

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5133899号

(P5133899)

(45) 発行日 平成25年1月30日 (2013. 1. 30)

(24) 登録日 平成24年11月16日 (2012. 11. 16)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/20 (2006. 01)

C 1 2 N 9/20

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 8 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-551567 (P2008-551567)
 (86) (22) 出願日 平成19年1月22日 (2007. 1. 22)
 (65) 公表番号 特表2009-523455 (P2009-523455A)
 (43) 公表日 平成21年6月25日 (2009. 6. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/060841
 (87) 国際公開番号 W02007/087508
 (87) 国際公開日 平成19年8月2日 (2007. 8. 2)
 審査請求日 平成21年12月1日 (2009. 12. 1)
 (31) 優先権主張番号 60/761, 109
 (32) 優先日 平成18年1月23日 (2006. 1. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/854, 891
 (32) 優先日 平成18年10月27日 (2006. 10. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500586299
 ノボザイムス アクティーゼルスカブ
 デンマーク国, デーコー 2880 バグ
 スバエルト, クロシェイバイ 36
 (73) 特許権者 500175602
 ノボザイムス, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 956
 16-4880, ディビス, ドリュウ ア
 ベニユ 1445
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リパーゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親リパーゼの変異体において、

当該親リパーゼは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そしてリパーゼ活性を有するポリペプチドであり、そして

当該リパーゼ変異体が、I86V、L227G、T231R、N233R、及びP256Kの変異を含み、そして配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に 2 個の変異T231R、及びN233Rを含む参照ポリペプチドに比べて高い、悪臭の危険性に対する洗浄性能 [BR] を有する、

ことを特徴とするリパーゼ変異体。

【請求項 2】

下記の変異：

- (27) S58N+V60S+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K；
- (38) S58A+V60S+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K；
- (39) D27R+S58N+V60S+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K；
- (40) V60K+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K；
- (41) Q4V+S58A+V60S+S83T+I86V+A150G+E210K+L227G+T231R+N233R+P256K；
- (42) Q4V+V60K+S83T+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K；
- (43) D27R+V60K+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K；
- (44) Q4N+L6S+S58N+V60S+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K；

10

20

- (45) E1N+V60K+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K ;
- (54) S58N+V60S+I86V+A150G+E210K+L227G+T231R+N233R+Q249R+P256K ;
- (55) S58N+V60S+I86V+A150G+E210K+L227G+T231R+N233R+ I255A+ P256K ;
- (56) S58N+V60S+I86V+A150G+G156R+E210K+L227G+T231R+N233R+I255A+P256K ;
- (57) S58T+V60K+I86V+N94K+A150G+E210V+L227G+T231R+N233R+P256K ;
- (58) S58T+V60K+I86V+D102A+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K ;
- (59) S58T+V60K+I86V+D102A+A150G+E210V+L227G+T231R+N233R+P256K ;
- (60) S58T+V60K+S83T+I86V+N94K+A150G+E210V+L227G+T231R+N233R+P256K ; 又は
- (61) S58A+V60S+I86V+T143S+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K ;

のいずれかを含む、請求項 1 に記載のリパーゼ変異体。

10

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のリパーゼ変異体をコードする DNA。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の DNA を含んで成る発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の DNA 又は請求項 4 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 に記載のリパーゼ変異体の製造方法において、

- (1) 請求項 5 に記載の宿主細胞を培養し；そして
 - (2) 培養物からリパーゼ変異体を回収する；
- ことを含んで成る方法。

20

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載のリパーゼ変異体を含んで成る洗浄用組成物。

【請求項 8】

洗濯洗剤である、請求項 7 に記載の洗浄用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

30

本発明は、リパーゼ変異体に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景：

リパーゼは、例えば布及び他の織布から脂質又は脂肪しみを除去するための洗剤酵素として、パン及び他のベーカリー製品のための生地への添加物として有用である。従って、サーモミセス・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) (別名ヒューミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*)、EP258068号及びEP305216号) に由来するリパーゼは、商品名 Lipolase (商標) (NOVO Nordisk A/S の製品) としての洗剤使用のために市販されている。WO0060063号は、洗剤溶液において特に良好な第一洗浄性能を有する T. ラヌギノサスの変異体を記載する。WO9704079号、WO9707202号及びWO0032758号はまた、T. ラヌギノサスリパーゼの変異体を開示する。

40

【0003】

いくつかの出願においては、臭気生成短鎖脂肪酸の形成を最少にすることに興味を示している。従って、リパーゼを有する洗濯洗剤が時々、牛乳により汚された布に結合される残留臭気を除去することが知られている (EP430315号)。WO02062973号は、リパーゼ変異体を開示し、ここで臭気発生が C - 末端延長の結合により低められた。

【発明の開示】

【0004】

発明の要約：

50

本発明者は、リパーゼの一定の領域/位置における突然変異の導入により、リパーゼの性質又は特徴を改良することが可能であることを見出した。

好ましい態様においては、本発明は、洗剤への使用のための改良された性質を有するリパーゼに関する。例えば、本発明は、親リパーゼにおいて同定される1又は複数の領域への突然変異の導入により得られる、臭気発生への低められた傾向を有する変異体を供給する。もう1つの好ましい態様においては、本発明は、親リパーゼに比較して、C-末端延長の結合を伴わないで臭気発生についての低められた可能性を有するリパーゼ変異体を供給する。

【0005】

好ましい観点においては、本発明は、本発明のリパーゼ変異体をコードするDNA配列、前記DNA配列を有する発現ベクター、及び前記DNA配列又は発現ベクターを含む形質転換された宿主細胞に関する。

10

もう1つの観点においては、本発明は、本発明のリパーゼ変異体の生成方法を提供する。

【0006】

配列表：

配列番号1は、サーモミセス・ラヌギノサスからのリパーゼをコードするDNA配列を示す。

配列番号2は、サーモミセス・ラヌギノサスからのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号3は、アブシジア・レフレキサ (*Absidia reflexa*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

20

配列番号4は、アブシジア・コリムベフェラ (*Absidia corymbifera*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号5は、リズムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

【0007】

配列番号6は、リゾパス・オリザエ (*Rhizopus oryzae*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号7は、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

30

配列番号8は、アスペルギラス・ツビゲンシス (*Aspergillus tubigenensis*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号9は、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号10は、フサリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

【0008】

配列番号11は、アスペルギラス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号12は、ペニシリウム・カメムベルチ (*Penicillium camemberti*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

40

配列番号13は、アスペルギラス・フォエチダス (*Aspergillus foetidus*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号14は、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号15は、アスペルギラス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号16は、ランデリナ・ペニサポラ (*Landerina penisapora*) からのリパーゼのアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 0 9 】

発明の特定の記載：

親リパーゼ：

いずれかの適切な親リパーゼが使用され得る。好ましい態様においては、親リパーゼは菌類リパーゼであり得る。もう1つの好ましい態様においては、親リパーゼは、セクション“ 相同性及び一列整列 ”において定義されるように、配列番号2で示されるT. ラヌギノサスリパーゼの配列に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の相同性を有するアミノ酸配列を有するリパーゼであり得る。

【 0 0 1 0 】

親リパーゼは、酵母ポリペプチド、例えばカンジダ (*Candida*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 又はヤロウィア (*Yarrowia*) ポリペプチド；又はより好ましくは糸状菌ポリペプチド、例えばアクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギラス (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*)、クリプトコカス (*Cryptococcus*)、フィロバシジウム (*Filobasidium*)、ヒューミコラ (*Humicola*)、マグナポルテ (*Magnaporthe*)、ムコル (*Mucor*)、マイセリオブソラ (*Myceliophthora*)、ネオカリマスフィックス (*Neocallimastix*)、ネウロスボラ (*Neurospora*)、パエシロミセス (*Paecilomyces*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、シゾフィラム (*Schizophyllum*)、タラロミセス (*Talaromyces*)、サーモアスカス (*Thermoascus*)、チエラビア (*Thielavia*)、トリポクラジウム (*Tolypocladium*) 又はトリコダーマ (*Trichoderma*) ポリペプチドであり得る。

【 0 0 1 1 】

好ましい観点においては、親リパーゼは、リパーゼ活性を有する、サッカロミセス・カリスベルゲンシス (*Saccharomyces carisbergensis*)、サッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ジアスタチカス (*Saccharomyces diastaticus*)、サッカロミセス・ドウグラシ (*Saccharomyces douglasii*)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロミセス・ノルベンシス (*Saccharomyces norbensis*) 又はサッカロミセス・オビホルミス (*Saccharomyces oviformis*) ポリペプチドである。

【 0 0 1 2 】

もう1つの好ましい観点においては、親リパーゼは、アスペルギラス・アキュレアタス (*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギラス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギラス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギラス・ホエチダス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギラス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギラス・ニジュランズ (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギラス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギラス・フルビゲンシス (*Aspergillus furbigensis*)、フサリウム・バクトリジオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フサリウム・セラリス (*Fusarium cerealis*)、フサリウム・クロックウェレンズ (*Fusarium crookwellense*)、フサリウム・クルモラム (*Fusarium culmorum*)、フサリウム・グラミネアラム (*Fusarium graminearum*)、フサリウム・グラミナム (*Fusarium graminum*)、フサリウム・ヘテロスボラム (*Fusarium heterosporum*)、フサリウム・ネグンジ (*Fusarium negundi*)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フサリウム・レチキュラタム (*Fusarium reticulatum*)、フサリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)、フサリウム・サムブシウム (*Fusarium sambucinum*)、フサリウム・サルコクロウム (*Fusarium sarcochroum*)、フサリウム・スポロトリキオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、フサリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フサリウム・トルロサム (*Fusarium torulosum*)、フサリウム・トリコセシオイデス (*Fusarium trichothecioides*)、フサリウム・ベネナタム (*Fusarium venenatum*)、ヒューミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、サーモミセス・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) (別名ヒューミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*))、ムコル・ミエヘイ (*Mucor miehei*)、ミセリオブラソ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophi*

10

20

30

40

50

la)、ネウロスボラ・クラサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・プルプロゲナム (*Penicillium purpurogenum*)、トリコダーマ・ハルジアナル (*Trichoderma harzianum*)、トリコダーマ・コニンギ (*Trichoderma koningii*)、トリコダーマ・ロンジブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコダーマ・レセイ (*Trichoderma reesei*)、又はトリコダーマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) ポリペプチドである。

【0013】

もう1つの好ましい観点においては、親リパーゼは、サーモミセスリパーゼである。

より好ましい観点においては、親リパーゼは、サーモミセス・ラヌギノサスリパーゼである。さらにより好ましい態様においては、親リパーゼは、配列番号2のリパーゼである。

10

【0014】

変異体リパーゼ：

本発明のリパーゼ変異体は、親リパーゼに比較して、

- a) 領域Iにおける少なくとも2つの置換；
- b) 領域IIにおける少なくとも1つの置換；
- c) 領域IIIにおける少なくとも1つの置換；及び
- d) 領域IVにおける少なくとも1つの置換、

から成る群から選択された少なくとも3個の置換を含んで成り、そしてリパーゼ活性を有する。

【0015】

好ましい態様においては、変異体リパーゼは、サーモミセスリパーゼ、より好ましくはT.ラヌギノサスリパーゼの変異体、及びさらにより好ましくは、配列番号2で示されるT.ラヌギノサスリパーゼである。好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号2に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する。

20

【0016】

変異体リパーゼは、次の親生物の1つに由来するか又はそれらから得られる遺伝子によりコードされる親リパーゼの変異体であり得る：カンジダ、クルイベロミセス、ピチア、サッカロミセス、シゾサッカロミセス又はヤロウィア、アクレモニウム、アスペルギラス、アウレオバシジウム、クリプトコーカス、フィロバシジウム、ヒューミコラ、マグナポルテ、ムコル、マイセリオブソラ、ネオカリマスフィックス、ネウロスボラ、パエシロミセス、ペニシリウム、ピロマイセス、シゾフィラム、タラロミセス、サーモアスカス、チエラピア、トリポクラジウム又はトリコダーマ。

30

【0017】

好ましい観点においては、変異体リパーゼは、次の親生物の1つに由来するか又はそれらから得られる遺伝子によりコードされる親リパーゼに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する：カンジダ、クルイベロミセス、ピチア、サッカロミセス、シゾサッカロミセス又はヤロウィア、アクレモニウム、アスペルギラス、アウレオバシジウム、クリプトコーカス、フィロバシジウム、ヒューミコラ、マグナポルテ、ムコル、マイセリオブソラ、ネオカリマスフィックス、ネウロスボラ、パエシロミセス、ペニシリウム、ピロマイセス、シゾフィラム、タラロミセス、サーモアスカス、チエラピア、トリポクラジウム又はトリコダーマ。

40

【0018】

好ましい観点においては、変異体リパーゼは、変異体サッカロミセス・カリスベルゲンシス、サッカロミセス・セレピシアエ、サッカロミセス・ジアスタチカス、サッカロミセス・ドウグラシ、サッカロミセス・クルイベリ、サッカロミセス・ノルベンシス又はサッカロミセス・オビホルミスである。好ましい態様においては、変異体リパーゼは、サッカロミセス・カリスベルゲンシス、サッカロミセス・セレピシアエ、サッカロミセス・ジアスタチカス、サッカロミセス・ドウグラシ、サッカロミセス・クルイベリ、サッカロミセス・ノルベンシス又はサッカロミセス・オビホルミスに由来するか又はそれらから得られ

50

る遺伝子によりコードされる親リパーゼに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する。

【0019】

親リパーゼは、次の親生物の1つに由来するか又はそれから得られる遺伝子によりコードされる親リパーゼの変異体であり得る：アスペルギラス・アキュレアタス、アスペルギラス・アワモリ、アスペルギラス・フミガタス、アスペルギラス・ホエチダス、アスペルギラス・ジャボニカス、アスペルギラス・ニジュランシ、アスペルギラス・ニガー、アスペルギラス・オリザエ、アスペルギラス・フルビゲンシス、フサリウム・バクトリジオイデス、フサリウム・セラリス、フサリウム・クロックウェレンズ、フサリウム・クルモラム、フサリウム・グラミネアラム、フサリウム・グラミナム、フサリウム・ヘテロスボラム、フサリウム・ネグンジ、フサリウム・オキシスポラム、フサリウム・レチキュラタム、フサリウム・ロゼウム、フサリウム・サムブシウム、フサリウム・サルコクロウム、フサリウム・スポロトリキオイデス、フサリウム・スルフレウム、フサリウム・トルロサム、フサリウム・トリコセシオイデス、フサリウム・ベネナタム、ヒュミコラ・インソレンス、サーモミセス・ラヌギノサス（別名ヒューミコラ・ラヌギノサ）、ムコル・ミエヘイ、ミセリオプラソ・サーモフィラ、ネウロスボラ・クラサ、ペニシリウム・プルプロゲナム、トリコダーマ・ハルジアナル、トリコダーマ・コニンギ、トリコダーマ・ロンジブラキアタム、トリコダーマ・レセイ、又はトリコダーマ・ビリデ。

【0020】

好ましい態様においては、変異体リパーゼは、次の親生物の1つに由来するか又はそれから得られる遺伝子によりコードされる親リパーゼに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する：アスペルギラス・アキュレアタス、アスペルギラス・アワモリ、アスペルギラス・フミガタス、アスペルギラス・ホエチダス、アスペルギラス・ジャボニカス、アスペルギラス・ニジュランシ、アスペルギラス・ニガー、アスペルギラス・オリザエ、アスペルギラス・フルビゲンシス、フサリウム・バクトリジオイデス、フサリウム・セラリス、フサリウム・クロックウェレンズ、フサリウム・クルモラム、フサリウム・グラミネアラム、フサリウム・グラミナム、フサリウム・ヘテロスボラム、フサリウム・ネグンジ、フサリウム・オキシスポラム、フサリウム・レチキュラタム、フサリウム・ロゼウム、フサリウム・サムブシウム、フサリウム・サルコクロウム、フサリウム・スポロトリキオイデス、フサリウム・スルフレウム、フサリウム・トルロサム、フサリウム・トリコセシオイデス、フサリウム・ベネナタム、ヒュミコラ・インソレンス、サーモミセス・ラヌギノサス（別名ヒューミコラ・ラヌギノサ）、ムコル・ミエヘイ、ミセリオプラソ・サーモフィラ、ネウロスボラ・クラサ、ペニシリウム・プルプロゲナム、トリコダーマ・ハルジアナル、トリコダーマ・コニンギ、トリコダーマ・ロンジブラキアタム、トリコダーマ・レセイ、又はトリコダーマ・ビリデ。

【0021】

もう1つの好ましい観点においては、親リパーゼは、サーモミセスリパーゼである。

より好ましい観点においては、親リパーゼは、サーモミセス・ラヌギノサスリパーゼである。さらにより好ましい態様においては、親リパーゼは、配列番号2のリパーゼである。

【0022】

領域及び置換の同定：

下記領域I～領域IVにおいて言及される位置は、配列番号2におけるアミノ酸残基の位置である。異なったリパーゼにおけるその対応する（又は相同の）位置を見出すためには、“相同性及び一列整列”に記載される方法が使用される。

【0023】

領域Iにおける置換：

領域Iは、N末端残基E1を取り囲むアミノ酸残基から成る。この領域においては、複数の陽性アミノ酸により親リパーゼのアミノ酸を置換することが好ましい。リパーゼ変異体

10

20

30

40

50

は、領域Iにおいては少なくとも2つの置換、例えば領域Iにおいて3、4、5又は6個の置換を含むことができる。

次の位置に対応するアミノ酸残基が領域Iにより包含される：2～11及び223～239。次の位置が特に興味ある対象である：1、4、8、11、223、227、229、231、233、234、236。

【0024】

特に、次の置換が同定されている：X1N/*、X4V、X227G、X231R及びX233R。

好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号2に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する。

最も好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号2のアミノ酸を有するリパーゼの変異体である。

【0025】

領域IIにおける置換：

領域IIは、アシル鎖の片側及びアルコール部分の片側上で基質と接触してのアミノ酸残基から成る。この領域においては、より陽性アミノ酸又は低い疎水性のアミノ酸により親リパーゼのアミノ酸を置換することが好ましい。

リパーゼ変異体は、領域IIにおいては少なくとも1つの置換、例えば領域IIにおいて2、3、4、5又は6個の置換を含むことができる。

【0026】

次の位置に対応するアミノ酸残基が領域IIにより包含される：202～211及び249～269。次の位置が特に興味ある対象である：202、210、211、253、264、255、256。

特に、次の置換が同定されている：X202G、X210K/W/A、X255Y/V/A 及びX256K/R 及びX259G/M/Q/V。

好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号2に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する。

最も好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号2のアミノ酸を有するリパーゼの変異体である。

【0027】

領域IIIにおける置換：

領域IIIは、柔軟な構造体を形成し、そして従って活性部位中への基質の入手を可能にするアミノ酸残基から成る。この領域においては、より陽性アミノ酸又は低い疎水性のアミノ酸により親リパーゼのアミノ酸を置換することが好ましい。

リパーゼ変異体は、領域IIIにおいては少なくとも1つの置換、例えば領域IIIにおいて2、3、4、5又は6個の置換を含むことができる。

次の位置に対応するアミノ酸残基が領域IIIにより包含される：82～102。次の位置が特に興味ある対象である：83、86、87、90、91、95、96、99。

【0028】

特に、次の置換が同定されている：X83T、X86V 及び X90A/R。

好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号2に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する。

最も好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号2のアミノ酸を有するリパーゼの変異体である。

【0029】

領域IVにおける置換：

領域IVは、表面に静電的に結合するアミノ酸残基から成る。この領域においては、より陽性アミノ酸により親リパーゼのアミノ酸を置換することが好ましい。

リパーゼ変異体は、領域IVにおいては少なくとも1つの置換、例えば領域IVにおいて2、3、4、5又は6個の置換を含むことができる。

【0030】

次の位置に対応するアミノ酸残基が領域IVにより包含される：27及び54～62。次の位置が特に興味ある対象である：27、56、57、58、60。

10

20

30

40

50

特に、次の置換が同定されている：X27R、X58N/AG/T/P 及び X60V/S/G/N/R/K/A/L。

好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号 2 に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する。

最も好ましい態様においては、変異体リパーゼは、配列番号 2 のアミノ酸を有するリパーゼの変異体である。

【0031】

他の位置でのアミノ酸：

親リパーゼは任意には、追加の変更、他のアミノ酸の置換、例えば親リパーゼに比較して、特に10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下の変更を包含する。例は、親リパーゼの位置24, 37, 38, 46, 74, 81, 83, 115, 127, 131, 137, 143, 147, 150, 199, 200, 203, 206, 211, 263, 264, 265, 267及び269の1又は複数の位置に対する置換である。特定の態様においては、位置81, 147, 150, 227及び249に対応する位置の少なくとも1つにおいて置換が存在する。好ましい態様においては、少なくとも1つの置換が、X38R、X81Q/E、X143S/C/N/D/A、X147M/Y、X150G/K、X227G 及びX249R/I/Lから成る群から選択される。

【0032】

変異体は、定義される領域I～IV外の置換を包含し；定義される領域I～IV外の置換の数は好ましくは、6以下、例えば5, 4, 3, 2又は1つの置換である。

さらなる置換は例えば、当業界において知られている原理、例えばWO 92/05249号、WO 94/25577号、WO 95/22615号、WO 97/04079号、及びWO 97/07202号に記載される置換に従って製造され得る。

親リパーゼ変異体：

変異体リパーゼは、下記表1に列挙される置換を有する親リパーゼを含む（番号付けについては配列番号 2 を用いる）：

【0033】

【表1】

表1

領域I	領域II	領域III	領域IV	領域外
X4V + X227G + X231R + X233R	X210K + X256K	X83T + X86V	X58A + X60S	X150G
X227G + X231R + X233R	X256K	X86V	X58N + X60S	X150G
X231R + X233R	X255Y			
X231R + X233R	X202G			
X227G + X231R + X233R	X256K	X86V		
X4V + X231R + X233R			X58N + X60S	
X231R + X233R		X90R	X58N + X60S	
X231R + X233R	X255V	X90A		
X227G + X231R + X233R	X256K	X86V	X58N + X60S	X150G
X231R + X233R	X211L		X58N + X60S	X147M
X231R + X233R				X150K

【 0 0 3 4 】

さらなる特定の態様においては、親リパーゼは配列番号 2 と同一であり、そして従って、表 1 の変異体は下記の通りであろう：

表 2：配列番号 2 のいくつかの特定の変異体：

【 0 0 3 5 】

【表 2】

表2

領域I	領域II	領域III	領域IV	領域外
Q4V + L227G + T231R + N233R	E210K + P256K	S83T + I86V	S58A + V60S	A150G
L227G + T231R + N233R	P256K	I86V	S58N + V60S	A150G
T231R + N233R	I255Y			
T231R + N233R	I202G			
L227G + T231R + N233R	P256K	I86V		
Q4V + T231R + N233R			S58N + V60S	
T231R + N233R		I90R	S58N + V60S	
T231R + N233R	I255V	I90A		
L227G + T231R + N233R	P256K	I86V	S58N + V60S	A150G
T231R + N233R	F211L		S58N + V60S	L147M
T231R + N233R				A150K

【 0 0 3 6 】

アミノ酸修飾についての命名法：

本発明のリパーゼ変異体の記載においては、次の命名法が参照を容易にするために使用される：

元のアミノ酸：位置：置換されるアミノ酸

この命名法によれば、例えば位置195でグリシンによるグルタミン酸の置換は、G195Eとして示される。同じ位置でのグリシンの欠失は、G195^{*}として示され、そして追加のアミノ酸残基、例えばリシンの挿入は、G195GKとして示される。

特定のリパーゼが、他のリパーゼに比較して、“欠失”を含み、そして挿入がそのような位置で製造される場合、これは、位置36でのアスパラギン酸の挿入のためには^{*}26Dとして示される。

複数の突然変異は+により分けられ、すなわちR170Y + G195Eは、それぞれアルギニン及びグリシンによりチロシン及びグルタミン酸を、位置170及び195で置換する突然変異を表す。

【 0 0 3 7 】

X231は、記載される一列整列方法を適用する場合、位置231に対応する新ポリペプチドにおけるアミノ酸を示す。X231Rは、アミノ酸がRにより置換されることを示す。配列番号 2 に関しては、XはTであり、そして従って、X231Rは、Rによる位置231でのTの置換を示す。位置（例えば、231）でのアミノ酸がアミノ酸群、例えば“R及びP及びYから成る群から選択されたもう1つのアミノ酸により置換される場合、これはX231R/P/Yにより示される

であろう。

すべての場合、許容されるIUPAC一文字又は三文字アミノ酸略語が使用される。

【0038】

アミノ酸グループ分け：

本明細書においては、アミノ酸は、pH10でのそれらの電荷に従って、負に荷電された、正に電荷された、又は電荷的に中性であるとして分類される。従って、負のアミノ酸はE, D, C(システイン)及びY、特にE及びDである。正のアミノ酸は、R, K及びH、特にR及びKである。中性アミノ酸は、ジスルフィド架橋の一部を形成する場合、G, A, V, L, I, P, F, W, S, T, M, N, Q及びCである。同じグループ(負、正又は中性)におけるもう1つのアミノ酸による置換は、保存性置換と呼ばれる。

10

中性アミノ酸は、疎水性又は非極性(ジスルフィド架橋の一部としてG, A, V, L, I, P, F, W及びC)及び親水性又は極性(S, T, M, N, Q)に分けられ得る。

【0039】

アミノ酸同一性：

2種のアミノ酸配列又は2種のヌクレオチド配列間の関係は、パラメーター“同一性”により説明される。

本発明に関しては、2種のアミノ酸配列の一例整列は、EMBOSSパッケージ(<http://emboss.org>)バージョン2.8.0からのNeedleプログラムを用いることにより、決定される。そのNeedleプログラムは、Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol., 48, 443-453に記載される包括的一列整列アルゴリズムを包含する。使用される置換マトリックスは、BLOSUM62であり、ギャップ開放ペナルティーは10であり、そしてギャップ延長ペナルティーは0.5である。

20

【0040】

本発明のアミノ酸配列(“本発明の配列”、例えば配列番号2のアミノ酸1~269)と、異なったアミノ酸配列(“外来性配列”)との間の同一性程度は、“本発明の配列”の長さ、又は最も短い“外来性配列”長さにより割り算された、2種の配列の一例整列における正確な適合の数として計算される。

【0041】

正確な適合は、“本発明の配列”及び“外来性配列”がオーバーラップの同じ位置で同一のアミノ酸残基を有する場合、存在する。配列の長さは、配列におけるアミノ酸残基の数である(例えば、配列番号2の長さは269である)。

30

上記方法は、同一性及び相同性の計算のために及び一例整列のために使用され得る。本発明においては、相同性及び一例整列は、下記のようにして計算された。

【0042】

相同性及び一例整列：

本発明に関しては、相同性の程度は、当業界において知られているコンピュータプログラム、例えばGCGプログラムパッケージ(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)(Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology: 48:443-45)に供給されるGAPにより、ポリペプチド配列比較について次の設定を有するGAPを用いて、適切に決定され得る：3.0のGAP創造ペナルティー及び0.1のGAP延長ペナルティー。

40

【0043】

本発明においては、アブシジア・レフレキサ(Absidia reflexa)、アブシジア・コリムベフェラ(Absidia corymbifera)、リズムコル・ミエヘイ(Rhizomucor miehei)、リゾパス・デフェマル(Rhizopus delemar)、アスペルギラス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギラス・ツビゲンシス(Aspergillus tubigenensis)、フサリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum)、フサリウム・ヘテロスポラム(Fusarium heterosporum)、アスペルギラス・オリザエ(Aspergillus oryzae)、ペニシリウム・カメムベルチ(Penicillium camemberti)、アスペルギラス・フォエチダス(Aspergillus foetidus)

50

、サーモミセス・ラヌギサス（類似語：ヒューミコラ・ラヌギノサス）及びランデリナ・ペニサポラ（*Landerina penisapora*）のリパーゼ配列における対応する（又は相同の）位置が、図1に示される一列整列により定義されている。

【0044】

一列整列に示されないリパーゼ配列における相同位置を見出すためには、興味ある配列が図1に示される配列と共に一列整列される。新規配列は、GAPプログラムにより見出されるほとんどの相同配列に対するGAP一列整列を用いることにより、図1における本発明の一列整列に一列整列される。GAPは、GCGプログラムパッケージ（Program Manual for the Wisconsin Package, Version B1 August 1994, Genetics Computer Group: 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711）（Needleman, S.B. and Wunsch, CD., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45）に供給される。次の設定がポリペプチド配列比較のために使用される：3.0のGAP創造ペナルティー及び0.1のGAP延長ペナルティー。

【0045】

ハイブリダイゼーション：

本発明はまた、(i) 配列番号1のヌクレオチド178～660、(ii) 配列番号1のヌクレオチド178～660に含まれるcDNA配列、(iii) (i) 又は(ii)の副配列、又は(iv) (i)、(ii) 又は(iii)の相補的鎖と、非常に低い、好ましくは低い、より好ましくは中位の、より好ましくは中位の高い、さらにより好ましくは高い、及び最も好ましくは非常に高い緊縮条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、リパーゼ活性を有する単離されたポリペプチドにも関する（J. Sambrook, E.R Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York）。配列番号1の副配列は、少なくとも100個の連続したヌクレオチド又は好ましくは少なくとも200個の連続したヌクレオチドを含む。さらに、副配列は、リパーゼ活性を有するポリペプチドフラグメントをコードすることができる。

【0046】

少なくとも100個の長さのヌクレオチドの長いプローブに関しては、非常に低い～非常に高い緊縮条件は、5 × SSPE, 0.3%のSDS、200 µg/mlの剪断され、そして変性されたサケの精子DNA、及び25%のホルムアミド（非常に低い及び低い緊縮性に関する）、35%のホルムアミド（中位及び中位の高い緊縮性に関する）、又は50%ホルムアミド（高い及び非常に高い緊縮性に関する）のいずれかでの42 °Cでの、最適には12～24時間の標準のザンブロット方法に従ってのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションとして定義される。

【0047】

少なくとも100個のヌクレオチドの長いプローブに関しては、キャリアー材料は最終的に、2 × SSC、0.2%のSDSにより、好ましくは少なくとも45 °C（非常に低い緊縮性）、より好ましくは少なくとも55 °C（中位の緊縮性）、より好ましくは少なくとも60 °C（中位の高い緊縮性）、さらにより好ましくは少なくとも65 °C（高い緊縮性）及び最も好ましくは少なくとも70 °C（非常に高い緊縮性）で、それぞれ15分間、3度洗浄される。

DNA配列、発現ベクター、宿主細胞、リパーゼの生成：

【0048】

本発明は、本発明のリパーゼをコードするDNA配列、前記DNA配列を有する発現ベクター、及び前記DNA配列又は発現ベクターを含む形質転換された宿主細胞を供給する。それらは、当業界において知られている方法により得られる。

本発明はまた、形質転換された宿主細胞を、リパーゼの形成のために助けになる条件下で培養し、そして得られるブイヨンからリパーゼを回収することによるリパーゼの生成方法を提供する。前記方法は、当業界において知られている原理に従って実施され得る。

【0049】

リパーゼ活性：

中性pHでのトリブチリンに対するリパーゼ活性（LU）：

リパーゼのための基質は、乳化剤としてアラビアガムを用いて、トリブチリン（グリセリントリブチレート）を乳化することにより調製される。pH7又は9及び30でのトリブチリンの加水分解に続いて、pH - 安定滴定実験が行われる。1単位のリパーゼ活性（1LU）は、pH7で1分当たり1μモル酪酸を開放できる酵素の量に等しい。

【0050】

ベネフィットリスク（Benefit Risk）：

悪臭についての低められた危険性に比較される性能を説明するベネフィットリスクは、下記に記載されるように、 $BR = RP_{avg}/R$ として定義される。

使用：

本発明の酵素は、産業的使用に見出すことができ、例えば脂肪物質の除去のために洗剤組成物に含まれ得る。

【実施例】

【0051】

緩衝液及び基質として使用される化学物質は、少なくとも試薬品種の商品であった。

培地及び溶液：

製品	商品名
LAS：	Surfac PS
ゼオライトA	Wessalith P

【0052】

使用される他の成分は、標準の実験用試薬である。

材料：

製品	供給者
EMPA221	EMPA St. Galien, Lerchfeldstrasse 5, CH-9014 St. Gallen, Switzerland

【0053】

例1：酵素の生成：

リパーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドを構成し、そして当業界の標準方法を用いて適切な宿主細胞を形質転換する。

発酵を、34の一定の培地温度及び1.2Lの開始体積を用いて、供給バッチ発酵として実施する。培地の初期pHは、6.5に設定される。pHが7.0に高められると、この値は、10%のH₃PO₄の添加を通して維持される。培地における溶解された酵素のレベルを、攪拌速度を変更し、そして1.0L空気/L培地/分の固定された通気速度を用いることにより調節する。供給物添加速度を、全供給バッチ相の間、一定レベルで維持する。

【0054】

バッチ培地は、炭素源としてのマルトースシロップ、窒素源としてのウレア及び酵母抽出物、及び微量金属及び塩の混合物を含む。供給バッチ相の間、連続して添加される供給物は、炭素源としてマルトースシロップを含み、ところが酵母抽出物及びウレアは、窒素の十分な供給を確保するために、添加される。

リパーゼの精製を、当業界において知られている標準方法の使用により、例えばEP0851913EP、例3に記載のように、発酵上清液を濾過し、そして続く疎水性クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーにより、実施することができる。

【0055】

例2：相対的性能（RP）の計算のためのAMSA（自動機械応力アッセイ）：

本出願の酵素変異体を、自動機械応力アッセイ（AMSA）を用いて試験する。AMSA試験により、大量の少体積の酵素 - 洗剤溶液の洗浄性能を試験することができる。AMSAプレートは、試験溶液のための多くのスロット、及びすべてのスロット開口に対して洗浄される布スワッチを強く絞る蓋を有する。洗浄時間の間、プレート、試験溶液、布及び蓋を、激しく振盪し、試験溶液と布とを接触し、そして機械的応力を適用する。さらなる説明のためには、W002/42740号（特に“特定方法の態様”、23 - 24ページ）を参照のこと。洗剤試験溶液を含む容器は、金属プレートにおける円柱状の穴（6mmの直径、10mmの深さ）から成

10

20

30

40

50

る。汚された布（試験材料）が金属プレートの上部に存在し、そして容器上のフタ及びシールとして使用される。もう1つの金属プレートが汚された布の上部に存在し、個々の容器からのいずれかのこぼれを回避する。汚された布と共に2つの金属プレートを、2mmの振動を伴って30Hzの振動数で上下に震動する。

【0056】

アッセイを、下記に特定される実験条件下で行なう：

【表3】

表3

試験溶液	0.5g/lのLAS 0.52g/lの Na_2CO_3 1.07g/lのゼオライトA 0.52g/lのクエン酸ナトリウム
試験溶液の体積	160 μl
pH	約9.9
洗浄時間	20分
温度	30°C
水の硬度	15° dH $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{NaHCO}_3$ の比；4：1：7.5
試験溶液における酵素濃度	0.125, 0.25, 0.50, 1.0mg ep/L
乾燥	性能：洗浄の後、布片をすぐに、水道水によりフラッシュし、そして85°Cで5分間、空気乾燥する。 臭気：洗浄の後、布片をすぐに水道水によりフラッシュし、そして室温（20°C）で2時間、乾燥する。
試験材料	下記のようなクリーム-うこんスワッチ（綿織物として使用されるEMPA221）

【0057】

クリーム-うこんスワッチを、100gのクリーム（38%の脂肪、Arla, Denmark）と共に5gのうこん（Santa Maria, Denmark）を、50 で混合することにより調製し、その混合物をこの温度で約20分間、放置し、そして濾過し（50 ）、いずれかの未溶解粒子を除去する。混合物を20 に冷却し、織られた綿スワッチEMPA221を、クリーム-うこん混合物に含浸し、そしてその後、室温で一晩、乾燥し、そして使用まで凍結する。クリーム-うこんスワッチの調製は、特許出願W02006/125437号に開示する。

【0058】

酵素変異体の性能を、特定酵素変異体により洗浄される布サンプルの色彩の明るさとして測定する。明るさはまた、白色光により照らされる場合、布サンプルから反射される光の強度としても表され得る。布が汚れる場合、反射される光の強度は、きれいな布の強度よりも低い。従って、反射される光の強度が、酵素変異体の洗浄性能を測定するために使用され得る。

【0059】

色の測定を、洗浄された布サンプルの像を捕獲するために使用される専門プラットフォーム（PFU DL2400 pro）により行う。走査を、200dpiの解像度、及び24ビットの出力カラーデプス（output color depth）により行った。正確な結果を得るために、スキャナーは時折、Kodak反射IT8標的物により構成される。

【0060】

走査された像から光強度についての値を得るために、特別に企画されたソフトウェアを

用いる (Novozymes Color Vector Analyzer)。そのプログラムは、像から24ビット画素値を再生し、そして赤、緑及び青 (RGB) についての値に、それらを転換する。強度値 (Int) を、ベクターとしてRGB値を一緒に加え、そして次に、得られるベクターの長さを計算することにより計算する：

【 0 0 6 1 】

【 数 1 】

$$\text{Int} = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

10

【 0 0 6 2 】

変異体の洗浄性能 (P) を、下記式に従って計算する：

$$P = \text{Int}(v) - \text{Int}(r)$$

式中、Int(v) は、酵素により洗浄された布表面の光強度値であり、そして

Int(r) は、酵素なしで洗浄された布表面の光強度値である。

【 0 0 6 3 】

相対的性能の評点を、定義に従ってAMSA洗浄の結果として与える：

相対的性能の評点 (RP) は、参照酵素に対する試験される酵素変異体の性能 (P) を要約する：

20

$$RP = P(\text{試験酵素}) / P(\text{参照酵素})$$

RP_{avg} は、すべての4種の酵素濃度 (0.125、0.25、0.5、1.0mg ep/l) で参照酵素に比較しての平均の相対的性能を示す：

$$RP_{\text{avg}} = \text{avg}(RP(0.125), RP(0.25), RP(0.5), RP(1.0))$$

【 0 0 6 4 】

変異体は、それが参照よりも良好に遂行する場合、改良された洗浄性能を示すと見なされる。

本発明においては、参照酵素は、置換T231R + N233Rを有する配列番号2のリパーゼである。

【 0 0 6 5 】

30

例3：危険因子 (Risk Factor) の計算のためのGC (ガスクロマトグラフィー)：

リパーゼ洗浄されたスワッチからの酪酸開放を、次の方法を用いて、固相マイクロ抽出ガスクロマトグラフィー (SPME-GC) により測定した。1mg/lのリパーゼを含む、表3における特定された溶液により洗浄された4種の布片 (直径5mm) をガスクロマトグラフ (GC) バイアルに移した。サンプルを、Stabilwax - DA w / Integra - Guardカラム (30m、0.32mmID及び0.25µmのdf) 及びCarboxen PDMS SPME繊維 (75µm) を備えたVarian 3800GC上で分析した。個々のサンプルを40で10分間プレインキュベートし、続いて、布片上のヘッドスペースにおけるSPME繊維により20分間サンプリングした。続いて、サンプルをカラム上に注入した (インジェクター温度 = 250)。カラム流 = 2mlのヘリウム/分。カラムオープン温度グラジエント：0分 = 40、2分 = 40、22分 = 240、32分 = 240。酪酸を、FID検出により検出し、そして酪酸の量を、酪酸標準曲線に基づいて計算した。

40

【 0 0 6 6 】

リパーゼ変異体の危険性能臭気 (Risk Performance Odour) Rは、リパーゼ変異体により洗浄されたスワッチからの開放される酪酸の量と、置換T231R + N233Rを有する、配列番号2のリパーゼ (参照酵素) により洗浄されたスワッチからの開放される酪酸の量との間の比であり、ここで両値は、非リパーゼにより洗浄されたスワッチからの開放される酪酸の量について補正されている。変異体の危険性 (R) は、下記式に従って計算される：

【 0 0 6 7 】

臭気 = ブランクのために補正された1mgの酵素タンパク質/lで発生された、測定されたµgでの酪酸

50

〔 試 験 酵 素 〕 = 〔 臭 気 試 験 酵 素 〕 - 〔 ブ ラ ン ク 〕

〔 参 照 酵 素 〕 = 〔 臭 気 参 照 酵 素 〕 - 〔 ブ ラ ン ク 〕

$$R = \frac{\text{試 験 酵 素}}{\text{参 照 酵 素}}$$

変異体は、R因子が1よりも低い場合、参照に比較して、低められた臭気を示すと見られる。

【 0 0 6 8 】

例 4 : 280nmでの吸光度に対する活性 (LU) :

280nmでの吸光度に対するリパーゼの活性を、次のアッセイにより決定する :

LU/A280 :

リパーゼの活性を、上記セクションのリパーゼ活性におけるようにして決定する。280nmでのリパーゼの吸光度を測定し (A280)、そして比LU/A280を計算する。相対的LU/A280を、参照酵素のLU/A280により割り算された変異体のLU/A280として計算する。本発明においては、参照酵素は、置換T231R+N233Rを有する、配列番号2のリパーゼである。

【 0 0 6 9 】

例 5 : BR - ベネフィットリスク :

したがって、悪臭についての低められた危険性を比較しての性能を説明するベネフィットリスク因子は下記のとおりに定義される :

$$BR = RP_{avg} / R$$

変異体は、BR因子が1よりも高い場合、改良された洗浄性能及び低められた臭気を示すと見なされる。

【 0 0 7 0 】

上記方法を適用すると、次の結果が得られた :

10

20

【表 4】

表4

変異体	配列番号2における突然変異	平均 RP (RP_{avg})	BR	LU/A280
1	I202G + T231R + N233R	0.84	1.41	測定されて いない
2	I86V + L227G + T231R + N233R + P256K	1.08	1.52	1700
3	Q4V + S58N + V60S + T231R + N233R	0.87	1.73	1950
4	S58N + V60S + I90R + T231R + N233R	1.06	1.27	2250
5	I255Y + T231R + N233R	1.19	1.17	3600
6	I90A + T231R + N233R + I255V	1.13	1.14	2700
参照	T231R + N233R	1.00	1.00	3650
7	G91A + E99K + T231R + N233R + Q249R + 270H + 271T + 272P + 273S + 274S + 275G + 276R + 277G + 278G + 279H + 280R	0.43	測定されて いない	850
8	G91A + E99K + T231R, N233R + Q249R + 270H + 271T + 272P + 273S + 274S + 275G + 276R + 277G + 278G	0.13	測定されて いない	500

表 4 における参照リパーゼ及び変異体 7 及び 8 は、W02000/060063号に記載される。

【 0 0 7 1 】

例 6 : BR - ベネフィットリスク :

ベネフィットリスクを、表 5 に列挙される変異体について測定した。ベネフィットリスク因子が、例 5 に記載される同じ手段で測定され、そしてすべての列挙される変異体について、1 より大であることが見出された。

【表 5】

表5

変異体	配列番号2における突然変異
参照	T231R + N233R
9	L97V+ T231R+N233R
10	A150G+T231R+N233R
11	I90R+T231R+N233R
12	I202V+T231R+N233R
13	L227G+ T231R+ N233R+ P256K
14	I90A+ T231R+ N233R
15	T231R+N233R+ I255P
16	I90V+I255V+T231R+N233R
17	F211L+ L227G+ T231R+ N233R+ I255L+ P256K
18	S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L
19	S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249I
20	A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
21	K46L+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
22	Q4L+ E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
23	Q4L+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
24	K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254L
25	K46L+ S58N+ V60S+ K223I+ T231R+ N233R+ D254I
26	E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
27	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
28	K24R+ K46R+ K74R+ I86V+ K98R+ K127R+ D137K+ A150G+ K223R+ T231R+ N233R
29	S58A+V60A+ I86V+T231R+N233R
30	K24R+ K46R+ S58N+ V60S+ K74R+ I86V+ K98R+ K127R+ D137K+ K223R+ T231R+ N233R

【 0 0 7 2 】

【表 6】

表6

31	S58A+ V60A+ I86V+ A150G+ T231R+ N233R	
32	S58N+ V60V+ D62G+ T231R+ N233R	
33	Q4V+ S58N+ V60S+ I86V+ T231R+ N233R+ Q249L	
34	Q4V+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V	10
35	Q4V+ S58N+ V60S+ I90A+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V	
36	Y53A+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ P256L	
37	I202L+ T231R+ N233R+ I255A	
38	S58A+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
39	D27R+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
40	V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
41	Q4V+ S58A+ V60S+ S83T+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	20
42	Q4V+ V60K+ S83T+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
43	D27R+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
44	Q4N+ L6S+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
45	E1N+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
46	V60K+ I86V+ A150G+ K223N+ G225S+ T231R+ N233R+ P256K	
47	E210V+ T231R+ N233R+ Q249R	30
48	S58N+ V60S+ E210V+ T231R+ N233R+ Q249R	
49	Q4V+ V60K+ I90R+ T231R+ N233R+ I255V	
50	Q4V+ V60K+ A150G+ T231R+ N233R	
51	V60K+ S83T+ T231R+ N233R	
52	V60K+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V	40

【表 7】

表7

53	T231R+ N233G+ D234G	
54	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ Q249R+ P256K	
55	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K	10
56	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ G156R+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K	
57	S58T+ V60K+ I86V+ N94K+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
58	S58T+ V60K+ I86V+ D102A+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
59	S58T+ V60K+ I86V+ D102A+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
60	S58T+ V60K+ S83T+ I86V+ N94K+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	20
61	S58A+ V60S+ I86V+ T143S+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K	
62	G91S+ D96V+ D254R	
63	V60L+ G91M+ T231W+ Q249L	
64	T37A+ D96A+ T231R+ N233R+ Q249G	
65	E56G+E87D+T231R+N233R+D254A	
66	E210K+T231R+N233R	30
67	D27H+E87Q+D96N+T231R+N233R+D254V	
68	F181L+E210V+T231R+N233R	
69	D27N+ D96G+ T231R+ N233R	
70	D96N+ T231R+ N233R	

【 0 0 7 4 】

【表 8】

表8

71	T231R+ N233I+ D234G	
72	S58K+ V60L+ E210V+ Q249R	
73	S58H+ V60L+ E210V+ Q249R	
74	Q4V+ F55V+ I86V+ T231R+ N233R+ I255V	10
75	Q4V+ S58T+ V60K+ T199L+ N200A+ E210K+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K	
76	Q4V+ D27N+ V60K+ T231R+ N233R	
77	I90F+ I202P+ T231R+ N233R+ I255L	
78	S58N+ V60S+ D158N+ T231R+ N233R	
79	S58N+ V60S+ S115K+ T231R+ N233R	
80	S58N+ V60S+ L147M+ A150G+ F211L+ T231R+ N233R	20
81	V60K+ A150G+ T231R+ N233R	
82	I90V+L227G+T231R+N233R+ P256K	
83	T231R+N233R+ I255S	
84	I86G+ T231R+ N233R	
85	V60K+ I202V+ E210K+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K	
86	I90G+ I202L+ T231R+ N233R+ I255S	
87	S58G+ V60G+ T231R+ N233R	30

参照リパーゼは、WO2000/060063号に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1-1】図1-1は、リパーゼの一例整列を示す。

【図1-2】図1-2は、リパーゼの一例整列を示す。

【図1-3】図1-3は、リパーゼの一例整列を示す。

【図 1 - 1】

```

ID NO 1: SSSSTQDYRIASERAKIHFTTALSANA
ID NO 2: SSSSTQDYRIASERAKIHFTTALSANA
ID NO 3: SIDGGIARAATQBIHFTTALSANA
ID NO 4: SADDGKIVATATQIGFTTALSANA
ID NO 5: TAGHALAASQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID NO 6: TAGHALAASQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID NO 7: AVGGTITDSNFKTIGHADA
ID NO 8: VYTCDLSENFRLGHADA
ID NO 9: DTPITGLRFRFVQYAAAT
ID NO 10: DVSTSELDCPEFVQYAAAT
ID NO 11: SVSTSTLDELQPSGMSAAA
ID NO 12: SVSTSTLDELQPSGMSAAA
ID NO 13: DVSSSLLNLDLQPSGMSAAA
ID NO 14: SVSGLFRQPLGAGYAAA
ID NO 15: PQDAYTASHADLKYATYAGLA

ID NO 1: YCRVTVPS GWSACPHGVAS NLQITKTPST LITDNYLVAN
ID NO 2: YCRVTVPS GWSACPHGVAS NLQITKTPST LITDNYLVAN
ID NO 3: YCRVTVPS ATWDCICDATE DLKIKTWST LIYDTHAMVAR
ID NO 4: YCRVTVPS NKWCVQCKHVP DKKIITTPST LLSDTMGVYLR
ID NO 5: YADLCNPST TIKGKTIYNSQDINGMILR
ID NO 6: YADLCNPST TIKGKTIYNSQDINGMILR
ID NO 7: YC NSEAAA GSKITCSNNGCPTVQMGKATVISP VGSKTIGGVVAT
ID NO 8: YC NENIAY GSKVFCGAGNCCEDLSEKAAIVGVS VSKTIGAGVAT
ID NO 9: YCDNFVAKD GSKLNCYKNCWCFAMGTVLSPS DSTIYDAGFVAV
ID NO 10: YVEADYTAQV GSKLSCGKAMCEVATGATVSVDFS DSTIYDAGFVAV
ID NO 11: YCSNHD BK DENLCTANACGVEEASTHLLSPDLNFGDTAGFLAA
ID NO 12: YCSNHD GO DENLCTANACGVEEASTHLLSPDLNFGDTAGFLAA
ID NO 13: YCDENIN ST QTKLCTGVCNCLVEASTGLSPFSSGSGVDPAGYALAA
ID NO 14: YCDENIN ST QTKLCTGVCNCLVEASTGLSPFSSGSGVDPAGYALAA
ID NO 15: YQYTDANBS RTVFKDTLLSFTD HTLESGSGYALF

ID NO 1: GEKKEKTIYVY FROTSISINA IADIVFPVM YPPV NGA KVHGFLODY
ID NO 2: GEKKEKTIYVY FROTSISINA IADIVFPVM YPPV NGA KVHGFLODY
ID NO 3: GDSKEKTIYVY FROTSISINW IADLTFVPVS YPPV SOT KVHGFLODY
ID NO 4: GDSKEKTIYVY FROTSISINW IADLTFVPVS YPPV SOT KVHGFLODY
ID NO 5: GDSKEKTIYVY FROTSISINW IADLTFVPVS YPPV SOT KVHGFLODY
ID NO 6: GDSKEKTIYVY FROTSISINW IADLTFVPVS YPPV SOT KVHGFLODY
ID NO 7: DSARKKEIVVS FROTSISINW LTMDFPQ QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 8: DSARKKEIVVS FROTSISINW LTMDFPQ QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 9: DETHKRLIYVA FROTSISINW VTAATFP QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 10: DETHKRLIYVA FROTSISINW VTAATFP QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 11: DETHKRLIYVA FROTSISINW VTAATFP QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 12: DETHKRLIYVA FROTSISINW VTAATFP QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 13: DETHKRLIYVA FROTSISINW VTAATFP QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 14: DETHKRLIYVA FROTSISINW VTAATFP QR DCSL VEGC GVHSGFORAN
ID NO 15: DETHKRLIYVA FROTSISINW VTAATFP QR DCSL VEGC GVHSGFORAN

ID NO 1: NEVQDKLVAE VKAQLDHPSG YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 2: NEVQDKLVAE VKAQLDHPSG YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 3: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 4: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 5: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 6: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 7: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 8: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 9: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 10: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 11: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 12: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 13: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 14: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA
ID NO 15: GEVQNEIYAT VLOQKQYPS YKIVVTGHSI GGATVLSALDLYHGHHA

```

【図 1 - 2】

```

ID NO 1: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 2: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 3: SNLSEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 4: SNLSEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 5: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 6: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 7: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 8: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 9: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 10: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 11: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 12: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 13: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 14: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL
ID NO 15: NIEIYTCQ QPRIGTPAPA NYVIGT KIPYQRLVHRDIPVHL

ID NO 1: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 2: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 3: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 4: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 5: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 6: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 7: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 8: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 9: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 10: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 11: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 12: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 13: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 14: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV
ID NO 15: DPGAPGFLHA GSEFWIMK DSSLRVCWGIETNCSNSIV

ID NO 1: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 2: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 3: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 4: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 5: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 6: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 7: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 8: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 9: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 10: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 11: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 12: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 13: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 14: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL
ID NO 15: PFT SVINDHLSVLEMTGL CL

```

【図 1 - 3】

識別番号	微生物	配列番号
1.	アブシジア・レフレキサ(<i>Absidia reflexa</i>)	3
2.	アブシジア・コリムピフェラ(<i>Absidia corymbifera</i>)	4
3.	リズムコル・ミエヘイ(<i>Rhizomorpha miehei</i>)	5
4.	リズムコル・デレマル(<i>Rhizomorpha delemar</i>)	6
5.	アスベルギラス・ニガー(<i>Aspergillus niger</i>)	7
6.	アスベルギラス・ツビゲンシス(<i>Aspergillus tubingensis</i>)	8
7.	フサリウム・オキシボラム(<i>Fusarium oxysporum</i>)	9
8.	フサリウム・ヘテロスポラム(<i>Fusarium heterosporum</i>)	10
9.	アスベルギラス・オリザエ(<i>Aspergillus oryzae</i>)	11
10.	ペニシリウム・カメルベルチ(<i>Penicillium camemberti</i>)	12
11.	アスベルギラス・フォエチダス(<i>Aspergillus foetidus</i>)	13
12.	アスベルギラス・ニガー(<i>Aspergillus niger</i>)	14
13.	アスベルギラス・オリザエ(<i>Aspergillus oryzae</i>)	15
14.	サーモミセス・ラヌサス(<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	2
15.	ランデリナ・ベニサボラ(<i>Landerina pensapora</i>)	16

Figure 1. リパーゼ配列の一例整理

【配列表】

0005133899000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 ビン, イエスパー

デンマーク国, デーコー - 3 5 0 0 ベルロセ, ヘイレバッケン 2 0

(72)発明者 ノツツェル, ユルゲン カルステン フランツ

デンマーク国, デーコー - 2 1 0 0 コペンハーゲン オーエー, オステルプロガーデ 2 2 6 ,
 2 . テーホー

(72)発明者 ボルシュ, キム

デンマーク国, デーコー - 3 4 6 0 ビルケレズ, バンタールンスバイ 1 8

(72)発明者 スベンセン, アラン

デンマーク国, デーコー - 2 9 7 0 ホルショルム, オベルラムスバイ 1 3

(72)発明者 カリセン, トマス ホンガー

デンマーク国, デーコー - 1 9 2 0 フレデリクスベルウ セー, フォルシュハンメルスバイ 1
 3

(72)発明者 イエイバー, デビー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 1 8 , デイビス, ホーグ プレイス 5 6 3 2

(72)発明者 ビョルンバド, マス エスケルン

デンマーク国, デーコー - 2 8 3 0 ビルム, ブレデバイ 2 1

(72)発明者 ハンセン, ペーター カンプ

デンマーク国, デーコー - 4 3 2 0 レイレ, ストレ ステンサガー 2 2

(72)発明者 ゲー, ハイヤン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 1 8 , デイビス, ラファエル プレイス 1 8 0 1

(72)発明者 ラムザ, マイケル

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 1 8 , デイビス, ダチャンプ ストリート 2 6 2 5

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 1 7 6 3 9 (J P , A)

特表平 0 6 - 5 0 1 1 5 3 (J P , A)

特表 2 0 0 4 - 5 2 2 4 3 5 (J P , A)

国際公開第 0 1 / 0 8 3 7 7 0 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C12N 9/20

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

WPI

CPlus(STN)