

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3868995号
(P3868995)

(45) 発行日 平成19年1月17日(2007. 1. 17)

(24) 登録日 平成18年10月20日(2006. 10. 20)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/62 (2006. 01)	C 1 2 N 9/62	
A 2 1 D 2/26 (2006. 01)	A 2 1 D 2/26	
A 2 3 K 1/165 (2006. 01)	A 2 3 K 1/165	C
請求項の数 27 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平7-503763	(73) 特許権者	ノボザイムス アクティーゼルスカブ
(86) (22) 出願日	平成6年7月5日(1994. 7. 5)		デンマーク国、デーコー - 2 8 8 0 バグ
(65) 公表番号	特表平8-512201		スバエルト、クロシェイバイ 3 6
(43) 公表日	平成8年12月24日(1996. 12. 24)	(74) 代理人	
(86) 国際出願番号	PCT/DK1994/000274		弁理士 石田 敬
(87) 国際公開番号	W01995/002044	(74) 代理人	
(87) 国際公開日	平成7年1月19日(1995. 1. 19)		弁理士 鶴田 準一
審査請求日	平成13年7月5日(2001. 7. 5)	(74) 代理人	
(31) 優先権主張番号	0811/93		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成5年7月6日(1993. 7. 6)	(74) 代理人	
(33) 優先権主張国	デンマーク(DK)		弁理士 日野 あけみ
		(74) 代理人	弁理士 中村 和広
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ活性を有する酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p H 7 以下、且つ 3 % 以下の H_2O_2 の存在下で活性であるプロテアーゼ活性を示す酵素をコードするDNA配列を含んで成るDNA構築体であって、ここでこのDNA配列はSEQ ID No.1はSEQ ID No.1に示すDNA配列と90%以上相同であるその類似配列から成る、DNA構築体。

【請求項 2】

タンパク質分解活性を示す酵素をコードする前記DNA配列が微生物から獲得できる、請求項 1 記載のDNA構築体。

【請求項 3】

前記DNA配列が糸状菌又は酵母から獲得できる、請求項 2 記載のDNA構築体。

【請求項 4】

前記DNA配列がアスペルギルス・アキュレアトウスCBS 101.43のDNAライブラリーを基礎に単離又は製造されたものである、請求項 3 記載のDNA構築体。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載のDNA構築体を含んで成る組換え発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載のDNA構築体又は請求項 5 記載の組換え発現ベクターを含んで成る細胞。

【請求項 7】

真核細胞である、請求項 6 記載の細胞。

10

20

【請求項 8】

菌類細胞である、請求項 7 記載の細胞。

【請求項 9】

酵母細胞又は糸状菌細胞である、請求項 8 記載の細胞。

【請求項 10】

前記細胞がアスペルギルス¹の株に属する、請求項 9 記載の細胞。

【請求項 11】

前記細胞がアスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・オリザの株に属する、請求項 10 記載の細胞。

【請求項 12】

タンパク質分解活性を示す酵素を製造する方法であって、請求項 6～11 のいずれか 1 項記載の細胞をその酵素の生産が可能な条件下で培養し、そしてその培養物からこの酵素を回収することを含んで成る方法。

【請求項 13】

請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の DNA 構築によりコードされる、又は請求項 12 記載の方法により製造される、タンパク質分解活性を示す酵素。

【請求項 14】

アスペルギルス・アキュレアトウス CBS 101.43 由来の精製プロテアーゼに対して生起された抗体と免疫学的に反応性であり、且つ SEQ ID No. 1 に示す DNA 配列によりコードされる、請求項 13 記載の酵素。

【請求項 15】

微生物から獲得できる、請求項 13 又は 14 記載の酵素。

【請求項 16】

細菌又は菌類から獲得できる、請求項 15 記載の酵素。

【請求項 17】

アスペルギルス・アキュアトウスの株から獲得できる、請求項 16 記載の酵素。

【請求項 18】

請求項 13～17 のいずれか 1 項記載のプロテアーゼ活性を示す酵素に富む、植物細胞壁の成分の分解のために有用な酵素調製品。

【請求項 19】

1 又は複数種のその他の植物細胞壁分解酵素を更に含んで成る、請求項 18 記載の調製品。

【請求項 20】

前記植物細胞壁分解酵素がペクチンリナーゼ、ペクテトリナーゼ、エンドグルカナーゼ、アラビナナーゼ、キシラナーゼ、グルカナーゼ、ガラクタナーゼ、マンナナーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、エキソペプチダーゼ及びペクチンメチルエステラーゼから成る群から選ばれる、請求項 19 記載の調製品。

【請求項 21】

タンパク質含有物質の分解又は改変のため、請求項 13～17 のいずれか 1 項記載の酵素又は請求項 18～20 のいずれか 1 項記載の酵素調製品を利用する方法。

【請求項 22】

コンタクトレンズの洗浄のため、請求項 13～17 のいずれか 1 項記載の酵素又は請求項 18～20 のいずれか 1 項記載の酵素調製品を利用する方法。

【請求項 23】

H₂O₂ の存在下で実施する、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

3 % の H₂O₂ の存在下で実施する、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

H₂O₂ の中和のためにカタラーゼを併せて使用する、請求項 23 又は 24 記載の方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

ペーケド製品の調製のため、請求項13～17のいずれか1項記載の酵素又は請求項18～20のいずれか1項記載の酵素調製品を利用する方法。

【請求項27】

動物飼料の調製のため、請求項13～17のいずれか1項記載の酵素又は請求項18～20のいずれか1項記載の酵素調製品を利用する方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明はプロテアーゼ活性を有する酵素をコードするDNA構築体、この酵素を製造する方法、プロテアーゼ活性を有する酵素及びこの酵素を含む酵素調製品に関する。

発明の背景

プロテアーゼはペプチド結合で切断できる酵素である。酸性プロテアーゼ（即ち、酸性の至適pHを有するプロテアーゼ）は哺乳動物及び微生物を含む多種多様な生物により生産されることが見い出されている。例えば、微生物の酸性プロテアーゼは、細菌株、例えばバチルス（*Bacillus*）種の株（JP 01240184）、菌類株、例えばリゾプス（*Rhizopus*）種の株（EP 72978）、シタリジウム（*Schytalidium*）種の株（JP 48091273）、スルホロブス（*Sulpholobus*）種及びサーモプラズマ（*Thermoplasma*）種の株（W0/9010072）、並びにアスペルギルス（*Aspergillus*）種の株（JP 50121486, EP 82395）により生産されることが見い出されている。

JP 3058794は *R. ニベウス*（*R. niveus*）由来の酸性プロテアーゼをコードする遺伝子のクローニング及びその組換え発現を開示している。クリホネクチラ・パラシチカ（*Cryhonec tira parasitica*）に由来するアスパラギン酸プロテアーゼをコードする遺伝子のクローニング及び発現がChoiら（1993）に記載されている。Takahashiら（1991）、Inoueら（1991）及びJP 40755586は酸性プロテアーゼ（プロテアーゼA）をコードするアスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）からの遺伝子のクローニングを開示している。

Berkaら（1990）のアスペルギルス・アワモリ（*Aspergillus awamori*）からのアスパラギン酸プロテアーゼ、アスペルギロペプシンAをコードする遺伝子を開示している。アスペルギルス・オリザ（*A. oryzae*）からのアスパラギン酸プロテアーゼ、アスペルギロペプシンOをコードする遺伝子のクローニングがBerkaら（1993）により述べられている。アスペルギルス・オリザからの酸性プロテアーゼ（PEPA）をコードする遺伝子のクローニングはGomiら（1993）により開示されている。

酸性プロテアーゼは工業的に、例えば食品及び飼料の製造において、革産業（例えば獣皮の脱毛）において、タンパク質加水分解物の製造において、並びにワインの製造及び醸造産業において幅広く利用されている。

様々な用途、特に食品及び飼料産業において、単一成分の酸性プロテアーゼの要望がある。

発明の概要

本発明の目的は単一成分プロテアーゼを製造することにある。

従って、第一の観点において、本発明はプロテアーゼ活性を示す酵素をコードするDNA配列を含んで成るDNA構築体に関連し、このDNA配列はSEQ ID No. 1 に示すDNA配列又はSEQ ID No. 1 に示すDNA配列と80%以上相同であるその類似配列を含んで成る。

第二の観点において、本発明はプロテアーゼ活性を示す酵素をコードするDNA配列を含んで成るDNA構築体に関連し、このDNA配列はSEQ ID No. 2 に示すDNA配列又はSEQ ID No. 2 に示すDNA配列と80%以上相同であるその類似配列を含んで成る。

SEQ ID No. 1 に示すDNA配列は、以降の開示においてプロテアーゼIと呼んでいる酵素をコードする。SEQ ID No. 2 に示すDNA配列によりコードされる酵素はプロテアーゼIIと呼ぶ。

データベース相同性サーチにより、SEQ ID No. 1 及び2 に示すDNA配列は一般的に新規であることが見い出された。SEQ ID No. 1 に示すDNA配列の、公知のプロテアーゼ遺伝子との最大の相同性は、アスペルギルス・ニガー（*A. niger*）酸性プロテアーゼAに対する74.7%であることが見い出させ、538個のヌクレオチドの重複が認められた。プロテ

10

20

30

40

50

ナーゼIIに対する最大の相同性はアスペルギルス・オリザ アスペルギロペプシンOに対する75.5%であることが見い出され、343個のヌクレオチドの重複が認められた。

更なる観点において、本発明は本発明のDNA構築体を有する発現ベクター、このDNA構築体又は発現ベクターを含んで成る細胞、及びプロテアーゼ活性を示す酵素を製造する方法に関する。この方法は、前記細胞を、この酵素の生産を可能とする条件下で培養し、そしてその培養物からこの酵素を回収することを含んで成る。

更なる別の観点において、本発明はプロテアーゼ活性を示す酵素に関連し、この酵素は上記の本発明のDNA構築体によりコードされるものであるか、又は本発明の方法により製造されたものである。

更なる重要な観点において、本発明はプロテアーゼ活性を有する酵素であって、7.0以下のpH及び3%以下の過酸化水素の存在下で活性である酵素に関する。本明細書において、酵素について用いている「活性」なる語は、その酵素が上述の条件、例えば本明細書の実施例5に記載の条件下で基質を加水分解できる酵素を意味することを意図している。

7.0以下のpH及び3%以下の過酸化水素の存在下で活性であり、且つ実施例5に特定する条件下でレンズから80%以上のリゾチームを除去する本発明の酵素を以下の開示において「H₂O₂・安全性プロテアーゼ」と呼ぶ。この酵素は一般に新規であると信じられている。

また、本発明はプロテアーゼ活性を有する酵素であって、7.0以下のpHで活性であり、且つPhe-Val又はLys-Tyr結合に対して特異的である酵素を提供する。「特異的」なる語は、その酵素が、基質がウシのグルカゴンであるときに、これらの結合を主として切断することを意味することを意図している。

本明細書に記載のプロテアーゼI及びプロテアーゼIIは本発明の酵素の好適な例である。これらの酵素は酸性プロテアーゼ、即ち、酸性の至適pHを有するプロテアーゼであることが見い出されている。

本発明により、高純度、即ち、本明細書の材料と方法の章に記載のSDSゲル電気泳動による決定に従い純度75%以上、そしてより好ましくは純度90%以上であるプロテアーゼを提供することが可能である。

最後の観点において、本発明は本発明の酵素を含んで成る酵素調製品、及びタンパク質含有物質の改変又は分解を所望する様々な目的のための酵素又は酵素調製品の利用に関する。

発明の詳細な説明

本発明のDNA構築体、ベクター及び方法

本明細書において、本発明のDNA構築体を定義するために用いている「類似体」なる語は、プロテアーゼ活性を有する酵素をコードし、且つSEQ ID No. 1又は2のそれぞれに示しているDNA配列と80%以上相同である任意のDNA配列を含むものと理解される。類似なDNA配列は、以下に記載の条件下でプロテアーゼ酵素をコードするDNAと同一のプロープにハイブリダイズするDNA配列でありうる：5 XのSSCの中での予備浸漬及び5 XのSSC、5 XのDenhardt、50mMのリン酸ナトリウム、pH6.8及び50 µgの変性音波処理牛胸腺DNA溶液中での1 hで約55°Cでのプレハイブリダイジング、それに続く50 µCiの32-P-dCTPラベル化プロープの添加された同一の溶液の中での18 hで約55°Cでのハイブリダイゼーション、それに続く2 XのSSC、0.2%のSDSでの55°Cで30分の3回の洗浄。類似のDNA配列はSEQ ID No. 1又は2に示す配列と90%以上相同であることが好ましく、その配列と95%以上相同であることが好ましい。

類似のDNA配列は、例えば、別の生物から単離されたものであるか、又はSEQ ID No. 1もしくは2に示すDNA配列をもとに、例えば別のプロテアーゼアミノ酸配列をもたらしうことはないが、このDNA構築体を導入する宿主生物のコドン用法に対応するヌクレオチド置換、又は異なるアミノ酸配列をもたらし、それ故、可能としては、天然酵素とは異なる特性を有するプロテアーゼ突然変異体をもたらしうる別のタンパク質構造をもたらしヌクレオチド置換により調製されたものであってよい。可能な改変のその他の例は、その配列への1もしくは複数個のヌクレオチドの挿入、その配列のいずれかの末端への1もしくは複数個のヌクレオチドの付加、又はその配列のいずれかの末端もしくは配列内での1もしくはは

10

20

30

40

50

複数個のヌクレオチドの欠失である。

更に、類似のDNA配列によりコードされるプロテアーゼはSEQ ID No. 1 もしくは 2 に示すDNA配列によりコードされる精製プロテアーゼに対して生起した抗体と免疫学的に交差反応性である。

SEQ ID No. 1 に示すDNA配列の類似体がハイブリダイズすることのできるヌクレオチドプローブは、例えば以下の任意のDNA配列又は任意のそれらの組合せをもとに調製できる：

- (a) AATTAAGCAT CCTCCATCTT
- (b) CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC 10
- (c) TCCCGCTCTT CTCTCGATCT
- (d) CATCATCCCA ATAAC TCGGA
- (e) CAAAATGAAG ACCTCTGCTC
- (f) TCTTGACCGC TGGCCTGTTG
- (g) GCACCGCTGC TATTGCTGCT
- (h) CCTCTCACCG CGAAGCGCGC 20
- (i) ACGTGCTCGC GCTGCCAAGC
- (j) TGGCACCAGC CGCAAGAGCA
- (k) AGGGGGGTCT CAAGCCCGGC
- (l) ACCCAGCGAG GCCATAACCT
- (m) GACCGGCTCC AAGAACACCG
- (n) GAGGTACTCG TCCAAC TGGG 30
- (o) CCGGCGCCGT GCCAT
- (p) AATTAAGCAT CCTCCATCTT CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC TCCCGCTCTT
- CTCTCGATCT CATCATCCCA ATAAC TCGGA CAAAATGAAG ACCTCTGCTC
- TCTTGACCGC TGGCCTGTTG GCACCGCTGC TATTGCTGCT CCTCTCACCG
- CGAAGCGCGC ACGTGCTCGC GCTGCCAAGC TGGCACCAGC CGCAAGAGCA
- AGGGGGGTCT CAAGCCCGGC ACCCAGCGAG GCCATAACCT GACCGGCTCC 40
- AAGAACACCG GAGGTACTCG TCCAAC TGGG CCGGCGCCGT GCCAT

これらの配列はSEQ ID No. 1 に示すDNA配列又はかかる配列の類似体の部分配列を構成する。

SEQ ID No. 2 に示すDNA配列の類似体とハイブリダイズすることのできるヌクレオチドプローブは、例えば任意の以下のDNA配列又は任意のそれらの組合せをもとに調製できる：

(p1) CTGCTTCTCC TTCTCTTCCT
 (q) CCTCGTGATA TCTGCTTGAA
 (r) CATCTCCTCA TCATGGTCGT
 (s) CCTCAACAAG GTGCAGCCTT
 (t) CTTCTGGGTC TGACCACCGC
 (u) CGCCACTGGT CCCCTGGCCG
 (v) AGCCGCAGGC TTCTGTCCGG
 (w) TCAAGAACTT CTCCGTCAAG
 (x) CAGGTCGAGA AGGCGGGCAG
 (y) CAAGGGACGT ACCGTTAACC
 (z) TGCCGGGTCT GTATGCGAAT
 (aa) GCGCTGGCCA AGTATGGCGC
 (bb) CCAGGTGCGG CCAGCGTCAA
 (cc) GGCCGCCGCC GTCAGTGGCA
 (dd) GCGTCGTGAC CACCCGCAGG CCAACGACG
 (ee) CTGCTTCTCC TTCTCTTCCT CCTCGTGATA TCTGCTTGAA CATCTCCTCA
 TCATGGTCTG CCTCAACAAG GTGCAGCCTT CTTCTGGGTC TGACCACCGC
 CGCCACTGGT CCCCTGGCCG AGCCGCAGGC TTCTGTCCGG TCAAGAACTT
 CTCCGTCAAG CAGGTCGAGA AGGCGGGCAG CAAGGGACGT ACCGTTAACC
 TGCCGGGTCT GTATGCGAAT GCGCTGGCCA AGTATGGCGC CCAGGTGCGG
 CCAGCGTCAA GGCCGCCGCC GTCAGTGGCA GCGTCGTGAC CACCCGCAGG CCAACGACG

10

20

30

これらの配列はSEQ ID No. 2 に示すDNA配列又はかかる配列の類似体の部分配列を構成する。

本発明のDNA配列は以下を包括する一般方法により単離されうる：

— 適当なベクターの中で、アスペルギルス・アキュレアトゥス (*A. aculeatus*) 由来のDNAライブラリーをクローニングする、

— このベクターで適当な酵母宿主細胞を形質転換させる、

— この宿主細胞を、このDNAライブラリー中のクローンによりコードされる任意の課題の酵素を発現させる適当な条件下で培養する、そして

— かかるクローンにより生産される酵素の任意のプロテアーゼ活性を決定することにより、陽性クローンをスクリーニングする。

このスクリーニング法のより詳細な説明は以下の実施例 1 及びその内容を引用することで本明細書に組入れる W093/11249 に示す。

酵素をコードするDNA配列は例えば、アスペルギルス・アキュレアトゥス、例えば Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, NL より公共的に入手できる株 CBS 101.43 の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、そして適度な酵素活性（即ち、タンパク質及びペプチドにおけるペプチド結合を加水分解する酵素の能力により規定されるプロテアーゼ活性）

40

50

を示すクローンを選別することにより単離されうる。適切なDNA配列は標準の手順、例えば実施例1に記載の通りにして、クローンから単離されうる。

同族酵素をコードするDNA配列、即ち、類似のDNA配列は、別の微生物、詳しくは菌類、例えば別のアスペルギルス種の株、特にA. アキュレアトゥスもしくはA. ニガーの株、トリコデルマ (*Trichoderma*) 種の株、特にT. ハージアヌム (*T. harzianum*) もしくはT. リージ (*T. reesie*) の株、フサリウム (*Fusarium*) 種の株、特にF. オキシスポルム (*F. oxysporum*) の株、リゾプス (*Rhizopus*) 種の株、例えばR. ニベウス (*R. niveus*) の株、シリタリジウム種の株、又はヒュミコラ (*Humicola*) 種の株のcDNAライブラリーを同様にスクリーニングすることにより誘導できうるものと予測される。

他方、本発明のDNA配列は、公知の手順に従って、本明細書に開示するDNA配列をもとに調製した合成オリゴヌクレオチドプローブの利用により、適当な生物由来のDNAから簡単に単離できうる。例えば、適切なオリゴヌクレオチドプローブは任意の上記の部分ヌクレオチド配列をもとに調製できうる。

このDNA配列を次に組換え発現ベクターの中に挿入できる。これは組換えDNA手順に簡単にかけることのできる任意のベクターであってよく、そしてベクターの選択は往々にしてそれを導入する宿主細胞に依存するであろう。即ち、このベクターは自己複製式ベクター、即ち、染色体外質として存在し、その複製は染色体の複製とは独立しているベクター、例えばプラスミドであってよい。他方、このベクターは、宿主細胞の中に導入したときに、その宿主細胞ゲノムの中に組込まれ、そしてそれが組込まれた染色体と一緒に複製されるものであってよい。

ベクターにおいて、このプロテアーゼをコードするDNA配列は適当なプロモーター及びターミネーター配列に作動連結されているべきである。このプロモーターは選択した宿主細胞の中で転写活性を示す任意のDNA配列であってよく、そしてその宿主細胞にとって内性又は外性のいずれかであるタンパク質をコードする遺伝子に由来しうる。このプロテアーゼをコードするDNA配列、プロモーター及びターミネーターをそれぞれライゲーションするのに用いる手順並びにそれらを適当なベクターの中に挿入するのに用いる手順は当業者に公知である (例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照のこと)。

本発明の酵素をコードするDNA配列により形質転換させる宿主細胞は真核細胞、特に菌類細胞、例えば酵母又は糸状菌細胞であることが好ましい。特に、この細胞のアスペルギルスの種に属し、最も好ましくはアスペルギルス・オリザ又はアスペルギルス・ニガーである。菌類細胞は、公知の方法での、プロトプラストの形式、及びそのプロトプラストの形質転換、それに続くその細胞壁の再生を包括する方法により形質転換されうる。宿主微生物としてのアスペルギルス・オリザの利用はEP 238,023 (Novo Noridisk A/S) に記載され、その内容は引用することで本明細書に組入れる。この宿主細胞は酵母細胞、例えばサッカロマイセス (*Saccharomyces*) の株、特にサッカロマイセス・セレビジエ (*S. cerevisiae*)、サッカロマイセス・クルイベリ (*S. kluyveri*) もしくはサッカロマイセス・ウバルム (*S. uvarum*)、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 種の株、例えばシゾサッカロマイセス・ポンベ (*S. ポンベ*)、ハンセヌラ (*Hansenula*) 種、ピチア (*Pichia*) 種、ヤロイア (*Yarrowia*) 種の株、例えばヤロイア・リポリチカ (*Y. lipolytica*)、又はクルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 種、例えばクルイベロマイセス・ラクチス (*K. lactis*) であってもよい。

更なる観点において、本発明はプロテアーゼ活性を有する酵素を製造する方法に関連し、その方法においてはこの酵素をコードする本発明のDNA構築体により形質転換された適当な宿主細胞を、この酵素の生産を可能とする条件下で培養し、そして得られる酵素をその培養物から回収する。

この形質転換宿主細胞を培養するのに用いる培地は注目の宿主細胞を増殖するのに適当な適当な任意の慣用の培地であってよい。発現したプロテアーゼは好都合には培養培地に分泌され、そしてそれから、遠心又は濾過によりその培地から細胞を分離させ、硫酸アンモニウムの如くの塩によりその培地のタンパク質性成分を沈殿させ、次いでイオンクロマト

10

20

30

40

50

グラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の如くのカロマトグラフィー手順を行うことを含む公知の手順により、回収できうる。

本発明の酵素

好ましくは、本発明のプロテアーゼ（例えば H_2O_2 安定性又はLys-TyrもしくはPhe-Val特異的プロテアーゼ）は2～7の範囲のpH、例えば6.0以下のpH、例えば2～6の範囲のpH、そして最も好ましくは4～6のpH範囲において活性である。

この両酸性プロテアーゼは0.01～5%の過酸化水素、例えば0.1～5%、0.5～4%、1～4%、又は2～3%の過酸化水素の存在下で活性であり、そしてコンタクトレンズの洗浄に適用できることが理解されるであろう。

本発明の H_2O_2 -安定プロテアーゼの好適な例は、SEQ ID No. 1 に示すDNA配列又はこのDNA配列と80%以上相同である上記したその類似体によりコードされる酵素である。 10

本発明のLys-Tyr又はPhe-Val特異的プロテアーゼの好適な例はSEQ ID No. 2 に示すDNA配列又はこのDNA配列と80%以上相同である上記したその類似体によりコードされる酵素である。

本発明の酵素のアスペルギルス・アキュレアトウスCBS 101.43に由来する精製酵素に対して生起させた抗体と免疫学的に反応性であることが好ましく、そしてSEQ ID No. 1 又は2 に示すDNA配列によりコードされる。本明細書において、「由来する」なる語は株CBS 101.43により生産されるプロテアーゼを意味するだけでなく、株CBS 101.43から単離され、且つ前記DNA配列により形質転換された宿主生物において生産されたDNA配列によりコードされるプロテアーゼも意味する。 20

本発明の H_2O_2 安定プロテアーゼ及びLys-Tyr又はPhe-Val特異的プロテアーゼは共に菌類種アスペルギルス・アキュレアトウスの株から獲得できるが、かかる酵素は同様にその他の生物、特に微生物からも獲得できると考えられる。

即ち、本発明の酵素は好ましくは細菌又は菌類、例えばアスペルギルス、リゾプス、トリコデルマ、例えばT. リージー又はT. ハーシアヌム、ペニシリウム (Penicillium)、フサリウム、シタリシウム又はヒュミコラ、例えばH. インソレンスもしくはH. ラヌギノーザ (H. lanuginosa) の株、あるいはバチルスの株から獲得できる。

アスペルギルス種の例には、A. ニガー、A・オリザ又はA. アキュレアトウス、例えばA. アキュレアトウスCBS 101.43が含まれる。

更なる別の観点において、本発明はプロテアーゼ含有材料の分解又は改変にとって有用な酵素調製品に関連し、この調製品は上記のプロテアーゼ活性を示す酵素に富んでいる。 30

本発明の酵素に富む酵素調製品は例えば複数種の酵素活性体を含んで成る酵素調製品、特に複数種の植物細胞壁分解酵素を含んで成る酵素調製品、例えばPectinase (商標)、Pectinex Ultra SP (商標)、ガマナーゼ、セルクラストもしくはセルザイム、又はプロテアーゼ及び／もしくはエキソペプチダーゼ含有酵素調製品、例えばNeutrase (商標)、Alcalase (商標) もしくはFlavourzyme (商標) (全てNovo Nordisk A/Sより入手可能) でありうる。本明細書において、「富む」なる語は、この酵素調製品のプロテアーゼ活性が上記の方法により調製される本発明の酵素の添加により、例えば少なくとも1.1倍の富化係数により高められていることを意味することを意図している。

他方、プロテアーゼ活性を示す酵素に富むこの酵素調製品は、主要酵素成分として本発明の酵素を含んで成るもの、例えば単一成分酵素調製品であってよい。 40

この酵素調製品は当業界に公知の方法に従って調製でき、そして液体又はドライ調製品の形態であってもよい。例えば、この酵素調製品は顆粒又は微顆粒の形態であってよい。この調製品に含ませるべき酵素は当業界に公知の方法に従って安定化されうる。

本発明に係る酵素調製品は植物の細胞壁の分解又は改変のための試薬として使用されうる。エクステンシンの如くの一部のタンパク質は植物細胞壁の成分である。従って、プロテアーゼは植物細胞壁の分解又は改変を促進するであろう。かかるプロテアーゼを含む植物細胞壁分解用酵素調製品は、オリーブ及びナタネの如く植物源からの油の抽出又はリンゴ、ナシ及びかんきつ類の如く様々な果実からの果汁の生産の如く多種多様な用途のために利用されうる。 50

この酵素調製品は更に1又は複数種のその他の植物細胞壁分解酵素、例えばペクチンリアーゼ、ペクテートリアーゼ、エンドグルカナーゼ、アラビナナーゼ、キシラナーゼ、グルカナーゼ、ガラクタナーゼ、マンナナーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、エキソペプチダーゼ又はペクチンメチルエステラーゼを含みうる。この調製品は更に上記のエンド酵素と同じ基質に対してエクソ活性を示す1又は複数種の酵素を含みうる。本発明に係るプロテアーゼは数多くのその他の細胞壁分解酵素と同じpH及び温度条件で働き、そしてそれ故かかる用途に極めてよく適合する。

更なる酵素はアスペルギルス属に属する微生物、好ましくはアスペルギルス・アキュレアトゥス、アスペルギルス・アワモリもしくはアスペルギルス・オリザ、又はトリコデルマにより生産されうる。

10

本発明に係る酵素調製品はワイン産業においても、濁りを防止するため又は濁りを溶かすために利用でき、なぜなら往々にしてタンパク質が望ましくない濁りの形成に参与しているからである。本発明に係るプロテアーゼはワインの発酵及び熟成下の条件下で活性であり、それ故この用途にとって極めて有用である。

本発明の酵素又は酵素調製品は、いわゆるハード・フラワーの軟化を獲得するためにフラワーのグルテン成分を虚弱化させる等のため、ベーキングにおいて利用されうる。ウィーク（虚弱）フラワーの利用は、非常に伸長であり、且つ弾性でないものでなければならない練り製品の製造、例えば押出ベーكد製品、ビスケット及びその他の製品であって輸送及びベーキングの際にそのもとの形態が保たれていなければならない製品の製造にとって重要である。本発明のプロテアーゼはフラワーの虚弱化のために慣用的に使用されている剤、例えばメタ亜硫酸ナトリウム（SMS）に対する所望の代替品を成す。SMSの利用は潜在的な健康に対する危険性を理由に望ましくないと考えられている。

20

このプロテアーゼ調製品はタンパク質の消化性を高めるために食品及び飼料産業においても利用できる。例えば、この酵素又は酵素調製品は動物飼料に加えるか、又は動物飼料を加工するのに用いられうる（特に、家豚又は家禽）。これにより、飼料の成分の消化性は高まり、動物の成長率及び飼料利用率の向上がもたらされる。Brenesら（1993）を参照のこと。

更に、本発明の酵素又は酵素調製品は例えば植物タンパク質、例えばダイズ（soy）、エンドウマメ（pea）、ハウチワマメ（lupin）及びナタネ（rape）の種子タンパク質、乳製品、例えばカゼイン、食肉タンパク質又は魚類タンパク質由来のタンパク質加水分解物を作るのに有用でありうる。このプロテアーゼは、食品、飼料又はデジカル製品を作るために、溶解度、粘稠度、味又は発酵性を高めるため、抗原性を下げるため、又はその他の目的のために、タンパク質加水分解物に利用されうる。このプロテアーゼは単独で、又はその他のプロテアーゼと共に、もしくはエキソペプチダーゼの如くのその他の酵素と共に利用できる。本発明のプロテアーゼの、エキソペプチダーゼに富む酵素調製品との一緒での利用はタンパク質加水分解物の味をよくするであろう。

30

このプロテアーゼ調製品はタンパク質を改変するため、例えばタンパク質に原因する又はある程度原因する粘性の低下のためにも利用できる。かかる粘性の問題はダイズ及びエンドウマメの如くの様々なタンパク質含有植物材料の加工において公知である。

40

更に、この酵素又は酵素調製品は魚類又は肉類の加工において、例えば歯ごたえ及び／又は粘性を変えるために用いられうる。

このプロテアーゼ調製品は発酵プロセス、例えば大麦、麦芽及びその他のビールの如くの製品のための原材料の酵母発酵を促進するのににも利用できる。

更に、本発明の酵素又は酵素調製品は革産業において、例えば獣皮からの脱毛において有用でありうる。このプロテアーゼの低い至摘pHは有利であり、なぜならその後の獣皮のなめし作業は酸性の条件で行われるからである。このプロテアーゼ調製品はタンパク質からのペプチドの製造にとって有用であり、この場合、その他のタンパク質分解活性物を本質的に含まないクローニングされた酵素を利用することが好都合である。

更に、このプロテアーゼ調製品は様々な製品の精製を助長するもしくは品質を向上するた

50

めに、例えばガム、例えばグアーガム、キサンタンガムの精製を助長するもしくは品質を向上するため、絹の脱ガムのため、又は羊毛の品質向上のために、タンパク質を分解するのに使用されうる。

過酸化水素に対する安定性のため、本発明の両プロテアーゼはコンタクトレンズの洗浄、及びタンパク質含有材料を除去するため過酸化水素の利用を包括するその他の用途のために極めて有用である。

以上の用途のため、本発明の酵素調製品の用量及びこの調製品を使用するためのその他の条件は当業界に公知の方法に基づいて決定されうる。

本発明を添付図面で更に説明する。

図1はプロテアーゼI及びIIそれぞれのpH活性プロフィールを示す；

10

図2はプロテアーゼI及びIIそれぞれの温度活性プロフィールを示す；

図3及び4はプロテアーゼI及びIIそれぞれのpH安定性を示す；

図5及び6はプロテアーゼI及びIIそれぞれの温度安定性を示す；

図7はコンタクトレンズの洗浄における様々なプロテアーゼの性能である；

図8は本発明の酵素のグルテン伸長作用である。

本発明を以下の実施例において更に詳しく説明し、ここでこれらは本発明の範囲を限定するものではない。

材料と方法

ドナー生物：mRNAは、ダイズ含有発酵培地の中で、十分な通気を保証するための攪拌を伴って増殖させたアスペルギルス・アキュレアトゥスCBS 101.43から単離した。菌糸を3～5日間の増殖後に回収し、液体窒素の中で急速凍結し、そして-80°Cで保存した。

20

酵母株：使用したサッカロマイセス・セビジエ株yNG231 (MATアルファ、leu2, ura3-52, his4-539, pep4-デルタ1、cir+) 又はJG169 (MAT α ; ura 3-52 ; leu 2-3, 112 ; his 3-D 200 ; pep 4-113 ; prcl::HIS3 ; prb1::LEU2 ; cir+) とした。

プラスミド：酵母TPIプロモーターを含む発現プラスミドpYHD17は市販のプラスミドpYESI I (Invitrogen) から調製した。プラスミド及びその構築は、その内容を引用することで本明細書に組入れるW093/11249に更に説明してある。

アスペルギルス発現ベクターpHD414はプラスミドp 775 (EP 238023に記載) の誘導体である。pHD414の構築はW093/11249に更に説明してある。pHD414は、A. ニガーグルコアミラーゼターミネーター及びA. オリザTAKAアミラーゼプロモーターを含む。

30

全RNAの抽出：全RNAは、Chirgwinら1979及びW093/11249に本質的に記載の通りの、グアニジニウムチオシアネートによる抽出、それに続く、5.7Mのクッションによる超遠心により調製した。

ポリ(A)⁺RNAの単離：ポリ(A)⁺RNAはオリゴ(dT) セルロースアフィニティークロマトグラフィー (Aviv & Leder, 1972) により単離した。一般には、0.2 gのオリゴ(dT) セルロース (Boehringer Mannheim) を10mlの1 Xのカラム装填バッファー (20mMのトリス-Cl、pH7.6、0.5MのNaCl、1 mMのEDTA、0.1%のSDS) の中で予備膨潤させ、DEPC処理した栓付きプラスチックカラム (Poly Prep Chromatography Column, Bio Rad) に載せ、次いで20mlの1 Xの装填バッファーで平衡化させた。全RNAを65°Cで8 min加熱し、氷の上で5 min急冷し、そして1 volの2 Xのカラム装填バッファーをRNAサンプルに加えた後、カラムの上に載せた。その溶出液を回収し、そして各装填の前にそのサンプルを上記の通りに加熱し、次いで氷の上で急冷して、2～3回再装填した。このオリゴ(dT) カラムを10volの1 Xの装填バッファー、次いで3 volのメディウム塩バッファー (20mMのトリス-Cl、pH7.6、0.1MのNaCl、1 mMのEDTA、0.1%のSDS) で洗い、次いで65°Cに予備加熱しておいた3 volの溶出バッファー (10mMのトリス-Cl、pH7.6、1 mMのEDTA、0.05%のSDS) によりポリ(A)⁺RNAを500 μ l づつの画分を回収しながら溶出させた。そのOD₂₆₀を各回収画分について測定し、そしてmRNA含有画分をプールし、そして-20°Cで12hかけてエタノール沈殿させた。ポリ(A)⁺RNAを遠心により回収し、DEPC-DIWに再懸濁し、そして5～10 μ gのアリコートとして-80°Cで保存した。

40

ノーザンブロット分析：様々な菌糸由来のポリ(A)⁺RNA (5 μ g / サンプル) を1.2ア

50

ガロースー2.2Mホルムアルデヒドゲル (Sambrookら、1989) で電気泳動させ、次いで10 XのSSC (Sambrookら、1989) をトランスファーバッファーとして用いてナイロン膜 (Hybond-N, Amersham) にブロットした。3種のランダムプライムした (Feinberg & Vogelstein, 1983) ³²P-ラベル化cDNAプローブを個々のハイブリダイゼーションに用いた：1) A. アキュレアトウス由来のポリガラクトナーゼのための1.3kbのNot I-Spe Iフラグメント、2) A. アキュレアトウス由来のエンドグルカナーゼIをコードする1.3kbのNot I-Spe Iフラグメント、及び3) A. アキュレアトウス由来のガラクタナーゼをコードする1.2kbのEag Iフラグメント。ノーザンハイブリダイゼーションは5 XのSSC (Sambrookら、1989)、5 XのDenhardt溶液 (Sambrookら、1989)、0.5%のSDS (w/v) 及び100 µg/mlの変性サク精子DNAの中で、約2 ng/mlのプローブ濃度で65°Cで16h行い、次いで65°Cで5 XのSSC (2×15min)、2 XのSSC、0.5%のSDS (1×30min)、0.2 XのSSC、0.5%のSDS (1×30min) 及び5 XのSSC (2×15min) で洗った。-80°Cで12hオートラジオグラフィーにかけた後、プローブ#1をフィルターからその製造者の仕様書に従って除去し、そしてプローブ#2と再ハイブリダイズさせ、そして最後にプローブ#3と再ハイブリダイズさせた。Bethesda Research Laboratories由来のRNAラダーをサイズマーカーとして用いた。

10

cDNA合成：

第一鎖の合成：二本鎖のcDNAを5 µgのA. アキュレアトウスポリ (A)⁺RNAから、RNase H法 (Gubler & Hoffman 1983, Sambrookら1989) により、ヘアーピン改良を利用して合成した。ポリ (A)⁺RNA (5 µlのDEPC処理中で5 µg) を70°Cで8 min加熱し、氷の上で急冷し、そして1 mMずつのdNTP (Pharmacia)、40ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター (RNasin, Promega)、10 µgのオリゴ (dT)₁₂₋₁₈プライマー (Pharmacia) 及び1000ユニットのSuper ScriptII RNase H-逆転写酵素 (Bethesda Research Laboratories) を含む逆転写酵素バッファー (50mMのトリス-Cl、pH8.3、75mMのKCl、3 mMのMgCl₂、10mMのDTT; Bethesda, Research Laboratories) により50 µlの最終容量となるように混合した。第一鎖cDNAは反応混合物を45°Cで1 hインキュベートすることにより合成した。

20

第二鎖の合成：合成後、30 µlの10mMのトリス-Cl、pH7.5、1 mMのEDTAを加え、そしてmRNA:cDNAハイブリドを、40 µgのグリコーゲン担体 (Buehringer Mannheim)、0.2volの10MのNH₄Ac及び2.5volの96%のEtOHの添加により、-20°Cで12hエタノール沈殿させた。そのハイブリドを遠心に回収し、70%のEtOHで洗い、風乾し、そして100 µMずつのdNTP、44ユニットのE. コリ (E. coli) DNAポリメラーゼI (Amersham)、6.25ユニットのRNase H (Bethesda Research Laboratories) 及び10.5ユニットのE. コリDNAリガーゼ (New England Biolabs) を含む256 µlの第二鎖バッファー (20mMのトリス-Cl、pH7.4、90 mMのKCl、4.6mMのMgCl₂、10mMの(NH₄)₂SO₄、16 µMのβNAD⁺) に再懸濁させた。第二鎖cDNA合成はこの反応チューブを16°Cで3 hインキュベートし、そしてその反応を20mMの最終濃度となるEDTAの添加により停止させ、次いでフェノール抽出した。

30

マング・ビーンヌクレアーゼ処理：二本鎖 (ds) cDNAを2 volの96%のEtOH、0.1volの3 MのNaAc、pH5.2の添加により-20°Cで12hエタノール沈殿させ、遠心により回収し、70%のEtOHで洗い、乾かし (Speed Vac)、そして36ユニットのマング・ビーンヌクレアーゼ (Bethesda Research Laboratories) を含む30 µlのマング・ビーンヌクレアーゼバッファー (30mMのNaAc、pH4.6、300mMのNaCl、1 mMのZnSO₄、0.35mMのDTT、2%のグリセロール) に再懸濁した。一本鎖のヘアーピンDNAを、その反応物の30°Cで30minのインキュベーション、それに続く70 µlの10mMのトリス-Cl、pH7.5、1 mMのEDTAの添加、フェノール抽出、並びに2 volの96%のEtOH及び0.1volの3 NのNaAc、pH5.2による-20°Cで12hのエタノール沈殿によりクリップした。

40

T4 DNAポリメラーゼによる平滑末端化：ds cDNAを0.5mMずつのdNTP及び7.5ユニットのT4 DNAポリメラーゼ (Invitrogen) を含む50 µlのT4 DNAポリメラーゼバッファー (20mMのトリス-アセテート、pH7.9、10mMのMgAc、50mMのKAc、1 mMのDTT) の中で、その反応混合物を37°Cで15minインキュベートすることにより平滑末端化した。その反応を20mMの最

50

終濃度となるEDTAの添加により停止させ、次いでフェノール抽出及びエタノール沈殿を行った。

アダプターライゲーション及びサイズ選別：フィル・イン反応の後、cDNAを非パリンドロームBstXIアダプターに、600pmolのBstXIアダプター及び5ユニットのT4リガーゼ（Invitrogen）を含む30 μ lのライゲーションバッファー（50mMのトリス-Cl、pH7.8、10mMのMgCl₂、10mMのDTT、1 mMのATP、25 μ g/mlの牛血清アルブミン）の中で、その反応混合物を16°Cで12hインキュベートすることによりライゲーションした。その反応は70°Cで5 min加熱することにより停止させ、そしてアダプター付きcDNAをアガロースゲル電気泳動（0.8%のHSB-アガロース、FMC）によりサイズ分画して、ライゲーションしていないアダプター及び小cDNAで分離させた。このcDNAを0.7kbのカットオフ値でサイズ選別し、そしてそのcDNAをアガロースゲルから、10mMのトリス-Cl、pH7.5、1 mMのEDTAの中で100ボルトで1 hかけて電気泳動させ、フェノール抽出し、そして上記のようにして-20°Cで12hエタノール沈殿させた。

10

cDNAライブラリーの構築：アダプター付きのds DNAを遠心により回収し、70%のEtOHで洗い、そして25mlのDIWに再懸濁させた。大スケールライブラリーライゲーションの前に、それぞれ1 μ lのds cDNA（反応チューブ#1-#3）、2ユニットのT4リガーゼ（Invitrogen）及び50ng（チューブ#1）、100ng（チューブ#2）及び200ng（チューブ#3及び#4）のBstXI切断酵母発現ベクターのpYES 2.0ベクター（Invitrogen）又はyHD17のいずれか、を含む10 μ lのライゲーションバッファー（先と同じ）の中で4通りの試験ライゲーションを行った。ライゲーション反応は16°Cで12hのインキュベーション、70°Cで5 minの加熱により行い、そして1 μ lずつのライゲーションを40 μ lのコンピテントE・コリ1061細胞（OD 600=0.9/1 リットルのLB培地；冷DIWで2回、20mlの10%のグリセロールで1回洗い、2 mlの10%のグリセロールに再懸濁）にエレクトロポレーションさせた（200 Ω ，2.5kV，25 μ F）。各形質転換混合物に1 mlのSOCを添加した後、細胞を37°Cで1 h増殖させ、50 μ lをLB+アンピシリンプレート（100 μ g/ml）でプレート培養し、そして37°Cで12h増殖させた。

20

最適な条件を利用し、大スケールライゲーションを、9ユニットのT4リガーゼを含む40 μ lのライゲーションバッファーの中で設定し、そしてその反応物を16°Cで12hインキュベートした。そのライゲーション反応を70°Cで5 min加熱することにより停止させ、-20°Cで12hかけてエタノール沈殿させ、遠心により回収し、そして10 μ lのDIWに再懸濁した。1 μ lのアリコートを経済コンピテントE・コリ1061細胞の中に、上記と同じエレクトロポレーション条件を利用して形質転換させ、そしてその形質転換細胞を力価検定し、そしてライブラリーを5000~7000c.f.u./プレートでLB+アンピシリンプレート上でプレート培養した。各プレートに3 mlの培地を加えた。細菌をかき取り、1 mlのグリセロールを加え、そしてプールとして-80°Cで保存した。残りの2 mlをDNA単離のために用いた。DNAの量が必須の数の酵母形質転換体をもたらすのに足りないときは、大スケールDNAを50 μ lの-80°Cの細菌ストックで接種して一夜増殖させた500mlの培地（TB）から調製した。

30

酵母ライブラリーの構築：酵母中の全ての細菌クローンが試験されることを保証するため、オリジナルのプール中の細菌クローン数より5倍多い数の酵母形質転換体をリミットとして用意した。

40

個々のプール由来の1 μ lのアリコートの精製プラスミドDNA（100ng/ μ l）を40 μ lのコンピテントS・セレビジエJG169細胞（OD 600=1.5/500mlのYPD；冷DIWで2回、冷1 Mのソルビトールで1回洗い、0.5mlの1 Mのソルビトールに再懸濁；Becker & Guarante, 1991）にエレクトロポレーションした（200 Ω ，1.5kV，25 μ F）。1 mlの1 Mの冷ソルビトールの添加後、250~400c.f.u./プレートとなるように80 μ lのアリコートをSC+グルコース-ウラシル上でプレート培養し、そして30°Cで3~5回インキュベートした。

アスペルギルスにおける発現のためのcDNA遺伝子の単離：

1又は複数種のプロテアーゼ生産性コロニーを50mlのガラス試験管中の20mlのYNB-1培地に接種せしめた。このチューブを30°Cで2日振盪した。その細胞を10min，3000rpmでの遠

50

心により回収した。

細胞を1 mlの0.9Mのソルビトール、0.1MのEDTA、pH7.5に再懸濁させた。そのペレットをエッペンドルフチューブに入れ、そして全速で30秒遠心した。細胞を0.4mlの0.9Mのソルビトール、0.1MのEDTA、14mMの β -メルカプトエタノールに再懸濁した。100 μ lの2 mg/mlのZymolaseを加え、そしてその懸濁物を37°Cで30分インキュベートし、そして30秒遠心した。そのペレット（スフェロプラスト）を0.4mlのTEに再懸濁した。1.5mlの0.05MのEDTA、pH8.0、0.6mlの2 Mのトリス-Cl、pH8.0、0.6mlの10%のSDSのうちの90 μ lを加え、そしてその懸濁物を65°Cで30分インキュベートした。80 μ lの5 MのK0Acを加え、そしてその懸濁物を氷の上で60分以上インキュベートし、そして15分全速で遠心した。その上清液を、EtOHで満たした新鮮なチューブ（室温）に移し、完全ではあるが緩やかに混合し、そして30秒遠心した。そのペレットを冷70%EtOHで洗い、30秒遠心し、そして室温で風乾した。そのペレットを50 μ lのTEに再懸濁し、そして15分遠心した。その上清液を新鮮なチューブに移した。2.5 μ lの10mg/mlのRNaseを加え、37°Cで30分インキュベートし、そして500 μ lのイソプロパノールを緩やかに混合しながら加えた。その混合物を30秒遠心し、そしてその上清液を除去した。そのペレットを冷96%EtOHですすぎ、そして室温で風乾した。そのDNAを50 μ lの水に約100 μ l/mlの最終濃度となるように溶かした。アスペルギルス・オリザ又はアスペルギルス・ニガーの形質転換（一般手順）

100mlのYPD (Shermanら、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) にA. オリザ又はA. ニガーの胞子を接種し、そして37°Cで約2日間振盪させながらインキュベートした。菌糸をミラクロスによる濾過により回収し、そして200mlの0.6 MのMgSO₄で洗った。その菌糸を15mlの1.2MのMgSO₄、10mMのNaH₂PO₄、pH=5.8に懸濁した。その懸濁物を氷で冷やし、そして120mgのNovozym（商標）234バッチ1687を含む1 mlのバッファを加えた。5分後、1 mlの12mg/mlのBSA (Sigma type H25)を加え、そして大量のプロトプラストがそのサンプルを顕微鏡で観察したときに見えるようになるまで37°Cで1.5~2.5時間緩やかに攪拌しながらインキュベートした。

その懸濁物をミラクロスで濾過し、濾液を滅菌チューブに移し、そして5 mlの0.6Mのソルビトール、100mMのトリス-HCl、pH=7.0をかぶせる。遠心を100 gで15分行い、そしてプロトプラストをMgSO₄クッションの頂部から集めた。2 容量のSTC (1.2Mのソルビトール、10mMのトリス-HCl、pH7.5、10mMのCaCl₂)をプロトプラスト懸濁物に加え、そしてその混合物を1000 gで5分遠心した。そのプロトプラストペレットを3 mlのSTCに再懸濁し、そして再びペレット化した。これを繰り返した。最後に、プロトプラストを0.2~1 mlのSTCに再懸濁した。

100 μ lのプロトプラスト懸濁物を10 μ lのSTC中の5~25 μ gの適当なDNAと混合した。プロトプラストをp3SR2（プラスミドを有するA. ニドゥランスamdS遺伝子）と混合した。この混合物を室温で25分放置した。0.2mlの60%のPEG 4000 (BDH 29576)、10mMのCaCl₂及び10mMのトリス-HCl、pH=7.5を加え、そして慎重に混合し（2回）、そして最後0.85mlの同じ溶液を加え、そして慎重に混合した。この混合物を室温で25分放置し、2500 gで15分遠心し、そしてそのペレットと2 mlの1.2Mのソルビトールに再懸濁した。もう1回の沈降化の後、プロトプラストを適当なプレート上にまいた。プロトプラストを1.0Mのスクロース、pH7.0、10mMのアセトアミド（窒素源）及び20mMのCsCl（バックグランド増殖のため）を含む最少プレート (Cove Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) 上にまいた。37°Cで4~7日間インキュベート後、胞子をひろい、そして単一コロニーのためにまいた。この手順を繰り返し、そして第二回目の再単離を経た単一コロニーの胞子を特定の形質転換体として保存した。

免疫学的交差反応性：免疫学的交差反応性を決定するのに用いる抗体は精製プロテアーゼの利用により調製できうる。より詳しくは、本のプロテアーゼに対する抗血清は、N. Axelssenらの：A Manual of quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 23又はA. Johnstone and R. ThorpeのImmunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982（より詳しくはpp. 27-31）に記載の手順に従い、ウサギ（又はその他のゲッ菌類）を免疫することにより生起させることが

10

20

30

40

50

できうる。精製したイムノグロブリンは抗血清から、例えば塩沈殿 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、それに続く透析及びイオン交換クロマトグラフィー (例えばDEAE-Sephadexでの) により得られうる。タンパク質免疫化学的特性決定はOuchterlony二重拡散分析 (O. Ouchterlonyの: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, ED.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706)、交差免疫電気泳動により (N. Axelsenら、前掲、Chapters 3 及び 4) 又はロケット免疫電気泳動 (N. Axelsenら、Chapter 2) により行うことができる。

培地:

YPD: 10 g の酵母抽出物、20 g のペプトン、810mlに至るまでの H_2O 。オートクレーブにかけ、90mlの20%のグルコース (滅菌濾過) を添加。

10

10XのBasal塩: 66.8 g の酵母窒素ベース、100 g のコハク酸、60 g のNaOH、1000mlに至るまでの H_2O 。滅菌濾過

SC-URA: 90mlの10XのBasal塩、22.5mlの20%のカスアミノ酸、9 mlの1%のトリプトファン、806mlに至るまでの H_2O 。オートクレーブにかけ、3.6mlの5%のスレオニン及び90mlの20%のグルコース又は20%のガラクトースを添加。

SC-Hプロス: アミノ酸抜きの7.5 g / l の酵母窒素ベース、11.3 g / l のコハク酸、6.8 g / l のNaOH、ビタミン抜きの5.6 g / l のカスアミノ酸、0.1 g / l のトリプトファン。121°Cで20minのオートクレーブにかける。オートクレーブにかけた後、10mlの30%のガラクトース溶液、5 mlの30%のグルコース溶液及び0.4mlの5%のスレオニン溶液を1000mlの培地当りに加える。

20

SC-Hアガー: アミノ酸抜きの7.5 g / l の酵母窒素ベース、11.3 g / l のコハク酸、6.8 g / l のNaOH、ビタミン抜きの5.6 g / l のカスアミノ酸、0.1 g / l のトリプトファン及び20 g / l のアガー (Bacto)。121°Cで20minオートクレーブにかける。オートクレーブにかけた後、55mlの22%のガラクトース溶液及び1.8mlの5%のスレオニン溶液を450mlのアガー当りに加える。

YNB-1アガー: 3.3 g / l の KH_2PO_4 、16.7 g / l のアガー、pHを7に調整。121°Cで20minオートクレーブにかける。オートクレーブにかけた後、アミノ酸抜きの25mlの13.6%の酵母窒素ベース、25mlの40%のグルコース溶液、1.5mlの1% L-ロイシン溶液及び1.5mlの1%のヒスチジン溶液を450mlのアガー当りに加える。

YNB-1プロス: 組成はYNB-1アガーと同じであるが、ただしアガー抜きとする。

30

FG-4アガー: 35 g / l のアガー、30 g / l のダイズマメミール、15 g / l のマルトデキストリン (Glucidex 6)、5 g / l のBactoペプトン、pH7。121°Cで40minオートクレーブにかける。

FG-4培地: 30 g / l のダイズマメミール、15 g / l のマルトデキストリン (Glucidex 6)、5 g / l のBactoペプトン。121°Cで40minオートクレーブにかける。

MDU-2培地: 45 g / l のマルトース、1 g / l の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g / l のNaCl、2 g / l の K_2SO_4 、12 g / l の KH_2PO_4 、0.1ml / l のPluronic 61L、0.5ml / l の微量金属溶液。pH5.0。121°Cで20minオートクレーブにかける。15ml / l の50%の滅菌濾過尿素をオートクレーブの後に加えた。

カゼイン上層ゲル: 1%のアガロース、pH5.5のバッファー中の0.5%のカゼイン。ゲルを煮沸し、次いでその上層をアガプレート上に注ぐ前に55%にまで冷却しておく。

40

供給バッチ式発酵

A. オリザによるプロテアーゼ I 又はIIの供給バッチ式発酵のために用いる培地は、炭素源としてのマルトデキストリン、窒素源としての尿素及び酵母抽出物を含んで成る。

供給バッチ式発酵は、課題のA. オリザ宿主細胞の振盪フラスコ培養物を、3.5%の炭素源及び0.5%の窒素源を含んで成る培地に接種せしめることにより行った。pH5.0及び34°Cで24時間の培養後、炭素源及び窒素源の連続供給を開始した。炭素源を規定因子として保ち、そして酵素が過剰に存在していることを確実とした。供給バッチ式培養を4日間続け、その後酵素が回収できた。

酵素の特性決定

50

タンパク質分解活性

1 ヘモグロビンプロテアーゼユニット (hpu) は以下の標準条件下で1分当り1mmoleの第一アミノ基を遊離せしめる酵素量と規定する (セリン標準品との比較により決定) :

2 % (w/v) のヘモグロビン溶液 (牛; Sigmaより供給) を、5.5のpHに調整したBritton and RobinsonのJ. Chem. Soc., 1931, p.1451に記載の万能バッファーにより調製した。2mlの基質溶液を水浴の中で25℃で10minプレインキュベートした。0.2~0.3hpu/mlの万能バッファー (pH5.5) に相当するb g/mlの酵素調製品を含む1mlの酵素溶液を加えた。25℃で30minのインキュベーション後、反応をクエンチング剤 (17.9gのトリクロロ酢酸、29.9gの酢酸ナトリウム及び19.8gの酢酸を含み、脱イオン水で500mlとした溶液5ml) の添加により停止させた。ブランクを試験溶液と同じようにして調製したが、ただし酵素溶液の添加前にクエンチング剤を加えておいた。その反応混合物を水浴の中に20min保ち、その後Whatman 42濾紙で濾過した。

第一アミノ基は以下の通りオーフタルジアルデヒド (OPA) の発色により決定した: 7.62gの四硼酸二ナトリウム・10水和物及び2.0gのドデシル硫酸ナトリウムを150mlの水に溶かした。4mlのメタノールに溶かした160mgのOPAを400μlのβ-メルカプトエタノールと共に加え、その後その溶液を水で200mlにした。3mlのOPA試薬に上記で得た400μlの濾液を混合しながら加えた。340nmでの光学密度 (OD) を約5min後に測定した。OPA試薬は、100mlの万能バッファー (pH5.5) 中の10mgのセリンを含むセリン標準品についても行った。バッファー単独をブランクとして用いた。プロテアーゼ活性を以下の式により、OD測定値から計算した。

$$\text{hpu/ml 酵素溶液} : \frac{(OD_t - OD_b) \times C_{ser} \times Q}{(OD_{ser} - OD_B) \times MW_{ser} \times t_i}$$

hpu/g の酵素調製品 = hpu/ml : b

式中、 OD_t 、 OD_b 、 OD_{ser} 及び OD_B は、試験溶液、ブランク、セリン標準品及びバッファーのそれぞれの光学密度であり、 C_{ser} は標準品中のセリンの濃度 (mg/ml) であり (この場合、0.1mg/ml)、そして MW_{ser} はセリンの分子量である (105.09)。Qは酵素溶液の希釈系数 (この場合8) であり、そして t_i は分でのインキュベーション時間である (この場合30分)。

阻 害

以下のインヒビターを試験した:

ペプスタチン (アスパラギン酸インヒビター) (1mM)

PMSF (セリンプロテアーゼインヒビター) (0.1%)

PEFABLOC (セリンプロテアーゼインヒビター) (0.1%)

EDTA (金属プロテアーゼインヒビター) (0.1M)

PEFABLOCはPentapharm, Basel、スイス国より入手、それ以外はSigmaより入手した。

残留活性はpH5.5でHPU/lとして決定した。

pH活性 プロフィールは様々なpH値 (4~8) でHPU/lとして決定した。

pH安定性 は酵素溶液 (0.3HPU/l) を50℃及び様々なpH値 (4-5-6-7-8) で30, 60及び120分放置し、そして放置前後のタンパク質分解活性を測定することにより決定した。

温度活性 プロフィールは様々な温度 (15~70℃) でHPU/lとして決定した。

温度安定性 は酵素溶液 (0.3HPU/l) をpH5及び様々な温度 (20-40-50-60℃) で30, 60及び120分放置し、そして放置前後のタンパク質分解活性を測定することにより決定した。

SDSゲル電気泳動 及び等密点電気泳動はPharmaciaのPhast-Systemで、その製造者の仕様書に従い、勾酸8~25及びIEF3~9を利用して行った。

特異性

本発明のプロテアーゼの特異性は下記のようにして決定した:

万能バッファーpH5.5（前述）中の0.5mlの1 mg/mlのヒトインスリン又はウシグルカゴン並びに同じバッファー中の75 μ lのプロテアーゼ I 及びIIそれぞれ（0.6hpu/l）を37°Cで120minインキュベートした。反応は50 μ lの1 Nの塩酸の添加により停止させた。インスリン又はグルカゴン分子はいくつかのペプチドフラグメントに切断された。これらを、適切なC-18カラム（Hibar LiChrosorb RP-18；5 μ m粒子；Merck AG, Darmstadt, FRGより供給）を用いる逆相HPLCにより単離した。そのフラグメントを以下の溶媒：

A. 0.2Mの硫酸ナトリウム及び0.1Mのリン酸、pH2.5；

B. アセトニトリル／水、50%；

を用い、90%のA／10%のBから80%のA／20%のBに至る0～5分間の線形勾配、それに続く80%のA／20%のBにより50分かけて溶出させた。単離したフラグメントを、L. T 10
himら、「Secretion of human insulin by a transformed yeast cell」TEBS Letters 21
2（2），1987，p307に記載の通りにして、Applied Biosystems（Foster City, CA, USA）
モデル470Aガス相シーケンサーを用いる自動エドマン分解、並びにフェニルチオヒンダ
ントイン（PTH-）アミノ酸の高性能液体クロマトグラフィーによる分析によってアミノ酸
配列決定にかけ、これによりインスリン又はグルカゴン分子中の切断部位を同定した。

実施例 1

150のプールにおいて約 1.5×10^6 の個別クローンより成るA. アキュレアトゥス由来のク
ローンを構築した。

DNAをこのライブラリー由来の20の個別のクローンから単離し、そしてcDNA挿入について
の分析にかけた。挿入頻度は>90%として認められ、そして平均インサートサイズは約14 20
00bpであった。

いくつかのプール由来のDNAを酵母に形質転換し、そして200～500の酵母コロニーを含む5
0～100枚のプレートが各プールから得られた。3～5日の増殖後、アガープレートを数セ
ットのアガープレートにレプリカプレートした。1セットのプレートを30°Cで2～4日間
インキュベートし、そしてプロテアーゼ活性の検出のためにカゼイン上層ゲルをかぶせた
。30°Cで一夜のインキュベーション後、プロテアーゼ陽性コロニーは、白色の輪光（ハロ
）により囲まれたコロニーとして同定した。

酵素陽性コロニー由来の細胞を単一コロニー単離のためにアガー上にまき、そして同定し
たプロテアーゼ生産性コロニーそれぞれについて酵素生産性単一コロニーを選別した。

単一コロニーとして陽性コロニーを獲得し、cDNAインサートをビオチニル化ポリリンカー 30
プライマーを用いて酵母コロニーから直接増幅し、磁性ビーズ（Dynabead M-280, Dynal）
システムにより精製し、そして個別に連鎖停止法（Sangerら1977）及びSequenaseシス
テム（United States Biochemical）を用い、各cDNAクローンの5'末端の配列決定により
特性決定した。2つの酵素遺伝子のDNA配列はそれぞれSEQ ID No. 1及び2に示す。

次いで、このプロテアーゼをコードするcDNAを上記の通りにして、アスペルギルスの中での
発現のために単離し、そして標準の手順を利用してE. コリに形質転換させた。2つの
E. コリのコロニーを各形質転換体から単離し、そしてDNAインサートを切り出す制限酵
素HindIII及びXba Iにより分析した。これらのクローンのうちの1つ由来のDNAを酵母株
JG169に再形質転換した。

いくつかの陽性クローンのDNA配列を決定した。プロテアーゼをコードする2つのDNA配列 40
をそれぞれSEQ ID No. 1及び2に示す。

実施例 2

アスペルギルスにおいて遺伝子を発現させるため、cDNAを各ファミリーの1又は複数の代
表体から、上記の手順を利用し、HindIII/Xba I又はその他の適当な制限酵素による消
化、ゲル上でのサイズ分画及び精製により単離し、その後のpHD 414へのライゲーション
によりプラスミドpA1P1及びpA1P2を得た。E. コリでの増幅後、プラスミドをA. オリザ
又はA. ニガーに、上記の一般手順に従って、形質転換させた。

A. オリザ形質転換体の試験

各形質転換体をTG-4アガーを有するペトリ皿の中央に接種した。30°Cで5日間のインキュ
ベーション後、直径4 mmのプラグをコークスクリューによりそのコロニーの中央から取り 50

出した。そのプラグを、pH5.5のバッファーに0.5%のカゼイン及び1%のアガロースを含むカゼイン上層ゲルに埋め込み、そして40℃で一夜インキュベートした。プロテアーゼ活性は上記のようにして決定した。形質転換体の一部は輪光を有し、それはアスペルギルス・オリザバックグランドよりも有意に大きかった。このことは、アスペルギルス・オリザにおけるプロテアーゼの有効な発現を実証する。最大のプロテアーゼ活性を有する8つの形質転換体を選別し、そしてYPG-アガー上で保持した。

選択した8つの形質転換体それぞれをYPG-アガースラントからFG-4及びMDU-2培地を有する500mlの振盪フラスコ上に接種した。良好な通気を確実なものとするための十分な攪拌を伴う3～5日間の発酵の後、培養液を2000gで10分遠心し、そして上清液を分析した。各上清液15μlを、カゼイン上層ゲル（直径13cmのペトリ皿中25ml）の中にあけられた直径4mmの穴の中に加えた。プロテアーゼ活性はインキュベーションによる白色輪光の形成により同定した。

供給バッチ式発酵

次に、プロテアーゼI及びIIのそれぞれを、上記の手順を用い、酵素を発現するA.オリザの供給バッチ式発酵により製造した。

実施例3

プロテアーゼI及びIIの特性決定

上記の供給バッチ式発酵により得られる上清液を、上記の材料と方法に記載の通りに実施する特性決定のために用いた。タンパク質分解活性は上記の手順を利用してpH5.5でHPU/lとして測定した。

阻害試験は以下の結果を示す：

	% 残 留 活 性			
	EDTA	ペプスタチン	PEFABLOC	PMSF
プロテアーゼ I	104	91	83	92
プロテアーゼ II	97	9	90	108

ペプスタチンによるプロテアーゼIIの阻害は、それがペプシン型のアスパラギン酸プロテアーゼであることを示す。プロテアーゼIはペプスタチンにより阻害されず、それ故アスパラギン酸プロテアーゼとしては積極的に同定されなかった。一方、pH5での至摘活性は、それが酸性プロテアーゼであることを示す。

pH活性プロファイルを図1に示す。両酵素はpH5で至摘活性を有し、そしてプロテアーゼIはプロテアーゼIIよりも狭い範囲で活性であることが示された。即ち、プロテアーゼIはpH4～6の範囲で60%以上の活性を示し、一方、プロテアーゼIIはpH4～7の範囲で60%以上の活性を示す。

SDSゲル分析により、プロテアーゼI及びIIのそれぞれの分子量は23,000及び37,000kDaであると推定された。IEF分析から、両酵素のpIは約4と推定された。

図2は温度活性プロファイルを示す。それは両酵素についてやや似ていたが、ただし至摘温度はやや異なり、プロテアーゼIは50℃、そしてプロテアーゼIIは45℃であった。

図3及び4はpH安定性を示す。各pHに関して、ゼロ時間活性を100%に設定し、従ってそれらの得られる絶対値は異なっている。両プロテアーゼはpH4及び5で安定であった。pH6ではプロテアーゼIは不安定であり、一方プロテアーゼIIは一定の安定性を有していた（30分、40%の残留活性）、両酵素ともpH7で不安定であった。

図5及び6は温度安定性を示す。各温度に関し、ゼロ時間活性を100%に設定し、そして得られる絶対値は異なっていた。両プロテアーゼとも50℃までは安定であり、そして60℃で不安定であった。

プロテアーゼI及びプロテアーゼIIによるインスリン又はグルカゴンの加水分解により得られる結果に基づいて、プロテアーゼIIはインスリンとは反応せず、一方両プロテアーゼともグルカゴンは加水分解することがわかった。プロテアーゼはやや非特異的なプロテア

ーゼであり、一方プロテアーゼIIはより特異的であるものと考えられうる。プロテアーゼIIはウシのグルカゴン（その配列はBromer, Sinn, and Behrens, J. Amer. Chem. Soc., Vol. 79, p2807, 1958に示されている）において見い出せるLys-Tyr及びPhe-Val結合を切断できることがわかった。

実施例 4

粘性低下のための本発明のプロテアーゼの利用

ダイズフラワー（脱脂して皮をむいたダイズマメより調製）を95℃でペレット化し、そして粉碎した。ダイズフラワーを15%のドライ物質となるように脱イオン水に懸濁した。ドライ物質のg当り5mgのプロテアーゼI酵素タンパク質及びドライ物質のg当り5mgのプロテアーゼII酵素タンパク質のそれぞれをダイズスラリーに加えた。このスラリーを40℃及びpH5～6でインキュベートした。そのスラリー中の粘度を、1、2及び24時間のインキュベーション後に、brookfield LV DVIII粘度計で、スピンドル#31を有する小サンプルアダプターを用い、250rpmで測定した。残留粘度は下記の通りであった。

	プロテアーゼ I	プロテアーゼ II
1 時間	73%	47%
2 時間	59%	38%

実施例 5

コンタクトレンズの洗浄のための本発明のプロテアーゼの利用

コンタクトレンズ洗浄の分野において、コンタクトレンズの効果的な消毒及び洗浄の両方を得ることが通常必須である。コンタクトレンズを消毒する最も有効な方法の一つはそれらを3%の H_2O_2 を含むpH3.5の溶液に20分以上浸すことにある。レンズを目に装着する前に H_2O_2 は例えばカタラーゼ又はプラチナディスクで中和する。残念ながら、このような苛酷な条件下で良好な効果を有することが示されている商業的に関心のもたれているプロテアーゼは今日までなく、従って H_2O_2 中和の後にプロテアーゼを添加してそのコンタクトレンズ上のタンパク質付着物を取り除くめんどろな第2工程が必要とされている。ブタのペプシンは現状用いられているプロテアーゼ（スブチリシン・カールスバーグ（Subtilisin carlsberg）よりは優れているが、しかし往々にして哺乳動物の生成物にはウイルスが結合しているため、問題がある。

本発明のプロテアーゼI及びIIをそれぞれ、コンタクトレンズから変性タンパク質を除去する能力について試験した。これらを現状用いられているセリンプロテアーゼ、更にはブタのペプシンと比較した。ただし、後者は商業的観点よりはむしろ技術的観点から関心をもたれる。

実験プロトコールは下記の通りにした：

材料：メンドリリゾチーム、L-6878（Sigma）

「Rythmic」コンタクトレンズ（Essilor）（II型レンズ、ハイ・ウォーター、非イオン性）

プロテアーゼIは上記の通りに製造

プロテアーゼIIは上記の通りに製造

ブタのペプシンP-6887（Sigma）

スブチリシン・カールスバーグ（Clear-lens Pro（商標）（Novo Nordisk A/S）。

標準バッファー：0.05M Na_2HPO_4 , 0.9% NaCl pH7.5

試薬バッファー：0.05M Na_2HPO_4 , 0.9% NaCl, 3% H_2O_2 , pH3.5

シンチレーション液、オプチフェース「HiSafe III」

Sigma由来のメンドリリゾチームを還元性メチル化により ^{14}C でラベルし、そして精製した。

溶液は0.05Mの Na_2HPO_4 , 0.9%のNaCl及び0.2mg/mlのリゾチームpH7.5を含むように調製した。 ^{14}C ラベル化リゾチームの量は、CPM（カウント/分）が約200,000となるようにした。1.0mlの溶液をシンチレーションガラスに移した。コンタクトレンズを加え、そし

てそのガラスを85℃の湯浴の中に30分入れておいた。

次いでコンタクトレンズを3×3mlの試薬バッファーですすいだ。それを外科用メスで4等分にした。4等分したものそれぞれを、3mlの試薬バッファーを含む新鮮なシンチレーションガラスに移し入れた。

様々な量の試験すべきプロテアーゼを、0.1, 0.5, 2.5, 5, 12.5, 50及び200μgの酵素タンパク質/ml試薬バッファーの最終濃度となるように加えた。

反応は25℃で4時間行った。4等分にしたレンズを2×3mlの標準バッファーですすいだ。12mlのシンチレーション液を加え、そしてCPMをPackard 2500 TR液体シンチレーションカウンターで測定した。

各プロテアーゼの評価のためには4枚のレンズを必要とした：二重測定を2日間にわたり行い、そしてブラインド対照を各レンズについて必要とした。

消毒／洗浄の際にレンズから除去されたリゾチームの相対量を各4等分にしたレンズの質量バランスから計算した。図7は様々なプロテアーゼの性能のグラフ図を示す。

両プロテアーゼともコンタクトレンズの洗浄の目的に非常に適していた。プロテアーゼIは他のプロテアーゼよりも非常に優れていることがわかった。プロテアーゼIIは性能においてブタのペプシンに非常に近く、一方、現状利用されているセリンプロテアーゼは劣った性能を示した。本発明の酸性プロテアーゼの更なる利点は、涙液において見い出せる中性pHにおける低い活性である。このことはもしレンズが消毒／洗浄の後に適切にすすがれていないときの刺激の危険性を低くする。

実施例6

ベーキングのための本発明のプロテアーゼの利用

手順：

10gのケーキフラワーに5.9gの水を加えた。この水は様々な濃度のプロテアーゼI、プロテアーゼII及びNeutrase（商標）（Novo Nordisk A/Sより入手可能）を含む。その練り製品をGlutamic 2200ミキサーで1分混合した。次いでそれをプラスチックバッグに入れ、そして32℃で25minインキュベートした。

その後、その練り製品をGlutamicミキサーを用いて2%のNaCl（水溶液）で洗い、デンプンを取り除き、且つ練り製品にグルテンが残るようにした。

次いでグルテン塊を均質となるまで手でころがし、そして高さ約0.5cm、直径2.5cm、そして中央に穴を有するシリンダーの形にプレスした。そのグルテン塊をその形に25℃で30minプレスしておいた。次に、そのグリテンシリンダーをフックにひっかけ、そして2gのおもりを穴の中に入れた。全てを25℃の水に浸した。

その後グルテンシリンダーの伸長を、それが破断するまで15分毎に測定した。

酵素はAnsonユニットベース（AU）に基づいて投与した。最初は、Neutrase（商標）にとって最適な用量である7.5mAU/kgフラワーで試みた。（タンパク質分解活性の決定のためのAnson-ヘモグロビン法では、変性ヘモグロビンを25℃の温度でpH7.5で、10minの反応時間で消化した。未消化のヘモグロビンをトリクロロ酢酸（TCA）で沈殿させ、そしてTCA可溶性生成物の量をフェノール試薬で決定した。これはチロシン及びトリプトファンにより青色を発する。1AUは、1ミリ当量のチロシンと同じ色調をフェノール試薬で発色させるTCA可溶性生成物の量を1分当り遊離させるような一次速度でヘモグロビンを消化する酵素の量である。）

図8は酵素抜きでの並びにNeutrase（商標）、プロテアーゼI及びプロテアーゼIIによるグルテンの伸長曲線を示す。これらの曲線は同じ酵素投与量での6～7回の測定の平均である。見ての通り、3種のプロテアーゼの全ての添加が、より速いグルテンの伸長を招いた。

7.5mAU/kgフラワーの投与量のプロテアーゼIは同じ投与量のNeutrase（商標）ほどグルテンを虚弱化させなかった。グルテンシリンダーは破断するまでより長く伸び、そして伸長速度は小さかった。

この系においては可能な最大量である2.3mAU/kgフラワーのプロテアーゼIIの添加はグルテンを7.5mAU/kgのNeutrase（商標）とほぼ同じぐらいに虚弱化させた。グルテンはやや

10

20

30

40

50

遅く破断し、そして曲線の形は同一ではなかった。このことは、プロテアーゼIIがAUベースに基づいて、グルテンの虚弱化についてNeutrase（商標）よりも約3倍の効率を有することを示す。

まとめると、本発明のプロテアーゼはグルテンの虚弱化のための慣用的に利用されている化学品（幅広く利用されているその代表例はSMS（メタ亜硫酸ナトリウム）である）によって代わる所望の代替品を成す。

実施例7

動物飼料のための本発明のプロテアーゼの利用

粉碎した脱脂済みの飼料級ダイズを以下の条件で脱イオン水を混合した。胃及び小腸のpH条件をシュミレートするために加水分解を2段階で行った。本発明のプロテアーゼIIの性能をBio-Feed Proのそれと比較した。Bio-Feed ProはBrenesら、1993により、ブロイラーの飼料として用いたときに向上した体重増及び飼料効率をもたらすことが実証されている。

加水分解条件：

加水分解混合物：70 g の粉碎脱脂ダイズ

330 g の脱イオン水

温度：40℃

pH：第一段階 4.0

第二段階 6.5

時間：第一段階 180 分

第二段階 180 分

酵素：第一段階 I) ペプシン 1.92 g

(Merck art. 7190)

II) I + Bio-Feed Pro 3.0L

5.5AU/kgダイズ

III) I + プロテアーゼ II

0.19AU/kgダイズ

第二段階 I) パンクレアチン 6 g

(Sigma P 1750)

II) I + Bio-Feed Pro 3.0L

5.5AU/kgダイズ

III) I + プロテアーゼ II

0.19AU/kgダイズ

Bio-Feed Pro（商標）はNovo Nordisk A/Sより入手した。プロテアーゼIIは上記の通りに獲得した。

これらの酵素を開始時の0分目において加えた。加水分解中、°Brix及び重量オスモル濃度を反応経過を追跡するために測定した。Adler-Nissen（1986）に従うと、重量オスモル濃度の値は以下の式により加水分解度（DH）の計算のために用いることができる：

10

20

30

40

50

$$DH = \frac{\Delta C}{S \% \times f_{osm}} \times \frac{1}{\omega} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \%$$

ここで、 Δ は重量オスモル濃度mOSMの上昇、 $S\%$ はタンパク質濃度、 ω は浸透圧計についての較正係数、 h_{tot} はタンパク質基質中のペプチド結合の総数 (meqv/g タンパク質)、そして f_{osm} は%を g/kg H_2O に変換する係数である。

$$f_{osm} = \frac{1000}{100 - DM\%}$$

更に、加水分解混合物の N-成分のスルホサルチル酸可溶性相の平均分子量を90分（第1段階）、並びに0.15及び180（第2段階）の後に分析した。分子量分析は以下の方法により行った。

1. 原理

サンプルを希釈し、濾過し、そしてグル浸透クロマトグラフィー (GPC) モードで作動させた液体クロマトグラフィー系に注入した。この分離技術は十分に規定された孔直径を有する孔をもつ多孔質粒子で充填されたカラムを介する液体フローを利用する。様々な分子サイズを有するペプチド溶液をカラムに流したとき、小ペプチドは孔の中に流入でき、一方大きなペプチドは孔から排除されるであろう。即ち、溶液中のペプチドはその分子サイズ（及び分子量）に従って分離され、大きなペプチドは小さなペプチドよりも速くカラムから溶出する。カラム出口にある検出器は溶出液を連続的に測定する。このクロマトグラフィー系は、既知の分子量を有するペプチドで較正する。

2. クロマトグラフィー装置

2.1 HPLC系は

高圧ポンプ WATERS M 510、流速0.7ml/min

インジェクター WATERS WISP M 710

検出器 WATERS M 440 214nmまでの波長エクステンション
より成る。

2.2 GPCカラム、一式に接続された3本のTSK G 2000 SW×L、7.8mm×300mm、周囲温度で運転。

2.3 積分/データー処理 Waters 820 MAXIMA SIMクロマトグラフィーデーターシステム (810/820 GPCオプション付き)。

3. 試薬

3.1 リン酸バッファー $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$

3.2 塩化アンモニウム NH_4Cl

3.3 トリフルオロ酢酸 (TFA), CF_3COOH

3.4 アセトニトリル CH_3CN

3.5 移動相:

0.1%のTFA及び25%のアセトニトリルを含む0.05Mのリン酸バッファー/0.5Mの塩化アンモニウム溶液

4. 詳細

4.1 較正

クロマトグラフィー系は既知分子量を有するいくつかのペプチド標準品の注入により較正した。各標準品の分子量を、そのカラムからペプチドを溶出するのに必要な移動相の観察容積に対して半対数的にプロットした。最少二乗法計算により、最も良くフィットする三次式を導いた。この曲線は較正曲線を示す。

4.2 分析

サンプルを移動相に約5mg/mlとなるように希釈/溶解した。この溶液を22µmのフィルターで濾過し、そしてその20µlをクロマトグラフィーに注入した。検出応答、対、溶出容積を記録した。記録した曲線—クロマトグラフィー図—は、サンプルの実際の分子量分布を示す。集積した重量分布及び平均分子量計算のため、クロマトグラフィー図を小タイ

10

20

30

40

50

ム（及び溶出・容積）セグメントに分割した。各セグメントを溶出容積及びインターバル間のクロマトグラフィー図の面積により特性決定した。

5. 計 算

結果は重量及び数平均分子量で表わす

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i (A_i * M_{w,i})}{\sum_i A_i}, \quad \overline{M}_n = \frac{\sum_i A_i}{\sum_i (A_i / M_{w,i})},$$

ここで

$\overline{M}_w$: 重量平均分子量

10

$\overline{M}_n$: 数平均分子量

A_i : 各時間インターバルの間の集積した検出応答として測定した、各セグメントのクロマトグラフィー図面積。

$M_{w,i}$: 各セグメントについての対応の分子量。この値は時間インターバルの間の平均溶出容積を用い、校正曲線により計算した。

20

結 果

$^{\circ}\text{Brix}$, mOSM 及び $\% \text{DH}$ 値を以下の表に示す。

ペプシン、BIO-FEED PRO、プロテアーゼⅡ及びパンクレアチンによる飼料ダイズの加水分解

パラメーター： °BRIX		工程Ⅰ， MIN.									
酵素		0	5	10	15	30	45	60	90	120	180
ペプシン	5.09	6.135	6.505	6.625	6.9275	7.345	7.745	8.175	8.695	9.195	
BIO-FEED PRO	5.09	6.125	6.325	6.545	7.245	7.465	7.565	8.185	8.545	9.105	
プロテアーゼⅡ	5.09	6.505	6.845	7.105	7.825	8.405	8.605	9.305	9.705	10.205	

パラメーター： °BRIX		工程Ⅱ， MIN.									
酵素		180	185	190	195	210	225	240	270	300	360
ペプシン	12.965	15.135	15.4025	15.637	16.135	16.415	16.705	17.075	17.437	18.075	
BIO-FEED PRO	12.965	15.165	15.165	15.725	16.105	16.4	16.525	16.885	17.285	17.805	
プロテアーゼⅡ	13.605	15.605	15.925	16.025	16.365	16.685	16.885	17.105	17.505	18.145	

パラメーター： mOSM		工程 I, MIN.									
		0	5	10	15	30	45	60	90	120	180
酵素											
ペプシン		347	362	362	360.5	363.5	366	368	370.5	373	381.5
BIO-FEED PRO		347	365	364	366	367	371	373	379	380	385
プロテアーゼ II		347	371	382	391	411	421	427	439	447	463

パラメーター： mOSM		工程 II, MIN.									
		180	185	190	195	210	225	240	270	300	360
酵素											
ペプシン		468	996	1009	1015.5	1037.5	1054.5	1068.5	1087.5	1111	1148
BIO-FEED PRO		468	1013	1017	1033	1048	1058	1069	1094	1113	1145
プロテアーゼ II		548	1118	1127	1135	1152	1161	1176	1201	1227	1284

10

20

30

40

パラメーター: mOSM 上昇 工程 I, MIN.											
酵素	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180	
ペプシン	0	15	15	13.5	16.5	19	21	23.5	26	34.5	
BIO-FEED PRO	0	18	17	19	20	24	26	32	33	38	
プロテアーゼ II	0	24	35	44	64	74	80	92	100	116	

パラメーター: mOSM 上昇 工程 II, MIN.											
酵素	180	185	190	195	210	225	240	270	300	360	
ペプシン	0	528	541	547.5	569.5	586.5	600.5	619.5	643	680	
BIO-FEED PRO	0	545	549	565	578	590	601	626	645	677	
プロテアーゼ II	0	570	579	587	604	613	628	653	679	736	

10

20

30

40

パラメーター：％ DH											
工程 I, MIN.											
	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180	
酵素											
ペプシン	0	2.86	2.86	2.57	3.14	3.62	4.00	4.47	4.95	6.57	
BIO-FEED PRO	0	3.43	3.24	3.62	3.81	4.57	4.95	6.09	6.28	7.24	
プロテアーゼ II	0	4.57	6.66	8.38	12.19	14.09	15.23	17.52	19.04	22.09	

分子量分析の結果を以下に示す：

10

20

30

40

	工程 I 90min	0 min	工程 II 15min	180min
ペプシン	960	1070	680	520
Bio-Feed Pro	880	1020	690	510
プロテアーゼ II	650	630	530	480

見かけ上の分子量はpHを6.5にすると大きくなり、なぜなら未消化のダイズタンパク質はpH4.0よりもpH6.5でのほうがより可溶性であるからである。

10

プロテアーゼIIはBio-Feed Proよりも多くのタンパク質及びペプチドを遊離させ、且つ多くのタンパク質を分解することがわかり、従ってプロテアーゼIIはBio-Feed Proより優れているものと考えられる。

本発明のプロテアーゼIIは酸性pH域において至適活性を有するため、この酵素は動物の胃において直ちに働き、それ故若い動物のための飼料に用いたときにBio-Feed Proに比べて飼料効率の総合的な向上が達せられる。上記の結果はこの所見を裏付けする。

配列表

(1) 一般情報：

(i) 出願人：

(A) 名称：NOVO NORDISK A/S

20

(B) 通り：Novo Alle

(C) 市：Bagsvaerd

(E) 国：DENMARK

(F) 郵便番号：KD-2880

(G) 電話番号：+45 44448888

(H) ファックス番号：+45 4449 3256

(I) テレックス番号：37304

(ii) 発明の名称：アスパルギルス・アキュレアトゥス プロテアーゼ

(iii) 配列の数：2

(iv) コンピューター読取フォーム：

30

(A) 媒体タイプ：Floppy disk

(B) コンピューター：IBM PC compatible

(C) 作動システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EP0)

(2) SEQ ID NO：1 についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1124塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖

40

(ii) 分子のタイプ：cDNA

(iii) ヒポセティカル：NO

(iii) アンチセンス：NO

(vi) 起源：

(A) 生物：アスパルギルス・アキュレアトゥス

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：1：

AATTAAGCAT CCTCCATCTT CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC TCCCGCTCTT CTCTCGATCT	60	
CATCATCCCA ATAACTCGGA CACAATGAAG ACCTCTGCTC TCTTGACCGC TGGCCTGTTG	120	
GCCACCGCTG CTATTGCTGC TCCTCTCACC GAGAAGCGCG CAGCTGCTCG CGCTGCCAAG	180	
CGTGGCACCA GCCGCAAGAG CAACCCCCCT CTCAAGCCCG GCACCAGCGA GGCCATCAAC	240	
CTGACCGGCT CCAAGAACAC CGAGTACTCG TCCAACGGG CCGGCGCCGT GCTCATCGGC	300	
ACCGGCTACA CTGCCGTCAC CGCCGAGTTC ACCATTCCCA CCCCCTCTCT CCCCTCCGGT	360	
GCCTCCAGCC GCGAGCAGTA CTGTGCCTCC GCCTGGGTG GTATCGACGG TGACACCTGC	420	10
GACACCGCCA TCCTGCAGAC CGGTCTCGAC TTCTGTATCG AGGGCAGCAC CGTTAGCTAC	480	
GACGCCTGGT ACGAGTGGTA CCCCAGCTAT GCCTACGACT TCAGCGGCAT CAGCTTCTCC	540	
GCCGGCGACG TTGTCAAGGT CACCGTCGAC GCCACCAGCA AGACCGCCGG TACCGCCACC	600	
GTCGAGAACG TCACCAAGGG CACCACCGTC ACCCACACCT TCAGCGGTGG TGTGATGGT	660	
GATCTCTGCG AGTACAACGC CGAGTGGATC GTCGAGGACT TCGAGGAGAA CTCCTCCCTC	720	
GTCCCCTTG CCGACTTCGG CACCGTCACC TTCTCCAGCG CCTACGCCAC CAAGAGCGGC	780	20
TCCACCGTTG GTCCCTCCGG CGCCACCATC ATCGACATCG AGCAGAACAA CAAGGTTCTC	840	
ACCTCCGTCT CGACCTCCAG CAGCTCCGTC ACCGTCGAGT ATGTTTGAAG GGGACTCCTG	900	
GGGATGTGAA GCGAGAATGC GGCTTGGGTG GTTGAGGTC CTTTGGGACG TCGAACGCCT	960	
AGGATTCAAC GGGATGAGAT CATTGGAAAT GAAGACGAGA ATGAGCGAAT ACTGTCCTG	1020	
ATTGAGATTG TGCTTTGTTG ATTGTGTTAG GGGCTTGCCT CTGAAAATTG AGCTTAGTGT	1080	
TGCTGCAATA TGATTGCTGT GGTGAGAAA AAAAAAAAAA AAAA	1124	30

(2) SEQ ID NO: 2 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1425塩基対

(B) タイプ: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子のタイプ: cDNA

(iii) ヒポセティカル: NO

(iii) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物: アスパルギルス・アキュレアトウス

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 2:

CTGCTTCTCC TTCTCTTCCT CCTCGTGATA TCTGCTTGAA CATCTCCTCA TCATGGTCTG	60	
CCTCAACAAG GCTGCAGCCC TTCTTCTGGG TCTGACCACC GCCGCCACTG CGGCTCCCCT	120	
GGCCGAGAAG CAGGCTTCTG TCCCGGTCAA GAACTTCTCC GTCAAGCAGG TCGAGAAGGA	180	
GGGCAGCAAG GGACGTACCG TTAACCTGCC GGGTCTGTAT GCGAATGCGC TGGCCAAGTA	240	
TGGCGCCCAG GTGCCGGCCA GCGTCAAGGC CGCCGCCGTC AGTGGCAGCG TCGTGACCAC	300	
CCCGCAGGCC AACGACGTCT CCTACCTGAC CCCCGTCACC GTGGGCAGCT CGACCTTGAA	360	10
CCTGGACTTC GACACCGGAT CCGCCGATCT CTGGGTCTTC TCCTCGGAGC TGGCCGCCTC	420	
CTCGCGCACC GGCCACAGCA TCTACACCCC CGGCAGCACC GCCCAGAAGC TGTCCGGCTA	480	
CAGCTGGAGC ATCTCCTACG GCGACGGCAG CTCCGCCAGC GCGACGTCT ACAAGGACAA	540	
GGTCACCGTC GGCACGGTGA CGGCCAGCAG CCAGGCCGTC GAGGCCGCCA GCCGCATCAG	600	
CTCCGAGTTC GTCCAGGACA CCGACACCGA CCGTCTGTTG GGTCTGGCCT TCAGCTCGAT	660	
CAACACGGTC TCCCCCGGG CCCAGACCAC CTTCTTCGAC ACCGTCAAGT CCAGCCTGGA	720	20
CAGCCCCCTC TTCGCCGTCG ACCTGAAGTA CCACGCCGCC GGTACCTACG ATTCGGGTT	780	
CATCGACTCC TCCAAGTACA CCGGCTCCCT GACCTACGCC AACGTCGACG ACTCCCAGGG	840	
CTTCTGGCAA TTCACGCCA GCGGCTACAG CGTGGGCTCG GCCTCCCACT CCTCCTCTTT	900	
CTCCGCCATT GATGACACCG GCACCACCCT CATCCTCCTC GACGACTCCA TCGTCTCCAC	960	
CTACTACAAG AGCGTCAGCG GCGCCTCCTA CAGCTACAAC TACGGGGGCT ACGTCTTCTC	1020	
CTGCTCCGCC AGCCTGTCCA ACTTCAGCGT CAAGATCGGC TCCTACACCG CCGTCGTCCC	1080	30
CGGCAAGTAC ATCAACTACG CCCCCATCTC CACCGGCAGC TCCACCTGCT ACGGCGGCAT	1140	
CCAGTCCAAC GAGGGCCTCG GTCTGTCCAT CCTGGGTGAT GTCTTCCTCA AGAGCCAGCA	1200	
CGTGGTCTTT GACTCGCAGG GTCCGAGAAT CGGGTTCGCC GCGCAGGCCT AGATCGTTTG	1260	
ATTGGGGTTG TGGATGTGGG TGATGCTTGG TGGTGGTCTG AGTCGTGGTC TATGTGGGCG	1320	
TGAATATAGT ACTGTATATA GTACTGTACA TAGGGGGGTG GTGAACATAT GGTCTGGTCG	1380	
ATGAATATAT GTCTTTGATG TTATGCTTCT GTGGAAAAA AAAAA	1425	40

参照文献

- Aviv, H. & Leder, P. 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 1408-1412.
 Becker, D. M. & Guarante, L. 1991. Methods Enzymol. 194: 182-187.
 Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. 1979. Biochemistry 18: 5294-5299.
 Gubler, U. & Hoffman, B. J. 1983. Gene 25: 263-269.
 Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
 Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 5463-5467.

Brenes, A.らPoultry Science, 72, 2281-2293, 1993.

Adler-Nissen, J. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, Elsevier Applied Science Publishers London and New York, 1986.

Takahashi, K.ら, 1991, The Primary Structure of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A*, The Journal of Biol. Chemistry, Vol. 266, No. 29, pp. 19480-19483.

Choi, G.H.ら, Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*, 1993, Gene 125: 135-131.

Gomi, K.ら1993, Cloning and Nucleotide Sequence of the Acid Protease-encoding Gene (pepA) from *Aspergillus oryzae*, Biosci. Biotech. Biochem., 57 (7) : 1095-1100 10

Inoue, H. et al., 1991, The Gene and Deduced Protein Sequences of the Zymogen of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, No. 29, pp. 19484-19489.

Berka, R.M.ら1993, Isolation and characterization of the *Aspergillus oryzae* gene encoding aspergillopepsin O, Gene, 125: 195-198.

Berka, R.M.ら1990, Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*, Gene 86: 153-162.

Berka, R.M.ら1990, Corrigendum, Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*, Gene 96: 313. 20

【図 1】

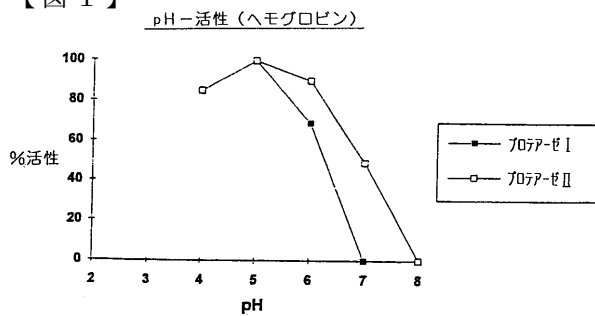


Fig. 1

【図 2】

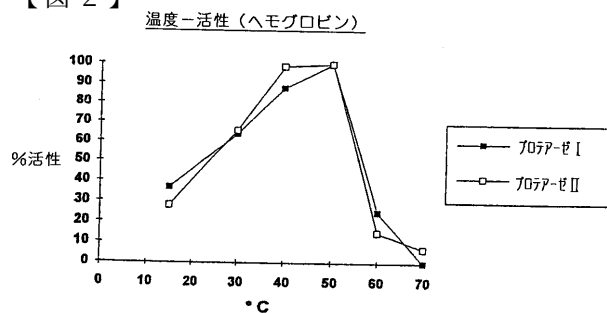


Fig. 2

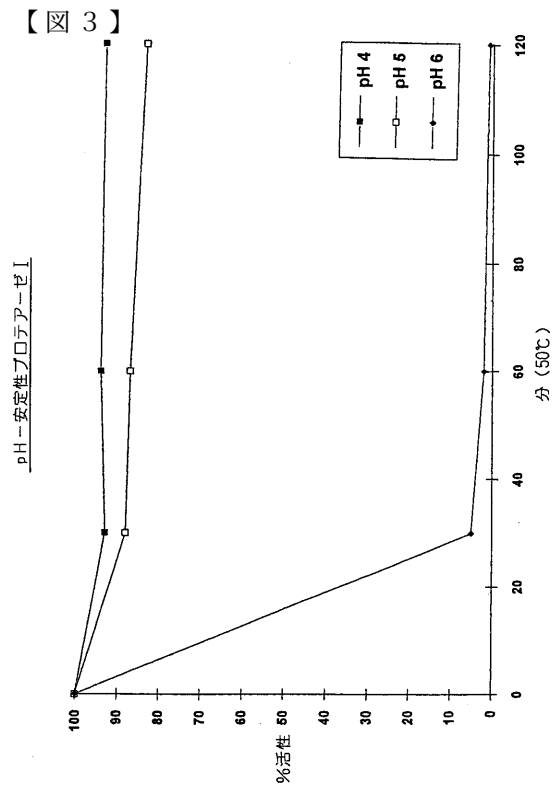


Fig. 3

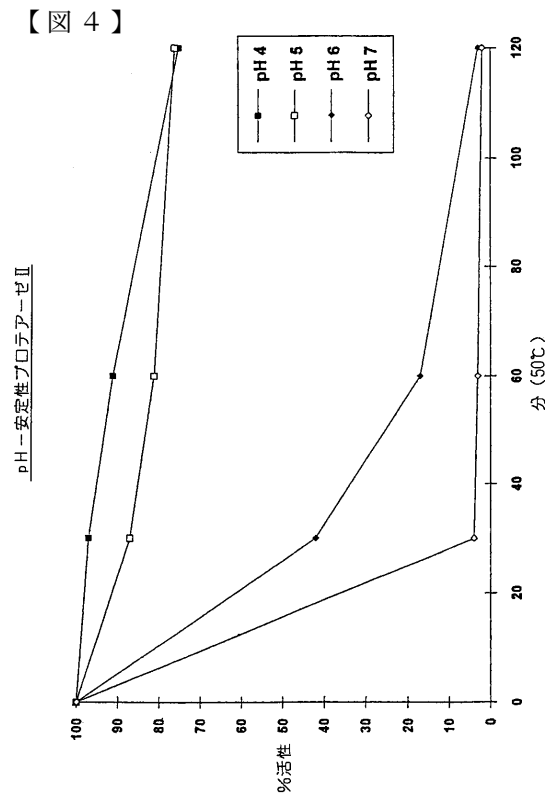


Fig. 4

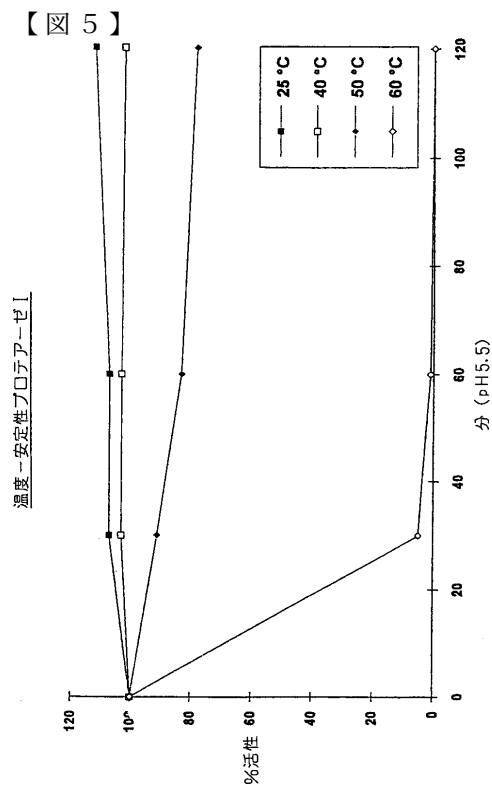


Fig. 5

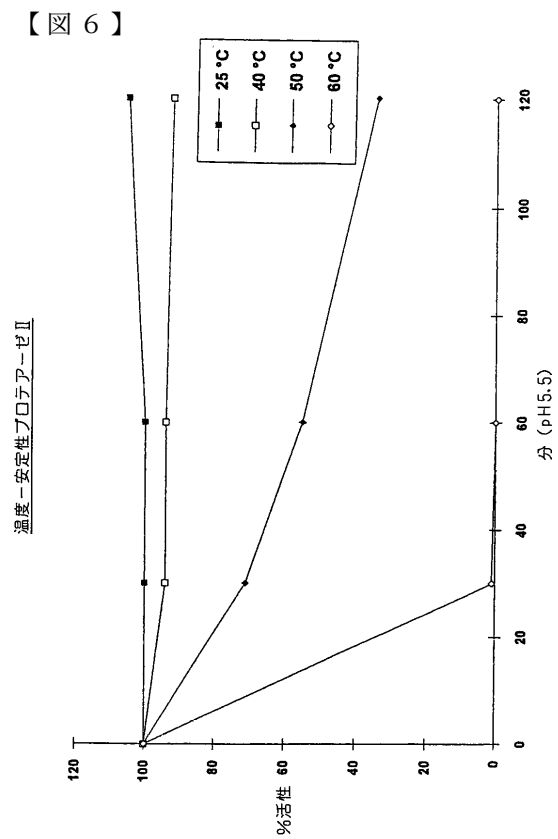


Fig. 6

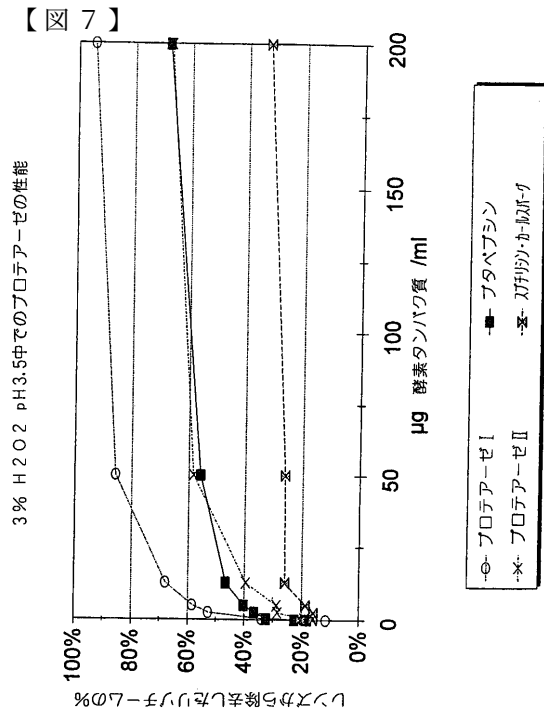


Fig. 7

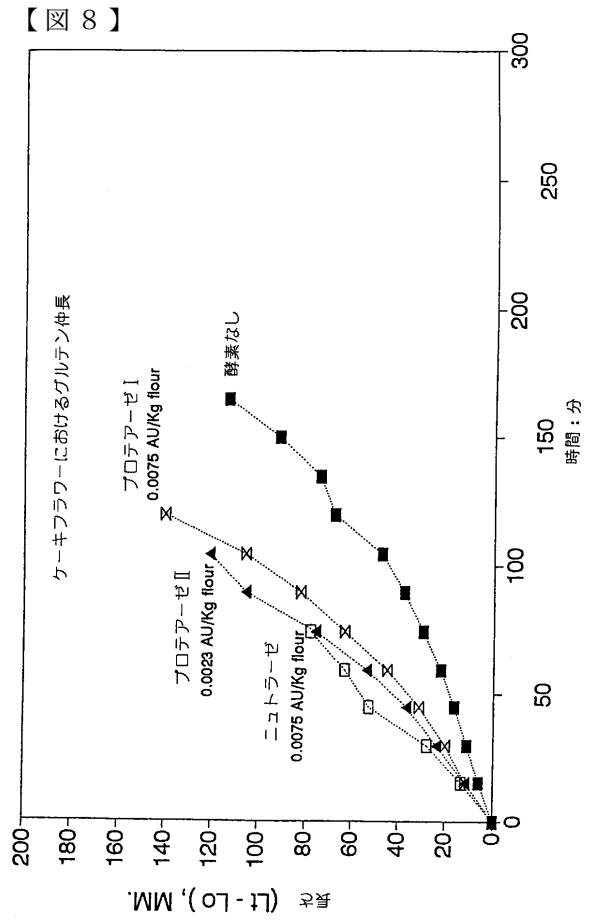


Fig. 8

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/69 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R 1/685 (2006.01) C 1 2 R 1:69
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:685
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:69
 C 1 2 N 9/62
 C 1 2 R 1:69

(74)代理人
 弁理士 渡邊 陽一

(74)代理人
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人
 弁理士 西山 雅也

(74)代理人
 弁理士 樋口 外治

(72)発明者 ダルバイエ, ヘンリック
 デンマーク国, デーコー—2 8 3 0 ビルム, パークバイ 2 8

(72)発明者 クリスタウ, ステファン
 デンマーク国, デーコー—2 8 2 0 ゲントフテ, ラエベスコブスバイ 1 0アー

(72)発明者 アンデルセン, レネ, ノンボエ
 デンマーク国, デーコー—3 4 6 0 ビルケレーズ, リンデヘイバイ 9

(72)発明者 コフォーズ, レネ, ベンケ
 デンマーク国, デーコー—4 3 5 0 ウゲルレーゼ, ブローフェルデバイ 8

(72)発明者 カウッピーネン, マークス, サカリ
 デンマーク国, デーコー—2 2 0 0 コペンハーゲン エン, エゲガーデ 1 0, 5

(72)発明者 ニールセン, ジャック ベック
 デンマーク国, デーコー—2 9 0 0 ヘレルupp, オレ オルセン ス アレ 1 2

(72)発明者 ダンプマン, クラウス
 デンマーク国, デーコー—2 8 6 0 セーボルイ, ヘーイエ グラサクセ 6 1, 7. テーホー

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 特開平0 4—0 7 5 5 8 6 (J P, A)
 特開平5—0 6 8 5 7 0 (J P, A)
 Adv Exp Med Biol, 1 9 9 1年, 306, 259-263
 J Biol Chem, 1 9 9 1年, 266(29), 19484-19489
 J Biol Chem 266(29) p.19480-19483 (1991)
 Biosci Biotechnol Biochem 59 p.954-955 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 C12N 9/62
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 PubMed