

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年4月7日(07.04.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/071451 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/56 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 9/28* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/036011
- (22) 国際出願日: 2021年9月29日(29.09.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-167797 2020年10月2日(02.10.2020) JP
特願 2021-135746 2021年8月23日(23.08.2021) JP
- (71) 出願人: 花王株式会社 (**KAO CORPORATION**)
[JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目14番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 日置 貴大 (**HIOKI, Takahiro**); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 釋 真緒 (**SHAKU, Mao**); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 川原 彰人 (**KAWAHARA, Akihito**); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (**THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE**); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

(54) Title: α -AMYLASE VARIANT

(54) 発明の名称: α -アミラーゼ変異体

(57) Abstract: Provided is an α -amylase which is capable of functioning at low temperatures and simultaneously maintains or improves stability and/or cleaning performance. A novel α -amylase variant which includes amino acid residue modifications at one or more of the positions which correspond to each of G5, S38, T49, Q96, N126, T129, G140, F153, Q167, G179, W186, E187, N192, M199, Y200, L203, Y205, D206, R211, K215, H240, S241, Y242, G244, E257, F259, K278, H283, S284, A288, H295, Y296, N303, T320, S331, L348, Y360, W408, L429, V430, G433, A434, W439, N471, G476 and G477 in the amino acid sequence represented by sequence number 2, wherein the sequence identity of the novel α -amylase or α -amylase variant is at least 90% that of the amino acid sequence represented by sequence number 4.

(57) 要約: 低温下で機能することが可能であり、同時に安定性及び又は洗浄性能が維持又は向上した α -アミラーゼを提供する。配列番号2で示されるアミノ酸配列のG5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置の1又は複数箇所のアミノ酸残基の改変を含む、親 α -アミラーゼの変異体であって、前記親 α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ変異体は配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、 α -アミラーゼ変異体。

WO 2022/071451 A1

TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： α -アミラーゼ変異体

技術分野

[0001] 本発明は、 α -アミラーゼの変異体に関する。

背景技術

[0002] α -アミラーゼは澱粉産業、醸造産業、繊維産業、医薬品産業及び食品産業等幅広い産業分野で利用されている他、洗浄剤への配合適性が知られており、デンプン質の汚れを除去する成分として自動食器洗浄機用の食器洗浄剤や衣料用洗剤等へ配合されている。

[0003] 洗浄剤用として有用な α -アミラーゼとしては、バチルス エスピー (Bacillus sp.) KSM-1378 (FERM BP-3048) 株由来の α -アミラーゼAP1378 (特許文献1)、バチルス リケニフォルミス由来の α -アミラーゼであるターマミルやデュラミル (登録商標) の他、バチルス エスピー (Bacillus sp.) DSM12649株由来の α -アミラーゼAA560 (特許文献2)、バチルス エスピー (Bacillus sp.) SP722株由来の α -アミラーゼSP722 (特許文献3の配列番号4)、サイトファーガ属由来の α -アミラーゼCspAmy2 (特許文献4) 等が知られている。また、これらの α -アミラーゼについては、特定の用途に向けて機能が改善するように改変され、例えば洗剤中における安定性が向上した変異体等が報告されている (特許文献5)。

[0004] 近年では、環境保護や洗浄コスト軽減の観点から、食器洗浄や洗濯洗浄、特にランドリーでの洗濯洗浄の際の温度を下げるのが重要とされ、また洗浄時間の短縮化も望まれている。しかしながら、アミラーゼを含む大部分の酵素の至適温度は、低温洗浄において通常設定される温度よりも高く、このため、多くのデンプン質の汚れは完全に除去することが困難となっている。

したがって、低温においても、洗浄性能やデンプン分解活性が保持され、汚れ除去効果が高い α -アミラーゼを見出すことが重要である。

- [0005] [特許文献1] 国際公開第94/26881号
[特許文献2] 国際公開第00/60060号
[特許文献3] 国際公開第06/002643号
[特許文献4] 国際公開第2014/164777号
[特許文献5] 国際公開第98/044126号

発明の概要

[0006] 本発明は、以下に係るものである。

1) 配列番号2で示されるアミノ酸配列のG5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置の1又は複数箇所のアミノ酸残基の改変を含む、親 α -アミラーゼの変異体であって、前記親 α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ変異体は配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、 α -アミラーゼ変異体。

2) 1)の変異体をコードするポリヌクレオチド。

3) 2)のポリヌクレオチドを含むベクター又はDNA断片。

4) 3)のベクター又はDNA断片を含有する形質転換細胞。

5) 1)の変異体を含む洗浄剤組成物。

図面の簡単な説明

[0007] [図1] 2アミノ酸欠失変異体の安定性評価。

発明の詳細な説明

[0008] 本発明は、低温下で機能することが可能であり、同時に安定性及び／又は洗浄性能が維持又は向上した α -アミラーゼを提供することに関する。

[0009] 本発明者らは、低温下で機能する α -アミラーゼを親として、当該親 α -

アミラーゼと比して向上した洗浄性能及び／又は安定性を有する α -アミラーゼ変異体を得ることに成功した。

[0010] 本発明によれば、親 α -アミラーゼと比して向上した洗浄性能及び／又は安定性を有する α -アミラーゼ変異体を提供することができる。斯かる α -アミラーゼ変異体を用いることにより、低温でも優れたデンプン汚れ除去効果を発揮する洗浄が可能となる。

[0011] 本明細書において、「アミラーゼ」(EC 3. 2. 1. 1; α -D-(1 \rightarrow 4)-グルカングルカノヒドロラーゼ)とは、デンプンならびに他の直鎖又は分岐1, 4-グリコシドオリゴ糖若しくは多糖類の加水分解を触媒する酵素群を意味する。 α -アミラーゼ活性は、デンプンの酵素的分解による還元末端の生成量を測定することによって決定することができる。また、これに限定されず、例えばPhadebasのような色素架橋デンプンの酵素的分解による色素の遊離を測定することによっても決定することができる (Soinen, K., M. Ceska, and H. Adlercreutz. "Comparison between a new chromogenic α -amylase test (Phadebas) and the Wohlgemuth amyloclastic method in urine." Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 30.3 (1972): 291-297.)。

[0012] 本明細書において、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列の同一性は、Lipman-Pearson法 (Science, 1985, 227: 1435-1441) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX Ver. 12のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を2として解析を行うことにより算出される。

[0013] 本明細書において、「アミノ酸残基」とは、タンパク質を構成する20種のアミノ酸残基、アラニン (Ala又はA)、アルギニン (Arg又はR)、アスパラギン (Asn又はN)、アスパラギン酸 (Asp又はD)、システイン (Cys又はC)、グルタミン (Gln又はQ)、グルタミン酸 (Glu又はE)、グリシン (Gly又はG)、ヒスチジン (His又はH)、

イソロイシン (I l e 又は I)、ロイシン (L e u 又は L)、リシン (L y s 又は K)、メチオニン (M e t 又は M)、フェニルアラニン (P h e 又は F)、プロリン (P r o 又は P)、セリン (S e r 又は S)、スレオニン (T h r 又は T)、トリプトファン (T r p 又は W)、チロシン (T y r 又は Y) 及びバリン (V a l 又は V) を意味する。

[0014] 本明細書において、アミノ酸の位置及び変異体の記載は、公認されている I U P A C の 1 文字のアミノ酸略記を用いて、以下のように表記される。

所定位置のアミノ酸は、[アミノ酸、位置]で表記される。例えば位置 2 2 6 のスレオニンは、「T 2 2 6」と示される。

アミノ酸の「置換」に関しては、[元のアミノ酸、位置、置換されたアミノ酸]で表記される。例えば位置 2 2 6 のスレオニンのアラニンへの置換は、「T 2 2 6 A」と示される。

アミノ酸の「欠失」に関しては、[元のアミノ酸、位置、Δ]で表記される。例えば、位置 1 8 1 でのセリンの欠失は「S 1 8 1 Δ」と示される。

アミノ酸の「挿入」に関しては、[元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入されたアミノ酸]で表記される。例えば位置 1 9 5 のグリシンの後へのリシンの挿入は、「G 1 9 5 G K」と示される。複数のアミノ酸の挿入は、[元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入されたアミノ酸 1 番、挿入されたアミノ酸 2 番；等]で表記される。例えば、位置 1 9 5 のグリシンの後へのリシン及びアラニンの挿入は、「G 1 9 5 G K A」と示される。

複数の改変を含む変異体は、加算記号（「+」）によって表記される。例えば、「R 1 7 0 Y + G 1 9 5 E」は、それぞれ、位置 1 7 0 のアルギニンのチロシンへの置換と位置 1 9 5 のグリシンのグルタミン酸への置換を表す。

1 つの位置で異なる改変を導入可能である場合、異なる改変はスラッシュ（「/」）によって分けられ、例えば、「R 1 7 0 Y / E」は、位置 1 7 0 のアルギニンのチロシン又はグルタミン酸への置換を表す。

[0015] 本明細書において、プロモーター等の制御領域と遺伝子の「作動可能な連

結」とは、遺伝子と制御領域とが、該遺伝子が該制御領域の制御の下で発現し得るように連結されていることをいう。遺伝子と制御領域との「作動可能な連結」の手順は当業者に周知である。

[0016] 本明細書において、遺伝子に関する「上流」及び「下流」とは、該遺伝子の転写方向の上流及び下流をいう。例えば、「プロモーターの下流に配置された遺伝子」とは、DNAセンス鎖においてプロモーターの3'側に該遺伝子が存在することを意味し、遺伝子の上流とは、DNAセンス鎖における該遺伝子の5'側の領域を意味する。

[0017] 本明細書において、細胞の機能や性状、形質に対して使用する用語「本来」とは、当該機能や性状、形質が当該細胞に元から存在していることを表すために使用される。対照的に、用語「外来」とは、当該細胞に元から存在するのではなく、外部から導入された機能や性状、形質を表すために使用される。例えば、「外来」遺伝子又はポリヌクレオチドとは、細胞に外部から導入された遺伝子又はポリヌクレオチドである。外来遺伝子又はポリヌクレオチドは、それが導入された細胞と同種の生物由来であっても、異種の生物由来（すなわち異種遺伝子又はポリヌクレオチド）であってもよい。

[0018] <変異体>

本発明の変異体は、配列番号2で示されるアミノ酸配列のG5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置の1又は複数箇所のアミノ酸残基の改変を含む、親 α -アミラーゼの変異体である。

すなわち、「変異体」は、親 α -アミラーゼを構成するアミノ酸において、1又は複数箇所の所定位置のアミノ酸残基が改変された α -アミラーゼ活

性を有するポリペプチドを意味する。斯かる所定位置のアミノ酸残基が改変は、洗浄性能及び／又は洗剤中での安定性を高めるための改変であり、したがって、当該変異体は、親 α -アミラーゼと比して向上した洗浄性能及び／又は安定性を有する。

[0019] 本発明の変異体において、アミノ酸残基の改変部位（変異位置）は、配列番号2で示されるアミノ酸配列のG5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置である。

ここで、配列番号2で示されるアミノ酸配列は、 α -アミラーゼYR288を構成するアミノ酸配列であり、本発明の変異体における変異位置は、当該アミノ酸配列のアミノ酸番号に基づいて番号付けされる。

YR288は、NCBIタンパク質配列データベースにおいて、WP_100346362.1として登録されているタンパク質であり、本出願人によって、低温でのデンプン分解活性及び洗浄性能が高い α -アミラーゼとして特定されたタンパク質である（特願2020-121626）。

[0020] アミノ酸配列上の「相当する位置」は、目的配列と参照配列（本発明においては配列番号2で示されるアミノ酸配列）とを、最大の相同性を与えるように整列（アラインメント）させることにより決定することができる。アミノ酸配列のアラインメントは、公知のアルゴリズムを用いて実行することができ、その手順は当業者に公知である。例えば、アラインメントは、Clustal Wマルチプルアラインメントプログラム（Thompson, J. D. et al, 1994, Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680）をデフォルト設定で用いることにより、行うことが

できる。あるいは、Clustal Wの改訂版であるClustal W2やClustal omegaを使用することもできる。Clustal W、Clustal W2及びClustal omegaは、例えば、欧州バイオインフォマティクス研究所（European Bioinformatics Institute: EBI [www.ebi.ac.uk/index.html]）や、国立遺伝学研究所が運営する日本DNAデータバンク（DDBJ [www.ddbj.nig.ac.jp/searches-j.html]）のウェブサイト上で利用することができる。上述のアラインメントにより参照配列の任意の位置にアラインされた目的配列の位置は、当該任意の位置に「相当する位置」とみなされる。

[0021] 当業者であれば、上記で得られたアミノ酸配列のアラインメントを、最適化するようにさらに微調整することができる。そのような最適アラインメントは、アミノ酸配列の類似性や挿入されるギャップの頻度等を考慮して決定するのが好ましい。ここでアミノ酸配列の類似性とは、2つのアミノ酸配列をアラインメントしたときにその両方の配列に同一又は類似のアミノ酸残基が存在する位置の数の全長アミノ酸残基数に対する割合（%）をいう。類似のアミノ酸残基とは、タンパク質を構成する20種のアミノ酸のうち、極性や電荷の点で互いに類似した性質を有しており、いわゆる保存的置換を生じるようなアミノ酸残基を意味する。そのような類似のアミノ酸残基からなるグループは当業者にはよく知られており、例えば、アルギニンとリシン又はグルタミン；グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミン；セリンとスレオニン又はアラニン；グルタミンとアスパラギン又はアルギニン；ロイシンとイソロイシン等がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0022] 本発明において、「親 α -アミラーゼ」とは、本発明の変異体をもたらすために改変が行われる基準 α -アミラーゼを意味する。親は、天然（野生型）ポリペプチド又はその変異体であり得る。

[0023] 本発明において、親 α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ変異体は、アミノ酸配列において、配列番号4で示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、

好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%の同一性を有する。

ここで、配列番号4で示されるアミノ酸配列からなる α -アミラーゼは、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる α -アミラーゼ(YR288)において、R178及びT180に対応するアミノ酸残基が欠失した(R178 Δ +T180 Δ) α -アミラーゼ変異体である。後述する実施例に示すとおり、配列番号2で示されるアミノ酸配列のR178、G179、T180及びG181の各位置に相当する位置の2箇所におけるアミノ酸残基の欠失を含む、YR288を親 α -アミラーゼとする変異体は、洗剤中での安定性がYR288よりも飛躍的に向上される。したがって、配列番号2で示されるアミノ酸配列又はこれと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列のR178、G179、T180及びG181の各位置に相当する位置の2箇所以上のアミノ酸残基を欠失させた α -アミラーゼ変異体は、配列番号4で示されるアミノ酸配列からなる α -アミラーゼを含め、いずれも本発明の変異体の親 α -アミラーゼとなり得る。

ここで、2箇所以上のアミノ酸残基を欠失としては、好ましくはR178 Δ +T180 Δ 、G179 Δ +T180 Δ 、R178 Δ +G179 Δ 、R178 Δ +G181 Δ 、G179 Δ +G181 Δ 等が挙げられ、R178 Δ +T180 Δ がより好ましい。

[0024] 配列番号4で示される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なる α -アミラーゼとしては、この他に、バチルス フレクサス (*Bacillus flexus*) 由来の α -アミラーゼであるDE0178や、バチルス エスピー (*Bacillus sp.*) 由来の α -アミラーゼであるRU2Cなどが挙げられる (特願2020-12162

6)。

[0025] 上記所定位置の1又は複数箇所で行われるアミノ酸残基の改変は、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失が挙げられる。ここで、「置換」はある位置にあるアミノ酸を異なるアミノ酸で置き換えることを意味し、「欠失」はある位置にあるアミノ酸の除去を意味し、「挿入」はある位置にあるアミノ酸に隣接して、直接連続するようアミノ酸を付加することを意味する。

[0026] 本発明において、変異箇所は1又は複数箇所であり得るが、2個所以上であるのが好ましくは、より好ましくは2～15箇所、より好ましくは3～15箇所、より好ましくは5～10箇所が挙げられる。

なお、当該変異体は、洗浄性能又は安定性向上の点から、配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する α -アミラーゼであるのが好ましい。また、変異体は、上記変異体としての性質を保持する限り、任意の数の保存的アミノ酸置換を含み得る。

[0027] 配列番号2で示されるアミノ酸配列のG5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置で示される変異箇所のうち、安定性向上の点から、好ましくは、N126、E187、N192、F205、R211、H240、S241、Y242、の各位置に相当する位置が挙げられる。

このうち、好適な2箇所以上の改変としては、例えば、以下のa)～f)の改変の組み合わせが挙げられる。

a) E187、F205及びH240の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変と、N126

、N192、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変の組み合わせ。

b) E187及びH240の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変と、N126、N192、F205、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変の組み合わせ。

c) F205及びH240の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変と、N126、E187、N192、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変の組み合わせ。

d) F205の位置に相当するアミノ酸残基における改変と、N126、E187、N192、R211、H240、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変の組み合わせ。

e) H240の位置に相当するアミノ酸残基における改変と、N126、E187、N192、F205、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変の組み合わせ。

f) R211の位置に相当するアミノ酸残基における改変と、N126、E187、N192、F205、H240、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変の組み合わせ。

[0028] G5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S

241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置のアミノ酸残基の改変の好適な態様を以下に示す。

すなわち、G5は、E、D、P、R又はKへの置換（G5E/D/P/R/K）が好ましく；

S38は、Nへの置換（S38N）が好ましく；

T49は、Qへの置換（T49Q）が好ましく；

Q96は、R又はKへの置換（Q96R/K）が好ましく；

N126は、Yへの置換（N126Y）が好ましく；

T129は、Iへの置換（T129I）が好ましく；

G140は、Y、F又はWへの置換（G140Y/F/W）が好ましく；

F153は、Wへの置換（F153W）が好ましく；

Q167は、Eへの置換（Q167E）が好ましく；

G179は、D又はHへの置換（G179D/H）が好ましく；

W186は、Lへの置換（W186L）が好ましく；

E187は、Pへの置換（E187P）が好ましく；

N192は、Fへの置換（N192F）が好ましく；

M199は、L、T、A、N、Q、S、V又はIへの置換（M199L/T/A/N/Q/S/V/I）が好ましく；

Y200は、Gへの置換（Y200G）が好ましく；

L203は、Y、M又はFへの置換（L203Y/M/F）が好ましく；

Y205は、Fへの置換（Y205F）が好ましく；

D206は、R、E、N、T又はGへの置換（D206R/E/N/T/G）が好ましく；

R211は、L、V又はIへの置換（R211L/V/I）が好ましく；

K215は、Fへの置換（K215F）が好ましく；

H 2 4 0 は、F への置換 (H 2 4 0 F) が好ましく ;

S 2 4 1 は、A、Q、D、L、Y、P、H への置換 (S 2 4 1 A / Q / D / L / Y / P / H) が好ましく ;

Y 2 4 2 は、F への置換 (Y 2 4 2 F) が好ましく ;

G 2 4 4 は、K、W、L 又は R への置換 (G 2 4 4 K / W / L / R) が好ましく ;

E 2 5 7 は、T への置換 (E 2 5 7 T) が好ましく ;

F 2 5 9 は、W への置換 (F 2 5 9 W) が好ましく ;

K 2 7 8 は、L、D、W、I、H、S、T、N、Q、V、A、Y 又は F への置換 (K 2 7 8 L / D / W / I / H / S / T / N / Q / V / A / Y / F) が好ましく ;

H 2 8 3 は、Q への置換 (H 2 8 3 Q) が好ましく ;

S 2 8 4 は、W への置換 (S 2 8 4 W) が好ましく ;

A 2 8 8 は、F への置換 (A 2 8 8 F) が好ましく ;

H 2 9 5 は、Y への置換 (H 2 9 5 Y) が好ましく ;

Y 2 9 6 は、A への置換 (Y 2 9 6 A) が好ましく ;

N 3 0 3 は、R、E、S、G、V、D、T 又は A への置換 (N 3 0 3 R / E / S / G / V / D / T / A) が好ましく ;

T 3 2 0 は、D 又は E への置換 (T 3 2 0 D / E) が好ましく ;

S 3 3 1 は、T への置換 (S 3 3 1 T) が好ましく ;

L 3 4 8 は、I への置換 (L 3 4 8 I) が好ましく ;

Y 3 6 0 は、C、M、L 又は V への置換 (Y 3 6 0 C / M / L / V) が好ましく ;

W 4 0 8 位は P への置換 (W 4 0 8 P) が好ましく ;

L 4 2 9 は、V への置換 (L 4 2 9 V) が好ましく ;

V 4 3 0 は、M への置換 (V 4 3 0 M) が好ましく ;

G 4 3 3 は、G の後へ S の挿入 (G 4 3 3 G S) が好ましく ;

A 4 3 4 は、V への置換 (A 4 3 4 V) が好ましく ;

W439は、Rへの置換（W439R）が好ましく；

N471は、Tへの置換（N471T）が好ましく；

G476は、A、P、E、S、F、R又はKへの置換（G476A/P/E/S/F/R/K）が好ましく；

G477は、Eへの置換（G477E）が好ましい。

[0029] 次に、洗浄性能の向上に寄与する好適な変異の組み合わせを、下記表1-1～1-4に示す。したがって、当該組み合わせ変異を少なくとも有する変異体は、洗浄性能の向上に特に寄与する変異体である。

[0030]

[表1-1]

G5R+W186L+E257T
G5R+E257T+G433GS
G5R+Y360L+G433GS
G5R+Q96K+E257T
G5R+Y360L+W408P
G5R+F259W+S284W
G5R+W186L+F259W
G5R+S284W+T320E
Q96K+F259W+G433GS
Q96K+W186L+W439R
Q96K+W186L+E257T
Q96K+W408P+N471T
Q96K+E257T+W408P
Q96K+W408P+G433GS
Q96K+F259W+N471T
Q96K+Y360L+A434V
Q96K+F259W+W408P
W186L+E257T+Y360L
W186L+W408P+N471T
W186L+E257T+W408P
W186L+E257T+N471T
E257T+A434V+N471T
E257T+W408P+A434V
F259W+S284W+W439R
F259W+S284W+Y360L
F259W+T320E+G433GS
S284W+T320E+Y360L
S284W+W408P+G433GS
S284W+T320E+A434V
T320E+Y360L+G433GS

[0031]

[表1-2]

T320E+W439R+N471T
T320E+G433GS+N471T
T320E+Y360L+W439R
Y360L+A434V+N471T
G5R+S284W+W439R
Q96K+E257T+T320E+W408P
Q96K+E257T+W408P+A434V
Q96K+E257T+W408P+N471T
Q96K+E257T+T320E+W408P+A434V
Q96K+E257T+T320E+W408P+N471T
Q96K+T320E+Y360L+W408P+A434V
Q96K+T320E+Y360L+A434V+N471T
E257T+T320E+W408P+A434V+N471T
G5R+Q96K+W186L+E257T+T320E+W439R
G5R+Q96K+W186L+E257T+S284W+G433GS
G5R+F259W+S284W+T320E+W439R+N471T
G5R+Q96K+W186L+Y360L+W408P+G433GS
G5R+Q96K+W186L+E257T+W408P+W439R
G5R+Q96K+F259W+Y360L+W408P+W439R
G5R+E257T+F259W+S284W+Y360L+N471T
G5R+Q96K+W186L+F259W+Y360L+G433GS
G5R+F259W+S284W+T320E+Y360L+A434V
Q96K+E257T+F259W+T320E+G433GS+N471T
Q96K+W186L+E257T+S284W+W439R+N471T
Q96K+S284W+T320E+W408P+W439R+N471T
Q96K+W186L+E257T+W408P+A434V+N471T
Q96K+W186L+F259W+Y360L+W439R+N471T
G5R+Q96K+Y360L+W408P+G433GS
G5R+Q96K+F259W+Y360L+G433GS
Q96K+F259W+Y360L+W439R+N471T

[0032]

[表1-3]

Q96K+E257T+W408P+A434V+N471T
E257T+Y360L
E257T+Y360L+W408P
E257T+Y360L+G476K
E257T+Y360L+W408P+G476K
G5R+S38N
Q96K+S38N
S38N+E257T
S38N+F259W
S38N+S284W
S38N+T320D
S38N+T320E
S38N+Y360L
S38N+W408P
S38N+N471T
S38N+G476A
S38N+G476K
S38N+G476E
S38N+N471T+G476K
S38N+N471T+G476K+G477E
E257T+Y360C
E257T+Y360M
E257T+Y360V
E257T+G476K+Y360C
E257T+G476K+Y360M
E257T+G476K+Y360V
G5R+W186L
G5R+E257T
G5R+Y360L
S284W+T320E
Q96K+F259W

[0033]

[表1-4]

Q96K+W186L
Q96K+W408P
G5R+S284W
G5R+W439R
S38N+S284W
S38N+T320D

[0034] 次に、安定性の向上に寄与する好適な変異の組み合わせを、下記表2-1～2-4に示す。したがって、当該組み合わせ変異を少なくとも有する変異体は、安定性の向上に特に寄与する変異体である。また、表1-1～1-4の組み合わせ変異と、表2-1～2-4の組み合わせ変異を組み合わせた変異も、洗浄性能及び安定性の向上を図る点から好ましい。

[0035]

[表2-1]

F205Y+H240F+Y242F
N192F+F205Y+H240F+Y242F
E187P+N192F
H240F+Y242F
H240F+Y242F+S331T
N126Y+T129I+L203Y+F205Y
N126Y+T129I+H240F+Y242F+G244W
N126Y+T129I+H283Q+A288F
H240F+Y242F+G244W
H240F+G244W
Y242F+G244W
L203Y+F205Y
N126Y+T129I
H283Q+A288F
S241Q+Y242F
S241F+G244W
S241Q+Y242F+G244W
H240F+S241Q+G244W
H240F+S241Q+Y242F
T129I+E187P+G244W+S331T
S241Q+H283Q+A288F+S331T
N126Y+T129I+G140W+E187P
N126Y+G179D+N192F+L203Y
N126Y+F205Y+Y242F+A288F
L203Y+R211I+Y242F+H283Q
G179D+E187P+R211I+H240F
G140W+L203Y+Y242F+G244W
H240F+S241Q+Y242F+G244W
F205Y+H240F+S241Q
F205Y+H240F+S241Q+Y242F

[0036]

[表2-2]

F205Y+S241Q
E187P+H240F+S241Q
E187P+H240F+S241Q+Y242F
E187P+S241Q+Y242F
E187P+H240F+Y242F
N126Y+E187P
T129I+E187P
G140W+E187P
E187P+L203Y
E187P+F205Y
E187P+S241Q
E187P+Y242F
E187P+G244W
E187P+H283Q
E187P+S331T
N126Y+T129I+E187P
E187P+N192F+F205Y+H240F+Y242F
M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
H240F+S241Q
E187P+R211I
E187P+N192F+M199L
E187P+F205Y+H240F+Y242F
E187P+N192F+Y242F
E187P+N192F+R211I
E187P+N192F+M199L+R211I
E187P+N192F+F205Y+Y242F
E187P+N192F+F205Y+H240F+Y242F

[0037]

[表2-3]

N192F+S241Q
N192F+H240F+S241Q
N192F+F205Y+H240F+S241Q
N192F+F205Y+H240F+S241Q+Y242F
R211I+H240F+S241Q
R211I+H240F+S241Q+Y242F
F205Y+R211I+H240F+S241Q
F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
G179H+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
G179H+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
G179H+F205Y+H240F+S241Q+Y242F
G179H+E187P+N192F
E187P+M199L
M199L+H240F+S241Q
F205Y+H240F+S241A
F205Y+H240F+S241D
H240F+S241A
H240F+S241D
N126Y+R211I
N126Y+H240F
E187P+H240F
N192F+F205Y
N192F+R211I
N192F+H240F
F205Y+R211I
F205Y+H240F
R211I+H240F
R211I+S241Q
R211I+Y242F

[0038]

[表2-4]

N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
G179H+N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
N192F+R211I+H240F+S241Q+Y242F
N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q
E187P+K278L
E187P+K278D
E187P+K278W
E187P+K278I
E187P+K278H
E187P+K278S
E187P+K278T
E187P+K278N
E187P+K278Q
E187P+K278V
E187P+K278A
E187P+K278Y
E187P+K278F
E187P+S241L+K278W
E187P+S241Y+K278I
E187P+S241P+K278W
E187P+S241L+K278I
E187P+S241P+K278I
E187P+S241Y+K278W
E187P+S241F+K278W
E187P+S241Y+K278Y
E187P+S241Y+K278F
E187P+S241Y+K278H
E187P+S241Y+K278L
E187P+S241H+K278W

[0039] 次に、洗浄性能及び安定性の向上に寄与する好適な変異の組み合わせを、下記表3に示す。したがって、当該組み合わせ変異を少なくとも有する変異体は、洗浄性能及び安定性の向上に特に寄与する変異体である。

[0040]

[表3]

G5R+E187P+N192F+S284W+W439R
G5R+E187P+N192F+Y360L+G433GS
Q96K+E187P+N192F+F259W+G433GS
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+G476K
F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
M199L+F205Y+H240F+Y242F+E257T+Y360L+S241Q+G476K
M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+S331T+Y360L+W408P+G476K
N126Y+M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
E187P+M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+G476K+W408P
G5R+Q96K+E187P+N192F+M199L+Y242F+F259W+S331T+Y360L+W439R
G5R+Q96K+E187P+N192F+M199L+R211I+Y242F+F259W+Y360L+W439R
G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
S38N+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+N471T+G476K+G477E
Q96K+E187P+N192F+R211I+F259W+G433GS
S38N+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+N471T+G476K+G477E
Q96K+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+F259W+G433GS
E187P+N192F+R211I+E257T+Y360L+W408P+G476K
Q96K+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+F259W+G433GS
G5R+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+S284W+W439R
G5R+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+S284W+W439R

[0041] <本発明の変異体をコードするポリヌクレオチド>

本発明の変異体は、当技術分野で公知の各種の変異導入技術を使用して製造することができる。例えば、その基準アミノ酸配列をコードする親 α -アミラーゼ遺伝子（基準 α -アミラーゼ遺伝子）内の改変対象のアミノ酸残基をコードするポリヌクレオチドを、改変後のアミノ酸残基をコードするポリヌクレオチドに変異させ、更にその変異遺伝子から変異体を発現させることにより、製造することができる。

[0042] 本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドは、一本鎖若しくは二本鎖DNA、RNA、又は人工核酸の形態であり得、あるいはcDNA、又はイントロンを含まない化学合成DNAであり得る。

- [0043] 本発明において、親 α -アミラーゼのアミノ酸残基を変異させる手段としては、当技術分野で公知の各種変異導入技術を使用することができる。例えば、親 α -アミラーゼのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド（以下、親遺伝子ともいう）において、変異すべきアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列を、変異後のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列に変異させることにより、本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドを得ることができる。
- [0044] 親遺伝子への目的の変異の導入は、基本的には、当業者に周知の様々な部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。部位特異的変異導入法は、例えば、インバースPCR法やアニーリング法などの任意の手法により行うことができる。市販の部位特異的変異導入用キット（例えば、Stratagene社のQuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kitや、QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit等）を使用することもできる。
- [0045] 親遺伝子への部位特異的変異導入は、最も一般的には、導入すべきヌクレオチド変異を含む変異用プライマーを用いて行うことができる。該変異用プライマーは、親遺伝子における変異すべきアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列を含む領域にアニーリングし、かつその変異すべきアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列（コドン）に代えて変異後のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列（コドン）を有するヌクレオチド配列を含むように設計すればよい。変異前及び変異後のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列（コドン）は、当業者であれば通常の教科書等に基づいて適宜認識し選択することができる。あるいは、部位特異的変異導入は、導入すべきヌクレオチド変異を含む相補的な2つのプライマーを別々に用いて変異部位の上流側及び下流側をそれぞれ増幅したDNA断片を、SOE (splicing by overlap extension) -PCR (Gene, 1989, 77 (1) : p61-68) により1つに連結する方法を用い

することもできる。

[0046] 親遺伝子を含む鋳型DNAは、上述した α -アミラーゼを産生する微生物から、常法によりゲノムDNAを抽出するか、又はRNAを抽出し逆転写によりcDNAを合成することによって、調製することができる。あるいは、親 α -アミラーゼのアミノ酸配列に基づいて、対応するヌクレオチド配列を化学合成して鋳型DNAとして用いてもよい。配列番号4で示されるアミノ酸配列からなる α -アミラーゼをコードする塩基配列を含むDNA配列を配列番号3に、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる α -アミラーゼ（Y R 2 8 8）をコードする塩基配列を含むDNA配列を配列番号1に示した。

[0047] 変異用プライマーは、ホスホロアミダイト法（Nucleic Acids Research, 1989, 17:7059-7071）等の周知のオリゴヌクレオチド合成法により作製することができる。そのようなプライマー合成は、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成装置（ABI社製など）を用いて実施することもできる。該変異用プライマーを含むプライマーセットを使用し、親遺伝子を鋳型DNAとして上記のような部位特異的変異導入を行うことにより、目的の変異を有する本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドを得ることができる。

[0048] 当該本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖のDNA、cDNA、RNAもしくは他の人工核酸を含み得る。該DNA、cDNA及びRNAは、化学合成されていてもよい。また当該ポリヌクレオチドは、オープンリーディングフレーム（ORF）に加えて、非翻訳領域（UTR）のヌクレオチド配列を含んでいてもよい。また当該ポリヌクレオチドは、本発明の変異ポリペプチド産生用の形質転換体の種にあわせて、コドン至適化されていてもよい。各種生物が使用するコドンの情報は、Codon Usage Database（[www.kazusa.or.jp/codon/]）から入手可能である。

[0049] <ベクター又はDNA断片>

得られた本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドはベクターに組み込むことができる。当該ポリヌクレオチドを含有するベクターの種類としては、特に限定されず、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、ウイルス、YACベクター、シャトルベクター等の任意のベクターであってよい。また該ベクターは、限定ではないが、好ましくは、細菌内、好ましくはバチルス属細菌（例えば枯草菌又はその変異株）内で増幅可能なベクターであり、より好ましくは、バチルス属細菌内で導入遺伝子の発現を誘導可能な発現ベクターである。中でも、バチルス属細菌と他の生物のいずれでも複製可能なベクターであるシャトルベクターは、本発明の変異体を組換え生産する上で好適に用いることができる。好ましいベクターの例としては、限定するものではないが、pHA3040SP64、pHSP64R又はpASP64（特許第3492935号）、pHY300PLK（大腸菌と枯草菌の両方を形質転換可能な発現ベクター；Jpn J Genet, 1985, 60:235-243）、pAC3（Nucleic Acids Res, 1988, 16:8732）等のシャトルベクター；pUB110（J Bacteriol, 1978, 134:318-329）、pTA10607（Plasmid, 1987, 18:8-15）等のバチルス属細菌の形質転換に利用可能なプラスミドベクター、等が挙げられる。また大腸菌由来のプラスミドベクター（例えばpET22b(+）、pBR322、pBR325、pUC57、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pBluescript等）を用いることもできる。

[0050] 上記ベクターは、DNAの複製開始領域又は複製起点を含むDNA領域を含み得る。あるいは、上記ベクターにおいては、本発明の変異体をコードするポリヌクレオチド（すなわち変異体遺伝子）の上流に、該遺伝子の転写を開始させるためのプロモーター領域、ターミネーター領域、又は発現されたタンパク質を細胞外へ分泌させるための分泌シグナル領域などの制御配列が作動可能に連結されていてもよい。なお、遺伝子と制御配列が「作動可能に連結されている」とは、遺伝子と制御領域とが、該遺伝子が該制御領域によ

る制御の下に発現し得るように配置されていることをいう。

[0051] 上記プロモーター領域、ターミネーター、分泌シグナル領域等の制御配列の種類は、特に限定されず、導入する宿主に応じて、通常使用されるプロモーターや分泌シグナル配列を適宜選択して用いることができる。例えば、ベクターに組み込むことができる制御配列の好適な例としては、*Bacillus* sp. KSM-S237株のセルラーゼ遺伝子のプロモーター、分泌シグナル配列等が挙げられる。

[0052] あるいは、上記本発明のベクターには、該ベクターが適切に導入された宿主を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの薬剤の耐性遺伝子）がさらに組み込まれていてもよい。あるいは、宿主に栄養要求性株を使用する場合、要求される栄養の合成酵素をコードする遺伝子をマーカー遺伝子としてベクターに組み込んでよい。またあるいは、生育のために特定の代謝を必須とする選択培地を用いる場合、該代謝の関連遺伝子をマーカー遺伝子としてベクターに組み込んでよい。このような代謝関連遺伝子の例としては、アセトアミドを窒素源として利用するためのアセトアミダーゼ遺伝子が挙げられる。

[0053] 上記本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドと、制御配列及びマーカー遺伝子との連結は、SOE (splicing by overlap extension) -PCR法 (Gene, 1989, 77:61-68) などの当該分野で公知の方法によって行うことができる。連結した断片のベクターへの導入手順は、当該分野で周知である。

[0054] <形質転換細胞>

本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主へ導入するか、又は本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドを含むDNA断片を宿主のゲノムに導入することにより、本発明の形質転換細胞を得ることができる。

[0055] 宿主細胞としては、細菌、糸状菌などの微生物が挙げられる。細菌の例と

しては、大腸菌 (*Escherichia coli*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、リステリア属 (*Listeria*)、バチルス属 (*Bacillus*) に属する細菌などが挙げられ、このうち、大腸菌及びバチルス属細菌 (例えば、枯草菌 *Bacillus subtilis* Marburg No. 168 (枯草菌168株) 又はその変異株) が好ましい。枯草菌変異株の例としては、*J. Biosci. Bioeng.*, 2007, 104 (2) : 135-143 に記載のプロテアーゼ9重欠損株 KA8AX、ならびに *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33 (9) : 1847-1852 に記載の、プロテアーゼ8重欠損株にタンパク質のフォールディング効率を向上させた D8PA 株を挙げることができる。糸状菌の例としては、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、リゾプス属 (*Rizhopus*) などが挙げられる。

[0056] 宿主へのベクターの導入の方法としては、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法などの当該分野で通常使用される方法を用いることができる。導入が適切に行われた株をマーカー遺伝子の発現、栄養要求性などを指標に選択することで、ベクターが導入された目的の形質転換体を得ることができる。

[0057] あるいは、本発明の変異体をコードするポリヌクレオチド、制御配列及びマーカー遺伝子を連結した断片を、宿主のゲノムに直接導入することもできる。例えば、SOE-PCR法などにより、上記連結断片の両端に宿主のゲノムと相補的な配列を付加したDNA断片を構築し、これを宿主に導入して、宿主ゲノムと該DNA断片との間に相同組換えを起こさせることによって、本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドが宿主のゲノムに導入される。

[0058] 斯くして得られた、本発明の変異体をコードするポリヌクレオチド又はそれを含むベクターが導入された形質転換体を適切な培地で培養すれば、該ベ

クター上のタンパク質をコードする遺伝子が発現して本発明の変異体が生成される。当該形質転換体の培養に使用する培地は、当該形質転換体の微生物の種類にあわせて、当業者が適宜選択することができる。

[0059] あるいは、本発明の変異体は、無細胞翻訳系を使用して本発明の変異体をコードするポリヌクレオチド又はその転写産物から発現させてもよい。「無細胞翻訳系」とは、宿主となる細胞を機械的に破壊して得た懸濁液にタンパク質の翻訳に必要なアミノ酸等の試薬を加えて、*in vitro* 転写翻訳系又は *in vitro* 翻訳系を構成したものである。

[0060] 上記培養物又は無細胞翻訳系にて生成された本発明の変異体は、タンパク質精製に用いられる一般的な方法、例えば、遠心分離、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、単離又は精製することができる。このとき、形質転換体内のベクター上で本発明の α -アミラーゼ変異体をコードする遺伝子と分泌シグナル配列が作動可能に連結されている場合、生成されたタンパク質は細胞外に分泌されるため、より容易に培養物から回収され得る。培養物から回収されたタンパク質は、公知の手段でさらに精製されてもよい。

[0061] 斯くして得られる本発明の変異体は、親 α -アミラーゼと比して向上した洗浄性能及び／又は安定性を有する。

ここで、「向上した洗浄性能」とは、親 α -アミラーゼと比して向上した洗浄効果、例えば汚れの除去を洗濯又は洗浄工程においてもたらず能力を意味する。

洗浄性能は、当該技術分野において周知の方法を用いて評価され得る。例えば、所定の大きさに裁断した汚染布を96穴アッセイプレートのウェルに挿入し、洗剤溶液及び酵素溶液を添加して所定の条件で洗浄処理する。洗浄終了後の洗浄液について488nmの吸光度を測定し、ブランクとの差分 ΔA_{488} を洗浄力として求める。変異体の ΔA_{488} を親 α -アミラーゼの ΔA_{488} で割ることで相対洗浄力を求めることができる。

[0062] また、「向上した安定性」とは、親 α -アミラーゼと比して向上した、洗浄剤存在下における α -アミラーゼ活性の維持能力を意味する。

安定性は、当該技術分野において周知の方法を用いて評価され得る。例えば、洗浄剤に酵素溶液を添加して、所定時間処理した後に α -アミラーゼ活性を測定し、当該処理による単位時間（h）当たりの失活速度を算出して半減期（h）を計算する。変異体の半減期（h）を親 α -アミラーゼの半減期（h）で割ることで相対安定性を求めることができる。

[0063] 本発明の変異体は、各種洗浄剤組成物配合用酵素として有用であり、特に低温洗浄に適した洗浄剤組成物配合用酵素として有用である。

ここで、「低温」としては、40℃以下、35℃以下、30℃以下、25℃以下が挙げられ、また5℃以上、10℃以上、15℃以上が挙げられる。また、5～40℃、10～35℃、15～30℃、15～25℃が挙げられる。

[0064] 洗浄剤組成物中への本発明の変異体の配合量は、当該タンパク質が活性を示す量であれば特に制限されないが、例えば、洗浄剤組成物1kg当たり好ましくは1mg以上、より好ましくは10mg以上、より好ましくは50mg以上であり、且つ好ましくは5000mg以下、より好ましくは1000mg以下、より好ましくは500mg以下である。また1～5000mgであるのが好ましく、10～1000mgであるのがより好ましく、50～500mgであるのがより好ましい。

[0065] 洗浄剤組成物は、本発明の変異体以外に様々な酵素を併用することもできる。例えば、加水分解酵素、酸化酵素、還元酵素、トランスフェラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、シンターゼ等である。このうち、本発明のタンパク質とは異なるアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、ケラチナーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、リパーゼ、プルナーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、グルコシダーゼ、グルカナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ等が好ましく、特にプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼが好ましい。

プロテアーゼとしては市販のAlcalase、Esperase、Everlase、Savinase、Kannase、Progress Uno（登録商標；ノボザイムズ社）、PREFERENZ、EFFECTENZ、EXCELLENZ（登録商標；デュポン社）、Lavergy（登録商標；BASF社）、またKAP（花王）、等が挙げられる。

セルラーゼとしてはCelluclean、Carezyme（登録商標；ノボザイムズ社）、またKAC、特開平10-313859号公報記載のバチルス・エスピーKSM-S237株が生産するアルカリセルラーゼ、特開2003-313592の号公報記載の変異アルカリセルラーゼ（以上、花王）等が挙げられる。

アミラーゼとしてはTermamyl、Duramyl、Stainzyme、Stainzyme Plus、Amplify Prime（登録商標；ノボザイムズ社）、PREFERENZ、EFFECTENZ（登録商標；デュポン社）、またKAM（花王）、等が挙げられる。

リパーゼとしてはLipolase、Lipex（登録商標；ノボザイムズ社）等が挙げられる。

[0066] 洗浄剤組成物には公知の洗浄剤成分を配合することができ、当該公知の洗浄剤成分としては、例えば次のものが挙げられる。

[0067] (1) 界面活性剤

界面活性剤は洗浄剤組成物中0.5～60質量%配合され、特に粉末状洗浄剤組成物については10～45質量%、液体洗浄剤組成物については20～90質量%配合することが好ましい。また本発明の洗浄剤組成物がランドリー用衣料洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤である場合、界面活性剤は一般に1～10質量%、好ましくは1～5質量%配合される。

[0068] 洗浄剤組成物に用いられる界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤の1種又は組み合わせを挙げることが出来るが、好ましくは陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤である。

[0069] 陰イオン性界面活性剤としては、炭素数10～18のアルコールの硫酸エステル塩、炭素数8～20のアルコールのアルコキシル化物の硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、パラフィンスルホン酸塩、 α -オレフィンスルホン酸塩、内部オレフィンスルホン酸塩、 α -スルホ脂肪酸塩、 α -スルホ脂肪酸アルキルエステル塩又は脂肪酸塩が好ましい。本発明では特に、アルキル鎖の炭素数が10～14の、より好ましくは12～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩及びアルキレン鎖の炭素数が12～20の、より好ましくは16～18の内部オレフィンスルホン酸から選ばれる一種以上の陰イオン性界面活性剤が好ましく、対イオンとしては、アルカリ金属塩やアミン類が好ましく、特にナトリウム及び／又はカリウム、モノエタノールアミン、ジエタノールアミンが好ましい。内部オレフィンスルホン酸は例えばWO2017/098637を参照することができる。

[0070] 非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数8～20）エーテル、アルキルポリグリコシド、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数8～20）フェニルエーテル、ポリオキシアルキレンソルビタン脂肪酸（炭素数8～22）エステル、ポリオキシアルキレングリコール脂肪酸（炭素数8～22）エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマーが好ましい。特に、非イオン性界面活性剤としては、炭素数10～18のアルコールにエチレンオキシドやプロピレンオキシド等のアルキレンオキシドを4～20モル付加した〔HLB値（グリフィン法で算出）が10.5～15.0、好ましくは11.0～14.5であるような〕ポリオキシアルキレンアルキルエーテルが好ましい。

[0071] (2) 二価金属イオン捕捉剤

二価金属イオン捕捉剤は0.01～50質量%、好ましくは5～40質量%配合される。本発明洗浄剤組成物に用いられる二価金属イオン捕捉剤としては、トリポリリン酸塩、ピロリン酸塩、オルソリン酸塩などの縮合リン酸塩、ゼオライトなどのアルミノケイ酸塩、合成層状結晶性ケイ酸塩、ニトリロ三酢酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、クエン酸塩、イソクエン酸塩、ポ

リアセタールカルボン酸塩などが挙げられる。このうち結晶性アルミノケイ酸塩（合成ゼオライト）が特に好ましく、A型、X型、P型ゼオライトのうち、A型が特に好ましい。合成ゼオライトは、平均一次粒径0.1~10 μ m、特に0.1~5 μ mのものが好適に使用される。

[0072] (3) アルカリ剤

アルカリ剤は0.01~80質量%、好ましくは1~40質量%配合される。粉末洗剤の場合、デンス灰や軽灰と総称される炭酸ナトリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、並びにJIS1号、2号、3号などの非晶質のアルカリ金属珪酸塩が挙げられる。これら無機性のアルカリ剤は洗剤乾燥時に、粒子の骨格形成において効果的であり、比較的硬く、流動性に優れた洗剤を得ることができる。これら以外のアルカリとしてはセスキ炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどが挙げられ、またトリポリリン酸塩などのリン酸塩もアルカリ剤としての作用を有する。また、液体洗剤に使用されるアルカリ剤としては、上記アルカリ剤の他に水酸化ナトリウム、並びにモノ、ジ又はトリエタノールアミンを使用することができ、活性剤の対イオンとしても使用できる。

[0073] (4) 再汚染防止剤

再汚染防止剤は0.001~10質量%、好ましくは1~5質量%配合される。本発明洗浄剤組成物に用いられる再汚染防止剤としてはポリエチレングリコール、カルボン酸系ポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。このうちカルボン酸系ポリマーは再汚染防止能の他、金属イオンを捕捉する機能、固体粒子汚れを衣料から洗濯浴中へ分散させる作用がある。カルボン酸系ポリマーはアクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸などのホモポリマーないしコポリマーであり、コポリマーとしては上記モノマーとマレイン酸の共重合したものが好適であり、分子量が数千~10万のものが好ましい。上記カルボン酸系ポリマー以外に、ポリグリシジル酸塩などのポリマー、カルボキシメチルセルロースなどのセルロース誘導体、並びにポリアスパラギン酸などのアミノカルボン酸系のポリマーも金属

イオン捕捉剤、分散剤及び再汚染防止能を有するので好ましい。

[0074] (5) 漂白剤

例えば過酸化水素、過炭酸塩などの漂白剤は1～10質量%配合するのが好ましい。漂白剤を使用するときは、テトラアセチルエチレンジアミン(TAED)や特開平6-316700号公報記載などの漂白活性化剤(アクチベーター)を0.01～10質量%配合することができる。

[0075] (6) 蛍光剤

洗浄剤組成物に用いられる蛍光剤としてはビフェニル型蛍光剤(例えばチノパールCBS-Xなど)やスチルベン型蛍光剤(例えばDM型蛍光染料など)が挙げられる。蛍光剤は0.001～2質量%配合するのが好ましい。

[0076] (7) その他の成分

洗浄剤組成物には、衣料用洗剤の分野で公知のビルダー、柔軟化剤、還元剤(亜硫酸塩など)、抑泡剤(シリコーンなど)、香料、防菌防カビ剤(プロキセル[商品名]、安息香酸など)、その他の添加剤を含有させることができる。

[0077] 洗浄剤組成物は、上記方法で得られた本発明のタンパク質及び上記公知の洗浄成分を組み合わせることで常法に従って製造することができる。洗剤の形態は用途に応じて選択することができ、例えば液体、粉体、顆粒、ペースト、固形などにすることができる。

[0078] 斯くして得られる洗浄剤組成物は、衣料洗浄剤、食器洗浄剤、漂白剤、硬質表面洗浄用洗浄剤、排水管洗浄剤、義歯洗浄剤、医療器具用の殺菌洗浄剤などとして使用することができるが、好ましくは衣料洗浄剤、食器洗浄剤が挙げられ、より好ましくはランドリー用衣料洗浄剤(ランドリー用洗濯洗剤)、手洗いによる食器洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤が挙げられる。

また、当該洗浄剤組成物は、40℃以下、35℃以下、30℃以下、25℃以下で、且つ5℃以上、10℃以上、15℃以上での使用に適する。また、5～40℃、10～35℃、15～30℃、15～25℃での使用に適する。

[0079] 上述した実施形態に関し、本発明においては更に以下の態様が開示される。

<1>配列番号2で示されるアミノ酸配列のG5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置の1又は複数箇所のアミノ酸残基の改変を含む、親 α -アミラーゼの変異体であって、前記親 α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ変異体は配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、 α -アミラーゼ変異体。

<2>前記G5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置のアミノ酸残基の改変が、それぞれG5E/D/P/R/K、S38N、T49Q、Q96R/K、N126Y、T129I、G140Y/F/W、F153W、Q167E、G179D/H、W186L、E187P、N192F、M199L/T/A/N/Q/S/V/I、Y200G、L203Y/M/F、Y205F、D206R/E/N/T/G、R211V/L/I、K215F、H240F、S241A/Q/D/L/Y/P/H、Y242F、G244K/W/L/R、E257T、F259W、K278L/D/W/I/H/S/T/N/Q/V/A/Y/F、H283Q、S

284W、A288F、H295Y、Y296A、N303R/E/S/G/V/D/T/A、T320D/E、S331T、L348I、Y360C/M/L/V、W408P、L429V、V430M、G433GS、A434V、W439R、N471T、G476A/P/E/S/F/R/K及びG477Eである、＜1＞の変異体。

＜3＞アミノ酸残基の改変が2箇所以上の改変である、＜1＞又は＜2＞の変異体。

＜4＞前記アミノ酸残基の改変がN126、E187、N192、F205、R211、H240、S241及びY242の各位置に相当する位置のアミノ酸残基の改変である、＜1＞の変異体。

＜5＞前記N126、E187、N192、F205、R211、H240、S241及びY242の各位置に相当する位置のアミノ酸残基の改変が、それぞれN126Y、E187P、N192F、F205Y、R211I、H240F、S241Q及びY242Fである、＜4＞の変異体。

＜6＞アミノ酸残基の改変が2箇所以上の改変である、＜4＞又は＜5＞の変異体。

＜7＞E187、F205及びH240の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変と、N126、N192、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変とを含む、＜1＞又は＜2＞の変異体。

＜8＞E187及びH240の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変と、N126、N192、F205、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変とを含む、＜1＞又は＜2＞の変異体。

＜9＞F205及びH240の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変と、N126、E18

7、N192、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変とを含む、〈1〉又は〈2〉の変異体。

〈10〉F205の位置に相当するアミノ酸残基における改変と、N126、E187、N192、R211、H240、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変とを含む、〈1〉又は〈2〉の変異体。

〈11〉H240の位置に相当するアミノ酸残基における改変と、N126、E187、N192、F205、R211、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変とを含む、〈1〉又は〈2〉の変異体。

〈12〉R211の位置に相当するアミノ酸残基における改変と、N126、E187、N192、F205、H240、S241及びY242の各位置に相当するアミノ酸残基から選択される少なくとも1つ以上のアミノ酸残基における改変とを含む、〈1〉又は〈2〉の変異体。

〈13〉親 α -アミラーゼが、配列番号2で示されるアミノ酸配列においてR178及びG179におけるアミノ酸残基が欠失した α -アミラーゼ変異体である、〈1〉又は〈2〉の変異体。

〈14〉変異体が、前記表1-1~1-4で示される変異の組み合わせから選ばれる変異を少なくとも含む、〈1〉、〈2〉又は〈13〉の変異体。

〈15〉変異体が、前記表2-1~2-4で示される変異の組み合わせから選ばれる変異を少なくとも含む、〈1〉、〈2〉又は〈13〉の変異体。

〈16〉変異体が、前記表1-1~1-4で示される変異の組み合わせから選ばれる変異と、前記表2-1~2-4で示される変異の組み合わせから選ばれる変異とを含む、〈1〉、〈2〉又は〈13〉の変異体。

〈17〉変異体が、前記表3で示される変異の組み合わせから選ばれる変異を少なくとも含む、〈1〉、〈2〉又は〈13〉の変異体。

〈18〉〈1〉~〈17〉のいずれかに記載の変異体をコードするポリヌ

クレオチド。

<19><18>のポリヌクレオチドを含むベクター又はDNA断片。

<20><19>のベクター又はDNA断片を含有する形質転換細胞。

<21>微生物である、<20>の形質転換細胞。

<22><1>~<17>の変異体を含む洗浄剤組成物。

<23>衣料洗浄剤又は食器洗浄剤である、<22>の洗浄剤組成物。

<24>粉末又は液体である、<23>の洗浄剤組成物。

<25>低温で使用される、<22>~<24>のいずれかの洗浄剤組成物。

<26>5~40℃の温度で使用される、<25>の洗浄剤組成物。

実施例

[0080] (1) YR288変異体発現プラスミドの構築

下記の実施例に記載のYR288変異体の構築方法を記す。5'末端にリバースプライマーとの相補配列を15塩基有し変異配列を含むフォワードプライマー、及び変異配列の直前の塩基を5'末端とするリバースプライマーを変異導入用プライマー対として用いた。特願2020-121626の実施例に記載のYR288発現プラスミドpHY-YR288又は本実施例にて作成したYR288変異体発現プラスミドを鋳型として、変異導入用プライマー対を使用してPCRを行った。複数断片を連結する場合、それぞれのPCR産物を用いてIn-Fusion, HD Cloning kit (Clontech)のプロトコルに従ってIn-Fusion反応を行った。PCR産物又はIn-Fusion反応液を枯草菌にプロトプラスト法により形質転換して目的のYR288変異体発現プラスミドを保持する形質転換体を取得した。

[0081] (2) 酵素生産培養

15ppmテトラサイクリンを添加したLB培地300μLを分注した96穴ディープウェルプレートに(1)で得た組換え枯草菌コロニーを植菌した後、30℃、210rpmで一晩培養した。翌日、培養液6μLを2×L

ーマルトース培地（2%トリプトン、1%酵母エキス、1%NaCl、7.5%マルトース、7.5ppm硫酸マンガン五水和物、0.04%塩化カルシウム二水和物、15ppmテトラサイクリン；%は（w/v）%）100 μ Lを分注した96穴ディープウェルプレートに植菌し、30 $^{\circ}$ C、210rpmで2日間培養した後、菌体から産生された酵素を含む培養上清を遠心分離により回収し酵素溶液とした。

[0082] （3）培養上清のタンパク質濃度測定

培養上清のタンパク質濃度測定にはプロテインアッセイラピッドキットワコーII（富士フイルム和光純薬株式会社）を用いた。アミラーゼ発現カセットを持たないpHY300PLK（タカラバイオ）導入株の培養上清のタンパク質濃度をブランクとすることで培養上清中のアミラーゼの濃度を算出した。

[0083] （4）活性測定

非還元末端を保護したエチリデンーパラニトロフェニル- α -D-マルトヘプタオシド（Et-G7-pNP）を基質として用いた。Et-G7-pNPに対する α -アミラーゼの作用により生成するマルトオリゴ糖-pNPに α -グルコシダーゼを作用させてpNPを遊離させ、pNP生成に伴う吸光度の増加速度を測定することで α -アミラーゼ活性を求めることができる。Et-G7-pNPと α -グルコシダーゼを含む α -アミラーゼ活性測定試薬であるAMY-EL（セロテック）のR1液とR11液を2：1で混合したものを基質溶液として用いた。基質溶液100 μ Lと適宜希釈した酵素サンプル10 μ Lを96穴アッセイプレートの各ウェルで混合し、30 $^{\circ}$ Cで405nmの吸光度変化（OD/min）を測定した。ブランク（酵素添加無しサンプル）との差分 Δ OD/minを活性値とした。

[0084] （5）178-181位における2アミノ酸欠失変異体の安定性評価

実施例（1）に記載の方法によりYR288（配列番号2）を親ポリペプチドとして図1に記載の変異体を構築した。イオン交換水で10%（v/v）に希釈した市販の液体衣料用洗剤（花王株式会社、アタック3X）に酵素

溶液を添加し、50℃で15分間インキュベートした後に活性測定を行った。50℃処理後のサンプルの活性値を50℃処理前のサンプルの活性値で割り100をかけることで残存活性(%)を算出した。R178、G179、T180、G181のうち任意の2残基を欠失させることで安定性が大きく向上した(図1)。

[0085] (6) 洗浄力評価

直径5.5mmの円形に裁断したCS-26汚染布をCFT社から入手して使用した。96穴アッセイプレートの各ウェルにCS-26円形汚染布を2枚ずつ挿入し、水道水で3000倍に希釈した市販の液体衣料用洗剤(花王株式会社、アタックゼロ)を200μLずつ加えた。水道水で3ppmに希釈した酵素溶液を10μLずつ添加し、シールをして20℃でキュートミキサーを用いて1200rpm、15分間振盪した。洗浄終了後、100μLの洗浄液を新たな96穴アッセイプレートに移し、488nmの吸光度を測定した。酵素溶液のかわりに水道水を加えたものをblankとし、blankとの差分ΔA488を洗浄力として求めた。各変異体のΔA488を親ポリペプチドのΔA488で割ることで相対洗浄力を求めた。

[0086] (7) 安定性評価

イオン交換水で10%(v/v)に希釈した市販の液体衣料用洗剤(花王株式会社、アタック3X又は花王株式会社、アタックゼロ)に酵素溶液を添加し、50℃で30分間~18時間インキュベートした後に活性測定を行った。50℃処理前のサンプルの活性値を初発活性として、50℃処理による単位時間(h)当たりの失活速度を算出し、そこから半減期(h)を計算した。各変異体の半減期(h)を親ポリペプチドの半減期(h)で割ることで相対安定性を求めた。

[0087] (8) 変異スクリーニング

実施例(1)に記載の方法によりYR288 R178Δ+T180Δ(配列番号4)を親ポリペプチドとして様々な変異体を構築した。実施例(6)及び(7)に記載の方法によって変異体の性能を評価した。相対洗浄力及び

／又は相対安定性が1.1以上である場合に性能が向上したとみなした。以下の変異体では性能が向上した。

[0088] G5E、G5D、G5P、G5R、G5K、S38N、T49Q、Q96R、Q96K、N126Y、T129I、G140Y、G140F、G140W、F153W、Q167E、G179D、G179H、W186L、E187P、N192F、M199L、M199T、M199A、M199N、M199Q、M199S、M199V、M199I、Y200G、L203Y、L203M、L203F、Y205F、D206R、D206E、D206N、D206T、D206G、R211V、R211L、R211I、K215F、H240F、S241A、S241Q、S241D、Y242F、G244K、G244W、G244L、G244R、E257T、F259W、H283Q、S284W、A288F、H295Y、Y296A、N303R、N303E、N303S、N303G、N303V、N303D、N303T、N303A、T320D、T320E、S331T、L348I、Y360C、Y360M、Y360L、Y360V、W408P、L429V、V430M、G433GS、A434V、W439R、N471T、G476A、G476P、G476E、G476S、G476F、G476R、G476K、G477E

[0089] (9) 多重変異体の洗浄力評価

実施例(1)に記載の方法により、YR288 R178 Δ +T180 Δ (配列番号4)を親ポリペプチドとして実施例(8)で得られた変異を2つ以上含む様々な変異体を構築した。実施例(6)に記載の方法によって変異体の洗浄力を評価した。以下にその結果を示す。

[0090]

[表4-1]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相对洗净力
G5R+W186L+E257T	2.7
G5R+E257T+G433GS	2.6
G5R+Y360L+G433GS	3
G5R+Q96K+E257T	2.5
G5R+Y360L+W408P	2.6
G5R+F259W+S284W	1.8
G5R+W186L+F259W	1.2
G5R+S284W+T320E	2.5
Q96K+F259W+G433GS	3
Q96K+W186L+W439R	3.2
Q96K+W186L+E257T	1.2
Q96K+W408P+N471T	2.6
Q96K+E257T+W408P	2.1
Q96K+W408P+G433GS	3
Q96K+F259W+N471T	2.8
Q96K+Y360L+A434V	2.6
Q96K+F259W+W408P	2.9
W186L+E257T+Y360L	2.8
W186L+W408P+N471T	1.7
W186L+E257T+W408P	1.3
W186L+E257T+N471T	2.5
E257T+A434V+N471T	1.1
E257T+W408P+A434V	2.1
F259W+S284W+W439R	1.7
F259W+S284W+Y360L	2.2
F259W+T320E+G433GS	2.3
S284W+T320E+Y360L	1.9
S284W+W408P+G433GS	2.6
S284W+T320E+A434V	2.2
T320E+Y360L+G433GS	1.8

[0091]

[表4-2]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相对洗净力
T320E+W439R+N471T	1.9
T320E+G433GS+N471T	2.1
T320E+Y360L+W439R	2.6
Y360L+A434V+N471T	2.2
G5R+S284W+W439R	3.1
Q96K+E257T+T320E+W408P	2.6
Q96K+E257T+W408P+A434V	2.1
Q96K+E257T+W408P+N471T	2.5
Q96K+E257T+T320E+W408P+A434V	2.9
Q96K+E257T+T320E+W408P+N471T	2.9
Q96K+T320E+Y360L+W408P+A434V	2.3
Q96K+T320E+Y360L+A434V+N471T	2.1
E257T+T320E+W408P+A434V+N471T	2.8
G5R+Q96K+W186L+E257T+T320E+W439R	2.3
G5R+Q96K+W186L+E257T+S284W+G433GS	1.4
G5R+F259W+S284W+T320E+W439R+N471T	2.5
G5R+Q96K+W186L+Y360L+W408P+G433GS	3.3
G5R+Q96K+W186L+E257T+W408P+W439R	1.9
G5R+Q96K+F259W+Y360L+W408P+W439R	3
G5R+E257T+F259W+S284W+Y360L+N471T	2.8
G5R+Q96K+W186L+F259W+Y360L+G433GS	3.2
G5R+F259W+S284W+T320E+Y360L+A434V	2.2
Q96K+E257T+F259W+T320E+G433GS+N471T	2.8
Q96K+W186L+E257T+S284W+W439R+N471T	3.1
Q96K+S284W+T320E+W408P+W439R+N471T	3
Q96K+W186L+E257T+W408P+A434V+N471T	3.3
Q96K+W186L+F259W+Y360L+W439R+N471T	3.4
G5R+Q96K+Y360L+W408P+G433GS	3.1
G5R+Q96K+F259W+Y360L+G433GS	3.1
Q96K+F259W+Y360L+W439R+N471T	3

[0092]

[表4-3]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相对洗净力
Q96K+E257T+W408P+A434V+N471T	2.6
E257T+Y360L	2.6
E257T+Y360L+W408P	2.8
E257T+Y360L+G476K	3.1
E257T+Y360L+W408P+G476K	3.3
G5R+S38N	2.2
Q96K+S38N	2.1
S38N+E257T	2.2
S38N+F259W	2.2
S38N+S284W	2.6
S38N+T320D	2.4
S38N+T320E	2
S38N+Y360L	2.3
S38N+W408P	2
S38N+N471T	2
S38N+G476A	1.9
S38N+G476K	2.2
S38N+G476E	1.9
S38N+N471T+G476K	2.5
S38N+N471T+G476K+G477E	2.6
E257T+Y360C	1.9
E257T+Y360M	2.5
E257T+Y360V	2.3
E257T+G476K+Y360C	2.5
E257T+G476K+Y360M	3.1
E257T+G476K+Y360V	2.7
G5R+W186L	3.1
G5R+E257T	1.8
G5R+Y360L	2
S284W+T320E	2
Q96K+F259W	2.2

[0093]

[表4-4]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相対洗浄力
Q96K+W186L	2
Q96K+W408P	2.1
G5R+S284W	2.4
G5R+W439R	3
S38N+S284W	2.6
S38N+T320D	2.4

[0094] (10) 多重変異体の安定性評価

実施例（1）に記載の方法により、Y R 2 8 8 R 1 7 8 Δ+T 1 8 0 Δ（配列番号4）を親ポリペプチドとして実施例（8）で得られた変異を2つ以上含む様々な変異体を構築した。実施例（7）に記載の方法によって変異体の安定性を評価した。以下にその結果を示す。

[0095]

[表5-1]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相对安定性
F205Y+H240F+Y242F	17.1
N192F+F205Y+H240F+Y242F	34.6
E187P+N192F	66.3
H240F+Y242F	9.7
H240F+Y242F+S331T	15.7
N126Y+T129I+L203Y+F205Y	4.3
N126Y+T129I+H240F+Y242F+G244W	27.2
N126Y+T129I+H283Q+A288F	7
H240F+Y242F+G244W	9.6
H240F+G244W	7.8
Y242F+G244W	1.8
L203Y+F205Y	1.7
N126Y+T129I	2.5
H283Q+A288F	2.8
S241Q+Y242F	7.5
S241F+G244W	8.2
S241Q+Y242F+G244W	7.7
H240F+S241Q+G244W	40
H240F+S241Q+Y242F	39.7
T129I+E187P+G244W+S331T	40.7
S241Q+H283Q+A288F+S331T	10.4
N126Y+T129I+G140W+E187P	61.6
N126Y+G179D+N192F+L203Y	3.1
N126Y+F205Y+Y242F+A288F	5.7
L203Y+R211I+Y242F+H283Q	3.3
G179D+E187P+R211I+H240F	44.6
G140W+L203Y+Y242F+G244W	2.7
H240F+S241Q+Y242F+G244W	38.7
F205Y+H240F+S241Q	47.3
F205Y+H240F+S241Q+Y242F	57.9

[0096]

[表5-2]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相对安定性
F205Y+S241Q	7.8
E187P+H240F+S241Q	38.9
E187P+H240F+S241Q+Y242F	43
E187P+S241Q+Y242F	18
E187P+H240F+Y242F	73.5
N126Y+E187P	62.1
T129I+E187P	36.7
G140W+E187P	36.7
E187P+L203Y	42.6
E187P+F205Y	35.3
E187P+S241Q	34.6
E187P+Y242F	36.9
E187P+G244W	36.6
E187P+H283Q	34.5
E187P+S331T	44.6
N126Y+T129I+E187P	64.7
E187P+N192F+F205Y+H240F+Y242F	99.2
M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	112.9
H240F+S241Q	33
E187P+R211I	61.1
E187P+N192F+M199L	88.1
E187P+F205Y+H240F+Y242F	81.7
E187P+N192F+Y242F	61.1
E187P+N192F+R211I	119.6
E187P+N192F+M199L+R211I	88.4
E187P+N192F+F205Y+Y242F	70.6
E187P+N192F+F205Y+H240F+Y242F	77.9

[0097]

[表5-3]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相对安定性
N192F+S241Q	7.9
N192F+H240F+S241Q	60.7
N192F+F205Y+H240F+S241Q	71.3
N192F+F205Y+H240F+S241Q+Y242F	69.9
R211I+H240F+S241Q	76.3
R211I+H240F+S241Q+Y242F	77.2
F205Y+R211I+H240F+S241Q	83
F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	94.8
G179H+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	99.8
G179H+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	76.2
G179H+F205Y+H240F+S241Q+Y242F	56.7
G179H+E187P+N192F	65.7
E187P+M199L	45.3
M199L+H240F+S241Q	40.6
F205Y+H240F+S241A	17.1
F205Y+H240F+S241D	87.4
H240F+S241A	15.1
H240F+S241D	77
N126Y+R211I	5.2
N126Y+H240F	13.1
E187P+H240F	76.9
N192F+F205Y	3.6
N192F+R211I	9.2
N192F+H240F	20
F205Y+R211I	6.4
F205Y+H240F	12.1
R211I+H240F	23
R211I+S241Q	18
R211I+Y242F	5.8

[0098]

[表5-4]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相対安定性
N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	84.8
G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	147.8
N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	116.7
G179H+N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	98.7
N192F+R211I+H240F+S241Q+Y242F	107.8
N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q	102.6

[0099] 実施例（1）に記載の方法により、Y R 2 8 8 R 1 7 8 Δ+T 1 8 0 Δ（配列番号4）を親ポリペプチドとして様々な変異体を構築した。実施例（7）に記載の方法によって変異体の安定性を評価した。以下にその結果を示す。

[0100]

[表5-5]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相対安定性
E187P+K278L	81.8
E187P+K278D	56.5
E187P+K278W	106
E187P+K278I	82.2
E187P+K278H	80.3
E187P+K278S	54.1
E187P+K278T	63.4
E187P+K278N	47.5
E187P+K278Q	62.1
E187P+K278V	63
E187P+K278A	50.1
E187P+K278Y	114.9
E187P+K278F	102.4
E187P+S241L+K278W	131.2
E187P+S241Y+K278I	75.1
E187P+S241P+K278W	40.7
E187P+S241L+K278I	37.9
E187P+S241P+K278I	102.6
E187P+S241Y+K278W	47.6
E187P+S241F+K278W	78.6
E187P+S241Y+K278Y	109.7
E187P+S241Y+K278F	105.8
E187P+S241Y+K278H	47.9
E187P+S241Y+K278L	49.8
E187P+S241H+K278W	96.6

[0101] (11) 多重変異体の洗浄力及び安定性の評価

実施例（1）に記載の方法により、Y R 2 8 8 R 1 7 8 Δ+T 1 8 0 Δ（配列番号4）を親ポリペプチドとして実施例（9）で得られた多重変異及び実施例（10）で得られた多重変異を含む様々な変異体を構築した。実施例（6）及び（7）に記載の方法によって変異体の性能を評価した。以下にその結果を示す。

[0102]

[表6]

酵素（親：R178Δ+T180Δ（配列番号4））	相対 洗浄力	相対 安定性
G5R+E187P+N192F+S284W+W439R	2.9	58.3
G5R+E187P+N192F+Y360L+G433GS	2.8	54.3
Q96K+E187P+N192F+F259W+G433GS	2.5	69.7
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L	2.4	47.6
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P	2.6	49.1
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+G476K	3.1	48.1
F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L	2.3	74.9
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K	3	45.8
M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K	2.9	57.3
M199L+F205Y+H240F+Y242F+E257T+Y360L+S241Q+G476K	2.8	54.7
M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K	2.8	104.6
M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+S331T+Y360L+W408P+G476K	2.7	66.5
N126Y+M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K	2.8	79.8
G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K	3	115.2
S38N+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+N471T+G476K+G477E	2.1	113.3
Q96K+E187P+N192F+R211I+F259W+G433GS	3.3	169.4
S38N+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+N471T+G476K+G477E	2.2	100.4
Q96K+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+F259W+G433GS	2.5	274.4
E187P+N192F+R211I+E257T+Y360L+W408P+G476K	3.5	107.8
Q96K+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+F259W+G433GS	2.8	182.7
G5R+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+S284W+W439R	2.8	104.4
G5R+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+S284W+W439R	2.4	146

[0103] (12) 多重変異体の洗浄力及び安定性の評価

実施例（1）に記載の方法により、YR288 R178Δ+G179Δを親ポリペプチドとして下記の変異体を構築した。実施例（6）及び（7）に記載の方法によって変異体の性能を評価した。以下にその結果を示す。

[0104]

[表7]

酵素（親：R178Δ+G179Δ）	相对 洗净力	相对 安定性
G5R+E187P+N192F+S284W+W439R	2.7	59.4
G5R+E187P+N192F+Y360L+G433GS	2.7	58.4
Q96K+E187P+N192F+F259W+G433GS	2.5	75.2
G5R+E187P+N192F+M199L+S284W+W439R	2.2	67.9
E187P+M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+G476K+W408P	3.2	57.4
G5R+Q96K+E187P+N192F+M199L+Y242F+F259W+S331T+Y360L+W439R	2	83.5
G5R+Q96K+E187P+N192F+M199L+R211I+Y242F+F259W+Y360L+W439R	2.9	200.4
M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K	3.1	116

請求の範囲

[請求項1] 配列番号2で示されるアミノ酸配列のG5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置の1又は複数箇所のアミノ酸残基の改変を含む、親 α -アミラーゼの変異体であって、前記親 α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ変異体は配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、 α -アミラーゼ変異体。

[請求項2] 前記G5、S38、T49、Q96、N126、T129、G140、F153、Q167、G179、W186、E187、N192、M199、Y200、L203、Y205、D206、R211、K215、H240、S241、Y242、G244、E257、F259、K278、H283、S284、A288、H295、Y296、N303、T320、S331、L348、Y360、W408、L429、V430、G433、A434、W439、N471、G476及びG477の各位置に相当する位置のアミノ酸残基の改変が、それぞれG5E/D/P/R/K、S38N、T49Q、Q96R/K、N126Y、T129I、G140Y/F/W、F153W、Q167E、G179D/H、W186L、E187P、N192F、M199L/T/A/N/Q/S/V/I、Y200G、L203Y/M/F、Y205F、D206R/E/N/T/G、R211V/L/I、K215F、H240F、S241A/Q/D/L/Y/P/H、Y242F、G244K/W/L/R、E257T、F

259W、K278L/D/W/I/H/S/T/N/Q/V/A/Y/F、H283Q、S284W、A288F、H295Y、Y296A、N303R/E/S/G/V/D/T/A、T320D/E、S331T、L348I、Y360C/M/L/V、W408P、L429V、V430M、G433GS、A434V、W439R、N471T、G476A/P/E/S/F/R/K及びG477Eである、請求項1に記載の変異体。

[請求項3] アミノ酸残基の改変が2箇所以上の改変である、請求項1又は2に記載の変異体。

[請求項4] 変異体が、下記表1-1～1-4で示される変異の組み合わせから選ばれる変異を少なくとも含む、請求項1又は2に記載の変異体。

〔表 1 - 1〕	〔表 1 - 2〕
G5R+W186L+E257T	T320E+W439R+N471T
G5R+E257T+G433GS	T320E+G433GS+N471T
G5R+Y360L+G433GS	T320E+Y360L+W439R
G5R+Q96K+E257T	Y360L+A434V+N471T
G5R+Y360L+W408P	G5R+S284W+W439R
G5R+F259W+S284W	Q96K+E257T+T320E+W408P
G5R+W186L+F259W	Q96K+E257T+W408P+A434V
G5R+S284W+T320E	Q96K+E257T+W408P+N471T
Q96K+F259W+G433GS	Q96K+E257T+T320E+W408P+A434V
Q96K+W186L+W439R	Q96K+E257T+T320E+W408P+N471T
Q96K+W186L+E257T	Q96K+T320E+Y360L+W408P+A434V
Q96K+W408P+N471T	Q96K+T320E+Y360L+A434V+N471T
Q96K+E257T+W408P	E257T+T320E+W408P+A434V+N471T
Q96K+W408P+G433GS	G5R+Q96K+W186L+E257T+T320E+W439R
Q96K+F259W+N471T	G5R+Q96K+W186L+E257T+S284W+G433GS
Q96K+Y360L+A434V	G5R+F259W+S284W+T320E+W439R+N471T
Q96K+F259W+W408P	G5R+Q96K+W186L+Y360L+W408P+G433GS
W186L+E257T+Y360L	G5R+Q96K+W186L+E257T+W408P+W439R
W186L+W408P+N471T	G5R+Q96K+F259W+Y360L+W408P+W439R
W186L+E257T+W408P	G5R+E257T+F259W+S284W+Y360L+N471T
W186L+E257T+N471T	G5R+Q96K+W186L+F259W+Y360L+G433GS
E257T+A434V+N471T	G5R+F259W+S284W+T320E+Y360L+A434V
E257T+W408P+A434V	Q96K+E257T+F259W+T320E+G433GS+N471T
F259W+S284W+W439R	Q96K+W186L+E257T+S284W+W439R+N471T
F259W+S284W+Y360L	Q96K+S284W+T320E+W408P+W439R+N471T
F259W+T320E+G433GS	Q96K+W186L+E257T+W408P+A434V+N471T
S284W+T320E+Y360L	Q96K+W186L+F259W+Y360L+W439R+N471T
S284W+W408P+G433GS	G5R+Q96K+Y360L+W408P+G433GS
S284W+T320E+A434V	G5R+Q96K+F259W+Y360L+G433GS
T320E+Y360L+G433GS	Q96K+F259W+Y360L+W439R+N471T

〔表 1 - 3〕	〔表 1 - 4〕
Q96K+E257T+W408P+A434V+N471T	Q96K+W186L
E257T+Y360L	Q96K+W408P
E257T+Y360L+W408P	G5R+S284W
E257T+Y360L+G476K	G5R+W439R
E257T+Y360L+W408P+G476K	S38N+S284W
G5R+S38N	S38N+T320D
Q96K+S38N	
S38N+E257T	
S38N+F259W	
S38N+S284W	
S38N+T320D	
S38N+T320E	
S38N+Y360L	
S38N+W408P	
S38N+N471T	
S38N+G476A	
S38N+G476K	
S38N+G476E	
S38N+N471T+G476K	
S38N+N471T+G476K+G477E	
E257T+Y360C	
E257T+Y360M	
E257T+Y360V	
E257T+G476K+Y360C	
E257T+G476K+Y360M	
E257T+G476K+Y360V	
G5R+W186L	
G5R+E257T	
G5R+Y360L	
S284W+T320E	
Q96K+F259W	

[請求項5] 変異体が、下記表 2 - 1 ~ 2 - 4 で示される変異の組み合わせから選ばれる変異を少なくとも含む、請求項 1 又は 2 に記載の変異体。

〔表 2 - 1〕	〔表 2 - 2〕
F205Y+H240F+Y242F	F205Y+S241Q
N192F+F205Y+H240F+Y242F	E187P+H240F+S241Q
E187P+N192F	E187P+H240F+S241Q+Y242F
H240F+Y242F	E187P+S241Q+Y242F
H240F+Y242F+S331T	E187P+H240F+Y242F
N126Y+T129I+L203Y+F205Y	N126Y+E187P
N126Y+T129I+H240F+Y242F+G244W	T129I+E187P
N126Y+T129I+H283Q+A288F	G140W+E187P
H240F+Y242F+G244W	E187P+L203Y
H240F+G244W	E187P+F205Y
Y242F+G244W	E187P+S241Q
L203Y+F205Y	E187P+Y242F
N126Y+T129I	E187P+G244W
H283Q+A288F	E187P+H283Q
S241Q+Y242F	E187P+S331T
S241F+G244W	N126Y+T129I+E187P
S241Q+Y242F+G244W	E187P+N192F+F205Y+H240F+Y242F
H240F+S241Q+G244W	M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
H240F+S241Q+Y242F	H240F+S241Q
T129I+E187P+G244W+S331T	E187P+R211I
S241Q+H283Q+A288F+S331T	E187P+N192F+M199L
N126Y+T129I+G140W+E187P	E187P+F205Y+H240F+Y242F
N126Y+G179D+N192F+L203Y	E187P+N192F+Y242F
N126Y+F205Y+Y242F+A288F	E187P+N192F+R211I
L203Y+R211I+Y242F+H283Q	E187P+N192F+M199L+R211I
G179D+E187P+R211I+H240F	E187P+N192F+F205Y+Y242F
G140W+L203Y+Y242F+G244W	E187P+N192F+F205Y+H240F+Y242F
H240F+S241Q+Y242F+G244W	
F205Y+H240F+S241Q	
F205Y+H240F+S241Q+Y242F	

(表2-3)	(表2-4)
N192F+S241Q	N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
N192F+H240F+S241Q	G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
N192F+F205Y+H240F+S241Q	N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
N192F+F205Y+H240F+S241Q+Y242F	G179H+N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F
R211I+H240F+S241Q	N192F+R211I+H240F+S241Q+Y242F
R211I+H240F+S241Q+Y242F	N192F+F205Y+R211I+H240F+S241Q
F205Y+R211I+H240F+S241Q	E187P+K278L
F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	E187P+K278D
G179H+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	E187P+K278W
G179H+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F	E187P+K278I
G179H+F205Y+H240F+S241Q+Y242F	E187P+K278H
G179H+E187P+N192F	E187P+K278S
E187P+M199L	E187P+K278T
M199L+H240F+S241Q	E187P+K278N
F205Y+H240F+S241A	E187P+K278Q
F205Y+H240F+S241D	E187P+K278V
H240F+S241A	E187P+K278A
H240F+S241D	E187P+K278Y
N126Y+R211I	E187P+K278F
N126Y+H240F	E187P+S241L+K278W
E187P+H240F	E187P+S241Y+K278I
N192F+F205Y	E187P+S241P+K278W
N192F+R211I	E187P+S241L+K278I
N192F+H240F	E187P+S241P+K278I
F205Y+R211I	E187P+S241Y+K278W
F205Y+H240F	E187P+S241F+K278W
R211I+H240F	E187P+S241Y+K278Y
R211I+S241Q	E187P+S241Y+K278F
R211I+Y242F	E187P+S241Y+K278H
	E187P+S241Y+K278L
	E187P+S241H+K278W

[請求項6]

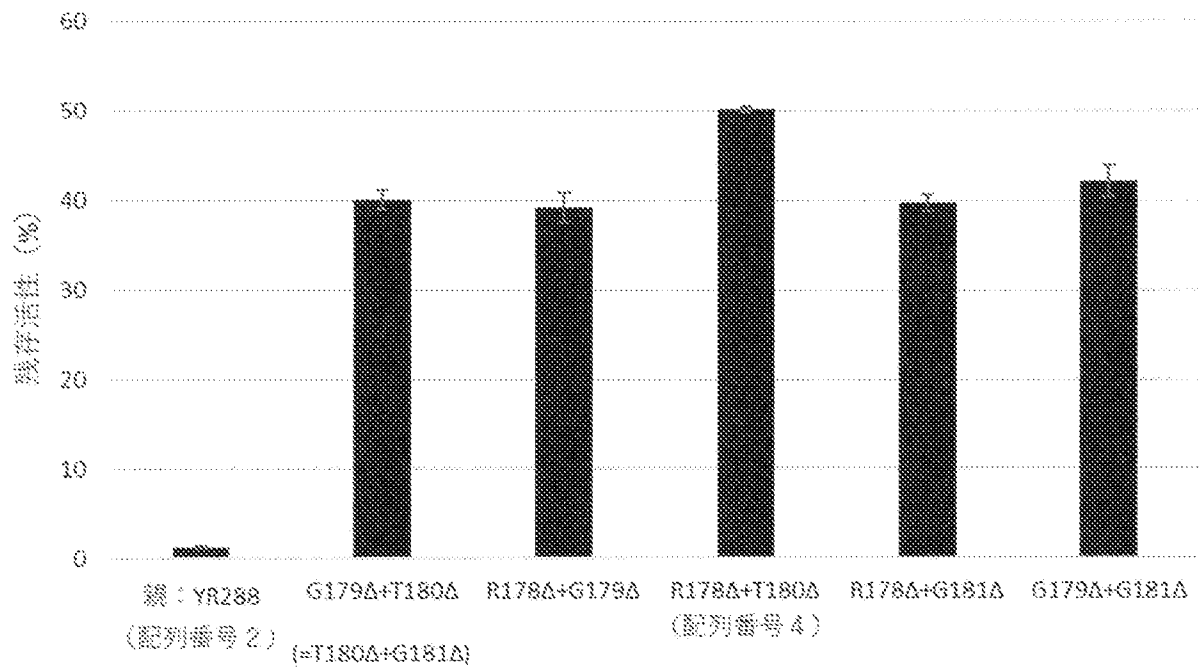
変異体が、下記表3で示される変異の組み合わせから選ばれる変異を少なくとも含む、請求項1又は2に記載の変異体。

(表 3)
G5R+E187P+N192F+S284W+W439R
G5R+E187P+N192F+Y360L+G433GS
Q96K+E187P+N192F+F259W+G433GS
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+G476K
F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L
F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
M199L+F205Y+H240F+Y242F+E257T+Y360L+S241Q+G476K
M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+S331T+Y360L+W408P+G476K
N126Y+M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
E187P+M199L+F205Y+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+G476K+W408P
G5R+Q96K+E187P+N192F+M199L+Y242F+F259W+S331T+Y360L+W439R
G5R+Q96K+E187P+N192F+M199L+R211I+Y242F+F259W+Y360L+W439R
G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+E257T+Y360L+W408P+G476K
S38N+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+N471T+G476K+G477E
Q96K+E187P+N192F+R211I+F259W+G433GS
S38N+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+N471T+G476K+G477E
Q96K+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+F259W+G433GS
E187P+N192F+R211I+E257T+Y360L+W408P+G476K
Q96K+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+F259W+G433GS
G5R+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+S284W+W439R
G5R+G179H+N192F+M199L+F205Y+R211I+H240F+S241Q+Y242F+S284W+W439R

- [請求項7] 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の変異体をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項8] 請求項 7 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター又は DNA 断片。
- [請求項9] 請求項 8 に記載のベクター又は DNA 断片を含有する形質転換細胞。
- [請求項10] 微生物である、請求項 9 に記載の形質転換細胞。
- [請求項11] 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の変異体を含む洗浄剤組成物。
- [請求項12] 衣料洗浄剤又は食器洗浄剤である、請求項 1 1 に記載の洗浄剤組成物。
- [請求項13] 粉末又は液体である、請求項 1 2 に記載の洗浄剤組成物。
- [請求項14] 低温で使用される、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の洗浄剤組成物。

[請求項15] 5～40℃の温度で使用される、請求項14に記載の洗浄剤組成物
。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/036011

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/56</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/15</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/19</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/21</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/28</i>(2006.01)i FI: C12N15/56 ZNA; C12N9/28; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/56; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/28		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed, Japio-GPG/FX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	alpha-amylase [Bacillus sp. SGD-V-76], Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 15 October 2021], 04 December 2015, Accession No. KSU86317, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KSU86317 pages 1, 2	1-3
Y	pages 1, 2	1-15
X	alpha-amylase [Bacillus sp. CBEL-1], Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 15 October 2021], 13 March 2019, Accession No. TDB53832, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/TDB53832 pages 1, 2	1, 3
Y	pages 1, 2	1-15
Y	JP 2020-510712 A (PROCTER & GAMBLE CO.) 09 April 2020 (2020-04-09) claims 1-18, paragraphs [0008], [0221]	1-15
Y	JP 2020-506698 A (NOVOZYMES A/S) 05 March 2020 (2020-03-05) claims 1-21, paragraph [0008]	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 19 October 2021		Date of mailing of the international search report 02 November 2021
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/036011

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-520517 A (NOVOZYMES A/S) 25 August 2014 (2014-08-25) claims 1-17, paragraph [0222]	1-15
Y	alpha-amylase [Bacillus sp. YR288]., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 15 October 2021], 28 November 2017, Accession No. PJJ22460, https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/PJJ22460.1?report=genpept page 1	1-15

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2021/036011

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2020-510712 A	09 April 2020	WO 2018/144399 A1 claims 1-18, page 2, paragraph [0002], page 51, paragraph [0002]	
JP 2020-506698 A	05 March 2020	WO 2018/141707 A2 claims 1-21, page 2, paragraph [0002] US 2019/0345470 A1 EP 3577219 A1	
JP 2014-520517 A	25 August 2014	WO 2013/001087 A2 claims 1-17, page 37, paragraph [0001] US 2014/0206026 A1 EP 2726500 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/56(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 9/28(2006.01)i FI: C12N15/56 ZNA; C12N9/28; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/56; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/28</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年									
<p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed, Japio-GPG/FX</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	alpha-amylase [Bacillus sp. SGD-V-76]., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2021-10-15], 2015.12.04, Accession No. KSU86317, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KSU86317 第1頁-第2頁	1-3								
Y	第1頁-第2頁	1-15								
X	alpha-amylase [Bacillus sp. CBEL-1]., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2021-10-15], 2019.03.13, Accession No. TDB53832, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/TDB53832 第1頁-第2頁	1,3								
Y	第1頁-第2頁	1-15								
Y	JP 2020-510712 A (ザ プロクター アンド ギャンブル カンパニー) 09.04.2020 (2020-04-09) 請求項1-18、[0008]、[0221]	1-15								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
* 引用文献のカテゴリー	<p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p>									
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	<p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p>									
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	<p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p>									
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	<p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>									
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献										
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日									
19.10.2021	02.11.2021									
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）									
日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	福澤 洋光 4B 3963									
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2020-506698 A (ノボザイムス アクティーゼルスカブ) 05.03.2020 (2020 - 03 - 05) 請求項 1 - 21、 [0008]	1-15
Y	JP 2014-520517 A (ノボザイムス アクティーゼルスカブ) 25.08.2014 (2014 - 08 - 25) 請求項 1 - 17、 [0222]	1-15
Y	alpha-amylase [Bacillus sp. YR288]., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2021-10-15], 2017.11.28, Accession No. PJJ22460, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/PJJ22460.1?report=genpept 第1頁	1-15

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/036011

引用文献			公表日	パテントファミリー文献		公表日
JP	2020-510712	A	09.04.2020	WO	2018/144399 A1	
				請求項 1 - 18、第 2 頁第 2 段落、第 5 頁第 2 段落		
JP	2020-506698	A	05.03.2020	WO	2018/141707 A2	
				請求項 1 - 21、第 2 頁第 2 段落		
				US	2019/0345470 A1	
				EP	3577219 A1	
JP	2014-520517	A	25.08.2014	WO	2013/001087 A2	
				請求項 1 - 17、第 3 頁第 1 段落		
				US	2014/0206026 A1	
				EP	2726500 A1	