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

特許第3553958号

(P3553958)

(45)発行日　平成16年8月11日(2004.8.11)　(24)登録日　平成16年5月14日(2004.5.14)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA
C11D 3/386	C11D 3/386	
C11D 7/42	C11D 7/42	
C12N 1/19	C12N 1/19	
C12N 1/21	C12N 1/21	

請求項の数 12　(全 44 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-521525
(86)(22)出願日　平成7年2月22日(1995.2.22)
(65)公表番号　特表平9-509058
(43)公表日　平成9年9月16日(1997.9.16)
(86)国際出願番号　PCT/DK1995/000079
(87)国際公開番号　WO1995/022615
(87)国際公開日　平成7年8月24日(1995.8.24)
審査請求日　平成13年12月3日(2001.12.3)
(31)優先権主張番号　0217/94
(32)優先日　平成6年2月22日(1994.2.22)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)

微生物の受託番号　DSM　DSM 4109

(73)特許権者
ノボザイムス　アクティーゼルスカブ
デンマーク国、デーコー-２８８０　バグスバエルト、クロシェイバイ　３６
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人
弁理士　福本　積
(74)代理人
弁理士　日野　あけみ
(74)代理人
弁理士　中村　和広

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脂質分解酵素の変異体の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

親リパーゼの変異体の製造方法であって、

（ａ）親リパーゼをコードするDNAをランダム変異誘発に委ね、

（ｂ）工程（ａ）で得られた変異誘発処理されたDNAを宿主細胞中で発現せしめ、そして

（ｃ）カルシウムに対して低下した依存性を有する変異したリパーゼを発現する宿主細胞についてスクリーニングする、

ことを含んで成る方法。

【請求項２】

工程（ｃ）が更に、親リパーゼと比較して洗剤又は洗剤成分に対して改善された耐性を有する事についてスクリーニングすることを含んで成る、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記リパーゼがフミコラ（Humicola）属の株から得られうる、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項４】

前記リパーゼがフミコラ．ラヌギノサ（Humicola lanuginosa）DSM 4109株から得られうる、請求項３に記載の方法。

【請求項５】

フミコラ．ラヌギノサDSM 4109から得られうるリパーゼの変異体であって、次の変異:S83T、G91A、I100V、D167G、の少なくとも１つを含んでなるリパーゼ変異体。

【請求項６】
更に、リパーゼのＮ－末端及びＣ－末端の一方又は両方への１個～数個のアミノ酸残基の付加、アミノ酸配列中の１個～数個の異なる部位における１個～数個のアミノ酸残基の置換、アミノ酸配列中の１個～数個の部位又はリパーゼの両端若しくは一端における１個～数個のアミノ酸残基の除去、あるいはアミノ酸配列中の１個～数個の部位における１個～数個のアミノ酸残基の挿入を含んで成る、請求項４に記載のリパーゼの変異体。
【請求項７】
フミコラ．ラヌギノサDSM 4109から得られうるリパーゼの変異体であって、次の変異：
N94K＋D96A
S83T＋N94K＋D96N
E87K＋D96V
E87K＋G91A＋D96A
N94K＋F95L＋D96H
F95C＋D96N
E87K＋G91A＋D96R＋I100V
E87K＋G91A
S83T＋E87K＋Q249R
S83T＋E87K＋W89G＋G91A＋N94K＋D96V
N73D＋S85T＋E87K＋G91A＋N94K＋D94A
E87K＋G91A＋L93I＋N94K＋D96A
D167G＋E210V
N73D＋E87K＋G91A＋N94I＋D96G
S83T＋E87K＋G91A＋N92H＋N94K＋D96M
E56R＋D57L＋V60M＋D62N＋S83T＋D96P＋D102E
D57G＋N94K＋K96L＋L97M
E87K＋G91A＋D96R＋I100V＋E129K＋K237M＋I252L＋P256T＋G263A＋L264Q
E56R＋D57G＋S58F＋D62C＋T64R＋E87G＋G91A＋F95L＋D96P＋K98I＋K237M
D167G
N73D＋E87K＋G91A＋N94I＋D96G
S83T＋E87K＋G91A＋N92H＋N94K＋D96M
D57G＋N94K＋D96L＋L97M
G91A＋N94K＋D96A,
の少なくとも１つを含んでなる、リパーゼ変異体。
【請求項８】
更に、リパーゼのＮ－末端及びＣ－末端の一方又は両方への１個～数個のアミノ酸残基の付加、アミノ酸配列中の１個～数個の異なる部位における１個～数個のアミノ酸残基の置換、アミノ酸配列中の１個～数個の部位又はリパーゼの両端若しくは一端における１個～数個のアミノ酸残基の除去、あるいはアミノ酸配列中の１個～数個の部位における１個～数個のアミノ酸残基の挿入を含んで成る、請求項７に記載のリパーゼの変異体。
【請求項９】
請求項５～８の何れか１項に記載のリパーゼ変異体をコードするDNA構成物。
【請求項１０】
請求項９に記載のDNA構成物を含む宿主細胞。
【請求項１１】
リパーゼ変異体の製造方法において、該変異体を発現するのに適当な条件下で請求項10に記載の宿主細胞を培養し、そして発現した変異体を培養物から回収することを含んで成る方法。
【請求項１２】
請求項５～８の何れか１項に記載のリパーゼ変異体を含んで成る洗剤組成物。
【発明の詳細な説明】

発明の分野
本発明は、親脂質分解酵素の変異体の製造方法および該方法により生産される変異体に関する。更に、本発明は、本発明の変異体をコードするDNA構築体、該DNA構築体を含んでなる発現ベクターおよび宿主細胞並びに変異体を含んでなる洗剤用添加剤又は洗剤組成物に関する。
発明の背景
多年にわたって、脂質分解酵素は、洗剤用酵素として、すなわち布類および他の繊維から脂質又は脂肪の汚れを除去するため用いられてきた。
例えば、種々の微生物リパーゼが、洗剤用酵素として提案されてきた。そのようなリパーゼの例には、例えばヨーロッパ特許（EP）258 068およびEP 305 216に記載されているようなフミコラ　ラヌギノサリパーゼ、例えばEP 238 023に記載されているようなリゾムコール　マイヘイリパーゼ、カンジダリパーゼ、例えばC.アンタルクチカリパーゼ、例えばEP 214 761に記載されているC.アンタルクチカリパーゼＡ又はＢ、シュードモナスリパーゼ例えばP.アルカリゲネスおよびP.シュードアルカリゲネスリパーゼ、例えば、EP 218 272に記載の如きもの、P.セパシアリパーゼ、例えばEP 331 376に記載の如きもの、バシラスリパーゼ、例えばB.ズブチリスリパーゼ（ダルトイス等、1993）、B.ステアロサーモフィラスリパーゼ（JP 64/744922）およびB.プミラスリパーゼ（EP 91 00664）が含まれる。
更に、多数のクローン化されたリパーゼが記載されてきており、これにはヤマグチ,S.等、1991によって記載されたペニシリウム　カメムベルチリパーゼ、ゲオトリカム　カンジダムリパーゼ（シマダ,Y.等、1989）、および種々のリゾプスリパーゼ例えばR.デルマーリパーゼ（ハース,M.J等、1991）、R.ニベウスリパーゼ（クギミヤ,W.1992）およびR.オリゼリパーゼが含まれる。
洗剤用酵素として提案されてきた脂質分解酵素の他のタイプには、例えば国際公開（WO）88/09367に記載されているようなシュードモナス　メンドシナ由来のクチナーゼ、又は（例えばWO 90/09446に記載の）フサリウム　ソラニ　ピシーから由来のクチナーゼが含まれる。
近年、洗剤特性に対し改善された特性を有するリパーゼ変異体を製造する試みがなされてきた。例えばWO 92/05249は改善された性質を有するリパーゼ変異体を開示しており、ここにおいて野生型リパーゼ酵素の幾つかの性質が、それらのアミノ酸配列の特異的、すなわち部位特異的修飾により変化された。より特異的には、リパーゼ変異体が記載され、ここにおいて親リパーゼのいわゆる脂質コンタクト（contact）域の１個又はそれ以上のアミノ酸残基が修飾された。
PCT/DK93/00225は、改善された性質を有するリパーゼ変異体を記載し、ここにおいてリパーゼの重要な位置を占めるアミノ酸残基が修飾された。
EP 407 225は、特異的に特定されたアミノ酸の修飾により製造された、脂質分解酵素に対し改善された抵抗を有するリパーゼ変異体を開示する。
EP 260 105はヒドロラーゼを開示し、ここにおいて活性部位から15Å内のアミノ酸残基が置換された。
全ての前記リパーゼ変異体は、特異的アミノ酸残基の修飾をもたらす部位特異的変異誘発の使用により構築され、そして該アミノ酸残基は、それらのタイプを基礎にして又は親リパーゼの第二次又は第三次構造内のそれらの位置を基にして選ばれた。
与えられたタンパク質の突然変異体又は変異体を構築するための択一的方法は、ランダム変異誘発を基礎にした。例えば米国特許（US）4,898,331およびWO 91/01285はそのような技術を開示している。
改善された洗浄および／又は皿洗い性能を有する新規脂質分解酵素に対しての必要性が存在し、そして本発明の目的はそのような酵素を製造することである。
発明の簡単な開示
本発明者等は、それらの親酵素と比較して改善された洗浄および／又は皿洗い性能を有する脂質分解酵素の変異体を製造する新規方法を今や開発した。この方法は脂質分解酵素を

コードするDNA配列のランダム又は局在ランダム変異誘発を基礎にする。
より詳しくは、第一の面において本発明は親脂質分解酵素の変異体の製造方法に関し、この方法は
（ａ）親脂質分解酵素をコードするDNA配列をランダム変異誘発に委ね、
（ｂ）工程（ａ）で得られた変異誘発DNA配列を宿主細胞中で発現し、次いで
（ｃ）カルシウムに対し減少せしめられた依存性および／又は親脂質分解酵素と比較して洗剤又は１又はそれ以上の洗剤成分に対し改善された耐性を有する変異誘発脂質分解酵素を発現する宿主細胞に対してスクリーニングすることを含んでなる。
本発明において、語句「脂質分解酵素」は、例えばトリグリセリド又はリン脂質を分解する能力の如き脂質分解能力を発現する酵素を示すことが意図される。脂質分解酵素は、例えばリパーゼ、リン脂質、エステラーゼ又はクチナーゼであってよい。
語句「ランダム変異誘発」は、常法ですなわち、親酵素のランダムの位置で（すなわち、部位特異的変異誘発に対比される如く）１又はそれ以上の変異を導入することを示すために意図される。ランダム変異は、修飾されるべきDNA配列の多数のコピーを変異誘発物質に暴露し次いで変異体の存在に対してスクリーニングすることによって典型的に導入される。
工程（ｃ）のスクリーニングの規準は、それらの親酵素と比較して改善された洗浄および／又は皿洗い特性を有する親脂質分解酵素の変異体を同定するために特に使用することが考慮される。
本発明に関し、語句「カルシウムに対し減少せしめられた依存性」は、類似の条件で試験したとき、親酵素の活性と同じ活性を示すためにより低量のカルシウムを必要とすることを意味することが意図される。多分、本発明の突然変異脂質分解酵素は、酵素活性を示すためカルシウムの存在に実質的に独立である。
語句「洗剤又は洗剤成分に対して改善された耐性」とは、親脂質分解酵素よりもより高濃度の洗剤又は洗剤成分で活性であることを意味するものと意図される。
本発明に関し、語句「洗剤」は洗浄又は皿洗いに対し通常用いられる洗剤成分の混合物を示すことが意図される。同様に、「洗剤成分」は、洗剤又は皿洗い組成物において通常見出される成分を示すことが意図され、その例は以下の記載に示される。
次のように理解されるであろう；すなわち、カルシウムに対し減少せしめられた依存性および／又は洗剤又は１又はそれ以上の洗剤成分に対し改善された耐性に加えて、本発明方法によって得られる変異体は、洗浄および／又は皿洗い条件のもとで試験したとき、好ましくは親脂質分解酵素の脂質分解活性に匹敵するか又はそれを超える大きさの脂質分解活性を示す。
本発明方法の工程（ｃ）で定義されるスクリーニング規準は、当業者に公知の適当な方法で測定できる。本発明の目的に対して開発された特に適当なアッセイは、下記の物質および方法の節において記載されている。
別の面において、本発明はカルシウムに対する減少せしめられた依存性および／又は親脂質分解酵素と比較して洗剤又は洗剤成分に対し改善された耐性を有する脂質分解酵素の変異体をコードする変異誘発DNA配列を含んでなるDNA構築体に関し、そのDNA配列は本発明方法の工程（ｃ）で選択される宿主細胞から単離される。
更に別の面において、本発明はDNA構築体を有する組換え発現ベクター、そのDNA構築体又はそのベクターで形質転換された細胞並びに該細胞を変異体の生産を助成する条件下で培養し、しかる後変異体を培地より回収することを含んでなる親脂質分解酵素の変異体の製造方法に関する。
最後の面において、本発明は脂質分解酵素の変異体並びに特に洗浄および皿洗いのために洗剤用酵素としての該変異体の使用、および洗剤用添加剤および該変異体を含んでなる洗剤に関する。
発明の詳細な開示
親脂質分解酵素をコードするDNA配列のクローニング
本発明に従ってランダム変異誘発に委ねられるべき親脂質分解酵素をコードするDNA配列

は、当業者に公知の方法により、対象の親酵素を生産する全ての細胞又は微生物から単離できる。
例えば、配列を有することが期待されている生物体からcDNA又はゲノムライブラリーを確立し次いで常法により陽性クローンに対しスクリーニングすることにより単離できる。このような手順の例は、標準法（注、サムブルック等、1989）に従い（もし配列情報が入手できる場合）親酵素又は（もし親酵素に関し情報が入手できない場合）関連脂質分解酵素のアミノ酸又はDNA配列を基礎にして製造されるオリゴヌクレオチドプローブにハイブリッド形成および／又は脂質分解例えばリパーゼ活性を発現するクローンの選択および／又は親脂質分解酵素に対して生じる抗体と反応性であるタンパク質を生産するクローンの選択である。
cDNA又はゲノムライブラリーから本発明に従い、修飾されるべき親脂質分解酵素をコードするDNA配列を単離する好ましい方法は、親酵素のDNA又はアミノ酸配列を基礎に得られた縮重したオリゴヌクレオチドプローブを用いポリメラーゼ鎖反応（PCR）の使用による。例えば、PCRは米国特許4,683,202に記載した方法を用い又はR.K.サイキ等（1988）により行うことができる。
択一的に、親酵素をコードするDNA配列は、確立された標準法例えばビーケージおよびカルテルス（1981）により記載されるホスホアミダイト法又はマテス等（1984）に記載される方法により合成的に製造できる。ホスホアミダイト法により、オリゴヌクレオチドは例えば自動DNA合成機で合成され、精製され、アニールされ、結合されそして適当なベクター中でクローン化される。
最後に、親酵素をコードするDNA配列は、標準法に従い合成、ゲノム又はcDNA起源（適当な場合）の断片を結合することによって調製された複合型のゲノムと合成起源、複合型の合成およびcDNA起源又は複合型のゲノムとcDNA起源のDNAから調製でき、断片は親酵素をコードする全DNA配列の種々の部分に相当する。
ランダム変異誘発
本発明方法の工程（ａ）に従って行われるべき親脂質分解酵素をコードするDNA配列のランダム変異誘発は、当業者に公知の方法により好都合に行うことができる。
例えば、適当な物理的又は化学的変異誘発剤の使用により、適当なオリゴヌクレオチドの使用により又はDNA配列をPCR作成変異誘発に委ねることにより行うことができる。更に、ランダム変異誘発は、これらの変異誘発剤の任意の組合わせの使用により行うことができる。
変異誘発剤は、例えば転位、トランスバージョン、スクランブリング（scrambling）、欠失および／又は挿入を誘発するものであってよい。
本発明に適当な物理的又は化学的変異誘発剤の例には、紫外線（UV）照射、ヒドロキシルアミン、Ｎ－メチル－Ｎ′－ニトロソ－Ｎ－ニトロソグアニジン（MNNG）、Ｏ－メチルヒドロキシルアミン、亜硝酸、蟻酸およびヌクレオチド類似体が含まれる。
そのような薬剤が用いられるとき、変異誘発は典型的には、変異誘発が生起するのに適当な条件下、選択の変異誘発剤の存在下、変異誘発されるべき親酵素をコードするDNA配列をインキュベートし次いで目的の性質を有する突然変異DNAを選択することによって行なわれる。
変異誘発は、オリゴヌクレオチドの使用によって行なわれるとき、オリゴヌクレオチドは変化が望まれる位置でオリゴヌクレオチドの合成中３種の非親ヌクレオチドでドープされ又はスパイクされ得る。ドーピング又はスパイキング（spiking）は、非所望のアミノ酸に対するコドンが避けられるように行なわれる。ドープされ又はスパイクされたオリゴヌクレオチドは、PCR,LCR又は任意のDNAポリメラーゼおよびリガーゼを用いる発表された技術により、脂質分解酵素をコードするDNAに挿入できる。
PCR作成変異誘発を用いるとき、親脂質分解酵素をコードする化学的に処理されたか又は非処理遺伝子を、ヌクレオチドのミス挿入（misincorporation）を増加する条件下PCRに委ねられる（デェシアー1992、ロイング等1989）。
E.コリー（Fowler等、1974）、S.セレビシエ又は他の任意の微生物生物体のミューテータ

ー菌株は、例えば親酵素を含有するプラスミドをミューテーター菌株に形質転換し、プラスミドを有するミューテーター菌株を増殖し次いで突然変異プラスミドをミューテーター菌株から単離することにより、脂質分解酵素をコードするDNAのランダム変異誘発に対して使用できる。引き続き、突然変異プラスミドを発現生物体に形質転換する。

突然変異されるべきDNA配列は、好都合には親脂質分解酵素を発現する生物体から調製されるゲノム又はcDNAライブラリー内で発現され得る。択一的に、DNA配列は、プラスミド又はバクテリオファージの如き適当なベクター上に存在でき、これらはそのまゝインキュベートでき又はさもなければ、変異誘発剤に暴露されてもよい。変異誘発されるべきDNAは、宿主細胞のゲノム内に組込むことにより又は細胞内に導入されたベクター上に存在することにより宿主細胞中に存在してもよい。最後に、変異誘発されるべきDNAは、単離された形で存在し得る。ランダム変異誘発に委ねられるべきDNA配列は、好ましくはcDNA又はゲノムDNA配列である。

幾つかの場合、発現工程（ｂ）又はスクリーニング工程（ｃ）が行われる前に、変異誘発DNA配列を増幅することが好都合である。そのような増幅は、当業者に公知の方法に従って行うことができ、今日好ましい方法は、親酵素のDNA又はアミノ酸配列を基礎に調製されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR作成増幅である。

変異誘発剤と共にインキュベーション又は変異誘発剤に暴露することに続き、突然変異DNAを、発現を生じさせるべき条件下DNA配列を有する適当な細胞を培養することにより発現する。この目的に対して使用される宿主細胞は、所望によりベクター上に存在する変異誘発DNA配列で形質転換されたものであるか、又は変異誘発処理中親酵素をコードするDNA配列を有するものであってよい。適当な宿主細胞の例を、以下に示す。変異誘発DNA配列は、更に変異誘発DNA配列の発現を許容する機能をコードするDNA配列を含んでなる。

次のように理解されるであろう；すなわち

前記工程（ｃ）で言及されたスクリーニング規準は注意深く選択された。従って、任意の理論に制限されることなく、カルシウムへの減少せしめられた依存性は、全体的に改善された性能を有する変異体を生じるものと信じられここにおいてカルシウムに対する要求は、特に少量の遊離カルシウムイオンが存在する条件下、最適活性に対する制限因子を考慮されるであろう。洗剤用リパーゼに関連し、要求される遊離カルシウムイオンは、通常洗浄水から提供され従って、脂質分解活性は水のカルシウム含量に依存する。

変異体が耐性を改善する洗剤又は洗剤成分は、例えば更に以下に記載されるように、任意のタイプであってよい。好ましくは、洗剤成分は、非イオン、アニオン、カチオン、双性又は両性界面活性剤である。非イオン界面活性剤の例には、アルコールエトキシレートが含まれ、アニオン界面活性剤の例には、LAS、アルキルスルフェート、アルコールエトキシスルフェート等が含まれる。

特に、次のように企図される；すなわち非イオン界面活性剤アルコールエトキシレート、商業的に入手できるもの（その例はドバノール（商標）である）に対する改善された耐性は、改善された洗浄性能の指標であり得る。

工程（ｃ）のスクリーニングは好都合には、次の原理に基づくフィルターアッセイの使用によって行なわれる：

対象の変異誘発脂質分解酵素を発現し得る微生物を、適当な培地上でかつ酵素が分泌されるのに適当な条件下でインキュベートし、培地には第一のタンパク質結合フィルターおよびその頂部に低タンパク質結合能を示す第二のフィルターを含んでなる二重フィルターが設けられている。微生物は、第二のフィルター上に存する。インキュベーションに続き、微生物から分泌される酵素を含んでなる第一のフィルターを、微生物を含んでなる第二のフィルターから分離する。第一のフィルターを所望の酵素活性のためのスクリーニングに委ね次いで第二のフィルター上に存在する対応する微生物コロニーを同定する。

酵素活性を結合するために用いられるフィルターは、例えばナイロン又はニトロセルロース等のあらゆるタンパク質結合フィルターであってよい。発現生物体のコロニーを有する頂部フィルターは、タンパク質の結合に対する親和性を有しないか又は低親和性を有する全てのフィルター、例えばセルロースアセテート又はDurapore（商標）であってよい。フ

ィルターは、スクリーニングに対し用いられるべき全ての条件で予備処理でき又は酵素活性の検出中に処理できる。
酵素活性は、染料、蛍光、沈殿、pH指示薬、IR吸光度又は酵素活性の検出に対し他の公知の技術により検出できる。
検出化合物は、あらゆる固定化剤、例えばアガロース、寒天、ゼラチン、ポリアクリルアミド、デンプン、濾紙、布；又は固定化剤の任意の組合せにより固定化できる。
リパーゼ活性は、脂質例えばオリーブ油又はラードと組み合わされたブリリアントグリーン、ローダミンＢ又はスーダンブラックにより検出される。改善された洗浄能力を有する親脂質分解酵素の変異体を同定するためのスクリーニング規準は、例えばEGTA,EDTA、非イオン又はアニオンテンサイド（tensides）、アルカリpH又は酵素活性の前記検出剤の一つと組み合わされた任意の洗剤組成物であってよい。
次のように理解されるであろう；すなわち、本発明のフィルターアッセイで用いられるスクリーニング規準は、スクリーニングされるべき酵素の所望の性質又は使用に応じるように選ばれる。例えば、製紙産業において特に使用されるリパーゼに対するスクリーニングにおいて、増加せしめられた温度安定性を有する酸性リパーゼに対してスクリーニングすることは適切である。このことは、酸性pH（例えばpH4）を有する緩衝液および／又は分析前又は分析下高温下でのインキュベートの使用により行うことができる。
工程（ｃ）で生産される宿主細胞は、好都合には先の変異誘発処理で用いられるよりもより緊縮選択規準を用い、工程（ａ）－（ｃ）で定義した如き更に変異誘発のラウンドに委ねることができる。
工程（ｃ）において選択される宿主細胞は、脂質分解酵素の変異体の製造に直接用いられる。択一的に、変異体をコードするDNAは、宿主細胞から単離できそして「本発明の変異体の発現」と表題された節（ここにおいて適当な宿主細胞も掲げられている）において以下に記載される手順を好都合に用いることにより、他の適当な宿主細胞内に挿入され得る。
局在ランダム変異誘発
本発明によれば、ランダム変異誘発は好都合には対象の親脂質分解酵素の一部に位置することができる。これは、例えば酵素の一定の領域が酵素の与えられた性質に対し特に重要であることが同定されるとき有利でありそしてこれは、修飾されるとき、改善された性質を有する変異体をもたらすことが期待される。そのような領域は、親酵素の三次構造が明らかにされそして酵素の機能と関連されるとき、通常同定され得る。
局在ランダム変異誘発は、前記のPCR発生変異誘発技術又は当業者に公知の他の適当な技術の使用により好都合に行なわれる。
択一的に、修飾されるべきDNA配列の一部をコードするDNA配列は、例えば適当なベクターに挿入されることにより単離でき、そして該部分は引き続き前記の変異誘発の使用により変異誘発に委ねられる。
親脂質分解酵素
本発明に従って修飾されるべき親脂質分解酵素は、先に特定した如き脂質分解活性を有するあらゆる酵素であってよい。脂質分解活性の例には、リパーゼ、エステラーゼ、クチナーゼおよびリン脂質が含まれる。
好ましくは、親脂質分解酵素は、脂質コンタクト（contact）ゾーン又は該ゾーンの一部をコードするDNA配列の部分上で行なわれる局在ランダム変異誘発によって修飾される。
今日まで見出された全ての晶出されたリパーゼは、リパーゼが不活性形であるとき活性部位をカバーする少なくとも一つの表面ループ構造（またリッド又はフラップとも称される）を含んでなる（そのようなリパーゼの例は、ブラジー等、1990により記載されている）。リパーゼが活性化されるとき、ループ構造はシフトして活性部位残基に暴露され、そして疎水性表面は活性部位Serの周囲に造られ、これは増加せしめられた表面疎水性を有しそしてこれは加水分解で又は加水分解中脂質基質と相互作用する。この活性化は、界面活性化と称されそして更にTilbeurgh等により論議されている（1993）。
本発明の目的に対し、活性より造られる表面は「脂質コンタクトゾーン（contact zone）

」と呼ばれ、所望によりループ構造の形で、この表面の部分内に位置する又は該部分を形成するアミノ酸残基を含むことが意図される。これらの残基は、脂質表面との接触により活性化されるとき、リパーゼが脂質からトリグリセリドを加水分解する場合、加水分解で又は加水分解中基質とリパーゼ相互作用に関与し得る。
脂質コンタクトゾーンは、脂質基質に対する結合領域を含有し、この基質は単一脂質基質分子が加水分解前に結合する脂質コンタクトゾーンの部分である。この結合領域は再たびアシル結合疎水性クレフト（creft）およびいわゆる加水分解ポケットを含有し、これは活性部位Serの周りに位置し、そしてここにおいて脂質基質の加水分解が生起するものと考えられている。今日知られている全てのリパーゼにおいて、脂質コンタクトゾーンは、例えば適当なコンピュータープログラムにより造られたリパーゼの三次元構造から容易に認識される。不活性および活性リパーゼの配座は、WO 92/05249の図１および図２に示される。
本出願で詳しく論議されているフミコラ　ラヌギノサリパーゼの脂質コンタクトゾーンは、アミノ酸残基21－25,36－38,81－98,110－116,144－147,172－174,199－213および248－269により形成される。これらの残基は、リパーゼとリパーゼ基質間の相互作用のコンピューターモデルシミュレーションを基礎に同定された。
他の脂質分解酵素の脂質コンタクトゾーンは、
ａ）３－Ｄ分子構造の疎水性ベクトルを計算し、
ｂ）線状配列内で活性部位セリンの後の第二のアミノ酸残基のＣα－原子を通ってベクトルに垂直なカット（cut）を作成し、次いで
ｃ）ベクトルが向いているカットのその側で少なくとも１つの原子を有する全ての残基を含有せしめ、次いで
ｄ）これらの残基から選択することにより形成された、これらの残基は（その開いた又は閉じた形でのリパーゼの場合）タンパク質の表面の５オングストローム内に少なくとも１つの原子を有する。
疎水性ベクトルは、開いた又は閉じた形でのリパーゼの場合、少なくとも10％の表面接近可能性（リー,B.およびリチャード,F.M.1971,Mol.Biol.55:379－400）を有する残基に対し全ての残基ベクトルを合計することにより、タンパク質から計算される。残基ベクトルの出発点は、残基のＣα－原子として規定されそしてその方向は側鎖の質量中心を通る。各残基ベクトルの大きさは、残基の相対伝達遊離エネルギーとして規定される。
各残基の表面接近可能性は、コンノリー（Connolly）プログラムを用いて計算される。
好ましくは、局在ランダム変異誘発は、親リパーゼのリッド（lid）領域および／又は疎水性クレフト、又は該リッド領域および／又は疎水性クレフトの一部をコードするDNA配列の部分上で行なわれる。
本発明に従って修飾されるべき親脂質分解酵素は、あらゆる起源のものであってよい。従って、酵素は哺乳動物、植物、脊椎動物又は他の任意の領域由来であってよい。しかし、今日酵素は微生物起源から造られそして多数の微生物菌株が見出され洗剤用目的に対し特定の用途の酵素を生産する。
更に特異的には、DNA配列親脂質分解酵素は、菌株すなわち酵母又は繊維状菌類から由来し得る。例えば、DNA配列はフミコラsp.、例えばH.ラヌギノサの菌株、リゾムコールsp.、例えばRh.マイヘイの菌株、リゾプスsp.の菌株、カンジダsp.の菌株、フサリアムsp.、例えばF.ソラニ　ピシーの菌株、ベンツリアspp.、例えばV.イネクアリスの菌株、コレトトリクムspp.、例えばC.グロェロスポリロイデス又はC.ラゲナリウムの菌株又はペニシリウムspp.、例えばP.スピヌロサム又はP.カメムベルチの菌株から由来できるものであってよい。
本発明において、「から由来できる」とは、対象の生物体の菌株により生産される酵素を示すばかりでなく、そのような酵素から単離されたDNA配列によってコードされそして該DNA配列で形質転換された宿主生物体内で生産される酵素をも示す。更に、その語句は、合成および／又はcDNA起源のDNA配列によりコードされそして対象の酵素を同定する特徴を有する酵素を示すことが意図される。

親脂質分解酵素として特に興味あるものは、H.ラヌギノサ、例えばH.ラヌギノサ菌株DSM 4109の菌株から由来するリパーゼ、又は該リパーゼの類似体、Rh.ムコール菌株、又はC.アンタルクチカの菌株から由来するリパーゼである。
本発明において、語句「類似体」は１個又はそれ以上のアミノ酸残基だけH.ラヌギノサリパーゼのそれとは異なるアミノ酸配列を含んでなりそして（二つの配列間で同一性の程度として測定して）、該リパーゼのアミノ酸配列と少なくとも70％の相同性、例えば少なくとも75％,80％,90％又は95％相同性であり、該リパーゼと免疫学的に交差反応性でありおよび／又は該リパーゼのアミノ酸配列又は該リパーゼをコードするDNA配列を基礎に調製されたオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド形成するDNA配列によってコードされるポリペプチドを含むことが意図される。
類似体は、例えば１個又はそれ以上のアミノ酸残基をリパーゼのＮ末端およびＣ末端の一方又は両方への付加、アミノ酸配列中の１個又はそれ以上の異なる部位で１個又はそれ以上のアミノ酸残基の置換、リパーゼの片方又は両端で又はアミノ酸配列中の１個又はそれ以上の部位で１個又はそれ以上のアミノ酸残基の欠失、又はアミノ酸配列中の１個又はそれ以上の部位で１個又はそれ以上のアミノ酸残基の挿入を生ぜしめるリパーゼをコードするDNA配列を修飾することにより調製される、H.ラヌギノサリパーゼの誘導体であってよい。DNA配列の修飾は、部位特異的又はランダム変異誘発又は周知の技術に従ったこれらの技術の組合せにより行うことができる。
更に、類似体は、前記の「発明の背景」の節において言及された生物体の一つの如き他の生物体から由来するポリペプチドであってよい。
関連のオリゴヌクレオチドプローブを用いた親H.ラヌギノサリパーゼの類似体をコードするDNA配列のハイブリッド形成は、DNA配列をハイブリッド形成せしめる適当な条件下で行うことができる。例えば、そのような条件は、例えば５×SSC中でのプレソーキングおよび20％ホルムアミド、５×デンハルト溶液、50mMのリン酸ナトリウム（pH6.8）、および50μｇの変性超音波処理されたウシ胸腺DNAの溶液中～40℃で１時間予備ハイブリッド形成、次いで100μM ATPを加えた同溶液中で～40℃で18時間ハイブリッド形成を含む特異的条件下でのハイブリッド形成、又は例えばSambrook等、1989により記載された他の方法である。
H.ラヌギノサリパーゼの類似体の免疫学的交差反応は、精製されたリパーゼの少なくとも１個のエピトープに対し生じた又はそれと反応性の抗体を用いて分析される。モノクローナル又はポリクローナルのいずれであってもよい抗体は、例えばHudson等により記載された当業者に公知の方法により製造される。免疫学的交差反応は、当業者に公知の分析を用いて測定され、その例はウェスターンブロッティング（Western Blotting）又は例えばハンソン等、1989に記載される如く放射免疫分析である。
親脂質分解酵素は、菌株DSM 4109から得ることのできるH.ラヌギノサリパーゼ又はその類似体であるとき、以下の内容が好ましい；すなわちランダム変異誘発に委ねられるDNA配列は、該リパーゼのアミノ酸残基21－27,56－64,18－99,83－100,108－116,145－147,174,202－213、例えば205－211,226－227,246－259又は263－269によって規制される領域の少なくとも１つをコードするDNA配列の一部を含んでなるか又はその一部を構成する。該リパーゼのDNAおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１および２から明らかである。
局在ランダム変異誘発は、これらの領域の１つ又はそれ以上において行うことができ、そして好ましくは少なくとも２つの領域において行なわれる。
本発明に従って修飾されるべき親脂質分解酵素は、細菌から由来することができる。例えば、親脂質分解酵素をコードするDNA配列は、シュードモナスspp.、例えばP.セパシア、P.アルカリゲネス、P.シュードアルカリゲンス、P.メンドシナ（またP.プチダとも称される）、P.シュリンゲ、P.エーロギノサ又はP.フラギーの菌株、バシラスspp.、例えばB.ズブチリス又はB.プミラスの菌株又はストレプトマイセスsp.、例えばS.スカビの菌株から由来できる。
親細菌脂質分解酵素は、前記種由来のリパーゼ例えばEP 218 272,EP 331 376およびEP 407 225で記載の如きシュードモナスリパーゼ、又は例えば国際公開（WO）88/09367で記載

されるようなクチナーゼであってよい。
本発明の変異体
参照を容易にするため、本発明の特異的変異体は、次の命名の使用によって記載される：
もとのアミノ酸（１以上）：位置（１以上）：置換アミノ酸（１以上）
この命名に従い、位置96でバリンをアスパラギン酸で置換することは次の如く示される：
Asp 96 Val　又は　D96V
同じ位置でアスパラギン酸の欠失は次の如く示される：
Asp 96 ＊　　又は　D96＊
そして追加のアミノ酸残基例えばリシンの挿入は次の如く示される：
Asp 96 ValLys　　又は　D96VK
多重変異はプラスにより分離される、すなわち：
Asp 96 Val＋Glu 87 Lys　又は　D96V＋E87K
は、位置96および87でバリンおよびリシンをそれぞれアスパラギン酸およびグルタミン酸で置換する変異を示す。
１又はそれ以上の択一的アミノ酸残基が、与えられた位置に挿入されるとき、それは
D96V,N又は
D96V又はD96N
として示される。
更に、修飾に好適な位置は提案された何らの特異的修飾なしで本発明において同定されるとき、次のように理解されるべきである；すなわちアミノ酸残基は位置内に存在するアミノ酸残基で置換できる。従って、例えば、位置96のアスパラギン酸の修飾が言及されるとき、明示されないけれども、次のように理解されるべきである；すなわちアスパラギン酸は欠失され得るか又は他のアミノ酸、すなわちR,N,A,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,Vのいずれか１つ、又は更にその位置で挿入されたアミノ酸で置換され得る。
最後に、親H.ラヌギノサリパーゼの変異は、本明細書中で同定されており、（先に定義した如き）該リパーゼの類似体の同様の変異を含むものとして理解されるべきである。
別の面において、本発明は本発明の前記方法により構築された変異体に関する。
親脂質分解酵素が、菌株4109から得ることのできるH.ラヌギノサリパーゼ又は先に定義した如きその類似体であるとき、変異体が次の位置:S58,T64,S83,N94,K98,I100,A121,E129,D167P R205,K237,I252,P256又はG263の少なくとも１つの位置で変異を含んでなる。次のように理解されるであろう；すなわち置換の場合野生型アミノ酸残基以外の任意のアミノ酸残基が挿入され、例えばR,N,A,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V,Dから選ばれるアミノ酸残基である。
本発明が知る限り、これらの位置における特異的変異の従来の開示は存在しない。
加えて、本発明は、DSM 4109から得ることのできるH.ラヌギノサリパーゼの変異体又は該リパーゼの類似体に関し、ここにおいてアミノ酸残基L264はロイシンとは異なるアミノ酸、すなわちR,N,A,C,Q,E,G,H,I,K,M,F,P,S,T,W,Y,V,Dのいずれか１つにより置換された。
好ましくは、本発明に係る変異体は、次の突然変異K46R,E57G,G61S,S83T,S58F,D62C,T64R,I90F,G91A,N92H,N94I,N94K,L97M,K98I,I100V,D102K,A121V,E129K,D167G,R205K,E210W,K237M,N259W,I252L,D254W,P256T,G263A,L264Q又はT267Wの少なくとも１つを含んでなる。
これらの位置は、酵素活性および／又は洗剤耐性が見出されたか又はそれらに対し重要であることが企図される。アミノ酸残基のナンバリングは、成熟リパーゼのアミノ酸配列を言及する。
好ましくは、本発明のこの面に係る変異体は、次の突然変異S83T,N94K,A121V,D167G,R205Kの少なくとも１つを含んでなる。
次のように理解されるであろう；すなわち、本発明は、本明細書中で定義される突然変異の１又はそれ以上の組合わせ、又は本明細書で定義される１又はそれ以上の突然変異とWO 92/05249,WO 94/25577およびWO 94/01541で開示される任意の突然変異の組合わせを含んでなる親H.ラヌギノサリパーゼの変異体を包含する。
更に別の面において、本発明は次の突然変異：

N94K＋D96A
S83T＋N94K＋D96N
E87K＋D96V
E87K＋G91A＋D96A
N94K＋F95L＋D96H
A121V＋R205K＋E210Q
F95C＋D96N
G91S＋L93V＋F95C
E87K＋G91A＋D96R＋I100V
E87K＋G91A
S83T＋E87K＋Q249R
S83T＋E87K＋W89G＋G91A＋N94K＋D96V
N73D＋S85T＋E87K＋G91A＋N94K＋D94A
E87K＋G91A＋L93I＋N94K＋D96A
D167G＋E210V
N73D＋E87K＋G91A＋N94I＋D96G
S83T＋E87K＋G91A＋N92H＋N94K＋D96M
E210W
E56T＋D57L＋I90F＋D96L＋E99K
E56R＋D57L＋V60M＋D62N＋S83T＋D96P＋D102E
D57G＋N94K＋K96L＋L97M
E87K＋G91A＋D96R＋I100V＋E129K＋K237M＋I252L＋P256T＋G263A＋L264Q
E56R＋D57G＋S58F＋D62C＋T64R＋E87G＋G91A＋F95L＋D96P＋K98I＋K237M
K46R＋E56R＋G61S
D102K
D167G
N73D＋E87K＋G91A＋N94I＋D96G
E210V
E210W
N251W＋D254W＋T267W
S83T＋E87K＋G91A＋N92H＋N94K＋D96M
E56R＋I90F＋D96L＋E99K
D57G＋N94K＋D96L＋L97M

の少なくとも１つを含んでなる、DSM 4109から得ることのできるH.ラヌギノサリパーゼの変異体又はその類似体に関する。

これらの変異体は、カルシウムに対し減少せしめられた抵抗性および／又は洗剤成分例えば非イオン界面活性剤アルコールエトキシレートに対する改善された耐性を示すことが見出されておりそして従って、洗剤又は皿洗いの目的に対し特に有用であると考えられる。

変異体は本発明方法によって構築されそして引き続き導入された突然変異に関し特性化そして更に以下の実施例で記載される。以下の内容は明らかであろう；すなわちこれらの変異体を構築する択一的方法は、適当なオリゴヌクレオチドプローブを用い部位特異的変異誘発に基礎をおいている。この方法は例３－６で説明される。

本発明の変異体の発現

本発明によれば、前記方法又は当業者に公知の択一的方法により製造された変異体酵素をコードする変異誘発DNA配列は、典型的にはプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、伝達開始シグナル、および所望によりレプレッサー遺伝子又は種々の活性化遺伝子を含有する発現ベクターを用い、酵素形で発現され得る。

本発明の変異体をコードするDNA配列を有する組換え体発現ベクターは、組換え体DNA手順に好都合に委ねられる全てのベクターであってよく、そしてベクターの選択はそれが導入されるべき宿主細胞にしばしば依存するであろう。従って、ベクターは自律的複製ベクタ

ー、すなわち染色体外実在として存在するベクター、例えばプラスミド、バクテリオファージ又は染色体外要素、ミニクロモソーム又は人工クロモソームである。択一的に、宿主細胞に導入されるとき、ベクターは宿主細胞ゲノムに組込まれそしてそれが組込まれた染色体と共に複製されるものであってよい。

ベクターにおいて、DNA配列は適当なプロモーター配列に操作可能に接続されるべきである。プロモーターは選択の宿主細胞中で転写活性を示す任意のDNA配列であってよくそして宿主細胞に相同又は不均一のタンパク質をコードする遺伝子から由来できる。特に細菌宿主の転写を命じるための適当なプロモーターの例は、E.コリーのlacオペロンのプロモーター、ストレプトマイセス　コエリカラーアガロース遺伝子dagAプロモーター、バシラス　リケニホルミスα－アミラーゼ遺伝子（dymL）のプロモーター、例えばWO 93/10249に記載の如きもの、バシラス　ステアロサーモフィラスマルトース産生アミロース遺伝子（amyM）のプロモーター、バシラス　アミロリクェファシエンスα－アミラーゼ（amyQ）のプロモーター、バシラス　ズブチリスxylAおよびxylB遺伝子等のプロモーターである。

菌類宿主中での転写に対し、有用なプロモーターの例は、A.オリゼTAKAアミラーゼ、リゾムコール　マイヘイアスパラギン酸プロテアーゼ、A.ニガー中性α－アミラーゼ、A.ニガー酸安定性α－アミラーゼ、A.ニガーグルコアミラーゼ、リゾムコール　マイヘイリパーゼ、A.オリゼアルカリプロテアーゼ、A.オリゼトリオースホスフェートイソメラーゼ又はA.ニドランスアセタミダーゼをコードする遺伝子から由来するものである。

本発明の発現ベクターはまた、適当な転写ターミネーターそして、真正生物中において、本発明の変異体をコードするDNA配列に操作可能に接続されたポリアデニル化配列を含むことができる。停止およびポリアデニル化配列は、プロモーターと同じ起源から適当に由来できる。

ベクターは更に、対象の宿主細胞中でベクターを複製せしめるDNA配列を含んでなる。そのような配列の例は、プラスミドpUC19,pACYC177,pUB110,pE194,pAMB1およびpIJ702の複製の起源である。

ベクターはまた選択可能なマーカー、例えば遺伝子その生成物は宿主細胞内の欠損を補足する、又は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の如き抗生物質耐性を与えるものを含んでなる。更に、ベクターはアスペルギルス選択マーカー例えばamdS,argB,nidDおよびsC、ハイグロマイシン耐性を生じさせるマーカーを含んでなるか、又は選択は例えばWO 91/17243に記載の如き共形質転換により達成できる。

例えば宿主細胞として或る細菌を用いるとき、細胞内発現は幾つかの点で有利であるけれども、発現が細胞外細胞であることは一般に好ましい。親脂質分解酵素は、それ自身内に発現された酵素を培地に分泌させる予備領域を含むことができる。もし望ましい場合、この予備領域は異なる予備領域又はシグナル配列により置換でき、それぞれの予備領域をコードするDNA配列の置換によって好都合に達成される。

適当な細菌の例は、グラム陽性細菌例えばバシラス　サブチリス、バシラス　リケルホルミス、バシラス　レンタス、バシラス　ブレビス、バシラス　ステアロサーモフィラス、バシラス　アルカロフィラス、バシラス　アミロリクェファシエンス、バシラス　コアグュランス、バシラス　サーキュランス、バシラス　ラウタス、バシラス　メガテリウム、バシラス　チューリンジエンシス又はストレプトマイセス　リビダンス又はストレプトマイセス　ムリナス、又はグラム陰性菌例えばE.コリーである。細菌の形質転換は、例えばプロトプラスト形質転換により又は自体公知の方法でコンピテント細胞を用いて行うことができる。

酵母生物体は、サッカロマイセス又はシゾサッカロマイセス種、例えばサッカロマイセス　セレビシエから好ましく選択できる。繊維状菌類は、好都合にはアスペルギルス種、例えばアスペルギルス　オリゼ、アスペルギルス　ニガー又はアスペルギルス　ニドランスに属する。菌類細胞は、プロトプラスト形成およびプロトプラストの形質転換次いで自体公知の方法で細胞の再生を含むプロセスによって形質転換され得る。アスペルギルス宿主細胞の形質転換のための適当な手順は、EP 238 023に記載されている。

更に別の面において、本発明は本発明の親脂質分解酵素の変異体の製造方法に関し、この方法は変異体の生産を助成する条件下、前記の如く宿主細胞を培養し次いで細胞および／又は培地より変異体を回収することを含んでなる。
細胞を培養するために用いられる培地は、対象の宿主細胞を増殖させそして本発明の親脂質分解酵素の発現を得るために好適なあらゆる通常の培地であってよい。適当な培地は、商業上の提供者から入手できるか又は公布された製法（例えばアメリカンタイプカルチュアコレクションのカタログにおいて）に従って製造できる。
宿主細胞から分泌される本発明の変異体は、遠心分離又は濾過により細胞を培地から分離し、そして塩例えば硫酸アンモニウムを用い培地のタンパク質成分を沈殿させ、次いでイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の如きクロマトグラフィー法を含む周知の手順により培地から回収される。
皿洗いおよび洗浄用の洗剤用添加剤および組成物
本発明の洗剤又は洗剤成分に対するカルシウムへ減少せしめられた依存性および／又は改善された耐性のため、変異体は洗剤組成物、例えばpH7－13の範囲内、特にpH8－11の範囲内で実行を企図される洗剤組成物への遂行に対し特に良好に適合している。
洗剤組成物
本発明によれば、本発明のリパーゼ変異体は、典型的には洗剤組成物の成分である。そのまゝで、それは無粉塵性粒質物、安定化液体又は保護された酵素の形で洗剤組成物中に含有され得る。無粉塵性粒質物は、例えば米国特許4,106,991および4,661,452（双方ともノボインダストリーに付与）に記載されるように製造できそして所望により自体公知の方法で被覆できる。ワックスコーティング材料の例は、平均分子量1000～20000を有するポリ（エチレンオキシド）製品（ポリエチレングリコール、PEG）;16～50酸化エチレン単位を有するエトキシル化ノニルフェノール；アルコールが12～20個の炭素原子を有しそして15～80個の酸化エチレン単位が存在するエトキシル化脂肪アルコール；脂肪アルコール；脂肪酸；および脂肪酸のモノ－およびジ－およびトリグリセリドである。流動床法により適用に適したフィルム形成コーティング物質の例は、英国特許1483591に示される。液体酵素調製品は、例えば、確立された方法に従いポリオール例えばプロピレングリコール、糖又は糖アルコール、乳酸又はホウ酸を添加することにより安定化される。他の酵素安定剤は当業者に周知である。保護された酵素はEP 238,216に開示された方法に従って製造できる。
本発明の洗剤組成物は、あらゆる好都合の形態、例えば粉末、顆粒、ペースト又は液体として存在し得る。液体洗剤は、典型的に70％までの水および０－30％の有機溶剤を含有する水性であるか又は非水性であってよい。
洗剤組成物は１種又はそれ以上の界面活性剤を含んでなり、その各々はアニオン、非イオン、カチオン、又は両性イオンであってよい。洗剤は通常０－50％のアニオン界面活性剤例えば直鎖アルキルベンゼンスルホナート（LAS）、α－オレフィンスルホナート（AOS）、アルキルスルファート（脂肪アルコールスルファート）、第二アルカンスルホナート（SAS）、α－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、又は石けんを含有するであろう。洗剤は０－40％の非イオン界面活性剤、例えばアルコールエトキシラート（AEO又はAE）、カルボキシル化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ンオキシド、エトキシル化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、又はポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド（例えばWO 92/06154に記載の如く）をまた含有してもよい。
洗剤組成物は、追加的に１種以上の他の酵素、例えばアミラーゼ、プルラナーゼ、クチナーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ、オキシダーゼ、（例えばラッカーゼ）および／又は他のリパーゼを含んでもよい。
洗剤は、１－65％の洗剤ビルダー又は錯化剤例えばゼオライト、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスホナート、シトラート、ニトリロトリ酢酸（NTA）、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTMPA）、アルキル－又はアルケニルコハク酸、可溶性シリケート又は層状シリケート（例えば、ヘキスト社からのSKS－６

）を含有してもよい。洗剤はビルダー配合でなくてもよく、すなわち本質的に洗剤ビルダーを有しない。
洗剤は、１以上のポリマーを含んでもよい、その例は、カルボキシメチルセルロース（CMC）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリカルボキシレート例えばポリアクリレート、マレイン酸、／アクリル酸コポリマーおよびラウリルメタクリレート／アクリル酸コポリマーである。
洗剤は、H_2O_2源例えばパーボレート又はパーカーボネートを含んでもよい漂白系を含有できこれは過酸形成漂白活性化剤例えばテトラアセチルエチレンジアミン（TAED）又はノナノイルオキシベンゼンスルホナート（NOBS）と組合せることができる。択一的に、漂白系は例えばアミド、イミド又はスルホナートタイプのペルオキシ酸を含んでもよい。
本発明の洗剤組成物の酵素は、通常の安定剤、例えばポリオール例えばプロピレングリコール又はグリセロール、糖又は糖アルコール、乳酸、ホウ酸、又はホウ酸誘導体例えば芳香族ボラートエステルを用いて安定化でき、そして組成物は例えばWO 92/19709およびWO 92/19708に記載の如く製剤化され得る。
洗剤は、他の通常の洗剤成分例えば粘土を含む布帛柔軟剤、起泡増進剤、土壌抑制剤、耐蝕材、土壌－沈殿防止剤、染料、抗土壌－再付着剤、殺菌剤、蛍光増白剤又は香料を含有できる。
（使用濃度で水性溶液中で測定された）pHは中性又はアルカリ性、例えば７～11の範囲内に存するであろう。
本発明の範囲内の洗剤組成物の特定の形態には以下のものが含まれる：
（１）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	7－12%
アルコールエトキシスルファート（例えばC_{12-18}アルコール、1-2 EO）又はアルキルスファート（例えばC_{16-18}）	1－4%
アルコールエトキシラート（例えばC_{14-15}アルコール、7 EO）	5－9%
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	14－20%
可溶性シリケート(Na_2O, $2SiO_2$として）	2－6%
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	15－22%
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	0－6%
クエン酸ナトリウム／クエン酸（$C_6H_5Na_3O_7$／$C_6H_8O_7$として）	0－15%
ナトリウムパーボラート($NaBO_3 \cdot H_2O$ として）	11－18%
TAED	2－6%
カルボキシメチルセルロース	0－2%
ポリマー（例えばマレイン酸／アクリル酸コポリマー、PVP, PEG）	0－3%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば土壌抑制剤、香料、螢光増白剤、フォトブリーチ）	0－5%

（２）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	6－11%
アルコールエトキシスルファート（例えばC_{12-18}アルコール、1-2 EO）又はアルキルスファート（例えばC_{16-18}）	1－3%
アルコールエトキシラート（例えばC_{14-15}アルコール、7 EO）	5－9%
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	15－21%
可溶性シリケート(Na_2O, $2SiO_2$として）	1－4%
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	24－34%
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	4－10%
クエン酸ナトリウム／クエン酸（$C_6H_5Na_3O_7$／$C_6H_8O_7$として）	0－15%
カルボキシメチルセルロース	0－2%
ポリマー（例えばマレイン酸／アクリル酸コポリマー、PVP, PEG）	1－6%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば土壌抑制剤、香料）	0－5%

（３）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	5－9％
アルコールエトキシラート（例えばC_{12-15}アルコール、7 EO）	7－14％
脂肪酸としての石けん（例えばC_{16-22}脂肪酸）	1－3％
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	10－17％
可溶性シリケート(Na_2O, $2SiO_2$として）	3－9％
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	23－33％
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	0－4％
ナトリウムパーボラート($NaBO_3 \cdot H_2O$ として）	8－16％
TAED	2－8％
ホスホナート（例えばEDTMPA）	0－1％
カルボキシメチルセルロース	0－2％
ポリマー（例えばマレイン酸／アクリル酸コポリマー、PVP, PEG）	0－3％
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1％
少量成分（例えば土壌抑制剤、香料、螢光増白剤（	0－5％

（４）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	8－12％
アルコールエトキシラート（例えばC_{12-15}アルコール、7 EO）	10－25％
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	14－22％
可溶性シリケート(Na_2O, $2SiO_2$として）	1－5％
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	25－35％
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	0－10％
カルボキシメチルセルロース	0－2％
ポリマー（例えばマレイン酸／アクリル酸コポリマー、PVP, PEG）	1－3％
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1％
少量成分（例えば土壌抑制剤、香料）	0－5％

（５）以下の成分を含んでなる水性液体洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	15－21％
アルコールエトキシラート（例えばC_{12-15}アルコール、7 EO又はC_{12-15}アルコール、5 EO）	12－18％
脂肪酸としての石けん（例えばオレイン酸）	3 －13％
アルケニルコハク酸（C_{12-14}）	0 －13％
アミノエタノール	8 －18％
クエン酸	2 － 8 ％
ホスホナート	0 － 3 ％
ポリマー（例えばPVP，PEG）	0 － 3 ％
ボラート（B_4O_7として）	0 － 2 ％
エタノール	0 － 3 ％
プロピレングリコール	8 －14％
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1％
少量成分（例えば分散剤、土壌抑制剤、香料、蛍光増白剤）	0 － 5 ％

（６）以下の成分を含んでなる水性に構築された液体洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	15－21%
アルコールエトキシラート（例えばC_{12-15}アルコール、7 EO、又はC_{12-15}アルコール、5 EO）	3 － 9 %
脂肪酸としての石けん（例えばオレイン酸）	3 －10%
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	14－22%
クエン酸カリウム	9 －18%
ボラート（B_4O_7として）	0 － 2 %
カルボキシメチルセルロース	0 － 2 %
ポリマー（例えばPEG，PVP）	0 － 3 %
定着ポリマー例えば、ラウリルメタアクリレート／アクリル酸コポリマー；モノマー比25：1；MW 3800	0 － 3 %
グリセロール	0 － 5 %
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば分散剤、土壌抑制剤、香料、螢光増白剤）	0 － 5 %

（７）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物

脂肪アルコールスルファート	5 －10%
エトキシル化脂肪酸モノエタノールアミド	3 － 9 %
脂肪酸としての石けん	0 － 3 %
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	5 －10%
可溶性シリケート(Na_2O，$2SiO_2$として）	1 － 4 %
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	20－40%
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	2 － 8 %
ナトリウムパーボラート($NaBO_3 \cdot H_2O$ として)	12－18%
TAED	2 － 7 %
ポリマー（例えばマレイン酸／アクリル酸コポリマー、PEG）	1 － 5 %
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば螢光増白剤、土壌抑制剤、香料）	0 － 5 %

（８）以下の成分を含んでなる粒質物として配合される洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	8－14%
エトキシル化脂肪酸モノエタノールアミド	5－11%
脂肪酸としての石けん	0－3%
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	4－10%
可溶性シリケート(Na_2O, $2SiO_2$として）	1－4%
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	30－50%
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	3－11%
クエン酸ナトリウム($C_6H_5Na_3O_7$として）	5－12%
ポリマー（例えばPVP、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、PEG）	1－5%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば土壌抑制剤、香料）	0－5%

（９）以下の成分を含んでなる粒質物として配合される洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	6－12%
非イオン界面活性剤	1－4%
脂肪酸としての石けん	2－6%
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	14－22%
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	18－32%
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	5－20%
クエン酸ナトリウム($C_6H_5Na_3O_7$として）	3－8%
ナトリウムパーボラート($NaBO_3 \cdot H_2O$ として）	4－9%
漂白活性化剤（例えばNOBS又はTAED）	1－5%
カルボキシメチルセルロース	0－2%
ポリマー（例えばポリカルボキシレート又はPEG）	1－5%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば螢光増白剤、香料）	0－5%

（10）以下の成分を含んでなる水性液体洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	15－23%
アルコールエトキシスルファート（例えばC_{12-15}アルコール、2-3 EO）	8－15%
アルコールエトキシラート（例えばC_{12-15}アルコール、7 EO、又はC_{12-15}アルコール、5 EO）	3－9%
脂肪酸としての石けん（例えばラウリン酸）	0－3%
アミノエタノール	1－5%
クエン酸ナトリウム	5－10%
ヒドロトロープ（例えばナトリウムトルエンスルホナート）	2－6%
ボラート（B_4O_7として）	0－2%
カルボキシメチルセルロース	0－1%
エタノール	1－3%
プロピレングリコール	2－5%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えばポリマー、分散剤、香料、蛍光増白剤）	0－5%

（11）以下の成分を含んでなる水性液体洗剤組成物

直鎖アルキルベンゼンスルホナート（酸として計算）	20－32%
アルコールエトキシラート（例えばC_{12-15}アルコール、7 EO、又はC_{12-15}アルコール、5 EO）	6－12%
アミノエタノール	2－6%
クエン酸	8－14%
ボラート（B_4O_7として）	1－3%
ポリマー（例えばマレイン酸／アクリル酸コポリマー、定着ポリマー、例えば、ラウリルメタクリレート／アクリル酸コポリマー）	0－3%
グリセロール	3－8%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えばヒドロトロープ、分散剤、香料、蛍光増白剤）	0－5%

（12）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合され

る洗剤組成物

アニオン界面活性剤（直鎖アルキルベンゼンスルホナート、アルキルスルファート、α－オレフィンスルホナート、α－スルホ脂肪酸メチルエステル、アルカンスルホナート、石けん）	25－40％
非イオン界面活性剤（例えばアルコールエトキシラート）	1－10％
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	8－25％
可溶性シリケート（Na_2O, $2SiO_2$として）	5－15％
硫酸ナトリウム（Na_2SO_4として）	0－5％
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	15－28％
ナトリウムパーボラート（$NaBO_3 \cdot 4H_2O$）として）	0－20％
漂白活性化剤（TAED又はNOBS）	0－5％
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1％
少量成分（例えば香料、螢光増白剤）	0－3％

（13）1）～12）で記載した如き洗剤配合物であって、ここにおいて直鎖アルキルベンゼンスルホナートの全部又は一部は（C_{12}－C_{18}）アルキルスルファートにより置換されている。

（14）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物

（C_{12-18}）アルキルスルファート	9－15%
アルコールエトキシラート	3－6%
ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド	1－5%
ゼオライト（$NaAlSiO_4$として）	10－20%
層状ジシリケート（例えばヘキスト社からのSK56）	10－20%
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	3－12%
可溶性シリケート(Na_2O, $2SiO_2$として）	0－6%
クエン酸ナトリウム	4－8%
ナトリウムパーカーボネート	13－22%
TAED	3－8%
ポリマー（例えばポリカルボキシラートおよびPVP）	0－5%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば螢光増白剤、フォトブリーチ、香料、土壌抑制剤）	0－5%

（15）以下の成分を含んでなる少なくとも600g/lの嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物

（C_{12-18}）アルキルスルファート	4－8%
アルコールエトキシラート	11－15%
石けん	1－4%
ゼオライト MAP又はゼオライトA	35－45%
炭酸ナトリウム（Na_2CO_3として）	2－8%
可溶性シリケート(Na_2O, $2SiO_2$として）	0－4%
ナトリウムパーカーボネート	13－22%
TAED	1－8%
カルボキシメチルセルロース	0－3%
ポリマー（例えばポリカルボキシラートおよびPVP）	0－3%
酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）	0.0001－0.1%
少量成分（例えば螢光増白剤、ホスホナート、香料）	0－3%

（16）追加の成分として又はすでに言及した漂白系に対する代替物として安定化又は封入された過酸を含有する１）～15）で記載される如き洗剤組成物。
（17）パーボラートがパーカーボネートで置き代えられている１）,3）,7）,9）および12）で記載される如き洗剤組成物。
（18）１）,3）,7）,9）,12）,14）および15）で記載される洗剤組成物であって、これは追加的にマンガン触媒を含有する。マンガン触媒は、例えば“Efficient manganese catalysts for low－temperature bleaching",Nature $_{369}$,1994,pp.637－639で記載される化合物の一つであってよい。
（19）液体非イオン界面活性剤、例えば直鎖アルコキシル化第一アルコール、ビルダー系（例えばホスファート）、酵素およびアルカリを含んでなる非水性洗剤液体として配合される洗剤組成物。洗剤はまたアニオン界面活性剤および／又は漂白系を含んでいてもよい。
本発明のリパーゼ変異体は、洗剤中で通常用いられる濃度で配合される。今は次のように考えられている；すなわち本発明の洗剤組成物において、本発明のリパーゼ変異体は洗剤１l当たりリパーゼ変異体の0.00001－1mg（純粋な酵素タンパク質として計算）に相当する量で添加できる。
皿洗い組成物
皿洗い洗剤組成物は、界面活性剤を含んでなりこの界面活性剤はアニオン、非イオン、カチオン、両性又はこれらのタイプの混合物であってよい。洗剤は０－90%の非イオン界面活性剤例えば低発泡ないし非発泡エトキシル化プロポキシル化直鎖アルコールを含有するであろう。
洗剤組成物は、無機および／又は有機タイプの洗剤ビルダー塩を含有できる。洗剤ビルダーはリン含有タイプと非リン含有タイプに細分されうる。洗剤組成物は通常１－90%の洗剤ビルダーを含有する。
存在する場合、リン含有無機アルカリ洗剤ビルダーの例には、水溶性塩、特にアルカリ金属ピロホスフェート、オルトホスフェート、ポリホスフェートおよびホスホナートが含まれる。存在する場合、非リン含有無機ビルダーの例には、水溶性アルカリ金属カーボナート、ボラートおよびシリケート並びに種々のタイプの水不溶性結晶質又は非晶質アルミノシリケートが含まれこの内ゼオライトが最も知られた代表例である。
適当な有機ビルダーの例には、アルカリ金属、アンモニウムおよび置換アンモニウム、シトラート、スクシナート、マロナート、脂肪酸スルホナート、カルボキシメトキシスクシナート、アンモニウムポリアセテート、カルボキシレート、ポリカルボキシレート、アミノポリカルボキシレート、ポリアセチルカルボキシレートおよびポリヒドロキシスルホナートが含まれる。
他の適当な有機ビルダーには、ビルダー特性を有することが知られている高分子量ポリマーおよびコポリマー、例えば適当なポリアクリル酸、ポリマレイン酸／ポリアクリル酸コポリマーおよびそれらの塩が含まれる。
皿洗い洗剤組成物は、塩素／臭素タイプ又は酸素タイプの漂白剤を含有できる。無機塩素／臭素タイプの漂白剤の例は、リチウム、ナトリウム又はカルシウムハイポクロライトおよびハイポブロマイト並びに塩化トリナトリウムホスファートである。有機塩素／臭素タイプの漂白剤の例は、複素環式Ｎ－ブロモおよびＮ－クロロイミド例えばトリクロロイソシアヌール酸、トリブロモイソシアヌール酸、ジブロモイソシアヌール酸およびジクロロイソシアヌール酸、および水可溶化カチオン例えばカリウムおよびナトリウムとそれらの塩である。ヒダントイン化合物も適当である。
酵素漂白剤は、例えばペルソルト（persalt）の形で、好ましくは漂白剤前駆物質と共に又はペルオキシ酸化合物として好ましい。適当なペルオキシ漂白剤化合物の典型的例は、アルカリ金属パーボラート、両テトラヒドラートおよびモノヒドラート、アルカリ金属パーカーボナート、パーシリケートおよびパーホスファートである。好ましい活性化剤物質は、TAEDおよびグリセロールトリアセテートである。
本発明の皿洗い洗剤組成物は、酵素（１以上）に対する通常の安定剤、例えばポリオール

、例えばプロピレングリコール、糖又は糖アルコール、乳酸、ホウ酸、又はホウ酸誘導体例えば芳香族ボラートエステルを用いて安定化できる。
皿洗い洗剤組成物はまた、他の酵素、特にアミラーゼ、プロテアーゼおよび／又はセルラーゼを含むことができる。
本発明の皿洗い洗剤組成物は、また他の通常の洗剤成分、例えば解膠剤物質、充填剤物質、発泡抑制剤、防蝕剤、土壌懸濁化剤、金属イオン封鎖剤、抗土壌再付着剤、脱水剤、染料、殺菌剤、蛍光剤、シックナーおよび香料を含んでもよい。
最後に、本発明の変異体は通常の皿洗い洗剤例えば以下の特許公報のいずれかに記載の洗剤の一つにおいて用いることができる：
EP 551670,EP 533239,WO 9303129,EP 507404,US 5141664,GB 2247025,EP 414285,GB 2234980,EP 408278,GB 2228945,GB 2228944,EP 387063,EP 385521,EP 373851,EP 364260,EP 349314,EP 331370,EP 318279,EP 318204,GB 2204319,EP 266904,US 5213706,EP 530870,CA 2006687,EP 481547,EP 337760,WO 93/14183,US 5223179,WO 93－06202,WO 93/05132,WO 92/19707,WO 92/09680,WO 92/08777,WO 92/06161,WO 92/06157,WO 92/06156,WO 91/13959,EP 399752,US 4941988,US 4908148。
リパーゼ変異体は、例えばJ.Falbe編のSurfactant and Consumer Products,1987,pp 295－296;Tenside Surfactants Detergents,$_{30}$（1993）,6,pp 394－399;JAOCS,Vol.$_{61}$（1984）,2,pp 367－376;EP 517 762;EP 123 400;WO 92/19714;WO 93/19147;US 5,082,578;EP 494 769;EP 544 493;EP 543 562;US 5,235,082;EP 568 297;EP 570 237に記載される如き布帛柔軟剤中で用いられることができる。
本発明を添付の図面において更に説明する。
図１はpYESHLの制限地図であり、
図２はプラスミドpAO1の制限地図であり、
図３はプラスミドpAHLの制限地図であり、そして
図４および図５は本発明の変異体をコードする遺伝子の構築である。
本発明を更に次の実施例により説明するが、いかなる場合も本発明の範囲を制限するものでない。
物質および方法
ドイッチェ　ザンムルグ　フォン　マイクロオルガニスメン　ウント　ツェルカルツレン　GmbH,マスシローデルベーク 1b,D－330　ブラウンシュバイク，ドイツ共和国から入手可能なフミコラ　ラヌギノサ（Humicola lanuginosa）DSM 4109。
pYESHLは酵母/E.コリーシャトルベクターリパーゼでありこれは酵母中で発現しそして低レベルのH.ラヌギノサリパーゼを酵母中で分泌する。より特異的にはpYESHLは、（インビトロゲン社,UKから購入された）pYES2の誘導体でありここにおいてGAL1プロモーターは切除されてそしてフミコラ　ラヌギノサリパーゼ遺伝子およびS.セレビシエからのTPI（トリオースホスファートイソメラーゼ）（アルバー,T.およびカワサキ,G.,J.Mol.Appl.Gene t 1,419－434（1982）をSph IおよびXba I部位間にクローン化した。pYESHLの制限地図を図１に示す。
低カルシウムフィルターアッセイ
手　順
１）SC Uraレプリカプレート（発現ベクターを有する菌株の選択に有用）に、第一のタンパク質結合フィルター（ナイロン膜）および第二の低タンパク質結合フィルター（セルロースアセテート）を頂部に設ける。
２）二重フィルター上に親リパーゼ遺伝子又は突然変異リパーゼ遺伝子を含有する酵母を拡げそして30℃で２日又は３日間インキュベートする。
３）トップフィルターを新しいプレートに移動させることによりトップフィルター上にコロニーを保持する。
４）ペトリ皿を空にするためタンパク質結合フィルターを除去する。
５）青－緑スポットの形でリパーゼ活性を発現するコロニーを同定するため、オリーブ油エマルション（２％P.V.A.:オリーブ油＝3:1）、ブリリアントグリーン（指示薬、0.004

％）、100無トリス緩衝液pH9およびEGTA（最終濃度5mM）を含んでなるアガロース溶液をボトムフィルター上にそそぐ。
６）親リパーゼと比較してカルシウムの減少せしめられた依存性を有する工程５）で見出されたコロニーを同定する。
ドバノール（商標）25－７フィルターアッセイ：
洗剤成分に対し改善された耐性のためのスクリーニングは、５）で定義した溶液が更に0.02％ドバノール（商標）25－７を含む事実を除いて前記のそれに相当するフィルターアッセイの使用によって行なわれる。
ランダム突然変異化ライブラリーの構築
ａ）全リパーゼコード遺伝子の使用
プラスミドpYESHLを12Mギ酸を用い20分間室温で処理する。生成リパーゼコード遺伝子を変異原性の条件（0.5mM $MnCl_2$および1/5の正常量のATP、例えばLeung等、1989参照）を用いギ酸処理プラスミドから増殖する。
この処理は広範囲の突然変異を与えることが期待される；何故ならギ酸は主にトランスバーションを与えそしてPCRで作り上げた突然変異は主に転位を与える。
得られたPCR断片は、インビボでシャトルベクター内へ二重組換え（Muhlrad等、1992）又はシャトルベクター内への消化および結合およびE.コリーの形質転換によりクローン化される。
８個のランダムにひろい上げたクローンは配列決めされそしてトランスバーションおよび転位の双方で平均２－３個の突然変異を有することが見出された。
この方法により、７種のライブラリーが10,000～140,000クローンを含有するように作成された。
ｂ）局在ランダム変異誘発の実施
変異原性プライマー（オリゴヌクレオチド）を合成し、これは突然変異化されるべきアミノ酸コドン（１以上）に相当するヌクレオチド（１以上）を除いて突然変異化されるべきDNA配列の一部に相当する。
引き続き、得られた変異原性プライマーを適当な反対のプライマーとのPCR反応で用いる。得られたPCR断片を精製し次いで消化し次いでシャトルベクター内にクローン化する。
択一的にそしてもし必要なら、生成PCR断片を、消化させそしてシャトルベクター内に突然変異化領域のクローニングをなさしめるように、プライマーとして第二の適当な反対のプライマーとの第二のPCR反応で用いられる。PCR反応は通常の条件下で行なわれる。
DNA配列決定は、ABIダイ・ターミネーターサイクルシークエンシングキット中、プロトコルに従いアプライドバイオシステムABI DNA配列モデル373Aを用いて行った。
実施例
例　１
ランダムリパーゼ変異体の構築
全H.ラヌギノサリパーゼ遺伝子およびそのアミノ酸（aa）91－97および206－211のランダム突然変異化ライブラリーを、前記物質および方法で記載した如く作成した。
アミノ酸領域91－97および206－211を、局在変異誘発の第一ラウンドに対して選定した；何故ならこれらの領域は洗浄性能に対し重要であることが見出されたからである。領域91－97は、リパーゼのリッド（lid）領域の一部でありそして領域206－211はリパーゼの疎水性クレフト（creft）の一部を構成する。
１個のオリゴヌクレオチドは、93％の野生型ヌクレオチドと突然変異化が望まれたアミノ酸コドンで他の３個のヌクレオチドの各々の2.33％を含んでなる、これらの領域の各々に対し合成された。アミノ酸の変化がなくて可能な場合、コドンにおける第三のヌクレオチド（Wobble塩基）を50％G/50％Ｃで合成し１個又は２個のコドンを有するアミノ酸に対する変化に対しより大きな可能性を得た。領域91－97の変異原性のオリゴヌクレオチドの組成を表１に示す。
このオリゴヌクレオチドの使用により、約65－70％の計算された突然変異頻度を、親リパーゼに導入された１個のアミノ酸変化に対しライブラリーにおいて得た。導入された２個

又はそれ以上のアミノ酸変化に対する突然変異の頻度は35％未満である。この低い突然変異頻度が選ばれ陽性コロニーにおける観察されたアミノ酸変化が酵素を改善することにもたらされそして高い突然変異頻度のため丁度「中性の（neutral）」変化でないことを確保する。

変異原性プライマーを、適当な対向プライマーとのPCR反応で用いた。得られたPCR断片を精製しそして領域206－211の場合に消化されそしてシャトルベクター内にクローン化した。領域91－97の場合に、得られたPCR断片をプライマーとして第二の適当な対向プライマーとの第二のPCR反応で用いた。この工程は消化しそして突然変異化領域をシャトルベクター内にクローン化し得るために必要であった。

領域91－97および領域206－211のライブラリーを作成しこれは10,000～80,000クローン／ライブラリーを含有していた。大抵のコロニーは親リパーゼが陽性である場合の条件下で検査するとき陽性（90％以上）であり、すなわちリパーゼ活性を示す。陽性反応は、2.5mM Ca（5mM EGTAの代わりに）についてフィルターアッセイで測定した。

Dobanol（商標）25－７および前記の物質および方法で記載した低カルシウムアッセイを用い、異なるライブラリーから450,000コロニーをスクリーニングした。aa 91－97ライブラリーC lid－領域からの25個の低カルシウム陽性物および全遺伝子ライブラリーからの12個のDobanol（商標）25－７陽性物を単離した。aa 91－97の変異誘発から低カルシウム陽性物の14個を配列決定した。

突然変異化領域の外側の３つの他の突然変異（コドン83,103,145における）は、PCR誤取込みにより説明できるがしかし、S83Tの突然変異はPCR誤取込みに対し異常なトランスバーションである。

配列：

5′	5	C	G
T	5	C	3′
T	7	A	
A	8	G	ボトル 5：93% A; 2.33% C; 2.33% G and 2.33% T
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	ボトル 6：93% C; 2.33% A; 2.33% G and 2.33% T
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	ボトル 7：93% G; 2.33% A; 2.33% C and 2.33% T
5	6	G	
7	G	A	
8	A	A	
6	T	C	ボトル 8：93% T; 2.33% A; 2.33% C and 2.33% G
7			

表１：リポラーゼ（商標）のアミノ酸91－97の局在ランダム変異誘発に対し用いられるオリゴヌクレオチドの構築の説明。配列中に存在する番号は、ボトルを意味し、そのボトルの組成は配列の各側に現われる。

表 2

菌株番号	変異体タイプ						
59	I			G91A	N94K		D96A
60	II	S83T			N94K		D96N
61	II	S83T			N94K		D96N
62	III		E87K				D96V
63	IV		E87K	G91A			D96V
64	II	S83T			N94K		D96N
65	III		E87K				D96V
67	V				N94K	F95L	D96H
69	V				N94K	F95L	D96H
71	III		E87K				D96V
72	II	S83T			N94K		D96N

表２：菌株番号は、アスペルギルス発現ベクターPAHL内にクローン化される当初に選ばれたクローンを言及する。変異体タイプは、同じクローンを言及しておりこのクローンは恐らくランダム突然変異化ライブラリーの増幅中に生じたものであろう。変異体タイプⅠおよびⅡは、0.01% Dobanol（商標）25－７において活性であり、一方残りは野生型に似て不活性である。

表　3

菌株番号	変異体タイプ	DNA配列（配列の上のアミノ酸番号）										
		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
wt		GGC	TCT	CGT	TCC	ATA	GAG	AAC	TGG	ATC	GGG	AAT
59	I										C	
60	II		A								C	
61	II		A								C	
62	III						A				C	
63	IV						A				C	
64	II		A								C	
65	III						A				C	
67	V										C	
52/68	wt											
53	wt											
69	V										C	
71	III						A				C	
72	II		A								C	
73	VI											

菌株番号	変異体タイプ	93	94	95	96	97	98	99	100	-103	-145
wt		CTT	AAC	TTC	GAC	TTG	AAA	GAA	ATA	-ATT	-CAT
59	I	G	G		C						
60	II	G	G		A						
61	II	G	G		A						
62	III				T						
63	IV				C					C	C
64	II	G	G		A						
65	III	G			T						
67	V		A	C	A	C					
52/68	wt										
53	wt										
69	V		A	C	A	C					
71	III	G			T						
72	II	G	A		A						
73	VI				A		?				

表３：野生型配列は最上ラインに示される。wtとは異なるヌクレオチドのみが、変異体配列に示される。コドン91および93の塩基を、それぞれＣ／ＴおよびＴ／Ｇの１：１でドープした。別に、コドン91－97でのヌクレオチドを93％wtおよび2.33％の３種の他のヌクレオチドを用いてドープした。

例　2

例１で記載した方法と同様の方法で、次の変異体をランダム変異誘発により構築した。幾つかの変異体を選択するために用いられる実際のスクリーニング基準もまた示す。

D167G＋E210V

5mM EGTA,0.01% Dobanol（商標）25－7,0.006% LAS

E87K＋G91A＋L93I＋N94K＋D96A

5mM EGTA,0.02% Dobanol（商標）25－7

N73D＋S85T＋E87K＋G91A＋N94K＋D96A

S83T＋E87K＋W89G＋G91A＋N94K＋D96V

E87K＋G91A＋D96R＋I100V

S83T＋E87K＋Q249R
E87K＋G91A
例　３
アスペルギルス　オリゼ中でのフミコラ　ラヌギノサリパーゼの発現
フミコラ　ラヌギノサリパーゼのクローニングは、EP305216に記載されている。またEP305216はアスペルギルス　オリゼ中でのリパーゼの発現および特徴を記載している。用いた発現プラスミドはp960と命名される。
本出願で用いられる発現プラスミドは、リパーゼコード領域にすぐ３′のわずかな修飾を除いて、p960と同一である。修飾は次のように行なわれた:p960をNru IおよびBamH I制限酵素で消化した。これらの２つの部位間に、プラスミドpBR322からのBamH I/Nhe I断片（ここでNhe I断片はクレノーポリメラーゼでフィルインされた）をクローン化し、これによりプラスミドpA01（図２）を作成し、これは独得のBamH IおよびNhe I部位を含有する。p960からのこれらの独得の部位BamH I/Xba I断片をクローン化しpAHL（図３）を得た。
リパーゼ遺伝子の部位特異的インビトロ変異誘発
リパーゼ遺伝子に突然変異を導入するために用いられる方法は、ネルソン　アンド　ロング、Analytical Biochemistry,180,147－151（1989）に記載されている。この方法は、PCR反応においてプライマーの一つとして化学的に合成したDNA鎖を用いて導入された目的の突然変異を含有するPCR（ポリメラーゼ鎖反応）の３工程作成を含む。PCR作成断片から、変異を有するDNA断片は、制限酵素で分解できそして発現ベクターに再挿入できる。この方法は例５に完全に記載されている。図４および図５において、この方法は更に概説されている。
フミコラ　ラヌギノサリパーゼのN94K/D96A類似体を発現するプラスミドの構築
プラスミドpAHLの線状化
円形プラスミドpAHLを、次の50μｌの反応混合物:50mM NaCl,10mMのトリス－HCl,pH7.9,10mMの$MgCl_2$,1mMのジチオトレイトール、１μｇのプラスミドおよび２ユニットのSpH I中、制限酵素Sph Iを用い線状化する。消化を37℃で２時間行なう。反応混合物をフェノール（トリス－HClで平衡化、pH7.5）で抽出し次いで２容量の氷冷96％エタノールを添加して沈殿させる。遠心しそしてペレットを乾燥後、線状化したDNAを50μｌの水に溶解し次いで濃度をアガロースゲル上で推定した。
３工程PCR変異誘発
図３に示すように、３工程変異誘発は４種のプライマーの使用を含む：

変異誘発ﾌﾟﾗｲﾏｰ（＝Ａ）：　5′-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTC-CCGAT-3′

PCR ﾍﾙﾊﾟｰ１（＝Ｂ）：5′-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAA-ATCGGC-3′

PCR ﾍﾙﾊﾟｰ２（＝Ｃ）：5′-CCATGGCTTTCACGGTGTCT-3′

PCR ﾊﾝﾄﾞﾙ　（＝Ｄ）：5′-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3′

ヘルパー１およびヘルパー２は、コード領域の外側の配列と相補的であり、そして従って変異体配列の構築において変異誘発プライマーと組合わせて用いることができる。全ての３工程は以下の成分を含有する次の緩衝液中で行なわれる:10mMトリス－HCl,pH8.3,50mM KCl,1.5mM $MgCl_2$,0.001％ゼラチン、0.2mM dATP,0.2mM dCTP,0.2mM dGTP,0.2mM TTP,2.5ユニット Taqポリメラーゼ。
工程１において、100pmolプライマーA,100pmolプライマーＢおよび1fmol線状化プラスミドを、合計100μｌの反応混合物に加えそして95℃で２分、37℃で２分そして72℃で３分から成る15回のサイクルを行なう。
PCR生成物の濃度をアガロースゲルで推定する。次いで、工程２を行なう。0.6pmol工程１

生成物と1fmol線状化プラスミドは、100μｌの前記緩衝液中に含まれそして95℃で５分、37℃で２分そして72℃で10分から成る１サイクルを行なう。
工程２の反応混合物に、100pmolプライマーＣおよび100pmolプライマーＤを加え（各々１μｌ）そして95℃で２分、37℃で２分そして72℃で３分から成る20回のサイクルを行なう。この操作は、変異誘発手順において工程３を含んでいた。
突然変異制限断片の単離
工程３の生成物をアガロースゲルから単離し次いで20μｌのH_2O中に再溶解する。次いで、以下の組成を有する総容量50μｌ中で制限酵素BamH IおよびBstX Iを用いて消化する:100mM NaCl,50mMトリス－HCl,pH7.9,10mMの$MgCl_2$,1mM DTT,10ユニットのBamH Iおよび10ユニットのBstX I。37℃で２時間インキュベーションを行なう。733bp BamH I/BstX I断片をアガロースゲルから単離する。
発現ベクターpAHLへの連結反応
発現プラスミドpAHLを前記の条件下BamH IおよびBstX Iを用いて切断しそしてこの大きな断片をアガロースゲルから単離する。このベクターに、先に単離した突然変異断片を結合させそして結合混合物を用いE.コリーに形質転換する。断片の切断および配向は、制限酵素による形質転換体からのプラスミド調製品の切断により立証される。配列の分析は、ABI DNAシークエンサー上のDyeDeoxy（商標）ターミネーターサイクルシーケンシングキット（アプライド　バイオシステム）を用い二本鎖プラスミドについて行なう。プラスミドはpAHLG91A/N94K/D96Aと命名されそして置換されたコドンを除いて、pAHLと同一である。

例　４

フミコラ　リパーゼの他の変異体を発現するプラスミドの構築
例３て記載した方法と同様の方法を用い、次の変異体を構築する。修飾に対し用いたプラスミドの命称およびプライマーを以下に掲げる。

プラスミド命称	プライマーＡ配列
pAHLS83T/N94K/D96A	5′-ATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTCCCGA-TCCAGTTCTCTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
pAHLE87K/D96V	5-TATTTCTTTCAAAACGAAGTTAAGATTCCCGATCC-AGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
pAHLE87K/G91A/D96A	5′-TATTTCTTTCAAAGCGAAGTTAAGATTAGCGATC-CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
pAHLN94K/F95L/D96H	5'-TATTTCTTTCAAGTGCAACTTAAGATTCCCGAT-3'
pAHLF95C/D96N	5'-TATTTCTTTCAAGTTACAGTTAAGATTCCC-3'
pAHLG91S/L93V/F95C	5′-TATTTCTTTCAAGTCACAGTTAACATTAGAGATCC-AGTTCTC-3'

pAHLE87K/G91A/L93I/N94K/D96A
5′-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAATATTAGCGATC-
CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'

pAHLD167G 5'-ATATGAAAACACACCGATATCATACCC-3'

pAHLA121V 5'-CCTTAACGTATCAACTACAGACCTCCA-3'

pAHLR205K/E210Q 5'-GCTGTAACCGAATTGGCGCGGCGGGAGCTTAGGG-
ACAATATC-3'

pAHLN73D/S85T/E87K/G91A/N94K/D96A
5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTAGCGATC-
CAGTTCTTTATAGTACGAGAGCCACGGAA-
AGAGAGGACGATCAATTTGTCCGTGTTGTCGAG-3'

pAHLS83T/E87K/W89G/G91A/N94K/D96V
5'-TATTTCTTTCAAAACGAACTTAAGATTAGCGATA-
CCGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'

pAHLE87K/G91A/D96R/I100V
5'-GCAAATGTCATTAACTTCTTTCAATCTGAAGTTAA-
GATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'

pAHLS83T/E87K 5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-
AAAGA-3'

pAHLE87K/G91A 5'-GAAGTTAAGATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAA-
CGAGA-3'

pAHLS83T/E87K 5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-
AAAGA-3'

pAHLQ249R 5'-CGGAATGTTAGGTCTGTTATTGCCGCC-3'

例 5

フミコラ リパーゼの組合わせ類似体を発現するプラスミドの構築

プラスミド pAHLD167G/E210V
pAHLA121V/R205K/E210Q
および pAHLS83T/E87K/Q249R
は、適当なプライマーを用い２つの連続的変異誘発工程を行なうことによって構築される。

例 6

アスペルギルス中でのリパーゼ類似体の発現

アスペルギルス オリゼの形質転換（一般的手順）

100mlのYPD（シャーマン等、Methods in Yeast Genetics,Gold Spring Harbor Laboratory,1981）を、A.オリゼの胞子で接種し次いで約24時間振とうしてインキュベートした。菌糸をミラクロス（miracloth）を通して濾過することによって集めそして200mlの0.6Mの$MgSO_4$で洗う。菌糸を15mlの1.2M $MgSO_4$,10mM NaH_2PO_4（pH＝5.8）で洗う。懸濁液を氷上で冷却し次いで120mgのノザザイム（商標）、バッチ1687を含有する1mlの緩衝液を加える。５分後、1mlの12mg/ml BSA（シグマタイプH25）を加え次いで多数のプロトプラストが顕微鏡下観察されるサンプル中で見えるまで、37℃で1.5－2.5時間穏やかな撹拌を伴うインキュベーションを継続した。

懸濁液をミラクロスを通して濾過し、濾液を殺菌管へ移しそして5mlの0.6Mソルビトール、100mMトリス－HCl（pH＝7.0）で加層する。遠心を1000gで15分間行いそしてプロトプラ

ストを$MgSO_4$クッションの頂部から集める。２容量のSTC（1.2Mソルビトール、10mMトリス－HCl,pH＝7.5,10mM $CaCl_2$）を、プロトプラスト懸濁液に加え次いで混合物を1000gで５分間遠心する。プロトプラストプレットを3mlのSTC中再懸濁させそして再ペレット化させる。これをくりかえす。最後に、プロトプラストを0.2－1mlのSTC中に再懸濁させる。
100μｌのプロトプラスト懸濁液を、５－25μｇのp3SR2（Hynes等、Mol.and Cel.Biol.,Vol.3,No.8 1430－1439,8月,1983に記載されたプラスミドを有するA.ニドランスamdS遺伝子）と、10μｌのSTC中で混合する。混合物を室温で25分間放置する。0.2mlの60% PEG 4000（BDH29576）,10mMの$CaCl_2$および10mMのトリス－HCl（pH＝7.5）を加えそして注意深く混合し（２回）そして最後に0.85mlの同溶液を加えそして注意深く混合する。混合物を室温で25分間放置し、2,500gで15分間回転しそしてペレットを2mlの1.2Mソルビトール中に再懸濁させる。もう１回沈降後、プロトプラストを、1.0Mスクロース、pH＝7.0、窒素源としての10mMのアセトアミドおよび20mM Csccを含有する微小プレー上に散布しバックグラウンド（hackground）増増を阻止する。37℃で４～７日間インキュベーション後、胞子を拾い集め、殺菌水中に懸濁させそしてシングルコロニーのために拡げる。この手順をくりかえしそして第二の再単離後シングルコロニーの種を定義した形質転換体として保存する。
A.オリゼ中でのリパーゼ同族体の発現
前記プラスミドを、前記例で記載した如くA.ニドランスからのamdS遺伝子を含有するp3SR2を用いた同時形質転換によりA.オリゼIFO 4177内に形質転換する。
前記の如く調製したプロトプラストを、発現プラスミドとp3SR2の同等混合物をインキュベートし、各々ほぼ５μｇを用いる。唯一の窒素源としてアセトアミドを使用した形質転換体を２回再単離した。３日間YPD上で増殖後、培養物の上澄みをリパーゼ活性用分析を用いて分析する。良高の形質転換体を、更に研究のための選択しそして200mlのFG4培地（３％大豆ミル、３％マルトデキストリン、１％ペプトン、pHを4M NaOHで７に調節）上１ｌの振とうフラスコ内で30℃で４日間30℃で増殖する。
例　7
本発明のリパーゼ変異体の精製
リパーゼ活性に対する分析：
リパーゼに対する基質を、乳化剤としてアラビアゴムを用いグリシントリブチラート（メルク）を乳化させることによって製造した。
リパーゼ活性を、pHスタット法を用いpH7で分析した。リパーゼ活性（LU/mg）の１単位は、毎分１マイクロモルの脂肪酸を遊離するために必要な量として定義された。
工程1:発酵上澄みを遠心し、沈殿物をすてる。上澄みのpHを７に調節しそして同等の冷96％エタノールを徐々に加える。混合物を氷浴中で30分間放置する。遠心しそして沈殿物をすてる。
工程2:イオン交換クロマトグラフィー。上澄みを濾過しそして50mMトリス－アセテート緩衝液（pH＝７）で平衡化されたDEAE－高速流（Pharmacia（商標））カラムに適用する。280nmでの吸収が0.050D以下になるまでカラムを同緩衝液で洗う。５個のカラム容量を用い、同じ緩衝液の線状塩グレージエント（０～5MのNaCl）で結合した酵素活性を流出させる。酵素活性を含有する分画を集める。
工程3:疎水性クロマトグラフィー。酵素活性を有するプールのモル濃度を、固体酢酸アンモニウムを添加することにより0.8Mに調節する。酵素をTSKゲルブチル－トーヨーパール650Cカラム（トーソー社、日本から入手可能）上に適用するがこのカラムは0.8M酢酸アンモニウムで予備平衡化されていた。0.8M酢酸アンモニウムで未結合物質を洗いそして蒸留水で結合物質を溶出させる。
工程4:リパーゼ活性を有するプールを、水で希釈しコンダクタンス2msおよびpH7に調節する。50mMのトリス－アセテート緩衝液（pH＝７）で予備平衡化した高性能Ｑセファロース（ファルアミア）カラムにプールを適用する。結合した酵素を直線塩グレージエントで流出させる。
例　8

本発明のリパーゼ変異体の洗浄性能
本発明のフミコラ　ラヌギノサ（Humicola lanuginosa）リパーゼの洗浄能力を、野生型H.ラヌギノサリパーゼと比較してOD_{280}に従がい１ｌ当たりのタンパク質のmg単位の酵素用量を基礎にして評価した。
洗浄試験を、温度設定された水溶中に置かれた150mlのビーカー中で行なった。ビーカーを三角磁気棒で撹拌した。
実験条件は次の通りであった。
方法：各サイクル間に一夜乾燥を伴う３回サイクル
洗液：ビーカー当たり100ml
スワッチ：ビーカー当たり６個のスワッチ（3.5×3.5cm）
布帛:100％綿、試験布帛スタイル＃400
しみ：スーダンレッド（ラード1g当たり0.75mgの染料）で着色されたラード。70℃に加熱した６μｌのラードを各スワッチの中心に適用した。しみを適用後、スワッチを75℃で30分間濾中で加熱した。次いでスワッチを最初の洗浄の前に室温で一夜保存した。

洗剤:LAS（ナンサ1169/p,30％ a.m.）	1.17g/l
AEO（Dobanol（商標）25－７）	0.15g/l
ナトリウム　トリホスフェート	1.25g/l
ナトリウム　スルファート	1.00g/l
ナトリウム　カーボナート	0.45g/l
ナトリウム　シリケート	0.15g/l

pH:10.2
リパーゼ濃度:1l当たり0.075,0.188,0.375,0.75および2.5mgのリパーゼタンパク質
時間:20分
濃度:30℃
すすぎ：水道水で15分
乾燥：室温で一夜（～20℃,30～50％ RH）
評価:3回洗浄後、460nmでの反射率を測定した。
結　果
用量－応答曲線をリパーゼ変異体および天然H.ラヌギノサリパーゼと比較した。用量－応答曲線を、測定されたデータを次の等式に適合させることにより計算した：

$$\Delta R = \Delta R_{max} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \qquad (I)$$

ここで、ΔＲは反射率単位で表わされる効果であり、Ｃは酵素濃度（mg/ml）であり、ΔR_{max}は最大効果を表わす定数であり、Ｋは定数であり;K^2は最大効果の半分が得られる酵素濃度を表わす。
各リパーゼ変異体並びに野生型リパーゼに見出された特徴的定数ΔR_{max}およびＫに基づき、改善因子を計算した。次式II

$$f_{改善} = C_{WT}/C \qquad (II)$$

として定義された改善因子は、0.25mg/lの対照野生型タンパク質（C_{WT}）について得られた効果と同じ効果を得るのに必要とされるリパーゼタンパク質の量を表わす。
従って、改善因子を計算する手順は次の如くであった：
１）0.25mg/lでの野生型タンパク質の効果（$\Delta R_{wild\text{-}type}$）を等式（Ｉ）を用いて計算した；
２）0.25mg/lで野生型と同じ効果をもたらすリパーゼ変異体の濃度

$$C = \left(K_{(類似体)} \frac{\Delta R_{(野生型)}}{\Delta R_{max(類似体)} - \Delta R_{(野生型)}}\right)^2 \qquad (III)$$

３）等式（II）によって改善因子を計算した。結果を下記の表１に示す。

表 1

変異体	改善因子
E87K+D96V	1.2
S83T+N94K+D96N	2.3
N94K+D96A	2.7
E87K+G91A+D96A	2.6
N94K+F95L+D96H	3.3
D167G+E210V	5.0
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A	1.3
E87K+G91A+D96R+I100V	5.2
E87K+G91A	5.0
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G	1.3
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3.8
K46R+E56R+G61S	1.9
D102K	0.2
D167G	1
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G	1.3
E210R	2.7
E210K	5.5
E210W	1
N251W+D254W+T267W	0.8
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3.8
E56R+I90F+D96L+E99K	4.8
D57G+N94K+D96L+L97M	1.9

明細書中で引用した文献

Muhlrad et al., 1992, Yeast, Vol. 8, 79-82

Shimada, Y. et al. (1989). cDNA Molecular Cloning of Geotrichum candidum Lipase. J. Biochem., 106, 383-388.

Yamaguchi, S. et al. (1991). Cloning and structure of the mono- and diglycerol lipase-encoding gene from Penicillium camembertii U-150. Gene 103, 61-67.

Hass, M.J. et al. (1991). Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from Rhizopus delemar. Gene 109, 107-113.

Kugimiya, W. et al. (1992). Cloning and Sequences Analysis of DNA encoding Rhizopus niveus Lipase. Biosci. Boitech. Biochem. 56, 716-719.

Dartois, V. et al. (1993). Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260.

Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

R.K. Saiki et al., Science 239, pp. 487-491, 1988.

Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22, pp. 1859-1869, 1981.

Matthes et al., The EMBO J. 3, pp. 801-805, 1984.

J.O. Deshler, (1992) A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction. GATA 9(4): 103-106

Leung et al., Technique, Vol. 1, No: 1, pp. 11-15, 1989

Fowler et al., Molec. gen. Genet., 133, pp. 179-191, 1974.

Brady et al., "A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase", Nature 343, 1990, pp. 767-770, 1990.

Tilbeyrgh, H. van, Egloff, M.-P., Martinez,C., Rugani,N., Verger,R. and Cambillau (1993) Nature 362, p. 814-820. Interfacial activation of the lipase-prolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography.

Hudson et al., Practical Immunology, Third edition, Blackwell Scientific Publications, 1989

Alber, T. and Kawasaki, G., J.Mol.Appl. Genet 1, 419-434 (1982)

配　列　表

（１）一般情報

（ｉ）出願人：ノボ　ノルディスク　A/S,

（ii）発明の名称：脂質分解酵素の変異体の製造方法

（iii）配列の数:2

（iv）通信住所：

（Ａ）住所：ノボ　ノルディスク　A/S,

（Ｂ）街：ノボ　アレ

（Ｃ）市：バグスバエルト

（Ｅ）国：デンマーク

（Ｆ）SIP:DK/2880

（ｖ）コンピューター読みとり方式

（Ａ）媒体のタイプ：フロッピーディスク

（Ｂ）コンピューター:IBM PC　コンパチブル

（Ｃ）作動システム:PC－DOS/MS－DOS

（vi）代理人／代理店情報

（Ａ）氏名：ソレンセン，ライス　アビルドガード

（Ｂ）参照／ドケット番号:4153.204－WO

（ix）通信情報

（Ａ）電話：＋45　4444　8888

（Ｂ）テレファックス：＋45　4449　3256

（Ｃ）テレックス:37304

（２）配列番号:1に対する情報

（ｉ）配列の特徴

（Ａ）長さ:918個の塩基対

（Ｂ）タイプ：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類:cDNA

（vi）起源：

（Ａ）生物名：フミコラ　ラヌギノサ

（ix）配列の特徴

（Ａ）名称／キー:CDS

（B）位置:1..873

（C）名称／キー:mat－ペプチド

（D）位置:67..83

（xi）配列：配列番号:1:

```
ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG   48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
       -20                 -15                 -10

GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC   96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
    -5                  1                   5                  10

AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT  144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
                15                  20                  25

GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC  192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
            30                  35                  40

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT  240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
        45                  50                  55

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA…288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
    60                  65                  70

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC  336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
75                  80                  85                  90

GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC  384
Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
                95                  100                 105
```

```
TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT  432
Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
            110                 115                 120
ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT  480
Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
        125                 130                 135

CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT  528
Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
    140                 145                 150

GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA  576
Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155                 160                 165                 170

TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC  624
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
                175                 180                 185

GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT  672
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
            190                 195                 200

GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA  720
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
        205                 210                 215

GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT  768
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
    220                 225                 230

ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT  816
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
235                 240                 245                 250

AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG  864
Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
                255                 260                 265

ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT    918
Thr Cys Leu
```

（２）配列番号:2に対する情報

（ｉ）配列の特徴

（Ａ）長さ:291個のアミノ酸

（Ｂ）タイプ：アミノ酸

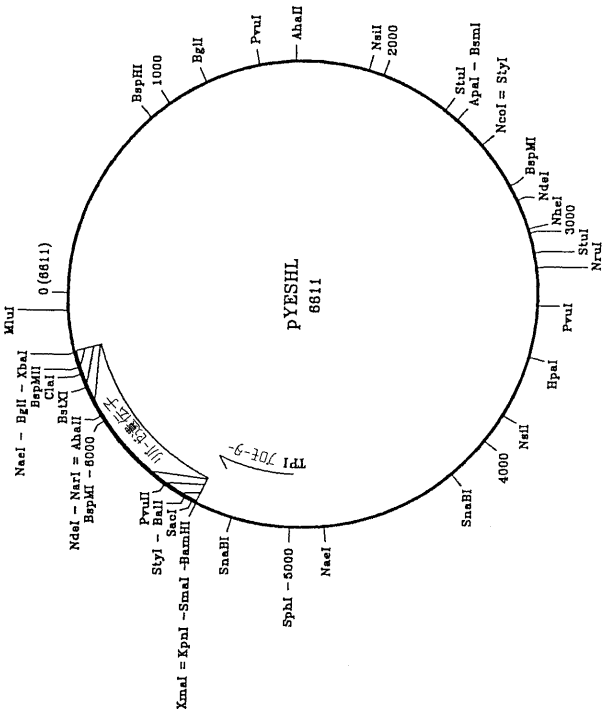
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：タンパク質

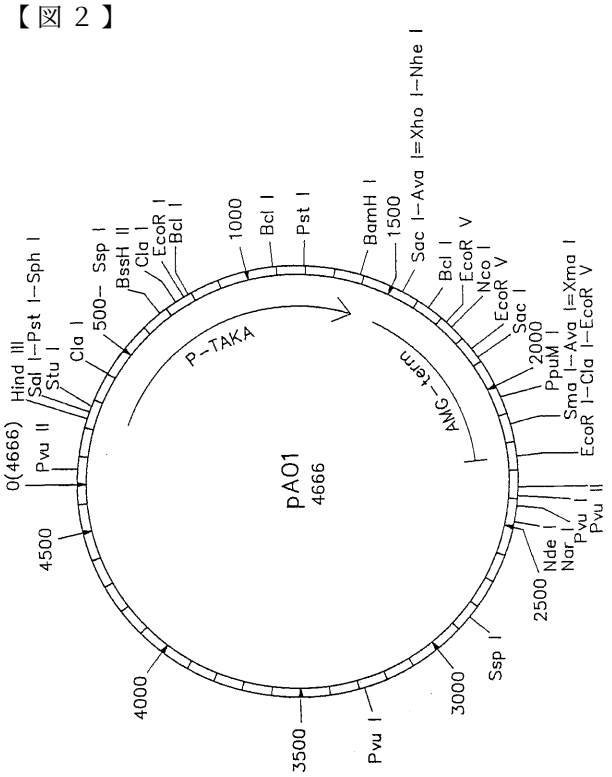
（xi）配列：配列番号:2:

```
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
      -20                 -15                 -10

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
   -5                  1                   5                  10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
               15                  20                  25

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
           30                  35                  40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
       45                  50                  55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
     60                  65                  70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
75                  80                  85                  90

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
               95                  100                 105

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
           110                 115                 120

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
       125                 130                 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
    140                 145                 150

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155                 160                 165                 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
               175                 180                 185

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
           190                 195                 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
       205                 210                 215

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
    220                 225                 230

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
235                 240                 245                 250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
               255                 260                 265

Thr Cys Leu
```

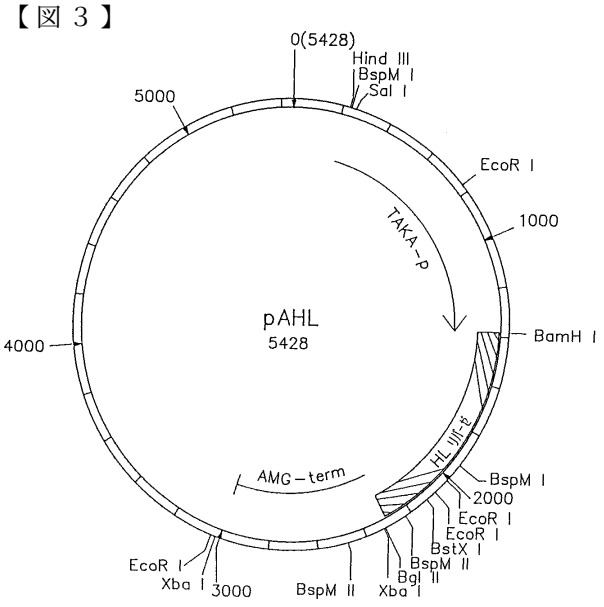
【図１】


pYESHL
6611
0(6611)
MluI
BspHI
1000
BglI
PvuI
AhaII
NsiI
2000
StuI
ApaI - BsmI
NcoI = StyI
BspMI
NdeI
NheI
3000
StuI
NruI
PvuI
HpaI
NsiI
4000
SnaBI
NaeI
SphI -5000
SnaBI
PvuII
StyI - BalI
SacI
XmaI = KpnI -SmaI -BamHI
NdeI - NarI = AhaII
BspMI -6000
NaeI - BglI - XbaI
BspMII
ClaI
BstXI
TPI 70E-9-

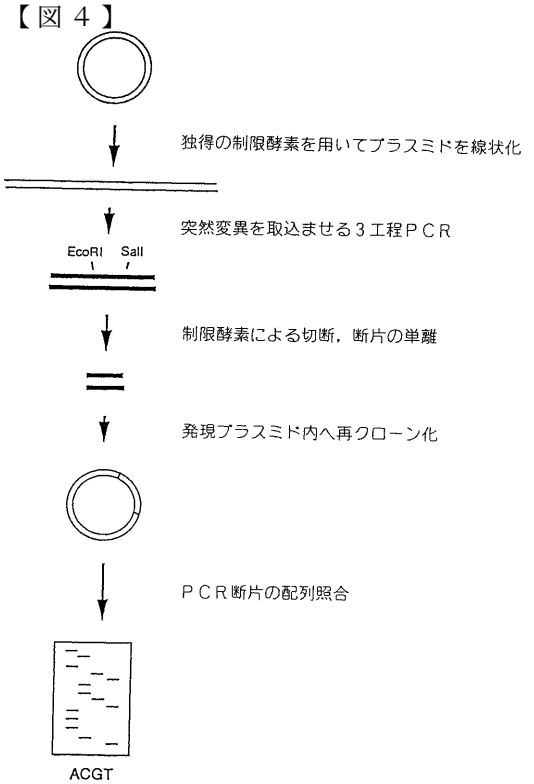
【図２】


pAO1
4666
P-TAKA
AMG-term
0(4666)
Pvu II
Hind III
Sal I-Pst I-Sph I
Stu I
Cla I
500- Ssp I
BssH II
Cla I
EcoR I
Bcl I
1000
Bcl I
Pst I
BamH I
1500
Sac I-Ava I=Xho I-Nhe I
Bcl I
EcoR V
Nco I
EcoR V
Sac I
2000
PpuM I
Sma I-Ava I=Xma I
EcoR I-Cla I-EcoR V
Pvu II
Pvu I
Nar I
Nde I
2500
Ssp I
3000
Pvu I
3500
4000
4500

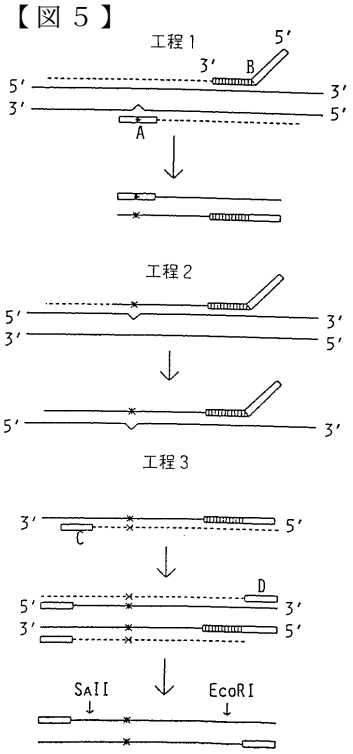
【図３】


pAHL
5428
0(5428)
Hind III
BspM I
Sal I
5000
EcoR I
1000
TAKA-p
BamH I
4000
HL リバーゼ
AMG-term
BspM I
2000
EcoR I
EcoR I
BstX I
BspM II
Bgl II
Xba I
BspM II
3000
EcoR I
Xba I

【図４】


独得の制限酵素を用いてプラスミドを線状化
突然変異を取込ませる３工程ＰＣＲ
EcoRI
SalI
制限酵素による切断，断片の単離
発現プラスミド内へ再クローン化
ＰＣＲ断片の配列照合
ACGT

【図５】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI	
Ｃ１２Ｎ	9/20	Ｃ１２Ｎ	9/20
//(Ｃ１２Ｎ	1/19	Ｃ１２Ｎ	1/19
Ｃ１２Ｒ	1:69)	Ｃ１２Ｒ	1:69
(Ｃ１２Ｎ	9/20	Ｃ１２Ｎ	9/20
Ｃ１２Ｒ	1:69)	Ｃ１２Ｒ	1:69

(74)代理人
弁理士 渡邉 陽一
(74)代理人
弁理士 大関 雅人
(74)代理人
弁理士 西山 雅也
(74)代理人
弁理士 樋口 外治
(72)発明者 スベンセン，アラン
デンマーク国，デーコー－２８８０，バグスバエルト，ノボ アレ（番地なし），ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ
(72)発明者 クラウセン，イーベー，グロス
デンマーク国，デーコー－２８８０，バグスバエルト，ノボ アレ（番地なし），ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ
(72)発明者 オケルス，イェン，シガーズ
デンマーク国，デーコー－２８８０，バグスバエルト，ノボ アレ（番地なし），ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ
(72)発明者 セラルセン，マリアンヌ
デンマーク国，デーコー－２８８０，バグスバエルト，ノボ アレ（番地なし），ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 欧州特許出願公開第２５８０６８（ＥＰ，Ａ２）
欧州特許出願公開第３０５２１６（ＥＰ，Ａ１）
特表平６－５０１１５３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12N 15/09 ZNA
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)