata (1997) *Toxicol. App. Pharmacol.* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996)）。本発明によって提供される合成DNA骨格類似体をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドにはまた、上記で述べたようにホスホロ-ジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-N-カルバメートおよびモルホリノカルバメート核酸が含まれる。

30

コンビナトリアル化学的方法を用いて膨大な数のオリゴヌクレオチドを生成することができる。前記オリゴヌクレオチドは、任意の標的（例えば本発明のセンスおよびアンチセンスアミラーゼ配列）に対し適切な結合親和性および特異性を有する特定のオリゴヌクレオチドについて迅速にスクリーニングすることができる（例えば以下を参照されたい：Gold (1995) *J. Biol. Chem.* 270:13581-13584）。

40

【0114】

阻害性リボザイム：本発明は、アミラーゼメッセージと結合することができるリボザイムを提供する。これらのリボザイムは、例えばmRNAを標的にすることによりアミラーゼ活性を阻害することができる。リボザイムを設計し、ターゲッティングのためにアミラーゼ特異的アンチセンス配列を選別する方法は学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬を用いてそのようなリボザイムを設計することができる

50

。リボザイムは、標的RNAを切断するRNAの酵素部分に接近して保持されているリボザイムの標的RNA結合部分を介して標的RNAと結合することによって機能する。したがって、リボザイムは、相補性塩基対形成により標的RNAを認識し、これと結合する。正確な部位にいったん結合したら、リボザイムは酵素として機能し標的RNAを切断し、これを不活化する。切断がコード配列内で発生すれば、そのような態様での標的RNAの切断は、コードされるタンパク質の合成を指令するその能力を破壊するであろう。リボザイムがそのRNA標的と結合し、これを切断した後、リボザイムは前記RNAから遊離し、新たな標的と繰り返し結合しこれを切断することができる。

【0115】

いくつかの環境下では、リボザイムの酵素的性質は他の技術、例えばアンチセンス技術（アンチセンス技術では、核酸分子は核酸標的に単に結合してその転写、翻訳または別の分子との結合を妨げるだけである）に比べて有利であり得る。なぜならば、治療達成に必要なリボザイムの有効濃度はアンチセンスオリゴヌクレオチドのそれよりも低いからである。この潜在的な利点はリボザイムの酵素として機能する能力の結果である。したがって、ただ1つのリボザイム分子が多くの標的RNA分子を切断することができる。さらにまた、リボザイムは典型的には特異性が高い阻害剤であり、阻害の特異性は塩基対形成による結合メカニズムだけでなく、リボザイムが結合するRNAの発現を前記リボザイム分子が阻害するメカニズムにも依存している。すなわち、前記阻害はRNA標的の切断によって生じ、したがって特異性は非標的RNAの切断速度に対する標的RNAの切断速度の比と定義される。

この切断メカニズムは塩基対形成に関与する要因に加えて更に種々の要因に依存する。したがって、リボザイム作用の特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド結合の特異性よりも高いであろう。

【0116】

本発明のリボザイム、例えば酵素リボザイムRNA分子は、ハンマーヘッドモチーフ、ヘアピンモチーフ、肝炎デルタウイルスモチーフ、グループIイントロンモチーフおよび／またはRNAガイド配列と結合したRNaseP様RNAモチーフとして生成することができる。ハンマーヘッドモチーフの例はRossi (Aids Research and Human Retroviruses 8:183 (1992)) によって、ヘアピンモチーフの例はHampel (Biochemistry 28:4929 (1989)およびNuc. Acids Res. 18:299 (1992)) によって、肝炎デルタウイルスモチーフの例はPerrotta (Biochemistry 31:16 (1992)) によって、RNasePモチーフの例はGuerrier-Takada (Cell 35:849 (1983)) によって、さらにグループIイントロンの例はCech (US Pat. No. 4,987,071) によって記載されている。前記の特定のモチーフの記載は前記に限定することを意図したものではない。当業者は、本発明のリボザイム、たとえば酵素RNA分子は、標的遺伝子のRNA領域の1つまたは2つ以上と相補的な固有の基質結合部位を有することができることを理解していよう。本発明のリボザイムは、基質結合部位内またはその周辺に前記リボザイム分子にRNA切断活性を付与するヌクレオチド配列を有すし得る。

【0117】

RNA干渉 (RNAi)：ある特徴では本発明は、本発明のアミラーゼ配列を含むRNA阻害分子、いわゆる“RNAi”分子を提供する。RNAi分子は二本鎖RNA (dsRNA) 分子を含む。RNAiはアミラーゼ遺伝子の発現を阻害することができる。ある特徴では、RNAiは、長さが約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25またはそれ以上の二重鎖ヌクレオチドである。

本発明はいずれの特定の作用メカニズムにも限定されないが、RNAiは細胞内に入り、類似または同一の配列を有する一本鎖RNA (ssRNA) (内因性mRNAを含む) の分解を引き起こす。細胞が二本鎖RNA (dsRNA) に暴露されるとき、相同な遺伝子に由来するmRNAは、RNA干渉 (RNAi) と称される過程によって選択的に分解される。RNAiの背後にある可能な基本的メカニズムは、特定の遺伝子配列と一致する二本鎖RNA (dsRNA) の短い破片 (短小干渉性RNAと称される) への分解である。前記短小干渉性RNAは、その配列と一致するmRNAの分解の引き金となる。ある特徴では、本発明の前記RNAiは遺伝子サイレンシング療法で用いられる (例えば以下を参照されたい：Shuey (2002) Drug Discov. Today 7:1040-1046)

ある特徴では、本発明は、本発明のRNAiを用いて選択的にRNAを分解する方法を提供する。前記方法はin vitro、ex vivoまたはin vivoで実施することができる。ある特徴では、本発明のRNAi分子を用いて細胞、器官または動物の機能低下変異を生成することができる。選択的にRNAを分解するためにRNAi分子を製造および使用する方法は当業界では周知である。例えば以下を参照されたい：米国特許第6,506,559号、第6,511,824号、第6,515,109号および第6,489,127号。

【0118】

核酸の改変

本発明は、本発明の核酸（例えばアミラーゼ酵素をコードする核酸）の変種を生成する方法を提供する。本方法は鋳型核酸によってコードされたアミラーゼのそれとは変異したもしくは異なる活性または変異したもしくは異なる安定性をもつアミラーゼ酵素を生成するために反復または多様な組合せでを使用することができる。本方法はまた、例えば遺伝子／メッセージ発現、メッセージ翻訳またはメッセージ安定性における変種を生成するために反復または多様な組合せで用いることができる。別の特徴では、細胞の遺伝的構成は、例えば相同遺伝子のex vivo改変とそれに続く前記遺伝子の細胞への再挿入により改変される。

本発明の核酸は任意の手段、例えばランダムもしくは確率的な方法、または非確率的方法、または“定方向進化”方法によって改変できる（例えば米国特許6,361,974号を参照されたい）。遺伝子のランダム変異導入の方法は当業界で周知である（例えば以下を参照されたい：US Pat. No. 5,830,696）。例えば変異原を用いて遺伝子をランダムに変異させることができる。変異原には、例えば紫外線またはガンマ線照射、または化学的変異原、例えばマイトマイシン、亜硝酸、光活性化ソラレンが含まれ、単独または併用して組換えによって修復されやすいDNA破壊を誘導する。他の化学的変異原には、例えば、重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはギ酸が含まれる。その他の変異原は、ヌクレオチド前駆体の類似物質、例えばニトロソグアニジン、5-ブロモウラシル、2-アミノプリンまたはアクリジンである。これらの薬剤はPCR反応にヌクレオチド前駆体の代わりに添加され、それによって前記配列を変異させることができる。インターカレーション薬剤（例えばプロフラビン、アクリフラビン、キナクリンなど）もまた用いることができる。

【0119】

分子生物学の任意の技術、例えばランダムPCR変異導入（例えば以下を参照されたい：Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471）またはコンビナトリアルマルチカセット変異導入（combinatorial multiple cassette mutagenesis）（例えば以下を参照されたい：Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196）を用いることができる。また別には、核酸（例えば遺伝子）をランダムにまたは“確率的に”フラグメント化した後で再アッセムブリングすることもできる（例えば以下を参照されたい：米国特許第6,291,242号；同6,287,862号；同6,287,861号；同5,955,358号；同5,830,721号；同5,824,514号；同5,811,238号；同5,605,793号）。また別の特徴では、改変、付加または欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセムブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセムブリ、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセムブリ（SLR）、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNAによる変異導入、ウラシル含有鋳型による変異導入、ギャップ含有二重鎖による変異導入、ポイントミスマッチ修復による変異導入、修復欠損宿主株による変異導入、化学的変異導入、放射源による変異導入、欠失による変異導入、制限-選別変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマーの生成および／またはこれらの組合せ並びに他の方法によって導入される。

【0120】

以下の文献は、本発明の方法に取り入れることができる多様な反復組換え手順および／

10

20

30

40

50

または方法を記載している：Stemmer (1999) "Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties", Tumor Targeting 4:1-4; Ness (1999) Nature Biotechnology 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling", Nature Biotechnology 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding", Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling", Nature Biotechnology 17:259-264; Cramer (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution", Nature 391:288-291; Cramer (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling", Nature Biotechnology 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines", Current Opinion in Biotechnology 8:724-733; Cramer et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling", Nature Medicine 2:100-103; Cramer et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling", Nature Biotechnology 14:315-319; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor headpiece dimer", Journal of Molecular Biology 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: The Encyclopedia of Molecular Biology. VCH Publishers, New York. pp.447-457; Cramer and Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" BioTechniques 18:194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" Gene, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" Science 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" Bio/Technology 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" Nature 370:389-391; および Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751.

【 0 1 2 1 】

多様性を生成する変異導入方法には例えば以下が含まれる：部位特異的変異導入 (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" Anal Biochem. 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method" Methods Mol. Biol. 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" Ann. Rev. Genet. 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" Science 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" Biochem. J. 237:1-7; および Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); ウラシル含有鋳型を用いる変異導入 (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" Methods in Enzymol. 154, 367-382; および Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" Science 242:240-245); オリゴヌクレオチド誘導変異導入 (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" Nucleic Acids Res. 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments

cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; および Zoller & Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350; ホスホロチオエート改変DNA変異導入(Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; および Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); ギャップをもつ二重鎖DNAを用いる変異導入(Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; および Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999)。

【0122】

本発明を実施するために用いることができるさらに別のプロトコルには以下が含まれる：点ミスマッチ修復(Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" *Cell* 38:879-887)、修復欠損宿主株を用いる変異導入(Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443; and Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 154: 382-403)、欠失変異導入(Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" *Nucl. Acids Res.* 14: 5115), restriction-selection and restriction-selection and restriction-purification (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423)、全遺伝子合成による変異導入(Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" *Science* 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) "Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" *Gene* 34:315-323; および Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316)、二本鎖開裂修復(Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455. "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181)。上記の方法の多くに関する更なる詳細は "Enzymology" (Volume 154) で見出すことができる。この文献にはまた種々の変異導入方法に関する問題を解決するための有用な管理に関する記述がある。

【0123】

本発明の実施に用いることができるプロトコルは例えば以下に記載されている：U.S. P 50

at. No. 5,605,793 (Stemmer, Feb. 25, 1997, "Methods for In Vitro Recombination") ; U.S. Pat. No. 5,811,238 (Stemmer et al., Sep. 22, 1998, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination") ; U.S. Pat. No. 5,830,721 (Stemmer et al., Nov. 3, 1998, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; U.S. Pat. No. 5,834,252 (Stemmer, et al., Nov. 10, 1998, "End-Complementary Polymerase Reaction") ; U.S. Pat. No. 5,837,458 (Minshull, et al., Nov. 17, 1998, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering") ; WO 95/22625 (Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; WO 96/33207 (Stemmer and Lipschutz, "End Complementary Polymerase Chain Reaction") ; WO 97/20078 (Stemmer and Cramer, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination") ; WO 97/35966 (Minshull and Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering") ; WO 99/41402 (Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors") ; WO 99/41383 (Punnonen et al. "Antigen Library Immunization") ; WO 99/41369 (Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering") ; WO 99/41368 (Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines") ; EP 752008 (Stemmer and Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; EP 0932670 (Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination") ; WO 99/23107 (Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling") ; WO 99/21979 (Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors") ; WO 98/31837 (del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination") ; WO 98/27230 (Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering") ; WO 98/27230 (Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection") ; WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries" ; WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences" ; WO 98/42832 (Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers") ; WO 99/29902 (Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences") ; WO 98/41653 (Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library") ; WO 98/41622 (Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling") ; および WO 98/42727 (Pati and Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination")

【 0 1 2 4 】

本発明の実施に用いることができるプロトコル（種々の多様性を生成する方法に関する詳細を提供する）は例えば以下に記載されている："SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" (Patten et al., 1999年9月28日出願、U.S. Ser. No. 09/407,800) ; "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" (del Cardayre et al., 米国特許6,379,964号) ; "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" (Cramer et al., 米国特許6,319,714号 ; 6,368,861号 ; 6,376,246号 ; 6,423,542号 ; 6,426,224号 および PCT/US00/01203 ; "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" (Welch et al., 米国特許6,436,675号) ; "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" (Selifonov et al., 2000年1月18日出願、PCT/US00/01202) および、例えば "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" (Selifonov et al., 2000年7月18日出願、U.S. Ser. No. 09/618,579) ; "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" (Selifonov and Stemmer, 2000年1月18日出願 PCT/US00/01138) ; および "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" (Affholter, 2000年9月6日出願、U.S. Ser. No. 09/656,549) ; および 米国特許6,177,263号 ;

同6,153,410号。

【0125】

非確率的、または“定方向進化”方法（例えば“飽和変異導入”（GSSM）、合成連結再アッセムブリ（SLR）または前記の組合せを含む）を用いて本発明の核酸を改変し、新規なまたは変異した特性（例えば強酸または強アルカリ条件下、高温または低温条件下などでの活性）を有するアミラーゼが生成される。改変された核酸によってコードされるポリペプチドは、タンパク分解活性または他の活性について試験する前に活性についてスクリーニングすることができる。任意の試験様式またはプロトコルを、例えばキャピラリーアレイ台を利用して用いることができる。例えば米国特許第6,361,974号、同6,280,926号、同5,939,250号を参照されたい。

10

【0126】

飽和変異導入（またはGSSM）：ある特徴では、ポリヌクレオチド（例えば本発明のアミラーゼまたは抗体）に点変異を導入し、子孫ポリペプチドの組を生成するために縮退N,N,G/T配列を含むコドンプライマーが使用される。前記子孫ポリペプチドの組では、例えば改変の標的となる酵素活性部位またはリガンド結合部位の各アミノ酸の位置で単一のアミノ酸置換の全範囲が提示される。これらのオリゴヌクレオチドは、連続する第一の相同配列、縮退N,N,G/T配列および場合によって第二の相同な配列を含むことができる。そのようなオリゴヌクレオチドを使用することによって得られる下流の子孫翻訳生成物には、N,N,G/T配列の縮退は20の全てのアミノ酸のためのコドンを含むので前記ポリペプチドに沿って各アミノ酸の位置で可能な全てのアミノ酸変化が含まれる。ある特徴では、1つのそのような縮退オリゴヌクレオチド（例えば1つに縮退N,N,G/Tカセットを含む）が、親のポリヌクレオチド鋳型中の本来のコドンの各々を全範囲のコドン置換に付すために用いられる。また別の特徴では、親のポリヌクレオチド鋳型中の少なくとも2つの本来のコドンを全範囲のコドン置換に付すために少なくとも2つの縮退カセットが（同じヌクレオチドまたは別個のヌクレオチドで）用いられる。例えば2つ以上のN,N,G/T配列を1つのオリゴヌクレオチド内に含ませ、2つ以上の部位でアミノ酸置換を導入することができる。この複数のN,N,G/T配列は連続していてもよいし、または1つもしくは2つ以上のさらに別のヌクレオチド配列によって分離されてあってもよい。別の特徴では、付加および欠失の導入に役立つオリゴヌクレオチドは単独またはN,N,G/T配列を含むコドンとともに用いて、アミノ酸付加、欠失および／または置換の任意の組合せまたは並べ換えが導入される。

20

30

【0127】

ある特徴では、2つまたは3つ以上の連続するアミノ酸位の同時変異は、連続するN,N,G/Tトリプレット（すなわち縮退（N,N,G/T）_n配列）を含むオリゴヌクレオチドを用いて実施される。別の特徴では、N,N,G/T配列よりも縮退性の小さい縮退カセットが用いられる。例えば、いくつかの事例では、ただ1つのN（Nは前記トリプレットの第一、第二または第三番目の位置に存在できる）を含む縮退トリプレット配列を（オリゴヌクレオチドで）用いることができる。任意の組合せおよび順列を含む他のいずれの塩基もトリプレットの残りの2つの位置において用いることができる。また別にはいくつかの事例で縮退N,N,N,トリプレット配列を（例えばオリゴヌクレオチドで）用いることが望ましいかも知れない。

40

ある特徴では、縮退トリプレット（例えばN,N,G/Tトリプレット）の使用によって、ポリペプチドのそれぞれ全てのアミノ酸の位置について可能な天然アミノ酸の全範囲にわたる（合計20アミノ酸）系統的で容易な生成が可能になる（別の特徴では、前記方法はまた、各アミノ酸残基、コドン、位置の可能な全ての置換よりも少ない置換の生成も含む）。例えば、100アミノ酸のポリペプチドの場合、2000個の別個の種（すなわち各位置につき20個の可能なアミノ酸X100個のアミノ酸位置）が生成される。縮退N,N,G/Tトリプレットを含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドセットを使用することによって、32個の個々の配列が20個の可能な天然のアミノ酸を全てコードすることができる。したがって、親のポリヌクレオチド配列が少なくとも1つの前記のようなオリゴヌクレオチドを用いて飽和変異導入に付される反応容器では、20個の別個のポリペプチドをコードする32個

50

のそれぞれ別個の子孫ポリヌクレオチドが生成される。対照的に、部位特異的変異導入では非縮退オリゴヌクレオチドを使用したとき、各反応容器につきただ1つの子孫ポリペプチド生成物が生じるだけである。場合によって非縮退オリゴヌクレオチドを開示の縮退プライマーとともに用いることができる。例えば、非縮退オリゴヌクレオチドを用いて対象のポリヌクレオチドで特定の点変異を生成することができる。これは、特定のサイレント点変異、対応するアミノ酸変化をもたらす点変異、並びに終止コドンおよびポリペプチドフラグメントの対応する発現を生じさせる点変異を生成する1つの手段を提供する。

【0128】

ある特徴では、各飽和変異導入反応容器は、親のポリヌクレオチドで変異を導入されたコドンの位置に一致する個々のアミノ酸位置において20個全ての天然アミノ酸が出現することができるように、少なくとも20の子孫ポリペプチド（例えばアミラーゼ）分子をコードするポリヌクレオチドを含む（他の特徴では20個未満の天然の組合せが用いられる）。各飽和変異導入反応容器から生成される32倍の縮退子孫ポリペプチドをクローン増幅に付し（例えば適切な宿主（例えば大腸菌宿主）に例えば発現ベクターを用いてクローニングする）、さらに発現スクリーニングに付すことができる。スクリーニングにより好ましい特性の変化を提示させることによって個々の子孫ポリペプチドが同定されたとき（例えば親のポリペプチドと比較したときアルカリ性または酸性条件下でタンパク分解活性が増加する）、前記子孫ポリペプチドを配列決定し、その中に含まれる対応する好ましいアミノ酸置換を同定することができる。

ある特徴では、本明細書に開示したように、親のポリペプチドのそれぞれ全てのアミノ酸位置を飽和変異導入を用いて変異を導入するとき、好ましいアミノ酸変化が2つ以上のアミノ酸位置において同定できることがある。これら好ましいアミノ酸置換の全てまたは一部分の組合せを含む1つまたは2つ以上の新規な子孫分子を生成することができる。例えば、2つの具体的な好ましいアミノ酸変化が、ポリペプチドの3つのアミノ酸位置の各々で同定されるならば、順列は各位置かつ3つの位置で3つの可能性を含む（最初のアミノ酸から変化のないものおよび2つの好ましい変化をもつそれぞれのもの）。したがって、 $3 \times 3 \times 3$ 、すなわち合計27の可能性が存在し、これは以前に調べられた7つ — 6つの単一点変異（すなわち3つの位置の各々で2つ）およびいずれの位置においても変化のないものを含む。

別の特徴では、位置飽和変異導入をまた別の確率的または非確率的手段と一緒に用いて配列を変化させることができる。前記別の手段は、例えば合成連結再アッセムブリ（下記参照）、シャッフリング、キメラ化、組換えおよび他の変異導入プロセスおよび変異誘発剤である。本発明は任意の突然変異導入プロセスの使用を提供する。前記には反復態様で用いられる飽和変異導入が含まれる。

【0129】

合成連結再アッセムブリ（SLR）：本発明は、“合成連結再アッセムブリ”、または簡潔に“SLR”、“定方向進化プロセス”と称される、新規なまたは変異した特性を有するポリペプチド（例えば本発明のアミラーゼまたは抗体）を生成する非確率的遺伝子改変系を提供する。SLRは、オリゴヌクレオチドフラグメントを非確率的に一緒に連結する方法である。この方法は、核酸構築ブロックがランダムにシャッフル、連結、またはキメラ化されず、むしろ非確率的にアッセムブリングされるという点で確率的オリゴヌクレオチドシャッフリングとは異なる。例えば以下を参照されたい：米国特許出願（USSN）09/332,835（“Synthetic Ligation Reassembly in Directed Evolution”）（1999年6月14日出願）。ある特徴では、SLRは以下の工程を含む：（a）鋳型ポリヌクレオチドを提供する工程（前記鋳型ポリヌクレオチドは相同な遺伝子をコードする配列を含む）；（b）複数の構築ブロックポリヌクレオチドを提供する工程（前記構築ブロックポリヌクレオチドは鋳型ポリヌクレオチドとあらかじめ定められた配列において交差再アッセムブリングを生じるように考案され、構築ブロックポリヌクレオチドは前記相同な遺伝子の変種である配列および前記変種配列にフランキングする前記鋳型ポリヌクレオチドと相同な配列を含む）；（c）前記構築ブロックポリヌクレオチドが前記鋳型ポリヌクレオチドと交差再アッセム

ブリッジして相同な遺伝子配列変種を含むポリヌクレオチドを生成できるように、構築ブロックポリヌクレオチドを鋳型ポリヌクレオチドと一緒にする工程。

SLRは、再配列を実施されるポリヌクレオチド間に高レベルの相同性が存在することを必要としない。したがって、本方法は、 10^{100} を超える種々のキメラを含む子孫分子のライブラリー（またはセット）を非確率的に作製するために用いることができる。SLRを用いて 10^{100} を超える種々の子孫キメラを含むライブラリーの作製に用いることができる。したがって、本発明の特徴は、設計に従って選択された全体的なアッセムブリの順番にしたがって完成されたキメラ核酸分子セットを製造する非確率的方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：互いに適合する連結可能な有用な末端を有する複数の特別な核酸構築ブロックを設計に従って作製する工程、および設計した全体的なアッセムブリの順番が達成されるように前記核酸構築ブロックをアッセムブリングする工程。

10

【0130】

アッセムブリングされる互いに適合する核酸構築ブロックの末端は、これらが前記構築ブロックをあらかじめ定めた順序で結合させることができるならば、このタイプの指定されたアッセムブリに対して“利用可能”であると考えられる。したがって、前記核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセムブリの順番は、連結させることができる末端の設計によって特定される。2つ以上のアッセムブリ工程が用いられる場合、核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセムブリの順番は、前記アッセムブリ工程の一連の順番によって特定される。ある特徴では、アニールされた構築片が酵素（例えばリガーゼ（例えばT4 DNAリガーゼ））で処理され、前記構築片の共有結合が達成される。

20

ある特徴では、オリゴヌクレオチド構築ブロックの設計は、祖先核酸配列鋳型セットを解析することによって得られる（祖先核酸配列は完成したキメラポリヌクレオチドの子孫セットを生成する基礎として機能する）。したがって、これら親のオリゴヌクレオチド鋳型は、変異（例えばシャッフリングまたはキメラ化）を導入しようとする核酸構築ブロックの設計に役立つ配列情報源として機能する。この方法のある特徴では、複数の親核酸鋳型の配列でアラインメントを実施して1つまたは2つ以上の境界点を選択される。前記境界点は相同領域に位置し、1つまたは2つ以上のヌクレオチドを含むことができる。これらの境界点は好ましくは少なくとも2つの祖先鋳型によって共有される。それによって前記境界点は、親ポリヌクレオチドの再編成のために作製されるオリゴヌクレオチド構築ブロックの境界線を引くために用いることができる。祖先分子中で特定され選別される境界点は、完成キメラ子孫分子のアッセムブリにおける潜在的キメラ形成点として機能する。境界点は、少なくとも2つの親ポリヌクレオチド配列によって共有される相同領域（少なくとも1つの相同なヌクレオチド塩基を含む）であり得る。あるいは、境界点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも半分によって共有される相同領域であるか、または親ポリヌクレオチド配列の少なくとも2/3によって共有される相同領域であり得る。さらに好ましくは、有用な境界点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも3/4によって共有される相同領域であるか、または境界点は親ポリヌクレオチド配列のほぼ全てによって共有され得る。ある特徴では、境界点は、親ポリヌクレオチド配列の全部によって共有される相同領域である。

30

ある特徴では、連結再アッセムブリ処理は、子孫キメラポリヌクレオチドの網羅的ライブラリーを作製するために網羅的に実施される。換言すれば、全ての可能な順番で組み合わされた核酸構築ブロックが、完成キメラ核酸分子セットに提示される。同時に、別の実施態様では、各組合せにおけるアッセムブリの順番（すなわち完成したキメラ核酸の各々の配列の5'から3'方向における各構築ブロックのアッセムブリの順番）は上記に記載したように意図的（または非確率的）である。本発明の非確率的な性質のために、望ましくない副生成物の可能性は極めて少ない。

40

【0131】

別の特徴では、前記連結再アッセムブリ方法は系統的に実施される。例えば、前記方法は、系統的に区画化された子孫分子のライブラリーを作製するために実施され、前記区画化ライブラリーは、系統的に（例えば1つずつ）スクリーニングすることができる区画を

50

有する。換言すれば、本発明は、連続工程によるアッセンブリング反応の選択的および慎重な使用と併せて特定の核酸構築ブロックを選択的および慎重に使用することによって、特定の子孫生成物セットがいくつかの反応容器の各々で生成される仕組みの達成を提供する。前記によって系統的な調査およびスクリーニング方法の実施が可能になる。したがって、これらの方法は、潜在的に膨大な数の子孫分子をより小さなグループで系統的に調査することを可能にする。特に祖先分子間で低レベルの相同性しか存在しないときに、高度に柔軟性を有し、しかも網羅的で系統的な態様でのキメラ化の実施を可能にするその能力のために、これらの方法は膨大な数の子孫分子を含むライブラリー（またはセット）の生成を提供する。本発明の連結再アッセンブリの非確率的性質のために、生成される子孫分子は好ましくは、設計に従って選択された全体的なアッセンブリの順番を有する完成されたキメラ核酸分子のライブラリーを含む。飽和変異導入および最適化された定方向進化方法もまた種々の子孫分子種の生成に用いることができる。本発明は、境界点、核酸構築ブロックのサイズおよび数並びに結合の設計の選択に関して選択と制御の自由を提供することは理解されよう。さらにまた、分子間相同性の要求は、本発明を実施し易くするために大きく緩和されることもまた理解されよう。実際、境界点はほとんどまたはまったく分子間相同性がない領域でも選択できる。例えば、コドンの揺らぎのために（すなわちコドンの縮退性のために）、対応する祖先鋳型で本来コードされるアミノ酸を変更することなくヌクレオチド置換を核酸中に導入することができる。あるいは、コドンを変更して本来のアミノ酸のコードを変更してもよい。本発明は、分子間相同性を有する境界点の出現傾向を高めるために、したがって構築ブロック間で達成される結合数を高めるために（それぞれ生成される子孫キメラ分子数の増加を可能にする）、前記のような置換の核酸構築ブロックへの導入を提供する。

【0132】

また別の特徴では、構築ブロックが作製される工程の合成的な性質によって、*in vitro* 過程（例えば変異導入により）または*in vivo* 過程（例えば宿主生物の遺伝子スプライシング能を利用することにより）で場合によって後で除去することが可能なヌクレオチド（例えば1つまたは2つ以上のヌクレオチドで、例えばコドンまたはイントロンまたは調節配列であろう）を設計または導入することが可能になる。多くの事例で、有用な境界点を創出できるという潜在的な利点の他に多くの他の理由からこれらヌクレオチドの導入はまた望ましいであろうということは理解されよう。

ある特徴では、核酸構築ブロックを用いてイントロンを導入することができる。したがって、機能的なイントロンが本明細書に記載された方法にしたがって製造された人工遺伝子に導入される。前記人工的に導入されたイントロンは、天然に存在するイントロンが遺伝子スプライシングで機能を発揮する態様とほぼ同じように遺伝子スプライシングのために宿主細胞で機能することができる。

【0133】

最適化定方向進化系：本発明は、新規なまたは変異した特性をもつポリペプチド、例えば本発明のアミラーゼまたは抗体を生成するために、“最適化定方向進化系”と称される非確率的遺伝子改変系を提供する。最適化定方向進化は、組換えによる核酸の定方向分子進化を可能にする、還元的再組合せ（*reductive reassortment*）、組換えおよび選別の反復サイクルを用いることを意図する。最適化定方向進化は進化したキメラ配列の大集団の生成を可能にし、前記生成集団には予め定められた数の交差事象を含む配列がきわめて豊富に存在する。

交差事象はキメラ配列内において、一方の親の変種から別の親の変種へ配列のシフトが生じる点である。そのような点は通常は2つの親に由来するオリゴヌクレオチドが一緒に連結され、単一の配列を形成する結合部に存在する。本方法は、最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象を豊富に含むことができるようにオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にする。これによって、予め定められた数の交差事象を含むキメラ変種の選択に対してより大きな制御が提供される。

【0134】

10

20

30

40

50

さらにまた、本方法は、他の系と比較して膨大な量の可能なタンパク質変種スペースの探索のための簡便な手段を提供する。以前には、反応中に例えば 10^{13} 個のキメラ分子が生成された場合、そのような膨大な数の変種の特定の活性についてテストすることは極めて困難であろう。さらにまた、子孫集団の顕著な部分が、特定の活性のレベルが増加している可能性が少ないタンパク質を生じる非常に大きな数の交差事象を含むであろう。前記の方法を用いることによって、キメラ分子集団は特定の数の交差事象を含む変種を豊富に含むことができる。したがって、反応中になお 10^{13} 個のキメラ分子を生成しても、更なる解析のために選別される分子の各々は、例えば3つの交差事象だけを含む可能性が高くなる。生成された子孫集団が予め定めた数の交差事象を持つように偏らせることができるので、キメラ分子間の機能的変種に対する境界線が減少する。これによって、最初の親のポリヌクレオチドに由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の属性に影響を及ぼすために必要かを計算するときにより操作しやすい数の変数が提供される。

10

【0135】

キメラ子孫ポリヌクレオチドを作製する1つの方法は、それぞれの親の配列のフラグメントまたは部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することである。各オリゴヌクレオチドは好ましくは固有のオーバーラップ領域を含み、その結果、前記オリゴヌクレオチドと一緒に混合することによって、各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順番でアッセンブリされた新規な変種が生成される。更なる情報は、例えばUSSN09/332,835；米国特許6,361,974号で見出すことができよう。

各親変種について生成されるオリゴヌクレオチドの数は、最終的に作製されるキメラ分子で生じる交差の総数と関係がある。例えば、3つの親のヌクレオチド配列変種が提供され、連結反応を経て高温でより高い活性をもつキメラ変種を見つけることができるであろう。1つの例として、50個のオリゴヌクレオチド配列を含むセットを各親変種のそれぞれの部分に対応して作製することができる。したがって、連結アッセンブリプロセスの間に、キメラ配列の各々の中に50個までの交差事象が存在することができよう。生成されたキメラポリヌクレオチドの各々が交互に各親変種由来のオリゴヌクレオチドを含む確率は非常に低い。各オリゴヌクレオチドフラグメントが連結反応で同じモル濃度で存在するならば、いくつかの位置で同じ親に由来するオリゴヌクレオチドが互いに並んで連結され、したがって交差事象を生じない可能性がある。各親に由来する各オリゴヌクレオチドの濃度がこの例のいずれの連結工程でも一定に保たれるならば、同じ親変種に由来するオリゴヌクレオチドがキメラ配列内で連結され、交差を生じないチャンスは $1/3$ （3つの親と仮定した）である。

20

30

【0136】

したがって、親変種セットの数、各変種に対応するオリゴヌクレオチドの数、および連結反応の各工程における各変種の濃度が与えられたならば、確率濃度関数(probability density function (PDF))を決定して連結反応の各工程で生じる可能性がある交差事象をもつ集団を予測することができる。PDFの決定の根拠となる統計学および数学は以下に記載される。これらの方法を用いることによって、前記の確率濃度関数を決定することができ、したがって個々の連結反応から生じる予め定めた数の交差事象のためにキメラ子孫集団の濃度を高めることができる。さらにまた、交差事象の標的数は予め定めることができ、続いて、予め定めた交差事象数に集中する確率濃度関数をもたらし連結反応の各工程における各親オリゴヌクレオチドの発量を算出するために前記系をプログラミングすることができる。これらの方法は、組換えによりポリペプチドをコードする核酸の誘導分子進化を可能にする還元的再組合せ、組換えおよび選別の反復サイクルを用いることを意図する。前記の系は進化したキメラ配列の大集団の作製を可能にし、前記作製された集団は、予め定めた数の交差事象を含む配列が顕著に濃縮されている。交差事象は、一方の親変種からもう一方の親変種へ配列のシフトが生じるキメラ配列中の点である。そのような点は通常は2つの親に由来するオリゴヌクレオチドと一緒に連結され、単一の配列を形成する結合部に存在する。前記方法は、最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象に富むことができるようにオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にする。これによ

40

50

って、予め定めた数の交差事象を含むキメラ変種の選択に対してより大きな制御が提供される。

さらにまた、これらの方法は、他の系と比較して膨大な量の可能なタンパク質変種スペースの探索のための簡便な手段を提供する。本明細書に記載した方法を用いることによって、特定の数の交差事象を含む変種についてキメラ分子集団を濃縮することができる。したがって、反応中になお 10^{13} 個のキメラ分子を生成しても、更なる解析のために選別される分子の各々は、例えば3つの交差事象だけを含む可能性が高くなる。生成された子孫集団が予め定めた数の交差事象を持つように偏らせることができるので、キメラ分子間の機能的変種に対する境界線が減少する。これによって、最初の親のポリヌクレオチドに由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の属性に影響を及ぼすために必要かを計算するときにより操作しやすい数の変数が提供される。

ある特徴では、本方法は、それぞれの親の配列のフラグメントまたは部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することによってキメラ子孫ポリヌクレオチド配列を生成する。各オリゴヌクレオチドと一緒に混合することによって各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順番でアッセムブリグされた新規な変種が生じるように、各オリゴヌクレオチドは好ましくは固有のオーバーラップ領域を含む。USSN09/332,835をまた参照されたい。

【0137】

交差事象の決定：本発明の特徴は、所望の交差事象の確立濃度関数（PDF）、再アッセムブリグされる親遺伝子の数および再アッセムブリグでのフラグメント数を入力として受け取るシステムおよびソフトを含む。このプログラムの出力は、再アッセムブリグされた遺伝子を製造するためのレシピを決定するために用いることができる“フラグメントPDF”およびこれら遺伝子の概算交差PDFである。本明細書に記載されるプロセッシングは好ましくは、MATLAB（商標）（The Mathworks, Natick, Massachusetts）、プログラミング言語およびテクニカルコンピューティングのための発展環境で実施される。

【0138】

反復処理：本発明の実施に際して、これらの処理は何度も繰り返すことができる。例えば、変異したまたは新規なアミラーゼ表現型をもたらすある核酸（または所定の核酸）は特定、再単離、再改変され、さらに活性について再試験される。この処理は、所望の表現型が作り出されるまで何度も繰り返すことができる。例えば、完全な生化学的同化作用または異化作用経路（例えばデンプン加水分解活性を含む）を細胞内に高度な操作により生成することができる。

同様に、特定のオリゴヌクレオチドが所望の属性（例えば新規なアミラーゼ表現型）について全く影響を与えないと決定されたならば、前記オリゴヌクレオチドは変数として除去することができ、それは除去される配列を含むより大きな親オリゴヌクレオチドを合成することによって達成される。配列をより大きな配列内に取り込むことによって一切の交差事象が防止されるので、子孫ポリヌクレオチド中にはこの配列の変型はもはや全く存在しないであろう。どのオリゴヌクレオチドが所望の属性と最も関係があり、どのオリゴヌクレオチドが無関係であるかを決定するこの反復実施は、特定の属性または活性を提供する可能性があるタンパク質の全てについてより効率的な探索を可能にする。

【0139】

in vivoシャッフリング：分子のin vivoシャッフリングは、本発明のポリペプチド（例えば抗体、アミラーゼなど）の変種を提供する本発明の方法で使用される。in vivoシャッフリングは、マルチマーを再結合させる細胞の天然の特性を利用して実施することができる。in vivo組換えは分子の多様性をもたらす主要な天然の経路を提供してきたが、一方遺伝子組み換えは以下を含む比較的複雑な過程のままである：1）相同性の認識；2）鎖の切断、鎖の侵襲、および組換え交差の生成をもたらす代謝過程；および最後に3）別個の再結合分子へのキアズマの分離。キアズマの形成は相同配列の認識を必要とする。

ある特徴では、本発明は、少なくとも第一のポリヌクレオチド（本発明のアミラーゼ）および第二のポリヌクレオチド（例えば酵素、例えば本発明のアミラーゼもしくはは任意の他のアミラーゼ、またはタグもしくははエピトープ）からハイブリッドポリヌクレオチドを

製造する方法を提供する。本発明を用いてハイブリッドポリヌクレオチドを製造することができる。これは、部分的な配列相同性を少なくとも1つの領域で共有する少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび第二のポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入することによって達成される。部分的な配列相同性領域は、ハイブリッドポリヌクレオチドを生成する配列認識を生じる過程を促進する。本明細書で用いられる“ハイブリッドポリヌクレオチド”という用語は、本発明の方法によりもたらされ、少なくとも2つの原型ポリヌクレオチド配列由来の配列を含む任意のヌクレオチド配列である。そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、DNA分子間の配列統合を促進する分子間組換え事象により生じる。さらにまた、そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、連続工程の繰り返しによりDNA分子内のヌクレオチド配列を改変させる分子内還元的再組合せ処理により生成することができる。

10

【0140】

配列変種の作製：本発明はまた、本発明の核酸（例えばアミラーゼ）配列の変種を作製する方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸およびポリペプチドを用いてアミラーゼを単離するさらに別の方法を提供する。ある特徴では、本発明は本発明のアミラーゼコード配列（例えば遺伝子、cDNAまたはメッセージ）の変種を提供する。前記変種は、任意の手段（例えばランダムもしくは確率的方法、または非確率的もしくは上記に記載した“定方向進化”方法を含む）によって変異させることができる。

前記単離変種は天然に存在するものでもあり得る。変種はまたin vitroで生成することもできる。変種は遺伝子工学技術、例えば部位特異的変異導入、化学的ランダム変異導入、エキソヌクレアーゼIII欠失方法および標準的クローニング技術を用いて生成することができる。あるいは、そのような変種、フラグメント類似体または誘導体は化学的合成または改変方法を用いて生成することができる。変種を作製する他の方法もまた当業者にはよく知られていよう。それらには、天然の単離物から得られた核酸配列を改変して、それらの工業的価値または実験室利用を高める性状をもつポリペプチドをコードする核酸を生成する方法が含まれる。そのような方法では、天然の単離物から得られた配列に対して1つまたは2つ以上のヌクレオチドの相違を有する多数の変種配列が生成され、性状が決定される。これらのヌクレオチド相違は、天然の単離物の核酸によってコードされるポリペプチドに対してアミノ酸変化をもたらすことができる。

20

【0141】

例えば、変種は変異性PCRを用いて作製することができる。変異性PCRでは、PCRは、DNAポリメラーゼの複写信頼性が低く、高率の点変異がPCR全長にわたって得られるような条件下で実施される。変異性PCRは例えば以下に記載されている：D.W. Leung et al., *Technique*, 1:11-15 (1989); R.C. Caldwell & G.F. Joyce, *PCR Methods Applic.* 2:28-33 (1992)。簡単に記せば、前記の方法では、突然変異を導入される核酸は、PCRプライマー、反応緩衝液、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、Taqポリメラーゼおよび適切な濃度のdNTPと混合され、PCR生成物の全長にわたって高率の点変異が達成される。例えば、前記反応は、20fmoleの突然変異を導入されるべき核酸、30pmoleの各PCRプライマー、反応緩衝液（50mMのKCL、10mMのトリス（pH8.3）および0.01%のゼラチンを含む）、7mMの $MgCl_2$ 、0.5mMの $MnCl_2$ 、5単位のTaqポリメラーゼ、0.2mMのdGTP、0.2mMのdATP、1mMのdCTPおよび1mMのdTTPを用いて実施される。PCRでは、94°C1分、45°C1分および72°C1分の30サイクルが実施される。しかしながら、これらのパラメーターは適宜変動させることができることは理解されよう。変異核酸は適切なベクターでクローニングされ、前記変異核酸によってコードされたポリペプチドの活性が評価される。

30

40

変種はまた、オリゴヌクレオチド特異的変異導入を用いて作製することができ、任意のクローニングされた関心のあるDNAに位置特異的変異を生じさせることができる。オリゴヌクレオチド変異導入は例えば以下に記載されている：Reidhaar-Olson (1988) *Science* 241:53-57。簡単に記せば、前記の方法では、クローン化DNAに導入されるべき1つまたは2つ以上の変異をもつ複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが合成され、突然変異を導入される前記クローン化DNAに挿入される。突然変異を導入されたDNAを含むクローンを回収し、そ

50

れらがコードするポリペプチドの活性を評価する。

【0142】

変種を生成するまた別の方法はアッセンブリPCRである。アッセンブリPCRでは、小さなDNAフラグメント混合物からPCR生成物をアッセンブリングすることが必要である。多数の様々なPCR反応が同じバイアル中で生じ、1つの反応の生成物が別の反応の生成物をプライミングする。アッセンブリPCRは例えば米国特許第5,965,408号に記載されている。

変種を生成するまた別の方法はセクシュアルPCR変異導入である。セクシュアルPCR変異導入では、配列相同性によるDNA分子のランダムなフラグメント化とそれに続くPCR反応におけるプライマーの伸長による交差の固定の結果として、強制された相同組換えが、別個であるが相関性を有するDNA配列をもつDNA分子間でin vitroで生じる。セクシュアルPCR変異導入は例えば以下に記載されている：Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751。簡単に記せば、前記の方法では、組換えられるべき複数の核酸をDNaseで消化して平均サイズが50-200ヌクレオチドのフラグメントを生成する。所望の平均サイズをもつフラグメントを精製し、PCR混合物に再懸濁する。PCRは、前記核酸フラグメント間の組換えが促進される条件下で実施される。PCRは、例えば以下によって実施できる：前記精製フラグメントを10-30ng/μLの濃度で溶液（0.2Mの各dNTP、2.2mMのMgCl₂、50mMのKCl、10mMのトリス塩酸（pH9.0）および0.1%トリトンX-100）に再懸濁する。100μLの反応混合物につき2.5単位のTaqポリメラーゼを添加し、PCRを以下の方式を用いて実施する：94℃60秒、94℃30秒、50-55℃30秒、72℃30秒（30-45回）および72℃で5分。しかしながら前記パラメーターは適宜変動させることができることは理解されよう。いくつかの特徴では、オリゴヌクレオチドをPCR反応に含ませることができる。他の特徴では、DNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントをPCR反応の最初のセットで用い、Taqポリメラーゼをその後のPCR反応セットで用いることができる。組換え配列を単離し、それらがコードするポリペプチドの活性を評価する。

【0143】

変種はまたin vivo変異導入によって生成することができる。いくつかの特徴では、DNA修復経路の1つまたは2つ以上に変異を含む細菌株（例えば大腸菌株）で関心のある配列を増殖させることによって、関心のある配列でランダム変異が生成される。そのような“ミューテーター”株は野生型の親よりも高いランダム変異率を有する。これらの株の1つでDNAを増殖させることによって、最終的にはDNA内部にランダム変異が生成されるであろう。in vivo変異導入に使用するために適したミューテーター株は例えばPCT公開広報W091/16427に記載されている。

変種はまたカセット変異導入を用いて生成される。カセット変異導入では、二本鎖DNA分子の小さな領域が、天然の配列とは異なる合成オリゴヌクレオチド“カセット”で置き換えられる。前記オリゴヌクレオチドはしばしば完全におよび／または部分的に任意抽出された天然の配列を含む。

再帰的アンサンブル変異導入もまた変種の生成に用いることができる。再帰的アンサンブル変異導入は、表現型が関連性をもつ変異体の多様化集団（そのメンバーはアミノ酸配列が異なる）を生成するために開発されたタンパク質工学（タンパク質変異導入）のためのアルゴリズムである。前記方法はフィードバックメカニズムを用いて、総当り組合せカセット変異導入（combinatorial cassette mutagenesis）の連続一巡工程を制御する。再帰的アンサンブル変異導入は例えば以下に記載されている：Arkin (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815。

【0144】

いくつかの特徴では、変種はエクスポネンシャルアンサンブル変異導入を用いて生成される。エクスポネンシャルアンサンブル変異導入は、高い割合の固有で機能的な変異体を含む総当り組合せライブラリーを生成する方法である。前記変異導入では、残基の小グループが並行して任意抽出され、機能的タンパク質を生じるアミノ酸がそれぞれ変更された位置で同定される。エクスポネンシャルアンサンブル変異導入は例えば以下に記載されている：Delagrave (1993) Biotechnology Res. 11:1548-1552。ランダムな変異導入

および部位特異的変異導入は例えば以下に記載されている：Arnold (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455。

いくつかの特徴では変種はシャッフリング手順によって生成される。前記では、別個のポリペプチドをコードする複数の核酸の部分が融合され、例えば米国特許第5,965,408号、同第5,939,250号に記載されたようなキメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列が生成される（上記の考察もまた参照されたい）。

【0145】

本発明はまた本発明のポリペプチド（例えばアミラーゼ）の変種を提供する。前記変種では、（例えば本発明の典型的なポリペプチドの）1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（例えば保存アミノ酸残基）で置換されている配列を含み、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされるものでも、そうでないものでもよい。保存的置換は、ポリペプチド内のあるアミノ酸が同様な特徴を持つ別のアミノ酸によって置換されるものである。したがって、本発明のポリペプチドは本発明の配列（例えば本発明の典型的なポリペプチド）の保存的置換を有するポリペプチドを含む。前記置換は以下の置換を含む（ただしこれらに限定されない）：脂肪族アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）の別の脂肪族アミノ酸による置換；セリンのスレオニンによる置換またはその逆；酸性残基（例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸）の別の酸性残基による置換；アミド基をもつ残基（例えばアスパラギンおよびグルタミン）の別のアミド基をもつ残基による置換；塩基性残基（例えばリジンおよびアルギニン）の別の塩基性残基による交換；および芳香族残基（例えばフェニルアラニン、チロシン）の別の芳香族残基による置換。他の変種は、本発明のポリペプチドの1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が置換基を含む変種である。

本発明に包含される他の変種は、前記ポリペプチドが別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させる化合物（例えばポリエチレングリコール）と結合しているものである。

本発明に包含されるさらに別の変種は、さらに別のアミノ酸が前記ポリペプチドに融合されているものである。前記別のアミノ酸は例えばリーダー配列、分泌配列、プロプロテイン配列または前記ポリペプチドの精製、濃縮または安定化を促進する配列である。

いくつかの特徴では、本発明のポリペプチドの変種、フラグメント、誘導体および類似体は、典型的なポリペプチドと同じ生物学的機能または活性、例えば本明細書に記載されたようなアミラーゼ活性を保持している。他の特徴では、前記変種、フラグメント、誘導体または類似体は、そのプロプロテイン部分の切断によって前記変種、フラグメント、誘導体または類似体が活性化されて活性なポリペプチド生成することができるようにプロプロテインを含む。

【0146】

宿主細胞における高レベルのタンパク質発現を達成するためのコドンの最適化

本発明は、コドン使用頻度を改変するためにアミラーゼコード核酸を改変する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、アミラーゼをコードする核酸のコドンを改変して宿主におけるその発現を増加または減少させる方法を提供する。本発明はまた、宿主細胞におけるその発現を高めるために改変されたアミラーゼをコードする核酸、そのように改変されたアミラーゼおよび前記改変アミラーゼ酵素を製造する方法を提供する。前記方法は、“非優先”または“低優先”コドンをアミラーゼコード核酸中で同定し、さらにこれら非優先もしくは低優先コドンの1つまたは2つ以上を、前記コドンと同じアミノ酸をコードする“優先コドン”で置き換え、さらに核酸内の少なくとも1つの非優先または低優先コドンが同じアミノ酸をコードする優先コドンによって置き換えられてあることを含む。優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度に提示されるコドンであり、非優先または低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである。

本発明の核酸、発現カセットおよびベクターの発現のための宿主細胞には細菌、酵母、真菌、植物細胞および哺乳動物細胞が含まれる。したがって、本発明はこれら全ての細胞

でコドン使用頻度を最適化する方法、コドン改変核酸およびコドン改変核酸によって生成されるポリペプチドを提供する。例示的な宿主細胞には、グラム陰性細菌（例えば大腸菌、）；グラム陽性細菌（例えばバチルス・セレウス、ストレプトミセス、ラクトバチルス・ガッセリ（*Lactobacillus gasserii*）、ラクトコッカス・ラクチス（*Lactococcus lactis*）、ラクトコッカス・クレモリス（*Lactococcus cremoris*）、バチルス・ズブチリス）が含まれる。例示的な宿主細胞はまた真核生物、例えば種々の酵母、例えばサッカロミセス種（サッカロミセス・セレビシアエを含む）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）およびクルイベロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces lactis*）、ハンセヌラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）、アスペルギルス・ニゲルを含む）並びに哺乳動物細胞および細胞株、並びに昆虫細胞および細胞株を含む。したがって、本発明はまた前記生物および種での発現のために最適化された核酸およびポリペプチドを含む。

【0147】

例えば、細菌細胞から単離されたアミラーゼをコードする核酸のコドンは、前記アミラーゼが由来した細菌とは異なる細菌細胞、酵母、真菌、植物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞で前記核酸が最適に発現できるように改変される。コドンを最適化する方法は当業界において周知で、例えば以下を参照されたい：US Pat. No. 5,795,737; Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188; Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253。さらにまた以下を参照されたい：Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253（マウス系でのコドンの最適化を記載）；Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24（酵母でのコドンの最適化を記載）；Feng (2000) *Biochemistry* 39:15339-15409（大腸菌でのコドンの最適化を記載）；Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264（大腸菌での分泌に影響するコドン使用頻度の最適化を記載）。

【0148】

非ヒトトランスジェニック動物

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド（例えばアミラーゼ）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトされたもしくは形質転換された細胞を含むヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。本発明はまた、前記非ヒトトランスジェニック動物の作製方法および使用方法を提供する。

前記トランスジェニック非ヒト動物は、例えばヤギ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、乳牛、ラットおよびマウスで、本発明の核酸を含む。前記の動物は、例えばアミラーゼ活性を調べる *in vivo* モデルとして、またはアミラーゼ活性を変化させる薬剤を *in vivo* でスクリーニングするモデルとして用いることができる。ヒト以外のトランスジェニック動物で発現されるべきポリペプチドのコード配列は、構成的であるように、または組織特異的、生育特異的もしくは誘導性調節因子の制御下にあるように設計することができる。ヒト以外のトランスジェニック動物は当業界で公知の任意の方法を用いて設計および生成することができる。例えば以下を参照されたい：US Patent No. 6,211,428; 6,187,992; 6,156,952; 6,118,044; 6,111,166; 6,107,541; 5,959,171; 5,922,854; 5,892,070; 5,880,327; 5,891,698; 5,639,940; 5,573,933; 5,387,742; 5,087,571（形質転換細胞および卵並びにトランスジェニックマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタおよびウシの製造および使用について記載されている）。さらにまた例えば以下を参照されたい：Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157（トランスジェニック乳牛のミルクの組換えタンパク質の製造について記載）；Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461（トランスジェニックヤギの作製を示す）。米国特許第6,211,428号は、DNA配列を含む核酸構築物をその脳で発現するヒト以外のトランスジェニック哺乳動物の製造および使用について記載している。

米国特許第5,387,742号は、クローン化組換えまたは合成DNA配列の受精マウス卵への注入、前記注入卵の偽妊娠雌への移植および、アルツハイマー病関連タンパク質をその細胞が発現するトランスジェニックマウスの妊娠期間満了までの発生について記載している。米国特許第6,187,992号は、そのゲノムがアミロイド前駆体（APP）をコードする遺伝子の

破壊を含むトランスジェニックマウスの製造および使用を記載している。

“ノックアウト動物”もまた本発明の方法の実施に用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明のトランスジェニックまたは改変動物は“ノックアウト動物”、例えば内因性遺伝子を発現しないように操作された“ノックアウトマウス”を含む（前記内因性遺伝子は、本発明のアミラーゼまたは本発明のアミラーゼを含む融合タンパク質を発現する遺伝子で置き換えられている）。

【0149】

トランスジェニック植物および種子

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド（例えばアミラーゼ、例えばアルファアミラーゼ）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトもしくは形質転換された細胞を含むトランスジェニック植物および種子を提供する。本発明はまた、本発明の核酸および／またはポリペプチド（例えばアミラーゼ、例えばアルファアミラーゼ）を含む植物生成物、例えば種子、葉、抽出物などを提供する。前記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であり得る。本発明はまた前記トランスジェニック植物および種子の製造方法および使用方法を提供する。本発明のポリペプチドを発現するトランスジェニック植物または植物細胞は当業界で公知の任意の方法にしたがって構築できる。例えば米国特許第6,309,872号を参照されたい。

本発明の核酸および発現構築物は任意の手段によって植物細胞に導入できる。例えば、核酸または発現構築物は所望の植物宿主のゲノムに導入することができるが、また前記核酸または発現構築物はエピソームであってもよい。所望の植物のゲノム中への導入は、宿主のアミラーゼの産生が内因性の転写または翻訳制御エレメントによって調節できるようなものであろう。本発明はまた、相同組換えによる遺伝子配列の挿入によって内因性遺伝子の発現が破壊された“ノックアウト植物”を提供する。“ノックアウト”植物を作製する手段は当業界で周知であり、例えば以下を参照されたい：Strepp (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4368-4373; Miao (1995) Plant J. 7:359-365。下記のトランスジェニック植物についての考察を参照されたい。

【0150】

本発明の核酸を用いて、所望の属性を本質的に任意の植物（例えば澱粉生成植物、例えばジャガイモ、コムギ、イネ、オオムギなど）に付与することができる。本発明の核酸を用いて植物の代謝経路を操作し、宿主の α -アミラーゼ発現を最適化または変化させることができる。本発明の核酸は植物のデンプン/糖変換率を変化させることができる。また別に、本発明の α -アミラーゼをトランスジェニック植物の製造に用いて、天然に産生することができない化合物を前記植物によって製造することができる。これによって製造コストを下げるか、または新規な生成物を生成することができる。

ある特徴では、トランスジェニック植物製造の第一の工程は、植物細胞での発現のための発現構築物を作製することを含む。これらの技術は当業界では公知である。これらにはプロモーターの選別およびクローニング、リボソームのmRNAへの効率的な結合を促進するためのコード配列および適切な遺伝子ターミネーター配列の選別が含まれる。典型的な構成的プロモーターの1つはカリフラワーモザイクウイルスに由来するCaMV35Sであり、一般的な植物で高度な発現をもたらす。他のプロモーターはより特異的であり、植物の内部環境または外部環境の合図に反応する。典型的な光誘導性プロモーターは、主要な葉緑素a/b結合タンパク質をコードするcab遺伝子に由来するプロモーターである。

ある特徴では、核酸は改変されて植物細胞でのより強い発現が達成される。例えば、本発明の配列は植物で認められるA-Tヌクレオチド対の割合と比較して高いA-Tヌクレオチド対をもつ可能性が高い（植物のいくつかはG-Cヌクレオチド対を好む）。従って、コード配列内のA-Tヌクレオチドを、アミノ酸配列を顕著に変化させることなくG-Cヌクレオチドに置換して、植物細胞での遺伝子生成物の産生を高めることができる。

【0151】

選別可能なマーカー遺伝子を遺伝子構築物に付加し、トランスジーンを組み込むことに成功した植物細胞または組織を同定することができる。これは、植物細胞での遺伝子の取

り込みおよび発現の達成が稀な事象であり、標的組織または細胞のわずかな割合で生じるだけであるので必要であり得る。選別可能なマーカー遺伝子は、通常は植物にとって有毒である物質（例えば抗生物質または除草剤）に対して耐性を提供するタンパク質をコードする。前記適切な抗生物質または除草剤を含む培地で増殖させたとき、選別可能なマーカー遺伝子を組み込んだ植物細胞だけが生存するであろう。他の挿入遺伝子の場合のように、マーカー遺伝子もまた適切な機能のためにプロモーターおよびターミネーター配列を必要とする。

ある特徴では、トランスジェニック植物または種子の作製は、本発明の配列および場合によってマーカー遺伝子の標的発現構築物（例えばプラスミド）への取り込みをプロモーターおよびターミネーター配列の適切な配置とともに含む。これは、適切な方法により改変遺伝子を前記植物に移すことを必要とするであろう。例えば、構築物は植物細胞のゲノムDNAに、例えば植物細胞のプロトプラストのエレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションのような技術を用いて直接導入することができる。または、構築物は弾道的方法（例えばDNA粒子ボンバードメント）を用いて植物組織に直接導入することもできる。例えば以下を参照されたい：Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69（トランスジーンのコムギへの導入のための粒子ボンバードメントの使用を考察する）；およびAdam (1997)（上掲書）（YACの植物細胞への導入のための粒子ボンバードメントの使用について記載）。例えばRinehart (1997)（上掲書）は粒子ボンバードメントを用いてトランスジェニックな綿の木を生成した。粒子を加速する装置は米国特許第5,015,580号に記載されており、さらにBioRad (Biolistics) PDS-2000粒子加速装置が市販されている。さらに以下もまた参照されたい：米国特許第5,608,148号（John）；および米国特許第5,681,730号（Ellis）（裸子植物の粒子仲介形質転換を記載している）。

【0152】

ある特徴では、プロトプラストを固定し、核酸（例えば発現構築物）を注入することができる。プロトプラストから植物を再生させることは穀類では容易ではないが、マメ類では体細胞の胚形成を用いてプロトプラスト由来カルスから植物の再生が可能である。器官を形成した組織を遺伝子銃技術を用いて裸のDNAで形質転換することができる。この場合、DNAはタングステンの微小発射体上に被覆され、細胞のサイズの1/100に発射される。前記発射体はDNAを細胞および細胞内小器官の奥深くに運ぶ。続いて形質転換組織を再生のために誘導する（通常は体細胞胚形成による）。この技術はいくつかの穀類種（トウモロコシおよびイネを含む）で成功した。

核酸、例えば発現構築物もまた組換えウイルスを用いて植物細胞に導入することができる。植物細胞はウイルスベクター、例えばタバコモザイクウイルス由来ベクターを用いて形質転換することができる（Rouwendal (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:989-999）。以下を参照されたい：“Use of viral replicons for the expression of genes in plants”，*Mol. Biotechnol.* 5:209-221。

【0153】

あるいは、核酸（例えば発現構築物）を適切なT-DNAフランキング領域と結合させて、一般的なアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）宿主ベクターに導入することができる。アグロバクテリウム・ツメファシエンスのビルレンス機能は、細胞が前記細菌に感染したとき植物細胞DNAに前記構築物および隣接するマーカーの挿入を誘導し得る。アグロバクテリウム・ツメファシエンス仲介形質転換技術（バイナリーベクターの無毒化および使用を含む）は学術文献に詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい：Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803; Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995)。アグロバクテリウム・ツメファシエンスの細胞中のDNAは細菌の染色体およびTi（腫瘍誘発；*tumor-inducing*）プラスミドとして知られている別の構造物中に含まれている。Tiプラスミドは、T-DNA（約20kbの長さ）と称される一続きのDNA（感染過程で植

物細胞に移される) および一連のvir (virulence、ビルレンス) 遺伝子 (感染過程を指令する) を含む。アグロバクテリウム・ツメファシエンスは創傷からのみ植物に感染する。

植物の根または茎が傷を受けたとき、植物はある種の化学的シグナルを発し、それに応答してアグロバクテリウム・ツメファシエンスのvir遺伝子が活性化され、TiプラスミドのT-DNAの植物染色体への移転に必要な一連の事象が誘導される。続いてT-DNAは創傷から植物細胞に進入する。1つの推測は、T-DNAは、植物DNAが複製または転写されるまで待機し、続いて自身を裸出した植物DNAに挿入するということである。アグロバクテリウム・ツメファシエンスをトランスジェニックベクターとして使用するために、T-DNAの腫瘍誘発部分を除去し、一方T-DNAボーダー領域およびvir遺伝子は維持する必要がある。続いてトランスジェニックをT-DNAボーダー領域間に挿入する (前記領域でトランスジェニックは植物細胞に移され、植物染色体に組み込まれる)。

本発明は、本発明の核酸を用いる単子葉植物 (重要な穀類を含む) の形質転換を提供する (Hiei (1997) Plant Mol. Biol. 35:205-218)。さらにまた、例えば以下を参照されたい: Horsch (1984) Science 233:496; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803; Thykjaer (1997) 上掲書; Park (1996) Plant Mol. Biol. 32:1135-1148 (ゲノムDNAへのT-DNAの組み込みについて考察する)。さらにまた以下を参照されたい: 米国特許第5,712,135号 (D'Halluin) (穀類または他の単子葉植物の細胞内で機能を有する遺伝子を含むDNAの安定な組み込みのための方法を開示する)。

【0154】

ある特徴では、第三の工程は、取り込まれた標的遺伝子を次の世代に伝達することができる植物体の選別および再生を含むことができる。そのような再生技術は、組織培養の増殖培地での一定の表現型の操作を必要とし、典型的には所望のヌクレオチド配列と一緒に導入された有毒物質および/または除草剤マーカーを必要とする。培養プロトプラストから植物を再生することについては以下に記載されている: Evans et al., Protoplast Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp.124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985。再生はまた植物カルス、外植片、器官またはその部分からも得ることができる。そのような再生技術は一般的には以下に記載されている: Klee (1987) Ann. Rev. of Phys. 38:467-486。トランスジェニック組織 (例えば未熟胚) から完全な植物体を得るために、前記胚を栄養およびホルモンを含む一連の培養液中で環境制御条件下 (組織培養として公知の方法) で増殖させることができる。いったん完全な植物体が生成され種子が生じたら、子孫の評価が開始される。

発現カセットがトランスジェニック植物に安定的に取り込まれた後、前記カセットは有性交配によって他の植物に導入することができる。交配される種に応じて、多くの標準的育種技術のいずれも用いることができる。本発明の核酸のトランスジェニック発現は表現型の変化を生じるので、本発明の組換え核酸を含む植物を第二の植物と有性交配して最終生成物を得ることができる。したがって、本発明の種子は、本発明の2つのトランスジェニック植物間の交配、または本発明の植物と他の植物間の交配から誘導することができる。所望の効果 (例えば本発明のポリペプチドを発現させて開花の態様に変化した植物を作製する) は、両方の親植物が本発明のポリペプチド (例えばアミラーゼ、例えば α -アミラーゼ) を発現するときに強化される。所望の効果は将来の植物世代に標準的な繁殖手段によって伝えることができる。

【0155】

本発明の核酸およびポリペプチドは任意の植物または種子で発現又は挿入される。本発明のトランスジェニック植物は双子葉植物でも単子葉植物でもよい。本発明のトランスジェニック単子葉植物の例は、牧草、例えばメドーグラス (meadow grass (ブルーグラス、Poa))、飼料用草類、例えばフェスチュカ (fescuca)、ロリウム (lolium)、テンペレートグラス、例えばアグロスチス (Agrostis) および穀類、例えばコムギ、エンバク、ライムギ、オオムギ、コメ、モロコシおよびトウモロコシ (コーン) である。本発明のトランスジェニック双子葉植物の例は、タバコ、豆類 (例えばルピナス)、ジャガイモ、サ

トウダイコン、エンドウマメ、インゲンマメおよびダイズ、並びに十字架植物 (Brassica ceae科)、例えばカリフラワー、ナタネ、および近縁のモデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) である。したがって、本発明のトランスジェニック植物および種子には以下を含む広範囲の植物が含まれる (ただしこれらに限定されない) : アナカルジウム (*Anacardium*)、アラキス (*Arachis*)、アスパラガス、アトロパ (*Atropa*)、アベナ (*Avena*)、ブラシカ (*Brassica*)、シトラス、シトラルス (*Citrullus*)、カプシカム (*Capsicum*)、カルサマス (*Carthamus*)、ココス (*Cocos*)、コフェア (*Coffea*)、ククミス (*Cucumis*)、ククルビタ (*Cucurbita*)、ダウクス (*Daucus*)、エレイス (*Elaeis*)、フラガリア (*Fragaria*)、グリシン (*Glycine*)、ゴッシピウム (*Gossypium*)、ヘリアンサス (*Helianthus*)、ヘテロカリス (*Heterocallis*)、ホルデウム (*Hordeum*)、ヒオシアムス (*Hyoscyamus*)、ラクツカ (*Lactuca*)、リヌム (*Linum*)、ロリウム (*Lolium*)、ルピナス、リコベルシコン (*Lycopersicon*)、マルス (*Malus*)、マニホット (*Manihot*)、マジョラナ (*Majorana*)、メディカゴ (*Medicago*)、ニコチアナ、オレア (*Olea*)、オリザ (*Oryza*)、パニエウム (*Panicum*)、パニセツム (*Panisetum*)、ペルセア (*Persea*)、ファゼオルス (*Phaseolus*)、ピスタキア (*Pistachia*)、ピスム (*Pisum*)、ピルス (*Pyrus*)、プルヌス (*Prunus*)、ラファヌス (*Raphanus*)、リシヌス (*Ricinus*)、セカレ (*Secale*)、セネシオ (*Senecio*)、シナピス (*Sinapis*)、ソラナム (*Solanum*)、ソルガム (*Sorghum*)、テオブロムス (*Theobromus*)、トリゴネラ (*Trigonella*)、トリチカム (*Triticum*)、ビシア (*Vicia*)、ビチス (*Vitis*)、ビグナ (*Vigna*)、およびゼア (*Zea*)。

10

20

【0156】

また別の実施態様では、本発明の核酸は、繊維細胞を含む植物 (綿、シルクコットンツリー (*Kapok*, *Ceiba pentandra*)、ヤナギ (*desert willow*)、クレオソートブッシュ、ウィンターファット、バルサ、カラムシ、ケナフ、アサ、ロゼレ (*roselle*)、ジュート、サイザル (*sisal abaca*) およびアマを含む) で発現される。また別の実施態様では、本発明のトランスジェニック植物はゴッシピウム (*Gossypium*) 属のメンバー (一切のゴッシピウム種メンバー、例えば *G. アルボレウム* (*arboreum*) ; *G. ヘルバセウム* (*herbaceum*) ; *G. バルバデンス* (*barbadense*) ; *G. ヒルスタム* (*hirsutum*) を含む) であり得る。

本発明はまた、大量の本発明のポリペプチド (例えばアミラーゼ、例えばアルファ-アミラーゼ) を製造するために用いることができるトランスジェニック植物を提供する。例えば以下を参照されたい : Palmgren (1997) *Trends Genet.* 13:348; Chong (1997) *Transgenic Res.* 6:289-296 (オーキシン誘導性二方向性マンノピンシンターゼ (*mas1',2'*) プロモーターを用い、アグロバクテリウム・ツメファシエンス媒介リーフディスク形質転換法により母乳タンパク質のベータカゼインのトランスジェニックなジャガイモによる生産を記載)。

30

公知の方法を用いて、当業者は、形質導入植物でトランスジーン mRNA またはタンパク質の増減を検出することによって本発明の植物をスクリーニングすることができる。mRNA の検出および定量手段は当業界で周知である。

【0157】

ポリペプチドおよびペプチド

40

ある特徴では、本発明は、本発明の例示的な配列、例えば配列番号:2 ; 配列番号:4 ; 配列番号:6 ; 配列番号:10 ; 配列番号:12 ; 配列番号:14 ; 配列番号:16 ; 配列番号:18 ; 配列番号:20 ; 配列番号:22 ; 配列番号:24 ; 配列番号:26 ; 配列番号:28 ; 配列番号:30 ; 配列番号:32 ; 配列番号:34 ; 配列番号:36 ; 配列番号:38 ; 配列番号:40 ; 配列番号:42 ; 配列番号:44 ; 配列番号:46 ; 配列番号:48 ; 配列番号:50 ; 配列番号:52 ; 配列番号:54 ; 配列番号:56 ; 配列番号:58 ; 配列番号:60 ; 配列番号:62 ; 配列番号:64 ; 配列番号:66 ; 配列番号:68 ; 配列番号:70 ; 配列番号:72 ; 配列番号:74 ; 配列番号:76 ; 配列番号:78 ; 配列番号:80 ; 配列番号:82 ; 配列番号:84 ; 配列番号:86 ; 配列番号:88 ; 配列番号:90 ; 配列番号:92 ; 配列番号:94 ; 配列番号:96 ; 配列番号:98 ; 配列番号:100 ; 配列番号:102 ; 配列番号:104 ; 配列番号:106 ; 配列番号:108 ; 配列番号:110 ; 配列番号:112 ; 配列番号:114 ; 配列番号:1

50

16；配列番号:118；配列番号:120；配列番号:122；配列番号:124；配列番号:126；配列番号:128；配列番号:130；配列番号:132；配列番号:134；配列番号:136；配列番号:138；配列番号:140；配列番号:142；配列番号:144；配列番号:146；配列番号:148；配列番号:150；配列番号:152；配列番号:154；配列番号:156；配列番号:158；配列番号:160；配列番号:162；配列番号:164；配列番号:166；配列番号:168；配列番号:190；配列番号:192；配列番号:194；配列番号:204；配列番号:206；配列番号:208；配列番号:210；配列番号:212；配列番号:323；配列番号:325；配列番号:327；配列番号:329；配列番号:331；配列番号:333；配列番号:335；配列番号:337；配列番号:339；配列番号:341；配列番号:343；配列番号:345；配列番号:347；配列番号:349；配列番号:351；配列番号:353；配列番号:355；配列番号:357；配列番号:359；配列番号:361；配列番号:363；配列番号:365；配列番号:367；配列番号:369；配列番号:371；配列番号:373；配列番号:375；配列番号:377；配列番号:379；配列番号:381；配列番号:383；配列番号:385；配列番号:387；配列番号:389；配列番号:391；配列番号:393；配列番号:395；配列番号:397；配列番号:399；配列番号:401；配列番号:403；配列番号:405；配列番号:407；配列番号:409；配列番号:411；配列番号:413；配列番号:415；配列番号:417；配列番号:419；配列番号:421；配列番号:423；配列番号:425；配列番号:427；配列番号:429；配列番号:431；配列番号:433；配列番号:435；配列番号:437；配列番号:439；配列番号:441；配列番号:443；配列番号:445；配列番号:447；配列番号:449；配列番号:451；配列番号:453；配列番号:455；配列番号:457；配列番号:459；配列番号:461；配列番号:463；配列番号:464；配列番号:466；配列番号:468；配列番号:469；配列番号:470；配列番号:471；配列番号:472；配列番号:474；配列番号:476；配列番号:477；配列番号:479；配列番号:481；配列番号:482；配列番号:483；配列番号:485；配列番号:487；配列番号:488；配列番号:489；配列番号:490；配列番号:491；配列番号:493；配列番号:495；配列番号:496；配列番号:497；配列番号:499；配列番号:501；配列番号:502；配列番号:503；配列番号:504；配列番号:505；配列番号:506；配列番号:507；配列番号:508；配列番号:510；配列番号:512；配列番号:513；配列番号:514；配列番号:516；配列番号:518；配列番号:520；配列番号:521；配列番号:523；配列番号:525；配列番号:526；配列番号:528；配列番号:530；配列番号:531；配列番号:533；配列番号:535；配列番号:536；配列番号:537；配列番号:538；配列番号:540；配列番号:542；配列番号:543；配列番号:545；配列番号:547；配列番号:548；配列番号:549；配列番号:550；配列番号:551；配列番号:553；配列番号:555；配列番号:556；配列番号:557；配列番号:559；配列番号:561；配列番号:562；配列番号:563；配列番号:564；配列番号:566；配列番号:568；配列番号:570；配列番号:572；配列番号:574；配列番号:576；配列番号:578；配列番号:580；配列番号:582；配列番号:584；配列番号:586；配列番号:588；配列番号:589；配列番号:590；配列番号:591；配列番号:592；配列番号:594；配列番号:604；配列番号:606；配列番号:608；配列番号:610；配列番号:612；配列番号:614；配列番号:616；配列番号:618；配列番号:620又は配列番号:622、並びにその部分配列及び変種と配列同一性（例えば少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高い、又は完全な（100%）配列同一性）を有する単離または組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、前記ポリペプチドは、アミラーゼ活性、例えばアルファアミラーゼ活性又はグルコアミラーゼ活性を有する。

【0158】

前記同一性はポリペプチドの完全長に及んでもよい。又は前記同一性は、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700又はそれより多くの残基の領域にわたることができる。本発明のポリペプチドはまた典型的なポリペプチドの完全長よりも短くてもよい。また別の特徴では、本発明は、約5から完全長の範囲のサイズのポリペプチド（例えば酵素、例えばアミラーゼ）を提供する。例示的なサイズは、本発明

の例示的なアミラーゼの、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700又はそれより多くの残基、例えば本発明の例示的なアミラーゼの連続する残基である。

例えば、以下の表は、本発明の例示的なポリペプチドの特徴（例えば活性、最初の供給源、シグナル配列の位置及び例示的なシグナル配列）をまとめたものである。例えば、配列番号:437（配列番号:436によってコードされる）に記載の配列を有するポリペプチドは人工的に生成され；配列番号:439（配列番号:438によってコードされる）に記載の配列を有するポリペプチドはアルカリ性の条件下でアミラーゼ活性を有し、最初は未知の供給源から誘導（単離）され；配列番号:441（配列番号:440によってコードされる）に記載の配列を有するポリペプチドはアルカリ性の条件下でアミラーゼ活性を有し、最初は未知の供給源から誘導（単離）され、配列番号:441のアミノ酸残基1から32（“AA1 - 32”）からなるシグナル配列を有する、etc。（本発明のシグナル配列に関しては下記の考察もまた参照されたい）。

10

【0159】

配列番号 :P	注記	供給源	シグナル位置	シグナル配列
436, 437	再組立てアミラーゼ	人工的		
438, 439	アルカリアミラーゼ	不明		
440, 441	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-32	MNQIVNFKSHFYRKIAL LFSITFIWAAGSLSA
442, 443	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-27	MNRYLRLAALTALAPL AYPWGNLVRA
444, 445	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-24	MTPFGQPMMPGARMAAA NMAPVRA
446, 447	アルカリアミラーゼ	不明		
448, 449	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-23	MRLIMKKMIILITLAWV FTGCE
450, 451	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-49	MNDSINLYNFFPYNRPM SINKTNTMKQMINWLGS LALLMLLLSCGEATE
452, 453	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-34	MMQLNPWFSTTLKAAGL ATALAAVSACQPASESA
454, 455	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-37	MDLLEYKNTIQRQTMT DRKLLFIVATVILAVLV SFS
456, 457	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-26	MMQLNPWFSASLKAAGL ATALAAVSA
458, 459	アルカリアミラーゼ	不明	AA1-29	MFKVSLRSKDMKKLSLI VTILVLALTLSA
460, 461	真菌	コクリオボルス・ヘテロストロフス (Cochliobolus heterostrophus) ATCC48331		
462-466	真菌	真菌	AA122	MSRSSTILFVLAAANLA SLVD
467-474	真菌	コクリオボルス・ヘテロストロフス (Cochliobolus heterostrophus) ATCC48331	注記：AA1 - 122は除去可能であり、残余のDNA/タンパク質配列はなおアミラーゼをコードする。	
475-479	真菌	真菌		
480-485	真菌	真菌	AA1-19	MKFSLLATIVASISPLA RA

10

20

30

40

486-493	真菌	真菌	AA1-54	MRRKSTDKYKKVSIRAH LAACEQLAISKMLFSRT ATILSLLCVQATAISPR GSA
494-499	真菌	真菌	AA1-22	MGFSKMLLGALIGIASL NGVQS
500-510	真菌	真菌		
511-516	真菌	真菌	AA1-21	MKYSIIPFVPLFAGLSR AAS
517, 518	真菌	真菌	AA1-26	MNMNIFLLIISLAFFST VNCYTMSNA
519-523	真菌	真菌		
524-528	真菌	真菌		
529-533	真菌	コクリオボルス・ヘ テロストロフスATC C48331		
534-540	真菌	コクリオボルス・ヘ テロストロフスATC C48331	AA1-20	MLLLNIFTTLFFYITCI VSA
541-545	真菌	真菌		
546-553	真菌	真菌	AA1-23	MASSLLSSLSSISTFNS TQILQA
554-559	真菌	コクリオボルス・ヘ テロストロフスATC C48331	AA1-19	MTTALSSGQVAPTPHTA AA
560 - 566	真菌	真菌	AA1-33	MLTTSERKTSTAFVTWS MLWVLLTSFVKDVHA
567, 568	アルカリア ミラーゼ	不明		
569, 570		テルモコッカス・ア ルカリフィルスAED II12RA		
571, 572		不明	AA1-28	MQSNGNVKGRSAVLALA LLLLTAVAATA
573, 574		バクテリア	AA1-27	MKKTFLKILVLMLSLTL VFGLTAPIQA
575, 576		不明		
577, 578		不明	AA1-34	MKPFLKKSIIITLLASTC LFTAWLIPSIAPTVSA
579, 580		不明	AA1-29	MFKRRALGFLLAFLLVF TAVFGSMPMEFA
581, 582		不明	AA1-27	MKKFYKLTTALALSLSL ALSLLGPAHA

10

20

30

40

583, 584		不明		
585, 586		バクテリア	AA1-28	MSLFKKSFPWILSLLLL FLFIAPFSIQT
587-594	グルコアミラーゼ	テルモミセス・ラヌギノサス <i>Thermomyces lanuginosus</i>) ATCC 200065	AA1-23	MLFQPTLCAALGLAALI VQGGEA
603, 604		不明	AA1-31	MQNTAKNSIWQVRHSA IALSALSLSFGLQA
605, 606		不明	AA1-34	MVNHLKKWIAGMALTLA LLTGTVVGLPVQVASA
607, 608		不明		
609, 610		不明	AA1-31	MQNTAKNSIWQVRHSA IALSALSLSFGLQA
611, 612		不明		
613, 614		不明	AA1-31	MQNTAKNSIWQVRHSA IALSALSLSFGLQA
615, 616		不明	AA1-34	MSERGVRRVRTALVGL AAAATAAVTLGAPTAQA
617, 618		不明	AA1 - 27	MNRYLRLAALTALAPL AYPWGNLARA
619, 620		バクテリア	AA1-29	MARKSVAAALALVAGAA AVAVTGNTAAQA
621, 622		不明	AA1-31	MQNTAKNSIWQVRHSA IALSALSLSFGLQA

10

20

【0162】

本発明のポリペプチドおよびペプチドは、天然の供給源から単離することも、合成または組換えによって生成することもできる。ペプチドおよびタンパク質はin vivoまたはin vitroで組換え的に発現させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、当業界で公知の任意の方法を用いて製造および単離できる。本発明のポリペプチドおよびペプチドはまた、当業界で周知の化学的方法を用いてその全体または部分を合成してもよい。例えば以下を参照されたい：Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Horn (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; A.K. Banga, Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA。例えば、ペプチド合成は、種々の固相技術を用いて実施してもよい（例えば以下を参照されたい：Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289:3-13）。さらに、例えばABI431Aペプチド合成装置（Perkin Elmer）を用い製造元の提供する指示にしたがって自動合成することもできる。

30

40

本発明のペプチドおよびポリペプチドはまたグリコシル化することもできる。グリコシル化は翻訳後に化学的にまたは細胞の生合成メカニズムによって実施できる。後者の場合、公知のグリコシル化モチーフの使用が含まれる（前記モチーフは配列にとって天然のものでよく、またペプチドとして付加するか配列をコードする核酸に付加することもできる）。前記グリコシル化はO-結合でもN-結合でもよい。グリコシル化は本発明の任意のポリペプチドに付加して、“親”酵素（これにグリコシル化が追加される）よりも耐熱性又は熱安定性である酵素を生成することができる。グリコシル化は化学的メカニズム又は細胞の生合成メカニズムによって付加することができる。

50

本発明は、広範囲の温度にわたって広い範囲の比活性、例えば約37℃で約10から10,000、又は100から約1000単位/mgタンパク質の比活性を有するアミラーゼを提供する。本発明のアミラーゼはまた120℃の高い温度で活性を有することができる。また別の特徴では、これらの方法で用いられるアミラーゼはこれらの温度で活性を有し、例えば約80℃から約115℃、約100℃から約110℃、約105℃から約108℃の範囲の温度で活性を有する。しかしながら、本発明のアミラーゼはまた低温、例えば4℃から5℃の低温で活性を有することができる。

本発明の酵素のT_mは熱活性化によってシフトさせることができる（例えば、約10℃から90℃の間でシフトさせることができる）。例えば、配列番号:336/337のT_mは、熱活性化（例えば80℃で5分間のプレインキュベーション）によって約17℃から87℃シフトさせることができる。

10

【0163】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは（上記で定義されたように）、全ての“模倣体”および“ペプチド模倣体”形を含む。“模倣体”および“ペプチド模倣体”という用語は、実質的に本発明のポリペプチドと同じ構造および／または機能的特徴を有する合成化学物質を指す。前記模倣体は完全に合成された非天然アミノ酸類似体で構成されているか、または部分的に天然のペプチドアミノ酸および部分的に非天然のアミノ酸類似体のキメラ分子である。前記模倣体はまた任意の量の天然アミノ酸の保存的置換を含むことができるが、ただしそのような置換が前記模倣体の構造および／または活性を実質的に変化させない限りである。保存的変種である本発明のポリペプチドに関しては、日常的な実験によって模倣体が発明の範囲内に包含されるものであるか否か、すなわちその構造および／または機能が実質的に改変されていないかどうかが決定的であろう。したがって、ある特徴では、模倣体組成物がアミラーゼ活性をもつならばそれらは本発明の範囲内に包含される。

20

本発明のポリペプチド模倣体組成物は任意の組合せの非天然成分を含むことができる。また別の特徴では、本発明の模倣体組成物は以下の3つの構造基の1つまたは全てを含む：a) 天然のアミド結合（“ペプチド結合”）以外の残基結合基；b) 天然に存在するアミノ酸残基の代わりに非天然残基；c) 二次構造模倣を誘導する（すなわち二次構造、例えばベータターン、ガンマターン、ベータシート、アルファヘリックス構造を誘導または安定化させる）残基。例えば本発明のポリペプチドは、その残基の全てまたはいくつかは天然のペプチド結合以外の化学的手段によって結合されるとき模倣体と特徴付けることができる。個々のペプチド模倣体残基は、ペプチド結合、他の化学的結合、またはカップリング手段、例えばグルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、二官能基性マレイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）またはN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）によって結合される。通常のアミド結合（“ペプチド結合”）の代用となることができる結合基には例えば以下が含まれる：ケトメチレン（例えば-C(=O)-NH-の代わりに-C(=O)-CH₂-）、アミノメチレン（CH₂-NH）、エチレン、オレフィン（CH=CH）、エーテル（CH₂-O）、チオエーテル（CH₂-S）、テトラゾール（CN₄）、チアゾール、レトロアミド、チオアミドまたはエステル（例えば以下を参照されたい：Spatola (1983) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol.7, pp267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcell Dekker, NY）。

30

40

【0164】

本発明のポリペプチドはまた、天然に存在するアミノ酸残基の代わりに全てまたはいくつかの非天然の残基が含まれることによって模倣体と特徴付けられる。非天然残基は学術文献および特許文献に詳しく記載されている。天然のアミノ酸残基の模倣体として有用な典型的な非天然組成物のいくつかおよび基準は以下で述べる。芳香族アミノ酸の模倣体は、例えば以下によって置き換えることによって生成することができる：D-またはL-ナフチルアラニン；D-またはL-フェニルグリシン；D-またはL-2チエネイルアラニン；D-またはL-1、-2,3-、または4-ピレネイルアラニン；D-またはL-3チエネイルアラニン；D-またはL-(2-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(3-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(2-ピラジ

50

ニル)-アラニン；D-またはL-(4-イソプロピル)-フェニルグリシン；D-(リフルオロメチル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルアラニン；D-p-フルオロ-フェニルアラニン；D-またはL-p-ビフェニルフェニルアラニン；D-またはL-p-メトキシ-ビフェニルフェニルアラニン；D-またはL-2-インドール(アルキル)アラニン；およびD-またはL-アルキルアラニン（前記アルキルはメチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、iso-ブチル、sec-イソチル、iso-ペンチルまたは非酸性アミノ酸で置換できるがまた置換されてなくてもよい）。非天然アミノ酸の芳香環には、例えばチアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、ベンゾイミダゾリル、ナフチル、フラニル、ピロリルおよびピリジル芳香環が含まれる。

【0165】

酸性アミノ酸の模倣体は、例えば陰性荷電を維持している非カルボキシレートアミノ酸、（ホスホノ）アラニン、硫酸スレオニンによって置換することにより生成できる。カルボキシル側鎖基（例えばアスパルチルまたはグルタミル）はまた、カルボジイミド（ $R'-N-C-N-R'$ ）、例えば1-シクロヘキシル-3(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3(4-アゾニア-4,4-ジメソールペンチル)カルボジイミドとの反応によって選択的に改変することができる。アスパルチルまたはグルタミルもまた、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミル残基に変換することができる。塩基性アミノ酸の模倣体は、（リジンおよびアルギニンの他に）アミノ酸オルニチン、シトルリン又は（グアニジノ）-酢酸または(グアニジノ)アルキル-酢酸（アルキルは上記で定義されたとおり）による置換によって生成することができる。ニトリル誘導体（例えばCOOHの代わりにCN-部分を含む）でアスパラギンまたはグルタミンを置換することができる。アスパラギニルおよびグルタミル残基は、対応するアスパルチルまたはグルタミル残基に脱アミノ化することができる。アルギニン残基模倣体は、アルギニルを例えば1つまたは2つ以上の通常の試薬（例えばフェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロ-ヘキサジオンまたはニンヒドリンを含む）と、好ましくはアルカリ性条件下で反応させることによって生成することができる。チロシン残基模倣体はチロシルを例えば芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンと反応させることによって生成することができる。N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いてO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成することができる。システイン残基模倣体は、システイニル残基を例えばアルファ-ハロアセテート（例えば2-クロロ酢酸またはクロロアセトアミド）および対応するアミンと反応させてカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生成することによって達成できる。システイン残基模倣体はまた、システイン残基を例えばプロモ-トリフルオロアセトン、アルファ-プロモ-ベータ-(5-イミドゾイル)プロピオン酸；クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド；メチル2-ピリジルジスルフィド；p-クロロ水銀ベンゾエート；2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール；またはクロロ-7-ニトロベンゾ-オキサ-1,3-ジアゾールと反応させることによって生成することができる。リジン模倣体は、リジニルをコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させることによって（さらにアミノ末端残基を変化させることによって）生成することができる。リジンおよび他のアルファ-アミノ含有残基模倣体はまた、イミドエステル、例えばメチルピコリンイミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロボロハイドライド、トリニトロ-ベンゼンスルホン酸、O-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオンとの反応、およびグキオキシレートとのトランスアミダーゼ触媒反応によって生成することができる。メチオニンの模倣体は、例えばメチオニンスルホキシドとの反応によって生成することができる。プロリンの模倣体には、例えばピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、3-または4-ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、3-または4-メチルプロリンまたは3,3-ジメチルプロリンが含まれる。ヒスチジン残基模倣体はヒスチジルを例えばジエチルプロカーボネートまたはパラ-プロモフェナシルプロミドと反応させることによって生成することができる。他の模倣体には、例えばプロリンおよびリジンのヒドロキシル化；セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化；リジン、アルギニンおよびヒスチジンのアルファ-アミノ基の

10

20

30

40

50

メチル化；N-末端アミンのアセチル化；主鎖アミド残基のメチル化またはN-メチルアミノ酸による置換；またはC-末端カルボキシル基のアミド化によって生成することができるものが含まれる。

【0166】

本発明のポリペプチドの残基、例えばアミノ酸はまた反対のキラリティーをもつアミノ酸(またはペプチド模倣体残基)によって置換することができる。したがって、L型構造で天然に存在するいずれのアミノ酸(前記化学物質の構造に応じてRまたはSとも呼ぶことができる)も、同じ化学構造型であるが反対のキラリティーのアミノ酸またはペプチド模倣体(D-アミノ酸と称されるが、またR-またはS-型とも称される)で置換することができる。

本発明はまた本発明のポリペプチドを、天然の過程(例えば翻訳後プロセッシング、例えばリン酸化、アセチル化など)または化学的改変技術のどちらかによって改変する方法、および生成された改変ポリペプチドを提供する。改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含むポリペプチド内のいずれの場所でも生じることができる。あるポリペプチドで同じタイプの改変が同じ程度または種々の程度でいくつかの部位で存在することができることは理解されよう。さらにまた与えられたポリペプチドが多くタイプの改変を含むこともできる。改変には以下が含まれる：アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合による付加、ヘム成分の共有結合による付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合による付加、脂質または脂質誘導体の共有結合による付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合による付加、架橋環形成、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストリエーション、酸化、PEG化、タンパク分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、およびタンパク質へのトランスファーRNA仲介アミノ酸付加、例えばアルギニル化。例えば以下を参照されたい：T.E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties* 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983)。

【0167】

固相ペプチド化学合成法もまた本発明のポリペプチドまたはフラグメントの合成に用いることができる。前記の方法は1960年代初頭より当業界で公知であり(R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963; さらにまた以下を参照されたい：J.M. Stewart and J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp.11-12)、さらに最近では市販の実験室ペプチド設計および合成キット(Canbridge Research Biochemicals)として用いられている。そのような市販の実験室キットは一般的にはH.M. Geysenら(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998 (1984))の教示を利用し、多数の“ロッド”または“ピン”(これらは全て一枚のプレートにつながっている)の先端でペプチドを合成させる。前記のような系を利用するときは、ロッドまたはピンを含むプレートはさかさまにされ、対応するウェルまたはレザーバーの第二のプレートに挿入される。前記ウェルまたはレザーバーは適切なアミノ酸をピンまたはロッドの先端に結合または固着させるために溶液を含んでいる。そのような工程(すなわちロッドまたはピンの先端をさかさまにして適切な溶液に挿入する工程)を繰り返すことによって、アミノ酸は所望のペプチドに構築される。さらにまた、多数のFMOCペプチド合成系が利用可能である。例えば、ポリペプチドまたはフラグメントのアッセンブリーはアブライドバイオシステムズ社のモデル431A(商標)自動ペプチド合成装置を用いて固相上で実施できる。前記のような装置は、直接合成または一連のフラグメント(前記フラグメントは他の公知の技術を用いて結合させることができる)の合成によって本発明のペプチドの容易な入手を提供する。

本発明は、新規なアミラーゼ(例えばアルファアミラーゼ)(本発明の典型的な酵素を

含む)、前記をコードする核酸、前記と結合する抗体、並びに前記を製造及び使用する方法を提供する。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、本明細書に開示するようにアミラーゼ活性(例えばデンプンを糖に加水分解する能力)有する。ある特徴では、本発明のポリペプチドはアルファアミラーゼ活性を有する。また別の特徴では、本発明のアミラーゼは、本明細書に開示した典型的なアミラーゼの活性から改変された活性を有する。

本発明には、シグナル配列を含むまたはシグナル配列を含まない本発明のアミラーゼ、及びシグナル配列それ自体(例えば下記の表3)が含まれる(前記シグナル配列は本発明のシグナル配列(例えば下記の表3を参照)又は他のシグナル配列を含む)。本発明はまた、本発明のシグナル配列(例えば下記の表3を参照)を含むポリペプチド(例えば融合タンパク質)を含む。本発明のシグナル配列を含むポリペプチドは、本発明のアミラーゼ、または別のアミラーゼ、または別の酵素または他のポリペプチドであろう。

10

【0168】

本発明には固定化されたアミラーゼ、抗アミラーゼ抗体およびそのフラグメントが含まれる。本発明は、例えば本発明の優性ネガティブ変異体または抗アミラーゼ抗体を用いてアミラーゼ活性を阻害する方法を提供する。本発明には、本発明のアミラーゼを含むヘテロ複合体(例えば融合タンパク質、ヘテロ二量体など)が含まれる。

ある特徴では、本発明のアミラーゼ(例えばアルファアミラーゼ)は、内部の多糖類結合(例えばデンプンの α -1,4-及び1,6-グルコシド結合)を加水分解して、より小さな分子量のマルトデキストリンを生成する。ある特徴では、この加水分解は大半がランダムである。したがって、本発明は、より小さな分子量のマルトデキストリンを生成する方法を提供する。

20

本発明のアミラーゼを実験室及び工業的環境で用いて、デンプン又は任意のマルトデキストリン含有化合物を多様な目的のために加水分解することができる。これらのアミラーゼは単独で用いて特異的な加水分解を生じさせるか、又は広い活性スペクトルをもつ“カクテル”を提供するため他のアミラーゼと組み合わせることもできる。例示的な使用には、生物学的、食品、動物の飼料、医薬又は工業的サンプルに由来するデンプン又は任意のマルトデキストリン含有化合物の除去又は部分的若しくは完全な加水分解が含まれる。

例えば本発明のアミラーゼは、デンプンを含む汚れの除去を促進するために洗濯用洗剤として処方することができる。ある特徴では、本発明は本発明のアミラーゼ(アルカリ性条件下で活性を有するアミラーゼを含む)を含有する洗剤、並びに前記を製造及び使用する方法を提供する。これらの洗剤組成物には洗濯用及び皿洗浄用(例えば自動皿洗い)溶液、並びにその応用物が含まれる。本発明のアミラーゼは任意の洗剤マトリックス中の洗浄薬剤として用いることができる(下記工業的応用を参照されたい)。本発明のアミラーゼは、デンプン加工の最初の段階(液化)で、湿式トウモロコシ製粉で、アルコール製造で、デンプン脱サイズのために繊維工業で、焼成の用途で、飲料工業で、油井の掘削工程で、リサイクル紙のインキングで、さらに動物の飼料に用いることができる。

30

【0169】

本発明のポリペプチドは、種々の条件(極端なpH及び/又は温度、酸化剤など)の下でアミラーゼ活性を有することができる。本発明は、(例えば温度、酸化剤および洗浄条件の変化に対し)種々の触媒効率および安定性を有するまた別のアミラーゼ調製物をもたらす方法を提供する。ある特徴では、アミラーゼ変種は、部位特異的変異導入及び/又はランダム変異導入の技術を用いて作製することができる。ある特徴では、定方向進化を用いてまた別の特異性および安定性を有する極めて多様なアミラーゼ変種を作製することができる。

40

本発明のタンパク質はまた、アミラーゼ調節物質(例えばアミラーゼ活性の活性化物質または阻害物質)を同定するための研究試薬として有用である。簡単に記せば、試験サンプル(化合物、プロス、抽出物など)をアミラーゼアッセイに加え、前記の基質切断能力を決定する。このようにして同定された阻害物質は、工業および研究で用いて、望ましくないタンパク質分解を減少または防止することができる。アミラーゼに関しては、阻害物質を併用して活性スペクトルを広げることができる。

50

本発明はまた、本発明の核酸、ポリペプチドおよび抗体を用いて新規なアミラーゼを発見する方法を提供する。ある特徴では、発現の有無によってアミラーゼを発見するためにラムダファージライブラリーがスクリーニングされる。ある特徴では、有毒クローンの検出、基質への接近の改善、ライブラリーの大量切り出しによる一切の偏りの可能性を回避し宿主操作の必要性の軽減すること、及び低クローン密度でのより速い増殖を可能にするために、本発明はラムダファージライブラリーを用いる。ラムダファージライブラリーは液相または固相でスクリーニングすることができる。ある特徴では、本発明は液相でのスクリーニングを提供する。これは、アッセイ条件のより大きな融通性、更なる基質融通性、弱いクローンに対するより高い感度、及び固相スクリーニングを超える自動化の容易さを提供する。

10

【0170】

本発明は、本発明のタンパク質および核酸並びにロボットによる自動化を用い、何千もの生物触媒反応およびスクリーニングアッセイを短時間（例えば1日で）実施しながら、なお高レベルの正確性および再現性を担保できるスクリーニング方法を提供する（下記のアレイの考察を参照されたい）。結果として誘導化合物ライブラリーを数週間程度で作製することができる。分子（小分子を含む）の改変についての更なる教示についてはPCT/US 94/09174を参照されたい。

本発明には、天然には存在しないカルボニルヒドロラーゼ変種（例えばアミラーゼ変種）であるアミラーゼ酵素が含まれる。前記変種は、そのアミノ酸配列が誘導された前駆体のカルボニルヒドロラーゼと比較して異なるタンパク分解活性、安定性、基質特異性、pHプロファイル及び／又は性能特性を有する。特に、そのようなアミラーゼ変種は天然には見出されないアミノ酸配列を有し、前駆体アミラーゼの複数のアミノ酸残基の別個のアミノ酸による置換によって誘導される。前記前駆体アミラーゼは天然に存在するアミラーゼまたは組換えアミラーゼであり得る。有用なアミラーゼ変種は、指定のアミノ酸残基の位置において天然に存在するL-アミノ酸のいずれかの置換を含む。

20

【0171】

アミラーゼシグナル配列：

本発明は、本発明のポリペプチドの残基1から12、1から13、1から14、1から15、1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、1から33、1から34、1から35、1から36、1から37、1から38、1から39又はそれより長い残基を含む配列を有するペプチドからなるか、又は前記を含むシグナル配列を提供する。

30

例えば、本発明は、アミラーゼ（例えばアルファアミラーゼ又はグルコアミラーゼ）シグナル配列、及びこれらシグナル配列をコードする核酸を提供する。前記シグナル配列は、例えば表3に記載の配列、配列番号:7、配列番号:8及び配列番号:213から257を有する本発明の典型的なペプチド、並びに表3に記載の配列、配列番号:7、配列番号:8及び配列番号:213から257を含む（又は前記からなる）ポリペプチドである。本発明はまた、アミラーゼシグナル配列及びこれらのシグナル配列をコードする核酸を提供する。前記シグナル配列は、例えば、配列番号:323（配列番号:322によってコードされる）の残基1から27を含むか又は前記からなるペプチド、配列番号:335（配列番号:334によってコードされる）の残基1から20を含むか又は前記からなるペプチド、配列番号:337（配列番号:336によってコードされる）の残基1から35を含むか又は前記からなるペプチドetc（これらについては表3を参照されたい）、さらに前記の配列の他に更に別のアミラーゼシグナル配列及びこれらシグナル配列をコードする核酸である。

40

【0172】

本発明はまた以下を含む又は以下からなるアミラーゼシグナル配列及びこれらシグナル配列をコードする核酸を提供する：配列番号:441の残基1から32又は1から33；配列番号:443の残基1から27又は1から28；配列番号:445の残基1から24又は1から25；配列番号:449の残基1から23又は1から24；配列番号:451の残基1から49又は1から50；配列番号:453の残基1から34又は1から35；配列番号:455の残基1から37又は1から38；配列番号:457の残基1

50

から26又は1から27；配列番号:459の残基1から29又は1から30；配列番号:466の残基1から22又は1から23；配列番号:485の残基1から19又は1から20；配列番号:493の残基1から54又は1から55；配列番号:499の残基1から22又は1から23；配列番号:516の残基1から21又は1から22；配列番号:518の残基1から26又は1から27；配列番号:540の残基1から20又は1から21；配列番号:553の残基1から23又は1から24；配列番号:559の残基1から19又は1から20；配列番号:566の残基1から33又は1から34。

例えば表3に関しては、本発明は配列番号:87のアミノ酸残基1から23（配列番号:213）を含むか又は前記からなるペプチドを提供する：

【0173】

表 3

配列番号	シグナル配列
配列番号:87	AA1 - 23 (配列番号:213)
配列番号:91	AA1 - 23 (配列番号:214)
配列番号:93	AA1 - 33 (配列番号:215)
配列番号:97	AA1 - 31 (配列番号:216)
配列番号:99	AA1 - 22 (配列番号:218)
配列番号:103	AA1 - 33 (配列番号:219)
配列番号:105	AA1 - 25 (配列番号:220)
配列番号:109	AA1 - 35 (配列番号:221)
配列番号:111	AA1 - 28 (配列番号:222)
配列番号:113	AA1 - 21 (配列番号:223)
配列番号:117	AA1 - 30 (配列番号:224)
配列番号:119	AA1 - 35 (配列番号:225)
配列番号:123	AA1 - 28 (配列番号:226)
配列番号:125	AA1 - 30 (配列番号:227)
配列番号:127	AA1 - 30 (配列番号:228)
配列番号:131	AA1 - 30 (配列番号:229)
配列番号:133	AA1 - 30 (配列番号:229)
配列番号:137	AA1 - 28 (配列番号:230)
配列番号:139	AA1 - 23 (配列番号:231)
配列番号:141	AA1 - 23 (配列番号:232)
配列番号:143	AA1 - 30 (配列番号:233)
配列番号:145	AA1 - 27 (配列番号:234)
配列番号:147	AA1 - 29 (配列番号:235)
配列番号:149	AA1 - 28 (配列番号:236)
配列番号:69	AA1 - 27 (配列番号:237)
配列番号:153	AA1 - 26 (配列番号:238)
配列番号:155	AA1 - 33 (配列番号:239)
配列番号:157	AA1 - 25 (配列番号:240)
配列番号:159	AA1 - 25 (配列番号:241)
配列番号:161	AA1 - 36 (配列番号:242)
配列番号:167	AA1 - 36 (配列番号:243)
配列番号:169	AA1 - 23 (配列番号:244)
配列番号:173	AA1 - 25 (配列番号:245)
配列番号:175	AA1 - 22 (配列番号:246)
配列番号:177	AA1 - 23 (配列番号:247)
配列番号:179	AA1 - 23 (配列番号:248)
配列番号:185	AA1 - 25 (配列番号:249)
配列番号:189	AA1 - 36 (配列番号:250)
配列番号:191	AA1 - 25 (配列番号:251)
配列番号:193	AA1 - 25 (配列番号:252)
配列番号:197	AA1 - 23 (配列番号:253)
配列番号:199	AA1 - 23 (配列番号:254)
配列番号:201	AA1 - 30 (配列番号:255)
配列番号:203	AA1 - 25 (配列番号:256)
配列番号:205	AA1 - 16 (配列番号:257)

10

20

30

40

配列番号:73	AA1 - 16 (配列番号:7)
配列番号:79	AA1 - 26 (配列番号:8)
配列番号:322, 323	残基1から27
配列番号:332, 333	残基1から22
配列番号:334, 335	残基1から20
配列番号:336, 337	残基1から35
配列番号:338, 339	残基1から50
配列番号:342, 343	残基1から23
配列番号:344, 345	残基1から22
配列番号:346, 347	残基1から21
配列番号:350, 351	残基1から21
配列番号:352, 353	残基1から27
配列番号:354, 355	残基1から24
配列番号:358, 359	残基1から29
配列番号:362, 363	残基1から20
配列番号:364, 365	残基1から29
配列番号:366, 367	残基1から24
配列番号:370, 371	残基1から22
配列番号:372, 373	残基1から25
配列番号:374, 375	残基1から21
配列番号:376, 377	残基1から37
配列番号:378, 379	残基1から27
配列番号:380, 381	残基1から29
配列番号:382, 383	残基1から35
配列番号:384, 385	残基1から37
配列番号:386, 387	残基1から25
配列番号:388, 389	残基1から21
配列番号:390, 391	残基1から58
配列番号:394, 395	残基1から57
配列番号:396, 397	残基1から19
配列番号:400, 401	残基1から19
配列番号:402, 403	残基1から19
配列番号:404, 405	残基1から26
配列番号:406, 407	残基1から21
配列番号:408, 409	残基1から51
配列番号:410, 411	残基1から21
配列番号:416, 417	残基1から24
配列番号:418, 419	残基1から44
配列番号:420, 421	残基1から44
配列番号:422, 423	残基1から27
配列番号:424, 425	残基1から37
配列番号:428, 429	残基1から30
配列番号:430, 431	残基1から33
配列番号:432, 433	残基1から34
配列番号:434, 435	残基1から27

10

20

30

40

【0175】

本発明のアミラーゼシグナル配列は、単離ペプチド、又は（例えば融合タンパク質として）別のアミラーゼもしくは非アミラーゼポリペプチドと結合した配列であり得る。ある特徴では、本発明は、本発明のアミラーゼシグナル配列を含むポリペプチドを提供する。ある特徴では、本発明のアミラーゼシグナル配列を含むポリペプチドは、本発明のアミラ

50

ーゼにとって異種の配列を含む（例えば本発明のアミラーゼシグナル配列及び別のアミラーゼ又は非アミラーゼタンパク質に由来する配列を含む融合タンパク質）。ある特徴では、本発明は、異種シグナル配列を有する本発明のアミラーゼ（例えば酵母のシグナル配列を有する配列）を提供する。例えば、本発明のアミラーゼは、異種シグナル配列をベクター（例えばpPICシリーズベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA））中に含むことができる。

ある特徴では、本発明のシグナル配列は新規なアミラーゼポリペプチドを同定した後で特定される。タンパク質がソーティングされ、それらの適切な細胞内の分布場所に輸送される経路はしばしばタンパク質標的化経路と称される。これら全ての標的化系でもっとも重要な成分の1つは、新たに合成されたポリペプチドのアミノ末端の短いアミノ酸配列（シグナル配列と称される）である。このシグナル配列はタンパク質をその適切な細胞内の分布場所に向かわせ、この配列は輸送中又はタンパク質がその最終的な目的地に到達したときに除去される。ほとんどのリソゾームタンパク質、膜タンパク質または分泌タンパク質が、小胞体の管腔内への輸送のための前記タンパク質の印となるアミノ末端シグナル配列を有する。このグループのタンパク質の100を超えるシグナル配列が決定されている。前記シグナル配列の長さは13から36アミノ酸残基と変動する。シグナル配列を認識する種々の方法が当業者には知られている。例えば、ある特徴では、新規なアミラーゼシグナルペプチドはSignalPと称される方法によって同定される。SignalPは神経結合ネットワークを使用し、シグナルペプチドおよびそれらの切断部位の両方を認識する（Nielsen et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". Protein Engineering, 10(1):1-6 (1997)）。 10 20

いくつかの特徴では、本発明のアミラーゼはシグナル配列を持たなくてもよいことは理解されよう。ある特徴では、本発明は、シグナル配列（例えば本発明のシグナル配列、下記表3参照）の全てまたは部分を欠く本発明のアミラーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるアミラーゼに由来するシグナル配列をコードする核酸が別のアミラーゼの核酸配列に機能可能に連結された核酸を提供し、また場合によって非アミラーゼタンパク質のシグナル配列を所望することもできる。表3は本発明の例示的なシグナル配列を示している。

【0176】

アミラーゼプレプロ及びシグナル配列及び触媒ドメイン：

上記で考察したようなシグナル配列（例えばシグナルペプチド（SP））の他に、本発明は、プレプロドメイン及び触媒ドメイン（CD）を提供する。本発明のSP、プレプロドメイン及び／又はCDは単離又は組換えペプチドであっても、又は例えばキメラタンパク質の異種ドメインのような融合タンパク質の一部であってもよい。本発明は、これら触媒ドメイン（CD）（例えば活性部位）、プレプロドメイン及びシグナル配列（SP、例えば本発明のポリペプチドのアミノ末端残基を含む／からなる配列を有するペプチド）をコードする核酸を提供する。 30

本発明のアミラーゼシグナル配列（SP）、触媒ドメイン及び／又はプレプロ配列は単離ペプチドであっても、又は別のアミラーゼ若しくは非アミラーゼポリペプチドと（例えば融合（キメラ）タンパク質として）結合した配列であってもよい。ある特徴では、本発明のアミラーゼシグナル配列SP及び／又はプレプロを含むポリペプチドは本発明のアミラーゼとは異種の配列を含む（例えば、本発明のSP及び／又はプレプロ並びに別のアミラーゼ又は非アミラーゼタンパク質由来の配列を含む融合タンパク質）。ある特徴では、本発明は、異種CD、SP及び／又はプレプロ配列を有する本発明のアミラーゼ（例えば酵母のシグナル配列を有する配列）を提供する。本発明のアミラーゼは、異種CD、SP及び／又はプレプロをベクター（例えばpPICシリーズベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA））中に含むことができる。 40

【0177】

ある特徴では、本発明のSP、CD及び／又はプレプロ配列は新規なアミラーゼポリペプチドを同定した後に特定される。タンパク質が区分され、それらの適切な細胞内の分布場所 50

に輸送される経路はしばしばタンパク質標的化経路と称される。これら全ての標的化系でもっとも重要な成分の1つは、新たに合成されたポリペプチドのアミノ末端の短いアミノ酸配列（シグナル配列と称される）である。このシグナル配列はタンパク質をその適切な細胞内の分布場所に誘導し、この配列は輸送中又はタンパク質がその最終的な目的地に到達したときに除去される。ほとんどのリソゾームタンパク質、膜タンパク質または分泌タンパク質が、小胞体の管腔内への輸送のためのそれらの目印となるアミノ末端シグナル配列を有する。このグループのタンパク質で100を超えるシグナル配列が決定された。前記シグナル配列の長さは変動可能で13から45又はそれ以上のアミノ酸残基であり得る。シグナル配列を認識する種々の方法が当業者には知られている。例えば、ある特徴では、新規なアミラーゼシグナルペプチドはSignalPと称される方法によって同定される。SignalPは神経結合ネットワークを使用し、シグナルペプチドおよびそれらの切断部位の両方を認識する (Nielsen et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". Protein Engineering, 10(1):1-6 (1997))。

10

【0178】

いくつかの特徴では、本発明のアミラーゼは、SP及び／又はプレプロ配列及び／又は触媒ドメイン (CD) を持たないかもしれない。ある特徴では、本発明は、SP、CD及び／又はプレプロドメインの全てまたは一部分を欠くアミラーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるアミラーゼに由来するシグナル配列 (SP)、CD及び／又はプレプロをコードする核酸が別のアミラーゼの核酸配列に機能可能に連結された核酸を提供し、また場合によって非アミラーゼタンパク質のシグナル配列 (SP)、CD及び／又はプレプロドメインが望ましいかも知れない。

20

本発明はまた、本発明のシグナル配列 (SP)、プレプロドメインおよび／または触媒ドメイン (CD) および異種の配列を含む単離または組換えポリペプチドを提供する。前記異種配列は、SP、プレプロドメイン及び／又はCDと (例えばアミラーゼと) 天然には結合していない配列である。SP、プレプロドメインおよび／またはCDが天然には結合していない配列は、SP、プレプロドメインおよび／またはCDのアミノ末端、カルボキシ末端、及び／又はSP及び／又はCDの両方の末端に存在し得る。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列 (SP)、プレプロドメイン及び／又は触媒ドメイン (CD) を含むポリペプチドを含む (または前記からなる) 単離または組換えポリペプチドを提供するが、ただし、それらが天然に結合しているいずれの配列 (例えばアミラーゼ配列) とも結合していないことを条件とする。同様にある特徴では、本発明は、これらのポリペプチドをコードする単離または組換え核酸を提供する。したがって、ある特徴では、本発明の単離または組換え核酸は、本発明のシグナル配列 (SP)、プレプロドメイン及び／又は触媒ドメイン (CD) および異種配列 (すなわち本発明のシグナル配列 (SP)、プレプロドメインおよび／または触媒ドメイン (CD) と天然には結合していない配列) のコード配列を含む。前記異種配列は、SP、プレプロドメイン及び／又はCDコード配列の3'末端、5'末端及び／又はその両末端に存在することができる。

30

【0179】

本発明のポリペプチドは活性型又は不活性型のアミラーゼを含む。例えば、本発明のポリペプチドは、“成熟”前又はプレプロ配列のプロセッシング前 (例えばプロタンパク質プロセッシング酵素 (例えばプロタンパク質変換酵素) によって“活性な”成熟タンパク質が生成される) のプロタンパク質を含む。本発明のポリペプチドは他の原因、例えば翻訳後プロセッシング事象 (例えばエンド-又はエキソ-ペプチダーゼ又はプロテイナーゼ作用)、リン酸化事象、アミド化、グリコシル化又は硫酸化、ダイマー化事象などにより活性化される前の、不活性であるアミラーゼを含む。“プレプロ”ドメイン配列、CD及びシグナル配列を同定する方法は周知である。例えば以下を参照されたい: Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136。例えば、プレプロ配列を同定するためには、前記タンパク質を細胞外間隙から精製し、さらに前記のN-末端配列を決定しプロセッシングを受けていない形態と比較する。

40

50

本発明のポリペプチドは全ての活性な形態を含み、これらには本発明の酵素の活性な部分配列、例えば触媒ドメイン（CD）又は活性部位が含まれる。ある特徴では、本発明は下記に示される触媒ドメイン又は活性部位を提供する。ある特徴では、本発明は、例えばPfamのようなデータベースを使用することにより予測される活性部位を含む、又は前記活性部位からなるペプチド又はポリペプチドを提供する。Pfamは、多数の一般的なタンパク質ファミリー又は等価物に及ぶ、マルチ配列アラインメント及び隠蔽マルコフモデルの大きな集合体である（Pfamタンパク質ファミリーデータベース；A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Ewinger, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, & E.L.L. Sonnhammer, *Nucleic Acids Research*, 30(1):276-280, 2002）。

【0180】

ハイブリッドアミラーゼおよびペプチドライブラリー

ある特徴では、本発明は、ハイブリッドアミラーゼおよび融合タンパク質（本発明の配列を含むペプチドライブラリーを含む）を提供する。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的（例えばアミラーゼ基質、レセプター、酵素）のペプチド調節物質（例えば活性化物質または阻害物質）を単離することができる。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的に正式な結合パートナー、例えばリガンド、例えばサイトカイン、ホルモンなどを同定することができる。

ある特徴では、本発明の融合タンパク質（例えばペプチド部分）は構造的に安定化される（直鎖状ペプチドと比較して）、標的に対してより高い結合親和性を可能にする。本発明は、本発明のアミラーゼと他のペプチド（公知の、およびランダムペプチドを含む）の融合を提供する。それらは、アミラーゼの構造が顕著には乱されない態様で、さらに前記ペプチドが代謝的にまたは構造的構成的に安定化されるような態様で融合させることができる。これによって、細胞内でのその存在および量を容易にモニターできるペプチドライブラリーの作製が可能になる。

【0181】

本発明のアミノ酸配列変種は、その変種の予め定めた性質、天然に存在する形態（例えばアミラーゼ配列の対立遺伝子の変型または種間変型）とそれらを区別する特徴によって特徴付けられる。ある特徴では、本発明の変種は、天然に存在する類似体と同じ定性的生物学的活性を示す。あるいは、変種は改変された特徴を有するものについて選別することができる。ある特徴では、アミノ酸配列の変型を導入する部位または領域が予め決定されるが、変異それ自体は予め決定される必要はない。例えば、ある部位における変種の成果を最適にするために、ランダム変異導入を標的コドンまたは領域で実施し、発現されたアミラーゼ変種を所望の活性の最適な組合せについてスクリーニングすることができる。既知の配列を有するDNAの予め定めた部位に置換変異を導入する技術は周知であり、例えばM13プライマー変異導入およびPCR変異導入が含まれる。変異体のスクリーニングはタンパク分解活性のアッセイを用いて実施できる。また別の特徴では、アミノ酸置換は単一残基であり得る。挿入は約1から20アミノ酸の規模であり得る。ただしはるかに大きな挿入も実施することができる。欠失は約1から約20、30、40、50、60、70残基またはそれを超える範囲でもよい。最適な特性を有する最終的な誘導体を得るために、置換、欠失、挿入または前記の任意の組合せを用いることができる。一般的には、これらの変更は数アミノ酸で実施し、分子の改変を最小限に止める。しかしながら、ある種の環境ではもっと大きな変更も容認される。

【0182】

本発明は、そのポリペプチド骨格構造、二次または三次構造（例えばアルファ-ヘリックスまたはベータ-シート構造）が改変されたアミラーゼを提供する。ある特徴では、電荷または疎水性が改変されている。ある特徴では、側鎖の嵩が改変されている。保存性が低い置換を選択することによって、機能または免疫学的同一性に実質的な変更がもたらされる。例えば、以下に対してより顕著な影響を与える置換を実施することができる：改変領域のポリペプチド骨格構造（例えばアルファ-ヘリックスまたはベータ-シート構造）；分子の荷電または疎水性部分（活性部位に存在していてもよい）；または側鎖。本発明は

、本発明のポリペプチドに以下のような置換を提供する：（a）疎水性残基（例えばセリルまたはスレオニル）で親水性残基（例えばロイシル、イソロイシル、バリルまたはアラニル）を置換する（または前者を後者で置換する）；（b）システインまたはプロリンで他の任意の残基を置換する（または前者を後者で置換する）；（c）陽性荷電側鎖をもつ残基（例えばリシル、アルギニルまたはヒスチジル）で陰性荷電残基（例えばグルタミルまたはアスパルチル）を置換する（または前者を後者で置換する）；または（d）嵩の大きな側鎖（例えばフェニルアラニン）で側鎖をもたない残基（例えばグリシン）を置換する（または前者を後者で置換する）。これらの変種は同じ定性的生物学的活性（例えばアミラーゼ活性）を示し得るが、変種を選別してアミラーゼの特性を必要とされるように改変することもできる。

10

【0183】

ある特徴では、本発明のアミラーゼは、エピトープもしくは精製タグ、シグナル配列または他の融合配列などを含む。ある特徴では、本発明のアミラーゼは任意のペプチドと融合させて、融合ポリペプチドを形成させることができる。本明細書では“融合”または“機能可能に連結”とは、任意のペプチドおよびアミラーゼが、前記アミラーゼ構造の安定性の破壊を最小限に止める（例えばアミラーゼ活性を維持する）ことができる態様で一緒に結合されることを意味する。融合ポリペプチド（または融合ポリペプチドをコードする核酸）はさらに別の成分（複数のループに存在する複数のペプチドを含む）も同様に含むことができる。

ある特徴では、ペプチドおよびそれらをコードする核酸はランダム化される。前記ランダム化は完全なランダム化であっても、またはランダム化が、例えばヌクレオチド／残基頻度において全体的にもしくは位置毎に偏っていてもよい。“ランダム化された”とは各核酸およびペプチドがそれぞれ本質的に任意のヌクレオチドおよびアミノ酸からなることを意味する。ある特徴では、前記ペプチドを生じる核酸は化学的に合成することができ、したがって、任意の位置に任意のヌクレオチドを取り込むことができる。したがって、核酸が発現されペプチドを生成するとき、任意の位置に任意のアミノ酸残基が取り込まれ得る。合成処理過程は、ランダム化された核酸が生成されるように設計して、核酸の全長にわたって可能な全てのまたは大半の組合せを形成し、したがってランダム化された核酸ライブラリーの形成を可能にすることができる。前記ライブラリーは、構造的に十分に多様なランダム化された発現生成物集団を提供し、所望の反応を示す1つまたは2つ以上の細胞の提供のために確率的に十分な範囲の細胞反応に影響を与えることができる。したがって、本発明は、ライブラリーメンバーの少なくとも1つがいくつかの分子、タンパク質または他の因子に対する親和性を与える構造を有することができるよう十分に大きな相互反応ライブラリーを提供する。

20

30

【0184】

スクリーニングの方法論および“オンライン”モニター装置

本発明の方法の実施に際して、多様な装置および方法論を本発明のポリペプチドおよび核酸と併せて用いて、例えばアミラーゼ活性についてポリペプチドのスクリーニング、アミラーゼ活性の潜在的調節物質（例えば活性化物質または阻害物質）としての化合物のスクリーニング、本発明のポリペプチドと結合する抗体について、本発明の核酸とハイブリダイズする核酸について、本発明のポリペプチドを発現する細胞のスクリーニングなどに用いることができる。

40

キャピラリーアレイ：キャピラリーアレイ、例えばGIGAMATRIX（商標）（Diversa Corporation, San Diego, CA）を本発明の方法で用いることができる。本発明の核酸又はポリペプチドは、アレイ（キャピラリーアレイを含む）に固定又は適用することができる。アレイを用いて組成物（例えば小分子、抗体、核酸など）のライブラリーを本発明の核酸又はポリペプチドとの結合能力又は前記の活性の調節能力についてスクリーニング又はモニターすることができる。キャピラリーアレイはサンプル保持およびスクリーニングのためのまた別のシステムを提供する。例えば、サンプルスクリーニング装置は複数のキャピラリーを含み、前記キャピラリーは、隣接するキャピラリーのアレイを形成し、ここで各キ

50

キャピラリーはサンプル保持のために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を含む。前記装置はさらに、アレイ内の隣接するキャピラリーの間に配置された間隙物質及び前記間隙物質内に形成された1つ又は2つ以上の参照用標識を含む。サンプルスクリーニング用キャピラリー（キャピラリーアレイに結合できるように調製されている）は、サンプルを保持するために管腔を仕切る第一の壁、及びサンプル励起のために提供される励起エネルギーのフィルタリングのためのフィルター物質で形成された第二の壁を含むことができる。

【0185】

ポリペプチド又は核酸（例えばリガンド）は、キャピラリーアレイのキャピラリーの少なくとも一部分の第一の成分に導入される。キャピラリーアレイの各キャピラリーは、前記第一の成分を保持するために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を含むことができる。気泡をキャピラリーの第一の成分の後ろに導入することができる。第二の成分をキャピラリーに導入することができ、この場合第二の成分は前記気泡によって第一の成分と分離される。関心のあるサンプルは検出可能な粒子で標識された第一の液体としてキャピラリーアレイのキャピラリーに導入することができる。ここでキャピラリーアレイの各キャピラリーは、第一の液体及び検出可能な粒子を保持するために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を含み、さらに前記少なくとも1つの壁は、前記少なくとも1つの壁に前記検出可能な粒子を結合させるために結合物質で被覆される。前記方法はさらに、キャピラリーチューブから第一の液体を除去する工程（ここで前記結合した検出可能粒子はキャピラリー内に保持される）、及び第二の液体をキャピラリーチューブに導入する工程を含む。

【0186】

キャピラリーアレイは、管腔を仕切る少なくとも1つの外壁を含む複数の個々のキャピラリーを含むことができる。前記キャピラリーの外壁は1つ又は2つ以上と一緒に融合させた壁である。同様に、前記の壁は、円筒形、四角形、六角形または、前記壁が液体又はサンプルの保持のための管腔を形成することができるかぎり他の任意の幾何学形である管腔を仕切ることができる。前記キャピラリーアレイのキャピラリーは接近して一緒に保持され平面構造を形成することができる。キャピラリーは、溶融（その場合はキャピラリーは例えばガラスで製造される）、接着剤による接着、縛るかまたは隣同士を留め金で固定することによって一緒に束ねることができる。キャピラリーアレイは、任意の数の個々のキャピラリー、例えば100から4,000,000本の範囲のキャピラリーで形成できる。キャピラリーアレイは、約100,000本またはそれ以上の個々のキャピラリーと一緒に結合させたマイクロタイタープレートを形成することができる。

【0187】

アレイまたは“バイオチップ”：本発明の核酸またはポリペプチドはアレイに固定化または塗布することができる。アレイを用いて、（例えば小分子、抗体、核酸などの）組成物ライブラリーを、本発明の核酸またはポリペプチドと結合するその能力または前記の活性を調節するその能力についてスクリーニングまたはモニターすることができる。例えば本発明のある特徴では、モニターされるパラメーターはアミラーゼ遺伝子転写物の発現である。細胞の1つもしくは2つ以上または全ての転写物は、細胞の転写物を含むサンプルのハイブリダイゼーションによって測定することができ、又細胞の代表的な核酸若しくは細胞の転写物と相補的な核酸はアレイ若しくは“バイオチップ”上に固定化された核酸とのハイブリダイゼーションによって測定することができる。マイクロチップ上の核酸“アレイ”を用いることによって、細胞の転写物のいくつかまたは全てを同時に定量することができる。また別には、ゲノム核酸を含むアレイはまた、本発明の方法によって新たに操作された株の遺伝子型の決定に用いることができる。“ポリペプチドアレイ”はまた、複数のタンパク質の同時定量に用いることができる。本発明は公知の任意の“アレイ”（“マイクロアレイ”または“核酸アレイ”または“ポリペプチドアレイ”または“抗体アレイ”または“バイオチップ”またはその変型とも称される）を用いて実施することができる。アレイは一般的には複数の“スポット”または“標的エレメント”である。各標的エレメントは一定量の1つまたは2つ以上の生物学的分子、例えばオリゴヌクレオチドを含み、それらはサンプル分子（例えばmRNA）と特異的に結合する基質表面の一定領域に固定され

ている。

【0188】

本発明の方法の実施に際して、任意の公知のアレイおよび／またはアレイの製造および使用方法の全体もしくは部分またはその変型を取り入れることができる。それらは例えば以下に記載されているようなものである：米国特許第6,277,628号；第6,277,489号；第6,261,776号；第6,258,606号；第6,054,270号；第6,048,695号；第6,045,996号；第6,022,963号；第6,013,440号；第5,965,452号；第5,959,098号；第5,856,174号；第5,830,645号；第5,770,456号；第5,632,957号；第5,556,752号；第5,143,854号；第5,807,522号；第5,800,992号；第5,744,305号；第5,700,637号；第5,556,752号；第5,434,049号。さらにまた例えば以下を参照されたい：WO99/5173；WO99/09217；WO97/46313；WO96/17958。さらにまた例えば以下を参照されたい：Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-R174；Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092；Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124；Solinas-Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407；Bowtell (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:25-32。さらにまた以下を参照されたい：米国特許出願公開広報第20010018642号；同第20010019827号；同第20010016322号；同第20010014449号；同第20010014448号；同第20010012537号；同第20010008765号。

【0189】

抗体および抗体使用スクリーニング方法

本発明は、本発明のアミラーゼと特異的に結合する単離または組換え抗体を提供する。これらの抗体を用いて、本発明のアミラーゼまたは関連するポリペプチドを単離、同定または定量することができる。これらの抗体を用いて本発明の範囲内に包含される他のポリペプチドまたは他の関連するアミラーゼを単離することができる。

これらの抗体はアミラーゼの活性部位と結合するように設計することができる。したがって、本発明は、本発明の抗体を用いてアミラーゼを阻害する方法を提供する。

前記抗体は、免疫沈澱、染色、イムノアフィニティークラムなどで用いることができる。所望の場合は、特異的な抗原をコードする核酸配列を、免疫とそれに続くポリペプチドまたは核酸の単離、増幅またはクローニングおよびポリペプチドの本発明のアレイ上への固定によって作製することができる。また別には、本発明の方法を用いて、改変されるべき細胞により産生される抗体の構造を改変することができる。例えば抗体の親和性を強化または低下させることができる。さらにまた、抗体を製造または改変する能力は本発明の方法により細胞を操作して付与した表現型であり得る。

【0190】

免疫、抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）の製造および単離の方法は当業者には公知で、さらに学術文献および特許文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：Coligan, *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY (1991)；Stites (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (7th ed.) Lang Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites")；Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed.) Academic Press, New York, NY (1986)；Kohler (1975) *Nature* 256:495；Harlow (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York。

抗体はまた、動物を用いる従来の *in vivo* 方法以外でも、*in vitro* で例えば組換え抗体結合部位発現ファージディスプレイライブラリーを用いて作製することができる。例えば以下を参照されたい：Hoogenboom (1997) *Trends Biotechnol.* 15:62-70；Katz (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45。

ポリペプチドまたはペプチドを用いて、前記ポリペプチド（例えば本発明のアミラーゼ）と特異的に結合する抗体を作製することができる。得られた抗体は前記ポリペプチドを単離または精製するためにイムノアフィニティークロマトグラフィー方法で用いることも前記ポリペプチドが生物学的サンプルに存在するか否かを決定するために使用することもできる。そのような方法では、タンパク質調製物（例えば抽出物）または生物学的サンプルを本発明のポリペプチドの1つと特異的に結合することができる抗体と接触させる。

イムノアフィニティークロマトグラフィー方法では、前記抗体を固相（例えばビーズまたは他のカラムマト

リックス)に付着させる。抗体が本発明のポリペプチドの1つと特異的に結合する条件下で、前記タンパク質調製物を前記抗体と接触させる。洗浄して非特異的に結合したタンパク質を除去した後、特異的に結合したポリペプチドを溶出させる。

【0191】

前記抗体と結合する生物学的サンプル中のタンパク質の能力は、当業者に周知の多様な方法を用いて決定できる。例えば、結合は前記抗体を検出可能な標識（例えば蛍光物質、酵素標識または放射性同位元素）で標識することによって決定できる。また別には、抗体とサンプルとの結合は、前記のような検出可能な標識をその上に保持する二次抗体を用いて検出してもよい。具体的なアッセイにはELISAアッセイ、サンドイッチアッセイ、放射能免疫アッセイおよびウェスタンブロットが含まれる。

10

本発明のポリペプチドに対して作製されるポリクローナル抗体は、動物に前記ポリペプチドを直接注射することによって、または非ヒト動物に前記ポリペプチドを投与することによって得ることができる。そのようにして得られた抗体は前記ポリペプチド自体と結合するであろう。このようにして、ポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえも完全な天然のポリペプチドと結合することができる抗体の作製に用いることができる。続いて前記のような抗体を用いて、前記ポリペプチドを発現している細胞から前記ポリペプチドを単離することができる。

【0192】

モノクローナル抗体の調製の場合、連続的な細胞株培養によって生成される抗体を提供するいずれの技術も用いることができる。その例にはハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術およびEBV-ハイブリドーマ技術が含まれる（例えば以下を参照されたい：Cole (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）。

20

単鎖抗体の生成のために記載された技術（例えば米国特許第4,946,778号を参照されたい）を利用して、本発明のポリペプチドに対する単鎖抗体を生成することができる。また別には、遺伝子導入マウスを用いて、これらポリペプチドまたはそのフラグメントに対するヒト化抗体を発現させることができる。

本発明のポリペプチドに対して作製された抗体を他の生物およびサンプル由来の類似のポリペプチド（例えばアミラーゼ）のスクリーニングに用いることができる。そのような技術では、前記生物由来のポリペプチドを抗体と接触させ、さらに前記抗体と特異的に結合するポリペプチドが検出される。上記に記載したいずれの方法も抗体結合の検出に用いることができる。

30

【0193】

キット

本発明は、前記構成物（例えば本発明の核酸、発現カセット、ベクター、細胞、トランスジェニック種子または植物もしくは植物部分、ポリペプチド（例えばアミラーゼ）および／または抗体）を含むキットを提供する。前記キットはまた、本明細書に記載されたような本発明の方法論および工業的使用を教示する指示資料を含むことができる。

【0194】

代謝パラメーターの測定

本発明の方法は、細胞の遺伝的構成を改変することによって、新規な表現型（例えば新規なまたは改変されたアミラーゼ活性）を持つ新規な細胞株を開発するために、全細胞進化または全細胞操作を提供する。前記遺伝的構成は、本発明の核酸を細胞に導入することによって改変することができる。新規な表現型を検出するために、改変細胞の少なくとも1つの代謝パラメータが“リアルタイム”または“オンライン”の時間枠でモニターされる。ある特徴では、複数の細胞（例えば細胞培養）が“リアルタイム”または“オンライン”でモニターされる。ある特徴では、複数の代謝パラメータが“リアルタイム”または“オンライン”でモニターされる。代謝パラメータは本発明のアミラーゼを用いてモニターできる。

40

代謝フラックス解析（MFA）は公知の生化学的フレームワークを基にしている。線形独

50

立な代謝マトリックスを、細胞内代謝物に対する質量保存の法則および擬似定常状態仮説 (pseudo-steady state hypothesis, PSSH) に基づいて構築する。本発明の方法の実施に際して、以下を含む代謝ネットワークが確立される：

- －全ての経路の基質、生成物および中間代謝物の実体；
- －前記経路の代謝物を変換する全ての化学反応の実体、前記経路の反応の化学量論；
- －前記反応を触媒する全ての酵素の実体、前記酵素反応のカイネティクス；
- －経路の成分間の調節的相互反応、例えばアロステリック相互反応、酵素-酵素相互反応など；
- －酵素の細胞内区画局在性または前記酵素の分子レベルを超えるその他の機構；および
- －代謝物、酵素またはエフェクター分子の何らかの濃度勾配またはそれらの移動に対する拡散障壁の存在。

【0195】

ある株について前記代謝ネットワークがいったん確立されたら、行列概念による数学的表現を導入し、オンライン代謝物データが利用可能ならば細胞内代謝フラックスを概算することができる。代謝表現型は細胞内の完全な代謝ネットワークの変化に依存する。代謝表現型は、環境条件、遺伝的調節、生育状態および遺伝子型などに対応する経路の利用変化に左右される。本発明の方法のある特徴では、オンラインMFA計算の後で、細胞の動的態様、細胞の表現型および他の特性が前記経路の利用を精査することによって解析される。例えば、酵母の発酵時にグルコースの供給が増加し、酸素が減少する場合、呼吸経路の利用は低下および／または停止し、発酵経路の利用が優先的になるであろう。細胞培養の生理的状态の制御は前記経路解析の後で可能になるであろう。本発明の方法は、基質供給、温度、誘導物質などをどのように変化させるか、細胞の生理的条件を制御して所望の方向にどのように誘導するかを決定することによって発酵の操作方法の決定に役立つことができる。本発明の方法の実施に際して、MFAの結果はまた、代謝の操作または遺伝子シャッフルリングなどのために実験およびプロトコル設計のために転写物データおよびタンパク質データと比較することができる。

本発明の実施では、任意の改変表現型または新規な表現型（細胞の新規なまたは改善された性状を含む）を付与しこれを検出することができる。代謝または増殖のいずれの特徴もモニターすることができる。

【0196】

mRNA転写物発現のモニタリング：本発明のある特徴では、操作された表現型は、細胞内でのmRNA転写物（例えばアミラーゼメッセージ）の発現の増加もしくは減少、または新規転写物（例えばアミラーゼ）の生成を含む。この発現増加または低下は、本発明のアミラーゼの存在について試験するか、またはアミラーゼ活性のアッセイによって追跡することができる。mRNA転写物（またはメッセージ）はまた、当業界で公知の任意の方法（ノザンブロット、定量的増幅反応、アレイへのハイブリダイゼーションなどを含む）によって検出および定量することができる。定量的増幅反応は、例えば定量的PCR（例えば定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（またはRT-PCR）を含む）；定量的リアルタイムRT-PCR（または“リアルタイムカイネティックRT-PCR”）を含む（例えば以下を参照されたい：Kreuzer (2000) Br. J. Haematol. 114:313-318; Xia (2001) Transplantation 72:907-914）。

本発明のある特徴では、操作される表現型は相同遺伝子の発現をノックアウトすることによって生成される。前記遺伝子のコード配列または1つもしくは2つ以上の転写制御エレメント（例えばプロモータまたはエンハンサ）をノックアウトすることができる。したがって転写物の発現は完全に除去されるか、または単に減少させることができる。

本発明のある特徴では、操作される表現型は相同遺伝子の発現の増加を含む。このことは、負の制御エレメント（cis-またはtrans-で作用する転写調節エレメントを含む）のノックアウト、または正の制御エレメントの突然変異導入によって実施できる。細胞の1つもしくは2つ以上または全ての転写物を、細胞の転写物を含むサンプルのハイブリダイゼーションによって測定することができ、また細胞の代表的核酸もしくは細胞の転写物と相

10

20

30

40

50

補的な核酸をアレイ上に固定化された核酸とのハイブリダイゼーションによって測定することができる。

【0197】

ポリペプチド、ペプチドおよびアミノ酸の発現のモニタリング：本発明のある特徴では、操作される表現型は、細胞内でのポリペプチド（例えばアミラーゼ）の発現の増加もしくは低下、または新規なポリペプチドの生成を含む。前記の発現増加または低下は、存在するアミラーゼ量の決定またはアミラーゼ活性のアッセイによって追跡することができる。ポリペプチド、ペプチドおよびアミノ酸はまた、当業界で公知の任意の方法（例えば核磁気共鳴（NMR）、分光光度法、ラジオグラフィ（タンパク質放射標識）、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高拡散クロマトグラフィー、多様な免疫学的方法、例えば免疫沈澱、免疫拡散、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、ゲル電気泳動（例えばSDS-PAGE）、抗体による染色、蛍光活性化細胞分類装置（FACS）、熱分解質量分析法、フーリエ変換赤外線分光解析、ラマン分光解析、並びにLC-エレクトロスプレーおよびcap-LC-タンデム-エレクトロスプレー質量分析などを含む）によって検出および定量することができる。新規な生物活性はまた、米国特許第6,057,103号に記載された方法またはその変法を用いてスクリーニングできる。さらにまた以下で詳細に考察されるように、細胞のポリペプチドの1つまたは2つ以上、またはその全てをタンパク質アレイを用いて測定することができる。

【0198】

工業的応用

洗剤組成物：本発明は、1つまたは2つ以上の本発明のポリペプチド（例えばアミラーゼ、例えばアルファアミラーゼ、グルコアミラーゼなど）を含む組成物、並びに前記組成物の製造および使用方法を提供する。本発明は、洗剤組成物を製造および使用方法の全てを取り込んでいる。例えば、米国特許6,413,928号、同6,399,561号、同6,365,561号、同6,380,147号を参照されたい。洗剤組成物は、一要素及び二要素水溶液組成物、非水溶液組成物、注型成形固体形態、顆粒形態、粒状形態、圧縮錠剤、ゲルおよび／またはペーストおよびスラリー形態であり得る。本発明はまた、甚だしい食べ物の汚れ、食べ物の残渣および他のわずかな食物組成物の薄層を前記洗剤組成物を用いて迅速に除去することができる方法を提供する。本発明のアミラーゼは、デンプン多糖類の触媒的加水分解により汚れの除去を促進することができる。本発明のアミラーゼは、皿洗浄洗剤、織物の洗濯洗剤として用いることができる。

実際の活性酵素含有量は、前記洗剤溶液が所望の酵素活性を有すると仮定して、洗剤組成物の製造方法によって左右され重要ではない。ある特徴では、最終溶液に存在するアミラーゼの量は、製剤組成物1gにつき約0.001mgから0.5mgの範囲である。本発明の方法および組成物で使用するために選択される具体的な酵素は、最終的な利用条件（製品の物理的形態、使用pH、使用温度、並びに分解および改変されるべき汚れのタイプを含む）によって左右される。酵素は、与えられた使用条件のいずれに対しても最適の活性および安定性を提供するように選択することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、約4から約12の範囲のpH、約20℃から約95℃の範囲の温度で活性を有する。本発明の洗剤は、陽イオン性、半極性非イオン性または双性イオン性界面活性剤または前記の混合物を含むことができる。

【0199】

本発明のアミラーゼは粉末または液体洗剤として処方できる（約0.01から約5質量%（好ましくは0.1から0.5質量%）のレベルで4.0から12.0のpHを有する）。前記洗剤組成物はまた他の酵素、例えば公知のプロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、またはエンドグリコシダーゼをビルダー及び安定化剤とともに含むことができる。通常の洗浄組成物への本発明のアミラーゼの添加は特別な使用制限をもたらさない。換言すれば、pHが上記の範囲内であり、温度が指定された酵素の変性温度以下である限り、前記洗剤に適した任意の温度およびpHがまた本発明の組成物に適切である。さらにまた、本発明のポリペプチドは洗

剤を含まない洗浄組成物で、単独でも又はビルダー及び安定化剤と一緒に用いることができる。

本発明は、硬質表面を洗浄する洗剤組成物、布地を洗浄する洗剤組成物、皿洗浄組成物、口内洗浄組成物、歯磨き組成物、およびコンタクトレンズ洗浄溶液を含む洗浄組成物を提供する。

【0200】

ある特徴では、本発明は、洗浄のために十分な条件下で対象物を本発明のポリペプチドと接触させることを含む対象物の洗浄方法を提供する。ある特徴では、本発明のポリペプチド（例えばアルカリ活性アミラーゼ）は、洗剤中で、すなわち洗剤添加物として用いられる。本発明の洗剤組成物は、本発明のポリペプチドを含む例えば手洗い用又は機械による洗濯洗剤組成物として製剤化することができる。本発明の洗剤組成物には洗濯用及び皿洗浄（例えば自動皿洗い機）溶液及びその応用が含まれる。汚れの付着した布地の前処理に適切な洗濯添加剤は本発明のポリペプチドを含むことができる。布地の柔軟化組成物は本発明のポリペプチドを含むことができる。また別には、本発明のポリペプチドは、一般的な家事用硬質表面洗浄作業で使用される洗剤組成物として製剤化することができる。また別の特徴では、本発明の洗剤添加物および洗剤組成物は、1つまたは2つ以上の他の酵素、例えばプロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、別のアミラーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、例えばラクターゼ及び／又はペルオキシダーゼを含むことができる。本発明の酵素の特性は、選択した洗剤に適合するように選択され（すなわち、最適pH、他の酵素および非酵素成分に対する適合性など）、さらに酵素は有効量で存在する。ある特徴では、本発明のアミラーゼ酵素を用いて布地から悪臭を有する物質が除去される。種々の洗剤組成物及び本発明の実施で用いることができる前記の製造方法は、例えば米国特許6,333,301号、同6,329,333号、同6,326,341号、同6,297,038号、同6,309,871号、同6,204,232号、同6,197,070号、同5,856,164号に記載されている。

【0201】

織物の処理：本発明は、本発明の1つまたは2つ以上のポリペプチドを用いて織物を処理する方法を提供する。本発明のポリペプチドは任意の織物処理方法で用いることができる。前記方法は当業界では周知で、例えば米国特許6,077,316号を参照されたい。例えば、ある特徴では、織物の感触および外観は、織物を本発明の溶液中のアミラーゼと接触することを含む方法によって改善される。ある特徴では、織物は加圧下で前記溶液で処理される。

ある特徴では、本発明の酵素は、布地を織っている間若しくは織った後で、または脱サイズ工程中に、又は1つ若しくは2つ以上のまた別の織物加工工程中に適用される。布地が織られている間、糸は強い機械的緊張に暴露される。織機で布を織る前に、縦糸はしばしばサイズ用澱粉または澱粉誘導体で被覆され、その引張り強度が高められ破損が防止される。本発明の酵素は前記のサイズ用澱粉または澱粉誘導体の除去に用いることができる。布地を織り上げた後、繊維を脱サイズ工程で処理することができる。前記工程の後に1つまたは2つ以上のまた別の織物加工工程が続く。脱サイズは“糊”を布地から除去する作業である。機織り後に、前記糊コーティングは更なる織物加工の前に除去され、均質で耐洗浄性が得られたことを担保しなければならない。本発明は、本発明の酵素の作用による“糊”の酵素による加水分解を含む脱サイズ方法を提供する。

【0202】

本発明の酵素を洗剤添加物として（例えば水性組成物で）用いて、織物（綿含有織物を含む）を脱サイズすることができる。本発明はインジゴ染色デニム織物および衣料にストーンウォッシュ（stonewashed）の外観を生じる方法を提供する。衣服の製造のために、布地を切断して衣服または衣料に縫製することができる。これら衣類は前記処理の前または後で完成される。特にデニムのジーンズ製造の場合、種々の酵素仕上げ方法が開発されている。デニムの衣料の仕上げは酵素による脱サイズ工程で開始し、その間衣料はアミロース分解酵素作用に付されて、柔軟さが織物に提供され、さらに綿をその後の酵素仕上げ

工程に馴染みやすくさせる。本発明は、本発明のアミラーゼを用いてデニムの衣料を仕上げる方法（例えば“バイオストーニング工程”）、酵素による脱サイズおよび布地に柔軟さを提供する方法を提供する。本発明は、脱サイズおよび／または仕上げ工程でデニム衣料を迅速に柔軟化する方法を提供する。

【0203】

食品及び食品加工：デンプンの液化：本発明の酵素は食品加工工業で多数の用途を有する。本発明のアミラーゼはデンプンからフルクトースへの加工処理で用いられる。デンプンからフルクトースへの加工処理は以下の4つの工程からなる：顆粒デンプンの液化、液化デンプンのデキストロースへの糖化、精製及びフルクトースへの異性化。

本発明は本発明の酵素を用いるデンプンの液化方法を提供する。デンプンポリマー顆粒の濃縮懸濁液は鎖の長さがより短い低粘性の可溶性デキストリン溶液に変換される。この工程は、標準的な装置を用いる簡便な処理、及びグルコース又は 10^3 の他の糖への効率的な変換に有用である。ある特徴では、顆粒デンプンは、温度を約72℃を超える温度に上昇させることによって顆粒をゼラチン化して液化される。前記加熱処理は瞬時に可溶性デンプン顆粒を破壊し、水溶性デンプン溶液を生成する。続いて前記可溶化デンプン溶液を本発明のアミラーゼにより液化することができる。したがって、本発明は、本発明のアミラーゼを用いる酵素によるデンプン液化処理方法を提供する。

【0204】

図26、図27及び図28は、少なくとも1つの本発明の酵素を用いる、また別の本発明の例示的なデンプン加工処理（デンプン液化処理を含む）を示す。例えば、図26は、本発明の例示的なデンプン液化処理方法を示している。前記処理方法は、一次液化のためにデンプンスラリー（例えば約30%から35%の固形物を含む）を蒸気で処理し（例えば約105℃で約5分）、フラッシュタンクに投入し、続いて二次液化を（例えば約90℃から95℃で約90分）実施することを含み、これら工程の各々又はその1つは本発明の酵素の使用を必要とする。図27は、本発明のまた別の例示的なデンプン液化処理方法を示している。前記処理方法は、デンプンスラリーを約pH4からpH5の間（例えばpH4.5）で処理し（pHはカルシウム添加により調節）、pH約5からpH6（例えばpH5.4）で約95℃で本発明のアルファアミラーゼを用いて液化し、続いてpH約4からpH5（例えばpH4.5）で約60℃から65℃の間の温度で本発明のグルコアミラーゼを用いる糖化のためにpH及び温度をさらに調整することを含む。図28は、本発明のまた別の例示的なデンプン加工処理方法を示している。前記処理方法は、pH約4からpH5（例えばpH4.5）（場合によってカルシウムを添加してpHを調整）でデンプンスラリーを処理し、本発明のアルファアミラー及び／又はグルコアミラーゼを約pH4からpH5（例えばpH4.5）で約90℃を超える温度または約95℃を超える温度で用いて液化-糖化を一体化し、続いて約pH4からpH5（例えばpH4.5）で約60℃から65℃の温度での糖化のためにpH及び温度を再度調整することを含む。ある特徴では前記液化-糖化の一体化は“一容器（one-pot）”処理方法である。ある特徴では、全工程が“一容器”処理方法である。前記処理方法のいずれも及び前記工程のいずれも、本発明のまた別の酵素（例えばグルコシダーゼ、例えば α -1,6-グルコシダーゼ、マルターゼなど）又は別の酵素（例えばプルラーゼ又はイソメラーゼ）を含むか、又はさらにそれらを追加することができる。

【0205】

例示的な酵素液化処理方法は、顆粒デンプンスラリーのpHを6.0から6.5の間に調整し、さらに水酸化カルシウム、水酸化ナトリウム又は炭酸ナトリウムの添加を必要とする。ある特徴では、水酸化カルシウムが添加される。これによりカルシウムイオンが提供され、本発明のグルコアミラーゼが不活化に対して安定化される。ある特徴では、アミラーゼの添加に際して、懸濁液はポンプで蒸気噴出流中を通され、瞬間的に温度が80℃-115℃に上昇する。ある特徴では、デンプンは直ちにゼラチン化され、さらにアミラーゼの存在により、 α -1,4-グルコシド結合がランダムに加水分解されて脱重合し液体（fluid mass）となる。前記液体は容易にポンプで押し出すことができる。

本発明は、本発明のアミラーゼを用いる種々の酵素的デンプン液化処理方法を提供する

。本発明の液化処理方法のある特徴では、アミラーゼはデンプン懸濁液に添加され、前記懸濁液は約80℃から100℃の間の温度で維持され、部分的にデンプン顆粒が加水分解される。ある特徴では、前記部分的に加水分解されたデンプン懸濁液は約105℃を越える温度でポンプによって噴出流中を通され、残留する顆粒構造のいずれも完全にゼラチン化される。ある特徴では、前記ゼラチン化デンプンを冷却した後、第二のアミラーゼ添加が実施されデンプンはさらに加水分解される。

【0206】

本発明は、液体（液化）デンプン及び顆粒デンプンを加水分解する酵素及び処理方法を提供する。そのようなデンプンは任意の供給源、例えばトウモロコシ、コムギ、ミロ、モロコシ、ライムギ、焙煎乾燥コムギ（bulgher）から得られる。本発明は、液化で有用な任意の穀粒デンプン源、例えば液化に適したデンプンを生成することが知られている他の任意の穀粒又は野菜に適用される。本発明の方法は、任意の天然材料、例えばコメ、発芽米、トウモロコシ、オオムギ、ミロ、コムギ、豆類及びサツマイモからデンプンを液化することを含む。液化工程は実質的にデンプンを加水分解してシロップを生成することができる。液化の温度範囲は、デンプンの液化で効果的なことが判明している任意の液化温度でよい。例えば、デンプンの温度は、約80℃から約115℃、約100℃から約110℃、及び約105℃から約108℃であってよい。また別の特徴では、これらの方法で用いられるアミラーゼは、前記の温度、例えば約80℃から約115℃、約100℃から約110℃、及び約105℃から約108℃で活性を有する。

【0207】

本発明は、図17に示した液化糖化の方法を提供する。ある特徴では、本発明のアルファ-アミラーゼは例示した液化工程で用いられる（現行のいくつかの工業的方法はB.リケニホルミスの α -アミラーゼを用いる）。ある特徴では、前記工程は約pH6.0で約95℃から105℃の範囲内のいずれかの温度で、約0.5から5時間の間のいずれかの時間（例えば60、90又は120分）実施される。ある特徴では、コーンステープ処理では、液化前にセルラーゼ、プロテアーゼ及び／又はタンパク質チオレダクターゼが添加される。

本発明の液化処理方法のある特徴では、約pH4.5（又は約pH5からpH5の間のいずれかのpH）で活性を有し、さらに Ca^{2+} 依存性又は非依存性である本発明のアミラーゼが添加される。前記処理方法の出発点での塩の添加を排除することで、前記処理方法の最終点でそれら塩の除去の必要性が排除される。本発明の液化処理方法のある特徴では、より活性が高いアミラーゼが用いられる。これによって必要とされる酵素の量を減少させることができる。ある特徴では、液化及び糖化は同じ反応容器で“一段階工程”として、例えば、約3時間処理工程として（又は約1時間から5時間持続する処理工程として）約90℃から95℃（又は約80℃から105℃の間のいずれかの温度）を含む条件下で実施される。この場合にもまた、前記添加される酵素を半分に減らすことができる。

本発明の糖化処理方法のある特徴では、本発明のグルコアミラーゼが用いられる。ある特徴では、本発明のグルコアミラーゼが例示の液化工程で用いられる（現行のいくつかの工業的方法はA.ニゲルのグルコアミラーゼを用いる）。ある特徴では、前記処理方法は約pH4.5で約60℃から62℃（又は約50℃から72℃、又は約40℃から80℃）の範囲内のいずれかの温度で、約12から96時間又はそれ以上の時間継続する処理工程として実施される。本発明の糖化処理方法のある特徴では、本発明のグルコアミラーゼがシロップ中のデキストロースレベルをより高くするために用いられる。ある特徴では、他の酵素、例えばプルランナーゼを添加してグルコースの量を高める。

【0208】

ある特徴では、本発明のアミラーゼが例示の異性化工程で用いられる（現行のいくつかの工業的方法はストレプトミセス種のグルコースイソメラーゼを用いる）。ある特徴では、本発明の異性化反応は約pH5からpH10の間のいずれかのpH、又は約pH6からpH9の間のいずれか、又は約pH7.0から8.5の間のいずれかのpHを含む条件下で実施される。ある特徴では、本発明の異性化反応は、約40℃から75℃、又は約50℃から65℃、又は約55℃から60℃を含む条件下で実施される。

本発明の異性化処理方法のある特徴では、キシロースイソメラーゼが用いられる。ある特徴では、コバルトが前記反応で用いられる（いくつかの公知の熱安定性グルコースイソメラーゼはコバルトを要求する）。ある特徴では、コバルト非依存性又はコバルト依存性の低い本発明の酵素が用いられる。ある特徴では、より低いpH、例えばpH7.0、pH6.5、pH6、pH5.5、pH5、pH4.5、pH4、pH3.5若しくはそれ未満、又は例えば約pH3.5から7.0の間の範囲で活性を有する本発明の酵素が用いられる。ある特徴では、これによって発色をより少なくすることができる（そうでなければ過剰な着色は除去する必要がある）。ある特徴では、異性化の間、温度は、例えば約80℃から110℃、85℃から105℃、又は90℃から100℃に高められる。これによって生成されるフルクトースの量が、例えば約51%増加する。

しかしながら、ある特徴では、ソーダ（例えばソフトドリンクなど）の場合、フルクトースレベルは約45%から65%、又は50%から60%の間のいずれか（例えば約55%）であってよい。

【0209】

ある特徴では、本発明の処理方法で用いられる酵素（本発明の酵素を含む）の1つ、いくつか又は全てが固定化され、例えば任意の表面（例えば平坦な表面又は酵素カラム）に固定化されるか、又はアレイ、ビーズ、線維、孔、キャピラリーなどに固定化される。ある特徴では、固定化されることによってそれら酵素を再使用することができる。

ある特徴では、本発明は、少なくとも1つの本発明の酵素を使用する“酵素カクテル”を提供する。ある特徴では、“酵素カクテル”が本発明の処理方法（例えば図17に示した液化糖化方法を含む）で用いられる。例えば、ある特徴では、細胞壁分解酵素（CWDE）が、例えば本発明の繊維、紙パルプ、および洗濯処理のために用いられ、例えばセルロース、ヘミセルロース、キシラナーゼ、ガラクトマンナーゼ、グルコマンナーゼ、アラビノフラノシダーゼ及び他の酵素の組合せを含む。ある特徴では、バイオブリーチングのための本発明の処理方法（例えば紙パルプ、洗濯工程）で用いられる“酵素カクテル”は、ラッカーゼ、ペルオキシダーゼ、オキシダーゼなどの組合せを含む。ある特徴では、細胞壁分解酵素はバイオブリーチング酵素及び本発明の酵素と併用されて植物の細胞壁を分解し、着色物質を遊離させる。

【0210】

高分子量デキストロースシロップを製造する方法：本発明は、本発明の酵素を使用する高分子量デキストロースのシロップを製造する方法を提供する。前記方法は分子量が約20,000に厳密に分類されたオリゴ糖を製造する方法を含む。ある特徴では、古細菌起源の本発明のアミラーゼ〔配列番号:80（配列番号:79によってコードされる）、配列番号:82（配列番号:81によってコードされる）、配列番号:116（配列番号:115によってコードされる）、配列番号:323（配列番号:322によってコードされる）、配列番号:570（配列番号:169によってコードされる）を含む〕及び前記古細菌アミラーゼと同じ活性を有する本発明の酵素を用いて、デンプン構成組成物（例えばトウモロコシ澱粉）を液化し、分子量が約20,000に厳密に分類されたオリゴ糖パターンを製造する（パチルスのアミラーゼははるかに大きい分子量のフラグメントを含むシロップを生成し、高分子量オリゴ糖はグルコアミラーゼ（例えばアスペルギルスのグルコアミラーゼ）では糖化中にグルコースに完全には変換されない）。

デンプン構成組成物（例えばトウモロコシデンプン）の加水分解の触媒に古細菌起源の本発明のアミラーゼを用い、分子量が約20,000のフラグメントが生成される。これら分子量約20,000のフラグメントは迅速及び完全にグルコースに変換される。したがって、ある特徴では、パチルスのアミラーゼによる液化から生成される糖化シロップは、本発明のアミラーゼを用いる液化から得られた糖化シロップよりもデキストロースの含有量が少ない。

【0211】

均質なマルトデキストリンを製造する方法：本発明は、本発明の酵素を用いる均質なマルトデキストリンを製造する方法を提供する。本発明の方法によって製造された均質なマルトデキストリンは、種々の食品、薬品及びコーティングで用いられる。ある特徴では、

古細菌起源の本発明のアミラーゼ〔配列番号:79、配列番号:80配列番号:81、配列番号:82、配列番号:115、配列番号:116、配列番号:322、配列番号:323の古細菌アミラーゼを含む〕及び前記古細菌アミラーゼと同じ活性を有する本発明の酵素は、極めて均質なマルトデキストリン組成物を生成することができる（酸又は酵素によるデンプンの加水分解を用いる通常の製造工程では広範囲の（典型的には二相性）MW分布を示すオリゴ糖を生じる）。本発明の方法によって生成された均質なマルトデキストリンは均質なMW分布を示し、多様なマルトデキストリン構成製品で用いることができ、低粘稠性で清澄な（濁りのない）溶液、良好なコーティング特性、良好な薄層形成特性などが得られる。

ある特徴では、古細菌起源の本発明のアミラーゼ（及び前記古細菌アミラーゼと同じ活性を有する本発明の酵素）を用いてトウモロコシデンプンを液化して均質なマルトデキストリン構成組成物が製造される。ある特徴では、前記液化は約pH4.5から約pH6.5の間のpH（例えばpH5.0又は5.5）で、約105℃の温度で実施される。均質なマルトデキストリン組成物は約5から約20の高さの範囲のDEで製造することができる。これら古細菌由来の本発明のアミラーゼによって製造されたシロップはろ過、木炭による処理及び／又は噴霧乾燥させて、マルトデキストリン構成製品を製造することができる。

【0212】

酵素による乾式製粉方法：本発明は、本発明のアミラーゼを用いる酵素による乾式製粉方法を提供する。乾式製粉では、全粒をすり潰し水と一緒にする。胚芽は場合によって浮遊選別又は同等な技術で除去する。得られた混合物（デンプン、線維、タンパク質及び穀粒中の他の成分を含む）をアミラーゼを用いて液化する。ある特徴では、酵素による液化は上記で述べたデンプンの液化処理よりも低い温度で実施される。ある特徴では、ゼラチン化の後、デンプン溶液はDEが10 - 20に達するまでアミラーゼの存在下で温度を上昇させて維持される。ある特徴では、この時間は約1 - 3時間である。デキストロース当量（DE）とは、全還元糖の濃度測定のための工業標準であり、乾燥質量基準でD-グルコースとして計算される。加水分解されていない顆粒デンプンはDEが実質的に0であり、一方D-グルコースのDEは100と定義される。

【0213】

酵素による湿式製粉方法：本発明は、本発明の酵素（例えばアミラーゼ）を用いる湿式製粉方法、例えばトウモロコシの湿式製粉を提供する。トウモロコシの湿式製粉は、トウモロコシ油、グルテンミール、グルテン飼料及びデンプンを製造する処理方法である。したがって、本発明は、本発明の酵素を用いるトウモロコシ油、グルテンミール、グルテン飼料及びデンプンを製造する方法を提供する。ある特徴では、本発明のアルカリアミラーゼがデンプンの液化で使用される。ある特徴では、本発明のグルコアミラーゼが糖化に用いられ、グルコースが製造される。本発明の典型的なトウモロコシ湿式製粉方法（本発明の少なくとも1つの酵素が使用される）は図25に示されている。図25は、浸漬、胚芽除去、線維除去及びグルテン分離、その後の本発明の酵素（例えばアルファアミラーゼ）を用いる液化、及び本発明の酵素（例えばグルコアミラーゼ）を用いる糖化を含む。

ある特徴では、トウモロコシ（種子外皮（線維）、デンプン、デンプン及びグルコースの組合せ、並びに内胚（inner germ）からなる穀粒）を4工程処理に付し、前記方法はデンプンの製造をもたらす。ある特徴では、トウモロコシを浸漬し、胚芽を除去し、線維を除去し、さらにグルテンを分離する。浸漬処理法では可溶化物は除去される。可溶化物の除去後に残留する生成物から胚芽が除去され、トウモロコシ油およびオイルケーキが生成され、浸漬工程から得られた可溶化物に添加される。残余の生成物から線維を除去し、前記線維固形物は前記オイルケーキ/可溶化物の混合物に添加される。この線維固形物、オイルケーキ及び可溶化物の混合物はグルテン飼料を形成する。脱線維後、残余の生成物をグルテン分離に付す。この分離によってグルテンミール及びデンプンが得られる。続いて本発明のポリペプチドを用い、前記デンプンを液化及び糖化に付してグルコースを製造する。

図25は、本発明（本発明の少なくとも1つの酵素を使用する）の例示的なトウモロコシの湿式製粉方法を示す。図26、図27及び図28は、少なくとも1つの本発明の酵素を用いる

、また別の本発明の例示的なデンプン加工処理法（デンプン液化処理を含む）を示す。

【0214】

抗老化処理方法(anti-staling process)：本発明は、本発明のアミラーゼを用いる（例えば焼成製品（例えばパンの）抗老化（アンチステーリング）処理方法(anti-staling process)を提供する。本発明は、本発明のアミラーゼを用いて、（例えば焼成製品の）肉質部（クラム）の堅さが増すのを遅らせ、さらに肉質部の弾力性が低下するのを遅らせる方法を提供する。焼成製品（例えばパン）の老化はパン製品の製造時と消費時との間の時間が経過するにつれ重大さを増していく。老化という用語は、オープンから出した後の、消費者にとっての望ましくないパン製品の特性の変化を指すために用いられる。前記変化は、例えば肉質部の堅さの増加、肉質部の弾力性の低下、及びパン外皮（クラスト）の変化（咀嚼し難い堅さになる）である。パンの肉質部の堅さはさらに保存中に不快とみなされるレベルにまで増加する。本発明のアミラーゼは、例えば米国特許6,197,352号；2,615,810号及び3,026,205号；Silberstein (1964) Baker's Digest 38:66-72に記載されているようにパンの老化を遅らせるために用いられる。

10

ある特徴では、本発明の酵素は、焼成製品の老化を遅らせ、一方デンプンを分枝デキストリンに加水分解させないために用いられる。分枝デキストリンは、 α -アミラーゼの加水分解作用によって生成されるデキストリンの分枝鎖（ α -アミラーゼによってさらに分解されない）を切断することによって形成される。これによって、製造されたパンにおいて粘着性のある肉質部が生じ得る。したがって、本発明は、エキソアミラーゼ活性を含む本発明の酵素を焼成製品の製造に使用される小麦粉又は生地添加到することを含む、焼成製品（例えばパン種発酵焼成製品）の老化を遅らせる方法を提供する。本発明のエキソアミラーゼは、グルコアミラーゼ、 β -アミラーゼ（ β -構造のマルトースを遊離させる）及び／又はマルトース生成アミラーゼ活性を有し得る。

20

【0215】

本発明はまた、パンの老化を遅らせるために有効な量で本発明のアミラーゼを生地に添加することを含む、生地又は生地から製造される焼成製品の製造方法を提供する。本発明はまた、アミラーゼを含む生地、及びアミラーゼと一緒に小麦粉を含むプレミックスを提供する。最後に本発明は、ベーキング用酵素添加物（前記アミラーゼを含む）を提供する。

。

本発明はまた、高品質のトウモロコシ線維ゴム製造のための高収量処理方法を提供し、前記方法は、トウモロコシ線維を本発明の酵素で処理し、続いて過酸化水素で処理して粉碎トウモロコシ繊維の抽出物を得る工程を含む。例えば米国特許6,147,206号を参照されたい。

30

【0216】

動物の飼料及び添加物：本発明は、本発明のアミラーゼ酵素を用いて動物の飼料及び添加物を処理する方法を提供する。本発明は、本発明のアミラーゼを含む動物の飼料及び添加物を提供する。ある特徴では、本発明のアミラーゼ酵素を用いて動物の飼料及び添加物を処理することによって、動物の飼料又は添加物中のデンプンの利用性を高めることができる。これによって、消化が簡単で吸収が容易な糖を遊離させることができる。

本発明のアミラーゼを使用することによって、動物又は鳥類の消化能力を高めることができる。本発明のアミラーゼを使用することによって、より良好な成長及び能力のために適切な栄養補給物の利用性が担保される。ある特徴では、本発明の酵素は動物の飼料添加物として添加することができる。別の特徴では、動物飼料を動物が消費するに先立ってアミラーゼで処理することができる。また別の特徴では、本アミラーゼは、トランスジェニックな飼料作物（例えばトランスジェニック植物、種子など）、例えばトウモロコシで本酵素を直接発現させることによって供給することができる。上記で述べたように、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物部分および植物細胞を提供する。ある特徴では、前記核酸は、本アミラーゼが回収可能な量で産生されるように発現される。本アミラーゼはいずれの植物または植物部分からも回収することができる。また別には、本組換えポリペプチドを含む植物または植物部分は、食

40

50

物または飼料の質を改善するために、例えば栄養価、賞味性および流動特性を改善するために、または栄養阻害因子を破壊するために用いることができる。

【0217】

紙又はパルプの処理：本発明の酵素は紙若しくはパルプの処理、又は紙の脱インクで用いることができる。例えばある特徴では、本発明は本発明のアミラーゼを用いる紙の処理方法を提供する。ある特徴では、本発明の酵素を用いて紙の中のデンプンを改変し、それによってデンプンを液化形にすることができる。また別の特徴では、生コピー用紙の紙成分化学的及び酵素的脱インク処理される。ある特徴では、本発明のアミラーゼはセルラーゼと併用して用いることができる。紙は以下の3つの方法によって処理することができる：1) 本発明の酵素の存在下における分解；2) 脱インク物質及び本発明の酵素による分解；及び／又は3) 本発明の酵素に浸漬した後での分解。アミラーゼで処理したりサイクル紙は、単にセルラーゼだけで処理された紙と比較してトナー粒子が除去されているために白さが増すであろう。本発明はいずれの特定の理論にも拘束されないが、本発明のアミラーゼの効果は、パルプ懸濁液中の界面活性剤としてのその働きによるものであろう。

【0218】

本発明は、本発明の1つまたは2つ以上のポリペプチドを用いる紙および紙パルプの処理方法を提供する。本発明のポリペプチドは任意の紙処理またはパルプ処理方法で用いることができる。前記方法は当業界で周知であり、例えば米国特許6,241,849号、同6,066,233号、同5,582,681号を参照されたい。例えばある特徴では、本発明は、染料を含む印刷された紙の脱インクおよび脱色のための方法を提供する。前記方法は、印刷された紙をパルプ化してパルプスラリーを得て、本発明の酵素（他の酵素もまた添加することができる）の存在下でインクを前記パルプスラリーから除去することを含む。別の特徴では、本発明は、パルプ（例えば二次線維から製造されたパルプ）のろ水度を高める方法を提供し、前記方法は、本発明の酵素を含む酵素混合物（他の酵素、例えばペクチナーゼもまた含むことができる）をパルプに添加し、酵素処理パルプを生成する反応を惹起させる条件下で処理することによって実施される。前記酵素処理パルプのろ水度は、白さが低下することなく二次線維パルプの初期ろ水度より高められる。

【0219】

再パルプ化：リグノセルロース原材料の処理：本発明はまたリグノセルロース線維の処理方法を提供する。本方法では、線維はその特性の改善に有効な量の本発明のポリペプチドにより処理される。本発明のアミラーゼはまた、デンプン補強反古紙及び厚紙からリグノセルロース素材（例えばパルプ、紙及び厚紙）を製造するとき、特に再パルプ化が7を超えるpHで実施され、さらにアミラーゼが前記廃棄材料の分解を補強デンプンの分解により促進できる場合に用いることができる。本発明のアミラーゼは、デンプン被覆印刷紙から製紙用パルプを製造する過程で有用であり得る。前記方法は例えばW095/14807に開示されたように実施することができる。

例示的な方法は、紙を分解してパルプを製造し、前記分解前、分解中又は分解後にデンプン分解酵素で処理し、さらに分解処理及び酵素処理後にインク粒子をパルプから分離する工程を含む。例えば米国特許6,309,871号及び前記文献中に引用された他の米国特許を参照されたい。したがって、本発明は、リサイクル紙を酵素によって脱インクする方法を含み、この場合、ポリペプチドは線維表面の効果的な脱インクに有効な量で適用される。

【0220】

廃棄物処理：本発明の酵素は多様な他の工業的用途、例えば廃棄物処理で用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明は、本発明の酵素を用いる固形廃棄物消化方法を提供する。前記方法は、実質的に未処理の固形廃棄物の大きさ及び体積を減少させることを含み得る。固形廃棄物は、制御温度で酵素溶液（本発明の酵素を含む）の存在下で酵素消化工程により処理することができる。これによって添加微生物がもたらす相当な細菌の発酵無しに反応が生じる。前記固形廃棄物は液化廃棄物及びいくらかの残留固形廃棄物に変換される。生じた液化廃棄物は前記いくらかの残留固形廃棄物から分離することができる。例えば米国特許5,709,796号を参照されたい。

口内手入れ製品：本発明は、本発明のアミラーゼを含む口内手入れ製品を提供する。典型的な口内手入れ製品には、練り歯磨き、歯磨きクリーム、ゲルまたは歯磨き粉、オドンティクス、口内洗浄液、歯磨き前または歯磨き後の洗浄剤、チューインガム、ロゼンジまたはキャンディーが含まれる。例えば米国特許6,264,925号を参照されたい。

【0221】

醸造および発酵：本発明は、本発明のアミラーゼを含むビール醸造（例えば発酵）方法を提供する。ある例示的な方法では、デンプン含有原料を分解し処理してモルトを形成する。本発明のアミラーゼは発酵過程の任意の時点で用いられる。例えば、本発明のアミラーゼはオオムギモルトの加工時に用いることができる。ビール醸造の主要な原料はオオムギモルトである。これは三段階プロセスであり得る。第一に、オオムギの穀粒を浸漬して水分含有量を、例えば約40%程度に増加させる。第二に、前記穀粒を酵素合成がジベレリンの制御下で刺激される3から6日間15から25℃でインキュベートすることによって発芽させることができる。この期間中にアミラーゼレベルは顕著に増加する。ある特徴では、本発明のアミラーゼは前記方法のこの段階（または他の任意の段階）で添加される。アミラーゼの作用は発酵可能な還元糖の増加をもたらす。これはジアスターゼ能力（DP）として表すことができ、DPは12℃、5日間でおおよそ80から190に上昇し得る。

本発明のアミラーゼは、例えば米国特許5,762,991号、同5,536,650号、同5,405,624号、同5,021,246号、同4,788,066号に記載されたように、任意のビール製造方法で用いることができる。

【0222】

井戸掘削及び採鉱作業での使用：本発明はまた、井戸及び掘削作業、例えばガス井、油井若しくは他の掘削又は採鉱作業で本発明の酵素を使用する方法を含む。例えば、ある特徴では、本発明の酵素を用いて地下の構造物、例えば井戸又は鉱床から生じる産出流体を増加させる。ある特徴では、本発明の酵素を用いて、粘稠なデンプンを含む有害な流体、例えば産出作業中に生じる流体が除去される。前記デンプン含有流体は、完成した井孔を取り巻く地下構造物内で見出されるであろう。ある特徴では、本発明のアミラーゼを油井掘削液で用いて掘削泥の除去を促進する。

ある特徴では、本方法は、産出流体（本発明の酵素を含む）を井孔又は鉱床から流出させることを含む。この方法は、構造物から生じる産出流体を予想される流速未満に低下させ、水性流体および本発明のポリペプチドと一緒に混合することによって酵素処理物を調合することを含むことができる。本方法は、酵素処理物を井孔又は他の掘削シャフト内の所望の場所にポンプで送り込み、酵素処理物で粘稠なデンプンを含む有害な流体を分解させることを含むことができる。本方法は、前記流体を地下構造物から井戸又はシャフトの表面へ移動させることを含み得る。ある特徴では、前記酵素処理はデンプン含有流体中の α -グルコシド結合の攻撃に有効である。ある特徴では、本発明のアミラーゼを鉱床掘削、井戸の掘削（例えばガス井又は油井掘削）などで用いて掘削泥を例えば孔（例えば井孔又はシャフト）の掘削時に除去する。

【0223】

本発明の酵素は任意の井戸、シャフト又は鉱床掘削作業で用いることができ、それらの多くは当業界で周知である。例えば、本発明は本発明の酵素（ある特徴では、また油田又はガス田産出化学物質を含むことができる）を油及び／又はガスを含む岩石層に導入する方法を提供する。前記方法は、前記酵素（ある特徴ではさらに化学物質）を含むマイクロ乳濁液を産出井戸に、続いて前記岩石層に送り込むことを含む。ある特徴では、産出井戸は“シャットイン”処置を施され、それによって本発明の酵素を含む水性組成物が前記産出井戸に加圧下で注入され、さらに岩石層に“押し込まれ”、そこで保持される。例えば米国特許6,581,687号を参照されたい。

ある特徴では、ガス、油もしくは他の掘削又は採鉱作業で用いられる本発明のアミラーゼは高い若しくは低いpH及び／又は高い若しくは低い温度で活性を示し、例えばこれらのプロセスで用いられる本発明のアミラーゼは、約pH6.5、pH6、pH5.5、pH5、pH4.5若しくはpH4又はそれより低いpHを含む条件下で、又は約pH7、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9、pH9.

5、pH10、pH10.5若しくはpH11又はそれより高いpHを含む条件下で活性を有する。ある特徴では、これらのプロセスで用いられる本発明のアミラーゼは約0℃から約37℃、又は約37℃から約95℃若しくはそれより高い、又は約80℃から約120℃のいずれかの範囲の温度（例えば85℃、90℃、95℃、98℃、100℃、105℃、110℃、115℃、120℃又はそれより高い温度）を含む条件下で活性を有する。

【0224】

徐放性組成物

本発明は、ラテックスポリマー（例えばラテックス塗料）又は等価物によって被覆された所望の組成物を含む徐放性又は“制御放出”組成物を提供する。本発明の徐放性／制御放出組成物は所望の任意の組成物を含むことができる。前記組成物は酵素又は任意の成分（小分子、薬剤、多糖類、脂質、核酸、ビタミン、抗体、殺虫剤などを含む）を含むことができる。ある特徴では、前記コーティングは比較的低温では容易には溶解しないが、比較的高温で分解して所望の成分（例えば酵素）を放出するであろう。

本発明は組成物を徐放又は“制御放出”する方法を提供し、この場合、前記組成物はラテックスポリマー（例えばラテックス塗料）又は等価物によって被覆される。

本発明の徐放性／制御放出組成物及び方法を多様な医学的用途及び工業的用途で用いることができる。例えばある特徴では、本発明の徐放性／制御放出酵素組成物は、油の回収作業を強化するグアール破碎流体に含まれる酵素を含む。本発明の油田のグアール分解での応用は、低温では容易に溶解しないが高温で分解して酵素を放出するコーティングによって促進されるであろう。

【0225】

別の特徴では、本発明の徐放性／制御放出酵素組成物は、動物の飼料又は栄養補強物（例えば酵素、ビタミン、抗生物質及び／又は他の食品、薬剤又は栄養補助物を含む）を含む。動物飼料又は栄養補助物質中のこれら活性化合物は、本発明の徐放性／制御放出組成物で被覆することによってペレット形成条件又は胃での消化から保護される。

ある特徴では前記放出は温度活性化放出であり、例えば所望の組成物（例えば酵素）は上昇させた温度（例えば約37℃から約95℃又はそれ以上、例えば85℃、90℃、95℃、98℃、100℃又はそれ以上）で放出される。前記放出速度は、前記所望の組成物に適用された“障壁”又はラテックスポリマー（例えば所望組成物を含むペレット又はマトリックス）の厚さ又は量によって制御することができる。したがって本発明は、ある範囲の厚さのラテックスポリマー又は等価物を有するペレット又はマトリックス、及びそれらを使用する方法を提供する。

【0226】

本発明は、徐放性／制御放出酵素組成物、例えばある特徴では本発明の酵素を含む組成物を提供する。ある特徴では本発明は、ラテックスポリマー（例えばラテックス塗料）又は等価物で被覆された酵素（例えば本発明の酵素）、又は酵素（本発明の酵素）を含むペレット化組成物を提供する。ある特徴では、本発明は、ラテックスポリマー（例えばラテックス塗料）又は等価物で酵素（例えば本発明の酵素）又は酵素（例えば本発明の酵素）を含むペレット化組成物を被覆することを含む、徐放性酵素組成物を製造する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、ラテックスポリマー（例えばラテックス塗料）又は等価物で所望の化合物を被覆することを含む、徐放性／制御放出酵素組成物を製造する方法を提供する。

徐放性／制御放出組成物（例えば徐放性／制御放出酵素組成物）及び本発明の方法で用いられるラテックスポリマーには多様なタイプが含まれ、例えば以下もの（アクリル樹脂、アルキド樹脂、セルロース、クマロン-インデン、エポキシ、エステル、ヒドロカーボン、マレイック、メラミン、天然樹脂、オレオ樹脂、フェノリック、ポリアミド、ポリエステル、ロジン、シリコーン、スチレン、テルペン、ウレア、ウレタン、ビニールなど）であるが、ただしこれらに限定されない。徐放性組成物及び本発明の方法で用いられるラテックスポリマーにはまた、1つ又は2つ以上の以下のモノマー（アクリレート、メタクリレート、酢酸ビニル、スチレン、エチレン、塩化ビニル、ブタジエン、塩化ビニリデン、

ビニルベルサテート、プロピオン酸ビニル、t-ブチルアクリレート、アクリロニトリル、ネオプレン、マレエート、フマレートなど（前記の可塑化されたもの又はその誘導体）を含む1つ又は2つ以上のホモポリマー又はコポリマーが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0227】

本発明のラテックス組成物で用いられるラテックスポリマーの量は重要ではないが、ラテックスを使用する確立された方法にしたがった任意の量であろう。また別の特徴では、乾燥ラテックスポリマーの量は、総ラテックス組成物の少なくとも約1若しくは約2から約50、又は約3から約40質量パーセントである。本発明のラテックス組成物は場合によって他の成分、例えばラテックス組成物で一般的に用いられるものを含むことができる。これらの付加成分には以下の物質の1つ又は2つ以上が含まれるが、ただしこれらに限定されない：溶媒、例えば脂肪族又は芳香族炭化水素、アルコール、エステル、ケトン、グリコール、グリコールエーテル、ニトロパラフィンなど；色素；充填剤；乾燥剤；延展剤；可塑剤；安定化剤；分散剤；界面活性剤；粘稠剤（ポリマー結合性濃縮剤、多糖類系濃縮剤などを含む）；懸濁剤；流動制御剤；消泡剤；抗剥離剤；保存料；伸展剤；薄層化促進剤；架橋剤；表面改良剤；腐食防止剤；及びラテックス組成物で有用な他の成分。ある特徴では、改善された流動性及び安定性を有する本発明のラテックス組成物が、確立された方法にしたがいラテックスポリマー及び多糖類を水と一緒にすることによって提供される（例えば米国特許6,372,901号、5,610,225号を参照されたい）。

【0228】

ある特徴では、ラテックスポリマー（例えばラテックス塗料）又は等価物で被覆された、活性な組成物、例えば酵素（例えば本発明の酵素）を含む本発明のペレット化又はマトリックス構成組成物の製造では、活性組成物（例えば酵素）はペレット本体に包埋されるか、又はある特徴では、活性組成物（例えば酵素）の大半又は全てがペレット中に包埋される。したがって、激甚な薬剤（例えばラテックスコーティング）（所望の活性成分の不活性化物質であるかもしれない）を用いてペレット又はマトリックスの表面を被覆することができる。前記コーティングの組成物は、作用物（例えば熱、酸、塩基、圧、酵素、他の化学物質など）によって分解され、コーティング分解剤への暴露が引き金となって所望の酵素活性を制御放出させることができる。

【0229】

ある特徴では、活性組成物、例えば酵素（例えば本発明の酵素又は別の酵素、例えばマンナナーゼ）は、コーンタームミール及び／又はトウモロコシデンプンマトリックス（例えばペレットとして）に分散される。この混合物（例えばペレット）は室温（例えば約22℃）の水で10分以内に崩壊して、全て（100%）の活性組成物を放出する（例えば全ての酵素活性を放出する）。より高い温度では放出速度は速くなる。これは多くの使用で認容できる崩壊速度ではない。

しかしながら、本発明の徐放性／制御放出組成物として、すなわち前記混合物がラテックスポリマー（例えばラテックス塗料）又は等価物で被覆された場合、前記混合物（例えばペレット、マトリックス）の崩壊は遅くなる。放出の速度及び程度はペレット又はマトリックスに適用されるコーティング（障壁）の厚さによって制御できる。例えば、被覆粒子は22℃の水中で6時間後に活性の30%しか放出しないであろう。60℃では90分で50%の酵素が放出される。80℃では1時間の間に80%の酵素が放出される。

本発明は以下の実施例を参照しながらさらに詳細に記載されるであろう。しかしながら本発明はそのような実施例に限定されないことは理解されよう。

【実施例1】

【0230】

実施例1

熱安定性 α -アミラーゼの同定及び特性決定

以下の実施例ではあるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法を述べる。本実施例では本発明の新規な酸性アミラーゼの特性について述べる

。本スクリーニングプログラムは中性pH及び低pH条件下で実施した。低pHサンプルから作製したDNAライブラリーを新規アミラーゼ発見の標的とした。前記の試みによってデンプンを分解する能力を有する数百のクローンを発見することができた。DNA配列及びバイオインフォマティクス解析によってこれらクローンの多くは以前には未同定であったアミラーゼとして分類された。

生化学的実験：アミラーゼゲノムクローンの生化学的分析によって、多くがpH6未満の至適pHを有することが示された。これらゲノムクローンの溶解物を70℃、80℃、90℃又は100℃で10分インキュベートし、残存活性をpH4.5で測定することによって耐熱性についてテストした。80℃での熱処理後50%を越える活性を維持していたクローンを更なる解析のために選択した。これらのクローンを90℃で10分間pH6.0及び4.5でインキュベートし、pH4.5で残存活性を調べた（図5）。多数のクローンがそれらの活性の40%を超える活性を前記の処理後に維持していた。比較すれば、本発明の酵素（“進化”アミラーゼ）（配列番号:436によってコードされる配列番号:437）の残存活性は第二世代酵素の最高のものに匹敵し、配列番号:437の比活性の方が高かった。

pH4.5で90℃での熱処理後に残存活性を有するクローンの耐熱活性を、室温、70℃及び90℃でpH4.5で測定した。表1は、配列番号:87（*B. ステアロテルモフィルス*（*stearothermophilus*）のアミラーゼ）及び配列番号:113（*B. リケミフォルミス*（*lichemiformis*）のアミラーゼ）の加水分解速度は高温で低下するが、配列番号:125の速度は温度が70℃に上昇するにしたがい増加し続け、90℃付近でのみ約50%に低下することを示している。

配列番号:437（配列番号:436によってコードされる）に記載の配列を有する例示的なポリペプチドは熱安定性であり、カルシウムの非添加下でpH4.5で100℃25分後に50%の活性を保持する。この例示的なポリペプチドは、pH4.5で40mg/Lのカルシウムの存在下で100℃にて60分後に90%の活性を保持していた。ポリペプチド（配列番号:437）の活性プロファイルは約4.8から5.0の範囲にある。カルシウムの添加は活性に要求されない。

ポリペプチド（配列番号:437）は、35%グリセロールで製剤化したときはpH10で1.1の比重を有する淡褐色から黄色の液体であり得る。

そのアルファアミラーゼ活性は約110から115 IAU*/グラムである（*IAU=INNOVASE(商標)活性単位）。使用した解析方法の1つは、4-ニトロフェニル- α -D-ヘキサ-グルコピラノシドを含んでいた（この同じ方法を用いて酵素が本発明の範囲内に包含されるか否かを決定することができる）。

【0231】

候補物質の評価

90℃の熱処理後のpH4.5での残存活性を基準にして、*B. リケニフォルミス*（*lichniiformis*）のアミラーゼ（配列番号:125）と配列番号:437の酵素（“進化”アミラーゼ）とをデンプン液化アッセイで比較した。

表 1

	室温	70℃	90℃
配列番号:87 ¹	1.25	1.43	0.33
配列番号:113 ²	3.3	1.9	0.39
配列番号:125	1.9	47	19

表1は、pH4.5及び3通りの温度における3つのゲノムクローンの色素標識デンプンの加水分解速度（相対蛍光単位/秒）を示している。

¹：*B. ステアロテルモフィルス*（*stearothermophilus*）、²：*B. リケニフォルミス*（*lichniiformis*）

【0232】

以下の表は、選択された本発明の例示的酵素の平均相対活性（ARA）、耐熱性、熱安定性、比活性及び発現（単位/L）のまとめである（例えば配列番号:125、126は、配列番号:125によってコードされる配列番号:126に記載の配列を有するポリペプチドを指す、etc）

【0233】

酵素	発現宿主	平均相対活性 (ARA)	至適pH	耐熱性 50, 60, 70 80, 90℃で 5分**後 の%RA	熱安 定性 37, 65, 80℃の %RA	比活性 (pH5.3, 37℃の U/mg)	発現 (単位/ L)
基準点 配列番号		80	4.0 - 5.5	105, 107, 88, 58, 27	100, 83, 0	82	
125, 126	Pichia (ピキア)	66	4.5 - 6.0	86, 88 100, 86, 6 5	100, 347, 553	81	8521
378, 126	Pichia	66	6.0 - 7.0	22, 0, 0, 0, 0		937	183615
416, 417	Pichia	59	4.5 - 5.0	56, 1, 1, 0, 1		39	23256
203, 204	Pichia	61	6.0 - 7.0	18, 2, 3 2, 3		20	122107
434, 435	Pichia	76	6.0 - 6.5	151, 58, 0, 0, 0		151	17171
420, 421	Pichia	84	5.5 - 7.0	68, 26, 0, 0, 0		75	5005
350, 351	Pichia	59	6.0 - 7.0	6, 0, 0, 0, 0		104	39662
402, 403	Pichia	67	5.5 - 6.0	42, 8, 11 12, 16		535	75053
336, 337	Pichia	63	4.5 - 5.5	124, 105 115, 108 117	100, 0, 0	572	20822
430, 431	Pichia	50	6.0 - 6.5	111, 86 82, 89, 35		138	6556
127, 128	Pichia	71	5.5 - 6.5	127, 115 53, 4, 5		17	114999
101, 102	Pichia	63	5.0 - 5.5	124, 164 145, 120 144		28	11559
388, 389	Pichia	80	6.0 - 7.0	87, 29, 5 0, 0		259	163163
539, 540	Pichia	TBD	4.0 - 4.5	102, 100 31, 12, 3	100, 186 123	TBD	TBD

ARAは平均相対活性である。ARAはpH4及びpH7.5の間のアミラーゼの平均相対活性として計算される。

*1リットルの発現当たりのおよその単位は以下のように計算される：（回収された凍結乾燥粉末に存在する全アミラーゼ単位）／（発酵槽の培養容積）

【0234】

アミラーゼ配列番号:437の評価

アミラーゼ配列番号:437（配列番号:436によってコードされる）を種々の条件下で評価

した。以下のプロトコルではN°2黄色デントコーンをデンプン供給源として用いた。

液化：35%の乾燥固形物（“DS”）を含むデンプンスラリーを、95℃から119℃の範囲の種々の温度（例えば約110℃）で5分間0.2から0.8g/kgデンプンDSの間の酵素濃度で、0から30百万分率（ppm）の範囲のカルシウムを添加し、pH4.0から5.6で一次液化に付した。二次液化は95℃120分の条件を含む。

糖化：糖化は先ず初めに35%の乾燥固形物（“DS”）（デンプンスラリー）及び0.225AGU/グラムDSのグルコアミラーゼAMG300L（Novozymes A/S, Denmark）（AGU＝アミログルコシダーゼ（又はグルコアミラーゼ）単位）をpH4.3、60℃で44時間用いてテストした。

アミラーゼ配列番号:437は上記のpH条件下で有用であることが判明し、カルシウム非依存性であり高温で安定性を有することが判明した。ある特徴では、アミラーゼ配列番号:437又は本発明の別のアミラーゼは、0.5から0.7kg/MT DSデンプンの間の用量範囲で用いられる。 10

本発明は、本発明の酵素を用いて滋養甘味料の製造方法、例えば上記に記載した液化及び糖化プロトコル（例えばアミラーゼ配列番号:437又は本発明の別の酵素を用いる）を含む方法を提供する。ある特徴では、これらの方法における本発明の酵素の用量範囲は約0.5から0.7g/kgデンプンDS、約110℃の蒸気温度（例えば蒸気釜を用いる）、pH4.5、添加カルシウム無しである。

【0235】

乾式ミルエタノール製造

本発明は、本発明の酵素、例えば配列番号:437又は本発明の別の酵素を用いる乾式ミルエタノール製造の方法を提供する。 20

乾式ミルエタノール製造（特に乾式ミルトウモロコシ粉の液化）で使用する本発明の酵素の評価では、ベンチスケールリアクターを市販の乾式ミルから供給されるトウモロコシ粉とともに用いた。TERMAMYL(商標)SC（Novozymes A/S, Denmark）アミラーゼを競合基準として用いた。テストによって至適条件はpH5.7で85℃であることが判明した。下記の5つのそれぞれ独立した変数を調べた：温度（80℃から100℃の範囲）、酵素用量（0.2から1.0g/kgデンプン）、pH4.4から6.0、カルシウム（0ppmから2000ppm）、及び再利用戻し（recycled backset）（約0%から40%）。

95℃でアミラーゼ配列番号:437は、その最適条件（85℃を含む）下で乾式ミルトウモロコシ粉の粘性をTERMAMYL(商標)SC（Novozymes A/S, Denmark）よりも迅速に低下させる。アミラーゼ配列番号:437による粘性低下速度は酵素の用量及び温度によってもっとも影響を受けた。最適範囲は、95℃の至適温度で0.4から0.6g/kgデンプンの範囲であることが判明した。アミラーゼ配列番号:437は、pH4.4からpH5.6のpH範囲ではTERMAMYL(商標)SC（Novozymes A/S, Denmark）アミラーゼよりも低いpH及び高い温度で有効であった。カルシウムの添加は、95℃では粘性低下速度に極めてわずかな影響しか与えなかった。アミラーゼ配列番号:437は30%のリサイクルバックセットの存在下で有効であった（例えば薄いアルコール蒸留廃液、洗浄廃液＝副生成物の液化へのリサイクル）。図29は、乾式ミルエタノール加工における、アミラーゼ配列番号:437とTERMAMYL(商標)SC（Novozymes A/S, Denmark）アミラーゼとを比較したこれらの発見の要約データを示している。 30

【0236】

また別の特徴では、乾式ミルエタノールプロセスでのアミラーゼ配列番号:437の使用によって操作上の利点が提供される：例えばスラリー化トウモロコシ粉の粘性の急速な低下；新たな資本の投下を必要とせずに溶解される固形物および処理量の増大を可能にする；最良競合物に対する優れた熱安定性を有することによって分割投与が不要となる（アミラーゼ配列番号:437は熱安定性酵素であり、蒸気過熱調理の前後に酵素投下を要しない）；より高いプロセス温度でより低い粘性が得られる；さらにスラリートank内の細菌制御の改善が提供される（処理工程はより高温で進行し、望ましくない微生物は殺菌される）；より低い液化pH（pH調整を不要にする）はかん石形成を減少させ（蓂酸カルシウム沈殿物が機械類などに形成され、低pHで液化が実施される場合はかん石形成の潜在性が増す）、さらに副生成物の形成を減少させる。 40

要約すれば、アミラーゼ配列番号:437は熱安定性酵素であり、重要な工業的要望に合致し(例えばある種の条件下で、高濃度の乾燥固形トウモロコシスラリーの粘性を急激に低下させる)、熱安定性であり(至適温度95℃)、カルシウム非依存性であり、低い至適pH下で活性を有し、30%までのリサイクルバックセットに耐えることができる。ある特徴では、推奨される酵素用量は約0.4から0.6kg/MTデンプンの範囲にある。

【実施例2】

【0237】

実施例2

アルカリ性pHで活性を有する熱安定性アミラーゼ

下記の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか、例えば熱安定性アミラーゼであるか否かを決定する例示的な方法を述べる。

本実施例の最初の目的は、市販の自動皿洗浄(ADW)製剤の現時点で存在するアミラーゼ集団の評価であった。この試みによって2つの候補アミラーゼ、高いpHで活性を有するアミラーゼ(配列番号:115)及びADW処方で安定性を有するもう1つのアミラーゼ(配列番号:207)が同定された。実験にはまた高pHアミラーゼの同定も含まれていた。前記の試みによってデンプン分解能力を有する数百のクローンを発見することができた。DNA配列及びバイオインフォマティクス解析によってこれら遺伝子の多くが未同定アミラーゼに分類された。残りのオープンリーディングフレームは非プルラナーゼ、アミロプルラナーゼ及びアミロマルターゼであった。広範囲の生化学的研究及び適用研究によって、3つの候補(クローンB、配列番号:147及び配列番号:139)がpH10で高い比活性を有するが、残念ながらADW処方中での安定性を欠くことが示された。要約すれば、各々がADWで適用するために所望の表現型をもつ新規なアミラーゼパネルが同定された。

【0238】

生化学的実験

アミラーゼのゲノムクローンの生化学的解析によって、それらの多くがpH10及び50℃でデンプンを加水分解することが示された。更なる生化学的検査及び適用試験に十分な量の酵素を製造するために、もっとも活性の高い40のゲノムクローンのアミラーゼオープンリーディングフレームを発現ベクターにサブクロニングした。この試みには、推定的シグナル配列を含むこれらクローンのために2つの構築物を作製し、さらに各サブクローン(アミラーゼシグナル配列を含むもの及び含まないもの)のために増殖及び誘導条件を確立することが含まれていた。

可溶性であって活性を有するタンパク質を34サブクローンから均質になるまで精製することができた。比活性(単位/mg、ここで1単位 = μmol 還元糖/分)は、緩衝液に2%のデンプンを用いてpH8及びpH10(40℃及び50℃)で測定された。バチルス・リケニフォルミス(配列番号:113)由来のアミラーゼをこれらの実験の基準として選択した。比活性は、30分の間の種々の時点でサンプルを取り出し、還元糖を分析することによって決定した。前記初速は、反応進行曲線を一次方程式適合させることによって決定した。上位2つの候補の比較は表2に示されている。

pHに対する加水分解速度の依存性を決定する実験によって、クローンBのみが約8の至適pHを有する“アルカリアミラーゼ”であり、他の全ては7又はそれ未満の至適pHを有することが示された。それでも、ヒットパネルにはpH10及び50℃で相当な活性を有するリードアミラーゼが含まれることは明白である。

【0239】

表2：アミラーゼの比活性(U/mg精製酵素)

10

20

30

40

酵素	比活性 (pH8, 40℃)	比活性 (pH10, 50℃)
クローンB	683	20
配列番号:139	430	33
配列番号:127	250	47
配列番号:137	230	3
配列番号:113 (B. licheniformis)	228	27
配列番号:205	163	4
残余のもの	<40	

10

【0240】

安定性

ADW処方 の存在下における安定性を、生化学的分析により同定した上位3つの候補の各々について測定した。これらの実験の基準物は製剤マトリックス中の市販酵素とした。図13は、ADW処方の種々の成分の存在下 (pH8、pH10.8、漂白剤を含むADW溶液及び漂白剤を含まないADW溶液) で、50℃で30分インキュベートした後の残存活性 (pH8及び50℃で測定) を示している。インキュベーション後の測定活性を最初の活性の百分率として表す。データでは、クローンBは高温に対して非常に鋭敏であるが、他のアミラーゼは影響が少ないことが示されている。酵素を高pH及び高温でインキュベートしたとき、市販の酵素配列番号:139は安定性が減じたが、配列番号:127は完全な活性を維持した。pH10でのインキュベ

20

ーション対pH8でのインキュベーションの後の配列番号:127の明らかに変則的な性状は反復実験で観察された。

ADWマトリックスで50℃で、色素標識デンプンによりアミラーゼ活性を測定したとき、市販のアミラーゼではpH8でその活性のざっと5%が示された。同じアッセイで、クローンB、配列番号:139及び配列番号:127はpH8でそれらの最初の活性の2%未満が示された。

洗浄試験

デンプン被覆スライドを用いた洗浄試験を実施し、市販アミラーゼと比較した精製酵素の各々の性能を測定した。スパゲッティデンプン被覆スライドをプロトコルに従って調製した。予め秤量したデンプンを被覆した2枚のスライドを背面と背面を合わせて50mLの円錐管に入れ、25mLのADW溶液+/-酵素を各管に添加した。この管を水平回転台で20分50℃で

30

穏やかに回転させてインキュベートした。前記インキュベーション時間の後で、スライドを直ちに水の中で水洗し、オープンで一晩乾燥させた。全ての実験は2つ組で実施し、市販の酵素を陽性コントロールとして使用した。これらの実験の結果 (図6) は除去されたデンプンの正味の百分率 (例えば酵素を含むADWで除去されたデンプンの% - ADWのみで除去されたデンプンの%) として表されている。

【実施例3】

【0241】

実施例3

遺伝子の最適化

以下の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法 (例えばADWの実行下で酵素の性能を評価することによる) が記載される。

40

酵素の特性は、種々の進化手段 (遺伝子部位飽和変異導入 (GSSM (商標) および遺伝子再アセンブリー (GeneReassembly (商標)) (Diversa Corporation, San Diego, CA) を含む) によって改善することができる。このような技術は、改善された性能についてスクリーニングすることができる変種プールを作製するために本発明のアミラーゼ核酸に応用されるであろう。ある特徴では、進化のための親分子には本発明の任意の核酸が含まれる。これらは例えば以下の核酸の1つ又は全てである: 配列番号:113、配列番号:139、配列番号:115及び配列番号:127 (配列番号:127の切端形)。

ADWの実行下での酵素性能を評価するために高処理スクリーニングを開発した。HTSの開発はいずれの進化プログラムにおいても極めて重要である。HTSは自動であり、親アミラ

50

ーゼに対して定常的な結果を示した（図7）。親アミラーゼはADW処方で測定可能な活性を有するが、pH8に比べてその活性は非常に低い。

【実施例4】

【0242】

実施例4

アルカリ性pHで活性を有するα-アミラーゼの特性決定

以下の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否か（例えばα-アミラーゼ活性をアルカリ性pHで有するか否か）を決定する典型的な方法を述べる。

アルカリ性pHで活性を有する本発明のアミラーゼの特性をさらに調べた。pH8及び10（40℃及び50℃）で2%デンプンに対するカイネティクスを調べた。

10

表4

酵素、比活性	pH8、40℃	pH10、50℃
配列番号:113 (B. licheniformis)	228単位/mg	27単位/mg
クローンB	682単位/mg	31単位/mg
配列番号:139	430単位/mg	33単位/mg
配列番号:127	540単位/mg	50単位/mg
コントロール0GL5（大腸菌）	1.8単位/mg	0単位/mg

活性1単位は、1分当たり1μmolの還元糖を遊離する活性と定義される。

20

【実施例5】

【0243】

実施例5

アミラーゼ活性アッセイ：BCA還元末端アッセイ

以下の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法（例えばBCA還元末端アッセイによる）を述べる。注目するクローンのアミラーゼ活性は以下の方法を用いて決定された。

1. 以下のような2つの基質溶液を調製する：

a) 2グラムのジャガイモデンプンを100mLのリン酸ナトリウム（100mM、pH8）に溶解した2%可溶性デンプン（ジャガイモ）のpH8溶液、

30

b) 2グラムのジャガイモデンプンを100mLの炭酸ナトリウム（100mM）に溶解した2%可溶性デンプン（ジャガイモ）のpH10溶液、

両溶液を沸騰水浴中で加熱し、その間デンプンが溶解するまで30から40分かき混ぜる。

2. 64mg/mLの炭酸ナトリウム一水和物、24mg/mLの炭酸水素ナトリウム及び1.95mg/mLのBCA（4,4'-ジカルボキシ-2,2'-ビキノリン二ナトリウム塩（Signa Chemical cat# D-8284））から溶液Aを調製する。これをdH₂Oに添加する。

3. 1.24 mg/mLの硫酸第二銅五水和物及び1.26mg/mLのL-セリンから溶液Bを調製する。混合物をdH₂Oに添加する。

4. 溶液A及びBの1：1比の作業試薬を調製する。

5. dH₂O中の10mMのマルトースの標準溶液を調製する。ここで所望のpHにて前記10mMマルトースを2%の可溶性デンプンと一緒にし、最終濃度0、100、200、300、400、600μMを得る。各時点の各々に対して標準曲線を作成する。前記曲線は10μLの標準物を前記作業試薬に添加して決定されるので、前記曲線は0、1、2、3、4、6nmolのマルトースについて結果を得ることができる。

40

6. 1mLの基質溶液を微量遠心管に部分採取し、ヒートブロック又は加熱水浴で（5分間）所望の温度に平衡化させる。50μLの酵素溶液を前記の管の蓋の内側に添加する。

7. 溶液を平衡化しながら5mLの両溶液A及びBを混合する。100μLを96ウェルPCRプレートに部分採取する。プレートを氷上に置く。

8. 5分間温度を平衡化させた後、管の蓋を閉め、逆さにし、さらに3回ヴォルテックス攪拌する。直ちに前記の10μLをt=0として（0時点）プレートに部分採取する。酵素混合

50

物をヒートブロックに残し、所望の各時点（例えば0、5、10、15、20、30分）で10 μ Lを部分採取する。

9. 標準曲線用に10 μ Lの標準物を添加するために12ウェル（作業用試薬のみ添加）が空であることを確認する。

10. 全ての時点で採取が行われたとき、標準物を添加し、プレートに覆いをして80℃で35分加熱する。プレートを10分間氷上で冷却する。100 μ LのH₂Oを全てのウェルに添加する。混合し、100 μ Lを平底の96ウェルプレートに部分採取し、560nmで吸収を読み取る。

11. 各サンプルの各時点の測定値をそれ自身のt=0に対して0点補正する（t=0のA560の平均を他のA560値の平均から差し引く）。A560_(experimental)を μ molに変換する（A560_(experimental)を標準曲線の勾配で割る（A560/ μ mol））。各時点の測定値及び μ molの勾配（ μ mol/分）を作製し、100を乗じる（1mLの反応で使用された量ではなく、 μ molの値が前記アッセイで用いられた10 μ Lについてのものである）。比活性を得るために、前記勾配（ μ mol/分）をタンパク質のmgで割る。全ての点について最低限1つ2組で実施すべきである（1つ3組が好ましい）。標準曲線の例は図11に示されている。

【0244】

表5：サンプルデータ

A560実験値/標準値勾配

クローン	希釈	分	A560 - 1	A560 - 2	平均A560	0点補正A560	μ mol
ENZ	50	0	0.1711	0.1736	0.17235	0	0.0000
		5	0.2104	0.2165	0.21345	0.0411	0.0005
		10	0.2492	0.2481	0.24865	0.0763	0.0009
		15	0.2984	0.2882	0.2933	0.12095	0.0014
		20	0.3355	0.3409	0.3382	0.16585	0.0020
		30	0.3942	0.3805	0.38735	0.215	0.0026
		40	0.4501	0.4412	0.44565	0.2733	0.0033

【0245】

活性=0.008646 μ mol/分

タンパク質濃度（mg/mL）を任意の希釈で割ってアッセイで使用されたmgを得る。

上記の勾配をアッセイで使用したmgで割って比活性を得る。

比活性=24.93 μ mol/分/mg

例えば以下の文献を参照されたい：Dominic W.S. Wong, Sarah B. Batt and George H. Robertson (2000) J. Agric. Food Chem. 48:4540-4543; Jeffrey D. Foxand John F. Robyt (1991) Anal. Biochem. 195:93-96。

【実施例6】

【0246】

実施例6

α -アミラーゼ活性のスクリーニング

以下の実施例は、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法を記載する。クロンのアミラーゼ活性は、当業界で公知の多数の方法によって評価することができる。以下は、本発明で用いられる一般的な方法である。プレート当たりスクリーニングされるプラークの数はほぼ10,000pfuであろう。各DNAライブラリーについて、 λ Zap発現増幅溶解物のpfu力価に応じて、単離ライブラリーにつき少なくとも50,000個のプラーク及び非単離ライブラリーにつき200,000個のプラークがスクリーニングされるべきである。

ラムダライブラリーの力価測定

1) 1 μ LのラムダZap発現増幅ライブラリーストックを600 μ Lの大腸菌MRF'細胞（OD₆₀₀=1.0）に添加した。MRF'ストックを希釈するために10mMのMgSO₄を用いる。

2) 37℃で15分インキュベートする。

- 3) 懸濁液を5から6mLの50℃のNZYトップ寒天に移し穏やかに混合する。
- 4) 直ちに寒天溶液を大型(150mm)NZY培地プレートに注ぎ入れる。
- 5) トップ寒天を完全に固化させ(約30分)、続いてプレートを逆さにする。
- 6) プレートを39℃で8から12時間インキュベートする。
- 7) プラークの数を概算する。ファージ力価を測定し、10,000pfu/プレートになるようにする。必要ならば、ライブラリーファージの一部をSM緩衝液で希釈する。

【0247】

基質スクリーニング

- 1) 増幅ライブラリーから50,000pfuのラムダZapエキスを600μLの大腸菌MRF'細胞($OD_{600}=1.0$)に添加した。非環境ライブラリーのためには、4本の試験管を準備する(50,000pfu/試験管)。10
- 2) 37℃で15分インキュベートする。
- 3) ファージ/細胞懸濁液をインキュベートしている間に、1.0mLの赤色デンプン基質(1.2%w/v)を50℃の6.0mLのNZYトップ寒天に添加し、完全に混合する。必要となるまで溶液を50℃で維持する。
- 4) 細胞懸濁液の1/5(10,000pfu)を基質/トップ寒天溶液に移し穏やかに混合する。
- 5) 直ちに溶液を大型(150mm)NZY培地プレートに注ぎ入れる。
- 6) トップ寒天を完全に固化させ(約30分)、続いてプレートを逆さにする。
- 7) 細胞懸濁液の残りのために手順4-6を4回繰り返す(各回懸濁液の1/5)
- 8) プレートを39℃で8から12時間インキュベートする。20
- 9) プラーク周囲の透明化ゾーンについてプレートを観察する。
- 10) ハロを有するプラークを中心から切り出し、滅菌微量管に移す。所望のプラークを含む寒天プラグを取り出す(芯をくりぬく)ために口径の大きな200μLピペットの先端が都合よい。
- 11) ファージを500μLのSM緩衝液に再懸濁する。20μLのクロロホルムを添加し更なる細胞増殖を一切阻害する。
- 12) 次の工程前に純粋なファージ懸濁液を室温で4時間又は一晩インキュベートする。

【0248】

純粋クローンの単離

- 1) 10μLの再懸濁したファージ懸濁液を500μLの大腸菌MRF'細胞($OD_{600}=1.0$)に添加する。30
- 2) 37℃で15分インキュベートする。
- 3) ファージ/細胞懸濁液をインキュベートしている間に、1.0mLの赤色デンプン基質(1.2%w/v)を50℃の6.0mLのNZYトップ寒天に添加し、完全に混合する。必要となるまで溶液を50℃で維持する。
- 4) 細胞懸濁液を基質/トップ寒天溶液に移し穏やかに混合する。
- 5) 直ちに溶液を大型(150mm)NZY培地プレートに注ぎ入れる。
- 6) トップ寒天を完全に固化させ(約30分)、続いてプレートを逆さにする。
- 7) プレートを39℃で8から12時間インキュベートする。
- 8) 単一プラーク(純粋クローン)の周囲の透明化ゾーン(ハロ)についてプレートを観察する。単一プラークを単離できない場合は、力価を調整してファージ溶液を再度プレートの40
- 9) 寒天からハロを有する単一プラークを中心から切り出し、滅菌微量管に移す。口径の大きな200μLピペットが所望のプラークを含む寒天プラグを取り出す(芯をくりぬく)ために都合よい。力価を増幅させるために、単一の5つの活性クローンを芯からくりぬいて微量管に加える。
- 10) ファージを500μLのSM緩衝液に再懸濁する。20μLのクロロホルムを添加し更なる細胞増殖を一切阻害する。
- 11) 次の工程の前に純粋なファージ懸濁液を室温で4時間又は一晩インキュベートする。純粋なファージ懸濁液はDMSOをファージ懸濁液に添加して(7%v/v)、-80℃で保存する50

。

【0249】

純粋クローンの切り出し

1) 100 μ Lの純粋なファージ懸濁液を200 μ Lの大腸菌MRF'細胞 ($OD_{600}=1.0$) に添加する。前記に対して、1.0 μ LのEXASSISTヘルパーファージ ($>1 \times 10^6$ pfu/mL; Stratagene) を添加する。切り出しには2059 Falcon管を使用する。

2) 37°Cで15分インキュベートする。

3) 2XのYT培養液の3.0mLを細胞懸濁液に添加する。

4) 攪拌しながら、少なくとも6時間又は一晩30°Cでインキュベートする。

5) 管を70°Cに20分移す。ファージミド懸濁液は4°Cで1から2ヶ月保存できる。

10

6) 100 μ Lのファージミド懸濁液を200 μ Lの大腸菌Exp505細胞 ($OD_{600}=1.0$) を含む微量管に移す。

7) 懸濁液を37°Cで15分インキュベートする。

8) 300 μ LのSOBを前記懸濁液に添加する。

9) 懸濁液を37°Cで30から45分インキュベートする。

10) 100 μ Lの懸濁液を小さな(90mm)のLB培地プレートに移す。前記LB培地プレートはZap発現DNAライブラリーのためにカナマイシンを含むか(カナマイシン50 μ g/mL含有LB培地)、又はZapIIDNAライブラリーのためにアンピシリンを含む(カナマイシン100 μ g/mL含有LB培地)。

11) 懸濁液の残りを別の小さなLB培地プレートに移す。

20

12) 滅菌ガラスビーズを用いてプレート上に懸濁液を均等に分布させる。

13) プレートを12から24時間30°Cでインキュベートする。

14) コロニーについてプレートを観察する。

15) 単一コロニーを適切な抗生物質を含むLB液体培地に接種し、30°Cで12から24時間インキュベートする。

16) グリセロールストックは80%グリセロールを液体培地に添加する(15%v/v) ことによって調製し、-80°Cで保存できる。

【0250】

活性の確認

1) 50 μ Lの液体培養を微量管に移す。前記微量管に8%のアミロペクチンアズレ (Azur e) (pH7) の500 μ Lを添加する。各クローンについて2本の管を用意する。

30

2) 活性は50°Cで3時間及び一晩テストする。pH7の緩衝液をコントロールとして用いる。

。

3) 検査標本を氷水浴で5分間冷却する。

4) 750 μ Lのエタノールを添加し、完全に混合する。

5) 13000rpm (16000g) で5分遠心する。

6) 上清のODを595nmで測定する。

RFLP解析

1) 1.0mLの液体培養を滅菌微量管に移す。

2) 13200rpm (16000g) で1分遠心する。

40

3) 上清を廃棄する。新たに1.0mLの液体培養を同じ滅菌微量管に添加する。

4) 13200rpm (16000g) で1分遠心する。

5) 上清を廃棄する。

6) プラスミドの単離についてはQIAprepスピンミニキットのプロトコルに従う。

7) バイオフォトメーターを用いてDNA濃度をチェックする。

8) 第一の二重消化にSacI及びKpnIを使用する。37°Cで1時間インキュベートする。

9) 第二の二重消化にPstI及びKhoIを使用する。37°Cで1時間インキュベートする。

10) ローディング染料を消化サンプルに添加する。

11) 消化サンプルを1.0%アガロースゲルで1から1.5時間120ボルトで泳動する。

12) ゲルイメージャーでゲルを観察する。異なる消化パターンを有する全てのクローン

50

を配列解析のために送る。

【実施例 7】

【0251】

実施例 7

アミラーゼのアッセイ

以下の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法を述べる。

宿主培養の調製

1. XL1-Blue MRF' 宿主細胞の一晩培養を開始する。ストリーク接種プレートからの単一コロニーを用い、20 μ g/mL のテトラサイクリンを添加した10mLのLBに接種する。一晩培養を37°Cで16時間振盪しながら増殖させる。

2. 無菌技術を用い、LB_{Tet}の一晩培養のXL1-Blue MRF' 宿主を新しい100mLのLB_{Tet}接種し一日培養する。

3. 37°CのシェーカーでODが0.75から1.0に達するまで増殖させる。

4. 宿主細胞を1000Xgで10分沈殿させ、さらに10mMのMgSO₄にOD5で穏やかに再懸濁させる。

5. 少量の宿主細胞をOD1に希釈し、力価測定及びピンツースリングに使用する。

6. 宿主調製物は、氷上または4°Cで保存する場合は1週間まで用いることができる。一日培養の増殖時間を短縮するために、LB中の通常のTet濃度の1/2倍を用いるか（1/2倍 = 10 μ g/mL）、又は抗生物質を全て省略する。

ーテトラサイクリンを用いて選別するときはNZYを用いない。NZY中の高濃度Mg⁺⁺はTetを不活化する。

【0252】

ラムダライブラリーの力価測定

7. 滅菌した3つの微量遠心管をラックに置く。

8. 調製した宿主細胞995 μ Lを1本の管へ部分採取し、さらに残りの2本の管の各々に45 μ Lの調製したOD1宿主細胞を部分採取する。

9. 5 μ Lのラムダライブラリーを995 μ Lの宿主細胞を含む前記管に添加し、ヴォルテックス攪拌する。これによって200の希釈係数が得られる。

10. 5 μ Lの前の希釈物を45 μ Lの調製宿主細胞を含む残りの2本の管に連続的に添加することにより、1/2,000及び1/20,000希釈を調製する。各希釈を作製後ヴォルテックス攪拌で混合する。

11. 37°Cで15分インキュベートして宿主にファージを吸着させる。

12. その間、調製OD1宿主細胞の100 μ Lを3つのファルコン（Falcon）2059管の各々にピペットで加える。

13. 各希釈の5 μ Lを宿主細胞を含む別々の2059管に添加する。

14. 各管に3mLのトップ寒天を添加し、迅速に90mmのNZYプレートに注いで各々をプレーティングする。トップ寒天を固化させる前に滑らかで平坦に分布していることを確認する。

15. プレートを逆さにし、37°Cで一晩インキュベートする。

16. プラークを数え、ライブラリーストックの力価（ μ L当たりのプラーク形成単位（pfu）で）を計算する。

【0253】

アミラーゼ調製のためのラムダマイクロタイタースクリーニング

1. 計画したスクリーニングに必要な量のために、上記に記載したようにXL1-Blue MRF' 宿主培養の十分な量を調製する。通常は2から3ライブラリーのスクリーニングには100mL培養で十分である。

2. QFill2ディスペンサーに適合する数個のピンをオートクレーブする。これらはコーニング（Corning）の広口ピン（250mL）で蓋の周囲にシーリングリングを備えている。

3. スクリーニングのために使用できる十分量のプレート、トップ寒天、BODIPYデンブ

ン、赤色デンプン溶液などがあることを確認する。

4. 自動化の代表例を用いて2日目のロボット操作の計画を立てる。

1日目

1. ライブラリースクリーニング及びプレート番号について1536 - ウェルプレート（黒）に標識を付ける。タフタグ（Tough-Tags(商標)）試験管ステッカー（半分幅に切断する）が1536ウェルプレートの標識に理想的である。

2. スクリーニングに必要なライブラリー、宿主細胞及びNZY培地の体積を計算する。これはエクセル（Excel）スプレッドシートで容易に実施できる。

3. ラムダライブラリー及びOD5宿主細胞の計算した容積を滅菌250mLコーニング広口ビン（シーリングリングを含む）で混合する。

4. 37℃で15分吸着させる。

5. 計算した体積のNZY培地を添加し、よく混合する。これを細胞-ファージ-培地懸濁液と称する。

6. 50 μ Lの細胞-ファージ-培地懸濁液と250 μ LのOD1宿主細胞をFalcon2059試験管で一緒にし、続いて9mLのトップ寒天とともに150mmのNZYプレートにプレーティングすることによって同時力価測定を実施する。同時力価プレート（concomitant titer plate）を37℃で一晩インキュベートする。

7. ディスペンサーに前記懸濁液の残りを装填し、標識した1536-ウェルプレートの各々にウェルにつき4 μ Lを分注する。ディスペンサーがいくつかのウェルに気泡を入れた場合は、プレートを200Xgで1分遠心することによってそれらを除去することができる。

8. アッセイプレートの少なくとも2つのウェルのAD46の位置に、0.5 μ Lの陽性コントロールファージを添加する。この目的のために強力なアミラーゼ陽性ラムダクロンを使用する。配列番号:113又は配列番号:199のラムダバージョンは陽性コントロールとしてよい選択である。

9. アッセイプレートを37℃で一晩、加湿（95%以上）インキュベーターでインキュベートする。

【0254】

2日目

1. 同時力価プレートのpfuを数え、ウェル当たりの平均播種密度（pfu/ウェルとして）を決定する。

2. 下記のように、各ライブラリースクリーニングの少なくとも2枚のプレートをピンツールリングする：

a) 2枚の宿主ローンプレートをピンツールリングのための表面として用意する：250 μ LのOD1宿主細胞を2mLの2%赤色デンプンと混合し、9mLのトップ寒天と一緒に150mmのNZYプレートにプレーティングする。プレート全体に均等な赤色色調を得るために、トップ寒天ができるだけ平らに固化できるように各プレートを保持する。

b) 2回火炎滅菌した1536位置ピンツールを用いて、スクリーニングプレートの少なくとも2つを宿主ローンプレート上に複製する。

c) ピンツールリングを実施したレシピエントプレートを層流フードに蓋を外して約15から30分間静置する（過剰な水分を発散させるため）。

d) 蓋を戻し、37℃で一晩逆さにしてインキュベートする。

【0255】

3. 以下のようにして2XのBODIPYデンプン基質緩衝液を調製する：

a) 4 μ L/ウェルとして全てのスクリーニングプレートのために必要とされる2Xの基質緩衝液の総体積を計算し（ディスペンサーのために必要な一切の余分なデッドスペース容積を含む）、使用するディスペンサーとして適切な容器に前記の量のCAPS（100mM、pH10.4）を計り入れる。

b) BODIPYデンプンの十分な0.5mg試験管を取り出し、必要な体積の2X基質緩衝液（上記工程aで計算）を最終濃度20–30 μ g/mLで作製する。

c) 頻繁にヴォルテックス攪拌しながら0.5mg試験管の各々を50 μ LのDMSO中で室温で

10

20

30

40

50

溶解し、遮光する。前記溶解のために15分以上を要するが、BODIPYデンプンのいくつかの製造ロットは他のものよりも良好に溶解する。

d) 50 μ LのCAPS緩衝液 (100mM、pH10.4) を各管に添加し、ヴォルテックス攪拌により混合する。

e) 全ての管の内容物をプールし、微量遠心器の最大速度で1分遠心して未溶解凝集物を全て除去する。

f) 工程 a) で計算した100mMのCAPS緩衝液の残りに前記上清を添加する。

g) フォイルで覆うことにより2Xの基質緩衝液を遮光する。

【0256】

4. プレート及び基質緩衝液を自動化室に持ち込み、ロボットを以下のパラメーターを用いてプログラムする：

a) ウェル当たり4 μ Lの基質緩衝液を分注する；

b) 基質投入後1時間で1回目の読み取り、9時間で2回目の読み取り、17時間で3回目の読み取り、読み取りの間は37℃でインキュベーション；

c) 励起フィルター：485nm、照射フィルター：535nm；

d) 蛍光分光計のゲインを70に設定するか、又は光学ゲインを調製した2X基質緩衝液バッチのために設定する；

e) 使用インキュベーターでアッセイプレートが遮光されていることを確認する。

【0257】

3日目

1. 関連するアッセイプレートのウェルに対応する全ての位置の細菌ローンの透明化について、ピンツールングを実施したプレートをチェックする。さらにまた、ピン位置の全てで赤色デンプン内の透明化についてもチェックする。陽性コントロールを含むプレートがピンツールングに用いられた場合、大きな透明化ゾーンが赤色の背景に認められるであろう。赤色デンプン中に透明化ゾーンを形成する夾雑物にも注意されたい（実施例7の終わりに記載した“赤色デンプン中に透明化ゾーンを形成する夾雑物”の注釈も参照されたい）。

2. 前記ロボットコンピュータによって作成されるデータファイルから得られた推定的ヒットを特定する。エンジニアリング製のKANALプログラムはデータの解析を容易にする。経験に基づく方法として、推定的ヒットの特徴は、背景より少なくとも1.5倍のシグナルの強さを有するウェルとされる。

3. 各推定的ヒットについて、ウェルから2 μ Lを取り出し、500 μ LのSM緩衝液及び50 μ LのCHCl₃を含む管に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合し、4℃で保存する。この溶液を以下では4e-3ストックと称する。原本のスクリーニングプレートは、少なくとも分析(breakout)が完了するまで4℃で保存し、遮光されねばならない。

【0258】

これは推定的ヒットを取り出す推奨方法である。BODIPYデンプンでの活性を確認できるのは液相アッセイである。また別には、推定的ヒットは、各ヒットにつき2000から3000pfuを透明化ゾーンについて調べることができるように赤色デンプンを含む固相プレートで直接プレーティングすることができる。しかしながら、赤色デンプン上で透明化ゾーンを観察できないことは、必ずしも推定的ヒットが擬陽性であることを示しているわけではない。その場合は、最初に特定された様式（すなわち、基質としてBODIPYデンプンを用いる液相）を用いてアッセイする必要があるであろう。さらにまた、非常に弱い陽性は下記に詳述する方法を用いてより簡単に同定される。

1日目

1. 50mLの滅菌円錐管に0.5mLのOD5宿主細胞及び45.5mLのNZYを混合する。前記を宿主-培地懸濁液と称する。

2. 解析すべき各推定的ヒットについて、宿主-培地懸濁液の1mLを3本の滅菌した微量遠心管のそれぞれに部分採取する。

3. 12チャンネルのピペットマンをアリコットサイズ20 μ L及びアリコット数2Xでマル

チディスペンスモードに設定する。前記ピペットマンに清浄な滅菌チップ一式を装填する。

4. 約1mLの宿主-培地懸濁液を新しい滅菌溶液皿に注ぎ、マルチチャンネルピペットマンに装填する。

5. 黒色の384ウェルプレートの最後の列（列P）（12チャンネルX2=24ウェル）に20 μ L/ウェルを分注する。この列は後でコントロールとして用いられる。

6. 溶液皿の表面にチップを触れさせ、さらにピペットマンのRESETボタンを押し下げることによりチップ内の残留液を排出させる。チップの汚染を防ぐようにしつつピペットマンを下に下ろす。この時点でチップを交換する必要はない。

7. 溶液跳ねによる汚染を避けるために注意しながら、皿内の残留液を（ビーカーのような）廃棄用容器に注ぐ。

8. 解析すべき第一の推定物について、4e-3ストック（アミラーゼのためのラムダマイクロタイタースクリーニングの2日目を参照されたい）の111 μ Lを採り、前記を宿主-培地懸濁液（工程2）の1mLを含む3本の管のセットの第一に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合する。これは希釈Aである。

9. 希釈Aの111 μ Lを採り、前記セットの次の管に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合する。これは希釈Bである。

10. 希釈Bの111 μ Lを採り、前記セットの最後の管に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合する。これは希釈Cである。今や3つのファージ希釈物があり、各々の濃度は10倍ずつ異なっているはずである。

11. 希釈C（3サンプルで最も希釈されたもの）の内容物を溶液皿に注ぎ、マルチチャンネルピペットマンに充填する。

12. 384ウェルプレートの第一の列（12チャンネルX2=24ウェル）に20 μ L/ウェルを分注する。

13. 溶液皿の表面にチップを触れさせ、さらにピペットマンのRESETボタンを押し下げることによりチップ内の残留液を排出させる。チップの汚染を防ぐようにしてピペットマンを下に下ろす。この時点でチップを交換する必要はない。

14. 上記に記載したように前記皿を空にする。

15. 希釈Bの内容物を同じ皿に注ぎ、マルチチャンネルピペットマンに装填する。

16. 384ウェルプレートの第二の列に20 μ L/ウェルを分注する。

17. 工程13から16を同様に実施して、希釈Aをプレートの第三の列に分注する。

18. 3つの希釈の全てをプレートの最初の3列に並べた後、全てのチップ及び溶液皿をバイオハザード廃棄物容器に廃棄する。

19. ピペットマンに清浄な滅菌チップ一式を装着し、新しい滅菌溶液皿を開ける。

20. プレートの残りの列を0列まで用いて、残りの推定的ヒットについて工程8-19を繰り返す。5つの推定的ヒットを1枚の384ウェルプレートで解析することができ、最後の列（列P）はコントロールのために確保される。

21. 別個のウェルに各コントロール0.5 μ Lを添加する。好ましくは活性範囲を含む、少なくとも2つから3つの別個のコントロールを用いる。

22. アッセイプレートを加湿（95%以上）インキュベーターで一晩インキュベートする。

【0259】

2日目

1. 全ての出現プレート(breakout plate)を赤色デンブンを含む宿主ローン上に、“アミラーゼのためのラムダマイクロタイタースクリーニング”の2日目で述べた方法と同じ方法（384位置ピンツールを用いる点を除く）を用いてピンツールリングする。

2. 以下のようにして2XのBODIPYデンブン基質緩衝液を調製する：

a) 20 μ L/ウェルとして全ての出現プレートのために必要とされる2Xの基質緩衝液溶液の総体積を計算し（ディスペンサーのために必要な一切の余分なデッドスペース容積を含む）、使用するディスペンサーとして適切な容器に前記の量のCAPS（100mM、pH10.4

10

20

30

40

50

）を計り入れる。

b) BODIPYデンブンの十分な0.5mg試験管を回収し、必要な体積の2X基質緩衝液（上記工程 a で計算）を最終濃度20–30 $\mu\text{g/mL}$ で作製する。

c) 頻繁にヴォルテックス攪拌しながら0.5mg管の各々を50 μL のDMSO中で室温で溶解し、遮光する。前記のために15分以上を要するが、BODIPYデンブンのいくつかの製造ロットは他のものよりも良好に溶解する。

d) 50 μL のCAPS緩衝液（100mM、pH10.4）を各管に添加し、ヴォルテックス攪拌により混合する。

e) 全ての管の内容物をプールし、微量遠心器の最大速度で1分遠心して未溶解凝集物を全て除去する。

f) 工程 a) で計算した100mMのCAPS緩衝液の残りに前記上清を添加する。

g) フォイルで覆うことにより2Xの基質緩衝液を遮光する。

【0260】

3. 全ての出現プレートに20 μL /ウェルを分注する。

4. 全てのプレートをアルミ箔で覆い、2から6時間室温でインキュベートする。

5. 各プレートを以下のように設定した蛍光分光計で読み取る：

a) 蛍光の読み（励起フィルター：485nm、照射フィルター：535nm）

b) プレートの指定：384ウェル黒

c) 上から読み取る

d) 最適ゲイン

e) フラッシュの数：3

6. 得られたエクセルスプレッドシートで、各推定的ヒットの3つの列を別々のグラフに表し、活性をチェックする。陽性コントロールは背景を超えるシグナルを生じたことを確認する。

7. ウェルのうち本物のシグナルを有するように見える各推定物について、以下のように陽性ウェルからサンプルを採取する：

a) 最も高い初期希釈を表す列から陽性ウェルを選別する。

b) 前記ウェルから2 μL を500 μL のSM及び50 μL の CHCl_3 を含む管に移す。これを出現ストックと称する。

c) 4°Cで保存する。

8. 先に述べた方法を用い、各出現ストックの約10 μL を、赤色寒天を用いて150mmNZYプレートにプレーティングする。目的は、いくつかの（少なくとも20）よく分散したプラークを得て、そこから単離物をくりぬくためである。

【0261】

3日目

1. 関連するアッセイプレートのウェルに対応する細菌ローン中の透明化の認容できる発生について、ピンツールリングを実施したプレートをチェックする。さらにまた、陽性コントロール及び調べた全ての推定物において赤色デンブンの透明化についてもチェックする。赤色デンブン中に透明化ゾーンを形成する夾雑物にも注意されたい（下記を参照されたい）。

2. 出現ストックの希釈を含む固相プレートから、いくつかの単離プラークをくりぬき、その各々を、 CHCl_3 （50 μL ）を含む500 μL のSM緩衝液に添加する。これを単離物ストックと称する。

3. 続いて上記の方法を用いて単離物ストックを個々にBODIPYデンブンの上で調べることができる。この工程は、工程2でくりぬいたプラークが赤色デンブンの背景に透明化ゾーンを生じた場合は省略することができる。

【0262】

切り出し

1日目

1. 200 μL のOD1 XL1-Blue MRF' 宿主、100 μL のラムダ単離物ストック及び1 μL のExAs

10

20

30

40

50

sistファージストックをファルコン2059管で混合する。

2. 37℃のシェーカーで15分インキュベートする。
3. 3 mLのNZY培地を添加する。
4. 30℃のシェーカーで一晩インキュベートする。

2日目

1. 切り出し管を70℃20分加熱する。
 2. 1000Xgで10分遠心する。
 3. 50 μ Lの上清を200 μ LのEXP505 OD1宿主とファルコン2059管で混合する。
 4. 37℃のシェーカーで30-45分インキュベートする。
 5. 300 μ LのSOB培地を添加する。
 6. 37℃のシェーカーで30-45分インキュベートする。
 7. 滅菌ガラスビーズを用いて大きなLB_{Kan50}プレート上に50 μ Lをプレーティングする。前記プレートが“乾燥”している場合は、更にSOB培地を添加し細胞の分散を助けることができる。
 8. プレートを30℃で少なくとも24時間インキュベートする。
 9. 配列決定及び／又はRFLPのために単離物を培養する。
- 30℃での増殖はプラスミドのコピー数を減少させ、いくつかのアミラーゼクローンの明かな毒性を緩和するために用いられる。

【0263】

赤色デンプン中に透明化ゾーンを形成する夾雑物

固形培地上で赤色デンプンを用いてアミラーゼ活性についてファージをアッセイする場合、赤色デンプン内に透明化ゾーンを形成する夾雑コロニー形成単位(cfu)が見られることは一般的である。ピンツールングを実施したプレートでは、アミラーゼ陽性ファージクロンをこれら夾雑物と、それらが特定のウェルの位置と関連しているときは常に区別することが重要である。夾雑微生物の供給源はおそらく2%赤色デンプンストック溶液である(これは調製後オートクレーブ又はろ過によって滅菌することができない)。それらは、赤色デンプンを代謝することによって生存する日和見微生物であると考えられる。これら夾雑物を減少させるために、2%赤色デンプン溶液を作製するときは無菌技術を用い、4℃又は氷上で前記ストックを保存する。

【実施例8】

【0264】

実施例8

バイオインフォマティクス解析

以下の実施例ではあるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法(例えばバイオインフォマティクス解析による)を述べる。

最初のバイオインフォマティクス解析を公知の超好熱性 α -アミラーゼ配列を用いて実施した。図14aは配列アラインメントを示している(前記配列のいくつかはNCBIデータベースに寄託された)。この解析によって、(そのシグナル配列を欠く)完全な遺伝子のPCRのための縮退プライマーを設計し(図14a参照)、おそらく新規であろう完全長 α -アミラーゼをライブラリーから得ることができる可能性が明らかにされた。

以下のライブラリーをPCRによってゲノムDNAからスクリーニングした。

【0265】

表6

ライブラリー#	名称	PCR陽性	サブクローン化
5	A. lithotropicus (A. リソトロピカス)	No	
13	Pyrodictium occultum (ピロジクチウム・オクルツム)	No	
17	Pyrodictium TAG11 (ピロジクチウムTAG11)	No	Yes
113	深海富裕物	Yes	Yes
170	深海富裕物	Yes	Yes
198	Archaeoglobus (アルカエグロブス)	No	
206	Acidianus sp (アシジアヌスsp)	No	
453	アイスランド混合富裕物	No	
455	アイスランド混合富裕物	Yes	Yes

10

【0266】

図14bは同定された配列のアラインメントを示し、表7（図18に示されている）はそれらの相対的パーセント同一性を表示している。

20

アミノ酸同一性は約85%から98%同一性の範囲である。したがって、これらの配列は本明細書で述べるように遺伝子シャッフリングで有用である。

図14cは上記の対応するポリペプチド配列の核酸のアラインメントを示している。発現ベクターpSE420及び宿主細胞株XL1-Blueでのこれらアミラーゼの発現は、1703及び1706はアミラーゼ活性を有することを示した。

【実施例9】

【0267】

実施例9

ライブラリー63GP-1アルファアミラーゼの特性決定、最適pH及び比活性の決定

以下の実施例ではあるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法（例えばαアミラーゼ活性のpH最適条件及び比活性の決定による）を述べる。

30

最初の実験では、テルモコッカス（Thermococcus）由来の配列番号:81は、トウモロコシの湿式製粉のためのデンプン液化及び織物の脱サイズの両方で有効であることが示された。この酵素は4.5から5.0の至適pHを有する。この低いpHでは、カルシウムをほとんど又は全く用いないことが可能であり、このことは全体的な操作コスト及び副生成物の形成を減少させる。さらにまた、この低いpHでは、化学物質の使用及びイオン交換ロードが減少する。工業標準物のB.リケニフォルミスのアミラーゼは、熱安定性及び至適pHの両方で最適に少し届かない。63GP-1アミラーゼは、B.リケニフォルミスのアミラーゼと比較してより高い適用比活性を有し、したがって1トンのデンプンの加水分解のために、はるかに少ない酵素しか必要としない（20倍少ない酵素を用いることができる）。

40

デンプン加水分解の最適pHは、50 μLのGP-1（0.35U/mL）を100mLの1%可溶性デンプン溶液と95℃で30分反応させて（0.0175U/gデンプン）決定した。液化デンプン溶液中で生じた還元末端は、本明細書に記載するネオキュプロインアッセイによって測定した。トウモロコシデンプンの%加水分解は、ネオキュプロインアッセイで精製された糖還元末端の数を測定することによって決定した。緩衝溶液70g（pH4-7）を秤量し、100ppmのカルシウムを添加した。トウモロコシデンプン30グラムを緩衝溶液に混合し、デンプンスラリーを形成させた。酵素を添加し、容器に封をし、加熱初速6℃/分で95℃で30分インキュベートした。反応ビーカーから1mLのサンプルを抽出し、ネオキュプロインアッセイによって解析した。GP-1のための最適条件はpH4.5から5であり、一方、市販のB.リケニフォルミスのアミラーゼは約pH6.0で最適に反応した。

50

【実施例 10】

【0268】

実施例 10

アミラーゼ連結再アッセブリー

以下の実施例では、特にあるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法（例えば下記に記載するアッセイによる）を述べる。

RBB-デンプンを使用するアッセイ：75 μ L の RBB-デンプン基質（50mM の NaAc 緩衝液中の 1 % の RBB-不溶性トウモロコシデンプン、pH4.5）を新しい 96 ウェルプレート（V 底）の各ウェルに添加した。5 マイクロリットルの酵素溶解物を、基質を含む各ウェルにバイオメック（Biomek）又はザイマーク（Zymark）を用いて移した。アルミのシーリングテープで前記プレートに封をし、シェーカー上で簡単に振盪した。前記プレートを 90℃ で 30 分インキュベートし、続いて室温に約 5 から 10 分冷却した。100 % エタノールの 100 μ L を各ウェルに添加し、プレートに封をし、シェーカー上で簡単に振盪した。続いて前記プレートを卓上遠心器を用いて 4000rpm で 20 分遠心した。100 μ L の上清をバイオメックにより新しい 96 ウェルプレート（平底）に移し、OD₅₉₅ を読み取った。コントロール：配列番号:81、配列番号:77、配列番号:79。

FITC-デンプンを用いるアッセイ：50 μ L の基質（100mM の NaAc 緩衝液中の 0.01 % の FITC-デンプン、pH4.5）を新しい 384 ウェルプレートの各ウェルに添加した。5 μ L の酵素溶解物を基質を含む各ウェルに移し、前記プレートを室温で一晩インキュベートした。各ウェルについて基質の分極変化、励起 485nm、照射 535nm を読み取った。コントロール：配列番号:81、配列番号:77、配列番号:79。好ましくは全てのアッセイについて 96 ウェルプレートが用いられる。

新規な活性クロンの確認：スクリーニングで陽性の各クロンを増殖させ、標準的なプロトコルで誘導した。増殖（すなわち時間経過に対する細胞密度）、細胞当たりの活性（RBB-デンプンアッセイ及び液化アッセイ）、発現（タンパク質ゲル）及びタンパク質の可溶性（顕微鏡分析による）について各クロンを調べた。確認済みの新規な優れたクロンを発酵のために移す。

【実施例 11】

【0269】

実施例 11

デンプン液化の例示的なプロトコル及び測定結果

以下の実施例では、本発明の選択したアミラーゼを用いてデンプンを液化する例示的なプロトコルを述べる。

配列番号:10 及び配列番号:4 に示す配列を有するアミラーゼは、下記に示す反応条件で pH4.5 又は 6.5 でデンプン液化活性を示した。

反応条件：100mM の PO₄（pH6.5）、1 %（w/w）の液化デンプン（55℃ で DE12）。活性を証明するために TLC 及び HPLC アッセイを実施した。両アッセイのデータは前記クロンが活性を有することを示した。

配列番号:4 及び配列番号:10 に示す配列を有するアミラーゼの pH プロファイルは、pH3.0 から 6.5 のリン酸緩衝液を用いて 55℃ で調べた。観察可能な加水分解量から、視覚的に前記クロンは、上記に示した反応条件で一定の pH 値において他の pH 値の場合よりも高い活性を有するといえることができる。

配列番号:4：pH5.0 から 6.5 で活性を有する；

配列番号:10：pH4.5 から 6.5 で活性を有する。

【0270】

pH6.5 での液化デンプンの糖化のための例示的なプロトコル：

－液化されるデンプンの pH を糖化が実施される pH に調整する。糖化の前に pH を 6.5 に調整することができるように 100mM のリン酸ナトリウム塩を添加した 100mM の酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）中でデンプンを液化する。

－5 グラムの液化デンプンサンプルを風袋を差し引いたビンに計り入れる。

ー100グラムの液化デンプン当たり、0.04% (w/w) のオブチデキス (Optidex) L-400又は約400mLの1 - 10希釈のオブチデキスL-400ストックを用いる。

ー1 - 10希釈のオブチデキスL-400ストック400mLに含まれるオブチデキスL-400の量 (ミリグラム) を計算する。次にオブチデキスL-400と同じ濃度の酵素を提供するために必要な溶解物の容積を計算する。

ーデンプンサンプルの液化のために酵素を添加し、所望の温度 (50℃) でインキュベートする。18時間後DEを決定し、HPLC分析のためのサンプルを調製する。

【0271】

例示的なDEの決定：

例示的なネオキュプロイン (Neocuproine) アッセイ：

100mLのサンプルを2.0mLのネオキュプロイン溶液A (40g/Lの炭酸ナトリウム、16g/Lのグリシン、0.45g/Lの硫酸銅) に添加した。これに2.0mLのネオキュプロイン溶液B (1.2g/Lのネオキュプロインヒドロクロリド (Sigma N-1626)) を添加した。管を混合し、沸騰水浴中で12分加熱し、冷却し、DI水で10mLの容積に希釈し、分光光度計を用いて450nmでODを読みとる。同時に実施した0.2mg/mLのグルコース標準物の反応からサンプル中のグルコース当量 (glucose equivalent) を外挿により得た。

例示的なHPLC分析：

炭水化物糖化プロファイルは、HPLC (シルバー形のBio-Rad Aminex HPX-87Aカラム、80℃) を用いて屈折率検出によって測定した。移動相はろ過ミリポア水で流速0.7mL/分を用いた。糖化サンプルは酸性DI水 (200mLのDI水に6MのHClを5滴) で1 - 10に希釈し、続いて0.45mmの円筒フィルターでろ過した。注入容積は20 μ Lである。

例示的なTLC：

反応生成物を1時間ごとに取り出し、TLCプレート上にスポットし、乾燥させた。続いて前記プレートを水：イソプロパノール (10：90) で展開し、ヴァニリン染色又はCAM染色で可視化し、続いて加熱して還元可能糖を示した。活性が観察される場合は、液化デンプンは部分的にグルコースに加水分解された。

【実施例12】

【0272】

実施例12

本発明のアミラーゼを用いるデンプン液化

以下の実施例では、本発明のアミラーゼを用いてデンプンを液化する本発明の例示的な方法を述べる。

アミラーゼ濃縮物は、発酵ブロスから加熱処理、細胞洗浄、ミクロろ過及び限外ろ過を用いたアルカリ性抽出によって調製された (総収量48%)。UF濃縮物を酢酸で中和し、30%グリセロールでpH4.5で調合した。スラリー調合物の活性レベルは市販製品に相当した (120U1/g-0.5kg/トンデンプン)。

標準的アミラーゼ活性アッセイ：

950 μ LのMOPS (50mM、pH7.0) (5mMのPNP- α -D-ヘキサ-(1 $\rightarrow$ 4)-グルコピラノシドを含む) を入れた1mLキュベットを、80℃に予熱したバックマンDU-7400分光光度計のペルティエ (Peltier) 温度制御装置に静置した。前記分光光度計の405nmでのブランクを決定し、50 μ Lの酵素溶液を前記キュベットに添加してよく混合し、OD₄₀₅の増加を1分間隔でモニターした。950mLのMOPS (50mM) 中の1 μ mol/mLのPNPの50 μ LのpH7.0、80℃でのOD_{405nm}反応から、 Δ OD_{405nm/min}速度を μ mol/分の標準単位に変換する。熱安定性 α -アミラーゼの1標準ダイヴァーサ単位 (Diversa unit of thermostable alpha amylase, DTAA) は、アッセイの規定条件下でpNPを1 μ mol/mL/分で遊離を触媒する酵素量に等しい。

【0273】

標準的グルコアミラーゼ活性アッセイ：

950 μ LのMOPS (50mM、pH7.0) (5mMのpNP- α -D-グルコピラノシドを含む) を入れた1mLキュベットを、60℃に予熱したバックマンDU-7400分光光度計のペルティエ温度制御装置に静置した。前記分光光度計の405nmでのブランクを決定し、50 μ Lの酵素溶液を前記キュ

10

20

30

40

50

ベットに添加してよく混合し、OD₄₀₅の増加を1分間隔でモニターした。950mLのMOPS (50mM) 中の1 μ mol/mLのPNPの50 μ LのpH7.0、60℃でのOD_{405nm}反応から、 Δ OD_{405nm/min}速度を μ mol/分の標準単位に変換する。グルコアミラーゼの1標準ダイヴァーサ単位 (Diversa unit of glucoamylase, DGA) は、前記アッセイの規定条件下でpNPを1 μ mol/mL/分で遊離を触媒する酵素量に等しい。

デキストロース当量(Dextrose Equivalent)の測定：

ネオキュプロインの方法を用いてDEを測定した。選択したサンプルを本発明の方法及びGPCフェーリング (Fehlings) 法を用いるGPC分析の両方法によって測定した。

ネオキュプロインアッセイ：

100 μ Lのサンプルを2.0mLのネオキュプロイン溶液A (40g/Lの炭酸ナトリウム、16g/Lのグリシン、0.45g/Lの硫酸銅) に添加した。これに2.0mLのネオキュプロイン溶液B (1.2g/Lのネオキュプロインヒドロクロリド (Sigma N-1626)) を添加した。管を混合し、沸騰水浴中で12分加熱し、冷却し、DI水で10mLの容積に希釈し、分光光度計を用いて450nmでODを読みとる。同時に実施した0.2mg/mLのグルコース標準物の反応からサンプル中のグルコース当量 (glucose equivalent) を外挿により決定した。

デンプンサンプルを約1から16にDIで希釈し、正確な希釈を記録する。10mLの希釈サンプルを20mLのDI水に添加した。10mLフェーリング溶液A及びBを前記希釈デンプンに添加した。サンプルを3分間煮沸し、さらに氷上で冷却した。30%のKIの10mL及び6NのH₂SO₄の10mLを添加した。前記溶液を0.1Nのチオ硫酸ナトリウムで滴定した。滴定体積を記録しDEの計算に用いる。

【0274】

残留デンプンの測定：

糖化後のサンプルを残留デンプンについてスターレー (Staley) ヨウ素法を用いて調べた。

20グラムのサンプルを大きな秤量皿に計り入れた。45 μ Lのヨウ素溶液を前記秤量皿に添加し、さらにデンプン溶液をよく混合した。暗青色はデンプンの存在を示し、淡青緑色は微量のデンプン、淡緑色は痕跡量のデンプンの存在を示し、さらに黄赤色はデンプンが存在しないことを示す。ヨウ素溶液は、21.25gのヨウ素及び40.0gのヨウ化カリウムを1Lの水に溶解して調製される。

オリゴ糖プロファイル：

炭水化物液化及び糖化プロファイルを、HPLC (カルシウム形のBio-Rad Aminex HPX-87C カラム-80℃) を用いて屈折率検出によって測定した。

ゲル透過クロマトグラフィー：

分子量分布を屈折率による物質検出を用いてPLアクアゲル-OHカラムでのクロマトグラフィーによって決定した (Waters Model 2410)。ヴィスコテック (Viscotek) モデルT60 検出装置を連続的粘度及び光散乱測定に用いた。

キャピラリー電気泳動：

バックマンコールターP/ACE MDQ糖タンパク質システム-融合シリカキャピラリー上でのAPTS誘導オリゴ糖の分離-レーザー誘導蛍光による検出。

一次液化：

GPCプロセスから直接送られたラインスターチをポンプで60Lのフィードタンクに押し出す (この記タンクでは液化の前にpH、DS (乾燥固形物) 及びカルシウムレベルを調整することができる)。アミラーゼをスラリーに添加する。32%DSスラリーを陽圧押しポンプでジェット (加圧) 混合チャンバーへ0.7L/分で押し出す (このチャンバーではデンプンスラリーは蒸気注入によって瞬時に100℃より高く加熱される)。ゼラチン化され部分的に液化したデンプンはパイプのネットワーク (なお加圧下にある) を通って押し出され、ある温度での所望の滞在時間 (5分) が与えられる。圧をフラッシュタンクに抜き、サンプルを採取する。サンプルを二重に採取する。

二次液化：

液化デンプンを1Lのガラスビンに採取し、95℃の水浴に90分保持した。

【0275】

糖化：

液化デンプンを60℃に冷却し、pHを4.5に調整し、サンプルをグルコアミラーゼで処理した。糖化の進行はHPLCで時間を追ってモニターした。

糖化：

各アミラーゼで生成された液化シロップを、90分の二次液化直後に6NのHClで約pH2.5に調整して、残留する一切のアミラーゼを不活化した。続いて前記シロップをpH4.5に調整し、60℃の水浴に置き、3レベルのグルコアミラーゼで糖化した。糖化の程度は18-88時間の時点でHPLCによりモニターした。

液化シロップは標準用量（ダブル強度のグルコアミラーゼの0.04%）及び2つのより低用量（50%及び20%）を用いて糖化し、糖化の進行における一切の相違をモニターした。

【0276】

糖化の進行：時間に対するデキストロースの生成%：0.04%グルコアミラーゼ

アミラーゼ	18時間	24時間	40時間	44時間	88時間
市販物	70.2	78.4	86.1	86.7	94.2
配列番号:437	79	88.6	92.5	92.8	95.3
配列番号:6	74.1	85.6	91.9	91.6	94.8

【0277】

糖化の進行：時間に対するデキストロースの生成%：0.02%グルコアミラーゼ

アミラーゼ	18時間	24時間	40時間	44時間	88時間
B. リケニフォルミスのアミラーゼ	54.5	66.7	76.1	77.2	90.9
配列番号:437	60.1	72	84.8	85.3	93.6
配列番号:6	57.1	70	84	86.5	92.5

【0278】

糖化後の糖プロフィール：

これらの実験及び以前の全ての糖化実験で、本発明のアミラーゼ及びB. リケニフォルミスのアミラーゼによる糖化後に達成された液化シロップ中の最終グルコースレベルは本質的に同一である。DP2（マルトース）レベルもまた同様である。これらの大きなフラグメントはグルコアミラーゼにとって貧弱な基質であり、ゆっくりとより小さなフラグメントに変換され、最終的にグルコースに変換される。

【0279】

	グルコース	DP2	DP3	>DP7
配列番号:437	95.25	2.39	1.13	0.91
市販物	94.16	2.10	0.39	2.91
配列番号:6	94.77	2.27	1.48	0.82

【0280】

分子量分布：

本発明の例示的なアミラーゼ（配列番号:6及び配列番号:437）並びに市販のバチルス・リケニフォルミス及びバチルス・ステアロテルモフィルスのアミラーゼによってDE12及び18に液化されたシロップの分子量分布を屈折率による検出を用いゲル透過性クロマトグラフィーによって測定した。B. リケニフォルミス及びB. ステアロテルモフィルスの両アミラーゼは二相性分布を生じ、最初のピークは2000に集中し、第二のピークは160,000の範囲を超えて広がる肩を有しながら32,000に集中した。小さい方の分子量ピークはサンプルの総量の約60%を占める。本発明の例示的なアミラーゼは2000で単一ピークを示し、30,000

10

20

30

40

50

を超えるものは非常にわずかであった。

HPLC：

本発明の例示的なアミラーゼ（配列番号:6及び配列番号:437）並びに市販のパチルス・リケニフォルミス及びパチルス・ステアロテルモフィルスのアミラーゼによって生成されたDE12及び18シロップをHPLCによって分析した。両技術は、各クラスのアミラーゼに特徴的なフィンガープリントを生じ、オリゴ糖パターンは、B.リケニフォルミスのアミラーゼ、B.ステアロテルモフィルスのアミラーゼ、本発明の例示的なアミラーゼについて異なる。本発明の液化シロップ（例えば本発明の方法によって製造されたシロップ及び／又は本発明の酵素によって製造されたシロップ）は、オリゴ糖内により大きな分枝を有する証拠を示した。HPLCは<DP15の範囲内のオリゴ糖のみを分離でき、より大きなフラグメントはこれらの技術では見ることができない。パチルスのアミラーゼでは、アミロペクチン分画はアミロース分画よりも加水分解される程度は小さい。これら>DP30のアミロペクチンフラグメントは、32,000に集中する高分子量分画に含まれ、結果としてパチルスに液化されたシロップのHPLC分析では分枝の証拠はほとんど認められない。本発明のアミラーゼによる<DP15オリゴ糖はアミロースとアミロペクチンの両方に由来するフラグメントを含む。

【実施例 1 3】

【0 2 8 1】

実施例 1 3

本発明のアミラーゼを用いる酸性条件下でのデンプンの液化

本発明は、本発明のアミラーゼ（酸性条件下、例えばpH約4.0から5.0、例えばpH4.5で活性を有するアミラーゼを含む）を用いてデンプンを液化する方法を提供する。デンプンのグルコースへの変換は、2つの酵素の一連の作用、すなわち本発明の α -アミラーゼによるデンプンの液化（例えば本発明のアミラーゼによる高分子量グルコースポリマーの2から20のグルコース単位、典型的には10から20のデキストロース当量からなるオリゴ糖への加水分解）、続いてグルコアミラーゼ（本発明のグルコアミラーゼであり得る）による糖化によって触媒される。ある特徴では、プロセッシングは、pHが約4.0から4.5のデンプンスラリーを製造するトウモロコシ湿式製粉プラントで実施される。ある特徴では、低pH活性及び安定性を有する α -アミラーゼ（例えば本発明の α -アミラーゼであり得る）を受け入れるために液化の前にpHを例えば5.8から6.0に上昇させる。ある特徴では、本発明のアミラーゼは、pH4.5でデンプンを12から18の範囲のデキストロース当量に液化させることができる。ある特徴では、デンプン1トン当たり約3から6グラムのレベルの本発明の α -アミラーゼを用いることができる。この特徴では、本発明の α -アミラーゼの使用によってデンプンの液化はpH4.5で実施することが可能になる。

ある特徴では、デンプンの液化は、本発明のアミラーゼを用いてpH4.5で105℃5分から95℃90分で実施できる。酵素の量は、液化後の標的DEを12から15に調整するために調節する。ある特徴では、液化デンプンは続いてグルコアミラーゼ（例えばアスペルギルスのグルコアミラーゼ）で約pH4.5で60℃で約48時間糖化される。糖化シロップが少なくとも95%のグルコースを含まない場合、標的液化DEを上昇させ、最終的に95%を超えるグルコースを含む糖化シロップが液化によって製造されるまで糖化を繰り返した。適切な糖化用液化供給原料を製造するために必要なアミラーゼタンパク質はPAGEによって決定した。

【実施例 1 4】

【0 2 8 2】

実施例 1 4

本発明のアミラーゼを用いるデンプン液化

本実施例では、本発明のアミラーゼを用いてデンプンを液化する例示的な方法を述べ、市販のパチルス・リケニフォルミス及びパチルス・ステアロテルモフィルスのアミラーゼに対して、本発明の例示的な酵素（配列番号:6及び配列番号:437（配列番号:436によってコードされる））の液化オリゴ糖パターンの特徴を示す。これらの結果が、糖化の進行及び本発明の酵素及び市販のアミラーゼによってシロップから生成された最終的なデキストロースレベルについて比較される。

3つの市販酵素、ジェネンコア・スペザイム(Genencor Spezyme)AA及び他の2つはいずれも、目標デキストロース当量(DE)の達成のために推奨される用量の2倍以上を必要とした。デキストロース当量(DE)は全還元糖の濃度測定のための工業標準であり、乾燥重量を基準にしてD-グルコースとして計算される。加水分解されていない顆粒デンプンはDEが実質的に0であり、D-グルコースのDEは100と定義される。

これらの結果によって、全てのバチルスアミラーゼに対する“2倍用量”効果が確認され、実験で観察される配列番号:437の用量は、より通常的な条件下で必要とされる値の2倍であろうという提唱に更なる信用を与える。19DEを達成するために計画した“通常の”用量、pH4.5で60から70ユニット/キロデンプンは実験室の液化データと一致する。

【0283】

本発明のアミラーゼによって生成されるオリゴ糖パターンはバチルスのプロファイルとは相違している。バチルスアミラーゼによる分子量分布(光散乱及び粘度による検出を用いるゲル透過性クロマトグラフィー)は二相性で、18DEの場合でさえも非常に大きな分子量レンジ(>300,000)に実質的な分画が存在する。配列番号:437は18DEで均質な分布を示し、20,000より大きな分子は存在しない。この結果は、本発明のシロップ(例えば本発明の方法によって製造されたシロップ又は本発明の酵素を用いて製造されたシロップ)の粘性が低いことと一致する。HPLCによって測定されるDP(重合度)プロファイルもまた作用パターンにおけるこの違いを反映している。

先の実験と同様に本実験では、バチルスシロップに対して本発明の液化シロップのアミラーゼによる糖化後の最終グルコースレベルは両方の場合について同じである。しかしながら、例えばGPC実験の糖化データによって、本発明のアミラーゼの場合の非デキストロース残留物はバチルスアミラーゼのシロップとは相違している。デキストロース及びマルトースレベルは本質的には両者とも同じであるが、本発明のアミラーゼはより高いDP3画分を有するが、“高いもの”の量はバチルスの酵素の場合よりも少ない。液化後に高分子量フラグメントが存在しないことと一致し、本発明の糖化後のシロップは>DP7の分画の含有量がより少ない。

【0284】

	グルコース	DP2	DP3	>DP7
配列番号:2	95.25	2.39	1.13	0.91
市販物	94.16	2.10	0.39	2.91
配列番号:6	94.77	2.27	1.48	0.82

【0285】

配列番号:437アミラーゼ濃縮物は、発酵ブロスから加熱処理、細胞洗浄、ミクロろ過及び限外ろ過を用いたアルカリ性抽出によって調製した(総収量48%)。UF濃縮物を酢酸で中和し、30%グリセロールでpH4.5で調合した。スラリー調合物の活性レベルは市販製品に相当した(120U/g-0.5kg/トンデンプン)。

【実施例15】

【0286】

実施例15

洗濯及び自動皿洗いに応用されるアルカリアミラーゼ

ある特徴では、本発明は、本発明のアミラーゼ(アルカリ性条件下で活性を有するアミラーゼを含む)を含む洗剤、並びに前記洗剤を製造及び使用方法を提供する。

アルカリ性で安定な本発明の3つの酵素を、洗濯及び自動皿洗い(ADW)での使用で重要な特性に関して市販の基準酵素と比較し、優れた性能が明らかにされた：

—配列番号:212(配列番号:211によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼは、デンプン被覆スライドによるADW洗浄試験で精製された市販の基準酵素よりも性能が優れており、過酸化水素に対して非常に耐性があった。

—配列番号:210(配列番号:209によってコードされる)及び配列番号:212(配列番号:2

10

20

30

40

50

11によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼは、洗濯／ADW処方存在下で可溶性基質を用いたとき精製された市販の基準酵素よりも性能が優れていた。

－キレート剤存在下で、配列番号:439(配列番号:438によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼは非常に安定であり、さらに配列番号:441(配列番号:440によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼは中等度に安定であった。

－配列番号:210(配列番号:209によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼ及び配列番号:441(配列番号:440によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼは、pH10から11の範囲の非常にアルカリ性の至適pHを有する。配列番号:445(配列番号:444によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼ及び配列番号:439(配列番号:438によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼは、8周辺の至適pHを有するが、一方pH10で顕著な活性を維持する。

－配列番号:441(配列番号:440によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼ及び配列番号:439(配列番号:438によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼは好熱性で、最高の性能を65℃から70℃で示す。

生化学的特性決定

本発明の5つのアミラーゼ(3つはアルカリ性の至適pHを有する)の特性を至適pH及び至適温度について表1に記載したように調べた。“配列番号:209、210”は、配列番号:209によってコードされる配列番号:110に示す配列を有するアミラーゼを意味する、etc。

【0287】

アミラーゼ	至適pH	至適温度(℃)*
配列番号:209、210	11	55
配列番号:211、212	10	50
配列番号:440、441	10	70
配列番号:444、445	8	40
配列番号:438、439	8	65

【0288】

至適温度は、配列番号:210(配列番号:209によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼ(“配列番号:209、210”)；配列番号:211、212；及び配列番号:440、441についてはpH10で、配列番号:444、445及び配列番号:438、439についてはpH8で決定した。

市販の洗濯／ADW製品で従来用いられている基準酵素と比較した本発明のアミラーゼのpHプロファイルは図1に提示されている。本発明の酵素はいずれもpH8から10の間で最適活性を示し、一方、市販の基準酵素は8より低いpHでもっとも活性が高く、pH10ではわずかに残存活性であった。図19は、検査を実施した本発明のアミラーゼ及び市販の基準酵素のpHプロファイルを示している。精製タンパク質を可溶性基質を含む表示のpHを有する緩衝液に添加し、活性を測定した。初速を10分間計算し、最大速度の百分率に変換した。

本発明の酵素の温度プロファイルは図20に提示されている。3つは45℃から55℃の温度でもっとも活性が高いが、配列番号:441(配列番号:440によってコードされる)に記載の配列を有するアミラーゼ(“配列番号:440、441”)及び配列番号:438、439は60℃から70℃で最適活性を示した。図20は、検査を実施した本発明のアミラーゼの活性の温度プロファイルを示している。精製タンパク質の活性は、pH10(配列番号:209、210；配列番号:211、212；配列番号:440、441)又はpH8で(配列番号:444、445；配列番号:438、439)で表示の温度で測定した。活性は、還元糖アッセイによって、又はBODIPY-デンプンを用いたときは520nm(485nm励起)で蛍光をモニターすることによって測定した。初速を計算し、最大速度の百分率に変換した。

【0289】

実用性試験

検査を実施した本発明のアルカリアミラーゼの洗濯／ADW処方における活性及び安定性、並びに個々の成分との活性及び安定性を評価するために実験を設計した。図21、22及び

23は可溶性デンプン基質を用いた実験の結果を示す。図24は固体基質 - 業界標準デンプン - 被覆スライドを用いた結果を示す。

配列番号:439 (配列番号:438によってコードされる) に記載の配列を有するアミラーゼ (“配列番号:438、439”) はキレート剤EDTAに対して非常に耐性を有し (図21)、配列番号:211、212は過酸化水素に対して顕著な耐性を示した (図22)。対照的に、市販の基準酵素は、本実験条件ではいずれの成分の存在下でも機能を示さなかった。完全な洗濯/ADW処方存在下では、配列番号:209、210及び配列番号:211、212は、市販の基準酵素よりも可溶性基質に対してはるかに強い活性を示した (図23)。

図21は、EDTAの存在下での酵素活性を示す。精製タンパク質を5mMのEDTAの存在下又は非存在下で表示した時間50℃でインキュベートし、その後、残存活性を可溶性基質を用いて測定した。EDTA存在下での活性はキレート剤の非存在下での活性の%として表されている。図22は、過酸化水素の存在下での酵素活性を示す。精製タンパク質を1MのH₂O₂の存在下又は非存在下で表示した時間50℃でインキュベートし、その後、アミラーゼ活性を可溶性デンプンを用いて測定した。過酸化水素存在下での活性はH₂O₂の非存在下での活性の%として表されている。図23は、可溶性基質 (BODIPY-デンプン) を含むADW溶液 (蒸留水、硬化溶液、漂白剤、キレート剤、界面活性剤) 中での酵素活性を示す。精製タンパク質を洗濯/ADW処方の存在下で40℃で可溶性デンプンと反応させた。初速を5分間計算し、タンパク質1ng当たりの蛍光単位 (FU) として表した。

【0290】

可溶性基質による試験から得られた優勢な性能を有するものは、配列番号:210 (配列番号:209によってコードされる) に記載の配列を有するアミラーゼ (“配列番号:209、210”) 及び配列番号:211、212であった。これらのアミラーゼを、配列番号:440、441とともに、デンプン被覆スライドによる工業標準洗浄検査で市販の基準酵素と比較した。これらの実験の結果は図24に提示されている。配列番号:212 (配列番号:211によってコードされる) に記載の配列を有する酵素の性能は、精製された基準酵素よりもこの試験で常に優れていた。ただし製剤化された基準酵素はより良好な性能を示した。市販の基準製剤の特性は不明であるが、精製された基準酵素はウシ血清アルブミン (BSA) の存在下では2倍の活性増加を示した。図24は、デンプン被覆スライドによる洗浄試験の結果を示している。精製タンパク質は、ADW溶液 (蒸留水、水硬化溶液、漂白剤、キレート剤、界面活性剤) の存在下で50℃で30分スライドとともにインキュベートした。デンプンの除去は、スライドの最初の質量に対し酵素処理後の質量低下を比較することによって測定した。

【0291】

例示的なアミラーゼの特性決定の要約

配列番号:212 (配列番号:211によってコードされる) に記載の配列を有するアミラーゼ (“配列番号:211、212”) を、pH11.0及び温度41℃のビオトープから収集された環境ライブラリーから単離した。この遺伝子によってコードされるアミラーゼはファミリーIに属し、公知のデンプン/炭水化物結合ドメインを全く含んでいない。前記タンパク質をC-末端ヒスチジンタグとともに、又はヒスチジンタグなしに、グリコシル化しない宿主又はグリコシル化する宿主で発現させた。これらの宿主/Hisタグ組合せの全てで発現させた酵素は約10の至適pH及び約50℃の至適温度を有している (実験は図19及び20によって示されている)。グリコシル化する宿主でHisタグとともに発現された酵素を図21から24に提示した実験のために用いた。Hisタグの存在は比活性に影響を与えないようであるが、グリコシル化は、グリコシル化されない酵素よりも比活性をわずかに低下させるようである。

【0292】

要約すれば、

—これらの実用性アッセイで最良の性能を有するものは、配列番号:212 (配列番号:211によってコードされる) に記載の配列を有するアミラーゼ (“配列番号:211、212”) であった。

—配列番号:211、212の最適pH及び最適温度は洗濯/ADWへの適用要件に合致し、さらに

配列番号:211、212は適切に処方された場合、市販の基準酵素の性能を超えるはずである。

【実施例 16】

【0293】

実施例 16

熱安定性グルコアミラーゼの同定及び特性決定

以下の実施例では、グルコアミラーゼ活性を有する本発明の例示的な熱安定性アミラーゼの同定及び特性決定を述べる。

核酸の抽出：糸状菌テルモミセス・ラスギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) ATCC200065をジャガイモデキストロース培地 (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ) の液体培養で増殖させた。バイオマスを採集し、高分子量ゲノムDNAをDNEASY(商標)プラントマキシキット (Plant Maxi Kit) (Qiagen, Valencia, CA) を用い標準的プロトコルにより単離した。全RNAもまた、RNEASY(商標)プラントミニキット (Plant Mini Kit) (QiagenA) を用い標準的プロトコルにより単離した。

ライブラリーの構築：テルモミセスのゲノムDNAを制限酵素で部分的に消化し、1から10 kbのフラグメントをゲノムライブラリーの構築のために精製した。このフラグメントをベクター、ラムダザップイクスプレス (Lambda Zap Express(商標)) (Stratagene, San Diego, CA) に連結し、製造元の指示にしたがって感染性ファージにパッケージングした。

【0294】

ライブラリースクリーニング：上記のラムダライブラリーを用いてXL1 Blue MRF'細胞 (Stratagene) にトップ寒天中で感染させた。約50,000pfuのファージをOD₆₀₀=1の細胞600 µLに添加した。前記混合物を水浴中で37°Cで15分インキュベートし、続いて6mLの溶融0.7%トップ寒天に添加し、NZY寒天プレート上にプレーティングした。続いて前記プレートを39°Cで一晩インキュベートした。ナイロンサークル (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) を生じたプラーククロンの上面に置き、ナイロンに付着したファージのいくらかとともに背面を持ち上げた。前記ナイロンを1.5MのNaCl、0.5MのNaOHに2分間、1.5MのNaCl、0.5Mのトリス (pH7.6) に5分間、さらに2XのSSC、0.2Mのトリス (pH7.6) に30秒間沈めた。続いて前記ナイロンフィルターをスタラタジーン (Stratagene) の架橋剤中でUV架橋した。

アスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*) のグルコアミラーゼ遺伝子由来の639bpのPCRフラグメントを、プローブとして使用するためにアスペルギルスのゲノムDNAから作製した。下記プライマーをエキスパンドハイファイデリティPCRキット (Roche) を利用するPCR反応で95°C20秒、55°C30秒及び72°C1分の30サイクルをサーマルサイクラーで用いた：5'-GCGACCTTGATTTCATGGTTGAGCAAC-3' (配列番号:595) 及び5'-CACAATAGAGACGAAGCCATCGGCGAA-3' (配列番号:596)。このPCRフラグメントはアスペルギルスのグルコアミラーゼ遺伝のエクソン1-4を構成する。プライムイットキット (Prime It Kit(商標)) (Stratagene) を製造元の指示にしたがって用い、単離した前記PCRフラグメントを放射性プローブとして調製した。

【0295】

ライブラリーフィルターリフトをハイブリダイゼーションオープン (Robbins) で予備ハイブリダイゼーション溶液 (DIGEasy Hyb(商標), Roche) 中で2時間、42°Cで洗浄した。前記プローブを15mLの新しい予備ハイブリダイゼーション溶液 (DIGEasy Hyb(商標)) に添加し、これを用いて予備ハイブリダイゼーション溶液と交換した。プローブを含むフィルターを45°Cで一晩洗浄した。続いて前記プローブを取り除き、フィルターを2XのSSC、0.1%SDSで1回15分、0.1XのSSC、0.1%SDSで2回各々15分洗浄した。続いてナイロンフィルターをX線フィルムに一晩-80°Cで暴露した。現像後、X線フィルム上のハイブリダイゼーションスポットを用いて最初のプレートのクロンを特定する。寒天プラグをスポットが並んでいたプレートから採取し、SM緩衝液に懸濁してファージを溶液中に放出させた。グルコアミラーゼ遺伝子の全て又は一部分を含むテルモミセスのゲノムフラグメントに対応するいくつかの単離プラークがしたがって単離された。

100 μ Lの単離ファージストックを200 μ LのXL1 Blue MRF'細胞 (Stratagene) 及び1 μ LのExAssist(商標)ヘルパーファージ (Stratagene) に添加した。前記混合物を37°C15分インキュベートし、さらに2XのYT培養液3mLを添加した。続いてこれを振盪しながら37°Cで2.5時間インキュベートした。続いて前記混合物を70°Cで20分間加熱し、さらに氷上で冷却した。100 μ Lの混合物を取り出し、200 μ LのSOLR細胞 (Stratagene) に添加し、37°Cで15分インキュベートした。50 μ LをLBカナマイシン (50 μ g/mL)プレート上に播種し、37°Cで一晩インキュベートした。得られたコロニーはクローン化ゲノムフラグメントをプラスミドpBK-CMV中に含んでいる。

【0296】

配列決定：候補クローンのDNA配列決定は、ビッグダイターミネーターサイクルシーケンシング (BigDye Terminator Cycle Sequencing) ヴァージョン2.0キット(商標) (Applied Biosystems, Foster City, CA) 及び3700DNAアナライザー(商標) (Applied Biosystems) で製造元のプロトコルを用いて実施された。配列番号:587に示される、完全なグルコアミラーゼ遺伝子及びフランキング配列を含む4.1kbの挿入物を有するゲノムクローンが同定された。潜在的イントロンは、アスペルギルス・ニッダーホルムiiのイントロンのためのコンセンサス配列を有するこの配列を比較することによって同定された。テルモミセス・ラヌギノサスのヌクレオチド配列は、それぞれ64bp、61bp、80bp及び57bpの4つのイントロンによって中断された617アミノ酸のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有する。

cDNA合成：プライマー、5'-ATGTTATTCCAACCGACTTTGTGCGC-3' (配列番号:597) 及び5'-TCATCGCCACCAAGAATTCACGGTG-3' (配列番号:598) を、サーモスクリプトrtPCRキット(商標) (Invitrogen) によるcDNA合成反応で製造元のプロトコルにしたがって用いた。合成のための鋳型は、ジャガイモデキストロース培地 (Difco) で増殖させたテルモミセス・ラヌギノサス細胞から単離した全RNAとした。反応から得られた1854bpフラグメントを配列番号:593に示された核酸配列を用いて単離し、クローニングした。

【0297】

発現クローニング：宿主のピキア・パストリス (Pichia pastoris) におけるテルモミセスのグルコアミラーゼの過剰発現のためにプライマーを設計した。プライマー、5'-GTC TCGAGAAAAGAGCAACGGGCTCGCTCGAC-3' (配列番号:599) 及び5'-GTTCTAGATCATCGCCACCAAGAAT TCACGGT-3' (配列番号:600) を使用し、鋳型としてcDNAクローンをういエキスパンドハイファイデリティPCRキット (Roche) 及び製造元のプロトコルを用い95°C20秒、55°C30秒及び72°C1分の30サイクルでPCRフラグメントを生成した。このPCRフラグメントを制限酵素XhoI及びXbaIで消化し、プラスミドpPIC Zアルファ (Invitrogen) の対応する制限部位に連結した。この構築物でピキア・パストリスX-33株 (Invitrogen) を形質転換した (ここで構築物はピキアの染色体に安定的に組み込まれる)。選別はゼオシンに対する耐性による。この構築物は、ピキアクローンをメタノールで誘導して、テルモミセスの成熟グルコアミラーゼが培地中に分泌されるように設計されていた。

ピキア発現クローンの1リットル培養は、BMGY中にスターターの一晩培養物を接種し、振盪フラスコで30°Cで一晩増殖させた。次の日に細胞を遠心で採集し、1リットルのBMMYに再懸濁した。メタノールを24時間毎に最終濃度0.5%に添加し、振盪フラスコで3日間30°Cで細胞を培養した。続いて発現したグルコアミラーゼ酵素を含む培養液を採集し、グルコアミラーゼ活性アッセイ及びタンパク質サイズの決定のために標準的プロトコルで電気泳動したSDSPAGEで調べた。

大腸菌でテルモミセスのグルコアミラーゼ遺伝子を過剰発現させるためのプライマーも設計した。プライマー、(配列番号:601) 5'-GTCCATGGCAACGGGCTCGCTCGAC-3' 及び (配列番号:602) 5'-GTTCTAGATCATCGCCACCAAGAATTCACGGT-3' を用いて、上記のようにPCR生成物をcDNA鋳型から生成した。前記PCRフラグメントを制限酵素、NcoI及びXbaIで消化し、プラスミドpSE420 (Invitrogen) の対応する制限部位に連結した。この構築物で大腸菌のXL-1 Blue MR株 (Syratagene) を形質転換した。プラスミドの選別はアンピシリンに対する耐性によった。グルコアミラーゼ遺伝子はこのプラスミドベクターのlac-zプロモーター

の制御下に有り、IPTG（イソプロピル-チオ-ガラクトピラノシド）で誘導される。成熟グルコアミラーゼ遺伝子が大腸菌細胞で発現され、余分のメチオニン残基がN-末端に含まれるように、構築物を設計した。

【0298】

標準アッセイ：水浴中の5mMの緩衝液、3mMのマルト-オリゴ糖（Sigma, M-3693）の溶液に酵素のアリコットを添加した。各時点で100 μ Lのアリコットを200 μ Lのグルコースオキシダーゼ試薬（Sigma, GAGO-20）へ取り出し、37℃で30分インキュベートした。12Nの硫酸を添加して反応を停止させ、540nmでの吸収を測定した。酵素（配列番号:594）の完全長バージョンをpH、温度及び基質利用について調べた。下記に特記するように、データは、至適pHはpH5.5周囲であることを明らかにした。データは、酵素（配列番号:8）は70℃で安定であり、70℃と75℃の間で急激で不可逆的な活性の低下を示した。酵素（配列番号:594）はオリゴ糖をマルトースへ加水分解し、より大きい糖類に対する加水分解速度はより高速であることをデータは示している。1,6結合の切断速度は、基質パノース（非還元末端に1,6結合を有する）で観察されるように、1,4結合の場合よりもはるかに遅い。前記の触媒ドメインバージョンの熱安定性はより低いように思われる。酵素（配列番号:594）は50℃で良好な加水分解速度を有するが、70℃では不活化するよう思われる。

10

活性アッセイ：酵素（配列番号:594）活性は、オリゴデキストリン基質の遊離グルコースの放出によって測定した。続いて遊離グルコースは共役反応で酸化され着色生成物を生じる。酵素（配列番号:594）のアリコットを、5mMの緩衝液、3mMのマルト-オリゴ糖（Sigma, M-3639）の溶液に水浴中で添加した。100 μ Lのアリコットを200 μ Lのグルコースオキシダーゼ試薬（Sigma, GAGO-20）に各時点で取り出し、37℃30分インキュベートした。12Nの硫酸を添加して反応を停止させ、540nmでの吸収を求めた。続いて各時点の測定値をつないだ曲線を作成し反応の相対速度を決定した。

20

【0299】

pHプロファイル：リン酸緩衝液（pH6.2、7.0、8.1）と同様に酢酸緩衝液（pH4.0、4.5、5.0及び5.4）を活性アッセイで用いて、各pHでのグルコアミラーゼ（配列番号:594）の相対速度を決定した。続いて前記速度をつないで図5に示したように曲線を作成した。前記酵素（配列番号:594）はpH5.5周辺で最大活性を示すようである。

温度プロファイル：種々の温度（50℃、60℃、70℃、80℃及び85℃）での酵素（配列番号:594）の相対速度を酢酸緩衝液（pH5.3）で決定した。前記速度を図6にプロットした。この酵素（配列番号:594）は70℃で最大活性を示し、これより上では活性は急激に低下するようである。

30

温度安定性のデータ：酵素（配列番号:594）を5mMの酢酸緩衝液に表示の温度で添加した。酵素（配列番号:594）の小分け量を4分間隔で氷上に取り出した。続いて基質に対する活性を70℃20分試験した。データは図7に表示されている。

基質利用性：デキストリンマルトース（G2）、マルトトリオース（G3）、パノース（Pan）、マルトテトラオース（G4）及びマルトヘプタオース（G7）を活性アッセイでマルト-オリゴ糖と置き換え、グルコアミラーゼ（配列番号:594）の基質利用性について試験した。5mMの酢酸緩衝液で70℃で、種々の基質についてグルコース遊離速度を調べた。被検基質（マルトース、マルトトリオース、パノース、マルトテトラオース及びマルトヘプタオース）は全て3mMであった。前記アッセイを続いて図8にプロットした。酵素（配列番号:594）は、より大きなデキストリンに対してはより高速で直鎖デキストリン（1,4結合）をマルトースに加水分解することができた。この酵素（配列番号:594）は、基質パノースによって示されるように1,6結合に対しては低い活性を示した。

40

【実施例17】

【0300】

実施例17

グルコアミラーゼ活性のアッセイ：BCA還元末端アッセイ

以下の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを、例えばBCA還元末端アッセイによって決定する例示的な方法を述べる。グルコアミラーゼ活性は

50

以下の方法を用いて決定することができる。

1. 以下のように2つの基質溶液を調製する：

a) 2グラムのジャガイモデンプンを100mLのリン酸ナトリウム (100mM、pH8) に溶解することによる2%可溶性デンプン (ジャガイモ) 溶液 (pH8)

b) 2グラムのジャガイモデンプンを100mLの炭酸ナトリウム (100mM) に溶解することによる2%可溶性デンプン (ジャガイモ) 溶液 (pH10)。

両溶液を沸騰水浴中で加熱し、その間デンプンが溶解するまで30から40分かき混ぜる。

2. 64mg/mLの炭酸ナトリウム一水和物、24mg/mLの炭酸水素ナトリウム及び1.95mg/mLのBCA (4,4'-ジカルボキシ-2,2'-ビキノリン二ナトリウム塩 (Signa Chemical cat# D-8284)) から溶液Aを調製する。上記をdH₂Oに添加する。

3. 1.24 mg/mLの硫酸第二銅五水和物及び1.26mg/mLのL-セリンを混合して溶液Bを調製する。混合物をdH₂Oに添加する。

4. 溶液A及びBの1：1比の作業試薬を調製する。

5. dH₂O中に10mMのマルトースを含むマルトース標準溶液を調製する。ここで所望のpHで前記10mMマルトースを2%の可溶性デンプンと一緒にし、最終濃度0、100、200、300、400、600 μMを得る。各時点の測定値について標準曲線を作成する。前記曲線は10 μLの標準物を前記作業試薬に添加して決定されるので、前記曲線は0、1、2、3、4、6nmolのマルトースに対するものである。

6. 1mLの基質溶液を微量遠心管に部分採取し、ヒートブロック又は加熱水浴で (5分間) 所望の温度に平衡化させる。50 μLの酵素溶液を前記の管の蓋の内側に添加する。

7. 溶液を平衡化させながら5mLの両溶液A及びBを混合する。100 μLアリコットを96ウェルPCRプレートに加える。プレートを氷上に置く。

8. 5分間温度を平衡化させた後、管の蓋を閉め、逆さにし、さらに3回ヴォルテックス攪拌する。直ちに前記の10 μLをt=0 (0時点) としてプレートに部分採取する。酵素混合物をヒートブロックに残し、所望の各時点 (例えば0、5、10、15、20、30分) で10 μLを部分採取する。

9. 標準曲線用に10 μLの標準物を添加するために12ウェル (作業用試薬のみ添加) が空であることを確認する。

10. 全ての時点で採取が行われたとき、標準物を添加し、プレートに覆いをして80℃で35分加熱する。プレートを10分間氷上で冷却する。100 μLのH₂Oを全てのウェルに添加する。混合し、100 μLを平底の96ウェルプレートに部分採取し、560nmで吸収を読み取る。

11. 各サンプルの各時点の測定値をそれ自身のt=0に対して0点補正する (t=0のA560の平均を他のA560値の平均から差し引く)。A560_(experimental)をμmolに変換する (A560_(experimental)を標準曲線の勾配で割る (A560/μmol))。各時点の測定値及びμmolの勾配 (μmol/分) を作製し、100を乗じる (1mLの反応で使用された量ではなく、μmolの値が前記アッセイで用いられた10 μLについてのものである)。比活性を得るために、前記勾配 (μmol/分) をタンパク質のmgで割る。全ての点について最低限2つ組で実施すべきである (1つ3組が好ましい)。タンパク質濃度 (mg/mL) を任意の希釈で割って、アッセイで使用されたmgを得る。上記の勾配をアッセイで使用したmgで割って、比活性を得る。例えば以下の文献を参照されたい：Wong (2000) J. Agric. Food Chem. 48:4540-4543; Fox (1991) Anal. Biochem. 195:93-96。

【実施例18】

【0301】

実施例18

グルコアミラーゼ活性についてのスクリーニング

以下の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法を述べる。クローンのグルコアミラーゼ活性は当業界で公知の多数の方法によって評価することができる。

プレート当たりスクリーニングするプラークの数は約10,000pfuであり得る。各DNAライ

10

20

30

40

50

ブラリーについては、λZapエクスプレスで増幅された溶解物のpfu力価に応じて、単離ライブラリー当たり約50,000プラーク及び非単離ライブラリー当たり200,000プラークをスクリーニングすることができる。

ラムダライブラリーの力価決定

8) ラムダZapエクスプレス増幅ライブラリーストックの__ μLを600 μLの大腸菌MRF'細胞 (OD₆₀₀=1.0) に添加した。MRF'ストックを希釈するために10mMのMgSO₄を用いる。

9) 37℃で15分インキュベートする。

10) 懸濁液を5から6mLの50℃のNZYトップ寒天に移し穏やかに混合する。

11) 直ちに寒天溶液を大型 (150mm) NZY培地プレート上に注ぎ入れる。

12) トップ寒天を完全に固化させ (約30分)、続いてプレートを逆さにする。

13) プレートを39℃で8から12時間インキュベートする。

14) プラークの数を概算する。ファージ力価を測定し、10,000pfu/プレートになるようにする。必要ならば、ライブラリーファージのアリコットをSM緩衝液で希釈する。

【0302】

基質スクリーニング

13) 増幅ライブラリーから50,000pfu のラムダZapエクスプレスを 600 μLの大腸菌MRF'細胞 (OD₆₀₀=1.0) に添加した。非環境ライブラリーについては、4本の試験管を準備する (50,000pfu/試験管)。

14) 37℃で15分インキュベートする。

15) ファージ/細胞懸濁液をインキュベートしている間に、1.0mLの赤色デンプン基質 (1.2%w/v) を50℃の6.0mLのNZYトップ寒天に添加し、完全に混合する。必要となるまで溶液を50℃で維持する。

16) 細胞懸濁液の1/5 (10,000pfu) を基質/トップ寒天溶液に移し穏やかに混合する。

17) 直ちに溶液を大型 (150mm) NZY培地プレート上に注ぎ入れる。

18) トップ寒天を完全に固化させ (約30分)、続いてプレートを逆さにする。

19) 細胞懸濁液の残りのために手順4-6を4回繰り返す (各回懸濁液の1/5)

20) プレートを39℃で8から12時間インキュベートする。

21) プラーク周囲の透明化ゾーン (ハロ) についてプレートを観察する。

22) ハロを有するプラークを寒天からくりぬき、滅菌微量管に移す。口径の大きな200 μLピペットの先端が所望のプラークを含む寒天プラグを取り出す (くりぬく) ために都合よい。

23) ファージを500 μLのSM緩衝液に再懸濁する。20 μLのクロロホルムを添加し更なる細胞増殖を一切阻害する。

24) 次の工程前に純粋なファージ懸濁液を室温で4時間又は一晩インキュベートする

【0303】

純粋クローンの単離

12) 10 μLの再懸濁したファージ懸濁液を500 μLの大腸菌MRF'細胞 (OD₆₀₀=1.0) に添加する。

13) 37℃で15分インキュベートする。

14) ファージ/細胞懸濁液をインキュベートしている間に、1mLの赤色デンプン基質 (1.2%w/v) を50℃の6.0mLのNZYトップ寒天に添加し、完全に混合する。必要となるまで溶液を50℃で維持する。

15) 細胞懸濁液を基質/トップ寒天溶液に移し穏やかに混合する。

16) 直ちに溶液を大型 (150mm) NZY培地プレート上に注ぎ入れる。

17) トップ寒天を完全に固化させ (約30分)、続いてプレートを逆さにする。

18) プレートを39℃で8から12時間インキュベートする。

19) 単一プラーク (純粋クローン) の周囲の透明化ゾーン (ハロ) についてプレートを観察する。単一プラークを単離できない場合は、力価を調整してファージ溶液を再度プレートティングする。

20) 寒天からハロを有する単一プラークをくりぬき、滅菌微量管に移す。所望のプラーク

クを含む寒天プラグを取り出す（くりぬく）ために口径の大きな200 μ Lピペットが都合よい。力価を増幅させるために、単一の5つの活性クローンを芯からくりぬいて微量管に加える。

21) ファージを500 μ LのSM緩衝液に再懸濁する。20 μ Lのクロロホルムを添加し更なる細胞増殖を一切阻害する。

22) 次の工程の前に純粋なファージ懸濁液を室温で4時間又は一晩インキュベートする。純粋なファージ懸濁液はDMSOをファージ懸濁液に添加して（7%v/v）、-80℃で保存する。

【0304】

純粋クローンの切り出し

17) 100 μ Lの純粋なファージ懸濁液を200 μ Lの大腸菌MRF'細胞（OD₆₀₀=1.0）に添加する。前記に対して、1.0 μ LのEXASSISTヘルパーファージ（ $>1 \times 10^6$ pfu/mL; Stratagene）を添加する。切り出しには2059 Falcon管を使用する。

18) 懸濁液を37℃で15分インキュベートする。

19) 2XのYT培養液の3.0mLを細胞懸濁液に添加する。

20) 攪拌しながら、少なくとも6時間又は一晩30℃でインキュベートする。

21) 管を70℃に20分移す。ファージミド懸濁液は4℃で1から2ヶ月保存できる。

22) 100 μ Lのファージミド懸濁液を200 μ Lの大腸菌Exp505細胞（OD₆₀₀=1.0）を含む微量管に移す。

23) 懸濁液を37℃で15分インキュベートする。

24) 300 μ LのSOBを前記懸濁液に添加する。

25) 懸濁液を37℃で30から45分インキュベートする。

26) 100 μ Lの懸濁液を小さな（90mm）のLB培地プレートに移す。前記LB培地プレートはZap発現DNAライブラリーのためにカナマイシンを含むか（カナマイシン50 μ g/mL含有LB培地）、又はZapIIDNAライブラリーのためにアンピシリンを含む（カナマイシン100 μ g/mL含有LB培地）。

27) 懸濁液の残りを別の小さなLB培地プレートに移す。

28) 滅菌ガラスビーズを用いてプレート上に懸濁液を均等に分布させる。

29) プレートを12から24時間30℃でインキュベートする。

30) コロニーについてプレートを観察する。

31) 単一コロニーを適切な抗生物質を含むLB液体培地に接種し、30℃で12から24時間インキュベートする。

32) グリセロールストックは80%グリセロールを液体培地に添加する（15%v/v）ことによって調製し、-80℃で保存できる。

【0305】

活性の確認

7) 50 μ Lの液体培養を微量管に移す。前記微量管に8%のアミロペクチンアズレ（Azure）（pH7）の500 μ Lを添加する。各クローンについて2本の管を用意する。

8) 活性は50℃で3時間及び一晩テストする。pH7の緩衝液をコントロールとして用いる。

9) 検査標本を氷水浴で5分間冷却する。

10) 750 μ Lのエタノールを添加し、完全に混合する。

11) 13000rpm（16000g）で5分遠心する。

12) 上清のODを595nmで測定する。

RFLP解析

13) 1.0mLの液体培養を滅菌微量管に移す。

14) 13200rpm（16000g）で1分遠心する。

15) 上清を廃棄する。新たに1.0mLの液体培養を同じ滅菌微量管に添加する。

16) 13200rpm（16000g）で1分遠心する。

17) 上清を廃棄する。

10

20

30

40

50

- 18) プラスミドの単離についてはQIAprepスピンミニキットのプロトコルに従う。
- 19) バイオフォトメーターを用いてDNA濃度をチェックする。
- 20) 第一の二重消化にSacI及びKpnIを使用する。37℃で1時間インキュベートする。
- 21) 第二の二重消化にPstI及びKhoIを使用する。37℃で1時間インキュベートする。
- 22) ローディング染料を消化サンプルに添加する。
- 23) 消化サンプルを1.0%アガロースゲルで1から1.5時間120ボルトで泳動する。
- 24) ゲルイメージャーでゲルを観察する。異なる消化パターンを有する全てのクローンを配列解析のために送る。

【実施例 19】

【0306】

10

実施例 19

グリコアミラーゼのアッセイ

以下の実施例では、あるポリペプチドが本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する例示的な方法を述べる。

宿主培養の調製

5. XL1-Blue MRF' 宿主細胞の一晩培養を開始する。画線接種プレートからの単一コロニーを用い、20 µg/mLのテトラサイクリンを添加した10mLのLBに接種する。一晩培養を37℃で少なくとも16時間振盪しながら増殖させる。

6. 無菌技術を用い、LB_{Tet}の一晩培養のXL1-Blue MRF' 宿主を新しい100mLのLB_{Tet}接種し一日培養する。

20

7. 37℃のシェーカーでODが0.75から1.0に達するまで増殖させる。

8. 宿主細胞を1000Xgで10分沈殿させ、さらに10mMのMgSO₄にOD5で穏やかに再懸濁させる。

9. 少量の宿主細胞をOD1に希釈し、力価測定及びピンツースリングに使用する。

10. 宿主調製物は、氷上または4℃で保存する場合は1週間まで用いることができる。

—微量管の増殖時間を短縮するために、LB中の通常のTet濃度の1/2倍を用いるか（1/2倍=10 µg/mL）、又は抗生物質を全て省略する。

—テトラサイクリンを用いて選別するときはNZYを用いない。NZY中の高濃度Mg⁺⁺はTetを不活化する。

【0307】

30

ラムダライブラリーの力価測定

11. 3つの微量遠心管をラックに置く。

12. 調製した宿主細胞995 µLを1本の管へ部分採取し、さらに残りの2本の管の各々に45 µLの調製したOD1宿主細胞を部分採取する。

13. 5 µLのラムダライブラリーを995 µLの宿主細胞を含む前記管に添加し、ヴォルテックス攪拌する。これによって200の希釈係数が得られる。

14. 5 µLの前の希釈物を45 µLの調製宿主細胞を含む残りの2本の管に連続的に添加することにより、1/2,000及び1/20,000希釈を調製する。各希釈を行った後ヴォルテックス攪拌で混合する。

15) 37℃で15分インキュベートして宿主にファージを吸着させる。

40

16) その間、調製OD1宿主細胞の100 µLを3つのファルコン（Falcon）2059管の各々にピペットで加える。

17) 各希釈の5 µLを宿主細胞を含む別々の2059管に添加する。

18) 各管に3mLのトップ寒天を添加し、迅速に90mmのNZYプレート上に注いで各々をプレーティングする。トップ寒天が固まる前に滑らかで平坦に分布していることを確認する。

19) プレートを逆さにし、37℃で一晩インキュベートする。

20) プラークを数え、ライブラリーストックの力価（µL当たりのプラーク形成単位（pfu）として）を計算する。

【0308】

グルコアミラーゼのためのラムダマイクロタイタースクリーニング

50

準備

5. 計画したスクリーニングに必要な量のために、上記に記載したようにXL1-Blue MRF⁺宿主培養の十分な量を調製する。通常は2から3ライブラリーのスクリーニングには100mL培養で十分である。

6. QFill2ディスペンサーに適合する数個のビンオートクレーブする。これらのビンはコーニング (Corning) の広口ビン (250mL) で蓋の周囲にシーリングリングを含む。

7. スクリーニングのために使用できる十分量のプレート、トップ寒天、BODIPYデンブレン、赤色デンブレン溶液などがあることを確認する。

8. 自動化の例示的例を用いて2日目のロボット操作の計画を立てる。

1日目

10. ライブラリースクリーニング及びプレート番号について1536 - ウェルプレート (黒) に標識を付ける。タフタグ (Tough-Tags (商標)) 試験管ステッカー (半分幅に切断する) が1536ウェルプレートの標識に理想的である。

11. スクリーニングに必要なライブラリー、宿主細胞及びNZY培地の体積を計算する。これはエクセル (Excel) スプレッドシートで容易に実施できる。

12. ラムダライブラリー及びOD5宿主細胞の計算した体積を滅菌250mLコーニング広口ビン (シーリングリングを含む) で混合する。

13. 37°Cで15分吸着させる。

14. 計算した体積のNZY培地を添加し、よく混合する。これを細胞-ファージ-培地懸濁液と称する。

15. 50 μ Lの細胞-ファージ-培地懸濁液と250 μ LのOD1宿主細胞をFalcon2059試験管で一緒にし、続いて9mLのトップ寒天とともに150mmのNZYプレート上にプレーティングすることによって同時力価測定を実施する。同時力価プレート (concomitant titer plate) を37°Cで一晩インキュベートする。

16. ディスペンサーに前記懸濁液の残りを加え、標識した1536-ウェルプレートの各々にウェルにつき4 μ Lを分注する。ディスペンサーがいくつかのウェルに気泡を入れた場合は、プレートを200Xgで1分遠心することによってそれらを除去することができる。

17. アッセイプレートの少なくとも2つのウェルのAD46の位置に、0.5 μ Lの陽性コントロールファージを添加する。この目的のために強力なアミラーゼ陽性ラムダクロンを使用する。配列番号:113又は配列番号:199のラムダバージョンは陽性コントロールとしてよい選択である。

18. アッセイプレートを37°Cで一晩、加湿 (95%以上) インキュベーターでインキュベートする。

【0309】

2日目

21. 前記同時力価プレートのpfuを数え、ウェル当たりの平均播種密度 (pfu/ウェルとして) を決定する。

22. 下記のように、各ライブラリースクリーニングの少なくとも2枚のプレートをピンツールリングする：

a) 2枚の宿主ローンプレートをピンツールリングのための表面として用意する：250 μ LのOD1宿主細胞を2mLの2%赤色デンブレンと混合し、9mLのトップ寒天と一緒に150mmのNZYプレート上にプレーティングする。プレート全体に均等な赤色色調を得るために、トップ寒天ができるだけ平らに固化できるように各プレートを保持する。

b) 2回火炎滅菌した1536位置ピンツールを用いて、前記スクリーニングプレートの少なくとも2つを宿主ローンプレート上に複製する。

c) ピンツールリングを実施したレシピエントプレートを層流フードに蓋を外して約15から30分間静置する (過剰な水分を発散させるため)。

d) 蓋を戻し、37°Cで一晩逆さにしてインキュベートする。

23. 以下のようにして2XのBODIPYデンブレン基質緩衝液を調製する：

a) 4 μ L/ウェルとして全てのスクリーニングプレートのために必要とされる2Xの基質

10

20

30

40

50

緩衝液の総体積を計算し（ディスペンサーのために必要な一切の余分なデッドスペース容積を含む）、使用するディスペンサーとして適切な容器に前記の量のCAPS（100mM、pH10.4）を計り入れる。

b) BODIPYデンブンの十分な0.5mg試験管を回収し、必要な体積の2X基質緩衝液の容積（上記工程 a で計算）を最終濃度20–30 µg/mLで作製する。

c) 頻繁にヴォルテックス攪拌しながら0.5mg試験管の各々を50 µLのDMSO中で室温で溶解し、遮光する。前記溶解のために15分以上を要するが、BODIPYデンブンのいくつかの製造ロットは他のものよりも良好に溶解する。

d) 50 µLのCAPS緩衝液（100mM、pH10.4）を各管に添加し、ヴォルテックス攪拌により混合する。

e) 全ての管の内容物をプールし、微量遠心器の最大速度で1分遠心して未溶解凝集物を全て除去する。

f) 工程 a) で計算した100mMのCAPS緩衝液の残りに前記上清を添加する。

g) フォイルで覆うことにより2Xの基質緩衝液を遮光する。

24. プレート及び基質緩衝液を自動化室に持ち込み、ロボットを以下のパラメーターを用いてプログラムする：

a) ウェル当たり4 µLの基質緩衝液を分注する；

b) 基質投入後1時間で1回目の読み取り、9時間で2回目の読み取り、17時間で3回目の読み取り、読み取りの間は37℃でインキュベーション；

c) 励起フィルター：485nm、照射フィルター：535nm；

d) 蛍光分光計のゲインを70に設定するか、又は光学ゲインを調製した2X基質緩衝液バッチのために設定する；

e) 使用インキュベーターでアッセイプレートが遮光されていることを確認する。

【0310】

3日目

4. 関連するアッセイプレートのウェルに対応する全ての位置の細菌ローンの透明化について、ピンツールリングを実施したプレートをチェックする。さらにまた、ピン位置の全てで赤色デンブンの透明化についてもチェックする。陽性コントロールを含むプレートがピンツールリングに用いられた場合、大きな透明化ゾーンが赤色の背景に認められるであろう。赤色デンブンの透明化ゾーンを形成する夾雑物にも注意されたい（実施例7の終わりに記載した“赤色デンブンの透明化ゾーンを形成する夾雑物”の注釈も参照されたい）。

5. 前記ロボットコンピュータによって作成されるデータファイルから得られた推定的ヒットを特定する。エンジニアリング製のKANALプログラムはデータの解析を容易にする。経験に基づく方法として、推定的ヒットの特徴は、背景より少なくとも1.5倍のシグナルの強さを有するウェルとされる。

6. 各推定的ヒットについて、ウェルから2 µLを取り出し、500 µLのSM緩衝液及び50 µLのCHCl₃を含む管に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合し、4℃で保存する。この溶液を以下では4e-3ストックと称する。原本のスクリーニングプレートは、少なくとも分析が完了するまで4℃で保存し、遮光されねばならない。

【0311】

これは推定的ヒットを取り出す推奨方法である。BODIPYデンブンの活性を確認できるのは液相アッセイである。また別には、推定的ヒットは、各ヒットにつき2000から3000pfuを透明化ゾーンについて調べることができるように赤色デンブンの固相プレートで直接プレーティングすることができる。しかしながら、赤色デンブンの透明化ゾーンを観察できないことは、必ずしも推定的ヒットが擬陽性であることを示しているわけではない。その場合は、最初に特定された様式（すなわち、基質としてBODIPYデンブンの液相）を用いてアッセイする必要があるであろう。さらにまた、非常に弱い陽性は下記に詳述する方法を用いてより簡単に同定される。

1日目

10

20

30

40

50

25. 50mLの滅菌円錐管に0.5mLのOD5の宿主細胞及び45.5mLのNZYを混合する。前記を宿主-培地懸濁液と称する。

26. 解析すべき各推定的ヒットについて、宿主-培地懸濁液の1mLを3本の滅菌した微量遠心管のそれぞれに部分採取する。

27. 12チャンネルのピペットマンをアリコットサイズ20 μ L及びアリコット数2Xで多数回分配モードに設定する。前記ピペットマンに清浄な滅菌チップ一式を装填する。

28. 約1mLの宿主-培地懸濁液を新しい滅菌溶液皿に注ぎ、マルチチャンネルピペットマンに装着する。

29. 黒色の384ウェルプレートの最後の列（列P）（12チャンネルX 2=24ウェル）に20 μ L/ウェルを分注する。この列は後でコントロールとして用いられる。

30. 溶液皿の表面にチップを触れさせ、さらにピペットマンのRESETボタンを押し下げることによりチップ内の残留液を排出させる。チップの汚染を防ぐようにしてピペットマンを下に下ろす。この時点でチップを交換する必要はない。

31. 液跳ねによる汚染を避けるために注意しながら、皿内の残留液を（ビーカーのような）廃棄用容器に注ぐ。

32. 解析すべき第一の推定物について、4e-3ストック（グルコアミラーゼのためのラムダマイクロタイタースクリーニングの2日目を参照されたい）の111 μ Lを採り、前記を宿主-培地懸濁液（工程2）の1mLを含む3本の管のセットの第一に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合する。これは希釈Aである。

33. 希釈Aの111 μ Lを採り、前記セットの次の管に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合する。これは希釈Bである。

34. 希釈Bの111 μ Lを採り、前記セットの最後の管に添加する。ヴォルテックス攪拌で混合する。これは希釈Cである。今や3つのファージ希釈物があり、各々の濃度は10倍ずつ異なっているはずである。

35. 希釈C（3サンプルで最も希釈されたもの）の内容物を溶液皿に注ぎ、マルチチャンネルピペットマンにロードする。

36. 384ウェルプレートの第一の列（12チャンネルX 2=24ウェル）に20 μ L/ウェルを分注する。

37. 溶液皿の表面にチップを触れさせ、さらにピペットマンのRESETボタンを押し下げることによりチップ内の残留液を排出させる。チップの汚染を防ぐようにしてピペットマンを下に下ろす。この時点でチップを交換する必要はない。

38. 上記に記載したように前記皿を空にする。

39. 希釈Bの内容物を同じ皿に注ぎ、マルチチャンネルピペットマンに装填する。

40. 384ウェルプレートの第二の列に20 μ L/ウェルを分注する。

41. 工程13から16を同様に実施して、希釈Aをプレートの第三の列に分注する。

42. 3つの希釈物の全てをプレートの最初の3列に並べた後、全てのチップ及び溶液皿をバイオハザード廃棄物容器に廃棄する。

43. ピペットマンに清浄な滅菌チップ一式を装着し、新しい滅菌溶液皿を開ける。

44. プレートの残りの列を0列まで用いて、残りの推定的ヒットについて工程8-19を繰り返す。5つの推定的ヒットを1枚の384ウェルプレートで解析することができ、最後の列（列P）はコントロールのために確保される。

45. 別個のウェルに各コントロール0.5 μ Lを添加する。好ましくは活性範囲を含む、少なくとも2つから3つの別個のコントロールを用いる。

46. アッセイプレートを加湿（95%以上）インキュベーターで37℃で一晩インキュベートする。

【0312】

2日目

47. 全ての出現プレートを赤色デンブンを含む宿主ローン上に、“グルコアミラーゼのためのラムダマイクロタイタースクリーニング”の2日目で述べた方法と同じ方法（384位置ピンツールを用いる点を除く）を用いてピンツールリングする。

10

20

30

40

50

48. 以下のようにして2XのBODIPYデンブン基質緩衝液を調製する：

a) 20 μ L/ウェルとして全ての出現プレートのために必要とされる2Xの基質緩衝液溶液の総体積を計算し（ディスペンサーのために必要な一切の余分なデッドスペース体積を含む）、使用するディスペンサーとして適切な容器に前記の量のCAPS（100mM、pH10.4）を計り入れる。

b) BODIPYデンブンの十分な0.5mg試験管を回収し、必要な体積の2X基質緩衝液の容積（上記工程aで計算）を最終濃度20–30 μ g/mLで作製する。

c) 頻繁にヴォルテックス攪拌しながら0.5mg管の各々を50 μ LのDMSO中で室温で溶解し、遮光する。前記のために15分以上を要するが、BODIPYデンブンのいくつかの製造ロットは他のものよりも良好に溶解する。

d) 50 μ LのCAPS緩衝液（100mM、pH10.4）を各管に添加し、ヴォルテックス攪拌により混合する。

e) 全ての管の内容物をプールし、微量遠心器の最大速度で1分遠心して未溶解凝集物を全て除去する。

f) 工程a)で計算した100mMのCAPS緩衝液の残りに前記上清を添加する。

g) フォイルで覆うことにより2Xの基質緩衝液を遮光する。

49. 全ての出現プレートに20 μ L/ウェルを分注する。

50. 全てのプレートをアルミ箔で覆い、2から6時間室温でインキュベートする。

51. 各プレートを以下のように設定した蛍光分光計で読み取る：

a) 蛍光の読み（励起フィルター：485nm、照射フィルター：535nm）

b) プレートの指定：384ウェル黒

c) 上から読み取る

d) 最適ゲイン

e) フラッシュの数：3

52. 得られたエクセルスプレッドシートで、各推定的ヒットの3つの列を別々のグラフに表し、活性をチェックする。陽性コントロールは背景を超えるシグナルを生じたことを確認する。

53. ウェルのうちで本物のシグナルを有するように見える各推定物について、以下のよう陽性ウェルからサンプルを採取する：

a) 最も高い初期希釈を示している列から陽性ウェルを選別する。

b) 前記ウェルから2 μ Lを500 μ LのSM及び50 μ LのCHCl₃を含む管に移す。これを出現ストックと称する。

c) 4°Cで保存する。

54. 先に述べた方法を用い、各出現ストックの約10 μ Lを、赤色寒天を用いて150mmNZYプレート上にプレーティングする。目的は、いくつかの（少なくとも20）よく分散したプラーク得て、そこから単離物をくりぬくことである。

【0313】

3日目

55. 関連するアッセイプレートのウェルに対応する細菌ローン中の透明化の認容できる発生について、ピンツールリングを実施したプレートをチェックする。さらにまた、陽性コントロール及び調べた全ての推定物において赤色デンブン内の透明化についてもチェックする。赤色デンブン中に透明化ゾーンを形成する夾雑物にも注意されたい（下記を参照されたい）。

56. 出現ストックの希釈を含む固相プレートから、いくつかの単離プラークをくりぬき、その各々を、CHCl₃（50 μ L）を含む500 μ LのSM緩衝液に添加する。これを単離物ストックと称する。

57. 続いて上記の方法を用いて単離物ストックを個々にBODIPYデンブンで調べることができる。この工程は、工程2でくりぬいたプラークが赤色デンブンの背景に透明化ゾーンを生じた場合は省略することができる。

【0314】

切り出し1日目

58. 200 μ LのOD1 XL1-Blue MRF' 宿主、100 μ Lのラムダ単離物ストック及び1 μ LのExAs sistファージストックをファルコン2059管で混合する。

59. 37°Cのシェーカーで15分インキュベートする。

60. 3 mLのNZY培地を添加する。

61. 30°Cのシェーカーで一晩インキュベートする。

2日目

10. 切り出し管を70°C 20分加熱する。

11. 1000Xgで10分遠心する。

10

12. 50 μ Lの上清を200 μ LのEXP505 OD1宿主とファルコン2059管で混合する。

13. 37°Cのシェーカーで30-45分インキュベートする。

14. 300 μ LのSOB培地を添加する。

15. 37°Cのシェーカーで30-45分インキュベートする。

16. 滅菌ガラスビーズを用いて大きなLB_{Kan50}プレート上に50 μ Lをプレーティングする。前記プレートが“乾燥”している場合は、更にSOB培地を添加し細胞の分散を助けることができる。

17. プレートを30°Cで少なくとも24時間インキュベートする。

18. 配列決定及び／又はRFLPのために単離物を培養する。

30°Cでの増殖はプラスミドのコピー数を減少させ、いくつかのグルコアミラーゼクローンの明らかな毒性を緩和するために用いられる。

20

【0315】赤色デンプン中に透明化ゾーンを形成する夾雑物

固形培地上で赤色デンプンを用いてグルコアミラーゼ活性についてファージをアッセイする場合、赤色デンプン内に透明化ゾーンを形成する夾雑コロニー形成単位(cfu)が見られることは一般的である。ピンツールリングを実施したプレートでは、グルコアミラーゼ陽性ファージクロンをこれら夾雑物と、それらが特定のウェルの位置と関連しているときは、常に区別することが重要である。夾雑微生物の供給源はおそらく2%赤色デンプンストック溶液である(調製後オートクレーブ又はろ過によって滅菌することができない)。それらは、赤色デンプンを代謝することによって生存する日和見微生物であると考えられる。これら夾雑物を減少させるために、2%赤色デンプン溶液を作製するときは無菌技術を用い、4°C又は氷上で前記ストックを保存する。

30

【0316】

RBB-デンプンを用いるアッセイ: 75 μ LのRBB-デンプン基質(50mMのNaAc緩衝液中の1%のRBB-不溶性トウモロコシデンプン、pH4.5)を新しい96ウェルプレート(V底)の各ウェルに添加することができる。5マイクロリットルの酵素溶解物を、基質を含む各ウェルにバイオメック(Biomex)又はザイマーク(Zymark)を用いて移すことができる。アルミのシーリングテープで前記プレートに封をし、シェーカー上で簡単に振盪する。前記プレートを90°Cで30分インキュベートし、続いて室温に約5から10分冷却する。100%エタノールの100 μ Lを各ウェルに添加し、プレートに封をし、シェーカー上で簡単に振盪する。続いて前記プレートを卓上遠心器を用いて4000rpmで20分遠心する。100 μ Lの上清をバイオメックにより新しい96ウェルプレート(平底)に移し、OD₅₉₅を読み取る。

40

FITC-デンプンを用いるアッセイ: 50 μ Lの基質(100mMのNaAc緩衝液中の0.01%のFITC-デンプン、pH4.5)を新しい384ウェルプレートの各ウェルに添加する。基質を含む各ウェルに5 μ Lの酵素溶解物を移し、前記プレートを室温で一晩インキュベートする。各ウェルについて基質の分極変化、励起485nm、照射535nmを読み取る。全てのアッセイについて96ウェルプレートを用いることができる。

【実施例20】**【0317】**

実施例20

50

デンプン液化のための例示的なプロトコル及び測定結果

以下の実施例では、デンプンを液化する例示的な手順を述べる。

反応条件：100mMの PO_4 (pH6.5)、1% (w/w) の液化デンプン (55℃、DE12)。活性を確認するためにTLC及びHPLCの両アッセを実施することができる。

pH6.5での液化デンプンの糖化のための例示的な手順：

－液化されるデンプンのpHを糖化が実施されるpHに調整する。糖化の前にpHを6.5に調整することができるように100mMのリン酸ナトリウム塩を添加した100mMの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 中でデンプンを液化する。

－5グラムの液化デンプンサンプルを風袋を差し引いたビンに計り入れる。

－100グラムの液化デンプン当たり、0.04% (w/w) のオブチデキス (Optidex) L-400又は約400mLの1 - 10希釈のオブチデキスL-400ストックを用いる。 10

－1 - 10希釈のオブチデキスL-400ストック400mLに含まれるオブチデキスL-400のミリグラムを計算する。次にオブチデキスL-400と同じ濃度の酵素を提供するために必要な溶解物の体積を計算する。

－デンプンサンプルの液化のために酵素を添加し、所望の温度 (50℃) でインキュベートする。18時間後DEを決定し、HPLC解析のためのサンプルを調製する。

【0318】

例示的なDE決定：

例示的なネオキュプロインアッセイ：100mLのサンプルを2.0mLのネオキュプロイン溶液A (40g/Lの炭酸ナトリウム、16g/Lのグリシン、0.45g/Lの硫酸銅) に添加することができる。これに2.0mLのネオキュプロイン溶液B (1.2g/Lのネオキュプロインヒドロクロリド (Sigma N-1626)) を添加する。管を混合し、沸騰水浴中で12分加熱し、冷却し、DI水で10mLの容積に希釈し、分光光度計を用いて450nmでODを読みとる。同時に実施した0.2mg/mLのグルコース標準物の反応からサンプル中のグルコース当量を外挿により得ることができる。 20

例示的なHPLC解析：炭水化物糖化プロファイルは、HPLC (シルバー形のBio-Rad Aminex HPLC-87Aカラム、80℃) を用いて屈折率検出によって測定する。移動相はろ過ミリポア水とし、流速0.7mL/分で用いる。糖化サンプルは酸性DI水 (200mLのDI水に6MのHClを5滴) で1 - 10に希釈し、続いて0.45mmの円筒フィルターでろ過する。注入容積は20 μL である。 30

例示的なTLC：反応生成物を1時間ごとに取り出し、TLCプレート上にスポットし、乾燥させる。続いて前記プレートを水：イソプロパノール (10：90) で展開し、ヴァニリン染色又はCAM染色で可視化し、続いて加熱すると還元可能糖が示される。活性が観察される場合は、液化デンプンは部分的にグルコースに加水分解されている。 30

【実施例21】**【0319】****実施例21**グルコアミラーゼを用いたデンプン液化

本実施例では、本発明のグルコアミラーゼを用いてデンプンを液化する本発明の例示的な方法を述べる。グルコアミラーゼ濃縮物は、発酵ブロスから加熱処理、細胞洗浄、ミクロろ過及び限外ろ過を用いたアルカリ性抽出によって調製できる (総収量48%)。UF濃縮物を酢酸で中和し、30%グリセロールでpH4.5にて処方することができる。市販製品の活性レベルは約120U¹/g-0.5kg/トンデンプンであろう。 40

例示的グルコアミラーゼ活性アッセイ：950 μL のMOPS (50mM、pH7.0) (5mMのPNP- α -D-ヘキサ-(1 $\rightarrow$ 4)-グルコピラノシドを含む) を含む1mLキュベットを、80℃に予熱したバックマンDU-7400分光光度計のペルティエ (Peltier) 温度制御装置に静置する。前記分光光度計の405nmにおけるブランクを決定し、50 μL の酵素溶液を前記キュベットに添加してよく混合し、OD₄₀₅の増加を1分間隔でモニターする。950mLのMOPS (50mM) 中の1 $\mu\text{mol/mL}$ のPNPの50 μL のpH7.0、80℃でのOD_{405nm}反応から、 $\Delta\text{OD}_{405\text{nm}/\text{min}}$ 速度を $\mu\text{mol/分}$ の標準単位に変換する。熱安定性 α -グルコアミラーゼの1標準単位 (DTAA) は、アッセイの規定条件下で1 $\mu\text{mol/mL/分}$ でのpNPの遊離を触媒する酵素量に等しい。 50

標準的グルコアミラーゼ活性アッセイ：950 μ LのMOPS（50mM、pH7.0）（5mMのpNP- α -D-グルコピラノシドを含む）を入れた1mLキュベットを、60℃に予熱したバックマンDU-740 0分光光度計のペルティエ温度制御装置に静置する。前記分光光度計の405nmにおけるブランクを決定し、50 μ Lの酵素溶液を前記キュベットに添加してよく混合し、OD₄₀₅の増加を1分間隔でモニターする。950mLのMOPS（50mM）中の1 μ mol/mLのPNPの50 μ LのpH7.0、60℃でのOD_{405nm}反応から、 Δ OD_{405nm/min}速度を μ mol/分の標準単位に変換する。グルコアミラーゼの標準ダイヴァーサユニット（DTAA）1単位は、前記アッセイの規定条件下で1 μ mol/mL/分でのpNPの遊離を触媒する酵素量に等しい。

【0320】

デキストロス当量の測定：ネオキュプロインの方法を用いてDEを測定する。選択したサンプルを本発明の方法及びGPCフェーリング（Fehlings）法を用いるGPCアナリストの両方法によって測定する。

ネオキュプロインアッセイ：100 μ Lのサンプルを2.0mLのネオキュプロイン溶液A（40g/Lの炭酸ナトリウム、16g/Lのグリシン、0.45g/Lの硫酸銅）に添加する。これに2.0mLのネオキュプロイン溶液B（1.2g/Lのネオキュプロインヒドロクロリド（Sigma N-1626））を添加する。管を混合し、沸騰水浴中で12分加熱し、冷却し、DI水で10mLの容積に希釈し、分光光度計を用いて450nmでODを読みとる。同時に実施した0.2mg/mLのグルコース標準物の反応からサンプル中のグルコース当量を外挿により決定する。

デンプンサンプルを約1から16にDIで希釈し、正確な希釈を記録する。10mLの希釈サンプルを20mLのDI水に添加する。10mLフェーリング溶液A及びBを前記希釈デンプンに添加する。サンプルを3分間煮沸し、さらに氷上で冷却する。30%のKIの10mL及び6NのH₂SO₄の10mLを添加する。前記溶液を0.1Nのチオ硫酸ナトリウムで滴定する。滴定体積を記録しDEの計算に用いる。

残留デンプンの測定：糖化後のサンプルを残留デンプンについてスターレー（Staley）ヨウ素法を用いて調べた。

20グラムのサンプルを大きな秤量皿に計り入れる。45 μ Lのヨウ素溶液を前記秤量皿に添加し、さらにデンプン溶液をよく混合する。暗青色はデンプンの存在を示し、淡青緑色は微量のデンプン、淡緑色は痕跡量のデンプンの存在を示し、さらに黄赤色はデンプンが存在しないことを示す。ヨウ素溶液は、21.25gのヨウ素及び40.0gのヨウ化カリウムを1Lの水に溶解して調製される。

【0321】

オリゴ糖プロファイル：炭水化物の液化及び糖化プロファイルは、HPLC（カルシウム形のBio-Rad Aminex HPX-87Cカラム－80℃）を用いて屈折率検出によって測定した。

ゲル透過性クロマトグラフィー：分子量分布は、屈折率による物質検出を用いてPLアクトアゲル-OHカラムでのクロマトグラフィーによって決定する（Waters Model 2410）。ヴィスコテック（Viscotek）モデルT60検出装置を連続的粘度及び光散乱測定に用いる。

キャピラリー電気泳動：バックマンコウルターP/ACE MDQ糖タンパク質システム－融合シリカキャピラリー上でのAPTS誘導オリゴ糖の分離－レーザー誘導蛍光による検出。

一次液化：GPCプロセスから直接送られたラインスターチをポンプで60Lのフィードタンクに押し出す（前記タンクでは液化の前にpH、DS（乾燥固形物）及びカルシウムレベルを調整することができる）。グルコアミラーゼをスラリーに添加する。32%DSスラリーを陽圧押しポンプでジェット（加圧混合チャンバー）へ0.7L/分で押し出す（前記チャンバーではデンプンスラリーは蒸気注入によって瞬時に100℃以上に加熱される）。ゼラチン化され部分的に液化したデンプンはパイプのネットワーク（なお加圧下にある）を通して押し出され、ある温度での所望の滞在時間（5分）が与えられる。圧をフラッシュタンクに抜き、サンプルを採取する。サンプルは二重に採取する。

二次液化：液化デンプンを1Lのガラスビンに採取し、95℃の水浴に90分保持する。

【0322】

糖化：

液化デンプンを60℃に冷却し、pHを4.5に調整し、サンプルをグルコアミラーゼで処理

する。糖化の進行はHPLCで時間を追ってモニターする。

糖化：各グルコアミラーゼで生成された液化シロップを、90分の二次液化直後に6NのHClで約pH2.5に調整して、残留する一切のグルコアミラーゼを不活化した。続いて前記シロップをpH4.5に調整し、60℃の水浴に置き、3レベルのグルコアミラーゼで糖化した。糖化の程度は18－88時間の時点でHPLCによりモニターする。

液化シロップは標準用量（2倍強度のグルコアミラーゼの0.04%）及び2つのより低用量（50%及び20%）を用いて糖化し、糖化の進行における一切の相違をモニターした。

糖化の進行- 時間に対する%デキストロース発生－0.04%グルコアミラーゼ。

【実施例 2 2】

【0 3 2 3】

実施例 2 2

グルコアミラーゼを用いたpH4.5でのデンプンの液化

デンプンからグルコースへの変換は2つの酵素の連続作用によって触媒される：すなわち、アミラーゼ（例えばα-アミラーゼ）（本発明の酵素を含む）によってデンプンが液化され（例えば高分子量グルコースポリマーは2から20個のグルコース単位、典型的には例えば本発明のグルコアミラーゼによって、10から20個のデキストロース当量からなるオリゴ糖に加水分解される）、続いてグルコアミラーゼ（本発明のアミラーゼ、例えば配列番号:594）によって糖化される。ある特徴では、この過程は、pH約4.0から4.5のデンプンスラリーを製造するトウモロコシ湿式製粉プラントで生じる。ある特徴では、前記pHは、液化前に例えば5.8から6.0に上昇させられ、低pH活性及び安定性を有するグルコアミラーゼを受容することができる。ある特徴では、本発明のグルコアミラーゼはpH4.5でデンプンを12から18の範囲のデキストロース当量に液化することができ、ある特徴では、デンプン1トン当たり約3から6グラムのレベルで本発明のグルコアミラーゼが用いられる。前記特徴では、本発明のグルコアミラーゼの使用は、pH4.5でのデンプン液化の実施を可能にする。

【0 3 2 4】

ある特徴では、デンプン液化はpH4.5で、105℃で5分から95℃で90分間本発明のグルコアミラーゼを用いて実施される。酵素の量は、標的DEを12から15に調節するために調整される。ある特徴では、液化デンプンは続いて、グルコアミラーゼ（例えばアスペルギルス_{ノボリス}のグルコアミラーゼ）を約pH4.5で60℃、約48時間用いて糖化される。糖化シロップが少なくとも95%のグルコースを含んでいない場合は、標的DEを上昇させ、最終的に95%を超えるグルコースを含む糖化シロップが液化によって生成されるまで糖化を繰り返す。糖化のための適切な液化フィードストックの製造に必要なグルコアミラーゼタンパク質はPAGEによって決定される。

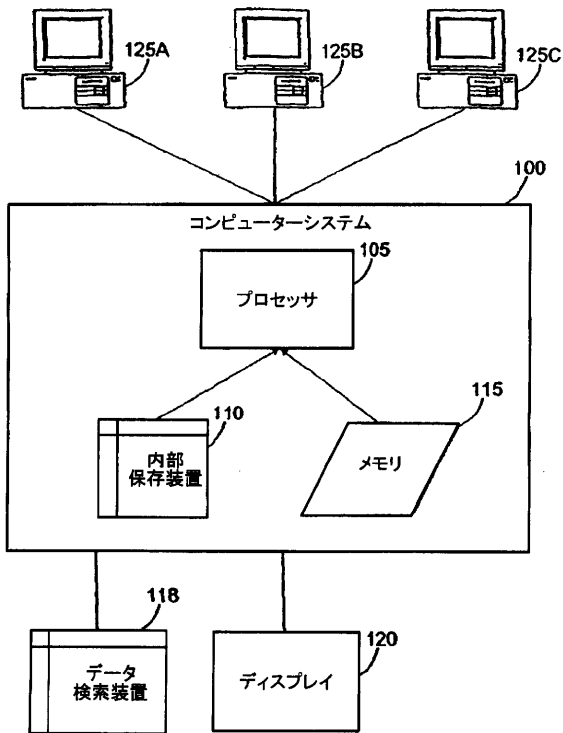
本発明の多数の実施態様を述べてきたが、本発明の範囲から逸脱することなく種々に改変を実施できることは理解されよう。したがって、その他の実施態様も請求の範囲内に包含される。

10

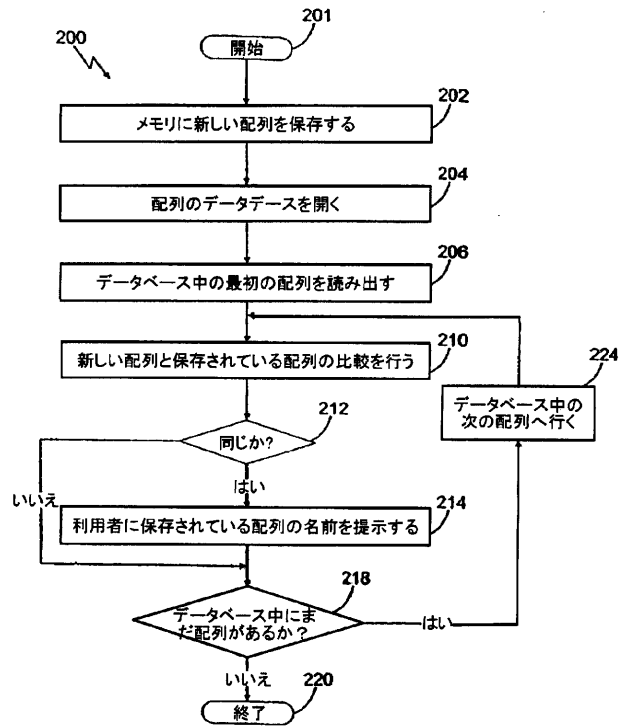
20

30

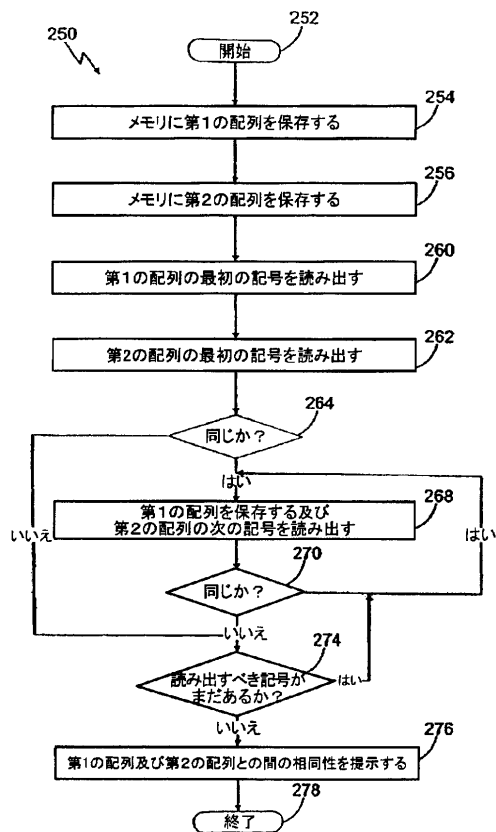
【図 1】



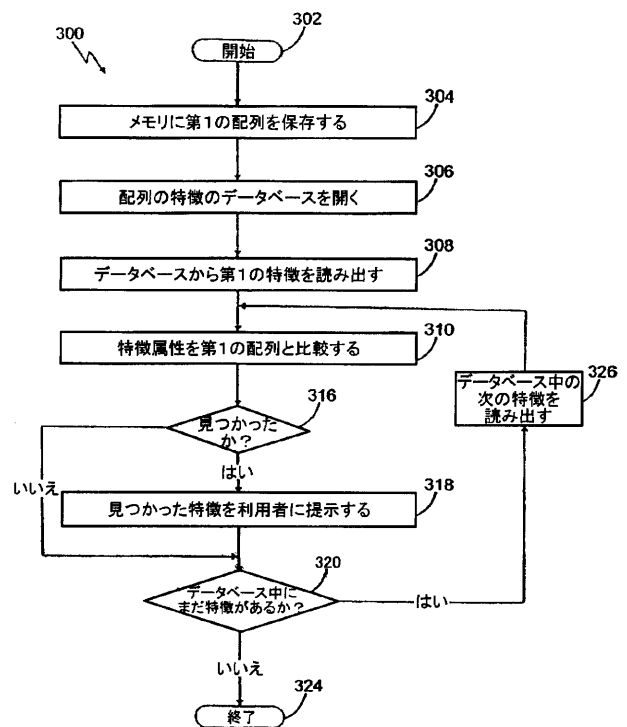
【図 2】



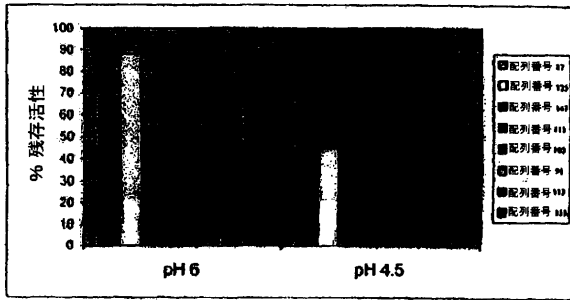
【図 3】



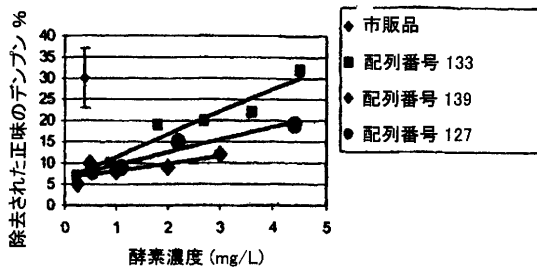
【図 4】



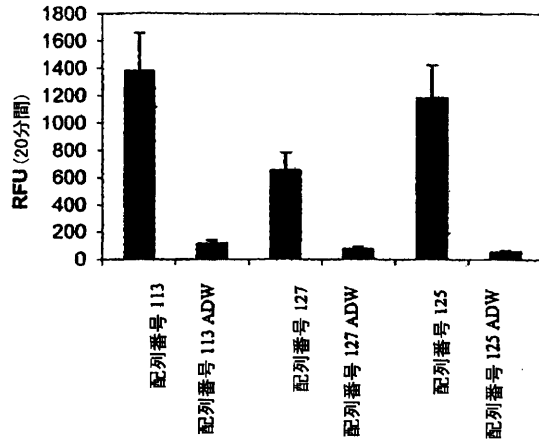
【図 5】



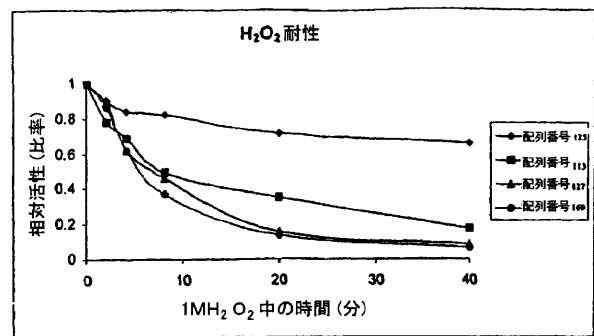
【図 6】



【図 7】



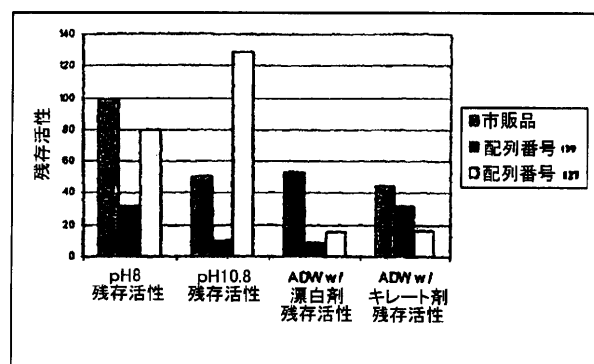
【図 8】



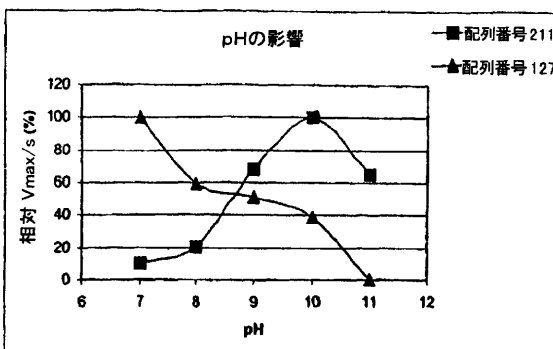
【図 10】

SEQ ID NO.: 113 (1) ...
 SEQ ID NO.: 127 (1) ...
 SEQ ID NO.: 115 (1) ...
 SEQ ID NO.: 113 (76) ...
 SEQ ID NO.: 127 (79) ...
 SEQ ID NO.: 115 (81) ...
 SEQ ID NO.: 113 (156) ...
 SEQ ID NO.: 127 (159) ...
 SEQ ID NO.: 115 (150) ...
 SEQ ID NO.: 113 (234) ...
 SEQ ID NO.: 127 (239) ...
 SEQ ID NO.: 115 (200) ...
 SEQ ID NO.: 113 (312) ...
 SEQ ID NO.: 127 (317) ...
 SEQ ID NO.: 115 (272) ...
 SEQ ID NO.: 113 (390) ...
 SEQ ID NO.: 127 (392) ...
 SEQ ID NO.: 115 (331) ...
 SEQ ID NO.: 113 (468) ...
 SEQ ID NO.: 127 (470) ...
 SEQ ID NO.: 115 (410) ...
 SEQ ID NO.: 113 (485) ...
 SEQ ID NO.: 127 (541) ...
 SEQ ID NO.: 115 (437) ...

【図 13】



【図 12】



【图 1 4 A - 2】

351 400

配列番号 81 AFILTYEQDP VFVYRDYEEN LNKDRLNLI WINDHLAGGS TSVITYDSDE
pyro AFILTYEQDP VFVYRDYEEN LNKDKLNLI WINDHLAGGS TSVITYDSDE
pyro2 AFILTYEQDP VFVYRDYEEN LNKDKLNLI WINDHLAGGS TSVITYDND E
thermo AFILTYEQDP VFVYRDYEEN LNKDKLNLI WINDHLAGGS TSVITYDND E
thermo2 AFILTYEQDP AIFYRDYEEN LNKDRLNLI WINDHLAGGS TDIITYDSDE
コンパサス AFILTYEQDP -IFYRD-EEEN LNKD-L-NLI WINDHLAGGS T-I-YDND E

401 450

配列番号81 MIPVNRGYGS KPLGITIYINL GSSKGVNRWVY VPKFAGACIH EYTNLGGGVH
pyro LIPVRNGDSR KPLGITIYINL GSSKGVNRWVY VPKFAGACIH EYTNLGGGVH
pyro2 LIPVRNGDSR KPLGITIYINL SPNHWGVNRY VPKFAGACIH EYTNLGGGVH
thermo LIPVRNGYGN KPLGITIYINL GSSKGVNRWVY VPKFAGACIH EYTNLGGGVH
thermo2 LIPVRNGYGD KPLGITIYINL GSSKGVNRWVY VPKFAGACIH EYTNLGGGVH
コンヤンサス -IPVRNG-- -KPLGITIYINL ----GRWVY VPKFAG-CIH EYTNLGGGVH

コンセンサス

	451		466
配列番号	DKKYV SSGWV	YFEAPA YDPA	NQOYGYV VNS YCGVGV
pyro1	DKCYE SSGWV	YLEAPA YDPA	SGQYGT VNS YCGVGV
pyro2	DKKVD SSGWV	YLEAPP HDPA	NGTYGT VNS YCGVGV
thermo	DKYGV SSGWV	YLEAPA HDPA	NKQYGY VNS YCGVGV
thermo2	DKKVD SSGRV	YLEAPA HDPA	NQOYGY VNS YCGVGV
コンセンサス	DK-V-S-G-V	Y-EAP--DPA	-G-YGT-VNS YCGVGV

コンセンサス DK-V- S-G-V Y-EAP--DPA -G-YGY-VMS TCGVG*
Antisense primer

【図 1 4 B - 2】

201	VKCCD BQTFQ	GFDDIAHKS	WQWHLWASD	BSYAAYLR SI	GVDMHRP DV	250
配列番号 #1	VKCCD BQTFQ	GFDDIAHKS	WQWHLWASD	BSYAAYLR SI	GVDMHRP DV	
pyro						
配列番号 ¹³	LHAGD SGTFG	GYPDICHSK	WQWHLWASH	BSYAAYLR SI	GIDAMHRP DV	
the mo2	LHAGD SGTFG	GYPDICHSK	WQWHLWASH	BSYAAYLR SI	GIDAMHRP DV	
配列番号 ¹⁵	LHAGD SGTFG	GYPDICHSK	WQWHLWASQ	BSYAAYLR SI	GIDAMHRP DV	
配列番号 ¹⁷	LHAGD SGTFG	GYPDICHSK	WQWHLWASQ	BSYAAYLR SI	GIDAMHRP DV	

[illegible][illegible]

配列番号 33 KGTGA VVVVD WLSQNGHNAV GGYMDTN YDA LNNWATSS GA KVDFPFLLY K

配列番号 33 KGYGA VVVVD WLSQNGHNAV GGYMDTN YDA LNNWATNS GA KVDFPFLLY K

配列番号 39 KGYGA VVVKD WLDNNGHNAV GGYMDTN YDA LNNWATSS DA KVDFPFLLY K

Chromo KGYGA VVKVW WLKWN ALAV LNNWATSS GA KVDFPFLLY K

prr02 KGYGA VVVVD WLVNKGHNAV GGYMDTN YDA LLSWATSS GA KVDFPFLLY K

KGYGA VVVKD WLVNQNGHNAV GGYMDTN YDA LNNWATSS GA KVDFPFLLY K

コンセンサス KGT--VVV--WL--M--AAV GGYMDTN YDA LNNWATSS-A KVDPF-LLY K

配列番号 #1	101		350
	MD5AF DNIMH	PALYDALONG	QTVVSDF PFK AVTVVAHDT DIWUKYLA
	MD5AF DNTHI	PALYDALONG	QTVVSDF PFK AVTVVAHDT DIWUKYPA
配列番号 #2	pyro	MD5AF DNIMH	PALYDALONG
	MD5AF DNTHI	PALYDALONG	QTVVSDF PFK AVTVVAHDT DIWUKYPA
配列番号 #3	the rmo2	MD5AF DNIMH	PALYDALONG
	MD5AF DNTHI	PALYDALONG	QTVVSDF PFK AVTVVAHDT DIWUKYPA
配列番号 #4	17	MD5AF DNIMH	PALYDALYQ
	MD5AF DNTHI	PALYDALYQ	QTVVSDF PFK AVTVVAHDT DIWUKYPA

配列番号 15 MDEAF DNTMI PALYSLQNG GTTVSRD PFK AVTPVANHDT DIHWKPYA Y
配列番号 16 MDAFA DNTMI PALYSLQNG GTTVSRD PFK AVTPVANHDT DIHWKPYA Y
Chemo 17 MDEAF DNTMI PALYSLQNG GTTVSRD PFK AVTPVANHDT DIHWKPYA Y
pysc0 18 MDEAF DNTMI PALYSLQNG GTTVSRD PFK AVTPVANHDT DIHWKPYA Y
クロニンA 19 MDEAF DNTMI PALYSLQNG GTTVSRD PFK AVTPVANHDT DIHWKPYA Y
コンセンサス MD-AFN-MI PALY-A---G -TTVSRD PFK AVTPVANHDT -IHWKY-A Y

配列番号 41	APFLTYBOQP	VIFPDR YERN	LMKRLKLNLI	MINHMLAGS	TSIVTYGDS
配列番号 11	APFLTYBOQP	VIFPDR YERN	LMKRLKLNLI	MINHMLAGS	TSIVTYGDS
配列番号 21	APFLTYBOQP	AIPTDR YERN	LMKRLKLNLI	MINHMLAGS	TSIVTYGDS
配列番号 31	APFLTYBOQP	AIPTDR YERN	LMKRLKLNLI	MINHMLAGS	TSIVTYGDS
配列番号 41	APFLTYBOQP	TIFPDR YERN	LMKRLKLNLI	MINHMLAGS	TSIVTYGDS
配列番号 51	APFLTYBOQP	TIFPDR YERN	LMKRLKLNLI	MINHMLAGS	TSIVTYGDS
配列番号 61	APFLTYBOQP	VIFPDR YERN	LMKRLKLNLI	MINHMLAGS	TSIVTYGDS

[illegible]

【図 14 C - 1】

	451		487
配列番号 11	VDKIV YSSGN	VYFRAP AYDP	ANGQYGV SVM
pyro	VDKIV YSSGN	VYLEAP AYDP	ASGQYGV TVM
配列番号 73	VDKIV DSSGR	VYLEAP AHDP	ANGQYGV SVM
themo2	VDKIV DSSGR	VYLEAP AHDP	ANGQYGV SVM
配列番号 75	VDKIV DSSGV	VYLEAP AHDP	ANGQYGV SVM
配列番号 77	VDKIV DSSGV	VYLEAP AHDP	ANGQYGV SVM
配列番号 81	VDKIV YSSGN	VYLEAP AHDP	ANGYGVY SVM
配列番号 85	VDKIV YSSGN	VYLEAP AHDP	ANGQYGV SVM
配列番号 79	VDKIV DSSGV	VYLEAP AHDP	ANGYGVY SVM
themo	VDKIV GSKNM	VYLEAP AHDP	AKQGYGV SVM
pyro2	VDKIV DSSGV	VYLEAP PHDP	ANGYGVY SVM
クロンサン	VDYRV YTGDM	VGLTAP PHDP	ANGYGVY SVM
コンセンサス	D--V---G--G-	V---AP--DP	A-G-TGY--VY

	51				100
配列番号	83	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	84	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	85	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	86	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	87	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	88	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	89	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	90	-----	-----	-----	ATGGCTCTGG
配列番号	91	CGCGGGG CTC	TACGCCCA GC	CGCGGGGGG GC	GGCCAAAGTAC
配列番号	92	CATGGCA CTC	GTTGCACA GC	CAGCTAGCG C	CGCAAAGTAT
配列番号	93	CGCGGGG ATT	TACTACCC CT	CCAGCAAGTG C	CGGAAAGTAC
配列番号	94	-----	-----	-----	TCCGAGCTGG
配列番号	95	-----	-----	-----	TCGAGAGCTG

		101				150		
配列	83	ANGAGGG	CGG	GCTCTAA	TG	CAGGCGTTC	ACTGGAGATG	TCTCTGGAGGA
配列	84	ANGAGGG	CGG	GCTTTAA	TG	CAGGCAATC	ATTGGAGCT	CCCAAGTGA
配列	85	ANGAGGG	CGG	GCTTTAA	TG	CAGGCAATC	T	CCCAAGTGA
配列	86	ANGAGGG	CGG	GCTCTAA	TG	CAGGCGTTC	ACTGGAGCT	CCCAATGGA
配列	87	TAGAGGG	CGG	GCTTTAA	TG	CAGGCGTTC	ACTGGAGCT	CCCAAGTGA
配列	88	ANGAGGG	CGG	GCTCTAA	TG	CAGGCGTTC	ACTGGAGCT	CCCTCTAGGA
配列	89	ANGAAGG	CGG	GCTTTAA	TG	CAGGCGTTC	ACTGGAGCT	CCCAAGTGA
配列	90	ANGAAGG	CGG	AGTCTAA	TG	CAGGCGTTC	ACTGGAGCT	TCTGGAGGA
配列	91	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	92	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	93	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	94	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	95	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	96	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	97	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	98	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	99	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT
配列	100	-----	GG	CG	TT-ATAA	TG	CAGGCGTTC	A-TGGAG-CT

[illegible][illegible]

【図 1 4 C - 3】

		251			300
配列番号	81	GTTATTC CAT	GGGTACG AT	CCCTACGAT T	TCITTTGACCT CGGCGAGTAC
配列番号	76	GTTATTC CAT	GGGTACG AT	CCCTACGAT T	TCITTTGACCT CGGCGAGTAC
配列番号	71	GCTATTC GAT	GGGTACG AC	CCCTACGAT T	ATTTTTCGCT CGGTGAGTAC
配列番号	77	GCTATTC GAT	GGGTACG AC	CCCTACGAT T	ATTTTTCGCT CGGTGAGTAC
配列番号	73	GCTATTC GAT	GGGTACG AC	CCCTACGAT T	TCITTCGACT CGGTGAGTAC
配列番号	70	GCTATTC GAT	GGGTACG AC	CCCTACGAT T	TCITTTGACCT CGGTGAGTAC
配列番号	91	GTATTC GAT	GGGTACG AT	CCCTACGAT T	TCITTTGACCT CGGCGAGTAC
配列番号	90	GTTATTC CAT	GGGTACG AC	CCCTACGAT T	ACTTTGAGCT GGGCGAGTAC
クローンA		-TA-TC-AT	GGGTACG A	CCCTACGA- T	-TT-GA-CT-
コンセンサス					GGG-GAGT--

[illegible]

配列番号	番号	400
配列番号 40	GAACATG ATA AACAACGCG AC ACTCTCATCG C	CATTAAGGTTG ATTAGCGAGCA
配列番号 41	GAACATG ATA AACAACGCG AC ACTCTCATCG C	CATTAAGGTTG ATTAGCGAGCA
配列番号 75	AAACATG ATA AACAACGCG C ACCGCTATG C	CHTGAAGTTA ATTAGCGAATA
配列番号 77	AAACATG ATA AACAACGCG C ACCGCTATG C	CATTAAGGTTG ATTAGCGAATA
配列番号 79	GAACATG ATA AACAACGCG C ATGCTCACA A	CATTAAGGTTG ATTAGCGAGCA
配列番号 79	GAACATG ATA AACAACGCG C ATGCTCACA A	CATTAAGGTTG ATTAGCGAGCA
配列番号 80	CAATCATG ATA AACAACGCG C	CATTAAGGTTG ATTAGCGAGCA
配列番号 81	CAACATG ATC TCCACGCG C	ACCAGTGAATG ATTAGCGAGCA
コンセンサス	-AA-ATG AT- -CAG-CG C A- - - - - CAT-AGGTT- AT-GC-GA-A	

配列番号	番号	401	450
配列番号 61	70	TAGTCAT AAA CCAACCGCC GC	GGTGGAGAC C TGGATGGAA CCCCTTCGT
配列番号 62	71	TAGTCAT AAA CCAACCGCC GC	GGTGGAGGC C TGGATGGAA CCCCTTCGT
配列番号 63	72	TAGTCAT AAA CCAACCGCC GC	TGCGGCGGC C TGGATGGAA CCCCTTCGT
配列番号 64	73	TAGTCAT AAA CCAACCGCC GC	GGCGGCGGC C TGGATGGAA CCCCTTCGT
配列番号 65	74	TAGTCAT CAA CCAACCGCC GC	GGGCGCGAC C TGGATGGAA TCCCTTCAC
配列番号 66	75	TAGTAAT CAA CCAACCGCC GC	GGAGCGGAC C TGGATGGAA TCCCTTCAC
配列番号 67	76	TGCTGAT AAA CCAACCGCC CA	GGGCGGAGC C TGGATGGAA TCCCTTCAC
配列番号 68	77	TGCTGAT CAA CCAACCGCC CA	TCGATGAGC C TGGATGGAA TCCCTTCAC
配列番号 69	78	TGCTGAT AAA CCAACCGCC GC	GGGCGGAGC C TGGATGGAA TCCCTTCAC
配列番号 70	79	TGCTGAT AAA CCAACCGCC GC	GGGCGGAGC C TGGATGGAA TCCCTTCAC

[illegible][illegible][illegible][illegible]

	651		700
配列番号 01	AGGGGTT GAC	GCTCTGGGCTT	TGCACTACGT T
配列番号 02	AGGGGTT GAT	GCTCTGGGTTT	TGCACTACGT T
配列番号 03	AGGGGTT GAT	GCTCTGGGTTT	TGCACTACGT T
配列番号 04	AGGCATC TAC	GCTCTGGGTTT	TGCACTACGT T
配列番号 05	AGGCATC GAT	GCTCTGGGTTT	TGCACTACGT T
配列番号 06	AGGCATC GAT	GCTCTGGGTTT	TGCACTACGT T
配列番号 07	CGCGCTT GAT	GCATATGGGCT	TGCACTACGT T
配列番号 08	CGCGCTT GAT	GCATATGGGCT	TGCACTACGT T
配列番号 09	CGCGCTT GAT	GCATATGGGCT	TGCACTACGT T
配列番号 10	AGGGATC GAT	GGGTGGGCGCT	TTGACTACGT T
クローン A			

[illegible]

【図 1 4 C - 4】

751
 配列番号 41 TGGGACA CGA ACGTGTGATGC ACTGCTCAAC TGGGCATACA GCACGCGCGC
 配列番号 45 TGGGACA CTA ACGTGTGATGC ACTGCTCAAC TGGGCATACA GCACGCGCGC
 配列番号 49 TGGGACA CCA ACGTGTGATGC ACTGCTCAAC TGGGCATACA GCACGCGCGC
 配列番号 53 TGGGACA CCA ACGTGTGATGC ACTGCTCAAC TGGGCATACA GCACGCGCGC
 配列番号 57 TGGGACA CCA ACGTGTGATGC ACTGCTCAAC TGGGCATACA GCACGCGCGC
 配列番号 61 TGGGACA CCA ACGTGTGATGC ACTGCTCAAC TGGGCATACA GCACGCGCGC
 クローンA
 コンセンサス TGGGACA CCA ACGTGTGATGC ACTGCTCAAC TGGGCATACA GCACGCGCGC

801
 配列番号 41 CAAGGTC TTT GACTTCCGCG TCTACTACAA GATGGACGAA GCCTTCGACA
 配列番号 45 CAAGGTC TTT GACTTCCGCG TCTACTACAA GATGGACGAA GCCTTCGACA
 配列番号 49 CAAGGTC TTT GACTTCCGCG TCTACTACAA GATGGACGAA GCCTTCGACA
 配列番号 53 CAAGGTC TTT GACTTCCGCG TCTACTACAA GATGGACGAA GCCTTCGACA
 配列番号 57 CAAGGTC TTT GACTTCCGCG TCTACTACAA GATGGACGAA GCCTTCGACA
 配列番号 61 CAAGGTC TTT GACTTCCGCG TCTACTACAA GATGGACGAA GCCTTCGACA
 クローンA
 コンセンサス CAAGGTC TTT GACTTCCGCG TCTACTACAA GATGGACGAA GCCTTCGACA

851
 配列番号 41 ACACCAA CAT CCGCGGATTA GTGGATGCA TCAGATACGG CCAGACAGTG
 配列番号 45 ATACCAA CAT CCGCGGATTA GTGGATGCA TCAGATACGG CCAGACAGTG
 配列番号 49 ACACCAA CAT CCGCGGATTA GTGGATGCA TCAGATACGG CCAGACAGTG
 配列番号 53 ACACCAA CAT CCGCGGATTA GTGGATGCA TCAGATACGG CCAGACAGTG
 配列番号 57 ACACCAA CAT CCGCGGATTA GTGGATGCA TCAGATACGG CCAGACAGTG
 配列番号 61 ACACCAA CAT CCGCGGATTA GTGGATGCA TCAGATACGG CCAGACAGTG
 クローンA
 コンセンサス ACACCAA CAT CCGCGGATTA GTGGATGCA TCAGATACGG CCAGACAGTG

901
 配列番号 41 GTGAGCG GCG ATCCGCTTAA GCGCGTAAC TTCTGTGCA ACCAGATATC
 配列番号 45 GTGAGCG GCG ATCCGCTTAA GCGCGTAAC TTCTGTGCA ACCAGATATC
 配列番号 49 GTGAGCG GCG ATCCGCTTAA GCGCGTAAC TTCTGTGCA ACCAGATATC
 配列番号 53 GTGAGCG GCG ATCCGCTTAA GCGCGTAAC TTCTGTGCA ACCAGATATC
 配列番号 57 GTGAGCG GCG ATCCGCTTAA GCGCGTAAC TTCTGTGCA ACCAGATATC
 配列番号 61 GTGAGCG GCG ATCCGCTTAA GCGCGTAAC TTCTGTGCA ACCAGATATC
 クローンA
 コンセンサス GTGAGCG GCG ATCCGCTTAA GCGCGTAAC TTCTGTGCA ACCAGATATC

951
 配列番号 41 AGATATA ATC TGGACAA GT ATCCGCTTAA TGCATTCATC CTACCTATAG
 配列番号 45 AGATATA ATC TGGACAA GT ATCCGCTTAA TGCATTCATC CTACCTATAG
 配列番号 49 AGATATA ATC TGGACAA GT ATCCGCTTAA TGCATTCATC CTACCTATAG
 配列番号 53 AGATATA ATC TGGACAA GT ATCCGCTTAA TGCATTCATC CTACCTATAG
 配列番号 57 AGATATA ATC TGGACAA GT ATCCGCTTAA TGCATTCATC CTACCTATAG
 配列番号 61 AGATATA ATC TGGACAA GT ATCCGCTTAA TGCATTCATC CTACCTATAG
 クローンA
 コンセンサス AGATATA ATC TGGACAA GT ATCCGCTTAA TGCATTCATC CTACCTATAG

【図 1 4 C - 5】

1001
 配列番号 41 AGGGACA GGC TGTATAT TC TACCGCGATC ACGAGGATG GCTCAACAAG
 配列番号 45 AGGGACA GGC TGTATAT TC TACCGCGATC ACGAGGATG GCTCAACAAG
 配列番号 49 AGGGACA GGC TGTATAT TC TACCGCGATC ACGAGGATG GCTCAACAAG
 配列番号 53 AGGGACA GGC TGTATAT TC TACCGCGATC ACGAGGATG GCTCAACAAG
 配列番号 57 AGGGACA GGC TGTATAT TC TACCGCGATC ACGAGGATG GCTCAACAAG
 配列番号 61 AGGGACA GGC TGTATAT TC TACCGCGATC ACGAGGATG GCTCAACAAG
 クローンA
 コンセンサス AGGGACA GGC TGTATAT TC TACCGCGATC ACGAGGATG GCTCAACAAG

1051
 配列番号 41 GATAAGC TTA ACAACCTC AT CTGGATACA C GATCAGCTTG CTGGAGGAG
 配列番号 45 GATAAGC TTA ACAACCTC AT CTGGATACA C GATCAGCTTG CTGGAGGAG
 配列番号 49 GATAAGC TTA ACAACCTC AT CTGGATACA C GATCAGCTTG CTGGAGGAG
 配列番号 53 GATAAGC TTA ACAACCTC AT CTGGATACA C GATCAGCTTG CTGGAGGAG
 配列番号 57 GATAAGC TTA ACAACCTC AT CTGGATACA C GATCAGCTTG CTGGAGGAG
 配列番号 61 GATAAGC TTA ACAACCTC AT CTGGATACA C GATCAGCTTG CTGGAGGAG
 クローンA
 コンセンサス GATAAGC TTA ACAACCTC AT CTGGATACA C GATCAGCTTG CTGGAGGAG

1101
 配列番号 41 TACTGAC ATT GTTTACTA CG ACAGCGACG A GCTTATCTTT GTGAGAAAG
 配列番号 45 TACTGAC ATT GTTTACTA CG ACAGCGACG A GCTTATCTTT GTGAGAAAG
 配列番号 49 TACTGAC ATT GTTTACTA CG ACAGCGACG A GCTTATCTTT GTGAGAAAG
 配列番号 53 TACTGAC ATT GTTTACTA CG ACAGCGACG A GCTTATCTTT GTGAGAAAG
 配列番号 57 TACTGAC ATT GTTTACTA CG ACAGCGACG A GCTTATCTTT GTGAGAAAG
 配列番号 61 TACTGAC ATT GTTTACTA CG ACAGCGACG A GCTTATCTTT GTGAGAAAG
 クローンA
 コンセンサス TACTGAC ATT GTTTACTA CG ACAGCGACG A GCTTATCTTT GTGAGAAAG

1151
 配列番号 41 GCTATGG GAC CAACACG GA CTGATAACC T ATATCAACT CGGCTCAAGC
 配列番号 45 GCTATGG GAC CAACACG GA CTGATAACC T ATATCAACT CGGCTCAAGC
 配列番号 49 GCTATGG GAC CAACACG GA CTGATAACC T ATATCAACT CGGCTCAAGC
 配列番号 53 GCTATGG GAC CAACACG GA CTGATAACC T ATATCAACT CGGCTCAAGC
 配列番号 57 GCTATGG GAC CAACACG GA CTGATAACC T ATATCAACT CGGCTCAAGC
 配列番号 61 GCTATGG GAC CAACACG GA CTGATAACC T ATATCAACT CGGCTCAAGC
 クローンA
 コンセンサス GCTATGG GAC CAACACG GA CTGATAACC T ATATCAACT CGGCTCAAGC

1201
 配列番号 41 AAGGTTG GAA GGTGGGT TA CGTT...CC A AGTTTCGCG GTTCATGAT
 配列番号 45 AAGGTTG GAA GGTGGGT TA CGTT...CC A AGTTTCGCG GTTCATGAT
 配列番号 49 AAGGTTG GAA GGTGGGT TA CGTT...CC A AGTTTCGCG GTTCATGAT
 配列番号 53 AAGGTTG GAA GGTGGGT TA CGTT...CC A AGTTTCGCG GTTCATGAT
 配列番号 57 AAGGTTG GAA GGTGGGT TA CGTT...CC A AGTTTCGCG GTTCATGAT
 配列番号 61 AAGGTTG GAA GGTGGGT TA CGTT...CC A AGTTTCGCG GTTCATGAT
 クローンA
 コンセンサス AAGGTTG GAA GGTGGGT TA CGTT...CC A AGTTTCGCG GTTCATGAT

【図 1 4 C - 6】

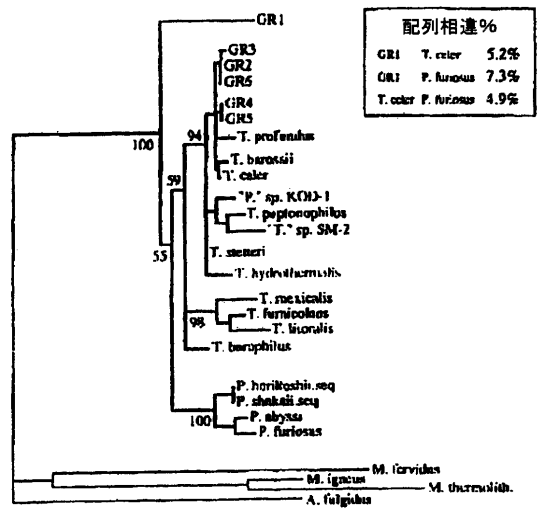
1251
 配列番号 41 CCACGAG TAC ACCGGCAA CC TCGGCGGTTG GATAGACAAG TACGCTCTCT
 配列番号 45 CCACGAG TAC ACCGGCAA CC TCGGCGGTTG GATAGACAAG TACGCTCTCT
 配列番号 49 CCACGAG TAC ACCGGCAA CC TCGGCGGTTG GATAGACAAG TACGCTCTCT
 配列番号 53 CCACGAG TAC ACCGGCAA CC TCGGCGGTTG GATAGACAAG TACGCTCTCT
 配列番号 57 CCACGAG TAC ACCGGCAA CC TCGGCGGTTG GATAGACAAG TACGCTCTCT
 配列番号 61 CCACGAG TAC ACCGGCAA CC TCGGCGGTTG GATAGACAAG TACGCTCTCT
 クローンA
 コンセンサス CCACGAG TAC ACCGGCAA CC TCGGCGGTTG GATAGACAAG TACGCTCTCT

1301
 配列番号 41 CCAGCGG CTG GGTCTATC TT GAGGCGCCAG CCCAGGACCC GCGGAACGCG
 配列番号 45 CCAGCGG CTG GGTCTATC TT GAGGCGCCAG CCCAGGACCC GCGGAACGCG
 配列番号 49 CCAGCGG CTG GGTCTATC TT GAGGCGCCAG CCCAGGACCC GCGGAACGCG
 配列番号 53 CCAGCGG CTG GGTCTATC TT GAGGCGCCAG CCCAGGACCC GCGGAACGCG
 配列番号 57 CCAGCGG CTG GGTCTATC TT GAGGCGCCAG CCCAGGACCC GCGGAACGCG
 配列番号 61 CCAGCGG CTG GGTCTATC TT GAGGCGCCAG CCCAGGACCC GCGGAACGCG
 クローンA
 コンセンサス CCAGCGG CTG GGTCTATC TT GAGGCGCCAG CCCAGGACCC GCGGAACGCG

1351
 配列番号 41 TACTAGCG GCT ACTCGGTA TG GAGCTACTGC GGGTTGGGT GA-
 配列番号 45 TACTAGCG GCT ACTCGGTA TG GAGCTACTGC GGGTTGGGT GA-
 配列番号 49 TACTAGCG GCT ACTCGGTA TG GAGCTACTGC GGGTTGGGT GA-
 配列番号 53 TACTAGCG GCT ACTCGGTA TG GAGCTACTGC GGGTTGGGT GA-
 配列番号 57 TACTAGCG GCT ACTCGGTA TG GAGCTACTGC GGGTTGGGT GA-
 配列番号 61 TACTAGCG GCT ACTCGGTA TG GAGCTACTGC GGGTTGGGT GA-
 クローンA
 コンセンサス TACTAGCG GCT ACTCGGTA TG GAGCTACTGC GGGTTGGGT GA-

【図 1 5】

テルモコッカス目(Thermococcales)に関する近隣結合樹



GR1

100回のブートストラップ値

Summit & Harman, Deep-Sea Research Pt. II, in press

SEQ ID NO.: 55

【図 1 6 L L】

Tyr Asp Gly Asp Ser Asn Val Leu Leu Lys Phe Ala Pro Met Pro Val Phe Asn Phe Ser Phe Met Tyr
 Asp Arg Arg Gly Asn Phe Glu Gly Arg Asp Asn Leu Ile Ser Asp Ser Ile Ser Tyr Val Asp Ser Ser
 Leu Tyr Asn Leu Asn Val Phe His Phe Pro Phe Ile Asp Ser His Asp Asn Arg Phe Ile Asn Ser Glu
 Leu Val Asp Ser Lys Tyr Gln Gly Asp Val Ile Ser Asp Tyr Lys Gln Tyr Leu Leu Val Asn Ala Leu
 Leu Leu Ser Leu Thr Gly Met Pro Thr Ile Tyr Tyr Gly Gly Asp Glu Ile Gly Leu Arg Gly Tyr Lys Thr
 His Ser Glu Pro Thr Asp Ile Asp Ile Pro Val Arg Glu Gly Thr Tyr Lys Asp Asn Gln Lys Gln Asn Gly
 Gln Thr Tyr Glu Thr Tyr Lys Glu Phe Val Arg Gly Glu Ile Thr Glu Gly Ser Ala Asn Glu Asp Gly Ala Ile
 Tyr Asp Asp Pro Asp Asp Gly Val Ser Val Glu Glu Gln Glu Asn Gly Tyr Ser Ile Leu Asn Asp Phe
 Lys Glu Phe Ile Asn Leu Arg Lys Val Asp Tyr Pro Ala Leu Ala Phe Gly Ser Thr Thr Ile Glu Arg Phe
 Tyr Lys Asn Leu Tyr Val Leu Lys Lys Ser Tyr Asn Phe Gln Asp Val Leu Val Leu Ile Asn Leu Asp
 Pro Thr Tyr Ser Asn Thr Tyr Glu Val Pro Glu Gly Tyr Lys Val Tyr Val Tyr Ala Phe Phe Asn Asp
 Asp Asn Tyr Glu Phe Gly Ala Lys Asp Glu Met Ile Leu Gln Asn Thr Ser Tyr Thr Ile Asn Pro Arg
 Gln Ile Tyr Ile Phe Val Lys

SEQ ID NO: 99

cttgatggatgacatggtttgttcggttcacagcaaaatgacacacgttgtagtgatgaagacatcatcatgtagaacctcactatg
gacatcagcagctgaataaataatgataaacaacatcaatgaacacgttcgtttgttagtggtgttggaacacacctcagacac
acctgggttcgtggaatgcgttggaagacaaacaggaattcgaatagtgagcatcatatgaatcattgaataagacgttggaatcact
ggatcagtgagatnactcaaaaggccaanaatgtaattctcggacgtgttgatcagctccggttgatgtaattgcgacatccacacgt
gacgaacaaatcagagaataacatgataacatgacatggtttggtgagtggttcaacttgatgcacaaagcactacaaggctggatggg
acacgacgattcattggttcacagacacgcagggaanaagaatgatactacagcaacgttggaagacagctgagtggttcgtggga
gtgatcagtgatgaacatccatcgctgttccaatcttgaccctggttcacatcatcgtatgataaagaacacaaatgaggggg
aaagataactctgctggagaacaaatcattgggttaatgagcagatgtatctacacgataaaactctccgctatgacacacatgga
acacgattgatcgtatcactgacaaagacacacacacacagcattgacgacgataatttccagctgctctgctcttcctta
aacgttgatcgtatgattatgggaatgaatggatgacgaggaatgaatggcggacacccctgttggttcgcgttgacgagcga
tgcagtgtgacgaatgaagggatggctgtggcagatggtagtgcacagctgttcacccaagaaagaatcattggaatgaaacgaac
gtcgttggttcgatgtacgatgacaaatgattgggtttcagtgaagacagatggttcacagataaabaacttttacaacttaca
acctggaagaacagatccgctcatcagaaatgctgtatcaacgagcagacgcgactggagacacctgcgtttacaacagctcaca
cctaagaagctctgttatgataacagacacactggccgacaaatcagatcaacgttggtgacagctgtgtgtgtgtgtgtttta
tggggtgtgtgtgatttggcctaataaacgaatcacctgacgcaatatacaactgtgacatccacggcaagtgtgtgtgtgaa
gacata

【図 1 6 M M】

【図 1 6 N N】

SEQ ID NO: 101

SEQ ID NO: 103

SEO ID NO: 102

SEQ ID NO: 104

Val Leu Thr Phe His Arg Ile Ile Arg Lys Gly Trp Met Phe Leu Leu Ala Phe Leu Thr Ala Ser
Leu Phe Cys Pro Thr Gly Gln Pro Ala Lys Ala Ala Phe Thr Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe
Glu Trp Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Thr Trp Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn Leu Ser Ser
Leu Gly Ile Thr Ala Leu Thr Leu Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly
Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Gln Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Asp Val
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val
Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg
Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Thr Trp Lys Phe Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn
Thr Trp Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu
Ser Arg Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Asp Trp Thr Glu Val Asp Thr Glu Asn Asn
Asn Tyr Asp Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn
Trp Gly Glu Trp Tyr Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly

【図 1 6 P P】

Glu Pro Gly Gln Ser Leu Gln Ser Thr Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 Thr Arg Gln Gly Gly Tyr Pro Cys Ile Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Tyr Tyr Ala Ile Pro
 Ala Leu Ser Ser Lys Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp
 Tyr Ile Asp Asn Ala Asp Ile Ile Gly Thr Arg Gln Gly Val Ala Gln Lys Ala Asn Ser Gly Leu
 Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys Thr Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys
 Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gln Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp Gly Tyr Gly Gly Phe
 Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Thr Val Pro Lys Thr Ser Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val
 Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gln Asn Ile Ser Gln Leu Gly Asn

SEQ ID NO: 107

[illegible]

SEQ ID NO: 108

SEQ ID NO: 108

Met Asp Ser Leu Asp Ala Pro Glu Gln Lys Pro Trp Val Lys Asp Gly Arg Leu Ser Ala Tyr Leu Asp
Thr Gly Thr Gly Thr Val Val Ala Pro Glu Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Glu Glu Val Arg
Pro Val Asp Lys Trp Lys Asn Asp Ile Ile Tyr Phe Val Leu Thr Asp Arg Phe Gln Asp Gly Asp Lys
Thr Asn Asn Met Asp Val Val Pro Thr Asp Met Lys Lys Tyr His Gly Gly Asp Ile Gln Gly Ile
Asp Lys Leu Asp Tyr Ile Lys Gln Thr Gly Ser Thr Ala Ile Leu Thr Pro Met Lys Gly Gln
Thr His Phe Phe Glu Thr Asp Asn Tyr His Gly Tyr Pro Ile Asp Phe Tyr Asp Thr Asp Pro His
Val Gly Thr Met Gln Lys Phe Glu Glu Leu Ile Glu Lys Ala His Gly Lys Glu Ile Ile Val Thr
Asp Ile Pro Leu Asn His Thr Ala Trp Glu His Pro Phe Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Lys Asp Trp Phe
His His Ile Gly Asp Val Lys Asp Trp Glu Asp Pro Tyr Trp Ala Glu Asn Gly Ser Ile Phe Gly Leu
Pro Asp Ile Ala Gln Glu Asn Pro Ala Val Glu Lys Tyr Leu Ile Asp Val Ala Lys Phe Thr Val Asp
Lys Gly Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys Asn Val Pro Leu Asn Phe Thr Ala Lys Phe Asp
Arg Ala Ile His Asp Tyr Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Gly Val Gly Tyr Phe Gly Asp Gln Pro Ala
Lys Val Ala Asn Tyr Gln Arg Met Met Ser Ser Leu Phe Asp Tyr Pro Leu Tyr Thr Leu Lys
Asp Thr Phe Ala Lys Asp Gly Ser Met Arg Asn Ser Leu Ala Lys Leu Asp Gln Cys Asp Arg Asn
Asn Tyr Pro Asp Pro Gly Leu Met Ser Val Phe Leu Asp Asn His Asp Thr Pro Arg Phe Leu Thr Glu Ala
Asn Gln Lys Asp Lys Lys Leu Lys Leu Ala Phe Ala Thr Thr Ile Asn Asp Arg Met Pro Thr Ile
Tyr Tyr Thr Gly Glu Val Ala Met Glu Gly Asn Cys Asp Ile Met Gly Ala Val Asp Asn Arg Asn
Asp Met Gln Trp Asp Lys Asp Pro Asp Met Phe Lys Thr Phe Lys Thr Leu Thr Ala Arg Arg
Gln His Glu Ser Leu Asp Gly Lys Lys Leu Glu Met Trp Glu Asp Asp Lys Val Tyr Ala Tyr Gly
Arg Gln Thr Pro Lys Asp Glu Ser Ile Val Val Leu Asn Asn Asp Cys Tyr Asn Thr Gln Gly Arg Asn Ile

【図 1 6 R R】

1atctccgacgatagggacgatgacgtgcttgctgactgtcaaaaggtaacgagcgtgggtgttaacagctggctacacgtggggag
 gtggccgctggagctatgggacaccaagtgtagctgtcttaacgggtacacaaagcgtggcgcaagctgtcttaccctgcctac
 tacaaagggtgagagacgtttgacaaagccctcccgctgttgcctccctacaaagcagggagacagctgttcccgacacccctaca
 ggcaatcctctgttgcgcacacacagatgataatctgacaaagatcctgttgcctatcctacttactgacacacgtgtatat
 ctacgcgacatggagagctgtgacaaaggctgataccttaacacgtttggatgacagcctctggcgagagatgaacaaacctat
 ctctacgatacgtacgatactatattatggaggagctgcagcagcggggctctaaacctacacacgtggaaacagctggg
 cgcagctgggtgggaacggtgcctaaagttcgcgctacacatcgaataacagcgaatcctgggtggctgggtacgacggtggct
 agtacgacgagtggttaactgacgcgcctctctgacgaccccaacggatattcggctactcgttggagctacgagggctgat

SEO ID NO: 112

SEQ ID NO: 112

Met Pro Ala Phe Lys Ser Lys Val Met His Met Lys Leu Lys Tyr Leu Ala Leu Val Leu Ala Val
Ala Ser Ile Gly Leu Leu Ser Thr Pro Val Gly Ala Ala Lys Tyr Ser Ser Glu Leu Glu Gly Gly Val
Met Glu Ala Phe Tyr Thr Asp Asp Val Pro Thr Gly Gly Ile Tyr Trp Asp Thr Ile Arg Glu Lys Ile Pro
Glu Trp Tyr Asp Ala Gly Ile Ser Ala Ile Trp Ile Pro Ala Ser Lys Gly Met Gly Lys Ala Tyr Ser
Met Gly Tyr Asp Pro Tyr Asp Phe Phe Asp Leu Gly Glu Tyr Trp Glu Lys Gly Thr Val Glu Thr
Arg Phe Gly Ser Lys Glu Leu Val Asp Asn Met Ile Asn Thr Ala His Ser Tyr Gly Ile Lys Val Ile
Ala Asp Ile Val Ile Asn His Arg Ala Gly Gly Asp Leu Glu Trp Asn Pro Phe Val Asn Asn Thr Thr
Trp Thr Asp Phe Ser Lys Val Ala Ser Gly Lys Tyr Thr Ala Asn Tyr Leu Asp Phe His Pro Asn Glu
Lys Val Cys Cys Asp Glu Ser Glu Thr Phe Tyr Asp Phe Pro Asp Ile Ala His Glu Lys Ser Trp Asp Gin
Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Asn Gly Ser Thr Ala Ala Tyr Leu Arg Ser Ile Gly Ile Asp Ala Trp Arg
Phe Asp Tyr Val Lys Gly Tyr Gly Ala Trp Val Val Asn Asp Trp Ser Gly Tyr Trp Gly Trp Trp
Ala Val Gly Glu Tyr Trp Asp Thr Asn Val Asp Ala Leu Asn Trp Ala Tyr Asn Ser Gly Ala Lys Val
Phe Asp Phe Pro Leu Tyr Tyr Lys Met Asp Glu Ala Phe Asn Asn Thr Asn Ile Pro Ala Leu Val Tyr
Ala Leu Gin Asn Gly Gly Thr Val Val Ser Asp Asp Pro Phe Lys Ala Val Thr Phe Val Ala Asn His
Asp Thr Asp Ile Ile Trp Asn Lys Tyr Pro Ala Tyr Phe Ile Leu Thr Tyr Gly Glu Gin Pro Val Ile
Phe Tyr Arg Asp Tyr Glu Glu Trp Leu Asn Lys Asp Lys Leu Asn Asn Leu Ile Trp Ile His Glu Lys
Leu Ala Gly Gly Ser Thr Lys Ile Leu Tyr Tyr Asp Asn Asp Glu Leu Ile Phe Met Arg Gly Gly Tyr
Gly Ser Lys Pro Gly Leu Ile Thr Tyr Ile Asn Leu Gly Asn Asp Trp Ala Glu Arg Trp Val Asn Arg
Gly Ser Lys Phe Ala Gly Tyr Thr Ile His Glu Tyr Thr Gly Asn Asp Gly Gly Tyr Val Asp Asp Gly
Val Glu Tyr Asp Gly Trp Val Lys Leu Thr Ala Pro Pro His Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Tyr Gly Tyr
Ser Val Trp Ser Tyr Tyr Ala Gly Val Gly

SEO ID NO: 113

[illegible]

agctcgggtgcaaattca

[illegible]

【図 1 6 T T】

Met Leu Ala Leu Ser Leu Gly Gly Cys Gly Ile Asp Ala Gly Pro Thr Gly Pro Arg Val Val Glu Pro
Leu Pro Glu Arg Pro Thr Leu Pro Glu Gly Thr Ala Ala Ser Gly His Ala Ala Gly Asp Val Phe
Val His Leu Phe Ghu Trp Lys Trp Pro Asp Ile Ala Glu Gly Cys Glu Asn Val Leu Gly Pro Ala Gly
Tyr Glu Ala Val Glu Val Ser Pro Glu Glu His Leu Val Glu Glu Gly Ala Pro Trp Glu Arg
Tyr Glu Pro Val Ser Tyr Ser Val Leu Asp Ser Arg Ser Gly Thr Gly Val Ghu Phe Ser Asn Met Ile
Ser Arg Cys Lys Ala Ala Gly Val Asp Ile Tyr Val Asp Ala Val Ile Asn His Met Thr Ala Gly Ala
Gly Thr Gly Ser Asn Gly Thr Ala Tyr Thr Lys Tyr Asn Tyr Gly Leu Tyr Ala Glu Ala Asp Phe
His Pro Glu Cys Ala Val Gly Asp Tyr Thr Ser Ala Ala Asn Val Glu Asp Cys Glu Leu Leu Gly Leu
Ala Asp Leu Asn Thr Gln Gly Ala Gly Val Glu Glu Lys Ile Ala Asp Tyr Leu Val Ser Leu Ala Arg
Leu Gly Val Ala Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ghu Pro Val Ghu Leu Asp Ala Ile Val
Asp Arg Val Asn Glu Thr Leu Ala Ala Glu Gly Arg Pro Leu Pro Tyr Trp Phe Ala Gly Val Ile Asp
Asn Gly Gly Glu Gly Val Arg Arg Glu His Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Tyr Gly Thr Gly Glu Ala Asp
Ile Thr Ghu Phe Arg Tyr Lys Gly Val Gly Asp Lys Lys Phe Ser Gly Gly Glu Glu Arg Leu Val Asp
Lys Lys Asn Phe Ser Ala Val Thr Trp Asn Leu Met Pro Ser Asp Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Asn
His Asp Arg Thr Glu Arg Gly Gly Ile Gly Tyr Arg Asp Gly Thr Ala Phe Arg Leu Ala Asn Val Trp
Met Leu Ala Glu Pro Tyr Gly Gly Pro Ser Val Met Ser Tyr Ala Phe Asp Arg Thr Ser Pro Phe
Gly Arg Asp Ala Gly Pro Pro Ser Ghu Asp Gly Ala Thr Lys Asp Val Thr Cys Ala Pro Thr Leu Glu
Thr Ala Val Leu Gly Thr Trp Val Cys Glu His Arg Asp Pro Val Ile Glu Arg Met Val Gly Phe Arg
Arg Ala Met Ala Gly Thr Asp Leu Asn Arg Trp Trp Asp Asn Gly Gly Asn Ala Ile Ala Phe Ser Arg
Gly Asp Arg Gly Phe Val Ala Ile Ser Arg Glu Pro Lys Val Thr Met Ala Val Pro Ser Gly Leu
Ser Pro Gly Thr Tyr Cys Asp Val Leu Thr Gly Gly Lys Val Gly Asn Ala Cys Ala Gly Thr Ser Val
Thr Val Asp Ser Glu Gly Val Val Glu Leu Ser Ile Val Glu Asn Ser Ala Leu Val Ile His Leu Gly
Ala Lys Leu Arg Arg Ala Gly Gly Cys Ala Glu

Val Asp Pro Lys Asn Cys Ser Gln Phe Met Gln Thr Ile Ala Lys Lys Gly Asp Glu Thr Met Lys Gly
Lys Lys Thr Phe Ala Leu Ala Leu Thr Thr Pro Leu Lys Ala Ala Ser Ser Leu Thr Thr Gly Val His Ala Gly
Thr Val His Lys Gly Lys Ala Leu Thr Thr Ala Asp Lys Asn Gly Val Phe Thr Glu Val Val Val Asn Ser
Phe Tyr Asp Ala Asn Lys Asp Gly His Gly Asp Leu Lys Gly Leu Thr Gln Lys Leu Asp Tyr Leu Asn
Asn Asp Gly Asn Ser His Thr Lys Asn Asp Gln Val Asn Gly Ile Thr Met Met Pro Val Asn Pro
Ser Pro Ser Tyr His Lys Tyr Asp Val Thr Asp Tyr Tyr Asn Ile Asp Pro Gln Tyr Gly Asn Leu Gln
Asp Phe Arg Lys Leu Met Lys Glu Ala Asp Lys Arg Asp Val Lys Val Ile Met Asp Leu Val Val
Asn His Thr Ser Ser Gln His Thr Pro Phe Gln Ala Ala Leu Lys Lys Asn Ser Lys Tyr Arg Asp
Tyr Tyr Ile Trp Ala Asp Lys Asn Thr Asp Leu Asn Glu Lys Gly Ser Trp Gln Gln Gln Val Thr His
Lys Ala Pro Asn Gly Glu Tyr Phe Tyr Gly Thr Phe Thr Gln Gly Met Pro Asp Leu Asn Tyr Asp
Asn Pro Gln Val Arg Lys Glu Met Ile Asn Val Gly Lys Phe Thr Leu Lys Gln Gly Val Asp Gly Phe
Arg Leu Asp Ala Ala Leu His Ile Phe Lys Gly Gln Thr Pro Glu Gly Lys Lys Asn Ile Leu Trp
Trp Asn Glu Phe Arg Asp Ala Met Lys Lys Glu Asn Pro Asn Val Tyr Leu Thr Gly Glu Val Trp
Asp Gln Pro Glu Val Val Ala Pro Tyr Tyr Gln Ser Leu Asp Ser Ser Leu Asn Phe Asp Leu Ala Gly
Lys Ile Val Ser Ser Val Lys Ala Gly Asn Asn Gln Gly Ile Ala Thr Ala Ala Ala Thr Asp Glu

[illegible]

【図 1 6 Z Z Z】

[illegible]

SEQ ID NO: 184

Met Gln Thr Ile Ala Ser Lys Gly Asp Glu Thr Met Lys Gly Lys Lys Trp Thr Ala Leu Ala Leu Thr
 Ala Leu Ala Leu Ala Ser Ser Thr Gly Val His Ala Glu Thr Val His Lys Gly Lys Ser Glu Ala
 Thr Asp Lys Asn Gly Val Phe Tyr Glu Val Asp Tyr Val Asn Ser Phe Tyr Thr Asn Lys Asp Gly His
 Gly Asp Leu Lys Gly Lys Thr Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Asn Asp Gly Asn Ser His Lys Thr Asn
 Asp Leu Gln Val Asn Gly Ile Trp Met Met Pro Val Asn Pro Ser Pro Ser Tyr His Lys Tyr Asp Val
 Thr Asp Tyr Val Asn Gly Ile Asp Pro Thr Tyr Gln Lys Leu Gln Asp Phe Arg Lys Leu Met Lys Glu Ala
 Asp Lys Arg Asp Val Val Lys Ile Met Asp Leu Val Val Asn His Lys Thr Ser Ser Glu His Pro Trp Phe
 Gln Ala Ala Leu Lys Asp Lys Asn Ser Lys Tyr Arg Asp Tyr Tyr Ile Trp Ala Asp Lys Asn Thr Asp
 Leu Asn Glu Lys Gly Ser Trp Gly Gln Glu Val Thr His Lys Ala Pro Asn Gly Glu Tyr Phe Tyr Gly
 Thr Phe Thr Glu Gly Met Pro Asp Leu Asn Tyr Asp Asn Pro Glu Val Arg Lys Glu Met Ile Asn Val
 Gly Lys Phe Thr Lys Lys Gln Gly Val Asn Gly Phe Arg Leu Asp Ala Ala Leu His Ile Phe Lys Gly
 Gln Thr Pro Glu Gly Ala Lys Lys Asn Ile Leu Trp Trp Asn Glu Phe Arg Asp Ala Met Tyr Lys Glu
 Asn Pro Asn Val Tyr Leu Thr Gly Glu Val Trp Asp Gln Pro Glu Val Val Ala Pro Tyr Gln Ser
 Leu Asp Ser Leu Phe Asn Phe Asp Leu Ala Gly Lys Ile Val Ser Ser Val Lys Ala Gly Asn Asp Gln
 Gly Ile Ala Thr Ala Ala Ala Thr Asp Glu Lys Phe Lys Ser Tyr Asn Pro Asn Lys Ile Asp Gly
 Ile Phe Leu Thr Asn His Asn Gln Asn Arg Val Met Ser Glu Leu Ser Gly Asp Val Asn Lys Ala Lys
 Ser Ala Ala Ser Ile Leu Leu Thr Leu Pro Gly Asn Pro Tyr Ile Tyr Tyr Gly Glu Ile Gly Met Thr
 Ser Gly Lys Lys Pro Asp Glu Lys Ile Arg Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Tyr Gly Glu Asn Gly Leu Gln Thr
 Thr Ser Gly Thr Pro Val Tyr Asn Lys Gly Lys Asp Gly Val Ser Val Glu Val Gln Thr Lys Gln Lys
 Asp Ser Leu Leu Asn His Tyr Arg Glu Met Ile Arg Val Gln Gln His Glu Leu Val Lys Gly
 Thr Leu Gln Ser Ile Ser Val Asp Ser Lys Glu Val Val Ala Tyr Ser Arg Thr Tyr Lys Val Asn Ser Ile
 Ser Val Tyr His Asn Ile Ser Asn Gln Pro Val Lys Val Ser Val Ala Ala Lys Gly Lys Leu Ile Phe Ala
 Ser Glu Lys Ala Lys Lys Val Lys Asn Gln Leu Val Ile Pro Ala Asn Thr Tyr Leu Leu Ile Lys

SEQ ID NO: 189

[illegible]

【 ☒ 1 6 B B B B 】

ggcaacctgggtaactccgtaaacctcgcgaagcccggtccgcctcgtgtttcccaaccaggataattggccctgttcacagactttagcaat
gacagcgggacgaggaacgcataataatccggcagtgtaaccggaattaacggacataaccggttcctcgggaacgaggattatcctaa
aacagcaacttataaccgcaatccagaccggttcgacgaccgccggcgagggaaggcacaaggagcacagcaatga

SEQ ID NO: 188

Met Tyr Leu Ile Gln Glu Gly His Met Arg Phe Pro Ile Ile His Pro Leu Thr Gly Leu Ala Val Pro
Val Gly Ala Arg Thr Ala Gln Ser Cys Gly Ile Gln Gly Phe Ala Asp Leu Pro Val Leu Ala Glu
Phe Cys Lys Lys Ala Gly Phe Asp Leu Val Gln Leu Leu Pro Val Asn Asp Thr Gly Thr Glu Ser Ser
Pro Tyr Ser Ala Leu Ser Ala Phe Ala Leu His Pro Tyr Leu Tyr Ile Arg Leu Ser Asp Leu Pro Glu Ala
Ala Gly Phe Glu Lys Gln Ile Thr Asp Leu Lys Ser Arg Phe Glu Asp Leu Pro Arg Phe Ser Tyr Thr
Glu Leu Arg Arg Ala Lys Leu Ser Asp Ile Leu Asp Ala Val Phe Asp Lys Asn Lys Ala Thr Ile Gln
Ser Ala Glu Leu Glu Ala Trp Ile Ser Asp Asn Pro Trp Ile Ile Glu Tyr Ala Val Phe Met Asn Gln
Lys His Arg Asn Phe Glu Ala Gly Trp Lys His Trp Glu Lys Leu Asp Asn Pro Thr His Asn Glu Ile
Gln Lys Thr Thr Gln Gly Lys Thr Trp Gln Ala Asp His Asn Gln Phe Ala Trp Leu Gln Met Arg Leu
Asp Gln Gln Phe Thr Ala Ala Thr Trp Glu Cys Asn Ala Leu Gly Val Tyr Leu Lys Glu Asp Ile Pro
Ile Met Met Asn Glu Asp Ser Ala Asp Ala Trp Ala Asn Pro Glu Phe Arg Asp Asp Leu Arg
Ala Gly Ser Pro Asp Gly Glu Asn Pro Gln Gln Gln Asn Trp Gly Phe Pro Ile Tyr Asn Trp Glu
Asn Leu Ala Asn Asp Gly Tyr Ser Trp Trp Lys Lys Arg Lys His Ser Ala Arg Tyr Tyr His Ala
Tyr Arg Ile Asp His Ile Leu Gly Phe Phe Arg Ile Trp Ala Ile Pro Tyr Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Leu
Gly Trp Trp Leu Pro His Glu Pro Val Ser Ala Ala Glu Leu Ala Glu Arg Gly Phe Ser Lys Asp Arg
Leu Arg Trp Leu Trp Glu Pro His Leu Trp Arg Ala Ala Glu Glu Ala Asn Asn Trp Asp Tyr Leu
Gly Thr His Gly Tyr Leu Asn Gln Ile Met Asn Arg Ile Gly Glu Glu Glu Leu Trp Leu Phe Lys Pro
Glu Ile Thr Cys Glu Ala Asp Ile Arg Asn Thr Asn Leu Pro Asp Ala Leu Lys Glu Val Leu Val Arg
Gln Trp Lys Asn Arg Leu Glu Gln Val Thr Gly Arg Asp Glu Lys Gly Arg Thr Ile Tyr Trp Pro Leu
Trp Arg Phe Arg Asp Ser Thr Ala Trp Gln Thr Leu Thr Asp Gly Glu Lys His Ser Leu Glu Glu Leu
Phe Ala Gln Lys Ala Ala His Asn Glu Thr Leu Trp Arg Glu Glu Ala Val Glu Leu Glu Gly Glu Leu
Thr Arg Ser Thr Ser Met Leu Ala Cys Ala Glu Asp Leu Gly Ser Ile Pro His Ser Val Pro Glu Val
Leu Ser Asn Leu Ser Ile Tyr Ser Leu Arg Val Thr Arg Trp Ala Arg Gln Trp Asp Asn Pro Gly Gln
Pro Phe His Arg Leu Glu Glu Tyr Pro Leu Met Ser Val Ala Thr Pro Ser Val His Asp Ser Ser Thr
Leu Arg Gly Trp Trp Glu Thr Glu Gly Asp Arg Ala Phe Met Asp Ala Trp Pro Glu Gln
Asp Ala Tyr Ala Gly Ala Gly Arg His Glu Phe Glu Gly Ala Trp Gly Pro Arg Gln Ala Ser Trp Val
Leu Arg Lys Leu Cys Glu Ala Arg Ser Ala Leu Cys Val Trp Ile Gln Asp Ile Leu Ala Leu Ser
Ser Asp Phe Tyr Ala Met Thr Ala Asp Glu Glu Asp Ile Asn Ile Pro Gly Ser Val Ser Gly Phe Asn
Trp Thr Tyr Arg Leu Pro Ala Ala Ile Glu Asp Leu Ser Lys Asn Ser Gln Leu Ile Thr Ala Ile Gln Thr
Ala Leu Gln Asp Arg Arg Arg Arg Lys Ala Gln Gly Ala Gln Gln

SEO ID NO: 189

[illegible]

【図 1 6 K K K K】

SEO ID NO: 206

Met Tyr Arg Val Ile Pro Ile Ile Leu Ile Met Ser Met Ile Val Ala Cys Glu Ser Pro Lys Lys Lys Thr Thr Glu Thr Ala Glu Pro Ser Thr Asn Ala Glu Lys Pro Phe Val Trp Glu Ala Ala Asn Val Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Asn Asn Gly Asn Pro Asn Asn Asp Ile Asn Phe Asn Arg Thr Lys Glu Ser Gly Lys Leu Arg Asn Phe Met Gly Asp Ile Lys Gly Ile Thr Gln Lys Ile Asn Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Leu Gly Val Asn Ala Ile Trp Leu Thr Pro Val Val Glu Gln Ile His Gly Ser Val Asp Glu Gly Thr Gly Asn Thr Tyr Ala Phe His Gly Tyr Trp Ala Lys Asp Trp Thr Asn Leu Asp Asp Pro Asn Phe Gly Thr Lys Glu Asp Leu Ala Glu Gly Val Ala Thr Ala His Ala Lys Gly Ile Arg Ile Leu Leu Asp Val Val Ile Asn His Thr Gly Pro Thr Thr Asp Gln Asp Pro Val Trp Gly Glu Asp Trp Val Arg Thr Gly Pro Gln Cys Thr Tyr Asp Asn Tyr Thr Asn Thr Thr Ser Cys Thr Leu Val Ala Asn Leu Pro Asp Ile Leu Thr Glu Ser Asn Glu Asn Val Ala Leu Pro Thr Phe Leu Leu Asp Lys Trp Lys Ala Glu Gly Arg Leu Glu Gln Glu Leu Lys Glu Leu Asp Asp Phe Ser Arg Thr Gly His Phe Arg Ala Pro Arg Phe Tyr Ile Ile Lys Trp Leu Thr Asp Tyr Ile Arg Glu Phe Gly Val Asp Gly Phe Arg Val Asp Thr Val Lys His Thr Glu Glu Thr Val Trp Ala Glu Leu Tyr Asp Glu Ala Val Ile Ala Phe Glu Asn Thr Lys Lys Ala Asn Pro Asp Lys Val Leu Asp Asp Asn Glu Phe Tyr Met Val Gly Glu Val Tyr Asn Tyr Gly Ile Ser Gly Arg Gly Phe Tyr Asp Phe Gly Asp Lys Lys Val Asp Tyr Phe Asn Arg His Gly Phe Lys Ser Leu Ile Asn Phe Glu Met Lys Tyr Asp Ala Asn Phe Thr Tyr Asp Thr Phe Arg Lys Tyr Asp Thr Leu Leu His Thr Lys Leu Lys Gly Arg Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Leu Ser Ser His Asp Asp Gly Ser Pro Phe Asp Lys Met Arg Gln Lys Pro Tyr Glu Ser Ala Asn Tyr Leu Leu Leu Thr Pro Gly Ala Ser Gln Ile Tyr Tyr Gly Asp Glu Thr Ala Arg Ser Leu Asn Ile Glu Gly Ala Gln Gly Asp Ala Thr Leu Arg Ser Phe Met Asn Trp Glu Leu Leu Ala Glu Asp Pro Ala Lys Gln Lys Ile Leu Gln His Thr Gln Lys Ser Phe Ser Phe Arg Asn Asn His Pro Ala Val Gly Ala Arg His Lys Thr Leu Gln Lys Lys Lys Pro Phe Tyr Thr Phe Ser Arg Val Tyr Gln Lys Asn Gly Phe Ile Asp Lys Val Val Ala Leu Asp Ala Pro Lys Gly Gln Lys Gln Ile Thr Val Asn Gly Val Phe Asp Gly Thr Lys Leu Val Asp Ala Tyr Ser Gly Lys Glu Thr Ser Val Lys Asn Gly Ile Val Ser Leu Ser Ser Glu Phe Asp Ile Val Leu Leu Glu Gln Lys

SEO ID NO: 207

[illegible]

SEQ ID NO: 208

Seq ID NO: 205
 Leu Ser Thr Gly Pro Phe Val Leu Gly Ser Arg Leu Thr Leu Ser Pro Pro Arg Ser Ser Ser Arg Arg
 Ser Ser Arg Asn Ser Arg Trp Pro Gly Arg Gly Gln Gly Pro Arg Gly Thr Pro Thr Arg Leu Ser Thr
 Thr Cys Pro Thr Pro Ser Arg Arg Gly Cys Arg Cys Thr Arg Gly Cys Thr Leu Pro Arg Thr Ser Glu
 Arg Arg Pro Thr Phe Arg Leu Cys Leu Arg Arg Gly Cys Met Leu Ser Val Pro Ala Cys Phe Arg

【図 1 6 M M M M】

GCGAATTGGTATATGCGGCTGACGCGGCGGATGGTGTGAATCACTTCCTGACGGGCTCCAC
 TGACCTACAAGTGGGGGCGCAACAATCAGGGTGTGTGGCAGATGTGAAGAGGTCA
 GCCAAACACCATGCCAACGCCGGCTTACGCAAGCTGTGTGTTCCCGCCGCTCCATAACT
 CGCGCCGATCCGAGGGTTACTACCCCGCAGCTGAACAACCTCAACTCCAGTATGAT
 CTCGGAAGCACAGTCTCGCAGGCCATCCAGGACGTGAACAATTCGCGGGTGTCATGCG
 ATTGGCGATGTGGTCTATGAACAACCGGGTGGGCTGATCTTGGCTGGCGGGGATTTCTGTA
 ACCCGGACCTGGCGCAACTGTGTACATCTGCGCAATGACTTCTGGCGGCGTGGCCGCGAA
 CAATCGAGAATCGGGAACGGGTGAGACGTACCAACGCCGCGCGTGAACCTGACATCCAGC
 CAATCCGCGAGTTGGCGAACAGTTATCTGCATACCTGAAGACCGCGCTCAAGGAAGCTG
 GGTCTCTCCGGCTGGCGCTGGGAATATGCCAAGGGTTTCTGGCCGCGCTATGTCCGGC
 AGTACAACTGGAACAACCAACCGAACTCTGTGTGGGTGATGTGTGGAGCATCTCGA
 CCCAAACAATCCCAACCGCAGCCGCAACCACTGGTGGAATGGGTTGATCTACACGGT
 GCGAATTGTCACTGCTTCTGACTTACCAACAAGGGGCTGACGAACATATGCGCTGACAG
 ATGGCAGTACTGGCCGCTGCAAGGTTGATAATGTTGGCCGCGCTGGCGGCAATCGGCTGT
 GTGGCGCAACAGCATGTGTGACTTCTGTGCGCAACATGACAGCGGCGCGAGCAATAC
 TGTGGTGACGCGCGAAGAACTCTGGCCGCTGGCTGTGACCAAGGTATGGAGAGCGGTATG
 CTTACATCTGACACCATCCGGGCGTGGCGTGGTGTACTGAGCGCACTTCTTCAACTAG
 AATCTTGTGATGGAGATACGCGCAATGTATGCAGATCCGGAAGCAACCGAGGGGCTGAC
 CGGGTTCCGACGCTGTGATCGCGAGGGCGGTGACCGCTGTGACGCGCGCTATTATCA
 CGGTAAATGTGGCGATGAAGATGGGCTGGGATACATGGAGCGCGGGCTGGGGCTGTGTC
 GTGGCGGCGCTCGGATCAACAACTGGGCGCTGTGACACGCTGA

SEQ ID NO: 212

SVK IED
VFRSDTVSR TCMYGRALNA YQDPDRVFTGVTGKTVRLCNLKHAMHRQALLFVITRCLCLKSRQT
HKNNKPIPTNDPSLR LRGNGMAFKLRKALVGLTGAAMVYAGAAAGSEIFLQGFHWHS
KCGWNGNGWQVMEQAGANTIANAGFTHV WFFPVHNSADAEGVLPRELNNLSYSGEAA
QLRSIAQLNLRNGVHAALDVTVMNHRVGSWGADFCNPDWPTWYTVYANDWSPGGKFSQN
WDTGETYHAARDLDHANPQVRNDISHYLNCSGLDQFGSGVRWDYAKGFVPGVYGEYN
WTNPNPFCVGEVWDDLDPNNPNHRQGLVDVWDVDTGGSCHFDDFTKGLNTYALHQEQ
YWRLQDNGDGGAGGIDWVQPRMFTVDNHDITGFSNHCGDGNQLVPVCPDKMEAYA
YILTHPVPSTVYTFHFNWNLGSEISQLMRKNCQGVHSGSDVWIAEARHGLYAA YINGN
VAMKMGWDNWSPGWGSLAASGNNAWYWR

【図 1 6 L L L L】

Ser Arg Phe Ser Arg Ile Ser Ala Arg Arg Cys Arg Ser Lys Arg Arg Gln Cys Phe Leu Arg Pro Gly
Cys His Val Ser Arg Gly Ser Ala Tyr Pro Cys Ala Thr Pro Arg Ser Arg Gly Arg Ile Leu Ser Ala
Gly Pro Arg Arg Gly Thr Arg Arg Leu Asp Thr Cys Ser Arg Leu Tyr Arg Cys Arg Gly Leu Gln
Arg Arg Leu Arg Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Cys Pro Arg Ser Gly Pro Arg Arg Val Arg Gln
Cys Ser Cys Cys Gln Arg Pro Arg Pro Ser Cys Arg Ala Gly Ser Arg Arg Pro Trp Arg Arg Ser
Ser Arg Pro Ser Gly Val His Gln Arg Trp Cys Pro Ser Thr Arg Gln Arg Pro Ser Arg Pro Thr Ser
Ala Ser Pro Arg Pro Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Ser Gln Ser Ala Arg His Gln Arg Cys Ser
Leu Gly Arg Arg Arg Ser Ser His Arg Ser Pro Arg Ala Ser Ala Gly Pro Ser Ser Arg Gly Leu
Cys Leu Gly Ser Leu Gln Met Cys Pro Arg His Ser Thr Pro Arg Trp Gly Ser Ser Arg Gly Ser Trp
Gln Tyr Ile Cys Pro Arg Pro Leu Arg Ser Pro Ser Arg Cys Ser Pro Gln Arg Thr Gly Ser Thr
Arg Gly Leu Arg Arg Ala Gly Gly Leu Arg Cys Pro Leu Pro Leu Cys Arg Arg His Gly Pro Cys
Leu Ser Cys Ser Arg Ala Gly Ala Trp Ser Gln Ser Ala Ser Leu Phe Pro Ser Gly Arg Thr His
Arg Gly Gln Arg Ser Arg Arg Gly Ser Arg Pro Ser Asn Arg Arg Arg Pro Cys Pro Cys Ser Pro Gly
Glu Ser Lys Trp Arg Ile Phe Pro Pro Arg Thr Thr Pro Val Ser Cys Ser Trp Cys Pro Thr Arg Phe
Leu His Leu Gly Arg Pro Ser Arg Arg Pro Ala Leu Arg Arg Pro Leu Pro Ala Arg Ser Thr Trp Pro
Val Thr Ser Tyr Ile Lys

SEO ID NO: 209

[illegible]

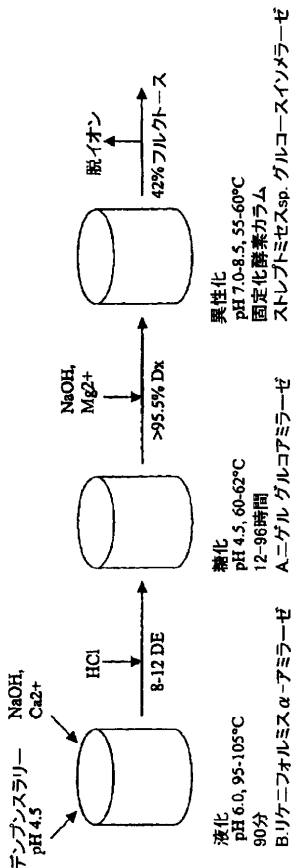
SEO ID NO: 210

MIQFMHSHREQAICRLPIALMTFALPLQIRADVTLHFNWSYADVADRAVIAAAGVSN
 VLYAPLPSSEGAHWIARVQRPDIPLDPLONTHDVAANMADLDVNGVQVADVPLNLM
 ANEAQAQRPFLVPLFGCAVLDEYADVDFVQVQRPFLPFLONFTNFSFSEVQACQIQSDYV
 QVQNRWLICGPPFDGLPDLVANDVVISQQRQYLKAIKALVAGMRIDVAKHMPMSHNA
 VLTPERSGLHVFVDSYVSGGAGDSYDRFLAPLQSDHGADYDFPLTEIRAFRGGSGMS
 ELVDPAASQAQALPPDRAITVTHDIPNDGFRFYLDQVDESLAYALYLRGRDGVPLLYSD
 NNESSGDGRWIDAVQRPDLVAVGVGHNAVGQDMVAWHDFDCHHLLFRGSLGVGVNCK
 GHAISSWNNNSVLYWXYADVDTLVDNSVYNIQSSWHSHEFPIARQALWLR

SEO ID NO:-211

SEQ ID NO: 1
GTGTTTCGTCTGACACAGTTTTCGCGTACCTGTCATGTATGGTGCCTGCGTAATGCCTA
CCAAACCCGATCGGGTGTTTACTCGTGAAGTACCGGTGCGCAGCTCAACTTAAAAAGCAT
GCTCATCGCCAGCGCGTGTGTTCTACTGTGACCGCGTGCTGTGCTGTAATCCAGCG
AGACCGTAATAAAAACAACAAACCCGATAACAAACGACCAAGCCTCTTAAGAGGAG
AAAACCGGATGGCTTTTAAACTCGCAAAAGGCGCTGTGTGGCCTGTTACCGCGCGG

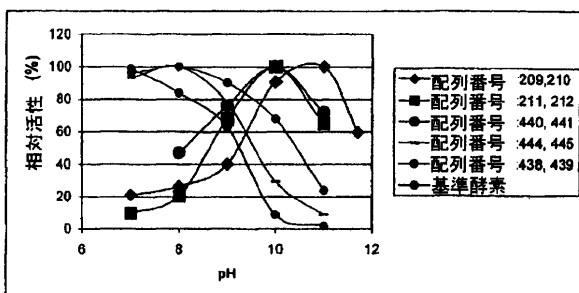
【图 17】



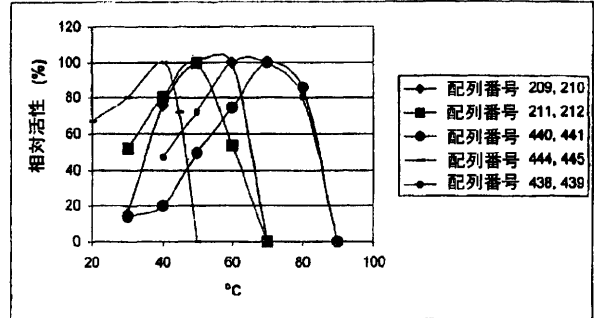
【図 18】

	配列番号 81	Pyro	Pyro	thermo	therm2	配列番号 75	配列番号 77	配列番号 83	配列番号 85	配列番号 79	配列番号 437
配列番号	100	91.7	75.1	82.1	80.1	82.3	82.6	82.1	82.6	83	77.8
pyro		100	74.8	82.5	80.5	82	82.2	82.9	82.8	84	78.5
Pyro2			100	71.5	71.1	74	74.2	77	77.1	73	70.5
therm				100	81.7	83.5	83.8	82.8	83.2	83.8	76.4
therm2					100	84.9	88.8	84.1	84.7	84	76.3
配列番号75						100	98.3	84.6	85.2	85.3	77
配列番号							100	84.8	84.9	85.4	77.4
配列番号								100	96	83.3	78.5
配列番号									100	83	78.1
配列番号										100	79.8
クロンA											100

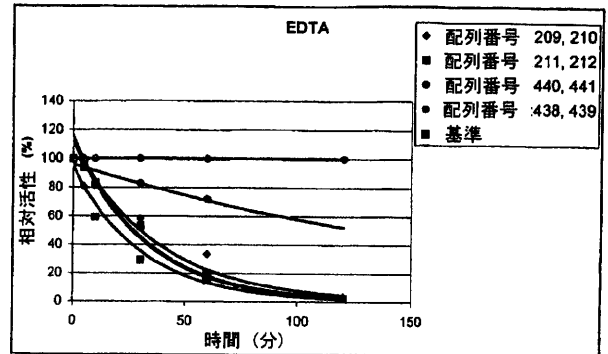
【図 19】



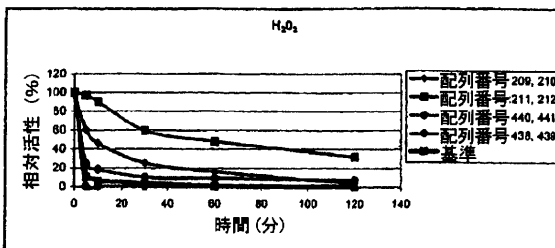
【図 20】



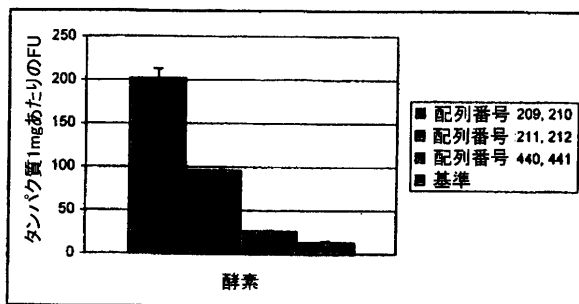
【図 21】



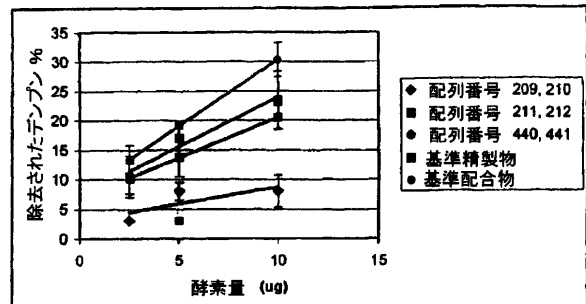
【図 22】



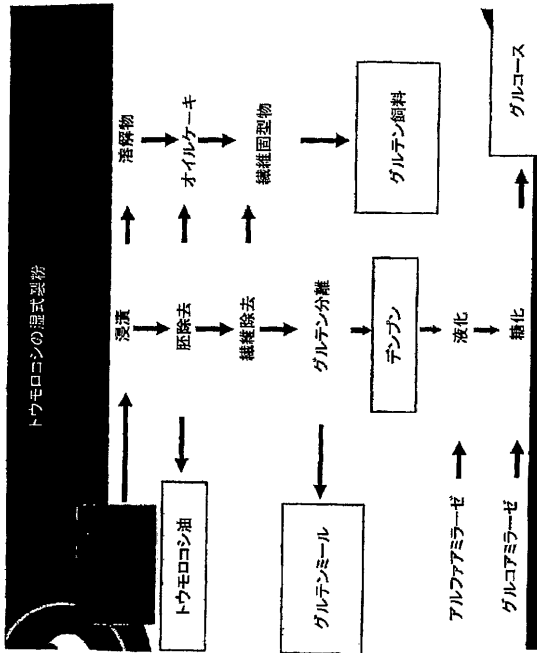
【図 23】



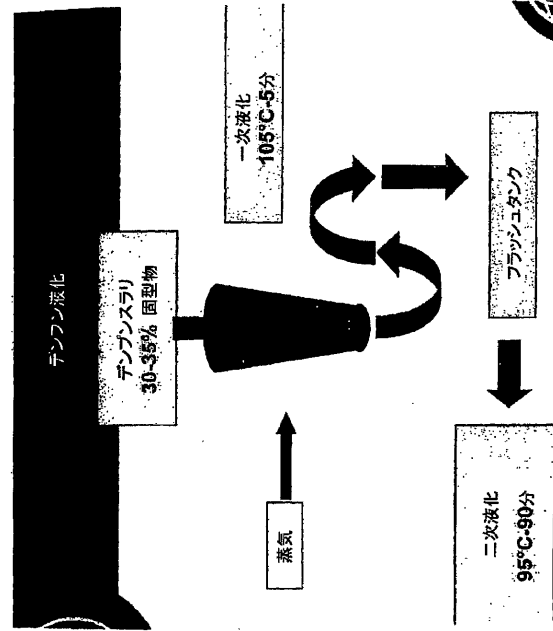
【図 24】



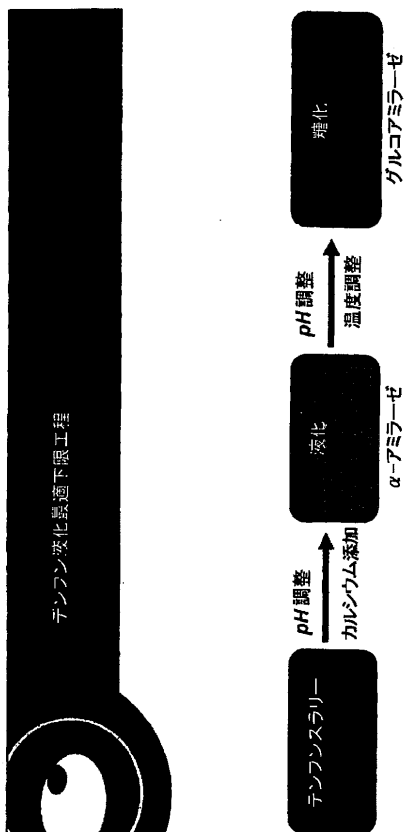
【図 25】



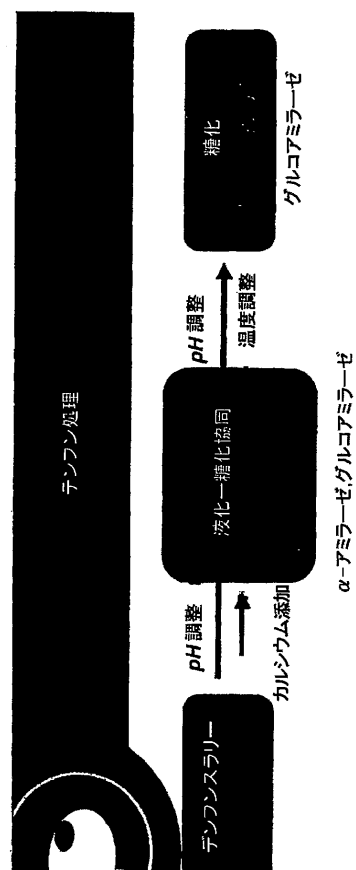
【図 26】



【図 27】



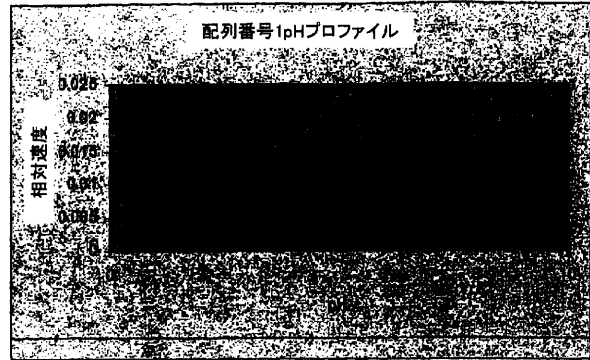
【図 28】



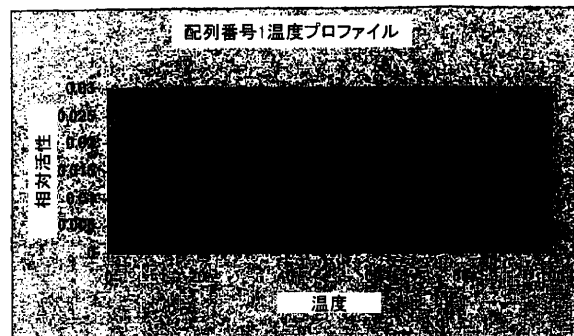
【図 29】

操作条件	D45	テルマミル(登録商標)SC アミラーゼ
温度	95°C	85°C
pH範囲	4.4 - 5.6	5.0 - 6.0 至適pH5.7
Ca++		不要
再利用逆流		粘性低下に有意な影響なし 30%まで良好に耐える
酵素量	0.4 - 0.6 kg/MT デンプン	0.3 - 0.5 kg/MT デンプン
液化後のDE	6-10	12-14

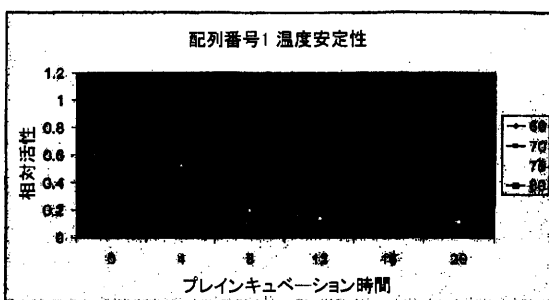
【図 30】



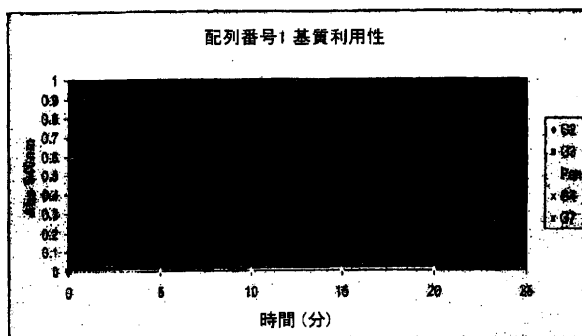
【図 31】



【図 32】



【図 33】



【図 34 A】

```

*          *          30          *          *          60
tccaagaattgaacgtcgtcggatgatcgtgatggtcagttttgaggtatcttccgaag

*          *          90          *          *          120
agccaatttggattaccggcagtcggcagtcgacggctccagacaaggatcaatcagg

*          *          150         *          *          180
gcctggcactatttttagcatgtcggtagtcccccaatcggtctctgcatttgacagcggac

*          *          210         *          *          240
atctgccgatcaggaacgaaacggtgcctgccgttgttgccctgtgagctctttatgcat

*          *          270         *          *          300
gtcaattcataataatccgataataggccgcagctattccaccctggggaaagggtttg

*          *          330         *          *          360
ttgaatgtcggcgatttgggtacatctgggggttcggcacttcagtgctccagggtccg

*          *          390         *          *          420
aatttcgattcatgcatgaaaatgcggagggaacctcggcactgtcaccatccccgt

*          *          450         *          *          480
caaaactacggcttttggcgggctacattggctacaatggccacaatggctacaacggcct

*          *          510         *          *          540
gtcaagggtatccattaatcttcggaagctcctgcaacgtttcgacaccttaatttcg

*          *          570         *          *          600
tttccgctacggagagcggagtagcggatacttttggacttttcattgtctctgtcgg

*          *          630         *          *          660
gcattcaagacgggcctgtcctaacgtccaggggatcggttggcagatcttccctcat

*          *          690         *          *          720

```

【図 3 4 B】

gcgttcacagagagaagtttgaattgagtcacaaacATGTTATTCCAAACGACTT
 * * * * * 750 * * * * * 780
 TGTGCGCGGCGCTTGGAGTCGCGCTTGTATCGTCCAAAGCGGAGAGCCAGACCTGAAA
 L C A A L G L A A L I V Q G G E A R P E
 * * * * * 810 * * * * * 840
 CAACCGTCCCATGCAACGGGCTCGCTCGACGACTTCTCGCGCACAGAGTCGAGTTG
 T T V P H A T G S L D D F L A A Q S P I
 * * * * * 870 * * * * * 900
 CTTTCAAGGCATCTGAACAATATCGGCGCTAGCGGAGCGTACTCGGAAGGTGTCAATC
 A F Q G I L N N I G P S G A Y S E G V N
 * * * * * 930 * * * * * 960
 CGGCTGTGCTCATTGCGAGTCAAGTAACAAGATCCCGACTGtatgctgctctggaaa
 P G V V I A S P S K Q D P D
 * * * * * 990 * * * * * 1020
 tttttcaattctgttggcaggactctctcttaataatggcacatagACTTTTACACCTGG
 * * * * * 1050 * * * * * 1080
 GTGCGCGAGCTGCTCTCACTGTCCATATCTGTTGGAGGAGCTGGTTGAGGAAATGCC
 V R D A A L T V Q Y L V E E L V A G N A
 * * * * * 1110 * * * * * 1140
 AGTCTTCACTTCTCATTAGGACTACATCGCTCCAGGCGAGCTGCGAGCGGTGAA
 S L Q F L I Q D Y I S S Q A R L Q T V E
 * * * * * 1170 * * * * * 1200
 AATCCATCGGCTCCCTCTCGTGGGTGGTCTAGGAGAGCCCAAGTTTCATGTCGAGAG
 N P S G S L S S G G L G E P K F H V D E
 * * * * * 1230 * * * * * 1260
 ACCGCTTTACGGACTCTGGGGCCGACACAGCGGAGCGGCGCTCTCGCGCGCAAT
 T A F T D S W G R P Q R D G P P L R A I
 * * * * * 1290 * * * * * 1320
 GCATGATTCTGTTGCCAATTACCTGATTgtaagtcagatttcccatcatgagagataa
 A M I S F A N Y L I
 * * * * * 1350 * * * * * 1380
 ttgacatgagtgctcagtgtagttttcagGACAAACGCTCATCAATGACTGTGGAGGA
 * * * * * 1410 * * * * * 1440
 CATCATCTGCGCGATGTTGCGCAATGACTTGTCTATGTCGCGAGCTTGGAAACGAAC
 I I W P I V R N D L S Y V S Q H W N E T
 * * * * * 1470 * * * * * 1500
 AACTTTTgtagtgcttaagccgctactagttgtagtgagagatttggattatagagagagc
 T F
 * * * * * 1530 * * * * * 1560
 ctcaagctataacaggagtttttccgagGACATCTGGGAGGAAGTCCATAGCTCATCTGTTT
 * * * * * 1590 * * * * * 1620
 TTCACCGCTGTCCAGTACCGTCTCTGCTCAAGGCGAGTCCCTTGGCTAGCAAGCTC
 F T T A V Q Y R A L V Q G S A L A S K L
 * * * * * 1650 * * * * * 1680
 GGCCATGCTCGACAACTCGCGGTCCCAAGCACCGCAGATCCTTGTCTCTGCGAGTGC
 G H T C D N C G S Q A P Q I L C F L Q S
 * * * * * 1710 * * * * * 1740
 TATTGGACCGGTGCGACATCTTAGCCAACACCGGTGGCGCGCTCGGGAAGGAGCTC

【図 3 4 D】

* * * * * 2790 * * * * * 2820
 AACGTGCGGAGGATGCGGTGCCAACACGGCCACCGTGAATCTTGTGGCGATGAACC
 N V P K D C G A N T A T V N S W W R
 * * * * * 2850 * * * * * 2880
 aacttggttctgtccacactccgctgtgtgctcagttctggtgtagatcgataaaata
 * * * * * 2910 * * * * * 2940
 tgacttggtcacttgacaaagatgatgtaaaagcgttctgttatgtagtagttagca
 * * * * * 2970 * * * * * 3000
 cttttccctagtagggagtagctcctgtagtatgccgataccgaactccgacggagtagaa
 * * * * * 3030 * * * * * 3060
 actaacgtgtcgagtagtcgagtgctgctggggagtaggaagcagtaggagtggaatg
 * * * * * 3090 * * * * * 3120
 ctgcagatcccttccctcaccgtctcagagacacggagtcaggttgaacctggcgagg
 * * * * * 3150 * * * * * 3180
 tgtgaagctgttgatgctcatttctcgtccaatatttcaaggacacgttgcacaacatc
 * * * * * 3210 * * * * * 3240
 aatccagcaatgagtcctggttgactgtgctgctgggtagcagagacttcgggaat
 * * * * * 3270 * * * * * 3300
 acattgaagtagcaaaacatgctcactaactatgtgctcagctcacttaccagtg
 * * * * * 3330 * * * * * 3360
 cagcatccgttctgtggaagggaagtctcctggttagcaggttctgctgattctgagat
 * * * * * 3390 * * * * * 3420
 cgactcgcaaaaaagaggggacatgctgctggaagttcgattcaaacgatgtcatc
 * * * * * 3450 * * * * * 3480
 agctcattgctccttgaatcctgctcgagatcagagattatcttgaactaaacgatatt
 * * * * * 3510 * * * * * 3540
 ctccgaagccggatggtgctatgcttctgctcgatgttgaagagacatttttatt
 * * * * * 3570 * * * * * 3600
 tgacaggagcaaacgtccgaacaagctcgaacaataagcgtctattttctcaagcgg
 * * * * * 3630 * * * * * 3660
 ccagtcagtagacatttctcggggaggtcttgcgtcctggacatgaaagccaggag
 * * * * * 3690 * * * * * 3720
 atatccgacaggagcttatggcttattttgcagtggtacgggtgattgaaatggaag
 * * * * * 3750 * * * * * 3780
 ccagtaagaaaaatttctccatggccagaagccggataagattggagcaaggatt
 * * * * * 3810 * * * * * 3840

【図 3 4 C】

Y W T G S H I L A N T G G G R S G K D V
 * * * * * 1770 * * * * * 1800
 AGCAGCATCTCGGCGTCAATGGCTCGTTGATCGGAACGCCGACTGTGATGACGTTACC
 S T I L G V I G S F D P N A D C D D V T
 * * * * * 1830 * * * * * 1860
 TTCCAGCCCTGCTCGGCGCGGCTCTTGCAAATCACAAGCAGGTCGTTGACAGCTTCCGC
 F Q P C S A R A L A N H K Q V V D S F R
 * * * * * 1890 * * * * * 1920
 AGTATCTATGCCATCAACGCTGGCATCCGCTCAGGGTCGCTGTTGCGGTTGGACGTTAT
 S I Y A I N A G I P S G S A V A V G R Y
 * * * * * 1950 * * * * * 1980
 CCCGAGGATGTCTATCAGGGTGGACACCCCTGGTACCTAACACGCTCGCGCGCGGAG
 P E D V Y Q G G H P W Y L T T A A A E
 * * * * * 2010 * * * * * 2040
 CAGCTTACGACGCCATTTACAGTGAACCATGTAGGGCACATCGACATCAATGCTGC
 Q L Y D A I Y Q W N H V G H I D I N A V
 * * * * * 2070 * * * * * 2100
 AATCTGGAATCTTCAAGAGCAITTTACGTCAGCGCGGAGGGCACATACATCAGAC
 N L D F F K S I Y P S A A E G T Y T S D
 * * * * * 2130 * * * * * 2160
 TCTTCAACATTTCAAGACATATATCTGCTGACGAGCTATGCGGAGGGGTTCTCAGC
 S T F Q D I I S A V R T Y A D G F L S
 * * * * * 2190 * * * * * 2220
 GTAATTgtaagtcacacacttcgaaacgaatgctcgaagtcttccactgacattttgag
 V I
 * * * * * 2250 * * * * * 2280
 cagGAGAAATACACTCCCGCGGATAACTTGTGCGGAGCAGTTCCACCGGAGACGGGC
 E K Y T P P D N L A E Q F H R E T G
 * * * * * 2310 * * * * * 2340
 ATTCCACTATCGGCGCTCTCTGACATGGTCTACCGCGCGCTCAACACGGCGCGGAG
 I P L S A A S L T W S Y A A L N T A A Q
 * * * * * 2370 * * * * * 2400
 CGCGAGCGTCAATCGTGCCTCACCGTGAACCTTAACAGCAGAGATCTCCCGGACAAA
 R R A S I V P S P W N S N S T D L P D K
 * * * * * 2430 * * * * * 2460
 TGCTCGGCAACCTCGGCAACAGGCGCTTATGCGCGCCCAAAACACGGCATGGCAACC
 C S A T S A T G P Y A T P T N T A W P T
 * * * * * 2490 * * * * * 2520
 ACTACGCAACCGCGGAGCGCGCGCATGCACACCGCGCTGGAAGTAACACTCACCTTC
 T T Q P P E R P A C T P P S E V T L T F
 * * * * * 2550 * * * * * 2580
 AACCGCTGCTGACACCGCGTTGGCCAGAATATTTATCTGCTGGCTCCATTCGCGAG
 N A L V D T A F G Q N I Y L V G S I P E
 * * * * * 2610 * * * * * 2640
 CTCGATCGTGGATCCGCGCAACGCGCTTGTATGAGCGCAAGAGCTGAGTAGCGGA
 L G S W D P A N A L L M S A K S W T S G
 * * * * * 2670 * * * * * 2700
 AATCGGCTCGGAGCTATCCATTTCCCTTCCAGCAGGAACCTCTTTGAGTACAAGTTC
 N P V W T L S I S L P A G T S F E Y K F
 * * * * * 2730 * * * * * 2760
 ATTCGAAAGGATGATGTTCTCGGATGTTGCTGGGAAAGTGACCCGAATCGTTCGTAC
 I R K D D G S S D V V W E S D P N R S Y

【図 3 4 E】

gagatttatctcgcggtctatattatcatgaatggaagaagagagcagtcggaatggtg
 * * * * * 3870 * * * * * 3900
 gatctggaactagaaagaggcggttctggccgcaaacgataaacacgtactttgaatc
 * * * * * 3930 * * * * * 3960
 ttgcatctgatgatattctttgatctcgggtaggttaggacaggatagtagattcc
 * * * * * 3990 * * * * * 4020
 tgttggtcgacaggtcgtctaactcagtgctaggaacgctgattgctggtggatata
 * * * * * 4050 * * * * * 4080
 caggagtcggaaggtggggagattagtgtagccctggcaggtgaacatcgtgcag
 * * * * * 4110
 gataaggtcgtcattgttgaacgaaagtaa (SER ID NO.1)

【 3 5 A 】

SEQ ID	TOP PUBLIC HT	PUBLIC EVALU	PUBLIC DEFINITION	PUBLIC ORGANISM	PUBLIC EC NUMBER	PUBLIC PROTEIN %ID	PUBLIC NUCLEOTIDE %ID	DIVERSA SEQUENCE LENGTH	PUBLIC SEQUENCE LENGTH
69, 70	g12655502g1A0003	98.1	0	alpha-amylase [Bacillus megaterium]	Bacillus megaterium	NO_HTS	91	90	513
87, 88	g13994289g1A0371	7.1	0	Sequence 8 from patent US 5755480	Unknown	NO_HTS	97	N/A	472
89, 90	g11200633g1A044	0	0	amygdalinase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	75	70	1100
91, 92	g15642326g1A0696	1.1	0	alpha-amylase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	549
93, 94	g11200633g1A044	0	0	amygdalinase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	74	70	515
95, 96	g15644583g1NF_229	636.1	e-145	alpha-amylase [Thermotoga maritima]	Thermotoga maritima	NO_HTS	52	58	507
97, 98	g15644583g1NF_229	636.1	e-145	alpha-amylase [Thermotoga maritima]	Thermotoga maritima	NO_HTS	29	33	976
99, 100	g15644583g1NF_229	636.1	e-144	alpha-amylase [Thermotoga maritima]	Thermotoga maritima	NO_HTS	53	58	511
101, 102	g13274586g1A0479	0	0	[Pseudomonas sp. KFCC10816]	Pseudomonas sp. KFCC10816	NO_HTS	61	55	711
103, 104	g12642326g1A0696	1.1	0	alpha-amylase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	99	549
105, 106	g1722278g1A063900	1	0	alpha-amylase [Bacillus sp. TS-23]	Bacillus sp. TS-23	NO_HTS	84	76	550
107, 108	g1091118g1rj2020344	A	3E-94	alpha-amylase, s vulgaris [Bacteria thermophilus]	Bacteria thermophilus	NO_HTS	37	N/A	502
109, 110	g1404891g1A03787	7.1	0	hydrothermalis [Archaea]	Archaea	NO_HTS	90	83	457

【 3 5 C 】

176, 178	g1560101g1rj2020344	254.1	0	alpha-amylase (from <i>Thermotoga</i>)	Thermotoga	NO_HTS	73	68	495
177, 178	g1122829g1A0003	885.5	e-17	unclassified protein product	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	60	56	507
178, 180	g1790586g1A0371	192.1	e-156	Sequence 8 from patent US 5755480	Unknown	NO_HTS	99	N/A	507
181, 182	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	68	N/A	609
183, 184	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	96	92	631
185, 186	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	97	94	622
187, 188	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
189, 190	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
191, 192	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
193, 194	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
195, 196	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
197, 198	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
199, 200	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
201, 202	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
203, 204	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
205, 206	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635

【 3 5 B 】

179, 180	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
181, 182	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
183, 184	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
185, 186	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
187, 188	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
189, 190	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
191, 192	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
193, 194	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
195, 196	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
197, 198	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
199, 200	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
201, 202	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
203, 204	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
205, 206	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635

【 3 5 D 】

207, 208	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
209, 210	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635
211, 212	g113789g1P23843A	102.1	0	GLUCANOTRANSFERASE	Geobacillus stearothermophilus	NO_HTS	99	98	635

【 3 5 E】

322, 323	alpha-amylase [Thermococcus sp. GUS15] hypothetical protein	Thermococcus sp. GUS15	3.2.1.1	21326995	0	2251107	1392	463	461	83
324, 325	Burkholderia fungorum alpha-amylase (EC 3.2.1.1) precursor- magnesium	Burkholderia fungorum	3.2.1.1	22966974	1E-28	7379424	1289	431	1146	25
326, 327	Bacillus hypothetical protein	Bacillus magnesium	3.2.1.1	80110	7E-98	11344494	1359	452	520	42
328, 329	Chloroflexus aurantiacus hypothetical protein	Chloroflexus aurantiacus	3.2.1.1	22570586	1E-155	535791	1677	556	575	53
330, 331	Chloroflexus aurantiacus hypothetical protein	Chloroflexus aurantiacus	2.4.1.1	22571466	0	4633809	3129	1042	851	55
332, 333	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	1E-117	186994	1707	569	643	49
334, 335	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	7E-91	82191	2051	686	643	43

【 3 5 F】

336, 337	alpha-amylase (EC 3.2.1.1) precursor- Streptomyces violaceus unlabeled protein	Streptomyces violaceus	3.2.1.1	80864	0	153156	1731	576	569	65
338, 339	outer membrane protein	Bacillus sp.	3.2.1.1	13539159	0	14774986	1704	568	697	90
340, 341	Streptococcus thermophilus hypothetical protein	Streptococcus thermophilus	3.2.1.1	14780301	1E-137	153156	1848	615	692	46
342, 343	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027631	0	13274585	2051	686	593	64
344, 345	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027631	1E-179	8247214	1990	659	563	62
346, 347	alpha-amylase precursor [Notoc sp. RCC 7120]	Notoc sp. RCC 7120	3.2.1.1	141870	0	141869	1398	405	464	92
348, 349	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-ALPHA-D- GLUCAN GLUCANOHYDROLASE) hypothetical protein	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-ALPHA-D- GLUCAN GLUCANOHYDROLASE) hypothetical protein	3.2.1.1	17226892	0	450848	1486	495	492	61
350, 351	GLUCANOHYDROLASE precursor [Pseudomonas aeruginosa] hypothetical protein	GLUCANOHYDROLASE precursor [Pseudomonas aeruginosa] hypothetical protein	3.2.1.1	6226551	0	2467094	2001	686	669	67
352, 353	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	1E-135	3549647	1283	420	643	55

【 3 5 G】

354, 355	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-ALPHA-D- GLUCAN GLUCANOHYDROLASE) hypothetical protein	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-ALPHA-D- GLUCAN GLUCANOHYDROLASE) hypothetical protein	3.2.1.1	728848	0	304014	2677	838	443	44
356, 357	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	7E-95	5442101	4875	1625	643	47
358, 359	Glycosylase (EC 3.2.1.1) precursor- magnesium	Glycosylase (EC 3.2.1.1) precursor- magnesium	3.2.1.1	27368339	1E-147	155351	1422	473	466	57
360, 361	amylase precursor [Bacillus thuringiensis] hypothetical protein	amylase precursor [Bacillus thuringiensis] hypothetical protein	2.4.1.18	560662	0	2635411	1938	645	648	98
362, 363	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	1E-65	13362592	2094	697	643	33
364, 365	Sequencing enzyme [Bacillus thuringiensis] hypothetical protein	Sequencing enzyme [Bacillus thuringiensis] hypothetical protein	3.2.1.1	3954288	0	722278	1536	511	549	69
366, 367	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-ALPHA-D- GLUCAN GLUCANOHYDROLASE) hypothetical protein	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-ALPHA-D- GLUCAN GLUCANOHYDROLASE) hypothetical protein	3.2.1.1	6226551	0	2467094	1992	663	669	70
368, 369	Burkholderia fungorum hypothetical protein	Burkholderia fungorum	3.2.1.1	22966974	7E-28	14547281	1257	418	1146	27

【 3 5 H】

370, 371	alpha-amylase A [Pseudomonas aeruginosa] hypothetical protein	alpha-amylase A [Pseudomonas aeruginosa] hypothetical protein	3.2.1.1	24365106	1E-107	216308	1614	537	515	41
372, 373	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	6E-77	169994	1437	478	643	42
374, 375	amylase precursor [Xanthomonas campestris] hypothetical protein	amylase precursor [Xanthomonas campestris] hypothetical protein	3.2.1.1	141870	0	141869	1398	465	464	91
376, 377	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	6E-52	13702782	1551	516	643	32
378, 379	Microbubler degradans 2-40 hypothetical protein	Microbubler degradans 2-40	3.2.1.1	23027235	1E-124	20334	1269	422	643	53
380, 381	periplasmic alpha- amylase precursor [Xanthomonas campestris] hypothetical protein	periplasmic alpha- amylase precursor [Xanthomonas campestris] hypothetical protein	3.2.1.1	1168403	1E-140	1168402	1644	547	526	49
382, 383	amylase precursor [Streptomyces coelicolor A3(2)] hypothetical protein	amylase precursor [Streptomyces coelicolor A3(2)] hypothetical protein	3.2.1.1	21220698	0	288162	4176	1391	1798	50
384, 385	alpha-amylase precursor [Xanthomonas campestris] hypothetical protein	alpha-amylase precursor [Xanthomonas campestris] hypothetical protein	3.2.1.1	19224331	0	155551	1434	477	475	65
386, 387	Chloroflexus aurantiacus hypothetical protein	Chloroflexus aurantiacus	3.2.1.1	22970586	1E-102	1771460	1458	485	575	59

【図 3 5 J】

402, 403	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1'-ALPHA-D- GLUCAN-1'') GLUCAN-1'') HYDROLASE	3.2.1.1	8225551	0	2467084	864	869	66
	Pseudomonas as hydrophila							
	Microbubler degradans 2-40							
404, 405	[Microbubler degradans 2-40] protein	3.2.1.1	23027244	1E-155	2337886	1653	550	48
405, 407	alpha-amylase precursor [Xanthomonas axonopodis pv. citr. str. 305] hypothetical	3.2.1.1	141870	0	141689	1398	465	94
408, 409	alpha-amylase precursor [Xanthomonas axonopodis pv. citr. str. 305] hypothetical	3.2.1.1	21106921	0	155351	1476	491	64
410, 411	[Microbubler degradans 2-40] hypothetical	3.2.1.1	23027235	0	14461204	1875	624	59
412, 413	Chloroflexus aurumflexus protein	3.2.1.1	22897473	0	8250619	2088	695	53
414, 415	protein [Nostoc punctiforme beta-agarum]	3.2.1.1	23126762	3E-38	14091925	2262	753	25
416, 417	[Pseudomonas sp. W7] alpha-amylase	3.2.1.1	9081616	5E-31	14518450	1344	447	27
418, 419	[Xanthomonas campestris pv. citr. str. 305] hypothetical	3.2.1.1	20092324	4E-438	155924	155924	155924	155924

【図 3 5 L】

	alpha-amylase (EC 3.2.1.1) isozyme III				
434-435	-	Oryza sativa	7 2 1 1	11283710	1E-110
					37609708
					1302
					433
					437
					481

【图 3 5 N】

444	alpha-amylose Thermotoga volcanium	232327	1E-107	Therm. amylose oxidase PCR primer	Alpha amylose PCR primer	ABU030 primer #1	92	1E-121	ABX16 protein	2.4.1.1	9	1521	506	2196	502	44	43
445	alpha-amylose Thermotoga volcanium	232327	1E-107	Therm. amylose oxidase PCR primer	Alpha amylose PCR primer	ABU030 primer #1	92	1E-121	ABX16 protein	2.4.1.1	9	1521	506	2196	502	44	43
446	alpha-amylose Thermotoga volcanium	232327	5E-74	Therm. amylose oxidase PCR primer	Alpha amylose PCR primer	ABU030 primer #1	92	3E-56	SEQ ID ABT16	2.4.1.1	9	3537	1176	482	14	35	
447	alpha-amylose Thermotoga volcanium	232327	5E-74	Therm. amylose oxidase PCR primer	Alpha amylose PCR primer	ABU030 primer #1	92	3E-56	SEQ ID ABT16	2.4.1.1	9	3537	1176	482	14	35	
448	AmvA [uncultured bacterium]	37183245	1E-158	uncult. red bacterium	Alpha amylose PCR primer	ABU031 primer #1	33	1E-126	Human CDNA SEQ ID ABQ33	2.4.1.2	5	1575	524	1554	517	51	57
449	AmvA [uncultured bacterium]	37183245	1E-158	uncult. red bacterium	Alpha amylose PCR primer	ABU031 primer #1	33	1E-126	Human CDNA SEQ ID ABQ33	2.4.1.2	5	1575	524	1554	517	51	57
450	alpha-amylose 3 Bacteroides thetaioamizone in VPI-5462	29344183	1E-151	Bacter. oxidase thetaioamizone PCR primer	Alpha amylose PCR primer	ABU031 primer #1	34	4E-16	CDNA encoding human transport protein polypeptide	AA518		1890	629	565	43	49	
451	alpha-amylose 3 Bacteroides thetaioamizone in VPI-5462	29344183	1E-151	Bacter. oxidase thetaioamizone PCR primer	Alpha amylose PCR primer	ABU031 primer #1	34	4E-16	CDNA encoding human transport protein polypeptide	AA518		1890	629	565	43	49	
452	AmvA [uncultured bacterium]	37222142	1E-135	uncult. red bacterium	Alpha amylose PCR primer	ABU031 primer #1	31	1E-72	Alpha amylose PCR primer	ABX08		1734	577				
453	AmvA [uncultured bacterium]	37222142	1E-135	uncult. red bacterium	Alpha amylose PCR primer	ABU031 primer #1	31	1E-72	Alpha amylose PCR primer	ABX08		1734	577				

【図 3 5 P】

462-466	related to glucosylase precursor [Neurospora crassa]	Neurospora crassa	Sequence #4	Thelebia thermophilum glucanase Ylase DNA PCR primer/AAM015	SEQ ID AB254	259	0.001	1206	401	405	60	63				
467-474	hypothetical protein MG03287.4 [Magnaporthe oryzae]	Magnaporthe oryzae	Sequence #5	eukaryotic gene and upstream region AAR093	Alpha amylase DNA PCR primer ABX08	1E-125	#1	477	0.61	3.2,1.1	2421	806	518	36	39	
475-478	putative alpha-1,3-glucan synthase [Aspergillus fumigatus]	Aspergillus fumigatus	Sequence #42	Sacchar syntrophus IL6 (SSIL6) LINKR domain related protein ABU065	Aspergillus s cryzase polynucleotide clone SEQ ID AB253	3E-103	NO.3150	554	5E-54	83	7131	2376	7281	2426	59	59
480-485	hypothetical protein MG10209.4 [Magnaporthe oryzae]	Magnaporthe oryzae	Sequence #6	Amino acid sequence of a fungal protein like AAB842	Fusarium venenatum EST m SEQ ID AAF07	1E-103	NO.1176	664	5E-65	3.2,1.1	1383	460	600	62	62	

【図 3 5 R】

GLUCOAMYLASE P PRECURSOR (GLUCAN 1,4- GLUCOSYLASE) 1(1,4-ALPHA-D GLUCAN 488- GLUCOHYDRO LASE),	481509	Amop hctec-encod g glucosam A4W30 P 155	cDNA hctec-encod g glucosam A4W30 P 155	AT890 glucosam g glucosam A4W30 P 155	330 SE-04 3.2.1.3	1932	643	616	61	60
alpha-amylose (Emicollin nidulans)	6591857 1E-144	Emicollin nidulans A4R450 S 87	Emicollin nidulans A4R450 S 87	Fusarium venenab S 87	AAE12 SE-04 3.2.1.1	1479	492	1473	49	54
alpha- glucosylase (Schizosacchar omyces pombe)	19111855 1E-145	Schizosacchar omyces pombe A4W27 P 81	Schizosacchar omyces pombe A4W27 P 81	Drosophila melanogaster polyphemus glucosylase A4B18 P 18	332 1E-04 3.2.1.1	1479	492	1473	49	54
alpha-stable acid-stable [Aspergillus keweenawii]	2570150 1E-125	Aspergillus keweenawii A4B342 P 06	Aspergillus keweenawii A4B342 P 06	Arabidopsis thaliana stress regulated A4B216 P 179	0 0.002	1833	610	1740	42	50
alpha-stable acid-stable [Aspergillus keweenawii]	2570150 1E-125	Aspergillus keweenawii A4B342 P 06	Aspergillus keweenawii A4B342 P 06	Arabidopsis thaliana stress regulated A4B216 P 179	0 0.002	1833	610	1740	42	50

517-518	alpha-amylase AmyA [Enterococcus nidulans]	6551087	1E-110	5	84	PCR variant with laucine at position	AAR241	36	1E-110	#1854	454	0.44	3.2.1.1	1768	585	1473	490	37	42
519-523	alpha-glucosidase [Aspergillus oryzae]	33503475	1E-179	dyzase	81	PCR B1 from illus J092340	AAR27	300	1E-128	NO1178	465	0.002	3.2.1.2	1788	595	1808	602	50	56
524-525	GLUCONATE GLUCONATE (SUCCINATE) (ISOMALTASE) (LIMIT DEXTRINASE) (DEXTRIN 6- (ISOMALTASE) ALPHA-D- GLUCONATE POLYMERASE]	129007	1E-145	dyzase	81	Gectia PCR cellus primer thermo B1 from illus J092340	AAR27	300	1E-138	NO1138	353	0.007	3.2.1.1	1785	594		562	46	51
529-533	alpha-glucosidase [Aspergillus oryzae]	23503475	1E-165	dyzase	81	PCR primer B1 from illus J092340	AAR27	300	1E-141	NO1141	241	5E-07	3.2.1.2	1797	598	1809	602	48	55

【図 3 5 T】

534-540	hypothetical protein MG10209.4 [Magnaporthe oryzae]	0	38101134	0	70-15 amylose	AAB842	06	1E-105	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.1	1770	588	600	65	68
541-545	hypothetical protein [Neurospora crassa]	0	32411795	0	crassal	AAR132	30	1E-137				3.2.1.2	1770	663	608	60	
546-553	glycan 1,4-alpha-glucosidase (EC 3.2.1.3) precursor [Neurospora crassa]	0	489543	0	crassal												
554-559	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
560-565	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
566-571	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
572-577	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
578-583	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
584-589	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
590-595	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
596-601	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
602-607	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
608-613	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
614-619	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
620-625	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
626-631	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
632-637	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
638-643	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
644-649	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
650-655	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
656-661	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
662-667	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
668-673	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
674-679	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
680-685	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
686-691	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
692-697	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
698-703	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
704-709	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
710-715	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
716-721	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
722-727	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
728-733	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
734-739	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
740-745	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
746-751	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
752-757	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
758-763	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
764-769	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
770-775	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
776-781	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
782-787	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
788-793	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
794-799	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
800-805	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
806-811	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
812-817	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
818-823	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
824-829	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
830-835	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
836-841	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
842-847	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
848-853	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
854-859	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
860-865	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
866-871	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
872-877	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
878-883	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
884-889	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
890-895	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
896-901	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
902-907	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
908-913	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
914-919	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
920-925	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
926-931	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
932-937	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
938-943	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
944-949	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
950-955	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921	0	oryzase	AAR132	30	1E-147	NCI:1176	684	5E-13	3.2.1.2	1770	588	600	65	68
956-961	Aspargillus myceliase [Aspergillus oryzae]	0	4278921														

560-566	ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-ALPHA-D-GLUCAN GLUCANOHYDROLASE A)	1703298 [E-725]	Aspergillus niger var. awamori	Amio 06	1E-125	1524	507	498	46
567	beta-amylase (Pseudomonas sp. W7)	9081816 [E-226]	Pseudomonas sp. W7	Alpha amylase	1E-125	1446	481	1928	642
568	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
571	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
572	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
573	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
574	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
575	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
576	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
577	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
578	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
579	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
580	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
581	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
582	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
583	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
584	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
585	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
586	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
587	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
588	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
589	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
590	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
591	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
592	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
593	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
594	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
595	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
596	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
597	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
598	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
599	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613
600	alpha-amylase (Bacillus sp. T3-23)	722276	Bacillus sp. T3-23	Alpha amylase	1E-125	1839	612	1842	613

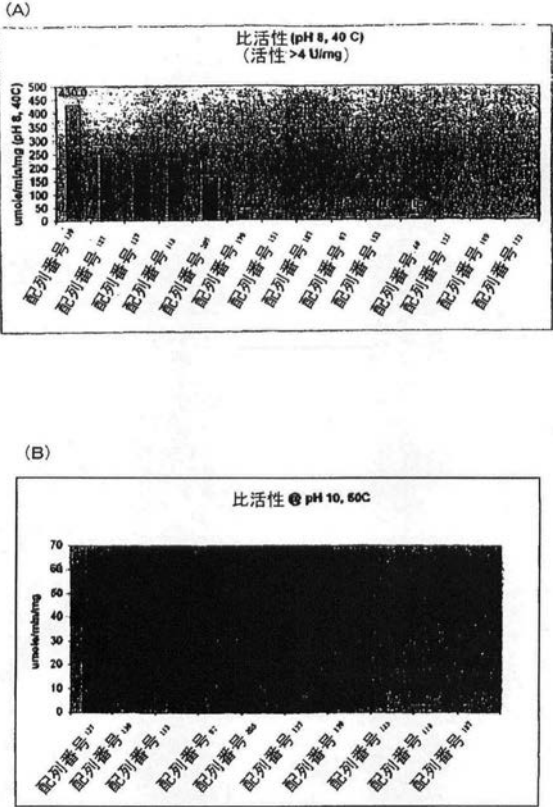
【図 3 5 Y】

ALPHA-AMYLASE PRECURSOR (1,4-GLUCAN GLUCANOLYD ROLASE)	113822	0	Strepto myces thermo autotrophicus	AMYLAse from Streptom yces thermo autotrophicus	AAQ08 3570 844	0	0.3.2.1.1	1716	571	569	91	81
alpha-amylase (Bacillus sp. TS-23)	722279	3E-77	Bacillus sp. TS-23	AMYLAse from Streptom yces thermo autotrophicus	AAQ08 3570 844	0	0.3.2.1.1	1773	590	1764	587	98
	622											97

【図 1 1】



【図 9】



【配列表】

2017006131000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027		4 B 0 6 5
A 0 1 H 5/00 (2006.01)	A 0 1 H 5/00	A	4 B 1 1 5
A 0 1 H 5/10 (2006.01)	A 0 1 H 5/10		4 C 0 8 3
C 1 2 N 9/26 (2006.01)	C 1 2 N 9/26	A	4 L 0 3 3
C 1 2 P 19/14 (2006.01)	C 1 2 P 19/14	Z	4 L 0 5 5
C 1 2 P 19/02 (2006.01)	C 1 2 P 19/14	A	
C 1 3 K 1/02 (2006.01)	C 1 2 P 19/02		
C 1 2 G 3/02 (2006.01)	C 1 3 K 1/02		
C 1 2 P 7/06 (2006.01)	C 1 2 G 3/02	1 1 9 B	
A 2 3 L 33/20 (2016.01)	C 1 2 P 7/06		
D 0 6 M 15/59 (2006.01)	A 2 3 L 33/20		
D 2 1 C 5/02 (2006.01)	D 0 6 M 15/59		
D 2 1 C 9/10 (2006.01)	D 2 1 C 5/02		
A 6 1 Q 19/10 (2006.01)	D 2 1 C 9/10		
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 Q 19/10		
A 2 3 K 20/147 (2016.01)	A 6 1 K 8/64		
A 2 3 L 33/195 (2016.01)	A 2 3 K 20/147		
	A 2 3 L 33/195		

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(72)発明者 カレン ウォルター

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ ステットソン アベニュー 3
469

(72)発明者 リチャードソン トビー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92131 サン ディエゴ キャンディー ローズ ウェ
イ 11646

(72)発明者 フレイ ガーハード

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92129 サン ディエゴ ヴィア シマ ベラ 137
68

(72)発明者 グレイ ケヴィン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92131 サン ディエゴ イレオノアー コート 12
119

(72)発明者 ケロヴォー ヤンネ エス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92109 サン ディエゴ ラ ジョラ ブールヴァード
5065 #2

(72)発明者 スラプスカ マトゴルザタ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92126 サン ディエゴ カミニート ロードー 11
186

(72)発明者 バートン ネルソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92131 サン ディエゴ サンセット リッジ ドライ
ヴ 10928

(72)発明者 オドノグー エイリーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92109 サン ディエゴ ミズーリ ストリート 11
36

(72)発明者 ミラー カール

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27614 ローリー マーティンデイル ドライブ 4

17

F ターム(参考) 2B030 AD20 CA11
2B150 AA01 AB01 DC23
4B018 MD27 MD34 MD49 ME01 ME02 MF12
4B050 CC04 DD02 LL01 LL02 LL03 LL04 LL05 LL10
4B064 AC03 AF02 AF12 CA19 CA21 CB07 CC24 CD19 DA01 DA10
DA11 DA13 DA16 DA19 DA20
4B065 AA15X AA15Y AA18X AA18Y AA26X AB01 AC14 BA02 BB18 BB26
CA32 CA41 CA43 CA44 CA46 CA47 CA50 CA53 CA54 CA57
CA60
4B115 AG02 AG05 CN03 NG02 NG04
4C083 AD411 CC23 DD15 DD16 DD21 DD22 DD28 DD41
4L033 AA02 AB01 AC15 CA55
4L055 AD20 AE10 AG47 BA37 BA39 BB25