

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4732591号
(P4732591)

(45) 発行日 平成23年7月27日(2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 24 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-608726 (P2000-608726)
 (86) (22) 出願日 平成12年3月29日(2000.3.29)
 (65) 公表番号 特表2002-539822 (P2002-539822A)
 (43) 公表日 平成14年11月26日(2002.11.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2000/000152
 (87) 国際公開番号 W02000/058445
 (87) 国際公開日 平成12年10月5日(2000.10.5)
 審査請求日 平成19年3月27日(2007.3.27)
 (31) 優先権主張番号 PA 1999 00431
 (32) 優先日 平成11年3月29日(1999.3.29)
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)

微生物の受託番号 DSMZ DSM12607

前置審査

(73) 特許権者 500586299
 ノボザイムス アクティーゼルスカプ
 デンマーク国, デーコー 2880 バグ
 スバエルト, クロシェイバイ 36
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分枝酵素活性を有するポリペプチド及びそれをコードする核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分枝酵素活性及び少なくとも60℃の至適温度を有する単離したポリペプチドであって、

a) 配列番号2の成熟アミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列から成るポリペプチド；

b) (i) 前記成熟酵素に相当する配列番号1の核酸配列のヌクレオチド、(ii) 配列番号1のcDNA配列、又は(iii) (i)若しくは(ii)の相補鎖と、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるポリペプチド、から成る群から選択される、ポリペプチド。

【請求項2】

N末端又はC末端に別のポリペプチドが融合されている、請求項1に記載のポリペプチドを含んで成る、単離したポリペプチド。

【請求項3】

配列番号2のアミノ酸配列、又は配列番号2のアミノ酸配列と5個以下のアミノ酸が異なるアミノ酸配列、から成る、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】

E. コリ(coli) DH12S, DSM12607に含まれるプラスミドpT7Blueに含まれる核酸配列によってコードされる、成熟分枝酵素のアミノ酸配列から成る、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列から成る、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 97% の同一性を有するアミノ酸配列から成る、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 2 のアミノ酸配列から成る、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 2 のアミノ酸配列又は置換 Y 3 9 7 C + L 4 1 9 P を有するその変異体から成る、請求項 7 に記載のポリペプチド。 10

【請求項 9】

E. コリ DH 1 2 S, DSM 1 2 6 0 7 に含まれるプラスミド p T 7 B l u e に含まれる核酸配列によってコードされる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記至適温度が 60℃～120℃の範囲にある、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記至適温度が 60℃～80℃の範囲にある、請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

前記至適温度が 65℃である、請求項 11 に記載のポリペプチド。 20

【請求項 13】

細菌起源の、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

ロドサームス (Rhodo thermus) 属の種の細胞に由来する、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

R. オバメンシス (obamensis) 及び R. マリヌス (marinus) の細胞に由来する、請求項 14 に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする、核酸配列を含んで成る単離した核酸。 30

【請求項 17】

分枝酵素活性を有するポリペプチドをコードする単離した核酸であって：

a) 配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 90% の同一性を有する核酸配列；

b) (i) 配列番号 1 の核酸配列、(ii) 配列番号 1 の cDNA 配列、又は (iii) (i) 若しくは (ii) の相補鎖と、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、
から成る群から選択される核酸。

【請求項 18】

E. コリ (coli) DH 1 2 S, DSM 1 2 6 0 7 に含まれるプラスミド p T 7 B l u e に含まれる、分枝酵素をコードする核酸配列から成る、請求項 17 に記載の核酸。 40

【請求項 19】

適当な発現宿主において前記ポリペプチドの生成を指示する 1 又は複数の調節配列と作用可能に連結している、請求項 16 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の核酸を含んで成る核酸構築物。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の核酸構築物を含んで成る組換え発現ベクター。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の核酸構築物を含んで成る組換え宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを生成する方法であって、(a) 前記ポリペプチドの生成に適した条件下で請求項 2 1 に記載の宿主細胞を培養し；そして (b) 前記ポリペプチドを回収することを含んで成る方法。

【請求項 2 3】

デンブン様材料を修飾するための、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の、又は請求項 1 9 に記載の核酸配列によってコードされるポリペプチドの使用。

【請求項 2 4】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド及び界面活性剤を含んで成る洗剤組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明の分野

本発明は分枝酵素活性を有するポリペプチド及びそのポリペプチドをコードする単離した核酸配列に関する。本発明は前記核酸配列を含んで成る核酸構築物、ベクター、及び宿主細胞並びに前記ポリペプチドを生成し、そして使用するための方法にも関する。

【0002】

関連技術の説明

以降 B E と表す分枝酵素 (E C 2 . 4 . 1 . 1 8) はグリコシル転移を触媒して、微生物、植物及び高等生物においてグリコーゲン及びアミロペクチンの α - 1 , 6 - グリコシド結合 (分枝点) を形成せしめる。グリコーゲン及びアミロペクチンは、微生物、植物及び高等生物におけるエネルギー保存に使用される、高度に分枝化した澱粉材料である。B E は異なる分子間で分枝を形成するだけでなく (分子間転移)、複数の分枝化したグルカンの、同一の分子上の別の部位への転移も触媒する (分子内転移)。

20

【0003】

高度に分枝化した澱粉材料は、末修飾の澱粉と比較して高い溶解性、低粘度及び劣化しにくいという様な独特の特性を持ち、これは E P O 6 9 0 1 7 0 に記載されている様に製紙業における表面のサイジング及びコーティングを含む接着性組成物、U S 4 4 5 4 1 6 1 に記載の食品及び飲料添加物並びに抗デンブン劣化剤における使用のために、それらを興味深いものになっている。

【0004】

30

複数の異なる生物に由来する分枝酵素が単離され、そして開示されてきた：例えば、U S 4 4 5 4 1 6 1 はバチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来の B E を記載し；Boyer and Preiss, *Biochemistry*, vol. 16 (16), pp. 3693-3699, 1977 は、エスクリッチャ・コリ (*Escherichia coli*) 由来の B E を記載し；Zeverhuizen, *Biochem. Biophys. Acta* (81), pp. 608-611, 1964 は、アルスロバクター・グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) 由来の B E を記載し；Walker and Builder, *Eur. J. of Biochem.*, vol. 20 (1), pp. 14-21, 1971 は、ストレプトコッカス・ミチス (*Streptococcus mitis*) 由来の B E を記載し；Kiel et al., *Gene*, vol. 78 (1), pp. 9-18, 1989 は、シアノバクテリア・シネココッカス (*Cyanobacterium Synechococcus*) 種の P C C 7 9 4 2 由来の B E を記載し；Rumbak et al., *Journal of Bacteriology*, vol. 173 (21), pp. 6732-6741, 1991 は、ブチリビブリオ・フィブリソルベンス (*Butyrivibrio fibrisolvens*) 由来の B E を記載し；Kiel et al., *DNA Sequence*, vol. 3 (4), pp. 221-232, 1992 は、バチルス・カルドリチカス (*Bacillus caldolyticus*) 由来の B E を記載している。

40

【0005】

50

上文で言及した引用の共通の特徴は、報告された至適温度のいずれも45℃以上ではないことである。わずかに2つの分枝酵素だけが、それより高い至適温度を有すると開示された：Kiel et al., Molecular & General Genetics, vol. 230 (1-2), pp. 136-144, 1991 (更にはEP 0418 945) : 53℃の至適温度を有するバチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus Stearothermophilus) 1503-4Rの分枝酵素；及びTakata et al., Applied and Environmental Microbiology, vol. 60 (9), pp. 3096-3104, 1994 : 約50℃の至適温度を有するバチルス・ステアロサーモフィルスTRBE14の分枝酵素。

10

【0006】

高温で増大する反応速度が得られるため、高い至適温度を有する分枝酵素を使用することは、産業上有利である。それによって、より高い能力が同量の酵素で得られ、そしてより良い生産経済が達成される。更に、高温での処理の実施は、感染の予防により有益である。

【0007】

分枝酵素活性を有する改良ポリペプチド及びそのポリペプチドをコードする核酸を提供することが本発明の目的である。

【0008】

本発明の要約

20

本発明は、分枝酵素活性、及び少なくとも60℃の至適温度を有する単離したポリペプチドに関する。

【0009】

本発明は、前記ポリペプチドをコードする単離した核酸配列並びにその核酸配列を含んで成る核酸構築物、ベクター、及び宿主細胞、並びに前記ポリペプチドを生成し、そして使用するための方法にも関する。

【0010】

本発明の詳細な説明

分枝酵素活性を有するポリペプチド

「分枝酵素活性」とは、グリコーゲン又はアミロペクチンの1, 6- α -グリコシド結合の形成を触媒する1, 4- α -グルカン分枝活性である (EC 2. 4. 1. 18)。本発明の目的のために、分枝酵素活性は、本明細書の材料と方法の項目の中の標題「分枝酵素活性」に記載されている、Takata et al., Applied and Environmental Microbiology (1994), p. 3097に記載の方法 (アッセイA) の改良版に従い決定され得る。

30

【0011】

第一の観点において、本発明は分枝酵素活性を有し、そして少なくとも60℃の至適温度を有する単離したポリペプチドに関し；好ましくは、その至適温度は60℃～120℃の範囲にあり；更に好ましくは、その至適温度は60℃～100℃の範囲にあり；より更に好ましくは、その至適温度は60℃～80℃の範囲にあり；最も好ましくは、その至適温度は60℃～70℃の範囲にあり；そしてより最も好ましくは、その至適温度は65℃である。

40

【0012】

第一の態様において、本発明のポリペプチドはpH 6～pH 8の範囲で約70%の相対的活性を保持し；好ましくはpH 6～pH 7の範囲で約80%の相対的活性を保持し；更に好ましくは、至適pHが約pH 7である。

【0013】

至適温度及びpHを決定するために使用する条件は、本明細書の材料を方法の項目において「分枝酵素活性」の標題のもとに記載されているものである。

【0014】

50

第二の態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸2～621（すなわち、成熟ポリペプチド）に対して、又はE. コリDSM12607に含まれるプラスミドpT7Blueに含まれる核酸配列によってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約70%、更に好ましくは少なくとも約80%、より更に好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、より最も好ましくは少なくとも約97%の相同性の値を有する、分枝酵素活性を有するアミノ酸配列を有する（以降、「相同ポリペプチド」と称する）。好ましい態様において、相同ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列と、5つのアミノ酸、好ましくは4つのアミノ酸、更に好ましくは3つのアミノ酸、より更に好ましくは2つのアミノ酸、最も好ましくは1つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。

10

【0015】

本発明の目的のために、配列のアラインメント及び相同性スコアの計算は、タンパク質及びDNA、その両方のアラインメントに有用な、完全なSmith-Watermanアラインメントを用いて行われ得る。デフォルトスコアリングマトリックスBLOSUM50及び同一性マトリックスは、それぞれタンパク質及びDNAのアラインメントに使用される。ギャップの最初の残基についてのペナルティーは、タンパク質で-12、そしてDNAで-16であり、一方、ギャップの追加の残基についてのペナルティーは、タンパク質で-2、そしてDNAで-4である。アラインメントは、FASTAパッケージの第v20u6版でも行われ得る（W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), 「Improved Tools for Biological Sequence Analysis」, PNAS 85:2444-2448、及びW. R. Pearson (1990) 「Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA」, Methods in Enzymology, 183:63-98）。タンパク質配列の複数のアラインメントは、「Clustal W」を用いて行われ得る（Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: (1673-4680)。DNA配列の複数のアラインメントは、アミノ酸を、DNA配列に由来する相当するコドンと置き換える鋳型としてタンパク質のアラインメントを用いて行われ得る。

20

30

【0016】

好ましくは、本発明のポリペプチドは配列番号2のアミノ酸配列又はその対立遺伝子変異体；あるいは分枝酵素活性を有するそのフラグメントを含んで成る。更に好ましい態様において、本発明のポリペプチドは配列番号2のアミノ酸配列を含んで成る。別の好ましい態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列又はその対立遺伝子変異体；あるいは分枝酵素活性を有するそのフラグメントから成る。別の好ましい態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列から成る。

40

【0017】

配列番号2のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ及び／又はカルボキシル末端から欠失した1又は複数のアミノ酸を有するポリペプチドである。

【0018】

対立変異体とは、同一の染色体の座を占める遺伝子の2又はそれ以上の択一型のいずれかを表す。対立変異は突然変異を介して自然に起こり、そして個体群において多型を生じ得る。遺伝子の突然変異はサイレント（コードされたポリペプチドにおける無変化）であることもあり、又は変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることもある。ポリペプチドの対立変異体は、対立変異体の遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

50

【0019】

第三の態様において、本発明のポリペプチドは、非常に低いストリンジェントな条件、好ましくは低いストリンジェントな条件、更に好ましくは中程度にストリンジェントな条件、更に好ましくは中程度－高度にストリンジェントな条件、より更に好ましくは高度にストリンジェントな条件、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件のもと、同一の条件下で (i) 配列番号1のヌクレオチド、(ii) 配列番号1のヌクレオチドに含まれるcDNA配列、(iii) (i)若しくは(ii)の亜配列、又は(iv) (i), (ii)、若しくは(iii)の相補鎖とハイブリダイズする核酸プローブとハイブリダイズする核酸配列によってコードされる、分枝酵素活性を有する(J. Sambrook, E. F. Fritsh, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York)。配列番号1の亜配列は少なくとも100個のヌクレオチド又は好ましくは少なくとも200個のヌクレオチドであってもよい。更に前記亜配列は、分枝酵素活性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ある。前記ポリペプチドは更に、分枝酵素活性を有するポリペプチドの対立遺伝子変異体又はフラグメントであってもよい。

10

【0020】

配列番号1の核酸配列又はその亜配列、及び配列番号2のアミノ酸配列又はそのフラグメントは、当業界で公知の方法に従い、異なる属又は種の菌株から分枝酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを同定し、そしてクローン化するための核酸プローブを設計するために使用されうる。特に、前記プローブは、標準的なサザンブロッティング方法に従い、その中で相当する遺伝子を同定し、そして単離するために、注目の属又は種のゲノム又はcDNAとのハイブリダイゼーションのために使用され得る。前記プローブは全配列よりもかなり短いことがあるが、少なくとも15、好ましくは少なくとも25、及び更に好ましくは少なくとも35ヌクレオチドの長さであるべきである。更に長いプローブも使用することができる。DNA及びRNAプローブ、その両方を使用することができる。前記プローブは、典型的に相当する遺伝子を検出するために標識される(例えば、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、ビオチン、又はアビジンによる)。前記プローブは本発明に包含される。

20

【0021】

従って、その様な他の生物から調製したゲノムDNA又はcDNAライブラリーは、上述したプローブとハイブリダイズし、そして分枝酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAのためにスクリーニングされ得る。その様な他の生物由来のゲノム又は他のDNAは、アガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動、あるいは他の分離技術によって分離され得る。前記ライブラリー由来のDNA又は分離したDNAは、ニトロセルロース又は他の適当な担体材料上に移され、そして固定化され得る。配列番号1又はその亜配列と相同なクローン又はDNAを同定するために、前記担体材料はサザンブロットに使用される。本発明の目的のためのハイブリダイゼーションは、前記核酸配列が、配列番号1に示した核酸配列、その相補鎖、又はそれらの亜配列に、非常に低いないし非常に高度なストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを示唆する。前記核酸プローブがこれらの条件下でハイブリダイズする分子は、X線フィルムを用いて検出される。

30

40

【0022】

好ましい態様において、前記核酸プローブは、配列番号2のポリペプチドをコードする核酸配列、又はその亜配列である。別の好ましい態様において、前記核酸プローブは配列番号1である。別の好ましい態様において、前記核酸プローブは、エスケリッチャ・コリDSM12607に含まれるプラスミドpT7Blueに含まれる核酸配列であり(例1を参照のこと)、この中で、前記核酸配列は分枝酵素活性を有するポリペプチドをコードする。

【0023】

少なくとも100ヌクレオチドの長さの長いプローブのための、非常に低いないし非常に

50

高度なストリンジェントな条件は、 $5 \times$ SSPE、 0.3% SDS、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の剪断し、そして変性したサケ精子DNA、並びに非常に低い及び低いストリンジェント性のための 25% ホルムアミド、中程度及び中程度－高度にストリンジェント性のための 35% ホルムアミド、又は高度及び非常に高度なストリンジェント性のための 50% ホルムアミドのいずれかにおける、標準的なサザンブロッティング法に従う 42°C でのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションとして定義される。

【0024】

少なくとも 100 ヌクレオチドの長さのプローブのために、前記担体材料は、最終的に $2 \times$ SSC、 0.2% SDSを用いて、好ましくは少なくとも 45°C （非常に低いストリンジェント性）、更に好ましくは少なくとも 50°C （低いストリンジェント性）、更に好ましくは少なくとも 55°C （中程度のストリンジェント性）、更に好ましくは少なくとも 60°C （中程度－高度なストリンジェント性）、より更に好ましくは 65°C （高度なストリンジェント性）、及び最も好ましくは少なくとも 70°C （非常に高度なストリンジェント性）で、各 15 分間、 3 回洗浄される。

10

【0025】

約 15 ヌクレオチド～約 70 ヌクレオチドの長さの短いプローブのためのストリンジェントな条件は、Bolton及びMcCarthy（ 1962 , Proceedings of the National Academy of Sciences USA $48:1390$ ）に従う計算を用いて算出した T_m から 5°C ～ 10°C 低い温度で、 1ml 当たり 0.9M NaCl、 0.09M Tris-HCl pH 7.6 、 6mM EDTA、 0.5% NP- 40 、 $1 \times$ デンハルト溶液、 1mM ピロリン酸ナトリウム、 1mM 一塩基リン酸ナトリウム、 0.1mM ATP、及び 0.2mg の酵母RNAにおいて、標準的なサザンブロッティング法に従うプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、及びハイブリダイゼーション後の洗浄として定義される。

20

【0026】

約 15 ヌクレオチド～約 70 ヌクレオチドの長さの短いプローブのための前記担体材料は、 1 回、 $6 \times$ SSC + 0.1% SDS中で 15 分間、及び 2 回、 $6 \times$ SSCを用いて算出した T_m より 5°C ～ 10°C 低い温度で各 15 分間洗浄される。

【0027】

第四の態様において、本発明は 1 又は複数のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は挿入を含んで成る配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドのBE活性を有する変異体に関する。

30

【0028】

変異体ポリペプチドのアミノ酸配列は、 1 又は複数のアミノ酸残基の挿入若しくは欠失によって、及び／又は異なるアミノ酸残基による 1 又は複数のアミノ酸残基の置換によって、配列番号 2 のアミノ酸配列又はその成熟ポリペプチドと異なることがある。好ましくは、アミノ酸の変化は前記タンパク質の折りたたみ及び／又は活性に有意に影響を与えない保存的なアミノ酸置換；典型的に 1 ～約 30 アミノ酸のわずかな欠失；わずかなアミノ又はカルボキシル末端の伸長、例えばアミノ末端のメチオニン残基；最大約 20 ～ 25 残基の小さいリンカーペプチド；あるいは正電価の変化又は別の機能により精製を容易にするわずかな伸長、例えばポリヒスチジントラクト、抗原性エピトープ又は結合ドメインという、軽微な性質のものである。

40

【0029】

保存性置換の例は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）及び小型アミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、スレオニン及びメチオニン）の群内である。一般的には比活性を変えないアミノ酸置換は当業界で既知であり、例えば、H. NeurathとR. L. Hill（ 1979 、「The Proteins」Academic Press, New York）により

50

記載されている。最も普通に発生する交換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu及びAsp/Glyならびにこれらの逆である。

【0030】

第五の態様において、本発明のポリペプチドは配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して免疫化学的同一性又は部分的な免疫化学的同一性を有する。免疫化学的特性は、公知のオクタロニー二重免疫拡散法による免疫学的交差反応同定試験によって決定される。具体的には、免疫反応性の、又は配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはその成熟ポリペプチドのエピトープに結合するポリクローナル抗体を含む抗血清は、Harboe and Ingild, In N. H. Axelsen, J. Kroll and B. Weeks, editors, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 23、又はJohnstone and Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (更に具体的には27~31ページ)に記載されている方法に従いウサギ(又は他のげっ歯類)を免疫化することで調製される。免疫化学的同一性を有するポリペプチドは、同一の様式、例えば沈澱の全体的な融合、同一な沈澱の形態、及び/又は同一な電気泳動の移動度で、特異的な免疫化学的技術を用いて抗血清と反応するポリペプチドである。免疫化学的同一性の更なる説明は、Axelsen, Bock, and Kroll, In N. H. Axelsen, J. Kroll, and B. Weeks, editors, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 10に記載されている。部分的な免疫化学的同一性を有するポリペプチドは、部分的に同一な様式、例えば沈澱の部分的融合、部分的に同一な沈澱の形態、及び/又は部分的に同一な電気泳動の移動度で、特異的な免疫化学的技術を用いて抗血清と反応するポリペプチドである。部分的な免疫化学的同一性の更なる説明は、Bock and Axelsen, In N. H. Axelsen, J. Kroll, and B. Weeks, editors, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 11に記載されている。

【0031】

前記抗体は更に、モノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、例えばE. Harlow and D. Lane, editors, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New Yorkの方法に従い調製され、そして使用されうる。

【0032】

本発明のポリペプチドは、配列番号2のポリペプチドの少なくとも20%、好ましくは少なくとも40%、更に好ましくは少なくとも60%、より更に好ましくは少なくとも80%、より更に好ましくは少なくとも90%、及び最も好ましくは少なくとも100%の分枝酵素活性を有する。

【0033】

本発明のポリペプチドは、任意の属の微生物から得られる。本発明の目的のために、「～から得られる」という用語は、所定の供給源と関連して本明細書中で用いる場合、核酸配列によりコードされるポリペプチドがその供給源により、又は供給源からの核酸が挿入された細胞により生成されることを意味する。好ましい態様において、ポリペプチドは細胞

外に分泌される。

【0034】

本発明のポリペプチドは、細菌ポリペプチドである。例えば、ポリペプチドは、グラム陽性細菌ポリペプチド、例えばバチルス属ポリペプチド、例えばバチルス・アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・コアギュランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・ラウツス (*Bacillus lautus*)、バチルス・レンツス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケミホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウム、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 又はバチルス・サーリングイエンス (*Bacillus thuringiensis*) ポリペプチド；あるいはストレプトミセスポリペプチド、例えばストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 又はストレプトミセス・ムリヌス (*Streptomyces murinus*) ポリペプチド；あるいはグラム陰性細菌ポリペプチド、例えば *E. コリ* 又はシュードモナス種ポリペプチドであり得る。

10

【0035】

本発明のポリペプチドは、真菌ポリペプチド、更に好ましくは酵母ポリペプチド、例えばカンジダ属 (*Candida*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*) 又はヤローウィア属 (*Yarrowia*) ポリペプチド；あるいは更に好ましくは糸状真菌ポリペプチド、例えばアクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、オーレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、クリプトコックス属 (*Cryptococcus*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、フミコラ属 (*Humicola*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフトラ属 (*Myceliophthora*)、ネオカリマスチクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスポラ属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスクス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、トリポクラジウム属 (*Tolypocladium*) 又はトリコデルマ属 (*Trichoderma*) ポリペプチドであり得る。

20

30

【0036】

好ましい態様において、ポリペプチドは、サッカロミセス属・カースベルゲンシス (*Saccharomyces carsbergensis*)、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ジアスタチクス (*Saccharomyces diastaticus*)、サッカロミセス・ドウグラシ (*Saccharomyces douglasii*)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロミセス・ノルベンシス (*Saccharomyces norbensis*) 又はサッカロミセス・オビホルミス (*Saccharomyces oviiformis*) ポリペプチドである。

40

【0037】

別の好ましい態様において、ポリペプチドは、アスペルギルス・クレツス (*Aspergillus culeatus*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フェチズス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・ジャポニクス (*Aspergillus japonicus*)

50

us)、アスペルギルス・ニズランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、フザリウム・バクトリジオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フザリウム・セレアリス (*Fusarium cerealis*)、フザリウム・クルックウェレンセ (*Fusarium crookwellense*)、フザリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*)、フザリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、フザリウム・グラミンム (*Fusarium graminum*)、フザリウム・ヘテロスポルム (*Fusarium heterosporum*)、フザリウム・ネグンジ (*Fusarium negundi*)、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・レタイキュラツム (*Fusarium reticulatum*)、フザリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)、フザリウム・ザムブチナム (*Fusarium sambucinum*)、フザリウム・ザルコクロウム (*Fusarium sarcochroum*)、フザリウム・スポロトリキオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、フザリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フザリウム・トルロスム (*Fusarium torulosum*)、フザリウム・トリコセキオイデス (*Fusarium trichothecioides*)、フザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*)、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、フミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*)、ムコール・ミエヘイ (*Mucor miehei*)、ミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、ニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・パープロゲナム (*purpurogenum*)、トリコデルマ・ハージアナム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・コニンギー (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンギブラキアツム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 又はトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) ポリペプチドである。

【0038】

別の好ましい態様において、ポリペプチドはロドサームス・オバメンシス (*Rhodothermus obamensis*)、又はロドサームス・マリヌス (*Rhodothermus marinus*) のポリペプチドである。

【0039】

更に好ましい態様において、ポリペプチドはロドサームス・オバメンシスのポリペプチドであり、そして最も好ましくは、エスケリッチャ・コリ DSM12607に含まれるプラスミド pT7Blue に含まれる配列 (例1を参照のこと) のコード領域のポリペプチド、例えば配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0040】

前記の種に関しては、それらが知られている種名にかかわらず、本発明は完全及び不完全状態、ならびにその他の分類学的等価物、例えば無性世代を含んで成ると理解される。適切な等価物の同一性を、当業者は容易に理解する。例えば、ロドサームス・オバメンシスの分類学的等価物は、Sako et al., International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 46 (4) pp. 1099-1104 (1996) によって定義されている。

【0041】

これらの種の系統は、多数の培養コレクション、American Type Culture Collection (ATCC)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)、Japan Collection of Microorganism (JCM)、Centraalbureau Voor Schimmelcultuur

10

20

30

40

50

es (CBS) 及び Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL) において、一般に容易に入手可能である。

【0042】

更にこのようなポリペプチドは、前記のプロープを用いて、自然（例えば土壌、堆肥、水等）から単離された微生物を含めたその他の供給源から同定され、そして入手され得る。天然生息地から微生物を単離するための技法は、当業界で周知である。次に、別の微生物のゲノム又は cDNA ライブラリーを同様にスクリーニングすることにより、核酸配列が得られる。ポリペプチドをコードする核酸配列がプロープにより一旦検出されれば、当業者

10

【0043】

本明細書中で定義する場合、「単離された」ポリペプチドとは、本質的にその他の非分枝酵素ポリペプチドを含まない、例えば、SDS-PAGE により決定した場合に、少なくとも約 20% 純粋な、好ましくは少なくとも約 40% 純粋な、更に好ましくは約 60% 純粋な、より更に好ましくは約 80% 純粋な、最も好ましくは約 90% 純粋な、そして更には最も好ましくは約 95% 純粋であるポリペプチドである。

【0044】

本発明の核酸配列によりコードされるポリペプチドは、もう一つのポリペプチドが前記ポリペプチド又はそのフラグメントの N 末端又は C 末端で融合される融合ポリペプチド又は開裂可能な融合ポリペプチドも含む。融合ポリペプチドは、別のポリペプチドをコードする核酸配列（又はその一部）を本発明の核酸配列（又はその一部）に融合することにより生成される。融合ポリペプチドを生成するための技法は当業界で既知であり、それらがフレーム内にあり、そして融合ポリペプチドの発現が同一プロモーター及びターミネーターの制御下にあるように、ポリペプチドをコードするコード配列をライゲーションすることを含む。

20

【0045】

核酸配列

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする単離した核酸配列にも関する。好ましい態様において、核酸配列は配列番号 1 に記載される。別の更に好ましい態様において、核酸配列は E・コリ DSM 12607 に含まれるプラスミド pT7Blue に含まれる配列（例 1 を参照のこと）である。本発明は、遺伝暗号の縮重の点で配列番号 1 とは異なる配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列も含んで成る。本発明は、分枝酵素活性を有する配列番号 2 のフラグメントをコードする配列番号 1 の亜配列にも関する。

30

【0046】

配列番号 1 の亜配列は配列番号 1 に包含される核酸配列であるが、但し 5' 及び／又は 3' 末端から 1 又は複数のヌクレオチドが欠失されている。

【0047】

本発明は、配列番号 1 のポリペプチドをコードしている配列中に少なくとも 1 つの変異を含んで成る変異体核酸配列にも関するが、この場合、変異体核酸配列は配列番号 2 のアミノ酸から成るポリペプチドをコードする。

40

【0048】

ポリペプチドをコードする核酸配列を単離又はクローン化するために用いられる技術は当業界で既知であり、その例としては、例えばゲノム DNA からの単離、cDNA からの調製、又はそれらの組合せが挙げられる。このようなゲノム DNA からの本発明の核酸配列のクローン化は、例えば例 1 に示す様な周知のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 又は共有の構造的特徴でクローン化した DNA フラグメントを検出するための発現ライブラリーの抗体スクリーニングを用いることにより実行され得る（例えば、Innis et al

50

1. , 1990, 「PCR: A Guide to Methods and Application」 Academic Press, New Yorkを参照のこと）。その他の核酸増幅法、例えばリガーゼ連鎖反応（LCR）、結合活性化転写（LAT）及び核酸配列を基にした増幅（NASBA）も用い得る。核酸配列は、ロドサームスの菌株、あるいは別の又は関連した生物からクローン化され、したがって、例えば核酸配列のポリペプチドをコードしている領域の対立遺伝子の又は種変異体であり得る。

【0049】

「単離した核酸配列」という用語は、本明細書中で用いる場合は、その他の核酸配列を本質的に含みない、例えばアガロース電気泳動により決定した場合に、少なくとも約20%純粋な、好ましくは少なくとも約40%純粋な、更に好ましくは少なくとも約60%純粋な、より更に好ましくは少なくとも約80%純粋な、最も好ましくは少なくとも約90%純粋である核酸配列を指す。例えば、単離した核酸配列は、その天然の位置からそれが再生成される異なる部位に核酸配列を配置し直すために遺伝子操作に用いられる標準的なクローン化法により得られる。クローン化法は、ポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る所望の核酸フラグメントの除去及び単離、そのフラグメントのベクター分子への挿入、そして核酸配列の多数のコピー又はクローンが複製される宿主細胞中への組換えベクターの組み込みを含み得る。核酸配列は、ゲノムDNA、cDNA、RNA、半合成、合成起源、又はそれらの任意の組合せのものであり得る。

【0050】

本発明は、少なくとも約65%、好ましくは約70%、好ましくは約80%、更に好ましくは約90%、より更に好ましくは約95%、そして最も好ましくは97%の、活性ポリペプチドをコードする配列番号1の成熟ポリペプチドのコード配列（すなわち、ヌクレオチド4～1863）とある程度の相同性を有する核酸配列にも関する。本発明の目的のために、2つの核酸配列間の相同性の程度は、タンパク質及びDNA、その両方のアラインメントに有用な、完全なSmith-Watermanアラインメントを用いて決定する。デフォルトスコアリングBLOSUM50及び同一性マトリックスは、それぞれタンパク質及びDNAのアラインメントに使用される。ギャップの最初の残基についてのペナルティーは、タンパク質で-12、そしてDNAで-16であり、一方、ギャップの追加の残基についてのペナルティーは、タンパク質で-2、そしてDNAで-4である。アラインメントはFASTAパッケージの第20.6版で行う（W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), Improved Tools for Biological Sequence Analysis, PNAS 85:2444-2448, 及びW. R. Pearson (1990) Rapid and sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA, Methods in Enzymology 183:63-98）。

【0051】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列の修飾は、本ポリペプチドと実質的に類似のポリペプチドの合成に必要である。本ポリペプチドと「実質的に類似の」という用語は、非天然形態のポリペプチドを示す。これらのポリペプチドは、何らかの工学処理方法で、その元の供給源から単離されたポリペプチドと異なり、例えば、比活性、熱安定性、至適pHなどで異なる変異体とは異なり得る。変異体配列は、配列番号1の一部をコードするポリペプチドとして示される核酸配列、例えばその亜配列を基礎にして、及び／又は核酸配列によりコードされるポリペプチドの別のアミノ酸配列を生じないが、しかし酵素の生成を意図された宿主生物のコドン使用に対応するヌクレオチド置換の導入により、あるいは異なるアミノ酸配列を生じ得るヌクレオチド置換の導入により構築され得る。ヌクレオチド置換の一般的記載に関しては、例えば、Ford et al., 1991, 「Protein Expression and Purification」2:95-107を参照のこと。

【0052】

このような置換は分子の機能に決定的な領域の外側でなすことができ、そして依然として

10

20

30

40

50

活性なポリペプチドを生じる、ということは当業者には明らかである。本発明の単離した核酸配列によりコードされるポリペプチドの活性に不可欠な、したがって好ましくは置換を受けないアミノ酸残基は、当業界で既知の手法により、例えば部位指定突然変異誘発又はアラニン走査変異誘発により同定され得る（例えば、Cunningham及びWells、1989、「Science」244：1081-1085参照）。後者の技法では、変異は、分子中のあらゆる正に荷電した残基に導入され、その結果生じる変異体分子が分枝酵素活性に関して試験されて、分子の活性に重大であるアミノ酸残基を同定する。基質-酵素相互作用の部位は、核磁気共鳴分析、結晶学又は光親和性標識のような技法により決定されるような三次元構造の分析により決定され得る（例えば、de Voss et al.、1992、「Science」255：306-312；Smith et al.、1992、「Journal of Molecular Biology」224：899-904；Wlodaver et al.、1992、「FEBS Letters」309：59-64を参照のこと）。

【0053】

本発明はまた、本明細書で定義したように、非常に低いストリンジェントな条件、好ましくは低いストリンジェントな条件、更に好ましくは中程度にストリンジェントな条件、更に好ましくは中程度-高度にストリンジェントな条件、より更に好ましくは高度にストリンジェントな条件、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件のもと、同一の条件下で配列番号1の核酸配列若しくはその相補鎖；又はそれらの対立変異体及び亜配列（Sambrook et al.、1989（前記））とハイブリダイズする核酸プローブとハイブリダイズする、本発明のポリペプチドをコードする単離した核酸配列に関する。

【0054】

本発明はまた、（a）非常に低い、低い、中程度、中程度-高度、高度、又は非常に高度にストリンジェントな条件下で（i）配列番号1のヌクレオチド、（ii）配列番号1のヌクレオチドに含まれるcDNA配列、（iii）（i）若しくは（ii）の亜配列、又は（iv）（i）、（ii）、若しくは（iii）の相補鎖とハイブリダイズし；そして（b）その核酸配列を単離することによって生成する単離した核酸配列に関する。亜配列は、好ましくは少なくとも100ヌクレオチドの配列、例えば分枝酵素活性を有するポリペプチドフラグメントをコードする配列である。

【0055】

変異体核酸配列の生成方法

本発明は更に、配列番号1のポリペプチドのコード配列又はその亜配列に少なくとも1つの変異を導入することを含んで成る変異体核酸配列の生成方法であって、変異体核酸配列が配列番号2のアミノ酸又は分枝酵素活性を有するそのフラグメントから成るポリペプチドをコードする方法に関する。

【0056】

一方のヌクレオチドを他方のヌクレオチドに交換するための、変異の核酸配列への導入は、当業界で既知の任意の方法を用いた部位指定突然変異誘発によりなし遂げ得る。特に有用なのは、注目の挿入物を有する超コイル二本鎖DNAベクターと所望の変異を含む2つの合成プライマーとを用いる手法である。各々がベクターの反対鎖と相補的なオリゴヌクレオチドプライマーは、Pfu DNAポリメラーゼによって温度周期進行中に伸張する。プライマーの組み込み時に、スタガーニックを含む変異化プラスミドが生成される。温度周期進行後、メチル化及び半メチル化DNAに特異的なDpnIで生成物を処理して親DNA鋳型を消化し、そして変異含有合成DNAを選択する。当業界で既知のその他の手法も用い得る。

【0057】

核酸構築物

本発明は、調節（control）配列と両立可能な条件下で適切な宿主細胞でのコード配列の発現を指示する1又は複数の調節配列と作用可能に連結した本発明の核酸配列を

含んで成る核酸構築物にも関する。発現は、ポリペプチドの生成に関与するあらゆる工程を含むと理解され、その例としては、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾及び分泌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

「核酸構築物」は、天然遺伝子から単離される、あるいはそうでなければ天然には存在しない方法で、結合され、並置される核酸のセグメントを含むよう修飾された一本鎖又は二本鎖の核酸分子と本明細書中では定義される。核酸構築物という用語は、核酸構築物が本発明のコード配列の発現に必要な調節配列をすべて含む場合の発現カセットという用語と同義である。「コード配列」という用語は、そのタンパク質生成物質のアミノ酸配列を直接特定する核酸配列と本明細書中では定義される。コード配列の境界は、一般に、リボソーム結合部位により（原核生物）、又はmRNAの5'末端のオープンリーディングフレームのすぐ上流に位置するATG開始コドンとmRNAの3'末端のオープンリーディングフレームのすぐ下流に位置する転写ターミネーター配列とにより（真核生物）決定される。コード配列としては、DNA、cDNA及び組換え核酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0059】

本発明のポリペプチドをコードする単離した核酸配列を種々の方法で操作して、ポリペプチドの発現を提供し得る。それをベクターに挿入する前の核酸配列の操作は、発現ベクターによっては望ましいか又は必要である。組換えDNA法を用いて核酸配列を修飾する技法は、当業界では公知である。

20

【0060】

「調節配列」という用語は、本発明のポリペプチドの発現に必要な又は有益なすべての成分を含むと本明細書中では定義される。各々の調節配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列に対して天然のものであるか又は外来のものであり得る。このような調節配列としては、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列及び転写ターミネーターが挙げられるが、これらに限定されない。最低限度、調節配列は、プロモーターと、転写及び翻訳停止シグナルを含む。調節配列は、調節配列とポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域とのライゲーションを容易にする特異的制限部位を導入する目的のためのリンカーを備え得る。「作用可能に連結される」という用語は、調節配列が、ポリペプチドの発現を指示するように、DNA配列のコード配列に関連する位置に適切におかれる相対的配置と本明細書中では定義される。

30

【0061】

前記調節配列は、核酸配列の発現のために宿主により認識される核酸配列である適切なプロモーター配列であり得る。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を仲介する転写調節配列を含む。プロモーターは、選択宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列、例えば変異体、切頭型及びハイブリッドプロモーターであり得るし、宿主細胞に対して同種又は異種の細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られる。

【0062】

特に細菌宿主細胞における本発明の核酸構築物の転写を指示するのに適したプロモーターの例は、E. コリのlacオペロン、ストレプトミセス・コエリカラー (Streptomyces coelicolor) のアガラーゼ遺伝子 (dagA)、バチルス・ズブチリスのレバンスクラゼ遺伝子 (sacB)、バチルス・リヘニホルミスのα-アミラーゼ遺伝子 (amyL)、バチルス・ステアロサーモフィラスのマルトース原性アミラーゼ遺伝子 (amyM)、バチルス・アミロリケファシエンスのα-アミラーゼ遺伝子 (amyQ)、バチルス・リヘニホルミスのペニシリナーゼ遺伝子 (penP)、バチルス・ズブチリスのxyIA及びxyIB遺伝子及び原核生物β-ラクタマーゼ遺伝子 (Vil-la-Kamaroff et al., 1978, 「Proceedings of the National Academy of Sciences USA」75:3727-3731) から得られるプロモーター、並びにtacプロモーター (DeBoer et al., 1983, 「Proceedings of the National

40

50

l Academy of Sciences USA」80:21-25)である。さらなるプロモーターは、「Scientific American」、1980、242:74-94中の“Useful proteins from recombinant bacteria”及びSambrook et al., 1989(前記)に記載されている。

【0063】

糸状真菌宿主細胞における本発明の核酸構築物の転写を指示するのに適したプロモーターの例は、アスペルギルス・オリザエのTAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイのアスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガーの中性 α -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーの酸安定性 α -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・アワモリのグルコアミラーゼ(glaA)、リゾムコール・ミエヘイのリパーゼ、アスペルギルス・オリザエのアルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリザエのトリオースホスフェートイソメラーゼ、アスペルギルス・ニズランスのアセトアミダーゼ及びフザリウム・オキシスポルムのトリプシン様プロテアーゼ(WO96/00787)に関する遺伝子から得られるプロモーター、ならびにNA2-tpiプロモーター(アスペルギルス・ニガーの中性 α -アミラーゼ及びアスペルギルス・オリザエのトリオースホスフェートイソメラーゼに関する遺伝子からのプロモーターのハイブリッド)、そしてその変異体、切頭型及びハイブリッドプロモーターである。

10

【0064】

酵母菌宿主では、有用なプロモーターは、サッカロミセス・セレビシエのエノラーゼ(ENO-1)、サッカロミセス・セレビシエのガラクトキナーゼ(GAL1)、サッカロミセス・セレビシエのアルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(ADH2/GAP)、及びサッカロミセス・セレビシエの3-ホスホグリセレートキナーゼに関する遺伝子から得られる。酵母菌宿主細胞に対するその他の有用なプロモーターは、Romanos et al., 1992、「Yeast」8:423-488に記載されている。

20

【0065】

調節配列は、転写を終結するよう宿主細胞に認識される配列である適切な転写ターミネーター配列でもある。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作用可能に連結される。選択される宿主細胞中で機能性である任意のターミネーターは、本発明に用い得る。

30

【0066】

糸状真菌宿主細胞に好ましいターミネーターは、アスペルギルス・オリザエのTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニズランスのアントラニル酸合成酵素、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼ及びフザリウム・オキシスポルムのトリプシン様プロテアーゼに関する遺伝子から得られる。

【0067】

酵母菌宿主細胞に好ましいターミネーターは、サッカロミセス・セレビシエのエノラーゼ、サッカロミセス・セレビシエのチトクロームC(CYC1)及びサッカロミセス・セレビシエのグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼに関する遺伝子から得られる。酵母菌宿主細胞に有用なその他のターミネーターは、Romanos et al., 1992(前記)に記載されている。

40

【0068】

調節配列は、宿主細胞による翻訳に関して重要なmRNAの非翻訳領域である適切なリーダー配列でもある。リーダー配列は、ペプチドをコードする核酸配列の5'末端に作用可能に連結される。選択される宿主細胞中で機能性である任意のリーダー配列は、本発明に用い得る。

【0069】

糸状真菌宿主細胞に好ましいリーダーは、アスペルギルス・オリザエのTAKAアミラーゼ及びアスペルギルス・ニズランスのトリオースホスフェートイソメラーゼに関する遺伝

50

子から得られる。

【0070】

酵母菌宿主細胞にとって適当なリーダーは、サッカロミセス・セレビシエのエノラーゼ（ENO-1）、サッカロミセス・セレビシエの3-ホスフェートグリセレートキナーゼ、サッカロミセス・セレビシエの α 因子及びサッカロミセス・セレビシエのアルコールデヒドロゲナーゼ／グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（ADH2／GAP）に関する遺伝子から得られる。

【0071】

調節配列は、核酸配列の3'末端に作用可能に連結される配列であって、転写された場合に、ポリアデノシン残基を転写mRNAに付加するためのシグナルとして宿主細胞に認識されるポリアデニル化配列でもあり得る。選択された宿主細胞中で機能性である任意のポリアデニル化配列は、本発明に用い得る。

10

【0072】

糸状真菌宿主細胞に好ましいポリアデニル化配列は、アスペルギルス・オリザエのTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニズランのアントラニル酸合成酵素、フザリウム・オキシスポルムのトリプシン様プロテアーゼ及びアスペルギルス・ニガーの α グルコシダーゼに関する遺伝子から得られる。

【0073】

酵母菌宿主細胞に有用なポリアデニル化配列は、Guo及びSherman、1995、「Molecular Cellular Biology」15：5983-5990に記載されている。

20

【0074】

調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に結合されるアミノ酸配列をコードし、細胞の分泌経路にコードされたペプチドを向けるシグナルペプチドのコード領域でもある。核酸配列のコード配列の5'末端は、分泌ポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと、翻訳リーディングフレームで天然に連結したシグナルペプチドのコード領域を固有に含み得る。あるいは、コード配列の5'末端は、コード配列に対して外来性であるシグナルペプチドのコード領域を含み得る。外来性シグナルペプチドのコード領域は、コード配列がシグナルペプチドのコード領域を天然に含まない場合に必要であり得る。あるいは、外来性シグナルペプチドのコード領域は、ポリペプチドの分泌を増強するために、天然シグナルペプチドのコード領域を単に置換し得る。しかしながら、発現ポリペプチドを選択された宿主細胞の分泌経路に向ける任意のシグナルペプチドのコード領域は、本発明に用い得る。

30

【0075】

細菌宿主細胞に有効なシグナルペプチドのコード領域は、バチルス属のNCIB11837マルトース原性アミラーゼ、バチルス・ステアロサーモフィルスの α アミラーゼ、バチルス・リヘニホルミスのズブチリシン、バチルス・リヘニホルミスの β ラクタマーゼ、バチルス・ステアロサーモフィルスの中性プロテアーゼ（nprT、nprS、nprM）及びバチルス・ズブチリスのprsAに関する遺伝子から得られるシグナルペプチドのコード領域である。さらなるシグナルペプチドは、Simonen及びPalva、1993、「Microbiological Reviews」57：109-137に記載されている。

40

【0076】

糸状真菌宿主細胞に有効なシグナルペプチドのコード領域は、アスペルギルス・オリザエのTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーの中性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイのアスパラギン酸プロテイナーゼ、フミコラ・インソレンスのセルラーゼ及びフミコラ・ラヌギノサのリパーゼに関する遺伝子から得られるシグナルペプチドのコード領域である。

【0077】

酵母菌宿主細胞に有用なシグナルペプチドは、サッカロミセス・セレビシエの α 因子及び

50

サッカロミセス・セレピシエのインベルターゼに関する遺伝子から得られる。その他の有用なシグナルペプチドのコード領域は、Romanos et al., 1992 (前記) に記載されている。

【0078】

調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドのコード領域でもある。その結果生じるポリペプチドはプロ酵素又はプロポリペプチド (又はいくつかの場合にはチモーゲン) として知られている。プロポリペプチドは一般に不活性であり、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的又は自己触媒的開裂により成熟活性ポリペプチドに変換され得る。プロペプチドのコード領域は、バチルス・ズブチリスのアルカリ性プロテアーゼ (aprE)、バチルス・ズブチリスの中性プロテアーゼ (nprT)、サッカロミセス・セレピシエの α 因子、リゾムコール・ミエヘイのアスパラギン酸プロテイナーゼ及びミセリオフトラ・サーモフィラのラッカーゼ (WO95/33836) に関する遺伝子から得られる。

10

【0079】

シグナルペプチド及びプロペプチド領域がともにポリペプチドのアミノ末端に存在する場合、プロペプチド領域はポリペプチドのアミノ末端の隣に位置し、シグナルペプチド領域はプロペプチド領域のアミノ末端の隣に位置する。

【0080】

宿主細胞の増殖に関してポリペプチドの発現の制御 (regulation) を可能にする制御配列を付加するのも望ましい。制御系の例は、制御化合物の存在を含めた、化学的又は物理的刺激に対して切り換えられる遺伝子の発現を引き起こすものである。原核生物系における制御系としては、lac、tac及びtrpオペレーター系が挙げられる。酵母菌では、ADH2系又はGAL1系が用いられる。糸状真菌では、TAKA α アミラーゼプロモーター、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼプロモーター及びアスペルギルス・オリザエのグルコアミラーゼプロモーターが制御配列として用いられる。制御配列のその他の例は、遺伝子増幅を可能にするものである。真核生物系では、これらの例としては、メトトレキセートの存在下で増幅されるジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、及び重金属を用いて増幅されるメタロチオネイン遺伝子が挙げられる。これらの場合、ポリペプチドをコードする核酸配列は、制御配列と作用可能に連結される。

20

【0081】

発現ベクター

本発明は更に、本発明の核酸配列、プロモーター、ならびに転写及び翻訳停止シグナルを含んで成る組換え発現ベクターに関する。前記の種々の核酸及び調節配列は、一緒に連結されて、このような部位でのポリペプチドをコードする核酸の挿入又は置換を可能にするために1又は複数の便利な制限部位を含みうる組換え発現ベクターを生成し得る。あるいは、本発明の核酸配列は、発現のための適切なベクター中に核酸配列又はその配列を含んで成る核酸構築物を挿入することにより発現され得る。発現ベクターを作製する場合、コード配列が発現のための適切な調節配列と作用可能に連結されるように、コード配列はベクター内に位置する。

30

【0082】

組換え発現ベクターは、都合良く組換えDNA法にかけられ得る、そして核酸配列の発現をもたらし得る任意のベクター (例えばプラスミド又はウイルス) であり得る。ベクターの選択は、典型的には、ベクターが導入される宿主細胞とのベクターの適合性によっている。ベクターは、直鎖状又は閉環状プラスミドであり得る。

40

【0083】

ベクターは、自律的複製ベクター、即ち染色体外存在物として存在するベクターであり、その複製は染色体複製とは無関係で、例えば、プラスミド、染色体外要素、ミニ染色体又は人工染色体がその例である。ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含み得る。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入された場合、そのゲノムに組込みされて、それが組込みされた染色体と一緒に複製され得る。更に、宿主細胞のゲノム中に導入され

50

る全DNA、又はトランスポゾンと一緒に含む単一ベクター又はプラスミド、あるいは2又はそれ以上のベクター又はプラスミドが用いられる。

【0084】

本発明のベクターは、好ましくは、形質変換した細胞の選択を容易にする1又は複数の選択マーカーを含む。選択マーカーは、その生成物が殺生物剤又はウイルス耐性、重金属に対する耐性、栄養素要求株に対する原栄養性等を提供する生成物の遺伝子である。細菌選択マーカーの例は、バチルス・ズブチリス又はバチルス・リヘニホルミスからのdal遺伝子、あるいは抗生物質耐性、例えばアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール又はテトラサイクリン耐性を付与するマーカーである。酵母菌宿主細胞に適したマーカーは、ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1及びURA3である。糸状真菌宿主細胞に用いるための選択マーカーとしては、amdS（アセトアミダーゼ）、argB（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、bar（ホスフィノシリシンアセチルトランスフェラーゼ）、hygB（ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、niaD（硝酸レダクターゼ）、pyrG（オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ）、sC（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）、trpC（アントラニル酸合成酵素）、ならびにその等価物が挙げられるが、これらに限定されない。アスペルギルス細胞に用いるのに好ましいのは、アスペルギルス・ニズランス又はアスペルギルス・オリザエのamdS及びpyrG遺伝子、ならびにストレプトミセス・ヒグロスコピクスのbar遺伝子である。

10

【0085】

本発明のベクターは、好ましくは、宿主細胞ゲノムへのベクターの安定な組込み、又はゲノムと無関係の細胞中でのベクターの自律性複製を可能にする要素を含む。

20

【0086】

宿主細胞ゲノムへの組込みのために、ベクターは、相同的又は非相同的組換えにより、ペプチドをコードする核酸配列、又はベクターのゲノムへの安定な組込みのためのベクターのその他の任意の要素に依存し得る。あるいは、ベクターは、宿主細胞のゲノムへの、相同的組換えによる組込みを指示するための付加的核酸配列を含み得る。付加的核酸配列は、染色体中の正確な位置でベクターを宿主細胞ゲノムの中へ組込ませ得る。正確な位置での組込みの見込みを増大するために、組込み性要素は、好ましくは、十分な数の核酸、例えば100～1,500塩基対、好ましくは400～1,500塩基対、そして最も好ましくは800～1,500塩基対を含むべきであり、これは対応する標的配列と高度に相同性で、相同的組換えの可能性を増強する。組込み要素は、宿主細胞のゲノム中の標的配列と相同の任意の配列であり得る。更に、組込み要素は、非コード又はコード核酸配列であり得る。他方、ベクターは、非相同的組換えにより、宿主細胞のゲノムに組込まれ得る。

30

【0087】

自律的複製のために、ベクターは、問題の宿主細胞中でベクターを自律的に複製させ得る複製起点を更に包含し得る。細菌の複製起点の例は、E.コリ中での複製を可能にするプラスミドpBR322、pUC19、pACYC177及びpACYC184、バチルス菌中での複製を可能にするpUB110、pE194、pTA1060及びpAMβ1の複製起点である。酵母菌宿主細胞で用いるための複製起点の例は、2μの複製起点、ARS1、ARS4、ARS1とCEN3の組合せ、ならびにARS4とCEN6の組合せである。複製起点は、宿主細胞中でその機能を温度感受性にする突然変異を有するものである（例えば、Ehrlich）1978、「Proceedings of the National Academy of Sciences USA」75:1433を参照のこと）。

40

【0088】

本発明の核酸配列の1つより多いコピーを宿主細胞に挿入して、遺伝子生成物の生成が増大され得る。核酸配列のコピー数の増大は、配列の少なくとも1つの付加的コピーを宿主細胞ゲノムに組込むことにより、又は核酸配列を有する増幅性選択マーカー遺伝子を含入

50

することにより得られるが、この場合、選択マーカー遺伝子の増幅コピーを含む細胞と、それによる核酸配列の付加的コピーが、適切な選択可能な作用物質の存在下で細胞を培養することにより選択され得る。

【0089】

本発明の組換え発現ベクターを構築するために前記の要素をライゲーションするために用いられる手法は、当業者には周知である（例えば、Sambrook et al., 1989（前記）を参照のこと）。

【0090】

宿主細胞

本発明は更に、本発明の核酸配列を含んで成り、ポリペプチドの組換え体生成に有益に用いられる組換え宿主細胞に関する。本発明の核酸配列を含んで成るベクターは、ベクターが、前記のように染色体組込み物として、又は自己複製染色体外ベクターとして保持されるように、宿主細胞中に導入される。「宿主細胞」という用語は、複製中に生じた変異のために親細胞と同一でない親細胞の任意の子孫を含む。宿主細胞の選択は、ポリペプチドをコードする遺伝子及びその供給源に大いに依存している。

【0091】

宿主細胞は、単細胞微生物、例えば原核生物、又は非単細胞性微生物、例えば真核生物であり得る。

【0092】

有用な単細胞性細胞は、細菌細胞、例えばグラム陽性細菌で、その例としては、バチルス属細胞、例えばバチルス・アルカロフィルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・サーキュランス、バチルス・クラウシ、バチルス・コアギュランス、バチルス・ラウツス、バチルス・レンツス、バチルス・リヘニホルミス、バチルス・メガテリウム、バチルス・ステアロサーモフィルス、バチルス・ズブチリス又はバチルス・スリングエンシス；あるいはストレプトミセス菌細胞、例えばストレプトミセス・リビダンス又はストレプトミセス・ムリヌス；あるいはグラム陰性細菌、例えばE. コリ及びシュードモナス種が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい態様において、細菌宿主細胞は、バチルス・レンツス、バチルス・リヘニホルミス、バチルス・ステアロサーモフィルス、又はバチルス・ズブチリス細胞である。別の好ましい態様において、バチルス菌細胞は、親アルカリ性バチルス菌である。

【0093】

細菌宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、コンピテント細胞（例えば、Young and Spizizin, 1961、「Journal of Bacteriology」81:823-829又はDubnau and Davidoff-Abelson, 1971、「Journal of Molecular Biology」56:209-221を参照のこと）を用いたプロトプラスト形質変換（例えば、Chang and Cohen, 1979、「Molecular General Genetics」168:111-115を参照のこと）、エレクトロポレーション（例えば、Shigekawa and Dower, 1988、「Biotechniques」6:742-751を参照のこと）又は接合（例えば、Koehler and Thorne, 1987、「Journal of Bacteriology」169:5771-5278を参照のこと）により実行され得る。

【0094】

宿主細胞は、真核生物、例えば哺乳類、昆虫、植物又は真菌細胞であり得る。

【0095】

好ましい態様において、宿主細胞は真菌細胞である。「真菌」とは、本明細書中で用いる場合には、子囊菌門、担子菌門、ツボカビ門及び接合菌門（Hawksworth et al., 「Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi」8版1995, CAB International, University Press, Cambridge, UKによる定義）、ならびに卵菌門

10

20

30

40

50

(Hawksworth et al., 1995 (前記) p171に引用)、そしてすべての糸状胞子真菌(Hawksworth et al., 1995 (前記))を含む。

【0096】

更に好ましい態様において、真菌宿主細胞は酵母菌細胞である。「酵母菌」とは、本明細書中で用いる場合には、子嚢胞子形成酵母菌(エンドミセス目)、担子菌形成酵母菌、及び不完全真菌(Blastomycetes)に属する酵母菌が含まれる。酵母菌の分類は将来、変わり得るため、本発明の目的のためには、酵母菌は、Biology and Activities of Yeast (Skinner, F. A., Passmore, S. M. 及びDavenport, R. R. 編「Soc. App. Bacteriol. Symposium Series」No. 9, 1980)に記載されたように定義する。

10

【0097】

より更に好ましい態様において、酵母菌宿主細胞はカンジダ属、ハンセヌラ属、クルイペロミセス属、ピキア属、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属又はヤローウィア属の細胞である。

【0098】

最も好ましい態様において、酵母菌宿主細胞はサッカロミセス・カールスベルゲンシス(Saccharomyces carlsbergensis)、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ジアスタチクス(Saccharomyces diastaticus)、サッカロミセス・ドウグラシ(Saccharomyces douglasii)、サッカロミセス・クルイペリ、サッカロミセス・ノルベンシス(Saccharomyces norbensis)又はサッカロミセス・オビホルミス細胞である。別の最も好ましい態様において、酵母菌宿主細胞は、クルイペロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)細胞である。別の最も好ましい態様において、酵母菌宿主細胞はヤローウィア・リポリチカ細胞である。

20

【0099】

別の更に好ましい態様において、真菌宿主細胞は糸状真菌細胞である。「糸状真菌」は、真菌門及び卵菌門のすべての糸状形態を含む(Hawksworth et al., 1995 (前記)により定義)。糸状真菌は、キチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン及びその他の複合多糖で構成される菌糸体壁を特徴とする。植物性成長は菌糸伸張により、そして炭素異化作用は無条件に好気性である。これに対比して、酵母菌、例えばサッカロミセス・セレビシエによる植物性成長は、単細胞性葉状体の出芽によるもので、炭素異化は発酵であり得る。

30

【0100】

より更に好ましい態様において、糸状真菌宿主細胞は、例えばアクレモニウム属(Acremonium)、アスペルギルス属、フザリウム属、フミコラ属、ムコール属、ミセリオフトラ属、ニューロスボラ属、ペニシリウム属、チエラビア属(Thielavia)、トリポクラジウム属又はトリコデルマ属の細胞であるが、これらに限定されない。

【0101】

最も好ましい態様において、糸状真菌宿主細胞は、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・フェチズス、アスペルギルス・ジャポニクス、アスペルギルス・ニズランス、アスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・オリザエ細胞である。別の最も好ましい態様において、糸状真菌宿主細胞は、フザリウム・バクトリジオイデス、フザリウム・セラリス、フザリウム・クルックウェレンセ、フザリウム・クルモルム、フザリウム・グラミネアルム、フザリウム・グラミヌム、フザリウム・ヘテロスポルム、フザリウム・ネグンジ、フザリウム・オキシスポルム、フザリウム・レティキラツム、フザリウム・ロゼウム、フザリウム・ザムブチヌム、フザリウム・ザルコロウム、フザリウム・スポロトリキオイデス、フザリウム・スルフレウム、フザリウム・トルロスム、フザリウム・トリコセキオイデス又はフザリウム・ベネナツム細胞である。より最も好ましい態様において、糸状

40

50

菌親細胞はフザリウム・ベネナツム (N i e r e n b e r g の新種) の細胞である。別の最も好ましい態様において、糸状真菌親細胞は、フミコラ・インソレンス、フミコラ・ラスギノサ、ムコール・ミエヘイ、ミセリオフトラ・サーモフィラ、ニューロスポラ・クラッサ、ペニシリウム・パープロゲナム、シーラビア・テレストリス (Thielavia terrestris)、トリコデルマ・ハージアナム、トリコデルマ・コニンギー、トリコデルマ・ロンギブラキアツム、トリコデルマ・リーセイ又はトリコデルマ・ピリデ細胞である。

【0102】

真菌細胞は、それ自体既知の方法での、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質変換、及び細胞壁の再生を含んで成る方法により形質変換され得る。アスペルギルス宿主細胞の形質変換に適した手法は、欧州特許第238023号、及びYelton et al., 1984、「Proceedings of the National Academy of Science USA」81:1470-1474に記載されている。フザリウム種の形質変換に適した方法は、Malaridier et al., 1989、「Gene」78:147-156及びWO96/00787に記載されている。酵母菌は、Becker and Guarente, In Abelson, J. N. and Simon, M. I. 編「Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology」Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983,「Journal of Bacteriology」153:163;及びHinnen et al., 1978,「Proceedings of the National Academy of Sciences USA」75:1920に記載された方法を用いて形質変換し得る。

【0103】

生成の方法

本発明はまた、本発明のポリペプチドを生成する方法であって、(a) 菌株を、前記ポリペプチドを生成することができるその野生型で培養し;そして(b)そのポリペプチドを回収することを含んで成る方法に関する。好ましくは、前記菌株はロドサームス属のものであり、そして更に好ましくはロドサームス・オバメンシスである。

【0104】

本発明はまた、本発明のポリペプチドを生成する方法であって、(a) 前記ポリペプチドの生成を助成する条件下で宿主細胞を培養し、(b) 前記ポリペプチドを回収することを含んで成る方法に関する。

【0105】

本発明はまた、本発明のポリペプチドを生成する方法であって、(a) 宿主細胞をポリペプチドの生成を助成する条件下で培養し、ここで、宿主細胞は配列番号1のポリペプチドのコード領域において少なくとも1つの変異を有する変異体核酸配列を含んで成り、ここで、変異体核酸配列は配列番号2のアミノ酸から成るポリペプチドをコードする、及び(b) 前記ポリペプチドを回収することを含んで成る方法に関する。

【0106】

本発明の生成方法において、細胞は、当業界で既知の方法を用いて、そのポリペプチドの生成に適切な栄養培地中で培養される。例えば、細胞は、ポリペプチドを発現及び/又は単離させるのに適切な培地及び条件下で実施される、振とうフラスコ培養、実験室又は工業的発酵器における小規模又は大規模発酵(連続、バッチ、フエド バッチ又は固体状態発酵を含む)により培養し得る。培養は当業界で既知の手順を用いて、炭素源及び窒素源、並びに無機塩を含む適切な栄養培地で行なわれる。適切な培地は、商業的な供給者から入手するか、公表された組成(例えば、American Type Culture Collectionカタログ中に)にしたがって調製し得る。ポリペプチドが栄養培地中に分泌されるなら、ペプチドを培地から直接回収することができる。ポリペプチドが分

泌されないなら、細胞溶解物から回収することができる。

【0107】

ポリペプチドは、そのポリペプチドに特異的である、当業界で既知の方法を用いて検出し得る。これらの検出方法は、特異的抗体の使用、酵素生成物の形成又は酵素基質の消失を含み得る。例えば、本明細書に記載したポリペプチドの活性を測定するのに酵素アッセイを用い得る。

【0108】

生じたポリペプチドは当業界で既知の方法で回収し得る。例えば、ポリペプチドは、栄養培地から、遠心、ろ過、抽出、スプレー乾燥、蒸発又は沈澱を含むが、これらに限定されない慣用の手順により回収し得る。

10

【0109】

本発明のポリペプチドは、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティ、疎水性、等電点電気泳動及びサイズ排除）、電気泳動手順（例えば、予備等電点電気泳動）、差溶解度（例えば、硫酸アンモニウム沈澱）、SDS-PAGE又は抽出（例えば、「Protein Purification」J. -C. Jansen and Lars Ryden編、VCH Publishers, New York、1989を参照のこと）を含むが、これらに限定されない、当業界で既知の種々の手順により精製し得る。

【0110】

植物

20

本発明はまた、回収可能な量でポリペプチドを発現し、かつ、生成するように、本発明の分枝酵素活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列で形質変換された、遺伝子組換え植物、植物の部分又は植物細胞にも関する。ポリペプチドは植物又は植物の部分から回収し得る。代りに、組み換えポリペプチドを含む植物又は植物部分はそれ自体食品又は飼料の品質を改良するため、例えば、栄養価値、味のよさ及びレオロジー特性を改良するため又は栄養とならない因子を破壊するために用い得る。

【0111】

遺伝子組換え植物は双子葉植物又は单子葉植物であり得る。单子葉植物はイネ科植物、例えば、牧草（イチゴツナギ、イネ科イチゴツナギ属）、飼料イネ科植物、例えば、フェスチュカ（*festuca*）、ロリウム（*lolium*）、温和なイネ科植物、例えば、アグロスチス（*Agrostis*）並びに穀物、例えば、ムギ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コメ、モロコシ及びメイズ（トウモロコシ）である。

30

【0112】

双子葉植物の例は、タバコ、まめ科植物、例えば、ルピナス、ジャガイモ、砂糖大根、えんどう、マメ、ダイズ及びアブラナ科の植物（アブラナ科）、例えば、カリフラワー、ナタネ及び密接に関連するモデル生物アラビドプシス・サリアナ（*Arabidopsis thaliana*）である。

【0113】

植物の部分の例は茎、カルス、葉、根、果実、種子及び塊茎である。また、特種な植物組織、例えば、葉緑体、アポプラスト（*apoplast*）、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシソーム及び細胞質は植物の部分と考えられる。更に組織の起原が何であれ、あらゆる植物細胞は植物の部分と考えられる。

40

【0114】

また、上記植物の子孫、植物部分及び植物細胞は本発明の範囲内に包含される。

【0115】

本発明のポリペプチドを発現する遺伝子組換え植物又は植物細胞は当業界で既知の方法にしたがって構築される。簡単に言うと、本発明のポリペプチドをコードする1又は複数の発現構築物を植物宿主ゲノムに組み込み、得られた変性植物又は植物細胞を遺伝子組換え植物又は植物細胞に伝播することにより、植物又は植物細胞を構築する。

【0116】

50

便利には、発現構築物は、選択された植物又は植物の部分中で核酸配列の発現に必要な適当な制御配列に作用可能に連結した、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸構築物である。更に、発現構築物は、発現構築物が組み込まれた宿主細胞及び問題の植物への構築物の導入に必要なDNA配列（後者は用いられるDNA導入方法に依存する）を同定するのに有用な選択マーカーを含むことができる。

【0117】

制御配列、例えば、プロモーター配列及びターミネーター配列並びに任意にシグナル配列又はランジット配列の選択は、例えば、ポリペプチドをいつ、どこで、どのように発現させることを望むかに基づいて決定される。例えば、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現は構成的もしくは誘導的でもよく、又は発達上、段階もしくは組織特異的でよく、そして、遺伝子産物は特定の組織又は植物の部分、例えば、種子又は葉を標的とすることができる。制御配列は、例えば、Tague et al., 1988, 「Plant Physiology」86: 506に記載されている。

【0118】

構成的発現のために、35S-CaMVプロモーターを用い得る(Franck et al., 「Cell」21: 285-294, 1980年)。器官特異的プロモーターは、例えば、貯蔵シンク組織、例えば、種子、ジャガイモ塊茎及び果実(Edwards及びCoruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303)又は代謝シンク組織、例えば、分裂組織(Ito et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878)からのプロモーター、種子特異的プロモーター、例えば、コメからのグルテリン、プロラミン、グロブリン又はアルブミンプロモーター(Wu et al., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 885-889)、レグミンB4からのVicia fabaプロモーター及びVicia fabaからの未知の種子タンパク質遺伝子(Conrad et al., 「Journal of Plant Physiology」152: 708-711, 1998年)、種子油体タンパク質からのプロモーター(Chen et al., 「Plant and Cell Physiology」39: 935-941, 1998年)、ブラシカ・ナプス(Brassica napus)からの貯蔵タンパク質napAプロモーター又は当業界で既知のあらゆる他の種子特異的プロモーター、例えば、WO91/14772号記載のものであり得る。更に、プロモーターは葉特異的プロモーター、例えば、コメ又はトマトからのrbcsプロモーター(Kyozuka et al., 「Plant Physiology」102: 991-1000, 1993年)、クロレラウィルス アデニンメチルトランスフェラーゼ遺伝子プロモーター(Mitra and Higgins, 1994, 「Plant Molecular Biology」26: 85-93)又はコメからのaldP遺伝子プロモーター(Kagaya et al., 1995, 「Molecular and General Genetics」248: 668-674)又は傷誘導性プロモーター、例えば、ジャガイモpin2プロモーター(Xu et al., 1993, 「Plant Molecular Biology」22: 573-588)であり得る。

【0119】

プロモーターエンハンサー因子も植物中の酵素の高い発現を達成するのに用い得る。例えば、プロモーターエンハンサー因子は、プロモーターと本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に位置するイントロンであってもよい。例えば、Xu et al., 1993 (上記)は、コメアクチン1遺伝子の第1イントロンを、発現を増強するのに用いることを開示している。

【0120】

選択マーカー遺伝子及び発現構築物のあらゆる他の部分は当業界で利用し得るものから選択し得る。

【0121】

核酸構築物は、アグロバクテリウムを介する形質変換、ウィルスを介する形質変換、マイ

10

20

30

40

50

クロインジェクション、粒子衝撃 (bombardment)、微粒子銃形質変換及びエレクトロポレーションを含んで成る、当業界で既知の慣用の技術にしたがって、植物ゲノムに組み込まれる (Gasser et al., 1990, 「Science」244: 1293, Potrykus, 1990, 「Bio/Technology」8: 535, Shimamoto et al., 1989, 「Nature」338: 274)。

【0122】

現在、アグロバクテリウム・ツメファシエンスを介する遺伝子導入は遺伝子組換え双子葉植物を発生させるための一般に好まれる方法である (概説のために、Hooykas and Schilperoort, 1992, 「Plant Molecular Biology」19: 15-38を参照のこと)。それは単子葉植物を形質変換するのにも使用され得るが、これらの植物を形質変換するために、他の形質転換法が一般に好ましい。現在、遺伝子組換え単子葉植物を生じさせるために一般的に好まれる方法は胚芽のカルス又は発育中の胚芽の粒子衝撃 (形質変換するDNAで被覆された超小型の金又はタングステン粒子) である (Christou, 1992, 「Plant Journal」2: 275-281, Shimamoto, 1994, 「Current Opinion Biotechnology」5: 158-162, Vasil et al., 1992, 「Bio/Technology」10: 667-674)。単子葉植物のための他の方法は、Omirulleh et al., 1993, 「Plant Molecular Biology」21: 415-428に記載された、プロトプラスト形質変換に基づく。

【0123】

形質変換後、発現構築物を組み込んだ形質変換体は、当業界で公知の方法にしたがって、選択され、そして植物全体へと再生される。

【0124】

本発明はまた、(a) ポリペプチドの生成を助成する条件下で、本発明の分枝酵素活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る遺伝子組換え植物又は植物細胞を培養し;そして(b) そのポリペプチドを回収することを含んで成る、本発明のポリペプチドを生成する方法にも関する。

【0125】

組成物

なお、さらなる観点においては、本発明は本発明のポリペプチドを含んで成る組成物に関する。好ましくは、前記組成物は本発明のポリペプチドが濃縮されている。本文脈においては、用語「濃縮された」は組成物の分枝酵素活性が、例えば、1.1の濃縮率で増加したことを示す。

【0126】

前記組成物は主要酵素成分、例えば、単成分組成物として本発明のポリペプチドを含んでよい。あるいは、前記組成物は、複数の酵素活性、例えば、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペプチドグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ又はキシラナーゼを含んで成ることもある。

【0127】

前記ポリペプチド組成物は、当業界で既知の方法にしたがって製造することができ、液体又は乾燥組成物の形でよい。例えば、ポリペプチド組成物は顆粒状物又は微顆粒状物の形でよい。組成物に包含されるポリペプチドは当業界で既知の方法にしたがって安定化し得

る。

【0128】

本発明のポリペプチド組成物の好ましい使用の例を下記に示す。本発明のポリペプチド組成物の投与量及び組成物を用いる他の条件は当業界で既知の方法に基づいて決定し得る。

【0129】

洗剤組成物

本発明の分枝酵素は洗剤組成物に加えられてもよく、そしてその結果、その成分となり得る。

【0130】

本発明の洗剤組成物は、汚れた織物の前処理に適した洗濯用添加剤組成物及びリンスを加えた織物柔軟剤組成物を含む、手洗い又は洗濯機洗剤組成物として調製され、あるいは通常の塗装面の洗浄作業における使用のための洗剤組成物として調製され、あるいは手洗い又は機械の食器洗い作業のために調製され得る。

【0131】

具体的な観点において、本発明は、本発明の分枝酵素を含んで成る洗剤添加物を提供する。前記洗剤添加物及び洗剤組成物は、1又は複数の他の酵素、例えばプロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、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、例えばラッカーゼ、及び／又はペルオキシダーゼを含んで成ることもある。

【0132】

通常、選択した酵素の特性は選択した洗剤との適合性があるべきであり（すなわち、他の酵素的かつ非酵素的成分との適合性がある至適pHなど）、そして前記酵素は有効量で存在すべきである。

【0133】

プロテアーゼ：

適当なプロテアーゼは、動物、植物又は微生物起源のものを含む。微生物起源が好ましい。化学的に修飾され、又はタンパク質工学的に処理した変異体が含まれる。前記プロテアーゼはセリンプロテアーゼ又はメタロプロテアーゼ、好ましくはアルカリ性の微生物プロテアーゼ又はトリプシン様プロテアーゼであってもよい。アルカリ性プロテアーゼの例にはズブチリシンであり、これは特にバチルス属に由来するものであり、例えばズブチリシンNovo、ズブチリシンCarlsberg、ズブチリシン309、ズブチリシン147及びズブチリシン168（WO89/06279に記載）である。トリプシン様プロテアーゼの例は、WO89/06270及びWO94/25583に記載のトリプシン（例えばブタ及びウシ起源のもの）及びフザリウム属のプロテアーゼである。

【0134】

有用なプロテアーゼの例は、WO92/19729、WO98/20115、WO98/20116、及びWO98/34946に記載の変異体であり、特に1又は複数の以下の位置：27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235及び274において置換を有する変異体である。

【0135】

好ましい市販のプロテアーゼ酵素は、Alcalase（商標）、Savinase（商標）、Primase（商標）、Duralase（商標）、Esperase（商標）、及びKannase（商標）（Novo Nordisk A/S）、Maxatase（商標）、Maxacal（商標）、Maxapem（商標）、Properase（商標）、Purafect（商標）、Purafect OxP（商標）、FN2（商標）、及びFN3（商標）（Genecor International Inc.）を含む。

【0136】

リパーゼ：

適当なリパーゼは細菌又は菌起源のものを含む。化学的に修飾され、又はタンパク質工学的に処理された変異体が含まれる。有用なリパーゼの例は、フミコラ（異名サーモミセス（*Thermomyces*））属由来、例えばEP 258 068及びEP 305 216に記載のH. ラスギノサ（*T. ラスギノサス*（*lanuginosus*））由来又はWO96/13580に記載のH. インソレンス由来のリパーゼ、シュードモナス属のリパーゼ、例えばP. アルカリジェネス（*alcaligenes*）若しくはP. シュードアルカリジェネス（*pseudoalcaligenes*）（EP 218 272）、P. セパシア（*cepacia*）（EP 331 376）、P. スタットゼリ（*stutzeri*）（GB 1, 372, 034）、P. フルオレセンス（*fluorescens*）、シュードモナスSP. 菌株SD705（WO95/06720及びWO96/27002）、P. ウィスコンシンシス（*wisconsinensis*）（WO96/12012）由来のもの；バチルス属のリパーゼ、例えばB. ズブチリス（*subtilis*）（Dartois et al., *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131:253-360, 1993）、B. ステアロサーモフィルス（JP64/744992）若しくはB. プミルス（*pumilus*）（WO91/16422）由来のものを含む。

10

【0137】

他の例は、リパーゼ変異体、例えばWO92/05249, WO94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO95/35381, WO96/00292, WO95/30744, WO94/25578, WO95/14783, WO95/22615, WO97/04079及びWO97/07202に記載のものを含む。

20

【0138】

好ましい市販のリパーゼ酵素はLipolase（商標）及びLipolase Ultra（商標）及びLipomax（商標）（Novo Nordisk A/S）を含む。

【0139】

アミラーゼ：

適当なアミラーゼ（ α 及び／又は β ）は、細菌又は菌起源のものを含む。化学的に修飾され、又はタンパク質工学的に処理された変異体が含まれる。アミラーゼは、例えばバチルス属から得た α -アミラーゼ、例えばB. リケミホルミスの特別な菌株のアミラーゼを含み、これはGB 1, 296, 839で更に詳細に説明されている。

30

【0140】

有用なアミラーゼの例は、WO94/02597, WO94/18314, WO96/23873、及びWO97/43424に記載の変異体であり、特に1又は複数の以下の位置：15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408、及び444において置換を有する変異体である。

【0141】

市販のアミラーゼには、Duramyl（商標）、Termamyl（商標）、Fungamyl（商標）及びBAN（商標）（Novo Nordisk A/S）、Rapidase（商標）及びPurastar（商標）（Genecor International Inc.）がある。

40

【0142】

セルラーゼ：

適当なセルラーゼは、細菌又は菌起源のものを含む。化学的に修飾され、又はタンパク質工学的に処理された変異体が含まれる。適当なセルラーゼは、バチルス、シュードモナス、フミコラ、フザリウム、チエラピア、アクレモニウム属由来のセルラーゼ、例えばUS 4, 435, 307, US 5, 648, 263, US 5, 691, 178, US 5, 776, 757及びWO89/09259に開示されている、フミコラ・インソレンス、マイセリオフトラ・サーモフィラ及びフザリウム・オキシスポルムから生成される菌

50

のセルラーゼを含む。

【0143】

特に適当なセルラーゼは、色の保護の利点を有するアルカリ性又は中性セルラーゼである。その様なセルラーゼの例は、EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO96/11262, WO96/29397, WO98/08940に記載のセルラーゼである。他の例はセルラーゼ変異体、例えばWO94/07998, EP 0 531 315, US 5, 457, 046, US 5, 686, 593, US 5, 763, 254, WO95/24471, WO98/12307及びPCT/DK98/00299に記載されているものである。

【0144】

市販のセルラーゼは、Celluzyme (商標)、及びCarezyme (商標) (Novo Nordisk A/S)、Clazinase (商標)、及びPuradax HA (商標) (Genecor International Inc.)、並びにKAC-500 (B) (商標) (Kao Corporation)を含む。

【0145】

ペルオキシダーゼ／オキシダーゼ：

適当なペルオキシダーゼ／オキシダーゼは、植物、細菌又は菌起源のものを含む。化学的に修飾され、又はタンパク質工学的に処理された変異体が含まれる。有用なペルオキシダーゼの例は、コプリヌス (Coprinus) 属由来、例えばC. シネレウス (Cine reus) 由来のペルオキシダーゼ、並びにWO93/24618, WO95/10602、及びWO98/15257に記載のそれらの変異体を含む。

【0146】

市販のペルオキシダーゼは、Guardzyme (商標) (Novo Nordisk A/S)を含む。

【0147】

洗剤酵素は、1又は複数の酵素を含む別々の添加物を加えることによって、あるいはこれらの酵素の全てを含んで成る複合型の添加物を加えることによって洗剤組成物に含めることもできる。本発明の洗剤添加物、すなわち別々の添加物又は複合型の添加物は、例えば顆粒、液体、スラリー等として調製され得る。好ましい洗剤添加物の形態は顆粒、特に無粉塵顆粒、液体、特に安定化液体、又はスラリーである。

【0148】

無粉塵顆粒は、例えばUS 4, 106, 991及び4, 661, 452に開示されている様に製造することができ、そして任意に当業者に既知の方法によってコーティングされることもある。ロウ性コーティング材料の例は、1000～20000の平均分子量を有するポリエチレンオキシド生成物 (ポリエチレングリコール、PEG)；16～50のエチレンオキシド単位を有する、エトキシ化したノニルフェノール；アルコールが12～20の炭素原子を含み、そして15～80のエチレンオキシド単位が存在する、エトキシ化した脂肪アルコール；脂肪アルコール：脂肪酸；並びに脂肪酸のモノー及びジー及びトリグリセリドである。流動床技術による適当な模形成コーティング材料の例は、英国特許第1483591号において与えられている。液体酵素調製物は、例えば確立された方法に従い、多価アルコール、例えばプロピレングリコール、糖又は糖アルコール、乳酸又はホウ酸を加えることによって安定することができる。他の酵素安定化剤は当業界で公知である。保護された酵素を、欧州特許第238, 216号に開示された方法に従い調製することができる。

【0149】

本発明の洗剤組成物は都合の良い形態、例えば粉末、顆粒、ペースト又は液体として存在することができる。液体洗剤は最大70%の水及び0～30%の有機溶媒を典型的に含む、水性であるか、又は非水性のものであってもよい。

【0150】

前記洗剤組成物は、半極性及び／又は陰イオン性及び／又は陽イオン性及び／又は両性で

10

20

30

40

50

あってもよい、1又は複数の界面活性剤を含んで成る。

【0151】

前記組成物に含まれる場合、前記洗剤は通常、約1%～約40%の直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルファオレフィンスルホン酸塩、アルキル硫酸塩（脂肪酸アルコール硫酸塩）、アルコールエトキシ硫酸塩、第2級アルカンスルホン酸塩、アルファスルホ脂肪酸メチルエステル、アルキル又はアルケニルコハク酸、又はセッケンを含むであろう。

【0152】

前記組成物に含まれる場合、前記洗剤は通常、約0.2%～約40%の非イオン性界面活性剤、例えばアルコールエトキシラート、ノニルフェノールエトキシラート、アルキルポリグリコシド、アルキルジメチルアミノオキシド、エトキシ化した脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド又はグルコサミンのN-アシルN-アルキル誘導体（glucamide）を含むだろう。

10

【0153】

前記洗剤は、0～65%の洗浄性ビルダー又は錯化剤、例えばゼオライト、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、ニトリロ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸、アルキル又はアルケニルコハク酸、可溶性ケイ酸塩又は層状ケイ酸塩（例えばHoechst社のSKS-6）を含むことがある。

【0154】

前記洗剤は1又は複数のポリマーを含んで成ることがある。例は、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピリジン-N-オキシド、ポリビニルイミダゾール、ポリカルボキシラート、例えばポリアクリラート、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、及びラウリルメタクリル酸／アクリル酸コポリマーである。

20

【0155】

前記洗剤は漂白系を含むことがあり、これはH₂O₂源、例えば過ホウ酸又は過炭酸を含んで成ることもでき、これは過酸を形成する漂白活性剤、例えばテトラアセチルエチレンジアミン又はノナノイルオキシベンゼンスルホン酸塩と組み合わせられることもある。あるいは、前記漂白系は、例えばアミド、イミド、又はスルホン型の過酸化物を含んで成ることもある。

30

【0156】

本発明の洗剤組成物の酵素は、常用の安定化剤を用いて安定化することができ、例えばプロピレングリコール若しくはグリセロールなどの多価アルコール、糖又は糖アルコール、乳酸、ホウ酸、又は例えば芳香族ホウ酸エステルなどのホウ酸誘導体、例えば4-ホルミルフェニルボロン酸であり、そして前記組成物を例えばWO92/19709及びWO92/19708に記載されている様に調製することができる。

【0157】

前記洗剤はまた、他の常用の洗剤成分、例えば粘土を含む繊維調節剤、泡増幅剤、石けん水抑制剤、防食剤、汚れの懸濁剤、抗-汚れ再沈着剤、染料、殺菌剤、光増白剤、屈水性誘発物質、変色阻害剤、又は香料などを含むことができる。

40

【0158】

現時点で、洗剤組成物において、いずれかの酵素、特に本発明の分枝酵素は、洗浄液1L当たり0.01～100mgの酵素タンパク質、好ましくは洗浄液1L当たり0.05～5mgの酵素タンパク質、特に洗浄液1L当たり0.1～1mgの酵素タンパク質に相当する量で加えられ得ると考えられている。

【0159】

本発明の分枝酵素は、引用によって本明細書に組み入れられる、WO97/07202に開示されている洗剤調製物に追加として組み入れられ得る。

【0160】

使用

50

本発明はまた、分枝酵素活性を有するポリペプチドを用いる方法を述べる。例えば、本発明のポリペプチドは、デンプン又はデンプン含有材料の修飾のために使用され、その結果その様な材料の特性が向上し得る。

【0161】

分枝酵素で修飾され得る材料の例は全ての型（ジャガイモ、トウモロコシ、コムギ）の天然デンプン（未修飾型）、ロウ性デンプン、高アミロースデンプン、アミロース、アミロペクチン、デキストリンを含む化学的に修飾されたデンプン変換型デンプン、架橋型デンプン（ジスターチホスフェート）、デンプンエーテル及びデンプンエステル（酢酸デンプン、ヒドロキシアルキル化デンプン、オクテニルコハク酸デンプン）を含む。

【0162】

本発明の分枝酵素は、上述した様なデンプン様材料の修飾にとって有用であり、その結果、修飾された材料は、その意図される目的のために、例えばUS 4,454,161に記載の様な食品生成物、例えば食品及び飲料組成物、食品添加物組成物、医薬製剤、サイジング剤、接着剤等の製造において一層適したものとなる。通常、分枝酵素で修飾した材料は、未修飾のデンプンと比較して高い溶解性、低い粘度及び老化しにくい傾向を有する。これらの特性は、デンプン様材料から調製した食品生成物の特性、特にその様な生成物の保存安定性を改良するために使用され得る。食品生成物の例は、パン、デザート、ケーキ、スナック菓子、ヌードル及びパスタ、ベビーフード、スポーツ飲料、冷凍又は冷蔵加工食品及びペットフードである。酵素的修飾は、食品生成物への添加前にデンプン様材料上で別々に、又は料理の前若しくは直後に酵素を食品材料に加え、食品を直接修飾することによって、そのいずれかで行われ得る。

【0163】

紙の表面のサイジング及びコーティングのために使用するデンプン溶液の高い溶解性、低い粘性及び良好な安定性は、EP 0,690,170に示した様なこれらの利用に、分枝酵素修飾型デンプンを関連づけるのに非常に重要である。

【0164】

本発明は以下の例によって更に説明されるが、これは本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0165】

例1

材料と方法

ロドサムス・オバメンシス（JCM 9785）は、理化学研究所微生物系統保存施設（日本国埼玉県和光市（351-0198））から入手した。

【0166】

分子クローニング技術は、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されている。

【0167】

以下の市販のプラスミド／ベクターを使用した：

pT7Blue（Invitrogen、オランダ）

pBluescript SK（-）（Stratagene、アメリカ）

pBAD／Myc-HisA（Invitrogen、オランダ）

【0168】

以下の菌株は、形質転換及びタンパク質の発現に使用した：

TOP10 E. コリ（Invitrogen、オランダ）

E. コリ DH12S（GIBCO BRL, Life Technologies、アメリカ）

【0169】

SB増殖培地（DIFCO # 0123-17-3）は、トリプトン／ペプトン、32

10

20

30

40

50

g/L；酵母抽出物、20 g/L；NaCl、5 g/L；5N NaOH、1 ml/Lから構成されている。

【0170】

緩衝液及び基質として使用した化学薬品は、少なくとも試薬等級の市販の製品であった。

【0171】

分枝酵素活性

分枝酵素活性は、Takata et al., Applied and Environmental Microbiology (1994), p. 3097 (assay A)に記載されている方法の改良版に従い決定した：50 μ lの酵素溶液を50 μ lの基質溶液で混合し、そして試験温度で30分間インキュベートする。基質溶液は、0.1 M Tris緩衝液に溶解した0.1%のIII型アミロースである。反応は、2 mlのヨウ素試薬の添加によって決定する。ヨウ素試薬は、0.5 mlの1N HClと混合した0.5 mlの保存液（0.26 gの I_2 及び2.6 gのKI/10 mlの水）から毎日作り、そして130 mlに希釈する。混合物は、色を安定化するために室温で15分間インキュベートする。活性は、試験する試料と、細胞抽出物を水で置換したコントロールとの間の A_{660} の差異として測定する。1ユニットの分枝酵素活性は、60°C、pH 7.0で1分当たり1%ずつアミロース-ヨウ素複合体の A_{660} を低下させ得る酵素量として定義される。

10

【0172】

R. オバメンシス glgBプロープの調製

20

プライマーa)（配列番号3）及びb)（配列番号4）を設計し（報告されている細菌のglgB配列のアラインメントに基づく）、調製し、ロドサームス・オバメンシス由来のゲノムDNAとのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）において使用した。

【0173】

配列番号3、PCRプライマーa)（上流）：

5'-GAGCACCCCTCGACGGCAGTTGG-3'

【0174】

配列番号4、PCRプライマーb)（下流）：

5'-CATCCAICCWAKRTTCCA-3'

【0175】

30

I = イノシン

K = G又はT

R = A又はG

W = A又はT

Y = C又はT

【0176】

反応成分を混合し〔1×緩衝液（Roche Diagnostics, Japan）中、ゲノムDNA、0.1 ng/ μ l；dNTP各0.125 mM； Mg^{2+} 、2.5 mM；プライマー、各2 pM；Taqポリメラーゼ0.025 U/ μ l〕、そして以下の条件下でのPCRに適用した：

40

【表1】

段階	温度	時間
1	94℃	5分
2	50℃	45秒
3	72℃	1分
4	94℃	45秒
5	50℃	45秒
6	72℃	1分
7	4℃	終了するまで

10

表1. 段階4～段階6は30回繰り返した。

【0177】

PCR反応混合物をアガロースゲル上で分離し、そして増幅したPCRフラグメントの予想されるサイズをE. コリg l g Bの配列データから計算し、約550bpとした。これらのフラグメントをQIAquick (QIAGEN, Japan) でゲル精製し、そして次に、Takaraライゲーションキットバージョン2 (Takara, Japan) を用いてpT7Blueベクターにライゲーションした。ライゲーション混合物をフェノール/クロロホルムで精製し、そして次にエレクトロポレーションによってE. コリDH12Sを形質転換した。得られた形質転換体由来のプラスミド (pMSra8) を制限酵素で調べ、ロドサームス・オバメンシスg l g Bのインサートのサイズを確認した。

20

【0178】

R. オバメンシスg l g B遺伝子のクローニング

R. オバメンシスg l g Bプローブとして、pMSra8の挿入フラグメントを用いて、サザンハイブリダイゼーションをR. オバメンシス由来のゲノムDNA上で行い、サブクローンを生成するのに便利な制限酵素を選択した。3.5kbのハイブリダイズしたBamHIフラグメントをg l g Bのサブクローンのために選択した。その結果、R. オバメンシスのゲノムDNAをBamHIで消化し、そしてサイズごとに分画したDNAをアガロースゲルから切り出し、そしてpBluescript SK (−) にクローン化した。BamHIのサブライブラリーは、ライゲーションしたクローンがE. コリDH12S細胞を形質転換することによって行われた。コロニーの拾い上げは、Hybond-N⁺膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Japan) を用いて、BamHIのサブライブラリーの形質転換体上で行い、そして次にDIG標識したR. オバメンシスg l g Bプローブにハイブリダイズした。ポジティブコロニーを突き、そしてインサートをPCRで調べた。選択したコロニー由来のプラスミドを調製し、そして配列決定することによって3.5kbのBamHIフラグメントがg l g B (pMSra10) の5'末端を失っていることが明らかになった。従って、KpnI及びSalIで2回消化したR. オバメンシスのゲノムDNAから作製した別のサブライブラリーを、R. オバメンシスg l g Bプローブでスクリーニングし、R. オバメンシスg l g B (pMSra29) の5'末端を回収した。構造g l g Bの全配列は、pMSra10及びpMSra29から入手し、そして全g l g B遺伝子の増幅のためのPCRプライマー (配列番号5及び配列番号6) をこの配列から設計した。

30

40

【0179】

発現ベクターの構築

それぞれBspHI及びHindIIIの制限酵素部位を含むプライマーc) (配列番号

50

5) 及び d) (配列番号 6) を用いて、全 *glgB* 遺伝子をロドサームス・オバメンシスのゲノム DNA から PCR 増幅した (PCR 反応の間の変異を避けるために、Boehringer Mannheim の Expand High Fidelity を使用した)。BspHI 及び HindIII にする PCR 増幅したフラグメントの切り出しは、NcoI 及び HindIII で消化した pBAD/Myc-HisA への一方向のクローニングを可能にした。生じたベクター pMSra33 は、TOP10 E. コリにおける形質転換及びアラビノースによる誘導後に R. オバメンシスの分枝酵素を生成した。

【0180】

配列番号 5、プライマー c) ; ロドサームス・オバメンシス *glgB* 遺伝子の増幅のためのプライマー (上流)。下線を引いたヌクレオチドが、BspHI 部位を導入する

5' - T T C C T C A T G A G C T G G C T C A C G G A A G A A G A C A - 3'

【0181】

配列番号 6、プライマー d) ; ロドサームス・オバメンシス *glgB* 遺伝子の増幅のための PCR プライマー (下流)。下線を引いたヌクレオチドが HindIII 部位を導入する:

5' - G T T T A A A G C T T T T C A G G A C G G C T A C C - 3'

【0182】

生物学的寄託 DSM 12607

完全なロドサームス・オバメンシス *glgB* 遺伝子を有するプラスミド pT7Blue (配列番号 1) も、E. コリ DH12S を形質転換させ、これは DSM 12607 として DSMZ に寄託された (生物学的材料の寄託に記載)。

【0183】

タンパク質の発現

R. オバメンシスの分枝酵素は、pMSra33 で形質転換した TOP10

E. コリの菌株において異種的に発現した。前記 E. コリの細胞は、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを有する SB 培地で、 28°C で一晩インキュベートした。 0.0002% のアラビノースを発現の誘導のために加えた。細胞は遠心によって遠心沈澱し、そして 20 mM のリン酸緩衝液 ($\text{pH } 6.0$) 中で再懸濁した。緩衝液の量は、増殖培地の $1/20$ に相当する。次に、細胞を超音波処理し、そして細片を遠心によって除去した。

【0184】

E. コリからの内因性アミロース分解活性の除去

E. コリの抽出物から全ての内因性アミロース分解酵素活性を除去することによって、発現した分枝酵素活性を検出するために、ヨウ素法 (Takata et al., Applied and Environmental Microbiology (1994), p. 3097) を使用することが可能になる。従って、pBAD/Myc-HisA ベクターを有し、そして *glgB* のインサートを持たない (ネガティブコントロール) 宿主 E. コリの菌株から、内因性のアミロース分解活性を除くために熱処理が使用できるかどうかを試験した。結果は、 $60^\circ\text{C}/20$ 分の処理が、Takata 等によって記述されたアミロース-ヨウ素アッセイで測定されるバックグラウンドのアミロース分解活性を熱で消滅させるのに十分であり、この中で活性は検出されなかったことを示した。

【0185】

R. オバメンシスの分枝酵素変異体 Y397C+L419P の部分精製

発現した R. オバメンシスの分枝酵素の配列決定は、配列番号 2 の成熟アミノ酸配列と比較して、2 つの変化が PCR 反応の間に導入されたことを明らかにした:

a) Tyr397 は Cys397 へと変化した。

b) Leu419 は Pro419 へと変化した。

この分枝酵素変異体は、以降「Y397C+L419P」と表す。

【0186】

E. コリで発現した、置換 Y397C+L419P を有する R. オバメンシスの分枝酵素はイオン交換及びハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによって部分的に精

製した。熱処理した細胞抽出物を透析し、そしてSuper-Q Toyopearl (22mm×200mm、TOSOH)にかけ、続いて0～0.6M NaCl/50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)の直線勾配で溶出した。分枝酵素活性を有する画分を回収し、そしてMacro-prep Ceramic Hydroxyapatite Type I (14mm×100mm、BioRad)にかけ、続いて5～400mMリン酸ナトリウム(pH6.5)の勾配で溶出した。活性を示す画分を回収した。それは、クーマシーブリリアントブルー染色によるSDS-PAGE上で、わずかなバンドと一緒に、1つの主要なバンドを示した。

【0187】

分枝結合の形成

α -1, 6-分枝結合の形成は、分枝結合アッセイの改良版(BL assay, Takeda et al., Carbohydrate Research, 240 253-260 (1993))によって確認した。

使用した基質は、100mM Tris-HCl (pH7.5)に溶解した0.5%のI II型アミロース(Sigma)である。基質(90 μ l)及び酵素溶液(10 μ l)を混合し、そして60℃で30分間インキュベートし、続いて反応を4分間の煮沸によって停止させた。10 μ lの1M酢酸緩衝液(pH4.1)の添加後、5 μ lのイソアミラーゼ(1mg/ml、Hayashibara Co. Ltd.)又は5 μ lの脱イオン水のいずれかを反応混合物に加えた。それを45℃で45分間インキュベートした。続いて、反応液を460 μ lの氷冷エタノールに加え、そして氷上で10分間保持した、沈澱した糖を12,000rpmで5分間の遠心によって回収し、そして一旦真空で乾燥させ、続いて8 μ lの1N NaOH及び292 μ lの脱イオン水中で再び溶解した。溶液の還元力は、改良型の3,5-ジニトロサリチル酸(DNS)法(Luchsinger and Cornesky, 1962)を用いて測定した。DNS溶液は、最初に10mlの2N NaOHに0.05gの3,5-ジニトロサリチル酸を溶解し、続いて3gのロッシェル塩を溶液に加え、そして最後に全量を脱イオン水で15mlに調整することで調製した。試料溶液(0.2～0.3ml)を0.4mlのDNS溶液と混合し、そして5分間煮沸した。流水による冷却の後、1.8mlの水を反応混合物に加え、そして525nmでの吸光度を測定した。還元末端の量は、グルコース量に等しいとして推定した。部分的に精製したY397C+L419Pの試料は、分枝結合の形成の測定のために使用した。表5に示す様に、還元末端はイソアミラーゼ処理によって生成し、示した α -1, 6分枝結合はY397C+L419Pによって形成した。

【表2】

実験番号	イソアミラーゼ処理	還元末端 (μ mol)
実験1	+	0.43
	無し	0
実験2	+	0.17
	無し	0.04

表2

【0188】

例2

分枝酵素変異体Y397C+L419Pについての温度及びpHの効果

至適温度及びpHを、分枝酵素変異体Y397C+L419Pについて評価した(例1に

記載)。

【0189】

分枝酵素活性測定に使用したアッセイは、材料と方法に記載した様に行った。R. オバメンシスの分枝酵素を発現している E. コリ由来の内因性アミロース分解活性を避けるために、細胞抽出物は 60℃で少なくとも 20 分間、あらかじめ加熱し、そして細片は遠心によって除去した。続いて、あらかじめ加熱した細胞抽出物をアッセイにかけ、そして分枝酵素活性について解析した。

【0190】

至適 pH アッセイにおいて、異なる緩衝液を使用して基質溶液を調製した：

pH < 4 0.1 M クエン酸ナトリウム

4 < pH < 6 0.1 M 酢酸ナトリウム

6 < pH < 10 0.1 M Tris

pH > 10 0.1 M グリシルグリシン

【0191】

酵素 (Y397C + L419P) を、指示温度で 30 分間、pH 7.0 でインキュベートした。分枝酵素活性は上述の様に測定した。実験は少なくとも三回一組で行った；平均値及び標準偏差を以下の表 2 及び表 3 に示す。

【0192】

データは、Y397C + L419P の至適温度が約 65℃であることを示している。

【表 3】

温度 (°C)	相対活性 (%) Y397C + L419P
30	39 +/− 4
40	61 +/− 3
50	64 +/− 8
55	93 +/− 4
60	93 +/− 4
65	97 +/− 3
68	94 +/− 4
70	78 +/− 3
72	57 +/− 2
75	54 +/− 7
80	12 +/− 6
90	9 +/− 3

表 3

【表 4】

温度 (°C)	残存活性 (%) Y 3 9 7 C + L 4 1 9 P
6 0	9 9 + / - 1
6 5	1 0 0 + / - 0
7 0	1 0 3 + / - 3
7 5	8 2 + / - 1
8 0	2 + / - 3
8 5	2 + / - 3
9 0	不検出

10

表 4

【 0 1 9 3 】

pH の活性実験は 6 0 °C で行い、そして酵素を 3 0 分間インキュベートした。実験は少なくとも三回一組で行い；平均値及び標準偏差は以下の表 4 に示す。データは、Y 3 9 7 C + L 4 1 9 P が約 pH 5 ～約 pH 8 の広範な至適 pH を有することを示している。

20

【表 5】

pH	相対活性 (%) Y 3 9 7 C + L 4 1 9 P
5 . 3	4 3 + / - 3
6 . 3	9 1 + / - 1
6 . 7	9 8 + / - 3
7 . 6	7 3 + / - 3
9 . 0	2 1 + / - 1
9 . 3	1 5 + / - 2

30

表 5

40

【 0 1 9 4 】

例 3

分枝酵素変異体 Y 3 9 7 C + L 4 1 9 P によるシクロデキストリンの調製
 コメアミロペクチン (Motyl B, Shimada Chemical, Japan) を、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7) 中の、置換 Y 3 9 7 C + L 4 1 9 P を有する R . オバメンシスの分枝酵素 (例 1 に記載) (4 0 0 ユニット / g デンプン) で、5 0 °C で 1 8 時間処理した。1 5 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間の遠心による細片の除去後、2 倍量のエタノールを溶液に加え、そして沈澱したデキストリンを回収し、そして乾燥させた。約 6 7 g のデキストリンを、1 0 0 g のコメアミロペクチンから得た。分子内分枝結合が酵素処理によって起きたならば、グルコアミラーゼに耐性があるシクロデキストリンが

50

得られるはずである。1 gの上述したデキストリンを、1500ユニットのグルコアミラーゼ（リゾパス（Rhizopus種、Wako Pure Chemicals, Japan））で、pH 4.1、40℃で18時間処理し、そして生じたデキストリンをエタノールによって回収した。約200mgのデキストリンを得た。酸 α -アミラーゼの存在下での処理によって、デキストリンは得られなかった。グルコアミラーゼ耐性デキストリンは、グルコアミラーゼ単独（0.9ユニット/gデキストリン）又はグルコアミラーゼとイソアミラーゼの組合わせ（それぞれ0.9ユニット及び29ユニット/gデキストリン）を用いて、pH 4.5、40℃で16時間再び処理した。その結果、90%のデキストリンがグルコアミラーゼ単独で回収され、一方、わずかに10%のデキストリンが、イソアミラーゼの存在下での処理後に残った。これは、環状デキストリンがY397C+L419Pによって触媒される分子内 α -1,6-分枝結合によって形成したことを示した。

【0195】

例4

アスペルギルスにおけるR. オバメンシスの発現

宿主生物

アスペルギルス・オリザエBEC h2は、デンマーク特許出願PA 1999 01726に記載されている。これは、IFO4177の変異体である、Jal228の変異体（WO98/123000に記載）である。

【0196】

A. オリザエの形質転換

アスペルギルス・オリザエの菌株BEC h2を100mlのYPG培地に接種し、そして80rpmで撹拌しながら32℃で16時間インキュベートした。生育した菌糸を濾過によって回収し、0.6M KClで洗浄し、そしてGlucanex（商標）（Novo Nordiskより入手可）を30 μ l/mlの濃度で含む30mlの0.6M KCl中で再懸濁した。混合物は、プロトプラストが形成するまで、60rpmで撹拌しながら32℃でインキュベートした。残った菌糸を除去するための濾過後、プロトプラストを遠心によって回収し、そしてSTC緩衝液で2回洗浄した。プロトプラストはヘマタイトメーター（hematitometer）で計数し、そしてSTC:STPC:DMSOの溶液（8:2:0.1）中で1.2 $\times 10^7$ プロトプラスト/mlの最終濃度に再懸濁した。約4 μ gのDNAを100 μ lのプロトプラストに加え、穏やかに混合し、そして氷上で30分間インキュベートした。1 μ lのSTPC緩衝液を混合物に加え、そして37℃で更に30分間インキュベートした。50℃であらかじめ暖めた10mlのCoveのトッパアガロスの添加後、反応混合物をCOVEのアガープレートに注いだ。プレートは、32℃で5日間又は形質転換体が出現するまでインキュベートした。

【0197】

培地及び緩衝溶液

COVE: 1L当たり、342.3gのスクロース、20mlのCOVE塩溶液、10mMのアセトアミド、15mMのCsCl₂、30gのアガーノーブル（Difco）。

COVE塩溶液: 1L当たり、26gのKCl、26gのMgSO₄·7H₂O、76gのKH₂PO₄、50mlのCove微量金属。

Cove微量金属: 1L当たり、0.04gのNaB₄O₇-10H₂O、0.4gのCuSO₄-5H₂O、1.2gのFeSO₄-7H₂O、0.7gのMnSO₄-H₂O、0.7gのNa₂MoO₄-2H₂O、0.7gのZnSO₄-7H₂O。

AMG微量金属: 1L当たり、14.3gのZnSO₄-7H₂O、2.5gのCuSO₄-5H₂O、0.5gのNiCl₂、13.8gのFeSO₄、8.5gのMnSO₄、3.0gのクエン酸。

YPG: 1L当たり、4gの酵母抽出物、1gのKH₂PO₄、0.5gのMgSO₄-7H₂O、5gのグルコース、pH6.0。

STC: 0.8Mソルビトール、25mM Tris pH8、25mM CaCl₂。

STPC: 40% PEG4000/STC緩衝液。

Cove トップアガロース：1 L 当たり、342.3 g のスクロース、20 ml の COVE 塩溶液、10 mM のアセトアミド、10 g の低融点アガロース。

MS-9：1 L 当たり 30 g のダイズ粉末、20 g のグリセロール、pH 6.0。MDU-2 Bp：1 L 当たり、45 g のマルトース-1 H₂O、7 g の酵母抽出物、12 g の K₂HPO₄、1 g の MgSO₄-7 H₂O、2 g の K₂SO₄、5 g の尿素、1 g の NaCl、0.5 ml の AMG 微量金属溶液 pH 5.0。

【0198】

SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティング

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は、市販のゲル PAGE L AE 6000 NPU-7.5 L (7.5 T%) を、装置 AE-6400 (Atto, Japan) と一緒に用い、提供されたプロトコルに従って行った。ゲルにおいて分離したタンパク質は、AE-6677 Horizon blot (Atto, Japan) を用いて、Clear Blot membrane-P AE-6655 (Atto, Japan) に転写した。タンパク質の検出は、Immuno Blot Assay Kit (BioRad) を用いて行った。

10

【0199】

アスペルギルスのための R. オバメンシス glgB の発現プラスミドの構築

R. オバメンシス glgB 遺伝子は、各末端に制限酵素部位 BglII 及び XhoI を導入するために、プライマーセット a) 及び b)、又は a) 及び c) を用いて、R. オバメンシスのゲノム DNA から増幅した。プライマー c) は、C 末端の glgB において Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu を含んで成る c-myc エピトープの配列を与える。

20

a) 5' -GAAGATCTAT GAGCTGGCTC ACGGAAGAAG ACATCCGGCG CTGGGAAA-3'

b) 5' -CCGCTCGAGC TACCCGTGCT CCGGCTCCAG GATGAGGGCG GCCA-3'

c) 5' -CCGCTCGAGC TACAGGTCCT CTTCGGAGAT GAGCTTCTGC TCCCCGTGCT CCGGCTCCA

G GATGAGGGCG GCCA-3'

【0200】

反応成分、すなわち 40 ng の R. オバメンシスの染色体 DNA、Expand (商標) High Fidelity PCR System (Boehringer) の 300 pmol の各プライマー、0.2 mM の dNTP 及び 2.6 ユニットの DNA ポリメラーゼを、提供されている緩衝液中で混合し、そして以下の条件下で PCR にかけた。

30

【表 6】

段階	温度	時間
1	94℃	2分
2	94℃	15秒
3	55℃	30秒
4	72℃	90秒
5	94℃	15秒
6	55℃	30秒
7	72℃	90+20秒/サイクル
8	72℃	7分

表6. 段階2～段階4は10回繰り返す、そして段階5～段階7は20サイクル繰り返す。

【0201】

増幅した1.9 kbのフラグメントをQIA gel extraction kit (Qiagen) で精製し、そしてBglII及びXhoIでの消化後、それをBamHI及びXhoIで消化したpCaHj483にライゲーションした。プラスミドpCaHj483は、アスペルギルス・ニガーの中性アミラーゼプロモーター、アスペルギルス・ニジュランスのTPILリーダー配列、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼターミネーター及びマーカーとしてアスペルギルス・ニジュランスのamdS遺伝子を有する。プライマーセットa)及びb)で得られたプラスミドはpIH28と命名され、そしてプライマーセットa)及びc)で得られたものをpIH29と表した。

【0202】

A. オリザエにおけるR. オバメンシスglgBの発現
発現プラスミド、pIH28及びpIH29をNotIで消化し、そして生じたR. オバメンシスglgBの発現カセットを含む6 kbのフラグメントをQIA gel extraction kitを用いて精製した。A. オリザエBECh2は各フラグメントで形質転換され、そして選択のポジティブな形質転換体を単離した。形質転換体は500 mlの振とうフラスコ中の100 mlのMS-9に接種し、そして32℃で1日間培養し、そして3 mlの各培養物を振とうフラスコ中の100 mlのMDU-2Bpに移し、32℃で2～3日間培養した。増殖した細胞は3500 rpmで15分間の遠心によって採集した。約0.1 gの回収した細胞を、100 µlの2倍濃度の試料添加緩衝液(100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、200 mMのジチオスレイトール、4% SDS、0.2%のプロモフェノールブルー及び20%グリセロール)中で懸濁し、そして5分間煮沸した。14000 rpmで5分間の遠心後、10 µlの上清をポリアクリルアミドゲルに載せ、そしてランニング緩衝液(25 mM Tris、0.1% SDS、192 mMグリシン)中での、ゲル当たり20 mAの電気泳動にかけた。そのゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した。ポジティブな形質転換体は、R. オバメンシスglgBの予想されるサイズ、72 kDaのタンパク質のバンドを示した。c-mycタグを有する形質転換体の抽出物を載せたゲルは、一次抗体として抗myc抗体(invitrogen)及び二次抗体として抗マウスIgG(sigma)を用いてウェスタンブロッティングにかけた。ポジティブなシグナルは、72 kDaに相当する位置で得られた。

【0203】

例5

R. オバメンシスの分枝酵素アッセイ並びに温度及びpHの効果

宿主菌株由来の内因性アミラーゼ活性を不活性化するために、細胞抽出物を 68℃で 30 分加熱した。活性は上述の様に測定した。

【0204】

pH の活性プロファイルは 65℃で測定し、そして温度の活性プロファイルは pH 7 で得た。実験は二回一組又は三回一組のいずれかでを行い、そして平均及び標準偏差を以下に示す。

【0205】

温度安定性は、次の様に c-myc タグ無しの、R. オバメンシスの分枝酵素上で測定した；30～50 ユニット/ml (pH 7) を含む酵素溶液を異なる温度で 30 分間インキュベートし、そして続いて残りの分枝酵素活性を測定した。

【0206】

データは、R. オバメンシスの分枝酵素の至適 pH 及び温度がそれぞれ約 pH 7 及び 65℃であることを示唆している。c-myc タグの存在は、pH 及び温度のプロファイルに影響を与えなかった。

【表 7】

pH	相対活性 (%) BE 1-5 (myc-タグ無し)	相対活性 (%) BB e 28 (タグ有り)
2.4	8 +/− 1	6 +/− 2
3.0	7 +/− 2	7 +/− 2
4.0	10 +/− 1	8 +/− 1
5.2	74 +/− 8	67 +/− 1
6.3	87 +/− 2	77 +/− 5
7.1	97 +/− 1	97 +/− 3
7.8	93 +/− 1	89 +/− 4
8.6	88 +/− 1	81 +/− 1
9.5	83 +/− 4	75 +/− 1
10.6	12 +/− 2	16 +/− 1

表 7

【表 8】

10

20

30

40

温度 (°C)	相対活性 (%) B E 1 - 5 (m y c - タグ無し)	相対活性 (%) B B e 2 8 (タグ有り)
3 0	4 + / - 1	1 + / - 4
4 0	1 1 + / - 1	6 + / - 1
5 0	3 5 + / - 1	2 4 + / - 0
5 5	6 0 + / - 5	5 0 + / - 0
6 0	8 0 + / - 1	7 1 + / - 1
6 3	9 2 + / - 3	8 8 + / - 2
6 5	9 6 + / - 4	9 4 + / - 4
6 8	9 3 + / - 3	9 0 + / - 4
7 0	8 7 + / - 2	8 6 + / - 1
7 3	7 5 + / - 1	7 3 + / - 2
7 5	5 9 + / - 5	5 9 + / - 2
8 0	1 7 + / - 1	1 2 + / - 2

表 8

【表 9】

温度 (°C)	残存活性 (%) R. オバメンシス B E
6 0	9 5 + / - 5
6 5	9 5 + / - 5
7 0	8 8 + / - 3
7 5	9 1 + / - 3
8 0	9 1 + / - 2
8 5	8 3 + / - 1
9 0	1 3 + / - 3

表 9

【0 2 0 7】

生物学的材料の寄託

プラスミド p T 7 B l u e 内に挿入されたロドサームス・オバメンシス由来の分枝酵素遺伝子（例 1 を参照のこと）を含む E. コリのクローンは、ブダペスト条約の名のもと、D e u t s c h e S a m m l u n g v o n M i k r o o r g a n i s m e n u n d Z e l l k u l t u r e n G m b H (D S M Z) (M a s c h e r o d e r W e g 1 b , D - 3 8 1 2 4 B r a u n s c h w e i g , G e r m a n y) に寄託され、そして次の寄託番号が与えられた：

寄託	寄託番号	寄託日
N M O 4 9 4 4 3	D S M 1 2 6 0 7	1 9 9 8 年 1 2 月 2 3 日

【 0 2 0 8 】

前記菌株は、米国特許法施行規則第 1 . 1 4 条及び米国特許法第 1 2 2 条のもとでそれらを名付けるために、特許商標庁長官によって決定されるものにとって、この特許出願の審査の間、前記培養物の入手が可能であることを保証する条件のもとで寄託された。前記寄託は、寄託した菌株の実質的に純粋な培養物を表す。前記寄託は、従属する出願の対応物、又はその孫が提出されている国の外国特許法によって必要とされる場合に入手可能である。しかし、寄託の入手可能性が、政府の指令によって付与される特許権の減損における従属発明を実施する許可を構成しないと理解すべきである。

10

【 0 2 0 9 】

本明細書に記載され、そして請求された発明が、本明細書で開示した具体的な態様によって範囲を限定されないのは、これらの態様が本発明の複数の観点の例示として意図されているためである。いずれかの等しい態様が、本発明の範囲内であることが意図されている。実際、本明細書に示し、そして記載したものに加えて、本発明の様々な変更が前述の説明から当業者に明らかとなるだろう。その様な変更は更に、特許請求の範囲に含まれることも意図されている。抵触する場合、定義を含む本開示が調節するだろう。

20

【 0 2 1 0 】

様々な引用を本明細書に列記しており、これらの開示は引用によってそれら全体が組み入れられる。

【配列表】

Sequence listing

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Polypeptides having branching enzyme activity and
nucleic acids encoding same

<130> Rhodothermus obamensis BE

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1866

<212> DNA

<213> Rhodothermus obamensis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1866)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (4)..(1863)

<400> 1

atg agc tgg ctc acg gaa gaa gac atc cgg cgc tgg gaa agc ggt acg	48
Met Ser Trp Leu Thr Glu Glu Asp Ile Arg Arg Trp Glu Ser Gly Thr	
-1 1 5 10 15	
ttc tac gac agt tac cga aag ctg ggc gcc cat ccc gac gac gaa ggc	96
Phe Tyr Asp Ser Tyr Arg Lys Leu Gly Ala His Pro Asp Asp Glu Gly	
20 25 30	
acc tgg ttc tgc gtc tgg gcg ccg cat gcc gat ggc gtc tcg gtg ctc	144
Thr Trp Phe Cys Val Trp Ala Pro His Ala Asp Gly Val Ser Val Leu	
35 40 45	
gga gcg ttc aac gac tgg aat ccg gag gcc aac ccg ctg gag cgc tac	192
Gly Ala Phe Asn Asp Trp Asn Pro Glu Ala Asn Pro Leu Glu Arg Tyr	
50 55 60	
ggc gcc ggc ctg tgg gcc ggt tac gta ccg gga gcg cgc ccg ggc cac	240
Gly Gly Gly Leu Trp Ala Gly Tyr Val Pro Gly Ala Arg Pro Gly His	
65 70 75	
acc tac aag tat cgc atc cgg cac gcc ttc tat cag gcc gac aag acg	288
Thr Tyr Lys Tyr Arg Ile Arg His Gly Phe Tyr Gln Ala Asp Lys Thr	
80 85 90 95	
gat ccc tac gcc ttc gcc atg gag ccg cct acc gcc agt ccc atc gaa	336
Asp Pro Tyr Ala Phe Ala Met Glu Pro Pro Thr Gly Ser Pro Ile Glu	
100 105 110	
ggg ctg gcc tcc atc atc acg cgg ctc gac tac acc tgg cac gac gac	384
Gly Leu Ala Ser Ile Ile Thr Arg Leu Asp Tyr Thr Trp His Asp Asp	
115 120 125	
gaa tgg atg cgg cgc cgg aag ggt ccg gcc agc ctt tac gag ccg gtt	432
Glu Trp Met Arg Arg Arg Lys Gly Pro Ala Ser Leu Tyr Glu Pro Val	

10

20

30

130	135	140	
tcc atc tac gag gta cat ctg ggc tcc tgg cgt cac aaa cgg ccc ggc Ser Ile Tyr Glu Val His Leu Gly Ser Trp Arg His Lys Arg Pro Gly 145 150 155			480
gag tcc ttc tct tac cgg gag att gcc gag ccg ctg gcc gac tac gtg Glu Ser Phe Ser Tyr Arg Glu Ile Ala Glu Pro Leu Ala Asp Tyr Val 160 165 170 175			528
cag gag atg ggc ttc acg cac gtg gag ctg ctg ccc gtc atg gaa cat Gln Glu Met Gly Phe Thr His Val Glu Leu Leu Pro Val Met Glu His 180 185 190			576
ccc tac tac ggc tcc tgg ggc tat cag gtg gtg ggc tac tac gcc cca Pro Tyr Tyr Gly Ser Trp Gly Tyr Gln Val Val Gly Tyr Tyr Ala Pro 195 200 205			624
acg ttt cgc tac gga tca ccc cag gac ctg atg tac ctg atc gac tac Thr Phe Arg Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Leu Met Tyr Leu Ile Asp Tyr 210 215 220			672
ctg cac cag cgc ggc atc ggc gtc atc ctc gac tgg gtc ccg agc cac Leu His Gln Arg Gly Ile Gly Val Ile Leu Asp Trp Val Pro Ser His 225 230 235			720
ttt gcg gcc gat ccc cag gga ctg gtt ttc ttc gac ggg acc aca ctc Phe Ala Ala Asp Pro Gln Gly Leu Val Phe Phe Asp Gly Thr Thr Leu 240 245 250 255			768
ttc gaa tac gac gat ccc aag atg cgc tat cac cct gac tgg ggt acg Phe Glu Tyr Asp Asp Pro Lys Met Arg Tyr His Pro Asp Trp Gly Thr 260 265 270			816
tat gtg ttc gat tac aac aag ccg ggc gta cgc aac ttt ctg att tcc Tyr Val Phe Asp Tyr Asn Lys Pro Gly Val Arg Asn Phe Leu Ile Ser 275 280 285			864
aac gca ctt ttc tgg ctc gaa aag tac cac gtc gac ggg ctg cgc gtc Asn Ala Leu Phe Trp Leu Glu Lys Tyr His Val Asp Gly Leu Arg Val 290 295 300			912
gat gcg gtg gct tct atg ctc tac cgg gac tac tca cgc aag gag tgg Asp Ala Val Ala Ser Met Leu Tyr Arg Asp Tyr Ser Arg Lys Glu Trp 305 310 315			960
aca ccc aac atc ttc ggc ggc cgt gaa aac ctg gag gcc att gat ttc Thr Pro Asn Ile Phe Gly Gly Arg Glu Asn Leu Glu Ala Ile Asp Phe 320 325 330 335			1008
atc aag aaa ttc aac gaa acg gtc tac ctg cac ttc ccc gag gcc atg Ile Lys Lys Phe Asn Glu Thr Val Tyr Leu His Phe Pro Glu Ala Met 340 345 350			1056
acg atc gcc gag gag tgg acg gcc tgg ccc ggc gtg tgg gcc ccc acc Thr Ile Ala Glu Glu Ser Thr Ala Trp Pro Gly Val Ser Ala Pro Thr 355 360 365			1104
tac aac aac ggt ctg ggc ttc ctc tac aag tgg aac atg ggc tgg atg Tyr Asn Asn Gly Leu Gly Phe Leu Tyr Lys Trp Asn Met Gly Trp Met 370 375 380			1152
cac gac acg ctg gac tac atc cag cgc gat ccc atc tac cgc aag tat His Asp Thr Leu Asp Tyr Ile Gln Arg Asp Pro Ile Tyr Arg Lys Tyr 385 390 395			1200

10

20

30

cac cac gac gag ctg acc ttc tgg ctc tgg tac gcc ttt tgg gag cac 1248
 His His Asp Glu Leu Thr Phe Ser Leu Trp Tyr Ala Phe Ser Glu His
 400 405 410 415
 tac gtc ctg ccg ctc tgg cac gac gag gtg gtg cac ggc aag ggc tgg 1296
 Tyr Val Leu Pro Leu Ser His Asp Glu Val Val His Gly Lys Gly Ser
 420 425 430
 ctc tgg ggt aaa atg ccc ggc gac gac tgg cag aag gca gcc aac ttg 1344
 Leu Trp Gly Lys Met Pro Gly Asp Asp Trp Gln Lys Ala Ala Asn Leu
 435 440 445
 cgc ctg ctc ttt ggc cac atg tgg ggc cat ccg ggc aaa aaa ctg ctc 1392
 Arg Leu Leu Phe Gly His Met Trp Gly His Pro Gly Lys Lys Leu Leu
 450 455 460
 ttc atg ggc ggc gag ttc ggc cag cac cac gag tgg aac cac gac acg 1440
 Phe Met Gly Gly Glu Phe Gly Gln His His Glu Trp Asn His Asp Thr
 465 470 475
 cag ctc gaa tgg cac ctg ctg gac cag ccc tac cat cga ggt att cag 1488
 Gln Leu Glu Trp His Leu Leu Asp Gln Pro Tyr His Arg Gly Ile Gln
 480 485 490 495
 ctg tgg gtg tgc gat ctg aac cac ctc tac cgt acg aat ccg gcc ctc 1536
 Leu Trp Val Cys Asp Leu Asn His Leu Tyr Arg Thr Asn Pro Ala Leu
 500 505 510
 tgg cac gac gga ccg gaa ggg ttc gag tgg atc gac ttc agc gac cgc 1584
 Trp His Asp Gly Pro Glu Gly Phe Glu Trp Ile Asp Phe Ser Asp Arg
 515 520 525
 gac cag agc gtg atc tgt tac ctg cgc aag aat gcc ggc cgc atg ctg 1632
 Asp Gln Ser Val Ile Cys Tyr Leu Arg Lys Asn Ala Gly Arg Met Leu
 530 535 540
 ctg ttc gtg ctg aac ttt acg ccc gtg cca cgc gag cac tac cgc gtg 1680
 Leu Phe Val Leu Asn Phe Thr Pro Val Pro Arg Glu His Tyr Arg Val
 545 550 555
 ggc gtg ccg atc ggt ggc ccc tgg cac gag gtg ctc aac agc gac gcg 1728
 Gly Val Pro Ile Gly Gly Pro Trp His Glu Val Leu Asn Ser Asp Ala
 560 565 570 575
 gtg gcc tac ggc ggg agc ggg atg ggc aac ttc ggc cgc gtc gag gcg 1776
 Val Ala Tyr Gly Gly Ser Gly Met Gly Asn Phe Gly Arg Val Glu Ala
 580 585 590
 gtg ccc gag tcc tgg cac ggc cgc ccc ttc cac tta gag ctg acg ctt 1824
 Val Pro Glu Ser Trp His Gly Arg Pro Phe His Leu Glu Leu Thr Leu
 595 600 605
 ccc ccg ctg gcc gcc ctc atc ctg gag ccg gag cac ggg tag 1866
 Pro Pro Leu Ala Ala Leu Ile Leu Glu Pro Glu His Gly
 610 615 620

<210> 2
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> Rhodothermus obamensis

<400> 2
 Met Ser Trp Leu Thr Glu Glu Asp Ile Arg Arg Trp Glu Ser Gly Thr

10

20

30

40

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

10

20

30

Thr Ile Ala Glu Glu Ser Thr Ala Trp Pro Gly Val Ser Ala Pro Thr
 355 360 365
 Tyr Asn Asn Gly Leu Gly Phe Leu Tyr Lys Trp Asn Met Gly Trp Met
 370 375 380
 His Asp Thr Leu Asp Tyr Ile Gln Arg Asp Pro Ile Tyr Arg Lys Tyr
 385 390 395 400
 His His Asp Glu Leu Thr Phe Ser Leu Trp Tyr Ala Phe Ser Glu His
 405 410 415
 Tyr Val Leu Pro Leu Ser His Asp Glu Val Val His Gly Lys Gly Ser
 420 425 430
 Leu Trp Gly Lys Met Pro Gly Asp Asp Trp Gln Lys Ala Ala Asn Leu
 435 440 445
 Arg Leu Leu Phe Gly His Met Trp Gly His Pro Gly Lys Lys Leu Leu
 450 455 460
 Phe Met Gly Gly Glu Phe Gly Gln His His Glu Trp Asn His Asp Thr
 465 470 475 480
 Gln Leu Glu Trp His Leu Leu Asp Gln Pro Tyr His Arg Gly Ile Gln
 485 490 495
 Leu Trp Val Cys Asp Leu Asn His Leu Tyr Arg Thr Asn Pro Ala Leu
 500 505 510
 Trp His Asp Gly Pro Glu Gly Phe Glu Trp Ile Asp Phe Ser Asp Arg
 515 520 525
 Asp Gln Ser Val Ile Cys Tyr Leu Arg Lys Asn Ala Gly Arg Met Leu
 530 535 540
 Leu Phe Val Leu Asn Phe Thr Pro Val Pro Arg Glu His Tyr Arg Val
 545 550 555 560
 Gly Val Pro Ile Gly Gly Pro Trp His Glu Val Leu Asn Ser Asp Ala
 565 570 575
 Val Ala Tyr Gly Gly Ser Gly Met Gly Asn Phe Gly Arg Val Glu Ala
 580 585 590
 Val Pro Glu Ser Trp His Gly Arg Pro Phe His Leu Glu Leu Thr Leu
 595 600 605
 Pro Pro Leu Ala Ala Leu Ile Leu Glu Pro Glu His Gly
 610 615 620

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)
C 1 1 D 3/386 (2006.01)
C 1 2 R 1/01 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P 21/00 C
C 1 1 D 3/386
C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R 1:01
C 1 2 N 1/15
C 1 2 R 1:01
C 1 2 N 1/19
C 1 2 R 1:01
C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:01
C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 R 1:01
C 1 2 N 9/10
C 1 2 R 1:01
C 1 2 P 21/00 C
C 1 2 R 1:01

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 篠原 眞理

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 4 4 6, ブルックリン, ビーコン ストリート 1 4 4
 0 # 4 1 3

審査官 神谷 昌男

(56)参考文献 国際公開第97/041736 (WO, A1)

欧州特許出願公開第00538177 (EP, A1)

特開平09-173082 (JP, A)

特開平07-213287 (JP, A)

欧州特許出願公開第00418945 (EP, A1)

国際公開第99/001545 (WO, A1)

Appl. Environ. Microbiol., 1994年, 60(9), 3096-3104

Biochim. Biophys. Acta., 1994年, 1200(3), 334-6

Mol. Gen. Genet., 1991年, 230, 136-44

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed