(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-146832
(P2016-146832A)
(43)公開日　平成28年8月18日(2016.8.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2B150
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B017
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B018
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4B050

審査請求 有　請求項の数 20　ＯＬ　（全 354 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-27583(P2016-27583)
(22)出願日　平成28年2月17日(2016.2.17)
(62)分割の表示　特願2014-122083(P2014-122083)の分割
原出願日　平成20年12月31日(2008.12.31)
(31)優先権主張番号　61/018,868
(32)優先日　平成20年1月3日(2008.1.3)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　508268621
ビーエーエスエフ　エンザイムズ　エルエルシー
アメリカ合衆国　９２１２１　カリフォルニア州，サンディエゴ，ジョン　ホプキンス　コート　３５５０
(74)代理人　100086771
弁理士　西島　孝喜
(74)代理人　100088694
弁理士　弟子丸　健
(74)代理人　100094569
弁理士　田中　伸一郎
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤

最終頁に続く

(54)【発明の名称】トランスフェラーゼおよびオキシドレダクターゼ、それらをコードする核酸並びにそれらを製造および使用する方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素およびそれをコードする核酸を提供する。
【解決手段】特定の配列と少なくとも９０％以上の配列同一性を有する核酸またはポリペプチド。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下を含む、トランスフェラーゼ活性、トランスアミナーゼ活性、d-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、オキシドレダクターゼ活性、デヒドロゲナーゼ活性またはd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸：
（ａ）配列番号869に記載の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸、
（ｂ）配列番号870に記載の配列を有するポリペプチドをコードする核酸、
（ｃ）（ａ）または（ｂ）の核酸と完全に相補的な配列を有する核酸。
【請求項２】
請求項１記載の核酸を含む、発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクルであって、前記クローニングビヒクルが、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含み、前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ関連ウイルスベクターを含むか、または前記人工染色体が、細菌人工染色体（BAC）、バクテリオファージP1-由来ベクター（PAC）、酵母人工染色体（YAC）、または哺乳動物人工染色体（MAC）を含む、前記発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクル。
【請求項３】
請求項1に記載の核酸を含むか、または請求項２記載の発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクルを含む形質転換細胞であって、細菌細胞、哺乳動物細胞、菌類細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または植物細胞である、前記形質転換細胞。
【請求項４】
以下を含む、トランスフェラーゼ活性、トランスアミナーゼ活性、d-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、オキシドレダクターゼ活性、デヒドロゲナーゼ活性またはd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド：
（ａ）配列番号870記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
（ｂ）請求項１記載の核酸によってコードされるアミノ酸配列。
【請求項５】
請求項４記載のポリペプチドを含むタンパク質調製物であって、液体、固体またはゲルを含む、前記タンパク質調製物。
【請求項６】
組み換えポリペプチドを生成する方法であって、
(a) 請求項１記載の核酸を提供する工程；および、
(b) ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程（a）の核酸を発現させ、それによって組み換えポリペプチドを生成する工程を含み、さらに、工程（a）の核酸で宿主細胞を形質転換させ、続いて工程（a）の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組み換えポリペプチドを生成する工程を含む、
前記組み換えポリペプチドを生成する方法。
【請求項７】
請求項１記載の核酸の変種を生成する方法であって、
（ａ）請求項１記載の核酸の配列を含む鋳型核酸を提供する工程、および、
（ｂ）前記鋳型核酸の配列内で1つ以上のヌクレオチドを改変、欠失もしくは付加、またはそれらの組合せを行って鋳型核酸の変種を生成する工程、
そ含み、さらに前記変種を発現させてトランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼ、を生成する工程を含み、
前記改変、欠失もしくは付加が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセンブリ（SLR）またはそれらの組合せを含む方法によって導入され、または、

前記改変、欠失もしくは付加が、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成およびそれらの組合せを含む方法によって導入され、

前記鋳型核酸によってコードされるポリペプチドの活性または安定性に対して変異したもしくは異なる活性、または変異したもしくは異なる安定性を有するトランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼが生成されるまで反復して繰り返され、

前記変種トランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼは熱耐性を有し、上昇した温度に曝露された後もある程度の活性を維持する、または、前記変種トランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼは前記鋳型核酸によってコードされるトランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼに比較してグリコシル化が増加している、または、前記変種トランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼは高温下でトランスフェラーゼ活性またはオキシドレダクターゼ活性を有するが前記鋳型核酸によってコードされるトランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼが前記高温下では活性でなく、

前記鋳型核酸のコドン使用頻度とは異なるコドン使用頻度を有するランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼコード配列が生成されるまで反復して繰り返され、

前記鋳型核酸のメッセージ発現レベルより高いもしくは低いレベルのメッセージ発現または安定性を有するトランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼ遺伝子が生成されるまで反復して繰り返される、

前記組み換えポリペプチドを生成する方法。

【請求項８】

請求項４記載のポリペプチドを含む、飲料または飲料前駆物質。

【請求項９】

請求項４記載のポリペプチドを含む、飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または栄養補助物もしくは食事サプリメントであって、さらに、穀物胚芽、油を消費しつくした穀物胚芽、干草、アルファルファ、チモシー、ダイズ殻、引き割りヒマワリ、コムギミッド（wheat midd）から成る群から選択される担体を含み、

トランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼがグリコシル化されてペレット化条件における熱安定性が付与されており、

前記穀物胚芽、並びに、トランスフェラーゼおよび/またはオキシドレダクターゼを含む混合物をペレット化することによってデリバリーマトリックスが形成され、

前記トランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼがトランスフェラーゼまたはオキシドレダクターゼ1ミリグラム当り少なくとも350から900ユニットの比活性を保持する、前記飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または栄養補助物もしくは食事サプリメント。

【請求項１０】

（a）D-アラニンおよび2-オキソグルタル酸を提供する工程、

（b）請求項４記載のポリペプチドを提供する工程、および

（c）工程（b）のポリペプチドをD-アラニン＋2-オキソグルタル酸と、D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸、を触媒する条件下で接触させる工程、

を含む、ピルビン酸および／またはD-グルタミン酸を製造する方法。

【請求項１１】

i）（a）D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプターを提供する工、；

（b）請求項４記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程、および

（c）工程（b）のポリペプチドを、前記ポリペプチドがD-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプターなる反応を触媒する条件下で、前記D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプターと接触させる工程を含む2-オキソ酸を製造する方法、または、

（ii）前記アクセプターがベンゾキノンである（i）の方法、または

（iii）ベンゾキノンが1,2-ベンゾキノン、1,4-ベンゾキノン、ユビキノン、ユビデカレノンまたはコエンザイムQである、（ii）の方法。

【請求項１２】

（i）（a）アミノ酸を提供する工程；

（b）請求項４記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および

（c）工程（b）のポリペプチドを、前記ポリペプチドが前記アミノ酸からアルファ-ケト酸への変換を触媒する条件下で前記アミノ酸と接触させる工程を含む、

アミノ基をアミノ酸からアルファ-ケト酸へ転移させる方法、または

（ii）前記トランスアミナーゼ活性がラセミアミノ酸混合物の光学的に実質的に純粋なアルファ-ケト酸への変換の触媒を含む、（i）の方法。

【請求項１３】

（i）（a）アルファ-ケト酸を提供する工程；

（b）請求項４記載のポリペプチドを提供する工程；および

（c）工程（b）のポリペプチドを、前記ポリペプチドが前記アルファ-ケト酸からアミノ酸への変換を触媒する条件下で前記アルファ-ケト酸と接触させる工程を含む、アルファ-ケト酸からアミノ酸を製造する方法、または、

（ii）請求項４記載のポリペプチドが、ラセミアルファ-ケト混合物の実質的に光学的に純粋なD-またはL-アミノ酸への変換の触媒を含む、（i）の方法、または

（iii）オキサロ酢酸がアスパラギン酸に変換されるか、またはα-ケトグルタル酸がグルタル酸に変換されるか、またはα-ケトイソバリレートがL-バリンに変換されるか、または前記ポリペプチドのトランスアミナーゼ活性が、イソブチルアミンのイソブチルアルデヒドへの変換を触媒するオメガトランスアミナーゼである、（i）または（ii）の方法。

【請求項１４】

（i）（a）アミンを提供する工程；

（b）請求項４記載のポリペプチドを提供する工程；および

（c）工程（b）のポリペプチドを、前記ポリペプチドが前記アミンのケトンへの変換を触媒する条件下で前記アミンと接触させる工程を含む、アミンのケトンへの変換を触媒する方法であって、前記アミンはトリプトファンに存在しないかまたはトリプトファンに由来しない、前記方法、

（ii）請求項４記載のポリペプチドの活性がキラルアミンのケトンへの変換の触媒を含む、（i）の方法、または

（iii）アミンがω-アミンである、（i）または（ii）の方法。

【請求項１５】

(i)（a）第一のアミノ酸およびケト酸を提供する工程であって、前記第一のアミノ酸はトリプトファンではない、前記工程、

（b）請求項４記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程、および

（c）工程（b）のポリペプチドを、第二のアミノ酸およびピルビン酸が生成される条件下で前記アミノ酸およびケト酸と接触させる工程を含む、アミノ酸の合成を触媒する方法であって、 前記第二のアミノ酸はトリプトファンではない、前記方法、または

（ii）トランスアミナーゼ酵素と反応しない化合物を生成するために適切な条件下でピルビン酸をアセトラクテートシンターゼ酵素と反応させる工程をさらに含む、（i）の方法、または、

（iii）トランスアミナーゼ酵素と反応しない化合物がアセトラクテートまたはアセトインであるか；または工程(i)（ａ）の第一のアミノ酸がアラニンまたはL-アスパラギン酸であるか；またはケト酸が2-ケト酪酸またはトリ-メチルピルビン酸であるか；または工程(i)（ｃ）の第二のアミノ酸が2-アミノ酪酸またはtert-ロイシンである、（ii）の方法。

【請求項１６】

シグナル配列を欠く、プレプロドメインを欠く、または結合ドメインを欠く、請求項４

記載のポリペプチド。
【請求項１７】
異種配列をさらに含む、請求項４記載のポリペプチド。
【請求項１８】
少なくとも１つのグリコシル化部位を有する、または、さらに多糖を含み、前記グリコシル化部位がN-結合グリコシル化であり、P.パストリス（P. pastoris）またはS.ポンベ（S. pombe）で発現されるとグリコシル化される、請求項１７記載のポリペプチド。
【請求項１９】
配列番号220のフラグメントであるアミノ酸配列を有し、D-アミノ酸トランスフェラーゼ活性を有する、請求項４記載のポリペプチド。
【請求項２０】
生地、パン、焼成製品、飲料、資料、食品、食品または飼料添加物、食品または飼料サプリメント、栄養補助物、食事サプリメント、顆粒、ペレット、粒子、洗浄組成物、洗剤、バイオマス、木材、木材パルプ、木材製品、紙パルプ、紙製品、新聞紙、紙廃棄物、クラフトパルプ、織物、編み物糸、布、織物材料、アルコール、チューインガム、ロゼンジ、キャンディー、燃料、バイオ燃料およびバイオディーゼルからなる群より選ばれる、請求項５記載のタンパク質調製物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
EFS-WEBにより提出した配列表との照合
本出願は、MPEP§1730 II.B.2.(a)(A)で認可および規定されたUSPTO EFS-WEBサーバーにより電子出願された。本電子出願は電子提出された配列表を含み、前記配列表は参照により本明細書に含まれる。本配列表は以下の電子出願.txtファイルで確認される：
ファイル名：564462016340SeqList.txt、作成日：2008年12月30日、
サイズ：3,566,371バイト
関連出願
本出願は、35U.S.C.§119(e)により、米国仮特許出願61/018,868（2008年1月3日出願）の優先権を主張する。前出の出願は引用によりその全体が全目的のために本明細書に含まれる。
【０００２】
本発明は、一般的には酵素、前記酵素をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用に関し、より具体的には、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、および／または化学基転移を触媒し、アミノ基転移反応を触媒し、以下の反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒し、および／または酸化還元反応を触媒し、水素原子除去を触媒し、および／または以下の反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）を触媒する酵素に関する。したがって本発明は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、酵素、組成物、および／または以下（医薬（薬剤）組成物、医薬（薬剤）前駆体および／または中間体（抗生物質を含む）、甘味剤、ペプチド酵素、ペプチドホルモン、燃料および燃料添加物組成物、食品および食品添加物、飲料および飲料添加物、飼料および飼料添加物、薬剤および薬剤添加物、栄養補助物、織物材料、木材、紙、パルプおよび洗剤）の製造法を提供する。
【背景技術】
【０００３】
トランスフェラーゼおよび／またはオキシドレダクターゼは、化学基転移を触媒し、アミノ基転移反応を触媒し、以下の反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒し、および／または酸化還元反応を触媒し、水素原子除去を

触媒し、および／または以下の反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）を触媒する。トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ（“d-アミノトランスフェラーゼ”または“D-AT”とも称される）、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、は重要な産業的価値を有し、製薬工業、食品、飼料および飲料工業（例えば甘味料製造）、製材／製紙工業、および燃料工業で用いられている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、および／または化学基転移を触媒し、アミノ基転移反応を触媒し、以下の反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒し、および／または酸化還元反応を触媒し、水素原子除去を触媒し、および／または以下の反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）を触媒する酵素を提供する。本発明はさらに、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素、並びにそれらをコードする核酸、それらを含むベクターおよび細胞、前記トランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード核酸を増幅および同定するためのプローブ、並びに前記ポリペプチドおよびペプチドを製造並びに使用する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本発明は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、酵素、組成物、および／または医薬（薬剤）組成物、医薬（薬剤）前駆体および／または中間体（抗生物質を含む）、甘味剤、ペプチド酵素、ペプチドホルモン、燃料および燃料添加物組成物、食品および食品添加物、飲料および飲料添加物、飼料および飼料添加物、薬剤および薬剤添加物、栄養補助物、織物材料、木材、紙、パルプおよび洗剤の製造法を提供する。これらの組成物は、多様な形態（例えば錠剤、ゲル、ピル、移植物、液体、スプレー、フィルム、ミセル、散剤、食品、飼料ペレットまたは任意のタイプの被包化形）で処方することができる。

【０００６】

いくつかの実施態様では、トランスフェラーゼ、たとえばトランスアミナーゼ、たとえばd-アミノ酸トランスフェラーゼおよび／またはそれらの組成物は医薬、工業および／または農業分野で有用であろう。

いくつかの実施態様では、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および／または前記の組成物は、アミノ酸とα-ケト酸との間の反応を触媒するために有用であり得る。いくつかの実施態様では、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／または前記の組成物は、アミノ酸からアミノ基を除去してα-ケト酸を生じ、さらにアミノ基を反応物α-ケト酸に転移させ前記をアミノ酸に変換させる反応を触媒するために有用であり得る。また別の実施態様では、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／または前記の組成物は、アミノ酸の製造で有用であり得る。

いくつかの実施態様では、オキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-

アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および／または前記の組成物は、1つ以上のプロトンおよび1対の電子をアクセプターに転移させることによる基質の酸化反応の触媒に有用であり得る。

いくつかの実施態様では、オキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および／または前記の組成物は、1つの分子から別の分子へ電子を転移させる反応の触媒に有用であり得る。いくつかの実施態様では、オキシドレダクターゼおよび／または前記の組成物は、還元体から酸化体へ電子を転移させる反応の触媒に有用であり得る。

いくつかの実施態様では、インドール-3-ピルビン酸の生成を促進するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼが提供される。いくつかの実施態様では、RR-モナチンの生成を促進するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼが提供される。

また別の実施態様では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および／または前記の組成物は、多くの疾患、例えば肝障害／疾患または心筋梗塞の診断および管理に有用であり得る。また別の実施態様では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および／または前記の組合せは、任意の症状および／または疾患、例えば肝障害／疾患または心筋梗塞の診断、管理または治療のための医薬（薬剤）組成物で用いられる。

【０００７】

また別の実施態様では、本発明は、任意のバイオマス燃料（例えばバイオ燃料、例えばエタノール、プロパノール、ブタノール、メタノール、および／またはバイオジーゼルおよび／またはバイオ燃料、例えば合成リキッドまたはガス、例えば合成ガス）へのバイオ変換および他の発酵生成物（例えばコハク酸、乳酸または酢酸）の製造のための酵素およびプロセスを提供する。

また別の実施態様では、本発明は、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有し、そのトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持するポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）を提供し；または、この場合、前記少なくとも1つの保存的アミノ酸置換はあるアミノ酸の類似の特徴をもつ別のアミノ酸による置換を含むか；または保存的置換は、脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸による置換（セリンのスレオニンによる置換またはその逆）、酸性残基の別の酸性残基による置換、アミド基をもつ残基のアミド基をもつ別の残基による置換、塩基性残基の別の塩基性残基による交換、または芳香族残基の別の芳香族残基による置換を含む。

また別の実施態様では、本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはオメガ-（またはω-）トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するが、シグナル配列、プレプロドメイン、結合ドメイン、および／または他のドメインを欠くポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）を提供し；ある特徴では、前記結合ドメインは、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記から成る。

【０００８】

また別の実施態様では、本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、さらに異種配列を含むポリペプチド（およびそれらを

コードする核酸）を提供。ある特徴では、前記異種配列は、以下をコードする配列を含むか、または前記から成る：（i）異種シグナル配列、異種ドメイン、異種結合ドメイン、異種ドッケリンドメイン、異種触媒ドメイン（CD）、またはこれらの組合せ；（ii）前記異種シグナル配列、結合ドメインまたは触媒ドメイン（CD）が異種酵素に由来しる（i）の配列；または（iii）タグ、エピトープ、標的誘導ペプチド、切断可能配列、検出可能部分または酵素。さらにある特徴では、前記異種結合ドメインは、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記から成る。さらにある特徴では、前記異種シグナル配列は、コードされたタンパク質を液胞、小胞体、葉緑体または澱粉顆粒へ標的化して誘導する。

また別の実施態様では、本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性を有するか、または前記トランスアミナーゼ活性が、イソブチルアミンのイソブチルアルデヒドへの変換を触媒するオメガトランスアミナーゼ活性であるか；および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド（およびそれらをコードする核酸）を提供し、前記ポリペプチドは補助因子依存性または補助因子非依存性である。ある実施態様では、補助因子依存ポリペプチドは機能を示すために非タンパク質成分の存在を必要とする。ある実施態様では、補助因子は金属イオン、補酵素、ピリドキサルリン酸および／またはホスホパントテインを含む。

【０００９】

本発明は、以下の（a）から（n）のいずれかを含む単離、合成または組み換え核酸を提供する：

（a）少なくとも1つのポリペプチドをコードする核酸（ポリヌクレオチド）であって、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、

配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517、配列番号:519、配列番号:521、配列番号:523、配列番号:525、配列番号:527、配列番号:529、配列番号:531、配列番号:533、配列番号:535、配列番号:537、配列番号:539、配列番号:541、配列番号:543、配列番号:545、配列番号:547、配列番号:549、配列番号:551、配列番号:553、配列番号:555、配列番号:557、配列番号:559、配列番号:561、配列番号:563、配列番号:565、配列番号:567、配列番号:569、配列番号:571、配列番号:573、配列番号:575、配列番号:577、配列番号:579、配列番号:581、配列番号:583、配列番号:585、配列番号:587、配列番号:589、配列番号:591、配列番号:593、配列番号:595、配列番号:597、配列番号:599、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:605、配列番号:607、配列番号:609、配列番号:611、配列番号:613、配列番号:615、配列番号:617、配列番号:619、配列番号:621、配列番号:623、配列番号:625、配列番号:627、配列番号:629、配列番号:631、配列番号:633、配列番号:635、配列番号:637、配列番号:639、配列番号:641、配列番号:643、配列番号:645、配列番号:647、配列番号:649、配列番号:651、配列番号:653、配列番号:655、配列番号:657、配列番号: 659、配列番号: 661、配列番号:663、配列番号:665、配列番号:667、配列番号:669、配列番号:671、配列番号:673、配列番号:675、配列番号:677、配列番号:679、配列番号:681、配列番号:683、配列番号:685、配列番号:687、配列番号:689、配列番号:691、配列番号:693、配列番号:695、配列番号:697、配列番号:699、配列番号:701、配列番号:703、配列番号:705、配列番号:707、配列番号:709、配列番号:711、配列番号:713、配列番号:715、配列番号:717、配列番号:719、配列番号:721、配列番号:723、配列番号:725、配列番号:727、配列番号:729、配列番号:731、配列番号:733、配列番号:735、配列番号:737、配列番号:739、配列番号:741、配列番号:743、配列番号:745、配列番号:747、配列番号:749、配列番号:751、配列番号:753、配列番号:755、配列番号:757、配列番号:759、配列番号:761、配列番号:763、配列番号:765、配列番号:767、配列番号:769、配列番号:771、配列番号:773、配列番号:775、配列番号:777、配列番号:779、配列番号:781、配列番号:783、配列番号:785、配列番号:787、配列番号:789、配列番号:791、配列番号:793、配列番号:795、配列番号:797、配列番号:799、配列番号:801、配列番号:803、配列番号:805、配列番号:807、配列番号:809、配列番号:811、配列番号:813、配列番号:815、配列番号:817、配列番号:819、配列番号:821、配列番号:823、配列番号:825、配列番号:827、配列番号:829、配列番号:831、配列番号:833、配列番号:835、配列番号:837、配列番号:839、配列番号:841、配列番号:843、配列番号:845、配列番号:847、配列番号:849、配列番号:851、配列番号:853、配列番号:855、配列番号:857、配列番号:859、配列番号:861、配列番号:863、配列番号:865、配列番号:867、配列番号:869、配列番号:871、配列番号:873、配列番号:875、配列番号:877、配列番号:879、配列番号:881、配列番号:883、配列番号:885、配列番号

:887、配列番号:889、配列番号:891、配列番号:893、配列番号:895、配列番号:897、配列番号:899、配列番号:901、配列番号:903、配列番号:905、配列番号:907、配列番号:909、配列番号:911、配列番号:913、配列番号:915、配列番号:917、配列番号:919、配列番号:921、配列番号:923、配列番号:925、配列番号:927、配列番号:929、配列番号:931、配列番号:933、配列番号:935、配列番号:937、配列番号:939、配列番号:941、配列番号:943、配列番号:945、配列番号:947、配列番号:949、配列番号:951、配列番号:953、配列番号:955、配列番号:957、配列番号:959、配列番号:961、配列番号:963、配列番号:965、配列番号:967、配列番号:969、配列番号:971、配列番号:973、および／または配列番号:975の核酸（ポリヌクレオチド）配列と少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれより高いか、または完全な（100%）配列同一性を有する配列を含み、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードするか、またはトランスフェラーゼ特異的抗体、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ特異的抗体を生成することができるポリペプチドまたはペプチド（エピトープまたは免疫原として作用するポリペプチドまたはペプチド）をコードする、前記核酸；

（b）（a）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記配列同一性が（A）配列比較アルゴリズムによる解析又は目視精査によって、または（B）cDNA、転写物（mRNA）、または遺伝子の少なくとも約20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150もしくはそれより多い残基の領域にわたって、またはその完全長にわたって決定される、前記核酸；

（c）（a）または（b）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記配列比較アルゴリズムがBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、フィルタリング設定がblastall -p blastp -d “nr pataa” -F Fに設定され、さらに他の全てのオプションが規定値に設定される、前記核酸；

（d）少なくとも1つのポリペプチドまたペプチドをコードする核酸（ポリヌクレオチド）であって、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211

、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517、配列番号:519、配列番号:521、配列番号:523、配列番号:525、配列番号:527、配列番号:529、配列番号:531、配列番号:533、配列番号:535、配列番号:537、配列番号:539、配列番号:541、配列番号:543、配列番号:545、配列番号:547、配列番号:549、配列番号:551、配列番号:553、配列番号:555、配列番号:557、配列番号:559、配列番号:561、配列番号:563、配列番号:565、配列番号:567、配列番号:569、配列番号:571、配列番号:573、配列番号:575、配列番号:577、配列番号:579、配列番号:581、配列番号:583、配列番号:585、配列番号:587、配列番号:589、配列番号:591、配列番号:593、配列番号:595、配列番号:597、配列番号:599、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:605、配列番号:607、配列番号:609、配列番号:611、配列番号:613、配列番号:615、配列番号:617、配列番号:619、配列番号:621、配列番号:623、配列番号:625、配列番号:627、配列番号:629、配列番号:631、配列番号:633、配列番号:635、配列番号:637、配列番号:639、配列番号:641、配列番号:643、配列番号:645、配列番号:647、配列番号:649、配列番号:651、配列番号:653、配列番号:655、配列番号:657、配列番号: 659、配列番号: 661、配列番号:663、配列番号:665、配列番号:667、配列番号:669、配列番号:671、配列番号:673、配列番号:675、配列番号:677、配列番号:679、配列番号:681、配列番号:683、配列番号:685、配列番号:687、配列番号:689、配列番号:691、配列番号:693、配列番号:695、配列番号:697、配列番号:699、配列番号:701、配列番号:703、配列番号:705、配列番号:707、配列番号:709、配列番号:711、配列番号:713、配列番号:715、配列番号:717、配列番号:719、配列番号:721、配列番号:723、配列番号:725、配列番号:727、配列番号:729、配列番号:731、配列番号:733、配列番号:735、配列番号:737、配列番号:739、配列番号:741、配列番号:743、配列番号:745、配列番号:747、配列番号:749、配列番号:751、配列番号:753、配列番号:755、配列番号:757、配列番号:759、配列番号:761、配列番号:763、配列番号:765、配列番号:767、配列番号:769、配列番号:771、配列番号:773、配列番号:775、配列番号:777、配列番号:779、配列番号:781、配列番

号:783、配列番号:785、配列番号:787、配列番号:789、配列番号:791、配列番号:793、配列番号:795、配列番号:797、配列番号:799、配列番号:801、配列番号:803、配列番号:805、配列番号:807、配列番号:809、配列番号:811、配列番号:813、配列番号:815、配列番号:817、配列番号:819、配列番号:821、配列番号:823、配列番号:825、配列番号:827、配列番号:829、配列番号:831、配列番号:833、配列番号:835、配列番号:837、配列番号:839、配列番号:841、配列番号:843、配列番号:845、配列番号:847、配列番号:849、配列番号:851、配列番号:853、配列番号:855、配列番号:857、配列番号:859、配列番号:861、配列番号:863、配列番号:865、配列番号:867、配列番号:869、配列番号:871、配列番号:873、配列番号:875、配列番号:877、配列番号:879、配列番号:881、配列番号:883、配列番号:885、配列番号:887、配列番号:889、配列番号:891、配列番号:893、配列番号:895、配列番号:897、配列番号:899、配列番号:901、配列番号:903、配列番号:905、配列番号:907、配列番号:909、配列番号:911、配列番号:913、配列番号:915、配列番号:917、配列番号:919、配列番号:921、配列番号:923、配列番号:925、配列番号:927、配列番号:929、配列番号:931、配列番号:933、配列番号:935、配列番号:937、配列番号:939、配列番号:941、配列番号:943、配列番号:945、配列番号:947、配列番号:949、配列番号:951、配列番号:953、配列番号:955、配列番号:957、配列番号:959、配列番号:961、配列番号:963、配列番号:965、配列番号:967、配列番号:969、配列番号:971、配列番号:973、および／または配列番号:975の配列を含む核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、さらに、ストリンジェントな条件が約65℃の温度で0.2XのSSCにて約15分間の洗浄を含む洗浄工程を含む、前記核酸；

（e）（a）から（d）のいずれかの核酸（ポリヌクレオチド）であって、遺伝子または転写物の少なくとも約20、 25、 30、 50、 75、 100、 125、 150、 175、 200、 225、 300、 350、 400、 450、 500、 550、 600、 650、 700、 750、 800、 850、 900、 950、 1000、 1050、 1100、 1150もしくはそれより多いヌクレオチド残基または完全長の長さを有する、前記核酸；

（f）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記ポリペプチドが、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てをもつ配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配

列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806

、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974、および／または配列番号:976、またはその酵素的に活性なフラグメントの配列を含む、前記核酸；

（g）（a）から（f）のいずれかの核酸（ポリヌクレオチド）であって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有し、かつそのトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持するポリペプチドをコードし、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換が、アミノ酸の同様な特徴を有する別のアミノ酸による置換を含むか；または保存的置換が、脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸による置換、セリンのスレオニンによる置換またはその逆、酸性残基の別の酸性残基による置換、アミド基をもつ残基のアミド基をもつ別の残基による置換、ある塩基性残基の別の塩基性残基による交換、または芳香族残基の別の芳香族残基による置換を含む、前記核酸；

（h）（a）から（g）のいずれかの核酸（ポリヌクレオチド）であって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするが、シグナル配列、プレプロドメイン、結合ドメインおよび／または他のドメインを欠く、前記核酸；

（i）（h）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記から成る、前記核酸；

（j）（a）から（i）のいずれかの核酸（ポリヌクレオチド）であって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、さらに異種配列を含む、前記核酸；

（k）（j）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記異種配列が、（A）異種シグナル配列、異種ドメイン、異種結合ドメイン、異種ドッケリンドメイン若しくは異種触媒ドメイン（CD）をコードする配列、または前記配列の組合せ；（B）前記異種シグナル配列、結合ドメインまたは触媒ドメイン（CD）が異種酵素に由来する（l）の配列；または（C）タグ、エピトープ、標的誘導ペプチド、切断可能配列、検出可能部分または酵素をコードする配列を含むか、または前記配列から成る、前記核酸；

（l）（k）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記異種結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記ドメインから成る、前記核酸；

（m）（l）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記異種シグナル配列が、コードさ

れたタンパク質を標的とし、液胞、小胞体、葉緑体または澱粉顆粒へ誘導する、前記核酸；

（ｎ）（ａ）から（ｍ）のいずれかの配列と完全に相補的な核酸配列（ポリヌクレオチド）。

【００１０】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメントをコードする核酸を含む、単離、合成または組み換え核酸を提供し、前記ポリペプチドは、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てをもつ配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番

号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974、および／または配列番号:976に示される配列を有し、前記配列には、本明細書並びに表1、2および3、並びに配列表に記載された配列（これらの配列はいずれも“本発明の例示的酵素／ポリペプチド”である）、および酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）および／または免疫学的に活性なその部分配列（例えばエピトープまたは免疫原）（いずれも“本発明のポリペプチド”）並びにその変種（こ

れらの配列のいずれも本発明のポリペプチドおよびペプチド配列を含む）（また以下では本発明の例示的ポリペプチド配列と称される）が含まれる。

本発明は、本発明のこれら核酸配列のいずれとも完全に相補的な配列を含む、単離、合成または組み換え核酸を提供する（相補的（非コード）およびコード配列もまた以下では包括的に本発明の核酸配列と称される）。

【００１１】

ある特徴では、配列同一性は、少なくとも約51%、 52%、 53%、 54%、 55%、 56%、 57%、 58%、 59%、 60%、 61%、 62%、 63%、 64%、 65%、 66%、 67%、 68%、 69%、 70%、 71%、 72%、 73%、 74%、 75%、 76%、 77%、 78%、 79%、 80%、 81%、 82%、 83%、 84%、 85%、 86%、 87%、 88%、 89%、 90%、 91%、 92%、 93%、 94%、 95%、 96%、 97%、 98%、 99%、または100％（完全な）配列同一性（相同性）である。ある特徴では、配列同一性は、遺伝子または転写物の少なくとも約150、 175、 200、 225、 250、 275、 300、 350、 400、 450、 500、 550、 600、 650、 700、 750、 800、 850、 900、 950、 1000、 1050、 1100、 1150もしくはそれより多い残基の領域または完全長に及ぶ。例えば、本発明は、、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、

配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517、配列番号:519、配列番号:521、配列番号:523、配列番号:525、配列番号:527、配列番号:529、配列番号:531、配列番号:533、配列番号:535、配列番号:537、配列番号:539、配列番号:541、配列番号:543、配列番号:545、配列番号:547、配列番号:549、配列番号:551、配列番号:553、配列番号:555、配列番号:557、配列番号:559、配列番号:561、配列番号:563、配列番号:565、配列番号:567、配列番号:569、配列番号:571、配列番号:573、配列番号:575、配列番号:577、配列番号:579、配列番号:581、配列番号:583、配列番号:585、配列番号:587、配列番号:589、配列番号:591、配列番号:593、配列番号:595、配列番号:597、配列番号:599、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:605、配列番号:607、配列番号:609、配列番号:611、配列番号:613、配列番号:615、配列番号:617、配列番号:619、配列番号:621、配列番号:623、配列番号:625、配列番号:627、配列番号:629、配列番号:631、配列番号:633、配列番号:635、配列番号:637、配列番号:639、配列番号:641、配列番号:643、配列番号:645、配列番号:647、配列番号:649、配列番号:651、配列番号:653、配列番号:655、配列番号:657、配列番号: 659、配列番号: 661、配列番号:663、配列番号:665、配列番号:667、配列番号:669、配列番号:671、配列番号:673、配列番号:675、配列番号:677、配列番号:679、配列番号:681、配列番号:683、配列番号:685、配列番号:687、配列番号:689、配列番号:691、配列番号:693、配列番号:695、配列番号:697、配列番号:699、配列番号:701、配列番号:703、配列番号:705、配列番号:707、配列番号:709、配列番号:711、配列番号:713、配列番号:715、配列番号:717、配列番号:719、配列番号:721、配列番号:723、配列番号:725、配列番号:727、配列番号:729、配列番号:731、配列番号:733、配列番号:735、配列番号:737、配列番号:739、配列番号:741、配列番号:743、配列番号:745、配列番号:747、配列番号:749、配列番号:751、配列番号:753、配列番号:755、配列番号:757、配列番号:759、配列番号:761、配列番号:763、配列番号:765、配列番号:767、配列番号:769、配列番号:771、配列番号:773、配列番号:775、配列番号:777、配列番号:779、配列番号:781、配列番号:783、配列番号:785、配列番号:787、配列番号:789、配列番号:791、配列番号:793、配列番号:795、配列番号:797、配列番号:799、配列番号:801、配列番号:803、配列番号:805、配列番号:807、配列番号:809、配列番号:811、配列番号:813、配列番号:815、配列番号:817、配列番号:819、配列番号:821、配列番号:823、配列番号:825、配列番号:827、配列番号:829、配列番号:831、配列番号:833、配列番号:835、配列番号:837、配列番号:839、配列番号:841、配列番号:843、配列番号:845、配列番号:847、配列番号:849、配列番号:851、配列番号:853、配列番号:855、配列番号:857、配列番号:859、配列番号:861、配列番号:863、配列番号:865、配列番号:867、配列番号:869、配列番号:871、配列番号:873、配列番号:875、配列番号:877、配列番号:879、配列番号:881、配列番号:883、配列番号:885、配列番号:887、配列番号:889、配列番号:891、配列番号:893、配列番号:895、配列番号:897、配列番号:899、配列番号:901、配列番号:903、配列番号:905、配列番号:907、配列番号:909、配列番号:911、配列番号:913、配列番号:915、配列番号:917、配列番号:919、配列番号:921、配列番号:923、配列番号:925、配列番号:927、配列番号:929、配列番号:931、配列番号:933、配列番号:935、配列番号:937、配列番号:939、配列番号:941、配列番号:943、配列番号:945、配列番号:947、配列番号:949、配列番号:951、配列番号:953、配列番号:955、配列番号:957、配列番号:959、配列番号:961、配列番号:963、配列番号:965、配列番号:967、配列番号:969、配列番号:971、配列番号:973、および／または配列番号:975の核酸配列（例えば表1、2および3、並びに配列表に記載のもの（これら

の配列はいずれも“本発明の例示的酵素／ポリペプチド”である））、および酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）を含む、単離、合成または組み換え核酸を提供する。

【００１２】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、単離、合成または組み換え核酸を提供し、前記核酸は、本発明の例示的配列または本発明のいずれかの配列の少なくとも1つの配列改変を有する。

ある特徴では（場合によって）、本発明の単離、合成または組み換え核酸は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、例えば、前記活性は、化学基の転移を触媒する活性、アミノ基転移反応の触媒活性、以下の反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒する活性、および／または酸化還元反応の触媒活性、水素原子除去の触媒活性、および／または以下の反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）の触媒活性を含む。

ある特徴では、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は熱安定性であり、例えばこの場合、前記ポリペプチドは、約-100℃から約-80℃、約-80℃から約-40℃、約-40℃から約-20℃、約-20℃から約0℃、約0℃から約5℃、約5℃から約15℃、約15℃から約25℃、約25℃から約37℃、約37℃から約45℃、約45℃から約55℃、約55℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約105℃、約105℃から約110℃、約110℃から約120℃、または約95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃、101℃、102℃、103℃、104℃、105℃、106℃、107℃、108℃、109℃、110℃、111℃、112℃、113℃、114℃、115℃または前記より高い温度範囲を含む条件下で、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する。いくつかの実施態様では、本発明の熱安定性ポリペプチドは、上記に記載の範囲の温度において、約pH 3.0、約pH 3.5、約pH 4.0、約pH 4.5、約pH 5.0、約pH 5.5、約pH 6.0、約pH 6.5、約pH 7.0、約pH 7.5、約pH 8.0、約pH 8.5、約pH 9.0、約pH 9.5、約pH 10.0、約pH 10.5、約pH 11.0、約pH 11.5、約 pH 12.0または前記より高いpHで、活性、例えばトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する。

【００１３】

ある特徴では、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は耐熱性であり、例えば、前記ポリペプチドは、約-100℃から約-80℃、約-80℃から約-40℃、約-40℃から約-20℃、約-20℃から約0℃、約0℃から約5℃、約5℃から約15℃、約15℃から約25℃、約25℃から約37℃、約37℃から約45℃、約45℃から約55℃、約55℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約105℃、約105℃から約110℃、約110℃から約120℃の範囲の温度、または約95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃、101℃、102℃、103℃、104℃、105℃、106℃、107℃、108℃、109℃、110℃、111℃、112℃、113℃、114℃、115℃または前記より高い温度に暴

露された後、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する。本発明の耐熱性ポリペプチドは、約-100℃から約-80℃、約-80℃から約-40℃、約-40℃から約-20℃、約-20℃から約0℃、約0℃から約5℃、約5℃から約15℃、約15℃から約25℃、約25℃から約37℃、約37℃から約45℃、約45℃から約55℃、約55℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約105℃、約105℃から約110℃、約110℃から約120℃の範囲の温度、または約95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃、101℃、102℃、103℃、104℃、105℃、106℃、107℃、108℃、109℃、110℃、111℃、112℃、113℃、114℃、115℃または前記より高い温度に暴露された後、活性、例えばトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持することができる。いくつかの実施態様では、本発明の耐熱性ポリペプチドは、約pH 3.0、約pH 3.5、約pH 4.0、約pH 4.5、約pH 5.0、約pH 5.5、約pH 6.0、約pH 6.5、約pH 7.0、約pH 7.5、約pH 8.0、約pH 8.5、約pH 9.0、約pH 9.5、約pH 10.0、約pH 10.5、約pH 11.0、約pH 11.5、約 pH 12.0または前記より高いpHで上記に記載の範囲の温度に暴露された後、活性、例えばトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する。

【００１４】

ある特徴では、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドのトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は、約pH 6.5、pH 6、pH 5.5、pH 5、pH 4.5、pH 4.0、pH 3.5、pH 3.0または前記より低い（より酸性）pHを含む酸性条件下で活性を保持するか、または約pH 6.5、pH 6、pH 5.5、pH 5、pH 4.5、pH 4.0、pH 3.5、pH 3.0または前記より低い（より酸性）pHを含む酸性条件に暴露された後、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持するか；または約pH 7、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9、pH 9.5、pH 10、pH 10.5、pH 11、pH 11.5、pH 12、pH 12.5または前記より高い（より塩基性）pHを含む塩基性条件下で活性を保持するか、または約pH 7、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9、pH 9.5、pH 10、pH 10.5、pH 11、pH 11.5、pH 12、pH 12.5または前記より高い（より塩基性）pHを含む塩基性条件に暴露された後、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する。ある特徴では、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドのトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は、少なくとも約80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃、101℃、102℃、103℃、103.5℃、104℃、105℃、107℃、108℃、109℃もしくは110℃または前記より高い温度、および少なくとも約pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9、pH 9.5、pH 10、pH 10.5、pH 11、pH 11.5、pH 12、pH 12.5または前記より高い（より塩基性）pHで活性を保持する。

【００１５】

本発明は、本発明の配列を含む核酸を含む発現カセット、クローニングビヒクルまたはベクター（例えば発現ベクター）を提供する。前記クローニングビヒクルは、ウイルスベ

クター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含むことができる。前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ関連ウイルスベクターを含むことができる。前記クローニングビヒクルは、細菌人工染色体（BAC）、バクテリオファージP1-由来ベクター（PAC）、酵母人工染色体（YAC）、または哺乳動物人工染色体（MAC）を含むことができる。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定する核酸プローブを提供し、前記プローブは、本発明の例示的配列または本発明のいずれかの配列（本明細書で規定）を含む核酸の連続する少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300またはそれより多い塩基を含み、ある特徴では（場合によって）、前記プローブは、少なくとも10から300、約25から250、約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、約60から100、もしくは約50から150またはそれより多い連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー対を提供し、前記プライマー対は、本発明の例示的配列、または本発明のいずれかの配列（本明細書で規定）、またはその部分配列を含む核酸を増幅することができ、場合によって前記増幅プライマー配列対のメンバーは、前記配列の連続する少なくとも約10から50塩基、または前記配列の約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35またはそれより多い連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む。本発明は増幅プライマー対を提供し、前記プライマー対は、本発明の例示的配列または本発明のいずれかの配列（本明細書で規定）の最初の（5’の）約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35またはそれより多い残基によって示される配列を有する第一のメンバー、および前記第一のメンバーの相補鎖の最初の（5’の）約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35またはそれより多い残基によって示される配列を有する第二のメンバーを含む。

【００１６】

本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いるポリヌクレオチドの増幅によって生成される、トランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード核酸を提供し、場合によって、前記増幅はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に夜。ある特徴では前記核酸は遺伝子ライブラリーの増幅によって生成され、ある特徴では（場合によって）、前記遺伝子ライブラリーは環境ライブラリーである。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いるポリヌクレオチドの増幅によって生成される、トランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード核酸によってコードされる、単離、合成または組み換えトランスフェラーゼおよび／またはオキシドレダクターゼを提供する。本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法を提供し、前記方法は、本発明の例示的配列、または本発明のいずれかの配列（本明細書で規定）、またはその部分配列を増幅することができる増幅プライマー配列対を用いて鋳型核酸を増幅する工程を含む。

本発明は、本発明の配列を含む核酸を含む発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクルを提供し、場合によって、前記クローニングビヒクルは、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含む。前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ関連ウイルスベクターを含むことができ、また人工染色体は、細菌人工染色体（BAC）、バクテリオファージP1-由来ベクター（PAC）、酵母人工染色体（YAC）、または哺乳動物人工染色体（MAC）を含む。

本発明は、本発明の核酸もしくはベクターまたは本発明の発現カセットまたはクローニングビヒクルを含む形質転換細胞を提供する。前記形質転換細胞は、細菌細胞でも、哺乳動物細胞でも、菌類細胞でも、酵母細胞でも、昆虫細胞でも、または植物細胞でもよい。

【００１７】

本発明は、本発明の配列を含むトランスジェニック非ヒト動物を提供する。前記トランスジェニック非ヒト動物は、マウスでも、ラットでも、ウサギでも、ヒツジでも、ブタでも、ニワトリでも、ヤギでも、魚でも、イヌでもまたは乳牛でもよい。本発明は、本発明の配列を含むトランスジェニック植物を提供し、例えば前記植物は、トウモロコシでも、ソルガムでも、ジャガイモでも、トマト、コムギ、オイルシード、ナタネ、ダイズ、イネ、オオムギ、牧草、またはタバコでもよい。本発明は本発明の配列を含むトランスジェニック種子を提供し、例えば前記種子は、トウモロコシの種子でも、コムギの穀粒、オイルシード、ナタネ、ダイズ、ヤシ、ヒマワリ、ゴマ、コメ、オオムギ、落花生、またはタバコの種子でもよい。

本発明は、本発明の配列（例えば本発明の例示的配列を含む）またはその部分配列と相補的であるか、または前記とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、場合によって、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、または約60から100塩基であり、ある特徴では（場合によって）、前記ストリンジェントな条件は、約65℃の温度で0.2XのSSCにて約15分間の洗浄を含む洗浄工程を含む。

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼメッセージの翻訳を細胞で阻害する方法を提供し、前記方法は、本発明の配列（例えば本発明の例示的配列を含む）と相補的であるか、または前記とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に投与するか、または細胞で発現させる工程を含む。

本発明は、本発明の配列（例えば本発明の例示的配列を含む）の部分配列を含む、二本鎖の阻害性RNA（RNAi）分子を提供する。前記二本鎖の阻害性RNA（RNAi）分子は、長さが約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、20もしくは30またはそれより長い二重鎖ヌクレオチドであり得る。本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの発現を細胞で阻害する方法を提供し、前記方法は、二本鎖の阻害性RNA（iRNA）を細胞に投与するか、または細胞で発現させる工程を含み、この場合、前記RNAは、発明の配列（例えば本発明の例示的配列を含む）の部分配列を含む。

【００１８】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する単離、合成または組み換えポリペプチド、またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼに特異的な免疫応答を生じさせることができる、単離、合成または組み換えポリペプチド（例えばエピトープ）を提供し、さらに別の特徴では、本発明のペプチドおよびポリペプチドは、以下

の（ａ）－（ｍ）を含む配列を含む：

（ａ）配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てを有する配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、

配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974、および／または配列番号:976、または酵素的に活性なそのフラグメントと、少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれより高いか、または100％（完全な）配列同一性を有するアミノ酸配列であって、（ｉ）または（ｉｉ）のポリペプチドまたはペプチドは、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するか、または前記ポリペプチドまたはペプチドは、トランスフェラーゼ特異的抗体、例えばトランスアミナーゼ特異的抗体、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ特異的抗体、および／またはオキシドレダクターゼ特異的抗体、例えばデヒドロゲナーゼ特異的抗体、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ特異的抗体を生じさせることができる（エピトープまたは免疫原として機能するポリペプチドまたはペプチド）、前記ア

ミノ酸配列；

（b）（a）のポリペプチドまたはペプチドであって、前記配列同一性が（A）配列比較アルゴリズムによる解析又は目視精査によって、または（B）ポリペプチドもしくはペプチドまたは酵素、および／または酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）の少なくとも約20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、100、150、200、250、300もしくはそれより多いアミノ酸残基の領域にわたって、またはその完全長にわたって決定される、前記ポリペプチドまたはペプチド；

（c）（a）または（b）のポリペプチドまたはペプチドであって、前記配列同一性が配列比較アルゴリズムによる解析又は目視精査によって決定され、さらに場合によって、前記配列比較アルゴリズムがBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、フィルタリング設定がblastall -p blastp -d “nr pataa” -F Fに設定され、さらに他の全てのオプションが規定値に設定される、前記ポリペプチドまたはペプチド；

（d）請求項1に記載の核酸によってコードされるアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドが、（i）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するか、または（ii）（a）の配列および／または酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体を生じることができるという点で免疫学的な活性を有する、前記アミノ酸配列；

（e）（a）から（d）のいずれかであり、さらに少なくとも1つのアミノ酸残基の保存的置換を含むアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドまたはペプチドが、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、前記アミノ酸配列；

（e）（d）のアミノ酸配列であって、前記保存的置換が、ある脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸による置換、セリンのスレオニンによる置換またはその逆、ある酸性残基の別の酸性残基による置換、アミド基をもつある残基のアミド基をもつ別の残基による置換、ある塩基性残基の別の塩基性残基による交換、またはある芳香族残基の別の芳香族残基による置換、またはそれらの組合せを含む、前記アミノ酸配列；

（f）（e）のアミノ酸配列であって、前記脂肪族残基が、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンまたはその合成等価物を含み、前記酸性残基が、アスパラギン酸、グルタミン酸またはその合成等価物を含み、前記アミド基を含む残基が、アスパラギン酸、グルタミン酸またはその合成等価物を含み、前記塩基性残基が、リジン、アルギニンまたはその合成等価物を含み、前記芳香族残基が、フェニルアラニン、チロシンまたはその合成等価物を含む、前記アミノ酸配列；

（g）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するが、シグナル配列、プレプロドメイン、結合ドメイン、および／または他のドメインを欠く（a）から（f）のいずれかのポリペプチド；

（h）（g）のポリペプチドであって、前記結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記から成る、前記ポリペプチド；

（i）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、さらに異種配列を含む、（a）から（h）のいずれかのポリペプチド；

（j）（i）のポリペプチドであって、前記異種配列が、（A）異種シグナル配列、異種ドメイン、異種結合ドメイン、異種ドッケリンドメイン若しくは異種触媒ドメイン（CD）、または前記の組合せを含むか、前記からなるか；（B）異種シグナル配列、結合ドメイ

ンまたは触媒ドメイン（CD）が異種酵素に由来する、（A）の配列；または（C）タグ、エピトープ、標的誘導ペプチド、切断可能配列、検出可能部分または酵素を含むかまたは前記から成る、前記ポリペプチド；

（k）（i）または（j）のポリペプチドであって、前記異種配列または前記異種結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記ドメインから成る、前記ポリペプチド；

（l）（i）のポリペプチドであって、前記異種シグナル配列が、コードされたタンパク質を液胞、小胞体、葉緑体または澱粉顆粒へ誘導する、前記ポリペプチド；または、

（m）本発明のいずれかの核酸配列によってコードされるアミノ酸配列。

【００１９】

ある特徴では、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は、化学基の転移を触媒する活性、アミノ基転移反応の触媒活性、以下の反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）の触媒活性、および／または酸化還元反応の触媒活性、水素原子除去の触媒活性、および／または以下の反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）の触媒活性を含む。

本発明は、本発明のポリペプチドを含みシグナル配列またはプレプロ配列を欠く、単離、合成または組み換えポリペプチドを提供する。本発明は、本発明のポリペプチドを含みシグナル配列またはプレプロ配列を有する、単離、合成または組み換えポリペプチドを提供する。

ある特徴では、本発明のポリペプチドは、約100から約1000ユニット/mgタンパク質、約500から約750ユニット/mgタンパク質、約500から約1200ユニット/mgタンパク質、または約750から約1000ユニット/mgタンパク質の範囲の約37℃での比活性を含む、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する。また別の特徴では、本発明のポリペプチドは、約0.05から20ユニット/gの範囲、または0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20または前記より高いユニット/gのトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、この場合、1ユニットは、酵素1mgにつき1分間に放出される1μmolの生成物に匹敵する。ある実施態様では、トランスアミナーゼについては、1ユニットの活性は、酵素1mgにつき1分間に生成される1μmolのアルファ-ケト酸またはケトンに匹敵する（対応するアルファ-アミノ酸またはアミンから生成される）。また別の実施態様では、トランスアミナーゼについては、1ユニットの活性は、酵素1mgにつき1分間に生成される1μmolのアルファ-アミノ酸またはアミンに匹敵する（対応するアルファ-ケト酸またはケトンから生成される）。

【００２０】

ある特徴では、本発明のポリペプチドは少なくとも1つのグリコシル化部位を含むか、またはさらに多糖類を含む。前記グリコシル化はN-結合グリコシル化であってもよく、例えば、ポリペプチドはP.パストリス（P. pastoris）またはS.ポンベ（S. pombe）において発現後にグリコシル化される。

本発明は、本発明のポリペプチドを含むタンパク質調製物を提供し、前記タンパク質調製物は、液体、スラリー、固体またはゲルを含む。本発明は、本発明のポリペプチドおよび第二のドメインを含むヘテロダイマーを提供する。前記第二のドメインはポリペプチドであってもよく、前記ヘテロダイマーは融合タンパク質である。前記第二のドメインはエピトープまたはタグであってもよい。

本発明は、本発明のポリペプチドを含む、ホモダイマーまたはヘテロダイマーを提供す

る。本発明は固定されたポリペプチドを提供し、前記ポリペプチドは、本発明の配列、またはその部分配列、または本発明の核酸によってコードされたポリペプチド、または本発明のポリペプチドおよび第二のドメインを含むポリペプチドを含み、例えば、前記ポリペプチドは細胞、小胞、リポソーム、フィルム、膜、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、石墨粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレイ、キャピラリーチューブ、結晶、錠剤、ピル、カプセル、粉末、凝結物、表面、多孔構造物、または例えば木材チップ、ブラウンストック、パルプ、紙のような素材、および前記に由来する物質上または内部に固定される。

【００２１】

本発明のトランスフェラーゼおよび／またはオキシドレダクターゼは、単独で、またはトランスフェラーゼおよび／またはオキシドレダクターゼ並びに他の加水分解酵素（例えばセルラーゼ、マンナナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ）またはレドックス酵素（例えばラッカーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、オキシダーゼまたはレダクターゼ）の混合物（“カクテル”）として用いるか、または処方することができる。前記は、固体形（例えば散剤、凍結乾燥調製物、顆粒、錠剤、バー、結晶、カプセル、ピル、ペレット）、または液体形（例えば水溶液、エーロゾル、ゲル、ペースト、スラリー、水／油エマルジョン、クリーム、カプセル）、または小胞もしくはミセル懸濁物として用いるかまたは処方することができる。本発明の処方物は、以下の成分のいずれかまたはその組合せを含むことができる：ポリオール（例えばポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、グリセロール）、糖（例えばシュクロース、ソルビトール、トレハロース、グルコース、フルクトース、マルトース、マンノース）、ゲル形成剤（例えばグアゴム、カラギーナン、アルギネート、セルロース誘導体、ペクチン）、塩（例えば塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、脂肪酸および脂肪酸誘導体の塩）、金属キレート剤（例えばEDTA、EGTA、クエン酸ナトリウム）、抗菌剤（例えば脂肪酸または脂肪酸誘導体、パラベン、ソルベート、ベンゾエート）、例えばプロテアーゼのような酵素の影響を阻止するための追加の調節化合物、バルクタンパク質（例えばBSA、コムギ水解物）、ホウ酸化合物、アミノ酸もしくはペプチド、適切なpHまたは温度調節化合物、乳化剤（例えば非イオン性および／またはイオン性界面活性剤）、酸化還元剤（例えばシスチン／システイン、グルタチオン、酸化グルタチオン）、還元または抗酸化化合物（例えばアスコルビン酸）、または分散剤。酵素の安定性を改善するために、架橋およびタンパク質改変（例えばPEG化）、脂肪酸改変、グリコシル化もまた用いることができる。

【００２２】

本発明は、本発明の固定化ポリペプチドおよび／または核酸を含むアレイ、および本発明の固定化オリゴヌクレオチドを含むアレイを提供する。本発明の酵素、そのフラグメントおよび前記酵素をコードする核酸、プローブおよびそのフラグメントを固体支持体に固定することができ、このような実施態様は、本発明の酵素および核酸を、工業、医学、研究、製薬、食品および飼料、食品および飼料補助物質でのプロセッシング並びに他の適用およびプロセスで使用するときに経済的で効率的であり得る。例えば、酵素（またはその活性なフラグメント）の混合物またはカクテル（前記は特定の化学反応に用いられる）を固体支持体に結合させて、反応容器に浸すことができ、当該酵素反応を生じさせることができる。続いて、固体支持体を前記に結合させた酵素とともに容器から取り出し、反復使用に供することができる。本発明のある実施態様では、単離、合成または組み換え核酸は固体支持体に結合される。本発明の別の実施態様では、固体支持体は、ゲル、樹脂、ポリマー、セラミックス、ガラス、微小電極および前記の任意の組合せの群から選択される。例えば、本発明で有用な固体支持体にはゲルが含まれる。ゲルのいくつかの例には、セファロース、ゼラチン、グルタルアルデヒド、キトサン処理グルタルアルデヒド、アルブミン-グルタルアルデヒド、キトサン-キサンタン、トヨパールゲル（ポリマーゲル）、アルギネート、アルギネート-ポリリジン、アルギネート-ポリリジン、カラギーナン、アガロース、グリオキシルアガロース、磁性アガロース、デキストラン-アガロース、ポリ(カル

バモイルスルホネート)ヒドロゲル、BSA-PEGヒドロゲル、リン酸化ポリビニルアルコール（PVA）、モノアミノエチル-N-アミノエチル（MANA）、アミノ、または前記の任意の組合せが含まれる。本発明で有用な別の固体支持体は樹脂またはポリマーである。樹脂またはポリマーのいくつかの例には、セルロース、アクリルアミド、ナイロン、レーヨン、ポリエステル、陰イオン交換樹脂、AMBERLITE™ XAD-7、AMBERLITE™ XAD-8、AMBERLITE™ IRA-94、AMBERLITE™ IRC-50、ポリビニル、ポリアクリリック、ポリメタクリレート、または前記の任意の組合せが含まれる。本発明で有用な別のタイプの固体支持体はセラミックである。そのいくつかの例には、無孔性セラミック、多孔性セラミック、SiO_2、Al_2O_3が含まれる。本発明で有用な別のタイプの固体支持体はガラスである。そのいくつかの例には、無孔性ガラス、多孔性ガラス、アミノプロピルガラスまたは前記の任意の組合せが含まれる。用いることができる別のタイプの固体支持体は微小電極である。一例はポリエチレンイミン被覆マグネタイトである。石墨粒子を固体支持体として用いてもよい。固体支持体の別の例は細胞、例えば赤血球である。

【００２３】

酵素もしくはそのフラグメントまたは核酸を固体支持体に固定する、当業者に公知の多くの方法が存在する。そのような方法のいくつかの例には、静電気的小滴生成、電気化学的手段（共有結合、架橋、化学反応もしくはプロセス、被包化、捕捉、アルギン酸カルシウムまたはポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)を介する）が含まれる。同様な方法が以下の文献に記載されている：Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C. 1987. Academic Press. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. Volume 136；およびImmobilization of Enzymes and Cells. 1977. Humana Press. Edited by G.F. Bickerstaff. Series: Methods in Biotechnology, Edited by J.M. Walker。

本発明は、本発明のポリペプチドと特異的に結合する単離、合成または組み換え抗体を提供する。前記抗体はモノクローナルまたはポリクローナル抗体でもよく、または単鎖抗体である。本発明は、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を含むハイブリドーマを提供する。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する方法を提供し、前記方法は、（a）本発明の抗体を提供する工程；（b）ポリペプチドを含むサンプルを提供する工程；および（c）工程（b）のサンプルを工程（a）の抗体と、前記抗体がポリペプチドと特異的に結合する条件下で接触させ、それによってトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する工程を含む。本発明は、抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を製造する方法を提供し、前記方法は、液性免疫応答を生じさせるために十分な量で、本発明の核酸またはその部分配列を非ヒト動物に投与し、それによって抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を製造する工程を含む。本発明は、抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を製造する方法を提供し、前記方法は、液性免疫応答を生じさせるために十分な量で、本発明のポリペプチドまたはその部分配列を非ヒト動物に投与し、それによって抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒド

ロゲナーゼ抗体を製造する工程を含む。

【００２４】

本発明は組み換えポリペプチドを生成する方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：（ａ）本発明の配列を含む核酸であって、プロモータに作動できるように連結されている前記核酸を提供する工程；および（ｂ）前記ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程（ａ）の核酸を発現させ、それによって組み換えポリペプチドを生成する工程。前記方法はさらに、工程（ａ）の核酸で宿主細胞を形質転換させる工程を含むことができ、続いて工程（ａ）の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組み換えポリペプチドを生成する。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法を提供し、前記方法は、（ａ）本発明のポリペプチドを提供する工程；（ｂ）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質を提供する工程；および（ｃ）ポリペプチドを工程（ｂ）の基質と接触させ、前記基質の量の低下または反応生成物の量の増加を検出する工程を含み、前記基質の量の低下または反応生成物の量の増加により、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドが検出される。

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質を同定する方法を提供し、前記方法は、（ａ）本発明のポリペプチドを提供する工程；（ｂ）試験基質を提供する工程；および（ｃ）工程（ａ）のポリペプチドを工程（ｂ）の試験基質と接触させ、前記基質の量の低下または反応生成物の量の増加を検出する工程を含み、前記基質の量の低下または反応生成物の量の増加があれば、前記試験基質をトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質として同定する。

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

本発明は、試験化合物があるポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する方法を提供し、前記方法は、（ａ）本発明のポリペプチドを提供する工程；（ｂ）試験化合物を提供する工程；（ｃ）前記ポリペプチドを前記試験化合物と接触させる工程；および（ｄ）工程（ｂ）の試験化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程を含む。

【００２５】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性の調節物質を同定する方法を提供し、前記方法は、（ａ）本発明のポリペプチドを提供する工程；（ｂ）試験化合物を提供する工程；（ｃ）工程（ａ）のポリペプチドを工程（ｂ）の試験化合物と接触させ、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの活性を測定する工程を含み、この場合、前記試験化合物の非存在下における活性

と比較して、前記試験化合物の存在下で測定したトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性に変化があれば、試験化合物が、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を調節するという決定がなされる。トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質を提供し、前記基質の量の低下もしくは反応生成物の量の増加、または前記基質の量の増加もしくは反応生成物の量の低下を検出することによって測定することができる。ある特徴では、試験化合物の非存在下における基質または反応生成物の量と比較して前記試験化合物の存在下で基質の量の低下または反応生成物の量の増加があれば、前記試験化合物は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性の活性化物質として同定される。ある特徴では、試験化合物の非存在下における基質または反応生成物の量と比較して試験化合物の存在下で基質の量の増加または反応生成物の量の低下があれば、前記試験化合物は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性の阻害物質として同定される。

【００２６】

本発明は、プロセッサおよびデータ保存装置を含むコンピュータシステムを提供し、前記データ保存装置にはポリペプチド配列または核酸配列が保存されてあり、前記ポリペプチド配列は本発明の配列、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む。前記コンピュータシステムはさらに、配列比較アルゴリズムおよび少なくとも1つの参照配列が保存されてあるデータ保存装置を含むことができる。別の特徴では、配列比較アルゴリズムは、多形性を表示するコンピュータプログラムを含む。ある特徴では、前記コンピュータシステムはさらに、前記配列内の1つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーを含むことができる。本発明は、本発明のポリペプチド配列または核酸配列が保存されてあるコンピュータ読み出し可能媒体を提供する。本発明は配列内の特徴を同定する方法を提供し、前記方法は、（a）配列内の1つ以上の特徴を同定するコンピュータプログラムを用いて配列を読み取る工程（前記配列は本発明のポリペプチド配列または核酸配列を含む）；および前記コンピュータプログラムを用いて配列内の1つ以上の特徴を同定する工程。本発明は、第一の配列と第二の配列を比較する方法を提供し、前記方法は、（a）配列を比較するコンピュータプログラムを使用することにより第一の配列および第二の配列を読み取る工程（第一の配列は本発明のポリペプチド配列または核酸配列を含む）；および（b）第一の配列と第二の配列との間の相違をコンピュータプログラムにより決定する工程を含む。第一の配列と第二の配列との間の相違を決定する前記工程はさらに多形性を同定する工程を含むことができる。ある特徴では、前記方法はさらに、配列内の1つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーを含むことができる。別の特徴では、前記方法は、コンピュータプログラムを用いて第一の配列を読み取り、配列内の1つ以上の特徴を同定する工程を含むことができる。

【００２７】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法を提供し、前記方法は、（a）トラン

スフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー配列対を提供する工程（前記プライマー対は本発明の核酸を増幅させることができる）；（b）環境サンプルから核酸を単離する工程、またはサンプル中の核酸がハイブリダイゼーションのために増幅プライマー対に接近できるように環境サンプルを処理する工程；および（c）工程（b）の核酸を工程（a）の増幅プライマー対と一緒にし、環境サンプルの核酸を増幅させ、それによって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離および回収する工程を含む。増幅プライマー配列対の一方または各メンバーは、本発明の配列の連続する少なくとも約10から50塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。ある特徴では、前記増幅プライマー配列対は本発明の増幅対である。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法を提供し、前記方法は、（a）本発明の核酸またはその部分配列を含むポリヌクレオチドプローブを提供する工程；（b）環境サンプルから核酸を単離する工程、またはサンプル中の核酸がハイブリダイゼーションのために工程（a）のポリヌクレオチドプローブに接近できるように環境サンプルを処理する工程；および（c）工程（b）の単離、合成もしくは組み換え核酸、または処理環境サンプルを工程（a）のポリヌクレオチドプローブと一緒にする工程；および（d）工程（a）のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離し、それによって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離および回収する工程を含む。前記環境サンプルは、水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプルまたは生物学的サンプルを含むことができる。ある特徴では、生物学的サンプルは、細菌細胞、原生動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、菌類細胞または哺乳動物細胞から誘導することができる。

【００２８】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の変種を生成する方法を提供する。前記方法は、（a）本発明の核酸を含む鋳型核酸を提供する工程；および（b）鋳型配列内で1つ以上の1つ以上のヌクレオチドを改変、欠失もしくは付加するか、または前記の組合せを実施して鋳型核酸の変種を生成する工程を含む。ある特徴では、前記方法はさらに、変種核酸を発現させて変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドを生成する工程を含むことができる。前記改変、付加または欠失は、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ（例えばGeneReassembly、例えば米国特許6,537,776号を参照されたい）、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセンブリ（SLR）または前記の組合せを含む方法によって導入することができる。別の特徴では、前記改変、付加または欠失は、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変

異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成および前記の組合せを含む方法によって導入される。

【００２９】

ある特徴では、前記方法は、鋳型核酸によってコードされたポリペプチドのものとは変異したもしくは異なる活性、または変異したもしくは異なる安定性を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが生成されるまで反復して繰り返すことができる。ある特徴では、前記変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドは耐熱性であり、上昇温度に暴露した後で何らかの活性を保持する。別の特徴では、前記変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドは、鋳型核酸によってコードされたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼと比較してグリコシル化の増加を示す。あるいは、前記変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドは、高温下でトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を示し、この場合、鋳型核酸によってコードされたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、前記の高温下では活性がない。ある特徴では、前記方法は、鋳型核酸のものとは変異したコドン使用頻度を有するランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが生成されるまで反復して繰り返すことができる。別の特徴では、前記方法は、鋳型核酸のものより高いもしくは低いレベルのメッセージ発現または安定性を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が生成されるまで反復して繰り返すことができる。別の特徴では、最終的なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ生成物を含む処方は、前記生成物中のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの性能の向上または調節を可能にする。

【００３０】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変して、宿主細胞中でその発現を増加させる方法を提供する。前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする本発明の核酸を提供する工程；および（b）工程（a）の核酸の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優

先コドンまたは中立的に使用されるコドンで置換し、それによって核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を増加させる工程を含み、この場合、優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先コドンまたは低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示されるコドンである。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変する方法を提供する。前記方法は、（a）本発明の核酸を提供する工程；および（b）工程（a）の核酸のコドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする異なるコドンで置換し、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸のコドンを改変する工程を含む。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変して、宿主細胞中でその発現を増加させる方法を提供する。前記方法は、（a）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドをコードする本発明の核酸を提供する工程；および（b）工程（a）の核酸の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンで置換し、それによって核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を増加させる工程を含み、この場合、優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先コドンまたは低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示されるコドンである。

【００３１】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変して、宿主細胞中でその発現を低下させる方法を提供する。前記方法は、（a）本発明の核酸を提供する工程；および（b）工程（a）の核酸中の少なくとも1つの優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする非優先コドンまたは低優先コドンで置換し、それによって核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を低下させる工程を含み、この場合、優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先コドンまたは低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示されるコドンである。

本発明は、複数の改変トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する方法を提供する（この場合、改変される活性部位または基質結合部位は、第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする配列を含む第一の核酸に由来する）。前記方法は、（a）第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする第一の核酸を提供する工程（この場合、前記第一の核酸配列は本発明の配列またはその部分配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、さらに前記核酸はトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性部位または基質結合部位をコードする）；（b）前記第一の核酸内の複数の標的コドンにおいて天然に存在するアミノ酸変種をコードする一組の変異導入オリゴヌクレオチドを提供する工程；および（c）前記一組の変異導入オリゴヌクレオチドを

用いて、変異が導入された各アミノ酸コドンにおいて一連のアミノ酸変種をコードする一組の活性部位コード変種または基質結合部位コード変種核酸を生成し、それによって複数の改変トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する工程を含む。ある特徴では、前記方法は、最適化定方向進化システム、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、または合成連結再アッセンブリ(SLR) 含む方法によって、工程（a）の第一の核酸に変異を導入する工程を含む。ある特徴では、前記方法は、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ（GeneReassembly, 米国特許6,537,776号）、遺伝子部位飽和変異導入(GSSM)、合成連結再アッセンブリ(SLR)、および前記の組合せを含む方法によって、工程（a）の第一の核酸または変種に変異を導入する工程を含む。ある特徴では、前記方法は、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成および前記の組合せを含む方法によって、工程（a）の第一の核酸または変種に変異を導入する工程を含む。

【００３２】

本発明は小分子を生成する方法を提供する。前記方法は、（a）小分子を合成または改変することができる複数の生合成酵素を提供する工程（この場合、前記酵素の1つは本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ含む）；（b）工程（a）の酵素の少なくとも１つに対する基質を提供する工程；および（c）複数の生物触媒反応を促進する条件下で工程（b）の基質を前記酵素と反応させて一連の生物触媒反応により小分子を生成する工程を含む。本発明は小分子を改変する方法を提供する。前記方法は、（a）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を提供する工程（この場合、前記酵素は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドまたはその部分配列を含む）；（b）小分子を提供する工程；および（c）前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素によって触媒される酵素反応が促進される条件下で工程（a）の酵素を工程（b）の小分子と反応させ、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素反応により小分子を改変する工程を含む。ある特徴では、前記方法は、工程（a）の酵素に対する複数の小分子基質を含み、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素により触媒される少なくとも1つの酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含むことができる。ある特徴では、前記方法は、複数の追加の酵素をそれら酵素による複数の生物触媒反応を促進する条件下で含み、複数の酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含むことができる。別の特徴では、前記方法はさらに、所望の活性を示す特定の小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために前記ライブラリーを試験する工程を含むことができる。前記ライブラリーの試験工程はさらに、所望の活性をもつ特定の改変小分子の有無について改変小分子の一部分を試験することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の前記一部分を生成するために用

いられた生物触媒反応の1つを除いて全てを系統的に排除し、所望の活性をもつ特定の改変小分子を生成する少なくとも1つの特異的な生物触媒反応を同定する工程を含むことができる。

【００３３】

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法を提供する。前記方法は、（a）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を提供する工程（この場合、前記酵素は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドまたはその部分配列を含む）；および（b）工程（a）の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性について残余の配列を試験し、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程を含む。ある特徴では、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質を提供し、前記基質量の低下または反応生成物量の増加を検出することによって測定される。

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

【００３４】

本発明は、本発明のポリペプチド（本発明の例示的ポリペプチド配列を含む）の残基1から12、1から13、1から14、1から15、1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、1から33、1から34、1から35、1から36、1から37、1から38、1から40、1から41、1から42、1から43または1から44に示される配列から成るか、または前記を含む、単離、合成または組換えシグナル配列を提供する。

本発明は、シグナルペプチド（SP）含む少なくとも第一のドメイン、および本発明の配列またはその部分配列を含む異種ポリペプチドまたはペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含むキメラポリペプチドを提供し、この場合、前記異種ポリペプチドまたはペプチドは天然には前記シグナルペプチド（SP）と随伴していない。ある特徴では、前記シグナルペプチド（CD）は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナー

ゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼには由来しない。前記異種ポリペプチドまたはペプチドは、前記シグナルペプチド（SP）またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの触媒ドメイン（CD）のアミノ末端、カルボキシ末端または両端に存在することができる。本発明は、キメラポリペプチドをコードする単離、合成または組み換え核酸を提供し、この場合、前記キメラポリペプチドは、シグナルペプチド（SP）含む少なくとも第一のドメインおよび本発明の異種ポリペプチドもしくはペプチドまたはその部分配列を含む少なくとも第二のドメインを含み、前記異種ポリペプチドまたはペプチドは前記シグナルペプチド（SP）と天然には随伴していない。

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を増加させる方法を提供する。前記方法は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチド（この場合、前記ポリペプチドは、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドの連続する少なくとも30のアミノ酸を含む）をグリコシル化し、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を増加させる工程を含む。ある特徴では、前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は、約0℃を超える温度から約20℃、約20℃から約37℃、約37℃から約50℃、約50℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約80℃、約80℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約110℃、または前記より高い範囲の温度で熱安定性または熱耐性であり得る。

【００３５】

本発明は、細胞内で組み換えトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドを過剰発現させる方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸を含むベクターまたは本発明の核酸配列を発現させる工程を含み、この場合、前記配列同一性は配列比較アルゴリズムによる解析または目視精査によって決定され、過剰発現は高活性プロモーター、二シストロンベクターの使用によって、または前記ベクターの遺伝子増幅によって達成される。

本発明はトランスジェニック植物および種子を作製する方法を提供する。前記方法は、（a）異種核酸配列を細胞に導入し、それによって形質転換植物または種子細胞を作製する工程（この場合、前記異種核酸配列は本発明の核酸配列を含む）；および（b）前記形質転換細胞または種子からトランスジェニック植物を作製する工程を含む。ある特徴では、工程（a）はさらに、植物細胞プロトプラストのエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションにより前記異種核酸配列を導入する工程を含むことができる。別の特徴では、工程（a）はさらに、DNA粒子ボンバードメントによって、異種核酸配列を植物組織に直接導入する工程を含むことができる。あるいは、工程（a）はさらに、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）宿主を用いて異種核酸配列を植物細胞DNAに導入する工程を含むことができる。ある特徴では、前記植物細胞はジャガイモ、トウモロコシ、イネ、コムギ、タバコまたはオオムギ細胞であり得る。

本発明は異種核酸配列を植物細胞で発現させる方法を提供する。前記方法は、（a）プロモーターに作動できるように連結された異種核酸配列で植物細胞を形質転換する工程（前記異種核酸配列は本発明の核酸配列を含む）；（b）前記異種核酸配列が前記植物細胞で発現する条件下で前記植物を栽培する工程を含む。本発明は異種核酸配列を植物細胞で

発現させる方法を提供する。前記方法は、（a）プロモーターに作動できるように連結された異種核酸配列で植物細胞を形質転換する工程（前記異種核酸配列は本発明の核酸配列を含む）；（b）前記異種核酸配列が前記植物細胞で発現する条件下で前記植物を栽培する工程を含む。

【００３６】

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチド（前記ポリペプチドは、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する）を含む洗剤組成物を提供する。前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは非表面活性でも表面活性でもよい。前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、非水性液体組成物、鋳造固体、顆粒形、粒状形、圧縮錠剤、ゲル形、ペーストもしくはスラリー形として処方することができる。本発明は物体を洗浄する方法を提供し、前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物を提供する工程；（b）物体を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と、前記組成物が物体を洗浄することができる条件下で接触させる工程を含む。

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む織物材料または織物（例えば糸を含む）を提供する。本発明は織物材料または織物を処理する（例えば組成物から汚れを除去する）方法を提供し、前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物を提供する工程；（b）織物材料または織物を提供する工程；および（c）前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが前記織物材料または織物を処理する（例えば汚れを除去する）ことができる条件下で、工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程を含む。本発明は織物の仕上がりを改善する方法を提供し、前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物を提供する工程；（b）織物を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の織物と前記ポリペプチドが織物を処理することができる条件下で接触させ、それによって織物の仕上がりを改善する工程を含む。ある特徴では、前記織物は羊毛または絹である。別の特徴では、前記織物はセルロース繊維または天然繊維と合成繊維の混紡である。

【００３７】

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、飼料、食品、飼料サプリメント、食品サプリメント、栄養組成物または栄養補助物を提供する。前記食品または飼料はシリアル、穀粒、トウモロコシなどであり得る。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを含む、生地、パンまたは焼成製品、および／または生地、

パンまたは焼成製品前駆物質を提供し、この場合、前記ポリペプチドは本発明の配列を含むか、または前記ポリペプチドは本発明の配列を含む核酸によってコードされる。

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを含む飲料および飲料前駆物質を提供し、この場合、前記ポリペプチドは本発明の配列を含むか、または前記ポリペプチドは本発明の配列を含む核酸によってコードされる。本発明は飲料製造方法を提供し、前記方法は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメントを飲料または飲料前駆物質に投与することを含み、この場合、前記ポリペプチドは本発明の配列を含むか、または前記ポリペプチドは本発明の配列を含む核酸によってコードされ、この場合、ある特徴では（場合によって）前記飲料または飲料前駆体は麦芽汁またはビールである。

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、例えば人間用または動物用の食品、飼料または栄養サプリメントを提供する。ある特徴では、前記食品または栄養サプリメント中のポリペプチドはグリコシル化できる。本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む食用酵素デリバリーマトリックスを提供する。ある特徴では、前記デリバリーマトリックスはペレットを含む。ある特徴では、前記ポリペプチドはグリコシル化できる。ある特徴では、前記トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は耐熱性である。別の特徴では、前記トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性は熱安定性である。

【００３８】

ある特徴では、前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを、細菌、酵母、植物、昆虫、菌類および動物から成る群から選択される生物で発現させることによって調製することができる。前記生物は、S.ポンベ（S. pombe）、S.セレビシアエ（S. cerevisiae）、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）、シュードモナス種（Pseudomonas sp.）、大腸菌（E. coli）、ストレプトミセス種（Streptomyces sp.）、バチルス種（Bacillus sp.）およびラクトバチルス種 （Lactobacillus sp.）から成る群から選択することができる。

本発明は、熱安定性組み換えトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素、例えば本発明のポリペプチドを含む、食用酵素デリバリーマトリックスを提供する。本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼサプリメントを動物にデリバリーする方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：顆粒状の食用担体および熱安定性組み換えトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を含む、ペレット形の食用酵素デリバリーマトリックスを調製する工程（この場合、前記ペレットは、その中に含まれている前記ト

ランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を水性媒体中に容易に分散させる）；および前記食用酵素デリバリーマトリックスを動物に投与する工程。前記組み換えトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素は本発明のポリペプチドを含むことができる。前記顆粒状食用担体は、穀物胚芽、油を消費しつくした穀物胚芽、干草、アルファルファ、チモシー、ダイズ殻、引き割りヒマワリ、コムギミッド（wheat midd）から成る群から選択される担体を含むことができる。前記食用担体は油を消費しつくした穀物胚芽を含むことができる。前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素はグリコシル化されて、ペレット化条件下で熱安定性を提供することができる。前記デリバリーマトリックスは、穀物胚芽およびトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む混合物をペレット化することによって形成できる。前記ペレット化条件は、約80℃を超える温度を約5分間適用する工程を含むことができ、前記酵素は、酵素1mgにつき少なくとも350から約900ユニットの比活性を保持する。

【００３９】

本発明は、乳製品を処理する、例えば前記の触感および風味を改善する方法を提供する。前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する工程；（b）乳製品を提供する工程；および（c）前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが前記乳製品を処理、例えば前記の触感または風味を改善することができる条件下で、工程（a）のポリペプチドおよび工程（b）の乳製品を接触させる工程を含む。ある特徴では、前記乳製品はチーズまたはヨーグルトを含む。本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む乳製品を提供する。

本発明は、油に富む植物材料の油の抽出を改善する方法を提供する。前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する工程；（b）油に富む植物材料を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドおよび工程（b）の油に富む植物材料を接触させる工程を含む。ある特徴では、前記油に富む植物材料は油に富む種子を含む。前記油は、大豆油でもオリーブ油でもナタネ（キャノーラ）油でも、ヒマワリ油でもよい。

【００４０】

本発明は、果実もしくは野菜ジュース、シロップ、ピューレまたは抽出物を調製する方

法を提供し、前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する工程；（b）果実または野菜材料を含む組成物もしくは液体を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドおよび組成物を接触させ、それによって果実もしくは野菜ジュース、シロップ、ピューレまたは抽出物を調製する工程を含む。

本発明は、木材、木材製品、紙、紙製品、パルプ、パルプ製品、紙廃棄物、再生紙組成物を処理する方法を提供する。前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する工程；（b）木材、木材製品、紙、紙製品、パルプ、パルプ製品、紙廃棄物、再生紙組成物を含む組成物を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドおよび組成物を接触させ、それによって木材、木材製品、紙、紙製品、パルプ、パルプ製品、紙廃棄物、再生紙組成物を処理する工程を含む。本発明のある特徴では、前記処理は、リグニンの削減または可溶化（脱リグニン）、漂白または脱色、および／またはインクの除去を含む。

本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、または本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む紙または紙製品または紙パルプを提供する。本発明は紙または紙もしくは木材パルプを処理する方法を提供し、前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する工程；（b）紙または紙もしくは木材パルプを含む組成物を提供する工程；および（c）前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが前記紙または紙もしくは木材パルプを処理できる条件下で、工程（a）のポリペプチドおよび工程（b）の組成物を接触させる工程を含む。

【００４１】

本発明は、糸、織物、編み物糸、布または織物材料を漂白する方法を提供する。前記方法は、前記織物、編み物糸、布または織物材料をトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼと、前記織物材料の漂白に適した条件下で接触させる工程を含み、この場合、前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、本発明のポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを含む。前記糸、織物、編み物糸、布または織物材料は、非木綿セルロース系の糸、織物、編み物糸、布または織物材料を含むことができる。本発明は、本発明の配列を有するポリペプチド、または本発明の配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド、または酵素的に活性な前記のフラグメントを

含む織物、編み物糸、布または織物材料を提供し、ある特徴では（場合によって）、前記織物、編み物糸、布または織物材料は、非木綿セルロース系の織物、編み物糸、布または織物材料を含むことができる。

本発明は、本発明のポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを含む、木材、木材チップ、木材パルプ、木材製品、紙パルプ、紙製品、新聞紙または紙廃棄物を提供する。本発明は、本発明のポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを含む織物、編み物糸、布または織物材料を提供する。

本発明はエタノールを製造する方法を提供し、前記方法は、有機材料（例えばバイオマス）をトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメントと接触させる工程を含み、この場合、前記ポリペプチドは本発明の配列を有するか、または前記ポリペプチドは本発明の配列を含む核酸によってコードされる。本発明は、エタノールおよびトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを含む組成物を提供し、この場合、前記ポリペプチドは本発明の配列を有するか、または前記ポリペプチドは本発明の配列を含む核酸によってコードされる。本発明はエタノールを製造する方法を提供し、前記方法は、（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメントを提供する工程；（b）有機組成物を提供する工程；および（c）工程（b）の組成物を工程（a）のポリペプチドと接触させる工程を含む。

【００４２】

本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメントを含む医薬組成物を提供し、この場合、前記ポリペプチドは本発明の配列を有するか、または前記ポリペプチドは本発明の配列を含む核酸によってコードされる。ある特徴では、前記医薬組成物は消化補助剤として機能するか、または任意の症状または疾患（例えば肝損傷／疾患または心筋梗塞）の診断、管理または治療に用いられる。

ある特徴では、本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む口内手入れ製品を提供する。前記口内手入れ製品は、歯磨きペースト、歯磨きクリーム、ゲルまたは歯磨き粉、オドンチック、口腔洗浄液、歯磨き前または歯磨き後洗浄処方物、チューインガム、ロゼンジまたはキャンディーを含むことができる。本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する本発明のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含むコンタクトレンズ洗浄組成物を提供する。

本発明は、本発明のポリペプチド配列および少なくとも1つの異種結合ドメインを含む

、キメラトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供し、ある特徴では（場合によって）、前記結合ドメインは、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含む。本発明は、新規な結合特異性有するか、または結合特異性が強化された、キメラトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの設計方法を提供する。前記方法は、異種結合ドメインまたは追加される内因性結合ドメインをトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼに挿入する工程を含み、この場合、前記結合ドメインは、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ配列の結合配列を含むか、あるいは異種結合ドメインまたは追加される内因性結合ドメインが本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼに挿入される。

【００４３】

本発明は、少なくとも1つの本発明の酵素および1つ以上の他の酵素を含む酵素混合物または“カクテル”を提供する。後者は別のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、または任意の酵素であり得る。例えば、本発明の“カクテル”は、本発明の少なくとも1つの酵素に加えて、任意の他の酵素、ほんの数例を列挙すると、例えばキシラナーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、またはエンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、ラセマーゼ、イソメラーゼ、エピメラーゼ、オキシドレダクターゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクツロナンアセチルエステラーゼ、ポリガラクツロナーゼ、ラムノガラクツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクチンリアーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼを含むことができる。また別の実施態様では、本発明の少なくとも1つの酵素を含むこれら酵素混合物または“カクテル”は、本発明の任意のプロセスもしくは方法で、または本発明の組成物（例えば食品もしくは飼料、食品もしくは飼料サプリメント、繊物材料、紙、加工木材など）および前記を製造する方法で、並びに、紙、パルプ、木材、紙パルプ、または木材廃棄物または副産物などを処理する組成物および方法で、並びに前記の最終製品で用いることができる。

本発明はピルビン酸および／またはD-グルタミン酸の製造方法を提供する。前記方法は、（a）D-アラニンおよび2-オキソグルタル酸を提供する工程；（b）本発明のポリペプチドを提供する工程；および（c）前記ポリペプチドが反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをD-アラニン＋2-オキソグルタル酸と接触させる工程を含む。

本発明は2-オキソ酸を製造する方法を提供する。前記方法は、（i）（a）D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプターを提供する工程；（b）本発明のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および（c）前記ポリペプチドが反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをD-アミノ酸＋H_2O＋アクセプターと接触させる工程を含む方法であるか、（ii）アクセプターがベンゾキノンである、（i）の方法、または（iii）ベンゾキノンが1,2-ベンゾキノンもしくは1,4-ベンゾキノン、またはユビキノン、ユビデカレノンまたはコエンザイム

Qである、（ii）の方法である。

【００４４】

本発明はアミノ基をアミノ酸からアルファ-ケト酸へ転移させる方法を提供する。前記方法は、（i）（a）アミノ酸を提供する工程；（b）本発明のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および（c）前記ポリペプチドがアミノ酸からアルファ-ケト酸への変換を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをアミノ酸と接触させる工程を含むか、または（ii）前記トランスアミナーゼ活性がラセミアミノ酸混合物の光学的に実質的に純粋なアルファ-ケト酸への変換の触媒を含む、（i）の方法である。

本発明はアルファ-ケト酸からアミノ酸を製造する方法を提供する。前記方法は、（i）（a）アルファ-ケト酸を提供する工程；（b）本発明のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および（c）前記ポリペプチドがアルファ-ケト酸からアミノ酸への変換を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをアルファ-ケト酸と接触させる工程を含むか、（ii）前記トランスアミナーゼ活性がラセミアルファ-ケト酸混合物の光学的に実質的に純粋なD-またはL-アミノ酸への変換の触媒を含む、（i）の方法であるか、または（iii）オキサロ酢酸がアスパラギン酸に変換されるか、またはα-ケトグルタル酸がグルタル酸に変換されるか、またはα-ケトイソバリレートがL-バリンに変換されるか、または前記トランスアミナーゼ活性が、イソブチルアミンのイソブチルアルデヒドへの変換を触媒するオメガトランスアミナーゼである、（i）または（ii）の方法である。

本発明は、アミンのケトンへの変換を触媒する方法を提供する。前記方法は、（i）（a）アミンを提供する工程；（b）本発明のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および（c）前記ポリペプチドがアミンのケトンへの変換を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをアミンと接触させる工程を含むか（この場合アミンはトリプトファンに存在しないかまたはトリプトファンに由来しないが、ただし第二のアミノ酸がトリプトファンではないことを条件とするか、またはアミンがトリプトファンに存在しないかまたはトリプトファンに由来しないことを条件とする）、（ii）前記トランスアミナーゼ活性がキラルアミンのケトンへの変換の触媒を含む、（i）の方法であるか、または（iii）アミンがω-アミンである、（i）または（ii）の方法である。

本発明はアミン酸の合成を触媒する方法を提供する。前記方法は、（i）（a）アミン酸およびケト酸を提供する工程（この場合アミノ酸はトリプトファンではない）；（b）本発明のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および（c）第二のアミノ酸およびピルビン酸が生成される条件下で、工程（b）のポリペプチドをアミノ酸およびケト酸と接触させる工程を含むか（この場合第二のアミノ酸はトリプトファンではない（ただし第二のアミノ酸はトリプトファンではないことを条件とする））、または（ii）トランスアミナーゼ酵素と反応しない化合物を生成するために適切な条件下でピルビン酸をアセトラクテートシンターゼ酵素と反応させる工程をさらに含む（i）の方法であるか、または（iii）トランスアミナーゼ酵素と反応しない化合物がアセトラクテートまたはアセトインであるか；または第一のアミノ酸がアラニンまたはL-アスパラギン酸であるか；またはケト酸が2-酪酸またはトリ-メチルピルビン酸であるか；または第二のアミノ酸が2-アミノ酪酸またはtert-ロイシンである、（ii）の方法である。

本発明の1つ以上の実施態様の詳細は付随の図面および下記の記述で示される。本発明の他の特徴、目的および利点は前記記述および図面から並びに特許請求の範囲から明瞭であろう。

本明細書に引用した全ての刊行物、特許、特許出願、GenBank配列およびATCC寄託物は、一切の目的のために参照により本明細書に含まれる。

以下の図面は本発明の特徴の説明であって、特許請求の範囲に包含される本発明の範囲を制限しようとするものではない。

本特許または出願ファイルは少なくとも1つのカラー図面を含む。カラー図面を含む、本特許または特許出願公開広報の写しは、申請および所定料金の支払いにより担当局により提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００４５】
【図１】コンピュータシステムのブロック図である。
【図２】新規なヌクレオチド又はタンパク質配列とデータベースの配列を比較し、前記新規配列とデータベース配列との間の相同性レベルを決定する方法の１つの特徴を示す流れ図である。
【図３】2つの配列が相同であるか否かを決定するためのコンピュータ処理の１つの特徴を示す流れ図である。
【図４】配列中の特徴の存在を検出するためのアイデンティファイヤープロセス300の１つの特徴を示す流れ図である。
【図５】下記実施例9で詳細に説明されるように、配列番号:894様タンパク質のコンセンサス領域（図面で強調されている）を示す、本発明の配列の比較図である。
【図６－１】下記実施例10で詳細に説明されるように、本発明の配列番号:910と他の公表DATSとの酵素配列比較図解であり、図でも強調されているとおり、本酵素を固有のものとし、さらにその優れた酵素活性を説明し得る残基を認めることができよう。
【図６－２】図６－１続き。
【図７－１】下記実施例14で詳細に説明されるように、関連するD-アミノトランスフェラーゼおよびそれらが共有するコア配列モチーフの比較図である。
【図７－２】図７－１続き。
【図８】3DAA-D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼのモデルである。下記実施例29で詳細に説明されるように、番号付き残基はTMCA^{SM}進化のために選択された部位を示している。　種々の図面中の同様な参照記号は同様なエレメントを表示している。
【発明を実施するための形態】
【００４６】
本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ（“d-アミノトランスフェラーゼ”または“D-AT”または“DAT”とも称される）、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および前記をコードするポリヌクレオチド、並びに前記を製造および使用する方法を提供する。本発明のポリペプチドのトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、および／または化学基転移を触媒し、アミノ基転移反応を触媒し、以下の反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒し、および／または酸化還元反応を触媒し、水素原子除去を触媒し、および／または以下の反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）を触媒する酵素を包含する。本発明のトランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼを用いて、医薬（薬剤）組成物、医薬（薬剤）前駆体および／または中間体、抗生物質、甘味剤、ペプチド酵素、ペプチドホルモン、燃料および燃料添加物組成物、食品および食品添加物、飲料および飲料添加物、飼料および飼料添加物、薬剤および薬剤添加物、栄養補助物、織物材料、木材、紙、パルプ、洗剤などを製造および加工することができる。
ある特徴では、本発明の酵素は耐熱性であり、および／または、高pHおよび／または低pHに耐性である。例えば、ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、少なくとも約80℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃、101℃、102℃、103℃、103.5℃、104℃、105℃、107℃、108℃、109℃もしくは110℃または前記より高い温度、および少なくとも約pH11またはそれより高い塩基性pHを含む条件下で活性を保持する。

【００４７】
本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性、または本明細書に記載の他の活性を有する、少なくとも1つのポリペプチドをコードする核酸を含む、単離、合成または組み換え核酸を提供し、前記核酸は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列

番号:513、配列番号:515、配列番号:517、配列番号:519、配列番号:521、配列番号:523、配列番号:525、配列番号:527、配列番号:529、配列番号:531、配列番号:533、配列番号:535、配列番号:537、配列番号:539、配列番号:541、配列番号:543、配列番号:545、配列番号:547、配列番号:549、配列番号:551、配列番号:553、配列番号:555、配列番号:557、配列番号:559、配列番号:561、配列番号:563、配列番号:565、配列番号:567、配列番号:569、配列番号:571、配列番号:573、配列番号:575、配列番号:577、配列番号:579、配列番号:581、配列番号:583、配列番号:585、配列番号:587、配列番号:589、配列番号:591、配列番号:593、配列番号:595、配列番号:597、配列番号:599、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:605、配列番号:607、配列番号:609、配列番号:611、配列番号:613、配列番号:615、配列番号:617、配列番号:619、配列番号:621、配列番号:623、配列番号:625、配列番号:627、配列番号:629、配列番号:631、配列番号:633、配列番号:635、配列番号:637、配列番号:639、配列番号:641、配列番号:643、配列番号:645、配列番号:647、配列番号:649、配列番号:651、配列番号:653、配列番号:655、配列番号:657、配列番号: 659、配列番号: 661、配列番号:663、配列番号:665、配列番号:667、配列番号:669、配列番号:671、配列番号:673、配列番号:675、配列番号:677、配列番号:679、配列番号:681、配列番号:683、配列番号:685、配列番号:687、配列番号:689、配列番号:691、配列番号:693、配列番号:695、配列番号:697、配列番号:699、配列番号:701、配列番号:703、配列番号:705、配列番号:707、配列番号:709、配列番号:711、配列番号:713、配列番号:715、配列番号:717、配列番号:719、配列番号:721、配列番号:723、配列番号:725、配列番号:727、配列番号:729、配列番号:731、配列番号:733、配列番号:735、配列番号:737、配列番号:739、配列番号:741、配列番号:743、配列番号:745、配列番号:747、配列番号:749、配列番号:751、配列番号:753、配列番号:755、配列番号:757、配列番号:759、配列番号:761、配列番号:763、配列番号:765、配列番号:767、配列番号:769、配列番号:771、配列番号:773、配列番号:775、配列番号:777、配列番号:779、配列番号:781、配列番号:783、配列番号:785、配列番号:787、配列番号:789、配列番号:791、配列番号:793、配列番号:795、配列番号:797、配列番号:799、配列番号:801、配列番号:803、配列番号:805、配列番号:807、配列番号:809、配列番号:811、配列番号:813、配列番号:815、配列番号:817、配列番号:819、配列番号:821、配列番号:823、配列番号:825、配列番号:827、配列番号:829、配列番号:831、配列番号:833、配列番号:835、配列番号:837、配列番号:839、配列番号:841、配列番号:843、配列番号:845、配列番号:847、配列番号:849、配列番号:851、配列番号:853、配列番号:855、配列番号:857、配列番号:859、配列番号:861、配列番号:863、配列番号:865、配列番号:867、配列番号:869、配列番号:871、配列番号:873、配列番号:875、配列番号:877、配列番号:879、配列番号:881、配列番号:883、配列番号:885、配列番号:887、配列番号:889、配列番号:891、配列番号:893、配列番号:895、配列番号:897、配列番号:899、配列番号:901、配列番号:903、配列番号:905、配列番号:907、配列番号:909、配列番号:911、配列番号:913、配列番号:915、配列番号:917、配列番号:919、配列番号:921、配列番号:923、配列番号:925、配列番号:927、配列番号:929、配列番号:931、配列番号:933、配列番号:935、配列番号:937、配列番号:939、配列番号:941、配列番号:943、配列番号:945、配列番号:947、配列番号:949、配列番号:951、配列番号:953、配列番号:955、配列番号:957、配列番号:959、配列番号:961、配列番号:963、配列番号:965、配列番号:967、配列番号:969、配列番号:971、配列番号:973、および／または配列番号:975、並びに本明細書および表1、2および3、および配列表に記載されてある配列（これらの配列はいずれも“本発明の例示的ポリヌクレオチド”である）、並びに酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）とcDNA、転写物（mRNA）または遺伝子の約10から2500またはそれより多い残基の領域にわたって、少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれより高いか、または完全な（100％）配列同一性（相同性）を有する配列を含む。

本発明の核酸は、本発明のポリペプチド（本発明の例示的ポリペプチドと少なくとも約

50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれより高いか、または完全な（100％）配列同一性（相同性）を有する）をコードするものを含み、前記例示的ポリペプチドは、例えば配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てをもつ配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列

番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974、および／または配列番号:976（本明細書並びに下記の表1、2および3、並びに配列表に記載された配列（これらの配列はいずれも“本発明の例示的酵素／ポリペプチド”である）を含む）、および酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）を含む。

【００４８】

下記の表１、2および3は、本発明の例示的核酸およびポリペプチドの選別された特徴を記載した図表であり、例示的配列と公開データベースとの配列同一性の比較を含んでいる。

下記表1は、特定された活性（実験データにより決定（本発明の例示的ポリペプチド（例示的ヌクレオチドによりコードされる）に関する実施例1から23を参照されたい）を記載している。表1はさらに、本発明のポリヌクレオチド（ポリペプチドをコードする）が

クローン（表2に記載した最初の供給源から単離されたゲノム配列）であるか否か、またはサブクローン（この場合、クローンは例えば天然のシグナル配列の除去、開始メチオニンの付加、タグの付加などによって操作されている）であるか否かを表示する。表1はまた、クローンとサブクローンとの関係（例えばサブクローンがどのクローンに由来するか）を表示する。表1の解読に資すれば、例えば欄1および4、行1および2は、配列番号:32（配列番号:31によってコードされる）は、対応する配列番号:868（配列番号:のサブクローン867によってコードされる）のサブクローンをもつクローンであり、“クローン／サブクローン対1”と表示されている。

下記の表2は、本発明の例示的核酸およびポリペプチドが最初に由来した供給源を示している。下記表2はまた、例示的酵素のシグナル配列（または“シグナルペプチド”、またはSP）のための“Signalp切断部位”（下記で考察するように模範Signalpによって決定される（Nielsen (1997)上掲書を参照されたい））を表示し、“予想シグナル配列”はアミノ末端からカルボキシ末端に向けて列挙されている。例えばポリペプチド配列番号:258については、シグナルペプチドは“MKSAIVLGAGMVGIATAVHL”である。

下記表3には本発明の例示的核酸およびポリペプチドの選別された特徴が記載され、例示的配列と公開データベースとの配列同一性の比較が含まれている。さらに表3の解読に資すれば、例えば、配列番号と標識されている最初の行の番号“1，2”は、配列番号:2（例えば配列番号:1によってコードされる）に示される配列を有する、本発明の例示的配列を表す。表2に記載されている全ての配列（いずれも本発明の例示的配列）が、2つのデータベースセットに対してBLAST検索（下記に詳細に記載されている）に付された。第一のデータベースセットは、NCBI（National Center for Biotechnology Information）から入手できる。これらデータベースに対する検索の全結果は、“NR詳細”、“NRアクセッションコード”、“NR　E値”または“NR生物”と表記された欄で見出される。“NR”は、NCBIによって維持されている非重複ヌクレオチドデータベースに該当する。このデータベースは、GenBank、GenBankアップデートおよびEMBLアップデートの複合物である。“NRの詳細”欄の記載事項は、ある任意のNCBI記録中の規定情報に該当し、前記には配列に関する記載、例えば生物源、遺伝子の名称／タンパク質の名称、配列の機能に関する何らかの記載が含まれる。“NRアクセッションコード”欄の記載事項は、配列記録に与えられた固有のアイデンティファイアーに該当する。“NR　E値”欄の記載事項は期待値（Expect value）に該当し、前記は、クェリー配列（本発明の配列）とデータベース配列間で見出されたアラインメントスコアと同程度に高いアラインメントスコアが、ランダム配列間において目下のBLAST検索で実施された場合と同じ数の比較で見出される確率を表す。“NR生物”欄の記載事項は、もっとも近似したBLASTヒットと認定された配列の供給源生物に該当する。第二のデータベースセットは、ひとまとめにしてGENESEQ^{TM}データベースとして知られているもので、前記はThomson Derwent（Philadelphia，PA）から入手できる。このデータベースに対する検索の全結果が、“GENESEQ^{TM}タンパク質の詳細”、“GENESEQ^{TM}タンパク質アクセッションコード”、“E値”、“GENESEQ^{TM} DNAの詳細”、“GENESEQ^{TM} DNAアクセッションコード”または“E値”と表記された欄で見出される。これらの欄で見出される情報は、上記に記載したNR欄で見出される情報に対応するが、ただし前記は、NCBIデータベースの代わりにGENESEQ^{TM}データベースに対するBLAST検索に由来する。さらにまた、この表は“予想EC番号”欄を含む。EC番号は、生化学分子生物学国際連盟（International Union of Biochemistry and Molecular Biology（IUBMB））の命名委員会の酵素委員会によって作製された標準的酵素命名体系にしたがって酵素タイプに割り当てられた番号である。“予想EC番号”欄の結果は、Kegg（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）データベースに対するBLAST検索によって決定される。最高のBLASTマッチがe-6と同等または前記未満のE値を有する場合、前記最高のマッチに割り当てられるEC番号が表に記入される。最高ヒットのEC番号は、本発明の配列の可能なEC番号の指針として用いられる。“クェリーDNA長”および“クェリータンパク質長”欄は、NCBIまたはGENESEQ^{TM}データベースに対して検索または審問された本発明の配列中のヌクレオチドの数またはアミノ酸の数にそれぞれ該当する。“対象DNA長”および“対象タンパク質長”欄は、BLAST検

索で最高マッチの配列中のヌクレオチドの数またはアミノ酸の数にそれぞれ該当する。これらの欄で提供される結果は、NCBIデータベースまたはGeneseqデータベースのどちらかから最も低いE値を応答してきた検索に由来する。“％IDタンパク質”および“％ID DNA”欄は、本発明の配列と最高のBLASTマッチをもつ配列との間のパーセント配列同一性に該当する。これらの欄で提供される結果は、NCBIデータベースまたはGENESEQ^{TM}データベースのどちらかから最低のE値を応答してきた検索に由来する。

【００４９】

表１

クローン／サブクローン対	配列番号	活性	配列のタイプ（クローンまたはサブクローン）
1	31, 32	D-AT	クローン
1	867, 868	D-AT	サブクローン
2	955, 956	D-AT	クローン
2	929, 930	D-AT	サブクローン
3	957, 958	D-AT	クローン
3	931, 932	D-AT	サブクローン
4	959, 960	D-AT	クローン
4	935, 936	D-AT	サブクローン
5	41, 42	D-AT	クローン
5	869, 870	D-AT	サブクローン
6	7, 8	D-AT	クローン
6	943, 944	D-AT	サブクローン
7	11, 12	D-AT	クローン
7	941, 942	D-AT	サブクローン
8	83, 84	D-AT	クローン
8	879, 880	D-AT	サブクローン
9	151, 152	D-AT	クローン
9	913, 914	D-AT	サブクローン
10	951, 952	D-AT	クローン
10	933, 934	D-AT	サブクローン
11	75, 76	D-AT	クローン
11	881, 882	D-AT	サブクローン
12	87, 88	D-AT	クローン
12	883, 884	D-AT	サブクローン
13	163, 164	D-AT	クローン
13	921, 922	D-AT	サブクローン
14	145, 146	D-AT	クローン
14	919, 920	D-AT	サブクローン
15	149, 150	D-AT	クローン
15	925, 926	D-AT	サブクローン
16	147, 148	D-AT	クローン
16	915, 916	D-AT	サブクローン
17	15, 16	D-AT	クローン
17	947, 948	D-AT	サブクローン
18	17, 18	D-AT	クローン
18	949, 950	D-AT	サブクローン

【００５０】

19	3, 4	D-AT	クローン
19	937, 938	D-AT	サブクローン
20	5, 6	D-AT	クローン
20	939, 940	D-AT	サブクローン
21	161, 162	D-AT	クローン
21	923, 924	D-AT	サブクローン
22	953, 954	D-AT	クローン
22	927, 928	D-AT	サブクローン
23	19, 20	D-AT	クローン
23	885, 886	D-AT	サブクローン
24	21, 22	D-AT	クローン
24	891, 892	D-AT	サブクローン
25	23, 24	D-AT	クローン
25	893, 894	D-AT	サブクローン
26	13, 14	D-AT	クローン
26	945, 946	D-AT	サブクローン
27	143, 144	D-AT	クローン
27	917, 918	D-AT	サブクローン
28	43, 44	D-AT	クローン
28	871, 872	D-AT	サブクローン
29	45, 46	D-AT	クローン
29	873, 874	D-AT	サブクローン
30	49, 50	D-AT	クローン
30	897, 898	D-AT	サブクローン
31	51, 52	D-AT	クローン
31	875, 876	D-AT	サブクローン
32	37, 38	D-AT	クローン
32	877, 878	D-AT	サブクローン
33	25, 26	D-AT	クローン
33	889, 890	D-AT	サブクローン
34	27, 28	D-AT	クローン
34	887, 888	D-AT	サブクローン
35	131, 132	D-AT	クローン
35	909, 910	D-AT	サブクローン
36	53, 54	D-AT	クローン
36	865, 866	D-AT	サブクローン
37	29, 30	D-AT	クローン
37	895, 896	D-AT	サブクローン
38	125, 126	D-AT	クローン
38	907, 908	D-AT	サブクローン

【００５１】

39	133, 134	D-AT	クローン
39	911, 912	D-AT	サブクローン
40	127, 128	D-AT	クローン
40	899, 900	D-AT	サブクローン
41	137, 138	D-AT	クローン
41	901, 902	D-AT	サブクローン
42	139, 140	D-AT	クローン
42	903, 904	D-AT	サブクローン
43	129, 130	D-AT	クローン
43	905, 906	D-AT	サブクローン
44	33, 34	D-AT	クローン
44	969, 970	D-AT	サブクローン
45	219, 220	D-AT	クローン
45	973, 974	D-AT	サブクローン
46	39, 40	D-AT	クローン
46	971, 972	D-AT	サブクローン
47	1, 2	D-AT	クローン
47	975, 976	D-AT	サブクローン
48	253, 254	デヒドロゲナーゼ	クローン
48	961, 962	デヒドロゲナーゼ	サブクローン
48	963, 964	デヒドロゲナーゼ	サブクローン
48	965, 966	デヒドロゲナーゼ	サブクローン
48	967, 968	デヒドロゲナーゼ	サブクローン
	35, 36	D-AT	クローン
	9, 10	D-AT	クローン
	85, 86	D-AT	クローン
	77, 78	D-AT	クローン
	153, 154	D-AT	クローン
	155, 156	D-AT	クローン
	201, 202	D-AT	クローン
	221, 222	D-AT	クローン
	235, 236	D-AT	クローン
	203, 204	D-AT	クローン
	237, 238	D-AT	クローン
	239, 240	D-AT	クローン
	159, 160	D-AT	クローン
	165, 166	D-AT	クローン
	211, 212	D-AT	クローン
	249, 250	D-AT	クローン
	177, 178	D-AT	クローン

【００５２】

	223, 224	D-AT	クローン
	169, 170	D-AT	クローン
	179, 180	D-AT	クローン
	181, 182	D-AT	クローン
	63, 64	D-AT	クローン
	107, 108	D-AT	クローン
	109, 110	D-AT	クローン
	111, 112	D-AT	クローン
	113, 114	D-AT	クローン
	115, 116	D-AT	クローン
	123, 124	D-AT	クローン
	225, 226	D-AT	クローン
	227, 228	D-AT	クローン
	247, 248	D-AT	クローン
	217, 218	D-AT	クローン
	205, 206	D-AT	クローン
	183, 184	D-AT	クローン
	185, 186	D-AT	クローン
	241, 242	D-AT	クローン
	243, 244	D-AT	クローン
	229, 230	D-AT	クローン
	231, 232	D-AT	クローン
	187, 188	D-AT	クローン
	189, 190	D-AT	クローン
	191, 192	D-AT	クローン
	207, 208	D-AT	クローン
	99, 100	D-AT	クローン
	55, 56	D-AT	クローン
	57, 58	D-AT	クローン
	193, 194	D-AT	クローン
	233, 234	D-AT	クローン
	215, 216	D-AT	クローン
	195, 196	D-AT	クローン
	199, 200	D-AT	クローン
	197, 198	D-AT	クローン
	209, 210	D-AT	クローン
	141, 142	D-AT	クローン
	157, 158	D-AT	クローン
	245, 246	D-AT	クローン
	59, 60	D-AT	クローン

【００５３】

	61, 62	D-AT	クローン
	47, 48	D-AT	クローン
	213, 214	D-AT	クローン
	171, 172	D-AT	クローン
	167, 168	D-AT	クローン
	173, 174	D-AT	クローン
	175, 176	D-AT	クローン
	65, 66	D-AT	クローン
	67, 68	D-AT	クローン
	69, 70	D-AT	クローン
	71, 72	D-AT	クローン
	73, 74	D-AT	クローン
	79, 80	D-AT	クローン
	81, 82	D-AT	クローン
	93, 94	D-AT	クローン
	91, 92	D-AT	クローン
	95, 96	D-AT	クローン
	97, 98	D-AT	クローン
	117, 118	D-AT	クローン
	119, 120	D-AT	クローン
	121, 122	D-AT	クローン
	101, 102	D-AT	クローン
	103, 104	D-AT	クローン
	105, 106	D-AT	クローン
	89, 90	D-AT	クローン
	135, 136	D-AT	クローン
	259, 260	デヒドロゲナーゼ	クローン
	261, 262	デヒドロゲナーゼ	クローン
	263, 264	デヒドロゲナーゼ	クローン
	327, 328	デヒドロゲナーゼ	クローン
	335, 336	デヒドロゲナーゼ	クローン
	353, 354	デヒドロゲナーゼ	クローン
	355, 356	デヒドロゲナーゼ	クローン
	321, 322	デヒドロゲナーゼ	クローン
	341, 342	デヒドロゲナーゼ	クローン
	265, 266	デヒドロゲナーゼ	クローン
	287, 288	デヒドロゲナーゼ	クローン
	267, 268	デヒドロゲナーゼ	クローン
	269, 270	デヒドロゲナーゼ	クローン
	301, 302	デヒドロゲナーゼ	クローン

【００５４】

	413, 414	デヒドロゲナーゼ	クローン
	433, 434	デヒドロゲナーゼ	クローン
	423, 424	デヒドロゲナーゼ	クローン
	303, 304	デヒドロゲナーゼ	クローン
	425, 426	デヒドロゲナーゼ	クローン
	393, 394	デヒドロゲナーゼ	クローン
	297, 298	デヒドロゲナーゼ	クローン
	299, 300	デヒドロゲナーゼ	クローン
	567, 568	デヒドロゲナーゼ	クローン
	515, 516	デヒドロゲナーゼ	クローン
	465, 466	デヒドロゲナーゼ	クローン
	387, 388	デヒドロゲナーゼ	クローン
	409, 410	デヒドロゲナーゼ	クローン
	411, 412	デヒドロゲナーゼ	クローン
	375, 376	デヒドロゲナーゼ	クローン
	407, 408	デヒドロゲナーゼ	クローン
	391, 392	デヒドロゲナーゼ	クローン
	485, 486	デヒドロゲナーゼ	クローン
	603, 604	デヒドロゲナーゼ	クローン
	605, 606	デヒドロゲナーゼ	クローン
	517, 518	デヒドロゲナーゼ	クローン
	543, 544	デヒドロゲナーゼ	クローン
	429, 430	デヒドロゲナーゼ	クローン
	443, 444	デヒドロゲナーゼ	クローン
	365, 366	デヒドロゲナーゼ	クローン
	445, 446	デヒドロゲナーゼ	クローン
	431, 432	デヒドロゲナーゼ	クローン
	449, 450	デヒドロゲナーゼ	クローン
	467, 468	デヒドロゲナーゼ	クローン
	379, 380	デヒドロゲナーゼ	クローン
	367, 368	デヒドロゲナーゼ	クローン
	405, 406	デヒドロゲナーゼ	クローン
	383, 384	デヒドロゲナーゼ	クローン
	357, 358	デヒドロゲナーゼ	クローン
	415, 416	デヒドロゲナーゼ	クローン
	395, 396	デヒドロゲナーゼ	クローン
	385, 386	デヒドロゲナーゼ	クローン
	369, 370	デヒドロゲナーゼ	クローン
	397, 398	デヒドロゲナーゼ	クローン
	435, 436	デヒドロゲナーゼ	クローン

【００５５】

	453, 454	デヒドロゲナーゼ	クローン
	469, 470	デヒドロゲナーゼ	クローン
	447, 448	デヒドロゲナーゼ	クローン
	473, 474	デヒドロゲナーゼ	クローン
	389, 390	デヒドロゲナーゼ	クローン
	427, 428	デヒドロゲナーゼ	クローン
	451, 452	デヒドロゲナーゼ	クローン
	399, 400	デヒドロゲナーゼ	クローン
	455, 456	デヒドロゲナーゼ	クローン
	417, 418	デヒドロゲナーゼ	クローン
	403, 404	デヒドロゲナーゼ	クローン
	419, 420	デヒドロゲナーゼ	クローン
	251, 252	デヒドロゲナーゼ	クローン
	371, 372	デヒドロゲナーゼ	クローン
	475, 476	デヒドロゲナーゼ	クローン
	457, 458	デヒドロゲナーゼ	クローン
	459, 460	デヒドロゲナーゼ	クローン
	461, 462	デヒドロゲナーゼ	クローン
	463, 464	デヒドロゲナーゼ	クローン
	477, 478	デヒドロゲナーゼ	クローン
	479, 480	デヒドロゲナーゼ	クローン
	481, 482	デヒドロゲナーゼ	クローン
	629, 630	デヒドロゲナーゼ	クローン
	519, 520	デヒドロゲナーゼ	クローン
	521, 522	デヒドロゲナーゼ	クローン
	589, 590	デヒドロゲナーゼ	クローン
	359, 360	デヒドロゲナーゼ	クローン
	361, 362	デヒドロゲナーゼ	クローン
	381, 382	デヒドロゲナーゼ	クローン
	363, 364	デヒドロゲナーゼ	クローン
	625, 626	デヒドロゲナーゼ	クローン
	549, 550	デヒドロゲナーゼ	クローン
	551, 552	デヒドロゲナーゼ	クローン
	501, 502	デヒドロゲナーゼ	クローン
	571, 572	デヒドロゲナーゼ	クローン
	601, 602	デヒドロゲナーゼ	クローン
	573, 574	デヒドロゲナーゼ	クローン
	575, 576	デヒドロゲナーゼ	クローン
	577, 578	デヒドロゲナーゼ	クローン
	611, 612	デヒドロゲナーゼ	クローン

【００５６】

	579, 580	デヒドロゲナーゼ	クローン
	523, 524	デヒドロゲナーゼ	クローン
	553, 554	デヒドロゲナーゼ	クローン
	503, 504	デヒドロゲナーゼ	クローン
	505, 506	デヒドロゲナーゼ	クローン
	507, 508	デヒドロゲナーゼ	クローン
	509, 510	デヒドロゲナーゼ	クローン
	525, 526	デヒドロゲナーゼ	クローン
	373, 374	デヒドロゲナーゼ	クローン
	421, 422	デヒドロゲナーゼ	クローン
	483, 484	デヒドロゲナーゼ	クローン
	511, 512	デヒドロゲナーゼ	クローン
	527, 528	デヒドロゲナーゼ	クローン
	555, 556	デヒドロゲナーゼ	クローン
	529, 530	デヒドロゲナーゼ	クローン
	591, 592	デヒドロゲナーゼ	クローン
	557, 558	デヒドロゲナーゼ	クローン
	559, 560	デヒドロゲナーゼ	クローン
	593, 594	デヒドロゲナーゼ	クローン
	581, 582	デヒドロゲナーゼ	クローン
	613, 614	デヒドロゲナーゼ	クローン
	595, 596	デヒドロゲナーゼ	クローン
	597, 598	デヒドロゲナーゼ	クローン
	599, 600	デヒドロゲナーゼ	クローン
	583, 584	デヒドロゲナーゼ	クローン
	615, 616	デヒドロゲナーゼ	クローン
	619, 620	デヒドロゲナーゼ	クローン
	621, 622	デヒドロゲナーゼ	クローン
	561, 562	デヒドロゲナーゼ	クローン
	563, 564	デヒドロゲナーゼ	クローン
	587, 588	デヒドロゲナーゼ	クローン
	513, 514	デヒドロゲナーゼ	クローン
	531, 532	デヒドロゲナーゼ	クローン
	533, 534	デヒドロゲナーゼ	クローン
	535, 536	デヒドロゲナーゼ	クローン
	585, 586	デヒドロゲナーゼ	クローン
	617, 618	デヒドロゲナーゼ	クローン
	627, 628	デヒドロゲナーゼ	クローン
	623, 624	デヒドロゲナーゼ	クローン
	537, 538	デヒドロゲナーゼ	クローン

【００５７】

	565, 566	デヒドロゲナーゼ	クローン
	539, 540	デヒドロゲナーゼ	クローン
	541, 542	デヒドロゲナーゼ	クローン
	569, 570	デヒドロゲナーゼ	クローン
	607, 608	デヒドロゲナーゼ	クローン
	609, 610	デヒドロゲナーゼ	クローン
	487, 488	デヒドロゲナーゼ	クローン
	545, 546	デヒドロゲナーゼ	クローン
	495, 496	デヒドロゲナーゼ	クローン
	497, 498	デヒドロゲナーゼ	クローン
	499, 500	デヒドロゲナーゼ	クローン
	489, 490	デヒドロゲナーゼ	クローン
	491, 492	デヒドロゲナーゼ	クローン
	493, 494	デヒドロゲナーゼ	クローン
	547, 548	デヒドロゲナーゼ	クローン
	401, 402	デヒドロゲナーゼ	クローン
	377, 378	デヒドロゲナーゼ	クローン
	437, 438	デヒドロゲナーゼ	クローン
	439, 440	デヒドロゲナーゼ	クローン
	441, 442	デヒドロゲナーゼ	クローン
	271, 272	デヒドロゲナーゼ	クローン
	273, 274	デヒドロゲナーゼ	クローン
	293, 294	デヒドロゲナーゼ	クローン
	275, 276	デヒドロゲナーゼ	クローン
	277, 278	デヒドロゲナーゼ	クローン
	279, 280	デヒドロゲナーゼ	クローン
	281, 282	デヒドロゲナーゼ	クローン
	283, 284	デヒドロゲナーゼ	クローン
	285, 286	デヒドロゲナーゼ	クローン
	291, 292	デヒドロゲナーゼ	クローン
	289, 290	デヒドロゲナーゼ	クローン
	255, 256	デヒドロゲナーゼ	クローン
	295, 296	デヒドロゲナーゼ	クローン
	257, 258	デヒドロゲナーゼ	クローン
	471, 472	デヒドロゲナーゼ	クローン
	323, 324	デヒドロゲナーゼ	クローン
	325, 326	デヒドロゲナーゼ	クローン
	305, 306	デヒドロゲナーゼ	クローン
	331, 332	デヒドロゲナーゼ	クローン
	343, 344	デヒドロゲナーゼ	クローン

【００５８】

	345, 346	デヒドロゲナーゼ	クローン
	337, 338	デヒドロゲナーゼ	クローン
	309, 310	デヒドロゲナーゼ	クローン
	307, 308	デヒドロゲナーゼ	クローン
	347, 348	デヒドロゲナーゼ	クローン
	329, 330	デヒドロゲナーゼ	クローン
	339, 340	デヒドロゲナーゼ	クローン
	311, 312	デヒドロゲナーゼ	クローン
	313, 314	デヒドロゲナーゼ	クローン
	315, 316	デヒドロゲナーゼ	クローン
	317, 318	デヒドロゲナーゼ	クローン
	349, 350	デヒドロゲナーゼ	クローン
	351, 352	デヒドロゲナーゼ	クローン
	333, 334	デヒドロゲナーゼ	クローン
	319, 320	デヒドロゲナーゼ	クローン
	675, 676	オキシドレダクターゼ	クローン
	671, 672	オキシドレダクターゼ	クローン
	673, 674	オキシドレダクターゼ	クローン
	643, 644	オキシドレダクターゼ	クローン
	645, 646	オキシドレダクターゼ	クローン
	647, 648	オキシドレダクターゼ	クローン
	649, 650	オキシドレダクターゼ	クローン
	663, 664	オキシドレダクターゼ	クローン
	807, 808	オキシドレダクターゼ	クローン
	697, 698	オキシドレダクターゼ	クローン
	699, 700	オキシドレダクターゼ	クローン
	837, 838	オキシドレダクターゼ	クローン
	715, 716	オキシドレダクターゼ	クローン
	717, 718	オキシドレダクターゼ	クローン
	701, 702	オキシドレダクターゼ	クローン
	687, 688	オキシドレダクターゼ	クローン
	703, 704	オキシドレダクターゼ	クローン
	719, 720	オキシドレダクターゼ	クローン
	709, 710	オキシドレダクターゼ	クローン
	711, 712	オキシドレダクターゼ	クローン
	713, 714	オキシドレダクターゼ	クローン
	689, 690	オキシドレダクターゼ	クローン
	681, 682	オキシドレダクターゼ	クローン
	705, 706	オキシドレダクターゼ	クローン
	721, 722	オキシドレダクターゼ	クローン

【００５９】

	809, 810	オキシドレダクターゼ	クローン
	811, 812	オキシドレダクターゼ	クローン
	813, 814	オキシドレダクターゼ	クローン
	815, 816	オキシドレダクターゼ	クローン
	839, 840	オキシドレダクターゼ	クローン
	695, 696	オキシドレダクターゼ	クローン
	707, 708	オキシドレダクターゼ	クローン
	791, 792	オキシドレダクターゼ	クローン
	745, 746	オキシドレダクターゼ	クローン
	747, 748	オキシドレダクターゼ	クローン
	855, 856	オキシドレダクターゼ	クローン
	857, 858	オキシドレダクターゼ	クローン
	859, 860	オキシドレダクターゼ	クローン
	861, 862	オキシドレダクターゼ	クローン
	863, 864	オキシドレダクターゼ	クローン
	773, 774	オキシドレダクターゼ	クローン
	723, 724	オキシドレダクターゼ	クローン
	775, 776	オキシドレダクターゼ	クローン
	633, 634	オキシドレダクターゼ	クローン
	635, 636	オキシドレダクターゼ	クローン
	749, 750	オキシドレダクターゼ	クローン
	725, 726	オキシドレダクターゼ	クローン
	825, 826	オキシドレダクターゼ	クローン
	751, 752	オキシドレダクターゼ	クローン
	777, 778	オキシドレダクターゼ	クローン
	683, 684	オキシドレダクターゼ	クローン
	685, 686	オキシドレダクターゼ	クローン
	753, 754	オキシドレダクターゼ	クローン
	755, 756	オキシドレダクターゼ	クローン
	779, 780	オキシドレダクターゼ	クローン
	827, 828	オキシドレダクターゼ	クローン
	781, 782	オキシドレダクターゼ	クローン
	757, 758	オキシドレダクターゼ	クローン
	829, 830	オキシドレダクターゼ	クローン
	851, 852	オキシドレダクターゼ	クローン
	849, 850	オキシドレダクターゼ	クローン
	817, 818	オキシドレダクターゼ	クローン
	831, 832	オキシドレダクターゼ	クローン
	793, 794	オキシドレダクターゼ	クローン
	823, 824	オキシドレダクターゼ	クローン

【００６０】

	843, 844	オキシドレダクターゼ	クローン
	845, 846	オキシドレダクターゼ	クローン
	819, 820	オキシドレダクターゼ	クローン
	759, 760	オキシドレダクターゼ	クローン
	783, 784	オキシドレダクターゼ	クローン
	785, 786	オキシドレダクターゼ	クローン
	833, 834	オキシドレダクターゼ	クローン
	835, 836	オキシドレダクターゼ	クローン
	795, 796	オキシドレダクターゼ	クローン
	797, 798	オキシドレダクターゼ	クローン
	799, 800	オキシドレダクターゼ	クローン
	801, 802	オキシドレダクターゼ	クローン
	761, 762	オキシドレダクターゼ	クローン
	803, 804	オキシドレダクターゼ	クローン
	805, 806	オキシドレダクターゼ	クローン
	763, 764	オキシドレダクターゼ	クローン
	765, 766	オキシドレダクターゼ	クローン
	767, 768	オキシドレダクターゼ	クローン
	769, 770	オキシドレダクターゼ	クローン
	771, 772	オキシドレダクターゼ	クローン
	787, 788	オキシドレダクターゼ	クローン
	789, 790	オキシドレダクターゼ	クローン
	841, 842	オキシドレダクターゼ	クローン
	729, 730	オキシドレダクターゼ	クローン
	731, 732	オキシドレダクターゼ	クローン
	733, 734	オキシドレダクターゼ	クローン
	735, 736	オキシドレダクターゼ	クローン
	727, 728	オキシドレダクターゼ	クローン
	691, 692	オキシドレダクターゼ	クローン
	693, 694	オキシドレダクターゼ	クローン
	847, 848	オキシドレダクターゼ	クローン
	853, 854	オキシドレダクターゼ	クローン
	651, 652	オキシドレダクターゼ	クローン
	653, 654	オキシドレダクターゼ	クローン
	655, 656	オキシドレダクターゼ	クローン
	657, 658	オキシドレダクターゼ	クローン
	659, 660	オキシドレダクターゼ	クローン
	661, 662	オキシドレダクターゼ	クローン
	637, 638	オキシドレダクターゼ	クローン

【００６１】

	631, 632	オキシドレダクターゼ	クローン
	639, 640	オキシドレダクターゼ	クローン
	641, 642	オキシドレダクターゼ	クローン
	737, 738	オキシドレダクターゼ	クローン
	739, 740	オキシドレダクターゼ	クローン
	821, 822	オキシドレダクターゼ	クローン
	741, 742	オキシドレダクターゼ	クローン
	743, 744	オキシドレダクターゼ	クローン
	679, 680	オキシドレダクターゼ	クローン
	665, 666	オキシドレダクターゼ	クローン
	667, 668	オキシドレダクターゼ	クローン
	669, 670	オキシドレダクターゼ	クローン
	677, 678	オキシドレダクターゼ	クローン

【００６２】

表２

配列番号	供給源	SignalP切断部位	予想シグナル配列
1, 2	不明		
3, 4	不明		
5, 6	不明		
7, 8	不明		
9, 10	不明		
11, 12	不明		
13, 14	不明		
15, 16	不明		
17, 18	不明		
19, 20	不明		
21, 22	不明		
23, 24	不明		
25, 26	不明		
27, 28	不明		
29, 30	不明		
31, 32	不明		
33, 34	不明		
35, 36	不明		
37, 38	不明		
39, 40	不明		
41, 42	不明		
43, 44	不明		
45, 46	不明		

【００６３】

47, 48	不明		
49, 50	不明		
51, 52	不明		
53, 54	不明		
55, 56	不明		
57, 58	不明		
59, 60	不明		
61, 62	不明		
63, 64	不明		
65, 66	不明		
67, 68	不明		
69, 70	不明		
71, 72	不明		
73, 74	不明		
75, 76	不明		
77, 78	不明		
79, 80	不明		
81, 82	不明		
83, 84	不明		
85, 86	不明		
87, 88	不明		
89, 90	不明		
91, 92	不明		
93, 94	不明		
95, 96	不明		
97, 98	不明		
99, 100	不明		
101, 102	不明		
103, 104	不明		
105, 106	不明		
107, 108	不明		
109, 110	不明		
111, 112	不明		
113, 114	不明		
115, 116	不明		
117, 118	不明		
119, 120	不明		
121, 122	不明		
123, 124	不明		
125, 126	不明		

【００６４】

127, 128	不明		
129, 130	不明		
131, 132	不明		
133, 134	不明		
135, 136	不明		
137, 138	不明		
139, 140	不明		
141, 142	不明		
143, 144	不明		
145, 146	不明		
147, 148	不明		
149, 150	不明		
151, 152	不明		
153, 154	不明		
155, 156	不明	確率:0.991 AA1:19 AA2:20	KNSPIIAAYRAATPGSAAA
157, 158	不明		
159, 160	不明		
161, 162	不明		
163, 164	不明		
165, 166	不明		
167, 168	不明		
169, 170	Rhodococcus Erythropolis DSMZ44522		
171, 172	不明		
173, 174	不明		
175, 176	不明		
177, 178	不明		
179, 180	不明		
181, 182	不明		
183, 184	不明		
185, 186	不明		
187, 188	不明		
189, 190	不明		
191, 192	不明		
193, 194	不明		
195, 196	不明		
197, 198	不明		
199, 200	不明		

【００６５】

201, 202	不明		
203, 204	不明		
205, 206	不明		
207, 208	不明		
209, 210	不明		
211, 212	不明		
213, 214	不明		
215, 216	不明		
217, 218	不明		
219, 220	不明		
221, 222	不明		
223, 224	不明		
225, 226	不明		
227, 228	不明		
229, 230	不明		
231, 232	不明		
233, 234	不明		
235, 236	不明		
237, 238	不明		
239, 240	不明		
241, 242	不明		
243, 244	不明		
245, 246	不明		
247, 248	不明		
249, 250	不明		
251, 252	不明		
253, 254	不明		
255, 256	不明		
257, 258	不明	確率:0.612 AA1:20 AA2:21	MKSAIVLGAGMVGIATAVHL
259, 260	不明		
261, 262	不明		
263, 264	不明		
265, 266	不明		
267, 268	不明		
269, 270	不明		
271, 272	不明	確率:0.836 AA1:22 AA2:23	MKPTSILVLGAGMVGTCTALHL
273, 274	不明		
275, 276	不明		

【００６６】

277, 278	不明		
279, 280	不明		
281, 282	不明		
283, 284	不明	確率:0.549 AA1:20 AA2:21	MKAIVLGSGVLGTTTAYYLA
285, 286	不明	確率:0.957 AA1:24 AA2:25	MARPRSVIICGGGIIGLCTAYSLA
287, 288	不明		
289, 290	不明		
291, 292	不明		
293, 294	不明		
295, 296	不明		
297, 298	不明	確率:0.898 AA1:21 AA2:22	MQSIAVIGGGITGVTSAYALA
299, 300	不明	確率:0.898 AA1:21 AA2:22	MQSIAVIGGGITGVTSAYALA
301, 302	不明		
303, 304	不明	確率:0.945 AA1:18 AA2:19	MKVLVLGAGVVGTATALA
305, 306	不明		
307, 308	不明		
309, 310	不明		
311, 312	不明		
313, 314	不明		
315, 316	不明		
317, 318	不明		
319, 320	不明	確率:0.725 AA1:25 AA2:2	MKSARPVKTVGIAGAGTMGRGIAAA
321, 322	不明		
323, 324	不明		
325, 326	不明	確率:0.552 AA1:20 AA2:21	MRVLVLGSGVIGTASAYYLA
327, 328	不明		
329, 330	不明		
331, 332	不明		
333, 334	不明	確率:0.725 AA1:25 AA2:26	MKSARPVKTVGIAGAGTMGRGIAAA
335, 336	不明		
337, 338	不明		
339, 340	不明		

【００６７】

341, 342	不明		
343, 344	不明		
345, 346	不明		
347, 348	不明		
349, 350	不明		
351, 352	不明		
353, 354	不明	確率:0.791 AA1:24 AA2:25	MRQSRSVIICGGGVIGLSCAYYLA
355, 356	不明		
357, 358	不明		
359, 360	Rhodococcus Erythropolis DSMZ44319		
361, 362	Rhodococcus Erythropolis DSMZ44319		
363, 364	Rhodococcus Erythropolis DSMZ44319		
365, 366	不明		
367, 368	不明		
369, 370	不明		
371, 372	不明		
373, 374	不明		
375, 376	不明		
377, 378	不明		
379, 380	不明		
381, 382	Rhodococcus Erythropolis DSMZ44319		
383, 384	不明	確率:0.657 AA1:21 AA2:22	MMKIMVLGGGVIGVTTAYYLA
385, 386	不明		
387, 388	不明	確率:0.930 AA1:20 AA2:21	MRIVVLGAGVVGTTAAYCLA
389, 390	不明		
391, 392	不明	確率:0.711 AA1:20 AA2:21	MSSTRRVIVIGGGVIGAASA
393, 394	不明	確率:0.968 AA1:18 AA2:19	MKILVIGAGVIGVATAWA

【００６８】

395, 396	不明	確率:0.638 AA1:20 AA2:21	MTKDIVVLGAGVVGVCTALA
397, 398	不明		
399, 400	不明		
401, 402	不明	確率:0.999 AA1:18 AA2:19	MKTLVLGGGIAGLSSAFA
403, 404	不明	確率:0.959 AA1:20 AA2:21	MSKKGTSVIIGGGISGLASA
405, 406	不明		
407, 408	不明		
409, 410	不明		
411, 412	不明		
413, 414	不明		
415, 416	不明		
417, 418	不明	確率:0.709 AA1:20 AA2:21	MKITILGAGVIGVTSAYYLA
419, 420	不明		
421, 422	不明		
423, 424	不明		
425, 426	不明		
427, 428	不明		
429, 430	不明		
431, 432	不明		
433, 434	不明		
435, 436	不明	確率:0.738 AA1:22 AA2:23	MPGTVDAIVLGAGIVGVSAALA
437, 438	不明		
439, 440	不明		
441, 442	不明		
443, 444	不明		
445, 446	不明		
447, 448	不明		
449, 450	不明	確率:0.823 AA1:23 AA2:24	MKRDVIVLGAGMVGVGCALHLQA
451, 452	不明		
453, 454	不明		
455, 456	不明		
457, 458	不明		
459, 460	不明	確率:0.950 AA1:21 AA2:22	MQRIAVIGGGITGITSAYALA

【００６９】

461, 462	不明	確率:0.557 AA1:18 AA2:19	MPSVLITGATSGFGKAAA
463, 464	不明		
465, 466	不明		
467, 468	不明		
469, 470	不明		
471, 472	不明		
473, 474	不明		
475, 476	不明		
477, 478	不明		
479, 480	不明		
481, 482	不明		
483, 484	不明		
485, 486	不明		
487, 488	不明		
489, 490	不明		
491, 492	不明	確率:1.000 AA1:21 AA2:22	MKISIVGAGLAGLCAAHALVA
493, 494	不明		
495, 496	不明		
497, 498	不明		
499, 500	不明	確率:0.852 AA1:23 AA2:24	MKFDVAVLGAGIVGISTALHLQA
501, 502	不明		
503, 504	不明		
505, 506	不明		
507, 508	不明		
509, 510	不明		
511, 512	不明	確率:0.692 AA1:28 AA2:29	MTEASRTSRQTEVIVLGAGIVGVSTALA
513, 514	不明		
515, 516	不明	確率:0.898 AA1:21 AA2:22	MQSIAVIGGGITGVTSAYALA
517, 518	不明	確率:0.798 AA1:21 AA2:22	MKSVIIIGGGIIGLCSAYYLA
519, 520	不明		
521, 522	Rhodococcus Erythropolis DSMZ44522		

【００７０】

523, 524	不明	確率:0.601 AA1:22 AA2:23	MKKKILVIGGGAIGLFCAYYLR
525, 526	不明		
527, 528	不明		
529, 530	不明		
531, 532	不明		
533, 534	不明	確率:0.716 AA1:24 AA2:25	MRNSKSVVVCGGGIVGLCTAYYLA
535, 536	不明		
537, 538	不明		
539, 540	不明		
541, 542	不明		
543, 544	不明		
545, 546	不明		
547, 548	不明	確率:0.696 AA1:24 AA2:25	MTDKRRVVVCGGGVIGLCCADSLA
549, 550	不明		
551, 552	不明		
553, 554	不明		
555, 556	不明		
557, 558	不明		
559, 560	不明		
561, 562	不明	確率:0.765 AA1:22 AA2:23	MDPHVVIAGCGFGGLFAARALA
563, 564	不明		
565, 566	不明		
567, 568	不明		
569, 570	不明		
571, 572	不明		
573, 574	不明	確率:0.982 AA1:24 AA2:25	MSRPRSVIICGGGIVGLCTAYSLA
575, 576	不明		
577, 578	不明		
579, 580	不明	確率:0.772 AA1:20 AA2:21	MKITILGAGVIGVTSAYYLA
581, 582	不明		
583, 584	不明		
585, 586	不明		
587, 588	不明		

【００７１】

589, 590	Rhodococcus Erythropolis DSMZ44522		
591, 592	不明		
593, 594	不明		
595, 596	不明		
597, 598	不明	確率:0.672 AA1:20 AA2:21	MKVLVLGGGVIGVSSAYFLA
599, 600	不明	確率:0.873 AA1:20 AA2:21	MKVIVLGAGVVGVTSAYQLA
601, 602	不明	確率:0.773 AA1:20 AA2:21	MKITILGAGVIGVTSAYYLA
603, 604	不明	確率:0.781 AA1:21 AA2:22	MKRVIVIGSGALGLCSAYFLQ
605, 606	不明		
607, 608	不明		
609, 610	不明		
611, 612	不明	確率:0.772 AA1:20 AA2:21	MKITILGAGVIGVTSAYYLA
613, 614	不明	確率:0.995 AA1:18 AA2:19	MKITIIGAGIAGVSTAWA
615, 616	不明		
617, 618	不明		
619, 620	不明		
621, 622	不明	確率:0.710 AA1:24 AA2:25	MRTSKSVIVCGGGIVGLCTAYYLA
623, 624	不明		
625, 626	Flavobacterium sp. ATCC27551		
627, 628	不明		
629, 630	不明		
631, 632	不明		
633, 634	不明	確率:0.648 AA1:20 AA2:21	MKVIVLGAGVIGTTTAYYLA
635, 636	不明	確率:0.651 AA1:20 AA2:21	MKVIVLGAGVIGTTTAYYLA
637, 638	不明		
639, 640	不明		
641, 642	不明		

【００７２】

643, 644	不明	確率:0.993 AA1:24 AA2:25	MTRARHVVVIGAGVVGSCTAQALA
645, 646	不明		
647, 648	不明		
649, 650	不明		
651, 652	不明	確率:0.598 AA1:21 AA2:22	MAREVIVLGAGIVGVSTAAHL
653, 654	不明		
655, 656	不明		
657, 658	不明		
659, 660	不明		
661, 662	不明	確率:0.944 AA1:39 AA2:40	MKRSVQRRQVVLGSGAALLVGALDGCAGSIRTLQ SPAPA
663, 664	不明		
665, 666	不明	確率:0.910 AA1:17 AA2:18	MKSVAIIGAGLAGLATA
667, 668	不明		
669, 670	不明		
671, 672	不明		
673, 674	不明		
675, 676	不明		
677, 678	不明		
679, 680	不明		
681, 682	不明	確率:0.781 AA1:22 AA2:23	MRIVVIGAGLPGVTTACFLAQA
683, 684	不明	確率:0.549 AA1:18 AA2:19	MNVLVVGAGVVGTSTALS
685, 686	不明	確率:0.957 AA1:24 AA2:25	MNKRTPERVVVIGGGVVGATTALA
687, 688	不明		
689, 690	不明		
691, 692	不明	確率:0.984 AA1:19 AA2:20	MKTIAVLGAGVTGITTAYA
693, 694	不明		
695, 696	不明		
697, 698	不明		
699, 700	不明		
701, 702	不明	確率:0.999 AA1:22 AA2:23	MNRSVAIIGAGVSGLTCGVVFA
703, 704	不明		

【００７３】

705, 706	不明	確率:0.935 AA1:19 AA2:20	MKSAIVLGAGMVGVSTALA
707, 708	不明		
709, 710	不明		
711, 712	不明		
713, 714	不明		
715, 716	不明	確率:0.528 AA1:18 AA2:19	MKVIVIGAGVVGATTALS
717, 718	不明		
719, 720	不明		
721, 722	不明		
723, 724	不明	確率:0.857 AA1:20 AA2:21	MHTIVIGAGVVGASTALSLA
725, 726	不明		
727, 728	不明	確率:0.785 AA1:18 AA2:19	MHIVVIGAGVMGVTTAYA
729, 730	不明		
731, 732	不明		
733, 734	不明	確率:0.903 AA1:18 AA2:19	MHVIVIGAGVVGSTTALA
735, 736	不明	確率:0.983 AA1:21 AA2:22	KEFGTSISAATLALAARPAQS
737, 738	不明		
739, 740	不明		
741, 742	不明		
743, 744	不明		
745, 746	不明	確率:0.754 AA1:23 AA2:24	MTHSDILIIGGGIAGMSAAFFLA
747, 748	不明		
749, 750	不明		
751, 752	不明		
753, 754	不明		
755, 756	不明		
757, 758	不明	確率:0.911 AA1:19 AA2:20	MQDILVLGAGMVGVSTALA
759, 760	不明		
761, 762	不明		
763, 764	不明	確率:0.857 AA1:20 AA2:21	MHTIVIGAGVVGASTALSLA
765, 766	不明		

【００７４】

767, 768	不明	確率:0.682 AA1:22 AA2:23	MSLHVIVIGAGVVGASTVLSLA
769, 770	不明		
771, 772	不明		
773, 774	不明		
775, 776	不明	確率:0.527 AA1:15 AA2:16	MRVLVIGAGLAGLTA
777, 778	不明		
779, 780	不明		
781, 782	不明		
783, 784	不明		
785, 786	不明	確率:0.706 AA1:20 AA2:21	MHTIVIGAGVVGTSTALSLA
787, 788	不明	確率:0.639 AA1:20 AA2:21	MHAIVIGAGVVGASTALSLA
789, 790	不明	確率:0.953 AA1:19 AA2:20	MKEVVVLGAGMVGTATALA
791, 792	不明		
793, 794	不明		
795, 796	不明		
797, 798	不明		
799, 800	不明		
801, 802	不明	確率:0.903 AA1:18 AA2:19	MHVIVIGAGVVGSTTALA
803, 804	不明	確率:0.763 AA1:22 AA2:23	MPPHVIVVGAGVVGASTALSLA
805, 806	不明		
807, 808	不明	確率:0.785 AA1:18 AA2:19	MHIVVIGAGVMGVTTAYA
809, 810	不明		
811, 812	不明		
813, 814	不明		
815, 816	不明		
817, 818	不明	確率:0.973 AA1:18 AA2:19	MKILVLGAGVVGTATALA
819, 820	不明	確率:0.926 AA1:20 AA2:21	MHVVVLGAGVVGTTTALALA
821, 822	不明		
823, 824	不明		
825, 826	不明		

【００７５】

827, 828	不明		
829, 830	不明	確率:0.973 AA1:24 AA2:25	MNKRTPERVVVIGGGVVGASTALA
831, 832	不明	確率:0.995 AA1:33 AA2:34	MYSETKTTRNVDCIVIGAGMAGASAAASLSAEA
833, 834	不明	確率:0.903 AA1:18 AA2:19	MHVIVIGAGVVGSTTALA
835, 836	不明		
837, 838	不明		
839, 840	不明		
841, 842	不明		
843, 844	不明		
845, 846	不明		
847, 848	不明		
849, 850	不明	確率:0.930 AA1:18 AA2:19	MRVLVLGAGVVGTATALA
851, 852	不明		
853, 854	不明		
855, 856	不明	確率:0.553 AA1:23 AA2:24	MQKDIWDFVIVGAGMAGASTAWQ
857, 858	不明	確率:0.553 AA1:23 AA2:24	MQKDIWDFVIVGAGMAGASTAWQ
859, 860	不明	確率:0.553 AA1:23 AA2:24	MQKDIWDFVIVGAGMAGASTAWQ
861, 862	不明	確率:0.672 AA1:23 AA2:24	MAHYDAVVVGAGVVGLTTAVSLA
863, 864	不明	確率:0.544 AA1:20 AA2:21	MRVLVLGSGVIGTASAYYLA
865, 866	不明		
867, 868	不明		
869, 870	不明		
871, 872	不明		
873, 874	不明		
875, 876	不明		
877, 878	不明		
879, 880	不明		
881, 882	不明		
883, 884	不明		
885, 886	不明		

【００７６】

887, 888	不明		
889, 890	不明		
891, 892	不明		
893, 894	不明		
895, 896	不明		
897, 898	不明		
899, 900	不明		
901, 902	不明		
903, 904	不明		
905, 906	不明		
907, 908	不明	確率:0.665 AA1:18 AA2:19	MAADVVWLNGAVVPAAEA
909, 910	不明		
911, 912	不明		
913, 914	不明		
915, 916	不明		
917, 918	不明		
919, 920	不明		
921, 922	不明		
923, 924	不明		
925, 926	不明		
927, 928	不明		
929, 930	不明		
931, 932	不明		
933, 934	不明	確率:0.607 AA1:30 AA2:31	MARVSRRFLEDSSSGATTMAFAQLASEAKR
935, 936	不明		
937, 938	不明		
939, 940	不明		
941, 942	不明		
943, 944	不明		
945, 946	不明		
947, 948	不明		
949, 950	不明		
951, 952	Pyrolobus fumarius		
953, 954	Aquifex aeolicus		
955, 956	不明		
957, 958	不明		
959, 960	不明		

【００７７】

【００７８】

表３

配列番号	NR の詳細	NR アクセッションコード	NR E 値	NR 生物	Geneseq タンパク質の詳細	Geneseq タンパク質アクセッションコード
1, 2	保存された仮説的タンパク質 [Aspergillus terreus NIH2624]	115385557	1.00E-125	アスペルギルス・テルレウス (Aspergillus terreus NIH2624)	アミノトランスフェラーゼ/ムターゼ/デアミナーゼ酵素 #14	ADS78245
3, 4	アミノトランスフェラーゼ：クラス IV [Silicibacter sp. TM1040]	99078146	1.00E-96	シリシバクター(Silicibacter) sp. TM1040	細菌ポリペプチド #19	ADF03944
5, 6	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Rhodopseudomonas palustris CGA009]	39935662	8.00E-77	ロードシュードモナス・パルストリス(Rhodopseudomonas palustris) CGA009	細菌ポリペプチド #19	ADF03944
7, 8	D-アラニントランスアミナーゼ [Azoarcus sp. BH72]	119896473	1.00E-92	アゾアルクス(Azoarcus) sp. BH72	P.スツッツェリ(P. stutzeri) 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
9, 10	アミノトランスフェラーゼ：クラス IV [Nitrosomonas eutropha C91]	114330773	2.00E-46	ニトロソモナス・オイトロファ (Nitrosomonas eutropha) C91	原核細胞必須遺伝子 #34740	ABU33175
11, 12	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Xanthobacter autotrophicus Py2] gi|89350945|gb|EAS16227.1| アミノトランスフェラーゼ：クラス IV	89360213	5.00E-85	キサントバクター・オートトロフィクス (obacter autotrophicus)Py2	細菌ポリペプチド #19	ADF03944
13, 14	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	2.00E-99	クロストリジウム・ベイジェリンキ(Clostridium beijerincki) NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031
15, 16	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Alcanivorax borkumensis SK2]	110834821	4.00E-56	アルカニボラクス・ボルクメンシス (Alcanivorax borkumensis) SK2	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
17, 18	仮説的分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（トランスアミナーゼ B）(BCAT).	3122274	6.00E-49	メタノデルモバクター・テルムオートトロフィクス (Methanothermobacter thermautotrophicus)	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU21638
19, 20	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	7.00E-97	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031

21, 22	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	1.00E-100	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体バチルス・スフェリクス（Bacillus sphaericus dat）蛋白質	ABB08244
23, 24	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	6.00E-96	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
25, 26	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ；仮説的 [Methylococcus capsulatus str. Bath]	53802655	3.00E-86	メチロコックス・カプスラツス(Methylococcus capsulatus) str. Bath	スタフィロコックス・アウレウス(Staphylococcus aureus)蛋白質 #10	ABM71198
27, 28	アミノトランスフェラーゼ：クラスIV [Nocardioides sp. JS614] gi|119537255|gb|ABL81872.1| アミノトランスフェラーゼ：クラスIV [Nocardioides sp. JS614]	119716594	9.00E-33	ノカルジオイデス(Nocardioides) sp. JS614	大腸菌アミノトランスフェラーゼ ilvE 配列番号:2	AEK20408
29, 30	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium acetobutylicum].	15894079	3.00E-81	クロストリジウム・アセトブチリクム(Clostridium acetobutylicum)	原核細胞必須遺伝子 #34740	ABU32980
31, 32	ヒスチジノール-ホスフェートアミノトランスフェラーゼ [Methanococcus maripaludis C7] gi|145278069|gb|EDK17867.1| ヒスチジノール-ホスフェートアミノトランスフェラーゼ[Methanococcus maripaludis C7]	145644535	1.00E-40	メタノコックス・マリパルジス(Methanococcus maripaludis) C7	細菌ポリペプチド #10001	ADS43070
33, 34	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ(D-アスパルテートアミノトランスフェラーゼ) (D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ) (D-アミノ酸) (DAAT).	118222	1.00E-108	バチルス (Bacillus) sp. YM-1	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18018
35, 36	ピリドキサール-依存酵素、仮説的 [Caldivirga maquilingensis IC-167] gi|126311802|gb|EAZ64256.1| ピリドキサール-依存酵素、仮説的[Caldivirga maquilingensis IC-167]	126353148	2.00E-53	カルジビルガ・マキリンゲンシス(Caldivirga maquilingensis)IC-167	クレブシーラ・プニューモニア(Klebsiella pneumonia)ポリペプチド 配列番号:7178	ABO62434
37, 38	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-104	プランクトミセス・マリス(Planctomyces maris) DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
39,	セリン-グリオキシレートトランスアミナ	148260372	1.00E-94	アシドフィリウム・クリプ	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU21492

50 40 30 20 10

40	ーゼ [Acidiphilium cryptum JF-5]			ツム(Acidiphilium cryptum)JF-5		
41, 42	チェーンA、ピリドキサール-5-ホスフェートと複合体を形成した D-アミノ酸トランスフェラーゼの結晶学的構造	1127164	1.00E-126	Bacillus sp. YM-1	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18037
43, 44	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-115	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
45, 46	セリン-グリオキシレートトランスアミナーゼ[Acidiphilium cryptum JF-5]	148260372	1.00E-111	Acidiphilium cryptum JF-5	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU21492
47, 48	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-103	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
49, 50	アミノトランスフェラーゼクラス-III [Rosciflexus castenholzii DSM 13941] gi|118014341|gb|EAV28318.1| アミノトランスフェラーゼクラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941]	118061613	1.00E-108	ロセイフレクス・カステンホルジー(Roseiflexus castenholzii) DSM 13941	細菌ポリペプチド # #10001	ADN26446
51, 52	アミノトランスフェラーゼクラス-III [Rosciflexus castenholzii DSM 13941] gi|118014341|gb|EAV28318.1| アミノトランスフェラーゼクラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941]	118061613	1.00E-107	Roseiflexus castenholzii DSM 13941	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
53, 54	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Lactobacillus salivarius subsp. salivarius UCC118]	90962639	3.00E-70	ラクトバチルス・サリバリウス(Lactobacillus salivarius)亜種 salivarius UCC118	Staphylococcus aureus 蛋白質 #10	ABM71198
55, 56	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	2.00E-66	シュードモナス・オモナスプチダ(omonas putida) F1	シュードモナス・アエルギノーザ(Pseudomonas aeruginosa) ポリペプチド #3	ABO84364
57, 58	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	5.00E-66	シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida) F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
59, 60	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	1.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364
61, 62	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	2.00E-66	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa polypeptide #3.	ABO84364
63, 64	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	1.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364

65, 66	COG0436：アスパルテート/チロシン/芳香族アミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas aeruginosa C3719] gi|126170242|gb|EAZ55753.1|アスパルテートトランスアミナーゼ[Pseudomonas aeruginosa C3719]	84317581	6.00E-59	シュードモナス・アエルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa) C3719	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364
67, 68	COG0436：アスパルテート/チロシン/芳香族アミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas aeruginosa C3719] gi|126170242|gb|EAZ55753.1|アスパルテートトランスアミナーゼ[Pseudomonas aeruginosa C3719]	84317581	1.00E-57	Pseudomonas aeruginosa C3719	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364
69, 70	COG0436：アスパルテート/チロシン/芳香族アミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas aeruginosa C3719] gi|126170242|gb|EAZ55753.1| アスパルテートトランスアミナーゼ[Pseudomonas aeruginosa C3719]	84317581	2.00E-58	Pseudomonas aeruginosa C3719	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364
71, 72	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	5.00E-68	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364
73, 74	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	3.00E-68	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364
75, 76	D-アラニントランスアミナーゼ[Oceanobacter sp. RED65] gi|94427424|gb|EAT12402.1| D-アラニントランスアミナーゼ [Oceanobacter sp. RED65]	94500389	1.00E-101	オセアノバクター(Oceanobacter)sp. RED65	L. pneumophila 蛋白質配列番号: 3367	AEB37927
77, 78	D-アラニントランスアミナーゼ[Oceanobacter sp. RED65] gi|94427424|gb|EAT12402.1| D-アラニントランスアミナーゼ [Oceanobacter sp. RED65]	94500389	1.00E-101	Oceanobacter sp. RED65	L. pneumophila 蛋白質配列番号: 3367	AEB37927
79, 80	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	3.00E-64	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa polypeptide #3.	ABO84364
81, 82	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	4.00E-66	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84364
83, 84	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-101	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド#10001	ADN26446
85, 86	アミノトランスフェラーゼ；クラス IV [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319339	1.00E-69	アルカリリムニコラ・エールリケイ(Alkalilimnicola ehrlichei)MLHE-1	L. pneumophila 蛋白質配列番号:3367	AEB37927

87, 88	D-アラニントランスアミナーゼ [Thiobacillus denitrificans ATCC 25259]	74316285	3.00E-55	ティオバチルス・デニトリフィカンス(Thiobacillus denitrificans) ATCC 25259	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワードPCRプライマー1	AEM18040
89, 90	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	5.00E-66	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
91, 92	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	4.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
93, 94	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	4.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
95, 96	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	4.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
97, 98	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	1.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
99, 100	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	1.00E-66	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
101, 102	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	7.00E-68	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
103, 104	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	5.00E-66	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
105, 106	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	2.00E-66	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
107, 108	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	7.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
109, 110	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	1.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
111, 112	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	3.00E-66	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
113, 114	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	1.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
115, 116	aspartate aminotransferase [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	1.00E-65	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
117, 118	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	4.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
119, 120	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	1.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
121, 122	アミノトランスフェラーゼ：クラスI及びII [Pseudomonas putida F1]	148547264	4.00E-65	Pseudomonas putida F1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364
123, 124	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas putida KT2440]	26990429	8.00E-66	Pseudomonas putida KT2440	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO84364

125, 126	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Streptomyces avermitilis MA-4680]	29833346	4.00E-77	ストレプトミセス・アベルミチリス(Streptomyces avermitilis) MA-4680	大腸菌アミノトランスフェラーゼ ilvE 配列番号:2	AEK20408
127, 128	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-143	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド #10001	ADN26446
129, 130	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Rhodobacter sphaeroides 2.4.1]	77465457	1.00E-87	ロードバクター・スファエロイデス (Rhodobacter sphaeroides) 2.4.1	細菌ポリペプチド # 19	ADF03944
131, 132	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ[Bacillus sp. B14905] gi|126591833|gb|EAZ85916.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ[Bacillus sp. B14905]	126651304	1.00E-158	Bacillus sp. B14905	P. taetrolens アルドラーゼ 2	ADW43694
133, 134	アミノトランスフェラーゼ：クラス IV [Azoarcus sp. EbN1]	56477154	4.00E-67	アゾアルクス (Azoarcus) sp. EbN1	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU33175
135, 136	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Rhodobacter sphaeroides 2.4.1]	77465457	1.00E-87	Rhodobacter sphaeroides 2.4.1	細菌ポリペプチド # 19	ADF03944
137, 138	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-111	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
139, 140	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-108	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
141, 142	仮説的 D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Bradyrhizobium sp. ORS278]	146342961	2.00E-71	ブラジリゾビウム(Bradyrhizobium) sp. ORS278	細菌ポリペプチド # 19	ADF03944
143, 144	アミノトランスフェラーゼ：クラス IV [Robiginitalea biformata HTCC2501] gi|88783620|gb|EAR14791.1| アミノトランスフェラーゼ：クラス IV [Robiginitalea biformata HTCC2501]	88806011	1.00E-101	ロビギニタレア・ビフォルマータ(Robiginitalea biformata)HTCC2501	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
145, 146	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-114	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
147, 148	アミノトランスフェラーゼ：クラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941] gi|118014341|gb|EAV28318.1| アミノトランスフェラーゼ：クラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941]	118061613	1.00E-104	Roseiflexus castenholzii DSM 13941	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
149, 150	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミ	149173540	1.00E-114	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446

	ノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]					
151, 152	D-alanine aminotransferase [Bacillus licheniformis ATCC 14580]	52079452	1.00E-56	Bacillus licheniformis ATCC 14580	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワードPCRプライマー1	AEM18039
153, 154	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-97	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
155, 156	アミノトランスフェラーゼ：クラス-III [Chloroflexus aggregans DSM 9485] gi|117997930|gb|EAV12112.1| アミノトランスフェラーゼ；クラス-III [Chloroflexus aggregans DSM 9485]	118045454	1.00E-107	クロロフレクス・アグレガンス（Chloroflexus aggregans） DSM 9485	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
157, 158	アミノトランスフェラーゼ、クラス IV [Rhodobacterales bacterium HTCC2150] gi|126706255|gb|EBA05345.1| アミノトランスフェラーゼ、クラス IV [Rhodobacterales bacterium HTCC2150]	126725091	2.00E-78	Rhodobacterales bacterium HTCC2150	細菌ポリペプチド # 19	ADF03944
159, 160	仮説的蛋白質 ALPR1_18298 [Algoriphagus sp. PR1] gi|126576766|gb|EAZ81014.1| 仮説的蛋白質 ALPR1_18298 [Algoriphagus sp. PR1]	126646718	6.00E-43	アルゴリファグス (Algoriphagus) sp. PR1	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU18963
161, 162	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、仮説的 [Roseobacter sp. MED193] gi|85823158|gb|EAQ43371.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、仮説的 [Roseobacter sp. MED193]	86140221	1.00E-139	ロセオバクター（Roseobacter） sp. MED193	細菌ポリペプチド # 19	ADF03944
163, 164	グルタメート-1-セミアルデヒド 2;1-アミノムターゼ；仮説的[Planctomyces maris DSM 8797]	149173540	1.00E-105	Planctomyces maris DSM 8797	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
165, 166	アミノトランスフェラーゼクラス-III [Roseiflexus sp. RS-1]	148656729	1.00E-105	ロセイフレクス（Roseiflexus） sp. RS-1	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
167, 168	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	8.00E-96	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワードPCRプライマー1	AEM18031
169, 170	仮定的アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Mycobacterium vanbaalenii PYR-1] gi|119958874|gb|ABM15879.1| 仮定的	120406056	1.00E-144	ミコバクテリウム・バンバーレニー(Mycobacterium vanbaalenii) PYR-1	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU33708

	アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Mycobacterium vanbaalenii PYR-1]					
171, 172	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	3.00E-99	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031
173, 174	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	1.00E-98	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
175, 176	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	7.00E-98	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
177, 178	アミノトランスフェラーゼクラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941] gi|118014341|gb|EAV28318.1| アミノトランスフェラーゼクラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941]	118061613	1.00E-110	Roseiflexus castenholzii DSM 13941	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
179, 180	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Bacillus coagulans 36D1] gi|124497181|gb|EAY44748.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Bacillus coagulans 36D1]	124520974	4.00E-54	バチルス・コアグランス(Bacillus coagulans)36D1	Staphylococcus aureus 蛋白質 #10	ABM71198
181, 182	分枝鎖-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Thermosynechococcus elongatus BP-1].	22299586	7.00E-53	テルモシネココックス・エロンガツス (Thermosynechococcus elongatus)BP-1	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU18055
183, 184	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	2.00E-53	オセアノバチルス・イヘイエンシス(Oceanobacillus iheyensis)	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
185, 186	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	2.00E-53	オセアノバチルス・イヘイエンシス (Oceanobacillus iheyensis)	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
187, 188	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	1.00E-96	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031

50 40 30 20 10

	gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]					
189, 190	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	9.00E-98	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
191, 192	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	1.00E-96	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031
193, 194	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	1.00E-96	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031
195, 196	仮説的 D-アラニンアミノトランスフェラーゼ[Bacillus sp. SG-1]	149182609	1.00E-59	Bacillus sp. SG-1	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
197, 198	仮説的 D-アラニンアミノトランスフェラーゼ[Bacillus sp. SG-1]	149182609	3.00E-57	Bacillus sp. SG-1	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18039
199, 200	仮説的 D-アラニンアミノトランスフェラーゼ[Bacillus sp. SG-1]	149182609	5.00E-59	Bacillus sp. SG-1	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
201, 202	仮説的 D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Symbiobacterium thermophilum IAM 14863]	51892468	6.00E-57	シンビオバクテリウム・テルモフィルム（Symbiobacterium thermophilum） IAM 14863	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
203, 204	仮説的分枝鎖-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（トランスアミナーゼ B）(BCAT).	3122274	2.00E-46	メタノテルモバクター・テルマウトトロフィクス（Methanothermobacter thermautotrophicus）	原核細胞必須遺伝子 # 34740	ABU23351
205, 206	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	2.00E-53	Oceanobacillus iheyensis	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
207, 208	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	7.00E-51	Oceanobacillus iheyensis	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
209, 210	アミノトランスフェラーゼ クラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941] gi|118014341|gb|EAV28318.1| アミノ	118061613	1.00E-105	Roseiflexus castenholzii DSM 13941	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446

	トランスフェラーゼ クラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941]					
211, 212	仮説的蛋白質 CdifQ_04002916 [Clostridium difficile QCD-32g58]	145952948	6.00E-42	クロストリジウム・ジフィシル(Clostridium difficile) QCD-32g58	細菌ポリペプチド # 10001	ADS43070
213, 214	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	3.00E-95	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18018
215, 216	アミノトランスフェラーゼ クラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941] gi|118014341|gb|EAV28318.1| アミノトランスフェラーゼ クラス-III [Roseiflexus castenholzii DSM 13941]	118061613	1.00E-116	Roseiflexus castenholzii DSM 13941	細菌ポリペプチド # 10001	ADN26446
217, 218	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	2.00E-53	Oceanobacillus iheyensis	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
219, 220	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	3.00E-98	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
221, 222	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Symbiobacterium thermophilum IAM 14863]	51892468	1.00E-57	シンビオバクテリウム・テルモフィルム (Symbiobacterium thermophilum) IAM 14863	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
223, 224	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	3.00E-97	Oceanobacillus iheyensis	耐熱性 D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼコード DNA.	ABB06297
225, 226	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	7.00E-97	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
227, 228	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	4.00E-98	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031
229, 230	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]					

50 40 30 20 10

	gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	3.00E-94	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
231, 232	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	2.00E-97	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18031
233, 234	仮説的蛋白質 ALPR1_18298 [Algoriphagus sp. PR1] gi|126576766|gb|EAZ81014.1| 仮説的蛋白質 ALPR1_18298 [Algoriphagus sp. PR1]	126646718	2.00E-43	アルゴリファグス (Algoriphagus)sp. PR1	B.リケニフォルミスブチリル(B. licheniformis butyryl)-CoA デヒドロゲナーゼ/アシル-CoA デヒドロゲナーゼ pro. 1.	AEJ13860
235, 236	分枝鎖-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (ilvE) [Pyrobaculum aerophilum].	18313971	1.00E-43	ピロバクルム・アエロフィルム (Pyrobaculum aerophilum)	アキフェックス・アスパルテート (Aquifex aspartate) アミノトランスフェラーゼ B DNA.	ABU57358
237, 238	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Alcanivorax borkumensis SK2]	110834821	1.00E-55	アルカニボラクス・ボルクメンシス(Alcanivorax borkumensis) SK2	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
239, 240	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Alcanivorax borkumensis SK2]	110834821	2.00E-54	Alcanivorax borkumensis SK2	バチルス D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ	AAY13560
241, 242	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	2.00E-53	Oceanobacillus iheyensis	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
243, 244	D-アラニンアミノトランスフェラーゼ [Oceanobacillus iheyensis].	23098538	2.00E-53	Oceanobacillus iheyensis	P. stutzeri 4 D-HPG AT N-末端外部フォワード PCR プライマー 1	AEM18040
245, 246	芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Pseudomonas entomophila L48]	104781758	1.00E-153	シュードモナス・エントモフィラ (Pseudomonas entomophila) L48	クレブシーラ・プニューモニアエ (Klebsiella pneumonia)ポリペプチド 配列番号:7178	ABO61955
247, 248	D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052] gi|82726488|gb|EAP61226.1| D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ [Clostridium beijerincki NCIMB 8052]	82745661	6.00E-99	Clostridium beijerincki NCIMB 8052	変異体 Bacillus sphaericus dat 蛋白質	ABB08244
249, 250	仮説的アミノトランスフェラーゼ [Thermobifida fusca YX]	72162511	8.00E-29	テルモビフィダ・フスカ(Thermobifida fusca)YX	大腸菌アミノトランスフェラーゼ ilvE 配列番号:2	AEK20408
251, 252	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Methylobacillus flagellatus KT]	91775144	6.00E-17	メチロバチルス・フラゲラツス (Methylobacillus flagellatus) KT	エンテロバクター・クロアカ (Enterobacter cloacae)蛋白質アミノ酸配列- 配列番号:5666	AEH60497
253,				ロードビレルラ・バルチカ		

50 40 30 20 10

254	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小さい鎖 [Rhodopirellula baltica SH 1]	32473614	1.00E-152	(Rhodopirellula baltica) SH 1	N.ゴノロエア（N. gonorrhoeae）ヌクレオチド配列、配列番号:4691	ABP80542
255, 256	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Burkholderia xenovorans LB400]	91779297	0	ブルクホルデリア・ゼノボランス（Burkholderia xenovorans） LB400	グリフォセートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
257, 258	仮説的 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ (DadA-様) [Bradyrhizobium sp. ORS278]	146341475	1.00E-174	Bradyrhizobium sp. ORS278	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
259, 260	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	1.00E-163	Bradyrhizobium ジャポニクム(japonicum) USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
261, 262	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-166	シノリゾビウム・メディカエ（Sinorhizobium medicae ） WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
263, 264	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、小サブユニット[Mesorhizobium loti].	13473406	1.00E-164	メゾリゾビウム・ロチ (Mesorhizobium loti)	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
265, 266	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+) [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92114170	1.00E-112	クロモハロバクター・サレキシゲンス(Chromohalobacter salexigens) DSM 3043	最近ポリペプチド #10001	ADS25020
267, 268	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Bordetella parapertussis 12822]	33596520	1.00E-172	ボルデテラ・パラペルツシス(Bordetella parapertussis)12822	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
269, 270	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小サブユニット[Pseudomonas stutzeri A1501]	146280878	0	シュードモナス・スツッツェリ(Pseudomonas stutzeri) A1501	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
271, 272	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	1.00E-144	ラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha) JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
273, 274	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306].	21243478	1.00E-106	キサントモナス・アキソノポジス pv. シトリ(Xanthomonas axonopodis pv. Citri) str. 306	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
275, 276	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Nitrobacter hamburgensis X14]	92118208	1.00E-174	ニトロバクター・ハンブルゲンシス(Nitrobacter hamburgensis)X14	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
277, 278	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Nitrobacter hamburgensis X14]	92118208	1.00E-170	Nitrobacter hamburgensis X14	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262

50 40 30 20 10

279, 280	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-116	ロードシュードモナス・パルストリス（Rhodopseudomonas palustris） HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
281, 282	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-151	ラルストニア・ピケッチー（Ralstonia pickettii） 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
283, 284	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	1.00E-158	ブラジリゾビウム・ジャポニクム（Bradyrhizobium japonicum） USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
285, 286	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacterium sp. MED217]	86141912	2.00E-87	フラボバクテリウム（Flavobacterium） sp. MED217	M. catarrhalis 蛋白質 #1.	ADL05210
287, 288	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645] gi|87287337|gb|EAQ79237.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645]	87309573	1.00E-128	ブラストピレルラ・マリナ（Blastopirellula marina） DSM 3645	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
289, 290	可能な D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris CGA009]	39936835	1.00E-120	Rhodopseudomonas palustris CGA009	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
291, 292	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645] gi|87287337|gb|EAQ79237.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645]	87309573	1.00E-136	Blastopirellula marina DSM 3645	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質.	ADQ03060
293, 294	D-amino acid dehydrogenase; small subunit family protein [Pseudomonas entomophila L48]	104781752	0	Pseudomonas entomophila L48	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
295, 296	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	4.00E-86	ミクロシラ・マリナ（Microscilla marina） ATCC 23134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
297, 298	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Pseudomonas stutzeri A1501]	146284421	1.00E-177	Pseudomonas stutzeri A1501	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19.	ADA36279
299, 300	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Pseudomonas stutzeri A1501]	146284421	1.00E-176	Pseudomonas stutzeri A1501	蛋白質 #19.	ADA36279

50 40 30 20 10

301, 302	仮説的 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	116250556	1.00E-168	リーゾビウム・レグミノサルム bv.ビシアエ（Rhizobium leguminosarum bv. Viciae） 3841	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
303, 304	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sphingomonas wittichii RW1]	148553731	4.00E-90	スフィンゴモナス・ウイッチキー（Sphingomonas wittichii） RW1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
305, 306	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Escherichia coli CFT073]	26247503	0	Escherichia coli CFT073	Enterobacter cloacae 蛋白質アミノ酸配列 – 配列番号:5666	AEH60497
307, 308	仮説的 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	116250556	1.00E-129	Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
309, 310	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	5.00E-98	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
311, 312	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	0	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
313, 314	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-119	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
315, 316	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	1.00E-145	ラルストニア・エウトロファ（Ralstonia eutropha） JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
317, 318	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Flavobacteriales bacterium HTCC 2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	5.00E-96	フラボバクテリアレス・バクテリウム(Flavobacteriales bacterium) HTCC2170	M. カタラーリス(M. catarrhalis) 蛋白質 #1	ADL05210
319, 320	エノイル-CoA ヒドラターゼ/イソメラーゼ:3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、NAD-結合蛋白質[Rhodobacterales bacterium HTCC2150] gi|126703311|gb|EBA02409.1| エノイル-CoA ヒドラターゼ/イソメラーゼ:3-ヒ			ロードバクテラレス・バクテリウム（Rhodobacteral		

50 40 30 20 10

	ドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシアシ	126727316	2.00E-96	es bacterium) HTCC21 50	細菌ポリペプチド #10001	ADN25932
321, 322	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-170	ラルストニア・ピケッチー (Ralstonia pickettii) 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
323, 324	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Pseudomonas putida GB-1] gi|126320385|gb|EAZ71237.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Pseudomonas putida GB-1]	126355875	0	Pseudomonas putida GB-1	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
325, 326	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Pseudomonas putida GB-1] gi|126319114|gb|EAZ69967.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Pseudomonas putida GB-1]	126356306	0	Pseudomonas putida GB-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
327, 328	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼサブユニット[Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306].	21243478	1.00E-112	キサントモナス・アクソノポジス pv.シトリ str. (Xanthomonas axonopodis pv. citri) 株 306	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
329, 330	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	4.00E-95	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
331, 332	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	0	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
333, 334	エノイル-CoA ヒドラターゼ/イソメラーゼ:3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、NAD-結合蛋白質[Rhodobacterales bacterium HTCC2150] gi|126703311|gb|EBA02409.1| エノイル-CoA ヒドラターゼ/イソメラーゼ:3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシアシ	126727316	2.00E-96	Rhodobacterales bacterium HTCC2150	細菌ポリペプチド #10001	ADN25932
335, 336	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX434					

	40.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-170	Ralstonia pickettii 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
337, 338	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-114	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
339, 340	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	1.00E-100	Microscilla marina ATCC 23134	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
341, 342	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-170	Ralstonia pickettii 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
343, 344	短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ SDR [Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444]	146275754	2.00E-51	ノボスフィンゴビウム・アロマチシボランス (Novosphingobium aromaticivorans) DSM 12444	細菌ポリペプチド # 10001	ADS24609
345, 346	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Maricaulis maris MCS10] gi|114341114|gb|ABI66394.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Maricaulis maris MCS10]	114570652	2.00E-91	Maricaulis maris MCS10	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
347, 348	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-152	シノリーゾビウム・メディカエ (Sinorhizobium medicae) WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
349, 350	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-117	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
351, 352	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小さい鎖 [Rhodopirellula baltica SH 1]	32473614	1.00E-155	Rhodopirellula baltica SH 1	N. gonorrhoeae ヌクレオチド配列、配列番号:4691	ABP80542
353, 354	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	1.00E-88	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	細菌ポリペプチド #19	ADF07894

355, 356	aldehyde dehydrogenase family protein [Myxococcus xanthus DK 1622]	108761092	2.00E-97	ミクソコックス・キサンタス(Myxococcus xanthus)DK 1622	細菌ポリペプチド #10001	ADN25785
357, 358	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	1.00E-96	Microscilla marina ATCC 23134	M. catarrhalis タンパク質 #1	ADL05210
359, 360	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Rhodococcus sp. RHA1]	111019145	1.00E-163	Rhodococcus sp. RHA1	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
361, 362	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Rhodococcus sp. RHA1]	111019145	1.00E-163	Rhodococcus sp. RHA1	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
363, 364	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhodococcus sp. RHA1]	111019145	1.00E-163	Rhodococcus sp. RHA1	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
365, 366	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	0	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
367, 368	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Herminiimonas arsenicoxydans] gi|133737889|emb|CAL60934.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Herminiimonas arsenicoxydans]	134093986	0	ヘルミニモナス・アルセニコキシダンス(Herminiimonas arsenicoxydans)	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
369, 370	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	1.00E-101	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
371, 372	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	0	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
373, 374	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ D-amino-acid dehydrogenase [Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	1.00E-136	Ralstonia eutropha JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
375, 376	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Psychroflexus torquis ATCC 700755] gi|91184468|gb|EAS70851.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Psychroflexus torquis ATCC 7			プシクロフレクス・トルキス(Psychroflexus torque		

50 40 30 20 10

	00755]	91217360	3.00E-98	s) ATCC 700755	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19	ADA33588
377, 378	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	1.00E-122	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
379, 380	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Maricaulis maris MCS10] gi|114341114|gb|ABI66394.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Maricaulis maris MCS10]	114570652	8.00E-91	Maricaulis maris MCS10	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
381, 382	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhodococcus sp. RHA1]	111019145	1.00E-163	Rhodococcus sp. RHA1	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
383, 384	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Mesorhizobium loti].	13473406	0	Mesorhizobium loti	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
385, 386	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	5.00E-99	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
387, 388	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Mesorhizobium loti].	13474742	0	Mesorhizobium loti	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO75104
389, 390	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Herminiimonas arsenicoxydans] gi|133737889|emb|CAL60934.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Herminiimonas arsenicoxydans]	134093986	0	Herminiimonas arsenicoxydans	Klebsiella pneumoniae ポリペプチド、配列番号:7178	ABO67618
391, 392	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、小さい鎖[Blastopirellula marina DSM 3645] gi|87287337|gb|EAQ79237.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小さい鎖[Blastopirellula marina DSM 3645]	87309573	1.00E-139	Blastopirellula marina DSM 3645	N. gonorrhoeae ヌクレオチド配列、配列番号:4691	ABP80542
393, 394	probable D-amino acid dehydrogenase small subunit [Azoarcus sp. BH72]	119897258	1.00E-111	Azoarcus sp. BH72	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO84309
395, 396	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	0	Ralstonia eutropha JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
397, 398	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-121	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262

399, 400	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	2.00E-97	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
401, 402	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Maricaulis maris MCS10] gi|114341114|gb|ABI66394.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Maricaulis maris MCS10]	114570652	3.00E-66	Maricaulis maris MCS10	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
403, 404	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	1.00E-111	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
405, 406	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Robiginitalea biformata HTCC2501] gi|88783849|gb|EAR15020.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Robiginitalea biformata HTCC2501]	88806240	2.00E-95	Robiginitalea biformata HTCC2501	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
407, 408	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	0	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
409, 410	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	2.00E-98	Microscilla marina ATCC 23134	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
411, 412	ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase [Pseudomonas entomophila L48]	104783034	1.00E-103	Pseudomonas entomophila L48	細菌ポリペプチド #10001	ADN25785
413, 414	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-119	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
415, 416	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-125	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
417, 418	AGR_L_3050p [Agrobacterium tumefaciens].	15891640	1.00E-179	Agrobacterium tumefaciens	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
419,	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ	91786059	0	Polaromonas sp. JS666	Photorhabdus luminescens 蛋白質配列	ABM69115

420	[Polaromonas sp. JS666]				#59	
421, 422	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rubrobacter xylanophilus DSM 9941]	108804652	1.00E-108	Rubrobacter xylanophilus DSM 9941	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
423, 424	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	4.00E-94	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
425, 426	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-122	Ralstonia pickettii 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
427, 428	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Nitrobacter hamburgensis X14]	92118208	0	Nitrobacter hamburgensis X14	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
429, 430	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	2.00E-97	Microscilla marina ATCC 23134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
431, 432	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	1.00E-119	Microscilla marina ATCC 23134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
433, 434	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-123	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
435, 436	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-121	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
437, 438	一酸化炭素デヒドロゲナーゼ G 蛋白質:仮説的[Silicibacter pomeroyi DSS-3]	56697247	1.00E-66	シリシバクター・ポメロイー(Silicibacter pomeroyi) DSS-3	細菌ポリペプチド#10001	ADS27598
439, 440	一酸化炭素デヒドロゲナーゼ F 蛋白質 [Silicibacter pomeroyi DSS-3]	56697248	1.00E-87	Silicibacter pomeroyi DSS-3	新規なヒト診断蛋白質 #20574 をコードする DNA	ABG25235
441, 442	一酸化炭素デヒドロゲナーゼ E 蛋白質 [Silicibacter pomeroyi DSS-3]	56697249	1.00E-171	Silicibacter pomeroyi DSS-3	ヒト粘着分子蛋白質 AD6/CAA17374.1	AAU75888

【００９８】

443, 444	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-150	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
445, 446	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Algoriphagus sp. PR1] gi|126578095|gb|EAZ82315.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Algoriphagus sp. PR1]	126646463	1.00E-175	Algoriphagus sp. PR1	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
447, 448	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Stenotrophomonas maltophilia R551-3] gi|119820020|gb|EAX22641.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Stenotrophomonas maltophilia R551-3]	119877440	0	ステノトロフォモナス・マルトフィラ(Stenotrophomonas maltophilia) R551-3	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
449, 450	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-104	Ralstonia pickettii 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
451, 452	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-143	Ralstonia pickettii 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
453, 454	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-125	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
455, 456	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	1.00E-104	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
457, 458	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	1.00E-173	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
459,	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニ	126666221	0	Marinobacter sp. ELB17	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19	ADA36279

10 20 30 40 50

460	ット [Marinobacter sp. ELB17] gi|126629543|gb|EBA00161.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Marinobacter sp. ELB17]					
461, 462	短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ SDR [Azotobacter vinelandii AvOP]	67154056	1.00E-109	アゾトバクター・ベネランディー(Azotobacter vinelandii) AvOP	Klebsiella pneumoniae ポリペプチド、配列番号:7178	ABO66363
463, 464	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Psychroflexus torquis ATCC 700755] gi|91184468|gb|EAS70851.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Psychroflexus torquis ATCC 700755]	91217360	1.00E-167	Psychroflexus torquis ATCC 700755	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
465, 466	デヒドロゲナーゼ [Geobacillus kaustophilus HTA426]	56420489	4.00E-18	ゲオバチルス・カウストフィルス (Geobacillus kaustophilus)HTA426	好熱菌 Methanopyrus kandleri 蛋白質 #28	ADM25691
467, 468	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	1.00E-133	Ralstonia eutropha JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
469, 470	仮説的 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	116250556	1.00E-166	リゾビウム・レグミノサルム bv. ビシアエ(Rhizobium leguminosarum bv. Viciae) 3841	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
471, 472	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Escherichia coli CFT073]	26247503	0	Escherichia coli CFT073	Enterobacter cloacae 蛋白質アミノ酸配列、配列番号:5666	AEH60497
473, 474	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-159	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
475, 476	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Maricaulis maris MCS10] gi|114341114|gb|ABI66394.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Maricaulis maris MCS10]	114570652	1.00E-155	Maricaulis maris MCS10	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
477, 478	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	4.00E-85	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
479, 480	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ	88712395	4.00E-85	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060

50 40 30 20 10

	酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]						
481, 482	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	1.00E-175	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	M. catarrhalis 蛋白質 #1		ADL05210
483, 484	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Herminiimonas arsenicoxydans] gi|133737889|emb|CAL60934.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Herminiimonas arsenicoxydans]	134093986	0	Herminiimonas arsenicoxydans	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質		ADQ03060
485, 486	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27377333	1.00E-167	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質		ADQ03060
487, 488	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-129	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域		AAR22262
489, 490	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris BisA53]	115523700	1.00E-123	Rhodopseudomonas palustris BisA53	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域		AAR22262
491, 492	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Maricaulis maris MCS10] gi|114341114|gb|ABI66394.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Maricaulis maris MCS10]	114570652	1.00E-78	Maricaulis maris MCS10	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質		ADQ03060
493, 494	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134] gi 123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	6.00E-90	Microscilla marina ATCC 23134	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935		AAG93079
495, 496	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris BisA53]	115523700	1.00E-112	Rhodopseudomonas palustris BisA53	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域		AAR22262
497, 498	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-129	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域		AAR22262
499,	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ	115523700	1.00E-112	Rhodopseudomonas	グリホセフェートオキシドレダクターゼ		AAR22262

【0100】

500	[Rhodopseudomonas palustris BisA53]			palustris BisA53	遺伝子下流フランキング領域	
501, 502	デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレートデヒドロゲナーゼ [Corynebacterium jeikeium K411]	68535524	1.00E-174	コリネバクテリウム・ジェイケウム Corynebacterium jeikeium K411	Corynebacterium glutamicum MP 蛋白質、配列番号:1148	AAR79787
503, 504	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645] gi|87287337|gb EAQ79237.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645]	87309573	1.00E-129	Blastopirellula marina DSM 3645	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
505, 506	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645] gi|87287337|gb|EAQ79237.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、小さい鎖 [Blastopirellula marina DSM 3645]	87309573	1.00E-127	Blastopirellula marina DSM 3645	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
507, 508	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Nitrobacter hamburgensis X14]	92118208	1.00E-174	Nitrobacter hamburgensis X14	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
509, 510	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-115	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
511, 512	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	1.00E-166	Ralstonia eutropha JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
513, 514	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Herminiimonas arsenicoxydans] gi|133737889|emb|CAL60934.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Herminiimonas arsenicoxydans]	134093986	0	Herminiimonas arsenicoxydans	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
515, 516	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Pseudomonas stutzeri A1501]	146284421	1.00E-177	Pseudomonas stutzeri A1501	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19	ADA36279
517, 518	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Algoriphagus sp. PR1] gi|126578095|gb|EAZ82315.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Algoriphagus sp. PR1]	126646463	1.00E-110	Algoriphagus sp. PR1	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19	ADA33588
519, 520	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	3.00E-98	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	N. gonorrhoeae ヌクレオチド配列、配列番号:4691	ABP80542
521, 522	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhodococcus sp. RHA1]	111019145	0	Rhodococcus sp. RHA1	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
523,	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ	126646463	7.00E-87	Algoriphagus sp. PR1	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270

524	[Algoriphagus sp. PR1] gi|126578095|gb|EAZ82315.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Algoriphagus sp. PR1]					
525, 526	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-146	Ralstonia pickettii 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
527, 528	仮説的 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	116250556	0	Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
529, 530	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Nitrobacter hamburgensis X14]	92118208	1.00E-116	Nitrobacter hamburgensis X14	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
531, 532	おそらく D-アミノ酸デヒドロゲナーゼサブユニット[Limnobacter sp. MED105]	149824671	1.00E-150	リムノバクター (Limnobacter) sp. MED105	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
533, 534	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	3.00E-88	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
535, 536	アルデヒドデヒドロゲナーゼ[Ralstonia eutropha JMP134]	73537548	1.00E-143	Ralstonia eutropha JMP134	細菌ポリペプチド#10001	ADN25785
537, 538	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	1.00E-136	Ralstonia eutropha JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
539, 540	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Burkholderia cepacia AMMD]	115359189	0	Burkholderia cepacia AMMD	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
541, 542	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼサブユニット[Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306].	21243478	1.00E-139	Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
543, 544	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134] gi|123984082|gb|EAY24455.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット、仮説的[Microscilla marina ATCC 23134]	124009931	1.00E-107	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
545, 546	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-117	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
547, 548	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]					

	gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	3.00E-86	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	Photorhabdus luminescens 蛋白質配列 #59	ABM69115
549, 550	おそらく D-アミノ酸デヒドロゲナーゼサブユニット[Limnobacter sp. MED105]	149824671	1.00E-146	Limnobacter sp. MED105	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
551, 552	デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレートデヒドロゲナーゼ [Corynebacterium jeikeium K411]	68535524	0	コリネバクテリウム・ジェイケイウム(Corynebacterium jeikeium) K411	Corynebacterium glutamicum MP 蛋白質配列、配列番号:1148	AAB79787
553, 554	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris BisA53]	115523700	1.00E-112	Rhodopseudomonas palustris BisA53	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
555, 556	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Nitrobacter hamburgensis X14]	92118208	1.00E-118	Nitrobacter hamburgensis X14	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
557, 558	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-132	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
559, 560	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-132	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
561, 562	NADH デヒドロゲナーゼ[Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306].	21244546	1.00E-143	Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306	M. xanthus 蛋白質配列、配列番号:9726	ABM91806
563, 564	短鎖デヒドロゲナーゼ [Ralstonia eutropha JMP134]	73541108	3.00E-66	Ralstonia eutropha JMP134	M. xanthus 蛋白質配列、配列番号:9726	ABM96904
565, 566	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Rhodopseudomonas palustris BisA53]	115523700	1.00E-112	Rhodopseudomonas palustris BisA53	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
567, 568	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Acidovorax avenae subsp. citrulli AAC00-1] gi|120587303|gb|ABM30743.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Acidovorax avenae subsp. citrulli AAC00-1]	1SEQ ID NO:9288839	0	アシドボラックス・アベナエ subsp. シトルリー(Acidovorax avenae subsp. Citrulli) AAC00-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
569, 570	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Maricaulis maris MCS10] gi|114341114|gb|AB166394.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ [Maricaulis maris MCS10]	114570652	8.00E-91	Maricaulis maris MCS10	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
571,	AGR_L_3050p [Agrobacterium	15891640	1.00E-180	Agrobacterium	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、	ADQ03060

【0104】

572	tumefaciens].			tumefaciens	VIR14、蛋白質	
573, 574	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Robiginitalea biformata HTCC2501] gi|88783849|gb|EAR15020.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Robiginitalea biformata HTCC2501]	88806240	5.00E-85	Robiginitalea biformata HTCC2501	Enterobacter cloacae 蛋白質アミノ酸配列、配列番号:5666	AEH60497
575, 576	アルデヒドデヒドロゲナーゼ[Ralstonia eutropha JMP134]	72384235	1.00E-141	Ralstonia eutropha JMP134	細菌ポリペプチド#10001	ADN22241
577, 578	仮説的 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	116250556	1.00E-166	Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
579, 580	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小サブユニット蛋白質[Rhizobium etli CFN 42]	86361166	0	リゾビウム・エトリ(Rhizobium etli)CFN 42	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
581, 582	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia eutropha JMP134]	73541345	1.00E-136	Ralstonia eutropha JMP134	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
583, 584	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Burkholderia xenovorans LB400]	91779297	0	Burkholderia xenovorans LB400	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
585, 586	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Polaromonas naphthalenivorans CJ2]	121603011	0	ポラロモナス・ナフタレニボランス(Polaromonas naphthalenivorans)CJ2	Photorhabdus luminescens 蛋白質配列#59	ABM69115
587, 588	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小サブユニットファミリー蛋白質[Pseudomonas entomophila L48]	104781752	1.00E-139	Pseudomonas entomophila L48	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
589, 590	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Rhodococcus sp. RHA1]	111019145	0	Rhodococcus sp. RHA1	C glutamicum コード配列フラグメント、配列番号:1935	AAG93079
591, 592	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-145	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
593, 594	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-118	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
595, 596	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Nitrobacter hamburgensis X14]	92118208	0	Nitrobacter hamburgensis X14	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
597, 598	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Chromobacterium violaceum ATCC 12472]	34497369	0	Chromobacterium violaceum ATCC 12472	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
599, 600	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小サブユニット蛋白質[Rhizobium etli CFN 42]	86361166	0	Rhizobium etli CFN 42	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060

10 20 30 40 50

【0105】

601, 602	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小サブユニット蛋白質[Rhizobium etli CFN 42]	86361166	0	Rhizobium etli CFN 42	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
603, 604	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	2.00E-93	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
605, 606	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419] gi|113726415|gb|EAU07507.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sinorhizobium medicae WSM419]	113871743	1.00E-170	Sinorhizobium medicae WSM419	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
607, 608	おそらく D-アミノ酸デヒドロゲナーゼサブユニット[Limnobacter sp. MED105]	149824671	1.00E-125	リムノバクター(Limnobacter) sp. MED105	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
609, 610	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J] gi|121302471|gb|EAX43440.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Ralstonia pickettii 12J]	121530396	1.00E-146	Ralstonia pickettii 12J	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
611, 612	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ；小サブユニット蛋白質[Rhizobium etli CFN 42]	86361166	0	Rhizobium etli CFN 42	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
613, 614	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Marinobacter algicola DG893]	149377918	3.00E-98	マリノバクター・アルジコラ (Marinobacter algicola)DG893	N. gonorrhoeae ヌクレオチド配列、配列番号:4691.	ABP80542
615, 616	仮説的 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	116250556	0	Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
617, 618	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Rhodopseudomonas palustris HaA2]	86750758	1.00E-113	Rhodopseudomonas palustris HaA2	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
619, 620	アルデヒドデヒドロゲナーゼ[Burkholderia phymatum STM815] gi|117986837|gb|EAV01212.1| アルデヒドデヒドロゲナーゼ[Burkholderia phymatum STM815]	118027543	1.00E-144	Burkholderia phymatum STM815	細菌ポリペプチド#10001	ADN25785
621, 622	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170] gi|88708933|gb|EAR01167.1| D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	88712395	1.00E-92	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO75104

10 20 30 40 50

623, 624	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Rhodobacter sphaeroides 2.4.1]	77465126	1.00E-121	Rhodobacter sphaeroides 2.4.1	Photorhabdus luminescens 蛋白質配列 #59	ABM69115
625, 626	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[Sphingomonas wittichii RW1]	148553731	0	Sphingomonas wittichii RW1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
627, 628	おそらく D-アミノ酸デヒドロゲナーゼサブユニット [Limnobacter sp. MED105]	149824671	1.00E-151	Limnobacter sp. MED105	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
629, 630	仮説的デヒドロゲナーゼ[Streptomyces parvulus]	39725441	5.00E-63	ストレプトミセス・パルブルス(Streptomyces parvulus)	Streptomyces parvulus ポレリジンポリケチドシンターゼ orfB8 蛋白質	ADQ74690
631, 632	FAD 依存オキシドレダクターゼ[Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117992233|gb|EAV06525.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ[Burkholderia phytofirmans PsJN]	118037424	0	ブルクホルディア・フィトフィルマンス(Burkholderia phytofirmans) PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
633, 634	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Delftia acidovorans SPH-1] gi|118665742|gb|EAV72348.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ[Delftia acidovorans SPH-1]	118734342	0	デルフチア・アシドボランス(Delftia acidovorans) SPH-1	Acinetobacter baumannii 蛋白質#19	ADA33588
635, 636	FAD 依存オキシドレダクターゼ[Delftia acidovorans SPH-1] gi|118665742|gb EAV72348.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Delftia acidovorans SPH-1]	118734342	0	Delftia acidovorans SPH-1	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19	ADA33588
637, 638	FAD 依存オキシドレダクターゼ[Pseudomonas fluorescens PfO-1]	77457196	0	Pseudomonas fluorescens PfO-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO71517
639, 640	オキシドレダクターゼ様[Roseiflexus castenholzii DSM 13941] gi|118014488|gb|EAV28464.1|オキシドレダクターゼ様[Roseiflexus castenholzii DSM 13941]	118061388	4.00E-72	Roseiflexus castenholzii DSM 13941	Hyperthermophile Methanopyrus kandleri 蛋白質 #28.	ADM25642
641, 642	FAD 依存オキシドレダクターゼ[Pseudomonas fluorescens PfO-1]	77457196	0	Pseudomonas fluorescens PfO-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
643, 644	グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ[Magnetospirillum magneticum AMB-1]	83311898	4.00E-86	マグネトスピリルム・マグネチクム(Magnetospirillum magneticum) AMB-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104
645, 646	FAD 依存オキシドレダクターゼ[Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-151	クロモハロバクター・サレキシゲン(Chromohalobacter salexigens) DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
647,	FAD 依存オキシドレダクターゼ					

50 40 30 20 10

648	[Burkholderia phymatum STM815] gi|117985258|gb|EAU99635.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ[Burkholderia phymatum STM815]	118029195	1.00E-165	ブルクホルディア・フィマツム (Burkholderia phymatum)STM815	Enterobacter cloacae 蛋白質アミノ酸配列、配列番号:5666	AEH60497
649, 650	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-146	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
651, 652	仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27379412	1.00E-122	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
653, 654	レダクターゼ[Xanthomonas campestris pv. campestris str. 8004]	66767863	1.00E-128	Xanthomonas campestris pv. campestris str. 8004	原核細胞必須遺伝子 #34740	ABU14721
655, 656	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-118	ニトロバクター・ウィノグラドスキー(Nitrobacter winogradskyi)Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
657, 658	D-アスパルテートオキシダーゼ [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1] gi|115366155|gb|EAU65167.1| D-アスパルテートオキシダーゼ [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1]	115376852	3.00E-85	スチグマテラ・アウランチア カ (Stigmatella aurantiaca) DW4/3-1	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
659, 660	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Dechloromonas aromatica RCB]	71909453	1.00E-142	Dechloromonas aromatica RCB	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
661, 662	仮説的分泌蛋白質 [Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10]	78049397	1.00E-102	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
663, 664	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-120	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
665, 666	グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Nitrococcus mobilis Nb-231] gi|88791478|gb|EAR22589.1| グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ[Nitrococcus mobilis Nb-231]	88810939	5.00E-83	ニトロコックス・モビリス (Nitrococcus mobilis) Nb-231	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
667, 668	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Solibacter usitatus Ellin6076] gi|116227684|gb|ABJ86393.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Solibacter usitatus Ellin6076]	116624522	2.00E-82	ソリバクター・ウシタツス (Solibacter usitatus) Ellin6076	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
669, 670	FAD dependent oxidoreductase [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-122	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
	FAD 依存オキシドレダクターゼ					

671, 672	[Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
673, 674	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ[Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
675, 676	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
677, 678	D-アミノ酸オキシダーゼ[Nocardioides sp. JS614] gi|119536676|gb|ABL81293.1| D-アミノ酸オキシダーゼ [Nocardioides sp. JS614]	119716015	2.00E-51	Nocardioides sp. JS614	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
679, 680	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Delftia acidovorans SPH-1] gi|118668198|gb|EAV74793.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ[Delftia acidovorans SPH-1]	118731339	0	Delftia acidovorans SPH-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
681, 682	グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Nitrococcus mobilis Nb-231] gi|88791478|gb|EAR22589.1| グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ[Nitrococcus mobilis Nb-231]	88810939	5.00E-94	Nitrococcus mobilis Nb-231	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
683, 684	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	2.00E-86	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104
685, 686	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	5.00E-86	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
687, 688	D-アスパルテートオキシダーゼ [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1] gi|115366155|gb|EAU65167.1| D-アスパルテートオキシダーゼ [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1]	115376852	2.00E-71	Stigmatella aurantiaca DW4/3-1	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
689,	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia multivorans ATCC 17616] gi|118660081|gb|EAV66824.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia			Burkholderia multivorans ATCC	グリホセフェートオキシドレダクターゼ	

50 40 30 20 10

690	multivorans ATCC 17616]	118716641	1.00E-154	17616	遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
691, 692	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Ralstonia metallidurans CH34]	94314499	1.00E-159	Ralstonia metallidurans CH34	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19.	ADA36279
693, 694	NADH:ユビキノンオキシドレダクターゼ 17.2 kD サブユニット[Mesorhizobium sp. BNC1]	110634071	9.00E-58	Mesorhizobium sp. BNC1	Drosophila melanogaster ポリペプチド、配列番号:24465	ABB59730
695, 696	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Ralstonia eutropha H16]	116695075	1.00E-141	Ralstonia eutropha H16	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
697, 698	グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Magnetospirillum magneticum AMB-1]	83311898	1.00E-103	Magnetospirillum magneticum AMB-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
699, 700	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-119	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
701, 702	D-アスパルテートオキシダーゼ [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1] gi|115366155|gb|EAU65167.1| D-アスパルテートオキシダーゼ [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1]	115376852	8.00E-51	Stigmatella aurantiaca DW4/3-1	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
703, 704	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Rhodopseudomonas palustris BisB5]	91976294	1.00E-118	Rhodopseudomonas palustris BisB5	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
705, 706	仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27379412	1.00E-133	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
707, 708	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-121	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
709, 710	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phymatum STM815] gi|117979745|gb|EAU94152.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phymatum STM815]	118034565	0	Burkholderia phymatum STM815	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
711, 712	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	1.00E-88	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
713, 714	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phymatum STM815] gi|117979745|gb|EAU94152.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phymatum STM815]	118034565	0	Burkholderia phymatum STM815	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
715, 716	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	144897812	4.00E-87	Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104

717, 718	FAD 依存オキシドレダクターゼ、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134] gi|123987451|gb|EAY27171.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ、仮説的 [Microscilla marina ATCC 23134]	124006998	4.00E-29	Microscilla marina ATCC 23134	H. pylori GHPO 1099 遺伝子	AAW98270
719, 720	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-137	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
721, 722	D-アミノ酸オキシダーゼ [Nocardioides sp. JS614] gi|119536676|gb|ABL81293.1| D-アミノ酸オキシダーゼ [Nocardioides sp. JS614]	119716015	7.00E-53	Nocardioides sp. JS614	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
723, 724	グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Nitrococcus mobilis Nb-231] gi|88791478|gb|EAR22589.1| グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ[Nitrococcus mobilis Nb-231]	88810939	2.00E-84	Nitrococcus mobilis Nb-231	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104
725, 726	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Dechloromonas aromatica RCB]	71909453	1.00E-133	Dechloromonas aromatica RCB	Enterobacter cloacae 蛋白質アミノ酸配列、配列番号:5666	AEH60497
727, 728	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Marinobacter algicola DG893]	149377918	1.00E-136	Marinobacter algicola DG893	Photorhabdus luminescens 蛋白質配列 #59	ABM69115
729, 730	ピルベートフラボドキシン/フェレドキシンオキシドレダクターゼドメイン蛋白質 [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319858	1.00E-135	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	Staphylococcus aureus 蛋白質#10	ABM73103
731, 732	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	144897812	4.00E-80	Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1	Klebsiella pneumoniae ポリペプチド、配列番号:7178	ABO67618
733, 734	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	144897812	1.00E-89	Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO75104
735, 736	FAD 連関オキシダーゼドメイン蛋白質 [Methylobacterium sp. 4-46]	149124512	3.00E-61	Methylobacterium sp. 4-46	FAD-依存-D-エリスロネート 4-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	ADM97925
737, 738	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-150	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR20642
739, 740	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-153	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
	FAD 依存オキシドレダクターゼ					

741, 742	[Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-153	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
743, 744	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-150	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR20642
745, 746	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Ralstonia metallidurans CH34]	94314005	1.00E-101	Ralstonia metallidurans CH34	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
747, 748	グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Parvibaculum lavamentivorans DS-1] gi|121298521|gb|EAX39710.1| グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Parvibaculum lavamentivorans DS-1]	121525574	1.00E-125	Parvibaculum lavamentivorans DS-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
749, 750	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Dechloromonas aromatica RCB]	71909453	1.00E-139	Dechloromonas aromatica RCB	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
751, 752	モノオキシゲナーゼ FAD-結合 [Comamonas testosteroni KF-1] gi|118002385|gb|EAV16539.1| モノオキシゲナーゼ FAD-結合 [Comamonas testosteroni KF-1]	118050299	8.00E-81	コマモナス・テストステロニ (Comamonas testosterone) KF-1	ファルネシルジベンゾジアゼピノン生合成 ORF9 蛋白質 HMGA、配列番号:18	ADR01274
753, 754	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-120	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
755, 756	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Rhodopseudomonas palustris BisB5]	91976294	1.00E-121	Rhodopseudomonas palustris BisB5	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
757, 758	仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Sagittula stellata E-37] gi|126707413|gb|EBA06477.1| 仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Sagittula stellata E-37]	126732124	1.00E-131	サギッツラ・ステラータ (Sagittula stellata) E-37	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
759, 760	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-113	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
761, 762	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-149	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR20642
763, 764	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	4.00E-84	アルカリリムニコラ・エーリケイ (Alkalilimnicola ehrlichei) MLHE-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO75104
765, 766	FAD 連関オキシダーゼドメイン蛋白質 linked oxidase domain protein [Methylobacterium sp. 4-46]	149124512	1.00E-106	Methylobacterium sp. 4-46	FAD-依存-D-エリスロネート 4-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	ADM97925

767, 768	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	3.00E-84	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO75104
769, 770	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-149	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR20642
771, 772	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Nitrobacter winogradskyi Nb-255]	75676467	1.00E-121	Nitrobacter winogradskyi Nb-255	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
773, 774	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-149	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
775, 776	グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Nitrococcus mobilis Nb-231] gi|88791478|gb|EAR22589.1| グリシン/D-アミノ酸オキシダーゼ [Nitrococcus mobilis Nb-231]	88810939	5.00E-77	Nitrococcus mobilis Nb-231	N. gonorrhoeae ヌクレオチド配列、配列番号:4691	ABP80542
777, 778	仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27379412	0	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
779, 780	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117992233|gb|EAV06525.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118037424	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
781, 782	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Stappia aggregata IAM 12614] gi|118434190|gb|EAV40846.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Stappia aggregata IAM 12614]	118593299	1.00E-122	スタッピア・アグレガータ (Stappia aggregate) IAM 12614	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
783, 784	FAD 連関オキシダーゼドメイン蛋白質 [Methylobacterium sp. 4-46]	149124512	7.00E-99	Methylobacterium sp. 4-46	FAD-依存-D-エリスロネート 4-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	ADM97925
785, 786	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	1.00E-84	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104
787, 788	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	144897812	9.00E-85	Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104
789, 790	仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Sagittula stellata E-37] gi|126707413|gb|EBA06477.1| 仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Sagittula stellata E-37]	126732124	1.00E-107	Sagittula stellata E-37	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
	オキシドレダクターゼ、N-末端：ジヒドロ					

50 40 30 20 10

791, 792	ジピコリネートレダクターゼ [Halothermothrix orenii H 168] gi|89158855|gb|EAR78543.1| オキシドレダクターゼ、N-末端：ジヒドロジピコリネートレダクターゼ[Halothermothrix orenii H 168]	89211549	2.00E-98	Halothermothrix orenii H 168	Propionibacterium acnes 予想 ORF-コードポリペプチド#300	ABM37055
793, 794	仮説的オキシドレダクターゼ蛋白質 [Sinorhizobium meliloti]	15964495	1.00E-149	Sinorhizobium meliloti	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
795, 796	インドールピルベートフェレドキシンオキシドレダクターゼ [Stappia aggregata IAM 12614] gi|118434188|gb|EAV40844.1| インドールピルベートフェレドキシンオキシドレダクターゼ [Stappia aggregata IAM 12614]	118593297	0	Stappia aggregata IAM 12614	Acinetobacter baumannii 蛋白質 #19	ADA35170
797, 798	FAD 連関オキシダーゼドメイン蛋白質 [Methylobacterium sp. 4-46]	149124512	1.00E-128	Methylobacterium sp. 4-46	FAD-依存-D-エリスロネート 4-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	ADM97925
799, 800	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	9.00E-90	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	M. catarrhalis 蛋白質 #1	ADL05210
801, 802	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	144897812	1.00E-89	マグネトスピリルム・グリフィスワルデンス (Magnetospirillum gryphiswaldense)MSR-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104
803, 804	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	1.00E-86	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
805, 806	FAD 連関オキシダーゼドメイン蛋白質 [Methylobacterium sp. 4-46]	149124512	1.00E-121	Methylobacterium sp. 4-46	FAD-依存-D-エリスロネート 4-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	ADM97925
807, 808	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット[Marinobacter algicola DG893]	149377918	1.00E-135	Marinobacter algicola DG893	Photorhabdus luminescens 蛋白質配列 #59	ABM69115
809, 810	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
811, 812	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262

813, 814	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフニートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
815, 816	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
817, 818	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	5.00E-93	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
819, 820	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	144897812	1.00E-124	Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
821, 822	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	92113847	1.00E-150	Chromohalobacter salexigens DSM 3043	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR20642
823, 824	仮説的蛋白質、サルコシンノキシダーゼと弱い類似性を含む[Mesorhizobium loti].	13473721	1.00E-176	Mesorhizobium loti	ヒト Her-2/neu 過剰発現調節蛋白質 (HOMPS) H14 cDNA.	AAE00797
825, 826	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Delftia acidovorans SPH-1] gi|118668198|gb|EAV74793.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Delftia acidovorans SPH-1]	118731339	0	Delftia acidovorans SPH-1	Pseudomonas acruginosa ポリペプチド#3	ABO71517
827, 828	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Stappia aggregata IAM 12614] gi|118434190|gb|EAV40846.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Stappia aggregata IAM 12614]	118593299	1.00E-122	Stappia aggregata IAM 12614	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
829, 830	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	2.00E-87	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO75104
831, 832	仮説的蛋白質[Mesorhizobium loti].	13475565	7.00E-99	Mesorhizobium loti	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
833, 834	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	144897812	2.00E-89	Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO75104
835, 836	FAD 連関オキシダーゼドメイン蛋白質 [Methylobacterium sp. 4-46]	149124512	1.00E-123	Methylobacterium sp. 4-46	FAD-依存-D-エリスロネート 4-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	ADM97925
	D-アスパルテートオキシダーゼ					

【0114】

【0115】

837, 838	[Stigmatella aurantiaca DW4/3-1] gi|115366155|gb|EAU65167.1| D-アスパルテートオキシダーゼ [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1]	115376852	1.00E-56	Stigmatella aurantiaca DW4/3-1	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
839, 840	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN] gi|117991720|gb|EAV06013.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phytofirmans PsJN]	118038076	0	Burkholderia phytofirmans PsJN	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
841, 842	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Dechloromonas aromatica RCB]	71909453	1.00E-126	Dechloromonas aromatica RCB	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
843, 844	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phymatum STM815] gi|117985258|gb|EAU99635.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Burkholderia phymatum STM815]	118029195	1.00E-180	Burkholderia phymatum STM815	Enterobacter cloacae 蛋白質アミノ酸配列、配列番号:5666	AEH60497
845, 846	推定オキシドレダクターゼ蛋白質 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	27379412	0	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	グリホセフェートオキシドレダクターゼ遺伝子下流フランキング領域	AAR22262
847, 848	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Pseudomonas fluorescens PfO-1]	77457196	1.00E-171	Pseudomonas fluorescens PfO-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド#3	ABO71517
849, 850	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1]	114319576	7.00E-93	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
851, 852	D-アミノ酸オキシダーゼ [Arthrobacter protophormiae].	32140775	1.00E-62	Arthrobacter protophormiae	プライマー Aprev4 配列番号:8	ADF68144
853, 854	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Pseudomonas fluorescens PfO-1]	77457196	1.00E-171	Pseudomonas fluorescens PfO-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
855, 856	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Comamonas testosteroni KF-1] gi|118001016|gb|EAV15172.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Comamonas testosteroni KF-1]	118051673	0	Comamonas testosteroni KF-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
857, 858	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Comamonas testosteroni KF-1] gi|118001016|gb|EAV15172.1| FAD 依存オキシドレダクターゼ [Comamonas testosteroni KF-1]	118051673	0	Comamonas testosteroni KF-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517
859, 860	FAD 依存オキシドレダクターゼ [Comamonas testosteroni KF-1] gi|118001016|gb|EAV15172.1| FAD 依	118051673	0	Comamonas testosteroni KF-1	Pseudomonas aeruginosa ポリペプチド #3	ABO71517

	仔オキシドレダクターゼ[Comamonas testosteroni KF-1]					
861, 862	D-アミノ酸オキシダーゼ[Rubrobacter xylanophilus DSM 9941]	108803375	3.00E-70	Rubrobacter xylanophilus DSM 9941	ヒト D-アスパルテートオキシダーゼ活性部位	AED18771
863, 864	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ小サブユニット [Pseudomonas syringae pv. syringae B728a]	66043505	0	Pseudomonas syringae pv. syringae B728a	P. aeruginosa ビルレンス遺伝子、VIR14、蛋白質	ADQ03060
865, 866				Lactobacillus salivarius subsp. salivarius UCC118		ABM71198
867, 868				Methanococcus maripaludis C7		ADS43070
869, 870						AEM18037
871, 872				プランクトミセス・マリス (Planctomyces maris) DSM 8797		ADN26446
873, 874				Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
875, 876				Roseiflexus castenholzii DSM 13941		ADN26446
877, 878				Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
879, 880				Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
881, 882				Oceanobacter sp. RED65		AEB37927
883, 884				チオバチルス・デントリフィカンス (Thiobacillus denitrificans) ATCC 25259		AEM18040
885, 886				Clostridium beijerinckii NCIMB 8052		AEM18031
887, 888				Nocardioides sp. JS614		AEK20408
889, 890				Methylococcus capsulatus str. Bath		ABM71198
891, 892				Clostridium beijerinckii NCIMB 8052		ABB08244
893, 894				Clostridium beijerinckii NCIMB 8052		ABB08244

895, 896			Clostridium acetobutylicum ATCC 824		ABU32980
897, 898			Roseiflexus castenholzii DSM 13941		ADN26446
899, 900			Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
901, 902			Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
903, 904			Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
905, 906			Rhodobacter sphaeroides 2.4.1		ADF03944
907, 908			Streptomyces avermitilis MA-4680		AEK20408
909, 910			Bacillus sp. B14905		ADW43694
911, 912			アゾアルクス(Azoarcus) sp. EbN1		ABU33175
913, 914			Bacillus licheniformis ATCC 14580		AEM18039
915, 916			Roseiflexus castenholzii DSM 13941		ADN26446
917, 918			Robiginitalea biformata HTCC2501		AAY13560
919, 920			Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
921, 922			Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
923, 924			Roseobacter sp. MED193		ADF03944
925, 926			Planctomyces maris DSM 8797		ADN26446
927, 928			アキフェクス・アエオリクス(Aquifex aeolicus)VF5		ADN17496
929, 930			Aspergillus terreus NIH2624		ADS78245
931, 932			Oceanicola granulosus HTCC2516		ADS78325
933, 934			ピロコックス・ホリコシー (Pyrococcus horikoshii)		ADS41897

【０１１７】

				OT3		
935, 936				アエロモナス・ヒドロフィラ subsp. (Aeromonas hydrophila subsp.)hydrophila ATCC 7966		ADS78291
937, 938				シリシバクター (Silicibacter) sp. TM1040		ADF03944
939, 940				Rhodopseudomonas palustris CGA009		ADF03944
941, 942				Xanthobacter autotrophicus Py2		ADF03944
943, 944				Azoarcus sp. BH72		AEM18040
945, 946				Clostridium beijerinckii NCIMB 8052		AEM18031
947, 948				アルカニヴォラクス・ブルクメンシス(Alcanivorax borkumensis)SK2		AAY13560
949, 950						ABU21638
951, 952	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Pyrococcus horikoshii].	14590640	2.00E-52	Pyrococcus horikoshii	細菌ポリペプチド#23667	ADS41897
953, 954	アスパルテートアミノトランスフェラーゼ [Aquifex aeolicus].	15606968	0	Aquifex aeolicus	細菌ポリペプチド#23667	ADN17496
955, 956	保存された仮説的蛋白質 [Aspergillus terreus NIH2624]	115385557	1.00E-126	Aspergillus terreus NIH2624	アミノトランスフェラーゼ/ムターゼ/デアミナーゼ酵素 #14	ADS78245
957, 958	仮説的蛋白質 OG2516_15919 [Oceanicola granulosus HTCC2516] gi|89043511|gb|EAR49723.1| 仮説的蛋白質 OG2516_15919 [Oceanicola granulosus HTCC2516]	89070918	0	Oceanicola granulosus HTCC2516	アミノトランスフェラーゼ/ムターゼ/デアミナーゼ酵素 #14	ADS78325
959, 960	アミノトランスフェラーゼ；クラス III [Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966]	117619456	1.00E-158	Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966	アミノトランスフェラーゼ/ムターゼ/デアミナーゼ酵素 #14	ADS78291

表 3（続き）

Geneseq DNA アクセッション番号	E 値	予想 EC 番号	クェリーDNA 長	クェリー 蛋白質長	対象 DNA 長	対象 蛋白質長	%ID 蛋白質	配列番号
ADS78244	0	2.6.1.42	879	292	954	317		1, 2
ADJ41018	2.4	2.6.1.21	855	284	0	286	66	3, 4

ADI39160	0.61	2.6.1.21	855	284	0	285	51	5, 6
ABZ69309	0.16	2.6.1.21	870	289	0	285	58	7, 8
ACA26397	0.28	2.6.1.21	435	144	0	286	60	9, 10
ABL17260	2.5	2.6.1.21	879	292	0	285	56	11, 12
AAH32576	0.039	2.6.1.21	855	284	0	282	63	13, 14
ADE99771	0.038	2.6.1.21	837	278	0	294	45	15, 16
	0	2.6.1.42	918	305	0	306	34	17, 18
ABL03988	2.4	2.6.1.21	861	286	0	282	61	19, 20
ACF71263	2.4	2.6.1.21	861	286	0	282	63	21, 22
ADA66322	0.16	2.6.1.21	861	286	0	282	61	23, 24
ABN23130	0.6	2.6.1.21	840	279	0	283	55	25, 26
ADL15020	0.57	2.6.1.42	801	266	0	274	37	27, 28
AAK71577	0.6	2.6.1.21	849	282	843	280	51	29, 30
ABA15896	0.003	2.6.1.9	1062	353	0	371	32	31, 32
ABQ69245	4.00E-08	2.6.1.21	852	283	0	283	66	33, 34
ABD13518	0.21	2.9.1.1	1143	380	0	388	35	35, 36
ABN18447	0.017	5.4.3.8	1389	462	0	455	43	37, 38
ADO84697	0.05	2.6.1.45	1080	359	0	397	48	39, 40
AAN81507	1.00E-20	2.6.1.21	852	283	0	282	76	41, 42
ABL08182	0.99	5.4.3.8	1350	449	0	455	48	43, 44
ACA25362	6.00E-08	2.6.1.45	1170	389	0	397	51	45, 46
ACA62990	0.066	5.4.3.8	1401	466	0	455	42	47, 48
ADS63519	7.00E-08	5.4.3.8	1353	450	0	454	49	49, 50
ADH48029	1.00E-09	5.4.3.8	1344	447	0	454	47	51, 52
ACA53304	2.4	2.6.1.21	861	286	0	281	49	53, 54
ABD17818	4.00E-34	2.6.1.1	399	132	0	396	94	55, 56
ABD17818	6.00E-36	2.6.1.1	399	132	0	396	93	57, 58
ABD17818	9.00E-29	2.6.1.1	399	132	0	396	93	59, 60
ABD17818	1.00E-34	2.6.1.1	399	132	0	396	94	61, 62
ABD17818	7.00E-48	2.6.1.1	399	132	0	396	93	63, 64
ABD17818	5.00E-52	2.6.1.1	399	132	615	410		65, 66
ABD17818	4.00E-46	2.6.1.1	399	132	615	410		67, 68
ABD17818	1.00E-43	2.6.1.1	399	132	615	410		69, 70
ABD17818	5.00E-52	2.6.1.1	399	132	0	396	96	71, 72
ABD17818	5.00E-52	2.6.1.1	399	132	0	396	96	73, 74
ABD03911	2.5	2.6.1.21	873	290	0	285	57	75, 76
ABD03911	2.5	2.6.1.21	873	290	0	285	57	77, 78
ABD17818	7.00E-42	2.6.1.1	396	131	0	396	93	79, 80
ABD17818	1.00E-40	2.6.1.1	396	131	0	396	94	81, 82
ADS58845	0.017	5.4.3.8	1398	465	0	455	41	83, 84

【０１１９】

AAI99682	0.62	2.6.1.21	873	290	0	286	46	85, 86
ACL13803	9.8	2.6.1.21	879	292	0	282	40	87, 88
ABD17818	4.00E-34	2.6.1.1	399	132	0	396	93	89, 90
ABD17818	3.00E-53	2.6.1.1	399	132	0	396	93	91, 92
ABD17818	8.00E-54	2.6.1.1	399	132	0	396	93	93, 94
ABD17818	8.00E-54	2.6.1.1	399	132	0	396	93	95, 96
ABD17818	5.00E-55	2.6.1.1	399	132	0	396	93	97, 98
ABD17818	3.00E-44	2.6.1.1	393	130	0	396	96	99, 100
ABD17818	8.00E-54	2.6.1.1	396	131	0	396	97	101, 102
ABD17818	8.00E-60	2.6.1.1	399	132	0	396	95	103, 104
ABD17818	5.00E-55	2.6.1.1	399	132	0	396	94	105, 106
ABD17818	8.00E-54	2.6.1.1	399	132	0	396	93	107, 108
ABD17818	5.00E-49	2.6.1.1	399	132	0	396	93	109, 110
ABD17818	5.00E-52	2.6.1.1	399	132	0	396	94	111, 112
ABD17818	3.00E-50	2.6.1.1	399	132	0	396	93	113, 114
ABD17818	5.00E-52	2.6.1.1	393	130	0	396	96	115, 116
ABD17818	5.00E-55	2.6.1.1	399	132	0	396	93	117, 118
ABD17818	5.00E-55	2.6.1.1	399	132	0	396	93	119, 120
ABD17818	3.00E-56	2.6.1.1	399	132	0	396	93	121, 122
ABD17818	3.00E-38	2.6.1.1	399	132	0	396	93	123, 124
ADS45796	0.038	2.6.1.42	831	276	0	273	57	125, 126
ADH48029	1.00E-09	5.4.3.8	1362	453	0	455	55	127, 128
ABL03211	2.4	2.6.1.21	864	287	0	285	57	129, 130
ADP27941	0	2.6.1.21	855	284	1709	284		131, 132
ACL64145	0.16	2.6.1.21	876	291	0	285	45	133, 134
ABL03211	2.4	2.6.1.21	864	287	0	285	57	135, 136
AEC75821	0.001	5.4.3.8	1386	461	0	455	46	137, 138
ADS57580	0.065	5.4.3.8	1383	460	0	455	43	139, 140
ABZ41029	0.15	2.6.1.21	855	284	0	286	51	141, 142
AAS82939	0.66	2.6.1.21	915	304	0	285	57	143, 144
ACL64704	0.99	5.4.3.8	1350	449	0	455	48	145, 146
AAQ63611	2.00E-05	5.4.3.8	1383	460	0	454	44	147, 148
ADS57112	0.004	5.4.3.8	1377	458	0	455	46	149, 150
ADE53957	2.4	2.6.1.21	852	283	0	283	40	151, 152
ACL64518	0.24	5.4.3.8	1269	422	0	455	46	153, 154
ADT43944	3.00E-04	5.4.3.8	1362	453	0	443	46	155, 156
ABQ42663	2.5	2.6.1.21	879	292	0	283	48	157, 158
ACA38856	0.58	2.6.1.42	822	273	0	277	36	159, 160
ADS56887	2.4	2.6.1.21	861	286	0	287	87	161, 162
ACL64750	0.065	5.4.3.8	1377	458	0	455	44	163, 164

【０１２０】

ADS63519	7.00E-11	5.4.3.8	1314	437	0	455	46	165, 166
ABL03988	2.4	2.6.1.21	861	286	0	282	60	167, 168
ACA37578	2.00E-53	4.1.3.38	882	293	0	293	85	169, 170
ABL03988	2.4	2.6.1.21	864	287	0	282	62	171, 172
AED18099	0.039	2.6.1.21	861	286	0	282	62	173, 174
AAF81809	0.61	2.6.1.21	861	286	0	282	62	175, 176
ADM27081	0.004	5.4.3.8	1374	457	0	454	47	177, 178
ADX27642	2.4	2.6.1.21	855	284	0	288	41	179, 180
ABL61996	0.62	2.6.1.42	876	291	861	286	39	181, 182
ADY80523	2.3	2.6.1.21	825	274	867	288	41	183, 184
ADY80523	2.3	2.6.1.21	825	274	867	288	41	185, 186
AAL04589	2.4	2.6.1.21	861	286	0	282	61	187, 188
ABL25490	0.62	2.6.1.21	864	287	0	282	62	189, 190
AAL04589	2.4	2.6.1.21	861	286	0	282	61	191, 192
AAL04589	2.4	2.6.1.21	861	286	0	282	61	193, 194
ADL41705	0.61	2.6.1.21	858	285	0	282	42	195, 196
AEM18017	0.003	2.6.1.21	858	285	0	282	40	197, 198
ABK78375	2.4	2.6.1.21	858	285	0	282	42	199, 200
ACF67498	0.15	2.6.1.21	855	284	0	281	40	201, 202
ACA40289	0.17	2.6.1.42	921	306	0	306	34	203, 204
ADY80523	2.3	2.6.1.21	825	274	867	288	41	205, 206
ABQ99281	0.15	2.6.1.21	825	274	867	288	40	207, 208
ADH48029	0.001	5.4.3.8	1374	457	0	454	44	209, 210
AAI92131	0.053	2.6.1.9	1137	378	0	367	29	211, 212
ADX37088	0.6	2.6.1.21	849	282	0	282	61	213, 214
ADS57580	0.004	5.4.3.8	1386	461	0	454	49	215, 216
ADY80523	2.3	2.6.1.21	825	274	867	288	41	217, 218
ABZ36033	0.16	2.6.1.21	861	286	0	282	62	219, 220
ACN44196	2.3	2.6.1.21	840	279	0	281	43	221, 222
AFB66287	0.62	2.6.1.21	867	288	867	288	60	223, 224
AED18099	0.039	2.6.1.21	861	286	0	282	61	225, 226
AED18099	0.61	2.6.1.21	861	286	0	282	62	227, 228
AED18099	0.62	2.6.1.21	873	290	0	282	60	229, 230
AED18099	0.62	2.6.1.21	864	287	0	282	61	231, 232
ABL22310	0.58	2.6.1.42	822	273	0	277	35	233, 234
ADT43796	0.65	2.6.1.42	906	301	1992	303		235, 236
AAI70509	2.3	2.6.1.21	837	278	0	294	44	237, 238
AEM18017	0.038	2.6.1.21	843	280	870	282		239, 240
ADY80523	2.3	2.6.1.21	825	274	867	288	41	241, 242
ADY80523	2.3	2.6.1.21	825	274	867	288	41	243, 244

【０１２１】

ADS56672	2.00E-28	2.6.1.57	909	302	0	398	90	245, 246
ABA93421	0.61	2.6.1.21	861	286	0	282	62	247, 248
ACL64761	0.15	2.6.1.42	837	278	0	280	34	249, 250
ADQ03059	8.00E-04	1.4.99.1	138	45	0	417	93	251, 252
ADA71348	0.92	1.4.99.1	1260	419	0	456	61	253, 254
ACA26961	0.004	1.4.99.1	1233	410	0	410	84	255, 256
ACL70702	0.058	1.4.99.1	1233	410	0	412	70	257, 258
ABN17150	4.00E-12	1.4.99.1	1254	417	0	421	66	259, 260
AEB45551	3.6	1...	1248	415	0	417	65	261, 262
AAV30459	1.00E-12	1.4.99.1	1254	417	1257	418	66	263, 264
ADS63414	7.00E-22	1.5.1.5	747	248	0	287	79	265, 266
AEH53102	0.001	1.4.99.1	1254	417	0	418	71	267, 268
ABD08815	3.00E-90	1.4.99.1	1299	432	0	432	78	269, 270
AAL40781	0.23	1.4.99.1	1239	412	0	414	59	271, 272
ADY72597	0.23	1.4.99.1	1257	418	1251	416	48	273, 274
ACL64753	0.92	1.4.99.1	1254	417	0	433	70	275, 276
ABL23528	0.92	1.4.99.1	1254	417	0	433	69	277, 278
ADS56371	3.6	1.4.99.1	1251	416	0	417	50	279, 280
AEC16041	0.058	1.4.99.1	1242	413	0	416	63	281, 282
ADQ03059	4.00E-12	1.4.99.1	1263	420	0	421	62	283, 284
ABQ98347	3.7	1.4.99.1	1263	420	0	416	40	285, 286
ABL11756	0.92	1.4.99.1	1257	418	0	416	52	287, 288
ACL64803	0.06	1.4.99.1	1284	427	0	417	52	289, 290
AEH54372	0.92	1.4.99.1	1263	420	0	416	56	291, 292
ADT06724	0.23	1.4.99.1	1245	414	0	414	91	293, 294
AAV06555	0.24	1.4.99.1	1296	431	0	427	42	295, 296
ADA32153	3.6	1.4.99.1	1242	413	0	419	74	297, 298
ADA32153	3.6	1.4.99.1	1242	413	0	419	74	299, 300
ABD16228	0.92	1...	1254	417	0	415	66	301, 302
AEH53102	0.059	1.4.99.1	1269	422	0	416	42	303, 304
AEH53102	0	1.4.99.1	1299	432	0	434	93	305, 306
ADR84929	0.24	1...	1320	439	0	415	51	307, 308
ADC87621	0.001	1.4.99.1	1242	413	0	427	44	309, 310
ABD01189	3.00E-13	1.4.99.1	1266	421	0	421	95	311, 312
ADS56475	3.6	1.4.99.1	1245	414	0	417	52	313, 314
AAI99682	0.058	1.4.99.1	1236	411	0	414	60	315, 316
ADZ00150	0.91	1.4.99.1	1245	414	0	416	43	317, 318
ACA26563	0.052	1.1.1.35	1110	369	0	648	47	319, 320
ACA26625	0.004	1.4.99.1	1248	415	0	416	68	321, 322
ADS56305	0.015	1.4.99.1	1245	414	0	414	97	323, 324

【０１２２】

ABD08815	########	1.4.99.1	1302	433	0	434	98	325, 326
ADT47109	0.059	1.4.99.1	1254	417	1251	416	49	327, 328
ACA32282	0.91	1.4.99.1	1251	416	0	416	43	329, 330
ABD01189	1.00E-09	1.4.99.1	1266	421	0	421	79	331, 332
ACA26563	0.052	1.1.1.35	1110	369	0	648	47	333, 334
ACA26625	0.004	1.4.99.1	1248	415	0	416	68	335, 336
AEI59268	0.91	1.4.99.1	1248	415	0	417	49	337, 338
ADC85461	0.91	1.4.99.1	1245	414	0	427	42	339, 340
ACA26625	0.91	1.4.99.1	1248	415	0	416	68	341, 342
ADS58499	0.008	1.1.1.184	693	230	0	228	48	343, 344
ABN17150	4.00E-09	1.4.99.1	1260	419	0	427	43	345, 346
ACL64399	0.23	1...	1245	414	0	417	63	347, 348
ACL64798	0.91	1.4.99.1	1251	416	0	417	51	349, 350
ADT17628	0.92	1.4.99.1	1260	419	0	456	61	351, 352
AED50859	0.059	1.4.99.1	1263	420	0	416	40	353, 354
ADS56451	8.00E-07	1.2.1.39	1020	339	0	524	55	355, 356
ABD32968	0.91	1.4.99.1	1251	416	0	427	40	357, 358
ABD00632	0.23	1.4.99.1	1251	416	0	415	68	359, 360
ABD00632	0.23	1.4.99.1	1251	416	0	415	68	361, 362
ABD00632	0.23	1.4.99.1	1251	416	0	415	68	363, 364
ABD01189	2.00E-11	1.4.99.1	1266	421	0	421	93	365, 366
ABD01189	3.00E-07	1.4.99.1	1317	438	0	443	80	367, 368
AEI27664	0.23	1.4.99.1	1245	414	0	427	44	369, 370
AAV30459	1.00E-15	1.4.99.1	1266	421	0	421	94	371, 372
ADS56859	0.23	1.4.99.1	1260	419	0	414	57	373, 374
ADX06332	3.6	1.4.99.1	1257	418	0	415	43	375, 376
AAK69489	0.23	1.4.99.1	1245	414	0	416	51	377, 378
AED48875	0.015	1.4.99.1	1257	418	0	427	43	379, 380
ABD00632	0.23	1.4.99.1	1251	416	0	415	68	381, 382
ADQ03059	7.00E-11	1.4.99.1	1260	419	1257	418	88	383, 384
ABA19863	0.91	1.4.99.1	1245	414	0	427	42	385, 386
AAZ19073	0.91	1.4.99.1	1251	416	1251	416	75	387, 388
ABD01189	2.00E-08	1.4.99.1	1317	438	0	443	80	389, 390
ADB80216	0.92	1.4.99.1	1257	418	0	416	55	391, 392
AEH53102	0.001	1.4.99.1	1257	418	0	416	51	393, 394
ADX30055	0.058	1.4.99.1	1242	413	0	414	88	395, 396
ADT43936	0.015	1.4.99.1	1245	414	0	417	52	397, 398
ADL62778	0.23	1.4.99.1	1242	413	0	427	44	399, 400
AAD06652	3.6	1.4.99.1	1260	419	0	427	33	401, 402
ABQ80343	3.6	1.4.99.1	1257	418	0	427	47	403, 404

【０１２３】

ADW91994	0.91	1.4.99.1	1239	412	0	417	42	405, 406
ABD01189	2.00E-11	1.4.99.1	1266	421	0	421	94	407, 408
ADQ18897	0.92	1.4.99.1	1260	419	0	427	45	409, 410
ADS55665	4.00E-09	1.2.1.4	1242	413	0	526	50	411, 412
ACA25332	0.23	1.4.99.1	1248	415	0	417	52	413, 414
ABL20166	0.015	1.4.99.1	1242	413	0	417	53	415, 416
ACD81455	3.00E-10	1.4.99.1	1248	415	1257	418	73	417, 418
ADQ03059	2.00E-05	1.4.99.1	1326	441	0	445	76	419, 420
ACA37735	0.24	1.4.99.1	1293	430	0	419	49	421, 422
ABL70446	0.91	1.4.99.1	1245	414	0	427	43	423, 424
ADJ44795	0.92	1.4.99.1	1260	419	0	416	53	425, 426
ADS57588	0.92	1.4.99.1	1254	417	0	433	72	427, 428
AAT42063	0.059	1.4.99.1	1263	420	0	427	44	429, 430
ADF77343	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	427	49	431, 432
AEF68383	0.23	1.4.99.1	1245	414	0	417	52	433, 434
ADB80390	0.92	1.4.99.1	1254	417	0	417	51	435, 436
ACL28407	1.2	1.2.99.2	453	150	0	150	84	437, 438
ADS63732	2.2		780	259	0	260	64	439, 440
AEB49411	0.22		1182	393	0	393	76	441, 442
ACA26463	0.06	1...	1272	423	0	417	61	443, 444
AEK18770	0.015	1.4.99.1	1245	414	0	415	69	445, 446
ABD08815	4.00E-37	1.4.99.1	1308	435	0	434	84	447, 448
ABD03414	0.015	1.4.99.1	1248	415	0	416	48	449, 450
ACA23380	0.23	1...	1245	414	0	416	62	451, 452
ABN24675	0.92	1...	1254	417	0	417	53	453, 454
ACA64961	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	427	45	455, 456
ABL10568	0.23	1.4.99.1	1251	416	0	416	68	457, 458
ABL12550	3.7	1.4.99.1	1266	421	0	410	78	459, 460
ACH99914	6.00E-04	1...	762	253	0	254	76	461, 462
ADQ64455	0.23	1.4.99.1	1248	415	0	415	69	463, 464
AAC90078	8.00E-05	1.1.1.95	447	148	0	334	34	465, 466
AEI59858	0.23	1.4.99.1	1242	413	0	414	55	467, 468
ADZ13449	0.91	1...	1245	414	0	415	66	469, 470
AAS77111	0	1.4.99.1	1299	432	0	434	100	471, 472
ACF04822	0.91	1...	1248	415	0	417	64	473, 474
ADN97550	0.25	1.4.99.1	1341	446	0	427	62	475, 476
ACN44608	0.001	1.4.99.1	1239	412	0	416	38	477, 478
ACN44608	0.001	1.4.99.1	1239	412	0	416	38	479, 480
ADF69167	0.059	1.4.99.1	1251	416	0	416	69	481, 482
ABD08815	0.001	1.4.99.1	1311	436	0	443	82	483, 484

【０１２４】

ABN17150	2.00E-11	1.4.99.1	1269	422	0	421	67	485, 486
ADI37347	3.7	1....	1263	420	0	417	53	487, 488
ADS57628	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	417	54	489, 490
ACA26589	0.015	1.4.99.1	1290	429	0	427	41	491, 492
ADO81756	0.063	1.4.99.1	1344	447	0	427	41	493, 494
ADO81304	0.92	1.4.99.1	1264	417	0	417	49	495, 496
ABL27820	3.7	1....	1263	420	0	417	53	497, 498
AAL04340	0.91	1.4.99.1	1245	414	0	417	49	499, 500
AAF71906	0.11	1.5.1.12	2334	777	0	1158	48	501, 502
ADS59567	0.015	1.4.99.1	1263	420	0	416	49	503, 504
ACF64502	0.93	1.4.99.1	1266	421	0	416	50	505, 506
ACL63896	0.059	1.4.99.1	1254	417	0	433	71	507, 508
ADP48960	3.6	1.4.99.1	1245	414	0	417	49	509, 510
ACH97397	0.015	1.4.99.1	1266	421	0	414	65	511, 512
ACA35076	2.00E-04	1.4.99.1	1269	422	0	443	77	513, 514
AEF51726	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	419	74	515, 516
ACA63029	0.058	1.4.99.1	1239	412	0	415	48	517, 518
AAX91990	0.015	1.4.99.1	1251	416	0	416	43	519, 520
ABK13581	0.015	1.4.99.1	1254	417	0	415	79	521, 522
ACN44966	0.23	1.4.99.1	1245	414	0	415	40	523, 524
AAA58472	0.91	1....	1242	413	0	416	61	525, 526
ADS59863	0.058	1....	1248	415	0	415	78	527, 528
ADZ14743	0.058	1.4.99.1	1245	414	0	433	53	529, 530
ABD17880	0.001	1.4.99.1	1257	418	0	429	59	531, 532
ACA35414	0.93	1.4.99.1	1269	422	0	416	40	533, 534
ADS55665	1.00E-12	1.2.1.	1581	526	0	525	52	535, 536
ABN88913	3.6	1.4.99.1	1260	419	0	414	57	537, 538
ABD17784	0.058	1.4.99.1	1242	413	0	413	96	539, 540
ABQ90794	0.059	1.4.99.1	1266	421	1251	416	57	541, 542
ADF77343	3.6	1.4.99.1	1248	415	0	427	45	543, 544
AAC41739	0.24	1.4.99.1	1296	431	0	417	50	545, 546
ADS50144	0.93	1.4.99.1	1266	421	0	416	39	547, 548
AAL13181	2.00E-04	1.4.99.1	1254	417	0	429	59	549, 550
ACF64460	0.003	1.5.1.12	3306	1101	0	1158	49	551, 552
ADO81304	0.92	1.4.99.1	1254	417	0	417	49	553, 554
ADZ14743	0.058	1.4.99.1	1242	413	0	433	53	555, 556
ACN44650	0.23	1....	1260	419	0	417	55	557, 558
ACN44650	0.23	1....	1260	419	0	417	55	559, 560
ACL64800	2.00E-05	1.6.99.3	1230	409	1293	430	62	561, 562
AAA55186	5.00E-04	1.1.1.100	720	239	0	270	56	563, 564

【０１２５】

ADO81304	0.92	1.4.99.1	1254	417	0	417	49	565, 566
ACH97385	0.016	1.4.99.1	1344	447	0	444	69	567, 568
ABX92073	0.92	1.4.99.1	1260	419	0	427	42	569, 570
ABD01189	3.00E-13	1.4.99.1	1248	415	1257	418	76	571, 572
ACA26568	0.059	1.4.99.1	1263	420	0	417	39	573, 574
ADS56451	2.00E-08	1.2.1.	1584	527	0	530	53	575, 576
ACL64632	0.91	1....	1242	413	0	415	67	577, 578
AAV30459	7.00E-51	1.4.99.1	1254	417	0	422	83	579, 580
AEG64174	0.92	1.4.99.1	1260	419	0	414	57	581, 582
ABD13052	3.6	1.4.99.1	1233	410	0	410	83	583, 584
ABD01189	3.00E-04	1.4.99.1	1338	445	0	455	81	585, 586
ABL10910	0.24	1.4.99.1	1290	429	0	414	57	587, 588
ACL64760	0.92	1.4.99.1	1254	417	0	415	78	589, 590
ADX35599	0.015	1....	1245	414	0	417	59	591, 592
ACA26173	0.015	1.4.99.1	1272	423	0	417	50	593, 594
ADS55748	0.015	1.4.99.1	1257	418	0	433	73	595, 596
AEH53102	3.00E-19	1.4.99.1	1317	438	0	435	71	597, 598
AAV30459	1.00E-61	1.4.99.1	1251	416	0	422	84	599, 600
AAV30459	2.00E-60	1.4.99.1	1254	417	0	422	81	601, 602
ABX86147	0.23	1.4.99.1	1254	417	0	416	42	603, 604
ADS56578	0.92	1....	1254	417	0	417	67	605, 606
ADZ49334	0.91	1.4.99.1	1251	416	0	429	51	607, 608
ADT18820	0.004	1....	1233	410	0	416	61	609, 610
AAV30459	7.00E-51	1.4.99.1	1254	417	0	422	83	611, 612
ABQ66079	0.24	1.4.99.1	1287	428	0	423	43	613, 614
ACL64301	0.91	1....	1248	415	0	415	79	615, 616
ADX64511	0.015	1.4.99.1	1245	414	0	417	49	617, 618
ADS55665	1.00E-12	1.2.1.39	1593	530	0	526	51	619, 620
ABQ81842	0.059	1.4.99.1	1266	421	0	416	42	621, 622
ABD08815	3.00E-07	1.4.99.1	1260	419	0	436	55	623, 624
ADQ03059	4.00E-09	1.4.99.1	1254	417	0	416	79	625, 626
ADQ03059	0.059	1.4.99.1	1257	418	0	429	60	627, 628
ADQ74672	0.17	1....	921	306	74787	305		629, 630
ACL30152	0.015	1.4.99.1	1233	410	0	465	86	631, 632
ABD08815	8.00E-23	1.4.99.1	1293	430	0	432	74	633, 634
ABD08815	2.00E-32	1.4.99.1	1296	431	0	432	76	635, 636
ABD05088	2.00E-66	1.1.99.	1128	375	0	375	87	637, 638
ACA27410	0.18	1.1.1.	1002	333	0	345	44	639, 640
ABD05088	2.00E-66	1.1.99.	1128	375	0	375	87	641, 642
ABN17150	0.059	1.4.99.1	1266	421	0	422	42	643, 644

【０１２６】

AEM45684	0.23	1...	1245	414	0	414	62	645, 646
ABD08815	4.00E-06	1.4.99.1	1296	431	0	428	65	647, 648
ABD05284	0.058	1.4.99.1	1245	414	0	414	61	649, 650
ACA27392	0.058	1.4.99.1	1236	411	0	410	53	651, 652
ACA36215	1.00E-15	1.8.1.7	1344	447	0	456	55	653, 654
ACF04822	0.94	1.4.99.1	1284	427	0	417	48	655, 656
AAD55815	2.9	1.4.3.3	1008	335	0	314	45	657, 658
AAL13181	0.001	1.4.99.1	1245	414	0	418	62	659, 660
ADJ40271	0.056		1188	395	0	404	50	661, 662
ADX45957	0.058	1.4.99.1	1245	414	0	417	52	663, 664
ABT17713	0.92	1.4.99.1	1263	420	0	423	41	665, 666
AAS83512	0.81	1.4.3.1	1113	370	0	377	45	667, 668
AAV21187	0.92	1.4.99.1	1260	419	0	417	52	669, 670
ABQ19293	3.6	1.4.99.1	1242	413	0	413	82	671, 672
ABQ19293	3.6	1.4.99.1	1242	413	0	413	82	673, 674
ABQ19293	3.6	1.4.99.1	1242	413	0	413	82	675, 676
ACA45556	0.65	1.4.3.3	909	302	0	310	42	677, 678
ABD04986	4.00E-09	1.1.99.	1161	386	0	385	83	679, 680
ADC76718	0.93	1.4.99.1	1266	421	0	423	43	681, 682
AAF71130	0.059	1.4.99.1	1251	416	0	421	42	683, 684
ABT07579	0.06	1.4.99.1	1281	426	0	421	40	685, 686
ADS56436	0.044	1.4.3.3	957	318	0	314	44	687, 688
ADX50476	0.23	1.4.99.1	1248	415	0	548	64	689, 690
AAA81470	0.058	1.4.99.1	1239	412	0	422	66	691, 692
ACA34135	3.9	1.6.99.3	396	131	0	132	73	693, 694
ABD05088	1.00E-12	1.1.99.	1164	387	0	388	63	695, 696
ADT43170	0.001	1.4.99.1	1257	418	0	422	47	697, 698
ACA26065	0.015	1.4.99.1	1245	414	0	417	52	699, 700
ABL13112	0.18	1.4.3.3	981	326	0	314	39	701, 702
ADM27081	0.23	1.4.99.1	1248	415	0	417	50	703, 704
ABD08105	0.23	1.4.99.1	1233	410	0	410	56	705, 706
ADY66589	0.06	1.4.99.1	1275	424	0	417	52	707, 708
ADT43021	0.23	1.4.99.1	1233	410	0	410	75	709, 710
ADA48957	0.23	1.4.99.1	1266	421	0	421	43	711, 712
ADT43021	0.23	1.4.99.1	1233	410	0	410	75	713, 714
AET00128	0.91	1.4.99.1	1251	416	0	420	43	715, 716
	0		912	303	0	358	29	717, 718
ABD10326	3.6	1.4.99.1	1251	416	0	417	57	719, 720
ADT44787	0.042	1.4.3.3	918	305	0	310	42	721, 722
AAL13181	0.001	1.4.99.1	1251	416	0	423	41	723, 724

【０１２７】

ABN17150	1.00E-12	1.4.99.1	1260	419	0	418	56	725, 726
ABL15242	3.9	1.4.99.1	1329	442	0	423	56	727, 728
ABD01828	0.051	1.2.7.3	1098	365	0	576	65	729, 730
AAL13181	1.00E-06	1.4.99.1	1260	419	0	420	41	731, 732
ADS63429	0.23	1.4.99.1	1257	418	0	420	44	733, 734
ACL64584	2.00E-06	1.1.2.4	807	268	0	477	48	735, 736
ABD10634	0.058	1.4.99.1	1242	413	0	414	62	737, 738
AAD07816	0.91	1...	1245	414	0	414	63	739, 740
AAD07816	0.91	1...	1245	414	0	414	63	741, 742
ABD10634	0.058	1.4.99.1	1242	413	0	414	62	743, 744
AER28868	0.83	1.1.99.	1146	381	0	385	49	745, 746
ABD08815	0.015	1.4.99.1	1278	425	0	462	53	747, 748
AAL13181	2.00E-07	1.4.99.1	1245	414	0	418	60	749, 750
ACA23297	0.65	1.14.13.	915	304	0	543	49	751, 752
ADD01267	0.23	1.4.99.1	1248	415	0	417	52	753, 754
	0	1.4.99.1	1245	414	0	417	51	755, 756
ADJ09909	3.6	1.4.99.1	1251	416	0	410	55	757, 758
AEH18256	0.23	1.4.99.1	1254	417	0	417	49	759, 760
ADR47152	0.23	1.4.99.1	1242	413	0	414	62	761, 762
AAL13181	0.001	1.4.99.1	1251	416	0	421	41	763, 764
ADS59768	9.00E-07	1.1.2.4	1182	393	0	477	51	765, 766
AAL13181	0.015	1.4.99.1	1257	418	0	421	41	767, 768
ACA37735	0.015	1.4.99.1	1242	413	0	414	62	769, 770
ABD14131	0.91	1.4.99.1	1245	414	0	417	53	771, 772
ADR47152	0.23	1.4.99.1	1242	413	0	414	62	773, 774
ABT17832	3.7	1.4.99.1	1272	423	0	423	38	775, 776
ACA26366	0.9	1.4.99.1	1233	410	0	410	92	777, 778
ACL30152	0.23	1.4.99.1	1233	410	0	465	86	779, 780
AEA26962	0.06	1.4.99.1	1272	423	0	422	52	781, 782
ADT42301	9.00E-10	1.1.2.4	1137	378	0	477	51	783, 784
ABD08815	0.001	1.4.99.1	1251	416	0	421	41	785, 786
AAL13181	0.001	1.4.99.1	1251	416	0	420	42	787, 788
ACA39870	0.23	1.4.99.1	1248	415	0	410	46	789, 790
ADQ24247	3	1.3.1.26	1044	347	0	333	50	791, 792
ADT18820	0.004	1...	1233	410	1254	417	63	793, 794
AEM45684	0.007	1.2.7.8	2313	770	0	1173	61	795, 796
ADT47055	1.00E-06	1.1.2.4	1437	478	0	477	53	797, 798
ACH13524	0.015	1.4.99.1	1281	426	0	421	42	799, 800
ADS63429	0.23	1.4.99.1	1257	418	0	420	44	801, 802
ADJ41976	0.92	1.4.99.1	1257	418	0	421	42	803, 804

【０１２８】

ABZ40619	4.00E-09	1.1.2.4	1323	440	0	477	53	805, 806
AAF66669	0.25	1.4.99.1	1329	442	0	423	55	807, 808
ABQ81849	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	413	81	809, 810
ABQ81849	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	413	81	811, 812
ABQ81849	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	413	81	813, 814
ABQ81849	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	413	81	815, 816
AEH53102	0.004	1.4.99.1	1269	422	0	421	43	817, 818
ABN17150	0.015	1.4.99.1	1263	420	0	420	54	819, 820
ABD10634	0.058	1.4.99.1	1242	413	0	414	62	821, 822
AAV72125	2.00E-04	1.5.3.1	1170	389	1167	388	77	823, 824
ABD04986	1.00E-12	1.1.99.	1146	381	0	385	90	825, 826
AEA26962	0.06	1.4.99.1	1272	423	0	422	52	827, 828
ABD08815	6.00E-05	1.4.99.1	1281	426	0	421	40	829, 830
ABD04986	2.00E-11	1.1.99.	1137	378	1152	383	49	831, 832
ADS63429	0.23	1.4.99.1	1257	418	0	420	44	833, 834
ADS56646	8.00E-14	1.1.2.4	1395	464	0	477	52	835, 836
AEK59509	0.68	1.4.3.1	942	313	0	314	39	837, 838
ABQ81849	0.91	1.4.99.1	1242	413	0	413	81	839, 840
ABN17150	2.00E-05	1.4.99.1	1269	422	0	418	52	841, 842
ABD08815	1.00E-43	1.4.99.1	1290	429	0	428	72	843, 844
AAD56788	0.23	1.4.99.1	1233	410	0	410	93	845, 846
ABD05088	2.00E-51	1.1.99.	1131	376	0	375	77	847, 848
AEH53102	0.004	1.4.99.1	1269	422	0	421	43	849, 850
AAI99682	0.18	1.4.3.3	975	324	4.00E+06	326		851, 852
ABD05088	2.00E-51	1.1.99.	1131	376	0	375	77	853, 854
ABD04986	1.00E-05	1.1.99.	1173	390	0	390	99	855, 856
ABD04986	1.00E-05	1.1.99.	1173	390	0	390	99	857, 858
ABD04986	1.00E-05	1.1.99.	1173	390	0	390	99	859, 860
AED11687	5.00E-08	1.4.3.3	987	328	0	326	46	861, 862
ABD08815	0	1.4.99.1	1299	432	0	433	88	863, 864
	2.7	2.6.1.21	861	286	690	282	37	865, 866
	0.003	2.6.1.9	1062	353	12392	373	30	867, 868
	2.00E-25	2.6.1.21	852	283	1140	283	78	869, 870
	1.1	5.4.3.8	1350	449	3784	417	46	871, 872
	0.071	5.4.3.8	1401	466	1358	417	44	873, 874
	1.00E-09	5.4.3.8	1344	447	37500	417	48	875, 876
	0.018	5.4.3.8	1389	462	231	417	43	877, 878
	0.018	5.4.3.8	1398	465	1356	417	43	879, 880
	2.7	2.6.1.21	873	290	1653	282	39	881, 882
		2.6.1.21		292		283	42	883, 884

【０１２９】

	2.7	2.6.1.21	861	286	19976	283	40	885, 886
	0.63	2.6.1.42	801	266	799	284	37	887, 888
	0.66	2.6.1.21	840	279	264	282	41	889, 890
	0.67	2.6.1.21	861	286	599	283	39	891, 892
	0.17	2.6.1.21	861	286	44577	283	37	893, 894
	0.66	2.6.1.21	849	282	16714	289	39	895, 896
	7.00E-08	5.4.3.8	1353	450	1287	417	47	897, 898
	1.00E-09	5.4.3.8	1362	453	37500	417	47	899, 900
	0.001	5.4.3.8	1386	461	1341	417	49	901, 902
	0.07	5.4.3.8	1383	460	870	417	47	903, 904
	2.7	2.6.1.21	864	287	5766	298	46	905, 906
	0.042	2.6.1.42	831	276	591	284	36	907, 908
	0	2.6.1.21	855	284	1709	284	97	909, 910
	0.17	2.6.1.21	876	291	4862	278	36	911, 912
	2.6	2.6.1.21	852	283	7166	282	43	913, 914
	2.00E-05	5.4.3.8	1383	460	1701	417	41	915, 916
	0.72	2.6.1.21	915	304	652	282	39	917, 918
	1.1	5.4.3.8	1350	449	18471	417	46	919, 920
	0.07	5.4.3.8	1377	458	20250	417	48	921, 922
	2.7	2.6.1.21	861	286	864	298	50	923, 924
	0.004	5.4.3.8	1377	458	1251	417	44	925, 926
	0	2.6.1.1	1185	394	1185	394	100	927, 928
		2.6.1.42		322		317	100	929, 930
		2.6.1.62		519		461	100	931, 932
	3.8	2.6.1.1	1206	401	9502	387	33	933, 934
	0	2.6.1.62	1383	460	1383	460	100	935, 936
	2.6	2.6.1.21	855	284	2000	298	48	937, 938
	0.67	2.6.1.21	855	284	86941	298	39	939, 940
	2.7	2.6.1.21	879	292	2840	298	41	941, 942
	0.17	2.6.1.21	870	289	1899	283	40	943, 944
	0.011	2.6.1.21	855	284	636	283	39	945, 946
	0.042	2.6.1.21	837	278	897	282	40	947, 948
		2.6.1.42		305		310	33	949, 950
	AAS46730	2.6.1.1	1206	401	9502	387		951, 952
	ADS45406	2.6.1.1	1185	394	0	394	100	953, 954
	ADS78244	2.6.1.42	879	292	954	317		955, 956
	ADS78324	2.6.1.62	1386	461	0	460	72	957, 958
	ADS78290	2.6.1.62	1383	460	1383	460		959, 960

【０１３０】

本発明は本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種を提供する。それらの変種は（それぞれ）1つ以上の塩基対、コドン、イントロン、エクソンまたはアミノ酸残基で改変された配列を含むが、それでもなお本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの生物学的活性を保持する。変種は任意の多数の手段によって生成することができ、これら手段には、例えば、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ（例えばGeneReassembly、例えば米国特許6,537,776号を参照されたい）、GSSMおよび前記の任意の組合せのような方法が含まれる。

“飽和変異導入”、“遺伝子部位飽和変異導入”または“GSSM”という用語は、下記で詳細に記載するように、縮退オリゴヌクレオチドプライマーを用いて点変異をポリヌクレオチドに導入する方法を含む。

“最適化定方向進化システム”または“最適化定方向進化”という用語は、関連する核酸配列、例えば関連する遺伝子のフラグメントを再アッセンブリングする方法を含み、下記で詳細に説明される。

“合成連結再アッセンブリ”または“SLR”という用語は、非確率的態様でオリゴヌクレオチドフラグメントを連結する方法を含み、下記で詳細に説明される。

【０１３１】

核酸の作製と操作

本発明は、核酸、例えばトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸（本発明のポリペプチドをコードする発現カセット、例えば発現ベクターを含む）を提供する（前記ポリペプチドは、本発明の例示的核酸配列（上記で規定）の少なくとも1つの配列改変を有する酵素を含み、前記配列改変は1つ以上のヌクレオチド残基変化（または前記と等価のもの）を含む。

本発明はまた、本発明の核酸を用いて新規なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ配列を発見する方法を含む。本発明はまた、本発明の核酸を用いて、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、転写物およびポリペプチドの発現を阻害する方法を含む。さらにまた提供されるものは、例えば合成連結再アッセンブリ、最適化定方向進化システムおよび／または飽和変異導入による本発明の核酸の改変方法である。

本発明の核酸は、例えばcDNAライブラリーのクローニングおよび発現、PCRによるメッセージまたはゲノムDNAの増幅によって作製、単離および／または操作することができる。

ある特徴では、本発明はまた、トランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード核酸であって、それらが環境供給源、細菌供給源または古細菌供給源に由来するという共通の新規性を有する前記核酸を提供する。

本発明の方法を実施するとき、本明細書に記載するように、鋳型核酸を操作することによって相同性遺伝子を改変することができる。本発明は、当分野で公知の任意の方法またはプロトコルまたは装置（これらは学術文献および特許文献に詳しく記載されている）を併用して実施することができる。

【０１３２】

本発明のある特徴は、本発明の配列およびそれと実質的に同一の配列、それらと相補的な配列、または本発明の配列（またはそれと相補的な配列）の1つの配列の連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400または500塩基を含むフラグメントを含む単離、合成または組み換え核酸である。前記単離核酸はDNA（cDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAを含む）を含むことができる。前記DNAは二本鎖でも一本鎖でもよく、一本鎖の場合はコード鎖でも非コード鎖（アンチセンス）でもよい。あるいは、本発明の単離、合成、組み換え核酸はRNAを含むことができる。

したがって、本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドの1つまたは本発明のポリペプチドの１つの連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメントをコードする単離、合成または組み換え核酸である。これらの核酸のコード配列は、本発明の核酸の1つまたは前記のフラグメントのコード配列の1つと同一であってもよいが、また遺伝暗号の反復性または縮退性の結果として、本発明のポリペプチドの1つ、前記と実質的に同一の配列、および本発明のポリペプチドの１つの連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を有するフラグメントをコードするものとは異なるコード配列であってもよい。前記遺伝暗号は当業者には周知であり、例えばGenes VI（B. Lewin, Oxford University Press, 1997）の214ページで入手できる。

本発明のポリペプチドの1つおよび前記と実質的に同一の配列をコードする単離、合成または組み換え核酸は、本発明の核酸のコード配列および前記と実質的に同一の配列のみ、および追加のコード配列（例えばリーダー配列または前タンパク質配列）、および非コード配列（例えばイントロンまたはコード配列の非コード5’および／または3’配列）を含むことができるが、ただしこれらに限定されない。したがって、本明細書で用いられる“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”には、前記ポリペプチドのためのコード配列のみと同様に追加のコードおよび／または非コード配列を含むポリヌクレオチドが包含される。

あるいは、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列は、通常の技術、例えば部位特異的変異導入または当業者に周知の他の技術を用い変異を導入して、本発明のポリヌクレオチドおよび前記と実質的に同一の配列にサイレント変化を導入することができる。本明細書で用いられる“サイレント変化”には、例えばポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸に変更がない変化が含まれる。そのような変化は、当該ポリペプチドをコードするベクターを含む宿主細胞によって生成されるポリペプチドのレベルを、当該宿主細胞で優先的に生じるコドンまたはコドン対を導入することによって増加させるために所望されよう。

本発明はまた、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列でアミノ酸置換、付加、欠失、融合および切端をもたらすヌクレオチド変化を有するポリヌクレオチドに関する。そのようなヌクレオチド変化は、例えば部位特異的変異導入、ランダムな化学変異導入、エキソヌクレアーゼIII欠失および他の組み換えDNA技術のような技術を用いて導入することができる。あるいは、そのようなヌクレオチド変化は天然に出現する対立遺伝子座変種であってもよい。前記変種は、本発明の配列の1つおよび前記と実質的に同一の配列（または前記と相補的な配列）の連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400または500塩基を含むプローブと、本明細書で提供する高、中等度または低ストリンジェンシー条件下で特異的にハイブリダイズする核酸を同定することによって単離される。

【０１３３】

一般的技術：

本発明の実施に用いられる核酸は、RNA、iRNA、アンチセンス核酸、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルス又は前記のハイブリッドのいずれであってもよく、種々の供給源から単離、遺伝的に操作、増幅、及び／又は組換えにより発現／作製することができる。これらの核酸から作製された組換えポリペプチド（例えば本発明のトランスアミナーゼおよびオキシドレダクターゼ）は個々に単離またはクローニングし、所望の活性について試験す

ることができる。任意の組換え発現系（細菌、哺乳動物、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含む）を用いることができる。

あるいは、これら核酸は周知の化学的合成技術によってin vitroで合成することができる。前記技術は例えば以下に記載されている：Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (9179) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; US Patent No. 4,458,066。

核酸操作のための技術、例えばサブクローニング、プローブの標識（例えばクレノーポリメラーゼ、ニックトランスレーション、増幅を用いるランダムプライマー標識）、配列決定、ハイブリダイゼーションなどは学術文献および特許文献に詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい：Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acids Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)。

【０１３４】

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

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

本発明は融合タンパク質およびそれらをコードする核酸を提供する。本発明のポリペプチドは異種ペプチドまたはポリペプチド、例えば所望の特性（例えば安定性増強または精製の簡便化）を付与するN-末端識別ペプチドと融合させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドはまた、例えばより強い免疫原性をもつペプチドを製造するため、組換えにより合成されたペプチドをより容易に単離するため、抗体および抗体発現B細胞を同定および単離するためなどの目的のために、前記に結合させた1つ以上の追加のドメインを有する融合タンパク質として合成および発現させることができる。検出および精製を容易にするドメインには、例えば金属キレートペプチド（例えばポリヒスチジン鎖およびヒスチジン-トリプトファンモジュール（固定化金属上での精製を可能にする）、プロテインAドメイン（固定化免疫グロブリン上での精製を可能にする）、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製系（Immune Corp, Seatle WA）で利用されるドメインが含まれる。精製ドメインおよびモチーフ構成ペプチドまたはポリペプチド間の切断可能リンカー配列（例えばXa因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego CA））の挿入は精製を容易にする。例えば、発現ベクターは、6つのヒスチジン残基とそれに続くチオレドキシン及びエンテロキナーゼ切断部位に連結されたエピトープコード核酸配列を含むことができる（例えば以下を参照されたい：Williams (1995) Biochemistry 34:1787-1797; Dobeli (1998) Protein Expr. Purif. 12:404-414）。前記ヒスチジン残基は検出および精製を容易にし、一方、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質の残りの部分からエピトープを精製するための手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクターおよび融合タンパク質の利用に関する技術は学術文献および特許文献に詳しく記載されている（例えば以

下を参照されたい：Kroll (1993) DNA Cell. Biol., 12:441-53）。

【０１３５】

本明細書で用いられる“核酸”または“核酸配列”という語句はオリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または前記のいずれかのフラグメント、ゲノムもしくは合成起源のDNAまたはRNA（例えばmRNA、rRNA、tRNA、iRNA）（これらは一本鎖でも二本鎖でもよく、センスまたはアンチセンス鎖を表していてもよい）、ペプチド核酸（PNA）または任意のDNA様もしくはRNA様物質、天然もしくは合成起源のリボヌクレオプロテイン（iRNAを含む）（例えば二本鎖iRNA、例えばiRNP）を指す。前記用語は、天然のヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸（すなわちオリゴヌクレオチド）を包含する。前記用語はまた合成骨格をもつ核酸様構造物を包含する（例えば以下を参照されたい：Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156）。“オリゴヌクレオチド”は一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは２つの相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖のいずれかが含まれ、前記は化学的に合成することができる。そのような合成オリゴヌクレオチドは5’リン酸基をもたず、したがってキナーゼの存在下でATPを用いてリン酸基を付加されなければ別のオリゴヌクレオチドと連結されない。合成オリゴヌクレオチドは脱リン酸化されていないフラグメントと連結することができる。

具体的なポリペプチドまたはタンパク質の“コード配列”または前記を“コードするヌクレオチド配列”は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、ポリペプチドまたはタンパク質に転写および翻訳される核酸配列である。

ある特徴では、“遺伝子”という用語は、ポリペプチド鎖の生成に必要とされるDNAセグメントを意味し、コード領域に先行する領域および後続する領域（リーダーおよびトレイラー）を含み、適切な場合には個々のコードセグメント（エクソン）の間に介在する配列（イントロン）も同様に含む。ある特徴では、本明細書で用いられる“作動できるように連結される”とは、2つ以上の核酸（例えばDNA）セグメント間における機能的関係を指す。ある特徴では、前記用語は、転写される配列に対する転写調節配列の機能的関係を指す。例えば、プロモーターが適切な宿主細胞または他の発現系でコード配列（例えば本発明の核酸）の転写を刺激または調節する場合、前記プロモーターは前記コード配列と作動できるように連結されている。ある特徴では、プロモーター転写調節配列は、転写される配列と作動できるように連結され、前記転写される配列と物理的に連続している（すなわちそれらはcis-作動性である）。ある特徴では、転写調節配列、例えばエンハンサーを、それらが転写を強化しようとするコード配列と物理的に連続させるか、または前記と接近して配置させることができる。

【０１３６】

ある特徴では、“発現カセット”という用語は、構造遺伝子（すなわちタンパク質コード配列、例えば本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）の発現に対して、それらの配列と適合する宿主内で影響を与えることのできるヌクレオチド配列を指す。発現カセットは、ポリペプチドコード配列（およびある特徴では他の配列、例えば転写終了シグナル）と作動できるように連結された少なくとも1つのプロモーターを含む。発現の達成に必要なまたは有用なさらに別の因子（例えばエンハンサー）もまた用いることができる。したがって、発現カセットはまた、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、任意の形態の組換え“裸のDNA”ベクターなどを含む。ある特徴では、“ベクター”は、細胞に感染、トランスフェクト、一過性もしくは永久的に形質導入することができる核酸を含む。また別の特徴では、ベクターは、裸の核酸またはタンパク質もしくは脂質と複合体を形成した核酸でもよい。ある特徴では、ベクターはウイルスまたは細菌の核酸および／またはタンパク質および／または膜（例えば細胞膜、ウイルスの脂質エンベロープなど）を含む。ベクターには、DNAフラグメントが結合し複製できるようになったレプリコン（例えばRNAレプリコン、バクテリオファージ）が含まれるが、ただし前記に限定されない。したがって、ベクターには

、自律的自己複製性環状もしくは直線状DNAまたはRNA（例えばプラスミド、ウイルスなど、例えば米国特許出願第5,217,879号参照）が含まれ（ただしこれらに限定されない）、さらに発現および非発現プラスミドが含まれる。組換え微生物または細胞培養が“発現ベクター”を宿主として受け入れていると記述されている場合には、染色体外環状および直鎖状DNA並びに宿主染色体に取り込まれたDNAの両方が含まれる。ベクターが宿主細胞により維持されている場合は、前記ベクターは自律性構造物として有糸分裂時に細胞によって安定的に複製されていても、または宿主のゲノム内に取り込まれていてもよい。

【０１３７】

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

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

また別の実施態様では、“単離”という用語は、材料（例えば核酸、ポリペプチド、細胞）がその本来の環境（例えば、材料が天然に存在する場合はその天然の環境）から取り出されることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然に出現するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然の系に一緒に存在する物質のいくつかまたは全てから分離されている前記と同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されている。そのようなポリヌクレオチドはベクターの部分であってもよいし、および／またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であってもよく、それでもなおそのようなベクターまたは組成物は前記の天然の環境の一部分ではないという点で、それらのポリヌクレオチドは単離されたものである。また別の実施態様では、“精製された”という用語は完全な純度を要求せず、むしろ相対的な定義と考えられている。ライブラリーから得られる個々の核酸は慣習的に電気泳動的に均質である程度まで精製されている。これらのクローンから得られる配列は、ライブラリーからもまたは人間の全DNAからも直接入手することはできないであろう。本発明の精製核酸はその生物体のゲノムDNAの残余のものから少なくとも10^4-10^6倍精製されてある。しかしながら、“精製される”という用語はまた、ゲノムDNAの残余のものから、またはライブラリー若しくは他の環境中の他の配列から少なくとも１桁、典型的には２または３桁、より典型的には４または５桁精製された核酸を含む。

【０１３８】

また別の実施態様では、“組換え”という用語は、その天然の環境では近傍にない“骨格”核酸に核酸が近接することを意味する。また別の実施態様では、“濃縮される”ためには、その核酸は、核酸の骨格分子集団において核酸挿入物の数の5%を占めるであろう。本発明の骨格分子には、核酸、例えば発現ベクター、自己複製核酸、ウイルス、問題の核酸挿入物を維持または操作するために用いられる組み込み用核酸および他のベクターまたは核酸が含まれる。また別の実施態様では、濃縮核酸は、組換え骨格分子集団において

核酸挿入物の数の15％またはそれより多くを占める。また別の実施態様では、濃た核酸は、組換え骨格分子集団において核酸挿入物の数の50％またはそれより多くを占める。ある特徴では、濃縮核酸は、組換え骨格分子集団において核酸挿入物の数の90％またはそれより多くを占める。

“プラスミド”は先行する小文字“ｐ”によって示され、および／または大文字及び／又は数字が後に続く。本明細書の出発プラスミドは市販または無制限に公開されているか、または発表された方法にしたがって利用可能なプラスミドから構築することができる。さらにまた、本明細書に記載したプラスミドと等価のものが当分野で知られており、当業者には明白であろう。“プラスミド”は市販または無制限に公開されているか、または発表された方法にしたがって利用可能なプラスミドから構築することができる。された方法にしたがって利用可能なプラスミドから構築することができる。さらにまた、本明細書に記載したプラスミドと等価のものが当分野で知られており、当業者には明白であろう。

また別の実施態様では、DNAの“消化”は、DNA内の一定の配列にのみ作用する制限酵素によるDNAの触媒的切断を指す。本明細書で用いられる種々の制限酵素は市販されてあり、それらの反応条件、補助因子および他の要件は、当業者に公知のとおり用いられる。分析目的のためには、典型的には1μgのプラスミドまたはDNAフラグメントが約2ユニットの酵素とともに約20μLの緩衝溶液中で用いられる。プラスミドの構築のためにDNAフラグメントを単離する目的の場合には、典型的には5から50μgのDNAが20から250ユニットの酵素とともにより大きな体積で消化される。具体的な制限酵素の適切な緩衝液および基質量は製造業者によって特定される。37℃で約1時間のインキュベーション時間が一般的に用いられるが、供給業者の指示にしたがって変動し得る。消化後に、ゲル電気泳動を実施して所望のフラグメントを単離することができる。

【０１３９】

また別の実施態様では、“ハイブリダイゼーション”は、核酸鎖が相補的な鎖と塩基対形成によって結合する過程を指す。ハイブリダイゼーション反応は鋭敏で選択性があり、低い濃度でしか存在しないサンプルにおいてさえ特定の配列の挿入物を同定することができる。適切にストリンジェントな条件は、例えば前ハイブリダイゼーション溶液またはハイブリダイゼーション溶液中の塩もしくはホルムアミドの濃度によって、またはハイブリダイゼーション温度によって規定することができ、当分野では周知である。また別の実施態様では、ストリンジェンシーは、塩濃度の低下、ホルムアミド濃度の増加、またはハイブリダイゼーション温度の上昇によって高めることができる。また別の特徴では、本発明の核酸は、本明細書に示す種々の（例えば高度、中等度および低度の）ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするその能力によって定義される。

例えば、高ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションは約37℃から42℃で約50%のホルムアミドで生じ得よう。約30℃から35℃で約35%から25%のホルムアミドの緩和ストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーションは起り得よう。特にハイブリダイゼーションは、約50%のホルムアミド、5XのSSPE、0.3%SDSおよび200μg/mLのせん断変性サケ精子DNA中で約42℃の高ストリンジェンシー条件下で起こり得よう。ハイブリダイゼーションは上記のような（しかしながら35℃の低温で35%のホルムアミドの）緩和ストリンジェンシー条件下で起こり得る。個々のストリンジェンシーレベルに対応する温度範囲は、対象の核酸のプリン対ピリミジン比を算出し、それにしたがって温度を調整することによってさらに狭めることができる。上記の範囲および条件についての変動は当分野で周知である。

【０１４０】

転写および翻訳制御配列：

本発明は、RNA合成／発現を誘導または調節するために発現（例えば転写または翻訳）制御配列（例えばプロモーターまたはエンハンサー）に作動できるようにに連結された本発明の核酸（例えばDNA）配列を提供する。前記発現制御配列は発現ベクター内に存在できる。例示的な細菌プロモーターにはlacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPR、PLおよびtrpが含まれる。例示的な真核細胞プロモーターにはCMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期

および後期SV40、レトロウイルスのLTRおよびマウスのメタロチオネインIが含まれる。プロモータで転写を開始するRNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写するとき、プロモータ配列は前記コード配列に“作動できるように連結され”ている。

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

【０１４１】

組織特異的植物プロモーター：

本発明は、組織特異的態様で発現させることができる発現カセット、例えば本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを組織特異的態様で発現させることができる発現カセットを提供する。本発明はまた、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを組織特異的態様で発現する植物または種子を提供する。前記組織特異性は、種子特異的、茎特異的、葉特異的、根特異的、果実特異的などであり得る。

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

本発明は、ウイルス由来の組織特異的または構成的プロモーターを用いる。これらには、例えばトバモウイルスのサブゲノムプロモーター（Kumagai (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1679-1683）；イネのツングロ杆状ウイルス（RTBV）（感染したイネの師部細胞でのみ複製し、強力な師部特異的レポータ遺伝子発現を駆動するプロモーターを有する）；キャッサバ葉脈モザイクウイルス（CVMV）プロモーター（維管束エレメント、葉の葉肉細胞および根の先端でもっとも強い活性を有する）（Verdaguer（1996） Plant Mol. Biol. 31:1129-1139）が含まれ得る。

あるいは、植物プロモーターは、特定の組織、器官または細胞タイプでトランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-発現核酸の発現を指令するか（すなわち組織特異的プロモーター）、また別にはより厳密な環境もしくは生育制御プロモータ下、または誘導性プロモーターの制御下にあってもよい。転写に影響を与えることができる環境条件の例には、嫌気性条件、上昇温度、光の存在、化学物質／ホルモンの噴霧が含まれる。例えば、本発明は、トウモロコシの乾燥誘導プロモーター（Busk (1997) 上掲書）；ジャガイモの低温、乾燥および高塩誘導プロモーター（Kirch (1997) Plant Mol. Biol. 33:897-909）を取り込んでいる。

【０１４２】

組織特異的プロモーターは、その組織内の一定の時間枠内の生育段階内でのみ転写を促進することができる。例えば以下を参照されたい：Blazquez (1998) Plant Cell 10:791-800（アラビドプシスのLEAFY遺伝子のプロモーターの特性を明らかにする）。さらにまた例えば以下を参照されたい：Cardon (1997) Plant J 12:367-377（A.タリアナ（thaliana）の花の分裂組織同一性遺伝子AP1のプロモーター領域中の保存配列モチーフを認識する転写因子SPL3について記載している）；およびMandel (1995) Plant Molecular Biology, vol 29, pp995-1004（分裂組織プロモーターeIF4について記載している）。特定の組織のライフサイクルの全体を通して活性を有する組織特異的プロモーターを用いることができる。ある特徴では、本発明の核酸は、主としてワタの繊維細胞でのみ活性を示すプロモーターに作動できるように連結される。ある特徴では、本発明の核酸は、例えば上掲書（Rinehart （1996））に記載されたように、主としてワタの繊維細胞の伸張期間に活性を示すプロモーターに作動できるように連結される。核酸は、ワタの繊維細胞で優先的に発現されるようにFbl2A遺伝子プロモーターに作動できるように連結することができる（上掲書）。さらに以下を参照されたい：John (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5769-5773；John et al., US Patent No. 5,608,148, 5,602,321（ワタの繊維特異的プロモーターおよびトランスジェニックな綿植物を構築する方法が記載されている）。根特異的プロモーターもまた本発明の核酸の発現に用いられる。根特異的プロモーターの例には、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターが含まれる（DeLisle (1990) Int. Rev. Cytol. 123:39-60）。本発明の核酸の発現に用いることができる他のプロモーターには、例えば胚珠特異的、胚特異的、内胚葉特異的、珠皮特異的、種子外皮特異的プロモーター、またはこれらのいくつかの組合せ；葉特異的プロモーター（例えば以下を参照されたい：Busk (1997) Plant J. 11:1285-1295、前記にはトウモロコシの葉特異的プロモーターが記載されている）；アグロバクテリウム・リゾゲネス（Agrobacterium rhizogenes）のORF13プロモーター（根で高い活性を示す（上掲書（Hansen, 1997）を参照されたい））；トウモロコシの花粉特異的プロモーター（例えば以下を参照されたい：Guerrero (1990) Mol. Gen. Gnet. 224:161-168）；果実成熟時、葉の（前記より低頻度で花の）老化および離脱時に活性を示すトマトのプロモーター（例えば以下を参照されたい：Blume (1997) Plant J. 12:731-746）；ジャガイモのSK2遺伝子のめしべ特異的プロモーター（例えば以下を参照されたい：Ficker (1997) Plant Mol. Biol. 35:425-431）；エンドウマメのBlec4遺伝子（トランスジェニックアルファルファの栄養および生殖茎頂の表皮組織で活性を示し、活発に生長しているシュートまたは繊維の表皮層で外来遺伝子を発現させるために有用である）；珠皮特異的BEL1遺伝子（例えば以下を参照されたい：Reiser (1995) Cell 83:735-742, GenBank No. U39944）；および／または米国特許第5,589,583号（

Klee）（分裂組織および／または急速に分裂している細胞で高レベルの転写を付与することができる植物プロモーターについて記載）のプロモーターが含まれる。

【０１４３】

あるいは、植物ホルモン（例えばオーキシン）の暴露に際して誘導することができる植物プロモーターが本発明の核酸を発現させるために用いられる。例えば、本発明は以下を用いることができる：ダイズ（Glycine max L.）のオーキシン応答エレメントE1プロモーターフラグメント（AuxRE）（Liu (1997) Plant Physiol. 115:397-407）；オーキシン応答性アラビドプシスGST6プロモーター（サリチル酸および過酸化水素にも反応性である）（Chen (1996) Plant J. 10:955-966）；タバコのオーキシン誘導性parCプロモーター（Sakai (1996) 37:906-913）；植物ビオチン応答エレメント（Streit (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:933-937）；およびストレスホルモンアブシジン酸に応答するプロモーター（Sheen (1996) 274:1900-1902）。

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

【０１４４】

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

本発明の核酸はまた、化学的試薬に暴露されたときに誘導される植物プロモーターに作動できるように連結することができる。前記の試薬には、例えば除草剤、合成オーキシンまたは抗生物質が含まれる。これらはトランスジェニック植物に適用、例えば噴霧することができる。本発明のトランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-生成核酸の誘導性発現によって、栽培者は最適なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ発現および／または活性を有する植物を選別することができる。植物の部分の生育はしたがって制御可能である。このようにして、本発明は、植物および植物の部分の収穫を促進する手段を提供する。例えば、種々の実施態様では、トウモロコシのIn2-2プロモーター（ベンゼンスルホンアミド除草剤の毒性緩和剤によって活性化される）が用いられる（De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577）。種々の除草剤の毒性緩和剤の適用によって、根、排水組織、茎頂分裂組織での発現を含む別個の遺伝子発現パターンが誘導される。本発明のコード配列はまた、テトラサイクリン誘導性プロモーター（例えばアヴェーナ・サティヴァL.（エンバク）のアルギニンデカルボキシラーゼ

遺伝子（Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473）を含むタバコのトランスジェニック植物で開示されたとおり）、またはサリチル酸応答エレメント（Stange (1997) Plant J. 11: 1315-1324）の制御下にある。

いくつかの特徴では、適切なポリペプチド発現には、コード領域の3’末端のポリアデニル化領域が必要かもしれない。前記ポリアデニル化領域は、天然の遺伝子、種々の他の植物（または動物またその他）の遺伝子、またはアグロバクテリウムのT-DNAの遺伝子に由来するものでよい。

“植物”（たとえば本発明のトランスジェニック植物もしくは植物種子または本発明のベクターで用いられる植物プロモータの場合のように）という用語には植物体全体、植物の部分（例えば葉、茎、花、根など）、植物のプロトプラスト、種子および植物細胞並びに前記の子孫が含まれる。本発明（組成物および方法を含む）の実施に用いることができる植物クラスは、一般的には、形質転換技術を施しやすい高等植物クラスと同じように範囲が広く、裸子植物と同様に被子植物（単子葉および双子葉植物）が含まれる。この語には多様な倍数性レベルを有する植物（倍数体、二倍体、一倍体および半接合状態を含む）が含まれる。本明細書で用いられる“トランスジェニック植物”には、異種核酸配列、例えば本発明の核酸および種々の組換え構築物（例えば発現カセット、例えばベクター）が挿入された植物または植物細胞が含まれる。本発明のトランスジェニック植物は下記でもまた考察される。

【０１４５】

発現ベクターおよびクローニングビヒクル：

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

発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写終了因子を含むことができる。発現を増幅させるために、ベクターはまた適切な配列を含むことができる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、必要な任意のリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列並びに5’フランキング非翻訳配列を含むことができる。いくつかの特徴では、SV40スプライシングおよびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いて、必要な非転写遺伝子エレメントを提供することができる。

ある特徴では、発現ベクターは1つ以上の選別可能なマーカー遺伝子を含み、前記ベクターを含む宿主細胞の選別を可能にする。そのような選別可能マーカーには、真核細胞培養に対してはジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子またはネオマイシン耐性を付与する遺伝子、大腸菌にテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性を付与する遺伝子、及びS.セレビシアエ（S. cerevisiae）のTRP1遺伝子が含まれる。プロモーター領域は、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ（CAT）ベクターまたは選別可能なマーカーを有

する他のベクターを用いて、所望される任意の遺伝子から選抜できる。

【０１４６】

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

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

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

使用できる具体的な細菌ベクターには、以下の周知のクローニングベクターの遺伝的要素を含む市販のプラスミドが含まれる：pBR322（ATCC37017）、pKK223-3（Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden）、GEM1（Promega Biotec, Madison, WI, USA）、pQE70、pQE60、pQE-9（Qiagen）、pD10、psiX174、pBluescript IIKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（Stratagene）、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmacia）、pKK232-8およびpCM7。具体的な真核細胞ベクターには、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG（Stratagene）、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL（Pharmacia）が含まれる。しかしながら他のベクターのいずれも宿主細胞内で複製可能で生存可能である限り使用することができる。

【０１４７】

本発明の核酸は、発現カセット、ベクターまたはウイルスで発現させることができ、さらに一過性または安定的に植物細胞および種子で発現させることができる。ある例示的な一過性発現系はエピソーム発現系、例えばカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）のウイルスRNA（スーパーコイルDNAを含むエピソームミニ染色体の転写によって核内で生成される）を用いる（例えば以下を参照されたい：Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1633-1637）。あるいは、コード配列（すなわち本発明の完全な配列または部分配列）を植物宿主細胞ゲノムに挿入して宿主染色体DNAの一体化部分を形成することができる。センスまたはアンチセンス転写物を前記のようにして発現させることができる。本発明の核酸由来の配列（例えばプロモーターまたはコード配列）を含むベクターは植物細胞または種子に選別可能な表現型を付与するマーカー遺伝子を含むことができる。例えば、殺菌物質耐性、特に抗生物質耐性（例えばカナマイシン、G418、ブレオマイシン、ヒグロマイシンに対する耐性）、または除草剤耐性（例えばクロロスルフロンまたはバスタに対する耐性）をコードすることができる。

植物で核酸およびタンパク質を発現することができる発現ベクターは当分野において周知で、例えばアグロバクテリウム種、ジャガイモウイルスX（例えば以下を参照されたい：Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3648）、タバコモザイクウイルス（例えば以下を参照されたい：Casper (1996) Gene 173:69-73）、トマトのブッシースタントウイルス（例えば以下を参照されたい：Hillman (1989) Virology 169:42-50）、タバコのエッチウイルス（例えば以下を参照されたい：Dolja (1997) Microbiol. Immunol. 37:471-476）、ビーンゴールデンモザイクウイルス（例えば、Morinaga(1993) Microbiol Immuol. 37:471-

476を参照されたし）、カリフラワーモザイクウイルス（例えば以下を参照されたい：Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:1094-1101）、トウモロコシAc/Ds転移因子（例えば以下を参照されたい：Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194）、およびトウモロコシサプレッサー‐ミューテータ（Spm）転移因子（例えば以下を参照されたい：Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725）、並びにこれらの誘導体由来のベクターが含まれよう。

【０１４８】

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

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

発現ベクター内のDNA配列は、RNA合成の指令のために適切な発現制御配列（プロモーター）に作動できるように連結される。具体的な細菌プロモーターを例示すればlacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPR、PLおよびtrpが含まれる。真核細胞プロモーターにはCMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR並びにマウスのメタルチオネイン-Iが含まれる。適切なベクターおよびプロモーターの選別は当業者の技術レベル内である。発現ベクターはまた転写開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネータを含む。ベクターはまた発現増幅のために適切な配列を含むことができる。プロモーター領域は、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ（CAT）ベクターまたは選別可能マーカーをもつ他のベクターを用いて任意の所望遺伝子から選択することができる。さらにまた、ある特徴では発現ベクターは1つ以上の選別可能マーカー遺伝子を含み、形質転換細胞の選別のために表現型の特質（真核細胞培養については例えばジヒドロホレートレダクターゼ若しくはネオマイシン耐性、または大腸菌については例えばテトラサイクリン若しくはアンピシリン耐性）を提供する。

哺乳動物の発現ベクターはまた、複製起点、必要な任意のリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列および5’フランキング非転写配列を含むことができる。いくつかの特徴では、SV40スプライスおよびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いて必要な非転写遺伝的エレメントを提供することができる。

【０１４９】

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

さらにまた、発現ベクターは典型的には1つ以上の選別可能なマーカー遺伝子を含み、ベクターを含む宿主細胞の選別を可能にする。そのような選別可能マーカーには、真核細胞培養に対してはジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子またはネオマイシン耐性を付与する遺伝子、大腸菌ではテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性を付与する遺伝子、及びS.セレビシアエ（S. cerevisiae）のTRP1遺伝子が含まれる。

いくつかの特徴では、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列、または

前記の連続する5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメントの１つをコードする核酸は、翻訳されたポリペプチドまたはそのフラグメントの分泌を誘導することができるリーダー配列とともに適切な局面でアッセンブリングされる。前記核酸は融合ポリペプチドをコードすることができ、前記融合ポリペプチドでは、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列、または前記の連続する5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメントの１つが、異種ペプチドまたはポリペプチド（例えばN-末端識別ペプチド）と融合される（前記異種ペプチドまたはポリペプチド所望の性状（例えば安定性強化または精製の簡便化）を付与する）。

適切なDNA配列は多様な方法によってベクターに挿入することができる。一般的には、DNA配列は、挿入物およびベクターの適切な制限酵素による消化に続いて、ベクター内の所望の位置に連結される。あるいは、挿入物とベクターの両方の平滑末端を連結することもできる。多様なクローニング技術が文献に記載されている：Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997およびSambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989）。そのような技術および他の技術は当業者の技術範囲内であろう。

ベクターは、例えばプラスミド、ウイルス粒子またはファージの形態を有し得る。他のベクターには染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列、SV40の誘導体、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAの組合せに由来するベクター、ウイルスDNA、例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルスが含まれる。原核細胞および真核細胞宿主で使用できる多様なクローニングベクターおよび発現ベクターは例えばSambrookによって記載されている（Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor, NY, 1989）。

【０１５０】

宿主細胞および形質転換細胞：

本発明はまた、本発明の核酸配列、例えば本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする配列、または本発明のベクターを含む形質転換細胞を提供する。宿主細胞は、当業者に周知の任意の宿主細胞であって、原核細胞、真核細胞、例えば細菌細胞、菌類細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞が含まれ得る。例示的な細菌細胞は、エシェリキア属、バチルス属、ストレプトミセス属、サルモネラ属、シュードモナス属およびスタフィロコッカス属の任意の種を含み、前記には大腸菌、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）、枯草菌（Bacillus subtilis）、バチルス・セレウス(B.cereus)、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、シュードモナス・フルオレセンス（Pseudomonas fluorescens）が含まれる。例示的な菌類細胞には、アスペルギルスの任意の種が含まれる。例示的な酵母細胞は、ピキア、サッカロミセス、シゾサッカロミセスまたはシュワンニオミセスの任意の種を含み、前記にはピキア・パストリス（Pichia pastoris）、サッカロミセス・セレビシアエ（Saccharomyces cerevisiae）またはシゾサッカロミセス・ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）が含まれる。例示的な昆虫細胞は、スポドプテラマタハドロソフィアの任意の種を含み、前記にはドロソフィラS2およびスポドプテラSf9が含まれる。例示的な動物細胞にはCHO、COSまたはボウズ・メラノーマまたは任意のマウスもしくはヒト細胞株が含まれる。適切な宿主を選択することは当業者の技術範囲内である。多様な高等植物種を形質転換する技術は周知で、技術文献および学術文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477；米国特許5,750,870号。

ベクターは、多様な任意の技術を用いて宿主細胞に導入することができる。前記技術には、形質転換、トランスフェクション、形質導入、ウイルス感染、遺伝子銃またはTi仲介遺伝子伝達が含まれる。具体的な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DE

AEデキストラン仲介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる（L. Davis, M. Dibner, I. Battey, Basic Methods in Molecular Biology, (1986)）。

【０１５１】

ある特徴では、本発明の核酸またはベクターはスクリーニングのために細胞に導入される。したがって前記核酸はその後の核酸の発現に適した態様で細胞に導入される。導入方法は、主として標的細胞タイプによって決定される。例示的な方法には$CaPO_4$沈殿、リポソーム融合、リポフェクション（例えばLIPOFECTIN（商標））、エレクトロポレーション、ウイルス感染などが含まれる。候補核酸は宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれるか（例えばレトロウイルス導入による）、または細胞質に一過性もしくは安定的に存在することができる（すなわち慣例的なプラスミドを使用し、標準的な調節配列、選別マーカーなどを利用する）。多くの医薬的に重要なスクリーニングではヒトまたはモデル動物細胞の標的が必要なので、そのような標的をトランスフェクトすることができるレトロウイルスを用いることができる。

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

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

【０１５２】

宿主細胞内の構築物を通常の態様で用い、組換え配列によってコードされる遺伝子生成物を産生させることができる。組換え作製工程で用いる宿主細胞に応じて、ベクターを含む宿主細胞により生成されるポリペプチドはグリコシル化されることも、またグリコシル化されないこともある。本発明のポリペプチドはまた最初のメチオニンアミノ酸残基を含んでいることも含まないこともある。

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

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

対象のポリヌクレオチド、例えば本発明の核酸を含む宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選別または遺伝子の増幅に適切なように改変した通常の栄養培養液で培

養することができる。培養条件（例えば温度、pHなど）は発現のために選択された宿主細胞で以前に用いられたものであり、当業者には明白であろう。続いて、規定の酵素活性を有すると認定されたクローンの配列を決定し、活性が強化された酵素をコードするポリヌクレオチド配列を同定する。

本発明は、本発明の核酸、例えば本発明の配列と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも約50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77%、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％またはそれより高い配列同一性を有する核酸配列を含む核酸（ここで前記配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、または目視精査によって決定される）、または本発明の核酸配列またはその部分配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を含むベクターを発現させることを含む、細胞内で組換えトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを過剰発現させる方法を提供する。過剰発現は任意の手段、例えば高活性プロモーターの使用、二シストロン性ベクターまたはベクターの遺伝子増幅によって実施することができる。

【０１５３】

本発明の核酸は、任意のin vitroまたはin vivo発現系で発現または過剰発現させることができる。任意の細胞培養系（細菌、酵母、菌類または哺乳動物細胞培養を含む）を利用して、組換えタンパク質を発現または過剰発現させることができる。過剰発現は、プロモーター、エンハンサー、ベクター（例えばレプリコンベクター、二シストロン性ベクター（例えば以下を参照されたい：Gurtu (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 229:295-8）、培養液、培養系などを適切に選択することによって実施できる。ある特徴では、細胞系で選別マーカー（例えばグルタミンシンターゼ（例えば以下を参照されたい：Saders (1987) Dev. Biol. Stand. 66:55-63））を使用する遺伝子増幅を用いて本発明のポリペプチドが過剰発現される。

このアプローチに関するさらなる詳細は刊行物に記載されおよび／または当業者に公知である。特に非限定的に例示すれば、そのような利用可能な刊行物には以下が含まれるが、ただしこれらの参考文献は本出願の酵素を開示してはいない：J. Bacteriol. 1998, Aug. 180(16):4319-4323；App. Microbiol. Biotechnol. 2003, June 61(5-6):463-471；Gene 1996, Oct. 177(1):217-222；J. Bacteriol. 1994, June 176(12):3552-3558；JBC. 1997, Sept. 272(37):23303-23311。

【０１５４】

前記宿主細胞は当業者に周知の任意の宿主細胞でもよく、原核細胞、真核細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞が含まれる。適切な宿主の代表的な例として、以下を挙げることができる：細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌（Bacillus subtilis）、バチルス・セレウス、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、並びにシュードモナス属、ストレプトミセス属およびスタフィロコッカス属の種々の種；菌類細胞、例えばアスペルギルス、酵母、例えばピキア、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、シュワンニオミセスの任意の種（ピキア・パストリス、サッカロミセス・セレビシアエまたはシゾサッカロミセス・ポンベを含む）；昆虫細胞、例えばドロソフィラS2およびスポドプテラSf9；動物細胞、例えばCHO、COSまたはボウズ・メラノーマ；およびアデノウイルス。適切な宿主を選択することは当業者の技術範囲内である。

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

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

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

種々の哺乳動物細胞培養系もまた組換えタンパク質の発現に用いることができる。哺乳動物発現系の例には、サル腎線維芽細胞のCOS-7株（Gluzmanが記載：Cell, 23:175, 1981）および適合ベクターからタンパク質を発現することができる他の細胞株（例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株）が含まれる。

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

あるいは、本発明のアミノ酸配列のポリペプチドまたは前記の連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメントは、通常のペプチド合成装置による合成によって製造することもできる。ある特徴では、ポリペプチドのフラグメントまたは部分を利用して、対応する完全長のポリペプチドをペプチド合成によって製造することができる。

無細胞翻訳系もまた、本発明のアミノ酸配列をもつポリペプチドの1つまたは前記の連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメントの製造に利用することができる（前記ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸に作動できるように連結されたプロモーターを含むDNA構築物から転写されたmRNAを使用する）。いくつかの特徴では、前記DNA構築物は、in vitro転写反応実施前に直線状化することができる。続いて適切な無細胞翻訳抽出物（例えばウサギ網状赤血球抽出物）とともに前記転写mRNAをインキュベートし、所望のポリペプチドまたはそのフラグメントを生成する。

【０１５５】

核酸の増幅：

本発明を実施するとき、本発明の核酸および本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸または本発明の改変核酸は増幅によって複製することができる。増幅はまた本発明の核酸のクローニングまたは改変にも用いることができる。したがって、本発明は、本発明の核酸を増幅するための増幅プライマー配列対を提供する。当業者は、これら配列の任意の部分またはその完全長のための増幅プライマー配列対を設計することができる。

ある特徴では、本発明は、本発明のプライマー対によって増幅された核酸を提供する。

前記プライマー対は、例えば本発明の核酸の最初の（５’側の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基、および相補鎖の最初の（５’側の）約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基によって示される。

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー配列対を提供する。前記プライマー対は、本発明の配列を含む核酸またはそのフラグメントもしくは部分配列を増幅することができる。前記増幅プライマー配列の一方または各メンバーは、前記配列の連続する少なくとも約10から50塩基、または前記配列の連続する約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。本発明は増幅プライマー対を提供し、前記プライマー対は、本発明の核酸の最初の（５’側の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基によって示される配列を有する第一のメンバーおよび前記第一のメンバーの相補鎖の最初の（５’側の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基によって示される配列を有する第二のメンバーを含む。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて、増幅（例えばポリメラーゼ連鎖反応）によって生成されたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて、増幅（例えばポリメラーゼ連鎖反応）によってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを製造する方法を提供する。ある特徴では、前記増幅プライマー対は、ライブラリー、例えば遺伝子ライブラリー（例えば環境ライブラリー）から核酸を増幅させる。

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

【０１５６】

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

【０１５７】

配列同一性の程度の決定

本発明は、本発明の例示的核酸（上記で規定）と少なくとも約50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550またはそれより多い残基領域にわたって、少なくとも約50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、

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

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

また別の実施態様では、2つの核酸またはポリペプチドの関係で“実質的に同一”という語句は、公知の配列比較アルゴリズムの1つを用いるかまたは目視精査により、最大一致のために比較およびアラインメントを実施したとき、例えば少なくとも約50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77%、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％またはそれより高いヌクレオチドまたはアミノ酸残基（配列）同一性を有する2つ以上の配列を指す。典型的には、実質的同一性は少なくとも約100残基の領域にわたって存在し、もっとも一般的には、配列は少なくとも約150－200残基にわたって実質的に同一である。いくつかの特徴では、配列はコード領域の全長にわたって実質的に同一である。

【０１５８】

別の実施態様では、“実質的に同一”なアミノ酸配列は、1つ以上の保存的もしくは非保存的アミノ酸置換、欠失または挿入によって参照配列と異なる配列である（特にそのような置換が分子の活性部位ではない部位で生じるとき、および前記ポリペプチドがその機能的特性を本質的に維持していることを条件とする）。また別の実施態様では、保存的アミノ酸置換は、例えばあるアミノ酸を同じクラスの別のアミノ酸で置換する（例えば疎水性アミノ酸（例えばイソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニン）で別の疎水性アミノ酸を置換、または極性アミノ酸で別の極性アミノ酸を置換、例えばアルギニンでリジンを置換、グルタミン酸でアスパラギン酸を置換、またはグルタミンでアスパラギンを置換）。1つ以上のアミノ酸を例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドから欠失させて、その生物学的活性を顕著に変更することなく、前記ポリペプチドの構造の改変をもたらすことができる。例えば、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの生物学的活性に必要でないアミノ末端またはカルボキシル末端のアミノ酸を除去することができる。本発明の改変ポリペプチド配列は、多数の方法によってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの生物学的活性についてアッセイすることができる。前記方

法は、改変ポリペプチド配列をトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質と接触させ、当該アッセイで前記改変ポリペプチドが特異的基質の量を低下させるか、または機能的なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドと基質との酵素反応のバイオ生成物を増加させるかを決定する工程を含む。

【０１５９】

本発明の核酸配列は、本発明の例示的配列および前記と実質的に同一の配列の連続する少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400または500ヌクレオチドを含むことができる。本発明の核酸配列は相同な配列を含むことができ、核酸配列のフラグメントおよび前記と実質的に同一の配列とは、これら配列と少なくとも50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77%、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％または前記より高い配列同一性（相同性）を有する配列を指す。相同性は、本明細書に記載の任意のコンピュータプログラムおよびパラメーターを用いて決定することができる（FASTA ver. 3.0t78とその規定値パラメーターを含む）。相同な配列にはまたRNA配列が含まれる（RNA配列の場合、本発明の核酸配列のチミンはウリジンに置換されている）。相同な配列は本明細書に記載されている方法のいずれかを用いて入手できるが、またシークェンシングエラーの修正から得ることができる。本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列は、伝統的な一文字様式（例えば以下を参照されたい：Lubert Stryer, Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York）または配列内のヌクレオチドの実体を記録する他の任意の様式で表現することができることは理解されよう。

本特許明細書のいずれかの箇所で検証される種々の配列比較プログラムは、特に本発明のこの特徴において使用することが意図される。タンパク質及び／又は核酸配列の相同性は、当分野で公知の多様な配列比較アルゴリズムおよびプログラムのいずれかを用いて評価することができる。そのようなアルゴリズムおよびプログラムには、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALWが含まれるが、ただしこれらに限定されない（Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993）。

相同性または同一性は配列分析ソフト（例えばジネティクスコンピュータグループ（Universty of Wisconsin Bitechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705）の配列分析ソフトウェアパッケージ）を用いて測定できる。そのようなソフトは、種々の欠失、置換および他の改変に対して相同性の程度を決めることによって類似の配列を見つけ出す。2つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関して“相同性”および“同一性”という用語は、比較ウィンドウまたは指定の領域上で、多数の配列比較アルゴリズムを使用するかまたは手動アラインメントおよび目視精査による測定にしたがって最大一致を求めて比較およびアラインメントを実施したとき、特定のパーセンテージの同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つ以上の配列または部分配列を指す。

配列比較の場合、典型的には一方の配列は参照配列として機能し、前記に対してテスト配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いるとき、テスト配列および参照配列はコンピュータに入力され、必要な場合には部分配列同等物が指定され、さらに配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。規定値プログラムパラメーターを用いることができるが、また別のパラメーターを指定することもできる。続いて配列比較アルゴリズムは、前記のプログラムパラメーターを基にして参照配列に対するテスト配列のパーセン

ト配列同一性を計算する。

【０１６０】

別の実施態様では、“比較ウィンドウ”は、20から600、通常は約50から約200、より通常は約100から約150から成る群から選択される任意数の連続する位置のセグメントに対する参照を含み、前記ウィンドウにおいて、ある配列が同じ数の連続した位置の参照配列と前記2つの配列を最適にアラインメントした後で比較される。比較のために参照配列をアラインメントする方法は当分野に周知である。配列比較の最適アラインメントは、例えばSmith & Watermanの局所相同性アルゴリズム（Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)）によって、Needleman & Wunschの相同性アラインメントアルゴリズム（J. Mol. Biol. 48:443, 1970）によって、Pearson & Lipmanの類似性検索方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988）によって、前記アルゴリズムのコンピュータによる実施によって（GAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）、または手動アラインメントと目視精査によって実施できる。相同性または同一性決定のための他のアルゴリズムには、BLASTプログラム（Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information）の他に、ALIGN、AMAS（Analysis of Multiply Aligned Sequences）、AMPS（Protein Multiple Sequence Alignment）、ASSET（Aligned Segment Statistical Evaluation Tool）、BANDS、BESTSCOR、BIOSCAN（Biological Sequence Comparative Analysis Node）、BLIMPS（BLocks IMProved Searcher）、FASTA、Intervals & Points、BMB、CLUSTALV、CLUSTALW、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Watermanアルゴリズム、DARWIN、ラスベガスアルゴリズム、FNAT（Forced Nucleotide Alignment Tool）、フレームアライン、フレームサーチ、DYNAMIC、FILTER、FSAP（Fristensky Sequence Analysis Package）、GAP（Global Alignment Program）、GENAL、GIBBS、GenQuest、ISSC（Sensitive Sequence Comparison）、LALIGN（Local Sequence Alignment）、LCP（Local Content Program）、MACAW（Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench）、MAP（Multiple Alignment Program）、MBLKP、MBLKN、PIMA（Pattern-Induced Multi-Sequence Alignment）、SAGA（Sequence Alignment by Genetic Algorithm）およびWHAT-IFが含まれる。前記のようなアラインメントプログラムはまたゲノムデータベースのスクリーニングに用いられ、実質的に同一の配列をもつポリヌクレオチド配列を同定することができる。多数のゲノムデータベースが利用可能で、例えばヒトゲノムの実質的部分がヒトゲノム配列決定プロジェクトの一部分として利用可能である（J. Roach, http://weber.u.Washington.edu/~roach/human_genome_progress2.html）（Gibbs, 1995）。少なくとも21の他のゲノムが既に配列決定されており、前記にはM. ジェニタリウム（genitalium）（Fraser et al., 1995）、M. ジャナスキイー（jannaschii）（Bult et al., 1996）、H. インフルエンザ（Fleischmann et al. 1995）、大腸菌（Blattner et al. 1997）、酵母（S. cerevisiae）（Mewes et al. 1997）およびD.メラノガスター（melanogaster）（Adams et al., 2000）が含まれる。顕著な進展がモデル生物（例えばマウス、C. エレガンスおよびアラビドプシス種（Arabidopsis sp））のゲノム配列決定で達成された。いくつかの機能的情報の注釈をもつゲノム情報を含むデータベースが種々の機関で維持されており、インターネットでアクセスすることができる。

【０１６１】

有用なアルゴリズムの一例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、前記は、それぞれ以下に記載されている：Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410。BLAST分析を実施するソフトは、National Center for Biotechnology Informationから公開されている。このアルゴリズムは、クェリー配列内の長さがWの短いワードを同定することによって高スコアをもつ配列対（HSP）をまず初めに同定することを必要とする。前記は、データベース配列中の同じ長さを持つワードとアラインメントを実施したとき、一致するかまたはいくらかの正の値をもつ閾値スコアTの条件を満たす。Tは近傍ワードスコア閾値と称される（Altschul (1990)上掲書）。これらの最初の近傍ワードヒットはそれらを含むより長いHSPを見つけるための検索

開始のシードとして機能する。前記ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加する限り各配列の両方向に沿って伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列についてはパラメーターM（一致残基対のための褒賞スコア、常に＞0）を用いて計算される。アミノ酸配列の場合、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアが計算される。各方向のワードヒットの伸長は以下の場合に停止する：累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ下降したとき；累積スコアが、1つまたは2つ以上の負のスコアを与える残基アラインメントの累積のために0またはそれ以下になったとき；またはどちらかの配列の末端に達したとき。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは前記アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、規定値として11のワード長、10の期待値（E）、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、3のワード長および10の期待値（E）、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915）アラインメント（B）50、期待値（E）10、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。

【０１６２】

BLASTアルゴリズムはまた2つの配列間の類似性の統計的分析を実施する（例えば以下を参照されたい：Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873）。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性測定の1つは最小合計確率（P(N)）であり、前記は2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然によって生じる確率を提供する。例えば、テスト核酸と参照核酸の比較で最小合計確率が約0.2未満、ある特徴では、好ましくは約0.01未満、ある特徴ではもっとも好ましくは約0.001未満であるならば、前記核酸は参照配列と類似であると考えられる。

ある特徴では、タンパク質および核酸配列相同性はベーシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール（Basic Local Alignment Search Tool, “BLAST”）を用いて評価される。特に、5つの特別なBLASTプログラムを用いて以下のタスクが実行される：（1）BLASTPおよびBLAST3はアミノ酸の問い合わせ配列をタンパク質配列データベースと比較する；（2）BLASTNはヌクレオチドの問い合わせ配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；（3）BLASTXは問い合わせヌクレオチド配列（その両方の鎖）の仮想的な6つのフレームの翻訳生成物をタンパク質配列データベースと比較する；（4）TBLASTNは問い合わせタンパク質配列（両方の鎖）を全ての6つの読み枠で翻訳されるヌクレオチド配列データベースと比較する；さらに（5）TBLASTXはヌクレオチド問い合わせ配列の6つの読み枠翻訳物をヌクレオチド配列データベースの6つの読み枠翻訳物と比較する。

BLASTプログラムは類似のセグメントを認識することによって相同な配列を同定する。前記セグメントは本明細書ではクェリーアミノ酸または核酸配列とテスト配列間の“高スコアセグメントペア”と称され、好ましくはタンパク質または核酸配列データベースから得られる。高スコアセグメントペアは、好ましくは、スコアリングマトリックス（その多くは当分野で公知である）によって同定される（すなわちアラインメントが実施される）。好ましくは、使用されるスコアリングマトリックスはBLOSUM62マトリックスである（Gonnet et al., Science 256:1443-1445 (1992); Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993）。前記より劣るが、PAMまたはPAM250もまた用いることができる（例えば以下を参照されたい：Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation）。BLASTプログラムは米国立医学図書館（U.S. National Library of Medicine）から入手できる。

上記のアルゴリズムとともに用いられるパラメーターは、調査される配列の長さおよび相同性の程度に応じて適合させることができる。いくつかの特徴では、前記パラメーターは、ユーザーの指示のない状態でアルゴリズムによって使用される規定値パラメーターでもよい。

【０１６３】

コンピュータシステムおよびコンピュータプログラム製品

配列同一性、構造的相同性、モチーフなどをコンピュータシステムで決定および同定す

るために、本発明の核酸およびポリペプチド配列を、コンピュータによって読み取りさらにアクセスすることができる任意の媒体上に保存、記録し、さらに操作することができる。

したがって、本発明は、本発明の核酸およびポリペプチド配列を記録または保存したコンピュータ、コンピュータシステム、コンピュータ読み出し可能媒体、コンピュータプログラム製品などを提供する。本明細書で用いられる“記録”および“保存”という用語はコンピュータ媒体に情報を保存するプロセスを指す。当業者は、コンピュータ読み出し可能媒体に情報を記録するための現時点で公知の任意の方法を容易に応用して、本発明の1つ以上の核酸配列および前記と実質的に同一の配列、本発明の1つ以上のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列を含む製品を製造することができる。本発明の別の特徴は、少なくとも2、5、10、15もしくは20または前記を超える本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列を記録したコンピュータ読み出し可能媒体である。

本発明のまた別の特徴は、1つ以上の本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列が記録されたコンピュータ読み出し可能媒体である。本発明のまた別の特徴は、1つ以上の本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列が記録されたコンピュータ読み出し可能媒体である。本発明のまた別の特徴は、上記に示された配列の少なくとも2、5、10、15もしくは20または前記を超える配列が記録されたコンピュータ読み出し可能媒体である。コンピュータ読み出し可能媒体には、磁気により読み出し可能な媒体、光学的に読み出し可能な媒体、電子的に読み出し可能な媒体および磁気/光学媒体が含まれる。例えば、前記コンピュータ読み出し可能媒体はハードディスク、フロッピー（登録商標）ディスク、磁気テープ、CD-ROM、多用途デジタルディスク（DVD）、ランダムアクセスメモリー（RAM）、または読み出し専用メモリー（ROM）の他、当業者に公知の他のタイプの他の媒体であり得る。

【０１６４】

本発明の特徴は、システム（例えばインターネット使用システム）、特に、本明細書に記載されている配列情報を保存し、これを操作するコンピュータシステムを含む。コンピュータシステム（100）の一例が図1の組み立て分解図に示されている。本明細書で用いられる“コンピュータシステム”は、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列のヌクレオチド配列、または本発明のアミノ酸配列で示されるポリペプチド配列の分析に用いられるハードウェア構成部分、ソフトウェア構成部分およびデータ保存構成部分を指す。コンピュータシステム（100）は典型的には、配列データを処理し、これにアクセスし、さらに前記を操作するプロセッサーを含む。プロセッサ（105）は周知のタイプの中央演算ユニットのいずれか、例えばインテル社（Intel Corporation）のペンチアムIIIまたはサン（Sun）、モトローラ（Motorola）、コンパック（Compaq）、AMDまたはインターナショナル・ビジネス・マシーンズ（IBM）の類似のプロセッサーであり得る。

典型的には、コンピュータシステム（100）は汎用システムであり、プロセッサー（105）およびデータ保存のための1つ以上の内部データ保存構成部分（110）、および前記データ保存構成部分に保存されたデータを検索するための1つ以上のデータ検索装置を含む。従来の利用可能なコンピュータシステムのいずれも適切であることは当業者には理解されよう。

【０１６５】

特にある特徴では、コンピュータシステム（100）は、バス（メインメモリー（115）（好ましくはRAMとして提供されている）に連結されている）に連結されたプロセッサー（105）、および1つ以上の内部データ保存装置（110）（例えばハードドライブおよび／またはそれにデータが記録される他のコンピュータ読み出し可能媒体）を含む。いくつかの特徴では、コンピュータシステム（100）はさらに、内部データ保存装置（110）に保存されたデータを読み取るための1つ以上のデータ検索装置（118）を含む。

データ検索装置（118）は、例えばフロッピーディスクドライブ、コンパクトディスクドライブ、磁気テープドライブ、または遠隔のデータ保存システムなどに連結することができる（例えばインターネットを介して）モデムであり得る。いくつかの特徴では、内部

データ保存装置（110）は取り外し可能なコンピュータ読み出し可能媒体、例えばフロッピーディスク、コンパクトディスク、磁気テープなどで、制御ロジックおよび／またはそれに記録されたデータを含んでいる。コンピュータシステム（100）は便利には、前記制御ロジックおよび／またはデータを含むか、またはデータ検索装置にいったん挿入された前記制御ロジックおよび／またはデータをデータ保存構成部分から読み出すために適切なソフトによってプログラムされる。

コンピュータシステム（100）は、コンピュータのユーザーに出力結果を表示するために用いられるディスプレー（120）を含む。コンピュータシステム（100）は他のコンピュータシステム（125a－c）とネットワークまたは広域ネットワークで連結され、コンピュータシステム（100）への中央アクセスを提供することができることは留意されるべきであろう。

本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列のヌクレオチド配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列にアクセスし前記を処理するためのソフト（例えば検索ツール、比較ツールまたはモデリングツールなど）は実行時にはメインメモリー（115）に存在することができる。

【０１６６】

ある特徴では、コンピュータシステム（100）はさらに、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列（コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている）を参照ヌクレオチドまたはポリペプチド配列（コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている）と比較するための配列比較アルゴリズムを含むことができる。“配列比較アルゴリズム”は、データ保存手段内に保存されている他のヌクレオチド配列および／または化合物とヌクレオチド配列を比較するためにコンピュータシステム（100）に（端末または遠隔端末から）提供される1つ以上のプログラムを指す。例えば、配列比較アルゴリズムは、コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列のヌクレオチド配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列を、コンピュータ読み出し可能媒体に保存されている参照配列と比較し、相同性または構造モチーフを同定することができる。

図2は、新規なヌクレオチドまたはタンパク質配列を配列データベースと比較して、新規な配列と配列データベースとの間の相同性レベルを決定するためのプロセス（200）のある特徴を示す組み立て図である。前記配列データベースは、コンピュータシステム（100）内に保存された個人的データベースでも、公的データベース（例えばインターネットを介して利用可能なGENBANK）でもよい。

プロセス（200）は開始状態（201）で始まり、続いて、比較されるべき新規な配列がコンピュータシステム（100）内のメモリーに保存される状態（202）に移行する。上記で考察したように、前記メモリーは任意のタイプのメモリー（RAMまたは内部保存装置を含む）であり得る。

続いてプロセス（200）は状態（204）に移行し、ここで配列データベースが分析および比較のために開かれる。続いてプロセス（200）は、データベースに保存されている第一の配列がコンピュータのメモリーに読み出される状態（206）に移行する。続いて比較が状態（210）で実施され、第一の配列が第二の配列と同じであるか否かが決定される。この工程は、新規な配列とデータベースの第一の配列との間の正確な比較の実施に限定されないことに留意することが重要である。2つのヌクレオチド配列またはタンパク質配列を（たとえそれらが同一ではなくても）比較する周知の方法を当業者は心得ている。例えばギャップを1つの配列に導入してこれら2つのテスト配列間の相同性レベルを高めることができる。比較時にギャップまたは他の特徴を配列に導入するか否かを制御するパラメーターは通常はコンピュータシステムのユーザーによって入力される。

【０１６７】

いったん2つの配列の比較が状態（210）で実施されたら、決定の状態（210）で前記2つの配列が同じか否かの決定が下される。もちろんのこと、“同じ”という用語は完全に同

一である配列に限定されない。ユーザーによって入力された相同性パラメーター内にある配列は、プロセス（200）で“同じ”と示される。

2つの配列が同じであるという決定が下されたら、プロセス（200）は状態（214）に移行し、ここでデータベース由来の配列の名称がユーザーに表示される。前記状態はディスプレーされた名称の配列が入力した相同性の特徴を満たすことをユーザーに知らせる。保存配列の名称がいったんユーザーに表示されたら、プロセス（200）は、それ以上の配列がデータベースに存在するか否かの決定が下される決定状態（218）に移行する。それ以上データベースに配列が存在しない場合には、プロセス（200）は終了状態（220）で終了する。しかしながらデータベースにさらに配列が存在する場合は、プロセス（200）は状態（224）に移行し、前記状態でポインターは、データベースの次の配列に移動し前記新たな配列と比較することができる。このようにして、新たな配列はアラインメントを実施されデータベースの各配列と比較される。

配列が相同でないという決定が決定状態（212）で下された場合、プロセス（200）は直ちに決定状態（218）に移行し、データベース内に比較されるべき他の配列が存在するか否かが決定されることは留意されよう。

したがって、本発明のある特徴は、プロセッサー、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列が保存されているデータ保存装置、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列と比較するための参照ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が検索できるように保存されたデータ保存装置、並びに比較を実施するための配列コンペアラーを含むコンピュータシステムである。前記配列コンペアラーは、比較される配列間の相同性レベルを示すか、または本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列のコード内の構造モチーフを同定するか、またはこれら核酸コードおよびポリペプチドコードと比較される配列内の構造モチーフを同定することができる。いくつかの特徴では、前記データ保存装置には、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列、または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30もしくは40またはそれより多い配列が保存されていることもある。

【０１６８】

本発明のまた別の特徴は、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列、または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列と参照ヌクレオチド配列との間の相同性レベルを決定する方法である。前記方法は、核酸コードまたはポリペプチドコード、および参照ヌクレオチドまたはポリペプチド配列をコンピュータプログラム（前記は相同性レベルを決定する）により読み取り、核酸コードまたはポリペプチドコードと参照ヌクレオチドまたはポリペプチド配列との間の相同性を前記コンピュータプログラムにより決定することを含む。前記コンピュータプログラムは、相同性レベルを決定するための多数のコンピュータプログラムのいずれでもよいが、特に本明細書に列挙されたものが含まれる（例えば規定値パラメーターまたは任意の改変パラメーターを用いるBLAST2N）。前記方法は上記に記載したコンピュータシステムを用いて実行することができる。前記方法はまた、上記に記載した本発明の核酸配列、または本発明のポリペプチド配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30もしくは40またはそれより多い配列をコンピュータプログラムを用いてより読み取り、さらに核酸コードまたはポリペプチドコードと参照ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列との間の相同性を決定することによって実施することができる。

図3は、2つの配列が相同であるか否かを決定するコンピュータシステムのプロセス（250）のある特徴を示す組み立て図である。プロセス（250）は開始状態（252）で開始し、続いて比較されるべき第一の配列がメモリーに保存される状態（254）に移行する。続いて比較されるべき第二の配列が状態（256）でメモリーに保存される。続いてプロセス（250）は状態（260）に移行し、前記状態（260）で第一の配列中の第一の記号が読み取られ、続いて状態（262）に移行し、前記状態（262）で第二の配列の第一の記号が読み取られ

る。前記配列がヌクレオチド配列の場合、前記記号は通常はA、T、C、GまたはUのいずれかであることは理解されよう。前記配列がタンパク質配列の場合は、前記記号は一文字のアミノ酸コードであり、それによって第一および第二の配列は容易に比較することができる

【０１６９】

続いて2つの記号が同じものであるか否かの決定が決定状態（264）で下される。それらが同じものである場合、プロセス（250）は状態（268）に移行し、前記状態（268）で第一および第二の配列の次の記号が読み取られる。続いて、前記次の記号が同じものであるか否かの決定が下される。それらが同じものである場合には、プロセス（250）は2つの記号が同じでなくなるまでこのループを繰り返す。次の2つの記号が同じでないという決定が下された場合、プロセス（250）は決定状態（274）に移行して、いずれかの配列に読み取られるべき記号がそれ以上存在するか否かが決定される。

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

あるいは、コンピュータプログラムは、本発明に示された核酸配列のヌクレオチド配列を1つ以上の参照ヌクレオチド配列と比較して、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列のヌクレオチドコードが参照核酸配列と1つ以上の位置で異なるか否かを決定するコンピュータプログラムであってもよい。ある特徴では、そのようなプログラムは、参照ポリヌクレオチド配列または本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列のいずれかの配列に対して挿入、欠失または置換されたヌクレオチドの長さまたはそれらが何であるかを記録する。ある特徴では、コンピュータプログラムは、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列が、参照ヌクレオチド配列に対して一ヌクレオチド多形性（SNP）を含むか否かを決定するプログラムであってもよい。

【０１７０】

本発明の別の特徴は、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列が、参照ヌクレオチド配列と1つ以上のヌクレオチドで異なるか否かを決定する方法であり、前記方法は以下の工程を含む：核酸配列間の相違を同定するコンピュータプログラムを使用して核酸コードおよび参照ヌクレオチド配列を読み取る工程および前記核酸コードおよび参照ヌクレオチド配列との間の相違を前記コンピュータプログラムにより同定する工程。いくつかの特徴ではコンピュータプログラムは一ヌクレオチド多形性を同定するプログラムである。前記方法は上記に述べたコンピュータシステムによって実施することができ、前記方法は図3に示されている。前記方法はまた、コンピュータプログラムを使用することにより本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30もしくは40またはそれより多い配列および参照ヌクレオチド配列を読み取り、さらにコンピュータプログラムにより前記核酸コードと参照ヌクレオチド配列との間の相違を同定することによって実施することができる。

他の特徴では、前記コンピュータ使用システムはさらに、本発明の核酸配列または本発明のポリペプチド配列並びに前記と実質的に同一の配列内の特徴を同定するアイデンティファイヤーを含むことができる。

“アイデンティファイヤー”は、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列内のある種の特徴を同定する1つ以上のプログラムを指す。ある特徴では、アイデンティファイヤーは、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列内のオープンリーディングフレームを同定するプログラムを含むことができる。

【０１７１】

図4は、配列内の1つの特徴の存在を検出するためのアイデンティファイヤープロセス（300）のある特徴を示す流れ作業図である。プロセス（300）は開始状態（302）で開始し

、続いて状態（304）に移行し、前記状態（304）で特徴についてチェックされるべき第一の配列がコンピュータシステム（100）のメモリー（115）に保存される。プロセス（300）は続いて状態（306）に移行し、前記状態（306）で配列の特徴のデータベースが開かれる。そのようなデータベースは各特徴の属性リストを前記特徴の名称とともに含むであろう。例えば、特徴の名称は“開始コドン”であり、その属性は“ATG”であろう。別の例では、特徴の名称は“TAATAAボックス”であり、特徴の属性は“TAATAA”であろう。そのようなデータベースの例は、ウィスコンシン大学のGenetics Computer Groupによって作製されている。あるいは、前記特徴は構造的なポリペプチドモチーフ例えばアルファヘリックス、ベータシートまたは機能的ポリペプチドモチーフ、例えば酵素触媒ドメイン（CD）または活性部位、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフまたは当業者に公知の他のモチーフであろう。

特徴のデータベースが状態（306）で開かれると直ちにプロセス（300）は状態（308）に移行し、前記状態（308）で第一の特徴がデータベースから読み取られる。続いて第一の特徴の属性と第一の配列との比較が状態（310）で実施される。続いて、前記特徴の属性の比較が第一の配列内で見出されるか否かの決定が決定状態（316）で下される。前記属性が見出された場合、プロセス（300）は状態（318）に移行し、前記状態（318）で見出された特徴の名称がユーザーに表示される。

続いてプロセス（300）は決定状態（320）に移行し、前記状態（320）でそれ以上の特徴がデータベースに存在するか否かの決定が下される。特徴がそれ以上存在しない場合は、プロセス（300）は終了状態（324）で終了する。しかしながら、それ以上の特徴がデータベースに存在する場合、プロセス（300）は状態（326）で次の配列特徴を読み取り、状態（310）に戻り、前記状態で次の特徴の属性が第一の配列に対して比較される。第一の配列で前記特徴の属性が決定状態（316）で見出されない場合、プロセス（300）は直接決定状態（320）に移行し、特徴がそれ以上データベースに存在するか否かを決定する。

【０１７２】

したがって、本発明のまた別の特徴は、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列内の特徴を同定する方法であり、前記方法は以下の工程を含む：核酸コードまたはポリペプチドコードを、それらに存在する特徴を同定するコンピュータプログラムを使用して読み取る工程および核酸コード内の特徴を前記コンピュータプログラムにより同定する工程。ある特徴では、コンピュータプログラムはオープンリーディングフレームを同定するコンピュータプログラムを含む。前記方法は、ただ1つの配列または本発明の複数の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または複数のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30、または40をコンピュータプログラムで読み取り、さらに前記コンピュータプログラムを用いて核酸コードまたはポリペプチドコード内の特徴を同定することによって実施できる。

本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列は、種々のデータプロセッサプログラムで多様な様式で保存および操作することができる。例えば、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列は、当業者に周知の多様なデータベースプログラム（例えばDB2（商標）、SYBASE（商標）またはORACLE（(商標)））でワードプロセッシングファイル（例えばマイクロソフトワード（WORD（商標））またはワードパーフェクト（WORDPERFECT（商標））のテキストとしてまたはアスキーファイルとして保存することができる。さらに、多くのコンピュータプログラムおよびデータベースを配列比較アルゴリズム、アイデンティファイヤー、または本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列と比較するべき参照ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の供給源として用いることができる。以下のリストは、本発明の核酸配列および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチド配列および前記と実質的に同一の配列に関して有用なプログラムおよびデータベースの手引きを提供することを意図し、本発明を限定しようとす

るものではない。

【０１７３】

使用することができるプログラムおよびデータベースには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：MacPattern（EMBL）、DiscoveryBase（Molecular Applications Group）、GeneMine （Molecular Applications Group）、Look（Molecular Applications Group）、MacLook（Molecular Applications Group）、BLASTおよびBLAST2（NCBI）、BLASTNおよびBLASTX（Alyschul et al. J. Mol. Biol. 215:403, 1990）、FASTA（Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444,1988）、FASTDB (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990)、Catalyst（Molecular Simulations Inc.）、Catalyst/SHAPE（Molecular Simulations Inc.）、Cerius2.DBAccess（Molecular Simulations Inc.）、HypoGen（Molecular Simulations Inc.）、Insight II（Molecular Simulations Inc.）、Discover（Molecular Simulations Inc.）、CHARMm（Molecular Simulations Inc.）、Felix（Molecular Simulations Inc.）、DelPhi（Molecular Simulations Inc.）、QuanteMN（Molecular Simulations Inc.）、Homology（Molecular Simulations Inc.）、Modeler（Molecular Simulations Inc.）、ISIS（Molecular Simulations Inc.）、Quanta/Protein Design（Molecular Simulations Inc.）、WebLab（Molecular Simulations Inc.）、WebLab Diversity Explorer（Molecular Simulations Inc.）、Gene Explorer（Molecular Simulations Inc.）、SeqFold（Molecular Simulations Inc.）、MDL Available Chemicals Directoryデータベース、MDL Drug Data Reportデータベース、Comprehensive Medical Chemistryデータベース、Derwent’s World Drug Indexデータベース、BioByteMasterFileデータベース、Genbankデータベース。他の多くのプログラムおよびデータベースも本発明の開示が提供される当業者には明白であろう。

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

【０１７４】

核酸のハイブリダイゼーション

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

また別の特徴では、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって規定される本発明の核酸は、本発明の核酸の約5残基から完全長の間であろう。例えばそれらは、長さが少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれより多い残基であり得る。完全長より短い核酸もまた含まれる。これらの核酸は、例えばハイブリダイゼーションプローブ、標識プローブ、PCRオリゴヌクレオチドプローブ、iRNA（一本鎖または二本鎖）、アンチセンス配列、または抗体結合ペプチド（エピトープ）、モチーフ、活性部位（触媒ドメイン（CD））などをコードする配列として有用である。

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

よって規定される。

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

核酸のハイブリダイゼーション反応では、具体的なストリンジェンシーレベルを達成するために用いられる条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質に応じて変動するであろう。例えば核酸のハイブリダイズする領域の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えばGC対AT含有量）および核酸のタイプ（例えばRNA対DNA）はハイブリダイゼーションの条件の選択で考慮することができる。さらにまた考慮されることは、核酸の1つが、例えばフィルターに固定されているか否かということである。

【０１７５】

ハイブリダイゼーションは低ストリンジェンシー、中等度ストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシー条件下で実施することができる。核酸のハイブリダイゼーションの例として、固定された変性核酸を含むポリマーメンブレンは、先ず初めに0.9MのNaCl、50mMのNaH_2PO_4（pH7.0）、5.0mMのNa_2EDTA、0.5%SDS、10Xのデンハルト溶液および0.5mg/mLのポリリボアデニル酸から成る溶液中で45℃、30分予備ハイブリダイズされる。続いて、約$2X10^7$cpm（比活性4－9$X10^8$cpm/μg）の^{32}P末端標識オリゴヌクレオチドプローブを前記溶液に添加する。12から16時間インキュベートした後、前記メンブレンを0.5%のSDSを含む、1XのSET（150mMのNaCl、20mMのトリス-塩酸（pH7.8）、1mMのNa_2EDTA）中で30分、室温で洗浄し、続いて前記オリゴヌクレオチドプローブのT_m－10℃で新しい1XのSETで30分洗浄する。続いて前記メンブレンでオートラジオグラフィー用フィルムを感光させハイブリダイゼーションシグナルを検出する。

前述の全てのハイブリダイゼーションは高ストリンジェンシー条件下にあると考えられよう。

ハイブリダイゼーションの後、フィルターを洗浄して非特異的に結合した検出可能なプローブを一切除去することができる。フィルターの洗浄に用いられるストリンジェンシーはまた、ハイブリダイズされる核酸の性質、ハイブリダイズされる核酸の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えばGC対AT含有量）および核酸のタイプ（例えばRNA対DNA）に応じて変動し得る。ストリンジェンシーがだんだんと高くなる洗浄条件の例は以下のとおりである：2XのSSC、0.1%のSDS、室温で15分（低ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5%のSDS、室温で30分から1時間（中等度ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5%のSDS、ハイブリダイゼーション温度から68℃で15から30分（高ストリンジェンシー）；および0.15MのNaCl、72℃で15分（超高ストリンジェンシー）。最後の低ストリンジェンシー洗浄は、0.1XのSSCで室温にて実施することができる。前述の例は、フィルターの洗浄で用いることができる1組の条件の単なる例示である。種々のストリンジェンシーの洗浄レシピが多数存在することは当業者には知られていよう。他のいくつかの例が下記で提供される。

プローブとハイブリダイズした核酸はオートラジオグラフィーまたは他の通常的な技術によって同定される。

【０１７６】

上記の方法を改変して、プローブ配列に対して相同性が低い核酸を同定することができる。例えば、検出可能なプローブに対して相同性が低い核酸を得るために、ストリンジェンシーが低い条件を用いることができる。例えば、約1MのNa$^+$濃度を有するハイブリダイゼーション緩衝液中でハイブリダイゼーション温度を68℃から42℃まで5℃ずつ下げることができる。ハイブリダイゼーション後に、フィルターをハイブリダイゼーション温度で2XのSSC、0.5％SDSで洗浄することができる。前記の条件は、50℃より上で“中等度”の条件、50℃未満で“低度”の条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条

件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが55℃で実施される場合である。“低ストリンジェンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが45℃で実施される場合である。

あるいは、ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを含む緩衝液（例えば6XのSSC）中で42℃の温度で実施することができる。この場合、ハイブリダイゼーション緩衝液中のホルムアミドの濃度を50%から0%まで5%ずつ減少させ、プローブに対して相同性レベルの低いクローンを同定することができる。ハイブリダイゼーションの後でフィルターを6XのSSC、0.5％SDSにより50℃で洗浄することができる。前記の条件は、25％を超えるホルムアミドで“中等度”の条件、25％より低いホルムアミドで“低度”の条件と考えられる。“中等度の”ハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、上記のハイブリダイゼーションが30％のホルムアミドで実施されるときである。“低ストリンジェンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、上記のハイブリダイゼーションが10％のホルムアミドで実施されるときである。

【０１７７】

しかしながら、ハイブリダイゼーションの様式の選択は決定的なものではなく、ある核酸が本発明の範囲内に包含されるか否かを決定する条件を示すのは洗浄条件のストリンジェンシーである。本発明に包含される核酸を同定するために用いられる洗浄条件には例えば以下が含まれる：pH７で約0.02Mの塩濃度、および少なくとも約50℃または約55℃から約60℃；または約0.15MのNaClの塩濃度で72℃、約15分；または約0.2XのSSCの塩濃度で少なくとも約50℃または約55℃から約60℃の温度で約15から約20分；またはハイブリダイゼーション複合体を、0.1％のSDSを含む約2XのSSCの塩濃度を有する溶液で室温で15分2回洗浄し、続いて0.1％のSDSを含む約0.1XのSSCで68℃で15分2回室温で洗浄する；または前記と同等な条件。SSC緩衝液および同等な条件に関してはSambrook, TijssenおよびAusubelの著書を参照されたい。

これらの方法は本発明の核酸の単離に用いることができる。例えば、前述の方法を用いて、本発明の配列の1つおよび前記と実質的に同一の配列、または連続する少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、300、400または500塩基を含む前記のフラグメント、およびそれらと相補的な配列から成る群から選択される核酸配列に対して少なくとも約97%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%相同性を有する核酸配列を単離することができる。相同性はアラインメントアルゴリズムを用いて測定することができる。例えば、相同なポリヌクレオチドは、本明細書に記載したコード配列の1つの天然に出現する対立遺伝子座変種のコード配列を有することができる。そのような対立遺伝子座変種は、本発明の核酸または前記と相補的な配列と比較したとき1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有することができる。

さらにまた、上記の方法を用いて、本発明のアミノ酸配列の1つの配列を有するポリペプチドまたは前記の連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150アミノ酸を含むフラグメントに対して、配列アラインメントアルゴリズム（例えば規定値パラメータを用いるFASTAバージョン3.0t78アルゴリズム）を用いたとき、少なくとも約99%、95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、または少なくとも50%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離することができる。

【０１７８】

オリゴヌクレオチドプローブおよびその使用方法

本発明はまた、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性をもつポリペプチドをコードする核酸もしくはそのフラグメントを同定するか、またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒ

ドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を同定するために用いることができる核酸プローブを提供する。ある特徴では、前記プローブは、本発明の核酸の連続する少なくとも10塩基を含む。あるいは、本発明のプローブは、本発明の核酸で示される配列の連続する少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150または約10から50、約20から60、約30から70の塩基であり得る。前記プローブは、結合および／またはハイブリダイゼーションによって核酸を同定する。前記プローブは、例えばキャピラリーアレイを含む本発明のアレイ（下記の考察を参照されたい）で用いることができる。本発明のプローブはまた他の核酸またはポリペプチドの単離に用いることができる。

本発明の単離、合成または組み換え核酸および前記と実質的に同一の配列、前記と相補的な配列、または、本発明の配列および前記と実質的に同一の配列もしくは前記と相補的な配列の1つの連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400もしくは500塩基を含むフラグメントをプローブとして用いて、生物学的サンプル（例えば土壌サンプル）が、本発明の核酸を有する生物または前記核酸が得られた生物を含むか否かを決定することができる。そのような方法では、前記核酸が単離された生物を潜在的に保有する生物学的サンプルを入手し、前記サンプルから核酸を得る。前記プローブがサンプル中に存在する相補的配列のいずれかと特異的にハイブリダイズすることができる条件下で、前記核酸を前記プローブと接触させる。

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

【０１７９】

前記核酸が単離された生物をサンプルが含む場合、プローブの特異的なハイブリダイゼーションが検出される。ハイブリダイゼーションは、プローブを検出可能な薬剤（例えば放射性同位元素、蛍光染料、または検出可能な生成物の形成を触媒することができる酵素）で標識することによって検出できる。

標識プローブを用いてサンプル中の相補性核酸の存在を検出する多くの方法が当業者にはよく知られている。前記方法にはサザンブロット、ノーザンブロット、コロニーハイブリダイゼーション法およびドットブロットが含まれる。前記方法の各々のプロトコルは以下にに示されている：Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. (1997)およびSambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。

あるいは、2つ以上のプローブ（そのうちの少なくとも1つは核酸サンプルに存在する任意の相補性配列と特異的にハイブリダイズすることができる）を増幅反応で用いて、サンプルが本発明の核酸配列を含む生物（例えば前記核酸が単離された生物）を含むか否かを決定することができる。典型的には、プローブはオリゴヌクレオチドを含む。ある特徴では、増幅反応はPCR反応を含むことができる。PCRプロトコルは文献（AusubelおよびSambrook、上掲書）に記載されている。あるいは、増幅はリガーゼ連鎖反応、3SRまたは鎖置換反応を含むことができる（以下を参照されたい：F. Barany, “The Ligasa Chain Reaction in a PCR World”, PCR Methods and Applications 1:5-16, 1991; E. Fahy et al., “Self-sustained Sequence Replication (3SR): An Isothermal Transcription-based Amplification System Alternative to PCR”, PCR Methods and Applications 1:25-33, 1991;およびG.T. Walker et al., “Strand Displacement Amplification an Isothermal in vitro DNA Amplification Technique”, Nucleic Acid Research 20:1691-1696, 1992）。そのような方法では、サンプル中の核酸をプローブと接触させ、増幅反応を実施し

、さらに生成された任意の増幅生成物を検出する。増幅生成物は、反応生成物のゲル電気泳動を実施し、前記ゲルをインターカレーション試薬（例えば臭化エチジウム）で染色することによって検出することができる。あるいは1つ以上のプローブを放射性同位元素で標識し、ゲル電気泳動の後で放射性増幅生成物の存在をオートラジオグラフィーによって検出してもよい。

【０１８０】

本発明の配列および前記と実質的に同一の配列の末端近くの配列に由来するプローブもまた染色体ウォーキング法で用いて、本発明の配列および前記と実質的に同一の配列の近傍に位置するゲノム配列を含むクローンを同定することができる。そのような方法は、さらに別のタンパク質をコードする遺伝子を前記宿主生物から単離することを可能にする。

本発明の単離、合成、組み換え核酸および前記と実質的に同一の配列、前記と相補的な配列、または本発明の配列および前記と実質的に同一の配列または前記と相補的な配列の1つの連続する少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、300、400もしくは500塩基を含むフラグメントをプローブとして用いて関連核酸を同定および単離することができる。いくつかの特徴では、前記関連核酸は、前記核酸が単離された生物以外の生物に由来するcDNAまたはゲノムDNAであり得る。例えば前記の他の生物は関連する生物であり得る。そのような方法では、プローブが特異的に関連配列とハイブリダイズすることができる条件下で、核酸サンプルを前記プローブと接触させる。続いて、関連生物に由来する核酸とプローブのハイブリダイゼーションが上記に記載した方法のいずれかを用いて検出される。

検出可能なプローブとハイブリダイズする核酸（例えばcDNAまたはゲノムDNA）を同定するために用いられるハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変動させることによって、プローブに対して種々のレベルの相同性を有する核酸を同定および単離することができる。ストリンジェンシーは、プローブの融解温度より低い種々の温度でハイブリダイゼーションを実施することによって変動させることができる。融解温度（T_m）は、（所定のイオン強度およびpHの下で）標的配列の50％が完全に相補性のプローブとハイブリダイズする温度である。非常にストリンジェントな条件は、個々のプローブのT_mに等しいかまたはそれより約5℃低くなるように選択される。プローブの融解温度は以下の等式を用いて計算できる。

長さが14から70ヌクレオチドのプローブの場合、融解温度（T_m）は下記式を用いて計算される：$T_m = 81.5 + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41$（G+Cの割合）－（600/N）、式中Nはプローブの長さである。

ハイブリダイゼーションがホルムアミド含有溶液中で実施される場合、融解温度は以下の等式を用いて計算できる：$T_m = 81.5 + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41$（G+Cの割合）－（0.63％ホルムアミド）－（600/N）、式中Nはプローブの長さである。

プレハイブリダイゼーションは、6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5％SDS、100μgの変性フラグメント化サケ精子DNA、または6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5％SDS、100μgの変性フラグメント化サケ精子DNA、50％ホルムアミド中で実施することができる。SSCおよびデンハルト溶液のための組成は例えば上掲書（Sambrook）に挙げられている。

ハイブリダイゼーションは、検出可能プローブを上記に挙げたプレハイブリダイゼーション溶液に添加することによって実施される。プローブが二本鎖DNAを含む場合、ハイブリダイゼーション溶液に添加する前にそれを変性させる。前記プローブが、それと相補的または相同な配列を含むcDNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズできるように十分な時間前記ハイブリダイゼーション溶液とフィルターを接触させる。長さが200ヌクレオチドを超えるプローブの場合、ハイブリダイゼーションはT_mより15－25℃下で実施できる。より短いプローブの場合（例えばオリゴヌクレオチドプローブ）、ハイブリダイゼーションはT_mより5－10℃下で実施できる。典型的には、6XのSSC中でのハイブリダイゼーションが約68℃で実施される。通常では、50％ホルムアミド含有溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、ハイブリダイゼーションは約42℃で実施される。

【０１８１】

トランスアミナーゼおよび／またはオキシドレダクターゼの発現阻害

本発明は、本発明の核酸（例えばトランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード核酸）と相補的な核酸（例えばアンチセンス配列）を提供する。また別の実施態様では、本発明のアンチセンス配列は、トランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード遺伝子の輸送、スプライシングまたは転写を阻害することができる。前記阻害は、ゲノムDNAまたはメッセンジャーRNAを標的とすることにより達成することができる。標的核酸の転写または機能は、例えばハイブリダイゼーションおよび／または切断によって阻害することができる。また別の実施態様では、本発明によって提供される阻害物質は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子またはメッセンジャーに結合することができるオリゴヌクレオチドを含み、いずれの事例でもトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの生成または機能を妨げまたは抑制する。前記の結合は配列特異的ハイブリダイゼーションによることができる。別の有用な阻害物質クラスは、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼメッセージの不活化または切断を引き起こすオリゴヌクレオチドを含む。前記オリゴヌクレオチドはそのような切断を惹起する酵素活性を有することができる（例えばリボザイム）。オリゴヌクレオチドは化学的に改変するか、または相補性核酸を切断することができる酵素または組成物と結合させることができる。多数のそのような様々なオリゴヌクレオチドのプールを所望の活性を有するものについてスクリーニングすることができる。したがって、本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの発現を核酸および／またはタンパク質レベルで阻害する種々の組成物を提供する。前記は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ配列を含むアンチセンス、iRNAおよびリボザイム、並びに本発明の抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体である。

トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの発現を阻害する本発明の組成物（例えばアンチセンス、iRNA、ミクロRNA、リボザイム、抗体）は、医薬（薬剤）組成物として用いることができる。

【０１８２】

アンチセンスオリゴヌクレオチド：

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼメッセージと結合することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNAを標的とすることによって、例えばトランスフェラーゼおよび／またはデヒドロゲナーゼ活性を阻害することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する方法は学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬を用いてそのようなトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ

オリゴヌクレオチドを設計することができる。例えば、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングするためのジーンウォーキング／RNAマッピングプロトコルは当業界で周知であり、例えば以下を参照されたい：Ho (2000) Methods Enzymol. 314:168-183。この文献はRNAマッピングアッセイを記載し、前記アッセイは標準的な分子技術を基にし、強力なアンチセンス配列選別のための簡単で信頼できる方法を提供する。以下もまた参照されたい：Smith (2000) Eur. J. Phar. Sci. 11:191-198。

天然に出現する核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いられる。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の長さであり得る。例えば、また別の特徴では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは約5から100、約10から80、約15から60、約18から40である。最適な長さは日常的なスクリーニングによって決定できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の濃度で存在してよい。最適濃度は日常的なスクリーニングによって決定できる。この潜在的課題に用いることができる極めて多様な合成された天然に存在しないヌクレオチドおよび核酸類似体が知られている。例えば、非イオン性骨格（例えばN-(2-アミノエチル)グリシンユニット）を含むペプチド核酸（PNA）を用いることができる。ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた用いることができる（それらは以下に記載されている：WO97/03211; WO96/39154；Mata (1997) Toxicol. App. Pharmacol. 144:189-197；Antisense Therapeutics, ed. Agrawal, Humana Press, Totowa, N.J., 1996）。本発明によって提供される合成DNA骨格類似体をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドにはまた、上記で述べたようにホスホロ-ジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3’-N-カルバメートおよびモルホリノカルバメート核酸が含まれる。

コンビナトリアル化学的方法論を用いて膨大な数のオリゴヌクレオチドを生成することができる。前記オリゴヌクレオチドは、任意の標的（例えば本発明のセンスおよびアンチセンストランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ配列）に対し適切な結合親和性および特異性を有する特定のオリゴヌクレオチドについて迅速にスクリーニングすることができる（例えば以下を参照されたい：Gold (1995) J. Biol. Chem. 270:13581-13584）。

【０１８３】

阻害性リボザイム：

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼメッセージと結合することができるリボザイムを提供する。これらのリボザイムは、例えばmRNAを標的にすることによりトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を阻害することができる。リボザイムを設計し、ターゲッティングのためにトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ特異的アンチセンス配列を選別する方法は学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬（例えば核酸）を用いてそのようなリボザイムを設計することができる。リボザイムは、標的RNAを切断するRNAの酵素部分に極めて近傍に保持されているリボザイムの標的RNA結合部分を介して標的RNAと結合することによって機能する。したがって、リボザイムは、相補性塩基対形成により標的RNAを認識し、これと結合し、正確な部位にいったん結合したら、リボザイムは酵素として機能し標的RNAを切断し、これを不活化する。切断がコード配列内で発生すれば、そのような態様での標的RNAの切断は、コードされるタンパク質の合成を指令するその能力を破壊するであろう。リボザイムがそのRNA標的と結合し、これを切断した後、リボザイムは前記RNAから遊離し、新たな標的と繰り返し結合および切断することができる。

いくつかの環境下では、リボザイムの酵素的性質は他の技術、例えばアンチセンス技術

（アンチセンス技術では、核酸分子は核酸標的に単に結合してその転写、翻訳または別の分子との結合を妨げるだけである）に比べて有利であろう。なぜならば、治療達成に必要なリボザイムの有効濃度はアンチセンスオリゴヌクレオチドのそれよりも低いからである。この潜在的な利点はリボザイムの酵素として機能する能力の結果である。したがって、ただ1つのリボザイム分子が多くの標的RNA分子を切断することができる。さらにまた、リボザイムは典型的には特異性が高い阻害因子であり、阻害の特異性は塩基対形成による結合メカニズムだけでなく、リボザイムが結合するRNAの発現を前記リボザイム分子が阻害するメカニズムにも依存している。すなわち、阻害はRNA標的の切断によって生じ、したがって特異性は非標的RNAの切断速度に対する標的RNAの切断速度の比と定義される。この切断メカニズムは塩基対形成に関与する要因に加えて更に種々の要因に依存する。したがって、リボザイム作用の特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド結合の特異性よりも高いであろう。

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

【０１８４】

RNA干渉（RNAi）：

ある特徴では、本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素配列を含むRNA阻害分子、いわゆる“RNAi”分子を提供する。RNAi分子は、二本鎖RNA（dsRNA）分子、例えばsiRNA、ミクロRNA（miRNA）および／またはショートヘアピンRNA（shRNA）分子を含むことができる。RNAi分子、例えばsiRNA（小型阻害性RNA）は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素遺伝子の発現を阻害し、および／またはmiRNA（ミクロRNA）は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼメッセージの翻訳を阻害することができる。ある特徴では、RNAi分子、例えばsiRNAおよび／またはmiRNAは、長さが約11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29またはそれより長い二重鎖ヌクレオチドである。本発明はいずれの特定の作用メカニズムにも限定されないが、RNAiは細胞内に入り、類似または同一の配列を有する一本鎖RNA（ssRNA）（内因性mRNAを含む）の分解を引き起こす。細胞が二本鎖RNA（dsRNA）に暴露されるとき、相同な遺伝子に由来するmRNAは、RNA干渉（RNAi）と称される過程によって選択的に分解される。RNAiの背後にある可能な基本的メカニズムは、特定の遺伝子配列と一致する二本鎖RNA（dsRNA）の短い破片（短小干渉性RNAと称される）への分解である。前記短小干渉性RNAは、その配列と一致するmRNAの分解の引き金となる。ある特徴では、本発明のRNAiは遺伝子サイレンシング療法で用いられる（例えば以下を参照されたい：Shuey（2002）Drug Discov. Today 7:1040-1046）。ある特徴では、本発明は、本発明のRNAi分子例えばsiRNAおよび／またはmiRNAを用いて選択的にRNAを分解する方法を提供する。前記方法は

in vitro、ex vivoまたはin vivoで実施することができる。ある特徴では、本発明のRNAi分子を用いて細胞、器官または動物で機能低下変異を生じることができる。

ある特徴では、RNAiの細胞内導入は、RNAi（例えばミクロRNA）を含むRNA結合タンパク質と結合させた標的細胞特異的リガンドを吸着させて内在化させることによって達成される。リガンドは、標的細胞の固有の表面抗原に特異的である。リガンドは細胞表面抗原と結合した後で偶発的に内在化され得る。固有の細胞表面抗原がそのリガンドと結合後に自然に内在化されない場合は、内在化は、アルギニン富裕ペプチドまたは他の膜透過性ペプチドをリガンドもしくはRNA結合タンパク質の構造中に取り込ませるか、またはリガンドもしくはRNA結合タンパク質に前記のようなペプチドを結合させることによって促進することができる。例えば、米国特許出願公開広報20060030003号、20060025361号、20060019286号、20060019285号を参照されたい。ある特徴では、本発明は、デリバー用、例えば細胞にRNAi分子を含む核酸-脂質粒子として本発明の核酸を導入するための脂質系処方物を提供する（例えば米国特許出願公開広報2006008910号を参照されたい）。RNAi分子例えばsiRNAおよび／またはmiRNAの製造および使用方法（選択的にRNAを分解することを目的とする）は、当分野では周知である（例えば以下を参照されたい：米国特許第6,506,559号、第6,511,824号、第6,515,109号および第6,489,127号）。

【０１８５】

核酸の改変

本発明は、本発明の核酸（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸）の変種を作製する方法を提供する。これらの方法は鋳型核酸によってコードされたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼのものとは変異したもしくは異なる活性または変異したもしくは異なる安定性を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を生成するために反復または多様な組合せで用いることができる。前記方法はまた、例えば遺伝子／メッセージ発現、メッセージ翻訳またはメッセージ安定性における変種を生成するために反復または多様な組合せで用いることができる。別の特徴では、細胞の遺伝的構成は、例えば相同遺伝子のex vivo改変とそれに続く前記遺伝子の細胞への再挿入により改変される。

また別の実施態様では、本発明の核酸は任意の手段、例えばランダムもしくは確率論的な方法、または非確率論的もしくは“定方向進化”の方法によって改変できる（例えば米国特許6,361,974号を参照されたい）。遺伝子のランダム変異導入の方法は当分野で周知である（例えば米国特許5,830,696号を参照されたい）。例えば変異原を用いて遺伝子をランダムに変異させることができる。変異原には、例えば紫外線またはガンマ線照射、または化学的変異原、例えばマイトマイシン、亜硝酸、光活性化ソラレンが含まれ、単独または併用して組換えによって修復されやすいDNA破壊を誘導する。他の化学的変異原には、例えば、重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはギ酸が含まれる。その他の変異原は、ヌクレオチド前駆体の類似物質、例えばニトロソグアニジン、5-ブロモウラシル、2-アミノプリンまたはアクリジンである。これらの薬剤はPCR反応にヌクレオチド前駆体の代わりに添加され、それによって前記配列を変異させることができる。インターカレーション薬剤（例えばプロフラビン、アクリフラビン、キナクリンなど）もまた用いることができる。

【０１８６】

分子生物学の任意の技術、例えばランダムPCR変異導入（例えば以下を参照されたい：Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471）またはコンビナトリアルマルチカセット変異導入（combinatorial multiple cassette mutagenesis）（例えば以下を参照されたい：Crameri (1995) Biotechniques 18:194-196）を用いることができる。ある

いは、核酸（例えば遺伝子）をランダムにまたは“確率論的に”フラグメント化した後で再アッセンブリングすることもできる（例えば以下を参照されたい：米国特許第6,291,242号；同6,287,862号；同6,287,861号；同5,955,358号；同5,830,721号；同5,824,514号；同5,811,238号；同5,605,793号）。また別の特徴では、改変、付加または欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ（例えばGeneReassembly、例えば米国特許6,537,776号を参照されたい）、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセンブリ（SLR）、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNAによる変異導入、ウラシル含有鋳型による変異導入、ギャップ含有二重鎖による変異導入、ポイントミスマッチ修復による変異導入、修復欠損宿主株による変異導入、化学的変異導入、放射源による変異導入、欠失による変異導入、制限-選別変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマーの生成および／またはこれらの組合せ並びに他の方法によって導入される。

【０１８７】

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

【０１８８】

多様性を生じる変異導入方法には例えば以下が含まれる：部位特異的変異導入(Ling et al. (1997) “Approaches to DNA mutagenesis: an overview” Anal Biochem. 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) “Oligonucleotide-directed random mutagenesis using

the phosphorothioate method” Methods Mol. Biol. 57:369-374; Smith (1985) “In vitro mutagenesis” Ann. Rev. Genet. 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) “Strategies and applications of in vitro mutagenesis” Science 229:1193-1201; Carter (1986) “Site-directed mutagenesis” Biochem. J. 237:1-7; および Kunkel (1987) “The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis” in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin))；ウラシル含有鋳型を用いる変異導入 (Kunkel (1985) “Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) “Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection” Methods in Enzymol. 154, 367-382;およびBass et al. (1988) “Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities” Science 242:240-245)；オリゴヌクレオチド誘導変異導入 (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) “Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment” Nucleic Acids Res. 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) “Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors” Methods in Enzymol. 100:468-500; および Zoller & Smith (1987) “Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template” Methods in Enzymol. 154:329-350)；ホスホロチオエート改変DNA変異導入(Taylor et al. (1985) “The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA” Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) “The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA” Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) “Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis” Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) “Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis” Nucl. Acids Res. 16:791-802;およびSayers et al. (1988) “Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide” Nucl. Acids Res. 16: 803-814)；ギャップをもつ二重鎖DNAを用いる変異導入(Kramer et al. (1984) “The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction” Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) Methods in Enzymol. “Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA” 154:350-367; Kramer et al. (1988) “Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations” Nucl. Acids Res. 16: 7207; およびFritz et al. (1988) “Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro” Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999)。

【０１８９】

本発明を実施するために用いることができるさらに別の方法には以下が含まれる：点ミスマッチ修復(Kramer (1984) “Point Mismatch Repair” Cell 38:879-887)、修復欠損宿主株を用いる変異導入(Carter et al. (1985) “Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors” Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; and Carter (1987) “Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors” Methods in Enzymol. 154: 382-403)、欠失変異導入(Eghtedarzadeh (1986) “Use of oligonucleotides to generate large deletions” Nucl. Acids Res. 14: 5115), restriction-selection and restriction-selection and restriction-purification (Wells et al. (1986) “Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin” Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423)、全遺伝子合成による

変異導入(Nambiar et al. (1984) “Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein” Science 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) “Total synthesis and expression of a gene for the a-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)” Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) “Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites” Gene 34:315-323;およびGrundstrom et al. (1985) “Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale ‘shot-gun’ gene synthesis” Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316)、二本鎖開裂修復(Mandecki (1986); Arnold (1993) “Protein engineering for unusual environments” Current Opinion in Biotechnology 4:450-455. “Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181)。上記の方法の多くに関する更なる詳細は” Enzymology”（Volume 154）で見出すことができる。この文献にはまた種々の変異導入方法に関する問題を解決するための有用な管理に関する記述がある。

【０１９０】

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

【０１９１】

本発明の実施に用いることができる方法（種々の多様性を生成する方法に関する詳細を提供する）は例えば以下に記載されている：“SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES”（Patten et al.,1999年9月28日出願、U.S. Ser. No. 09/407,800）；“EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION”（del Cardayre et al., 米国特許6,379,964号）；“OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION”（Crameri et al., 米国特許6,319,714号; 6,368,861号; 6,376,246号; 6,423,542号; 6,426,224号およびPCT/US00/01203；“USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING”（Welch et al., 米国特許6,436,675号）；“METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS”（Selifonov et al., 2000年1月18日出願、PCT/US00/01202） および、例えば “METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS”（Selifonov et al., 2000年7月18日出願、U.S. Ser. No. 09/618,579）；“METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS”（Selifonov and Stemmer, 2000年1月18日出願PCT/US00/01138)；および “SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION”（Affholter, 2000年9月6日出願、U.S. Ser. No. 09/656,549)；および米国特許6,177,263号；同6,153,410号。

非確率論的、または“定方向進化”方法（例えば“飽和変異導入”（GSSM）、合成連結再アッセンブリ（SLR）または前記の組合せを含む）を用いて本発明の核酸を改変し、新規なまたは変異した特性（例えば強酸または強アルカリ条件下、高温または低温条件下などでの活性）を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが作製される。改変された核酸によってコードされるポリペプチドを活性についてスクリーニングすることができる。任意の試験様式またはプロトコルを、例えばキャピラリーアレイ台を利用して用いることができる。例えば米国特許第6,361,974号、同6,280,926号、同5,939,250号を参照されたい。

【０１９２】

遺伝子部位飽和変異導入（またはGSSM）：

本発明はまた、本明細書に記載され、さらにまた米国特許6,171,820号および6,579,258号にも記載されている遺伝子部位飽和変異導入（またはGSSM）を用い酵素を生成する方法を提供する。ある特徴では、ポリヌクレオチド（例えば本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼまたは抗体）に点変異を導入し、一組の子孫ポリペプチドを生成するために縮退N,N,G/T配列を含むコドンプライマーが使用される。前記一組の子孫ポリペプチドでは、例えば改変の標的となる酵素活性部位またはリガンド結合部位の各アミノ酸の位置で単一のアミノ酸置換の全範囲が出現する。これらのオリゴヌクレオチドは、連続する第一の相同配列、縮退N,N,G/T配列およびある特徴では第二の相同な配列を含むことができる。そのようなオリゴヌクレオチドを使用することによって得られる下流の子孫翻訳生成物には、N,N,G/T配列の縮退は20の全てのアミノ酸のためのコドンを含むので前記ポリペプチドに沿って各アミノ酸の位置で可能な全てのアミノ酸変化が含まれる。ある特徴では、１つのそのような縮退オリゴヌクレオチド（例えば１つに縮退N,N,G/Tカセットを含む）が、親のポリヌクレオチド鋳型中の本来のコドンの各々を全範囲のコドン置換に付すために用いられる。また別の特徴では、親のポリヌクレオチド鋳型中の少なくとも2つの原型コドンを全範囲のコドン置換に付すために少なくとも2つの縮退カセットが（同じオリゴヌクレオチド内であれまたは別個のオリゴヌクレオチド内であれ）用いられる。例えば2つ以上のN,N,G/T配列を1つのオリゴヌクレオチド内に含ませ、2つ以上の部位でアミノ酸置換を導入することができる。この複数のN,N,G/T配列は連続していてもよいし、または1つ以上のさらに別のヌクレオチド配列によって分離されてあってもよい。別の特徴では、付加および欠失の導入に

役立つオリゴヌクレオチドは単独またはN,N,G/T配列を含むコドンとともに用いて、アミノ酸付加、欠失および／または置換の任意の組合せまたは並べ換えが導入される。

【０１９３】

ある特徴では、2つ以上の連続するアミノ酸の位置の同時変異は、連続するN,N,G/Tトリプレット（すなわち縮退(N,N,G/T)ｎ配列）を含むオリゴヌクレオチドを用いて実施される。別の特徴では、N,N,G/T配列よりも縮退度の小さい縮退カセットが用いられる。例えば、いくつかの事例では、ただ1つのＮ（前記Ｎはトリプレットの第一、第二または第三番目の位置に存在できる）を含む縮退トリプレット配列を（例えばオリゴヌクレオチドにおいて）用いることができる。任意の組合せおよび並べ換えを含む他のいずれの塩基もトリプレットの残りの2つの位置において用いることができる。あるいはいくつかの事例で縮退N,Ｎ,Ｎ,トリプレット配列を（例えばオリゴにおいて）用いることができる。

ある特徴では、縮退トリプレット（例えばN,N,G/Tトリプレット）の使用によって、ポリペプチドのそれぞれおよび全てのアミノ酸の位置について可能な天然アミノ酸の全範囲（合計20アミノ酸）の系統的で容易な生成が可能になる（別の特徴では、前記方法はまた、各アミノ酸残基、コドン、位置の可能な全ての置換よりも少ない置換の生成も含む）。例えば、100アミノ酸のポリペプチドの場合、2000個の別個の種（すなわち各位置につき20個の可能なアミノ酸Ｘ100個のアミノ酸位置）が生成される。縮退N,N,G/Tトリプレットを含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドセットを使用することによって、32個の個々の配列が20個の可能な天然のアミノ酸を全てコードすることができる。したがって、親のポリヌクレオチド配列が少なくとも1つの前記のようなオリゴヌクレオチドを用いて飽和変異導入に付される反応容器では、20個の別個のポリペプチドをコードする32個のそれぞれ別個の子孫ポリヌクレオチドが生成される。対照的に、部位特異的変異導入では非縮退オリゴヌクレオチドを使用したとき、各反応容器につきただ1つの子孫ポリペプチド生成物が生じるだけである。ある特徴では、非縮退オリゴヌクレオチドを開示の縮退プライマーとともに用いることができる。例えば、非縮退オリゴヌクレオチドを用いて対象のポリヌクレオチドで特定の点変異を生成することができる。これは、特定のサイレント点変異、対応するアミノ酸変化をもたらす点変異、並びに終止コドンおよびポリペプチドフラグメントの対応する発現を生じさせる点変異を生成する1つの手段を提供する。

【０１９４】

ある特徴では、各飽和変異導入反応容器は、親のポリヌクレオチドで変異を導入されるコドンの位置に一致する特定の１つのアミノ酸位置において20個全ての天然アミノ酸が提示されるように、少なくとも20の子孫ポリペプチド（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）分子をコードするポリヌクレオチドを含む（他の特徴では20個全てよりも少ない天然の組合せが用いられる）。各飽和変異導入反応容器から生成される32倍の縮退子孫ポリペプチドをクローン増幅に付し（例えば適切な宿主（例えば大腸菌宿主）で例えば発現ベクターを用いてクローニングする）、さらに発現スクリーニングに付すことができる。スクリーニングにより好ましい特性の変化を提示させることによって個々の子孫ポリペプチドを同定したとき（親のポリペプチドと比較して例えばアルカリ性または酸性条件下でトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼまたはω-トランスアミナーゼ活性が増加する）、前記子孫ポリペプチドの配列を決定し、その中に含まれる対応する好ましいアミノ酸置換を同定することができる。

ある特徴では、本明細書に開示したように、親のポリペプチドのそれぞれおよび全てのアミノ酸の位置に飽和変異導入を用いて変異を導入したとき、好ましいアミノ酸変化が2つ以上のアミノ酸位置で同定できることがある。これら好ましいアミノ酸置換の全てまたは一部分の組合せを含む1つ以上の新規な子孫分子を生成することができる。例えば、2つの具体的な好ましいアミノ酸変化がポリペプチドの3つのアミノ酸位置の各々で同定されるならば、この順列は各位置かつ3つの位置で3つの可能性（最初のアミノ酸から変化のな

いものおよび2つの好ましい変化のそれぞれ）を含む。したがって、３ｘ３ｘ３、または合計27の可能性が存在し、これらは以前に調べられた7つ－6つの単一点変異（すなわち3つの位置の各々で2つ）およびいずれの位置においても変化のないものを含む。

【０１９５】

さらに別の特徴では、スクリーニングと併せて、部位飽和変異導入をシャッフリング、キメラ化、組換えおよび他の変異導入方法と一緒に用いることができる。本発明は任意の突然変異導入方法の使用を提供する。前記方法には反復態様で用いられる飽和変異導入が含まれる。ある実施態様では、任意の変異導入方法がスクリーニングと併用して反復使用される。

本発明はまた、点変異をポリヌクレオチドに導入して、全範囲の単一アミノ酸置換が各アミノ酸の位置で出現する一組の子孫ポリペプチドを作製するために専有コドンプライマー（縮退N,N,N配列を含む）の使用を提供する（遺伝子部位飽和変異導入（GSSM））。使用されるオリゴは、連続する第一の相同配列、縮退N,N,N配列および、ある特徴では（必ずというわけではない）第二の相同な配列を含む。そのようなオリゴヌクレオチドを使用することによって得られる下流の子孫翻訳生成物には、N,N,N配列の縮退は20の全てのアミノ酸のためのコドンを含むので、前記ポリペプチドに沿って各アミノ酸の位置で可能な全てのアミノ酸変化が含まれる。

ある特徴では、１つのそのような縮退オリゴ（１つの縮退N,N,Nカセットを含む）が、親のポリヌクレオチド鋳型中の本来のコドンの各々を全範囲のコドン置換に付すために用いられる。また別の特徴では、親のポリヌクレオチド鋳型中の少なくとも2つの本来のコドンを全範囲のコドン置換に付すために、少なくとも2つの縮退N,N,Nカセットが（同じオリゴまたは別個のオリゴで）用いられる。したがって、2つ以上のN,N,N配列を1つのオリゴ内に含ませ、2つ以上の部位でアミノ酸置換を導入することができる。この複数のN,N,N配列は連続していてもよいし、または1つ若しくは2つ以上のさらに別のヌクレオチド配列によって分離されてあってもよい。別の特徴では、付加および欠失の導入に役立つオリゴを単独またはN,N,N配列を含むコドンとともに用いて、アミノ酸付加、欠失および／または置換の任意の組合せまたは並べ換えを導入することができる。

【０１９６】

ある具体的な実施態様では、連続するN,N,Nトリプレット（すなわち縮退$(N,N,N)_n$配列）を含むオリゴを用いて、2つ以上の連続するアミノ酸の位置で同時に変異を導入することが可能である。

別の特徴では、本発明は、N,N,N配列よりも低い縮退度を有する縮退カセットの使用を提供する。例えば、いくつかの事例では、ただ1つのNを含む縮退トリプレット配列を（例えばオリゴで）用いることが所望されることがある（この場合、Nはトリプレットの第一、第二または第三の位置に存在することができる）。任意の組合せおよび並べ換えを含む他のいずれの塩基もトリプレットの残りの2つの位置において用いることができる。あるいはいくつかの事例では、縮退N,Ｎ,Ｎ,トリプレット配列を（例えばオリゴで）用いることが所望されることがある。

しかしながら、本発明で開示したような縮退配列（例えばN,N,G/TまたはN,N,G/Cトリプレット配列）を使用することはいくつかの理由で有利であることは理解されよう。ある特徴では、本発明は、ポリペプチド中の各々および全てのアミノ酸の位置で可能なアミノ酸の全範囲（合計20アミノ酸について）の置換が系統的且つ容易に得られる手段を提供する。したがって、100アミノ酸のポリペプチドについて、本発明は系統的にかつそこそこ容易に2000個の別個の種（すなわち各位置に付き20の可能なアミノ酸X 100個のアミノ酸の位置）を作製する方法を提供する。縮退N,N,G/TまたはN,N,G/Cトリプレット配列を含むオリゴの使用により、20の可能なアミノ酸をコードする32個の配列が提供されることは理解されよう。したがって、1つのそのようなオリゴを用いて親のポリヌクレオチド配列が飽和変異導入に付される反応容器では、20個の別個のポリペプチドをコードする32個の別個の子孫ポリヌクレオチドが生成される。対照的に、位置特異的変異導入において非縮退オリゴを使用した場合、反応容器に付きただ1個の子孫ポリペプチド生成物しか得られない

。

本発明はまた、非縮退オリゴの使用を提供する。ある特徴では、、前記オリゴは開示した縮退プライマーと一緒に用いることができる。いくつかの状況では、対象のポリヌクレオチドで特定の点変異を作製するためには、非縮退オリゴを用いることが有利であることは理解されよう。これによって、特定のサイレント点変異、対応するアミノ酸変化をもたらす点変異および終止コドンを生成させる点変異並びにポリペプチドフラグメントの対応する発現をもたらす手段が提供される。

【０１９７】

したがって、本発明のある特徴では、飽和変異導入の各反応容器は、20アミノ酸の全てが、親のポリヌクレオチドで変異が導入されたコドンの位置に対応する特定の１つのアミノ酸の位置で提示されるように、少なくとも20の子孫ポリペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含んでいる。飽和変異導入の各反応容器から生成された32倍の縮退子孫ポリペプチドはクローン増幅に付すことができ（例えば発現ベクターを用いて適切な大腸菌宿主でクローニングできる）、さらに発現スクリーニングに付すことができる。（親のポリペプチドと比較したとき）個々の子孫ポリペプチドが好ましい特性変化を示すことがスクリーニングによって同定されたら、前記の配列を決定して、前記配列に含まれる対応する好ましいアミノ酸置換を同定することができる。

本明細書に開示した飽和変異導入を用いて親のポリペプチド中の各々および全てのアミノ酸の位置に変異を導入するとき、好ましいアミノ酸変異が2つ以上のアミノ酸の位置で同定できることは理解されよう。これら好ましいアミノ酸置換の全てまたは部分が組み合わされた1つ以上の新規な子孫分子を作製することができる。例えば、あるポリペプチド中の3つのアミノ酸の位置の各々で2つの特定のアミノ酸の変異が同定された場合、前記入れ替えは各位置で3つの可能性（最初のアミノ酸から変化のないものおよび2つの好ましい変化のそれぞれ）を含む。したがって、合計３ｘ３ｘ３、または27の可能性が存在し、これらは以前に調べられた7つ－6つの単一点変異（すなわち3つの位置の各々で2つ）およびいずれの位置においても変化のないものを含む。

したがって、非限定的な具体例では、本発明は、また別の変異導入プロセスと組み合わされた飽和変異導入の使用を提供する。前記別の変異導入プロセスは例えば、ハイブリッドポリヌクレオチドを組換えおよび還元的再組合せによって生成することができるように2つ以上の関連ポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入するプロセスである。

遺伝子の配列全体に変異を導入すること以外にも、本発明は、変異導入を用いてポリヌクレオチド中の多数の塩基の各々を置換することができる。この場合、変異を導入される塩基の数は、ある特徴では15から100,000のいずれかである。したがって、分子の全ての位置に変異を導入する代わりに、全ての塩基または所定の数の塩基（ある特徴では合計で15から100,000になるサブセット）に変異を導入することができる。ある特徴では、ポリヌクレオチド配列の各々の位置または位置群に変異を導入するために、別々のヌクレオチドが用いられる。変異を導入される3つの位置から成る群はコドンであってもよい。前記変異は、変異原プライマー（異種カセットを含み、変異原カセットとも称される）を用いて導入することができる。例示的カセットは1つから500の塩基を有することができる。そのような異種カセットの各ヌクレオチドの位置はN、A、C、G、T、A/C、A/G、A/T、C/G、C/T、G/T、C/G/T、A/G/T、A/C/T、A/C/G、またはEで、ここでEはA、C、GまたはTではない任意の塩基である（Eはデザイナーオリゴと称することができる）。

【０１９８】

一般的な意味では、飽和変異導入は、変異を導入される所定のポリヌクレオチド配列（この場合変異を導入される配列は、ある特徴では長さが約15から100,000塩基である）中の完全な一組の変異原カセット（この場合各カセットはある特徴では長さが約1－500塩基である）に変異を導入することを含む。したがって、変異群（1から100変異に及ぶ）が変異を導入される各カセットに導入される。1回の飽和変異導入の実施中に、1つのカセットに導入される変異群は、第二のカセットに導入される第二の変異群とは異なっていても同じであってもよい。そのような群の例は、欠失、付加、特定コドン群および特定ヌクレオ

チド群である。
変異を導入される所定配列には完全な遺伝子、経路、cDNA、完全なオープンリーディングフレーム（ORF）および完全なプロモーター、エンハンサー、リプレッサー/トランスアクチベーター、複製起点、イントロン、オペレーターまたは任意のポリヌクレオチド機能群が含まれる。一般的には、この目的のための“所定配列”は、15塩基のポリヌクレオチド配列および15塩基から15,000塩基の長さのポリヌクレオチド配列のいずれかのポリヌクレオチドであり得る（本発明では特に15から15,000の間の全てのものが含まれる）。コドン群の選択で考慮しなければならないことには、縮退変異原カセットによってコードされるアミノ酸のタイプが含まれる。
変異原カセットに導入することができる変異群のある具体例では、本発明は特に縮退コドン置換およびそれによってコードされるポリペプチドライブラリーを提供する。前記は縮退オリゴを用いて提供され、前記オリゴは各位置で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、、14、15、16、17、18、19および20アミノ酸をコードする。
【０１９９】
合成連結再アッセンブリ（SLR）：
本発明は、“合成連結再アッセンブリ”、または簡潔に“SLR”、“定方向進化プロセス”と称される、新規なまたは変異した特性を有するポリペプチド（例えば本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼまたは抗体）を生成する非確率論的遺伝子改変系を提供する。
SLRは、オリゴヌクレオチドフラグメントを非確率論的に一緒に連結する方法である。この方法は、核酸構築ブロックがランダムにシャッフル、連結、またはキメラ化されるのではなく、非確率論的にアッセンブリングされるという点で確率的オリゴヌクレオチドシャッフリングとは異なる。例えば以下を参照されたい：米国特許6,773,900；6,740,506；6,713,282；6,635,449；6,605,449；6,573,776。ある特徴では、SLRは以下の工程を含む：（a）鋳型ポリヌクレオチドを提供する工程（前記鋳型ポリヌクレオチドは相同な遺伝子をコードする配列を含む）；（b）複数の構築ブロックポリヌクレオチドを提供する工程（前記構築ブロックポリヌクレオチドは鋳型ポリヌクレオチドとあらかじめ定められた配列で交差再アッセンブリングを生じるように考案され、構築ブロックポリヌクレオチドは前記相同な遺伝子の変種である配列および前記変種配列にフランキングする前記鋳型ポリヌクレオチドと相同な配列を含む）；（c）前記構築ブロックポリヌクレオチドが前記鋳型ポリヌクレオチドと交差再アッセンブリングして相同な遺伝子配列変種を含むポリヌクレオチドを生成できるように、構築ブロックポリヌクレオチドを鋳型ポリヌクレオチドと一緒にする工程。
SLRは、再編成を実施されるポリヌクレオチド間に高レベルの相同性が存在することを必要としない。したがって、本方法は、10^{100}を超える種々のキメラを含む子孫分子のライブラリー（またはセット）を非確率論的に作製するために用いることができる。SLRを用いて10^{1000}を超える種々の子孫キメラを含むライブラリーの作製に用いることができる。したがって、本発明の特徴は、意図的に選択された全体的なアッセンブリの順番にしたがって完成されたキメラ核酸分子セットを製造する非確率論的方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：互いに適合する連結可能な有用な末端を有する複数の特別な核酸構築ブロックを設計に従って作製する工程、および、設計した全体的なアッセンブリの順番が達成されるように前記核酸構築ブロックをアッセンブリングする工程。
【０２００】
アッセンブリングされる互いに適合する核酸構築ブロックの末端は、これらが前記構築ブロックをあらかじめ定めた順序で結合させることができるならば、このタイプの指定されたアッセンブリに対して“利用可能”であると考えられる。したがって、前記核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセンブリの順番は、連結させることができる末端の設計によって特定される。2つ以上のアッセンブリ工程が用いられる場合、核酸構築ブロックが結合される全体的アッセンブリの順番は、前記アッセンブリ工程の一連の順番によっ

て特定される。ある特徴では、アニールした構築片が酵素（例えばリガーゼ（例えばT4DNAリガーゼ））で処理され、前記構築片の共有結合が達成される。

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

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

【０２０１】

別の特徴では、前記連結再アッセンブリ方法は系統的に実施される。例えば、前記方法は、系統的に区画化された子孫分子のライブラリーを作製するために実施され、前記区画化ライブラリーは、系統的に（例えば1つずつ）スクリーニングすることができる区画を有する。換言すれば、本発明は、連続工程によるアッセンブリング反応の選択的および慎重な使用と併せて特定の核酸構築ブロックを選択的および慎重に使用することによって、特定の子孫生成物セットがいくつかの反応容器の各々で生成される仕組みの達成を提供する。前記によって系統的な調査およびスクリーニング方法の実施が可能になる。したがって、これらの方法は、潜在的に膨大な数の子孫分子をより小さなグループで系統的に調査することを可能にする。特に祖先分子間で低レベルの相同性しか存在しないときに、高度に柔軟性を有し、しかも網羅的で系統的な態様でのキメラ化の実施を可能にするその能力のために、これらの方法は膨大な数の子孫分子を含むライブラリー（またはセット）の生成を提供する。本発明の連結再アッセンブリの非確率論的性質のために、生成される子孫分子は好ましくは、意図的に選択された全体的なアッセンブリの順番を有する完成されたキメラ核酸分子のライブラリーを含む。飽和変異導入および最適化された定方向進化方法もまた種々の子孫分子種の生成に用いることができる。本発明は、境界点、核酸構築ブロックのサイズおよび数並びに結合の設計の選択に関して選択と制御の自由を提供することは理解されよう。さらにまた、分子間相同性の要求は、本発明を実施し易くするために大きく緩和されることもまた理解されよう。実際、境界点はほとんどまたはまったく分子間相同性がない領域でも選択できる。例えば、コドンの揺らぎのために（すなわちコドンの縮退のために）、対応する祖先鋳型で本来コードされるアミノ酸を変更することなく核酸中にヌクレオチド置換を導入することができる。あるいは、コドンを変更して本来のアミノ酸のコードを変更してもよい。本発明は、分子間相同性を有する境界点の出現傾向を高

めるために、したがって構築ブロック間で達成される結合数を高めるために（生成される子孫キメラ分子数の増加を可能にする）、前記のような置換の核酸構築ブロックへの導入を提供する。

【０２０２】

合成遺伝子再アッセンブリ：

ある特徴では、本発明は、合成遺伝子再アッセンブリ（例えばGeneReassembly、例えば米国特許6,537,776号を参照されたい）と称される非確率的方法を提供する。この方法は、核酸構築ブロックがランダムにシャッフル、連結、またはキメラ化されるのではなく非確率論的にアッセンブリングされるという点で確率論的シャッフリングと異なる。

合成遺伝子再アッセンブリ法は、シャッフリングされるポリヌクレオチド間に高レベルの相同性が存在することを必要としない。本発明は、10^{100}を超える異なるキメラを含む子孫分子のライブラリー（またはセット）を非確率論的に作製するために用いることができる。おそらく、合成遺伝子再アッセンブリを用いて10^{1000}を超える種々の子孫キメラを含むライブラリーを作製することができる。

したがって、ある特徴では、本発明は、意図的に選択された全体的なアッセンブリの順番にしたがって完成されたキメラ核酸分子セットを製造する非確率論的方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：互いに適合する連結可能な有用な末端を有する複数の特別な核酸構築ブロックを設計に従って作製する工程、および、設計した全体的なアッセンブリの順番が達成されるように前記核酸構築ブロックをアッセンブリングする工程。

ある特徴では、合成遺伝子再アッセンブリは以下の工程の方法を含む：1）1つ以上の先祖または親世代の鋳型から、少なくとも1つの点変異、付加、欠失および／またはキメラ化を達成するために変異を導入された子孫世代分子（ポリヌクレオチド配列を含む分子、例えばポリペプチドコード配列を含む分子を含む）を調製する工程；2）対象の少なくとも1つの特性（例えば酵素活性の改善）について、前記子孫世代分子を例えば高処理方法を用いてスクリーニングする工程；3）ある特徴では、親および／または子孫世代分子に関する構造情報および／または機能情報を入手しおよび／または目録を作成する工程；および4）ある特徴では、1）－3）の工程を繰り返す工程。ある特徴では、“コドン部位-飽和変異導入”と称されるもので、子孫世代ポリヌクレオチドが（例えば親ポリヌクレオチド鋳型から）生成される。前記子孫世代ポリヌクレオチドの各々は3つまでの連続する点変異の少なくとも１つのセット（すなわち新規コドンを含む種々の塩基）を有し、それによって全コドン（または同じアミノ酸をコードする縮退コドンの各ファミリー）が各コドンの位置で提示される。この子孫世代ポリヌクレオチドに対応して（および前記によってコードされて）、子孫ポリペプチドセットもまた生成され、その各々は少なくとも1つのアミノ酸の点変異を有する。ある特徴では、“アミノ酸部位-飽和変異導入”と称されるもので、当該ポリペプチドの全長にわたってそれぞれおよび全てのアミノ酸において、19の天然にコードされるポリペプチド形成アルファ-アミノ酸の各々でそれぞれ置換された変異体ポリペプチドが生成される。その結果、親ポリペプチドの全長にわたって、それぞれおよび全てのアミノ酸の位置について、原型アミノ酸を含む合計20個の別個の子孫ペプチドが得られ、20の天然にコードされるアミノ酸の代わりにまたは前記に加えてさらに別のアミノ酸が用いられる場合には、潜在的に21を超える別個の子孫ポリペプチドが得られる。

【０２０３】

したがって別の特徴では、このアプローチはまた、20の天然にコードされるポリペプチド形成アルファ-アミノ酸に加えておよび／またはそれらアルファ-アミノ酸と一緒に、他の希少なアミノ酸および／または天然ではコードされないアミノ酸およびアミノ酸誘導体を含む変異体の生成に有用である。さらに別の特徴では、このアプローチはまた、適切な宿主の天然または非改変コドン認識システムに加えておよび／またはそれらシステムと一緒に、改変、変異および／またはデザイナーコドン認識システムを（例えば1つ以上の改変tRNA分子を有する宿主細胞で）使用することによって変異体を生成するために有用である。

さらに別の特徴では本発明は組み換えに関する。より具体的には、本発明は、部分的な相同性を有する領域を含むポリヌクレオチド配列のin vivo再分類の方法によりポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製し、前記ポリヌクレオチドをアッセンブリングして少なくとも1つのポリヌクレオチドを形成し、さらに有用な特性を有するポリペプチドを製造するために前記ポリヌクレオチドをスクリーニングする方法に関する。

さらに別の特徴では、本発明は、従来技術による任意の分子特性（例えば酵素活性）または特性の組合せ、任意の突然変異（特に飽和変異導入を含む）によって達成された変化の影響に関して解析し目録を作成するために有用である。したがって、親ポリペプチド中の各アミノ酸を少なくとも19の可能な置換の各々に変化させることによる影響を決定するための包括的方法が提供される。前記方法は、親ポリペプチド中の各アミノ酸の当該ポリペプチドの測定可能な特性における一連の潜在的影響にしたがって、前記各アミノ酸の特徴を調べその目録を作成することを可能にする。

ある特徴では、核酸構築ブロックの方法によってキメラ子孫分子にイントロンを導入することができる。イントロンはしばしば両末端にコンセンサス配列を有し、それらを操作しやすくする。遺伝子スプライシングを可能にするということ以外にも、イントロンは、他の核酸に相同な部位を提供することによってさらに別の目的に有用で、相同組み換えを可能にする。この目的（および潜在的には他の目的）のために、イントロン導入用の大きな核酸構築ブロックを作製することが時に所望され得る。二本鎖オリゴを直接的化学合成によって容易に作製するにはサイズが大きすぎる場合は、そのような特殊な核酸構築ブロックはまた、3つ以上の一本鎖オリゴの直接的化学合成またはポリメラーゼ使用増幅反応によって作製することができる。

【０２０４】

アッセンブリングされる互いに適合する連結可能な核酸構築ブロックの末端は、これらが前記構築ブロックをあらかじめ定めた順序で結合させることができるならば、このタイプの指定されたアッセンブリに対して“利用可能”であると考えられる。したがって、ある特徴では、前記核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセンブリの順番は、連結させることができる末端の設計によって特定され、2つ以上のアッセンブリ工程が用いられる場合、核酸構築ブロックが結合される全体的アッセンブリの順番は、前記アッセンブリ工程の一連の順番によって特定される。本発明のある特徴では、アニールされた構築片が酵素（例えばリガーゼ（例えばT4DNAリガーゼ））で処理され、前記構築片の共有結合が達成される。

結合は、関与するオーバーハング中の全ヌクレオチドの一部を利用する態様で生じ得る。リガーゼ酵素で補強されて“ギャップ連結”または“ギャップ付き連結”と称され得る連結が形成されたならば、結合は（例えば形質転換宿主内で）特に活発に存続する。このタイプの結合は望ましくないバックグラウンド生成物の生成の一因となり得るが、そのような結合はまた有利に利用され、意図的な連結再アッセンブリによって生成子孫ライブラリーの多様性を高めることができる。ある種のオーバーハングは自己結合を生じる能力を有し、パリンドローム結合を形成する。結合は、リガーゼ酵素による処理で補強されるならば実質的に強化される。これらのオーバーハングの5’ホスフェートの欠如を有利に利用して、このタイプのパリンドローム自己結合を防止することができる。したがって、本発明は、化学的に製造または決定することができる、5'リン酸基を欠く核酸構築ブロックを提供する。あるいは、それらを例えばホスファターゼ酵素（例えばウシの腸内アルカリ性ホスファターゼ、CIPA）の処理によって除去し、連結アッセンブリ過程でパリンドローム自己結合を防止することができる。

【０２０５】

また別の特徴では、核酸構築ブロックの設計は、祖先核酸鋳型セットの配列の分析を基にして得られる（祖先核酸鋳型は完成したキメラ核酸分子の子孫セットを製造する基礎として機能する）。したがって、これら祖先核酸鋳型は、変異が導入される（すなわちキメラ化またはシャッフルされる）核酸構築ブロックの設計に役立つ配列情報源として機能する。

ある実施態様では、本発明は、関連遺伝子ファミリーおよびそれらによってコードされる関連生成物ファミリーのキメラ化を提供する。特にある実施態様では、コードされる生成物は酵素である。本明細書に記載した方法にしたがって、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼに変異が導入される。

したがって本発明の特徴にしたがえば、複数の祖先核酸鋳型（例えば本発明のポリヌクレオチド）の配列でアラインメントを実施して1つ以上の境界点が選択される。前記境界点は相同領域に位置することができる。前記境界点は作製される核酸構築ブロックの境界線を引くために用いることができる。したがって、祖先分子中で同定および選別された境界点は、子孫分子のアッセンブリにおける潜在的キメラ形成点として機能する。

典型的には、有用な境界点は、少なくとも2つの祖先鋳型によって共有される相同領域（少なくとも1つの相同なヌクレオチド塩基を含む）であるが、前記境界点は、祖先鋳型の少なくとも半分、祖先鋳型の少なくとも2/3、祖先鋳型の少なくとも3/4、および好ましくは、祖先鋳型のほぼ全てによって共有され得る。さらに好ましくは、より有用な境界点は、祖先鋳型の全部によって共有される相同領域である。

ある特徴では、遺伝子再アッセンブリ過程は網羅的ライブラリーを作製するために網羅的に実施される。換言すれば、全ての可能な順番で組み合わされた核酸構築ブロックが、完成キメラ核酸分子セットで提示される。同時に、各組合せにおけるアッセンブリの順番（すなわち完成したキメラ核酸の各々の配列の5’から3’方向における各構築ブロックのアッセンブリの順番）は意図的である（または非確率論的である）。本方法の非確率論的な性質のために、望ましくない副生成物の可能性は極めて低くなる。

【０２０６】

別の特徴では、前記方法は、系統的に（例えば1つずつ）スクリーニングすることができる区画を有する、例えば系統的に区画化されたライブラリーを作製するために系統的に実施される遺伝子再アッセンブリ過程を提供する。換言すれば、本発明は、連続工程によるアッセンブリング反応の選択的および慎重な使用と併せて特定の核酸構築ブロックを選択的および慎重に使用することによって、特定の子孫生成物セットがいくつかの反応容器の各々で生成される実験的な仕組みの達成を提供する。前記によって系統的な調査およびスクリーニング方法の実施が可能になる。したがって、これらの方法は、潜在的に膨大な数の子孫分子をより小さなグループで系統的に調査することを可能にする。

特に祖先分子間で低レベルの相同性しか存在しないときに、高度に柔軟性を有し、しかも網羅的で系統的な態様でのキメラ化の実施を可能にするその能力のために、本方法は膨大な数の子孫分子を含むライブラリー（またはセット）の生成を提供する。本発明の遺伝子再アッセンブリの非確率論的性質のために、生成される子孫分子は、好ましくは、意図的に選択された全体的なアッセンブリの順番を有する完成されたキメラ核酸分子のライブラリーを含む。特にある特徴では、そのように作製されたライブラリーは10^3を超える種々の子孫分子種から10^{1000}を超える種々の子孫分子種を含む。

ある特徴では、記載のように生成された完成キメラ核酸分子はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特徴にしたがえば、このポリヌクレオチドは遺伝子であり、前記は人工遺伝子でもよい。別の特徴にしたがえば、このポリヌクレオチドは遺伝子経路であり、前記は人工遺伝子経路でもよい。本発明は、本発明により作製された1つ以上の人工の遺伝子が人工の遺伝子経路（例えば真核生物（植物を含む）で作働できる経路）に取り込まれたものを提供する。

【０２０７】

また別の特徴では、構築ブロックが作製される工程の合成的な性質によって、ある特徴ではin vitro過程（例えば変異導入により）またはin vivo過程（例えば宿主生物の遺伝子スプライシング能を利用することにより）の後で除去することが可能なヌクレオチド（例えば1つ以上のヌクレオチドで、例えばコドンまたはイントロンまたは調節配列であり得る）を設計または導入することが可能になる。多くの事例で、有用な境界点を創出でき

るという潜在的な利点以外にも他の多くの理由からこれらヌクレオチドの導入はまた望ましいものであり得ることは理解されよう。

したがって、別の特徴にしたがえば、本発明によって、核酸構築ブロックを用いてイントロンを導入することができる。したがって、本発明にしたがえば、機能的イントロンを本発明の人工遺伝子に導入することができる。さらにまた本発明にしたがえば、機能的イントロンを本発明の人工遺伝子経路に導入することができる。したがって、本発明は、1つ（以上）の人工的に導入されたイントロンを含む人工遺伝子であるキメラポリヌクレオチドの生成を提供する。

したがって、本発明はまた、1つ（以上）の人工的に導入されたイントロンを含む人工遺伝子経路であるキメラポリヌクレオチドの生成を提供する。好ましくは、人工的に導入されたイントロンは、天然に存在するイントロンが遺伝子スプライシングで機能を発揮する態様とほぼ同じように遺伝子スプライシングのために1つ以上の宿主細胞で機能する。本発明は、組換えおよび／またはスプライシングのために宿主生物に導入されるべき人工イントロン含有ポリヌクレオチドの作製方法を提供する。

本発明を用いて作製された人工遺伝子はまた、また別の核酸との組換えのための土台として機能することができる。同様に、本発明を用いて作製された人工遺伝子経路はまた、また別の核酸との組換えのための土台として機能することができる。ある特徴では、前記組換えは、人工の、イントロン含有遺伝子と核酸（組換えのパートナーとして機能する）との間の相同領域によって促進されるか、または前記相同領域で生じる。ある特徴では、前記組換えパートナーはまた、本発明によって生成された核酸（人工遺伝子または人工遺伝子経路を含む）であり得る。組換えは、人工遺伝子内に人工的に導入された1つ（以上）のイントロンに存在する相同性領域によって促進されるか、または前記領域で生じる。

【０２０８】

本発明の合成遺伝子再アッセンブリの方法は、複数の核酸構築ブロック（その各々は好ましくは2つの連結可能末端を有する）を利用する。各核酸構築ブロックの2つの連結可能末端は2つの平滑端であるか（すなわち各々はヌクレオチドのオーバーハングをもたない）、また好ましくは１つの平滑端および１つのオーバーハングを有するか、またより好ましくは2つのオーバーハングを有することができる。

この目的のために有用なオーバーハングは3’側のオーバーハングでも5’側のオーバーハングでもよい。したがって、核酸構築ブロックは3’オーバーハングを有するか、また別には5’オーバーハングを有するか、また別には2つの3’オーバーハングまたは2つの5’オーバーハングを有することができる。核酸構築ブロックがアッセンブリングされて完成キメラ核酸分子が形成される全体的な順序は、意図的な実験設計によって決定され、ランダムではない。

ある特徴では、核酸構築ブロックは、2つの一本鎖核酸（一本鎖オリゴとも称される）を化学的に合成し、それらをアニールさせて二本鎖核酸構築物を形成することによって作製される。

二本鎖核酸構築ブロックのサイズは変動し得る。これら構築ブロックのサイズは小さくても大きくてもよい。構築ブロックの例示的サイズは1塩基対（いずれのオーバーハングも含まない）から100,000塩基対（いずれのオーバーハングも含まない）の範囲である。他の例示的なサイズ範囲もまた提供され、前記は1bpから10,000bp（その間の全ての整数値を含む）の下限から、2bpから100,000bp（その間の全ての整数値を含む）の上限を有する。

本発明で有用な二本鎖核酸構築ブロックを作製することができる多くの方法が存在し、これらは当業者に公知であり、さらに当業者は容易にこれらを実施できる。

【０２０９】

ある特徴にしたがえば、二本鎖核酸構築物は、先ず初めに2つの一本鎖核酸を作製し、さらにそれらをアニールさせて二本鎖核酸構築ブロック形成することによって作製される。二本鎖核酸構築ブロックの2つの鎖は、オーバーハングを形成するものは別として全てのヌクレオチドと相補的であり得る。したがって、オーバーハングを除いてミスマッチを

含まない。別の特徴にしたがえば、二本鎖核酸構築ブロックの2つの鎖は、オーバーハングを形成するものは除いて、全ヌクレオチドより少ないヌクレオチドにおいて相補的である。したがって、この特徴にしたがえば、二本鎖核酸構築物を用いてコドンの縮退を導入することができる。コドンの縮退は、本明細書に開示した部位飽和変異導入により、1つ以上のN,N,G/Tカセット、あるいは1つ以上のN,N,Nカセットを用いて導入される。

本発明のin vivo組換え方法は未知のハイブリッドプールまたは特定のポリヌクレオチド配列の対立遺伝子座プールで手当たり次第に実施することができる。しかしながら、前記特定のポリヌクレオチドのDNAまたはRNAの実際の配列を知ることは必須というわけではない。

遺伝子の混合集団内での組換えを用いるアプローチは、任意の有用なタンパク質、例えばインターロイキンI、抗体、tPAおよび成長ホルモンの作出に有用であり得る。このアプローチを用いて、変異した特異性または活性を有するタンパク質を作出することができる。前記アプローチはまた、ハイブリッド核酸配列、例えばプロモーター領域、イントロン、エクソン、エンハンサー配列、遺伝子の31の非翻訳領域または51の非翻訳領域の作出に有用であり得る。したがって、このアプローチを用いて発現率が増加した遺伝子を作出することができる。このアプローチはまた、反復DNA配列の研究で有用である。最後に、このアプローチはリボザイムまたはアプタマーに変異を導入するために有用であり得る。

ある特徴では、本明細書に開示した発明は、高度に複雑な直鎖状配列（例えばDNA、RNAまたはタンパク質）の組換えによる定方向分子進化を可能にする、還元的再組合せ、組換えおよび選別サイクルを繰り返して使用することを意図する。

【０２１０】

最適化定方向進化系：

本発明は、新規なまたは変異した特性をもつポリペプチド、例えば本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、または抗体を生成するために、“最適化定方向進化系”と称される非確率論的遺伝子改変系を提供する。最適化定方向進化系は、組換えによる定方向分子進化を可能にする、還元的再組合せ、組換えおよび選別サイクルを繰り返して使用することを意図する。最適化定方向進化は進化させたキメラ配列の大きな集団の作出を可能にし、この場合、前記作出集団には予め定められた数の交差事象を含む配列がきわめて豊富に存在する。

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

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

【０２１１】

キメラ子孫ポリヌクレオチドを作製する１つの方法は、それぞれの親の配列のフラグメ

ントまたは部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することである。各オリゴヌクレオチドは、好ましくは、固有の重複領域を含み、その結果、前記オリゴヌクレオチドを一緒に混合することによって、各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順番でアッセンブリングされた新規な変種が生成される。更なる情報は、例えばUSSN09/332,835；米国特許6,361,974号で見出すことができよう。

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

【０２１２】

したがって、親変種セットの数、各変種に対応するオリゴヌクレオチドの数、および連結反応の各工程における各変種の濃度が与えられたならば、確率濃度関数（probability density function (PDF)）を決定して連結反応の各工程で生じる可能性がある交差事象をもつ集団を予測することができる。PDFの決定の根拠となる統計学および数学は以下に記載される。これらの方法を用いることによって、前記の確率濃度関数を決定することができ、したがって個々の連結反応から生じる予め定めた数の交差事象のためにキメラ子孫集団の濃度を高めることができる。さらにまた、交差事象の標的数は予め定めることができ、続いて、予め定めた交差事象数に集中する確率濃度関数をもたらす連結反応の各工程における各親オリゴヌクレオチドの出発量を算出するために前記系をプログラミングすることができる。これらの方法は、組換えによりポリペプチドをコードする核酸の定方向分子進化を可能にする還元的再組合せ、組換えおよび選別の反復サイクルを用いることを意図する。前記の系は進化したキメラ配列の大集団の作製を可能にし、前記作製された集団は、予め定めた数の交差事象を含む配列が顕著に濃縮されている。交差事象は、一方の親変種からもう一方の親変種へ配列のシフトが生じるキメラ配列中の点である。そのような点は通常は2つの親に由来するオリゴヌクレオチドが一緒に連結されて単一の配列を形成する結合部に存在する。前記方法は、最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象に富むことができるようにオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にする。これによって、予め定めた数の交差事象を含むキメラ変種の選択に対してより大きな制御が提供される。

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

ある特徴では、前記方法は、それぞれの親の配列のフラグメントまたは部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することによってキメラ子孫ポリヌクレオチド配列を作出する。各オリゴヌクレオチドを一緒に混合することによって各オリゴヌクレオチドフラグメン

トが正しい順番でアッセンブリングされた新規な変種が生じるように、各オリゴヌクレオチドは好ましくは固有のオーバーラップ領域を含む。USSN09/332,835をまた参照されたい。

【０２１３】

交差事象の決定：

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

【０２１４】

反復工程：

本発明の実施に際して、これらの工程は何度も繰り返すことができる。例えば、変異したまたは新規なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ表現型をもたらすある核酸（または所定の核酸）が同定され、再単離され、再改変され、さらに活性について再試験される。この過程は、所望の表現型が生成されるまで何度も繰り返すことができる。例えば、完全な生化学的同化作用または異化作用経路（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を含む）を細胞内に高度な操作により生成することができる。

同様に、特定のオリゴヌクレオチドが所望の属性（例えば新規なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ表現型）について全く影響を与えないと決定されたならば、除去される配列を含むより大きな親オリゴヌクレオチドを合成することによって前記オリゴヌクレオチドは変数として除去することができる。配列をより大きな配列内に取り込むことによって一切の交差事象が防止されるので、子孫ポリヌクレオチド中にはこの配列の変型はもはや全く存在しないであろう。どのオリゴヌクレオチドが所望の属性と最も関係があり、どのオリゴヌクレオチドが無関係であるかの決定の反復実施は、特定の属性または活性を提供する可能性があるタンパク質の全てについてより効率的な探索を可能にする。

【０２１５】

in vivoシャッフリング：

分子のin vivoシャッフリングは、本発明のポリペプチド（例えば抗体、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼなど）の変種を提供する本発明の方法で使用される。in vivoシャッフリングは、マルチマーを組み換えを生じる細胞の天然の特性を利用して実施することができる。in vivo組換えは分子の多様性をもたらす主要な天然の経路を提供してきたが、一方遺伝子組み換えは以下の工程を含む比較的複雑な過程のままである：1）相同性の認識；2）鎖の切断、鎖の侵襲、および組換えキアズマの生成をもたらす代謝工程；および最後に3）別個の組み換え分子へのキアズマの解離。キアズマの形成は相同な配列の認識を必要とする。別の特徴では、本発明は、少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび第二のポリヌクレオチドからハイブリッドポリヌクレオチドを製造する方法を提供する。本発明を用い、少なくとも1つの部分的な配列相同性領域を共有する少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび第二のポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入することによってハイブリッドヌクレオチドを生成することができる。前記の部分的な配列相同性を有する領域は、ハイブリッドポ

リヌクレオチドを生成する配列再編成を生じる過程を促進する。本明細書で用いられる“ハイブリッドポリヌクレオチド”という用語は、本発明の方法により得られる、少なくとも2つの原型ポリヌクレオチド配列由来の配列を含む任意のヌクレオチド配列である。そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、DNA分子間の配列統合を促進する分子間組換え事象により生じる。さらにまた、そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、DNA分子内のヌクレオチド配列を変異させるために反復配列を利用する分子内還元的再組合せ方法により生成することができる。

【０２１６】

in vivo再組合せは、包括的に“組換え”と称される“分子間”プロセス（細菌では一般的に“RecA-依存”現象とみなされる）に集約される。本発明は、配列を再結合し再組合せを生じる宿主細胞の組換え過程、または細胞内の擬似反復配列の複雑度を欠失によって減少させる還元的過程を仲介する細胞の能力を必要とするであろう。“還元的再組合せ”のこの過程は“分子内”Rec-A非依存過程によって生じる。

したがって、本発明の別の特徴では、新規なポリヌクレオチドは、還元的再組合せ過程によって作製することができる。本方法は、連続配列を含む構築物の生成（原型コード配列）、それらの適切なベクターへの挿入およびそれに続く適切な宿主へのそれらの導入を必要とする。個々の分子実体の再組合せは、相同性領域を有する構築物中の連続配列間または擬似反復ユニット間のコンビナトリアルプロセスによって生じる。再組合せプロセスは組み換えおよび／または反復配列の複雑度および程度の減少をもたらし、新規な分子種の生成をもたらす。多様な処理を適用して、再組合せの速度を速めることができる。これらの処理には、紫外線またはDNA損傷化学物質による処理および／または“遺伝的不安定性”レベルの強化を示す宿主細胞株の使用が含まれよう。したがって、再組合せプロセスは相同な組換えまたは自身の進化を指令する擬似反復配列の天然の特性を必要とすることがある。

反復配列または“擬似反復”配列は遺伝的不安定性において役割を果たす。本発明では、“擬似リピート”はそれらの原型ユニット構造に制限されないリピートである。擬似反復ユニットは構築物中で一連の配列（すなわち同様な配列の連続ユニット）として提示され得る。いったん連結されると、連続配列間の結合点は本質的に見えなくなり、生成された構築物の擬似反復特性は今や分子レベルで連続性である。細胞の欠失プロセスは、生成構築物が擬似反復配列間の複雑度を低下させるために実施される。擬似反復ユニットは、スリップ事象を発生させることができる鋳型のレパートリーを実際的には無制限に提供する。したがって、擬似リピートを含む構築物は、擬似反復ユニット内の実質的にはいずれの場所でも欠失（および潜在的には挿入）事象が発生できるように十分な分子の弾性を効果的に提供する。

擬似反復配列が全て同じ向き（例えばヘッド-テール連結またはその逆）で連結されるとき、細胞は個々のユニットを区別することができない。結果的に、還元プロセスが配列全体で発生することが可能である。対照的に、例えばユニットが頭尾連結ではなく頭頭連結で提示されるとき、本発明は近傍のユニットの末端の輪郭を明らかにし、その結果欠失形成は分離されてある別個のユニットが失われるのを促進するであろう。したがって、配列が同じ向きで存在することは本発明の方法で好ましいであろう。擬似反復配列のランダムな向きは再組合せの効率の低下をもたらすが、前記配列の一致した向きは最高の効率を提供するであろう。しかしながら、同じ向きの連続配列の数が減少することによって効率は低下するが、それによって新規な分子の効果的な回収のために十分な弾性はなお提供され得る。構築物は、より高い効率を可能にするために同じ向きの擬似反復配列を用いて作製することができる。

【０２１７】

配列は、以下を含む多様な方法のいずれかを用いて頭尾の向きでアッセンブリすることができる：

a）ポリ-Aヘッドおよびポリ-Tテールを含むプライマー（一本鎖として作製されたとき、方向性を提供する）を利用することができる。これは、プライマーの最初の数塩基をRN

Aから作製（したがってRNAse Hで容易に除去できる）することにより達成される。

b）固有の制限切断部位を含むプライマーを利用することができる。マルチ部位、固有配列一式、並びに反復合成および連結工程が要求されるであろう。

c）プライマーの内部数塩基をチオール化し、さらにエキソヌクレアーゼを用いて適切なテールを有する分子を生成することができる。

再組合せされた配列の回収は反復指数（RI）が低下したクローニングベクターの同定を必要とする。続いて再組合せされたコード配列を増幅によって回収することができる。生成物を再クローニングして発現させる。RIが低下したクローニングベクターの回収は以下によって実施することができる：

1）複雑度が低下したときにのみ構築物が安定的に維持されるベクターの使用。

2）物理的方法による短縮ベクターの物理的回収。この場合には、クローニングベクターは、標準的なプラスミド単離方法によって回収され、アガロースゲル上、または標準的な方法を使用する低分子量カットオフによるカラムによってサイズ分画される。

3）挿入物のサイズが低下したときに選別することができる分断遺伝子を含むベクターの回収。

4）発現ベクターおよび適切な選別を用いる直接選別技術の使用。

関連生物から得られたコード配列（例えば遺伝子）は高度な相同性を示すことが可能で、極めて多様なタンパク質生成物をコードし得る。このような配列タイプは、擬似リピートとして本発明で特に有用である。下記に例示する例はほぼ同一の原型コード配列（擬似リピート）の再組合せを示しているが、しかしながら本方法はそのようなほぼ同一のリピートに限定されない。

【０２１８】

下記の例は本発明の方法を提示する。3つの固有種に由来するコード核酸配列（擬似リピート）が記載される。各配列は別個の一組の特性を有するタンパク質をコードする。前記配列の各々はただ1つの塩基対または数塩基対が配列内の固有の位置で異なっている。擬似反復配列は別々にまたは包括的に増幅され、ランダム連結によりアッセンブリされ、それによって連結分子集団において全ての可能な入れ替えおよび組合せが入手できる。擬似リピートの数はアッセンブリ条件によって制御することができる。構築物中の擬似反復ユニットの平均数は反復指数（RI）と定義される。

いったん形成されたら、構築物は公表されているプロトコルにしたがってアガロースゲルでサイズ分画し（または分画せずに）、クローニングベクターに挿入し、適切な宿主細胞にトランスフェクトすることができる。続いて細胞を増殖させ、“還元的再組合せ”を起こさせる。所望する場合は、還元的再組合せ過程の速度はDNA損傷の導入によって速めることができる。RIの低下が“分子内”メカニズムにより反復配列間の欠失形成によって仲介されるか、または“分子間”メカニズムにより組換え様事象によって仲介されるかは重要ではない。最終的な結果は分子の再組合せによる全ての可能な組合せを得ることである。

ある特徴では（場合によって）、本方法はシャッフルされたプールのライブラリーメンバーをスクリーニングし、予め定めた巨大分子（例えばタンパク質性レセプター、オリゴ糖、ビリオンまたは多の予め定めた化合物もしくは構造）と結合または相互作用するか、または前記との特定の反応を触媒する能力を有する個々のシャッフルされたライブラリーメンバー（例えば酵素の触媒ドメイン）を同定するさらに別の工程を含む。

そのようなライブラリーから同定されたポリペプチドを治療、診断、研究および関連する目的（例えば触媒、水溶液の浸透圧を高めるための溶質）に用いることができ、および／または1つ以上の更なるシャッフリングおよび／または選別サイクルに付すことができる。

【０２１９】

別の特徴では、組換えもしくは再組合せ前またはそれらの間に、原型ポリヌクレオチドへの変異の導入を促進する薬剤または過程に本発明の方法によって生成されたポリヌクレオチドを付すことが意図される。そのような変異の導入は生成されるハイブリッドポリヌ

クレオチドおよびそれらからコードされるポリペプチドの多様性を高めるであろう。変異導入を促進する薬剤または過程には以下が含まれる得る（ただしこれらに限定されない）：(+)-CC-1065または合成類似体、例えば(+)-CC-1065-(N3-アデニン)（以下を参照されたい：Sun and Hurley, 1992）；DNA合成を阻害することができるN-アセチル化または脱アセチル化-4’-フルオロ-4-アミノビフェニル付加物（例えば以下を参照されたい：van de Poll et al. (1992)）；またはDNA合成を阻害することができるN-アセチル化または脱アセチル化-アミノビフェニル付加物（さらにまた例えば以下を参照されたい：van de Poll et al. (1992), pp.751-758）；三価クロム、三価クロム塩、DNA複製を阻害することができる多環式芳香族炭化水素（PAH）DNA付加物、例えば7-ブロモメチル-ベンゾ[a]アントラセン（“BMA”）、トリス（2,3-ジブロモプロピル）ホスフェート（“トリス-BP”）、1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン（“DBCP”）、2-ブロモアクロレイン（2BA）、ベンゾ[a]ピレン-7,8-ジヒドロジオール-9-10-エポキシド（“BPDE”）、白金(II)ハロゲン塩、N-ヒドロキシ-2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]-キノリン（“N-ヒドロキシ-IQ”）およびN-ヒドロキシ-2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-f]-ピリジン（“N-ヒドロキシ-PhIP”）。PCR増幅を遅くするかまたは停止させるための例示的手段は、紫外線(+)-CC-1065および(+)-CC-1065-(N3-アデニン)から成る。特に包含される手段は（ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプール由来のDNA付加物を含む）DNA付加物またはポリヌクレオチドであり、前記は、更なる処理の前にポリヌクレオチドを含む溶液を加熱することを含む過程によって遊離または除去することができる。

また別の特徴では、本発明は、生物学的活性を有する組換えタンパク質を製造する方法を意図し、前記方法はハイブリッドまたは再組合せされたポリヌクレオチドの生成を提供する本発明の条件下で、野生型タンパク質をコードする二本鎖鋳型ポリヌクレオチドを含むサンプルを処理することを含む。

【０２２０】

配列変種の作製：

本発明はまた、本発明の核酸（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）配列の変種を作製するさらに別の方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸およびポリペプチドを用いてトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを単離するさらに別の方法を提供する。ある特徴では、本発明は本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼコード配列（例えば遺伝子、cDNAまたはメッセージ）の変種を提供する。前記変種は、任意の手段（例えばランダムもしくは確率的方法、または非確率的もしくは上記に記載した“定方向進化”方法を含む）によって変異させることができる。

前記単離変種は天然に存在するものでもよい。変種はまたin vitroで生成することもできる。変種は遺伝子工学技術、例えば部位特異的変異導入、化学的ランダム変異導入、エキソヌクレアーゼIII欠失方法および標準的クローニング技術を用いて生成することができる。あるいは、そのような変種、フラグメント、類似体または誘導体は化学的合成または改変方法を用いて生成することができる。変種を作製する他の方法もまた当業者にはよく知られていよう。前記には、天然の単離物から得られた核酸配列を改変して、それらの工業、医学、実験室（研究）、医薬、食品および飼料並びに食品および飼料サプリメントでのプロセッシング並びに他の適用およびプロセスにおけるそれらの価値を向上させる特徴をもつポリペプチドをコードする新規な核酸を生成する方法が含まれる。そのような方法では、天然の単離物から得られた配列に対して1つ以上のヌクレオチドの相違を有する多数の変種配列が生成され、特徴が決定される。これらのヌクレオチドの相違は、天然の単離物の核酸によってコードされるポリペプチドに対してアミノ酸変化をもたらすことができる。

【０２２１】
例えば、変種は変異性PCRを用いて作製することができる。変異性PCRでは、PCRは、DNAポリメラーゼの複写信頼性が低く、高率の点変異がPCR生成物の全長にわたって得られるような条件下で実施される。変異性PCRは例えば以下に記載されている：D.W. Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989); R.C. Caldwell & G.F. Joyce, PCR Methods Applic. 2:28-33 (1992)。簡単に記せば、前記の方法では、変異を導入される核酸は、PCRプライマー、反応緩衝液、$MgCl_2$、$MnCl_2$、Taqポリメラーゼおよび適切な濃度のdNTPと混合され、PCR生成物の全長にわたって高率の点変異が達成される。例えば、前記反応は、20fmoleの突然変異を導入されるべき核酸、30pmoleの各PCRプライマー、反応緩衝液（50mMのKCL、10mMのトリス（pH8.3）および0.01％のゼラチンを含む）、7mMのMgCl２、0.5mMのMnCl２、5単位のTaqポリメラーゼ、0.2mMのdGTP、0.2mMのdATP、1mMのdCTPおよび1mMのdTTPを用いて実施される。PCRでは、94℃1分、45℃1分および72℃1分の30サイクルが実施される。しかしながら、これらのパラメーターは適宜変動させることができることは理解されよう。変異核酸は適切なベクターでクローニングされ、前記変異核酸によってコードされたポリペプチドの活性が評価される。
変種はまた、任意のクローニングされた対象DNAで位置特異的変異を生じるオリゴヌクレオチド特異的変異導入を用いて生成することができる。オリゴヌクレオチド変異導入は例えば以下に記載されている：Reidhaar-Olson (1988) Science 241:53-57。簡単に記せば、前記の方法では、クローン化DNAに導入されるべき1つ以上の変異をもつ複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが合成され、変異を導入される前記クローン化DNAに挿入される。変異を導入されたDNAを含むクローンを回収し、それらがコードするポリペプチドの活性を評価する。
【０２２２】
変種を生成するまた別の方法はアッセンブリPCRである。アッセンブリPCRでは、小さなDNAフラグメント混合物からPCR生成物をアッセンブリングすることが必要である。多数の様々なPCR反応が同じバイアル中で並行して生じ、1つの反応の生成物が別の反応の生成物をプライミングする。アッセンブリPCRは例えば米国特許第5,965,408号に記載されている。
変種を生成するまた別の方法はセクシュアルPCR変異導入である。セクシュアルPCR変異導入では、配列相同性によるDNA分子のランダムなフラグメント化とそれに続くPCR反応におけるプライマーの伸長による交差の固定の結果として、強制された相同組換えが、異なるが高度の相関性を有するDNA配列をもつDNA分子間においてin vitroで生じる。セクシュアルPCR変異導入は例えば以下に記載されている：Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751。簡単に記せば、前記の方法では、組換えられるべき複数の核酸をDNaseで消化して平均サイズが50－200ヌクレオチドのフラグメントを生成する。所望の平均サイズをもつフラグメントを精製し、PCR混合物に再懸濁する。PCRは、前記核酸フラグメント間の組換えが促進される条件下で実施される。PCRは、例えば以下によって実施できる:前記精製フラグメントを10－30ng/μＬの濃度で溶液（0.2Mの各dNTP、2.2mMの$MgCl_2$、50mMのKCl、10mMのトリス塩酸（pH9.0）および0.1％トリトンX-100）に再懸濁する。100μＬの反応混合物につき2.5単位のTaqポリメラーゼを添加し、PCRを以下の方式を用いて実施する：94℃60秒、94℃30秒、50－55℃30秒、72℃30秒（30－45回）および72℃で5分。しかしながら前記パラメーターは適宜変動させることができることは理解されよう。いくつかの特徴では、オリゴヌクレオチドをPCR反応に含ませることができる。他の特徴では、DNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントをPCR反応の最初のセットで用い、Taqポリメラーゼをその後のPCR反応セットで用いることができる。組換え配列を単離し、それらがコードするポリペプチドの活性を評価する。
【０２２３】
変種はまたin vivo変異導入によって生成することができる。いくつかの特徴では、対象の配列を細菌株（例えば大腸菌株）で増殖させることによって、対象配列中でランダム変異が生成される。前記大腸菌株はDNA修復経路の1つ以上に変異を含む。そのような“ミ

ューテーター”株は野生型の親よりも高いランダム変異率を有する。これらの株の1つでDNAを増殖させることによって、最終的にはDNA内部にランダム変異が生成されるであろう。in vivo変異導入に使用するために適したミューテーター株は例えばPCT公開広報WO91/16427（1991年10月31日公開、発明の名称”Methods for Phenotype Creation from Multiple Gene Populations”）に記載されている。

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

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

【０２２４】

いくつかの特徴では、変種はエクスポネンンシャルアンサンブル変異導入を用いて生成される。エクスポネンンシャルアンサンブル変異導入は、高い割合の固有で機能的な変異体を含むコンビナトリアルライブラリーを作製する方法である。前記変異導入では、残基の小グループが並行して任意抽出され、機能的タンパク質を生じるアミノ酸がそれぞれ変更された位置で同定される。エクスポネンンシャルアンサンブル変異導入は例えば以下に記載されている：Delagrave (1993) Biotechnology Res. 11:1548-1552。ランダムな変異導入および部位特異的変異導入は例えば以下に記載されている：Arnold (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455。

いくつかの特徴では変種はシャッフリングの方法によって生成される。前記では、別個のポリペプチドをコードする複数の核酸の部分が融合され、例えば米国特許第5,965,408号（1996年7月9日出願、発明の名称“Methods of DNA Reassembly by Interrupting Synthesis”）、および同第5,939,250号（1996年5月22日出願、発明の名称”Production of Enzymes Having Desirede Activities by Mutagenesis”）に記載されたようなキメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列が生成される。

本発明のポリペプチドの変種は、本発明の配列のポリペプチドの1つ以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）で置換されれた変種であり得る。さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされるものでも、そうでないものでもよい。

保存的置換は、同様な特徴を有する別のアミノ酸によってポリペプチド内のあるアミノ酸が置換されるものである。保存的置換として典型的に観察されるものは以下の置換である：脂肪族アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）の別の脂肪族アミノ酸による置換；セリンのスレオニンによる置換またはその逆；酸性残基（例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸）の別の酸性残基による置換；アミド基をもつ残基（例えばアスパラギンおよびグルタミン）の別のアミド基をもつ残基による置換；塩基性残基（例えばリジンおよびアルギニン）の別の塩基性残基による交換；および芳香族残基（例えばフェニルアラニン、チロシン）の別の芳香族残基による置換。

他の変種は、本発明のポリペプチドの1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含む変種である。

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

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

いくつかの特徴では、フラグメント、誘導体および類似体は、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列と同じ生物学的機能または活性を保持している。他の特徴では、前記フラグメント、誘導体または類似体は、そのプロプロテイン部分の切断によって前記フラグメント、誘導体または類似体が活性化されて活性なポリペプチド生成することができるようなプロプロテインを含む。

【０２２５】

宿主細胞において高レベルのタンパク質発現を達成するコドンの最適化：

本発明は、コドン使用頻度を改変するためにトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼコード核酸を改変する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸のコドンを改変して宿主におけるその発現を増加または減少させる方法を提供する。本発明はまた、宿主細胞でその発現を高めるように改変されたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸、そのように改変されたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、並びに前記改変トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を製造する方法を提供する。前記方法は、“非優先”または“低優先”コドンをトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼコード核酸中で同定し、さらにこれら非優先もしくは低優先コドンの1つ以上を、前記コドンと同じアミノ酸をコードする“優先コドン”で置き換えることを含み、核酸内の少なくとも1つの非優先または低優先コドンは同じアミノ酸をコードする優先コドンによって置き換えられいる。優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度に提示されるコドンであり、非優先または低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである。

本発明の核酸、発現カセットおよびベクターを発現させる宿主細胞には細菌、酵母、真菌、植物細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞が含まれる。したがって、本発明はこれら全ての細胞でコドン使用頻度を最適化する方法、コドン改変核酸およびコドン改変核酸によって生成されるポリペプチドを提供する。例示的な宿主細胞には、グラム陰性細菌（例えば大腸菌およびシュードモナス・フルオレセンス）；グラム陽性細菌（例えばラクトバチルス・ガッセリ（Lactobacillus gasseri）、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）、ラクトコッカス・クレモリス（Lactococcus cremoris）、枯草菌（Bacillus subtilis））が含まれる。例示的な宿主細胞にはまた、真核生物、例えば種々の酵母、例えばサッカロミセス種（サッカロミセス・セレビシアエ、、シゾサッカロミセス・ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）およびクルイベロミセス・ラクチス（Kluyveromyces lactis）、ハンセヌラ・ポリモルファ（Hansenula polymorpha）、アスペルギルス・ニゲルを含む）、並びに哺乳動物細胞および細胞株、並びに昆虫細胞および細胞株が含まれる。他の例示的な宿主細胞には、細菌細胞（例えば大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、バチルス・セレウス（Bacillus cereus）、ネズミチフス菌、並びにシュードモナス、ストレプトミセスおよびスタフィロコッカス属の種々の種）、菌類細胞（例えばアスペルギルス）、酵母（例えばピキア、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、シュワンニオミセスの任意の種（ピキア・パストリス、サッカロミセス・セレビシアエまたはシゾサッカロミセス・ポンベを含む））、昆虫細胞（例えばドロソフィラS2およびスポドプテラSf9）、動物細胞（例えばCH、COSまたはボウズメラノーマ）

およびアデノウイルスが含まれる。適切な宿主の選択は当業者の技量の範囲内である。したがって、本発明はまた、これら生物および種での発現のために最適化された核酸およびポリペプチドを含む。

【０２２６】

例えば、細菌細胞から単離されたトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸のコドンは、前記トランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが由来した細菌とは異なる細菌細胞、酵母、菌類、植物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞で前記核酸が最適に発現されるように改変される。コドンを最適化する方法は当分野で周知であり、例えば以下を参照されたい：米国特許5,795,7号；Baca (2000) Int. J. Parasitol. 30:113-118; Hale (1998) Protein Expr. Purif. 12:185-188；Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253。さらにまた以下を参照されたい：Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253（マウス系におけるコドンの最適化を記載）；Outchkourov (2002) Protein Expr. Purif. 24:18-24（酵母におけるコドンの最適化を記載）；Feng (2000) Biochemistry 39:15339-15409（大腸菌におけるコドンの最適化を記載）；Humphreys (2000) Protein Expr. Purif. 20:252-264（大腸菌における分泌に影響するコドン使用頻度の最適化を記載）。

【０２２７】

非ヒトトランスジェニック動物

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトされたもしくは形質転換された細胞を含む非ヒトトランスジェニック動物を提供する。本発明はまた、前記非ヒトトランスジェニック動物の作製方法および使用方法を提供する。

前記トランスジェニック非ヒト動物は、本発明の核酸を含む、例えばヤギ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、乳牛、ラット、ウマ、イヌ、魚およびマウスであり得る。これらの動物は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を調べるための例えばin vivoモデルとして、またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性をin vivoで変化させる薬剤をスクリーニングするためのモデルとして用いることができる。非ヒトトランスジェニック動物で発現されるべきポリペプチドのコード配列は、構成的であるように、または組織特異的、発育特異的もしくは誘導性転写調節因子の制御下にあるように設計することができる。非ヒトトランスジェニック動物は当分野で公知の任意の方法を用いて設計および作製することができる。例えば以下を参照されたい：US Patent No. 6,211,428; 6,187,992; 6,156,952; 6,118,044; 6,111,166; 6,107,541; 5,959,171; 5,922,854; 5,892,070; 5,880,327; 5,891,698; 5,639,940; 5,573,933; 5,387,742; 5,087,571（形質転換細胞および卵並びにトランスジェニックマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ヤギ、魚および乳牛の作製および使用を記載）。さらにまた例えば以下を参照されたい：Pollock (1999) J. Immunol. Methods 231:147-157（トランスジェニックな酪農動物のミルク中の組換えタンパク質の製造について記載）；Baguisi (1999) Nat. Biotechnol. 17:456-461（トランスジェニックヤギの作製を示す）。米国特許第6,211,428号は、DNA配列を含む核酸構築物をその脳で発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物の作製および使用について記載している。米国特許第5,387,742号は、クローン化組換えまたは合成DNA配列の受精マウス卵への注入、前記注入卵の偽妊娠雌への移植および、アルツハイマー病関連タンパク質をその細胞が発現するトランスジェニックマウスの妊娠期間満了までの発生について記載している。米国特許第6,187,992号は、そ

のゲノムがアミロイド前駆体（APP）をコードする遺伝子の破壊を含むトランスジェニックマウスの作製および使用を記載している。

“ノックアウト動物”もまた本発明の方法の実施に用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明のトランスジェニックまたは改変動物は“ノックアウト動物”、例えば内因性遺伝子を発現しないように操作された“ノックアウトマウス”を含み、前記内因性遺伝子は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、または本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む融合タンパク質を発現する遺伝子で置き換えられている。

【０２２８】

トランスジェニック植物および種子

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド(例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトもしくは形質転換された細胞を含むトランスジェニック植物および種子を提供する。本発明はまた、本発明の核酸および／またはポリペプチド（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）を含む植物生成物または副産物、例えば果実、油、種子、葉、抽出物など（任意の植物部分を含む）を提供する（この場合、本発明の核酸またはポリペプチドは前記植物、植物部分、種子などにとって異種である）。前記トランスジェニック植物（植物部分、果実、種子などを含む）は双子葉植物でもまたは単子葉植物でもよい。本発明はまた前記トランスジェニック植物および種子の製造方法および使用方法を提供する。本発明のポリペプチドを発現するトランスジェニック植物または植物細胞は当分野で公知の任意の方法にしたがって構築できる。例えば米国特許第6,309,872号を参照されたい。

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

【０２２９】

本発明の核酸を用いて、所望の属性を本質的に任意の植物（例えば澱粉生成植物、例えばジャガイモ、コムギ、イネ、オオムギなど）に付与することができる。本発明の核酸を用いて植物の代謝経路を操作し、宿主のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ発現を最適化または変化させることができる。本発明の核酸は植物のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を変化させることができる。あるいは、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例え

ばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをトランスジェニック植物の製造に用いて、前記植物が天然に産生することができない化合物を製造することができる。これによって製造コストを下げるか、または新規な生成物を製造することができる。

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

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

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

【０２３０】

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

【０２３１】

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

のために誘導する（通常は体細胞胚形成による）。この技術はいくつかの穀類種（トウモロコシおよびイネを含む）で成功した。

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

【０２３２】

あるいは、核酸（例えば発現構築物）を適切なT-DNAフランキング領域と結合させて、一般的なアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）宿主ベクターに導入することができる。アグロバクテリウム・ツメファシエンスのビルレンス機能は、細胞が前記細菌に感染したとき植物細胞DNAに前記構築物および隣接するマーカーの挿入を誘導するであろう。アグロバクテリウム・ツメファシエンス仲介形質転換技術（バイナリーベクターの無毒化および使用を含む）は学術文献に詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい：Horsch (1984) Science 233:496-498；Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803；Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995)。A.ツメファシエンスの細胞中のDNAは細菌の染色体とともに、Ti（腫瘍誘導；tumor-inducing）プラスミドとして知られている別の構造物中にも含まれている。Tiプラスミドは、T-DNA（約20kbの長さ）と称される一続きのDNA（感染過程で植物細胞に移される）および一連のvir（virulence、ビルレンス）遺伝子（感染過程を誘導する）を含む。A.ツメファシエンスは創傷からのみ植物に感染する。植物の根または茎が傷を受けたとき、植物はある種の化学的シグナルを発し、それに応答してA.ツメファシエンスのvir遺伝子は活性化され、TiプラスミドのT-DNAの植物染色体への移転に必要な一連の事象を誘導する。続いてT-DNAは創傷から植物細胞に進入する。１つの推測は、T-DNAは、植物DNAが複製または転写されるまで待機し、続いて自身を裸の植物DNAに挿入するということである。A.ツメファシエンスをトランスジーンベクターとして使用するために、T-DNAの腫瘍誘導部分を除去し、一方T-DNAボーダー領域およびvir遺伝子は維持する必要がある。続いてトランスジーンをT-DNAボーダー領域間に挿入する（この場合、トランスジーンは植物細胞に移入し、植物染色体に組み込まれる）。

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

【０２３３】

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

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

【０２３４】

本発明の核酸およびポリペプチドは任意の植物または種子で発現又は挿入される。本発明のトランスジェニック植物は双子葉植物でも単子葉植物でもよい。本発明のトランスジェニックな単子葉植物の例は、牧草、例えばメドーグラス（meadow grass（ブルーグラス、Poa））、飼い葉用草類、例えばウシノケグサ（festuca）、ロリウム（lolium）、温帯性イネ科草本、例えばアグロスチス（Agrostis）および穀類、例えばコムギ、エンバク、ライムギ、オオムギ、コメ、ソルガムおよびトウモロコシ（コーン）である。本発明のトランスジェニックな双子葉植物の例は、タバコ、豆類（例えばルピナス）、ジャガイモ、サトウダイコン、エンドウマメ、インゲンマメおよびダイズ、並びに十字架植物（Brassicaceae科）、例えばカリフラワー、ナタネ、および近縁のモデル植物のシロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）である。したがって、本発明のトランスジェニック植物および種子には以下の属に由来する種を含む（ただしこれらに限定されない）広範囲の植物が含まれる：アナカルジウム（Anacardium）、アラキス（Arachis）、アスパラガス、アトロパ（Atropa）、アベナ（Avena）、ブラシカ（Brassica）、シトラス、シトラルス（Citrullus）、カプシクム（Capsicum）、カルサムス（Carthamus）、ココス（Cocos）、コフェア（Coffea）、ククミス（Cucumis）、ククルビタ（Cuurbita）、ダウクス（Daucus）、エレイス（Elaris）、フラガリア（Fragaria）、グリシン（Glycine）、ゴッシピウム（Gossypium）、ヘリアンサス（Helianthus）、ヘテロカリス（Heterocallis）、ホルデウム（Hordeum）、ヒオシアムス（Hyoscyamus）、ラクツカ（Lactuca）、リヌム（Linum）、ロリウム（Lolium）、ルピナス、リコペルシコン（Lycopersicon）、マルス（Malus）、マニホット（Manihot）、マジョラナ（Majorana）、メディカゴ（Medicago）、ニコチアナ、オレア（Olea）、オリザ（Oryza）、パニエウム（Panieum）、パニセツム（Panisetum）、ペルセア（Persea）、ファセオルス（Phaseolus）、ピスタキア（Pistachia）、ピスム（Pisum）、ピルス（Pyrus）、プルヌス（Prunus）、ラファヌス（Raphanus）、リシヌス（Ricinus）、セカレ（Secale）、セネシオ（Senecio）、シナピス（Sinapis）、ソラナム（Solanum）、ソルガム（Sorghum）、テオブロムス（Theobromus）、トリゴネラ（Trigonella）、トリチクム（Triticum）、ビシア（Vicia）、ビチス（Vitis）、ビグナ（Vigna）、およびゼア（Zea）。本発明のトランスジェニック植物および種子は、任意の単子葉植物または双子葉植物、例えば単子葉植物のトウモロコシ、サトウキビ、イネ、コムギ、オオムギ、スイッチグラスまたはミスカンタス（Miscanthus）；または双子葉植物のオイルシード作物、ダイズ、キャノーラ、アブラナ、アマ、ワタ、パームオイル、サトウダイコン、落花生、樹木、ポプラまたはルピナスであり得る。

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

um）；G．バルバデンス（barbadense）；G．ヒルスタム（hirsutum）を含む）であり得る。

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

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

【０２３５】

ポリペプチドおよびペプチド

ある特徴では、本発明は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する単離、合成または組換えポリペプチドおよびペプチド、またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ（本発明の酵素を含む）と特異的に結合する抗体を生成することができる単離、合成または組換えポリペプチドおよびペプチド、並びに酵素的に活性な前記の部分配列（フラグメント）、並びに本発明の核酸配列を提供し、前記ポリペプチドおよびペプチドは本発明のアミノ酸配列を含み、前記本発明のアミノ酸配列には、本発明の例示的ポリペプチド（上記で規定されたように、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てをもつ配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列

番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、

配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974、および／または配列番号:976を含む）と少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは前記より高いか、または完全な（100％）配列同一性を有する配列が含まれ（表1、2、3、46、47および53並びに配列表を含む本明細書に記載のアミノ酸配列を含み、これらアミノ酸配列のすべてが“本発明の例示的酵素／ポリペプチド”である）、前記本発明の核酸配列はこれらアミノ酸配列の全てをコードする核酸配列である。

【０２３６】

ある特徴では、本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含むキメラ酵素を提供し、前記酵素は、例えば本発明の過程で、および工業、医学、医薬、研究、食品および飼料並びに食品および飼料サプリメントでのプロセッシング、並びに他の多様な適用において使用するため異種結合ドメインを有する。例えば、ある特徴では、本発明は、酵素、例えば本発明の酵素の1つ以上の結合ドメインを含むトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する。別の特徴では、結合ドメインは、本発明の種々の酵素間で交換することができる。あるいは、本発明の1つ以上の酵素の1つ以上の結合ドメインを、ある酵素（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼに）にスプライスすることができる。本発明のある特徴では、前記結合ドメインは、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインから選択される。

本発明はさらに、異種で非天然の基質を有するキメラ酵素を提供する。前記は、それらに“スプライス-イン”された異種結合ドメインの性質により複数の基質を有する（したがって新規な特異性または結合強化を酵素に提供する）キメラ酵素を含む。本発明のキメラ酵素の異種結合ドメインは、モジュール様式として（すなわち触媒モジュールまたは触媒ドメイン（例えば活性部位）に付加される）設計することができ、前記結合ドメインはまた当該酵素にとって異種でも同種でもよい。

トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ（例えば本発明の酵素）の触媒モジュールのみの利用が効率的であることが示された。したがって、本発明は、モジュール様式の結合ドメイン／活性部位モジュールから成るか、または前記を含むペプチドおよびポリペプチドを提供し、前記は同種でペアを形成してもよいが、またはキメラ（異種）活性部位-結合モジュールペアとして結合していてもよい。したがって、本発明のこれらキメラポリペプチド／ペプチドを用いて、個々の酵素、例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ

、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素の性能を改善または改変できる。本発明のキメラ触媒モジュール（本発明の少なくとも1つの結合ドメインを含む）は、酵素が基質の特定の領域を標的とするように設計することができる。例えば、ある特徴では、前記は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼと種々の結合ドメインとを融合させることによって達成される（本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼと異種結合ドメインとの融合または本発明の結合ドメインと別の酵素（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）との融合）。

【０２３７】

したがって、本発明は、キメラトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、例えば、トランスアミナーゼおよび／またはデヒドロゲナーゼと種々の（例えば異種）結合ドメインとの融合物を提供する。ある特徴では、キメラトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは本発明の酵素を含む。本発明はまた、種々の結合ドメインを種々のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ（例えば本発明の結合ドメインおよび／または本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）と組み換える工程、および得られたキメラをスクリーニングして具体的な適用または基質について最良の組合せを見つける工程を含む方法を提供する。

他の変種、例えば、1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つまたは6つ以上の残基が、本発明の任意のポリペプチドのカルボキシ末端またはアミノ末端から除去された変種もまた本発明の範囲内である。別の変種は、ポリペプチドのpIを増加または低下させるために任意の残基の改変、例えばグルタミン酸の除去または（例えば別のアミノ酸への）改変を含む。この方法は、アミノ酸を変異させないので、調節に関する問題を生じることなく酵素の特性を改善するための一般的なやり方として用いられた。この一般的なやり方は本発明の任意のポリペプチドに用いることができる。

【０２３８】

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、例えば、トランスアミナーゼおよび／またはデヒドロゲナーゼ活性を有する単離、合成または組換えポリペプチド、および酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）を提供し、前記ポリペプチドは、本発明の任意の例示的アミノ酸配列を含む、本発明の任意のポリペプチドの配列改変を含む。前記本発明の例示的アミノ酸配列には、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番

号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てをもつ配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配

列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974および／または配列番号:976（本明細書並びに表1、2および3並びに配列表に記載された配列を含む）を含む（これら酸配列の全てが“本発明の例示的酵素／ポリペプチド”である）。前記配列変化は、ポリペプチドのpIを変化させるための任意のアミノ酸改変、例えばグルタミン酸の欠失もしくは改変、またはグルタミン酸からまた別の残基への変更を含むことができる。

本発明はさらに、本発明の例示的配列と配列同一性（例えば、少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは前記より高いか、または完全な（100%）配列同一性）を有する単離、合成または組換えポリペプチドを提供する。

【０２３９】

ある特徴では、前記ポリペプチドは、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、および／または化学基転移を触媒し、アミノ基転移反応を触媒し、以下の反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒し、および／または酸化還元反応を触媒し、水素原子除去を触媒し、および／または以下の反応（D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプター）を触媒する。

当分野で公知の任意のトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼアッセイを用いて、あるポリペプチドがトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロ

ゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、本発明の範囲内のものであるか否かを決定することができる。例えばLeeら（AEM. 2006 February. 72(2):1588-1594）は、ラクテートデヒドロゲナーゼによるカップリングアッセイを用いてピルビン酸生成速度を計算する方法を記載している。別の例では、Mayer（J. Biomolecular Screening, 7(2):135-140, 2002）は、デヒドロゲナーゼによって生成されるNADPHとの反応でニトロブルーテトラゾリウム（NBT）およびフェナジンメトスルフェート（PMS）を用い、不溶性で青紫色のフォルマザンを生じる比色アッセイを記載している。

本発明のポリペプチドは、活性型または不活性型のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、例えば、トランスアミナーゼおよび／またはデヒドロゲナーゼを含む。例えば、本発明のポリペプチドは、“活性な”成熟タンパク質を生成する、例えば前タンパク質プロセッシング酵素（例えば前タンパク質コンバターゼ）によるプレプロ配列の“成熟化”またはプロセッシングの前の前タンパク質を含む。本発明のポリペプチドは、他の理由、例えば翻訳後プロセッシング事象（例えばエンド-またはエキソ-ペプチダーゼもしくはプロテイナーゼ作用）、リン酸化事象、アミド化、グリコシル化、硫酸化、ダイマー化事象による“活性化”前のために不活性であるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む。本発明のポリペプチドは、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、例えば、トランスアミナーゼおよび／またはデヒドロゲナーゼの全ての活性型（活性な部分配列、例えば触媒ドメインまたは活性部位を含む）を含む。

【０２４０】

“プレプロ”ドメイン配列およびシグナル配列を同定する方法は当分野で周知であり、例えば以下を参照されたい：Van de Ven (1993) Crit Rev Oncog 4(2):115-136。例えば、プレプロ配列を同定するために、タンパク質を細胞外間隙から精製し、N-末端タンパク質配列を決定し、未加工型と比較する。

本発明は、シグナル配列および／またはプレプロ配列をもつポリペプチドまたは前記をもたないポリペプチドを含む。本発明は、異種シグナル配列および／またはプレプロ配列をもつポリペプチドを含む。前記プレプロ配列（異種プレプロドメインとして用いられる本発明の配列を含む）は、当該タンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端に配置することができる。本発明はまた、本発明の配列を含む、単離、合成または組換えシグナル配列、プレプロ配列および触媒ドメイン（例えば“活性部位”）を含む。

パーセント配列同一性は当該ポリペプチドの完全長に及ぶことができるが、同一性はまた、少なくとも約50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700または前記より長い領域にわたることができる。本発明のポリペプチドはまた、例示的ポリペプチドの完全長よりも短くてもよい。また別の特徴では、本発明は、あるポリペプチド（例えば酵素、例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）の約5から完全長の間のサイズ範囲のポリペプチド（ペプチド、フラグメント）を提供する。例示的サイズは、本発明の例示的トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700またはそれより多い残基、例えば連続する残基である。

本発明のペプチド（例えば本発明の例示的ポリペプチドの部分配列）は、例えばプローブの標識、抗原、トレラゲン、モチーフ、活性部位（例えば“触媒ドメイン”）、シグナル配列および／またはプレプロ配列として有用であり得る。

【０２４１】
本発明のポリペプチドおよびペプチドは、天然の供給源から単離されても、合成されても、または組換えにより生成されたポリペプチドであってもよい。ペプチドおよびタンパク質は、in vitroまたはin vivoで組換えにより発現させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドは当分野で公知の方法を用いて生成および単離することができる。本発明のポリペプチドおよびペプチドはまた、当分野で周知の化学的方法を用いて完全体または部分として合成することができる。例えば以下を参照されたい：Carythers 1980, Nucleic Acids Res Symp Ser 215-223；Nucleic Acids Res Symp Ser 225-232；A.K. Banga Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems 1995, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA。例えば、ペプチド合成は種々の固体支持体技術を用いて実施でき（例えば以下を参照されたい：Roberge 1995, Science 269:202；Merrifield 1997, Methods Enzymol 289:3-13）、さらに自動合成は、例えばABI 431Aペプチド合成装置（Perkin Elmer）を製造業者が提供した指示にしたがって使用して達成することができる。
本発明のペプチドおよびポリペプチドはまたグリコシル化することができる。グリコシル化は、化学的にまたは細胞の生合成メカニズムによって翻訳後に添加することができる。後者のメカニズムは公知のグリコシル化モチーフの使用を必要とし、前記モチーフは当該配列にとって天然であっても、またはペプチドとして付加しても、もしくは配列をコードする核酸に付加してもよい。グリコシル化はO-結合でもN-結合でもよい。
【０２４２】
本明細書で用いられる“アミノ酸”または“アミノ酸配列”、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列、または前記のいずれかのフラグメント、部分またはサブユニット、および天然に存在する分子または合成分子を指す。“アミノ酸”または“アミノ酸配列”には、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列、または前記のいずれかのフラグメント、部分またはサブユニット、および天然に存在する分子または合成分子が含まれる。本明細書で用いられる“ポリペプチド”という用語は、ペプチド結合または改変ペプチド結合によって互いに結合したアミノ酸、すなわちペプチドイソステアーを指し、20個の遺伝子によってコードされるアミノ酸以外の改変アミノ酸を含むことができる。ポリペプチドは、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）によって、または化学的修飾技術（当分野で周知である）によって改変することができる。改変はポリペプチドの任意の場所（ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端を含む）で生じ得る。あるポリペプチドで同じタイプの改変が同程度または種々の程度で存在し得ることは理解されよう。さらにまた、あるペプチドが多くのタイプの改変を有することもできる。改変にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質若しくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合環状化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストール化、酸化、ポリエチレングリコール化、グルカンヒドロラーゼプロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA仲介付加（例えばアルギニル化）が含まれる（例えば以下を参照されたい：T.E. Creighton, Proteins-Structure and Molecular Properties 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 1983）。本発明のペプチドおよびポリペプチドにはまた、下記でさらに詳細に記載されるように全ての“模倣体”および“ペプチド模倣体”が含まれる。
【０２４３】
“組換え”ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術によって製造された、すなわち所望のポリペプチドまたはタンパク質をコードする外因性DNA構築物によって形質

転換された細胞から製造されたポリペプチドまたはタンパク質を指す。本発明の“合成”核酸（オリゴヌクレオチドを含む）、ポリペプチドまたはタンパク質は、任意の化学的合成によって、例えば下記に記載したように調製されたものを含む。化学的な固相ペプチド合成法もまた本発明のポリペプチドまたはフラグメントの合成に用いることができる。そのような方法は1960年初頭より当分野で知られており（R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963）（さらにまた以下を参照されたい：J.M. Stewart and J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12））、さらに最近は市販の実験室用ペプチド設計合成キット（Cambridge Research Biochemicals）が利用されている。そのような市販の実験室キットは一般的にH. M. Geysenら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998, 1984）の教示を利用し、多数の“ロッド”または“ピン”（前記はいずれも一枚のプレートに連結されている）の先端に合成ペプチドを提供する。そのような系を利用する場合、ロッドまたはピンのプレートはひっくり返され、対応するウェルまたはレザバーをもつ第二のプレートに挿入される。前記ウェルまたはレザバーは、前記ピンまたはロッドの先端に適切なアミノ酸を付着または固定させるための溶液を含んでいる。そのような反応工程（すなわちひっくり返してロッドとピンの先端を適切な溶液への挿入する工程）を繰り返すことによって、アミノ酸は所望のペプチドに構築されていく。さらにまた、多数の利用可能なFMOCペプチド合成系が利用可能である。例えば、ポリペプチドまたはフラグメントのアッセンブリは、アプライドバイオシステムズ社（Applied Biosystems, Inc.）のモデル431A自動ペプチド合成装置を用いて固体支持体上で実施できる。そのような装置は、直接合成によってまたは一連のフラグメントを合成することによって（それらフラグメントは他の公知の技術により結合させることができる）、本発明のペプチドの容易な入手を提供する。

【０２４４】

本明細書で用いられる“フラグメント”は、少なくとも２つの別個の構造として存在することができる天然に存在するタンパク質の部分である。フラグメントは、天然に存在するタンパク質と同じまたは実質的に同じアミノ酸配列を有し得る。“実質的に同じ”とは、アミノ酸配列がほとんど同じである（完全にではない）が、関連するその配列の少なくとも1つの機能的活性は維持されていることを意味する。一般的には、2つのアミノ酸配列は、もしそれらが少なくとも約85%同一であるならば“実質的に同じ”または“実質的に相同”である。天然に存在するタンパク質と異なる三次元構造を有するフラグメントもまた含まれる。この例は、“前駆型”分子、例えば切断によっ改変されて顕著に高い活性をもつ成熟酵素を生じることができる低活性の前タンパク質である。

本発明のペプチドおよびポリペプチド（上記で規定）は、全ての“模倣体”および“ペプチド模倣体”型を含む。“模倣体”および“ペプチド模倣体”という用語は、実質的に本発明のポリペプチドと同じ構造および／または機能的特徴を有する合成化学物質を指す。前記模倣体は完全に合成された非天然アミノ酸類似体で構成されているか、または部分的に天然のペプチドアミノ酸および部分的に非天然のアミノ酸類似体のキメラ分子である。前記模倣体はまた任意の量の天然アミノ酸の保存的置換を、そのような置換が前記模倣体の構造および／または活性を実質的に変化させない限り含むことができる。保存的変種である本発明のポリペプチドに関しては、日常的な実験によって模倣体が本発明の範囲内に包含されるものであるか否か、すなわちその構造および／または機能が実質的に改変されていないかどうかが決定されるであろう。したがって、ある特徴では、模倣体組成物がトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性をもつならばそれらは本発明の範囲内に包含される。

本発明のポリペプチド模倣組成物は任意の組合せの非天然成分を含むことができる。また別の特徴では、本発明の模倣体組成物は以下の3つの構造基の1つまたは全てを含む：a）天然のアミド結合（“ペプチド結合”）以外の残基結合基；b）天然に存在するアミノ酸残基の代わりに非天然残基；c）二次構造模倣を誘導する（すなわち二次構造、例えばベータターン、ガンマターン、ベータシート、アルファヘリックス構造を誘導または安定

化させる）残基。例えば本発明のポリペプチドは、その残基の全てまたはいくつかが天然のペプチド結合以外の化学的手段によって結合されるとき模倣体と特徴付けることができる。個々のペプチド模倣体残基は、ペプチド結合、他の化学的結合、またはカップリング手段、例えばグルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、二官能基性マレイミド、N,N’-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）またはN,N’-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）によって結合される。通常のアミド結合（“ペプチド結合”）の代用となることができる結合基には例えば以下が含まれる：ケトメチレン（例えば-C(=O)-NH-の代わりに-C(O=)-CH_2-）、アミノメチレン（CH_2-NH）、エチレン、オレフィン（CH=CH）、エーテル（CH_2-O）、チオエーテル（CH_2-S）、テトラゾール（CN_4-）、チアゾール、レトロアミド、チオアミドまたはエステル（例えば以下を参照されたい：Spatola (1983) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol.7, pp267-357, “Peptide Backbone Modifications”, Marcell Dekker, NY）。

【０２４５】

本発明のポリペプチドはまた、天然に存在するアミノ酸残基の代わりに全てまたはいくつかの非天然の残基が含まれることによって模倣体と特徴付けられる。非天然残基は学術文献および特許文献に詳しく記載されている。天然のアミノ酸残基の模倣体として有用な例示的な非天然組成物のいくつかおよび基準は以下で述べる。芳香族アミノ酸の模倣体は、例えば以下によって置き換えることによって生成することができる：D-またはL-ナフチルアラニン；D-またはL-フェニルグリシン；D-またはL-2チエネイルアラニン；D-またはL-１、-2、3-、または4-ピレネイルアラニン；D-またはL-3チエネイルアラニン；D-またはL-(2-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(3-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(2-ピラジニル)-アラニン；D-またはL-(4-イソプロピル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルアラニン；D-p-フルオロ-フェニルアラニン；D-またはL-p-ビフェニルフェニルアラニン；D-またはL-p-メトキシ-ビフェニルフェニルアラニン；D-またはL-2-インドール(アルキル)アラニン；およびD-またはL-アルキルアラニン（前記アルキルはメチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、iso-ブチル、sec-イソチル、iso-ペンチルまたは非酸性アミノ酸で置換できるがまた置換されてなくてもよい）。非天然アミノ酸の芳香環には、例えばチアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、ベンゾイミダゾリル、ナフチル、フラニル、ピロリルおよびピリジル芳香環が含まれる。

酸性アミノ酸の模倣体は、例えば陰性荷電を維持している非カルボキシレートアミノ酸、（ホスホノ）アラニン、硫酸スレオニンによって置換することにより生成できる。カルボキシル側鎖基（例えばアスパルチルまたはグルタミル）はまた、カルボジイミド（R’-N-C-N-R’）、例えば1-シクロヘキシル-3(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3(4-アゾニア-4,4-ジメソールペンチル)カルボジイミドとの反応によって選択的に改変することができる。アスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基もまた、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギン残基およびグルタミン残基に変換することができる。塩基性アミノ酸の模倣体は、（リジンおよびアルギニンの他に）アミノ酸オルニチン、シトルリン又は（グアニジノ）-酢酸または(グアニジノ)アルキル-酢酸（アルキルは上記で定義されたとおり）による置換によって生成することができる。ニトリル誘導体（例えばCOOHの代わりにCN-部分を含む）でアスパラギンまたはグルタミンを置換することができる。アスパラギンおよびグルタミン残基は、対応するアスパラギン酸またはグルタミン酸残基に脱アミノ化することができる。アルギニン残基模倣体は、アルギニン残基を例えば1つまたは2つ以上の通常の試薬（例えばフェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロ-ヘキサンジオンまたはニンヒドリンを含む）と、好ましくはアルカリ性条件下で反応させることによって生成することができる。チロシン残基模倣体はチロシン残基を例えば芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンと反応させることによって生成することができる。N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いてO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成することができる。システイン残基模倣体は、システイニル残基を例えばアルファ-ハロアセテート（例えば2-

クロロ酢酸またはクロロアセトアミド）および対応するアミンと反応させてカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生成することによって達成できる。システイン残基模倣体はまた、システイン残基を例えばブロモ-トリフルオロアセトン、アルファ-ブロモ-ベータ-(5-イミドゾイル)プロピオン酸；クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド；メチル2-ピリジルジスルフィド；p-クロロ水銀ベンゾエート；2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール；またはクロロ-7-ニトロベンゾ-オキサ-1,3-ジアゾールと反応させることによって生成することができる。リジン模倣体は、リジン残基をコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させることによって（さらにアミノ末端残基を変化させることによって）生成することができる。リジンおよび他のアルファ-アミノ含有残基模倣体はまた、イミドエステル、例えばメチルピコリンイミデート、ピリドキサールホスフェート、ピリドキサール、クロロボロハイドライド、トリニトロ-ベンゼンスルホン酸、O-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオンとの反応、およびグキオキシレートとのトランスアミダーゼ触媒反応によって生成することができる。メチオニンの模倣体は、例えばメチオニンスルホキシドとの反応によって生成することができる。プロリンの模倣体には、例えばピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、3-または4-ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、3-または4-メチルプロリンまたは3,3-ジメチルプロリンが含まれる。ヒスチジン残基模倣体はヒスチジルを例えばジエチルプロカーボネートまたはパラ-ブロモフェナシルブロミドと反応させることによって生成することができる。他の模倣体には、例えばプロリンおよびリジンのヒドロキシル化；セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化；リジン、アルギニンおよびヒスチジンのアルファ-アミノ基のメチル化；N-末端アミンのアセチル化；主鎖アミド残基のメチル化またはN-メチルアミノ酸による置換；またはC-末端カルボキシル基のアミド化によって生成することができるものが含まれる。

【０２４６】

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

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

【０２４７】

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

本発明は、シグナル配列をもつ、またはシグナル配列をもたない本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む。本発明のシグナル配列を含むポリペプチドは、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼであっても、または別のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼであっても、または別の酵素、または他のポリペプチドであってもよい。

本発明は、固定されたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および、抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体、並びに前記のフラグメントを含む。本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を阻害する方法を提供する。前記は、例えば負の優性変異体または本発明の抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を用いることによって実施される。本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含むヘテロ複合体（例えば融合タンパク質、ヘテロダイマーなど）を含む。

【０２４８】

本発明のポリペプチドは、種々の条件下で（例えば極端なpH及び／又は温度、酸化剤など）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有することができる。本発明は、（例えば温度、酸化剤および

洗浄条件の変化に対して）種々の触媒効率および安定性を有する、また別のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ調製物をもたらす方法を提供する。ある特徴では、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ変種は、位置特異的変異導入及び／又はランダム変異導入の技術を用いて作製することができる。ある特徴では、定方向進化を用い、また別の特異性および安定性を有する極めて多様なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ変種を作製することができる。

本発明のタンパク質はまた、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ調節物質、例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性の活性化物質または阻害物質の同定のための研究用試薬として有用である。簡単に記せば、テストサンプル（化合物、ブロス、抽出物など）をトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼアッセイに添加し、基質の切断を阻害するそれらの活性を測定する。このようにして同定された阻害物質を工業および研究で用いて、望ましくないタンパク質分解を低下または防止することができる。阻害物質を混合して活性スペクトルを広げることができる。

本発明の酵素はまた、タンパク質消化またはタンパク質の配列決定において研究用試薬として有用である。例えば、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用い、例えば自動配列決定装置を用いる配列決定のためにより小さなフラグメントにポリペプチドを分解することができる。

【０２４９】

本発明はまた、本発明の核酸、ポリペプチドおよび抗体を用いて新規なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを発見する方法を提供する。ある特徴では、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの発現を基準にしてファージミドライブラリーをスクリーニングして前記を発見する。別の特徴では、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの発現を基準にしてラムダファージライブラリーをスクリーニングして前記を発見する。ファージまたはファージミドライブラリーのスクリーニングは、毒性クローンの検出、基質への接近の改善、高度操作の必要性の減少（ライブラリーの大量の排除により生じる全ての偏りの可能性を無視することによる）および低いクローン密度でのより迅速な増殖を可能にすることができる。ファージまたはファージミドライブラリーのスクリーニングは液相でも固相でもよい。ある特徴では、本発明は液相でのスクリーニングを提供する。それによって、アッセイ条件でのより大きな融通性、追加される基質の融通性、弱いクローンに対するより高い感度および固相スクリーニングを超える自動化の容易さが提供される。

本発明は、本発明のタンパク質および核酸並びに機械による自動化を用いて、何千もの生触媒反応およびスクリーニングアッセイを短時間で（例えば毎日）実施でき、同様に高度な正確性および再現性を担保できるスクリーニング方法を提供する（下記のアレイに関

する考察を参照されたい）。結果として、誘導化合物ライブラリーを数週間で作製することができる。分子（小分子を含む）の改変に関する更なる教示については、PCT/US94/09174を参照されたい。

本発明のまた別の特徴は、本発明の1つの配列および前記と実質的に同一の配列、または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントを含む単離または精製されたポリペプチドである。上記で考察したように、そのようなポリペプチドは、当該ポリペプチドをベクターに挿入し、コードされたポリペプチドの発現を適切な宿主細胞で駆動できる配列に当該コード配列を作動できるように連結することによって得ることができる。例えば発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位、および転写終了因子を含むことができる。前記ベクターはまた発現を増幅させるための適切な配列を含むことができる。

【０２５０】

本発明のまた別の特徴はポリペプチドまたはそのフラグメントであり、前記は、本発明のポリペプチドの1つおよび前記と実質的に同一の配列、または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントに対して少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85％、少なくとも約90%、少なくとも約95%または約95%より高い相同性を有する。相同性は、上記に記載したプログラムのいずれかを用いて決定することができる（前記プログラムはそれらの間のアミノ酸同一性または類似性の程度を比較および決定する）。アミノ酸“相同性”は保存的アミノ酸置換（例えば上述のもの）を含むことは理解されよう。

本発明のポリペプチドの1つ、または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントに対して相同性を有するポリペプチドまたはフラグメントは、上述の技術を用いてそれらをコードする核酸を単離することによって得ることができる。

あるいは、相同なポリペプチドまたはフラグメントは、生化学的濃縮または精製方法により得ることができる。潜在的に相同なポリペプチドまたはフラグメントの配列は、ゲル電気泳動および／またはミクロシークェンシングによって決定することができる。相同性が予想されるポリペプチドまたはフラグメントの配列は、本発明のポリペプチドの1つまたは少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または 150の連続するアミノ酸残基を含むそのフラグメントと上述のプログラムのいずれかを用いて比較することができる。

【０２５１】

本発明のまた別の特徴は、本発明のポリペプチドの酵素機能を保持している、本発明のフラグメントまたは変種を同定するアッセイである。例えば前記ポリペプチドのフラグメントまたは変種を用いて生化学反応（前記反応は本発明のポリペプチドの酵素活性を前記フラグメントまたは変種が保持していることを示す）を触媒することができる。

変種のフラグメントが本発明のポリペプチドの酵素活性を保持しているかどうかを決定するアッセイは以下の工程を含む：ポリペプチドフラグメントまたは変種を基質分子と前記ポリペプチドフラグメントまたは変種が機能できる条件下で接触させ、基質レベルの減少または前記ポリペプチドと基質との間の反応の特異的反応生成物レベルの増加を検出する。

本発明は、酵素の固有の触媒特性を利用する。化学的変換における生物触媒（すなわち精製酵素、粗酵素、非生細胞または生細胞）の使用は、特定の出発化合物と反応する個々の生物触媒の同定を必要とするが、本発明は選択した生物触媒および反応条件を使用する（前記生物触媒および反応条件は、多くの出発化合物、例えば小分子に存在する官能基に特異的である）。各生物触媒は1つの官能基または関連するいくつかの官能基に特異的であり、この官能基を含む多くの出発化合物と反応することができる。

前記生触媒反応はただ1つの出発化合物に由来する誘導体集団を生成する。これらの誘導体をさらにもう1回の生触媒反応に付して誘導体化合物の第二の集団を生成することが

できる。生触媒反応による誘導体形成の繰り返し毎に原型小分子または化合物から数千の変種を生成することができる。

酵素は、分子の残り部分に影響を与えることなく出発化合物の特異的部位で反応する。前記は伝統的な化学的方法を用いて達成することは非常に困難な過程である。生触媒反応のこの高度な特異性は、ライブラリー内のただ1つの活性化合物を同定する手段を提供する。前記ライブラリーは、それを作製するために用いられる生触媒反応シリーズ（いわゆる“生合成歴”）によって特徴付けられる。生物学的活性についてのライブラリーのスクリーニングおよび生合成歴のトレーシングによって活性な化合物を生成する特異的連続反応が同定される。前記連続反応を繰り返し、合成された化合物の構造を決定する。前記の同定態様は、他の合成およびスクリーニングの方法と違って固定化技術を必要とせず、化合物は溶液中で自由な状態で合成され、実質的に任意のタイプのスクリーニングアッセイを用いて試験することができる。官能基に対する酵素反応の高度な特異性は、生触媒反応により作製されるライブラリーを構築する特異的な酵素反応の“追跡”を可能にすることは特記に値する。

工程の多くは機械による自動化を用いて実施され、毎日何千もの生触媒反応およびスクリーニングの実施を可能にするとともに、高レベルの正確さと再現性が担保される。結果として、従来の化学的方法を用いた場合数年を要する誘導体化合物ライブラリーが数週間で作製することができる。

特にある特徴では、本発明は小分子の改変方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載したポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを小分子と接触させ、改変小分子を生成することを含む。所望の活性を示す改変小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために、改変小分子ライブラリーを試験する。ライブラリーの一部分の作製に用いられた生触媒反応の各々を系統的に排除し、さらに所望の活性を有する改変小分子の有無についてライブラリーの前記部分で生成された小分子を試験することによって、所望の活性を有する改変小分子を生成する特異的な生触媒反応を同定する。ある特徴では（場合によって）、所望の活性を有する改変小分子を生成する特異的な生触媒反応が繰り返される。前記生触媒反応を、小分子の構造内で見出される別個の構造成分と反応する生物触媒群を用いて実施する。各々の生物触媒は1つの構造成分または関連構造成分群に対して特異的であり、各生物触媒は前記別個の構造成分を含む多くの種々の小分子と反応する。

【０２５２】

トランスアミナーゼおよび／またはオキシドレダクターゼシグナル配列、プレプロおよび触媒ドメイン：

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼシグナル配列（例えばシグナルペプチド（SP））、プレプロドメインおよび触媒ドメイン（CD）を提供する。本発明のSP、プレプロドメインおよび/またはCDは単離、合成または組換えペプチドでもよく、または融合タンパク質の部分（例えばキメラタンパク質の異種ドメイン）であってもよい。本発明は、これらの触媒ドメイン（CD）、プレプロドメインおよびシグナル配列（SP、例えば本発明のペプチドのアミノ末端残基を含む／前記から成る配列を有するペプチド）をコードする核酸を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明のポリペプチドの残基1から12、１から13、1から14、1から15、1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、1から33、1から34、1から35、1から36、1から37、1から38、1から39、1から40、1から41、1から42、1から43、1から44、1から45、1から46、1から47、1から48、1から49または1から50に示される配列を含む／前記配列から成るペプチドを含むシグナル配列を提供する。

本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-

アミノ酸デヒドロゲナーゼシグナル配列（SP）および／またはプレプロ配列は単離ペプチドであってもよいが、または、融合（キメラ）タンパク質として、別のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、または非トランスフェラーゼ、例えば非トランスアミナーゼ、例えば非d-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／または非オキシドレダクターゼ、例えば非デヒドロゲナーゼ、例えば非d-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドと結合した配列であってもよい。ある特徴では、本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼシグナル配列を含むポリペプチドを提供する。ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼシグナル配列（SP）および／またはプレプロ配列を含むポリペプチドは、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼにとって異種の配列を含む（例えば本発明のSPおよび／またはプレプロ配列および別のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、または非トランスフェラーゼ、例えば非トランスアミナーゼ、例えば非d-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／または非オキシドレダクターゼ、例えば非デヒドロゲナーゼ、例えば非d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ由来の配列を含む融合タンパク質）。ある特徴では、本発明は、異種SPおよび／またはプレプロ配列を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ（例えば酵母のシグナル配列有する配列）を提供する。本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、ベクター中に異種SPおよび／またはプレプロ配列を含むことができる（例えばpPICシリーズのベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA））。

【０２５３】

ある特徴では、本発明のSPおよび／またはプレプロ配列は、新規なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドの同定に続いて同定される。タンパク質が分類され、それらの適切な細胞内の配置場所に輸送される経路は、しばしばタンパク質誘導経路と称される。これら全ての誘導系のうちで最も重要な成分の１つは、新規に合成されるポリペプチドのアミノ末端に存在するシグナル配列と呼ばれる短いアミノ酸配列である。このシグナル配列は、タンパク質を細胞内の適切な配置場所に誘導し、輸送中にまたは当該タンパク質がその最終目的地に到達したときに除去される。ほとんどのリソソームタンパク質、膜タンパク質、または分泌タンパク質が、それらを小胞体の管腔に移転させるアミノ末端シグナル配列を有する。このグループのタンパク質については、100を超えるシグナル配列が決定されている。シグナル配列は約10から50アミノ酸残基の間で長さが変動し得る。多様なシグナル配列認識方法が当業者に知られている。例えば、ある特徴では、新規なトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼシグナル配列が、SignalPと称される方法によって同定される。SignalPは、シグナルペプチドおよびそれらの切断部位の両者を認識する合同ニューラルネットワークを用いる（例えば以下を参照されたい：Nielsen 1997, "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Protein Engineering 10:1-6

）。

いくつかの特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼはSPおよび／またはプレプロ配列、または“ドメイン”をもたないことがあることは理解されよう。ある特徴では、本発明は、SPおよび／またはプレプロドメインの全部または部分を欠く本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼに由来するシグナル配列（SP）および／またはプレプロ配列をコードする核酸配列であって、別個のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの核酸配列に作動できるように連結されたものを提供し、ある特徴では（場合によって）、非トランスフェラーゼ、例えば非トランスアミナーゼ、例えば非d-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／または非オキシドレダクターゼ、例えば非デヒドロゲナーゼ、例えば非d-アミノ酸デヒドロゲナーゼタンパク質由来のシグナル配列（SP）および／またはプレプロドメインが所望されることがある。

【０２５４】

本発明は、本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメインおよび／または触媒ドメイン（CD）、並びに異種配列を含む単離、合成または組換えポリペプチドを提供する。前記異種配列は、SP、プレプロドメインおよび／またはCDと（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼと）天然の状態では結合していない配列である。SP、プレプロドメインおよび／またはCDが天然の状態では結合していない配列は、SP、プレプロドメインおよび／またはCDのアミノ末端、カルボキシ末端、および／またはSPおよび／またはCDの両末端に存在し得る。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメインおよび／または触媒ドメイン（CD）を含むポリペプチドを含む（または前記から成る）単離、合成または組換えポリペプチドを提供するが、ただし前記配列またはドメインが、前記が天然の状態で結合しているいずれの配列（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）とも結合していないことを条件とする。同様にある特徴では、本発明は、これらのポリペプチドをコードする単離、合成または組換え核酸を提供する。したがって、ある特徴では、本発明の単離、合成または組換え核酸は、本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメインおよび／または触媒ドメイン（CD）のコード配列並びに異種配列（すなわち本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメインおよび／または触媒ドメイン（CD）と天然の状態では結合していない配列）を含む。前記異種配列は、SP、プレプロドメインおよび／またはCDコード配列の3’末端、5'末端および／または両末端に存在することができる。

【０２５５】

ハイブリッド（キメラ）トランスフェラーゼおよび／またはオキシドレダクターゼ並びにペプチドライブラリー

ある特徴では、本発明は、本発明の配列を含むハイブリッドトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼおよび融合タンパク質（ペプチドライブラリーを含む）を提供する。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナー

ゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質、レセプター、酵素）のペプチド調節物質（例えば活性化物質または阻害物質）を単離することができる。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的（例えばリガンド、例えばサイトカイン、ホルモンなど）の正式な結合パートナーを同定することができる。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列（S）、プレプロドメイン及び／又は触媒ドメイン（CD）またはそれらの組合せ並びに異種配列（上記参照）を含むキメラタンパク質を提供する。

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

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

【０２５６】

本発明は、そのポリペプチド骨格構造、二次または三次構造（例えばアルファ-ヘリックスまたはベータ-シート構造）が改変されたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを提供する。ある特徴では、電荷または疎水性が改変されている。ある特徴では、側鎖の嵩が改変されている。保存性が低い置換を選択することによって、機能または免疫学的同一性に本質的な変更がもたらされる。例えば、改変領域のポリペプチド骨格構造（例えばアルファ-ヘリックスまたはベータ-シート構造）、分子の荷電または疎水性部分（活性部位に存在していてもよい）、または側鎖に対して、より顕著な影響を与える置換を実施することができる。本発明は、本発明のポリペプチドに以下のような置換を提供する：（ａ）疎水性残基（例えばセ

リルまたはスレオニル）で親水性残基（例えばロイシル、イソロイシル、バリルまたはアラニル）を置換する（または前者を後者で置換する）；（ｂ）システインまたはプロリンで他の任意の残基を置換する（または前者を後者で置換する）；（ｃ）陽性荷電側鎖をもつ残基（例えばリジル、アルギニルまたはヒスチジル）で陰性荷電残基（例えばグルタミルまたはアスパルチル）を置換する（または前者を後者で置換する）；または（ｄ）嵩の大きな側鎖（例えばフェニルアラニン）で側鎖をもたない残基（例えばグリシン）を置換する（または前者を後者で置換する）。前記変種は同じ定性的生物学的活性（すなわちトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性）を示し得るが、変種を選別してトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの性状を必要とされるように改変することができる。

【０２５７】

ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、エピトープもしくは精製タグ、シグナル配列または他の融合配列などを含む。ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを任意のペプチドと融合させて、融合ポリペプチドを形成することができる。本明細書では“融合”または“作動できるように連結”とは、任意のペプチドとトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼとが、当該構造の安定性の破壊を最小限に止める（例えば前記がトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を維持する）ことができる態様で一緒に結合されることを意味する。融合ポリペプチド（または融合ポリペプチドをコードする融合ポリヌクレオチド）はさらに別の成分（複数のループに存在する複数のペプチドを含む）も同様に含むことができる。

ある特徴では、ペプチドおよびそれらをコードする核酸はランダム化される。ランダム化は完全なランダム化であっても、またはランダム化が、例えばヌクレオチド／残基頻度において全体的にもしくは位置毎に偏っていてもよい。“ランダム化された”とは各核酸およびペプチドがそれぞれ本質的に任意のヌクレオチドおよびアミノ酸から成ることを意味する。ある特徴では、ペプチドを生じる核酸は化学的に合成することができ、したがって、任意の位置に任意のヌクレオチドを取り込むことができる。したがって、核酸が発現されペプチドを生成するとき、任意の位置に任意のアミノ酸残基が取り込まれ得る。合成プロセスは、ランダム化された核酸が生成されるように設計して、核酸の全長にわたって可能な全てのまたは大半の組合せを形成し、したがってランダム化された核酸ライブラリーの形成を可能にすることができる。前記ライブラリーは、ランダム化された発現生成物の十分に構造的に多様な集団を提供し、所望の反応を示す1つ以上の細胞を提供するために確率的に十分な範囲の細胞反応に影響を与えることができる。したがって、本発明は、ライブラリーメンバーの少なくとも1つがいくつかの分子、タンパク質または他の因子に対する親和性を与える構造を有することができるように十分に大きな相互作用ライブラリーを提供する。

トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼはマルチドメイン酵素であり、前記は、ある特徴では（場合によって）シグナルペプチド、結合ドメイン、リンカーおよび／または別の触媒ドメインから成る。

【０２５８】

本発明は、生物学的に活性なハイブリッドポリペプチド（例えばハイブリッドトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）をコードすることができるキメラポリペプチドを作製する手段を提供する。ある特徴では、原型ポリヌクレオチドは生物学的に活性なポリペプチドをコードする。本発明の方法は、生成されるハイブリッドポリヌクレオチドが生物学的に活性な原型ポリペプチドに由来する活性を表すポリペプチドをコードできるように原型ポリヌクレオチドの配列を組み込む細胞性過程を利用することによって新規なハイブリッドポリペプチドを生成する。例えば、原型ポリヌクレオチドは種々の微生物に由来する特定の酵素をコードすることができる。ある生物または変種に由来する第一のポリヌクレオチドによってコードされる酵素は、例えば特定の環境条件下（例えば高塩濃度）で効率的に機能することが可能である。異なる生物または変種に由来する第二のポリヌクレオチドによってコードされる酵素は、異なる環境条件下（例えば超高温）で効率的に機能することができる。第一および第二の原型ポリヌクレオチドに由来する配列を含むハイブリッドポリヌクレオチドは、原型ポリヌクレオチドによってコードされる両方の酵素の特徴を示す酵素をコードすることができる。したがって、ハイブリッドポリヌクレオチドによってコードされる酵素は、第一および第二のポリヌクレオチドによってコードされる酵素の各々が共有する環境条件下（例えば高塩濃度および超高温）で効率的に機能することができる。

本発明の方法から得られるハイブリッドポリペプチドは、原型酵素では示されない特殊化された酵素活性を示すことができる。例えば、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性をコードするポリヌクレオチドの組換えおよび／または還元的再組合せに続いて、ハイブリッドポリヌクレオチドによってコードされる生成ハイブリッドポリペプチドを、原型酵素の各々から得られる特殊化されたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性（すなわちトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが作用する結合のタイプおよびトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが機能する温度）についてスクリーニングすることができる。したがって、例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、原型トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼからハイブリッドトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを区別するそれら化学的機能性（例えば多様な温度、pHまたは塩濃度における活性の相違）を確認するためにスクリーニングすることができる。

【０２５９】

原型ポリヌクレオチドの供給源は、個々の生物（“単離株”）、所定の培地で増殖させた生物集合物（“濃縮培養”）、または未培養生物（“環境サンプル”）から単離することができる。環境サンプルから新規な生物活性をコードするポリヌクレオチドを誘導するために培養非依存的方法を用いることは、生物多様性を有する手付かずの資源へ近づくことを可能にするのでもっとも好ましい。

“環境ライブラリー”は環境サンプルから作製され、適切な原核細胞宿主で増殖させることができるクローニングベクター内に保管された状態で、天然に存在する生物のゲノム集合物を提示する。前記クローン化されたDNAは先ず初めに環境サンプルから直接抽出さ

れるので、前記ライブラリーは純粋培養として増殖することができる原核細胞の小分画に限定されない。さらにまた、これらサンプルに存在する環境DNAの正規化によって、最初のサンプルに存在する種の全てに由来するDNAのより均等な提示が可能になろう。このことは、サンプルのきわめてわずかな構成成分（これらは優勢な種と比較して数桁低く提示される可能性がある）から興味深い遺伝子を発見する効率を劇的に高めることができる。

例えば、1つ以上の未培養微生物から作製された遺伝子ライブラリーを対象の活性についてスクリーニングする。対象の生物活性分子をコードする潜在的経路は原核細胞で遺伝子発現ライブラリーの形態で先ず捕捉される。対照の活性をコードするポリヌクレオチドをそのようなライブラリーから単離し、宿主細胞に導入する。前記宿主細胞を組換えおよび／または還元的再組合せが促進される条件下で増殖させ、新規なまたは強化された活性を有する潜在的に活性な生物分子を作出する。

【０２６０】

さらにまた、サブクローニングを実施して対象の配列をさらに単離することができる。サブクローニングでは、DNAの一部分を増幅、消化（一般的には制限酵素による）し、所望の配列を切り出し、前記所望の配列をレシピエントベクターに連結し増幅させる。サブクローニングの各工程で、構造タンパク質をコードするDNAが排除されていないことを確認するために、前記の部分を対象の活性について試験する。挿入物は、サブクローニングの任意の工程で（例えばベクターへの連結前にゲル電気泳動によって）、またはレシピエントベクター含有または非含有細胞を例えば抗生物質（前記はレシピエントベクターを含まない細胞を死滅させる）を含む選択培地に入れる工程で精製してもよい。cDNA挿入物をベクターでサブクローニングする具体的な方法は当分野で周知である（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）。また別の特徴では、本発明の酵素はサブクローンである。そのようなサブクローンは親クローンとは例えば長さ、変異、タグまたは標識が異なっている可能性がある。

前記ポリヌクレオチドを調製することができる微生物には原核細胞微生物（例えば真性細菌および古細菌）および下等真核微生物（例えば菌類、いくつかの藻類および原虫）が含まれる。ポリヌクレオチドは環境サンプルから分離することができ、その場合には生物を培養することなく核酸が回収されるか、または1つ以上の培養生物から回収することができる。ある特徴では、そのような微生物は、エクストレモフィル、例えば超好熱菌、低温菌、低栄養菌、好塩菌、好圧性菌、好酸性菌であろう。エクストロモフィルから単離された酵素をコードするポリヌクレオチドを用いることができる。そのような酵素は、陸上の温泉または深海の熱水噴出孔の100℃を超える温度で、北極海の0℃未満の温度で、死海の飽和食塩の環境で、石炭堆積物および硫黄に富む地熱温泉での0に近いpH値で、または下水汚泥の11を超えるpH値で機能することができる。例えば、エクストレモフィルから単離され発現されたいくつかのエステラーゼおよびリパーゼは広範囲の温度およびpHを通して高い活性を示す。

上述のように選別および単離したポリヌクレオチドは適切な宿主細胞に導入される。適切な宿主細胞は、組換えおよび／または還元的再組合せを促進することができる任意の細胞である。選別したポリヌクレオチドは既に適切なコントロール配列を含むベクター内に存在する。前記宿主細胞は、高等な真核細胞（例えば哺乳動物細胞）でも、下等な真核細胞（例えば酵母細胞）でもよいが、また好ましくは、前記宿主細胞は原核細胞（例えば細菌細胞）である。構築物の宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション（Davis et al., 1986）によって実施することができる。

【０２６１】

適切な宿主の代表的な例として、以下を挙げることができる：細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセス、ネズミチフス菌；菌類細胞、例えば酵母；昆虫細胞、例えばドロソフィラS2およびスポドプテラSf9；動物細胞、例えばCHO、COSまたはボウズメラノーマ；アデノウイルス；および植物細胞。適切な宿主細胞の選択は、本明細書の開示から当業者

の技術範囲内にあると考えられる。

組換えタンパク質の発現に用いることができる種々の哺乳動物細胞培養系について特に言及すれば、哺乳動物発現系の例には、サル腎線維芽細胞のCOS-7株（“SV40-trnsformed simian cells support the replication of early SV40 mutants”(Gluzman, 1981)に記載されている）および適合しえるベクターを発現することができる他の細胞株（例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株）が含まれる。哺乳動物の発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、並びに任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列および5’フランキング非転写配列を含むであろう。必要な非転写遺伝エレメントを提供するためにSV40スプライス部位およびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いることができる。

別の特徴では、本発明の方法を用いて、1つ以上のオペロンまたは遺伝子クラスターまたはその部分から生化学的経路をコードする新規なポリヌクレオチドを作製することは本発明の意図するところである。例えば、細菌および多くの真核細胞は、その生成物が関連する過程に必要とされる遺伝子を調節するために協調的なメカニズムを有する。前記遺伝子は、“遺伝子クラスター”と称される構造を有するクラスターを単一の染色体上に形成し、ただ１つの調節配列（全クラスターの転写を開始するただ1つのプロモーターを含む）の制御下で一緒に転写される。したがって、遺伝子クラスターは、通常それらの機能に関して同一または関連する隣接する遺伝子の一群である。遺伝子クラスターによってコードされる生化学的経路の例はポリケチドである。

【０２６２】

遺伝子クラスターDNAは種々の生物から単離して、ベクター、特に調節配列を発現することができるベクターに連結することができる（前記調節配列は、連結された遺伝子クラスターから検出可能なタンパク質またはタンパク質関連アレイの活性の生成を制御および調節することができる）。外因性DNAの導入に対して格別に大きな収容能力を有するベクターの使用が、そのような遺伝子クラスターとともに使用するためには特に適切であり、大腸菌のF因子（または稔性因子）を含む例示として本明細書に記載されている。大腸菌のこのF因子は、接合中にそれ自体の高頻度の伝達に影響を与えるプラスミドであり、大きなDNAフラグメント、例えば混合微生物サンプルの遺伝子クラスターの安定的な増殖の達成に理想的である。本発明のある特徴は、“フォスミド”または細菌人工染色体（BAC）ベクターと称されるクローニングベクターを使用することである。これらは大腸菌のF因子に由来し、ゲノムDNAの大きなセグメントを安定的に組み込むことができる。未培養の混合環境サンプル由来のDNAとともに組み込まれたとき、これは、安定な“環境DNAライブラリー”の形態で大きなゲノムフラグメントを獲得することを可能にする。本発明で使用できるまた別のベクターのタイプはコスミドベクターである。コスミドベクターは、本来ゲノムDNAの大きなセグメントのクローニングおよび増殖のために設計された。コスミドベクターによるクローニングは以下に詳細に記載されている：Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。いったん適切なベクターに連結したら、種々のポリケチドシンターゼ遺伝子クラスターを含む1つ以上のベクターを適切な宿主細胞に導入することができる。前記遺伝子クラスターによって共有される部分的な配列相同性を有する領域は、ハイブリッド遺伝子クラスターを生じる配列再編成を生じる過程を促進するであろう。続いて、原型遺伝子クラスターには見出されない強化された活性について、新規なハイブリッド遺伝子クラスターをスクリーニングすることができる。

したがって、ある特徴では、本発明は、以下の工程による、生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドの製造方法およびそのようなポリペプチドを強化された活性についてスクリーニングする方法に関する：

1）作動できるように連結された少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび作動できるように連結された第二のポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入する工程（ここで前記少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび第二のポリヌクレオチドは部分的に配列相同性

を有する少なくとも１つの領域を共有する）；
2）作動できるように連結されたハイブリッドポリヌクレオチドを生じる配列再編成が促進される条件下で、宿主細胞を生育させる工程；
3）前記ポリヌクレオチドによってコードされるハイブリッドポリペプチドを発現させる工程；
4）強化された生物学的活性の同定を促進する条件下でハイブリッドポリペプチドをスクリーニングする工程；および
5）前記ハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離する工程。
種々の酵素活性についてスクリーニングする方法は当業者に公知であり、本明細書を通して考察されている。そのような方法は、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを単離した時に利用することができる。

【０２６３】

スクリーニングの方法論および“オンライン”追跡装置

本発明の方法の実施するとき、多様な装置および方法論を本発明のポリペプチドおよび核酸と一緒に用いて、例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性についてポリペプチドをスクリーニングし；トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの潜在的な潜在的調節物質（例えば活性化物質または阻害物質）として化合物をスクリーニングし；本発明のポリペプチドと結合する抗体について、本発明の核酸とハイブリダイズする核酸について、本発明のポリペプチドを発現する細胞ついてスクリーニングすることなどが可能である。さらに、サンプルのスクリーニングについて下記で詳細に記載するアレイ様式の他に、また別の様式もまた本発明の方法の実施に用いることができる。そのような様式には、例えば質量分光光度計、クロマトグラフ（例えば高速HPLCおよび他の液体クロマトグラフィー様式）およびより小型の様式（例えば1536-ウェルプレート、384-ウェルプレート）などが含まれる。高処理スクリーニング装置を適合させて、本発明の方法の実施に用いてもよい（例えば米国特許出願20020001809を参照されたい）。

【０２６４】

キャピラリーアレイ：

本発明の核酸又はポリペプチドは、アレイに固定又は適用することができる。アレイを用いて、組成物（例えば小分子、抗体、核酸など）のライブラリーを、本発明の核酸又はポリペプチドとの結合能力又は前記の活性の調節能力についてスクリーニング又は追跡することができる。キャピラリーアレイ（例えばGIGAMATRIX^{TM}（Diversa Corporation, San Diego, CA）および例えば米国特許出願No. 20020080350A1；WO0231203；WO0244336Aに記載されたアレイ）は、サンプル保持およびスクリーニングのためのまた別の装置を提供する。ある特徴では、キャピラリーアレイは、隣接するキャピラリーのアレイを形成する複数のキャピラリーを含み、ここで各キャピラリーはサンプル保持のために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を構成する。管腔は、円筒形、四角形、六角形または、前記壁が液体又はサンプルの保持のための管腔を形成することができるかぎり他の任意の幾何学形であり得る。キャピラリーアレイのキャピラリーは接近して一緒に保持され平面構造を形成することができる。キャピラリーは、溶融（キャピラリーが例えばガラスで製造される場合）、接着剤による接着、縛るかまたは隣同士を留め金で固定することによって一緒に束ねることができる。さらにまた、キャピラリーアレイは、アレイ中の隣接するキャピラリー間に沈積された間隙物質を含むことができ、それによって複数の貫通孔を含む硬い平板状装置を形成する。

キャピラリーアレイは、任意の数の個々のキャピラリー、例えば100から4,000,000本の範囲のキャピラリーで形成できる。さらに、約100,000本またはそれ以上の個々のキャピラリーを有するキャピラリーアレイを、標準的な研究室用装置に適合させるためにマイク

ロタイター（Microtiter(商標)）プレートの標準的サイズおよび形状に形成することができる。管腔は手動で満たされるか、または毛細管作用もしくは細い注射針によるマイクロインジェクションを用いて自動的に満たされる。問題のサンプルは続いて更なる分析または性状決定のために個々のキャピラリーから除去される。例えば、細い注射針様のプローブが液体通路に配置される(前記液体通路は添加のためまたは管腔から物質を引き出すために選択されるキャピラリーを有する)。

【０２６５】

一容器スクリーニングアッセイでは、キャピラリーアレイへの挿入の前にアッセイ成分は混合され、対象溶液が得られる。アレイの少なくとも一部分が対象溶液中に浸されたとき、管腔は毛細管作用によって満たされる。各キャピラリーにおける化学反応または生物学的反応及び／又は活性は検出可能な事象についてモニターされる。検出可能な事象はしばしば“ヒット”と称され、これは通常は光学的検出によって“無ヒット”をもたらすキャピラリーと区別される。したがって、キャピラリーアレイは大量の並行的な“ヒット”の検出を可能にする。

複数容器スクリーニングアッセイでは、ポリペプチドまたは核酸、例えばリガンドは第一の成分に導入することができる。前記第一の成分はキャピラリーアレイのキャピラリーの少なくとも一部分に導入される。続いて、気泡を第一の成分の後ろのキャピラリーに導入することができる。続いて、第二の成分をキャピラリーに導入することができ、この場合第二の成分は前記気泡によって第一の成分と分離される。続いて、キャピラリーの両側に水圧をかけて気泡を壊すことによって第一の成分および第二の成分を混合することができる。続いて、前記2つの成分の反応または無反応から生じる検出可能な事象についてキャピラリーアレイをモニターする。

結合スクリーニングアッセイでは、問題のサンプルは検出可能な粒子で標識された第一の液体としてキャピラリーアレイのキャピラリーに導入することができ、この場合、キャピラリーの管腔は前記検出可能粒子を管腔と結合させるための結合物質で被覆される。続いて、第一の液体をキャピラリー管から除去することができ（この場合、結合した検出可能粒子はキャピラリー内に維持される）、さらに第二の液体をキャピラリー管に導入することができる。続いて、前記粒子と第二の液体との反応または無反応から生じる検出可能な事象についてキャピラリーをモニターする。

【０２６６】

アレイまたは“バイオチップ”：

本発明の核酸および／またはポリペプチドはアレイに固定または塗布することができる。アレイを用いて、（例えば小分子、抗体、核酸などの）組成物ライブラリーを、本発明の核酸またはポリペプチドと結合するその能力または前記の活性を調節するその能力についてスクリーニングまたは追跡することができる。例えば本発明のある特徴では、追跡されるパラメーターはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の転写物の発現である。細胞の1つ以上または全ての転写物が、細胞の転写物を含むサンプルのハイブリダイゼーションによって測定することができ、また細胞の代表的な核酸もしくは細胞の転写物と相補的な核酸は、アレイまたは“バイオチップ”上に固定化された核酸とのハイブリダイゼーションによって測定することができる。マイクロチップ上の核酸“アレイ”を用いることによって、細胞の転写物のいくつかまたは全てを同時に定量することができる。あるいは、ゲノム核酸を含むアレイはまた、本発明の方法によって新規に操作された株の遺伝子型の決定に用いることができる。“ポリペプチドアレイ”はまた、複数のタンパク質の同時定量に用いることができる。本発明は公知の任意の“アレイ”（“マイクロアレイ”または“核酸アレイ”または“ポリペプチドアレイ”または“抗体アレイ”または“バイオチップ”またはその変型をもいう）を用いて実施することができる。アレイは一般的には複数の“スポット”または“標的エレメント”である。各標的エレメントは一定量の1つ以上の生物学的分子、例えばオリゴヌクレオチドを含み、それらはサンプル分子（例えばmRNA転写物）と特異的

に結合させるため基質表面の一定領域に固定されている。
本明細書で用いられる“アレイ”または“マイクロアレイ”または“バイオチップ”または“チップ”という用語は複数の標的エレメント”であり、下記でさらに詳細に考察するように、各標的エレメントは、土台表面の一定領域に固定された一定量の1つ以上のポリペプチド（抗体を含む）または核酸分子を含む。
本発明の方法を実施するとき、任意の公知のアレイおよび／またはアレイの製造および使用方法の全体もしくは部分またはその変型を、例えば以下に記載されているように取り入れることができる：米国特許第6,277,628号；第6,277,489号；第6,261,776号；第6,258,606号；第6,054,270号；第6.048,695号；第6,045,996号；第6,022,963号；第6,013,440号；第5,965,452号；第5,959,098号；第5,856,174号；第5,830,645号；第5,770,456号；第5,632,957号；第5,556,752号；第5,143,854号；第5,807,522号；第5,800,992号；第5,744,305号；第5,700,637号；第5,556,752号；第5,434,049号。さらにまた例えば以下を参照されたい：WO99/5173；WO99/09217；WO97/46313；WO96/17958。さらにまた例えば以下を参照されたい：Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174；Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092；Kern (1997) Biotechniques 23:120-124；Solinas-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407；Bowtell (1999) Nature Genetis Supp. 21:25-32。さらにまた以下を参照されたい：米国特許出願公開広報第20010018642号；同第20010019827号；同第20010016322号；同第20010014449号；同第20010014448号；同第20010012537号；同第20010008765号。

【０２６７】

抗体および抗体使用スクリーニング方法

本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼと特異的に結合する単離または組換え抗体を提供する。これらの抗体を用いて、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼまたは関連するポリペプチドを単離、同定または定量することができる。これらの抗体を用いて本発明の範囲内に包含される他のポリペプチドまたは他の関連するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを単離することができる。これらの抗体はトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの活性部位と結合するように設計することができる。したがって、本発明は、本発明の抗体を用いてトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを阻害する方法を提供する（本発明の抗トランスフェラーゼ、例えば抗トランスアミナーゼ、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／または抗オキシドレダクターゼ、例えば抗デヒドロゲナーゼ、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ組成物の応用に関する上記の考察を参照されたい）。
本発明は、本発明の酵素のフラグメント（本発明のポリペプチドの免疫原性フラグメントを含む）を提供する。本発明は、本発明のポリペプチドまたはペプチドおよびアジュバントまたは担体などを含む組成物を提供する。
前記抗体は、免疫沈降、染色、イムノアフィニティーカラムなどで用いることができる。所望の場合は、特異的な抗原をコードする核酸配列を、免疫とそれに続くポリペプチドまたは核酸の単離、増幅またはクローニングおよびポリペプチドの本発明のアレイ上への固定によって作製することができる。あるいは、本発明の方法を用いて、改変されるべき細胞により産生される抗体の構造を改変することができる。例えば抗体の親和性を強化または低下させることができる。さらにまた、抗体を製造または改変する能力は本発明の方法により細胞を操作して付与した表現型であってもよい。

【０２６８】

“抗体”という用語には、１つの免疫グロブリン遺伝子もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子または前記のフラグメントに由来するか、前記にならって作製されたか、または前記によって実質的にコードされたペプチドまたはポリペプチドであって、抗原またはエピトープに特異的に結合することができるものが含まれる。例えば以下を参照されたい：Fundamental Immunology, Third Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)；Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273；Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97。抗体という用語は、抗原に結合する能力を保持する抗原結合部分、すなわち“抗原結合部位”（例えばフラグメント、部分配列、相補性決定領域（CDR））を含み、（i）Fabフラグメント（VL、VH、CLおよびCH1ドメインから成る一価のフラグメント）；（ii）$F(ab')_2$フラグメント（ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント）；（iii）VHおよびCH1ドメインから成るFdフラグメント；（iv）抗体の単一の腕のVLおよびVHドメインから成るFvフラグメント；（v）dAbフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）（VHドメインから成る）；および（vi）単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。単鎖抗体もまた関連する場合には“抗体”という用語に含まれる。

免疫の方法、抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）の製造および単離の方法は当業者には公知で、さらに学術文献および特許文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：Coligan, Current Protocols in Immunology, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) Basic and Clinical Immunology (7th ed.) Lang Medical Publications, Los Altos, CA (“Stites”); Goding, Monoclonal Antibodies: Priciples and Practice (2nd ed.) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) Nature 256:495; Harlow (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York。抗体はまた、動物を用いる従来のin vivo方法以外でも、in vitroで例えば組換え抗体結合部位発現ファージディスプレーライブラリーを用いて作製することができる。例えば以下を参照されたい：Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45。

本発明のポリペプチドまたは連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150のアミノ酸を含む前記のフラグメントを用いて、前記ポリペプチドまたはフラグメントと特異的に結合する抗体を作製することもまた可能である。得られた抗体をイムノアフィニティークロマトグラフィー方法で用いて、前記ポリペプチドを単離または精製するか、または前記ポリペプチドが生物学的サンプルに存在するか否かを決定することができる。そのような方法では、本発明のポリペプチドの1つ、または連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150のアミノ酸を含む前記のフラグメントと特異的に結合することができる抗体と、タンパク質調製物（例えば抽出物）または生物学的サンプルを接触させる。

イムノアフィニティーの方法では、前記抗体を固体支持体（例えばビーズまたは他のカラムマトリックス）に付着させる。抗体が本発明のポリペプチドの1つまたはそのフラグメントと特異的に結合する条件下で、前記タンパク質調製物を前記抗体と接触させる。洗浄して非特異的に結合したタンパク質を除去した後、特異的に結合したポリペプチドを溶出させる。

【０２６９】

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

本発明のポリペプチドまたは連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150のアミノ酸を含む前記のフラグメントに対して作製されるポリクロー

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

モノクローナル抗体の調製の場合、継続的な細胞株培養によって生成される抗体を提供するいずれの技術も用いることができる。その例にはハイブリドーマ技術（Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., Immunology Today 4:72, 1983）およびEBV-ハイブリドーマ技術（Cole (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）が含まれる。

単鎖抗体の生成のために記載された技術（米国特許第4,946,778号）を利用して、本発明のポリペプチドまたは連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150のアミノ酸を含む前記のフラグメントに対する単鎖抗体を生成することができる。あるいは、トランスジェニックマウスを用いて、これらポリペプチドまたはそのフラグメントに対するヒト化抗体を発現させることができる。

本発明のポリペプチドまたは連続する少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150のアミノ酸を含む前記のフラグメントに対して作製された抗体を他の生物およびサンプルに由来する類似のポリペプチドのスクリーニングに用いることができる。そのような技術では、前記生物由来のポリペプチドを抗体と接触させ、前記抗体と特異的に結合するポリペプチドが検出される。上記に記載したいずれの方法も抗体結合の検出に用いることができる。そのようなスクリーニングアッセイの１つが以下に記載されている：“Methods for Measuring Cellulase Activities”., Methods in Enzymology, vol.160, pp. 87-116。

【０２７０】

キット

本発明は、前記組成物（例えば本発明の核酸、発現カセット、ベクター、細胞、トランスジェニック種子または植物もしくは植物部分、ポリペプチド（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）および／または抗体）を含むキットを提供する。前記キットはまた、本明細書に記載したような本発明の方法論、並びに工業、医学、研究、製薬、食品および飼料、食品および飼料補助物質でのプロセッシング並びに他の適用およびプロセスを教示する指示資料を含むことができる。

【０２７１】

全細胞操作および代謝パラメーターの測定

本発明の方法は、細胞の遺伝的構成を改変することによって、新規な表現型（例えば新規なまたは改変されたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性）を有する新規な細胞株を開発するために、全細胞進化または全細胞操作を提供する。前記遺伝的構成は、本発明の核酸、例えば本発明の酵素のコード配列を細胞に導入することによって改変することができる。例えばWO0220032、WO0196551を参照されたい。

新規な表現型を検出するために、改変細胞の少なくとも1つの代謝パラメータを“リアルタイム”または“オンライン”時間枠でモニターする。ある特徴では、複数の細胞（例えば細胞培養）を“リアルタイム”または“オンライン”でモニターする。ある特徴では、複数の代謝パラメータを“リアルタイム”または“オンライン”でモニターする。代謝パラメータは本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ

、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いてモニターできる。

代謝フラックス分析（MFA）は公知の生化学的フレームワークを基にしている。質量保存の法則および細胞内代謝に関する擬似定常状態仮説（pseudo-steady state hypothesis，PSSH）に基づいて線形独立代謝行列が構築される。本発明の方法の実施に際して、以下を含む代謝ネットワークが確立される：

－全ての経路の基質、生成物および中間代謝物の実体；

－前記経路の代謝物を変換する全ての化学反応の実体、前記経路の反応の化学量論；

－前記反応を触媒する全ての酵素の実体、前記酵素反応のカイネティクス；

－経路の成分間の調節的相互反応、例えばアロステリック相互反応、酵素-酵素相互反応など；

－酵素の細胞内区画局在性または前記酵素の超分子的構成；および

－代謝物、酵素またはエフェクター分子の濃度勾配の存在またはそれらの移動に対する拡散障壁の存在。

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

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

【０２７２】

mRNA転写物発現の追跡：

本発明のある特徴では、操作された表現型は、細胞内でのmRNA転写物（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼメッセージ）の発現の増加もしくは減少、または新規転写物（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）の生成を含む。この発現の増加または低下は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの存在について試験するか、またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性のアッセイによって追跡することができる。mRNA転写物（またはメッセージ）はまた、当分野で公知の任意の方法（ノザンブロット、定量的増幅反応、アレイへのハイブリダイゼーションなどなどを含む）によって検出および定量することができる。定量的増幅反応は、例えば定量的PCR（例えば定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（またはRT-PCR）を含む）；定量的リアルタイムRT-PCR（または“リアルタイムカイネティックRT-PCR”）を含む（例えば以下を参照されたい：Kreuzer (2000) Br. J. Haematol. 114:313-318; Xia (2001) Transplantation 72:907-914）。

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

本発明のある特徴では、操作される表現型は相同遺伝子の発現の増加を含む。前記は、負の制御エレメント（cis-またはtrans-で作用する転写調節エレメントを含む）のノックアウト、または正の制御エレメントの変異導入によって実施できる。細胞の1つ以上または全ての転写物を、細胞の転写物または細胞の転写物に相当する核酸もしくは前記と相補的な核酸を含むサンプルのハイブリダイゼーションによって、アレイ上に固定された核酸とのハイブリダイゼーションによって測定することができる。

【０２７３】

ポリペプチド、ペプチドおよびアミノ酸の発現の追跡：

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

【０２７４】

工業、エネルギー、医薬、医学、食品におけるプロセッシングおよび他の応用

本発明のポリペプチドは、任意の工業、農業、食品および飼料並びに食品および飼料サプリメントでのプロセッシング、医薬（薬剤）、医学、研究（実験室）におけるプロセスまたは他のプロセスで用いることができる。本発明は本発明の酵素を用いる工業的プロセスを提供し、前記工業的プロセスは、例えば医薬または栄養（食事）サプリメント工業、エネルギー工業（例えば“クリーンな”バイオ燃料の製造）、食品および飼料工業（例えば食品および飼料製品並びに食品および飼料添加物を製造する方法で用いられる）におけるプロセスである。ある特徴では、本発明は、医学工業で（例えば医薬（薬剤）、医薬（薬剤）前駆物質もしくは中間物質、または食事補完物質もしくは補助物質、または食品補助物質および添加物の製造のために）本発明の酵素を用いるプロセスを提供する。さらにまた、本発明は、燃料製造で本発明の酵素を使用する方法を提供する（バイオアルコール、例えばバイオエタノール、バイオメタノール、バイオブタノールまたはバイオプロパノール含み、したがって“クリーン”燃料の製造を含む）。

本発明のトランスフェラーゼは、任意のトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼまたはω-トランスアミナーゼ活性を有し、例えばω-アミンのケトンへ

の変換を触媒することができる。本発明のトランスフェラーゼはまた、オキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有することができる。本発明の酵素は高度に選択的な触媒である。それらは、通常の合成化学では比類のない完璧な立体選択性、領域選択性および化学的選択性を有する反応を触媒することができる。例えば、本発明の酵素は、キラルω-アミンのケトンへの変換の触媒を含むω-トランスアミナーゼ活性を有することができる。

本発明の酵素は顕著な融通性を示すことができる。例えば、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素は、有機溶媒中で機能するように、極端なpH（例えば高pHおよび低pH)、極端な温度（例えば高温および低温)、極端な塩レベル（例えば高塩濃度および低塩濃度）で作用するように、さらに前記酵素の天然の生理学的な基質とは構造的に無関係の化合物との反応を触媒することができるように、“都合に合わせて調整”（例えば配列の改変、また別の改変（例えばグリコシル化））することができる。

ある特徴では、本発明のトランスアミナーゼおよび／またはアミノトランスフェラーゼ酵素は、医薬、農薬または前記の中間体の製造における有機合成反応プロセスで用いられる。ある実施態様では、本発明のトランスアミナーゼおよび／またはアミノトランスフェラーゼ酵素は、病理学的または生物学的プロセス、例えば肝損傷／疾患または心筋梗塞に対する応答でタンパク質の消長を調べるための標的として用いられる。本発明の酵素を用いるある例示的なトランスアミナーゼ反応では、アルファ-アミノ基は、当該アミノ酸の対応するアルファ－ケト酸類似体を生成するアルファ－ケトグルタル酸のアルファ-炭素原子に転移される。

【０２７５】

天然および非天然アミノ酸の合成：

本発明の酵素を用いて、全ての天然および非天然アミノ酸（L-および／またはD-アミノ酸を含む）を生成することができる。前記は、例えば工業または医薬（薬剤）製品および／または医薬（薬剤）前駆物質および／または中間物質、例えば甘味料、抗生物質、ペプチド酵素およびペプチドホルモンで用いることができる。例えば、アリターム（例えばALITAME™）、チロシジンA、アクチノマイシンD、ペニシリンNおよびセファロスポリンC、並びにシクロスポリンAは、D-アラニンおよびD-フェニルアラニン、D-バリン、D-アルファアミノバリレート、D-アルファアミノアバリレートおよびD-アラニンをそれぞれ含み、前記は本発明の酵素を用いて製造される。ある特徴では、セファロスポリンCをグルタリル-7-セファロスポラニック酸（GL-7ACA）（セフェム系抗生物質の合成のためにきわめて重要な医薬用化学物質）に変換するために、本発明の酵素が用いられる。本発明のアミノトランスフェラーゼを用いることによってセファロスポリンCからグルタリル-7-セファロスポラニック酸を製造するある例示的方法では、本発明の酵素をセファロスポリンCおよびD-アミノアクセプター（例えばピルビン酸またはアルファ-ケトグルタル酸）を含む基質混合物に添加し、ケト-GL-7ACAおよびD-アラニンまたD-グルタミン酸をそれぞれ生成する。続いて前記混合物を過酸化水素と反応させ、グルタリル-7-セファロスポラニック酸を生成物として単離する。例えば米国特許6,337,190号を参照されたい。

本発明は天然および非天然アミノ酸を製造する酵素および方法を提供する。本発明の酵素は、当分野で公知の天然または非天然アミノ酸合成方法とともに用いることができる。例えば、また別の実施態様では、本発明の酵素を用いる本発明の方法は、米国特許（USPN）6,197,558号、6,180,374号、4,518,692号および4,826,766号に記載の方法を用いて天然および非天然アミノ酸を合成する。例えばある特徴では、本発明は、第一のアミノ酸、ケト酸および本発明のトランスアミナーゼ酵素を適切な条件下で反応させて第二のアミノ酸およびピルビン酸を生成する工程、前記ピルビン酸をアセトラクテートシンターゼと適切な条件下で反応させてトランスアミナーゼ酵素と反応しない化合物を生成する工程および前記第二のアミノ酸を分離する工程を含む方法を提供する。

【０２７６】

ある特徴では、本発明の酵素および方法を用いてtert-ロイシンを生成する。続いて前記を薬剤／医薬合成プロセスで用いることができる。例えば、L-tert-ロイシン-2-ピリジルアミドは、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害化合物の製造のための有用な中間体である。例えば欧州特許EP0822186号を参照されたい。

本発明の酵素および方法を用いて、例えば以下のような“非天然”アミノ酸を製造することができる：

－β-アミノ酸（β3およびβ2）
－ホモアミノ酸
－環式アミノ酸
－芳香族アミノ酸
－N-メチルアミノ酸
－ProおよびPyr誘導体
－3-置換アラニン誘導体
－グリシン誘導体
－環置換PheおよびTyr誘導体
－直鎖コアアミノ酸
－ジアミノ酸（ジアミン）
－オルニチン
－ノルロイシン
－フェニルセレノシステイン（米国特許出願公開広報20070238152参照）
－置換アミノ酸（例えばオルト-、パラ-またはメタ-置換アラニン、フェニルアラニン、チロシンなど）
－DAB（2,4-ジアミノ酪酸）

脂環式アミノ酸（例えば、(cis)-3-アミノビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2-カルボン酸；1-アミノ-1-シクロブタンカルボン酸；1-アミノシクロヘキサンカルボン酸 purum；cis-2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸など）、本発明の酵素およびプロセスを非天然アミノ酸のin vivo取り込みのための方法（例えば米国特許出願公開広報20070117184、20060234339、20060233744、20050272121、20050250183、20030082575に記載されたもの）と一緒に用いることができる。

【０２７７】

洗剤、消毒剤および洗浄組成物：

本発明は、本発明のポリペプチド（例えばトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ）を含む洗浄組成物（例えば洗剤）、消毒剤またはクレンザー（クリーニングまたはクレンジング）組成物（例えば布地洗浄用、食器洗浄用、洗濯用、口腔洗浄用、歯の洗浄用、およびコンタクトレンズ洗浄用）、並びに前記組成物を製造および使用する方法を提供する。本発明は、洗剤、消毒剤またはクレンザー組成物を製造および使用する方法の全てを取り込んでいる（例えば以下を参照されたい：米国特許6,413,928号、6,399,561号、6,365,561号、6,365,561号、6,380,147号）。前記洗剤、消毒剤またはクレンザー組成物は、1要素および2要素水性組成物、非水性液体組成物、鋳造固形物、顆粒形、粒状形、圧縮錠剤、ゲルおよび／またはペーストおよびスラリー形であり得る。本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼはまた、固形または液体形の洗剤、消毒剤またはクレンザーの添加生成物としても用いることができる。そのような添加生成物は通常の洗剤組成物の性能の補充または補強を目的とし、洗浄プロセスの任意の段階で添加できる。

洗剤溶液が所望の酵素活性を有すると仮定して、実際の活性酵素含有量は洗剤、消毒剤またはクレンザー組成物の製造方法によって左右され重要ではない。ある特徴では、最終溶液に存在するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トラ

ンスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの量は、製剤組成物1gにつき約0.001mgから0.5mgの範囲である。本発明の方法および組成物で使用するために選択される具体的な酵素は、最終的な利用条件（製品の物理的形態、使用pH、使用温度、並びに分解および改変されるべき汚れのタイプを含む）によって左右される。酵素は、与えられた使用条件のいずれに対しても最適の活性および安定性を提供するように選択することができる。ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、約4から約12の範囲のpH、約20℃から約95℃の範囲の温度で活性を有する。本発明の洗剤は、陽イオン性、半極性非イオン性または双性イオン性界面活性剤または前記の混合物を含むことができる。

【０２７８】

本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは粉末および液体の洗剤、消毒剤またはクレンザーに処方できる（約0.01から約5質量％（好ましくは0.1から0.5質量％）のレベルで4.0から12.0のpHを有する）。これらの洗剤、消毒剤またはクレンザー組成物はまた、他のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、および／または他の酵素、例えばキシラナーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、またはエンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、オキシドレダクターゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、エピメラーゼ、イソメラーゼ、ラセマーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクツロナンアセチルエステラーゼ、ポリガラクツロナーゼ、ラムノガラクツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクチンリアーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼを含むことができる。これらの洗剤、消毒剤またはクレンザー組成物はまた、染料、着色剤、芳香剤、漂白剤、緩衝剤、ビルダー、酵素“強化剤”（例えば米国特許出願20030096394参照）および安定化剤を含むことができる。

ある特徴では、本発明は、洗浄または洗濯のために十分な条件下で対象物を本発明のポリペプチドと接触させる工程を含む対象物の洗浄または洗濯方法を提供する。本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、洗剤、消毒剤またはクレンザーの添加物として加えることができる。布地の柔軟化組成物は本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含むことができる。

【０２７９】

食品処理および食品加工：

本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは食品加工工業において多数の用途を有する。例えば、ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いて、油に富む植物材料（例えば油に富む種子）の油の抽出、例えばダイズから大豆油の抽出、オリーブからオリーブ油の抽出、ナタネからナタネ油の抽出および／またはヒマワリの種子からヒマワリ油の抽出が改善される。別の特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸

トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは植物細胞材料の成分の分離に用いることができる。

本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、果実もしくは野菜ジュース、シロップ、抽出物などの製造に用いて収量を高めることができる。本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、種々の植物細胞壁由来材料または廃棄物質（例えば穀類、穀粒、ワインまたはジュース製造に由来する）、または農作物残渣（例えば野菜の外皮、豆類外皮、テンサイの茎髄、オリーブの茎髄、ジャガイモの茎髄など）の酵素処理に用いることができる。本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、加工果実または野菜の濃度および外観の改変に用いることができる。本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いて植物材料を処理し、植物材料（食品を含む）の加工を促進、植物成分の精製もしくは抽出を促進することができる。

ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、焼成用途（例えばクッキー、パンおよびクラッカー）で用いられる。ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、生地の加工で添加物として用いられる。本発明の別の特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼはまた、任意の食品もしくは飲料の処理、または食品もしくは飲料の製造プロセスで用いることができる。本発明の別の特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、任意の食品または飲料組成物に混合することができる。

【０２８０】

飼料および食品または飼料もしくは食品添加物：

本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いて、飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または食事用補填物質を処理する方法を提供する。前記動物には哺乳動物（例えばヒト）、鳥類、魚類などが含まれる。本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む飼料、食品、飼料もしくは食品添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または食事用補填物質を提供する。ある特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いて、飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または食事用補填物質を処理することによって、飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または食事用補填物質中の栄養物、例えばデンプン、タンパク質、糖などの利用性を高めることができる。

本発明の飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、また

は食事用補填物質は顆粒形、ペレット形、粒状形であることが可能で、前記はまた被覆されてあっても被覆されてなくてもよい。あるいは、本発明の飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または食事用補填物質は、安定化させた液体組成物でもよい。前記は水性または油性スラリーであってもよい。例えば米国特許6,245,546号を参照されたい。

【０２８１】

別の特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、トランスジェニックな飼料作物（例えばトランスジェニック植物、種子など）、例えば穀粒、穀類、トウモロコシ、ダイズ豆、ナタネ、ルピナスなどで前記酵素を直接発現させることによって供給することができる。上記で考察したように、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物部分および植物細胞を提供する。ある特徴では、前記核酸は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが回収可能な量で生成されるように発現される。前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、任意の植物または植物部分から回収することができる。あるいは、組換えポリペプチドを含む植物または植物部分は、食品または飼料の質の改善（例えば栄養価、味、レオロジー的特性の改善）のため、または抗栄養性因子の破壊のために用いることができる。

多くの種々の目的のために（例えば香りまたは栄養サプリメントを添加するため、胃の環境下で栄養物および酵素の放出を遅らせるためなど）、本発明の酵素マトリックス粒子にコーティングを適用することができる。または前記コーティングは、機能的な目的を達成するために、例えばマトリックス粒子から酵素の緩徐な放出を所望するか、または酵素が放出される条件を制御することを所望するときはいつでも適用することができる。コーティング物質の組成は、前記コーティングが感受性を有する因子（例えば熱、酸もしくは塩基、酵素または他の化学物質）によって選択的に分解されるようなものであり得る。あるいは、前記のような種々の分解因子に感受性を有する2つ以上のコーティングを連続的にマトリックス粒子に適用してもよい。

【０２８２】

本発明はまた、酵素放出マトリックスの製造を目的とする。本発明にしたがえば、前記方法は、酵素放出マトリックスとしての使用に適した粒子サイズの穀粒系基質の複数のそれぞれ分離した粒子を提供する工程を含み、この場合、前記粒子は、本発明のアミノ酸配列または前記の少なくとも30の連続するアミノ酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を含む。好ましくは、前記方法は、酵素放出マトリックスを凝縮または圧縮して顆粒にする工程を含み、前記はペレット化によって達成され得る。カビ抑制剤および粘着剤を使用するときは、それらは任意の適切なときに添加することができ、穀粒系基質のペレット化の前に所望の割合で穀粒系基質と混合することができる。ペレットミルの飼料中の水分含有量は、完成製品中の水分含有量に関して上記で述べた範囲であり、約14－15％である。ある特徴では、水分は酵素の水性調製物の形で原料ストックに添加され、原料ストックを前記の水分含有量にする。ペレットミル中の温度は、水蒸気により約82℃にされる。ペレットミルは原料ストックに十分な成果が付与される任意の条件下で操作され、ペレットが提供される。前記ペレット形成プロセス自体は、酵素含有組成物から水を除去するための費用効率の高いプロセスである。

【０２８３】

ある特徴では、ペレットミルは、1/8インチｘ2インチのダイを用いて100lb/分の圧力にて82℃で操作され、ペレットが提供される。続いて、前記ペレットをペレット破砕装置で

砕いて、8メッシュのスクリーンを通過することができるが20メッシュスクリーンには保持され得る粒子サイズを有するそれぞれ分離した複数の粒子を提供する。

本発明の熱安定性トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは本発明のペレットで用いることができる。それらは高い至適温度および高い熱耐性を有し、これまで実施されたことがない温度での酵素反応を実施できる。本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（例えば本発明の配列のいずれかで示されるもの）を、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの特徴（至適pH、至適温度、耐熱性、溶媒に対する安定性、比活性、基質親和性、分泌能力、翻訳速度、転写制御などに関して）とは異なる特徴を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの調製に用いることができる（例えば本明細書に記載したGSSMを用いる）。

【０２８４】

廃棄物処理：

本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは多様な他の工業的用途、例えば廃棄物処理で用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いる固形廃棄物の消化方法を提供する。前記方法は、実質的に未処理の固形廃棄物の体積及び容積を減少させることを含み得る。固形廃棄物は、制御温度で酵素溶液（本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含む）の存在下で酵素消化プロセスにより処理することができる。前記は、添加微生物による相当な細菌発酵無しに反応を生じる。前記固形廃棄物は液化廃棄物および任意の残留固形廃棄物に変換される。生じた液化廃棄物は前記任意の残留固形廃棄物から分離することができる。例えば米国特許5,709,796号を参照されたい。

本発明の別の特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼはまた、任意の廃棄物処理プロセスで用い得る。本発明の別の特徴では、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼはまた、任意の廃棄物処理組成物に加え得る。

【０２８５】

口腔手入れ製品：

本発明は、本発明のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ（本発明の酵素混合物または“カクテル”を含む）を含む口腔手入れ製品を提供する。例示的な口腔手入れ製品には、練り歯磨き、歯磨きクリーム、ゲルまたは歯磨き粉、オドンティクス、口内洗浄液、歯磨き前または歯磨き後の洗浄処方物、チューインガム、ロゼンジまたはキャンデーが含まれる。例えば米国特許6,264,925号を参照されたい。

本発明の口腔用製品は、他の酵素の任意の組合せ、例えばプロテアーゼ、ペプチダーゼ

、プロテイナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、エンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、アミログリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、アミログルコシダーゼおよびグルコシダーゼを含むことができる。

【０２８６】

バイオマス変換およびバイオ燃料製造：

本発明は、本発明の酵素（本発明の酵素混合物または“カクテル”を含む）を用いる、バイオマス変換、または任意の有機物質の燃料、例えばバイオ燃料（例えばバイオエタノール、バイオメタノール、バイオプロパノールおよび／またはバイオブタノールなど）への変換のための方法およびプロセスを提供する。したがって、本発明は、本発明のポリペプチド（本発明の酵素混合物もしくは“カクテル”、または本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む）を含む燃料、例えばバイオ燃料（例えばバイオエタノール）を提供する。また別の特徴では、前記燃料は植物材料に由来し、前記植物材料は、場合によってジャガイモ、ダイズ、（ナタネ）、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、エンバク、コムギ、テンサイまたはサトウダイコンを含み、さらに場合によって前記燃料はバイオエタノールまたはガソリン-エタノール混合物を含む。

本発明は燃料を製造する方法を提供し、前記方法は、バイオマス組成物または任意の有機物質を、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドまたは本発明の混合物もしくは“カクテル”もしくは本発明の製品のいずれかと接触させる工程を含む。また別の実施態様では、バイオマス組成物は、植物、植物生成物または植物誘導体を含み、前記植物または植物生成物は、サトウキビまたはその生成物、テンサイまたはサトウダイコン、コムギ、トウモロコシ、ダイズ、ジャガイモ、イネまたはオオムギを含むことができる。ある特徴では、前記燃料は、バイオエタノールもしくはガソリン-エタノール混合物、またはバイオプロパノールもしくはガソリン-プロパノール混合物、またはバイオブタノールもしくはガソリン-ブタノール混合物、またはバイオメタノールもしくはガソリン-メタノール混合物、またはバイオディーゼルもしくはガソリン-バイオディーゼル混合物、または前記の任意の組合せを含む。

本発明はバイオエタノール、バイオブタノール、バイオメタノールおよび／またはバイオプロパノールを製造する方法を提供し、前記方法は、バイオマス組成物または任意の有機物質を、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドまたは本発明の混合物もしくは“カクテル”もしくは本発明の製品のいずれかと接触させる工程を含む。また別の実施態様では、前記バイオマス組成物は、植物、植物生成物または植物誘導体を含み、さらに前記植物または植物生成物は、サトウキビまたはその生成物、テンサイまたはサトウダイコン、コムギ、トウモロコシ、ダイズ、ジャガイモ、イネまたはオオムギを含むことができる。また別の実施態様では、前記有機物質またはバイオマスは、農作物（例えばコムギ、オオムギ、ジャガイモ、スイッチグラス、ポプラ材）から派生し、食品または飼料製造の副産物であり、または植物残留物または廃棄紙製品であり、さらに場合によって前記植物残留物は、茎、葉、外皮、殻、トウモロコシもしくはトウモロコシの穂軸、トウモロコシの茎葉、トウモロコシのひげ根、干し草、わら（例えば稲わらまたは麦わら）、サトウキビバガス、サトウダイコンパルプ、かんきつ類パルプおよびかんきつ類の皮、木材シンニング（thinning）、木材チップ、木材パルプ、パルプ廃棄物、木材廃棄物、木材削り屑およびおがくず、建築および／または解体廃棄物および屑（例えば木材、木材削り屑およびおがくず）であり、さらに場合によって、前記紙廃棄物は、廃棄もしくは使用済みコピー用紙、コンピュータプリント用紙、ノート用紙、便箋用紙、タイプライター用紙、新聞紙、雑誌類、厚紙および紙製包装材およびリサイクル紙材料を含む。さらにまた、都市廃棄物、例えば自治体の固形廃棄物の紙部分、自治体の木材廃棄物、および自治体の植物系廃棄物を用いることができる。

本発明は、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素の混合物（または“カクテル”）を含む組成物（製品、

酵素アンサンブルまたは“カクテル”を含む）を提供する。
本発明は、天然のバイオマス（例えば植物）の変換を含む化学反応サイクルに関与するために、本発明の酵素を発現する細胞および／または生物を提供する（例えばこの場合、前記細胞および／または生物は異種核酸として本発明の配列を含む）。あるいは、本発明のポリペプチドは前記バイオマス植物材料または原料自体で発現されることがある。
本発明の方法はまた、変換バイオマス（例えばリグのセルロース系）材料（本発明の酵素によって処理されたもの）を採取する工程、および発酵および／または化学的合成によって前記を燃料（例えばバイオ燃料、例えばバイオエタノール、バイオブタノール、バイオメタノール、バイオプロパノールまたはバイオディーゼル）に生成する工程を含む。ある特徴では、生成糖は発酵糖であり、および／または非発酵生成物はガス化される。
本発明の方法はまた、本発明の酵素を用いて、藻類、バージン植物油、植物廃油、動物脂肪および獣脂（例えば牛脂、豚脂、黄色グリース）または下水を変換する工程、および発酵および／または化学的合成または変換によって前記を燃料（例えばバイオアルコール、例えばバイオエタノール、バイオメタノール、バイオブタノール、バイオプロパノールまたはバイオディーゼル）に生成する工程を含む。
本発明の酵素（例えば本発明の組換え酵素を生成し、さらにいくつかの特徴では前記を分泌する生物、例えば微生物（例えば菌類、酵母または細菌）並びに植物および植物細胞および植物部分（例えば種子）を含む）は、任意の有機物質／バイオマス変換プロセスの任意の段階で（例えば任意の１つの工程、いくつかの工程、または含まれる全ての工程で）、またはバイオマス変換プロセスの以下の方法の全て、またはこれらバイオ燃料代替物の全てで用いられるか、または加えられ／組み込まれ得る：
直接燃焼：直接加熱による材料の燃焼はもっとも単純なバイオマス技術であり、バイオマス供給源が付近に存在する場合は非常に経済的である。
１．熱分解：熱分解は酸素の非存在下での加熱によるバイオマスの熱分解である。ある特徴では、バイオマスは華氏800度から1400度の間の温度で加熱されるが、燃焼に必要な酸素が導入されず、気体、燃料油および木炭を生じる。
２．ガス化：バイオマスを用いて、加熱または嫌気的消化によりメタンを生成することができる。合成ガス（一酸化炭素と水素の混合物）はバイオマスから誘導することができる。
ゴミ投棄場ガス：ゴミ投棄場ガスは、ゴミ投棄場に埋められたゴミの分解によって生じる。有機性廃棄物が分解するとき、約50％のメタン（天然ガスの主要成分）から成るガスが発生する。
－嫌気的消化：嫌気的消化は、有機材料をメタン（天然ガスの主要成分）と二酸化炭素の混合物に変換する。ある特徴では、バイオマス（例えば廃水（下水））、肥料、または植物加工廃棄物を水と混合し、空気を添加せずに消化タンクに供給する。
－発酵：
アルコール発酵：燃料アルコールは、セルロース系物質および／またはデンプンを糖に変換し、前記糖をアルコールに発酵させ、続いてアルコールと水の混合物を蒸留により分離することによって生成される。フィードストック、例えば専用作物（コムギ、オオムギ、ジャガイモ、スイッチグラス、ポプラ材）、農業残留物および廃棄物（例えば稲わら、トウモロコシ茎葉、麦わら、サトウキビバガス、籾殻、トウモロコシのひげ根、サトウダイコンパルプ、かんきつ類パルプおよびかんきつ類の皮）、森林廃棄物（例えば硬木および軟木のシンニング、林業由来の硬木および軟木の残留物、木材の削り屑およびおがくず）、都市廃棄物（例えば自治体の固形廃棄物の紙部分、自治体の木材廃棄物、自治体の植物系廃棄物）、木材廃棄物（製材所廃棄物、パルプミル廃棄物、建築廃棄物、解体廃棄物、木材削り屑およびおが屑）および古紙、または糖、デンプンおよび／またはセルロースを含む他の材料を、酵母による発酵によって糖に、続いてアルコールに変換することができる。あるいは、発酵によって糖を含む材料を直接アルコールに変換することができる。
－トランスエステル化：油をバイオディーゼルに変換する例示的反応はトランスエステル化と呼ばれる。トランスエステル化プロセスでは、アルコール（例えばメタノール）を植

物油、動物脂肪またはリサイクル獣脂に含まれるトリグリセリドと反応させ、脂肪酸アルキルエステル（バイオディーゼル）およびグリセリンが生成される。前記反応は、熱および強塩基触媒（例えば水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム）を必要とする。

－バイオディーゼル：バイオディーゼルは、植物油、動物脂肪またはリサイクル獣脂から生成される脂肪酸アルキルエステルの混合物である。バイオディーゼルは、その純粋な形態で運搬手段のための燃料として用いることができるが、しかし通常、前記は石油ディーゼル添加物として用いられ、ディーゼル駆動式運搬手段に由来する粒子状物質、二酸化炭素、炭水化物および大気中有害物質のレベルが削減される。

加水分解：本発明の酵素を用いて触媒される、化合物（例えばバイオマス（例えばリグノセルロース系材料））の加水分解が含まれる。

共同エネルギー生成（cogeneration）：共同エネルギー生成は、ただ1つの燃料および施設を用いた2つ以上のエネルギー形態の同時生成である。ある特徴では、バイオマス共同エネルギー生成は熱および電気の両方を生成するので、バイオマス単独エネルギー生成よりも潜在力の高い成長を示す。

本発明の酵素はまたグリセリン精製で用いることができる。グリセリン副産物は、未反応触媒および酸で中和される石鹸を含む。水およびアルコールを除去して50％から80％の粗グリセリンが生成される。残余に夾雑物には未反応脂肪および油が含まれ、前記は本発明のポリペプチドを用いて処理することができる。本発明の大規模なバイオディーゼルプラントでは、製薬および化粧品工業のために、グリセリンはさらに精製、例えば99％以上の純度に精製される。

【０２８７】

液体または気体ガソリンとしてのバイオ燃料：

本発明は、バイオ燃料および合成燃料を気体またはガソリン（例えば合成ガス）の形態で提供する。ある特徴では、本発明の方法は、天然のバイオマスの変換のための化学反応サイクルのために、例えばバイオマスを加水分解してバイオ燃料（例えばバイオエタノール、バイオプロパノール、バイオブタノールまたはバイオメタノール）または合成燃料を液体の形態でまたは気体（例えば“合成ガス”）として製造するために、本発明の酵素を使用することを含む。

例えば、本発明は、本発明のポリペプチドを用いて製造されるか、または本発明の方法を用いて製造される、バイオエタノール、バイオプロパノール、バイオブタノールおよび／またはバイオメタノールを含むバイオ燃料ガスおよび合成ガス燃料（“合成ガス”）を製造する方法を提供し、ある特徴では、本発明のこのバイオ燃料ガスは、天然ガス（これもまたバイオマスから合成することができる）、例えば水素または炭化水素系ガス燃料と混合される。

ある特徴では、本発明は、ガス化によってバイオマスを合成燃料、例えば合成ガス（例えばバイオマスから生成される合成ガス）に加工する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、サトウキビ（例えばバガス）からエタノール、プロパノール、ブタノールおよび／またはメタノールガスを製造する方法を提供する。ある特徴では、この燃料（またはガス）は内燃機関の燃料（例えば自動車、トラック、飛行機、船、小型エンジンなどの燃料）として用いられる。ある特徴では、本発明は、植物（例えばトウモロコシ）、または植物生成物（例えば干し草またはわら（例えば稲わらまたは麦わら）または任意の穀物植物の任意の乾燥茎））または農業廃棄物からエタノール、プロパノール、ブタノールおよび／またはメタノールを製造する方法を提供する。

ある特徴では、本発明の方法または組成物を用いて製造されるエタノール、プロパノール、ブタノールおよび／またはメタノールは、燃料（例えばガソリン）の添加物（例えば酸素付加剤）として用いるか、または燃料として直接用いてもよい。例えば、本発明の方法によって製造されるエタノール、プロパノール、ブタノールおよび／またはメタノール（燃料を含む）は、エチル三級ブチルエーテル（ETBE）またはETBT混合物、例えばバイオ燃料として47％エタノールを含むETBTと、またはMTBE（メチル三級ブチルエーテル）と混合することができる。別の特徴では、本発明の方法によって製造されるエタノール、プロ

パノール、ブタノールおよび／またはメタノール（燃料を含む）は、以下と混合することができる：

IUPCの名称	一般名称
ブタ-1-エン	α-ブチレン
cis-ブタ-2-エン	cis-β-ブチレン
trans-ブタ-2-エン	trans-β-ブチレン
2－メチルプロペン	イソブチレン

【０２８８】

本発明の方法によって（例えば本発明の酵素を用いて）製造されるブタノールおよび／またはエタノールは、“A.B.E.”（アセトン、ブタノール、エタノール）発酵を用いてさらに加工することができ、ある特徴では、ブタノールはただ1つの液体生成物である。ある特徴では、このブタノールおよび／またはエタノールを、既存のガソリンエンジンで（エンジンまたは車を改変することなく）“そのまま（straight）”燃焼させて、より多くのエネルギーを生成し、さらに腐食性が少なくエタノールよりも水溶性が低く、さらに既存のインフラを通して供給することができる。

ある特徴では、前記アルコールの1つ、いくつかまたは全てが、本発明の酵素を用い本発明のプロセスによって製造され、前記プロセスは、さらにバイオマスの液体変換（biomass-to-liquid）技術、例えばガス化プロセスを含み、触媒合成を伴うかまたはバイオマスの混合アルコール燃料へのバイオ変換を伴って合成ガスを生成することができる。

本発明はまた、“ガスの液体変換”（もしくはGTL）または“石炭の液体変換”（もしくはCTL）または“バイオマスの液体変換”（もしくはBTL）または“油砂の液体変換”（もしくはOTL）プロセスを組み込んだ（または前記に組み込まれた）本発明の酵素の使用を含むプロセスを提供し、ある特徴では、本発明のこれらプロセスは合成燃料の製造に用いられる。ある特徴では、本発明のこれらのプロセスの1つは、例えば、いわゆる“フィッシャー-トロプシュ”プロセスを用いて、バイオマスからバイオ燃料（例えばシンフューエル）を製造することを含む（フィッシャー-トロプシュプロセスは一酸化炭素および水素が種々の形態の液体炭化水素に変換される化学触媒反応であり、使用される典型的な触媒は鉄またはコバルトを土台にしている。このプロセスの主要な目的は、合成潤滑油または合成燃料として使用される合成石油代替物を生成することである）。ある特徴では、本発明のこの合成バイオ燃料は酸素を含むことができ、高品質ディーゼルおよびガソリンの添加物として用いることができる。

また別の特徴では、本発明のプロセスは多様な前処理を用い、前記前処理は、物理的、化学的および多重前処理（物理的＋化学的処理）の3つのカテゴリーに分類することができる。任意の化学物質、例えば酸、アルカリ、気体、セルロース溶媒、アルコール、酸化剤および還元剤を前処理剤として用いることができる。これらの化学物質の中で、とりわけアルカリが、比較的高価でなくセルロースのより穏やかな分解をもたらすので、もっとも好まれる前処理剤である。一般的なアルカリである水酸化ナトリウムおよび石灰もまた前処理剤として用いることができる。水酸化ナトリウムはバイオマスの消化性を顕著に高めるが、リサイクルすることが困難であり、比較的高価で取扱いに危険を伴う。対照的に、石灰は多くの利点を有する。すなわち、石灰は安全で非常に安価であり、洗浄水を二酸化炭素で炭酸化することによって回収することができる。

【０２８９】

ある特徴では、本発明は、嫌気性菌による有機物質の嫌気的消化プロセスによって生成されるバイオ燃料（例えばバイオガス）を提供する（前記嫌気的消化プロセスは本発明の酵素または本発明の方法の使用を含む）。このバイオ燃料（例えばバイオガス）は、生物消化性廃棄物質から生成されるか、またはガス収量を補うために嫌気性消化菌に供給されるエネルギー作物の使用によって生成される。固形の産出物、消化物もまたバイオ燃料として用いることができる。

本発明は、ディーゼルエンジンに使用することができる、生物学的に生成される油（粗

雑な油を含む）およびガスを製造する方法を提供し、前記プロセスは本発明の酵素または本発明の方法の使用を含む。ある特徴では、これらの方法によって、石油（例えば原油）を軽油、石油、ディーゼルおよび他の分画に精製することができる。

本発明は、生物学的に生成される油を以下から製造する方法（本発明の酵素および本発明の方法を用いる）を提供する：

－ストレート植物油（SVO）

－植物廃油（WVO）、主として商業的調理場で生じる良質の料理廃油および獣脂、

－動物脂肪および植物油のトランスエステル化から得られるバイオディーゼル、石油ディーゼルエンジンで直接使用できる、

－生物学的に誘導された粗雑な油、非オイル系材料を含む複雑な有機材料（例えば製品廃棄物、例えば古タイヤ、もみがら、木材およびプラスチック）の熱による脱ポリマー化を受けたバイオガスおよび炭素固形物と一緒に、

－熱分解油、前記はバイオマス、木材廃棄物などから熱のみを用いてフラッシュピロリーシスプロセスで生成され得る（前記油は、通常の燃料系または内燃エンジンで使用する前に処理することができる）、

－木材、木炭および乾燥糞。

【０２９０】

本発明の具体的実施態様を以下に列挙する。

（１）　以下の（a）から（p）のいずれかを含む単離、合成または組み換え核酸（ポリヌクレオチド）：

（a）少なくとも1つのポリペプチドをコードする核酸（ポリヌクレオチド）であって、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番

号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517、配列番号:519、配列番号:521、配列番号:523、配列番号:525、配列番号:527、配列番号:529、配列番号:531、配列番号:533、配列番号:535、配列番号:537、配列番号:539、配列番号:541、配列番号:543、配列番号:545、配列番号:547、配列番号:549、配列番号:551、配列番号:553、配列番号:555、配列番号:557、配列番号:559、配列番号:561、配列番号:563、配列番号:565、配列番号:567、配列番号:569、配列番号:571、配列番号:573、配列番号:575、配列番号:577、配列番号:579、配列番号:581、配列番号:583、配列番号:585、配列番号:587、配列番号:589、配列番号:591、配列番号:593、配列番号:595、配列番号:597、配列番号:599、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:605、配列番号:607、配列番号:609、配列番号:611、配列番号:613、配列番号:615、配列番号:617、配列番号:619、配列番号:621、配列番号:623、配列番号:625、配列番号:627、配列番号:629、配列番号:631、配列番号:633、配列番号:635、配列番号:637、配列番号:639、配列番号:641、配列番号:643、配列番号:645、配列番号:647、配列番号:649、配列番号:651、配列番号:653、配列番号:655、配列番号:657、配列番号: 659、配列番号: 661、配列番号:663、配列番号:665、配列番号:667、配列番号:669、配列番号:671、配列番号:673、配列番号:675、配列番号:677、配列番号:679、配列番号:681、配列番号:683、配列番号:685、配列番号:687、配列番号:689、配列番号:691、配列番号:693、配列番号:695、配列番号:697、配列番号:699、配列番号:701、配列番号:703、配列番号:705、配列番号:707、配列番号:709、配列番号:711、配列番号:713、配列番号:715、配列番号:717、配列番号:719、配列番号:721、配列番号:723、配列番号:725、配列番号:727、配列番号:729、配列番号:731、配列番号:733、配列番号:735、配列番号:737、配列番号:739、配列番号:741、配列番号:743、配列番号:745、配列番号:747、配列番号:749、配列番号:751、配列番号:753、配列番号:755、配列番号:757、配列番号:759、配列番号:761、配列番号:763、配列番号:765、配列番号:767、配列番号:769、配列番号:771、配列番号:773、配列番号:775、配列番号:777、配列番号:779、配列番号:781、配列番号:783、配列番号:785、配列番号:787、配列番号:789、配列番号:791、配列番号:793、配列番号:795、配列番号:797、配列番号:799、配列番号:801、配列番号:803、配列番号:805、配列番号:807、配列番号:809、配列番号:811、配列番号:813、配列番号:815、配列番号:817、配列番号:819、配列番号:821、配列番号:823、配列番号:825、配列番号:827、配列番号:829、配列番号:831、配列番号:833、配列番号:835、配列番号:837、配列番号:839、配列番号:841、配列番号:843、配列番号:845、配列番号:847、配列番号:849、配列番号:851、配列番号:853、配列番号:855、配列番号:857、配列番号:859、配列番号:861、配列番号:863、配列番号:865、配列番号:867、配列番号:869、配列番号:871、配列番号:873、配列番号:875、配列番号:877、配列番号:879、配列番号:881、配列番号:883、配列番号:885、配列番号:887、配列番号:889、配列番号:891、配列番号:893、配列番号:895、配列番号:897、配列番号:899、配列番号:901、配列番号:903、配列番号:905、配列番号:907、配列番号:909、

配列番号:911、配列番号:913、配列番号:915、配列番号:917、配列番号:919、配列番号:921、配列番号:923、配列番号:925、配列番号:927、配列番号:929、配列番号:931、配列番号:933、配列番号:935、配列番号:937、配列番号:939、配列番号:941、配列番号:943、配列番号:945、配列番号:947、配列番号:949、配列番号:951、配列番号:953、配列番号:955、配列番号:957、配列番号:959、配列番号:961、配列番号:963、配列番号:965、配列番号:967、配列番号:969、配列番号:971、配列番号:973、および／または配列番号:975の核酸（ポリヌクレオチド）配列と少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれより高いか、または完全な（100%）配列同一性を有する配列を含み、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性もしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードするか、またはトランスフェラーゼ特異的抗体、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ特異的抗体を生成することができるポリペプチドまたはペプチド（エピトープまたは免疫原として機能するポリペプチドまたはペプチド）をコードする、前記核酸；

（b）（a）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、配列同一性が（A）配列比較アルゴリズムによる解析又は目視精査によって、または（B）cDNA、転写物（mRNA）、または遺伝子の少なくとも約20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150もしくはそれより多い残基の領域にわたって、またはその完全長にわたって決定される、前記核酸；

（c）（a）または（b）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、配列比較アルゴリズムがBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、フィルタリング設定がblastall -p blastp -d “nr pataa” -F Fに設定され、さらに他の全てのオプションが規定値に設定される、前記核酸；

（d）少なくとも1つのポリペプチドまたペプチドをコードする核酸（ポリヌクレオチド）であって、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147、配列番号:149、配列番号:151、配列番号:153、配列番号:155、配列番号:157、配列番号:159、配列番号:161、配列番号:163、配列番号:165、配列番号:167、配列番号:169、配列番号:171、配列番号:173、配列番号:175、配列番号:177、配列番号:179、配列番号:181、配列番号:183、配列番号:185、配列番号:187、配列番号:189、配列番号:191、配列番号:193、配列番号:195、配列番号:197、配列番号:199、配列番号:201、配列番号:203、配列番号:205、配列番号:207、配列番号:209、配列番号:211、配列番号:213、配列番号:215、配列番号:217、配列番号:219、配列番号:221、配列番号:223、配列番号:225、配列番号:227、配列番号:229、配列番号:231、配列番号:233、配列番号:235、配列番号:237、配列番号:239、配列番号:241、配列番号:243、配列番号:245、

配列番号:247、配列番号:249、配列番号:251、配列番号:253、配列番号:255、配列番号:257、配列番号:259、配列番号:261、配列番号:263、配列番号:265、配列番号:267、配列番号:269、配列番号:271、配列番号:273、配列番号:275、配列番号:277、配列番号:279、配列番号:281、配列番号:283、配列番号:285、配列番号:287、配列番号:289、配列番号:291、配列番号:293、配列番号:295、配列番号:297、配列番号:299、配列番号:301、配列番号:303、配列番号:305、配列番号:307、配列番号:309、配列番号:311、配列番号:313、配列番号:315、配列番号:317、配列番号:319、配列番号:321、配列番号:323、配列番号:325、配列番号:327、配列番号:329、配列番号:331、配列番号:333、配列番号:335、配列番号:337、配列番号:339、配列番号:341、配列番号:343、配列番号:345、配列番号:347、配列番号:349、配列番号:351、配列番号:353、配列番号:355、配列番号:357、配列番号:359、配列番号:361、配列番号:363、配列番号:365、配列番号:367、配列番号:369、配列番号:371、配列番号:373、配列番号:375、配列番号:377、配列番号:379、配列番号:381、配列番号:383、配列番号:385、配列番号:387、配列番号:389、配列番号:391、配列番号:393、配列番号:395、配列番号:397、配列番号:399、配列番号:401、配列番号:403、配列番号:405、配列番号:407、配列番号:409、配列番号:411、配列番号:413、配列番号:415、配列番号:417、配列番号:419、配列番号:421、配列番号:423、配列番号:425、配列番号:427、配列番号:429、配列番号:431、配列番号:433、配列番号:435、配列番号:437、配列番号:439、配列番号:441、配列番号:443、配列番号:445、配列番号:447、配列番号:449、配列番号:451、配列番号:453、配列番号:455、配列番号:457、配列番号:459、配列番号:461、配列番号:463、配列番号:465、配列番号:467、配列番号:469、配列番号:471、配列番号:473、配列番号:475、配列番号:477、配列番号:479、配列番号:481、配列番号:483、配列番号:485、配列番号:487、配列番号:489、配列番号:491、配列番号:493、配列番号:495、配列番号:497、配列番号:499、配列番号:501、配列番号:503、配列番号:505、配列番号:507、配列番号:509、配列番号:511、配列番号:513、配列番号:515、配列番号:517、配列番号:519、配列番号:521、配列番号:523、配列番号:525、配列番号:527、配列番号:529、配列番号:531、配列番号:533、配列番号:535、配列番号:537、配列番号:539、配列番号:541、配列番号:543、配列番号:545、配列番号:547、配列番号:549、配列番号:551、配列番号:553、配列番号:555、配列番号:557、配列番号:559、配列番号:561、配列番号:563、配列番号:565、配列番号:567、配列番号:569、配列番号:571、配列番号:573、配列番号:575、配列番号:577、配列番号:579、配列番号:581、配列番号:583、配列番号:585、配列番号:587、配列番号:589、配列番号:591、配列番号:593、配列番号:595、配列番号:597、配列番号:599、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:605、配列番号:607、配列番号:609、配列番号:611、配列番号:613、配列番号:615、配列番号:617、配列番号:619、配列番号:621、配列番号:623、配列番号:625、配列番号:627、配列番号:629、配列番号:631、配列番号:633、配列番号:635、配列番号:637、配列番号:639、配列番号:641、配列番号:643、配列番号:645、配列番号:647、配列番号:649、配列番号:651、配列番号:653、配列番号:655、配列番号:657、配列番号: 659、配列番号: 661、配列番号:663、配列番号:665、配列番号:667、配列番号:669、配列番号:671、配列番号:673、配列番号:675、配列番号:677、配列番号:679、配列番号:681、配列番号:683、配列番号:685、配列番号:687、配列番号:689、配列番号:691、配列番号:693、配列番号:695、配列番号:697、配列番号:699、配列番号:701、配列番号:703、配列番号:705、配列番号:707、配列番号:709、配列番号:711、配列番号:713、配列番号:715、配列番号:717、配列番号:719、配列番号:721、配列番号:723、配列番号:725、配列番号:727、配列番号:729、配列番号:731、配列番号:733、配列番号:735、配列番号:737、配列番号:739、配列番号:741、配列番号:743、配列番号:745、配列番号:747、配列番号:749、配列番号:751、配列番号:753、配列番号:755、配列番号:757、配列番号:759、配列番号:761、配列番号:763、配列番号:765、配列番号:767、配列番号:769、配列番号:771、配列番号:773、配列番号:775、配列番号:777、配列番号:779、配列番号:781、配列番号:783、配列番号:785、配列番号:787、配列番号:789、配列番号:791、配列番号:793、配列番号:795、配列番号:797、配列番号:799、配列番号:801、配列番号:803、配列番号:805、配列番号:807、配列番号:809、配列番号:811、配列番号:813、配列番号:815、配列番号

:817、配列番号:819、配列番号:821、配列番号:823、配列番号:825、配列番号:827、配列番号:829、配列番号:831、配列番号:833、配列番号:835、配列番号:837、配列番号:839、配列番号:841、配列番号:843、配列番号:845、配列番号:847、配列番号:849、配列番号:851、配列番号:853、配列番号:855、配列番号:857、配列番号:859、配列番号:861、配列番号:863、配列番号:865、配列番号:867、配列番号:869、配列番号:871、配列番号:873、配列番号:875、配列番号:877、配列番号:879、配列番号:881、配列番号:883、配列番号:885、配列番号:887、配列番号:889、配列番号:891、配列番号:893、配列番号:895、配列番号:897、配列番号:899、配列番号:901、配列番号:903、配列番号:905、配列番号:907、配列番号:909、配列番号:911、配列番号:913、配列番号:915、配列番号:917、配列番号:919、配列番号:921、配列番号:923、配列番号:925、配列番号:927、配列番号:929、配列番号:931、配列番号:933、配列番号:935、配列番号:937、配列番号:939、配列番号:941、配列番号:943、配列番号:945、配列番号:947、配列番号:949、配列番号:951、配列番号:953、配列番号:955、配列番号:957、配列番号:959、配列番号:961、配列番号:963、配列番号:965、配列番号:967、配列番号:969、配列番号:971、配列番号:973、および／または配列番号:975の核酸（ポリヌクレオチド）配列を含む核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み；前記ポリペプチドまたはペプチドが、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼもしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するか、またはトランスフェラーゼ特異的抗体、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ特異的抗体を生成することができ（エピトープまたは免疫原として機能するポリペプチドまたはペプチド）；さらに、前記ストリンジェントな条件が約65℃の温度で0.2XのSSCにて約15分間の洗浄を含む洗浄工程を含む、前記核酸；

（e）（a）から（d）のいずれかの核酸（ポリヌクレオチド）であって、遺伝子または転写物の少なくとも約20、25、30、50、75、100、125、150、175、200、225、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150もしくはそれより多いヌクレオチド残基または完全長の長さを有する、前記核酸；

（g）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼもしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメントをコードする核酸（ポリヌクレオチド）であって、前記ポリペプチドが、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号

:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てを有する配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配

列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974、および／または配列番号:976の配列を含む、前記核酸；

（i）（A）（a）から（g）のいずれかであり、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有し、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼもしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持するポリペプチドをコードする核酸（ポリヌクレオチド）；または（B）（i）（A）の核酸であって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換が、アミノ酸の同様な特徴を有する別のアミノ酸による置換を含むか；または保存的置換が、脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸による置換、セリンのスレオニンによる置換またはその逆、酸性残基の別の酸性残基による置換、アミド基をもつ残基のアミド基をもつ別の残基による置換、塩基性残基の別の塩基性残基による交換、または芳香族残基の別の芳香族残基による置換を含む、前記核酸；

（j）（a）から（i）のいずれかであり、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性もしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するが、シグナル配列、プレプロドメイン、結合ドメインおよび／または他のドメインを欠くポリペプチドをコードする核酸（ポリヌクレオチド）；

（k）（j）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記から成る、前記核酸；

（l）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性もしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、さらに異種配列を含む、（a）から（k）のいずれかの核酸（ポリヌクレオチド）；

（m）（l）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、異種配列が、（A）異種シグナル配列、異種ドメイン、異種結合ドメイン、異種ドッケリンドメイン、異種触媒ドメイン（CD）、をコードする配列または前記配列の組合せを含むか、またはそれらから成る、前記核酸；（B）異種シグナル配列、結合ドメインまたは触媒ドメイン（CD）が異種酵素に由来する（l）の配列；または（C）異種配列が、タグ、エピトープ、標的誘導ペプチド、切断可能配列、検出可能部分または酵素をコードする配列を含むか、またはそれらから成る、

前記核酸；
（n）（m）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、異種結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記ドメインから成る、前記核酸；
（o）（m）の核酸（ポリヌクレオチド）であって、異種シグナル配列が、コードされたタンパク質を液胞、小胞体、葉緑体または澱粉顆粒へ標的化して誘導する、前記核酸；
（p）（a）から（o）のいずれかの配列と完全に相補的な核酸配列（ポリヌクレオチド）。
（２）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、化学基の転移を触媒する活性、アミノ基転移反応の触媒活性、D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸という反応を触媒する活性、および／または酸化還元反応の触媒活性、水素原子除去の触媒活性、および／またはD-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプターという反応を触媒する活性を含む、（1）に記載の単離、合成または組み換え核酸。
（３）　（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が熱安定性であるか；または（b）ポリペプチドが、約0℃から約20℃、約20℃から約37℃、約37℃から約50℃、約50℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約80℃、約80℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約110℃、または前記より高い温度範囲を含む条件下で、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性もしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、（１）に記載の単離、合成または組み換え核酸。
（４）　（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が耐熱性であるか；または（b）ポリペプチドが、約0℃から約20℃、約20℃から約37℃、約37℃から約50℃、約50℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約80℃、約80℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約110℃、または前記より高い範囲の温度に暴露された後で、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性もしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、（１）に記載の単離、合成または組み換え核酸。
（５）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、約pH 6.5、pH 6、pH 5.5、pH 5、pH 4.5、pH 4.0、pH 3.5、pH 3.0または前記より低い（より酸性の）pHを含む酸性条件下で活性を保持するか；またはトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性を保持するか；または前記トランスアミナーゼ活性が、イソブチルアミンのイソブチルアルデヒドへの変換を触媒するオメガトランスアミナーゼ活性であるか；および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、約pH 6.5、pH 6、pH 5.5、pH 5、pH 4.5、pH 4.0、pH 3.5、pH 3.0または前記より低い（より酸性の）pHを含む酸性条件に暴露した後で活性を保持する、（１）に記載の単離、合成または組み換え核酸。
（６）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナ

ーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、約pH 7、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9、pH 9.5、pH 10、pH 10.5、pH 11、pH 11.5、 pH 12、pH 12.5または前記より高い（より塩基性）pHを含む塩基性条件下で活性を保持するか、または約pH 7、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9、pH 9.5、pH 10、pH 10.5、pH 11、pH 11.5、 pH 12、pH 12.5または前記より高い（より塩基性）pHを含む塩基性条件に暴露した後で、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、（１）に記載の単離、合成または組み換え核酸。

（７） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブであって、（１）から（6）のいずれかのに記載の核酸の少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100、125、150、175、200、225またはそれより多い連続する塩基を含む、前記核酸プローブ。

（８） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー対であって、（a）（１）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸を増幅することができる前記プライマー対、；または、（b）（a）のプライマー対であって、前記増幅プライマー対のメンバーが、前記配列の少なくとも約10から50の連続する塩基、または前記配列の約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35またはそれより多い連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む、前記増幅プライマー対。

（９） （１）から（６）のいずれかに記載の配列の最初の（5’の）約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35またはそれより多い残基によって示される配列を有する第一のメンバー、および前記第一のメンバーの相補鎖の最初の（5’の）約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35またはそれより多い残基によって示される配列を有する第二のメンバーを含む、増幅プライマー対。

（１０） （8）または（9）に記載の増幅プライマー対を用いるポリヌクレオチドの増幅によって生成される、トランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード核酸であって、場合によって前記増幅がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による、前記コード核酸。

（１１） （10）に記載の増幅プライマー対を用いるポリヌクレオチドの増幅によって生成される、トランスフェラーゼ-、例えばトランスアミナーゼ-、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ-、および／またはオキシドレダクターゼ-、例えばデヒドロゲナーゼ-、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ-コード核酸であって、遺伝子ライブラリーの増幅によって生成され、場合によって前記遺伝子ライブラリーが環境ライブラリーである、前記コード核酸。

（１２） （8）または（9）に記載の増幅プライマー配列対を用いて鋳型核酸を増幅する工程を含む、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法。

（１３） （1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸を含む発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクルであって、場合によって、前記クローニングビヒクルが

、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含む、前記発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクル。

（１４） ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ関連ウイルスベクターを含むか、または人工染色体が、細菌人工染色体（BAC）、バクテリオファージP1-由来ベクター（PAC）、酵母人工染色体（YAC）、または哺乳動物人工染色体（MAC）を含む、（13）に記載のクローニングビヒクル。

（１５） （１）に記載の配列を有する核酸を含むか、または（13）または（14）に記載の発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクルを含む形質転換細胞であって、場合によって、細菌細胞、哺乳動物細胞、菌類細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または植物細胞である、前記形質転換細胞。

（１６） （1）から（6）のいずれかに記載の配列を有する核酸を含むか、または（13）または（14）に記載の発現カセット、ベクターまたはクローニングビヒクル、または（15）に記載の形質転換細胞を含むトランスジェニック非ヒト動物であって、場合によって、前記動物が、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ヤギ、魚または乳牛である、前記トランスジェニック非ヒト動物。

（１７） （１）に記載の配列を有する核酸を含むトランスジェニック植物、植物の部分または植物の種子であって、場合によって、前記植物が、トウモロコシ、ソルガム、ジャガイモ、トマト、コムギ、オイルシード、アブラナ、ヤシ、ゴマ、落花生、ヒマワリ、またはタバコである、前記トランスジェニック植物、植物の部分または植物の種子。

（１８） （１）に記載のいずれかの配列と相補的であるか、または前記配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、場合によって、長さが約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、または約60から100塩基であり、さらに場合によって、前記ストリンジェントな条件が、約65℃の温度で0.2XのSSCにて約15分間の洗浄を含む洗浄工程を含む、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド。

（１９） （1）から（6）のいずれかに記載の配列の部分配列を含む二本鎖の阻害性RNA（RNAi）分子であって、場合によって、長さが約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、20もしくは30またはそれより長い二重鎖ヌクレオチドである、前記二本鎖の阻害性RNA分子。

（２０） トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼメッセージの翻訳を細胞で阻害するか、またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの発現を細胞で阻害する方法であって、前記方法が、（18）に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは（19）に記載の二本鎖の阻害性RNA（RNAi）分子を細胞に投与するか、または細胞で発現させる工程を含む、前記方法。

（２１） （a）配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配

列番号:143、配列番号:146、配列番号:148、配列番号:150、配列番号:152、配列番号:154、配列番号:156、配列番号:158、配列番号:160、配列番号:162、配列番号:164、配列番号:166、配列番号:168、配列番号:170、配列番号:172、配列番号:174、配列番号:176、配列番号:178、配列番号:180、配列番号:182、配列番号:184、配列番号:186、配列番号:188、配列番号:190、配列番号:192、配列番号:194、配列番号:196、配列番号:198、配列番号:200、配列番号:202、配列番号:204、配列番号:206、配列番号:208、配列番号:210、配列番号:212、配列番号:214、配列番号:216、配列番号:218、配列番号:220、表46または表55の改変の1つ、いくつか、もしくは全てをもつ配列番号:220、配列番号:222、配列番号:224、配列番号:226、配列番号:228、配列番号:230、配列番号:232、配列番号:234、配列番号:236、配列番号:238、配列番号:240、配列番号:242、配列番号:244、配列番号:246、配列番号:248、配列番号:250、配列番号:252、配列番号:254、配列番号:256、配列番号:258、配列番号:260、配列番号:262、配列番号:264、配列番号:266、配列番号:268、配列番号:270、配列番号:272、配列番号:274、配列番号:276、配列番号:278、配列番号:280、配列番号:282、配列番号:284、配列番号:286、配列番号:288、配列番号:290、配列番号:292、配列番号:294、配列番号:296、配列番号:298、配列番号:300、配列番号:302、配列番号:304、配列番号:306、配列番号:308、配列番号:310、配列番号:312、配列番号:314、配列番号:316、配列番号:318、配列番号:320、配列番号:322、配列番号:324、配列番号:326、配列番号:328、配列番号:330、配列番号:332、配列番号:334、配列番号:336、配列番号:338、配列番号:340、配列番号:342、配列番号:344、配列番号:346、配列番号:348、配列番号:350、配列番号:352、配列番号:354、配列番号:356、配列番号:358、配列番号:360、配列番号:362、配列番号:364、配列番号:366、配列番号:368、配列番号:370、配列番号:372、配列番号:374、配列番号:376、配列番号:378、配列番号:380、配列番号:382、配列番号:384、配列番号:386、配列番号:388、配列番号:390、配列番号:392、配列番号:394、配列番号:396、配列番号:398、配列番号:400、配列番号:402、配列番号:404、配列番号:406、配列番号:408、配列番号:410、配列番号:412、配列番号:414、配列番号:416、配列番号:418、配列番号:420、配列番号:422、配列番号:424、配列番号:426、配列番号:428、配列番号:430、配列番号:432、配列番号:434、配列番号:436、配列番号:438、配列番号:440、配列番号:442、配列番号:444、配列番号:446、配列番号:448、配列番号:450、配列番号:452、配列番号:454、配列番号:456、配列番号:458、配列番号:460、配列番号:462、配列番号:464、配列番号:466、配列番号:468、配列番号:470、配列番号:472、配列番号:474、配列番号:476、配列番号:478、配列番号:480、配列番号:482、配列番号:484、配列番号:486、配列番号:488、配列番号:490、配列番号:492、配列番号:494、配列番号:496、配列番号:498、配列番号:500、配列番号:502、配列番号:504、配列番号:506、配列番号:508、配列番号:510、配列番号:512、配列番号:514、配列番号:516、配列番号:518、配列番号:520、配列番号:522、配列番号:524、配列番号:526、配列番号:528、配列番号:530、配列番号:532、配列番号:534、配列番号:536、配列番号:538、配列番号:540、配列番号:542、配列番号:544、配列番号:546、配列番号:548、配列番号:550、配列番号:552、配列番号:554、配列番号:556、配列番号:558、配列番号:560、配列番号:562、配列番号:564、配列番号:566、配列番号:568、配列番号:570、配列番号:572、配列番号:574、配列番号:576、配列番号:578、配列番号:580、配列番号:582、配列番号:584、配列番号:586、配列番号:588、配列番号:590、配列番号:592、配列番号:594、配列番号:596、配列番号:598、配列番号:600、配列番号:602、配列番号:604、配列番号:606、配列番号:608、配列番号:610、配列番号:612、配列番号:614、配列番号:616、配列番号:618、配列番号:620、配列番号:622、配列番号:624、配列番号:626、配列番号:628、配列番号:630、配列番号:632、配列番号:634、配列番号:636、配列番号:638、配列番号:640配列番号:642、配列番号:644、配列番号:646、配列番号:648、配列番号:650、配列番号:652、配列番号:654、配列番号:656、配列番号:658、配列番号: 660、配列番号: 662、配列番号:664、配列番号:666、配列番号:668、配列番号:670、配列番号:672、配列番号:674、配列番号:676、配列番号:678、配列番号:680、配列番号:682、配列番号:684、配列番号:686、配列番号:688、配列番号:690、配列番号:692、配列番号:694、配列番号:696、配列番号:698、配列番号:700、配列番号:702、配列番号:704

、配列番号:706、配列番号:708、配列番号:710、配列番号:712、配列番号:714、配列番号:716、配列番号:718、配列番号:720、配列番号:722、配列番号:724、配列番号:726、配列番号:728、配列番号:730、配列番号:732、配列番号:734、配列番号:736、配列番号:738、配列番号:740、配列番号:742、配列番号:744、配列番号:746、配列番号:748、配列番号:750、配列番号:752、配列番号:754、配列番号:756、配列番号:758、配列番号:760、配列番号:762、配列番号:764、配列番号:766、配列番号:768、配列番号:770、配列番号:772、配列番号:774、配列番号:776、配列番号:778、配列番号:780、配列番号:782、配列番号:784、配列番号:786、配列番号:788、配列番号:790、配列番号:792、配列番号:794、配列番号:796、配列番号:798、配列番号:800、配列番号:802、配列番号:804、配列番号:806、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:812、配列番号:814、配列番号:816、配列番号:818、配列番号:820、配列番号:822、配列番号:824、配列番号:826、配列番号:828、配列番号:830、配列番号:832、配列番号:834、配列番号:836、配列番号:838、配列番号:840配列番号:842、配列番号:844、配列番号:846、配列番号:848、配列番号:850、配列番号:852、配列番号:854、配列番号:856、配列番号:858、配列番号:860、配列番号:862、配列番号:864、配列番号:866、配列番号:868、配列番号:870、配列番号:872、配列番号:874、配列番号:876、配列番号:878、配列番号:880、配列番号:882、配列番号:884、配列番号:886、配列番号:888、配列番号:890、配列番号:892、配列番号:894、配列番号:896、配列番号:898、配列番号:900、配列番号:902、配列番号:904、配列番号:906、配列番号:908、配列番号:910、配列番号:912、配列番号:914、配列番号:916、配列番号:918、配列番号:920、配列番号:922、配列番号:924、配列番号:926、配列番号:928、配列番号:930、配列番号:932、配列番号:934、配列番号:936、配列番号:938、配列番号:940、配列番号:942、配列番号:944、配列番号:946、配列番号:948、配列番号:950、配列番号:952、配列番号:954、配列番号:956、配列番号:958、配列番号:960、配列番号:962、配列番号:964、配列番号:966、配列番号:968、配列番号:970、配列番号:972、配列番号:974、および／または配列番号:976と少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは前記より高いか、または100％（完全な）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する単離、合成または組み換えポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントであって、（i）または（ii）のポリペプチドまたはペプチドが、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するか、または前記ポリペプチドまたはペプチドが、トランスフェラーゼ特異的抗体、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ特異的抗体を生じさせることができる（エピトープまたは免疫原として機能するポリペプチドまたはペプチド）、前記ポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（b）配列同一性が（A）配列比較アルゴリズムによる解析又は目視精査によって、または（B）ポリペプチドもしくはペプチドまたは酵素、および／または酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）の少なくとも約20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、100、150、200、250、300もしくはそれより多いアミノ酸残基の領域にわたって、またはその完全長にわたって決定される、（a）のポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（c）配列同一性が配列比較アルゴリズムによる解析又は目視精査によって決定され、さらに場合によって、前記配列比較アルゴリズムがBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、フィルタリング設定がblastall -p blastp -d “nr pataa” -F Fに設定され、さ

らに他の全てのオプションが規定値に設定される、（a）または（b）のポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（d）（1）から（6）のいずれかに記載の核酸によってコードされるアミノ酸配列または酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）を含む、単離、合成または組み換えポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントであって、前記ポリペプチドが

（i)トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するか、または

（ii)（a）に示した配列および／または酵素的に活性なその部分配列（フラグメント）を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体を生じることができるという点で免疫学的な活性を有する、（1）から（6）のいずれかに記載の核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、

前記ポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（e）（a）から（d）のいずれかの単離、合成または組み換えポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントであって、さらに少なくとも1つのアミノ酸残基の保存的置換を含み、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、前記ポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（e）保存的置換が、脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸による置換、セリンのスレオニンによる置換またはその逆、酸性残基の別の酸性残基による置換、アミド基をもつ残基のアミド基をもつ別の残基による置換、塩基性残基の別の塩基性残基による交換、または芳香族残基の別の芳香族残基による置換、または前記置換の組合せを含む、（d）のポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（f）脂肪族残基が、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンまたはその合成等価物を含み、酸性残基が、アスパラギン酸、グルタミン酸またはその合成等価物を含み、アミド基を含む残基が、アスパラギン酸、グルタミン酸またはその合成等価物を含み、塩基性残基が、リジン、アルギニンまたはその合成等価物を含み、芳香族残基が、フェニルアラニン、チロシンまたはその合成等価物を含む、（e）のポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（g）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するが、シグナル配列、プレプロドメイン、結合ドメイン、および／または他のドメインを欠く（a）から（f）のいずれかの単離、合成または組み換えポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（h）結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記から成る、（g）の単離、合成または組み換えポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（i）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、さらに異種配列を含む、（a）から（h）のいずれかのポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（j）異種配列が、（A）異種シグナル配列、異種ドメイン、異種結合ドメイン、異種ドッケリンドメイン若しくは異種触媒ドメイン（CD）または前記ドメインの組合せを含むかまたは前記から成るか；（B）（A）の配列であって、異種シグナル配列、結合ドメインまたは触媒ドメイン（CD）が異種酵素に由来するか、；または異種配列が、（C）タグ、エ

ピトープ、標的誘導ペプチド、切断可能配列、検出可能部分または酵素を含むかまたは前記配列から成る、（i）のポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（k）記異種配列または異種結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含むか、または前記ドメインから成る、（i）または（j）のポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント；

（l）異種シグナル配列が、コードされたタンパク質を液胞、小胞体、葉緑体または澱粉顆粒へ標的化して誘導する、（i）のポリペプチド；または、

（m）（1）から（6）のいずれかに記載の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する、単離、合成または組み換えポリペプチド、ペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメント。

（２２）　トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、化学基の転移を触媒する活性、アミノ基転移反応の触媒活性、D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸という反応を触媒する活性、および／または酸化還元反応の触媒活性、水素原子除去の触媒活性、および／またはD-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプターという反応を触媒する活性を含むか；またはトランスアミナーゼ活性が、イソブチルアミンのイソブチルアルデヒドへの変換を触媒するオメガトランスアミナーゼ活性である、（21）に記載の単離、合成または組み換えポリペプチド。

（２３）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が熱安定性であり、場合によって、約0℃から約20℃、約20℃から約37℃、約37℃から約50℃、約50℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約80℃、約80℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約110℃、または前記より高い温度範囲を含む条件下で、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性もしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、（21）記載の単離、合成または組み換えポリペプチド。

（２４）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が耐熱性であり、場合によって、約0℃から約20℃、約20℃から約37℃、約37℃から約50℃、約50℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約80℃、約80℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃から約100℃、約100℃から約110℃、または前記より高い範囲の温度に暴露された後で、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性もしくはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持し、場合によって、前記耐熱性が、上昇温度に加熱後にトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの少なくとも半分の比活性を37℃で保持することを含むか、または場合によって、前記耐熱性が、上昇温度に加熱後にタンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニットの範囲の比活性を37℃で保持することを含み、さらに場合によって、前記上昇温度が、少なくとも約0℃から約20℃、約20℃から約37℃、約37℃から約50℃、約50℃から約70℃、約70℃から約75℃、約75℃から約80℃、約80℃から約85℃、約85℃から約90℃、約90℃から約95℃、約95℃

から約100℃、約100℃から約110℃、または前記より高い温度である、（21）記載の単離、合成または組み換えポリペプチド。
（２５） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、約pH 6.5、pH 6、pH 5.5、pH 5、pH 4.5、pH 4.0、pH 3.5、pH 3.0または前記より低い（より酸性の）pHを含む酸性条件下で活性を保持するか、または約pH 6.5、pH 6、pH 5.5、pH 5、pH 4.5、pH 4.0、pH 3.5、pH 3.0または前記より低い（より酸性の）pHを含む酸性条件に暴露された後でトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、（21）のいずれかに記載の単離、合成または組み換えポリペプチド。
（２６） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、約pH 7、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9、pH 9.5、pH 10、pH 10.5、pH 11、pH 11.5、 pH 12、pH 12.5または前記より高い（より塩基性）pHを含む塩基性条件下で活性を保持するか、または約pH 7、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9、pH 9.5、pH 10、pH 10.5、pH 11、pH 11.5、 pH 12、pH 12.5または前記より高い（より塩基性）pHを含む塩基性条件に暴露された後でトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を保持する、（21）に記載の単離、合成または組み換えポリペプチド。
（２７） （21）から（26）のいずれかに記載のポリペプチドを含み、シグナル配列またはプレプロ配列を欠く、単離、合成または組み換えポリペプチド。
（２８） （21）から（27）のいずれかに記載のポリペプチドを含み、さらにシグナル配列または異種プレプロ配列を有する、単離、合成または組み換えポリペプチド。
（２９） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、約37℃でタンパク質1ミリグラムにつき約100から約1000ユニット、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約750ユニット、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200ユニット、またはタンパク質1ミリグラムにつき約750から約1000ユニットの範囲の比活性を含む、（21）から（28）のいずれかに記載の単離、合成または組み換えポリペプチド。
（３０） タンパク質が少なくとも1つのグリコシル化部位を含むか、またはさらに多糖類を含み、場合によって、前記グリコシル化がN-結合グリコシル化であり、さらに場合によって、前記ポリペプチドが、P.パストリス（P. pastoris）またはS.ポンベ（S. pombe）で発現された後でグリコシル化される、（21）から（29）のいずれかに記載の単離、合成または組み換えポリペプチド。
（３１） （21）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを含むタンパク質調製物であって、前記タンパク質調製物が液体、固体またはゲルを含む、前記タンパク質調製物。
（３２） （21）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドおよび第二のドメインを含むヘテロダイマーであって、場合によって前記第二のドメインがポリペプチドであり、さらに前記ヘテロダイマーが融合タンパク質であり、前記第二のドメインがエピトープまたはタグであってもよい、前記ヘテロダイマー。
（３３） （21）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを含むホモダイマーであって、融合タンパク質であってもよい、前記ホモダイマー。
（３４） （21）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを含み、場合によって、木材チップ、紙、細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、石墨粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレイまたはキャピラリーチューブに固定された、固定化ポ

リペプチド。
（３５）　（21）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドと特異的に結合する単離、合成または組み換え抗体であって、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体で合ってもよく、または一本鎖抗体であってもよい、前記抗体。
（３６）　（35）に記載の抗体を含むハイブリドーマ。
（３７）　（21）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを含む固定化されたポリペプチド、（1）から（6）のいずれかに記載の核酸を含む固定化された核酸、（35）に記載の抗体、またはそれらの組合せを含むアレイ。
（３８）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する方法であって、
（a）（35）に記載の抗体を提供する工程；
（b）ポリペプチドを含むサンプルを提供する工程；および
（c）工程（b）のサンプルを工程（a）の抗体と、前記抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合する条件下で接触させ、それによってトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する工程を含む、前記方法。
（３９）　抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を生成する方法であって、液性免疫応答を生じさせるために十分な量で、（1）から（6）のいずれかに記載の核酸を非ヒト動物に投与し、それによって抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を生成する工程を含む、前記方法。
（４０）　抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を生成する方法であって、液性免疫応答を生じさせるために十分な量で、（21）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを非ヒト動物に投与し、それによって抗トランスフェラーゼ抗体、例えば抗トランスアミナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸トランスフェラーゼ抗体、および／または抗オキシドレダクターゼ抗体、例えば抗デヒドロゲナーゼ抗体、例えば抗d-アミノ酸デヒドロゲナーゼ抗体を生成する工程を含む、前記方法。
（４１）　組み換えポリペプチドを生成する方法であって、（a）プロモータに作動できるように連結されている、（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸を提供する工程；および（b）ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程（a）の核酸を発現させ、それによって組み換えポリペプチドを生成する工程を含み、場合によって、さらに、工程（a）の核酸で宿主細胞を形質転換させ、続いて工程（a）の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組み換えポリペプチドを生成する工程を含む、前記方法。
（４２）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法であって、
（a）（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを提供する工程；
（b）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質を提供する工程；および

（c）ポリペプチドを工程（b）の基質と接触させ、基質の量の低下または反応生成物の量の増加を検出する工程を含み、基質の量の低下または反応生成物の量の増加によって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドを検出する、前記方法。

（４３）　トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼまたはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質を同定する方法であって、前記方法が、

（a）（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを提供する工程；

（b）試験基質を提供する工程；および

（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の試験基質と接触させ、前記基質の量の低下または反応生成物の量の増加を検出する工程を含み、前記基質の量の低下または反応生成物の量の増加があれば、前記試験基質をトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質として同定する、前記方法。

（４４）　ポリペプチドと試験化合物が特異的に結合するか否かを決定する方法であって、

（a）核酸または前記核酸を含むベクターを、前記核酸のポリペプチドへの翻訳を許容する条件下で発現させる工程であって、前記核酸が（１）から（16）のいずれかに記載の配列を有する、前記工程；

（b）試験化合物を提供する工程；

（c）前記ポリペプチドを前記試験化合物と接触させる工程；および

（d）工程（b）の試験化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程を含む、前記方法。

（４５）　ポリペプチドと試験化合物が特異的に結合するか否かを決定する方法であって、

（a）（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを提供する工程；

（b）試験化合物を提供する工程；

（c）前記ポリペプチドを前記試験化合物と接触させる工程；および

（d）工程（b）の試験化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程を含む、前記方法。

（４６）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性の調節物質を同定する方法であって、

（a）（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを提供する工程；

（b）試験化合物を提供する工程；

（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の試験化合物と接触させ、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの活性を測定する工程を含み、前記試験化合物の非存在下における活性と比較して前記試験化合物の存在下で測定したトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性に変化があれば、前記試験化合物は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を調節すると決定され；

場合によって、前記トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質を提供し、前記基質の量の低下もしくは反応生成物の量の増加、または前記基質の量の増加もしくは反応生成物の量の低下を検出することによって測定され、

場合によって、前記試験化合物の非存在下における前記基質または前記反応生成物の量と比較して前記試験化合物の存在下で前記基質の量の低下または前記反応生成物の量の増加があれば、前記試験化合物は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性の活性化物質として同定され；

場合によって、前記試験化合物の非存在下における前記基質または前記反応生成物の量と比較して前記試験化合物の存在下で前記基質の量の増加または前記反応生成物の量の低下があれば、前記試験化合物は、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性の阻害物質として同定される、前記方法。

（４７） プロセッサおよび、ポリペプチド配列または核酸配列が保存されているデータ保存装置またはコンピュータ読み出し可能媒体を含むコンピュータシステムであって、前記データ保存装置またはコンピュータ読み出し可能媒体にはポリペプチド配列または核酸配列が保存されてあり、前記ポリペプチド配列が、（２１）から（30）のいずれかに記載の配列、（1）から（6）のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含み、

場合によって、前記システムがさらに、配列比較アルゴリズムおよび少なくとも1つの参照配列が保存されてあるデータ保存装置を含み、場合によってさらに配列内の1つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーを含み、

さらに場合によって、配列比較アルゴリズムが多形性を表示するコンピュータプログラムを含む、前記コンピュータシステム。

（４８） 配列内の特徴を同定する方法であって、（a）配列内の1つ以上の特徴を同定するコンピュータプログラムを用いて配列を読み取る工程であって、前記配列はポリペプチド配列または核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドは（1）から（6）のいずれかに記載の核酸によってコードされる、前記工程；および（b）前記コンピュータプログラムを用いて配列内の1つ以上の特徴を同定する工程を含む、前記方法。

（４９） 第一の配列と第二の配列を比較する方法であって、（a）配列を比較するコンピュータプログラムを使用することにより第一の配列および第二の配列を読み取る工程であって、前記第一の配列はポリペプチド配列または核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含み、ポリペプチドは（1）から（6）のいずれかに記載の核酸によってコードされる、前記工程；および（b）第一の配列と第二の配列との間の相違をコンピュータプログラムにより決定する工程を含み、

場合によって、第一の配列と第二の配列との間の相違を決定する前記工程はさらに多形性を同定する工程を含み、

さらに場合によって、配列内の1つ以上の特徴を同定するアイデンティファイアーを含み、場合によって、さらに、コンピュータプログラムを用いて第一の配列を読み取り、配列内の1つ以上の特徴を同定する工程を含む、前記方法。

（５０） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性

を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法であって、 （a）（7）に記載のポリヌクレオチドプローブを提供する工程；

（b）環境サンプルから核酸を単離するか、またはサンプル中の核酸がハイブリダイゼーションのために工程（a）のポリヌクレオチドプローブに接近できるように環境サンプルを処理する工程；

（c）工程（b）の単離、合成もしくは組み換え核酸、または処理環境サンプルを工程（a）のポリヌクレオチドプローブと一緒にする工程；および

（d）工程（a）のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離し、それによって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離および回収する工程を含み、

場合によって、前記環境サンプルが、水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプルまたは生物学的サンプルを含み；

さらに場合によって、前記生物学的サンプルが、細菌細胞、原生動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、菌類細胞または哺乳動物細胞に由来する、前記方法。

（５１） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法であって、 （a）（8）または（9）に記載の増幅プライマー対を提供する工程；

（b）環境サンプルから核酸を単離するか、またはサンプル中の核酸がハイブリダイゼーションのために増幅プライマー対に接近できるように環境サンプルを処理する工程；および

（c）工程（b）の核酸を工程（a）の増幅プライマー対と一緒にし、環境サンプルの核酸を増幅させ、それによって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離および回収する工程を含む、前記方法。

（５２） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の変種を生成する方法であって、

（a）（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む鋳型核酸を提供する工程；および

（b）鋳型配列内で1つ以上のヌクレオチドの改変、欠失もしくは付加、または前記の組合せを実施して鋳型核酸の変種を生成する工程を含み、

場合によって、さらに、変種核酸を発現させて変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドを生成する工程を含み、

さらに場合によって、前記改変、付加または欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセンブリ（SLR）または前記の組合せを含む方法によって導入されるか、または前記改変、付加または欠失が、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-改変DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導

入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成および前記の組合せを含む方法によって導入され、

場合によって、鋳型核酸によってコードされたポリペプチドのものとは変異したもしくは異なる活性、または変異したもしくは異なる安定性を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが生成されるまで反復して繰り返され、

場合によって、前記変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドが耐熱性であり、上昇温度に暴露された後で何らかの活性を保持するか、または場合によって、前記変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドが、鋳型核酸によってコードされたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼと比較してグリコシル化の増加を示すか、または場合によって、前記変種トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドが、高温下でトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を示し（この場合、鋳型核酸によってコードされたトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼは、前記の高温下では活性がない）、

場合によって、鋳型核酸のものとは変異したコドン使用頻度を有するランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが生成されるまで反復して繰り返され、

場合によって、鋳型核酸のメッセージ発現レベルより高いもしくは低いレベルのメッセージ発現または安定性を有するトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が生成されるまで反復して繰り返される、前記方法。

（５３） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変して、宿主細胞でその発現を増加させる方法であって、

（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸を提供する工程；および

（b）工程（a）の核酸中の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンで置換し、それによって核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を増加させる工程を含み、優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先コドンまたは低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において

低頻度で提示されるコドンである、前記方法。
（５４） トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変する方法であって、
（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸を提供する工程；および
（b）工程（a）の核酸中のコドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする異なるコドンで置換し、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸のコドンを改変する工程を含む、前記方法。
（５５） トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変して、宿主細胞でその発現を増加させる方法であって、
（a）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドをコードし、（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸を提供する工程；および
（b）工程（a）の核酸中の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中立的に使用されるコドンで置換し、それによって核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を増加させる工程を含み、優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先コドンまたは低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示されるコドンである、前記方法。
（５６） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸においてコドンを改変して、宿主細胞でその発現を低下させる方法であって、
（a）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドをコードし、（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸を提供する工程；および
（b）工程（a）の核酸中の少なくとも1つの優先コドンを同定し、前記コドンを置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする非優先コドンまたは低優先コドンで置換し、それによって核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を低下させる工程を含み、優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先コドンまたは低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子内のコード配列において低頻度で提示されるコドンであり、
場合によって、前記宿主細胞が、細菌細胞、菌類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞である、前記方法。
（５７） 複数の改変トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する方法であって、改変される活性部位または基質結合部位は第一の活

性部位または第一の基質結合部位をコードする配列を含む第一の核酸に由来し、
（a）第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする第一の核酸を提供する工程であって、前記第一の核酸配列は（1）から（6）のいずれかに記載の配列またはその部分配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、さらに前記核酸が、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性部位、またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ基質結合部位をコードする、前記工程；
（b）前記第一の核酸中の複数の標的コドンにおいて天然に存在するアミノ酸変種をコードする一組の変異導入オリゴヌクレオチドを提供する工程；および
（c）前記一組の変異導入オリゴヌクレオチドを用いて、変異が導入される各アミノ酸コドンにおいて一連のアミノ酸変種をコードする一組の活性部位コード変種または基質結合部位コード変種核酸を生成し、それによって複数の改変トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する工程を含む、前記方法。
（５８） 最適化定方向進化システム、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、または合成連結再アッセンブリ(SLR)、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシュアルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ含有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成および前記の組合せを含む方法によって工程（a）の第一の核酸または変種に変異を導入する工程を含む、（57）に記載の方法。
（５９） 小分子を生成する方法であって、
（a）小分子を合成または改変することができる複数の生合成酵素を提供する工程であって、前記酵素の1つが、（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ含む、前記工程；
（b）工程（a）の酵素の少なくとも１つのに対する基質を提供する工程；および
（c）複数の生物触媒反応を促進する条件下で工程（b）の基質を前記酵素と反応させて一連の生物触媒反応により小分子を生成する工程を含む、前記方法。
（６０） 小分子を改変する方法であって、
（a）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素が（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドまたは（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドを含む、前記工程；
（b）小分子を提供する工程；および
（c）前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素によって触媒される酵素反応が促進される条件下で工程（a）の酵素を工程（b）の小分子と反応させ、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素反応によ

り小分子を改変する工程を含み、
場合によって、工程（a）の酵素に対する複数の小分子基質を提供し、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素により触媒される少なくとも1つの酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製することを含む、前記方法。
（６１） 複数の追加の酵素をそれら酵素による複数の生物触媒反応を促進する条件下で含み、複数の酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを作製する工程をさらに含む、（60）に記載の方法であって、場合によってさらに、所望の活性を示す特定の小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために前記ライブラリーを試験する工程を含み、場合によって、前記ライブラリーの試験工程がさらに、所望の活性をもつ特定の改変小分子の有無について改変小分子の一部分を試験することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の前記一部分を生成するために用いられた生物触媒反応の1つを除いて全てを系統的に排除し、所望の活性をもつ特定の改変小分子を生成する少なくとも1つの特異的な生物触媒反応を同定する工程を含む、前記方法。
（６２） トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法であって
（a）トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素が（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドまたは（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドを含む、前記工程；および
（b）工程（a）の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性について残余の部分配列を試験し、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程を含み、
場合によって、前記トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性が、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの基質を提供し、前記基質量の低下または反応生成物量の増加を検出することによって測定される、前記方法。
（６３） リアルタイム代謝フラックス分析を用いることによる新規または改変表現型のための全細胞操作方法であって、
（a）細胞の遺伝的構成を改変することによって改変細胞を生成する工程であって、前記遺伝的構成が（1）から（6）のいずれかに示される配列を含む核酸を細胞に導入することによって改変される、前記工程；
（b）前記改変細胞を培養して複数の改変細胞を生成する工程；
（c）工程（b）の細胞培養をリアルタイムでモニターすることによって前記細胞の少なくとも1つの代謝パラメーターを測定する工程；および
（d）工程（c）のデータを分析して、測定パラメーターが類似の条件下における未改変細胞の対応する測定値と異なるか否かを決定し、それによって細胞の操作された表現型をリアルタイム代謝フラックス分析により同定する工程を含み、
場合によって、前記細胞の遺伝的構成が細胞内の配列の欠失もしくは改変または遺伝子発現のノックアウトを含む方法によって改変され、

場合によって、さらに、新規に操作された表現型を含む細胞を選別する工程を含み、さらに場合によって、選別された細胞を培養し、それによって新規に操作された表現型を含む新規な細胞株を生成することを含む、前記方法。

（６４） シグナルペプチド（SP）含む少なくとも第一のドメイン、および、（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその部分配列を含む異種ポリペプチドまたはペプチドを含む少なくとも第二のドメイン、を含むキメラポリペプチドであって、前記異種ポリペプチドまたはペプチドが前記シグナルペプチド（SP）と天然には随伴せず、場合によって、前記シグナルペプチド（CD）が、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼには由来せず、さらに場合によって、前記異種ポリペプチドまたはペプチドが、前記シグナルペプチド（SP）またはトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの触媒ドメイン（CD）のアミノ末端、カルボキシ末端または両端に存在する、前記キメラポリペプチド。

（６５） キメラポリペプチドをコードする単離、合成または組み換え核酸であって、前記キメラポリペプチドが、シグナルペプチド（SP）含む少なくとも第一のドメインおよび異種ポリペプチドまたはペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含み、前記シグナルペプチド（SP）が（64）に示されるシグナル配列を含む、前記核酸。

（６６） トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼをグリコシル化することを含む、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を増加させる方法であって、前記ポリペプチドは（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチド、または（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされるポリペプチドまたは酵素的に活性なそのフラグメントを含み、それによってトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの耐熱性または熱安定性を増加させる工程を含む、前記方法。

（６７） 組み換えトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼを細胞で過剰発現させる方法であって、（1）から（6）のいずれかに示される核酸配列、または（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメントをコードする核酸を含むベクターを発現させる工程を含み、過剰発現が高活性プロモーター、二シストロンベクターの使用によって、または前記ベクターの遺伝子増幅によって達成される、前記方法。

（６８） トランスジェニック植物を作製する方法であって、

（a）異種核酸配列を細胞に導入し、それによって形質転換植物または種子細胞を作製する工程であって、前記異種核酸配列が（1）から（6）のいずれかに記載の配列、または（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメントをコードする核酸を含む、前記工程；および

（b）前記形質転換細胞からトランスジェニック植物を作製する工程を含み、

場合によって、工程（a）がさらに、植物細胞プロトプラストのエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションにより前記異種核酸配列を導入する工程を含み、

さらに場合によって、工程（a）が、DNA粒子ボンバードメントによって、またはアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）宿主を用いることによって異種核酸配列を植物組織に直接導入する工程を含む、前記方法。

（６９） 異種核酸配列を植物細胞で発現させる方法であって、

（a）プロモーターに作動できるように連結された異種核酸配列で植物細胞を形質転換する工程であって、前記異種核酸配列が（1）から（6）のいずれかに記載の配列、または（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメントをコードする核酸を含む、前記工程；

（b）前記異種核酸配列が前記植物細胞で発現する条件下で前記植物を栽培する工程を含む、前記方法。

（７０） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、生地、パンまたは焼成製品、および／または生地、パンまたは焼成製品の前駆物質であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドは（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされる、前記生地、パンまたは焼成製品、および／または生地、パンまたは焼成製品の前駆物質。

（７１） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、飲料または飲料前駆物質であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドは（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされる、前記飲料または飲料前駆物質。

（７２） 飲料の製造方法であって、トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを飲料または飲料前駆物質に投与する工程を含み、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、場合によって、前記飲料または飲料前駆物質が麦芽汁またはビールである、前記方法。

（７３） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または栄養補助物もしくは食事サプリメントであって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、

場合によって、前記飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または栄養補助物が、穀物胚芽、油を消費しつくした穀物胚芽、干草、アルファルファ、チモシー、ダイズ殻、引き割りヒマワリ種子およびコムギミッドから成る群から選択される担体を含み、

さらに場合によって、前記担体が油を消費しつくした穀物胚芽を含むか、または場合によって前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ酵素がグリコシル化されてペレット形成条件下の耐熱性を提供し、さらに場合によって、デリバリーマトリックスが、穀粒胚芽およびトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／または

オキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの混合物をペレット化することによって形成され、さらに場合によって、前記ペレット形成条件が蒸気の適用を含み、さらに場合によって、ペレット形成条件が約5分間の約80℃を超える温度の適用を含み、前記酵素が酵素1ミリグラム当り少なくとも350から約900ユニットの比活性を保持する、前記飼料、食品、食品もしくは飼料添加物、食品もしくは飼料サプリメント、または栄養補助物もしくは食事サプリメント。

（７４） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、顆粒、ペレットまたは粒子であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、

場合によって、前記トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼが耐熱性である、前記顆粒、ペレットまたは粒子。

（７５） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、洗浄組成物であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、

場合によって、前記洗浄組成物が、洗剤、消毒剤またはクレンザーであるか、または場合によって、前記洗浄組成物が、織物洗浄用、食器洗浄用、洗濯用、口腔洗浄用、入れ歯洗浄用、またはコンタクトレンズ用である、前記洗浄組成物。

（７６） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、医薬（薬剤）組成物であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされる、前記医薬（薬剤）組成物。

（７７） 木材、木材製品、紙、紙製品、パルプ、パルプ製品、紙廃棄物、再生紙組成物を処理する方法であって、木材、木材製品、紙、紙製品、パルプ、パルプ製品、紙廃棄物または再生紙組成物をトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルと接触させる工程を含み、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、

場合によって、前記処理が、リグニンの削減または可溶化（脱リグニン）、漂白または脱色、および／またはインクの除去を含む、前記方法。

（７８） （２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド、または酵素的に活性な前記のフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、バイオマス、木材、木材パルプ、木材製品、紙パルプ、紙製品、新聞紙または紙廃棄物。

（７９）　（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされるポリペプチド、または酵素的に活性な前記のフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む、織物、編み物糸、布または織物材料であって、
場合によって、前記織物、編み物糸、布または織物材料が、非木綿のセルロース系織物、編み物糸、布または織物材料である、前記織物、編み物糸、布または織物材料。
（８０）　有機材料を処理する方法であって、
（a）トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされるトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼであるポリペプチド、の少なくとも１つまたは酵素的に活性な前記のフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを提供する工程；
（b）有機材料を提供する工程；および
（c）工程（b）の有機材料を工程（a）のポリペプチドと接触させる工程を含み、
場合によって、前記有機材料が、バイオマス、木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙、紙製品または紙パルプであり、
さらに場合によって、前記バイオマス、木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙、紙製品または紙パルプが軟木および硬木を含むか、または前記木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙または紙パルプが軟木および硬木に由来する、前記方法。
（８１）　トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む有機材料を含む組成物であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、
場合によって、前記有機材料が、バイオマス、木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙、紙製品または紙パルプであり、
さらに場合によって、前記バイオマス、木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙、紙製品または紙パルプが軟木および硬木を含むか、または前記木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙または紙パルプが軟木および硬木に由来する、前記組成物。
（８２）　アルコールを製造する方法であって、有機材料をトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド、または酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルと接触させる工程を含み、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、
場合によって、前記有機材料が、バイオマス、木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙、紙製品または紙パルプであり、
さらに場合によって、前記バイオマス、木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙、紙製品または紙パルプが軟木および硬木を含むか、または前記木材、木材パルプ、クラフトパルプ、紙または紙パルプが軟木および硬木に由来し、
さらに場合によって、発酵を含み、
さらに場合によって、前記アルコールがエタノールであるか、またはエタノールを含む

、前記方法。
（８３） アルコールおよびトランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む組成物であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされ、
さらに場合によって、前記アルコールがエタノールであるか、またはエタノールを含む、前記組成物。
（８４） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む廃棄物処理溶液であって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされる、前記廃棄物処理溶液。
（８５） トランスフェラーゼ活性、例えばトランスアミナーゼ活性、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ活性またはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ活性、例えばデヒドロゲナーゼ活性、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドもしくは酵素的に活性なそのフラグメント、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含むチューインガム、ロゼンジまたはキャンディーであって、前記ポリペプチドが（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するか、または前記ポリペプチドが（1）から（6）のいずれかに記載の配列を含む核酸によってコードされる、前記チューインガム、ロゼンジまたはキャンディー。
（８６） キメラトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼであって、（a）（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列および少なくとも1つの異種結合ドメインを含む、または、（b）（a）のキメラトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼまたはω-トランスアミナーゼ活性、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼであって、場合によって、前記結合ドメインが、NAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含む、前記キメラトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼ。
（８７） 新規な結合特異性または強化された結合特異性を有する、キメラグリコシダーゼ、トランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲナーゼの設計方法であって、異種結合ドメインまたは別に加えられる内因性結合ドメインをグリコシダーゼに挿入する工程を含み、前記結合モジュールが、（２１）から（30）のいずれかに記載のアミノ酸配列の結合配列またはNAD、NAD(P)、カルシウム、チアミン、FAD、亜鉛、DNAおよび／またはリポイル結合ドメインを含む結合配列を含む、前記方法。
（８８） （a）（２１）から（30）のいずれかに記載の少なくとも1つの酵素および1つ以上の他の酵素を含む、混合物またはカクテル；
（b）（a）の混合物またはカクテルであって、前記1つ以上の他の酵素が別のトランスフェラーゼ、例えばトランスアミナーゼ、例えばd-アミノ酸トランスフェラーゼ、および／またはオキシドレダクターゼ、例えばデヒドロゲナーゼ、例えばd-アミノ酸デヒドロゲ

ナーゼ、マンナナーゼおよび／またはグルカナーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、またはエンドグリコシダーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、エンド-ベータ-1,3(4)-グルカナーゼ、クチナーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、ラセマーゼ、エピメラーゼ、イソメラーゼ、オキシドレダクターゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、アラビナナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナナーゼ、キシログルカナーゼ、キシラナーゼ、マンナナーゼおよび／またはグルカナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ラムノガラクツロナンアセチルエステラーゼ、ポリガラクツロナーゼ、ラムノガラクツロナーゼ、ガラクタナーゼ、ペクチンリアーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／またはトランスグルタミナーゼである、前記酵素混合物またはカクテル。

（８９）　（a）アルコールおよび（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチド、または（88）に記載の酵素混合物もしくはカクテルを含む液体組成物；

（b）アルコールがエタノール、プロパノール、ブタノールおよび／またはメタノールであるか、または前記を含む、（a）の液体組成物；（c）燃料、バイオ燃料、合成リキッドもしくはガスまたは合成ガスを含むか、または前記に含まれる、（a）または（c）の液体組成物液体組成物。

（９０）　ピルビン酸および／またはD-グルタミン酸の製造方法であって、

（a）D-アラニンおよび2-オキソグルタル酸を提供する工程；

（b）（２１）から（30）のいずれかに記載のポリペプチドを提供する工程；および

（c）前記ポリペプチドが反応（D-アラニン＋2-オキソグルタル酸＜＝＞ピルビン酸＋D-グルタミン酸）を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをD-アラニン＋2-オキソグルタル酸と接触させる工程を含む、前記方法。

（９１）　（i）（a）D-アミノ酸＋H_2O＋アクセプターを提供する工程；

（b）（２１）から（30）のいずれかに記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および

（c）前記ポリペプチドがD-アミノ酸＋H_2O＋アクセプター＜＝＞2-オキソ酸＋NH_3＋還元アクセプターなる反応を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをD-アミノ酸＋H_2O＋アクセプターと接触させる工程を含む2-オキソ酸を製造する方法、または

（ii）前記アクセプターがベンゾキノンである（i）の方法、または

（iii）ベンゾキノンが1,2-ベンゾキノンもしくは1,4-ベンゾキノン、またはユビキノン、ユビデカレノンまたはコエンザイムQである、（ii）の方法。

（９２）　（i）（a）アミノ酸を提供する工程；

（b）（２１）から（30）のいずれかに記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および

（c）前記ポリペプチドがアミノ酸からアルファ-ケト酸への変換を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをアミノ酸と接触させる工程を含む、アミノ基をアミノ酸からアルファ-ケト酸へ転移させる方法、または

（ii）前記トランスアミナーゼ活性がラセミアミノ酸混合物の光学的に実質的に純粋なアルファ-ケト酸への変換の触媒を含む、（i）の方法。

（９３）　（i）（a）アルファ-ケト酸を提供する工程；

（b）（２１）から（30）のいずれかに記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および

（c）前記ポリペプチドがアルファ-ケト酸からアミノ酸への変換を触媒する条件下で、工程（b）のポリペプチドをアルファ-ケト酸と接触させる工程を含む、アルファ-ケト酸からアミノ酸を製造する方法、または、

（ii）前記トランスアミナーゼ活性がラセミアルファ-ケト混合物の実質的に光学的に純粋なD-またはL-アミノ酸への変換の触媒を含む、（i）の方法、または

（iii）オキサロ酢酸がアスパラギン酸に変換されるか、またはα-ケトグルタル酸がグルタル酸に変換されるか、またはα-ケトイソバリレートがL-バリンに変換されるか、ま

たは前記トランスアミナーゼ活性が、イソブチルアミンのイソブチルアルデヒドへの変換を触媒するオメガトランスアミナーゼである、（ｉ）または（ｉｉ）の方法。
（９４）　（ｉ）（ａ）アミンを提供する工程；
（ｂ）（２１）から（30）のいずれかに記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および
（ｃ）前記ポリペプチドがアミンのケトンへの変換を触媒する条件下で、工程（ｂ）のポリペプチドをアミンと接触させる工程を含む、アミンのケトンへの変換を触媒する方法であって、前記アミンはトリプトファンに存在しないかまたはトリプトファンに由来しないが、ただし第二のアミノ酸がトリプトファンではないこと、またはアミンがトリプトファンに存在しないかまたはトリプトファンに由来しないことを条件とする、前記方法、または、
（ｉｉ）前記トランスアミナーゼ活性がキラルアミンのケトンへの変換の触媒を含む、（ｉ）の方法、または
（ｉｉｉ）アミンがω-アミンである、（ｉ）または（ｉｉ）の方法。
（９５）　（ｉ）（ａ）アミノ酸およびケト酸を提供する工程であってこ、前記アミノ酸はトリプトファンではない、前記工程；
（ｂ）（２１）から（30）のいずれかに記載のトランスアミナーゼポリペプチドを提供する工程；および
（ｃ）第二のアミノ酸およびピルビン酸が生成される条件下で、工程（ｂ）のポリペプチドをアミノ酸およびケト酸と接触させる工程を含む、アミノ酸の合成を触媒する方法であって、第二のアミノ酸はトリプトファンではないことを条件とする、前記方法、または
（ｉｉ）トランスアミナーゼ酵素と反応しない化合物を生成するために適切な条件下でピルビン酸をアセトラクテートシンターゼ酵素と反応させる工程をさらに含む、（ｉ）の方法、または、
（ｉｉｉ）トランスアミナーゼ酵素と反応しない化合物がアセトラクテートまたはアセトインであるか；または第一のアミノ酸がアラニンまたはL-アスパラギン酸であるか；またはケト酸が2-酪酸またはトリ-メチルピルビン酸であるか；または第二のアミノ酸が2-アミノ酪酸またはtert-ロイシンである、（ｉｉ）の方法。
本発明を以下の実施例に関してこれからさらに説明するが、本発明はそのような実施例に限定されないことは理解されよう。
【０２９１】
本明細書に記載されるアミノトランスフェラーゼおよびオキシドレダクターゼは、選択ストラテジーを使用して得た。この選択ストラテジーにおいて、Ｌ－トリプトファン栄養要求性を示す細菌宿主株で環境ＤＮＡライブラリーを構築した。ライブラリークローンを、Ｄ－トリプトファンを含有する（が、Ｌ－トリプトファンを欠く）培地上に接種した。増殖することができた唯一のクローンは、Ｄ－トリプトファンに対して活性な酵素をコードする、別々の環境ＤＮＡ断片のうち１つの上にある遺伝子を発現したクローンである。たとえば、活性なトリプトファンラセマーゼを発現し、Ｄ－トリプトファンをＬ－トリプトファンに変換することができるクローンを同定した。さらに、Ｄ－トリプトファンを（宿主細胞がＬ－トリプトファンに変換することができる）中間体に変換することができるオキシドレダクターゼ（アミノ酸オキシダーゼまたはデヒドロゲナーゼなど）を発現するクローンを同定した。アミノ酸オキシダーゼおよびデヒドロゲナーゼなどのオキシドレダクターゼの場合には、１つのそのような中間体はインドール－３－ピルビン酸である。
パートＡにおける例は、候補ＤＡＴおよびオキシドレダクターゼ核酸ならびにコードポリペプチドの最初の特徴づけに使用される方法論を記載する。特定の核酸およびポリペプチドのさらなる特徴づけは、パートＢに記載される。
パートＡ
【実施例】
【０２９２】
〔実施例１〕

増殖およびアッセイ手順＃１
酵素調製
グリセロールストックを使用して、適切な抗生物質を有する５０ｍＬのＬＢ培地を含有するフラスコに接種した。スターター培養物を２３０ｒｐｍで振盪させながら３７℃で一晩増殖させ、$ＯＤ_{600nm}$をチェックした。スターター培養物を使用して０．０５の$ＯＤ_{600nm}$となるように４００ｍＬに接種した。培養物は２３０ｒｐｍで振盪させながら３７℃でインキュベートした。
$ＯＤ_{600nm}$が０．５および０．８の間となったときに、培養物を１ｍＭ　ＩＰＴＧを用いて誘導し、３０℃および２３０ｒｐｍで一晩インキュベートした。１５分間４０００ｒｐｍでの遠心分離によって細胞をペレットにすることにより培養物を収集した。上清を流し出し、ペレットは、後の使用のために凍結させまたは２６Ｕ／ｍＬのＤＮアーゼを補充した２０ｍＬの５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．５）中に再懸濁し、メーカーの指示によって、ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｎｅｗｔｏｎ、ＭＡ）を使用して溶解した。清浄化した溶解物を収集し、３０分間１１，０００ｒｐｍで遠心分離した。上清は、清浄チューブ中に収集し、０．２μｍフィルターで濾過した。清浄化した溶解物の５ｍＬのアリコートをバイアル中に入れ、メーカーの指示によって、凍結乾燥器（Ｖｉｒｔｉｓ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｇａｒｄｉｎｉｅｒ、ＮＹ）を使用して凍結乾燥した。清浄化した溶解物の約１ｍＬを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を使用するタンパク質定量化のために保存した。次いで、各凍結乾燥試料中のタンパク質の量を計算した。
【０２９３】
活性アッセイ
活性アッセイのための酵素を、５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．５中で調製した。ＤＡＴアッセイは約１ｍｇ／ｍＬ総タンパク質を使用して通常行った。
【０２９４】
ＲＲ－モナチン基質を使用するＤＡＴアッセイ
２５ｍＭ　ＲＲ－モナチン、２５ｍＭピルビン酸ナトリウム塩、０．０８ｍＭ　ＰＬＰ、９０ｍＭリン酸ナトリウム　ｐＨ８．０、および上記（「酵素調製」の節）に記載されるように調製した０．８ｍｇ／ｍＬ　ＤＡＴ（総タンパク質）を組み合わせ、３００ｒｐｍ、３０℃でインキュベートした。様々な時点（一般的に０、２、４、および２４時間）で、５０μＬの反応産物を１５０μＬの氷冷アセトニトリルに移し、試料を３０秒間ボルテックスした。試料は、４℃で１０分間、１３，２００ｒｐｍで遠心分離し、上清は０．４５μｍフィルターを通過させた。濾液をメタノール中で希釈して１０倍にし、試料は、形成されたＤ－アラニンをモニターするために液体クロマトグラフィー／質量分析／質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）によって分析した（「Ｄ－アラニンまたはＲ，Ｒ－モナチンを検出するためのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法」の節、この実施例において以下に記載される）。
【０２９５】
トリプトファン基質を使用するＤＡＴアッセイ
１０ｍＭ　Ｄ－トリプトファン、２５ｍＭピルビン酸ナトリウム塩、０．０８ｍＭ　ＰＬＰ、９０ｍＭリン酸ナトリウム　ｐＨ８．０、および上記（「酵素調製」の節）に記載されるように調製した０．８ｍｇ／ｍＬ　ＤＡＴ（総タンパク質）を組み合わせ、３０℃および３００ｒｐｍでインキュベートした。ある時点（一般的に０、２、４、および２４時間）で、５０μＬの反応産物を１５０μＬの氷冷アセトニトリルに移し、３０秒間ボルテックスし、４℃で１０分間、１３，２００ｒｐｍで遠心分離した。上清は０．４５μｍフィルターを通過させ、濾液は、メタノール中で希釈して１０倍にした。試料は、形成されたＤ－アラニンをモニターするためにＬＣ／ＭＳ／ＭＳによって分析した（「Ｄ－アラニンまたはＲ，Ｒ－モナチンを検出するためのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法」の節、この実施例中、以下に記載される）。
【０２９６】

Ｄ－アラニンまたはＲ，Ｒ－モナチンを検出するためのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法
液体クロマトグラフィー／質量分析／質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）スクリーニングは、Ｚｏｒｂａｘ ＥＣＬＩＰＳＥ ＸＤＢ－Ｃ８（商標）（２．１×５０ｍｍ）カラムを通して１．０ｍＬ／分でＬＣ－１０ＡＤｖｐポンプ（Ｓｈｉｍａｄｚｕ、Ｋｙｏｔｏ、Ｊａｐａｎ）によって供給される３０／７０ H_2O／Ａｃｎ（０．１％ギ酸）混合物の中におよびＡＰＩ４０００ ＴＵＲＢＯＩＯＮ－ＳＰＲＡＹ（商標） ｔｒｉｐｌｅ－ｑｕａｄ質量分析計（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）の中に、ＣＴＣＰａｌオートサンプラー（ＬＥＡＰ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｒｂｏｒｏ、ＮＣ）を使用して９６ウェルプレートから試料を注入することによって達成した。
イオンスプレーおよび多重反応モニタリング（ＭＲＭ）は、陽イオンモードにおいて対象とする分析物について行った。アラニン：親／娘イオン：９０．１２／４４．２５、モナチン：親／娘イオン：２９３．１１／１３０．１５。

【０２９７】

［実施例２］

実施例２－アッセイ手順＃１を使用するＤＡＴの活性
ベクターｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓは、ｐＳＥ４２０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）の誘導体である。ｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓについては、ベクターは、ＮｃｏＩおよびＨｉｎｄ ＩＩＩを用いて切断し、Ｃ－Ｈｉｓとライゲーションした。Ｃ－Ｈｉｓ：５’ＣＣＡ ＴＧＧ ＧＡＧ ＧＡＴ ＣＣＡ ＧＡＴ ＣＴＣ ＡＴＣ ＡＣＣ ＡＴＣ ＡＣＣ ＡＴＣ ＡＣＴ ＡＡＧ ＣＴＴ（配列番号９７７）。このベクターにおけるＨｉｓタグの発現は宿主および終止コドンの選択に依存する。すなわち、ＴＡＧ終止コドンおよびｓｕｐＥ宿主が使用される場合はＨｉｓタグが発現され、ＴＡＧ終止コドンおよび非ｓｕｐＥ宿主が使用される場合にはＨｉｓタグは発現されない。他に指定のない限り、Ｈｉｓタグはこれらの実験において発現されなかった。
ＤＡＴサブクローンは、以下のサブクローンを例外として、ｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓベクター／大腸菌ＨＭＳ１７４宿主（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）中とした。配列番号９３０、９３２、および９３６は、ｐＥＴ１０１ Ｄ－Ｔｏｐｏベクター／ＢＬ２１Ｓｔａｒ（ＤＥ３）宿主（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）中とし、配列番号９３４は、ｐＥＴ１０１ Ｄ－Ｔｏｐｏベクター／ＢＬ２１ ＣＯＤＯＮ ＰＬＵＳＲＩＬ（商標）宿主（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）中とし、配列番号９３８、９４２、９４４、９４６は、ｐＳＥ４２０ベクター／ＸＬ１ＢＬＵＥ（商標）宿主（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）中とし、配列番号９４０、９４８、９５０、９６２、および９６６は、ｐＳＥ４２０－ｃ－Ｈｉｓベクター／ＸＬ１ＢＬＵＥ（商標）宿主（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）中とし、配列番号９２８は、ｐＱＥＴ１ベクター／Ｍ１５ｐＲＥＰ４宿主中とした（ｐＱＥＴ１は、米国特許第５，８１４，４７３号および第６，０７４，８６０号に記載される；Ｍ１５ｐＲＥＰ４はＱｉａｇｅｎ、Ｖａｌｅｎｃｉａ、ＣＡからのものとする）。

【０２９８】

サブクローンは、実施例１に記載される手順に従って増殖させ、溶解し、凍結乾燥した。試料は、Ｒ，Ｒ－モナチンおよびｄ－トリプトファンに対する活性について試験した（例１に記載されるように）。モナチンＤＡＴアッセイについては、ＤＡＴは、３０℃で、２５ｍＭ Ｒ，Ｒ－モナチン、２５ｍＭピルビン酸ナトリウム塩、および０．０８ｍＭ ＰＬＰ（ｐＨ８）と共にインキュベートした。ｄ－トリプトファンＤＡＴアッセイについては、ＤＡＴは、３０℃で、１０ｍＭ ｄ－トリプトファン、２５ｍＭピルビン酸ナトリウム（ｓｏｌｄｉｕｍ）塩、および０．０８ｍＭ ＰＬＰ（ｐＨ８）と共にインキュベートした。すべてのＤＡＴは、両方のアッセイにおいて０．８ｍｇ／ｍＬ総タンパク質で添加した。

【０２９９】

示した時点で、５０μＬの反応産物を１５０μＬの氷冷アセトニトリルに加えた。試料

は、３０秒間ボルテックスし、次いで、上清はメタノール中で希釈して１０倍にした。次いで、試料は、形成されたＤ－アラニンをモニターするために、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによって分析した（例１に記載されるように）。下記の表は、両基質に対するＤ－アミノトランスフェラーゼ活性を示す。

【０３００】

表４：Ｒ，Ｒ－モナチンおよびＤ－トリプトファンに対するＤ－アミノトランスフェラーゼサブクローンの活性

配列番号	Ｒ，Ｒ－モナチンに対する活性 示した時間に形成されたＤ－アラニンμg/ml	Ｄ－トリプトファンに対する活性 示した時間に形成されたＤ－アラニンμg/ml	相対的発現
928	24時間で30	NT	+
938	24時間で122	NT	++
940	24時間で5	NT	ND
942	24時間で12	NT	ND
944	24時間で75	NT	ND
946	24時間で39	NT	ND
948	0.5時間で200	0.5時間で441	ND
950	0.5時間で75	0.5時間で452	ND
962	NT	NT	+
964	24時間で7	24時間でND	++
966	NT	NT	++
968	24時間で6.7	24時間で52	+++
886（XL1 Blue細胞において発現）	NT	NT	++

ＮＴ、試験せず；ＮＤ、使用した条件下で検出されず；＋、低発現、＋＋、中程度の発現、＋＋＋、高発現

【０３０１】

表４：Ｒ，Ｒ－モナチンおよびＤ－トリプトファンに対するＤ－アミノトランスフェラーゼサブクローンの活性（続き）

配列番号	ＲＲ－モナチン に対する活性	Ｄ－トリプトファン に対する活性	相対的 発現
	示した時間に形成された Ｄ－アラニンμg/ml	示した時間に形成された Ｄ－アラニンμg/ml	
886（大腸菌HMS174細胞において発現）	24時間で15.4	24時間で143	+++
888（XL1 Blue細胞において発現）	NT	NT	++
888（HMS174細胞において発現）	24時間で7	24時間で317	+++
890（XL1 Blue細胞において発現）	NT	NT	++
890（HMS174細胞において発現）	24時間で54	24時間で278	+++
892（XL1 Blue細胞において発現）	NT	NT	+
892（HMS174細胞において発現）	24時間で113	24時間で<5	++
894（XL1 Blue細胞において発現）	NT	NT	ND
894（HMS174細胞において発現）	24時間で16	24時間で116	+
866	24時間で28	NT	+++
868	24時間で<1	NT	+++
970	24時間で10.8	NT	+
870	24時間で123.5	NT	+++
872	24時間で62.3	NT	+++
874	24時間で46.5	NT	+++
876	24時間で44	NT	++
878	24時間で37	NT	+++
972	24時間で<5	NT	+
880	24時間で72.4	24時間で79.6	+
882	24時間で158.8	2時間で344	+++
884	24時間で290	2時間で363	++
896	24時間で54	2時間で450	+++
898	24時間で466	24時間で300	+
900	24時間で135	24時間で154	+
902	24時間で280	24時間で130	++
904	24時間で170	24時間で140	+
906	24時間で700	24時間で500	+++
908	24時間で55	24時間で45	+不溶性

ＮＴ、試験せず；ＮＤ、検出されず；＋、低発現；＋＋、中程度の発現；＋＋＋、高発現

【０３０２】

表４．Ｒ，Ｒ－モナチンおよびＤ－トリプトファンに対するＤ－アミノトランスフェラーゼサブクローンの活性（続き）

配列番号	ＲＲ－モナチンに対する活性 示した時間に形成されたＤ－アラニンμg/ml	Ｄ－トリプトファンに対する活性 示した時間に形成されたＤ－アラニンμg/ml	相対的発現
910	24時間で384	24時間で240	+++
912	NT	NT	ND
914	NT	NT	ND
916	NT	NT	ND
918	NT	NT	ND
920	NT	NT	ND
922	NT	NT	ND
924	NT	NT	ND
926	NT	NT	ND
974（HMS174細胞において発現）	NT	NT	ND
974（XL1 Blue細胞において発現）	NT	NT	ND
930	NT	NT	ND
932	NT	NT	ND
934	NT	NT	ND
936	NT	NT	ND
976（LX1 Blue細胞において発現）	NT	24時間で<5	++

ＮＴ、試験せず；ＮＤ、検出されず；＋、低発現；＋＋、中程度の発現；＋＋＋、高発現

【０３０３】

配列表にもある上記に挙げられるサブクローンおよびそれらの本来の配列の間に非常に保存的な差異のみがあることに注目されるべきである。たとえば、かなり多くの場合、開始コドンまたは終止コドンは、大腸菌における発現のためにより効率的なものとなるように改変されている。野生型配列のクローニングはＤＡＴ活性について同様の結果をもたらすことが予想される。

パートＢ

【０３０４】

［実施例３］

実施例３－モナチン、ＭＰ、トリプトファン、アラニン、およびＨＭＧの検出

この実施例は、選択したＤ－アミノトランスフェラーゼ（ＤＡＴ）酵素のさらなる特徴づけと関連する分析的な方法論を記載する。

モナチンおよびトリプトファンのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ多重反応モニタリング（ＭＲＭ）分析

生化学的反応に由来するモナチンおよびトリプトファンについての混合物の分析は、クロマトグラフおよびＭＩＣＲＯＭＡＳＳ（登録商標）　ＱＵＡＴＴＲＯ　ＵＬＴＩＭＡ（登録商標）三連四重極型質量分析計の間に直列に配置したＷａｔｅｒｓ　９９６　Ｐｈｏｔｏ－Ｄｉｏｄｅ　Ａｒｒａｙ（ＰＤＡ）吸光度モニターと共にＷａｔｅｒｓ２７９５（商標）液体クロマトグラフを含むＷａｔｅｒｓ／ＭＩＣＲＯＭＡＳＳ（登録商標）液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）機器を使用して行った。ＬＣ分離は、４０℃で、Ｘｔｅｒｒａ　ＭＳ　Ｃ８逆相クロマトグラフィーカラム、２．１ｍｍ×２５０ｍｍを使用して行った。ＬＣ移動相は、Ａ）０．３％ギ酸および１０ｍＭギ酸アンモニウムを含有する水ならびにＢ）０．３％ギ酸および１０ｍＭギ酸アンモニウムを

含有するメタノールから成るものとした。

【０３０５】

勾配溶離は、５％Ｂから４５％Ｂまで０～８．５分間の直線勾配、４５％Ｂから９０％Ｂまで８．５～９分間の直線勾配、９０％Ｂから９０％Ｂまで９～１２．５分間の均一溶媒、９０％Ｂから５％Ｂまで１２．５～１３分間の直線勾配とし、操作の間の再平衡期間を４分間とした。流速は０．２７ｍＬ／分とし、ＰＤＡ吸光度を２１０ｎｍから４００ｎｍまでモニターした。ＥＳＩ－ＭＳのすべてのパラメーターは、対象とする分析物のプロトン化された分子イオン（［Ｍ＋Ｈ］＋）の生成および特徴的なフラグメントイオンの産生に基づいて最適化し、選択した。以下の機器のパラメーターを、モナチンおよびトリプトファンのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ多重反応モニタリング（ＭＲＭ）分析のために使用した：キャピラリー：３．５ｋＶ；コーン：４０Ｖ；Ｈｅｘ１：２０Ｖ；開口部：０Ｖ；Ｈｅｘ２：０Ｖ；ソース温度：１００℃；脱溶媒温度：３５０℃；脱溶媒ガス：５００Ｌ／時；コーンガス：５０Ｌ／時；低質量分解度（Ｑ１）：１２．０；高質量分解度（Ｑ１）：１２．０；イオンエネルギー：０．２；入口：－５Ｖ；衝突エネルギー：８；出口：１Ｖ；低質量分解度（Ｑ２）：１５；高質量分解度（Ｑ２）：１５；イオンエネルギー（Ｑ２）：３．５；増倍管：６５０。４つのモナチン特異的親－娘ＭＲＭ遷移および１つのトリプトファン特異的親－娘遷移を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ反応において、モナチンおよびトリプトファンを特異的に検出するために使用する。モニターした遷移は、２９３．０８から１５７．９４、２９３．０８から１６７．９４、２９３．０８から１３０．０１、および２９３．０８から２５６．７７である。トリプトファンは、ＭＲＭ遷移２０５．０から１４６．０でモニターする。モナチンおよびトリプトファンの内部標準定量化については、d_5－トリプトファンおよびd_5－モナチンに対して４つの異なる比の各分析物を含有する４つの較正標準物を分析する。これらのデータは、モナチンおよびトリプトファンのための較正曲線を形成するために、線形最小二乗法にかける。各試料に、固定量のd_5－トリプトファンおよびd_5－モナチンを加え（d_5－モナチンは、ＷＯ２００３／０９１３９６Ａ２からの方法に従ってd_5－トリプトファンから合成した）、上記に記載される較正曲線と共に応答比（モナチン／d_5－モナチン；トリプトファン／d_5－トリプトファン）を、混合物における各分析物の量を計算するために使用する。d_5－トリプトファンおよびd_5－モナチンについてモニターされた親－娘質量遷移は、それぞれ、２１０．０から１５０．０ならびに２９８．１から１７２．０および２９８．１から１６２．００である。

【０３０６】

モナチンのキラルＬＣ／ＭＳ／ＭＳ（ＭＲＭ）測定

生化学的反応におけるモナチンの立体異性体分布の決定は、１－フルオロ－２－４－ジニトロフェニル－５－Ｌ－アラニンアミド（ＦＤＡＡ）を用いる誘導体化、その後に続く逆相ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ　ＭＲＭ測定によって達成した。

【０３０７】

ＦＤＡＡを用いるモナチンの誘導体化

５０μＬの試料または標準物および１０μＬの内部標準に、アセトン中のＦＤＡＡの１％溶液を１００μＬ加えた。２０μＬの１．０Ｍ炭酸水素ナトリウムを加え、混合物は、時々混合しながら４０℃で１時間インキュベートした。試料を取り出し、冷却し、２０μＬの２．０Ｍ　ＨＣｌを用いて中和した（緩衝生物学的混合物の中和を達成するためにより多くのＨＣｌが必要とされてもよい）。脱気が完了した後、試料は、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによる分析の準備が整った。

【０３０８】

モナチンの立体異性体分布の決定のためのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ多重反応モニタリング

分析は、先の節に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ計測装置を使用して行った。モナチン（特にＦＤＡＡ－モナチン）の４つのすべての立体異性体を分離することができるＬＣ分離は、４０℃にてＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ（登録商標）２．０×２５０ｍｍ（μｍ）　Ｃ１８逆相クロマトグラフィーカラム上で行った。ＬＣ移動相は、Ａ）０．０５％（

質量／容量）酢酸アンモニウムを含有する水およびＢ）アセトニトリルから成るものとした。溶離は、１３％Ｂ、０～２分間の均一溶媒、１３％Ｂから３０％Ｂまで２～１５分間の直線勾配、３０％Ｂから８０％Ｂまで１５～１６分間の直線勾配、８０％Ｂ、１６～２１分間の均一溶媒、８０％Ｂから１３％Ｂまで２１～２２分間の直線勾配、操作の間の再平衡期間を８分間とした。流速は０．２３ｍＬ／分とし、ＰＤＡ吸光度を２００ｎｍから４００ｎｍまでモニターした。ＥＳＩ－ＭＳのすべてのパラメーターはＦＤＡＡ－モナチンの脱プロトン化された分子イオン（［Ｍ－Ｈ］$^-$）の生成および特徴的なフラグメントイオンの産生に基づいて最適化し、選択した。

【０３０９】

以下の機器のパラメーターを、陰イオンＥＳＩ／ＭＳモードにおけるモナチンのＬＣ／ＭＳ分析のために使用した：キャピラリー：３．０ｋＶ；コーン：４０Ｖ；Ｈｅｘ１：１５Ｖ；開口部：０．１Ｖ；Ｈｅｘ２：０．１Ｖ；ソース温度：１２０℃；脱溶媒温度：３５０℃；脱溶媒ガス：６６２Ｌ／時；コーンガス：４２Ｌ／時；低質量分解度（Ｑ１）：１４．０；高質量分解度（Ｑ１）：１５．０；イオンエネルギー：０．５；入口：０Ｖ；衝突エネルギー：２０；出口：０Ｖ；低質量分解度（Ｑ２）：１５；高質量分解度（Ｑ２）：１４；イオンエネルギー（Ｑ２）：２．０；増倍管：６５０。３つのＦＤＡＡモナチン特異的親－娘遷移を、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏ反応におけるＦＤＡＡ－モナチンを特異的に検出するために使用した。モナチンについてモニターされた遷移は、５４２．９７から２６７．９４、５４２．９７から４９９．０７、および５４２．９７から５２５．０４であった。モニターされたモナチン内部標準誘導体質量遷移は、５４８．２から５３０．２であった。ＦＤＡＡ－モナチン立体異性体の同定は、精製モナチン立体異性体と比較したクロマトグラフィー保持時間および質量スペクトルデータに基づくものとした。内部標準は、反応の進行をモニターするためにおよびＳ，Ｓ立体異性体の保持時間の確認のために使用した。

【０３１０】

トリプトファン、モナチン、アラニン、およびＨＭＧを含むアミノ酸の液体クロマトグラフィー－ポストカラム蛍光検出

トリプトファン（Ｔｒｙｔｏｐｈａｎ）、モナチン、およびアラニンについての手順

生化学的反応におけるアミノ酸の決定のためのポストカラム蛍光検出を用いる液体クロマトグラフィーは、Ｗａｔｅｒｓ ４７４スキャニング蛍光検出器およびＷａｔｅｒｓポストカラム反応モジュールと組み合わせたＷａｔｅｒｓ ２６９０ ＬＣシステムまたは同等物で行った（ＬＣ／ＯＰＡ法）。ＬＣ分離は、６０℃で、相互作用ナトリウム充填イオン交換カラム上で行った。移動相Ａは、Ｐｉｃｋｅｒｉｎｇ Ｎａ ３２８緩衝液（Ｐｉｃｋｅｒｉｎｇ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｉｎｃ．；Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ、ＣＡ）とした。移動相Ｂは、Ｐｉｃｋｅｒｉｎｇ Ｎａ ７４０緩衝液とした。勾配溶離は、０％Ｂから１００％Ｂ、０～２０分間、１００％Ｂ、２０～３０分間の均一溶媒、１００％Ｂから０％Ｂ、３０～３１分間の直線勾配、２０分間を操作の間の再平衡期間とした。移動相についての流速は、０．５ｍＬ／分とした。ＯＰＡポストカラム誘導体化溶液についての流速は、０．５ｍＬ／分とした。蛍光検出器設定は、ＥＸ ３３８ｎｍおよびＥｍ ４２５ｎｍとした。ノルロイシンを、分析のための内部標準として用いた。アミノ酸の同定は、精製標準物についてのクロマトグラフィー保持時間データに基づくものとした。

【０３１１】

ＨＭＧについての手順

生化学的反応から試料は、充填材料としてＣ１８および溶離液として０．６％酢酸を含有する固相抽出（ＳＰＥ）カートリッジによって精製した。次いで、ＳＰＥから収集画分を既知の容量にし、蛍光検出器を用いて、ＨＰＬＣポストカラムＯ－フタルアルデヒド（Ｐｈｔｈａｌａｄｅｈｙｄｅ）（ＯＰＡ）誘導体化を使用して分析した。クロマトグラフィー分離は、Ｗａｔｅｒｓ ２６９５液体クロマトグラフィーシステムおよび２つのＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＡｑｕａＣ１８カラム；５μｍ粒子を用いる２．１ｍｍ×２５０ｍｍ

カラムおよび３μｍ粒子を用いる２．１ｍｍ×１５０ｍｍカラムを直列に使用して可能にした。カラムの温度は、４０℃とし、カラムの均一溶媒の流速は、０．１８ｍｌ／分とした。移動相は、０．６％酢酸とした。ＯＰＡポストカラム誘導体化および検出システムは、Ｗａｔｅｒｓ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｍａｎａｇｅｒ（ＲＭＡ）、反応コイルチャンバー、反応コイルチャンバーのための温度制御モジュール、およびＷａｔｅｒｓ　２８４７蛍光検出器から成るものとした。ＯＰＡ流速は、０．１６ｍＬ／分に設定し、反応コイルチャンバーは、８０℃に設定した。蛍光検出器は、３４８ｎｍの励起波長および４５０ｎｍの放射波長を用いて設定した。シグナル利得および減衰などの検出器感度を制御する他のパラメーターは、実験の必要性に応じて設定した。ＨＭＧの定量化は、グルタミン酸のモル応答に基づくものとした。

【０３１２】

ＬＣ／ＭＳによるＭＰの検出

液体クロマトグラフィー分離は、Ｗａｔｅｒｓ　２６９０液体クロマトグラフィーシステムおよび２．１ｍｍ×５０ｍｍ　Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　ＸＤＢ－Ｃ１８　１．８μｍ逆相クロマトグラフィーカラムを使用して行い、流速を０．２５ｍＬ／分とし、勾配条件は以下に示す条件とした。

時間（分間）	A%	B%
0.00	95	5
0.2	95	5
1.2	5	95
4.5	5	95
5.0	95	5
10	95	5

移動相Ａは１０ｍＭギ酸アンモニウムを有する０．３％（ｖ／ｖ）ギ酸とし、移動相Ｂは５０：５０メタノール／アセトニトリル中に１０ｍＭギ酸アンモニウムを有する０．３％ギ酸とした。カラム温度は４０℃とした。

陰性エレクトロスプレーイオン化モード（－ＥＳＩ）で作動するＭｉｃｒｏｍａｓｓ　ＺＱ四重極型質量分析計についてのパラメーターは、以下のように設定した：キャピラリー：２．２ｋＶ；コーン：３５Ｖ；抽出器：４Ｖ；ＲＦレンズ：１Ｖ；ソース温度：１２０℃；脱溶媒温度：３８０℃；脱溶媒ガス：６００Ｌ／時；コーンガス：なし；低質量分解度：１５．０；高質量分解度：１５．０；イオンエネルギー：０．２；増倍管：６５０。単一イオンモニタリングＭＳ実験は、ｍ／ｚ２９０．３、２１０．３、１８４．３、および２０８．４の選択的な検出を可能にするために設定した。ｍ／ｚ２０８．４は、内部標準d_5－トリプトファンの脱プロトン化された分子［Ｍ－Ｈ］⁻イオンである。

【０３１３】

ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによるＭＰの検出

ＬＣ分離は、Ｗａｔｅｒｓ　ＨＰＬＣ液体クロマトグラフィーシステムおよび２．１ｍｍ×５０ｍｍ　Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　ＸＤＢ－Ｃ１８　１．８μｍ逆相クロマトグラフィーカラムを使用して行い、流速は０．２５ｍＬ／分とし、勾配条件は以下の条件とした。

時間（分間）	A%	B%
0.00	95	5
0.7	95	5
3.0	5	95
4.0	5	95
4.3	95	5
6.0	95	5

移動相Ａは１０ｍＭギ酸アンモニウムを有する０．３％（ｖ／ｖ）ギ酸とし、Ｂは５０：５０メタノール／アセトニトリル中に１０ｍＭギ酸アンモニウムを有する０．３％ギ酸とした。カラム温度は４０℃とした。

【０３１４】

陰性エレクトロスプレーイオン化モード（－ＥＳＩ）で作動する、ＬＳ／ＭＳ／ＭＳ多重反応モニタリング（ＭＲＭ）実験のためのＷａｔｅｒｓ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　ＸＥ四重極型質量分析計についてのパラメーターは、以下のように設定した：キャピラリー：３．０ｋＶ；コーン：２５Ｖ；抽出器：３Ｖ；ＲＦレンズ：０Ｖ；ソース温度：１２０℃；脱溶媒温度：３５０℃；脱溶媒ガス：６５０Ｌ／時；コーンガス：４７Ｌ／時；低質量分解度（Ｑ１）：１３．５；高質量分解度（Ｑ１）：１３．５；イオンエネルギー（Ｑ１）：０．５Ｖ；入口：１Ｖ；衝突エネルギー：１８Ｖ；出口１：１９；低質量分解度（Ｑ２）：１５；高質量分解度（Ｑ２）：１５；イオンエネルギー（Ｑ２）：２．０；増倍管：６５０。４つの親－娘ＭＲＭ遷移を、モナチン前駆体（ＭＰ）およびd_5－モナチン前駆体（d_5－ＭＰ）を選択的に検出するためにモニターした。d_5－ＭＰを内部標準（Ｉ．Ｓ．）として使用した。４つのＭＲＭ遷移は、２９０．１から１８４．１、２９０．１から２１０．１、２９０．１から２２８．１、および２９５．１から１８９．１であった。これらの遷移のうちの２つ、ＭＰについての２９０．１から１８４．１およびd_5－ＭＰについての２９５．１から１８９．１を、較正曲線の生成および定量化の目的のために使用した。２９０．１から２１０．１および２９０．１から２２８．１の遷移は、ＭＰの定質的な第２の確認として使用した。

【０３１５】

標準物およびアッセイのためのモナチンおよびＭＰの生成

モナチンの生成

Ｒ，ＲモナチンおよびＳ，Ｓモナチンのラセミ混合物は、米国特許第５，１２８，４８２号に記載されるように合成して生成した。Ｒ，ＲおよびＳ，Ｓモナチンは、誘導体化および加水分解のステップによって分離した。手短に言えば、モナチンラセミ混合物をエステル化し、遊離アミノ基をカルバマゼピン（ＣＢＺ）を用いてブロックし、ラクトンを形成し、Ｓ，Ｓラクトンを、固定化プロテアーゼ酵素を使用して選択的に加水分解した。モナチンはまた、Ｂａｓｓｏｌｉら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，８：１６５２～１６５８ページ、（２００５）に記載されるように分離することもできる。

【０３１６】

ＭＰ生成

Ｒ－ＭＰは、アミノ受容体としてピルビン酸ナトリウムを使用して、０．１Ｍリン酸カリウム緩衝液中の、ＡＴ－１０３広範囲Ｄ－アミノトランスフェラーゼ（Ｂｉ℃ａｔａｌｙｔｉｃｓ、Ｐａｓａｄｅｎａ、ＣＡ）を使用し、Ｒ，Ｒモナチンのアミノ基転移によって生成した。Ｓ－ＭＰは、アミノ受容体としてピルビン酸ナトリウムを使用して、０．１Ｍリン酸カリウム緩衝液中の、ＡＴ－１０２Ｌ－アミノトランスフェラーゼ（Ｂｉ℃ａｔａｌｙｔｉｃｓ）を使用し、Ｓ，Ｓモナチンのアミノ基転移によって生成した。両反応は、約２０時間、約８．０～８．３のｐＨで、３０℃で実行した。両化合物は、Ｒｏｈｍ　ａｎｄ　Ｈａａｓ（Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＰＡ）疎水性樹脂（ＸＡＤ（商標）１６００）を用いる予備段階ＨＰＬＣを使用して精製し、水中に溶離した。９０％を超える純

度のモナチン前駆体を含有する試料を収集し、凍結乾燥した。
【０３１７】
［実施例４］
実施例４－タンパク質調製法
この実施例は、選択されたＤＡＴの第２の特徴づけのためのクローニング、発現、細胞抽出物調製、タンパク質精製、およびタンパク質定量化のために使用する方法論を記載する。
当業者らは、サブクローニング（たとえばフラグメント）またはその他の形で改変された（たとえばタグの付いた）核酸からコードされるポリペプチドにおける活性の存在が、完全長または野生型核酸からコードされる、対応するポリペプチドにおける活性の存在を予測するものと考えられることを理解するであろう。
【０３１８】
ＴｏｐｏプラスミドへクローニングするためのＤＡＴコード遺伝子の増幅
ＴｏｐｏクローニングのためのＰＣＲ反応（ＳｔｒａｔａｇｅｎｅからのＰｆｕ Ｔｕｒｂｏまたはクローニング Ｐｆｕのいずれかを使用）は、以下のとおりとした。ポリメラーゼ酵素のための１×推奨緩衝液、０．２ｍＭ ｄＮＴＰ、０．５μＭの各プライマー、および５０μｌの反応当たり１μｌのポリメラーゼ（２．５ユニット）。反応は、反応当たり約５～１００ｎｇの鋳型ＤＮＡを含有した。９４℃の融解温度と同様に、２分間の９４℃のホットスタートをＰＣＲに使用した。アニーリング温度はプライマーのＴｍに依存して３０秒間または６０秒間とした。伸長時間（７２℃で）はｋｂ当たり少なくとも２分間とした。反応産物を１×ＴＡＥ １％アガロースゲル上で通常分離し、適切なサイズのバンドは１０～５０μｌの溶離容量を使用した以外はメーカーによって推奨されるようにＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔを用いて精製した。１～４μｌの容量の精製ＰＣＲ産物を、メーカーによって推奨されるように、ｐＣＲＩＩ－Ｔｏｐｏ Ｂｌｕｎｔプラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）とのライゲーションのために使用した。
【０３１９】
非タグ付き発現のためのｐＥＴ３０ａにおけるＤＡＴのクローニング
配列番号９４５、９４７、９４９、８９１、８９３、８６９、８７３、８７７、８８１、８８３、および８９５に示される配列を有するＤＡＴ（配列番号９４６、９４８、９５０、８９２、８９４、８７０、８７４、８７８、８８２、８８４、および８９６の配列を有するポリペプチドをコードする）を、Ｐｆｕ Ｔｕｒｂｏ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）ならびに５’端にＮｄｅ Ｉおよび３’端にＮｏｔ ＩまたはＢａｍＨ Ｉ制限部位を加えるプライマーを用いてプラスミドまたはＰＣＲ産物から増幅した。ＰＣＲフラグメントを、メーカーによって推奨されるように、ｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔ ＩＩ－Ｔｏｐｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）中にクローニングした。配列を配列決定法（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）によって検証し、正確な配列を有する挿入物を適切な制限酵素を使用してベクターから切り出し、ｐＥＴ３０ａのＮｄｅ ＩおよびＮｏｔ Ｉ（またはＢａｍＨ Ｉ）制限部位にライゲーションした。具体的なプライマーについては表５を参照されたい。
【０３２０】
配列番号１５５の配列を有するＤＡＴ核酸（配列番号１５６を有するポリペプチドをコードする）は、Ｐｆｕ Ｔｕｒｂｏ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）ならびに５’および３’端に、それぞれ、Ｎｄｅ ＩおよびＨｉｎｄ ＩＩＩの制限部位を加えるプライマーを用いて増幅した。ＰＣＲフラグメントは、Ｎｄｅ ＩおよびＨｉｎｄ ＩＩＩの制限酵素を使用して消化し、ｐＥＴ３０ａのＮｄｅ ＩおよびＨｉｎｄ ＩＩＩ制限部位にライゲーションした。具体的なプライマーについては表５を参照されたい。配列番号１５６の配列を有するポリペプチドが０．９９１の確率で以下のリーダー配列を含有するように思われることに注目されるべきである（Ｎｉｅｌｓｅｎ、１９９７、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、１０：１～６ページにおいて議論されるようなＳｉｇｎａｌ Ｐによって決

定）：ＫＮＳＰＩＩＡＡＹＲＡＡＴＰＧＳＡＡＡ（配列番号１０８４）。このＤＡＴポリペプチドをコードする核酸をリーダー配列（と思われる配列）と共にクローニングした。

【０３２１】

表５．増幅用のプライマー

増幅する配列番号	PCRプライマー	配列番号
945	5’-CCGCCCCATATGAACGCACTAGGATATTACAACGGAAAATGG-3’	978
	5’- GGCGGATCCTTATCCAAAGAATTCGGCACGAGCTGTC-3’	979
947	5’- CCGCCCCATATGCGCGAAATTGTTTTTTTGAATGGG -3’	980
	5’- CGGATCCCTAAACCATCTCAAAAAACTTTTGCTGAATAAACCGTG -3’	981
949	5’-CCGCCCCATATGTTGGATGAACGGATGGTGTTCATTAAC-3’	982
	5’-GGCGGATCCCTAGTCCACGGCATAGAGCCACTCGG-3’	983
891	5’-GGCCGCATATGGACGCACTGGGATATTACAACGGAAAATG-3’	984
	5’- GGCCGCGGCCGCCTATGCCTTTCTCCACTCAGGCGTGTAGC -3’	985
893	5’- GGCCGCATATGGACGCACTGGGATATTACAACGGAAAATG -3’	986
	5’- GGCCGCGGCCGCCTATACTGTGCTCCACTCAGGCGTGTAGCC -3’	987
869	5’- CATATGTATTCATTATGGAATGATCAAATAGTGAAGG -3’	988
	5’- GCGGCCGCCTATTTATTCGTAAAAGGTGTTGGAATTTTCG -3’	989
873	5’- CATATGAGCACCCCGCCGACCAATC -3’	990
	5’- GCGGCCGCCTAGGCCGCCTTCACTTCACGCTC -3’	991
877	5’- CATATGAGCACCCCGCCAACCAATTC -3’	992
	5’- GCGGCCGCCTACGCGGCCTTCACTTCGCGC -3’	993
881	5’- TCCAGGCATATGAGCACAGTATATTTAAATGGCC -3’	994
	5’- CCAGTAGCGGCCGCCTAACACTCAACACTATACTTATGC -3’	995
883	5’- TCTAGGCATATGGTTTATCTGAACGGGCG -3’	996
	5’- ACTGTAGCGGCGGCCTATCCGAGGGACGCGTTGG -3’	997
895	5’- CATATGAAAGAGCTGGGCTATTACAACGGAAAAATC-3’	998
	5’- GCGGCCGCCTATGACCTCCACCCCTGATTTCCAAAATAC-3’	999
155	5’-CTAGGATTCCATATGAAGAATTCGCCGATCATC-3’	1000
	5’-CGAAGCTTCAACAGCGGCCGCTTAAAG -3’	1001

【０３２２】

部位特異的変異導入

部位特異的変異導入は、メーカーの指示に従って、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ Ｍｕｌｔｉ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を使用して行った。配列番号８７０ Ｔ２４２Ｎ変異体を生成するために、実施例１０に記載されるｐＥＴ３０ａ非タグ付き構築物を、鋳型として使用した。配列番号２２０ Ｇ２４０Ｎおよび配列番号２２０ Ｔ２４１Ｎ変異体を生成するために、実施例１０に記載されるＣ末端ｈｉｓタグを有するｐＥＴ３０ａ構築物を、鋳型として使用した。使用した変異導入性のプライマーを、表６において下記に挙げる。所望の変異はすべて、ＤＮＡ配列決定法によって確認した。

【０３２３】

表６．プライマー配列

変異体ポリペプチドの名称(配列番号)	配列	配列番号
870 T242N	5’ - AATTATTTGTTTCATCAACAAATTCTGAAATTACGCCGGTTATTG-3’	1002
220 G240N	5’ - CTTGTGTCCAGCAGCAACACACTCGGCCTTAG -3’	1003
220 T241N	5’ - GTCCAGCAGCGGCAACCTCGGCCTTAGCGCC -3’	1004

【０３２４】
非タグ付きタンパク質としての発現のための、ｐＥＴ３０ａにおけるＤＡＴ　ＰＣＲ産物のクローニング
　配列番号１７７、１７９、１５３、１６５、１８１、２１７、１８７、１８９、２０７、２１９、２１５、１９５、１９９、１９７、２０９、２０１、２２１、２３５、２０３、２３７、２３９、２２３、２２５、２２７、２２９、２３１、２４５、２１３、１５５、１６９、１７１、１６７、１７３、および１７５に示される配列を有するＤＡＴ核酸（配列番号１７８、１８０、１５４、１６６、１８２、２１８、１８８、１９０、２０８、２２０、２１６、１９６、２００、１９８、２１０、２０２、２２２、２３６、２０４、２３８、２４０、２２４、２２６、２２８、２３０、２３２、２４６、２１４、１５６　１７０、１７２、１６８、１７４、および１７６に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドをコードする）は、切断効率を改善するために、Ｎｄｅ　ＩおよびＮｏｔ　Ｉ適合性の端ならびに外来ヌクレオチドを有するＰＣＲ産物として得た。
　ＤＡＴ　ＰＣＲ産物は、５’端にＮｄｅＩ制限酵素部位および３’端にＮｏｔＩ部位を含有した。ＰＣＲフラグメントは、最初に、ｐＣＲ４　ＴＯＰＯまたはｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔ　ＩＩ－ＴＯＰＯベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中にクローニングした。ＤＮＡ配列を配列決定法によって検証した後に、ＤＡＴ遺伝子をＮｄｅＩおよびＮｏｔＩの消化によってＴＯＰＯプラスミドから切り離し、同じ制限酵素を使用して切断したｐＥＴ３０ａベクターの中にライゲーションした。ＮｄｅＩまたはＮｏｔＩ部位を内部に含有するＤＡＴ遺伝子を適合性の制限酵素部位を有するプライマーを使用して増幅し、ｐＥＴ３０ａ中にクローニングした。たとえば配列番号１５５を有するＤＡＴ核酸（配列番号１５６の配列を有するポリペプチドをコードする）は、ｐＥＴ３０ａ中にクローニングするためにＮｄｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩの制限部位を使用して元のＰＣＲ産物から再増幅した。
【０３２５】
Ｃ－Ｈｉｓタグ付き融合タンパク質としての発現のための、ｐＥＴ３０ａにおけるＤＡＴのクローニング
　ＤＡＴ　４９７８およびＤＡＴ　４９７８　Ｔ２４３Ｎ（例６に記載される）、配列番号８７０（プラスミドｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓから発現）および配列番号８７０　Ｔ２４２Ｎ、配列番号１７６、ならびに配列番号２２０（ｐＥＴ３０から発現される非タグ付きバージョン）をコードする核酸は、Ｐｆｕ　Ｔｕｒｂｏ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）および終止コドンのすぐ上流にＸｈｏＩ部位を配置するプライマーを用いて再増幅した。ＰＣＲフラグメントを、メーカーによって推奨されるように、ｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔ　ＩＩ－Ｔｏｐｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）の中にクローニングしたまたはｐＥＴ３０ａのＮｄｅ　ＩおよびＸｈｏ　Ｉ制限部位の中に直接クローニングした。配列は、配列決定法（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）によって検証し、次いで、正確な配列を有する挿入物をＮｄｅ　ＩおよびＸｈｏ　Ｉの制限酵素を使用してベクターから切り離し、挿入物をｐＥＴ３０ａのＮｄｅ　ＩおよびＸｈｏ　Ｉ制限部位にライゲーションした。具体的なプライマーおよびプラスミド名については、表７を参照されたい。
【０３２６】
表７．プライマー配列

ポリペプチドの名称（配列番号）	配列	配列番号
870および870 T242N	5’- CATATGTATTCATTATGGAATGATCAAATAGTGAAGG -3’ 5’- CTCGAGTTTATTCGTAAAAGGTGTTGGAATTTTCGTTTC -3’	1005 1006
DAT4978およびDAT4978T243N	5’- CATATGAGTTATAGCTTATGGAATGACCAAATTGTGAATG -3’ 5’- CTCGAGTGCGCGAATACCTTTTGGGATTTTCGTATC -3’	1007 1008
220	5’- CTAGGATCTCATATGGACGCACTGGGATATTAC -3’ 5’- GCCTCGAGTACCCTGCTCCACTCAGG -3’	1009 1010
176	5’- CTAGGATTCCATATGGACGCGCTTGGCTATTAC -3’ 5’- GCCTCGAGTACCCTGCTCCACGCAG -3’	1011 1012

【０３２７】

ＣｂＤＡＴおよびＣａＤＡＴのクローニング

クロストリジウム　ベイジェリンキＤ－アミノ－トランスフェラーゼは、５’ＮｄｅＩおよび３’ＮｏｔＩ制限部位を含有するＰＣＲプライマーを用いて、Ｐｆｕ　Ｔｕｒｂｏ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）およびＣ．ベイジェリンキゲノムＤＮＡを使用してＰＣＲ増幅した。ゲノムＤＮＡは、メーカーの指示によって、ＰｕｒｒｇｅｎｅゲノムＤＮＡ精製キット（Ｇｅｎｔｒａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を使用して、Ｃ．ベイジェリンキ（ＡＴＣＣ　５１７４３）から抽出した。

８２４ｂｐ　ＰＣＲ産物は、Ｑｉａｇｅｎ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔを使用してゲル抽出し、ｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔ　ＩＩ－Ｔｏｐｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の中にＴＯＰＯクローニングした。配列を検証した後に、遺伝子は、Ｒａｐｉｄ　Ｌｉｇａｔｉｏｎキット（Ｒｏｃｈｅ）を使用して、Ｎｄｅ　Ｉ／Ｎｏｔ　Ｉ切断ｐＥＴ２８ｂおよびｐＥＴ３０ａベクターにライゲーションした。

【０３２８】

Ｃ．アセトブチリカムＤＡＴは、５’ＮｄｅＩおよび３’ＮｏｔＩ制限部位を含有するＰＣＲプライマーと共にゲノムＤＮＡ（ＡＴＣＣ　８２４）およびＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｏｐｔｉｐｒｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｋｉｔを使用してＰＣＲによって増幅した。成功したＰＣＲ反応物を、ｐＣＲ４　ＴＯＰＯベクターにクローニングし、ＴＯＰＯクローンを配列決定した。陽性ＴＯＰＯクローンを制限酵素ＮｄｅＩおよびＮｏｔＩを用いて消化し、ＤＡＴフラグメントを同じ制限酵素を用いて消化したｐＥＴ３０ａベクター中にライゲーションした。

【０３２９】

表８．プライマー配列

名称	配列	配列番号
CbDAT1	5’- GGTTCATATGGAGAATTTAGGTTATTA -3’ 5’- GGAAGCGGCCGCATATTCTACCTCCTATTCTG -3’	1013 1014
CaDAT2	5’- GGTTCATATGAAAGATTTAGGATATTACAATGGAGAATAC-3’ 5’ GGAAGCGGCCGCTTAATTTGTTTCTTCCAAAAATTCATTAAG -3’	1015 1016

【０３３０】

ＬｓＤＡＴのｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成

ラクトバチルス　サリバリウスＤＡＴを、Ｓｔｅｍｍｅｒら、１９９５、Ｇｅｎｅ，１６４：４９～５３ページに基づいて修正した方法を使用してアセンブルした。手短に言えば、センスおよびアンチセンス鎖の間に２０塩基対のオーバーラップを有する４３オリゴヌクレオチド（本来は４０ｍｅｒ）を、遺伝子配列およびその相補ＤＮＡ配列に基づいてＩＤＴに注文した。プライマーリストについては、表９を参照されたい。プライマーを水

で２５０μＭまで希釈し、５μＬの各プライマーをマイクロチューブ中で共に混合した。ＰＣＲを以下のように実行した：１００μＬの反応当たり、１．５μＬのプライマープール、４μＬ　ｄＮＴＰ、１×ＸＬ　ＰＣＲ緩衝液、１ｍＭ酢酸マグネシウム、２μＬ　ｒＴｔｈポリメラーゼ（Ｒｏｃｈｅ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）、および０．２５μＬ　Ｐｆｕポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を加えた。３分間のホットスタートを９４℃で行い、３０秒間９４℃、３０秒間４２℃、および１５秒間６８℃を１５サイクル続けた。さらに１０サイクルを３０秒間（６８℃で）の伸長時間を用いて行った。さらに１０サイクルを７５秒間の伸長時間を用いて行った。最後に、鎖伸長ステップを６８℃で７分間行った。

【０３３１】

表９．ＬｓＤＡＴの合成に使用したオリゴ

名称	配列(5’ → 3’)	配列番号
F1:	ATGAAGCAAG TTGGATACTA CAATGGTACT ATCGCTGATT	1017
F2:	TAAATGAACT TAAGGTGCCT GCTACTGATC GTGCACTTTA	1018
F3:	TTTTGGTGAT GGTTGCTACG ATGCAACTAC ATTTAAGAAC	1019
F4:	AATGTTGCAT TTGCCTTAGA AGATCATCTT GATCGTTTTT	1020
F5:	ATAATAGTTG TCGCCTACTA GAGATCGATT TCCCTTTAAA	1021
F6:	TCGCGATGAA CTTAAAGAAA AGCTTTACGC TGTTATTGAT	1022
F7:	GCTAACGAAG TTGATACTGG TATCCTTTAT TGGCAAACTT	1023
F8:	CACGTGGTTC TGGTTTACGT AACCATATTT TCCCAGAAGA	1024
F9:	TAGCCAACCT AATTTATTAA TTTTTACTGC TCCTTATGGT	1025
F10:	TTAGTTCCAT TTGATACTGA ATATAAACTT ATATCTCGCG	1026
F11:	AAGACACTCG CTTCTTACAT TGCAATATTA AAACTTTGAA	1027
F12:	TTTACTTCCA AACGTTATTG CAAGTCAAAA GGCTAATGAA	1028
F13:	AGTCATTGCC AAGAAGTGGT CTTCCATCGC GGTGACAGAG	1029
F14:	TTACAGAATG TGCACACTCT AACATCTTAA TTCTAAAAGA	1030
F15:	TGGCGTTCTT TGCTCCCCAC CTAGAGATAA TTTAATCTTG	1031
F16:	CCAGGAATTA CTTTGAAACA TCTCTTGCAA TTAGCAAAAG	1032
F17:	AAAATAATAT TCCTACTTCC GAAGCACCAT TCACTATGGA	1033
F18:	TGATCTTAGA AATGCTGATG AAGTTATTGT TAGTTCTTCA	1034
F19:	GCTTGTCTAG GTATTCGCGC AGTCGAGCTT GATGGTCAGC	1035
F20:	CTGTTGGTGG AAAAGATGGA AAGACTTTAA AGATCTTGCA	1036
F21:	AGATGCTTAT GCTAAGAAAT ATAATGCTGA AACTGTAAGT CGTTAA	1037
R1:	TAGTATCCAA CTTGCTTCAT	1038
R2:	AGGCACCTTA AGTTCATTTA AATCAGCGAT AGTACCATTG	1039
R3:	CGTAGCAACC ATCACCAAAA TAAAGTGCAC GATCAGTAGC	1040
R4:	TCTAAGGCAA ATGCAACATT GTTCTTAAAT GTAGTTGCAT	1041
R5:	TAGTAGGCGA CAACTATTAT AAAAACGATC AAGATGATCT	1042
R6:	TTTCTTTAAG TTCATCGCGA TTTAAAGGGA AATCGATCTC	1043
R7:	CCAGTATCAA CTTCGTTAGC ATCAATAACA GCGTAAAGCT	1044
R8:	ACGTAAACCA GAACCACGTG AAGTTTGCCA ATAAAGGATA	1045
R9:	TTAATAAATT AGGTTGGCTA TCTTCTGGGA AAATATGGTT	1046
R10:	TCAGTATCAA ATGGAACTAA ACCATAAGGA GCAGTAAAAA	1047
R11:	ATGTAAGAAG CGAGTGTCTT CGCGAGATAT AAGTTTATAT	1048
R12:	CAATAACGTT TGGAAGTAAA TTCAAAGTTT TAATATTGCA	1049
R13:	ACCACTTCTT GGCAATGACT TTCATTAGCC TTTTGACTTG	1050
R14:	AGAGTGTGCA CATTCTGTAA CTCTGTCACC GCGATGGAAG	1051
R15:	GTGGGGAGCA AAGAACGCCA TCTTTTAGAA TTAAGATGTT	1052
R16:	TGTTTCAAAG TAATTCCTGG CAAGATTAAA TTATCTCTAG	1053
R17:	GGAAGTAGGA ATATTATTTT CTTTTGCTAA TTGCAAGAGA	1054

R18:	CATCAGCATT TCTAAGATCA TCCATAGTGA ATGGTGCTTC	1055
R19:	GCGCGAATAC CTAGACAAGC TGAAGAACTA ACAATAACTT	1056
R20:	TCCATCTTTT CCACCAACAG GCTGACCATC AAGCTCGACT	1057
R21:	ATTTCTTAGC ATAAGCATCT TGCAAGATCT TTAAAGTCTT	1058
R22:	TTAACGACTT ACAGTTTCAG CATTAT	1059

【０３３２】

プライマーＬ．ｓａｌ　ＤＡＴ　Ｒ　Ｎｏｔ　ＩおよびＬ．ｓａｌ　ＤＡＴ　Ｆ　Ｎｄｅ　Ｉ（下記）を用いる第２の増幅により正しい分子量のバンドがもたらされた。これらの第２の増幅プライマー配列については表１０を参照されたい。

【０３３３】

表１０．プライマー配列

名称	配列(5’ → 3’)	配列番号
L. sal DAT R NotI	TTGGCCAAGCGGCCGCTTAACGACTTACAGTTT	1060
L. sal DAT F NdeI	GGTTCCAAGGCATATGAAGCAAGTTGGATACTA	1061

【０３３４】

第２のＰＣＲ反応は、２つしかプライマーを加えなかったということを除いて上記と同じように設定した。ＰＣＲ鋳型については、２．５μｌの一次ＰＣＲ反応物を使用した。３分間のホットスタートを９４℃で行い、９４℃で３０秒間、４２℃で３０秒間、６８℃で１５秒間を１０サイクル続けた。さらに１０サイクルを、アニーリング温度を４８℃に上げて３０秒間にし、伸長時間を（６８℃で）３０秒間にして行った。最後に、鎖伸長ステップを６８℃で７分間行った。

【０３３５】

フラグメントを、ｐＣＲ－ＢｌｕｎｔＩＩ－ＴＯＰＯベクター中にクローニングし、ＴＯＰＯクローンを配列決定した。陽性ＴＯＰＯクローンをＮｄｅＩおよびＮｏｔＩを用いて切断し、ＤＡＴフラグメントを同じ制限酵素を用いて消化したｐＥＴ３０ａベクターの中にライゲーションした。

【０３３６】

酵素調製

大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）を、ｐＥＴ由来プラスミドからのＤＡＴの発現のために宿主株として使用した。大腸菌株ＴＯＰ１０は、他のすべてのＤＡＴ構築物において使用した。所望の構築物の単一コロニーは、典型的に、適切な量の抗生物質を含有するＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＩＩ培地（Ｎｏｖａｇｅｎ）へ接種した。一晩、３０℃での培養の後に、OD_{600}が１０を超えたときに、細胞を遠心分離によって収集した。あるいは、一晩培養物は、適切な抗生物質を含有するＬＢ培地中の培養物に接種するために利用した。培養物を、０．５～０．９のOD_{600}まで３０℃で増殖させ、タンパク質発現を、同じ温度で４時間、１ｍＭ　ＩＰＴＧを用いて誘発した。

【０３３７】

細胞抽出物は、５μＬ／ｍＬのＰｒｏｔｅａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　Ｃｏｃｋｔａｉｌ　ＩＩ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ／Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ　カタログ＃５３９１３２）、１μｌ／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標）　Ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７０７４６）、および０．０３３μｌ／ｍｌのｒ－Ｌｙｓｏｚｙｍｅ（商標）溶液（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７１１１０）と共に、１ｇの細胞ペレット当たり５ｍＬまたは５０ｍＬの一晩培養物当たり５ｍＬのＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（登録商標）（第一級アミンなし）　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７０９２３）を細胞に加えることによって調製した。細胞再懸

濁液は、緩やかに振盪させながら、１５分間、室温でインキュベートした。４℃での２０分間の１６，１００ｒｃｆでの遠心分離の後に、上清を無細胞抽出物として取り出した。

【０３３８】

モナチン反応のために酵素調製物を使用する前に、洗浄剤および低分子量化合物は、０．０５ｍＭのＰＬＰを含有するリン酸カリウム緩衝液（１００ｍＭ、ｐＨ７．８）またはＥＰＰＳ緩衝液（１００ｍＭ、ｐＨ８．２）を用いてあらかじめ平衡化したＰＤ－１０カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を通過させることによって、無細胞抽出物から除去した。タンパク質は、平衡化緩衝液を使用して溶離した。タンパク質濃度は、典型的に、標準物としてＢＳＡ（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いるプレートアッセイであるＢｉｏＲａｄ Ｃｏｏｍａｓｓｉｅプレートアッセイ（Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイとしても知られている）を使用して決定した。記載されるところでは、時々、ＢＣＡ（Ｐｉｅｒｃｅ）マイクロプレートアッセイをタンパク質決定のために使用した。無細胞抽出物におけるＤ－アミノトランスフェラーゼの濃度を評価するために、１ｍｇ／ｍＬ試料をＥｘｐｅｒｉｏｎ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、Ｃａ）電気泳動システムに装荷し、Ｅｘｐｅｒｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（バージョン２．０．１３２．０）を無細胞抽出物における可溶性ＤＡＴタンパク質のパーセンテージを計算するために使用した。あるいは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を行い、目視による評価を発現のパーセンテージを評価するために使用した。

【０３３９】

Ｈｉｓタグ付き融合タンパク質はＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ樹脂またはＮｏｖａｇｅｎ Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄカラムのいずれかを使用して精製した。Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂を使用する精製は、２００ｍＭの塩化ナトリウムおよび０．０５０ｍＭのＰＬＰを含有するリン酸カリウム緩衝液（１００ｍＭ、ｐＨ７．８）を用いてあらかじめ平衡化したカラムに無細胞抽出物を充填することを伴った。次いで、３～５カラム容量の平衡化緩衝液、２５ｍＭのイミダゾールを含有する３～５カラム容量の平衡化緩衝液、および５０～１００ｍＭのイミダゾールを含有する３～５カラム容量の平衡化緩衝液を使用して続けてカラムを洗浄した。５００ｍＭのイミダゾールを含有する３～５カラム容量の平衡化緩衝液を使用してカラムからＨｉｓタグ付きタンパク質を溶離した。Ａｍｉｃｏｎ（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ） Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ－７０を使用して溶離液を濃縮した。濃縮タンパク質溶液におけるイミダゾールおよび塩化ナトリウムの塩は、５０μＭのＰＬＰを含有するリン酸カリウム緩衝液（１００ｍＭ、ｐＨ７．８）（ＤＡＴ４９７８およびＤＡＴ４９７８ Ｔ２４３Ｎについて）またはＥＰＰＳ緩衝液（１００ｍＭ、ｐＨ８．２）（配列番号８７０および配列番号８７０ Ｔ２４２Ｎについて）を使用してあらかじめ平衡化したＰＤ－１０脱塩カラムを通過させることによって除去した。Ｂｉｏ－Ｒａｄタンパク質アッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）および標準物としてのアルブミン（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用してタンパク質濃度を決定した。アリコート（０．５～１ｍＬ）の精製酵素を使用まで－８０℃で保存した。Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄカラムを使用するＨｉｓタグ付きタンパク質の精製はメーカーの指示に従った。上記に記載されるようにＰＤ１０カラムを使用してカラムからの溶離液を脱塩した。

【０３４０】

［実施例５］

実施例５－Ｄ－アミノトランスフェラーゼ活性のためのアッセイ手順＃２

モナチン生成アッセイ（標準物）

以下の成分を組み合わせた：１００ｍＭ ＥＰＰＳ、ｐＨ８．２；２００ｍＭピルビン酸ナトリウム；１００ｍＭのＤ－トリプトファン；５０μＭ ＰＬＰ；１ｍＭ $MgCl_2$；０．０１％ Ｔｗｅｅｎ－８０；実施例６に記載される５０ｇ／ｍＬのアルドラーゼ（無細胞抽出物を使用した；アルドラーゼ濃度はＥｘｐｅｒｉｏｎチップから読み取るパーセンテージに基づいて評価した）、および適切な量のＤＡＴ（典型的に０．１～１ｍｇ／ｍＬ）。

ＰＬＰストック溶液およびタンパク質溶液を除いて、他のすべての試薬は無酸素脱イオ

ン水を使用して作製し、無酸素チャンバーにおいて保存した。反応は、一定の緩やかな混合を行いつつ、室温の無酸素チャンバー中に設定した。ある時点をとるために、ギ酸を反応混合物のアリコートの中に２％（ｖ／ｖ）の最終濃度まで加えた。ベンチ－トップ微量遠心管を使用して５分間の１６，１００ＲＣＦの遠心分離の後に、上清を０．２μｍナイロン膜フィルターを通して濾過した。次いで、試料をＬＣ／ＭＳ／ＭＳによる分析に先立って水を用いて２０～１００倍に希釈した。

【０３４１】

Ｄ－トリプトファンアミノ基転移アッセイ

ある種のＤ－アミノトランスフェラーゼのＤ－トリプトファンアミノ基転移活性を比較するために、以下のアッセイを行った。アッセイミックスは、Ｄ－ＡＴを含有する、０．５ｍｇ／ｍＬの細胞抽出物タンパク質；４０ｍＭリン酸カリウム　ｐＨ８．０；２０ｍＭＤ－トリプトファン；１００ｍＭ　ピルビン酸ナトリウム；および５０μＭ　ＰＬＰを含有した。アッセイは、３０分間、３７℃でインキュベートし、次いで、氷上に配置した。

【０３４２】

以下のアッセイを使用して、形成されたインドール－３－ピルビン酸の量を測定することによって反応の進行度を追跡した：５μｌ、１０μｌ、および２０μｌの反応ミックスに、２００μｌの以下の溶液を加えた：０．５ｍＭ　ヒ酸ナトリウム；０．５　ｍＭ　ＥＤＴＡ；および５０ｍＭ四ホウ酸ナトリウム（ｐＨ８．５）。３２５ｎｍのインドール－３－ピルビン酸エノールホウ酸複合体の吸光度を、同じ溶液において調製したインドール－３－ピルビン酸の標準曲線と比較した。

Ｄ－トリプトファンアミノ基転移反応進行度を経過観察するためにアラニン形成も使用することができる。アラニン濃度は実施例３に記載されるように決定した。

【０３４３】

Ｒ，Ｒモナチンアミノ基転移アッセイ

アッセイ条件（最終容量２ｍＬ）は、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ；１００ｍＭ　ＥＰＰＳ　ｐＨ８．２；１００ｍＭ　ピルビン酸ナトリウム；約３ｍＭ　Ｒ，Ｒモナチン；０．５ｍｇ／ｍＬ　ＤＡＴ；および５０Ｍ　ＰＬＰを含んでいた。実施例３に記載されるプロトコールを使用して、形成されたアラニンまたはＲ－ＭＰの検出によって反応進行度をモニターした。

【０３４４】

［実施例６］

実施例６－ＤＡＴおよびアルドラーゼを得るための方法

本方法は、Ｄ－アミノトランスフェラーゼと共にモナチン形成反応において使用されるアルドラーゼおよび比較の目的のために使用される、あらかじめ単離したＤ－アミノトランスフェラーゼのクローニングを記載する。

【０３４５】

アルドラーゼ

Ｄ－トリプトファンからのモナチン生成アッセイにおいて使用されるアルドラーゼは、ＷＯ２００７／１０３３８９（この出願において、配列番号２７５の核酸によってコードされる配列番号２７６のアルドラーゼとして参照される）に記載されるように単離し、ｐＥＴベクター中にサブクローニングした。

【０３４６】

ＤＡＴおよびＤＡＴ４９７８　Ｔ２４３Ｎ

ＡＴＣＣ＃４９７８からのＤ－アミノトランスフェラーゼ（ＤＡＴ　４９７８）を、米国特許公開第２００６／０２５２１３５号に記載されるようにクローニングした。Ｔ２４３Ｎ変異体をｐＥＴ３０（非タグ付き）ＤＡＴ　４９７８構築物を使用して作製した。

変異導入用のプライマーは、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｍｕｌｔｉ－Ｃｈａｎｇｅキット（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）において挙げられる示唆に従って設計した。プライマーを５’リン酸化した。変異導入は、メーカーの指示に従って、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｍｕｌ

ｔｉ－Ｃｈａｎｇｅキットを使用して行った。変異導入オリゴヌクレオチド配列を表１１に示す。

表１１．変異導入オリゴヌクレオチド配列

変異体名	アミノ酸変化	プライマー	配列番号
DAT4978T243N	T243N	5'-GTGATTGTTTCATCAACGAATTCAGAAGTAACGCC-3'	1062

大腸菌ＸＬ１０－ＧＯＬＤ細胞（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を形質転換し、結果として生じた精製プラスミド調製物は、正確な変異が組み込まれたことを確認するために配列決定した。次いで、ＤＡＴ　４９７８　Ｔ２４３Ｎを含有するプラスミドを、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）発現宿主の中に形質転換した。

Ｂ．スファエリクス　ＤＡＴ

Ｂ．スファエリクスからのＤ－アミノトランスフェラーゼ（ＡＴＣＣ番号１０２０８）を、ＵＳ２００６／０２５２１３５に記載されるようにクローニングした。タンパク質を、同じ参考文献に記載されるように調製した。

【０３４７】

［実施例７］

実施例７－ＤＡＴの分析

配列番号９２８、９３０、９３２、９３４、９３６、９３８、９４０、９４２、９４４、９４６、９４８、および９５０に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドを、実施例２に記載されるベクターおよび適合性の大腸菌発現宿主における対応する核酸の発現によって生成した。当業者は、実施例４に記載されるようなアセンブリーＰＣＲ技術を使用してこれらのＤ－アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子を合成することができる。カルベニシリン（１００μｇ／ｍＬ）を含有するＬＢ培地中の一晩培養物を１００ｍＬの同じ培地において希釈して１００×にし、５００ｍＬバッフルフラスコにおいて増殖させた。培養物を、０．５～０．９のOD_{600}まで３０℃で増殖させ、タンパク質発現を、同じ温度で４時間、１ｍＭ　ＩＰＴＧを用いて誘発した。総タンパク質のための試料は、収集の直前に得た。細胞を遠心分離によって収集し、１０ｍＬのリン酸カリウム緩衝液　ｐＨ７．８を用いて１回洗浄した。細胞抽出物を調製するまで、細胞を－８０℃で直ちに凍結させておいた。

ＰＤ１０カラムを溶離し平衡化するための緩衝液として１００ｍＭリン酸カリウムを使用して、実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製して脱塩した。総タンパク質およびＤＡＴの濃度を記載されるように決定した。

【０３４８】

アミノ受容体としてピルビン酸を用いるＲ，Ｒモナチンのアミノ基転移を、１０ｍＭＲ，Ｒモナチンを利用したことを除いて実施例５に記載されるように行った。アラニン、モナチン、およびモナチン前駆体のレベルの初期の分析は互いに一致せず、結果は定性的なものと考えられた。配列番号９４８の配列を有するＤＡＴポリペプチドはモナチン前駆体形成を示すように思われた。

【０３４９】

活性のさらなる確認については、モナチン形成アッセイを、約０．２ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ濃度を用いる方法に記載されるように行った。コントロールとして、０．２ｍｇ／ｍＬ濃度の精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴを評価した。２および２１時間後に、アリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。試料は実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチンについて、ＬＣ／ＯＰＡポストカラム蛍光方法論を用いてトリプトファンおよびアラニンについて分析した。配列番号９４６および９５０の配列を有するＤＡＴポリペプチドは試験した条件下においてＲ，Ｒモナチン形成が可能であった。配列番号９４８の配列を有するＤＡＴポリペプチドは、トリプトファンの減少およびアラニン形成の増加を示し、Ｄ－ト

リプトファントランスアミナーゼとしての活性を実証した。配列番号９４６の配列を有するＤＡＴポリペプチドは、総タンパク質の量によって決定されるように十分に発現したが、あまり可溶性ではなく、これはいくつかの一致しない結果を説明する。配列番号９３０、９３２、９４０、９４２、および９４４に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析において目に見えるバンドを生成せず、したがって、異なる条件下で生成した場合に活性となる可能性がある。結果については表１２を参照されたい。

【０３５０】

表１２．ＤＡＴの活性

DATポリペプチド(配列番号)	モナチン[mM] 時間=2時間	モナチン[mM] 時間= 21時間
928	nd	nd
930	nd	nd
932	nd	nd
934	nd	nd
936	nd	nd
938	nd	nd
940	nd	nd
942	nd	nd
944	nd	nd
946	0.1	0.6
948	nd	nd
950	0.4	3.1
B.スファエリクスコントロールDAT	0.8	4.4

ｎｄ＝試験した条件下で検出されず

【０３５１】

ｐＥＴ３０ａ中のＤＡＴポリペプチドの分析

配列番号９４６、９４８、および９５０の配列を有するＤＡＴポリペプチドを、実施例４に記載されるようにｐＥＴ３０ａ中にサブクローニングした。ｐＥＴ３０ａ中にＤＡＴを含む大腸菌株ＢＬ２１　ＤＥ３の２つ組の培養物を２５および３０℃の両方でＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＩＩ（Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　１～６、Ｎｏｖａｇｅｎ）において一晩、増殖させた。コントロールとして、挿入物を有していないｐＥＴ３０ａプラスミドを含有する株も増殖させた。細胞を５～１０のOD_{600}で収集した。細胞を遠心分離によって収集し、１０ｍＬの１００ｍＭのリン酸カリウム緩衝液　ｐＨ７．８を用いて１回洗浄した。さらに処理するまで細胞を－８０℃で凍結させた。

【０３５２】

ＰＤ１０カラムを溶離し平衡化するための緩衝液として１００ｍＭリン酸カリウムを使用して、実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質およびＤＡＴタンパク質の濃度を記載されるように決定した。配列番号９４６の配列を有するＤＡＴポリペプチドは総タンパク質画分において３０℃で十分に発現したが、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって観察されるように可溶性ではなかった。配列番号９４８および９５０の配列を有するＤＡＴポリペプチドはより高い温度でも発現したが、可溶性であった。

【０３５３】

モナチン形成アッセイは、配列番号９４６のポリペプチドについて０．１ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ濃度を用いた以外は（すべての他のものについては０．５ｍｇ／ｍＬ）実施例５に記載されるように行った。ポジティブコントロールとして０．５ｍｇ／ｍＬ濃度の精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴもまたアッセイした。２および２１時間後に、アリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、さらに処理するまで試料を凍結させた。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳを用いてモナチンについて、ならびにＬＣ／ＯＰＡポストカラム蛍光検出法を用いてトリプトファンおよ

びアラニンについて試料を分析した。結果を表１３において示す。Ｄ－トリプトファン消費およびアラニン形成は、試験したすべてのＤ－アミノトランスフェラーゼについて示され、それらがすべて、Ｄ－トリプトファンに対する活性を有することを示す。これらの条件下で、配列番号９４６および９４８の配列を有するＤＡＴポリペプチドのみが、モナチン形成のための活性を有するように思われた。２つの宿主系の間の発現または安定性の差異は、活性がいくつかの場合には観察され他の場合には観察されない理由となる可能性がある。

【０３５４】

表１３

DATポリペプチド(配列番号)	モナチン[mM] 時間=2時間	モナチン[mM] 時間=21時間
pET30（ネガティブコントロール)	nd	nd
946	0.4	1.8
948	nd	0.2
950	nd	nd
B.スファエリクスポジティブコントロール	1.8	8.6

ｎｄ、試験した条件下で検出されず

【０３５５】

［実施例８］

実施例８－ｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓにおけるＤＡＴの分析

配列番号８８６、８８８、８９０、８９２、および８９４　ＤＡＴに示される配列を有するＤＡＴポリペプチドを大腸菌ＨＭＳ１７４におけるｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓベクターから生成した。当業者は、実施例４に記載されるものなどのアセンブリーＰＣＲ技術を使用してこれらのＤ－アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子を合成することができる。様々なＤＡＴ構築物の一晩培養物を、３０℃で、アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含有するＬＢ培地において増殖させた。５０ｍＬの同じ培地に、翌日、１ｍＬの一晩培養物を接種した。培養物をOD_{600nm}が約０．５に達するまで３０℃で増殖させ、次いで、１ｍＭ　ＩＰＴＧを用いて誘導した。培養物を３０℃で４時間さらにインキュベートし、次いで、１５分間、３８００ｒｃｆでの遠心分離によって収集した。細胞を１．５ｍＬの５０ｍＭリン酸カリウム　ｐＨ７．０を用いて洗浄し、再度遠心分離した。上清をデカントし細胞ペレットを秤量した。

カラムを溶離し平衡化するための緩衝液として１００ｍＭリン酸カリウムを使用して、方法に記載したように細胞抽出物を調製した。総濃度およびＤＡＴ濃度はＢＣＡ（Ｐｉｅｒｃｅ）をＢｒａｄｆｏｒｄの代わりに総タンパク質決定のために使用した以外、記載したように決定した。２つの異なるベクターのみの培養物をクローニングＤＡＴと同じ大腸菌宿主において増殖させた。タンパク質はすべてＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で目に見えるバンドを生じたが、可溶性の程度が異なった。配列番号８９２の配列を有するポリペプチドはあまり可溶性ではなかった。

【０３５６】

酵素のそれぞれのＤ－トリプトファンアミノ基転移活性を比較するために、実施例５に記載されるＤ－トリプトファンアミノ基転移アッセイおよびＲ，Ｒモナチンアミノ基転移アッセイを行った。Ｄ－トリプトファンアミノトランスフェラーゼは、Ｄ－アミノトランスフェラーゼを含有する細胞抽出物の０．５ｍｇ／ｍＬおよびコントロールとしての精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴの０．１ｍｇ／ｍＬの最終濃度を使用して標的とした。細胞抽出物におけるＤＡＴの定量化は、可溶性ポリペプチドのレベルが低いために困難であった。配列番号８８８、８９２、および８９４に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドは、３０分間の反応において基質としてのＤ－トリプトファンに対して好適な活性を示した。配列番号８８６および８９０に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドは、無酵素コ

ントロールを超える測定可能な活性を有したが、試験した条件下では活性をほとんど示さなかった。

【０３５７】

モナチンアミノ基転移実験は、０．５、１、および２時間後に試料を得て、室温で行い、Ｂ．スファエリクスからの精製ポジティブコントロールを含む０．５ｍｇ／ｍＬの各ＤＡＴを標的とした。次いで、Ｒ，Ｒモナチンアミノ基転移試料をモナチンおよびアラニンについて分析した。残りのモナチンの量をＬＣ／ＭＳ／ＭＳによって定量し、アラニン形成は実施例３におけるポストカラム誘導体化法を使用して測定した。試験した条件下で、配列番号８９２および８９４に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドは、活性であった。配列番号８９４の配列を有するＤＡＴポリペプチドはＲ－ＭＰへのＲ，Ｒモナチンの変換について最も高い活性を有するように思われた。アラニン形成をアッセイしたところ、傾向は一致していた。様々な時点についてのアラニン生成数（ｍＭ）を表１４に示す。

【０３５８】

表１４．Ｒ，Ｒモナチンアミノ基転移反応からのアラニン形成（ｍＭ）

DATポリペプチド(配列番号)	0.5時間	1時間	2時間
ベクターコントロール1	0.139	0.185	0.215
ベクターコントロール2	0.179	0.242	0.301
886	0.128	0.203	0.242
888	0.13	0.203	0.275
890	0.112	0.153	0.176
892	1.034	1.587	2.167
894	2.2	2.52	2.663
BsphDAT(精製)	0.287	0.519	0.894
酵素なし	0.043	0.035	0.037

【０３５９】

配列番号８９１および８９３に示される配列を有するＤＡＴ核酸を実施例４に記載されるようにｐＥＴ３０中にサブクローニングした。これらの構築物をＴ７プロモーターからの発現のために溶原化ＤＥ３を保持する様々な大腸菌宿主（大腸菌のＫ－１２およびＢ株の両方を含む）およびｐＬｙｓＳプラスミドを保持する一つの株に形質転換した。クローンは、０．５ｍＭピリドキシンを加えた状態および加えない状態で、実施例４に記載されるようなＯｖｅｒｎｉｇｈｔＥｘｐｒｅｓｓ　Ｓｙｓｔｅｍ　ＩＩにおいて発現させ、発現についてＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはＥｘｐｅｒｉｏｎによって分析した。これらの実験から、タンパク質が不溶性画分においてほとんど発現していたことが明らかになった。誘導のために３７から３０℃まで温度を低下させたので、ピリドキシンはわずかな程度可溶性を改善するのを助けた。可溶性発現を最大限にするように設計したクローニングシステムにおいてさらなる作業を行った（実施例１６～２２を参照されたい）。

【０３６０】

［実施例９］

実施例９－ｐＥＴ３０ａにおける、ＣａＤＡＴ、ＣｂＤＡＴ、およびＬｓＤＡＴの分析

配列番号８９４において示されるアミノ酸配列は、公的データベースにおいて入手可能な類似のタンパク質を検索するために使用した。配列番号８９４に対して類似性を有する３つのＤＡＴが見つかった。それらは、ラクトバチルス　サリバリウス（タンパク質レベルで４７％同一）、クロストリジウム　ベイジェリンキ（タンパク質レベルで５７％同一）、およびクロストリジウム　アセトブチリカム（タンパク質レベルで６０％同一）からのものであった。遺伝子配列およびタンパク質配列ならびにそれらの受入番号をこの例の終わりに示す。図５は、本発明のこれらの配列番号８９４様タンパク質のコンセンサス領域を示すアライメント（配列比較）である。図において強調されるように、構造的類似性を示す高程度のコンセンサス領域を観察することができる。

これらの核酸をｐＥＴ３０ａ中にクローニングし、対応するポリペプチドを本明細書に

記載されるように発現させ、活性について試験した。

【０３６１】

ＣｂＤＡＴ

クロストリジウム　ベイジェリンキからのＤ－アミノトランスフェラーゼ（ＣｂＤＡＴ）を、ｐＥＴ３０ａ（非タグ付き）ＢＬ２１（ＤＥ３）中にクローニングし、ＯＶＥＲＮＩＧＨＴ　ＥＸＰＲＥＳＳ　ＩＩ（商標）（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用して発現させた。細胞を約９の６００ｎｍでの光学濃度で収集し、１５分間、４０００ｒｃｆで遠心分離した。細胞を１００ｍＭリン酸カリウム　ｐＨ７．８（冷）を用いて１回洗浄し、再度遠心した。

カラムを溶離し平衡化するための緩衝液として１００ｍＭ　ＥＰＰＳ　ｐＨ８．２を使用して、本明細書に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質濃度およびＤＡＴタンパク質濃度はＢＣＡ法（Ｐｉｅｒｃｅ）をＢｒａｄｆｏｒｄ（Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ）アッセイの代わりに使用した以外、記載されるように決定した。ＣｂＤＡＴは十分に発現したが、わずかに部分的に可溶性であった。

【０３６２】

モナチン形成アッセイを実施例５に記載されるように行ったが、ＣｂＤＡＴ（０．５ｍｇ／ｍＬ）の活性もｐＨ７．４で調べた（緩衝液としてリン酸カリウムを用いる）。コントロールとして、精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴ（１ｍｇ／ｍＬ）をｐＨ８．２でアッセイした。１、２、４、８、および２３時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加えた。試料は分析するまで－８０℃で凍結させた。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。試料を実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチンについて分析した。結果を表１５に示す。生成されたモナチンの量は、ｐＨ８．２で実行したアッセイについてわずかに多かった。同様の実験をＮ末端Ｈｉｓタグを有するｐＥＴ２８から発現されるポリペプチドを用いて行った。タグ付きバージョンの活性は非タグ付きの活性よりもわずかに少ないように思われたが、なお容易に検出可能であった。

【０３６３】

表１５．時間経過に伴う活性

DAT酵素	モナチン (ppm) 1時間	モナチン (ppm) 2時間	モナチン (ppm) 4時間	モナチン (ppm) 8時間	モナチン (ppm) 23時間
CbDAT pET30 (7.4 mg/mL)	45	126	280	428	502
CbDAT pET30 (8.2 mg/mL)	67	189	344	436	568
B.スファエリクスDAT (1 mg/mL)	531	968	1742	2310	3706

【０３６４】

ＣａＤＡＴおよびＬｓＤＡＴ

ラクトバチルス　サリバリウス（ＬｓＤＡＴ）およびクロストリジウム　アセトブチリカム（ＣａＤＡＴ）からのＤ－アミノトランスフェラーゼを、ｐＥＴ３０ａ（非タグ付き）ＢＬ２１（ＤＥ３）中にクローニングし、Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＩＩ（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用して発現させた。培養物が約９の６００ｎｍでの光学濃度に達したとき、細胞を１５分間、４０００ｒｃｆでの遠心分離によって収集した。

カラムを溶離し平衡化するための緩衝液として１００ｍＭ　ＥＰＰＳ　ｐＨ８．２を使用して、本明細書に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質濃度およびＤＡＴタンパク質濃度はＢＣＡ（Ｐｉｅｒｃｅ）プロトコールを使用して決定した。両酵素は十分に発現し、可溶性であった。

アッセイは無酸素条件下で室温にて行った。コントロールとして、精製Ｂ．スファエリクスＤ－アミノトランスフェラーゼをアッセイした。約０．５ｍｇ／ｍＬの各ＤＡＴを使用した。０．５、１、２、４、６、８、および２２時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。試料実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチンについて分析した。

結果を表１６に示す。

【０３６５】

表１６．

DATポリペプチド	モナチン(ppm) 0.5時間	モナチン(ppm) 1時間	モナチン(ppm) 2時間	モナチン(ppm) 4時間	モナチン(ppm) 6時間	モナチン(ppm) 8時間	モナチン(ppm) 22時間
B.スファエリクス	76.6	194.4	457.6	860.8	1186	1770	2546
LsDAT	2.8	6.4	14.6	33	52	69.8	173
CaDAT	50.2	141.2	318.6	543.4	612	1144	668

【０３６６】

配列番号８９４に示される配列を有するＤＡＴの相同体は活性であった。上記の保存配列を示す相同体がすべてモナチン形成アッセイにおいて活性であったので、本明細書に記載されるコンセンサス配列を含有するあらゆるＤ－アミノトランスフェラーゼも、それらの一次配列同一性が４７％ほどの低いものであっても、やはり活性であることが予想される。より特徴づけられたバチルスＤ－アミノトランスフェラーゼに対して低い相同性を有するこれらの特有のＤ－アミノトランスフェラーゼが、モナチンに対する活性を有する、または広い特異性酵素となるという証拠はこの作業の前になかった。

【０３６７】

ＤＮＡ配列ＣａＤＡＴ（アクセッションＡＥ００１４３７　ＡＥ００７５１３～ＡＥ００７８６８；バージョンＡＥ００１４３７．１　ＧＩ：２５１６８２５６；ヌクレオチド９１４０４９．．９１４８９１）

```
   1  atgaaagatt taggatatta caatggagaa tacgacttaa ttgaaaatat gaaaatacca
  61  atgaatgatc gtgtatgcta ttttggtgat ggtgtttatg atgctactta tagtagaaac
 121  cataatatat ttgcactaga tgagcatatt gaccgatttt ataatagtgc cgagctttta
 181  agaattaaaa ttccatatac aaagaaggaa atgaaagagc ttttaaagga tatggttaaa
 241  aaggttgata gcggagaaca atttgtatat tggcaggtta ctagaggtac tggcatgcgt
 301  aatcatgctt ttttgagtga ggatgttaag gctaatattt ggattgtttt aaagccacta
 361  aaggtaaaag atatgtcaaa aaaattaaaa ctaataacat tagaggatac tagattttta
 421  cattgtaaca taaaaacctt aaatttgctt cctagtgtaa ttgcagcaca aaaaactgaa
 481  gaagcaggct gccaggaagc agtatttcat agaggagata gagttactga atgtgctcat
 541  agtaatgttt caattataaa ggatgagatt ttaaaaactg cgccaacaga taatcttatt
 601  ttgccgggaa tagcaagggc gcatcttata aaaatgtgca aaaaatttga gatacctgta
 661  gatgaaactc catttacatt aaaggagtta attaatgcgg atgaagttat agttacaagt
 721  tcagggcaat tttgtatgac tgcttgtgag atagatggaa gacctgtagg cggaaaagcg
 781  ccagatatta ttaaaaagct tcagactgcc ttacttaatg aatttttgga agaaacaaat
 841  taa  (SEQ ID NO:1063)
```

【０３６８】

タンパク質配列ＣａＤＡＴ（アクセッションＮＰ＿３４７４２８；バージョンＮＰ＿３４７４２８．１　ＧＩ：１５８９４０７９）

```
   1  MKDLGYYNGE YDLIENMKIP MNDRVCYFGD GVYDATYSRN HNIFALDEHI DRFYNSAELL
  61  RIKIPYTKKE MKELLKDMVK KVDSGEQFVY WQVTRGTGMR NHAFLSEDVK ANIWIVLKPL
 121  KVKDMSKKLK LITLEDTRFL HCNIKTLNLL PSVIAAQKTE EAGCQEAVFH RGDRVTECAH
 181  SNVSIIKDEI LKTAPTDNLI LPGIARAHLI KMCKKFEIPV DETPFTLKEL INADEVIVTS
 241  SGQFCMTACE IDGRPVGGKA PDIIKKLQTA LLNEFLEETN  (SEQ ID NO:1064)
```

【０３６９】

ＤＮＡ配列ＣｂＤＡＴ（アクセッションＣＰ０００７２１　ＡＡＬＯ０１０００００００１～ＡＡＬＯ０１０００００８９　バージョンＣＰ０００７２１．１　ＧＩ：１４９９０１３５７；ヌクレオチド３２１３４８４．．３２１２６３６）

```
  1  atggagaatt taggttatta taatggaaag tttggattat tagaggaaat gacagtacca
 61  atgcttgatc gtgtttgcta ttttggagat ggagtttatg atgctactta tagcagaaat
121  cacaagattt ttgcattgga ggagcatatt gaaagatttt acaacagcgc tggtttatta
181  ggaattaaaa ttccttattc aaaggagcaa gtaaaagaaa tccttaagga gatggtatta
241  aaggttgatt caggagaaca atttgtatat tggcaaatta ctagaggaac tggaatgaga
301  aatcatgctt ttcctggaga tgaggtccct gcaaatctat ggattatgtt aaagccttta
361  aatattaagg atatgtcaca aaaattaaag ttaatcactt tagaagacac tagattttta
421  cactgtaata tcaaaacctt aaatttatta ccaagtgtaa ttgcatctca aaaaactgaa
481  gaggcaggat gtcaggaagc tgtatttcat agaggggata gagtaactga atgtgcacat
541  agcaatgtat caattattaa ggatggtata ttaaaaactg ctccaacaga caatttaatt
601  ttaccaggta tagcaagagc tcaccttatt aaaatgtgta aatcctttaa tattcctgta
661  gatgaaacag catttacctt gaaggaatta atggaggcag atgaagttat agttactagt
721  tcaggtcaat tttgtatggc aaccagtgaa atagatggaa tacctgtagg gggaaaagca
781  ccagagcttg taaagaaatt acaagatgca ttgttaaatg agttcttaga agaaacaaaa
841  acagaatag  (SEQ ID NO:1065)
```

【０３７０】

タンパク質配列ＣｂＤＡＴ（アクセッションＹＰ＿００１３０９８６９　バージョンＹＰ＿００１３０９８６９．１　ＧＩ：１５００１７６１５）

```
  1  MENLGYYNGK FGLLEEMTVP MLDRVCYFGD GVYDATYSRN HKIFALEEHI ERFYNSAGLL
 61  GIKIPYSKEQ VKEILKEMVL KVDSGEQFVY WQITRGTGMR NHAFPGDEVP ANLWIMLKPL
121  NIKDMSQKLK LITLEDTRFL HCNIKTLNLL PSVIASQKTE EAGCQEAVFH RGDRVTECAH
181  SNVSIIKDGI LKTAPTDNLI LPGIARAHLI KMCKSFNIPV DETAFTLKEL MEADEVIVTS
241  SGQFCMATSE IDGIPVGGKA PELVKKLQDA LLNEFLEETK TE (SEQ ID NO:1066)
```

【０３７１】

ＤＮＡ配列ＬｓＤＡＴ（アクセッションＣＰ０００２３３　バージョンＣＰ０００２３３．１　ＧＩ：９０８２０１８４；ヌクレオチド１７５００８２．．１７５０９２７）

```
  1  atgaagcaag ttggatacta caatggtact atcgctgatt taaatgaact taaggtgcct
 61  gctactgatc gtgcacttta ttttggtgat ggttgctacg atgcaactac atttaagaac
121  aatgttgcat ttgccttaga agatcatctt gatcgttttt ataatagttg tcgcctacta
181  gagatcgatt tccctttaaa tcgcgatgaa cttaaagaaa agctttacgc tgttattgat
241  gctaacgaag ttgatactgg tatcctttat tggcaaactt cacgtggttc tggtttacgt
301  aaccatattt tcccagaaga tagccaacct aatttattaa tttttactgc tccttatggt
361  ttagttccat ttgatactga atataaactt atatctcgcg aagacactcg cttcttacat
421  tgcaatatta aaactttgaa tttacttcca aacgttattg caagtcaaaa ggctaatgaa
481  agtcattgcc aagaagtggt cttccatcgc ggtgacagag ttacagaatg tgcacactct
541  aacatcttaa ttctaaaaga tggcgttctt tgctccccac ctagagataa tttaatcttg
601  ccaggaatta ctttgaaaca tctcttgcaa ttagcaaaag aaaataatat tcctacttcc
661  gaagcaccat tcactatgga tgatcttaga aatgctgatg aagttattgt tagttcttca
721  gcttgtctag gtattcgcgc agtcgagctt gatggtcagc ctgttggtgg aaaagatgga
781  aagactttaa agatcttgca agatgcttat gctaagaaat ataatgctga aactgtaagt
841  cgttaa (SEQ ID NO:1067)
```

【０３７２】

タンパク質配列ＬｓＤＡＴ（アクセッションＹＰ＿５３６５５５　バージョンＹＰ＿５３６５５５．１　ＧＩ：９０９６２６３９）

```
  1  MKQVGYYNGT IADLNELKVP ATDRALYFGD GCYDATTFKN NVAFALEDHL DRFYNSCRLL
 61  EIDFPLNRDE LKEKLYAVID ANEVDTGILY WQTSRGSGLR NHIFPEDSQP NLLIFTAPYG
121  LVPFDTEYKL ISREDTRFLH CNIKTLNLLP NVIASQKANE SHCQEVVFHR GDRVTECAHS
181  NILILKDGVL CSPPRDNLIL PGITLKHLLQ LAKENNIPTS EAPFTMDDLR NADEVIVSSS
241  ACLGIRAVEL DGQPVGGKDG KTLKILQDAY AKKYNAETVS R (SEQ ID NO:1068)
```

【０３７３】

［実施例１０］
実施例１０－ＤＡＴの分析
ベクターｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓにおいて配列番号８６５、８６７、８６９、８７１、８７３、８７５、および８７７の配列を有するＤＡＴ核酸を含有するＨＭＳ１７４大腸菌を得て、アンピシリンを有するＬＢ培地を含有する寒天プレート上に画線した。当業者は実施例４に記載したようなアセンブリーＰＣＲ技術を使用してこれらのＤ－アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子を合成することができる。アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含有する３ｍＬのＬＢ培地に接種するために単一コロニーを使用した。５００μｌの一晩培養物を使用して２５０ｍＬバッフルフラスコ中の５０ｍＬの同じ培地に接種した。細胞を約０．５のOD_{600nm}まで３０℃で増殖させた。ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで加えた。細胞を４時間３０℃で誘発し、遠心分離によって収集した。
【０３７４】
実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質濃度およびＤＡＴ濃度を実施例４に記載されるように決定した。ＤＡＴはすべて十分に発現するように思われ、そのほとんどは高度の可溶性を示した。
【０３７５】
モナチン形成アッセイは、０．１ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ濃度および１０μｇ／ｍｌの濃度のアルドラーゼを用いた以外は実施例５に記載されるように行った。コントロールとして、０．１ｍｇ／ｍＬの精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴをアッセイした。６および２２時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、モナチン濃度について試料を分析した。試験した条件下で、配列番号８７０、８７４、および８７８はすべて３ステップのモナチン形成アッセイにおいて高い活性を有するように思われた。配列番号８６６、８７２、および８７６に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドもモナチン形成経路において活性を有したが、試験した条件下で配列番号８７０、８７４、および８７８に示される配列を有するポリペプチドが有したのと同じ程度ではなかった。表１７はモナチン形成（ｐｐｍ）についての結果を示す。
【０３７６】
表１７．モナチン形成アッセイ

DATポリペプチド(配列番号)	6時間	22時間
866	17.4	76
868	nd	nd
870	132	836
872	13.8	50
874	281.6	798
876	2.4	12
878	223.4	576
B.スファエリクスDAT	175.6	616

ｎｄ、試験した条件下で検出されず
【０３７７】
ｐＥＴ３０ａにおいて配列番号８７０、８７４、および８７８の配列を有するポリペプチドのさらなる分析
上記に示すＤＡＴをコードする核酸を含有するｐＥＴ３０ａプラスミドを用いて形質転換した大腸菌ＢＬ２１　ＤＥ３の培養物を、３０℃で、５０ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＩＩ（Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　１～６、Ｎｏｖａｇｅｎ）において一晩、増殖させた。ポジティブコントロールとして、ｐＥＴ３０ａにおいてＡＴＣＣ＃４９７８からのＤＡＴを含有する株もまた増殖させ、誘発した（例６に記載される）。細胞を５～１０のOD_{600nm}で収集し、遠心分離によって集め、さらに処理するまで８０℃で凍結した。

実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質濃度およびＤＡＴ濃度を実施例４に記載されるように決定した。

モナチン形成アッセイを、配列番号８７０について０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴポリペプチド濃度および配列番号８７４および８７８のそれぞれのについて０．２７５ｍｇ／ｍＬの濃度を用いた以外は、実施例５に記載されるように行った。コントロールとして、ＤＡＴ４９７８および精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴを０．５ｍｇ／ｍＬ濃度でアッセイした。０．５、１、２、４、６．５、９、２４、および２２時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、モナチンについて試料を分析した。結果を表１８に示す（形成されたモナチンのｐｐｍ）。

【０３７８】

表１８

DATポリペプチド（配列番号）	0.5時間	1時間	2時間	4時間	6.5時間	9時間	24時間
4978 DAT	18	85.6	283.4	673.2	890	1226	2020
870	14.4	71	279.4	736	1340	1680	3362
874	63.8	182.6	415.6	674	888	938	1154
878	97.8	244.4	607	912.2	1068	1174	1356
B.スファエリクス	44.6	142.8	375.2	813	1294	1382	2746

３つすべてのサブクローニングＤＡＴ（配列番号８７０、８７４、および８７８の配列を有するポリペプチドをコードする）は、ｐＥＴ系において十分に発現し、可溶性タンパク質を産出した。配列番号８７０に示される配列を有するポリペプチドは可溶性画分において最も高い量の発現をもたらし、配列番号８７４および８７８の配列を有するＤＡＴポリペプチドと比較して、時間とともに減少するようには思われなかった、高い活性を示した。

【０３７９】

野生型および変異体ＤＡＴポリペプチドの間の比較

配列番号８７０の残基がＴからＮに変化した変異体ポリペプチド（配列番号８７０　Ｔ２４２Ｎ）を実施例４に記載されるように構築して発現させ、ＤＡＴ４９７８、ＤＡＴ４９７８　Ｔ２４３Ｎ（例６に記載される）、Ｂ．スファエリクス、および野生型配列番号８７０と比較した。

配列番号８７０、８７０　Ｔ２４２Ｎ、ＤＡＴ４９７８、およびＤＡＴ４９７８　Ｔ２４３Ｎの配列を有する野生型および変異体ポリペプチドをｐＥＴ３０ａベクターから発現させたＢＬ２１　ＤＥ３の培養物を３０℃および２５０ｒｐｍで一晩、２５０ｍＬバッフルフラスコ中５０ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｎｏｖａｇｅｎ）において増殖させた。６００ｎｍでの光学濃度が１０を超えるまでに達したとき、細胞を遠心分離によって収集した。実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製し、総タンパク質濃度およびＤＡＴ濃度を、実施例４に記載されるように決定した。試験したＤＡＴはすべて高度に発現し、可溶性であり、Ｅｘｐｅｒｉｏｎソフトウェアを使用して決定したところすべて約３０％であった。配列番号８７０　Ｔ２４２Ｎの配列を有するポリペプチドが最も高い発現を有し、これは総可溶性タンパク質の３６．３％であることが予測された。

【０３８０】

モナチン形成アッセイは、０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴポリペプチド濃度で実施例５に記載されるように行った。コントロールとして、０．５ｍｇ／ｍＬの精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴをアッセイした。０．５、１、２、４、６．５、９、および２３．２５時間後に、アリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度までそのアリコートに加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。実施例３に記載されるように、モナチン、トリプトファン、アラニン、および４－ヒドロキシ－４－メチルグルタミン酸（ＨＭＧ

）について試料を分析した。
最後の時点で、さらなるアリコートを、例３に記載されるＦＤＡＡ誘導体化法によってＲ，Ｒモナチン％を決定するために採取した。
モナチン形成数（ｐｐｍ）を表１９において下記に示す。Ｒ，Ｒパーセントを２３．２５時間の時点について右の欄に示す。
【０３８１】
表１９

DATポリペプチド(配列番号)	0.5時間	1時間	2時間	4時間	6.5時間	9時間	23.25時間	R，R%
野生型DAT 4978	11	57	216	472	694	942	1616	95.0
4978 T243N	74	237	542.6	1106	1396	1784	2202	99.0
870	15.6	74.4	269.6	702	1250	1522	2788	97.8
870 T242N	49.4	194	655.2	1496	2212	2666	3670	99.5
B.スファエリクス	40.6	144	372	800	1090	1458	2434	97.2

配列番号８７０ポリペプチドのＴ２４２Ｎ変異体の活性は非常に高く、ポジティブコントロールよりも良好であり、ＤＡＴポリペプチドの野生型形態よりも高かった。この変異体によって形成されたＲ，Ｒモナチンのパーセンテージは、他のベンチマーク酵素のいずれよりも高かった。形成されたＨＭＧ（副産物）の量の分析は定性的であるが、９時間および２３．２５時間の時点で、同様の量のＨＭＧがＤＡＴ　４９７８　Ｔ２４３Ｎポリペプチドおよび配列番号８７０　Ｔ２４２Ｎポリペプチドによって形成されたように思われる。
【０３８２】
配列番号８７０に示される配列を有する本発明の例示的なＤＡＴポリペプチドは新規なタンパク質であり、最も近い既知のＤ－アミノトランスフェラーゼ（バチルスＹＭ－１Ｄ－アミノトランスフェラーゼ）に対して７６％配列同一性および実施例６に記載したＢ．スファエリクスＤＡＴに対して６９％アミノ酸配列同一性を示す。図６は他の公開されたＤＡＴとの本発明のこの新規な酵素のアライメントを示し、残基はこの酵素を特有なものにする１つの特性であり、その優れた活性を説明する可能性があることが分かる。
【０３８３】
配列番号９１０に示される配列を有する高度に活性なＤＡＴポリペプチド（Ｂ．スファエリクス型ＤＡＴに対してより類似している；実施例１２を参照されたい）もアライメントに示した。配列番号８７０ポリペプチドの特有性の例として、図６のアライメントにおいてアミノ酸残基５４～５５（Ｂ．スファエリクス型ナンバリング）を囲む領域において、バチルス様ＤＡＴは高度の保存性を有するのに対して、配列番号８７０はＡＳではなく残基ＥＣを有することが明らかである。他の例として、図６において示されるアライメントの残基１３５を囲む高度に保存された領域において、配列番号８７０ポリペプチドは主にバリン残基に対してより親水性の残基（Ｔ）を有する。配列番号８７０酵素を表すが、以前より知られている広い特異性Ｄ－アミノトランスフェラーゼおよび高度に関連した相同体を排除するコア配列はコンセンサス配列ＡおよびＢとして示される。これらのコンセンサス配列の１つを含有するいずれのポリペプチドもＤＡＴ活性を示し、モナチン形成経路ステップにおいて活性であることが予想される。
【０３８４】
コンセンサス配列Ａ
Y.*LWND.*IV.*EDRGYQFGDG.*YEV.*KVY.*G.*FT.*EH.*DR.*YECAEKI.*PYTK.*H.*LLH.*L.*E.*N.*TG.*YFQ.*TRGVA.*RVHNFPAGN.*Q.*V.*SGT.*K.*F.*R.*N.*KGVKAT.*TED.*RWLRCDIKSLNLLGAVLAKQEAIEKGCYEA.*LHR.*G.*TE.*SS.*N.*GIK.*GTLYTHPA.*N.*ILRGITR.*V.*TCAKEIE.*PV.*Q.*T.*K.*LEMDE.*V.*S.*SE.*TP.*I.*DG.*KI.*NG.*G.*WTR.*LQ.*F.*K.*P (SEQ ID NO:1069).

【０３８５】
コンセンサス配列Ｂ
Y[ST]LWND[QK]IV.[DE].{2}[VI].[IV].{2}EDRGYQFGDG[IV]YEV[IV]KVY[ND]G.[ML]FT.{2}EH[IV]DR.YECAEKI[RK][LIV].[IV]PYTK.{3}H[QK]LLH.L[VI]E.N.[LV].TG[HN][IVL]YFQ[IV]TRGVA.RVHNFPAGN[VI]Q.V[LI]SGT.K.F.R.{3}N.[EQ]KGVKAT.TED[IV]RWLRCDIKSLNLLGAVLAKQEAIEKGCYEA[IV]LHR.G.[VI]TE.SS.N[VI][FY]GIK[DN]GTLYTHPA[ND]N.ILRGITR.V[IV][LI]TCAKEIE[LMI]PV.[EQ]Q.{2}T.K.{2}LEMDE[LIVM].V[ST]S.[TS]SE[IV]TP[VI]I[DE][IVL]DG.KI.NG.{2}G[ED]WTR[KQ]LQ.{2}F.{2}K[IL]P.（SEQ ID NO:1070).
【０３８６】
ＰＥＲＬ正規表現慣用表記と同様に、「.*」は、２０のタンパク質構成アミノ酸のいずれかから任意の数のアミノ酸残基が存在してもよいことを示し、［］は、括弧内のアミノ酸のいずれか１つが存在し得るを示し、「.｛＃｝」は、残基の数が括弧内に示される数｛＃｝と一致する限り、２０のタンパク質構成アミノ酸のいずれかが存在できることを示す。
【０３８７】
コンセンサス配列Ａにおける「.*」の使用に関して、「.*」位置のいずれかでのアミノ酸の数は、たとえば、０から約２０残基まで（たとえば、コンセンサス配列Ｂ（配列番号１０７０）を参照されたい）もしくは約２０残基から約１００残基まで変動することができ、またはアミノ酸の数ははるかに大きく、たとえば１０００残基までもしくはそれ以上の残基とすることができる。たとえば、限定を伴うことなく、１つまたは複数の「.*」位置での挿入は、たとえば（これに限定されないが）キチナーゼ結合ドメインなどのドメイン（たとえばパイロコッカス　フリオサス（受入番号２ＣＺＮ＿Ａ）もしくはＰ．バークホルデリア（受入番号ＹＰ＿３３１５３１）に由来）またはセルロース結合ドメイン（たとえばセルロモナス　フィミ（受入番号１ＥＸＨ＿Ａ）もしくはクロストリジウム　ステルコラリウム（受入番号１ＵＹ１＿Ａ）に由来）に対応し得る。いくつかの実施形態において（限定を伴うことなく）、「.*」と指定される５つ以下の位置は、それぞれ、たとえば約２０残基よりも多くの（たとえば約１００残基よりも多くの）挿入を含有する。他の実施形態において（限定を伴うことなく）、「.*」と指定される５つ以上の位置は、それぞれ、約１００残基未満（たとえば約２０残基未満、たとえば３、５、１０、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、７５、８０、９０、または９５残基）の挿入を含有する。本明細書において開示される１つまたは複数のコンセンサス配列に対応する配列を有し、１つまたは複数の「.*」位置に挿入された任意の数の残基を含有するポリペプチドの活性は、本明細書に記載される方法を使用して評価することができる。
配列番号１０６９において示されるコンセンサス配列を含有する非限定的な代表的なポリペプチドは、配列番号８７０およびコンセンサス配列Ｂ（配列番号１０７０）に示される配列を有するポリペプチドを含む。
【０３８８】
タグ付きおよび非タグ付きの配列番号８７０、８７０　Ｔ２４２Ｎ、ＤＡＴ　４９７８、およびＤＡＴ　４９７８　Ｔ２４３Ｎの間の比較
配列番号８７０、８７０　Ｔ２４２Ｎ、ＤＡＴ　４９７８、およびＤＡＴ　４９７８　Ｔ２４３Ｎの配列を有するポリペプチドを発現する大腸菌ＢＬ２１　ＤＥ３細胞を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩、２５０ｍＬバッフルフラスコ中５０ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｎｏｖａｇｅｎ）において増殖させた。６００ｎｍでの光学濃度が１０を超えたときに、遠心分離によって細胞を収集した。実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質濃度およびＤＡＴ濃度を実施例４に記載されるように決定した。
【０３８９】
Ｃ末端タグ付き配列番号８７０、８７０　Ｔ２４２Ｎ、ＤＡＴ　４９７８、およびＤＡＴ　４９７８　Ｔ２４３Ｎポリペプチドを発現する大腸菌ＢＬ２１　ＤＥ３培養物を３０℃および２５０ｒｐｍで一晩、１０００ｍＬバッフルフラスコ中２００ｍＬのＯｖｅｒｎ

ｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｎｏｖａｇｅｎ）において増殖させた。各クローンの２つの培養物を増殖させた。６００ｎｍでの１０を超えるで光学濃度となったときに、プールし、遠心分離によって細胞を収集した。５０μｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ Ｎｕｃｌｅａｓｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ）、０．７５μｌのｒＬｙｓｏｚｙｍｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ）、および２５０μｌのＰｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ ＩＩ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）と共に５０ｍＬのＢｕｇ Ｂｕｓｔｅｒ Ｐｒｉｍａｒｙ Ａｍｉｎｅ Ｆｒｅｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ）の添加によって細胞抽出物を作製した。細胞を緩やかに振動させながら、室温で１５分間、インキュベートした。抽出物を１０分間、４５，０００×ｇで遠心分離した。

【０３９０】

Ｈｉｓタグ付きタンパク質は、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ） Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（商標） Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ樹脂を使用して、方法の部に記載されるように精製した。精製タンパク質は、ＰＤ１０カラムを使用して１００ｍＭリン酸カリウム、ｐＨ７．８（ＤＡＴ ４９７８およびＤＡＴ ４９７８ Ｔ２４３Ｎのポリペプチドについて）または１００ｍＭ ＥＰＰＳ ｐＨ８．２（配列番号８７０および８７０ Ｔ２４２Ｎのポリペプチドについて）へ脱塩した。両方の緩衝液は５０μＭのＰＬＰを含有した。

【０３９１】

Ｒ，Ｒモナチン形成アッセイは、０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ濃度を用いる実施例５に記載されるように行った。アリコートを、２．２５、４．５、９、および２４時間に得て、ギ酸を用いてｐＨ調節し、凍結した。実施例３に記載されるＦＤＡＡ誘導体化法を使用する立体異性体分布の決定のために最終時点で剰余のアリコートを採取し、ギ酸の添加は行わなかった。試料を融解し、５分間遠心分離し、上清を０．２μｍナイロン膜フィルターを用いて濾過した。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法を使用して、試料をモナチン分析にかけた。形成されたモナチンｐｐｍとして結果を表２０に示す。最も右の欄は実験の終わりに形成されたＲ，Ｒモナチン％である。

【０３９２】

表２０．

DATポリペプチド(配列番号)	2.25時間	4.5時間	9時間	24時間	R, R%
DAT 4978	330	676	1470	2384	92.3
DAT 4978 T243N	1392	2856	4068	3688	98.2
870	395	952	1896	2998	97.8
870 T242N	1416	2936	3868	3976	99.3
DAT 4978 6×Hisタグ付き	362	887	1664	2818	96.5
DAT 4978 T243N 6×Hisタグ付き	1364	2298	3464	4440	98.9
870 6×Hisタグ付き	228	688	1508	3138	98.1
870 T242N 6×Hisタグ付き	746	2020	3962	4552	99.5

Ｃ末端タグ付きおよび非タグ付き酵素の全体的な活性および立体特異性は非常に類似している。さらに、サブクローニング核酸からコードされるポリペプチドにおける活性の存在が、完全長または野生型核酸からコードされる、対応するポリペプチドにおける活性の存在を予測するものであることが予想される。

【０３９３】

［実施例１１］

実施例１１－ＤＡＴの分析

ｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓベクター中に配列番号８８０、８８２、および８８４の配列を有するポリペプチドをコードするＤＡＴ核酸を含有する大腸菌ＨＭＳ１７４を、アンピシリンを有するＬＢ培地を含有する寒天プレート上に画線した。当業者は、実施例４に記載

したようなアセンブリーＰＣＲ技術を使用してこれらのＤ－アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子を合成することができる。単一コロニーを、アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含有する３ｍＬのＬＢ培地に接種した。５００μｌを使用して２５０ｍＬバッフルフラスコ中の５０ｍＬの同じ培地に接種した。細胞を約０．４のOD_{600nm}まで３０℃で増殖させ、ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで加えた。細胞を４時間３０℃で増殖させ、遠心分離によって収集した。

実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質濃度およびＤＡＴポリペプチド濃度を実施例４に記載したように決定した。配列番号８８２および８８４は十分に発現し、可溶性画分において高レベルで存在した。

【０３９４】

Ｒ，Ｒモナチン形成アッセイは、約０．５ｍｇ／ｍＬの各ＤＡＴポリペプチドを使用して、実施例５に記載したように（０．３５ｍｇ／ｍＬの配列番号８８０ポリペプチドを利用した以外）行った。２、８、および２３時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、モナチンについて試料を分析した。結果を表２１に示す。

最後の時点で、実施例３に記載されるＦＤＡＡ誘導体化方法論を用いて、生成されたモナチンの立体異性体分布を決定するために剰余のアリコートを採取した（ｐＨ調節を行わない）。生成されたＲ，Ｒのパーセンテージを下記の表１８の右手の欄に示す。残りは主にＳ，Ｒモナチンである。

【０３９５】

表２１

ポリペプチド (配列番号)	モナチンppm (2時間)	モナチンppm (8時間)	モナチンppm (23時間)	R, R% (23時間)
880	31.6	140	176	97.5
882	31.6	872	2790	99.3
884	79.4	644	1610	100
B.スファエリクス	337	1518	2538	96.7

配列番号８８２および８８４に示される配列を有するポリペプチドは、Ｄ－トリプトファンからのモナチン形成反応において良好な活性を示した。

生成されたモナチンの立体純度（ｓｔｅｒｅｏｐｕｒｉｔｙ）は、これらのＤＡＴを使用する場合、Ｂ．スファエリクスコントロール酵素の場合より高かった。配列番号８８２および８８４の配列を有するＤＡＴポリペプチドをコードするＤＡＴ核酸を実施例４に記載したｐＥＴ３０ａベクター中にサブクローニングした。

【０３９６】

ｐＥＴ３０ａベクターから発現された配列番号８８２および８８４の配列を有するＤＡＴポリペプチドの分析

ｐＥＴ３０ａベクター中に配列番号８８２および８８４の配列を有するＤＡＴポリペプチドをコードする核酸を含有する大腸菌ＢＬ２１　ＤＥ３の培養物を３０℃および２５０ｒｐｍで一晩、２５０ｍＬバッフルフラスコ中５０ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｎｏｖａｇｅｎ）中で増殖させた。６００ｎｍでの光学濃度が１０を超えたときに、遠心分離によって細胞を収集した。

実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質およびＤＡＴポリペプチドの濃度を記載されるように決定した。４～１５％勾配アクリルアミドゲルを使用しておよびＥｘｐｅｒｉｏｎシステムによって総可溶性タンパク質試料を分析した。発現は、Ｅｘｐｅｒｉｏｎソフトウェアによって約３０％であると予測された。総タンパク質および可溶性タンパク質（無細胞抽出物）画分の両方について目に見えるバンドが観察された。

【０３９７】

モナチン形成アッセイは、０．５および２ｍｇ／ｍＬ　ＤＡＴポリペプチド濃度を用いて、実施例５に記載されるように行った。精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴをコントロールとして使用した。２、４．５、９、２４、３６、および４８時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、モナチンについて試料を分析した。試料をＨＭＧレベルで定性的に分析した。さらなるアリコートを実施例３に記載されるＦＤＡＡ誘導体化方法論を用いる立体異性体分析のために得た（ｐＨ調節を行わない）。結果を表２２および２３に示す。

【０３９８】

表２２

DATポリペプチド (配列番号)	モナチン (ppm) 2時間	モナチン (ppm) 4.5時間	モナチン (ppm) 9時間	モナチン (ppm) 24時間	モナチン (ppm) 36時間	モナチン (ppm) 48時間
882 (0.5 mg/mL)	61	274	780	1802	2172	2170
882 (2 mg/mL)	985	2452	3232	3128	3082	3158
884 (0.5 mg/mL)	149	362	656	1394	1756	2158
884 (2 mg/mL)	811	1628	2466	2988	3178	2864
B.スファエリクス (0.5 mg/mL)	362	860	1268	2362	2532	2804
B.スファエリクス (2 mg/mL)	1335	2344	3154	3866	3842	4008

【０３９９】

表２３．選択した時点で産生されたモナチンの立体純度

DATポリペプチド (配列番号)	24時間 (R, R%)	48時間 (R, R%)
882 (2mg/mL)	95.4	94.1
884 (2mg/mL)	99.6	99.4
Bs DAT (2mg/mL)	95.8	93.3

配列番号８８２および８８４に示される配列を有するポリペプチドは良好なモナチン形成活性および立体特異性を示し、開始時点の間はＢ．スファエリクスコントロールよりも少ないＨＭＧを生成するように思われた。配列番号８８２の配列を有するポリペプチドは同様の開始モナチン形成率を示したが、より低いモナチンタイターの本実験において横ばい状態になったように思われた。

【０４００】

［実施例１２］

実施例１２－ｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓにおけるＤＡＴおよびｐＥＴ３０ａにおけるＤＡＴの分析

配列番号８９８、９００、９０２、９０４、９０６、９１０、および８９６の配列を有するＤＡＴポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを評価した。当業者は、実施例４に記載されるものなどのアセンブリーＰＣＲ技術を使用してこれらのＤ－アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子を合成することができる。

【０４０１】

ｐＥＴ３０ａベクター（例４に記載されるようにサブクローニング）中に配列番号８９６に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドをコードする核酸を含有する大腸菌ＢＬ２１　ＤＥ３の培養物を３０℃および２５０ｒｐｍで一晩、２５０ｍＬバッフルフラスコ中

５０ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｎｏｖａｇｅｎ）において増殖させた。６００ｎｍでの光学濃度が１０を超えたときに、遠心分離によって細胞を収集した。

【０４０２】

Ｔｏｐ１０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）大腸菌細胞を、配列番号８９７、８９９、９０１、９０３、９０５、および９０９に示される配列を有するＤＡＴ核酸を含有するｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓプラスミドを用いて形質転換し、アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含有するＬＢ培地に播いた。５００μｌの一晩培養物を使用して２５０バッフルフラスコ中の５０ｍＬの同じ培地に接種した。細胞を約０．４のOD_{600nm}まで３０℃で増殖させ、ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで加えた。細胞を４時間３０℃で増殖させ、遠心分離によって収集した。

実施例４に記載したように細胞抽出物を調製した。可溶性タンパク質濃度および推定ＤＡＴ濃度を実施例４に記載したように決定した。

【０４０３】

Ｒ，Ｒモナチン形成アッセイは、配列番号８９６の配列を有する０．３ｍｇ／ｍＬのポリペプチドを使用したことを除いて、０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴポリペプチド濃度を用いて、実施例５に記載されるように行った。配列番号８９８の配列を有する０．０６ｍｇ／ｍＬのポリペプチドを使用し、配列番号９００に示される配列を有する０．４ｍｇ／ｍＬのポリペプチドを使用し、配列番号９０２の配列を有する０．１ｍｇ／ｍＬのポリペプチドを使用し、配列番号９０４の配列を有する０．１２ｍｇ／ｍＬのポリペプチドを使用した。ポジティブコントロールとして、配列番号８７０、８７０　Ｔ２４２Ｎ、および精製Ｂ．スファエリクスは、０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴポリペプチド濃度で試験した。２、６、および２４時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過した。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、モナチンについて試料を分析した。立体異性体分布分析のためにさらなるアリコートを得たが、ギ酸を用いて処理しなかった。２４時間の時点についての結果を表２４に示す。配列番号９０８に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドをコードするＤＡＴ核酸はサブクローニングしなかったのでアッセイすることができなかった。

【０４０４】

表２４

ポリペプチド(配列番号)	モナチン 2時間(ppm)	モナチン 6時間(ppm)	モナチン 24時間(ppm)	24時間 R, R%
B.スファエリクス	261	1203	2604	95.6
870	193	1067	2490	96.8
870 T242N	813	2230	3380	98.8
896	30	127	286	99.8
898	nd	3	15	95.7
900	4	16	56	92.9
902	144	411	1209	96.7
904	nd	1	4	92.3
906	14	18	25	98
910	487	1154	2770	94.5

ｎｄ＝試験した条件下で検出不能

配列番号９１０および９０２に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドはモナチン形成反応について高レベルの活性があり、かなり高レベルのＲ，Ｒモナチンを生成した。配列番号８７０に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドは試験した条件下で配列番号９１０に示される配列を有する野生型ポリペプチドの活性に匹敵する活性を示すが、配列番号８７０ポリペプチドにおけるＴ２４２Ｎ変異は酵素の活性および立体特異性を大きく改善したことをこの結果は示している。

【０４０５】

［実施例１３］
実施例１３－ＤＡＴの分析
配列番号９１２、９１４、９１６、９１８、９２０、９２２、９２４、および９２６のＤＡＴをコードする核酸配列を含有するプラスミド（ｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓ）を得た。当業者は、実施例４に記載されるものなどの任意の数の遺伝子アセンブリープロトコールを使用して遺伝子をクローニングすることができる。
大腸菌Ｔｏｐ１０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）細胞を、配列番号９１２、９１４、９１６、９１８、９２０、９２２、９２４、および９２６の配列を有するＤＡＴポリペプチドを含有するｐＳＥ４２０－ｃＨｉｓプラスミドを用いて形質転換し、アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含有するＬＢ培地に播いた。５００μｌの一晩培養物を使用して、２５０ｍＬバッフルフラスコ中の５０ｍＬの同じ培地に接種した。約０．４のOD_{600nm}まで３０℃で培養物を増殖させた。ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで加えた。細胞を４時間３０℃で増殖させ、遠心分離によって収集した。
【０４０６】
実施例４に記載したように細胞抽出物を調製した。総可溶性タンパク質およびＤＡＴタンパク質の濃度を実施例４に記載したように決定した。発現されたほとんどのＤＡＴポリペプチドは配列番号９１６ポリペプチド（わずかに可溶性）を除いて可溶性であった。
【０４０７】
Ｒ，Ｒモナチン形成アッセイは、０．１ｍｇ／ｍＬの配列番号９２２ポリペプチドを使用し、０．２ｍｇ／ｍＬの配列番号９２６ポリペプチドを使用したことを除いて、ＤＡＴポリペプチド濃度の目標を約０．２５ｍｇ／ｍＬとして、実施例５に記載したように行った。ポジティブコントロールとして、精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴを０．２５ｍｇ／ｍＬ濃度で試験した。２、８、および２４時間後にアリコートを採取し、ギ酸を、２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠視意志、濾過した。実施例３に記載したＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、モナチンについて試料を分析した。結果を表２５に示す。
【０４０８】
表２５

ポリペプチド (配列番号)	モナチン(ppm) 2時間	モナチン(ppm) 8時間	モナチン(ppm) 24時間
B.スファエリクス	179	774	1482
912	0.2	2	2
914	4	22	62
916	0.6	2	6
918	158.8	402	496
920	5	40	96
922	0.2	2	2
924	nd	nd	nd
926	1.2	12	30

ｎｄ＝アッセイした条件下で検出されず
【０４０９】
配列番号１６９、１７１、１６７、１７３、および１７５に示される配列を有するＤＡＴ核酸（配列番号１７０、１７２、１６８、１７４、および１７６に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドをコードする）をＰＣＲ産物として得て、実施例４に記載したｐＥＴ３０ａにおいてサブクローニングした。当業者は、実施例４に記載されたような任意の数の遺伝子アセンブリー法を使用して遺伝子を再構築することができる。
ｐＥＴ３０ａベクター中に配列番号１６９、１７１、１６７、１７３、および１７５の配列を有するＤＡＴ核酸を含有する大腸菌ＢＬ２１　ＤＥ３細胞を３０℃および２５０ｒ

ｐｍで一晩、２５０ｍＬバッフルフラスコ中５０ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｎｏｖａｇｅｎ）において増殖させた。６００ｎｍでの光学濃度が１０を超えたときに、遠心分離によって細胞を収集した。

【０４１０】

細胞抽出物を、実施例４に記載されるように調製した。総可溶性タンパク質およびＤＡＴタンパク質の濃度を、実施例４に記載されるように決定した。配列番号１７０の配列を有するポリペプチド（配列番号１６９の配列を有するＤＡＴ核酸によってコードされる）は可溶性であるように思われず、これは、活性アッセイを妨害したかもしれない。

Ｒ，Ｒモナチン形成アッセイは、０．２５ｍｇ／ｍＬの配列番号１７０ポリペプチドを使用した以外は、０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴポリペプチド濃度を使用して、実施例５に記載されるように行った。ポジティブコントロールとして、精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴを０．５ｍｇ／ｍＬ濃度で試験した。２、８、および２４時間後にアリコートを採取し、ギ酸を、２％の最終濃度まで加え、試料を凍結した。次いで、試料を融解し、遠心し、濾過し、実施例３に記載したＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチンについて分析した。結果を表２６に示す。

【０４１１】

表２６

ポリペプチド(配列番号)	モナチン(ppm) 2時間	モナチン(ppm) 8時間	モナチン(ppm) 24時間
B.スファエリクス	456	1502	2970
170	2	8	14
172	5	20	60
168	15	68	186
174	1	4	8
176	451	1508	2744

【０４１２】

実施例３に記載されるＦＤＡＡ誘導体化プロトコールを使用してＲ，Ｒ％を決定するために試料（ｐＨ調節を伴わない）を分析した。配列番号１７６に示される配列を有するＤＡＴポリペプチドによって生成されたモナチンは、２４時間後に９５．２％のＲ，ＲとなったＢ．スファエリクスによって生成されたことと比較して、同じ時点（24時間後）９９．６％Ｒ，Ｒとなった。配列番号１７６の配列を有するＤＡＴポリペプチドから生じる活性および立体純度は共にかなり高く、対応する核酸をより定量的な研究のために、実施例４に記載されるようなＣ末端タグ付きタンパク質としてサブクローニングした。

【０４１３】

配列番号１７６　Ｃ－Ｈｉｓタグ付きタンパク質の特徴づけ

配列番号１７６の配列を有するポリペプチドをコードする配列番号１７５を有する核酸を、Ｃ末端に６×Ｈｉｓタグを有する融合タンパク質として発現することができるように、終止コドンを有していないｐＥＴ３０ａ中にクローニングした。実施例４に記載したＨｉｓ結合樹脂を使用してタンパク質を精製した。融合タンパク質がＰＤ－１０脱塩カラムから溶離すると、黄色の沈殿物が溶液中に形成された。黄色の残留物はカラム上にも観察された。通常、黄色はＰＬＰ結合タンパク質の存在を示す。脱塩ステップにおけるＰＬＰ結合タンパク質の沈殿を予防するために、ｐＨ値（７．８および８．２）の異なる２種の緩衝液（１０％グリセロールを有するまたは有していない１００ｍＭリン酸および１００ｍＭ　ＥＰＰＳ）を利用した。試した緩衝液のどちらも沈殿を完全に予防しないようであった。

モナチンアッセイは、十分に混合した不均質タンパク質溶液および０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴポリペプチド濃度を使用して行った。結果を表２７に示す。精製配列番号１７６ＤＡＴポリペプチド（Ｃタグ付き）は、Ｂ．スファエリクスからのポジティブコントロールＤＡＴポリペプチドに匹敵する活性を示したが、その活性は配列番号８７０　Ｔ２４２

Ｎまたは配列番号８７０　Ｔ２４２Ｎの配列を有する変異体ポリペプチドによって示される活性よりも低いように思われた。

【０４１４】

表２７．モナチン産生（ｐｐｍ）

ポリペプチド(配列番号)	2時間	4時間	8時間	24時間
B.スファエリクス	262	676	1044	2150
870	332	678	1346	2826
870 T242N	942	1938	2834	4004
176	208	392	732	1806

【０４１５】

［実施例１４］

実施例１４－ＤＡＴの評価

２９のＤＡＴをコードするオープンリーディングフレームをＰＣＲ産物として得た。当業者は、実施例４に記載したようなアセンブリー技術を使用してＤＡＴをコードする遺伝子を合成することができることに注目されたい。ＤＡＴ核酸をｐＥＴ３０ａベクター中にサブクローニングし、実施例４に記載されるような非タグ付きタンパク質として発現させた。脱塩無細胞抽出物（実施例４に記載されるように調製）をモナチン形成アッセイにおいて使用した。以下のポリペプチド（括弧内に使用する量）を除いて、０．５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴポリペプチド濃度をモナチンアッセイのために使用した：配列番号１５６ポリペプチド（０．４ｍｇ／ｍＬ）、配列番号１８２ポリペプチド（０．４５ｍｇ／ｍＬ）、配列番号２４０ポリペプチド（０．４７ｍｇ／ｍＬ）、および配列番号２０４ポリペプチド（０．４２ｍｇ／ｍＬ）。

【０４１６】

ほとんどのＤＡＴポリペプチドはアッセイした条件下で検出不可能であり、ポジティブコントロール酵素と比較してモナチン生成は低かった。ほとんどの発現されたＤＡＴポリペプチドはＥｘｐｅｒｉｏｎによって決定したところ可溶性であったが、配列番号２０４および２４０を有するポリペプチドは非常に低いレベルで発現され、あまり可溶性ではないかもしれない。他方では、配列番号２２０を有するポリペプチドはＥｘｐｅｒｉｏｎソフトウェアで判断すると、総可溶性タンパク質の６８％であると予測された。

【０４１７】

モナチン生成結果を表２８および２９に示す。２４時間において、配列番号１５６および２１４を有するＤＡＴポリペプチドは、ポジティブコントロール酵素であるＢ．スファエリクスからのＤＡＴと比較して、４０～５０％のモナチンを生成した。最も活性なＤＡＴポリペプチドは配列番号２２０ポリペプチドであった。反応を開始して約４時間後にモナチン濃度は最大に達した。配列番号１５６の成熟タンパク質（予測されるリーダー配列を有していない）はＤＡＴポリペプチドの活性成分であると予想され、そのため、このタンパク質はリーダー配列なしで組換え的に生成することができることが予想される。

【０４１８】

表２８．形成されたモナチン（ｐｐｍ）

ポリペプチド(配列番号)	2時間	4時間	8時間	24時間
178	11	24	62	194
180	nd	nd	nd	nd
154	52	103	166	178
182	nd	nd	nd	nd
218	1.6	2.8	274	12
188	2.4	5.2	10	22
190	3.8	9.4	22	42
208	1	1.2	nd	nd
220	2418	3563	3812	3882
196	1	1.8	nd	8
156	64.8	156	296	796
B.スファエリクス	422	791	1302	2124

ｎｄ＝アッセイした条件下で検出不能

【０４１９】

表２９．形成されたモナチン（ｐｐｍ）

ポリペプチド(配列番号)	2	4	8	24
166	nd	nd	1	nd
216	69	91	109	134
200	nd	nd	1	1
198	nd	nd	nd	nd
210	1.6	3.8	6.2	15.2
202	3.4	6.2	12.2	29.8
222	3.6	7	12.8	25.8
236	nd	nd	nd	nd
204	nd	nd	nd	3.6
238	10.4	21.8	46.4	115.6
240	3	6	12.4	32.2
224	39.8	85	171.8	268.8
226	2.6	5.8	12.4	30.6
228	4.2	9.8	21.4	66.8
230	9.2	21.8	42.2	94.4
232	3.6	9.4	21.6	57
246	nd	nd	nd	nd
214	160	327	694	1346
B.スファエリクス	393	986	1624	2597

ｎｄ＝アッセイした条件下で検出不能

【０４２０】

配列番号２２０ポリペプチドの高活性は、配列番号２２０ポリペプチドを配列番号８７０、８７０　Ｔ２４２Ｎ、およびＢ．スファエリクスＤＡＴポリペプチドと比較した他のモナチン形成アッセイにおいて確認された。０．１ｍｇ／ｍＬおよび０．５ｍｇＤＡＴポリペプチド濃度をアッセイしたＤＡＴポリペプチドのそれぞれについて使用した。結果を表３０に示す。アッセイするＤＡＴポリペプチドが高度の活性を有するので、使用した機器の定量範囲内となるようにモナチン試料を（典型的な１０または２０倍希釈とは対照的に）１００倍に希釈しなければならなかった。

【０４２１】

表３０．形成されたモナチン（ｐｐｍ）

DATポリペプチド(配列番号)	2時間	4時間	8時間	24時間
B.スファエリクス(0.1 mg/mL)	74	170	309	728
B.スファエリクス(0.5 mg/mL)	510	921	1068	2704
870 (0.1 mg/mL)	28	81	179	706
870 (0.5 mg/mL)	399	847	1466	2916
870 T242N (0.1 mg/mL)	93.2	245.8	582.4	1270
870 T242N (0.5 mg/mL)	1158.8	2026	3202	4126
220 (0.1 mg/mL)	965.8	1512	2330	3788
220 (0.5 mg/mL)	2950	4302	4618	4488

上記の実験において、配列番号２２０を有するＤＡＴポリペプチドによって形成されたＲ，Ｒのパーセンテージは、実施例３に記載したＦＤＡＡ誘導体化方法論を用いて決定した。配列番号２２０の配列を有するＤＡＴポリペプチドは高度に立体特異性であり、Ｂ．スファエリクスについての９２．９％　Ｒ，Ｒと比較して、２４時間で９９．３％　Ｒ，Ｒモナチンを生成した。他のアッセイにおいて、配列番号２２０ポリペプチドは９９．８％　Ｒ，Ｒ－モナチンを生成した。

配列番号２２０の配列を有する本発明の例示的なＤＡＴポリペプチドは、実施例９に示されるＣ．ベイジェリンキＤＡＴポリペプチドに対してタンパク質レベルで６２％同一な、新規なタンパク質である。配列番号２２０ポリペプチドは、他の高度に活性なＤＡＴポリペプチドに対して（たとえば配列番号８９２および８９４（実施例８）、９４６（実施例７）、ならびに１７６（実施例１３）に示される配列を有するもの）、８６％～９０％一次配列相同性（配列同一性）を有する。これらの高度に活性で新規なＤＡＴポリペプチドはこの研究以前には特徴づけられておらず、これらの酵素は公開されているどのバチルス様Ｄ－アミノトランスフェラーゼよりもＲ，Ｒモナチン生成反応に対してより高い活性および立体特異性を示した。図７はこれらの関連するＤ－アミノトランスフェラーゼのアライメントを示し、それらが共通して有するコンセンサス配列モチーフを下記に記載する。

【０４２２】

コンセンサス配列Ｃ

M.*GYYNG.*P.*DR.*FGDG.*YDAT.*N.*FAL.*H.*RF.*NS.*LL.*I.*K.*YWQ.*RG.*G.*R.*H.*F.*N.*I.*P.*KLI.*DTRF.*HCNIKTLNL.*P.*VIA.*Q.*E.*C.*E.*VFHRG.*VTECAHSN.*I.*NLIL.*G.*HL.*P.*E.*F.*L.*ADE.*V.*SS.*DG.*GGK.*K.*Q.*T (SEQ ID NO:1071)

【０４２３】

コンセンサス配列Ｄ

M.{3}GYYNG.{10}P.{2}DR.{3}FGDG.YDAT.{3}N.{3}FAL.{2}H.{2}RF.NS.{2}LL.I.{9}K.{17}YWQ.{2}RG.G.R.H.F.{5,7}N.{2}I.{3}P.{10}KLI.{3}DTRF.HCNIKTLNL.P.VIA.Q.{3}E.{2}C.E.VFHRG.{2}VTECAHSN.{2}I.{11}DNLIL.G.{4}HL.{9}P.{2}E.{2}F.{4}L.{2}ADE.{2}V.SS.{10}DG.{3}GGK.{5}K.{2}Q.{10}T (SEQ ID NO:1072)

【０４２４】

コンセンサス配列Ｅ

M.*[LV]GYYNG.*[LI].*[ML].*[VI]P.*DR.*[YF]FGDG.*YDAT.*N.*FAL[DE][ED]H[IL][DE]RF.*NS.*LL.*I.*[KR].*[EQ][LMV]K[KE].*[MV].*[DE].*[VL]YWQ.*[TS]RG[TS]G.*R[NS]H.*F.*N[LI].*I.*P.*[IVL].*[KE].*KLI[TS].*[ED]DTRF.*HCNIKTLNL[IL]P[NS]VIA[SA]Q[RK].*E.*C.*E.*VFHRG[ED].*VTECAHSN[VI].*I[IL][KR][ND].*[TS].*DNLIL.*G.*HL[LI][QK].*[IV]P.*E.*F[TS][LM].*[ED]L.*ADE[VI][LI]V[ST]SS.*[LMI].*[IL]DG.*GGK.*[LVI]K.*[IL]Q.*[EK][FY].*T (SEQ ID NO:1073)

ＰＥＲＬ正規表現慣用表記と同様に（ｐｅｒｌｄｏｃ．ｐｅｒｌ．ｏｒｇ）、「．*」は、２０のタンパク質構成アミノ酸のいずれかから任意の数のアミノ酸残基が存在してもよいことを示し、［］は、括弧内のアミノ酸のうちの任意の１つが存在できることを示し

、「．｛＃｝」は、残基の数が、括弧内に示される数（＃）と一致する限り、２０のタンパク質構成アミノ酸のいずれかが存在できることを示す。

【０４２５】

コンセンサス配列Ｃにおける「．*」の使用に関して、「．*」位置のいずれかでのアミノ酸の数は、たとえば、約０から約２０残基まで（たとえばコンセンサス配列Ｄ（配列番号１０７２）およびＥ（配列番号１０７３）を参照されたい）もしくは約２０残基から約１００残基まで変動することができ、またはアミノ酸の数ははるかに大きく、たとえば１０００残基までもしくはそれ以上の残基とすることができる。たとえば、限定を伴うことなく、１つまたは複数の「．*」位置での挿入は、たとえば（これに限定されないが）キチナーゼ結合ドメインなどのドメイン（たとえばパイロコッカス　フリオサス（アクセッション番号２ＣＺＮ＿Ａ）もしくはＰ．バークホルデリア（アクセッション番号ＹＰ＿３３１５３１）に由来）またはセルロース結合ドメイン（たとえばセルロモナス　フィミ（アクセッション番号１ＥＸＨ＿Ａ）もしくはクロストリジウム　ステルコラリウム（アクセッション番号１ＵＹ１＿Ａ）に由来）に対応し得る。いくつかの実施形態において（限定を伴うことなく）、「．*」と指定される５つ以下の位置は、それぞれ、たとえば約２０残基よりも多くの（たとえば約１００残基よりも多くの）挿入を含有する。他の実施形態において（限定を伴うことなく）、「．*」と指定される５つ以上の位置は、それぞれ、約１００残基未満（たとえば約２０残基未満、たとえば３、５、１０、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、７５、８０、９０、または９５残基）の挿入を含有する。本明細書において開示される１つまたは複数のコンセンサス配列に対応する配列を有し、１つまたは複数の「．*」位置に挿入された任意の数の残基を含有するポリペプチドの活性は、本明細書に記載される方法を使用して評価することができる。

【０４２６】

配列番号１０７１において示されるコンセンサス配列を含有する非限定的な、代表的なポリペプチドは、配列番号２２０、８９２、８９４、１７６、および９４６ならびにコンセンサス配列Ｄ（配列番号１０７２）およびＥ（配列番号１０７３）を含む。コンセンサス配列Ｃ、Ｄ、またはＥのいずれかを示す任意のＤ－アミノトランスフェラーゼはモナチン形成経路ステップにおいて活性であることが予想される。

【０４２７】

配列番号２２０の配列を有するｃ－Ｈｉｓタグ付きポリペプチドの特徴づけ

配列番号２１９の配列を有するＤＡＴ核酸（配列番号２２０のポリペプチドをコードする）を、Ｃ末端上に６×Ｈｉｓタグを有する融合タンパク質として発現されるように、終止コドンを有していないｐＥＴ３０ａ中にクローニングした（実施例４に記載）。融合タンパク質は、実施例４に記載したＨｉｓ－Ｂｉｎｄカラム（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用して精製した。ＰＤ－１０脱塩カラムからの溶離液は黄色の沈殿物を形成した。黄色の残留物はカラム上にも観察された。モナチンアッセイは、十分に混合した不均一なタンパク質溶液を使用して行った。使用したＤＡＴポリペプチドの量を最も左の欄の括弧内に示す。表記ｗ／Ｔｒｐは、酵素を氷上で一晩、１０ｍＭ　Ｄ－トリプトファンと共にインキュベートしたことを示す。結果を表３１に示す。

【０４２８】

表３１．形成されたモナチン（ｐｐｍ）

ポリペプチド(配列番号)	2時間	4時間	8時間	24時間
B.スファエリクス(0.5 mg/mL)	382	660	1021	1986
870 T242N (0.1 mg/mL)	69	205	412	1074
870 T242N w/Trp (0.1 mg/mL)	63	163	383	978
870 T242N (0.5 mg/mL)	919	1698	2356	3130
870 T242N w/ Trp (0.5 mg/mL)	772	1519	2294	3023
220 (0.1 mg/mL)	847	1462	2202	3004
220 (0.1 mg/mL)	811	1522	2202	2887
220 w/ Trp (0.1 mg/mL)	537	1080	1590	2401
220 (0.5 mg/mL)	2885	3446	3813	4066
220 w/ Trp (0.5 mg/mL)	1933	3223	3939	3911

【０４２９】

０．１ｍｇ／ｍＬの配列番号２２０ポリペプチドを含有する反応は、０．５ｍｇ／ｍＬの配列番号８７０　Ｔ２４２Ｎポリペプチドを含有する反応と類似するモナチン形成時間的経過を示した。精製タンパク質を含有する溶液へのＤ－トリプトファン（１０ｍＭ）の添加により沈殿はなくなった。配列番号２２０を氷上で、一晩、Ｄ－トリプトファン（１０ｍＭ）と共にインキュベートした試料について活性の損失が観察されたが、配列番号８７０　Ｔ２４２ＮポリペプチドをＤ－トリプトファン（１０ｍＭ）と共に処理した場合は負の影響は観察されなかった。ピーク面積を比較することによって、配列番号２２０ポリペプチドによって触媒される反応についてＨＭＧの存在も定性的に分析した。両ＤＡＴポリペプチドを０．５ｍｇ／ｍＬの濃度で利用した場合、配列番号２２０ポリペプチドによって触媒された反応は、配列番号８７０　Ｔ２４２Ｎポリペプチドを含有する反応と比較して約４０％のＨＭＧを形成した。初期の時点では、２つの酵素の間のさらに明らかな差異が示される。

配列番号２２０ポリペプチドの精製の間のタンパク質沈殿を予防するために、Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄカラムのための緩衝液およびＰＤ－１０カラムのための緩衝液であるＢｕｇｂｕｓｔｅｒ試薬を含むすべての緩衝液中にＤＴＴ（５ｍＭ）を含ませた。脱塩カラム後に沈殿は観察されず、ＤＴＴを精製の間に含ませたまたは２ｍＭの濃度で精製タンパク質溶液の中に加えた場合、配列番号２２０ポリペプチドの活性に対してＤＴＴの負の影響は観察されなかった。モナチン形成アッセイについてのデータを表３２に示す。使用したＤＡＴポリペプチドの量を左の欄において括弧内に示す。「ＤＴＴ添加」は、２ｍＭ　ＤＴＴを精製の後にタンパク質を再度可溶性にするために加えたことを示し、「精製ｗ／ＤＴＴ」は、５ｍＭ　ＤＴＴが精製の全体にわたって存在したことを示す。

【０４３０】

表３２．形成されたモナチン（ｐｐｍ）

ポリペプチド(配列番号)	2時間	4時間	24時間
B.スファエリクス(0.5 mg/mL)	426	965	2638
870 T242N (0.5 mg/mL)	977	1916	4227
220 (0.1 mg/mL)	1214	2163	3964
220 (0.5 mg/mL)	3534	4246	4415
220 DTT添加(0.1 mg/mL)	1287	2202	3566
220 DTT添加(0.4 mg/mL)	3495	4833	5082
220 精製w/ DTT (0.1 mg/mL)	1204	2169	3997
220 精製w/ DTT (0.5 mg/mL)	3562	4110	4353

配列番号２２０ポリペプチドの非常に望ましい特性のため、このポリペプチドはさらなる変異導入または定向進化実験のための優れた候補となった。

【０４３１】
配列番号２２０ポリペプチドの部位特異的変異導入
バチルスＤＡＴポリペプチドと関連するＤＡＴポリペプチドのループ領域は酵素の基質特異性および立体特異性にとって重要であるとして同定された（Ｒｏら、１９９６、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ、３９８：１４１～１４５ページ；Ｓｕｇｉｏら、１９９５、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３４：９６６１～９６６９；およびＥＰ１５８０２６８）。この領域における１つの重要な残基は残基２４２のＴである（ＡＴＣＣ＃４９７８からのＤＡＴポリペプチド中、この位置は残基２４３のＴに対応する）。配列番号８７０ポリペプチドのＴ２４２Ｎ変異体は、ＤＡＴ　４９７８のＴ２４３Ｎ変異体のように、活性および立体特異性の両方における改善を示した（実施例１０を参照されたい）。配列番号８７０ポリペプチドを有する配列番号２２０ポリペプチドの一次配列アライメントは、わずか３５％のアミノ酸配列同一性および６５％相同性を示した。配列番号８７０におけるＴ２４２残基を配列番号２２０におけるＧ２４０残基（Ｔ２４１残基が続く）とアライメントした。両タンパク質についてＡｃｃｅｌｒｙｓ　ＤＳ　Ｍｏｄｅｌｅｒソフトウェアを使用する（鋳型としてバチルスＹＭ－１構造を用いる）と、配列番号２２０ポリペプチドと配列番号８７０ポリペプチドのループ領域をオーバーラップさせるのが困難であった。そのため、両アミノ酸を部位特異的変異導入のための標的として選んだ。

【０４３２】
配列番号２２０　Ｇ２４０Ｎおよび配列番号２２０　Ｔ２４１Ｎと指定される変異体ポリペプチドを、実施例４に記載したように、対応する核酸（配列番号２１９）の部位特異的変異導入によって生成した。２つの変異体ポリペプチドを、モナチン形成アッセイにおいて使用した６×Ｈｉｓタグ付き融合タンパク質として発現させて精製した。黄色の沈殿が変異体配列番号２２０ポリペプチド両方について脱塩ステップで観察された。結果をモナチン形成アッセイについて表３３および３４に示す。使用したＤ－アミノトランスフェラーゼの量を左欄に括弧内に示す。配列番号２２０ポリペプチドの異なる調製物をアッセイにおいて利用した。「ｆｅｒｍ」は、使用した配列番号２２０ポリペプチドを実施例１５に記載したように発酵槽において生成させたことを示す。

【０４３３】
表３３．産生されたモナチン（ｐｐｍ）

ポリペプチド(配列番号)	2時間	4時間	8時間	24時間
B.スファエリクス(0.5 mg/mL)	440	777	1510	2621
870 T242N (0.5 mg/mL)	961	1913	2793	3904
ferm 220 (0.1 mg/mL)	1396	2379	3217	3770
ferm 220 (0.2 mg/mL)	2301	3277	3789	4328
ferm 220 w/ DTT (0.1 mg/mL)	1434	2384	3109	3730
ferm 220 w/ DTT (0.2 mg/mL)	2423	3568	3859	4755
220 (0.1 mg/mL)	1109	1912	2809	3713
220 T241N (0.1 mg/mL)	554	856	1084	1986

【０４３４】
表３４．形成されたモナチン（ｐｐｍ）

ポリペプチド(配列番号)	2時間	4時間	8時間	24時間
B.スファエリクス(0.5 mg/mL)	634	938	1651	2754
870 T242N (0.5 mg/mL)	1422	1922	3211	3793
ferm 220 (0.1 mg/mL)	1976	2505	3442	4211
ferm 220 (0.2 mg/mL)	3198	3430	4452	4639
220 G240N (0.1 mg/mL)	3	5	14	42
220 G240N (0.2 mg/mL)	9	17	46	94

【０４３５】

変異体配列番号２２０　Ｇ２４０Ｎポリペプチドによって触媒された反応において非常に少量のモナチン（９５．７％　Ｒ，Ｒモナチン）が形成された。変異体配列番号２２０　Ｔ２４１Ｎポリペプチドは約５０％の活性を失ったが、立体特異性はなお維持した（９９．７％Ｒ，Ｒモナチンが生成された）。これらの結果と相同性（配列同一性）モデリングおよびアライメントと併せると、残基２４２～２４３を囲む（および可能性としてそれを超える）領域において、配列番号２２０ポリペプチドの構造が配列番号８７０ポリペプチドの構造または文献におけるバチルス様ＤＡＴポリペプチドの構造に類似していないことを示唆する。Ｘ線結晶構造がないので、配列番号２２０ポリペプチドおよび関連するＤＡＴポリペプチドのランダム変異導入、コンビナトリアルアプローチ、および他の定向進化アプローチは、酵素の活性をさらに改善する際に非常に有益であることが予想される。

【０４３６】

［実施例１５］

実施例１５－発酵槽におけるＤＡＴの生成

細菌増殖培地成分は、Ｄｉｆｃｏ、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、またはＶＷＲからのものとし、他の試薬は市販で入手可能な分析グレードまたは最も高いグレードのものとした。発酵は、Ｎｅｗ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｅｄｉｓｏｎ、ＮＪ）　ＢｉｏＦｌｏ　３０００（登録商標）発酵槽において実行した。遠心分離は、ＪＬＡ－１６．２５０またはＪＡ－２５．５０ローターを有するＢｅｃｋｍａｎ（Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ、ＣＡ）Ａｖａｎｔｉ（登録商標）Ｊ－２５Ｉ遠心分離機を使用して実行した。

【０４３７】

Ｃ末端Ｈｉｓタグを有する、配列番号２２０における配列を有するポリペプチドをコードするＤＡＴ核酸を、Ｎｄｅ　Ｉ／Ｘｈｏ　Ｉ制限部位を使用して実施例１６に記載されるｐＭｅｔ１ａベクター中にクローニングした。抗生物質マーカー（ｂｌａ遺伝子）は、Ｐｓｉ　Ｉ制限酵素消化、ベクターバンドのゲル精製、ベクター端のセルフライゲーション、大腸菌宿主への形質転換、およびメチオニンを含有しない最少培地プレート上での選択を使用して、除去することができる。典型的には、１５のアミノ酸を有するＮｅｉｄｈａｒｄｔの培地を使用する。クローニング部位は、ｐＭＥＴ１ａの中に配列番号２２０核酸配列を挿入するためにＮｄｅＩ／ＸｈｏＩとした（実施例１６を参照されたい）。

【０４３８】

Ｃ末端Ｈｉｓ精製タグを保持する配列番号２２０　ＤＡＴポリペプチドは、高度な細胞密度および高レベルの所望のタンパク質の発現を達成する流加プロセスにおいて、２．５Ｌスケールの発酵槽において生成した。大腸菌株Ｂ８３４（ＤＥ３）：：配列番号２２０ｃＨＩＳ　ｐＭＥＴ１の増殖についてのプロトコールおよび結果を以下に記載する。新鮮な培養プレート（Ｎｅｉｄｈａｒｄｔ＋１５のアミノ酸、メチオニンなし）から開始して、細胞を、６～８時間、３０℃および２２５ｒｐｍにて、１５のアミノ酸を補充した５ｍＬのＮｅｉｄｈａｒｄｔの培地において増殖させた。１ｍＬの培養物を５ｇ／Ｌのグルコースを補充した２つの１２５ｍＬアリコートの生成培地のそれぞれに移した。フラスコを、一晩（１６～１８時間）、３０℃および２２５ｒｐｍで増殖させた。発酵槽に、２．０ｇ／Ｌ（NH_4）$_2SO_4$、８．０ｇ／Ｌ　K_2HPO_4、２．０ｇ／Ｌ　ＮａＣｌ、１．０

ｇ／Ｌ　Na_3クエン酸・$2H_2O$、１．０ｇ／Ｌ　$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、０．０２５ｇ／Ｌ　$CaCl_2 \cdot 2H_2O$、０．０５ｇ／Ｌ　$FeSO_4 \cdot 7H_2O$、０．４ｍＬ／Ｌ　Ｎｅｉｄｈａｒｄｔ微量養素、および２．０ｇ／Ｌグルコースを含有する（１リットル当たり）、２．５リットルの生成培地を入れた。発酵槽に、１０％ｖ／ｖの一晩培養物を接種した。接種の３時間後に、６０％ｗ／ｖグルコース溶液を使用して指数関数的なグルコース供給装置を設定した。０．１５時間$^{-1}$の指数関数的な速度の微生物の増殖を支持するのに必要とされる速度でグルコース供給を行った。二酸化炭素発生速度（ＣＥＲ）が１００ミリモル／Ｌ／時の値に達したとき（接種の約２１時間後；１５～１６ｇ　ＤＣＷ／Ｌの細胞バイオマスに相当する）、遺伝子発現を２ｇ／Ｌラクトースのボーラス添加（２０％溶液として供給）を用いて誘導した。供給量を６０％ｗ／ｖグルコースから５０％ｗ／ｖグルコース＋１０％ｗ／ｖラクトースに変化させたが、供給速度は誘導時の速度に固定した。「５０％ｗ／ｖグルコース＋１０％ｗ／ｖラクトース」供給量を６時間維持した。発酵の終わりに、１０分間、５０００～７０００×ｇでの遠心分離によって細胞を収集し、－８０℃で湿性細胞ペーストとして凍結した。２．８Ｌの細胞ブロスから細胞ペースト（３１８グラム）を収集した。

【０４３９】

配列番号２２０ポリペプチドを含有する無細胞抽出物を調製するために、５０ｇの湿性細胞ペーストを５０Ｍピリドキサールリン酸（ＰＬＰ）を含有する、１５０ｍＬの５０ｍＭ　ＥＰＰＳ緩衝液（ｐＨ８．４）中に懸濁し、次いで、懸濁液の温度を１５℃未満に維持しながら、Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓホモジナイザー（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ、Ｎｅｗｔｏｎ、ＭＡ）（１８，０００ｐｓｉで３回通過）を使用して破壊した。細胞片を遠心分離（３０分間、２０，０００×ｇ）によって除去した。２ｍＭ　ＤＴＴを清浄化細胞抽出物に加えた。

【０４４０】

精製配列番号２２０を調製するために、２×２５ｍＬアリコートの清浄化細胞抽出物を、０．０５ｍＭ　ＰＬＰおよび２００ｍＭ塩化ナトリウムを含有する５０ｍＭ　ＥＰＰＳ（ｐＨ８．４）を用いてあらかじめ平衡化した４５ｍＬ　Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（商標）　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ樹脂（ニッケル（ＩＩ）型）カラムにそれぞれ充填した。試料を充填した後に、カラムを３～５容量の平衡化緩衝液、２５ｍＭイミダゾールを含有する３～５容量の平衡化緩衝液、１００ｍＭイミダゾールを含有する３～５容量の平衡化緩衝液、および５００ｍＭイミダゾールを含有する３～５容量の平衡化緩衝液を用いて続けて洗浄／溶離した。５００ｍＭイミダゾール溶離液は、Ａｍｉｃｏｎ（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ－７０遠心濾過デバイス（ＭＷＣＯ　１０ｋＤａ）を用いて１０×に濃縮した。０．０５ｍＭ　ＰＬＰを含有する５０ｍＭ　ＥＰＰＳ（ｐＨ８．４）を用いてあらかじめ平衡化した使い捨てのＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＰＤ１０脱塩カラムを通過させることによってイミダゾールおよび塩化ナトリウムを除去した。Ｐｉｅｒｃｅ　ＢＣＡアッセイキット（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を使用して脱塩溶液のタンパク質濃度を決定した。４～１５％の勾配ゲルを用いたＳＤＳ－ＰＡＧＥによって各画分の純度および無細胞抽出物画分中の発現のレベルを決定した。約９０％の純粋な約４５０ｍｇのタンパク質を、清浄化細胞抽出物５０ｍＬから回収した。２ｍＭ　ＤＴＴを１０ｍＬの精製タンパク質に加えた。精製タンパク質をアリコート（０．５～５ｍＬ）に分注し、－８０℃で保存した。

【０４４１】

窒素ヘッドスペース下の０．７Ｌ　Ｓｉｘｆｏｒｓ撹拌発酵槽（Ｉｎｆｏｒｓ　Ａｇ、Ｂｏｔｔｍｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）中でベンチスケール反応（２５０ｍＬ）を実行した。反応ミックスは、１０ｍＭリン酸カリウム、１ｍＭ　$MgCl_2$、０．０５ｍＭ　ＰＬＰ、２００ｍＭピルビン酸ナトリウム、および１００ｍＭ　Ｄ－トリプトファンを含有した。反応ミックスを適切な温度に調節し、水酸化カリウムを用いて適切なｐＨに調節した。実施例６に記載したアルドラーゼを清浄化細胞抽出物として０．０２ｍｇ／ｍＬ標的タンパク質で加えた。配列番号２２０　ＤＡＴポリペプチドを、０．２５ｍｇ

／ｍＬ標的タンパク質で加えた（精製酵素または清浄化細胞抽出物として）。
実施例３に記載したＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチン濃度を測定することによって反応の進行を経過観察した。
Ｄ－トリプトファンおよび試験した条件下で開始し、配列番号２２０ポリペプチドを使用するモナチン形成反応の最適ｐＨは約ｐＨ８．０であることが分かり、配列番号２２０ポリペプチドを利用するモナチン形成反応の最適温度は約２５℃であることが分かった。これらの反応は複雑な動態を有しており、完全なモナチン生成反応のための最適反応条件は、ＤＡＴポリペプチドによって触媒される個々の反応のための最適条件と同じではないかもしれない。

【０４４２】

［実施例１６］

実施例１６－ＤＡＴポリペプチドの可溶性発現を増加させるためのシャペロンの同時発現

配列番号８９４　ＤＡＴポリペプチドの可溶性発現は標準的な発現プロトコールを使用すると低かったので（ＬＢまたはＮｏｖａｇｅｎ　Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ａｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ２中１ｍＭ　ＩＰＴＧ、実施例８を参照されたい）、配列番号８９４ポリペプチドおよび様々な入手可能なシャペロンの同時発現を検討した。

【０４４３】

シャペロン：

ＴａＫａＲａ　Ｃｈａｐｅｒｏｎｅ　Ｓｅｔ（ＴＡＫＡＲＡ　ＢＩＯ　カタログ＃３３４０）は、ＨＳＰ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｉｎｃ．によって開発されたシャペロンの５つの異なるセットから成る。それらは、フォールディングプロセスにおいて協力して作用することで知られている多数の分子シャペロンの効率的な発現を可能にするように設計される。このセットは以下のものを含有した。

プラスミド	シャペロン	プロモーター	誘発因子	耐性マーカー
pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE; groES-groEL	araB; Pzt1	L-アラビノース; テトラサイクリン	クロラムフェニコール
pGro7	groES-groEL	araB	L-アラビノース	クロラムフェニコール
pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	araB	L-アラビノース	クロラムフェニコール
pG-Tf2	groES-groEL-tig	Pzt1	テトラサイクリン	クロラムフェニコール
pTf16	tig	araB	L-アラビノース	クロラムフェニコール

【０４４４】

形質転換プロトコール

化学的コンピテントＢＬ２１（ＤＥ３）細胞（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃６９４５０）を、４２℃での３０秒間の熱ショックによって、２０ｎｇのＴａＫａＲａシャペロンプラスミドの１つおよび２０ｎｇの配列番号８９３／ｐＥＴ３０ａ（配列番号８９４ポリペプチドをコード；プラスミド構築についての例Ｃ２を参照されたい）を用いて形質転換した。形質転換細胞を、３７℃で１時間、０．５ｍＬのＳＯＣ培地中に回収し、５０ｍｇ／Ｌカナマイシンおよび２５ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含有するＬＢプレートに播いた。プレートを３７℃で一晩インキュベートした。コロニーを一晩プレートから選び取り、５０ｍｇ／Ｌカナマイシンおよび２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコールを含有する５ｍＬの２×ＹＴ培地に接種した。３７℃での一晩のインキュベーションの後に、プラスミドをＱＵＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ　カタログ＃２７１０４）を使用して細胞ペレットから単離した。メーカー推奨プロトコールに従って、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）からの１箇所切断酵素を用いる制限消化により、プラスミドをシャペロンプラスミドおよび配列番号８９３／ｐＥＴ３０ａプラスミドの両方について分析した。

プラスミド	制限酵素
pG-KJE8	XhoI
pGro7	XbaI
pKJE7	NheI
pG-Tf2	XhoI
pTf16	XbaI

配列番号８９３／ｐＥＴ３０ａおよびｐＫＪＥ７の両方を含有する単離ＤＮＡをＮｈｅＩおよびＸｂａＩを用いて消化した。

【０４４５】

発現研究

溶液１～６、５０ｍｇ／Ｌカナマイシン、および２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコールを含有するＮｏｖａｇｅｎ Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標） ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ２（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７１３６６）のフラスコ（各フラスコ中２５ｍＬ）に、シャペロンプラスミドおよび配列番号８９３／ｐＥＴ３０を用いて同時形質転換した細胞の新鮮なプレートから接種した。シャペロンプラスミドに必要とされる誘発因子も接種時に加えた。

プラスミド	誘発因子濃度
pG-KJE8	2 mg/mL L-アラビノース; 10 ng/mLテトラサイクリン
pGro7	2 mg/mL L-アラビノース
pKJE7	2 mg/mL L-アラビノース
pG-Tf2	10 ng/mLテトラサイクリン
pTf16	2 mg/mL L-アラビノース

細胞を一晩３０℃でインキュベートし、６００ｎｍでのＯＤが６以上に達したら、遠心分離によって細胞を収集した。冷５０ｍＭ ＥＰＰＳ緩衝液（ｐＨ８．４）を用いて細胞を洗浄し、再度遠心分離し、直ちに使用、または－８０℃で凍結した。

【０４４６】

５μＬ／ｍＬのＰｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ ＩＩ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ／Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ カタログ＃５３９１３２）、１μｌ／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標） Ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７０７４６）、および０．０３３μｌ／ｍｌのｒ－Ｌｙｓｏｚｙｍｅ溶液（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７１１１０）を含むＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（登録商標）（第一級アミンなし）Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７０９２３）を１ｇの細胞ペレット当たり５ｍＬ細胞に加えることによって細胞抽出物を調製した。細胞懸濁液を１５分間緩やかに混合させながら室温でインキュベートした。２０分間、１４，０００ｒｐｍで遠心し（４℃）、上清を注意深く取り出した。総タンパク質濃度は、標準物としてウシ血清アルブミンおよびマイクロタイタープレートフォーマットを用いて、Ｐｉｅｒｃｅ ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ カタログ＃２３２２５）を使用して決定した。Ｄ－アミノトランスフェラーゼの発現は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｒｅａｄｙ Ｇｅｌ（登録商標） Ｐｒｅｃａｓｔ ４～１５％ポリアクリルアミド勾配ゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ カタログ＃１６１－１１０４）を使用して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。ＢｉｏＲａｄ ＳＤＳ－ＰＡＧＥ低範囲標準物（カタログ＃１６１－０３０４）は、各ゲル上で標準物として泳動した。アリコートの細胞抽出物（１５μｇタンパク質）を、２％ＳＤＳ、１０％グリセロール、１２．５％ ２－メルカプトエタノール、０．１％ブロモフェノールブルー、および６２．５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）を含有するタンパク質添加緩衝液と混合し、５分間、９５℃でインキュベートし、冷却し、次いでゲルに添加した。さらに、各形質転換体について、混じり合った可溶性および不溶性タンパク質の発現（総タンパク質）を

分析した。遠心分離の前の１０μｌアリコートの各細胞懸濁液を、９０μＬタンパク質添加緩衝液中で希釈し、１０分間、９５℃でインキュベートし、冷却した。１０μＬの各冷却溶液をゲルに添加した。

【０４４７】

可溶性タンパク質ゲルは、配列番号８９４の配列を有するポリペプチドの最も良好な可溶性発現は、シャペロンＧｒｏＥＬ－ＧｒｏＥＳ（ｐＧｒｏ７）を同時発現させた場合に生じることを示した。

【０４４８】

ＧｒｏＥＬ－ＧｒｏＥＳシャペロンの存在下における別のプラスミドを使用する配列番号８９４ポリペプチドの発現も検討した。Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓからの制限酵素ＮｄｅＩおよびＸｈｏＩを使用して、ｐＭＥＴ１ａプラスミド中に配列番号８９３核酸をサブクローニングした。このプラスミドはｐＥＴ２３ａ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃６９７４５－３）の誘導体であり、ｍｅｔＥ遺伝子（プラスミドのＮｇｏＭＩＶ部位に挿入）を保持しており、大腸菌株Ｂ８３４（ＤＥ３）および大腸菌ＢＷ３０３８４（ＤＥ３） ｏｍｐＴｍｅｔＥ（「ＥＥ２Ｄ」）のメチオニン栄養要求性を補完することができる。「ＥＥ２Ｄ」株の構築はＷＯ２００６／０６６０７２に記載されている。ｐＥＴ２３ｄの誘導体であるｐＭＥＴ１ａに類似のプラスミドの構築は前記ＰＣＴ出願に記載されている。

【０４４９】

Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ ＩＩシステム（カタログ＃１６５－２１１１）を用いる大腸菌細胞のための標準的なＢｉｏ－Ｒａｄエレクトロポレーションプロトコールを使用して、配列番号８９３／ｐＭＥＴ１ａプラスミド（２５ｎｇ）を「ＥＥ２Ｄ」エレクトロコンピテント細胞中に単独で形質転換、またはｐＧｒｏ７（２０ｎｇ）と共に同時形質転換した。形質転換細胞を３７℃で１時間、０．５ｍＬのＳＯＣ培地中に回収し、１００ｍｇ／Ｌアンピシリンを含有するＬＢプレートにまたは１００ｍｇ／Ｌアンピシリンおよび２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコール（二重プラスミド形質転換体）を含有するプレートに播いた。プレートを３７℃で一晩インキュベートした。各プレートセットから１つのコロニーを溶液１～６、１００ｍｇ／Ｌアンピシリン、および２ｍｇ／ｍＬ Ｌ－アラビノースを含有する５０ｍＬのＮｏｖａｇｅｎ Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標） ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ２に接種した。ｐＧｒｏ７プラスミドを含有する細胞を接種した培養物は２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコールも含有させた。細胞を一晩、３０℃でインキュベートし、OD_{600}が６以上に達したら、遠心分離によって細胞を収集した。細胞ペレットを冷５０ｍＭ ＥＰＰＳ緩衝液（ｐＨ８．４）を用いて洗浄し、再度遠心分離し、直ちに使用、または－８０℃で凍結した。Ｎｏｖａｇｅｎ ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（登録商標）（第一級アミンなし） Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔを使用して、上記に記載されるように細胞抽出物を調製した。可溶性の総Ｄ－アミノトランスフェラーゼの発現を上記に記載したようにＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。

【０４５０】

ゲルは、可溶性配列番号８９４ポリペプチドの発現が、ＧｒｏＥＬ－ＧｒｏＥＳタンパク質を同時発現させた場合に、より大きかったことを示した。しかしながら、可溶性発現は、上記に記載されるｐＥＴ３０ａ構築物ほど高くなかった。

【０４５１】

発現の際のインキュベーション温度の影響もまた検討した。１００ｍｇ／Ｌアンピシリンおよび２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコールを含有するＬＢの５ｍＬ培養物に、ＥＥ２Ｄ：：配列番号８９４ＰＭＥＴ１ａ＋ｐＧｒｏ７の新鮮なプレートから接種した。培養物を３０℃で一晩インキュベートし、次いで、それぞれ、溶液１～６、１００ｍｇ／ｍＬアンピシリン、２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコール、および２ｍｇ／ｍＬ Ｌ－アラビノースを含有する５０ｍＬのＮｏｖａｇｅｎ Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標） Ａｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ２を含有する３つのフラスコに接種した。１

つ目のフラスコは２０℃で、２つ目は２５℃で、３つ目は３０℃でインキュベートした。OD_{600}が６以上に達したら細胞を収集した。細胞を収集し、細胞抽出物を上記に記載したように調製した。総タンパク質濃度は、標準物としてウシ血清アルブミンおよびマイクロタイタープレートフォーマットを用いて、Ｐｉｅｒｃｅ　ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ　カタログ＃２３２２５）を使用して決定した。Ｄ－アミノトランスフェラーゼの発現は、１ｍｇ／ｍＬに希釈した細胞抽出物溶液を用いて、メーカーのプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｅｘｐｅｒｉｏｎ　Ｐｒｏ２６０　Ａｕｔｏｍａｔｅｄ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ　Ｓｔａｔｉｏｎを使用して分析した。結果を表３５に示す。最も低い温度により、配列番号８９４ポリペプチドの最も高い量の発現がもたらされたようである。

【０４５２】

表３５．

レーン	試料	温度	推定DAT発現
1	Pro260ラダー		
2	EE2D::23463pMET1+pGRO7細胞抽出物	20℃	23%
3	EE2D::23463pMET1+pGRO7細胞抽出物	25℃	21%
4	EE2D::23463pMET1+pGRO7細胞抽出物	30℃	19%

【０４５３】

活性アッセイプロトコール

ＧｒｏＥＬ－ＧｒｏＥＳシャペロンと共に同時発現させた配列番号８９４　ＤＡＴの酵素活性を標準的なモナチン反応プロトコールに従って試験した。手短に言えば、各アッセイチューブは、以下のものを含有した（合計２ｍＬ中）：細胞抽出物中０．０５０ｍｇ／ｍＬアルドラーゼ（２０％可溶性発現を仮定）；細胞抽出物中１．０ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－アミノトランスフェラーゼ（配列番号８９４ポリペプチドを含有する抽出物について２０％可溶性発現を仮定）または精製Ｂ．スファエリクスＤ－アミノトランスフェラーゼ；０．０１％　Ｔｗｅｅｎ－８０；２００ｍＭピルビン酸ナトリウム；１００ｍＭ　Ｄ－トリプトファン；１００ｍＭ　ＥＰＰＳ（ｐＨ８．２）；１ｍＭ　$MgCl_2$；０．０５　ｍＭ　ＰＬＰ；および１０ｍＭリン酸カリウム。

反応は、酸素への曝露を最小限にするために、Ｃｏｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．無酸素チャンバーにおいて室温でインキュベートした。酵素以外のすべての成分を共に混合した（トリプトファンは、酵素の添加の少なくとも１時間後まで完全には溶解しなかった）。酵素の添加によって反応を開始させた。１、４、８、および２２時間に試料を回収した。１ｍｇ／ｍＬ精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴを使用するコントロール反応もまた実行した。このＤＡＴの構築、発現、および精製は実施例６に記載される。基質および産物の濃度を実施例３に記載されるように測定した。

結果を表３６に示す。配列番号８９４ポリペプチドが存在した場合、２２時間にてモナチンの濃度は９．２ｍＭであり、Ｂ．スファエリクス酵素を使用した場合は１２．４ｍＭであった。配列番号８９４ポリペプチドがアッセイ混合物中にあった場合、副産物ＨＭＧの濃度は著しく少なかった（Ｂ．スファエリクス酵素を含有するアッセイ試料と比較した場合の＜１／３濃度　）。ＨＭＧ濃度はＯＰＡ誘導体化試料のピーク面積を比較することによって評価した。

【０４５４】

表３６．モナチン形成（ｍＭ）

ポリペプチド(配列番号)	1時間	4時間	8時間	22時間
894 DAT + GroEL-ES	1.3	4.5	6.8	9.2
B.スファエリクスDAT	1.6	5.7	8.3	12.4

【０４５５】

［実施例１７］
実施例１７－可溶性ＤＡＴポリペプチド発現を増加させるためのＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システムの使用
配列番号８９４ポリペプチドの可溶性発現は標準的な発現プロトコールを使用すると低かったので（ＬＢまたはＮｏｖａｇｅｎ　Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ２中１ｍＭ　ＩＰＴＧ－実施例８を参照されたい）、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システムにおける配列番号８９３／ｐＭＥＴ１ａプラスミドの発現を検討した。
Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システムは、好冷性のシャペロン（Ｃｐｎ１０およびＣｐｎ６０）を運ぶ大腸菌コンピテント細胞を含有する。これらは、好冷性の生物オレイスピラ　アンタルクティカ（Ｏｌｅｉｓｐｉｒａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）から単離されたシャペロンである。Ｃｐｎ１０およびＣｐｎ６０は大腸菌シャペロンＧｒｏＥＬおよびＧｒｏＥＳに対して高い配列類似性をそれぞれ示し、４～１２℃で高いタンパク質フォールディング活性を有する。ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）宿主細胞は、大腸菌ＢＬ２１株に由来する。これらの細胞はＬｏｎプロテアーゼを欠くだけではなく、ＯｍｐＴプロテアーゼを同様に欠損するように操作されている。
【０４５６】
形質転換プロトコール
プラスミド配列番号８９３／ｐＭＥＴ１ａ（実施例１６に記載される）を、メーカーのプロトコールに従って化学的コンピテントＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）（ＤＥ３）細胞（カタログ＃２３０１９２）に形質転換した。形質転換細胞を３７℃で１時間、０．５ｍＬのＳＯＣ培地中に回収し、１００ｍｇ／Ｌアンピシリンを含有するＬＢプレートに播いた。プレートを３７℃で一晩インキュベートし、次いで、４℃で保存した。
【０４５７】
発現プロトコール
形質転換プレートからのコロニーを使用して、１００ｍｇ／Ｌアンピシリンおよび１０ｍｇ／Ｌゲンタマイシンを含有する５ｍＬの２×ＹＴ培地に接種し、３０℃で一晩インキュベートした。一晩培養物を使用して、１００ｍｇ／Ｌアンピシリンおよび１２ｍｇ／Ｌゲンタマイシンと共に溶液１～６を含有するＮｏｖａｇｅｎ　Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）　ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ　２（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７１３６６）のフラスコに接種した。６時間３０℃でのインキュベーションの後に、Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）培養物を１５℃または２０℃または２５℃インキュベーターに移動した。インキュベーションは培養物の６００ｎｍにおけるＯＤが６以上に達するまで継続した。遠心分離によって細胞を収集し、冷５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、ｐＨ８．４を用いて洗浄し、細胞ペレットを－８０℃で凍結させた。
【０４５８】
５μＬ／ｍＬのＰｒｏｔｅａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　Ｃｏｃｋｔａｉｌ　ＩＩ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ／Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ　カタログ＃５３９１３２）、１μｌ／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ　Ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７０７４６）、および０．０３３μｌ／ｍｌのｒ－Ｌｙｓｏｚｙｍｅ（商標）溶液（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７１１１０）を含む５ｍＬのＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（登録商標）（第一級アミンなし）　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７０９２３）を１ｇの細胞ペレット当たり５ｍＬ細胞に加えることによって細胞抽出物を調製した。細胞懸濁液を１５分間緩やかに混合させながら室温でインキュベートした。２０分間、１４，０００ｒｐｍで遠心し（４℃）、上清を注意深く取り出した。総タンパク質濃度は、標準物としてウシ血清アルブミンおよびマイクロタイタープレートフォーマットを用いて、Ｐｉｅｒｃｅ　ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ　カタログ＃２３２２５）を使用して決定した。Ｄ－アミノトランスフェラーゼの発

現は、１ｍｇ／ｍＬに希釈した細胞抽出物溶液を用いて、メーカーのプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｅｘｐｅｒｉｏｎ　Ｐｒｏ２６０　Ａｕｔｏｍａｔｅｄ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ　Ｓｔａｔｉｏｎを使用して分析した。

【０４５９】

電気泳動結果は、シャペロンを用いない発現と比較した場合または実施例１６に記載される大腸菌ＧｒｏＥＬ－ＧｒｏＥＳシャペロンと共に同時発現させた場合、Ａｒｃｔｉｃ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）システムが配列番号８９４ポリペプチドの可溶性発現を著しく増加させたことを示す。可溶性発現は、より低い温度でより高かったが、２５℃でも非常に高かった。

レーン	試料	インキュベーション温度	推定DAT発現
1	Pro260ラダー		
2	ArcticExpress(DE3)::894pMET1細胞抽出物	15℃	58%
3	ArcticExpress(DE3)::894pMET1細胞抽出物	20℃	46%
4	ArcticExpress(DE3)::894pMET1細胞抽出物	25℃	47%

【０４６０】

活性アッセイプロトコール：

ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システムにおいて発現させた配列番号８９４ポリペプチドの酵素活性を実施例６に記載されるアルドラーゼの存在下におけるモナチン形成を経過観察することによって試験した。各アッセイチューブは、以下のものを含有した（合計２ｍＬ中）：細胞抽出物中０．０１０ｍｇ／ｍＬアルドラーゼ（２０％可溶性発現を仮定）；細胞抽出物中１．０または２．０ｍｇ／ｍＬの配列番号８９４ポリペプチド（配列番号８９４ポリペプチドを含有する抽出物について５０％可溶性発現を仮定）または精製Ｂ．スファエリクスＤ－アミノトランスフェラーゼ；０．０１％　Ｔｗｅｅｎ－８０；２００ｍＭピルビン酸ナトリウム；１００ｍＭ　Ｄ－トリプトファン；１００ｍＭ　ＥＰＰＳ、ｐＨ８．２；１ｍＭ　$MgCl_2$；０．０５　ｍＭ　ＰＬＰ；および１０ｍＭリン酸カリウム。

【０４６１】

反応は、酸素への曝露を最小限にするために、Ｃｏｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．無酸素チャンバーにおいて室温でインキュベートした。酵素以外のすべての成分を一緒に混合した（トリプトファンは、酵素の添加の少なくとも１時間後まで完全には溶解しなかった）。酵素の添加によって反応を開始させた。１、４、７、および２２時間に試料を回収した。１または２ｍｇ／ｍＬ精製Ｂ．スファエリクスＤ－アミノトランスフェラーゼを使用するコントロール反応もまた実行した。基質および産物の濃度を実施例３に記載されるように測定した。結果を表３７において示す。２２時間で、モナチンの濃度は、配列番号８９４ポリペプチドが１ｍｇ／ｍＬで存在した場合に８．２ｍＭであり、２ｍｇ／ｍＬ　ＤＡＴポリペプチドで１０．５ｍＭであった。Ｂ．スファエリクス酵素を１ｍｇ／ｍＬで加えた場合、２２時間でのモナチンの濃度は１０．７ｍｇ／ｍＬであり、２ｍｇ／ｍＬで、モナチン濃度は１４．５ｍＭであった。産物の立体純度（例３におけるＦＤＡＡ誘導体化プロトコールによって決定される）は、酵素および酵素濃縮物の両方を用いて＞９８％Ｒ，Ｒであった。副産物ＨＭＧの濃度は、配列番号８９４ポリペプチドを使用した場合は著しく少なかった（どちらかの酵素濃度でＢ．スファエリクス酵素を含有するアッセイ試料と比較した場合の約１／３濃度）。ＨＭＧ濃度はＯＰＡ誘導体化試料のピーク面積を比較することによって評価した。

【０４６２】

表３７．モナチン形成（ｍＭ）

ポリペプチド(配列番号)	1時間	4時間	7時間	22時間
894 DAT (1 mg/mL)	0.9	2.3	3.6	8.3
894 DAT (2 mg/mL)	1.4	3.7	6.3	10.5
B.スファエリクスDAT (1 mg/lmL)	1.0	4.2	6.1	10.7
B.スファエリクスDAT (2 mg/lmL)	1.5	6.7	8.2	14.5

【０４６３】
［実施例１８］
実施例１８－可溶性ＤＡＴ発現を増加させるためのＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ａｒｃｔｉｃ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）システムの使用
形質転換プロトコール：
プラスミド配列番号８９１／ｐＥＴ３０ａ（配列番号８９２ポリペプチドをコード）、配列番号８７３／ｐＥＴ３０ａ（配列番号８７４ポリペプチドをコード）、およびｐＥＴ３０ａにおけるクロストリジウム　ベイジェリンキＤＡＴ（ＣｂＤＡＴ）を、メーカーのプロトコールに従って、化学的コンピテントＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）（ＤＥ３）細胞（カタログ＃２３０１９２）中に形質転換した。これらの遺伝子のクローニングは実施例４に記載され、アッセイ結果は実施例９に記載されている。形質転換細胞を３７℃で１時間、０．５ｍＬのＳＯＣ培地中に回収し、１００ｍｇ／Ｌアンピシリンおよび１３ｍｇ／Ｌゲンタマイシンを含有するＬＢプレートに播いた。プレートを２日間室温でインキュベートし、次いで、４℃で保存した。
【０４６４】
発現プロトコール：
形質転換回収プレートからのコロニーを使用して、５０ｍｇ／Ｌカナマイシンおよび１３ｍｇ／Ｌゲンタマイシンを含有する５ｍＬの２×ＹＴ培地に接種した、液体培養物を３０℃で６時間インキュベートした。１００ｍｇ／Ｌアンピシリンおよび１３ｍｇ／Ｌゲンタマイシンと共に溶液１～６を含有するＮｏｖａｇｅｎ　Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）　ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ　２（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７１３６６）のフラスコに５ｍＬ培養物を接種した。５～６時間３０℃でのインキュベーションの後に、培養物を１５℃インキュベーターに移動した。１５℃インキュベーションを培養物のOD_{600}が６以上に達するまで継続した。遠心分離によって細胞を収集し、冷５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、ｐＨ８．４を用いて洗浄し、次いで、細胞ペレットを－８０℃で凍結させた。
【０４６５】
５μＬ／ｍＬのＰｒｏｔｅａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　Ｃｏｃｋｔａｉｌ　ＩＩ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ／Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ　カタログ＃５３９１３２）、１μｌ／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標）　Ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７０７４６）、および０．０３３μｌ／ｍｌのｒ－Ｌｙｓｏｚｙｍｅ（商標）溶液（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７１１１０）を含むＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（第一級アミンなし）　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ＃７０９２３）を１ｇの細胞ペレット当たり５ｍＬ細胞に加えることによって細胞抽出物を調製した。細胞懸濁液を１５分間緩やかに混合させながら室温でインキュベートした。２０分間、１４，０００ｒｐｍで遠心し（４℃）、上清を注意深く取り出した。総タンパク質濃度は、標準物としてウシ血清アルブミンおよびマイクロタイタープレートフォーマットを用いて、Ｐｉｅｒｃｅ　ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ　カタログ＃２３２２５）を使用して決定した。ＤＡＴの発現は、１ｍｇ／ｍＬに希釈した細胞抽出物溶液を用いて、メーカーのプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｅｘｐｅｒｉｏｎ　Ｐｒｏ２６０　Ａｕｔｏｍａｔｅｄ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ　Ｓｔａｔｉｏｎを使用して分析した。結果を表３８および３９に示す。

【０４６６】
電気泳動結果は、ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システムを使用すると、配列番号８７４ポリペプチドは配列番号８９２ポリペプチドよりもわずかに良好に可溶性形態で発現したことを示す。Ｃｂ　ＤＡＴの可溶性発現は形質転換プレートにおいて選び取られたコロニーに応じて変動した。実施例１６に記載される配列番号８９４ポリペプチドが発現したのと同様にはＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システムを使用してこれらのＤＡＴポリペプチドのいずれも可溶性形態で発現しなかった。
【０４６７】
表３８．

レーン	試料	インキュベーション温度	推定DAT発現
1	Pro260ラダー		
2	ArcticExpress(DE3)::891/pET30a細胞抽出物(コロニー#1)	15℃	11%
3	ArcticExpress(DE3)::891/pET30a細胞抽出物(コロニー#2)	15℃	9%
4	ArcticExpress(DE3)::873/pET30a細胞抽出物(コロニー#1)	15℃	15%
5	ArcticExpress(DE3)::873/pET30a細胞抽出物(コロニー#2)	15℃	10%
6	ArcticExpress(DE3)::891/pET30a細胞抽出物(コロニー#1)	15℃	9%
7	ArcticExpress(DE3)::891/pET30a細胞抽出物(コロニー#2)	15℃	8%
9	ArcticExpress(DE3)::873/pET30a細胞抽出物(コロニー#1)	15℃	15%
10	ArcticExpress(DE3)::873/pET30a細胞抽出物(コロニー#2)	15℃	11%

【０４６８】
表３９

レーン	試料	インキュベーション温度	推定DAT発現
1	Pro260ラダー		
2	pET30a細胞抽出物(コロニー#1)におけるArcticExpress(DE3)::CbDAT	15℃	9%
3	pET30a細胞抽出物(コロニー#2)におけるArcticExpress(DE3)::CbDAT	15℃	19%
4	pET30a細胞抽出物(コロニー#3)におけるArcticExpress(DE3)::CbDAT	15℃	13%
5	pET30a細胞抽出物(コロニー#4)におけるArcticExpress(DE3)::CbDAT	15℃	4%

【０４６９】
活性アッセイプロトコール
ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システムにおいて発現させたＤＡＴポリペプチドの酵素活性は、実施例６に記載したアルドラーゼの存在下におけるモナチン形成を経過観察することによって試験した。各アッセイチューブは以下のものを含有した（合計３ｍＬ

中）：細胞抽出物中０．０５０ｍｇ／ｍＬアルドラーゼ（２０％可溶性発現を推定）；細胞抽出物中０．５ｍｇ／ｍＬ　ＤＡＴポリペプチド（Ｅｘｐｅｒｉｏｎデータから可溶性発現を推定）または精製Ｂ．スファエリクスＤＡＴ；０．０１％　Ｔｗｅｅｎ－８０；２００ｍＭピルビン酸ナトリウム；１００ｍＭ　Ｄ－トリプトファン；５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、ｐＨ８．２；１ｍＭ　$MgCl_2$；０．０５ｍＭ　ＰＬＰ；および１０ｍＭリン酸カリウム。

【０４７０】

反応は、酸素への曝露を最小限にするために、Ｃｏｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．無酸素チャンバーにおいて室温でインキュベートした。酵素以外のすべての成分を共に混合した（トリプトファンは、酵素の添加の少なくとも１時間後まで完全には溶解しなかった）。酵素の添加によって反応を開始させた。２、４．５、９、および２４時間に試料を回収した。精製Ｂ．スファエリクスＤ－アミノトランスフェラーゼを用いるコントロール反応も実行した。基質および産物の濃度を実施例３に記載したように測定した。２４時間で、配列番号８９２または８９４ポリペプチドを含有するアッセイはコントロールＢ．スファエリクスＤＡＴ反応とおよそ同じタイターのモナチンを生成した。Ｃ．ベイジェリンキＤＡＴ反応は８分の１未満のモナチン産物を生成したが、配列番号８７４ポリペプチドは約半分を生成した。２４時間での産物の立体純度（実施例３におけるＦＤＡＡ誘導体化プロトコールによって決定）は、配列番号８９２ポリペプチドについて９６％Ｒ，Ｒモナチンまたはそれ以上であった。副産物ＨＭＧ（４－ヒドロキシ－４－メチルグルタミン酸）の濃度を、配列番号８９２、配列番号８９４、およびＢ．スファエリクスＤＡＴポリペプチドを用いる反応について測定した。配列番号８９４に示される配列を有するポリペプチドを用いるアッセイは、他の２つよりもはるかにより少ない量のＨＭＧ副産物を生成した（Ｂ．スファエリクスＤＡＴを含有するアッセイによって生成されるものの約２０％および配列番号８９２ポリペプチドを用いるアッセイによって生成されるものの約４０％）。ＨＭＧ濃度はＯＰＡポストカラム誘導体化試料のピーク面積を比較することによって評価した。

【０４７１】

表４０．モナチン形成（ｍＭ）

ポリペプチド(配列番号)	2時間	4.5時間	9時間	24時間
C. ベイジェリンキDAT	0.3	0.7	0.8	0.9
874 DAT	1.8	3.2	4.1	4.4
892 DAT	1.6	3.7	5.4	8.4
894 DAT	1.4	2.8	4.5	8.4
B.スファエリクスDAT	1.2	2.9	4.3	8.1

これらの結果は、適切な条件下で発現される場合、配列番号８９２および８９４の配列を有するポリペプチドを反応に利用して非常に純粋なＲ，Ｒモナチンをポジティブコントロール酵素と同じくらい高いタイターで生成することができることを示す。

【０４７２】

［実施例１９］

実施例１９－ＤＡＴの可溶性発現を増加させるための代替発現宿主の評価

配列番号８９４ポリペプチドの可溶性発現は、核酸をＢＬ２１（ＤＥ３）において発現させると低かったので（実施例８を参照されたい）、代替発現宿主を可溶性発現の改善について評価した。ＯｖｅｒＥｘｐｒｅｓｓ（商標）Ｃ４１（ＤＥ３）およびＣ４３（ＤＥ３）宿主は、毒性耐性の付与について表現型的に選択した遺伝子変異を含有しており、ある種の毒性タンパク質を他の大腸菌宿主よりも高いタイターで発現する。

【０４７３】

形質転換プロトコール

メーカーのプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓａｒ　ＩＩシ

ステムを使用して、ＯｖｅｒＥｘｐｒｅｓｓ（商標）Ｃ４１（ＤＥ３）およびＣ４３（ＤＥ３）（それぞれＬｕｃｉｇｅｎ カタログ＃６０３４１および６０３４５）のエレクトロコンピテント細胞をプラスミド配列番号８９３／ｐＥＴ３０ａで形質転換した。形質転換混合物を３７℃で１時間、１ｍＬ ＳＯＣ培地中に回収し、５０ｍｇ／Ｌカナマイシンを含有するＬＢプレートに播いた。プレートを３７℃で一晩インキュベートした。多数のコロニーを新鮮なプレート上にパッチし、コロニーＰＣＲを使用して適切な挿入物サイズについて分析した。細胞のわずかなアリコートを、０．０２５ｍＬ H_2O中に懸濁し、１０分間、９５℃でインキュベートした。冷却後、２μＬのそれぞれの懸濁液を０．０２５ｍＬ反応において鋳型として使用し、それぞれ、０．５μＬ Ｔ７プロモータープライマー（０．１ｍＭ）０．５μＬ Ｔ７ターミネータープライマー（０．１ｍＭ）、０．５μＬ ＰＣＲ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｍｉｘ（Ｒｏｃｈｅ ＃１２５２６７２０；１０ｍＭ 各ヌクレオチド）、２．５μＬ Ｒｏｃｈｅ Ｅｘｐａｎｄ ＤＮＡポリメラーゼ緩衝液＃２、および０．５μＬ Ｅｘｐａｎｄ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｒｏｃｈｅ Ｅｘｐａｎｄ Ｈｉｇｈ Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ カタログ＃１７３２６５０）もまた含有した。３ステップサーモサイクラープログラムを２５～３０サイクル：９４℃で１分間；５４℃で１分間、７２℃で１．３分間、７２℃で７分間の最終ポリッシングステップを実行した。

【０４７４】

発現研究

溶液１～６および５０ｍｇ／Ｌカナマイシン（各フラスコ中４０ｍＬ）を含有するＮｏｖａｇｅｎ Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標） ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ ２（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７１３６６）のフラスコに、形質転換Ｃ４１（ＤＥ３）およびＣ４３（ＤＥ３）細胞のパッチプレートから接種した（形質転換のそれぞれについて２パッチ）。細胞を一晩３０℃でインキュベートし、OD_{600}が６以上に達したら、遠心分離によって細胞を収集した。細胞を冷緩衝液を用いて洗浄し、再度遠心分離し、直ちに使用、または－８０℃で凍結した。

【０４７５】

５μＬ／ｍＬのＰｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ ＩＩ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ／Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ カタログ＃５３９１３２）、１μｌ／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標） Ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７０７４６）、および０．０３３μｌ／ｍｌのｒ－Ｌｙｓｏｚｙｍｅ（商標）溶液（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７１１１０）を含むＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（登録商標）（第一級アミンなし）Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７０９２３）を１ｇの細胞ペレット当たり５ｍＬ細胞に加えることによって細胞抽出物を調製した。細胞懸濁液を１５分間緩やかに混合させながら室温でインキュベートした。２０分間、１４，０００ｒｐｍで遠心し（４℃）、上清を注意深く取り出した。総タンパク質濃度は、標準物としてウシ血清アルブミンおよびマイクロプレートフォーマットを用いて、Ｐｉｅｒｃｅ ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ カタログ＃２３２２５）を使用して決定した。ＤＡＴポリペプチドの発現は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｒｅａｄｙ Ｇｅｌ（登録商標） Ｐｒｅｃａｓｔ ４～１５％ポリアクリルアミド勾配ゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ カタログ＃１６１－１１０４）を使用して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。ＢｉｏＲａｄ ＳＤＳ－ＰＡＧＥ低範囲標準物（カタログ＃１６１－０３０４）は、各ゲル上で標準物として泳動した。アリコートの細胞抽出物（１５μｇタンパク質）を２％ＳＤＳ、１０％グリセロール、１２．５％ ２－メルカプトエタノール、０．１％ブロモフェノールブルー、および６２．５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）を含有するタンパク質添加緩衝液と混合し、５分間、９５℃でインキュベートし、冷却し、次いでゲルに添加した。さらに、混じり合った可溶性および不溶性タンパク質の発現（総タンパク質）を形質転換体について分析した。遠心

分離の前の１０μｌアリコートの各細胞懸濁液を９０μＬタンパク質添加緩衝液中で希釈し、１０分間、９５℃でインキュベートし、冷却した。１０μＬの各冷却溶液をゲルに装荷した。

【０４７６】

電気泳動ゲルにより、このタンパク質はＣ４３（ＤＥ３）宿主においてよりもＣ４１（ＤＥ３）宿主においてより良好に発現したが、みかけの可溶性発現はＢＬ２１（ＤＥ３）細胞を使用した場合ほど高くなかったことが示された。

【０４７７】

［実施例２０］

実施例２０－可溶性ＤＡＴ発現を増加させるための低温発現の評価

配列番号８９４　Ｄ－アミノトランスフェラーゼの可溶性発現は、遺伝子を大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）において発現させた場合に低かったので（実施例８を参照されたい）、低温発現を評価するために、寒冷ショックプロテインＡプロモーターと共に遺伝子をベクター中に挿入した。

【０４７８】

Ｔａｋａｒａ　ｐＣｏｌｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒは、大腸菌における高純度、高収量組換えタンパク質の発現のために寒冷ショックプロテインＡ（ｃｓｐＡ）プロモーターを利用する４つの異なるベクターである。これらのベクターでは、低温（１５℃）で標的タンパク質合成が選択的に誘発され、他のタンパク質の合成が抑制され、プロテアーゼ活性は減少する。ｃｓｐＡプロモーターに加えて、４つのベクターはすべて、ｌａｃオペレーター（発現のコントロールのため）、アンピシリン耐性遺伝子（ａｍｐ^{r}）、ＣｏｌＥ１複製開始点、Ｍ１３　ＩＧフラグメント、およびマルチプルクローニング部位（ＭＣ）を含有する。ベクターのうち３つはまた、翻訳増強エレメント（ＴＥＥ）、Ｈｉｓタグ配列、および／またはＸａ因子切断部位を含有する。

【０４７９】

クローニングプロトコール

プラスミド配列番号８９４ｐＥＴ３０ａからの配列番号８９４　ＤＡＴ核酸を、ｐＣＯＬＤＩＩ（ＴＥＥおよびＨｉｓタグ配列を含有する）、ｐＣＯＬＤＩＩＩ（ＴＥＥを含有する）、ならびにｐＣＯＬＤＩＶベクターのＮｄｅＩならびにＸｈｏＩの部位でＴａｋａｒａ　ｐＣｏｌｄベクター中にサブクローニングした。消化ベクターおよび挿入バンドは、メーカーのプロトコールに従って、ＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ　カタログ＃２８７０４）を使用してゲル精製し、Ｒｏｃｈｅ　Ｒａｐｉｄ　ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（カタログ＃１６３５３７９）を使用してライゲーションした。ライゲーション混合物は、４２℃での熱ショックによって、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＯｎｅＳｈｏｔ　ＴＯＰ１０化学的コンピテント細胞（カタログ＃Ｃ４０４００３）に形質転換した。３７℃での１時間の５００Ｌ　ＳＯＣ培地中での回収の後に、形質転換混合物を１００ｍｇ／Ｌアンピシリンを含有するＬＢプレートに播き、一晩、３７℃でインキュベートした。コロニーを形質転換プレートから選び取り、１００ｍｇ／ｍＬアンピシリンを含有するＬＢの５ｍＬ培養物に接種し、３７℃で一晩インキュベートした。プラスミドＤＮＡを、ＱＩＡｐｒｅｐ（登録商標）　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ　カタログ＃２７１０４）を使用して、５ｍＬ培養物から精製した。挿入物をＮｄｅＩおよびＸｈｏＩでの制限消化ならびに配列決定（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｃｏｒｐ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）によって検証した。

【０４８０】

配列番号８９４ｄａｔ　ｐＣＯＬＤプラスミドを、メーカーのプロトコールに従って、化学的コンピテントＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）（ＤＥ３）細胞およびＮｏｖａｇｅｎ　ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞の中に形質転換した。形質転換混合物を３７℃で１時間、０．５～１ｍＬ　ＳＯＣ培地中に回収し、１００ｍｇ／ｍＬアンピシリンおよび１３ｍｇ／Ｌゲンタマイシン（ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）（ＤＥ３））または１００ｍｇ／ｍＬアンピシリン（ＢＬ２１（ＤＥ３））を含有するＬＢ

プレートに播いた。プレートを３７℃で一晩インキュベートした。

【０４８１】

発現研究

溶液１～６および１００ｍｇ／Ｌアンピシリンおよび１３ｍｇ／Ｌゲンタマイシン（ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）（ＤＥ３））または１００ｍｇ／ｍＬアンピシリン（ＢＬ２１（ＤＥ３））を含有するＮｏｖａｇｅｎ Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標） ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ２（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７１３６６）のフラスコに形質転換細胞のパッチプレートから接種した（配列番号８９３／ｐＣＯＬＤＩＩ、配列番号８９３／ｐＣＯＬＤＩＩＩ、および配列番号８９３／ｐＣＯＬＤＩＶ形質転換のそれぞれについて２パッチ）。

３～５時間の３０℃でのインキュベーションの後に、培養物を１５℃インキュベーターに移動した。１５℃インキュベーションを培養物の６００ｎｍでのＯＤが６以上に達するまで継続した。細胞を遠心分離によって収集し、冷緩衝液を用いて洗浄し、次いで、細胞ペレットを－８０℃で凍結させた。

【０４８２】

５μＬ／ｍＬのＰｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ ＩＩ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ／Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ カタログ＃５３９１３２）、１μｌ／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標） Ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７０７４６）、および０．０３３μｌ／ｍｌのｒ－Ｌｙｓｏｚｙｍｅ（商標）溶液（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７１１１０）を含むＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（登録商標）（第一級アミンなし）Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７０９２３）を１ｇの細胞ペレット当たり５ｍＬ細胞に加えることによって細胞抽出物を調製した。細胞懸濁液を１５分間緩やかに混合させながら室温でインキュベートした。２０分間、１４，０００ｒｐｍで遠心し（４℃）、上清を注意深く取り出した。総タンパク質濃度は、標準物としてウシ血清アルブミンおよびマイクロタイタープレートフォーマットを用いて、Ｐｉｅｒｃｅ ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ カタログ＃２３２２５）を使用して決定した。Ｄ－アミノトランスフェラーゼの発現は、１ｍｇ／ｍＬに希釈した細胞抽出物溶液を用いて、メーカーのプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｅｘｐｅｒｉｏｎ（商標） Ｐｒｏ２６０ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ Ｓｔａｔｉｏｎを使用して分析した。結果を表４１および４２に示す。

【０４８３】

表４１

レーン	試料	推定DAT発現%
L	Pro260ラダー	
1	BL21(DE3)::配列番号893/pCOLDII#1	8.7
2	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDII#2	8.5
3	ArcticExpress(商標)(DE3):: 配列番号893/pCOLDII#1	9.8
4	ArcticExpress(商標)(DE3):: 配列番号893/pCOLDII#2	6.4

【０４８４】

表４２

レーン	試料	推定DAT発現%
L	Pro260ラダー	
1	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIII#1	4.3
2	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIII#2	2.3
3	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIV#1	14.6
4	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIV#2	14.2
5	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIII#1	4.4
6	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIII#2	5.2
7	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIV#1	13.8
8	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIV#2	16.1
9	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIV#1	16.2
10	BL21(DE3):: 配列番号893/pCOLDIV#2	16.8

【０４８５】
Ｅｘｐｅｒｉｏｎ　Ｐｒｏ２６０結果は、配列番号８９４　ＤＡＴタンパク質は、核酸をｐＣＯＬＤＩＶベクター中に組み込んだ場合にｐＣＯＬＤＩＩまたはｐＣＯＬＤＩＩＩベクター中よりも良好に発現したことを示す。上記に示される実験から、配列番号８９３／ｐＣＯＬＤＩＩについての平均発現レベルは使用した発現宿主にかかわらず約８％であり、配列番号８９３／ｐＣＯＬＤＩＩＩについての平均発現レベルは約４％であったが、配列番号８９３／ｐＣＯＬＤＩＶについての平均発現レベルは約１５％であった。これらの発現レベルは、配列番号８９３核酸をＧｒｏＥＬ－ＧｒｏＥＳシャペロンと同時発現した実施例１６および核酸をＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＡｒｃｔｉｃＥｘｐｒｅｓｓ（商標）システム中で発現させた場合の実施例１７に記載されるものよりも著しく少なかった。
【０４８６】
［実施例２１］
実施例２１－ＤＡＴのコドン改変
大腸菌における翻訳の速度を遅くすることにより、配列番号８９４ポリペプチドの適切なフォールディングのためにより多くの時間をかけ、それによって可溶性タンパク質のより高い発現がもたらされることを仮定して、大腸菌において発現される配列番号８９４ポリペプチドの可溶性を改善することを試みた。配列番号８９４ポリペプチド配列のＢＬＡＳＴ検索（ＮＣＢＩ）は、最も密接に関連する公表された配列のうちのいくつかが、クロストリジウム種、特にクロストリジウム　ベイジェリンキ由来のものであることを明らかにした。実施例９は、ＣｂＤＡＴのクローニング、発現、およびアッセイからの結果ならびにモナチン形成反応におけるその使用を記載する。特に、発現は総タンパク質画分において高かったが、可溶性タンパク質画分において非常に低かった。
【０４８７】
Ｃ．ベイジェリンキおよび大腸菌Ｋ１２のコドン使用頻度表を比較した。Ｃ．ベイジェリンキにおけるいくつかのまれに使用されるコドンは、大腸菌Ｋ１２において非常に豊富であることが分かった（表４３）。これらのまれなコドンがＣ．ベイジェリンキにおいて翻訳の休止を引き起こすのに対して、大腸菌Ｋ１２宿主において休止がない可能性がある。配列番号８９４配列において、Ｃ．ベイジェリンキについての縦並びのまれなコドンが、大腸菌Ｋ１２において「まれでない」（つまり豊富）ようになった４つのダブレットを同定した。目標は、大腸菌Ｋ１２コドン使用頻度表を使用して、大腸菌Ｋ１２宿主における発現のためにこれらのコドンをまれなコドンに変化させることであった。これらのダブレットを変化させるようにプライマーを設計した。配列番号８９３／ｐＥＴ３０ａ（例４に記載）を鋳型として使用し、変異はＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅキットの指示に従って実行した。配列番号８９３核酸配列を改変するために利用したプライマーを天然の遺伝子と共に下記に示す（標的ダブレット配列に下線を引く）。
【０４８８】

表４３

元のコドン	コドン使用頻度（1000当たり）		変化したコドン	コドン使用頻度
	C.ベイジェリンキ	大腸菌		大腸菌
GCC	3.7	25.6	GCT	15.3
CTG	1.4	52.9	CTA	3.9
ACC	2.5	23.5	ACA	7.0
CGC	0.8	22.0	CGA	3.5
GCG	2.9	33.8	GCT	15.3
CCG	1.1	23.3	CCC	5.4

＞配列番号８９３の天然の配列

ATGGACGCACTGGGATATTACAACGGAAAATGGGGGCCTCTGGACGAGATGACCGTGCCGATGAACGACAGGGGTTGTTT
CTTTGGGGACGGAGTGTACGACGCTACCATCGCCGCTAACGGAGTGATCTTTGCCCTGGACGAGCACATTGACCGGTTTT
TAAACAGCGCAAAGCTCCTGGAAATAGAAATCGGTTTTACAAAAGAGGAATTAAAAAAAACTTTTTTTGAAATGCACTCC
AAAGTGGATAAAGGGGTGTACATGGTTTATTGGCAGGCGACTCGCGGAACAGGCCGTCGAAGCCATGTATTTCCGGCAGG
TCCCTCAAATCTCTGGATTATGATTAAGCCCAATCACGTCGACGATCTTTATAGAAAAATCAAGCTCATTACCATGGAAG
ATACCCGCTTCCTCCACTGCAACATCAAGACCCTTAACCTTATTCCCAATGTCATTGCCTCCCAGCGGGCGCTGGAAGCG
GGCTGCCACGAGGCGGTCTTTCACCGGGGTGAAACAGTAACCGAGTGCGCCCACAGCAATGTCCACATCATTAAAAACGG
CAGGTTTATCACCCACCAGGCGGACAACCTAATCCTTCGGGGCATAGCCCGTAGCCATTTATTGCAAGCCTGTATCAGGC
TGAACATTCCATTTGACGAACGGGAATTTACCCTTTCGGAATTATTTGACGCGGATGAGATTCTTGTGTCCAGCAGCGGC
ACACTCGGCCTTAGCGCCAATACAATTGATGGAAAAAACGTGGGGGGGAAAAGCGCCGGAACTGCTAAAAAAAATTCAGGG
CGAAGTGTTGAGGGAATTTATCGAAGCGACAGGCTACACGCCTGAGTGGAGCACAGTATAG

【０４８９】

ダブレット１変異体用のプライマー

CTAACGGAGTGATCTTTGCTCTAGACGAGCACATTGAC （配列番号1074）

GTCAATGTGCTCGTCTAGAGCAAAGATCACTCCGTTAG （配列番号1075）

ダブレット２変異体用のプライマー

CATGGAAGATACACGATTCCTCCACTGCAACATCAAGAC （配列番号1076）

GTCTTGATGTTGCAGTGGAGGAATCGTGTATCTTCCATG （配列番号1077）

ダブレット３変異体用のプライマー

ATTGCCTCCCAGCGGGCTCTAGAAGCGGGCTGCCACG （配列番号1078）

CGTGGCAGCCCGCTTCTAGAGCCCGCTGGGAGGCAAT （配列番号1079）

ダブレット４変異体用のプライマー

GGGGGGAAAAGCTCCCGAACTGCTAAAAAAAATTCAGG （配列番号1080）

CCTGAATTTTTTTTTAGCAGGTCGGGAGCTTTTCCCCCC （配列番号1081）

【０４９０】

酵素発現アッセイのために、正しく改変された配列を有するクローンをＢＬ２１（ＤＥ３）宿主の中に形質転換した。酵素発現は、Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＩＩにおいて一晩細胞を増殖させ、ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ試薬を用いて細胞を溶解し、その後の粗製細胞抽出物および可溶性タンパク質のＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析によって決定した。

ダブレット１、２、および３にコドンを変化させると、可溶性タンパク質発現においてわずかな改善があったように思われた。ダブレット４でのコドン変化は可溶性タンパク質発現にとって有益ではなかった。ダブレット１、２、および３についてのコドン変化をＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅキットを使用して２つ１組で組み合わせ、最初のコドン変化向けにプライマーを設計した。酵素発現アッセイのために、正しく改変

された配列を有するクローンをＢＬ２１（ＤＥ３）宿主の中に形質転換した。酵素発現は、Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ ＩＩにおいて一晩細胞を増殖させ、ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ試薬を用いて細胞を溶解し、その後の粗製細胞抽出物および可溶性タンパク質のＳＤＳ ＰＡＧＥ分析によって決定した。ダブレット１および２、２および３、ならびに１および３に対する変異の組み合わせは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で目に見える可溶性タンパク質バンドを産出した。しかしながら、総タンパク質画分中により多くのタンパク質がなおあるように思われた。

【０４９１】

［実施例２２］

実施例２２－ＤＡＴポリペプチドの周辺質の発現の評価

配列番号８９４ポリペプチドの可溶性発現は、遺伝子産物を大腸菌宿主ＢＬ２１（ＤＥ３）において細胞質タンパク質として発現させた場合に低かったので（実施例８を参照されたい）、ペリプラズム空間に輸送されるはずである融合タンパク質を生成するために、遺伝子をベクターにクローニングした。ペリプラズムは、適切なフォールディングおよびジスルフィド結合形成を促進し、ある種の標的タンパク質の可溶性および活性を増強する可能性がある条件を提供する。

ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ ｐＥＴ２６ｂへのクローニングは、周辺質シグナル配列を有する標的タンパク質の生成を可能にする。シグナル配列は輸送と同時にシグナルペプチダーゼによって切断される。ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ ｐＥＴ３９ｂおよびｐＥＴ４０ｂは、２０８アミノ酸ＤｓｂＡ－Ｔａｇ（商標）または２３６アミノ酸ＤｓｂＣ－Ｔａｇ（商標）と融合された標的タンパク質のクローニングおよび発現のために設計されている。ＤｓｂＡおよびＤｓｂＣは、それぞれ、ジスルフィド結合の形成および異性化を触媒する周辺質の酵素である。融合タンパク質は典型的にはペリプラズムに局在化している。

【０４９２】

クローニングプロトコール

プラスミド配列番号８９３／ｐＥＴ３０ａ（例４に記載される）からの配列番号８９３核酸を、ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ ｐＥＴ２６ｂ（カタログ ＃６９８６２－３）、ｐＥＴ３９ｂ（カタログ ＃７００９０－３）、およびｐＥＴ４０ｂ（カタログ ＃７００９１－３）ベクターにベクターのＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩの部位にクローニングした。５’ＥｃｏＲＩ部位および３’ＮｏｔＩ部位を有するＤＡＴ核酸を、実施例４に記載される増幅プロトコールおよび以下のプライマーを使用して生成した。

5'-CGCAGAATTCGGACGCACTGGGATATTACAAC-3' (SEQ ID NO:1082)

5'-GTTAGCGGCCGCCTATACTGTGCTCCACTCAG-3' (SEQ ID NO:1083)

【０４９３】

制限部位は、プライマー配列におけるイタリック体（下線部）で示した。結果として生じるＤＮＡ産物ならびにｐＥＴ２６ｂ、ｐＥＴ３９ｂ、およびｐＥＴ４０ｂのベクターを、推奨されるメーカーのプロトコールに従って、ＥｃｏＲ１およびＮｏｔ Ｉ（New England Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて消化した。ベクター反応混合物をＳｈｒｉｍｐ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（Ｒｏｃｈｅ カタログ＃１７５８２５０）を用いて続いて処理した。メーカーのプロトコールに従って、Ｑｉａｇｅｎ ＱＩＡｑｕｉｃｋ（登録商標） Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（カタログ ＃２８７０４）を使用して、１％アガロースゲルから消化ベクターおよび挿入バンドをゲル精製し、Ｒｏｃｈｅ Ｒａｐｉｄ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（カタログ＃１６３５３７９）を使用してライゲーションした。ライゲーション混合物を、４２℃での熱ショックによって、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＯｎｅＳｈｏｔ（登録商標） ＴＯＰ１０化学的コンピテント細胞（カタログ＃ Ｃ４０４００３）に形質転換した。３７℃において１時間の５００Ｌ ＳＯＣ培地中での回収の後に、形質転換混合物を５０ｍｇ／Ｌカナマイシンを含有するＬＢプレートに播き、一晩３７℃でインキュベートした。コロニーを形質転換プレートか

ら選び取り、５０ｍｇ／ｍＬカナマイシンを含有するＬＢの５ｍＬ培養物に接種し、３７℃で一晩インキュベートした。プラスミドＤＮＡを、Ｑｉａｇｅｎ ＱＩＡｐｒｅｐ ｓｐｉｎ ｍｉｎｉｐｒｅｐ ｋｉｔ（カタログ＃２７１０４）を使用して、５ｍＬ培養物から精製した。核酸配列は、配列決定（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｃｏｒｐ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）によって検証した。正確な挿入物配列を有するプラスミドは、上記に記載されるように、熱ショックによって、ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ ＢＬ２１（ＤＥ３）化学的コンピテント細胞（カタログ＃６９４５０）に形質転換した。

【０４９４】

発現研究

溶液１～６および５０ｍｇ／Ｌカナマイシン（各フラスコ中５０ｍＬ）を含有するＮｏｖａｇｅｎ Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標） ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ ２（ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ カタログ＃７１３６６）のフラスコに、ｐＥＴ２６ｂ、ｐＥＴ３９ｂ、またはｐＥＴ４０ｂ中の配列番号８９３ ＤＡＴ核酸（配列番号８９４のポリペプチドをコードする）を運ぶＢＬ２１（ＤＥ３）細胞の新鮮なプレートから接種した。細胞を一晩３０℃でインキュベートし、OD_{600}が６以上に達したら、遠心分離によって細胞を収集した。細胞を冷緩衝液を用いて洗浄し、再度遠心分離し、直ちに使用、または細胞ペレットを－８０℃で凍結した。収集前に、２ｍＬ培養物のアリコートを可溶性および総タンパク質（可溶性および不溶性）発現分析のために各フラスコから回収した。実施例１６に記載されるように細胞抽出物を調製した。総タンパク質試料は、２％ＳＤＳ、１０％グリセロール、１２．５％ ２－メルカプトエタノール、０．１％ブロモフェノールブルー、および６２．５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８を含有するタンパク質添加緩衝液中に少量の細胞ペレットを懸濁し、１０分間、９５℃でインキュベートすることによって調製した。

【０４９５】

ペリプラズムの細胞性画分を、ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｎｏｖａｇｅｎ ｐＥＴ Ｓｙｓｔｅｍ Ｍａｎｕａｌに記載されるプロトコールに従って、各培養物からの細胞の残りから調製した。結果として生じる画分を、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａｃｅｌ １０ｋ遠心濾過デバイス（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ カタログ＃ＵＦＣ９０１０２４）を使用して３０倍に濃縮した。細胞抽出物および周辺質画分の総タンパク質濃度は、標準物としてウシ血清アルブミンおよびマイクロタイタープレートフォーマットを用いて、Ｐｉｅｒｃｅ ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ カタログ＃２３２２５）を使用して決定した。細胞抽出物の１５ｇのタンパク質試料および周辺質画分の１０ｇのタンパク質試料は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｒｅａｄｙ Ｇｅｌ（登録商標） Ｐｒｅｃａｓｔ ４～１５％ポリアクリルアミド勾配ゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ カタログ＃１６１－１１０４）を使用してＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。さらに、総タンパク質試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。ＢｉｏＲａｄ ＳＤＳ－ＰＡＧＥ低範囲標準物（カタログ＃１６１－０３０４）を各ゲル上で標準物として泳動した。

総タンパク質ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの分析は、予測された分子量を有するタンパク質が、Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標） ＡｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎＳｙｓｔｅｍ２を使用して発現したことを示す。しかしながら、細胞抽出物画分または周辺質画分を添加したＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの分析は、これらのタンパク質が可溶性に発現せず、それらがペリプラズムに輸送されなかったことを示唆する。

【０４９６】

［実施例２３］

実施例２３－インドール－３－ピルビン酸からのモナチンの生成

Ｄ－トリプトファンおよびピルビン酸が実施例５に記載されるモナチン形成アッセイにおける出発原材料である場合、得られるモナチンの最大濃度はトリプトファンの可溶性によって制限される。より高いモナチン濃度に達するためにアルドラーゼおよび配列番号２２０ ＤＡＴポリペプチド（実施例１４に記載される）を使用する可能性を調査するため

に、原材料としてインドール－３－ピルビン酸（Ｉ３Ｐ）およびピルビン酸から開始する反応を分析した。この場合、Ｄ－アラニンまたはは Ｄ－アラニンおよび Ｄ－トリプトファンの両方などのアミノドナーを供給することもまた必要であった。

試験は、精製配列番号２２０　ＤＡＴポリペプチド（生成および精製は実施例１５に記載される）およびアルドラーゼ（例６に記載される）を使用して行った。反応を、以下のように設定した（合計１ｍＬ中）：２００ｍＭインドール－３－ピルビン酸（Ｉ３Ｐ）；２００ｍＭピルビン酸ナトリウム；４００ｍＭ　Ｄ－アラニン；１００ｍＭ　ＥＰＰＳ、ｐＨ８．０；１ｍＭ　$MgCl_2$；０．０５　ｍＭ　ＰＬＰ；および１０ｍＭリン酸カリウム。

両酵素は、モナチンへの変換を促進するために過剰に加え、非酵素分解反応からの競合を最小限にした。反応は、酸素への曝露を最小限にするために、Ｃｏｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．無酸素チャンバーにおいて室温でインキュベートした。酵素以外のすべての成分を共に混合し、ｐＨを８．０に調節した。酵素（細胞抽出物としての０．０４ｍｇ／ｍＬアルドラーゼ（２０％の発現を仮定）および０．４０ｍｇ／ｍＬ精製配列番号２２０　ＤＡＴポリペプチド）の添加によって反応を開始させた。

下記の表において示されるいくつかの試験において、Ｄ－トリプトファンもアミノドナーとして作用し、さらに、Ｄ－トリプトファンの形成において消費されるインドール－３－ピルビン酸の量を制限するように、Ｄ－アラニンに加えて５０または１００ｍＭで加えた。実施例３に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて１８時間後にモナチン形成を測定し、結果を下記の表４４に示す。

【０４９７】

表４４．Ｉ３Ｐからのモナチン形成（ｍＭ）

反応物開始濃度(mM)	モナチン濃度(mM)
200 I3P; 200 pyr: 400 D-ala	44.9
200 I3P; 200 pyr: 400 D-ala, 50 D-trp	47.8
200 I3P; 200 pyr: 400 D-ala, 100 D-trp	61.0

【０４９８】

上記に示されるように、アミノトランスフェラーゼおよびアルドラーゼの酵素は、より高い反応物濃度で活性であり、はるかに高いモナチン濃度が達成された。

１８時間で、２００ｍＭインドール－３－ピルビン酸、２００ｍＭピルビン酸ナトリウム、および１００ｍＭ　Ｄ－トリプトファンを使用すると、モナチンの濃度は６１ｍＭであった。４００ｍＭ　Ｄ－アラニンのみの使用に対して、５０ｍＭ　Ｄ－トリプトファンを添加すると、モナチン生成におけるわずかな増加（４７．８ｍＭ）がアッセイの条件下で観察された。

【０４９９】

［実施例２４］

実施例２４－相同性表

表４５は、公開されたデータベースまたは文献からの、最も活性なＤＡＴポリペプチドおよび対応する最も密接な相同体のいくつかを示す。

【０５００】

表４５

DATポリペプチド(配列番号)	データベースからの最も密接なヒット	配列同一性%
896	バチルス種YM-1	76
874	アシディフィラム　クリプタムJF-5由来のセリングリオキシル酸トランスアミナーゼ(NR受入番号148260372)	51
878	プランクトミセス　マリスＤＳＭ　8797由来の推定上のグルタミン酸－１－セミアルデヒド２，１－アミノムターゼ(NR受入番号149173540)	43
882	オセアノバクター種RED65由来のＤ－アラニントランスアミナーゼ(NR受入番号94500389)	57
910	B.マセランス由来のDAT	91
176	クロストリジウム　ベイジェリンキ由来のD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(NCIMB 8052)	62
220	クロストリジウム　ベイジェリンキ由来のD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(NCIMB 8052)	62
156	クロロフレクサス　アグレガンスDSM 9485由来のアミノトランスフェラーゼ　クラスIII（リーダーあり）(NR受入番号118045454)	46
214	クロストリジウム　ベイジェリンキ由来のD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(NCIMB 8052)	61
918	ロビジニタレア　ビフォルマタHTCC2501由来のアミノトランスフェラーゼ　クラスIV(NR受入番号88806011)	57
902	プランクトミセス　マリスDSM 8797由来の推定上のグルタミン酸-1-セミアルデヒド2,1-アミノムターゼ(上記と同じタンパク質)	46
884	チオバチルス　デニトリフィカンスATCC 25259由来のD-アラニントランスアミナーゼ(NR受入番号74316285)	40
866	ラクトバチルス　サリバリウス亜種サリバリウスUCC118由来のＤ－アラニンアミノトランスフェラーゼ	49
946	クロストリジウム　ベイジェリンキ由来のD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(NCIMB 8052)	63

【０５０１】

実施例９に示されるように、配列番号８６６、９４６、２２０、および１７６に示される配列を有するポリペプチドの相同体をクローニングし、さらに、４９％および６３％の間であるそれらのポリペプチドの間の配列同一性にもかかわらず、これらのポリペプチドはＲ，Ｒモナチンの生成における活性を有した。同様に、オセアノバクター種からの予測されるＤ－アラニントランスアミナーゼおよびロビジニタレア　ビフォルマタアミノトランスフェラーゼは、配列番号８８２および９１８の配列を有するＤＡＴポリペプチドのように、広いＤ－アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有することが予想される。

【０５０２】

［実施例２５］

実施例２５－ＧＳＳＭ^{SM}変異体の構築および試験

この実施例は、例示的な核酸およびポリペプチドの構築を記載し、それらの酵素活性を記載する。ヌクレオチド配列（配列番号２１９）をｐＳＥ４２０Ｃ－Ｈｉｓベクターにサ

ブクローニングし、大腸菌ＸＬ１－ＢＬＵＥ宿主（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）において発現させ、配列番号２２０に示されるアミノ酸配列を有する例示的なＤ－アミノトランスフェラーゼ（ＤＡＴ）酵素を生成した。ｐＳＥ４２０Ｃ－Ｈｉｓベクターは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）からのｐＳＥ４２０ベクターにＣ末端Ｈｉｓタグを加えることによって作製した。構築物配列番号２２０（大腸菌ＸＬ１－ＢＬＵＥ中）を、改変が導入され、本明細書において野生型（ＷＴ）配列と呼ばれる出発配列として使用した。改変（つまり単一残基変異）の第１ラウンドは、Ｇｅｎｅ Ｓｉｔｅ Ｓａｔｕｒａｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ[SM]（ＧＳＳＭ[SM]）技術を使用して行った（たとえば米国特許第６，１７１，８２０号を参照されたい）。ＧＳＳＭ[SM]技術を使用して作製した変異体を、大腸菌宿主ＸＬ１－ＢＬＵＥ中のｐＳＥ４２０Ｃ－Ｈｉｓベクターにおいて発現させ、３８４ウェルプレートに並べ、一晩３７℃で増殖させた。試料を継代培養し、２晩（３６～４８時間）３０℃で増殖させた。培養物は、細胞溶解物を調製することができるまで－２０℃で凍結した。

【０５０３】

細胞は、それぞれのウェルへ１０μＬのＢＰＥＲ ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を添加することによって溶解した。試料を３回混合し、１時間、氷上で溶解した。次いで、粗製溶解物を一次スクリーニングにおいてアッセイした。２５μＬの粗製溶解物を、室温にて５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ８）中の１ｍＭ Ｒ，Ｒ－モナチン、２５ｍＭピルビン酸ナトリウム塩、０．０８ｍＭ ＰＬＰを用いてアッセイした。３時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加えた。標準曲線の範囲内となるように、水を用いて試料を希釈した。実施例１に記載したＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法を使用して、モナチン消費およびアラニン形成について試料を分析した（Ｄ－アラニンまたはＲ，Ｒ－モナチンを検出するためのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法）。試料性能を野生型コントロール（つまり配列番号２２０）の性能と比較した。

【０５０４】

野生型コントロールより性能が優れた変異体をＧＳＳＭ[SM]一次スクリーニングからヒットとして選択した。一次ヒットのグリセロールストックを使用して新しい３８４ウェルプレートに接種した。ヒットを、一次スクリーニングについて示したように、四連で配置して増殖させ、溶解した。次いで、一次ヒットを二次スクリーニングにおいて試験した。二次スクリーニング法は、変異体を１ｍＭおよび１５ｍＭ Ｒ，Ｒ－モナチン基質を用いて試験した以外は一次スクリーニングと同じとした。ＬＣ／ＭＳ／ＭＳを使用して、モナチン消費およびアラニン形成について試料を分析した。試料性能を野生型コントロールの性能と比較した。

【０５０５】

試料性能を、アラニン生成およびモナチン消費に基づいてスコアリングシステムを使用して評価した。単一試料についての最高スコアは６であった。最大３ポイントをアラニン生成に割り当て、最大３ポイントをモナチン消費に割り当てた。スコアリング基準は以下のとおりとした：１ポイントが、ポジティブコントロールの平均および１標準偏差の間の値について割り当てられる；２ポイントが、ポジティブコントロールの１および２標準偏差の間の値について割り当てられる；３ポイントが、ポジティブコントロールを２標準偏差超える値について割り当てられる。

変異体についての最も高い可能性のある総スコアは４８であった（試料を、１および１５ｍＭモナチンで四連でスクリーニングしたので）。一般的に、２０ポイントまたはそれ以上のスコアの変異体を二次ヒットとして選択した。しかしながら、２０ポイント未満のスコアの試料についていくつかの例外を設けた。閾値必要量に近いアラニン形成およびモナチン消費の値を有する試料もヒットとして選択した。これは、ヒットの早まった排除を予防し、三次スクリーニングにおけるさらなる試験および特徴づけを可能にした。

【０５０６】

上記の基準を使用して二次スクリーニングヒットとして同定された試料を表４６に挙げる。二次ヒットを、１００μｇ／ｍｌカルベニシリンを含有するＬＢ寒天プレート上にグ

リセロールストックから画線し、３７℃で一晩増殖させた。単一コロニーを使用してカルベニシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含有する１ｍＬ　ＬＢに接種した。培養物を３７℃で一晩増殖させた。ＤＮＡを培養物から単離し、次いで調製し、３７３０ＸＬ自動配列決定装置（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を使用して配列決定した。

【０５０７】

二次ヒットについての変異および変異のアミノ酸位置を表４６において下記に挙げる。アミノ酸位置のナンバリングは、Ｎ末端メチオニンから開始する。たとえば、挙げられる最初の変異「Ｙ６Ｌ」は、野生型酵素（配列番号２２０）のアミノ酸位置６においてチロシンがロイシンに変化したことを指す。核酸レベルで、所望の（変異）アミノ酸をコードする任意のコドンを使用することができる。

【０５０８】

表４６、４７、および５３に記載されるアミノ酸配列はすべて例示的なポリペプチドであり、そのようなポリペプチドをコードする核酸配列もまた提供される。

【０５０９】

［実施例２６］

実施例２６－ＧＳＳＭ^{SM}変異のリスト

表４６：二次スクリーニングヒットとして同定されたＧＳＳＭ^{SM}変異体

変異体名	変異	変異体名	変異
1	Y6L	92	D2G
2	Y6C;サイレント変異AT AA31 (GGC → GGT)	93	D2Q
3	Y6F	94	D2F
4	Y6L	95	D2A
5	Y6H	96	D2T
6	Y6L	97	D2N
7	Y6M	98	D2R
8	N10S	99	D2I
9	N10W	100	D2V; G9A
10	N10T	101	G12A
11	N10R	102	D47W
12	N10T	103	S56S
13	L14V	104	I64H
14	L14L	105	L66L
15	G41G	106	I64C
16	T18W	107	L66G
17	N40N	108	E69Y
18	V19T	109	T74L
19	V42V	110	K73L
20	I62C	111	T74V
21	V82A	112	T74M
22	A57M	113	T74R
23	V42M	114	T74A
24	G41Y	115	N76C
25	A45L	116	E77R
26	V93Y	117	R156A
27	V93G	118	K72M
28	L46A	119	S205A
29	L46H	120	Q209S
30	G98A	121	V212E
31	P20S	122	R213W
32	V93A	123	I216T
33	V103T	124	P217H
34	P108F	125	P217V
35	V93L	126	D219F
36	S101S	127	E220V
37	A106G	128	R221E
38	S101Q	129	F223C

39	P108T	130	S226P
40	N118G	131	L228F
41	P108C	132	V234A
42	I120L	133	S238S
43	A106W	134	V236T
44	N118R	135	V236T
45	N110A; N118G	136	T241R
46	N118A	137	L242F
47	N118R	138	T241R
48	P117W; N118K	139	T241C
49	D133N	140	E248F
50	K126Q	141	D250E
51	K126R	142	K257V
52	K128S	143	G256K
53	I127M	144	E260G
54	T131T	145	L262R
55	D133L	146	K263M
56	M132A	147	D267G
57	D133E	148	D267R
58	L129V	149	I265L
59	K126K	150	E268S
60	I130M	151	L270S
61	M132Y	152	L270G
62	K128R	153	L270W
63	M132R	154	R271S
64	L129I	155	I274W
65	K128L; D2D (GAC → GAT)	156	G278S
66	F137W	157	Y279C
67	I152V	158	S284R
68	N55L	159	E282G
69	N150S	160	T280N
70	L138L	161	V286G
71	P149P	162	R285F
72	G161G	163	V286R
73	A165T	164	G240G
74	H163R	165	E61R
75	H163K	166	E61D
76	H168A	167	E61Y
77	E171S	168	G85G
78	E171R	169	G85D

79	E171R	170	S80R
80	T172I	171	Y79R
81	C176G	172	Y79V
82	A177S	173	W283V
83	A177S	174	W283E
84	S80L; R156W	175	W283A
85	H182G	176	W283S
86	N186S	177	W283G
87	K185R	178	W283A
88	K185T	179	W283R
89	D2H	180	W283T
90	D2T; E260G	181	P281W
91	D2Y	182*	V236T; T241R

*変異体１８２は、鋳型として変異体１３６　ＤＮＡを使用する部位特異的変異導入を使用し、次いで、Ｖ２３６Ｔ変異を導入して作製した。当業者は、部位特異的変異導入技術を使用してこの遺伝子を合成することができる。

【０５１０】

次いで、表４６に挙げた試料を三次スクリーニングのために調製した。グリセロールストックを使用して、１００μｇ／ｍｌカルベニシリンを含有する５ｍＬのＬＢに接種した。培養物を３７℃で一晩増殖させた。次いで、一晩培養物を使用して、２５０ｍＬバッフルフラスコ中の、１００μｇ／ｍｌカルベニシリンを含有するＬＢの５０ｍＬ培養物に０．０５のOD_{600nm}になるように接種した。OD_{600nm}が０．４～０．８に達したら、ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで加えた。培養物を３０℃で一晩誘発した。細胞ペレットを２０分間の６，０００ｒｐｍでの遠心分離によって収集した。細胞ペレットは細胞溶解物を調製することができるまで－２０℃に凍結した。細胞は、１時間、氷上で、ＢＰＥＲ　ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いて溶解した。清浄化した溶解物を３０分間の１２，０００ｒｐｍでの遠心分離によって調製した。

【０５１１】

タンパク質を、メーカーの指示に従って、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｂｒａｄｆｏｒｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）によって定量した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析およびデンシトメトリーを使用して、発現したＤ－アミノトランスフェラーゼの量を決定した。試料を、発現したＤ－アミノトランスフェラーゼについて正規化した。０．０２ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－アミノトランスフェラーゼを三次スクリーニングにおいて試験した。三次スクリーニング法は、時間的経過を示すために０、５、１０、１５、３０、６０、１２０、および２１０分間で試料を得た以外は二次スクリーニング法と同じとした。アラニン生成およびモナチン消費の値をＬＣ／ＭＳ／ＭＳ分析によって測定し、標準曲線と比較した。試料を野生型コントロールと比較した。

野生型コントロールよりも高い最終タイターまたは速い初速度を有する試料をヒットとして同定し、上方変異体（ｕｐｍｕｔａｎｔ）と呼ぶ。三次スクリーニングにおいて同定されたＧＳＳＭ^{SM} 上方変異体を表４７に挙げる。これらの上方変異体を下記の実施例２７においてさらに記載する。

【０５１２】

［実施例２７］

実施例２７－ポリペプチド上方変異体の酵素活性

この実施例は、本明細書において示される例示的な上方変異体ポリペプチド、たとえば表４７に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの酵素活性を実証するデータを記載する。表４７は、１ｍＭおよび１５ｍＭ　Ｒ，Ｒ－モナチン基質を使用する反応における、１５分間の時点での野生型コントロールと比較した上方変異体の活性を示す。相対的

活性は、試料によって生成されたアラニンの量を野生型コントロールによって生成されたアラニンの量で割った値である。

【０５１３】

表４７：三次スクリーニングにおけるＧＳＳＭ　上方変異体の活性

変異体	変異	野生型コントロール（配列番号220）と比較した活性	
		1 mMモナチン基質を用いる反応	15 mMモナチン基質を用いる反応
23	V42M	1.28	1.04
24	G41Y	1.37	1.31
27	V93G	1.73	1.98
31	P20S	1.29	1.60
35	V93L	1.14	0.96
40	N118G	2.61	1.52
44	N118R	1.55	0.47
45	N110A; N118G	2.50	2.02
46	N118A	2.28	0.69
48	P117W; N118K	2.54	1.12
58	L129V	1.04	0.85
66	F137W	1.25	1.44
67	I152V	1.19	1.24
81	C176G	1.11	1.27
82	A177S	1.24	1.02
104	I64H	1.37	1.07
109	T74L	1.37	1.31
110	K73L	2.83	3.75
111	T74V	1.99	2.19
112	T74M	1.78	2.01
135	V236T	3.44	2.88
136	T241R	2.64	1.79
152	L270G	1.24	0.89
153	L270W	2.00	1.54
174	W283E	1.23	0.84
175	W283A	1.61	1.09
177	W283G	1.71	1.06
6	Y6L	2.52	2.21
88	K185T	1.04	0.95
107	L66G	1.08	1.02

【０５１４】

試験した条件下で野生型コントロールより性能が優れたいくつかの試料を同定した。可能性のあるK_mおよびV_{max}　上方変異体を同定した。これらの結果は、野生型コントロール（配列番号２２０）が、モナチンに対する特異的なＤ－アミノトランスフェラーゼ活性の増加についてさらに進化可能であることを示す。

【０５１５】

［実施例２８］

実施例２８－モナチンプロセスにおけるＧＳＳＭ^{SM}変異体の活性

ｐＳＥ４２０－Ｃ－ＨｉｓにおけるＧＳＳＭ　ＤＡＴの分析

この実施例は、本明細書において示される例示的なポリペプチドの酵素活性を実証する

データを記載する。変異体２７、変異体４４、変異体５８、変異体１１９、変異体１３５、変異体１３６、変異体１５２、変異体１５４、および野生型コントロール（実施例２５および２６に記載されるように、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ中のベクターｐＳＥ４２０－Ｃ－Ｈｉｓ中）を、アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を有するＬＢ培地を含有する寒天プレート上に画線した。単一コロニーをアンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含有する５ｍＬのＬＢ培地に接種した。５００μｌを、２５０ｍＬバッフルフラスコ中の５０ｍＬの同じ培地に接種した。細胞を３０℃にて約０．４のOD_{600nm}まで増殖させた。ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで加えた。細胞を４時間３０℃で増殖させ、遠心分離によって収集した。細胞抽出物を調製するまで細胞を－８０℃で直ちに凍結させた。

【０５１６】

実施例４に記載したように細胞抽出物を調製した。タンパク質濃度を、メーカーの指示にしたがって、標準物としてＢＳＡ（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いるＢＣＡ（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）マイクロタイタープレートアッセイを使用して決定した。無細胞抽出物におけるＤ－アミノトランスフェラーゼの濃度を評価するためにＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を行い、目視による評価を発現のパーセンテージを評価するために使用した。ＤＡＴタンパク質は、総タンパク質のパーセンテージとして１０～２５％の発現の範囲において可溶性であり、これをアッセイの用量を計算するために使用した。

【０５１７】

０．１ｍｇ／ｍＬアルドラーゼおよび０．２ｍｇ／ｍＬのＤＡＴと共に、１００ｍＭ ＥＰＰＳ緩衝液 ｐＨ７．８、１ｍＭ $MgCl_2$、０．０５ｍＭ ＰＬＰ、２００ｍＭピルビン酸ナトリウム、１０ｍＭリン酸カリウム、０．０１％ Ｔｗｅｅｎ－８０を含有するＲ，Ｒモナチン形成アッセイを室温にて４ｍＬ反応において行った。変異体２７は０．２ｍｇ／ｍＬの代わりに０．１５ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ酵素を使用した。０．５、１、２、４、および２３時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を遠心し、濾過した。実施例３６に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、モナチンについて試料を分析した。結果を表４８に示す。

【０５１８】

表４８：ＤＡＴの活性（ｐＳＥ４２０－Ｃ－Ｈｉｓにクローニング）

DATポリペプチド	モナチン(mM) 0.5時間	モナチン(mM) 1時間	モナチン(mM) 2時間	モナチン(mM) 4時間
野生型コントロール	2.12	5.26	9.34	13.05
変異体27	4.74	9.55	14.72	18.06
変異体44	3.73	6.61	10.38	13.23
変異体58	3.61	7.51	11.85	14.56
変異体135	3.50	7.72	12.50	16.17
変異体136	1.40	4.63	6.59	--
変異体152	4.79	9.19	13.08	14.85
変異体154	3.76	7.66	11.85	14.38

【０５１９】

表４８に示すデータから分かるように、ＧＳＳＭ^{SM}進化を通して得た多くのＤＡＴ変異体は、アッセイの条件下で野生型コントロールに対するモナチン形成の初速度の改善を示した。

【０５２０】

ｐＭｅｔ１ａにおけるＧＳＳＭ^{SM} ＤＡＴの分析

この実施例は、本明細書において示される例示的なポリペプチドの酵素活性を実証するデータを記載する。変異体２、変異体６、変異体１１、変異体２７、変異体４０、変異体４４、変異体４５、変異体５８、変異体１１０、変異体１３５、および変異体１３６を、

メーカーの指示に従って、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ Ｍｕｌｔｉ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を使用して、部位特異的変異導入によって再構築した。変異体を生成するために、実施例１６に記載されるｐＭＥＴ１ａタグ付き構築物（ｐＭＥＴ１ａ：配列番号２２０（ＷＴ））を鋳型として使用した。使用した変異導入性のプライマーを、表４９において下記に挙げる。ＰＣＲフラグメントを、１時間、Ｄｐｎ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を用いて消化し、大腸菌Ｔｏｐ１０細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）に形質転換した。結果として生じた精製プラスミド調製物は、正確な変異が組み込まれたことを確認するために配列決定した（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）。次いで、プラスミドを大腸菌Ｂ８３４（ＤＥ３）発現宿主（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に形質転換した。

【０５２１】

表４９：変異導入用のプライマー

産生した変異体	PCRプライマー	鋳型
変異体2	5’-ATG GAC GCA CTG GGA TGT TAC AAC GGA AAT TGG -3’（配列番号1084） 5’- CCA ATT TCC GTT GTA ACA TCC CAG TGC GTC CAT -3’（配列番号1085）	配列番号220
変異体6	5’- ATG GAC GCA CTG GGA CTT TAC AAC GGA AAT TGG GGG-3’（配列番号1086） 5’- CCC CCA ATT TCC GTT GTA AAG TCC CAG TGC GTC CAT-3’（配列番号1087）	配列番号220
変異体27	5’- TAC CTG GTT TAT TGG CAG GGT ACT CGC GGA ACA GGC CGG-3’（配列番号1088） 5’- CCG GCC TGT TCC GCG AGT ACC CTG CCA ATA AAC CAG GTA-3’（配列番号1089）	配列番号220
変異体40	5’- CTC TGG ATT ATA ATT AAG CCC GGC CAC ATC GAC AAT CTT TAT AG -3’（配列番号1090） 5’- CTA TAA AGA TTG TCG ATG TGG CCG GGC TTA ATT ATA ATC CAG AG -3’（配列番号1091）	配列番号220
変異体44	5’- CTC TGG ATT ATA ATT AAG CCC AGG CAC ATC GAC AAT CTT TAT AG-3’（配列番号1092） 5’- CTA TAA AGA TTG TCG ATG TGC CTG GGC TTA ATT ATA ATC CAG AG-3’（配列番号1093）	配列番号220
変異体45	5’- GTA TTT CCG GCA GGC CCT TCA GCG CTC TGG ATT ATA ATT AAG CC -3’（配列番号1094） 5’- GGC TTA ATT ATA ATC CAG AGC GCT GAA GGG CCT GCC GGA AAT AC -3’（配列番号1095）	変異体40
変異体58	5’- CAA TCT TTA TAG AAA AAT CAA GGT TAT TAC CAT GGA TGA TAC CCG C 3’（配列番号1096） 5’- GCG GGT ATG ATC CAT GGT AAT AAC CTT GAT TTT TCT ATA AAG ATT G -3’（配列番号1097）	配列番号220
変異体110	5’- CTT AAC AAA AGA GGA ATT GAA ACT GAC TTT AAA TGA AAT GTA CTC C-3’（配列番号1098） 5’- GGA GTA CAT TTC ATT TAA AGT CAG TTT CAA TTC CTC TTT TGT TAA G -3’（配列番号1099）	配列番号220
変異体135	5’- TTC GAC GCG GAC GAG GTG CTT ACT TCC AGC AGC GGC ACA CTC G-3’（配列番号1100） 5’- CGA GTG TGC CGC TGC TGG AAG TAA GCA CCT CGT CCG CGT CGA A-3’（配列番号1101）	配列番号220
変異体136	5’- TGC TTG TGT CCA GCA GCG GCC GGC TCG GCC TTA GCG CCG-3’（配列番号1102） 5’- CGG CGC TAA GGC CGA GCC GGC CGC TGC TGG ACA CAA GCA-3’（配列番号1103）	配列番号220

【０５２２】

変異体２、変異体６、変異体２７、変異体４０、変異体４５、変異体５８、変異体１１０、変異体１１９、変異体１３１、変異体１３５、変異体１３６、変異体１５２、変異体１５４はｐＭＥＴ１ａベクター中で生成され、これらで実施例２に記載した適合性の大腸菌発現宿主Ｂ８３４（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａ）を形質転

換した。カルベニシリン（１００μｇ／ｍＬ）を含有するＬＢ培地中の一晩培養物を１００ｍＬの同じ培地において希釈して１：１００にし、５００ｍＬバッフルフラスコで増殖させた。培養物を、Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＩＩ培地（Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　１～６（Ｎｏｖａｇｅｎ））において１０のＯＤ$_{600nm}$まで一晩３０℃で増殖させた。総タンパク質のための試料は収集の直前に得た。細胞を遠心分離によって収集し、１０ｍＬのリン酸カリウム緩衝液　ｐＨ７．８を用いて１回洗浄した。細胞は、細胞抽出物を調製するまで－８０℃で直ちに凍結させた。部位特異的変異導入に加えて、当業者は、実施例２５に記載されるような多重変化変異導入ＰＣＲ技術を使用して、これらのＤ－アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子を合成することができることに注目されたい。

【０５２３】

ＰＤ１０カラムを溶離し平衡化するための緩衝液として１００ｍＭリン酸カリウムを使用して、実施例４に記載されるように細胞抽出物を調製および脱塩した。総タンパク質およびＤＡＴの濃度を記載されるように決定した。

【０５２４】

アミノ受容体としてピルビン酸を用いるＲ，Ｒモナチンのアミノ基転移は、１５ｍＭＲ，Ｒモナチンを利用したことを除いて実施例５に記載されるように行った。アラニン、モナチン、およびモナチン前駆体レベルの開始分析により、表５０に示されるように最も高いレベルのアラニン生成をもたらす優れた変異体として変異体４０、変異体１３５、および変異体１３６が同定された。ＤＡＴ変異体１３６はＲ－ＭＰへのＲ，Ｒモナチンの変換のための最も高い活性を有するように思われる。様々な時点についてのアラニン生成数（ｍＭ）を表５０に示す。

【０５２５】

表５０：ｐＭＥＴ１ａにクローニングしたＤＡＴのＲ，Ｒモナチンアミノ基転移反応によるアラニン形成（ｍＭ）

DATポリペプチド	アラニン(mM) 15分間	アラニン(mM) 30分間	アラニン(mM) 60分間	アラニン(mM) 120分間
野生型コントロール	3.08	5.47	8.19	10.07
変異体2	3.38	5.74	8.85	10.52
変異体6	3.51	5.97	8.99	10.81
変異体27	4.36	8.00	10.72	10.52
変異体40	7.89	10.37	11.79	12.50
変異体44	2.65	4.58	7.18	--
変異体58	3.90	6.95	9.93	10.52
変異体110	3.50	6.17	9.53	10.52
変異体135	5.35	8.64	10.82	10.91
変異体136	6.24	9.46	11.24	11.15
変異体152	4.26	7.12	9.83	10.32
変異体154	4.16	7.13	10.07	10.76

--：この条件下で決定されず

【０５２６】

活性をさらに評価するために、約０．２ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ濃度を用いて実施例１に記載されるようにモナチン形成アッセイを行った。コントロールとして０．２ｍｇ／ｍＬ濃度の精製野生型ＤＡＴを評価した。０．５、１、２、および４時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を遠心し、濾過した。本明細書に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチンについてならびに実施例３６に記載されるＬＣ／ＯＰＡポストカラム蛍光方法論を用いてトリプトファンおよびアラニンについて試料を分析した。

【０５２７】

表５１：ｐＭＥＴ１ａにおけるＤＡＴの活性

DATポリペプチド	モナチン(mM) 0.50時間	モナチン(mM) 1.00時間	モナチン(mM) 2.00時間	モナチン(mM) 4.00時間
野生型コントロール	3.96	7.83	9.70	11.18
変異体2	1.56	3.78	8.77	12.68
変異体27	4.70	9.70	n.d.	13.80
変異体44	3.03	5.61	8.50	12.28
変異体45	1.40	4.00	7.70	11.50
変異体58	3.83	7.23	11.33	14.12
変異体110	2.60	5.90	9.90	12.70
変異体119	4.12	7.87	11.37	13.50
変異体131	3.75	7.41	11.40	13.90
変異体135	6.39	10.65	13.49	13.15
変異体136	3.36	8.02	12.86	13.16
変異体154	3.00	6.06	10.67	13.17

【０５２８】

表５１に示されるＤＡＴはすべてモナチンを生成した。ＤＡＴ変異体である変異体５８、変異体１３５、および変異体１３６は野生型コントロールよりも速い初速度を有した。変異体１３６は反応１（Ｄ－ＴｒｐからＩ３Ｐへの変換）についてより遅かったが、野生型コントロールよりも良好な全体的なモナチン生成を有した。

実施例３６に記載されるＦＤＡＡ誘導体化方法論を用いて生成されたモナチンの立体異性体分布を決定するために、最終時点でさらなるアリコートを得た（ギ酸の添加を伴わないで）。試験し、選択した変異体については立体純度への影響はほとんどまたは全くなかった。すべての場合において、変異体は試験したアッセイ条件下で９８．８％以上のＲ，Ｒを生成した。これらの結果を表５２に示す。

【０５２９】

表５２：選択した変異体によって４時間で産生されたモナチンの立体純度

DATポリペプチド	%SS	%RS	%RR	%SR
野生型(pMet1a)コントロール	0.00	0.40	99.30	0.20
変異体6	0.00	0.40	99.50	0.10
変異体27	0.00	0.80	98.80	0.30
変異体40	0.00	0.20	99.80	0.00
変異体45	0.00	0.50	99.40	0.10
変異体110	0.10	0.40	99.30	0.10
変異体135	0.00	0.40	99.50	0.10
変異体136	0.02	1.00	99.00	0.03

【０５３０】

［実施例２９］

実施例２９－Ｔａｉｌｏｒｅｄ Ｍｕｌｔｉ－Ｓｉｔｅ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ａｓｓｅｍｂｌｙ（ＴＭＣＡ^{SM}）変異体の構築および試験

この実施例は、例示的な核酸およびポリペプチドの構築を記載し、それらの酵素活性を記載する。ＧＳＳＭ変異のサブセットを、Ｔａｉｌｏｒｅｄ Ｍｕｌｔｉ－Ｓｉｔｅ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ａｓｓｅｍｂｌｙ^{SM}（ＴＭＣＡ^{SM}）技術を使用する組み合わせのために選択した。１または１５ｍＭモナチン反応における、ＧＳＳＭ進化からの上位１０の性能の良いものをＴＭＣＡ^{SM}進化のために選択した。野生型配列（配列番号２２０）を、３ＤＡＡ－Ｄ－アミノ酸アミノトランスフェラーゼのモデル上に通した（図８）。図８におけるモデルは、ピリドキシル－５’－リン酸Ｄ－アラニンと共に示され、ナンバリングした残基は、ＴＭＣＡ^{SM}進化のために選択した部位を示す。表５３はＴＭＣＡライ

ブラリーへの包含のために選択した変異も列挙する。ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ０８／０７１７７１に記載される方法を使用してＴＭＣＡ進化を野生型（配列番号２２０）および変異体４５に対して行った。

【０５３１】

ＴＭＣＡ進化はＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ０８／０７１７７１に記載されており、多数の部位で様々な変異の異なる組み合わせを有する複数の後代ポリヌクレオチドを生成するための方法を含む。この方法は、以下のステップの少なくとも１つまたは複数の組み合わせによって部分的に行うことができる。

（「第１の」または「鋳型」）ポリヌクレオチドの配列情報を得るステップ

たとえば、第１のまたは鋳型配列は野生型（たとえば配列番号２２０）または変異（たとえば変異体４５）配列とすることができる。配列情報は、完全なポリヌクレオチド（たとえば遺伝子もしくはオープンリーディングフレーム）または結合、結合特異性、触媒作用、もしくは基質特異性のための部位をコードする配列などの対象とする、部分的な領域のものとすることができる。

【０５３２】

第１または鋳型ポリヌクレオチド配列に沿って対象とする３つ以上の変異を同定するステップ

たとえば、変異は、第１または鋳型配列内の３、４、５、６、８、１０、１２、２０、またはそれ以上の位置とすることができる。位置は、絶対的な位置として予め定めることもでき、周囲の残基もしくは相同性の関係によってあらかじめ定めることもできる。ＤＡＴポリペプチドのＴＭＣＡでは、酵素性能における改善をもたらした上位１０のコドン変化を対象とする変異として含んでいた。どちらの側の変異の位置に隣接する配列も知ることができる。各変異の位置は、異なるアミノ酸についてなど、２つ以上の変異を含有していてもよい。そのような変異は、本明細書ならびに米国特許第６，１７１，８２０号、第６，５６２，５９４号、および第６，７６４，８３５号に記載されるように、Ｇｅｎｅ Ｓｉｔｅ Ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ[SM]（ＧＳＳＭ [SM]）技術を使用することによって同定することができる。

【０５３３】

対象とする変異を含むプライマー（たとえば合成オリゴヌクレオチド）を提供するステップ

一実施形態において、プライマーは、対象とする各変異について提供される。したがって、対象とする３つの変異を有する第１または鋳型ポリヌクレオチドは、その位置において３つのプライマーを使用することができる。プライマーはまた、対象とする変異が、任意のヌクレオチドもしくは天然に存在するアミノ酸の範囲またはその範囲のサブセットとなるように、縮重位置を含有するプライマーのプールとして提供することもできる。たとえば、プライマーのプールは脂肪族アミノ酸残基を選ぶ変異を提供することができる。

プライマーはフォワードもしくはリバースプライマーとして調製することができ、またはプライマーは、少なくとも１つのフォワードプライマーおよび少なくとも１つのリバースプライマーとして調製することができる。変異が共に接近して位置する場合、１つを超える位置についての変異または多数の位置での変異の異なる組み合わせを含有するプライマーを使用することは便利となり得る。

【０５３４】

鋳型配列を含有するポリヌクレオチドを提供するステップ

第１のまたは鋳型ポリヌクレオチドは、クローニング、配列決定、または発現のためのプラスミドまたはベクターのように、環状とすることもでき、またはスーパーコイルとすることもできる。ポリヌクレオチドは、一本鎖（「ｓｓＤＮＡ」）または二本鎖（「ｄｓＤＮＡ」）とすることができる。たとえば、ＴＣＭＡ法は、スーパーコイル（「ｓｃ」）ｄｓＤＮＡ鋳型を、１分間、９５℃での加熱ステップにかける（Ｌｅｖｙ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．、２８（１２）：ｅ５７（ｉ－ｖｉｉ） （２０００）を参照されたい）。

【０５３５】
反応混合物中の鋳型ポリヌクレオチドにプライマーを加えるステップ
プライマーおよび鋳型ポリヌクレオチドは、プライマーが鋳型ポリヌクレオチドにアニールすることを可能にする条件下で結合する。ＴＭＣＡプロトコールの一実施形態において、プライマーは単一反応混合物中のポリヌクレオチドに加えられるが、多数の反応物中に加えることができる。
【０５３６】
ポリメラーゼ伸長反応を行うステップ
伸長産物（たとえば「後代」または「改変伸長ポリヌクレオチド」として）は、従来の手段によって増幅されてもよい。産物は、長さ、配列、所望の核酸特性について分析されてもよいまたはポリペプチドとして発現させてもよい。他の分析法は、ｉｎ－ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、配列スクリーニング、または発現スクリーニングを含む。分析は、所望の特性をスクリーニングし、選択するための１つまたは複数のラウンドを含むことができる。
産物はまた、細胞または無細胞系などの他の発現システムに形質転換することができる。無細胞系は、ＤＮＡ複製、修復、組換え、転写、または翻訳に関する酵素を含有していてもよい。例示的な宿主は、細菌、酵母、植物、および動物細胞ならびに細胞系を含み、大腸菌、蛍光菌、ピキア　パストリス、および黒色コウジ菌を含む。たとえば、大腸菌のＸＬ１－Ｂｌｕｅ株またはＳｔｂ１２株を宿主として使用することができる。
【０５３７】
本発明の方法は、変異の異なる組み合わせまたは多くの変異を有する産物を促進するために、異なる反応条件下で同じまたは異なるプライマーと共に使用されてもよい。
【０５３８】
上記に記載される例示的な方法を行うことによって、このプロトコールもまた、このＴＭＣＡ進化法によって生成される１つまたは複数のポリヌクレオチドを提供し、次いで、これは、所望の特性についてスクリーニングすることができ、または選択することができる。１つまたは複数の後代ポリヌクレオチドは、ポリペプチドとして発現することができ、所望の特性についてスクリーニングされてもよいまたは選択されてもよい。したがって、ＴＭＣＡ進化プロトコールの本実施形態は、ポリヌクレオチドおよびコードポリペプチドならびにそのようなポリペプチドをコードするそのようなポリヌクレオチドのライブラリーを提供する。ＴＭＣＡ進化プロトコールの本実施形態は、所望の活性を有する１つまたは複数のポリペプチドをコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドを得るためのライブラリーのスクリーニングまたは選択によるライブラリーのスクリーニングをさらに提供する。
【０５３９】
ＰＣＴ／ＵＳ０８／０７１７７１に記載されるＴＭＣＡ進化プロトコールの他の実施形態は、複数の改変ポリヌクレオチドを生成するための方法を含む。そのような方法は、一般的に、（ａ）単一反応混合物中の二本鎖鋳型ポリヌクレオチドに少なくとも３つのプライマーを加えるステップであって、前記少なくとも３つのプライマーはオーバーラップせず、前記少なくとも３つのプライマーのそれぞれは他のプライマーと異なる少なくとも１つの変異を含み、少なくとも１つのプライマーは鋳型のマイナス鎖にアニールすることができるフォワードプライマーであり、少なくとも１つのプライマーは鋳型のプラス鎖にアニールすることができるリバースプライマーである前記ステップおよび（ｂ）少なくとも３つのプライマーから複数の伸長改変ポリヌクレオチドを産出するために反応混合物をポリメラーゼ伸長反応にかけるステップ、を含む。
【０５４０】
ＰＣＴ／ＵＳ０８／０７１７７１に記載されるＴＭＣＡ進化プロトコールの他の実施形態は、細胞が、リガーゼを用いて処理していない複数の伸長産物を用いて形質転換される方法を含む。本発明の他の実施形態において、複数の伸長改変ポリヌクレオチドは、細胞から回収される。他の実施形態において、回収された複数の伸長改変ポリヌクレオチドは

、たとえば、複数の伸長改変ポリヌクレオチドの少なくとも１つを発現させることおよびそこから発現されたポリペプチドを分析することによって分析される。他の実施形態において、対象とする変異を含む複数の伸長改変ポリヌクレオチドが選択される。

ＴＭＣＡ進化プロトコールの他の実施形態において、鋳型ポリヌクレオチドに関する配列情報が得られ、鋳型ポリヌクレオチドに沿った対象とする３つ以上の変異を同定することができる。他の実施形態において、ポリメラーゼ伸長によって得られた産物は、複数の拡張改変産物を細胞に形質転換する前に分析することができる。

ＴＭＣＡ進化プロトコールの一実施形態において、ポリメラーゼ伸長によって得られた産物は、酵素、たとえばＤｐｎＩ制限酵素などの制限酵素を用いて処理され、それによって、鋳型ポリヌクレオチド配列を破壊することができる。処理された産物は、細胞、たとえば大腸菌細胞に形質転換することができる。

【０５４１】

ＴＭＣＡ進化プロトコールの一実施形態において、少なくとも２または少なくとも３または少なくとも４または少なくとも５または少なくとも６または少なくとも７または少なくとも８または少なくとも９または少なくとも１０または少なくとも１１または少なくとも１２またはそれ以上のプライマーを使用することができる。一実施形態において、各プライマーは単一の点突発変異を含む。他の実施形態において、２つのフォワードプライマーまたは２つのリバースプライマーは、鋳型ポリヌクレオチド上の同じ位置において異なる変化を含む。他の実施形態において、少なくとも１つのプライマーは、鋳型ポリヌクレオチド上の異なる位置において少なくとも２つの変化を含む。他の実施形態において、少なくとも１つのプライマーは、異なる位置において少なくとも２つの変化を含み、少なくとも２つのフォワードプライマーまたは２つのリバースプライマーは、鋳型ポリヌクレオチド上の同じ位置において異なる変化を含む。

【０５４２】

ＴＭＣＡ進化プロトコールの一実施形態において、複数のフォワードプライマーがフォワードグループにグループ化され、複数のリバースプライマーがリバースグループにグループ化され、フォワードグループ中のプライマーおよびリバースグループ中のプライマーは、鋳型ポリヌクレオチド上の位置にかかわらず、互いに独立に、対応するグループにおいて等濃度となるように正規化され、正規化の後に、等量のフォワードおよびリバースプライマーが反応に加えられる。この正規化法において、いくつかの位置の組み合わせは偏っていてもよい。偏りは、たとえば、多数のプライマーを含有する位置と比較して単一のプライマーを含有するある位置での比較的低いプライマー濃度に起因するものとすることができる。「位置の偏り」は、そのフォワードまたはリバースプライマーグループ内の他の位置と比較して単一の位置でのプライマーの組み込みに対する強い優先度を示す結果として生じるポリヌクレオチドを指す。これは、単一のプライマー位置に高いパーセンテージの変異を有するが、そのフォワードまたはリバースプライマーグループ内の他の位置に低いパーセンテージの変異を有する改変ポリヌクレオチドの組み合わせをもたらす。この偏りは、ＴＭＣＡの目的が、鋳型に対する変化のあらゆる可能性がある組み合わせを含む後代ポリヌクレオチドを生成することである場合は不利となる。たとえば、偏りは、各位置でのプールとしてのプライマーが等価となるように正規化することによって、修正することができる。

【０５４３】

ＴＭＣＡ進化プロトコールの一実施形態において、プライマー正規化は、鋳型上の同じ選択された領域をカバーするプライマーが１つのグループにあるように、プライマーを鋳型ポリヌクレオチド上のそれらの位置に応じて多数のグループに整理すること；各グループ内のグループ化されたプライマーが等しい濃度となるように、各グループ内のグループ化されたプライマーを正規化すること；１つのグループ内のフォワードプライマーをフォワードグループにプールし、フォワードプライマーの各グループの間の濃度が等しくなるように正規化すること；１つのグループ内のリバースプライマーをリバースグループにプールし、リバースプライマーの各グループの間の濃度が等しくなるように正規化すること

；および等量のプールされたフォワードおよびリバースプライマーを反応に加えることによって行われる。位置の組み合わせについて偏りは観察されなかった。

【０５４４】

ＴＭＣＡ進化プロトコールの一実施形態において、それぞれ縮重位置を含む縮重プライマーのセットが提供され、対象とする変異は縮重位置における一連の異なるヌクレオチドである。他の実施形態において、鋳型ポリヌクレオチドの少なくとも１つのコドンに対応する少なくとも１つの縮重コドンおよび鋳型ポリヌクレオチド配列のコドンに隣接する配列に相同である少なくとも１つの隣接する配列を含む縮重プライマーのセットが提供される。他の実施形態において、縮重コドンはＮ，Ｎ，Ｎであり、２０の天然に存在するアミノ酸のいずれかをコードする。他の実施形態において、縮重コドンは２０未満の天然に存在するアミノ酸をコードする。

【０５４５】

ＰＣＴ／ＵＳ０８／０７１７７１に記載されるＴＭＣＡ進化プロトコールの他の実施形態は、対象とする変異を含む、複数の改変ポリヌクレオチドを生成するための方法を含む。そのような方法は、一般的に、（ａ）単一反応混合物中の二本鎖鋳型ポリヌクレオチドに少なくとも２つのプライマーを加えるステップであって、前記少なくとも２つのプライマーはオーバーラップせず、前記少なくとも２つのプライマーのそれぞれは（１つまたは複数の）他のプライマーと異なる少なくとも１つの変異を含み、少なくとも１つのプライマーは鋳型のマイナス鎖にアニールすることができるフォワードプライマーであり、少なくとも１つのプライマーは鋳型のプラス鎖にアニールすることができるリバースプライマーである前記ステップ、（ｂ）反応混合物をポリメラーゼ伸長反応にかけて前記少なくとも２つのプライマーから複数の伸長改変ポリヌクレオチドを産出するステップ、（ｃ）酵素を用いて前記複数の伸長改変ポリヌクレオチドを処理し、それによって鋳型ポリヌクレオチドを破壊するステップ、（ｄ）リガーゼで処理していない、前記処理された伸長改変ポリヌクレオチドを細胞に形質転換するステップ、（ｅ）細胞から前記複数の伸長改変ポリヌクレオチドを回収するステップ、ならびに（ｆ）対象とする変異を含む前記複数の伸長改変ポリヌクレオチドを選択するステップ、を含む。

【０５４６】

表５３：ＴＭＣＡ進化の部位のリスト

変異	新しいコドン
P20S	AGT
K73L	TTG
T74V	GTG
V93G	GGT
N110A	GCT
P117W	TGG
N118G	GGG
N118A	GCG
V236T	ACT
T241R	CGG
L270W	TGG

【０５４７】

ＴＭＣＡ変異体は、実施例２５におけるＧＳＳＭ進化について記載したのと同じ方法を使用して増殖させ、配置し、アッセイし、配列決定した。試料の性能は、実施例２５に記載したのと同じスコアリングシステムを使用して、ＧＳＳＭ進化からの上位の候補－変異体１３５の性能と比較した。表５５は特有のＤＮＡ配列を有するＴＭＣＡ二次スクリーニングヒットを列挙する（ＴＭＣＡ変異体は、数字で指定されるＧＳＳＭ変異体と区別するために、アルファベットの文字を用いて指定される）。

【０５４８】

表５５：二次スクリーニングヒットとして同定されたＴＭＣＡ変異体

変異体名	変異	変異体名	変異
A	P20S-N118G	EE	P20S-N110A-N118G
B	T74V-V93G-L270W	FF	N110A-N118G-T241R-L270W
C	P20S-T74V-L270W	GG	P20S-T74V-V93G-N110A-N118G-V236T-L270W
D	T74V-L270W	HH	V93G-N110A-N118G-V236T
E	P20S-K73L-T241R-L270W	II	P20S-T74V-N110A-N118G
F	K73L-V93G-V236T-T241R	JJ	N110A-N118G
G	P20S-T74V-V236T	KK	P20S-V93G-N110A-N118G-T241R
H	P20S-K73L-V93G	LL	N110A-N118A-L270W
I	K73L-V236T	MM	P20S-N110A-N118G-L270W
J	P20S-L270W	NN	N110A-N118A-V236T-T241R
K	2N-P20S-K73L-V93G-N118G	OO	N110A-N118G-L270W
L	P20S-T74V-N118A	PP	V93G-N110A-N118G-T241R
M	P20S-V236T	QQ	P20S-V93G-N110A-N118G
N	P20S-T241R-L270W	RR	V93G-N110A
O	P20S-T241R	SS	P20S-N110A-N118G-V236T
P	T74V-V93G-V236T-T241R	TT	T74V-N110A-N118A-V236T
Q	P20S-K73L-T74V-L270W	UU	P20S-K73L-T74V-N110A-N118G-V236T-T241R
R	P20S-V93G-V236T	VV	86E（サイレントGAG → GAA)-N110A-N118A-V236T
S	P20S-K73L-T74V-T241R-L270W	WW	T74V-N118G
T	P20S-K73L-L270W	XX	P20S-T241R-L270W-277T（サイレントACA → ACG)
U	T74V-V93G-N118G-V236T-T241R	YY	T74V-N118A-L270W
V	P20S-K73L-210A（サイレントGCC → GCT)-V236T	ZZ	P20S-K73L-N118A-L270W
W	N118A-L270W	AAA	P20S-V93G-T241R
X	P20S-58K（サイレントAAG → AAA)-L270W	BBB	T74V-V93G-N110A-T241R
Y	P20S-V93G-N118G	CCC	V93G-N110A-N118A
Z	P20S-V236T-T241R	DDD	P20S-T74V-V93G-N110A-N118G-T241R
AA	P20S-P117W-N118A-V236T-L270W	EEE	T74V-N110A-N118G-L270W
BB	V93G-V236T	FFF	P20S-231A（サイレントGCG → GCA)-V236T
CC	V236T-L270W	GGG	V93G-V236T-T241R
DD	P20S-N118G-L270W		

【０５４９】

表５５において同定された試料を増殖させ、正規化し、実施例２６におけるＧＳＳＭ進化について記載したのと同じ方法を使用して、三次スクリーニングにおいてアッセイした。モナチンおよびアラニンの値をＬＣ／ＭＳ／ＭＳによって決定し、標準曲線と比較した。試料の性能を変異体１３５（ＧＳＳＭ進化からの上位の性能の良いもの）の活性と比較した。三次スクリーニングにおいて同定されたＴＭＣＡ　上方変異体を表５６に挙げる。

【０５５０】
〔実施例３１〕
実施例３１－ＴＭＣＡヒットの活性
この実施例は、例示的なポリペプチドの酵素活性を実証するデータを記載する。下記の表５６は、１ｍＭおよび１５ｍＭ　Ｒ，Ｒ－モナチン基質を使用する反応における、１５分間の時点での変異体１３５と比較した上方変異体の活性を示す。相対的活性は、試料によって生成されたアラニンの量を変異体１３５によって生成されたアラニンの量で割った値である。
【０５５１】
表５６：三次スクリーニングにおけるＴＭＣＡ　上方変異体の活性

変異体	変異	GSSM変異体135と比較した活性	
		1 mMモナチン基質を用いる反応	15 mMモナチン基質を用いる反応
C	P20S-T74V-L270W	1.02	0.93
E	P20S-K73L-T241R-L270W	1.32	1.31
F	K73L-V93G-V236T-T241R	1.29	0.64
G	P20S-T74V-V236T	1.28	1.30
I	K73L-V236T	1.24	1.29
J	P20S-L270W	0.79	1.01
L	P20S-T74V-N118A	1.62	0.83
M	P20S-V236T	1.27	1.46
O	P20S-T241R	1.33	1.71
R	P20S-V93G-V236T	1.22	1.02
S	P20S-K73L-T74V-T241R-L270W	1.16	1.18
V	P20S-K73L-210A（サイレントGCC → GCT)-V236T	1.03	1.00
Z	P20S-V236T-T241R	1.02	0.89
BB	V93G-V236T	1.55	1.98
CC	V236T-L270W	1.24	1.40
DD	P20S-N118G-L270W	1.54	1.78
PP	V93G-N110A-N118G-T241R	1.40	1.53
TT	T74V-N110A-N118A-V236T	1.10	0.42
VV	86E（サイレントGAG → GAA)-N110A-N118A-V236T	1.31	0.52
WW	T74V-N118G	1.23	1.49
YY	T74V-N118A-L270W	1.97	1.30
ZZ	P20S-K73L-N118A-L270W	1.01	0.44
AAA	P20S-V93G-T241R	1.86	3.49
CCC	V93G-N110A-N118A	1.26	0.56

【０５５２】
試験した条件下で変異体１３５より性能が優れたいくつかの試料を同定した。可能性のあるK_mおよびV_{max}　上方変異体を同定した。ＧＳＳＭおよびＴＭＣＡの進化の結果は、野生型配列番号２２０はモナチンに対する特異的な活性の増加についてさらに進化可能であることを示す。
【０５５３】
〔実施例３２〕
実施例３２－ｐＭＥＴ１ａにおけるＴＭＣＡ変異体ＤＡＴの評価

この実施例は、本明細書において示される例示的なポリペプチドの酵素活性を実証するデータを記載する。変異体Ｅ、変異体Ｇ、変異体Ｉ、変異体Ｍ、変異体Ｏ、変異体Ｐ、変異体ＢＢ、変異体ＰＰ、変異体ＷＷ、および変異体ＡＡＡ（ＤＡＴは、ＴＭＣＡ技術を使用して作製、実施例２９および３０を参照されたい）を、メーカーの指示に従って、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｍｕｌｔｉ　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を使用して部位特異的変異導入によって再構築した。実施例１６および実施例２８に記載されるｐＭＥＴ１ａのタグ付き構築物を鋳型として使用して変異体を生成した。使用した変異導入性のプライマーを表５７として下記に挙げる。ＰＣＲフラグメントを１時間、Ｄｐｎ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を用いて消化し、大腸菌ＸＬ１０－ＧＯＬＤ細胞（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）に形質転換した。正確な変異が組み込まれたことを確認するために結果として生じた精製プラスミド調製物を配列決定した（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）。次いで、このプラスミドを大腸菌Ｂ８３４（ＤＥ３）発現宿主（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に形質転換した。

【０５５４】

表５７：ｐＭＥＴ１ａベクターにおける変異体用のプライマー

産生したTMCA変異体ポリペプチド	PCRプライマー	鋳型
変異体E	5’- CTG GAC GAG ATG ACT GTG AGT ATG AAC GAC AGG GGC TGC TAC -3’ (配列番号1104) 5’- TGC TTG TGT CCA GCA GCG GCC GGC TCG GCC TTA GCG CCG-3’ (配列番号1105) 5’CTA AAA AAA ATC CAG GAT GAA GTG TGG AGG GAA TTT ATC GAA GCG ACA GG3’ (配列番号1106)	変異体110
変異体G	5’- CAA AAG AGG AAT TGA AAA AAG TGT TAA ATG AAA TGT ACT CC -3’ (配列番号1107) 5’- GGA GTA CAT TTC ATT TAA CAC TTT TTT CAA TTC CTC TTT TG -3’ (配列番号1108)	変異体M
変異体I	5’- CTT AAC AAA AGA GGA ATT GAA ACT GAC TTT AAA TGA AAT GTA CTC C-3’ (配列番号1109) 5’- GGA GTA CAT TTC ATT TAA AGT CAG TTT CAA TTC CTC TTT TGT TAA G -3’ (配列番号1110)	変異体135
変異体M	5’- CTG GAC GAG ATG ACT GTG AGT ATG AAC GAC AGG GGC TGC TAC -3’ (配列番号1111) 5’- GTA GCA GCC CCT GTC GTT CAT ACT CAC AGT CAT CTC GTC CAG -3’ (配列番号1112)	変異体135
変異体O	5’- CTG GAC GAG ATG ACT GTG AGT ATG AAC GAC AGG GGC TGC TAC -3’ (配列番号1113) 5’- GTA GCA GCC CCT GTC GTT CAT ACT CAC AGT CAT CTC GTC CAG -3’ (配列番号1114)	変異体136

変異体P	5’- CAA AAG AGG AAT TGA AAA AAG TGT TAA ATG AAA TGT ACT CC -3’（配列番号1115） 5’- TTC GAC GCG GAC GAG GTG CTT ACT TCC AGC AGC GGC ACA CTC G-3’（配列番号1116） 5’- TGC TTG TGT CCA GCA GCG GCC GGC TCG GCC TTA GCG CCG-3’（配列番号1117）	変異体27
変異体BB	5’- TAC CTG GTT TAT TGG CAG GGT ACT CGC GGA ACA GGC CGG-3’（配列番号1118） 5’- CCG GCC TGT TCC GCG AGT ACC CTG CCA ATA AAC CAG GTA-3’（配列番号1119）	変異体135
変異体PP	5’- TAC CTG GTT TAT TGG CAG GGT ACT CGC GGA ACA GGC CGG-3’（配列番号1120） 5’- TGC TTG TGT CCA GCA GCG GCC GGC TCG GCC TTA GCG CCG-3’（配列番号1121）	変異体45
変異体WW	5’- CAA AAG AGG AAT TGA AAA AAG TGT TAA ATG AAA TGT ACT CC -3’（配列番号1122） 5’- GGA GTA CAT TTC ATT TAA CAC TTT TTT CAA TTC CTC TTT TG -3’（配列番号1123）	変異体M
変異体AAA	5’- CTG GAC GAG ATG ACT GTG AGT ATG AAC GAC AGG GGC TGC TAC -3’（配列番号1124） 5’- TGC TTG TGT CCA GCA GCG GCC GGC TCG GCC TTA GCG CCG-3’（配列番号1125）	変異体27

【０５５５】

カルボキシ末端Ｈｉｓタグ付き変異体１１０、変異体１３５、変異体１３６、変異体Ｅ、変異体Ｇ、変異体Ｉ、変異体Ｍ、変異体Ｏ、変異体Ｐ、変異体ＢＢ、変異体ＰＰ、変異体ＷＷ、変異体ＡＡＡ、および野生型（配列番号２２０）タンパク質を発現する大腸菌Ｂ８３４（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）培養物を、１０のOD_{600}まで３０℃で一晩、５００ｍＬバッフルフラスコ中の２００ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ ＩＩ培地（Ｓｏｌｕｔｉｏｎ １～６（Ｎｏｖａｇｅｎ））中で増殖させた。総タンパク質のための試料を収集の直前に得た。細胞を遠心分離によって収集し、細胞抽出物を実施例４に記載されるように調製するまで、－８０℃で直ちに凍結させた。

【０５５６】

５０μｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ Ｎｕｃｌｅａｓｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、０．７５μｌのｒＬｙｓｏｚｙｍｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、および２５０μｌのＰｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ ＩＩ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）と共に５０ｍＬのＢｕｇ Ｂｕｓｔｅｒ Ｐｒｉｍａｒｙ Ａｍｉｎｅ Ｆｒｅｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）の添加によって細胞抽出物を作製した。細胞を緩やかに振動させながら、室温で１５分間、インキュベートした。抽出物は１０分間、４５，０００ｘｇで遠心分離した。

【０５５７】

Ｈｉｓタグ付きタンパク質は、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ） Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（商標） Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ樹脂を使用して、実施例４に記載したように精製した。例外は変異体１８２であって、これは実施例４に記載したようにＣＦＥとして分析した。精製タンパク質を、０．０５０ｍＭ ＰＬＰを有する１００ｍＭリン酸カリウム、ｐＨ７．８にＰＤ１０カラムを使用して脱塩した。総タンパク質濃度およびＤＡＴ濃度を実施例４に記載されるように決定した。

【０５５８】

３ステップのモナチン形成アッセイを、約０．２ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ濃度および０．１ｍｇ／ｍＬの濃度のアルドラーゼを用いて、実施例５に記載されるように行った。コントロールとして、０．２ｍｇ／ｍＬ濃度の精製野生型ＤＡＴ（配列番号２２０）を評価した。０．５、１、２、４、および２４時間後、アリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を遠心し、濾過した。実施例３６に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチンについてならびにＬＣ／ＯＰＡポストカラム蛍光方法論を用いてトリプトファンおよびアラニンについて試料を分析した。実施例３６に記載されるＦＤＡＡ誘導体化法によってＲ，Ｒモナチン％を決定するために、最後の時点で、さらなるアリコートを得た（ｐＨ調節を伴わないで）。様々な時点で生成されたモナチン（ｍＭ）の量は表５８において知ることができる。立体純度もまた決定し、Ｒ，Ｒ立体異性体のパーセントは、最も右手の欄において知ることができる。立体異性体Ｒ，Ｓが、残りの大部分を構成した。

【０５５９】

表５８：選択したＤＡＴ変異体の活性

DATポリペプチド	モナチン (mM) 0.25時間	モナチン (mM) 0.5時間	モナチン (mM) 1時間	モナチン (mM) 4時間	RR%
野生型コントロール(配列番号220)	1.60 (±0.42)	2.95 (±0.64)	5.00 (±0.85)	11.40 (±0.42)	99.50 (±0.08)
変異体110	1.70 (±0.00)	3.20 (±0.85)	5.75 (±0.21)	12.60 (±0.14)	99.48 (±0.32)
変異体135	3.65 (±0.35)	6.17 (±0.65)	10.33 (±0.32)	13.20 (±0.56)	99.42 (±0.11)
変異体136	2.60	5.00	8.10	12.90	98.98
変異体182	--	3.20	6.80	14.30	99.50
変異体E	1.80	3.80	8.60	18.60	99.45
変異体G	3.10	6.50	9.90	12.90	99.05
変異体I	2.90	5.30	8.50	12.90	99.46
変異体M	4.20	8.10	11.20	13.80	98.96
変異体O	2.60	5.70	9.50	14.00	98.59
変異体BB	4.20	8.20	11.40	13.70	98.97
変異体PP	2.40	3.20	6.20	17.40	97.25
変異体AAA	2.80	6.80	11.80	14.80	97.98

--＝試験した条件下で決定されず

【０５６０】

変異体および野生型コントロール（配列番号２２０）ＤＡＴの間で最初の１時間にわたるモナチン形成速度を精製タンパク質と比較することによってモナチン生成の相対速度を決定したところ、試験した条件下でのモナチン生成の相対速度は、変異体１３５、変異体１３６、変異体Ｅ、変異体Ｇ、変異体Ｍ、変異体Ｏ、変異体ＢＢ、および変異体ＡＡＡの初期活性が最も大きく改善されることを示す。ＤＡＴ変異体Ｅおよび変異体ＡＡＡは高い活性を有したが、試験した条件下で十分に発現されず（総タンパク質の５％未満）、あまり可溶性でもなかった。

【０５６１】

実施例３６に記載されるように、モナチン前駆体、Ｉ３Ｐ、および副産物４－ヒドロキシ－４－メチルグルタミン酸（ＨＭＧ）などの中間体についてもアッセイ試料を分析した。形成されたＨＭＧの量の分析を、変異体である変異体Ｅ、変異体Ｇ、変異体Ｉ、変異体Ｍ、変異体Ｏ、変異体ＢＢ、変異体ＰＰ、変異体ＡＡＡならびに変異体１１０、変異体１

３５、および変異体１３６について決定した。４時間の時点で、より多くのＨＭＧが、変異体である変異体１３５、変異体Ｇ、変異体Ｉ、変異体Ｍ、および変異体ＢＢによって形成されたように思われる。これらの変異体はすべて改変Ｖ２３６Ｔを含有していた。ＨＭＧは、おそらく残基Ｐ２０Ｓにおける変化に起因して、変異体である変異体Ｅ、変異体Ｇ、変異体Ｍ、および変異体ＡＡＡでも野生型コントロール（配列番号２２０）のレベルを超えて存在した。

【０５６２】

表５９：４時間後のＤＡＴ変異体によるＨＭＧ形成

DATポリペプチド	HMG（mM） 4時間
野生型コントロール (配列番号220)	nd
変異体110	nd
変異体135	1.0
変異体136	nd
変異体E	0.2
変異体G	1.6
変異体I	0.8
変異体M	1.6
変異体O	nd
変異体BB	1.5
変異体AAA	0.6

ｎｄ＝検出されず

【０５６３】

Ｉ３Ｐ形成をモニターするＤＡＴアッセイ

トリプトファンからのＩ３Ｐの形成を３４０ｎｍの波長で検出しモニターした。反応は、９００μＬの２５ｍＭ　Ｄ－トリプトファン、２５ｍＭピルビン酸ナトリウム塩、０．０５ｍＭ　ＰＬＰ、上記に記載されるように調製した１００μＬ希釈のＤＡＴ（総タンパク質）と組み合わせた１００ｍＭリン酸カリウム（ｐＨ７．８）溶液を含有する１ｍＬ反応容量で実行した。アッセイへの添加の前に、冷５０ｍＭリン酸カリウム（ｐＨ７．８）および５０μＭ　ＰＬＰを用いて酵素を１：１００および１：２００に希釈した。酵素を反応混合物に１：１００で加え、３分間、１５秒間のインクリメントでモニターした。インドール－３－ピルビン酸（Ｉ３Ｐ）の形成を、ＢｉｏＲａｄ　Ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）上で３分間、３４０ｎｍの波長でモニターし、速度は標準曲線のダイナミックレンジ内で測定した。精製野生型（配列番号２２０）ＤＡＴタンパク質を用いて標準曲線を生成し、細胞抽出物におけるＤＡＴの濃度は標準曲線の式に基づいて決定した。第１の反応についての野生型ＤＡＴに関してのＤＡＴの有効濃度を表６０に報告する。

【０５６４】

表６０：ＤＡＴの活性（トリプトファンからＩ３Ｐへの変換）

DAT ポリペプチド	13P形成の速度 (Δ Abs340 nm/分)	DATの濃度 (活性によって決定)mg/mL	第1の反応についての野生型に対する活性
野生型コントロール (配列番号220)	0.058	0.065	1.0
変異体135	0.067	0.075	1.2
変異体136	0.017	0.019	0.3
変異体E	0.000	0.002	0.1
変異体G	0.027	0.030	0.5
変異体M	0.050	0.055	0.9
変異体O	0.031	0.033	0.8
変異体BB	0.045	0.050	0.8
変異体AAA	0.002	0.004	0.2

【０５６５】

野生型ＤＡＴ（配列番号２２０）ならびに変異体１３６、Ｅ、Ｇ、Ｍ、Ｏ、ＢＢ、およびＡＡＡは、Ｉ３Ｐへのトリプトファンならびにモナチンへのモナチン前駆体の変換の両方を促進することができる。表６０は、トリプトファンからＩ３Ｐへの変換について野生型ＤＡＴ（配列番号２２０）に比較してこれらの変異体が低い活性を有したことを示す。しかし、表５８によれば、同じ変異体が野生型ＤＡＴ（配列番号２２０）よりもより多くの総モナチンをトリプトファンから生成した。したがって、本明細書に記載されるアッセイの条件下で、モナチン生合成経路において、トリプトファンからＩ３Ｐへの変換のコントロールを通してモナチン生成に対する有益な効果があるように思われる。たとえば、変異体Ｅはトリプトファンから Ｉ３Ｐへの変換について最も低い相対的活性を示した（表６０を参照されたい）が、それはまた４時間で最も高い量のモナチンをも生成した（表５８を参照されたい）。理論に拘束されないが、反応における第１のステップをコントロールすることの有益な効果は、Ｉ３Ｐ蓄積およびそれに続くモナチン以外の産物への潜在的Ｉ３Ｐ分解の低下にあるとすることができる。一般的に、たとえば１つまたは複数の変異体ＤＡＴを使用する、トリプトファンからのモナチンの生成に関与する反応の１つまたは複数の速度のコントロールは、生成されるモナチンの総量に対して有益な効果を有するようにも思われる。

【０５６６】

〔実施例３３〕

実施例３３－３５℃での変異体ＤＡＴの評価

この実施例は、本明細書において示される例示的なポリペプチドの酵素活性を実証するデータを記載する。スターター培養物を、OD_{600nm}が０．０５に達するまで、２５０ｒｐｍで振盪させながら３７℃で一晩増殖させた。２００ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ ＩＩ培地（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）を、実施例３に記載されるように接種し、増殖させた。培養物を二連で増殖させ、細胞ペレットを一緒に合わせた。ペレットを０．０５ｍＭ ＰＬＰを含む４０ｍＬの５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．８）中に再懸濁し、メーカーの指示にしたがって、Ｆｒｅｎｃｈ Ｐｒｅｓｓ（Ｓｉｍ Ａｍｉｎｃｏ、Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ、ＮＹ）を使用して溶解した。上清を清浄チューブ中に収集し、使用するまで－８０℃で保存した。

【０５６７】

３ステップモナチン形成アッセイは、グラスバイアルにおいて、約０．２ｍｇ／ｍＬのＤＡＴ濃度および０．１ｍｇ／ｍＬの濃度のアルドラーゼを用いる方法に記載されるように行った。２つ組の試料を２５℃または３５℃でインキュベートし、１、３、および４時間後にアリコートを採取し、ギ酸を２％の最終濃度まで加え、試料を遠心し、濾過した。実施例３６に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いてモナチンについてならびにＬＣ

／ＯＰＡポストカラム蛍光方法論を用いてトリプトファンおよびアラニンについて試料を分析した。実施例３６に記載されるように、モナチン前駆体、Ｉ３Ｐ、および４－ヒドロキシ－４－メチルグルタミン酸（ＨＭＧ）などの中間体についても試料を分析した。様々な時点で生成されたモナチン（ｍＭ）の量を表６１に示す。

【０５６８】

モナチン形成アッセイは、反応をプラスチックバイアルにおいて実行した以外、同様の条件下で、野生型コントロール（配列番号２２０）、変異体１３５、および変異体Ｍについて繰り返した。様々な時点でのモナチン生成は表６１において知ることができる。

【０５６９】

表６１：２５℃および３５℃でのモナチン形成

DATポリペプチド	モナチン(mM) 1時間	モナチン(mM) 3時間	モナチン(mM) 4時間
25℃			
野生型コントロール(pMet1a)	2.0	6.8	8.4
変異体135 (V236T)	10.0	14.4	14.2
変異体136 (241R)	4.0	10.8	12.4
変異体E (20S, 73L, 241R, 270W)	0.8	4.2	5.6
変異体M (20S, 236T)	10.0	13.4	14.2
変異体O (20S, 241R)	8.0	13.8	13.6
変異体BB (93G, 236T)	4.0	11.4	12.4
変異体AAA (20S, 93G, 241R)	0.2	1.0	1.6
35℃			
野生型コントロール(pMet1a)	2.2	5.4	6.2
変異体135 (V236T)	9.4	9.2	9.8
変異体136 (241R)	4.8	9.4	10.4
変異体E (20S, 73L, 241R, 270W)	0.6	3.4	4.2
変異体M (20S, 236T)	9.2	13.6	14.6
変異体O (20S, 241R)	9.6	10.6	10.8
変異体BB (93G, 236T)	4.6	9.0	9.2
変異体AAA (20S, 93G, 241R)	0.2	1.6	2.2

【０５７０】

アッセイの条件下で、ここに記載されるＤＡＴ酵素を使用してより低いモナチンタイターが３５℃にて観察された。しかしながら、選択した変異体である変異体１３５、変異体１３６、変異体Ｍ、変異体Ｏ、および変異体ＢＢは、アッセイ条件下、３５℃にて、野生型コントロール（配列番号２２０）よりも初期モナチン生成速度の増加およびより大きな４時間時点のモナチンタイターを示した。

【０５７１】

〔実施例３４〕

実施例３４－バイオリアクターにおける変異体ＤＡＴの評価

この実施例は、バイオリアクターにおける、本明細書に示される例示的なポリペプチドの酵素活性を実証するデータを記載する。野生型コントロール（配列番号２２０）、変異体１３５、変異体１３６、変異体Ｍ、変異体Ｏ、および変異体ＢＢのグリセロールストックを使用して、単一コロニーのためにプレートに画線した。単一コロニーを用いて、適切な抗生物質を有する５ｍＬのＬＢ培地を含有するフラスコに接種した。スターター培養物を２５０ｒｐｍで振盪させながら３７℃で一晩増殖させ、OD_{600nm}をチェックした。OD_{600nm}が０．０５に達したら、５ｍＬ培養物を２００ｍＬのＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＩＩ培地（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に接種し、次いで

、２５０ｒｐｍで振盪させながら３０℃でインキュベートした。各培養物は二連で増殖させ、細胞ペレットを一緒に併せた。１５分間４０００ｒｐｍでの遠心分離によって細胞をペレットにすることにより培養物を収集した。上清を流し出し、ペレットは、後の使用のために凍結させまたは４０ｍＬの５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．８）中に再懸濁し、メーカーの指示にしたがってＦｒｅｎｃｈ　Ｐｒｅｓｓ（Ｓｉｍ　Ａｍｉｎｃｏ、Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ、ＮＹ）または、ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｎｅｗｔｏｎ、ＭＡ）を使用して溶解した。上清を清浄チューブ中に収集し、使用しるまで－８０℃で保存した。清浄化した溶解物の約１ｍＬをＢＣＡアッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を使用するタンパク質定量化のために保存した。

【０５７２】

ベンチスケール反応（２５０ｍＬ）を、実施例１５に記載したように、窒素ヘッドスペース下で、０．７Ｌ　Ｓｉｘｆｏｒｓ撹拌発酵槽（Ｉｎｆｏｒｓ　ＡＧ、Ｂｏｔｔｍｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）中で実行した。反応ミックスは、１０ｍＭリン酸カリウム、１ｍＭ　$MgCl_2$、０．０５ｍＭ　ＰＬＰ、２００ｍＭピルビン酸ナトリウム、および１３０ｍＭ　Ｄ－トリプトファンを含有した。反応ミックスを２５℃に調節し、水酸化カリウムを用いてｐＨ７．８に調節した。実施例６に記載したアルドラーゼを、０．０２ｍｇ／ｍＬ標的タンパク質で清浄化細胞抽出物として加えた。野生型コントロール（配列番号２２０）、変異体１３５、変異体１３６、変異体Ｍ、変異体Ｏ、および変異体ＢＢ　ＤＡＴは、目視による評価に基づくと、１５～３５％の範囲の可溶性タンパク質発現を有する。清浄化細胞抽出物を、０．２０ｍｇ／ｍＬ標的タンパク質で加えた。

実施例３６に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて、１、２、４、および２４時間にモナチン生成を測定することによって、反応の進行を経過観察した。結果を表６２に示す。

【０５７３】

表６２：発酵槽におけるモナチン産生

DATポリペプチド	タンパク質発現	モナチン(mM) 1時間	モナチン(mM) 2時間	モナチン(mM) 4時間	モナチン(mM) 24時間
野生型コントロール	25%	0.90	2.80	12.40	12.80
変異体135	30%	0.50	8.80	12.40	12.40
変異体136	35%	3.80	7.80	11.60	12.80
変異体M	15%	3.40	6.80	12.10	12.20
変異体O	15%	5.20	8.60	10.90	9.80
変異体BB	15%	3.40	6.20	10.50	12.60

【０５７４】

変異体である変異体１３６、変異体Ｍ、変異体Ｏ、および変異体ＢＢを用いて観察されたモナチン生成の初速度は、野生型コントロール（配列番号２２０）での速度よりも速かった。試験した条件下で、変異体はすべて２時間にてモナチン形成の改善を示した。変異体１３５についての予想よりも低い１時間でのモナチンタイターは、最初の１時間の間の酸素への不注意な曝露によるものであった。４時間後にはモナチンタイターは試験した条件下で変異体およびコントロールの間で同等であった。

【０５７５】

〔実施例３５〕

実施例３５－バイオリアクターにおける変異体ＤＡＴに対する温度の影響の評価

この実施例は、異なる温度条件下における、本明細書に示される例示的なポリペプチドの酵素活性を実証するデータを記載する。野生型コントロール（配列番号２２０）、変異体１３５、および変異体Ｍを、実施例１５に記載されるように２．５Ｌスケールで発酵槽

において生成した。発酵の終わりに、細胞を１０分間、５０００～７０００×ｇでの遠心分離によって収集し、－８０℃で湿性細胞ペーストとして凍結した。

野生型コントロール、変異体１３５、および変異体ＭのＤ－アミノトランスフェラーゼを含有する無細胞抽出物を調製するために、５０ｇの湿性細胞ペーストを、０．０５ｍＭピリドキサールリン酸（ＰＬＰ）を含有する、１５０ｍＬの５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．８）中に懸濁し、次いで、懸濁液の温度を１５℃未満に維持しながら、Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓホモジナイザー（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ、Ｎｅｗｔｏｎ、ＭＡ）（１８，０００ｐｓｉで３回通過）を使用して破壊した。遠心分離（３０分間、２０，０００×ｇ）によって細胞片を除去した。

【０５７６】

トリプトファンからのＩ３Ｐの形成の速度を、実施例３２に記載されるように、３分間、３４０ｎｍでモニターした。精製ＤＡＴ野生型コントロールを用いて生成された標準曲線に基づいて、野生型コントロールの濃度は６．８ｍｇ／ｍＬであると決定され、変異体１３５の濃度は７．０ｍｇ／ｍＬであると決定され、変異体Ｍは５．６ｍｇ／ｍＬである決定された。Ｉ３Ｐ形成によって決定されたＤＡＴ濃度はＩｎｆｏｒを０．２ｍｇ／ｍＬＤＡＴに添加するために使用した。アルドラーゼは、０．０２ｍｇ／ｍＬアルドラーゼの無細胞抽出物として加えた。反応ミックスは、窒素ヘッドスペース下で、１０ｍＭリン酸カリウム、１ｍＭ　$MgCl_2$、０．０５ｍＭ　ＰＬＰ、２００ｍＭピルビン酸ナトリウム、および１３０ｍＭ　Ｄ－トリプトファンを含有した。ＤＡＴのそれぞれを、３５℃および２５℃にて、バイオリアクターにおいてモナチン生成について評価した。

試料を０．５、１、３、４、および２４時間に得て、実施例３６に記載されるＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法論を用いて分析した。結果を表６３に示す。

【０５７７】

表６３：２５℃および３５℃の発酵槽

DATポリペプチド	モナチン (mM) 0.5時間	モナチン (mM) 1時間	モナチン (mM) 3時間	モナチン (mM) 4時間	モナチン (mM) 24時間
25℃					
野生型コントロール (配列番号220)	0.9	2.4	5.6	7.9	19.1
変異体135	1.6	4.4	10.9	12.1	18.6
変異体M	2.1	4.5	9.4	12.4	17.4
35℃					
野生型コントロール (配列番号220)	2.3	3.9	6.5	7.9	10.7
変異体135	4.1	6.1	9.8	11.5	14.9
変異体M	4.1	6.3	9.9	11.3	14.9

【０５７８】

実施例３４から分かるように、選択した変異体ＤＡＴは、野生型コントロールＤＡＴ（配列番号２２０）と比較して３５℃にてより高いモナチンタイターを生成した。野生型コントロールＤＡＴはモナチン生成のより遅い初速度を有したが、試験した条件下で、２５℃にてより高い最終タイターを有した。変異体である変異体１３５および変異体Ｍの両方は、２５℃および３５℃で、野生型コントロールに対して活性の改善を示した。変異体である変異体１３５および変異体Ｍの両方は、試験した条件下で、コントロールと比較して、３５℃で、モナチン生成のより速い初速度およびより高い最終タイターを有した。選択された変異体は、より高い温度で野生型コントロールよりも安定していた。このことは、野生型コントロールよりも優れた熱安定性を有する変異体を生成する際のＧＳＳＭおよびＴＭＣＡの技術の利点を示す。当業者は、たとえば温度耐性が増加した変異体についてのこれらのＧＳＳＭまたはＴＭＣＡライブラリーをスクリーニングすることができる。

【０５７９】
〔実施例３６〕
実施例３６－モナチン、ＭＰ、トリプトファン、アラニン、およびＨＭＧの検出
この実施例は、本明細書において開示される例示的なＤ－アミノトランスフェラーゼ（ＤＡＴ）酵素のさらなる特徴づけと関連する分析的な方法論を記載する。
【０５８０】
モナチンおよびトリプトファンのＵＰＬＣ／ＵＶ分析
生化学的反応に由来するモナチンおよびトリプトファンについての混合物の分析を、Ｗａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ Ｐｈｏｔｏ－Ｄｉｏｄｅ Ａｒｒａｙ（ＰＤＡ）吸光度モニターを含むＷａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣ機器を使用して行った。ＵＰＬＣ分離は、２３℃で、Ａｇｉｌｅｎｔ ＸＤＢ Ｃ８ １．８μｍ ２．１×１００ｍｍカラム（部品＃９２８７００－９０６）（Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）を使用して行った。ＵＰＬＣ移動相は、Ａ）０．１％ギ酸を含有する水Ｂ）０．１％ギ酸を含有するアセトニトリルから成るものとした。
勾配溶離は、５％Ｂから４０％Ｂまで０～４分間の直線勾配、４０％Ｂから９０％Ｂまで４～４．２分間の直線勾配、９０％Ｂから９０％Ｂまで４．２～５．２分間の均一溶媒、９０％Ｂから５％Ｂまで５．２～５．３分間の直線勾配とし、１．２分間を操作の間の再平衡期間とした。流速は０．５ｍＬ／分とし、ＰＤＡ吸光度を２８０ｎｍでモニターした。既知濃度に対する２８０ｎｍでのピーク面積の線形最小二乗法による較正から試料濃度を計算し、最小決定係数を９９．９％とした。
【０５８１】
Ｏ－（４－ニトロベンジル）塩酸ヒドロキシルアミン（ＮＢＨＡ）を用いるモナチン中間体（インドール－３－ピルビン酸（Ｉ３Ｐ）、ヒドロキシメチルオキシグルタル酸（Ｈｙｄｒｏｘｙｍｅｔｈｙｌｏｘｙｇｌｕｔａｒｉｃ Ａｃｉｄ）、モナチン前駆体、およびピルビン酸）の誘導体化
モナチン生成のプロセスにおいて、様々な中間体化合物が形成され、利用される。これらの化合物は、インドール－３－ピルビン酸（Ｉ３Ｐ）、ヒドロキシメチルオキシグルタル酸、モナチン前駆体、およびピルビン酸を含む。これらの化合物上のケトン基はＯ－（４－ニトロベンジル）塩酸ヒドロキシルアミン（ＮＢＨＡ）を用いて誘導体化することができる。
２０μＬの試料または標準物に、１４０μＬのＮＢＨＡ（ピリジン中４０ｍｇ／ｍＬ）を琥珀色のバイアルにおいて加えた。試料は、時々混合しながら、熱の存在下で１５分間、超音波処理した。３５％アセトニトリル水溶液で１：３希釈を行った。
【０５８２】
モナチン中間体（インドール－３－ピルビン酸、ヒドロキシメチルオキシグルタル酸、モナチン前駆体、およびピルビン酸）のＵＰＬＣ／ＵＶ分析
Ｗａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ Ｐｈｏｔｏ－Ｄｉｏｄｅ Ａｒｒａｙ（ＰＤＡ）吸光度モニター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）を含むＷａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣ機器を、中間体化合物の分析のために使用した。ＵＰＬＣ分離は、５０℃で、Ｗａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＨＳＳ Ｔ３ １．８ｍｍ×１５０ｍｍカラム（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）を使用して行った。ＵＰＬＣ移動相は、Ａ）０．３％ギ酸および１０ｍＭギ酸アンモニウムを含有する水ならびにＢ）０．３％ギ酸および１０ｍＭギ酸アンモニウムを含有する５０／５０アセトニトリル／メタノールから成るものとした。
【０５８３】
勾配溶離は、５％Ｂから４０％Ｂまで０～１．５分間の直線勾配、４０％Ｂから５０％Ｂまで１．５～４．５分間の直線勾配、５０％Ｂから９０％Ｂまで４．５～７．５分間の直線勾配、９０％Ｂから９５％Ｂまで７．５～１０．５分間の直線勾配とし、３分間を操作の間の再平衡期間とした。流速は、０～７．５分間０．１５ｍＬ／分、７．５～１０．５分間０．１８ｍＬ／分、１０．５～１１分間０．１９ｍＬ／分、１１～１３．５分間０

．１５ｍＬ／分とした。ＰＤＡ吸光度を２７０ｎｍでモニターした。
既知濃度に対する２７０ｎｍでのピーク面積の線形最小二乗法による較正から試料濃度を計算し、最小決定係数を９９．９％とした。
【０５８４】
モナチンのキラルＬＣ／ＭＳ／ＭＳ（ＭＲＭ）測定
生化学的反応におけるモナチンの立体異性体分布の決定は、１－フルオロ－２－４－ジニトロフェニル－５－Ｌ－アラニンアミド３０（ＦＤＡＡ）を用いる誘導体化、その後に続く逆相ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ　ＭＲＭ測定によって達成した。
【０５８５】
ＦＤＡＡを用いるモナチンの誘導体化
アセトン中ＦＤＡＡの１％溶液の１００μＬを、５０μＬの試料または標準物に加えた。２０μＬの１．０Ｍ炭酸水素ナトリウムを加え、混合物を時々混合させながら４０℃で１時間インキュベートした。試料を取り出して冷却し、２０μＬの２．０Ｍ　ＨＣｌを用いて中和した（緩衝生物学的混合物の中和をもたらすために、より多くのＨＣｌを必要としてもよい）。ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによって試料を分析した。
【０５８６】
モナチンの立体異性体分布の決定のためのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ多重反応モニタリング
分析は、クロマトグラフおよびＭｉｃｒｏｍａｓｓ（登録商標）　Ｑｕａｔｔｒｏ　Ｕｌｔｉｍａ（登録商標）三連四重極型質量分析計の間に直列に配置したＷａｔｅｒｓ　９９６　Ｐｈｏｔｏ－Ｄｉｏｄｅ　Ａｒｒａｙ（ＰＤＡ）吸光度モニター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）と共にＷａｔｅｒｓ２７９５液体クロマトグラフを含むＷａｔｅｒｓ／Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ（登録商標）液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）機器を使用して行った。モナチン（特にＦＤＡＡ－モナチン）の４つのすべての立体異性体を分離することができるＬＣ分離は、４０℃にてＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ（登録商標）２．０×２５０ｍｍ（３μｍ）　Ｃ１８逆相クロマトグラフィーカラム上で行った。ＬＣ移動相は、Ａ）０．０５％（質量／容量）酢酸アンモニウムを含有する水およびＢ）アセトニトリルから成るものとした。溶出は、０～２分間は１３％Ｂで均一溶媒とし、２～１５分間は１３％Ｂから３０％Ｂまでの直線勾配とし、１５～１６分間は３０％Ｂから８０％Ｂまでの直線勾配とし、１６～２１分間は８０％Ｂで均一溶媒とし、２１～２２分間は８０％Ｂから１３％Ｂまでの直線勾配とし、操作の間の再平衡化期間を8分間とした。流速を０．２３ｍＬ／分とし、ＰＤＡ吸光度を２００ｎｍから４００ｎｍまでモニターした。ＥＳＩ－ＭＳのすべてのパラメーターは、ＦＤＡＡ－モナチンの脱プロトン化された２０分子イオン（［Ｍ－Ｈ］－）の生成および特徴的なフラグメントイオンの産生に基づいて最適化し、選択した。以下の機器のパラメーターを陰イオンＥＳＩ／ＭＳモードにおけるモナチンのＬＣ／ＭＳ分析のために使用した：キャピラリー：３．０ｋＶ；コーン：４０Ｖ；Ｈｅｘ１：１５Ｖ；開口部：０．１Ｖ；Ｈｅｘ２：０．１Ｖ；ソース温度：１２０℃；脱溶媒温度：３５０℃；脱溶媒ガス：６６２Ｌ／時；コーンガス：４２Ｌ／時；低質量分解度（Ｑ１）：１４．０；高質量分解度（Ｑ１）：１５．０；イオンエネルギー：０．５；入口：０Ｖ；衝突エネルギー：２０；出口：０Ｖ；低質量分解度（Ｑ２）：１５；高質量分解度（Ｑ２）：１４；イオンエネルギー（Ｑ２）：２．０；増倍管：６５０。３つのＦＤＡＡモナチン特異的親－娘遷移を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ反応におけるＦＤＡＡ－モナチンを特異的に検出するために使用した。モナチンについてモニターされた遷移は、５４２．９７から２６７．９４、５４２．９７から４９９．０７、および５４２．９７から５２５．０４であった。ＦＤＡＡ－モナチン立体異性体の同定は、精製モナチン立体異性体と比較したクロマトグラフィー保持時間および質量スペクトルデータに基づくものとした。
【０５８７】
ヒドロキシメチルグルタミン酸（ＨＭＧ）およびアラニンを含むアミノ酸の液体クロマトグラフィー－ＯＰＡを用いるポストカラム誘導体化、蛍光検出
生化学的反応に由来するＨＭＧおよびアラニンの混合物の分析は、Ｗａｔｅｒｓ　Ａｌ

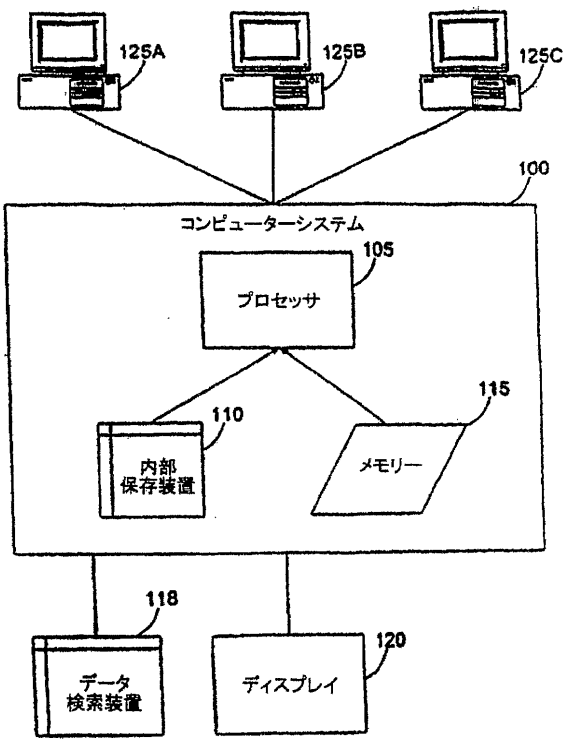
ｌｉａｎｃｅ ２６９５ならびに検出系としてＷａｔｅｒｓ ２４８７ Ｄｕａｌ Ｗａｖｅｌｅｎｇｔｈｓ Ａｂｓｏｒｂａｎｃｅ ＤｅｔｅｃｔｏｒおよびＷａｔｅｒｓ ２４７５ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｏｒを有するＷａｔｅｒｓ ６００構成機器（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）を使用して行った。ＨＰＬＣ分離は、分析カラムとして直列の２本のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ａｑｕａ Ｃ１８ １２５Ａ、１５０ｍｍ×２．１ｍｍ、３μ、カタログ＃００Ｆ－４３１１Ｂ０カラムおよびオンライン固相抽出（ＳＰＥ）カラムとしてＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ａｑｕａ Ｃ１８ １２５Ａ、３０ｍｍ×２．１ｍｍ、３μ カタログ＃００Ａ－４３１１Ｂ０を使用して行った。２本の分析カラムについての温度を５５℃に設定し、オンラインＳＰＥカラムは室温にした。ＨＰＬＣ移動相は、Ａ）１％メタノールを有する０．６％酢酸から成るものとした。流速は、（１００％のＡ）０～３．５分間、０．２ｍＬ／分、３．５～６．５分間、０．２４ｍＬ／分、６．５～１０．４分間、０．２６ｍＬ／分、１０．４～１１分間、０．２ｍＬ／分とした。ＵＶ－ＶＩＳ吸光度検出器は、３３６ｎｍの波長でモニターするために設定した。蛍光検出器は、励起および放射波長をそれぞれモニターするために、３４８ｎｍおよび４５０ｎｍに設定した。

【０５８８】

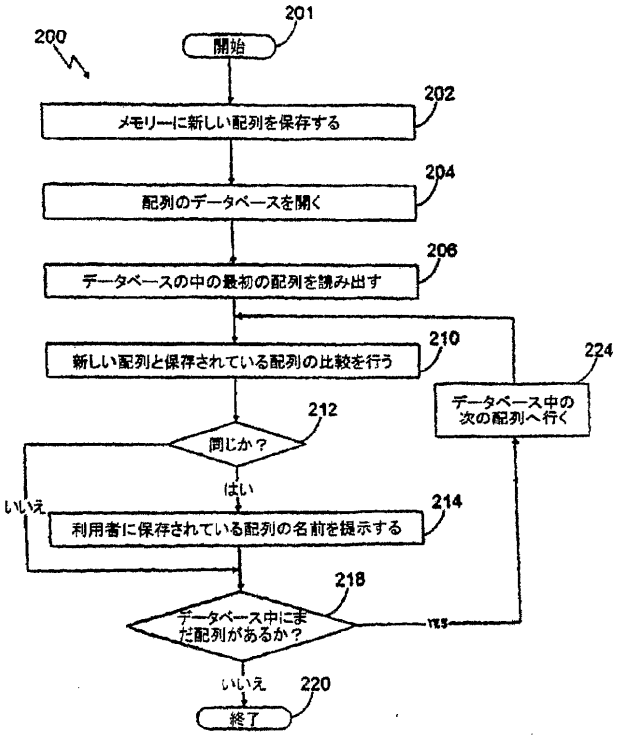
他の実施形態

本発明をその詳細な説明と共に記載してきたが、上記説明は例証することを意図しており、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定することを意図しないことを理解されたい。他の態様、利点、および変更は本特許請求の範囲内にある。

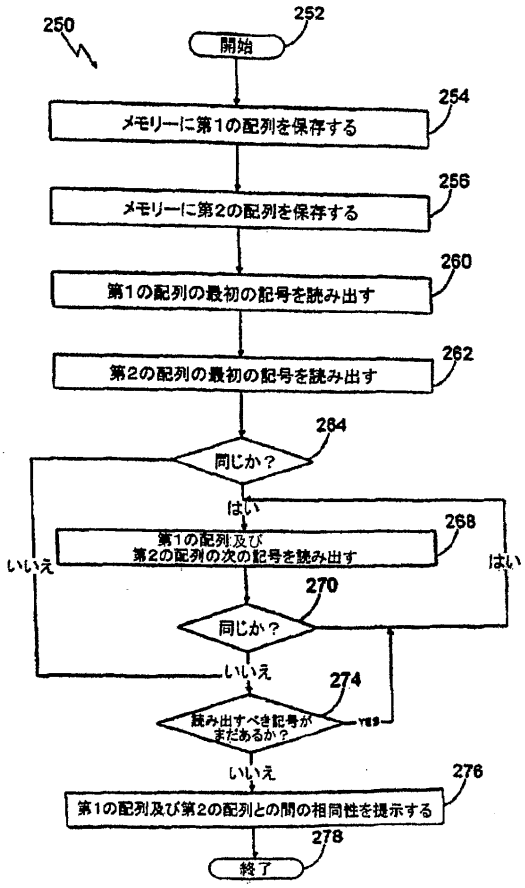
【図１】



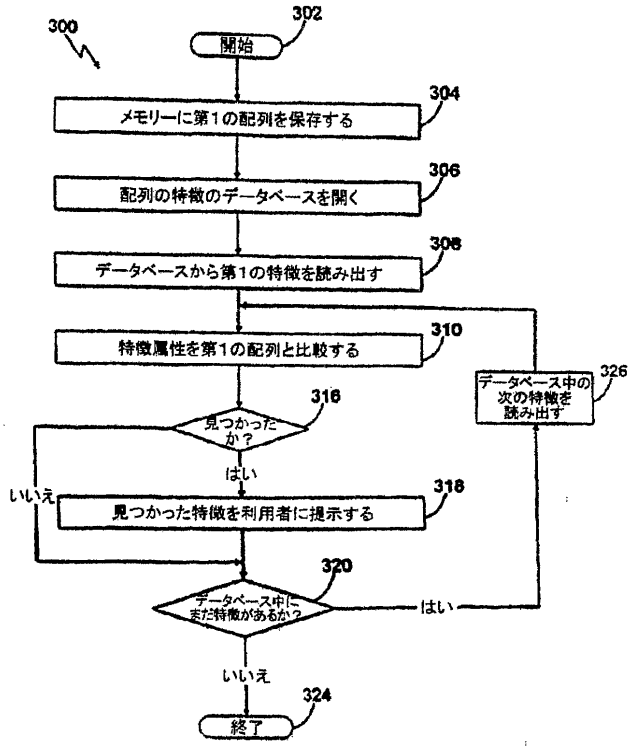
【図２】



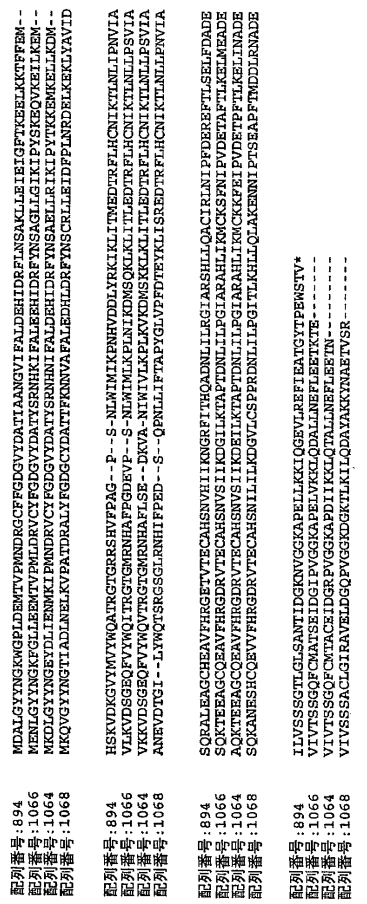
【図３】


250
252
開始
254
メモリーに第1の配列を保存する
256
メモリーに第2の配列を保存する
260
第1の配列の最初の記号を読み出す
262
第2の配列の最初の記号を読み出す
264
同じか？
はい
いいえ
268
第1の配列及び
第2の配列の次の記号を読み出す
はい
270
同じか？
いいえ
274
読み出すべき記号が
まだあるか？
YES
いいえ
276
第1の配列及び第2の配列との間の相同性を提示する
278
終了

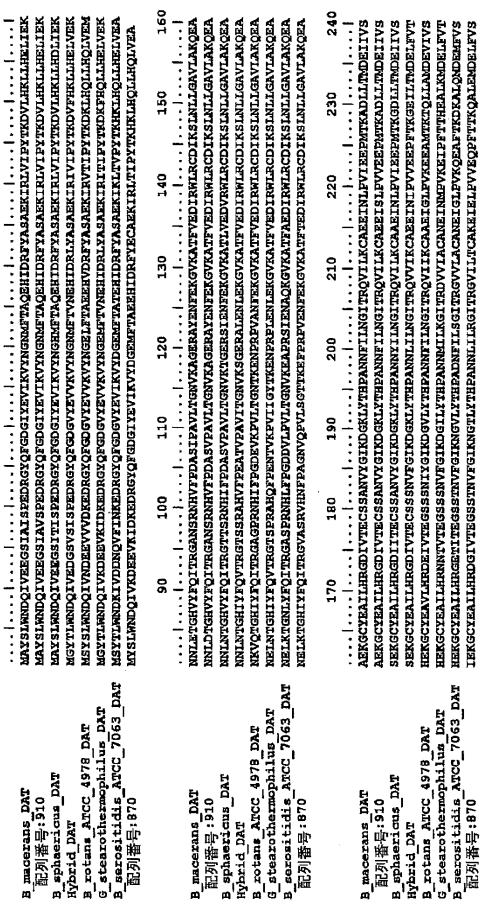
【図４】


300
302
開始
304
メモリーに第1の配列を保存する
306
配列の特徴のデータベースを開く
308
データベースから第1の特徴を読み出す
310
特徴属性を第1の配列と比較する
316
見つかったか？
はい
いいえ
318
見つかった特徴を利用者に提示する
320
データベース中にまだ特徴があるか？
はい
いいえ
324
終了
326
データベース中の
次の特徴を
読み出す

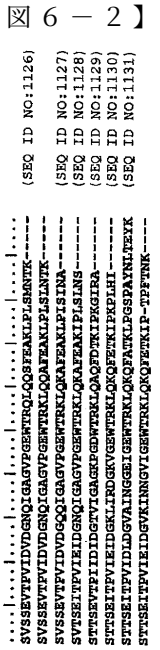
【図５】


配列番号:894
配列番号:1066
配列番号:1064
配列番号:1068
MDALGYYNGKWGPLDEMTVPMNDRGCFFGDGVYDATAANGVIFALDEHIDRFLNSAKLLEIRIGPTKEELKKTFFEM--
MENLGYYNGKPFGLLEEMTVPMLDRVCVFGDGVYDATYSRNHKIFALEEHIDRFVNSAGLLGIKIPVSKEQVTEILKEM--
MKOLGYYNGEYDLIENMKIPMNDRVCVFGDGVYDATYSRNHNIFALDEHIDRFVNSAELLRIKIPVTKKEMKELLKOM--
MKQVGYYNGTIADLNELKVPATDRALIYFGDGCTDATTFKNNVAPALEDHLDRFINSCRLLEIDFPLNRDELKEKIYAVID
HSKVDKGVYVMVTWQATRTGRRSHVFPAG--P--S-NLWIMIKPNHVDDLYRKIKLITMEDTRFLHCNIKTANLIPNVIA
VLKVDSGEQFVVWQITRTGTMRNHAFPGDEVP--S-NLWIMLKPLNIKDMSQKLKLITLEDTRFLHCNIKTANLLPSVIA
VKKVDSGEQFVVWQVTRTGTGMRNHAFLSE--DKVA-NIWIVLKPLKVKDMSKKLKLITLEDTRFLHCNIKTANLLPSVIA
ANEVDTGI--LYWQTSRGSGGLRNHIIFPED--S--QPNLLIFTAPYGLVPFDTEYKLISREDTRFLHCNIKTANLIPNVIA
SQRALEAGCHEAVFHRGETVTECAHSNVHIIKNGRPITHQADNLILRGIARSHLLQACIRLNIPVDERSFTLSELFDADE
SQKTEEAGCQEAVFHRGDRVTECAHSNVSIIKDGILKTAPTDNLILPGIARAHLIKMCKKSFNIPVDETAFTLKELMEADE
AQKTEEAGCQEAVFHRGDRVTECAHSNVSIIKDEILKTAPTDNLILPGIARAHLIKMCKKFEIPVDETPFTLKELINADE
SQKANESHCQEVVFHRGDRVTECAHSNILLLKDGVLCSPPRDNLILPGITLKHLQLAKENNIPTSEAPFTMDDLRNADE
ILVSSSGTLGLSANTIDGKNVGGKAPELLKKIQGEVLREFIEATGYTPEWSTV*
VIVTSSGQFCMATSKIDGIPVGGKAPELVKKLQDALINEPLEETKTE-------
VIVTSSGQFCMTACKIDGRPVGGKAPDIIKKLQTALLNEFLEETN--------
VIVSSSACLGIRAVELDGQPVGGKDGKTLKIIQDAYAKKYNAETVSR-------

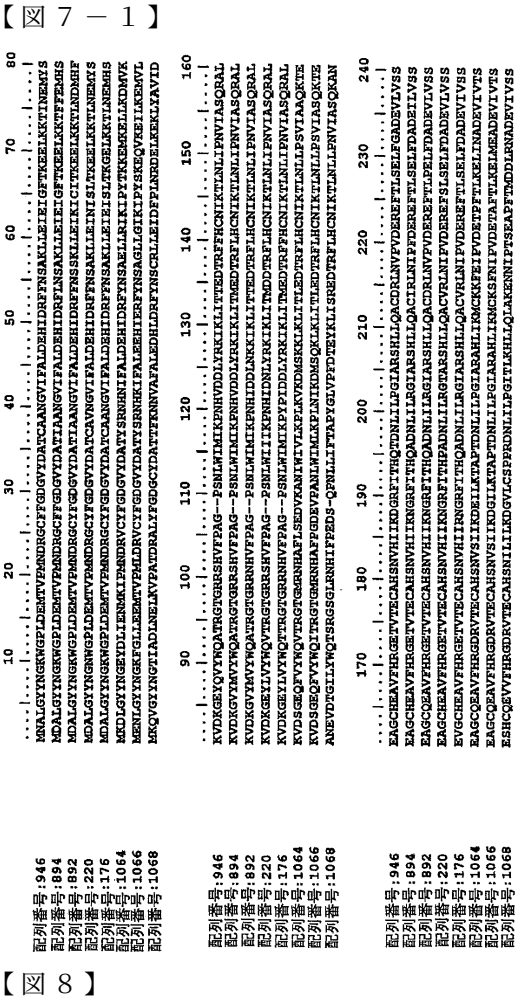
【図６－１】


B_macerans_DAT
配列番号:910
B_sphaericus_DAT
Hybrid_DAT
B_rotans_ATCC_4978_DAT
G_stearothermophilus_DAT
B_sercositidis_ATCC_7063_DAT
配列番号:870
MAYSLWNDQIVEEGSIAISPEDRGYQPGDGIYEVIKVFNGNGMFTAQEHIDRFYASAEKIRLVIPFTKDVVLHKLIEK
MAYSLWNDQIVEEGSIAVSPEDRGYQPGDGIYEVIKVFNGNGMFTAQEHIDRFYASAEKIRLVIPFTKDVVLHKLIEK
MAYSLWNDQIVEKGSITISPEDRGYQPGDGIYEVIKVFNGNGMFTAQEHIDRFYASAEKIRLVIPFTKDVVLHKLIEK
MGYTLWNDQIVEDGSVSISPEDRGYQPGDGVYEVVKVFNGNGMFTVHEHIDRLYASAEKIRIVIPVTKDVPFKKLIHEVVEK
MSYSLWNDQIVNDEVVVDEEDRGYQPGDGVIEVVKVFNGEAFTAHEHVDRFYASAEKINVIIPITKDKLHQLIHQAVEM
MGYTLWNDQIVKDEEVKKIDREDRGYQPGDGVIEVVKVFNGEEFTVHEHIDRLYASAEKIHIIPITKDKPHQLLHELVEK
MSYTLWNDKIVDDNQYFINEEDRGYQPGDGVIEVIKVYDGEMFTAYEHIDRFYASAEKIKLIVPFTKHKLHQLLHELVEA
MYSLWNDQIVDEEVKIDKEDRGYQPGDGVIEVIKVYDGEMFTAEEHIDRFYECAEKIRLTIPYTKHKLHQLLHQLVEA
90
100
110
120
130
140
150
160
B_macerans_DAT
配列番号:910
B_sphaericus_DAT
Hybrid_DAT
B_rotans_ATCC_4978_DAT
G_stearothermophilus_DAT
B_sercositidis_ATCC_7063_DAT
配列番号:870
NNLEYGHVYFQITRGANSRNHVFFDASIFAVLNVGNVKAGERAVENFEKGVKATFVEDIRWLRCDIKSINLLGAVLAKQEA
NNLDYGHVYFQITRGANSRNHVFFDASVFAVLDVGNVKAGERAVENFEKGVKATFVEDIRWLRCDIKSINLLGAVLAKQEA
NNLNYGHIYFQVTRGTSRNHIFFDASVFAVLDVGNVKGERSIENFEKGVKATLVEDVRWLRCDIKSINLLGAVLAKQEA
NNLAYGHIYFQVTRGASSRAHVFFEATVFAVLVSGNVKAGERAAENLEKGVKATFVEDIRWLRCDIKSINLLGAVLAKQEA
NKVQYGHIYFQITRGARGFRNHIIFPGDEVAPVFANFEKGVKATFVEDIRWLRCDIKSINLLGAVLAKQEA
NEINYGHIYFQVTRGTSPRAHQFFENTVKPVLIGTKKENPAPLESLEKGVKATFVEDIRWLRCDIKSINLIGAVLAKQEA
NEIKYGHIYFQITRGANSPRNHLFFGDDVLFVLTGNVKEAAPRSIENAQKGVKATFAEDIRWLRCDIKSINLIGAVLAKQEA
NELKYGHIYFQITRGVASRVHNFPAGNVQPVLSGTTKEFPPAFVESNFEKGVKATFTEDIRWLRCDIKSINLIGAVLAKQEA
170
180
190
200
210
220
230
240
B_macerans_DAT
配列番号:910
B_sphaericus_DAT
Hybrid_DAT
B_rotans_ATCC_4978_DAT
G_stearothermophilus_DAT
B_sercositidis_ATCC_7063_DAT
配列番号:870
AEKGCYEAIIHGDIVTECSSANYVGIKDGKLVTHPANNFINGITRQVILKCAEEINLPVTEEPMTKADLIVADEIIVS
AEKGCYEAIIHGDIVTECSSANYVGIKDGKLVTHPANNFINGITRQVILKCAEEISLPVTEEPMTKADLIVDEEIIVS
AEKGCYEAIIHGDIITECSSANYVGIKDGKLVTHPANNFINGITRQVILKCAEEISLPVTEEPMTKADLIVDEEIIVS
SEKGCYEAIIHRGDIITECSSANYVGIKDGKLITHPANNLINGITRQVILKCAEEINIPVVEEPFTKGELIVNDELFVT
SEKGCYEAVIHRGDIVTECSSSNYVGIKDGVLITHPANNFINGTRQVIIKCAEEIGLPVKEEAMTKQHLIANDEVIVS
HEKGCYEAVLHRDEIVTESSSSNYVGIKDGVLITHPANNFINGTRQVIIKCAEEIGLPVKEEAMTKQHLIANDEVIVS
HEKGCYEAIIHRNNIVTESSSSNVFGIKDGILITHPANNMINGITRDVVIACANEINMPVKEIPFTTHEALKNDELFVT
HERGCYEAIIHRGETITESSSSTNVFGIKNGVLITHPADNFILSGITRGVVLACANEIGLPVKEQAFTKDEALQNDEMFVS
IEKGCYEAIIHRDGIVTESSSTNVFGIKNGLLTHPANNLILRGITRGVLLACAKEIELPVVEQPFTTKQALEADELFVS

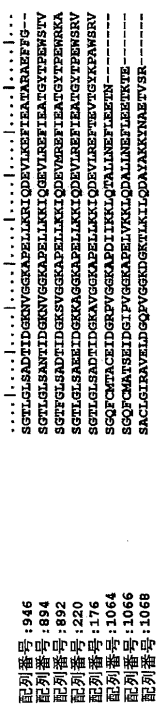
【図６－２】



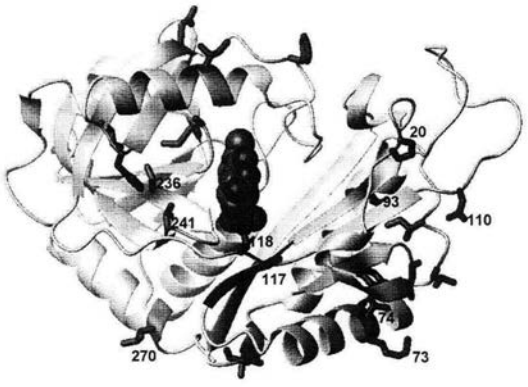
【図７－１】



【図７－２】



【図８】



【配列表】
2016146832000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C12P 21/02	*(2006.01)*	C12P	21/02	C	4B064
C12P 7/40	*(2006.01)*	C12P	7/40		4B065
C12P 13/14	*(2006.01)*	C12P	13/14		
C12P 7/42	*(2006.01)*	C12P	7/42		
C12P 13/02	*(2006.01)*	C12P	13/02		
C12N 9/10	*(2006.01)*	C12N	9/10		
C12N 9/02	*(2006.01)*	C12N	9/02		
C12P 13/00	*(2006.01)*	C12P	13/00		
A23L 33/17	*(2016.01)*	A23L	33/17		
A23L 2/52	*(2006.01)*	A23L	2/00	F	
A23K 20/147	*(2016.01)*	A23K	1/16	303F	
A23K 20/189	*(2016.01)*	A23K	1/165	C	

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
(72)発明者 ウェイナー デイヴィッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２０１４ デル マー ポートフィーノ ドライブ １３４１６
(72)発明者 ルジンブール ピーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１３０ サン ディエゴ カーレ デ ラ シエナ １２８０２
(72)発明者 ブエノ アナリア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１１３ サン ディエゴ オーシャン ビュー ブールヴァード ４４９８
(72)発明者 クエンカ ジョスリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２６ サン ディエゴ スペクトラム センター ブールヴァード ８８４７ ＃６１１６
(72)発明者 マラスコ エリン
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ５５４０６ ミネアポリス フォーティーファースト アベニュー サウス ４１１４

Ｆターム(参考) 2B150 AA01 AB03 AB10 DC23 DF09 DF16
4B017 LC03 LK23
4B018 LB08 MD90
4B024 AA03 AA05 AA10 AA17 BA08 BA10 CA01 CA09 CA11 CA20
DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 DA20 EA01 EA02 EA03 EA04
EA06 GA11 HA01 HA09 HA11
4B050 CC03 CC04 DD01 FF14E LL02 LL04 LL10
4B064 AD51 AD52 AE01 AE02 AE19 AG01 CA01 CA19 CE12 DA10
DA16 DA20
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA72X AA87X AA95Y AA99X AB01 AC14 BA01
CA09 CA10 CA16 CA17 CA24 CA41 CA43 CA50 CA51 CA54

CA57