

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4426094号  
(P4426094)

(45) 発行日 平成22年3月3日 (2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日 (2009.12.18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 N 9/28 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 C 1 1 D 3/386 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 1 2 N 9/28  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 1 D 3/386

請求項の数 17 (全 72 頁)

(21) 出願番号 特願2000-519071 (P2000-519071)  
 (86) (22) 出願日 平成10年10月30日 (1998.10.30)  
 (65) 公表番号 特表2001-521739 (P2001-521739A)  
 (43) 公表日 平成13年11月13日 (2001.11.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK1998/000471  
 (87) 国際公開番号 WO1999/023211  
 (87) 国際公開日 平成11年5月14日 (1999.5.14)  
 審査請求日 平成17年10月27日 (2005.10.27)  
 (31) 優先権主張番号 1240/97  
 (32) 優先日 平成9年10月30日 (1997.10.30)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)  
 (31) 優先権主張番号 PA 1998 00936  
 (32) 優先日 平成10年7月14日 (1998.7.14)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(73) 特許権者 500586299  
 ノボザイムス アクティーゼルスカプ  
 デンマーク国, デーコー 2880 バグ  
 スバエルト, クロシェイバイ 36  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100092624  
 弁理士 鶴田 準一  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100082898  
 弁理士 西山 雅也  
 (74) 代理人 100081330  
 弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\alpha$ アミラーゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親 アミラーゼの変異体であって、ここで該親 アミラーゼは (i) 配列番号 1 又は 2 に示されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有するか、あるいは (ii) 1 又は複数の上記アミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を示し、そしてここで該変異体は親 アミラーゼと比べて pH 8 ~ 10.5 において向上した  $Ca^{2+}$  安定性を示し、かつ該変異体は アミラーゼ活性を有し、そして該変異体は位置 183 及び 184 におけるアミノ酸残基の欠失、ならびに変異 N195F を含むことを特徴とする、変異体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の アミラーゼ変異体をコードする DNA 配列を含んでなる DNA 構築物。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の DNA 構築物を保有する組換え発現ベクター。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の DNA 構築物又は請求項 3 に記載のベクターによって形質転換された細胞。

【請求項 5】

微生物である、請求項 4 に記載の細胞。

【請求項 6】

細菌又は真菌である、請求項 5 に記載の細胞。

10

20

## 【請求項 7】

グラム陽性細菌である、請求項 6 に記載の細胞。

## 【請求項 8】

洗浄及び / 又は食器洗浄のための、請求項 1 に記載の アミラーゼ変異体の使用。

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載の アミラーゼ変異体を含んでなる、洗剤添加剤。

## 【請求項 10】

非粉末化顆粒、安定化液又は保護化酵素の形態における、請求項 9 に記載の洗剤添加剤。

## 【請求項 11】

更に、別の酵素を含んでなる、請求項 9 に記載の洗剤添加剤。

## 【請求項 12】

請求項 1 に記載の アミラーゼ変異体を含んでなる、洗剤組成物。

## 【請求項 13】

更に、別の酵素を含んでなる、請求項 12 に記載の洗剤組成物。

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載の アミラーゼ変異体を含んでなる、手動又は自動食器洗浄用洗剤組成物。

## 【請求項 15】

更に、別の酵素を含んでなる、請求項 14 に記載の食器洗浄用洗剤組成物。

## 【請求項 16】

請求項 1 に記載の アミラーゼ変異体を含んでなる、手動又は自動洗濯洗浄用組成物。

## 【請求項 17】

更に、別の酵素を含んでなる、請求項 16 に記載の洗濯洗浄用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

〔発明の分野〕

本発明は、Termamyl 様 アミラーゼを親酵素とし、中温及び / 又は高 pH でより高い活性を有する変異体に関する。

〔発明の背景〕

アミラーゼ ( -1,4- グルカン-4- グルカノヒドロラーゼ、EC3.2.1.1) は、でんぷん並びに直鎖状及び分鎖状の 1,4- グルコシド性の少糖及び多糖の加水分解を触媒する一群の酵素から成る。

## 【0002】

この工業的にとても重要な酵素群に関する多数の特許及び科学文献が存在する。いくつかの アミラーゼ、例えば Termamyl 様 アミラーゼの変異体は、例えば WO90/11352, WO95/10603, WO95/26397, WO96/23873 及び WO96/23874 に記載されている。

アミラーゼに関する最近の文献の中で、WO96/23874 には、Termamyl 様 アミラーゼの 3 次元 X 線結晶構造解析のデータが報告されている。この アミラーゼは、*B. amyloliquefaciens* の アミラーゼ (BAN (登録商標)) の N 末端の 300 アミノ酸残基、及び *B. licheniformis* の アミラーゼ (市販品 Termamyl (登録商標)) の C 末端アミノ酸 301-483 から成り、従って工業的に重要なバチルス菌 アミラーゼ (これは、本文中では、用語「Termamyl 様 アミラーゼ」に含まれ、特に *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* (BAN) 及び *B. stearothermophilus* (BSG (登録商標)) の アミラーゼを含む) と近縁である。更に WO96/23874 は、親の Termamyl 様 アミラーゼの構造分析に基づいて、親酵素と比べて特性が変化した Termamyl 様 アミラーゼの変異体を設計する方法論が記載されている。

〔発明の簡単な説明〕

本発明は、高 pH 及び中温で (親酵素に比べて) 活性が向上した、Termamyl 様 アミラーゼに由来する アミロース分解性変異体に関する。

## 【0003】

10

20

30

40

50

用語「中温」は、本明細書中では、10～60、好ましくは20～50、特には30～40を意味する。

用語「高pH」は、今日洗浄の際に用いられるアルカリpHを意味し、特には約8～10.5である。

本明細書中では、「低温 アミラーゼ」は、0～30の温度範囲で相対的に至適な活性を示す アミラーゼを意味する。

#### 【0004】

本明細書中では、「中温 アミラーゼ」は、30～60の温度範囲で至適活性を示す アミラーゼを意味する。例えばSP690及びSP722の アミラーゼは、各々「中温 アミラーゼ」である。

10

本明細書中では、「高温 アミラーゼ」は、60～110の温度範囲で至適活性を示す アミラーゼを意味する。例えばTermamylは「高温 アミラーゼ」である。

#### 【0005】

本発明の変異体において達成され得る特性変化は、以下の特性に関する変化である：pH8～10.5での酵素安定性、及び／又は、pH8～10.5でのCa<sup>2+</sup>安定性、及び／又は、10～60、好ましくは20～50、特には30～40での比活性。

相対至適温度は、しばしば、使用した特定のpHに依存することに注意すべきである。すなわち、例えばpH8で決定された相対至適温度は、pH10で決定されたものとは実質的に異なり得る。

#### 酵素活性に対する温度の影響

20

活性部位及びその周囲における動態は、温度及びアミノ酸組成に依存し、酵素の相対至適温度にとってとても重要である。中温 アミラーゼと高温 アミラーゼの動態を比較することによって、中温における高温 アミラーゼの機能にとって重要な領域を決定できる。SP722 アミラーゼ（配列番号2）及び*B. licheniformis* アミラーゼ（市販品Termamyl、Novo Nordisk）（配列番号4）の温度活性曲線を図2に示す。

#### 【0006】

SP722の相対至適温度、すなわち中温域（30～60）において、その絶対活性は、相同酵素である*B. licheniformis* アミラーゼより高い。後者は、約60～100で至適活性を示す。この曲線は、主に、温度安定性、及び活性部位残基とその周囲の動態に依存する。更に、この活性曲線は、使用したpHと活性部位残基のpKaに依存する。

30

#### 【0007】

本発明の第1点目は、Termamyl様 アミラーゼを親とし、アミラーゼ活性を有する変異体であって、配列番号2のアミノ酸配列中の以下の変異に相当する変異を1つ以上含んでいる変異体に関する：T141, K142, F143, D144, F145, P146, G147, R148, G149, Q174, R181, G182, D183, G184, K185, A186, W189, S193, N195, H107, K108, G109, D166, W167, D168, Q169, S170, R171, Q172, F173, F267, W268, K269, N270, D271, L272, G273, A274, L275, K311, E346, K385, G456, N457, K458, P459, G460, T461, V462, T463。

#### 【0008】

本発明の変異体は、以下の置換又は欠失を1つ以上有する：

T141A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
 K142A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F143A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 D144A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F145A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 P146A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 G147A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 R148A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G149A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 R181\*, A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G182\*, A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;

40

50

D183<sup>\*</sup>, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G184<sup>\*</sup>, A, R, D, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K185A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 A186D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 W189A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
 S193A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
 N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 H107A, D, R, N, C, E, Q, G, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K108A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G109A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 D166A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 W167A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
 D168A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 Q169A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 S170A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
 R171A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 Q172A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F173A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 Q174<sup>\*</sup>, A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F267A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 W268A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
 K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 D271A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 L272A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G273A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 A274D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 L275A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K311A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 E346A, D, R, N, C, Q, G, H, I, K, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K385A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G456A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N457A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 G460A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
 V462A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y;  
 T463A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V。

10

20

30

## 【 0 0 0 9 】

40

以下の置換又は欠失を1つ以上有する変異体が好ましい：K142R；S193P；N195F；K269R，  
 Q；N270Y，R，D；K311R；E346Q；K385R；K458R；P459T；T461P；Q174<sup>\*</sup>；R181Q，N，S；G  
 182T，S，N；D183<sup>\*</sup>；G184<sup>\*</sup>；K185A，R，D，C，E，Q，G，H，I，L，M，N，F，P，S，T，  
 W，Y，V；A186T，S，N，I，V，R；189T，S，N，Q。

D183及びG184の位置の欠失、そして更に1つ以上の下記の置換又は欠失を有する変異体が  
 特に好ましい：K142R；S193P；N195F；K269R，Q；N270Y，R，D；K311R；E346Q；K385R；K  
 458R；P459T；T461P；Q174<sup>\*</sup>；R181Q，N，S；G182T，S，N；K185A，R，D，C，E，Q，G，H  
 ，I，L，M，N，F，P，S，T，W，Y，V；A186T，S，N，I，V，R；W189T，S，N，Q。

## 【 0 0 1 0 】

前記の本発明の変異体は、親のアミラーゼに比べて以下の特性を少なくとも1つ呈する改

50

変を有する：

- i) pH 8 ~ 10.5におけるpH安定性の向上；及び／又は
  - ii) pH 8 ~ 10.5におけるCa<sup>2+</sup>安定性の向上；及び／又は
  - iii) 10 ~ 60、好ましくは20 ~ 50、特に30 ~ 40の温度での比活性の増加。
- 更に、この詳細を以下に記す。

#### 【 0 0 1 1 】

更に本発明は、本発明の変異体をコードするDNA構成体；本発明の変異体の調製方法；及び、様々な工業製品又は方法において、例えば洗剤又はでんぷんの融解において、単独で又は他酵素と共に、本発明の変異体を使用することに関する。

本発明の最後の点は、至適pHの変化、及び／又は至適温度の変化、及び／又は安定性の向上を伴った アミラーゼを提供する方法に関する。

10

#### 命名法

本明細書及び特許請求の範囲において、アミノ酸残基の通常の1文字表記及び3文字表記を使用する。参照を容易にするために、本発明の アミラーゼ変異体を、以下の規則で命名記載する：元のアミノ酸：位置：置換アミノ酸。

#### 【 0 0 1 2 】

この命名法に従えば、例えばアスパラギンによる位置30のアラニンの置換を、Ala30Asn又はA30Nと表し、同位置のアラニンの欠失を、Ala30<sup>\*</sup> 又は A30<sup>\*</sup> と表し、そして、追加アミノ酸の挿入を、Ala30AlaLys 又はA30AK と表す。

連続したアミノ酸の欠失、例えばアミノ酸30 ~ 33の欠失は、(30 ~ 33)<sup>\*</sup> 又は (A30-N33)と表す。

20

#### 【 0 0 1 3 】

特定の アミラーゼが、他の アミラーゼと比べて「欠失」を有していて、その位置に挿入があった場合、例えば位置36にアスパラギン酸が挿入された場合、<sup>\*</sup>36Asp 又は <sup>\*</sup>36D と表す。

複数の変異は、+で分け、例えば位置30と34でアラニンとグルタミン酸が、アスパラギンとセリンに各々置換した変異は、Ala30Asp + Glu34Ser 又はA30N + E34Sと表す。

#### 【 0 0 1 4 】

ある位置に1つ以上のアミノ酸が互換的に挿入される場合、A30N, E 又はA30N or A30Eと表す。

30

修飾に適する位置が、修飾が特定されずに示されている場合、その位置のアミノ酸は、任意のアミノ酸で置換され得ることを示す。従って、位置30のアラニンの修飾が、特定されずに記載されている場合、そのアラニンが欠失しているか、又は、任意の他のアミノ酸、すなわち、R, N, D, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, Vの中のいずれかで置換され得ることを示す。

〔発明の詳細な説明〕

#### Termamyl様 アミラーゼ

バチルス菌種によって生産される アミラーゼは、アミノ酸レベルで高い相同性を有することが知られている。例えば、配列番号4のアミノ酸配列を含んで成るB. licheniformis

アミラーゼ（市販品Termamyl）は、配列番号5のアミノ酸配列を含んで成るB. amyloliquefacien アミラーゼに対して約89%相同であり、配列番号3のアミノ酸配列を含んで成るB. stearothermophilus アミラーゼに対して約79%相同である。その他の相同なアミラーゼには、バチルス菌種の菌株NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513又はDSM 9375に由来する アミラーゼが含まれ、これらは全てW095/26397に詳細に記載されており、更にTsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), pp. 25-31に記載されている アミラーゼ（配列番号6参照）が含まれる。

40

#### 【 0 0 1 5 】

更に、相同な アミラーゼには、EP 0252666に記載されているB. licheniformisの菌株（ATCC 27811）によって生産される アミラーゼ、及びW091/00353とW094/18314に記載されている アミラーゼも含まれる。その他の市販されているTermamyl様のB. licheniformis

50

アミラーゼには、製品 Optitherm (登録商標) と Takatherm (登録商標) (Solvay社製)、Maxamyl (登録商標) (Gist-brocades/Genencor社製)、Spezym AA (登録商標) と Spezyme Delta AA (登録商標) (Genencor社製)、及び Keistase (登録商標) (Daiwa 社製) が含まれる。

【0016】

これらの アミラーゼは、実質的に相同なので、アミラーゼの同一群、すなわち「Termamyl様 アミラーゼ」群に属すると考えられる。

従って、本明細書では、用語「Termamyl様 アミラーゼ」は、アミノ酸レベルにおいて、Termamyl、すなわち配列番号4のアミノ酸配列を有する *B. licheniformis* アミラーゼ、  
10  
に対して実質的に相同な アミラーゼを意味する。すなわち、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7又は8のアミノ酸配列、あるいは、W095/26397に記載の配列番号1又は2のアミノ酸配列(各々本明細書の配列番号7又は8のアミノ酸配列に等しい)、又は、Tsukamoto et al., 1988に記載のアミノ酸配列(本明細書の配列番号6のアミノ酸配列に等しい)を有する前記全ての アミラーゼが、「Termamyl様 アミラーゼ」と考えられる。その他のTermamyl様 アミラーゼは、

i) 配列番号1~8のいずれかのアミノ酸配列に対して、少くとも60%、例えば少くとも70%、例えば少くとも75%、又は、少くとも80%、例えば少くとも85%、少くとも90%、又は、少くとも95%の相同性を示す、及び/又は、

ii) 前記 アミラーゼの少くとも1つに対して作られた抗体と免疫交差反応する、及び/又は、  
20

iii) 本明細書の配列番号9, 10, 11又は12(各々配列番号1, 2, 3, 4及び5のアミノ酸配列をコードするDNA配列)、W095/26397の配列番号4(停止コドンTAAと合わせて、本明細書の配列番号13のDNA配列に等しく、本明細書の配列番号8のアミノ酸配列をコードするDNA配列)、及びW095/26397の配列番号5(本明細書の配列番号14に等しい)から明らかである前記特定の アミラーゼをコードするDNA配列にハイブリダイズするDNA配列によってコードされる、

アミラーゼである。

【0017】

i) の特性に関連して、「相同性」は、任意の通常のアプローチ、好ましくは、GCG パッケージ、バージョン 7.3 (1993年6月)の中の間GAP プログラムを用いて、その場合、GA  
30  
P ペナルティのデフォルト値、すなわちGAP クリエーションペナルティ3.0 及びGAP エクステンションペナルティ0.1 において、決定され得る (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version, 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)。

【0018】

Termamyl (配列番号4) とTermamyl様 アミラーゼとの間の構造整列によって、その他のTermamyl様 アミラーゼにおける等価/対応位置を同定できる。この構造整列を得る1つの方法は、デフォルトのgap ペナルティ値、すなわちgap クリエーションペナルティ3.0 及びgap エクステンションペナルティ0.1 において、GCG パッケージのPile Up プログラムを用いることである。その他の構造整列する方法には、疎水性クラスター分析 (Gabori  
40  
aud et al., (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155) 及びリバーズスレッディング (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1, No. 1 pp. 142-149 (1998) がある。

【0019】

前記の アミラーゼの特性ii)、すなわち免疫交差反応性は、関連するTermamyl様 アミラーゼの少くとも1つのエピトープに対して作られた抗体、又はそのエピトープと反応する抗体を用いて検査され得る。モノクローナル又はポリクローナル抗体は、ともに、当業界の既存の方法、例えばHudson et al., Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publicationsに記載の方法によって作成され得る。免疫交差反応性は、当業界の既存の検査法、例えば、Hudson et al., 1989 に記載されている通り、ウ  
50

エスタンプロット法又は放射状免疫拡散法によって決定され得る。この様にして、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7又は8のアミノ酸配列を有する アミラーゼ間で、各々免疫交差反応性が認められた。

#### 【0020】

前記特性 iii) に従ってTermamyl様 アミラーゼを評価する際に使用されるオリゴヌクレオチドプローブは、問題とする アミラーゼの完全又は部分ヌクレオチド又はアミノ酸配列を基にして適切に調製され得る。

検査ハイブリダイゼーションのための適当な条件は、5 × SSC 中での予備浸漬；20%ホルムアミド、5 × デンハルト溶液、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、及び50mg変性超音波処理子牛胸腺DNA から成る溶液中で40℃で1時間のプレハイブリダイゼーション；その後100mM ATP を補充した同上溶液中で~40℃で18時間のハイブリダイゼーション；その後2 × SSC、0.2% SDS中で、40℃で（低ストリンジェント性）、好ましくは50℃で（中ストリンジェント性）、より好ましくは65℃で（高ストリンジェント性）、さらに好ましくは~75℃で（超高ストリンジェント性）、30分間3回の当フィルターの洗浄を含む。ハイブリダイゼーション法に関する詳細は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989 に記載されている。

#### 【0021】

本明細書中で、「から得られる、に由来する」は、問題とする生物株によって生産された、又は生産され得る アミラーゼだけでなく、その株から単離されたDNA 配列によってコードされる アミラーゼ、そして、そのDNA 配列によって形質転換された宿主細胞によって生産された アミラーゼをも含む様な意味である。最後に、当用語は、合成及び/又はcDNA起源のDNA 配列によってコードされ、そして問題とする アミラーゼの同定特性を有する アミラーゼを含んで意味する。また当用語は、親の アミラーゼが、天然に存在する アミラーゼの変異体、すなわち、天然の アミラーゼの1つ以上のアミノ酸残基が修飾（挿入、置換、欠失）された結果の変異体であり得ることも意味する。

#### 親のハイブリッド アミラーゼ

親の アミラーゼ（すなわち基幹体 アミラーゼ）は、ハイブリッド アミラーゼ、すなわち少なくとも2つの アミラーゼに由来する部分アミノ酸配列の組み合わせを含んで成る アミラーゼであってよい。

#### 【0022】

親のハイブリッド アミラーゼは、アミノ酸相同性及び/又は免疫交差反応性及び/又はDNA ハイブリダイゼーション（前記通り）に基づいて、Termamyl様 アミラーゼ群に属することが決定され得るものでよい。この場合、そのハイブリッド アミラーゼは、典型的には、Termamyl様 アミラーゼの少なくとも1つの部分と、微生物（細菌又は真菌）及び/又は哺乳動物起源のTermamyl様 アミラーゼ又は非Termamyl様 アミラーゼから選ばれた1つ以上の他の アミラーゼの部分とを含んで成る。

#### 【0023】

従って、親のハイブリッド アミラーゼは、少なくとも2つのTermamyl様 アミラーゼに由来する部分アミノ酸の組合せ、少なくとも1つのTermamyl様 アミラーゼと少なくとも1つの非Termamyl様の細菌 アミラーゼとに由来する部分アミノ酸の組合せ、あるいは、少なくとも1つのTermamyl様 アミラーゼと少なくとも1つの真菌 アミラーゼとに由来する部分アミノ酸の組合せを含んで成り得る。この部分アミノ酸の由来であるTermamyl様 アミラーゼは、例えば、本明細書中に参照された前記の特定のTermamyl様 アミラーゼのいずれかであってよい。

#### 【0024】

例えば、親の アミラーゼは、*B. licheniformis*の菌株に由来する アミラーゼのC末端と、*B. amyloliquefaciens*又は*B. stearrowthermophilus*の菌株に由来する アミラーゼのN末端部分とを含んで成り得る。例えば、親の アミラーゼは、*B. licheniformis* アミラーゼのC末端部分の少なくとも430 アミノ酸を含んでよく、例えば、a) 配列番号5のアミノ酸配列を有する*B. amyloliquefaciens* アミラーゼのN末端の37アミノ酸残基に相当

10

20

30

40

50

するアミノ酸部分、及び配列番号4のアミノ酸配列を有する*B. licheniformis* アミラーゼのC末端の445アミノ酸残基に相当するアミノ酸部分を含むものでよく、あるいは、ハイブリッドのTermamyl様アミラーゼは、その成熟タンパク質のN末端の35アミノ酸残基が、BAN（成熟タンパク質）、すなわち配列番号5の*B. amyloliquefaciens* アミラーゼのN末端の33残基によって置換されていること以外は、Termamylの配列、すなわち配列番号4の*B. licheniformis* アミラーゼの配列に等しいものでよく、あるいは、b)配列番号3のアミノ酸配列を有する*B. stearothermophilus* アミラーゼのN末端の68アミノ酸残基に相当するアミノ酸部分、及び、配列番号4のアミノ酸配列を有する*B. licheniformis* アミラーゼのC末端の415アミノ酸残基に相当するアミノ酸部分を含むものでよい。

#### 【0025】

別の適当な親のハイブリッドアミラーゼは、W096/23874 (Novo Nordisk) に記載されたもので、BAN(*B. amyloliquefaciens* アミラーゼ)のN末端(成熟タンパク質のアミノ酸1~300)及びTermamylのC末端(成熟タンパク質のアミノ酸301~483)を含むものである。このハイブリッドアミラーゼ(BAN: 1-300/Termamyl: 301-483)の下記の1つ以上の位置を置換することによって、その活性が増加した: Q360, F290及びN102。特に興味深い置換は、下記の下記の1つ以上の置換である: Q36E, D; F290A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T; N102D, E。

#### 【0026】

配列番号2に示したSP722アミラーゼ上の対応位置は、S365, Y295及びN106である。配列番号2のアミラーゼにおける特に興味深い対応する置換は、下記の下記の1つ以上の置換である: S365D, E; Y295 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T; 及びN106D, E。

配列番号1に示したSP690アミラーゼ上の対応位置は、S365, Y295, N106である。これの特に興味深い対応する置換は、下記の下記の1つ以上の置換である: S365D, E; Y295 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T; N106D, E。

#### 【0027】

前記の非Termamyl様アミラーゼは、例えば、真菌のアミラーゼ、哺乳動物又は植物のアミラーゼ、あるいは細菌のアミラーゼ(Termamyl様アミラーゼとは異なるもの)である。このようなアミラーゼの特定の例には、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*A. niger* 酸性アミラーゼ、*Bacillus subtilis* アミラーゼ、ブタ膵臓アミラーゼ及び大麦アミラーゼが含まれる。これら全てのアミラーゼは、本明細書中に参照した典型的なTermamyl様アミラーゼの構造とは著しく異なった構造を有することが解明されている。

#### 【0028】

前記の真菌アミラーゼ、すなわち*A. niger*及び*A. oryzae*由来のものは、アミノ酸レベルで高度に相同であり、一般に、同一アミラーゼ群に属すると考えられる。*A. oryzae*由来の真菌アミラーゼは、商品名Fungamyl(登録商標)として市販されている。

更に、Termamyl様アミラーゼの特定の変異体(本発明の変異体)を、通常の様式で、特定のTermamyl様アミラーゼのアミノ酸配列中の特定のアミノ酸残基の修飾(例えば欠失又は置換)を参照して言及する場合には、相当する位置において修飾された別のTermamyl様アミラーゼの変異体も本発明に含まれると解釈する(相当する位置は、各アミノ酸配列間の考えられる最良のアミノ酸配列の整列に基づいて決定される)。

#### 【0029】

本発明の好ましい態様では、このアミラーゼ基幹体は、(親のTermamyl様アミラーゼとして)*B. licheniformis*に由来するものであり、前記参照例の1つ、例えば、配列番号4のアミノ酸配列を有する*B. licheniformis*アミラーゼである。

#### 本発明の変異体の変更された特性

本発明の変異体に存在する変異と、それに帰因する特性の変化(親のTermamyl様アミラーゼに対する変化)との間の関係を、以下に考察する。

#### pH 8 ~ 10.5での安定性の向上

10

20

30

40

50



本発明では、高pH（すなわちpH 8 ~ 10.5）での安定性の向上の獲得に関して重要な変異（アミノ酸置換を含む）には、（配列番号2のアミノ酸配列を有する）SP722 アミラーゼにおける1つ以上の下記の変異に相当する変異が含まれる：T141, K142, F143, D144, F145, P146, G147, R148, G149, R181, A186, S193, N195, K269, N270, K311, K458, P459, T461。

【0030】

本発明のこの変異体は、（配列番号2のアミノ酸番号に従い）下記の1つ以上の置換を有する：

T141A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
 K142A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F143A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 D144A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F145A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 P146A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 G147A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 R148A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G149A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K181A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 A186D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, P, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 S193A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
 N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K311A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V。

10

20

【0031】

好ましい高pH安定性変異体は、SP722 アミラーゼ（配列番号2のアミノ酸配列）における下記の1つ以上の置換を有するものが含まれる：K142R, R181S, A186T, S193P, N195F, K269R, N270Y, K311R, K458R, P459T及びT461P。

30

特定の態様では、配列番号1の配列を有するバチルス菌株NCIB 12512の アミラーゼ、又は配列番号3の配列を有する*B. stearothermophilus* の アミラーゼ、又は配列番号4の配列を有する*B. licheniformis*の アミラーゼ、又は配列番号5の配列を有する*B. amyloliquefaciens*の アミラーゼを、基幹体、すなわち親のTermamyl様 アミラーゼとして、前記の修飾のために使用する。

【0032】

図1の整列から分かる通り、*B. stearothermophilus* アミラーゼでは、SP722 のN270に対応する位置が既にチロシンである。更に、バチルス菌株NCIB 12512の アミラーゼ、*B. stearothermophilus* アミラーゼ、*B. licheniformis* アミラーゼ及び*B. amyloliquefaciens* アミラーゼでは、SP722 のK458に対応する位置が既にアルギニンである。更に、*B. licheniformis* アミラーゼでは、SP722 のT461に対応する位置が既にプロリンである。従って、これらの アミラーゼにおいては、それらの置換は適当でない。

40

【0033】

高pHで安定性が向上した アミラーゼ変異体を、実施例2に記した分子動態シミュレーションによって見出した領域において置換を行うことによって、作ることができる。このシミュレーションによって、中pHに比べて、高pH（pH 8 ~ 10.5）で、より高い柔軟性又は運動性を有する領域が示めされる。

W096/23874 (Novo Nordisk) の付表に開示されている3D構造を有するTermamyl様 アミラーゼ(BA2) に相同な（下記参照）任意の細菌 アミラーゼの構造を利用することによって

50

、その様な アミラーゼの構造をモデル化すること、そしてそれに対して分子動態シミュレーションを施すことが可能となる。前記の細菌 アミラーゼの相同性は、前記Termamyl様 アミラーゼ(BA2) に対して、少くとも60%、好ましくは70%超、より好ましくは80%超、最も好ましくは90%超であってよく、ただしこれは、GCG パッケージ、バージョン 7.3 (1993年 6 月) 中のUWGCG GAP プログラムを、デフォルトのGAP ペナルティ値で使用して測定される (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 )。

#### 【 0 0 3 4 】

好ましくない残基を別の残基に置換することも適用可能であろう。

#### pH 8 ~ 10.5でのCa<sup>2+</sup>安定性の向上

Ca<sup>2+</sup>安定性の向上は、Ca<sup>2+</sup>除去時の酵素安定性が向上することを意味する。本発明では、高pHでのCa<sup>2+</sup>安定性の向上の獲得に関して重要な変異 (アミノ酸置換を含む) には、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するSP722 アミラーゼ中の下記の位置に対応する 1 つ以上の位置での変異又は欠失が含まれる: R181, G182, D183, G184, K185, A186, W189, N195, N270, E346, K385, K458, P459。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明のこの変異体は、1 つ以上の下記の置換又は欠失を有する:

R181<sup>\*</sup>, A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G182<sup>\*</sup>, A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 D183<sup>\*</sup>, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G184<sup>\*</sup>, A, R, D, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K185A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 A186D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 W189A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
 N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N270A, R, D, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 E346A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K385A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K458A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 P459A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V。

#### 【 0 0 3 6 】

1 つ以上の下記の置換又は欠失を有する変異体が好ましい: R181Q, N; G182T, S, N; D183<sup>\*</sup>; G184<sup>\*</sup>; K185A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V; A186T, S, N, I, V; W189T, S, N, Q; N195F; N270R, D; E346Q; K385R; K458R; P459T。

特定の態様では、配列番号 1 の配列を有するパチルス菌株NCIB 12512の アミラーゼ、又は配列番号 5 の配列を有する*B. amyloliquefaciens* アミラーゼ、又は配列番号 4 の配列を有する*B. licheniformis* アミラーゼを、前記変異のための基幹体として使用する。

#### 【 0 0 3 7 】

図 1 の整列から分かる通り、前記*B. licheniformis* アミラーゼでは、SP722 のD183及びG184に対応する位置が欠失している。従って、この アミラーゼにおいては、それらの置換は適当でない。

好ましい態様では、この変異体は、D183及びG184の欠失、そして更に下記の下記の 1 つの置換を有するパチルス菌株NCIB 12512の アミラーゼである: R181Q, N及び / 又はG182T, S, N 及び / 又はD183<sup>\*</sup>; G184<sup>\*</sup> 及び / 又はK185A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V 及び / 又はA186T, S, N, I, V 及び / 又はW189T, S, N, Q及び / 又はN195 F 及び / 又はN270R, D及び / 又はE346Q 及び / 又はK385R 及び / 又はK458R 及び / 又はP459T。

#### 中温での比活性の増加

本発明の別の点として、10 ~ 60 、好ましくは20 ~ 50 、特に30 ~ 40 の温度で比活性が増加する変異体を獲得することに関する重要な変異には、配列番号 2 のアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

有するSP722 アミラーゼの下記の1つ以上の位置に対応する変異が含まれる：H107, K108, G109, D166, W167, D168, Q169, S170, R171, Q172, F173, Q174, D183, G184, N195, F267, W268, K269, N270, D271, L272, G273, A274, L275, G456, N457, K458, P459, G460, T461, V462, T463。

【0038】

本発明のこの変異体は、1つ以上の下記の変換を有する：

H107A, D, R, N, C, E, Q, G, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K108A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G109A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 D166A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 W167A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
 D168A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 Q169A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 S170A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
 R171A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 Q172A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F173A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 Q174<sup>\*</sup>, A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 D183<sup>\*</sup>, A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
 G184<sup>\*</sup>, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F267A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 W268A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
 K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 D271A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 L272A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G273A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 A274D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 L275A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G456A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N457A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 G460A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
 V462A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y;  
 T463A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V。

【0039】

好ましい変異体は、1つ以上の下記の変換又は欠失を有する：Q174<sup>\*</sup>, D183<sup>\*</sup>, G184<sup>\*</sup>, K269S。

特定の態様では、配列番号4の配列を有する*B. licheniformis* アミラーゼを、それらの変異の基幹体として用いる。

本発明の変異体における一般的変異：中温での比活性の増加

特に興味深いアミノ酸置換は、当酵素の活性部位周辺の運動性を増加させるものである。これは、活性部位の近傍、すなわち活性部位を構成する任意の残基から、好ましくは10又は8 又は6 又は4 以内の安定な相互作用を壊す変化によって達成される。

【0040】

この変異の例には、側鎖の大きさを減少させる変異、例えば下記のものがある：

Ala からGly へ

10

20

30

40

50

Val からAla 又はGly へ  
Ile 又はLeu からVal, Ala又はGly へ  
Thr からSer へ。

【 0 0 4 1 】

このような変異は、腔の導入又は当変異によって残された空間を満たす構造的再構築によって、活性部位領域の柔軟性を増加することが期待される。

本発明の変異は、好ましくは、上記概説した変異に加えて、1つ以上の修飾を含み得る。従って、有利には、修飾される当 アミラーゼ変異体のその部分に存在する1つ以上のプロリン残基が、天然の任意の可能な非プロリン残基、好ましくはアラニン、グリシン、セリン、スレオニン、バリン又はロイシンによって置換され得る。

10

【 0 0 4 2 】

同様にして、好ましくは、修飾される親の アミラーゼのアミノ酸残基中に存在する1つ以上のシステイン残基が、非システイン残基、例えばセリン、アラニン、スレオニン、グリシン、バリン又はロイシンによって置換され得る。

更に、本発明の変異体では、配列番号4のアミノ酸断片 185~209 に対応するアミノ酸断片中に存在する1つ以上のAsp 及び/又はGlu が、各々Asu 及び/又はGln によって、単独で、又は上記概説した修飾のいずれかと共に、置換され得る。また、Termamyl様 アミラーゼでは、配列番号4のアミノ酸断片 185~209 に対応するアミノ酸断片中に存在する1つ以上のLys 残基の、Arg による置換も注目される。

【 0 0 4 3 】

20

本発明には、2つ以上の上記概説した修飾を組み込んだ変異体が含まれると解釈される。更に、本明細書中に記載した任意の変異体において、点突然変異を導入することも有利であろう。

活性部位周辺の運動性が増加した アミラーゼ変異体

本発明の アミラーゼ変異体の運動性は、基質部位の近傍の1つ以上の位置で1つ以上のアミノ酸を置換することによって増加し得る。このような位置は、(配列番号2のSP722 アミラーゼの番号に従い) V56, K108, D168, Q169, Q172, L201, K269, L272, L275, K446, P459 である。

【 0 0 4 4 】

従って、本発明の1つの点は、1つ以上の前記位置に変異を有する変異体に関する。

30

好ましい置換は、下記の1つ以上の置換である：

V56A, G, S, T;

K108A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, S, T, V;

D168A, G, I, V, N, S, T;

Q169A, D, G, H, I, L, M, N, S, T, V;

Q172A, D, G, H, I, L, M, N, S, T, V;

L201A, G, I, V, S, T;

K269A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, S, T, V;

L272A, G, I, V, S, T;

L275A, G, I, V, S, T;

40

Y295A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, S, T, V;

K446A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, S, T, V;

P459A, G, I, L, S, T, V。

【 0 0 4 5 】

特定の態様では、配列番号1の配列を有するパチルス菌株NCIB 12512の アミラーゼ、配列番号3の配列を有する*B. stearothermophilus* アミラーゼ、配列番号4の配列を有する*B. licheniformis* アミラーゼ、又は配列番号5の配列を有する*B. amyloliquefaciens* アミラーゼを、これらの変異の基幹体として用いる。

【 0 0 4 6 】

図1の整列から分かる通り、*B. licheniformis* アミラーゼ及び*B. amyloliquefaciens*

50

アミラーゼは、SP722 のK269に対応する位置にグルタミンを有する。更に、*B. stearothermophilus* アミラーゼは、SP722 のK269に対応する位置にセリンを有する。従って、これらの アミラーゼにおいては、それらの置換は適当ではない。

【 0 0 4 7 】

更に、図 1 の整列から分かる通り、*B. amyloliquefaciens* アミラーゼは、SP722 のL272に対応する位置にアラニン有し、*B. stearothermophilus* アミラーゼは、SP722 のL272に対応する位置にイソロイシンを有する。従って、これらの アミラーゼにおいては、それらの置換は適当でない。

図 1 の整列から分かる通り、*バチルス*菌株12512 の アミラーゼは、SP722 のL275に対応する位置にイソロイシンを有する。従って、この アミラーゼにおいては、その置換は適当でない。

10

【 0 0 4 8 】

図 1 の整列から分かる通り、*B. amyloliquefaciens* アミラーゼは、SP722 のY295に対応する位置にフェニルアラニン有する。更に、*B. stearothermophilus* アミラーゼは、SP722 のY295に対応する位置にアスパラギン有する。従って、これらの アミラーゼにおいては、それらの置換は適当でない。

図 1 の整列から分かる通り、*B. licheniformis* アミラーゼ及び*B. amyloliquefaciens* アミラーゼは、SP722 のK446に対応する位置にアスパラギン有する。更に、*B. stearothermophilus* アミラーゼは、SP722 のK446に対応する位置にヒスチジン有する。従って、これらの アミラーゼにおいては、それらの置換は適当でない。

20

【 0 0 4 9 】

図 1 の整列から分かる通り、*B. licheniformis* アミラーゼ、*B. amyloliquefaciens* アミラーゼ、及び*B. stearothermophilus* アミラーゼは、SP722 のP459に対応する位置にセリン有する。更に、*バチルス*菌株NCIB 12512の アミラーゼは、SP722 のP459に対応する位置にスレオニン有する。従って、これらの アミラーゼにおいては、それらの置換は適当でない。

中温で高活性を有する酵素の安定化

別の態様では、本発明は、低温 アミラーゼ（例えば*Asteromonas haloplanctis*のもの（Feller et al., (1994), Eur. J. Biochem. 222 : 441-447)）、及び中温で活性を有する中温 アミラーゼ（例えばSP722 及びSP690）、すなわち一般的に好冷性及び好中温性酵素として知られている酵素の安定性の改良に関する。この特定の酵素群における安定性は、温度安定性、又はカルシウム欠失条件下での安定性として解釈され得る。

30

【 0 0 5 0 】

典型的には、中温で高活性を示す酵素は、酵素にストレスを与える条件、例えば温度又はカルシウム欠失において深刻な問題を露呈する。

従って、本発明の対象は、少しばかり負荷のかかった条件下で、その活性を失うことなく、同時に中温での希望する高活性を示す酵素を提供することである。

中温で測定される当安定化変異体の活性は、酵素安定化前の特定温度における元々の活性の、好ましくは 100% 以上から50%まで、より好ましくは 100% 以上から70%まで、そして最も好ましくは 100% 以上から85%までであるべきであろう。そして生成した酵素は、野生型酵素に比べて、負荷のかかった条件下でより長いインキュベーションに耐え得る必要がある。

40

【 0 0 5 1 】

考え得る酵素には、例えば細菌又は真菌由来の アミラーゼが含まれる。

その様な低温 アミラーゼの例には、*Alteromonas haloplanctis*から単離されたものがある（Feller et al., (1994), Eur. J. Biochem. 222 : 441-447）。この アミラーゼの結晶構造が解明されている（Aghajari et al., (1988), Protein Science 7 : 564-572）。

【 0 0 5 2 】

この*A. haloplanctis* アミラーゼ（AHA）（図 4 の整列中の第 5 番）は、ブタ膵臓 アミラーゼ（PPA）（図 4 の整列中の第 3 番）に対して約66%の相同性を示す。PPA の 3 D 構造

50

は知られており、Brookhavenデータベースから10SE又は1DHKの名称で得ることができる。その他のより安定な アミラーゼに対する相同性に基づいて、*Alteromonas haloplanctis* アミラーゼに由来する「低温高活性酵素」の安定化は、中温での希望する高活性の維持と同時に、得ることができる。

#### 【 0 0 5 3 】

図 4 は、5 つの アミラーゼの配列整列を示すもので、AHA 及びPPA の アミラーゼを含んでいる。*Alteromonas haloplanctis* アミラーゼの安定性を改良する特定の変異は、T6 6P, Q69P, R155P, Q177R, A205P, A232P, L243R, V295P, S315R である。

#### アミラーゼ変異体の調製方法

遺伝子に変異を導入するいくつかの方法が、当業界に知られている。 アミラーゼをコードするDNA 配列のクローニングを簡単に検討した後、その アミラーゼのコード配列中の特定部位に変異を発生する方法を説明する。

#### アミラーゼをコードするDNA 配列のクローニング

親の アミラーゼをコードするDNA 配列を、当業界に周知の種々の方法によって、その アミラーゼを生産する任意の細胞又は微生物から単離し得る。最初に、ゲノムDNA 及び/又はcDNAのライブラリーを、研究対象の アミラーゼを生産する生物体由来する染色体DNA 又はメッセンジャーRNA を用いて構築する必要がある。次に、その アミラーゼのアミノ酸配列が知られている場合、相同の標識オリゴヌクレオチドプローブを合成し、それを用いて、問題とする生物体から調製したゲノムライブラリーから、 アミラーゼをコードするクローンを同定し得る。あるいは、既知の アミラーゼ遺伝子に相同な配列を有する標識オリゴヌクレオチドプローブを用いて、より低いストリンジェント性条件下でのハイブリダイゼーション及び洗浄によって、 アミラーゼをコードするクローンを同定し得る。

#### 【 0 0 5 4 】

アミラーゼをコードするクローンを同定する更に別の方法は、ゲノムDNA の断片を、発現ベクター、例えばプラスミドに挿入し、できたゲノムDNA ライブラリーによって アミラーゼ陰性の細菌を形質転換し、 アミラーゼの基質を含有するアガープレートに、形質転換した細菌をまき、それによって、同定する対象の アミラーゼを発現するクローンを得ること、を含んで成る。

#### 【 0 0 5 5 】

あるいは、当酵素をコードするDNA 配列を、確立した標準的な方法、例えばS.L. Beaucage and M.H. Caruthers (1981) に記載されたホスホロアミダイト法又はMatthes et al. (1984) に記載された方法によって、合成調製してもよい。ホスホロアミダイト法では、例えば自動DNA 合成装置によって、オリゴヌクレオチドを合成し、精製し、アニールし、適当なベクター中に連結して、クローン化する。

#### 【 0 0 5 6 】

最後に、当DNA 配列は、ゲノム由来と合成由来の混合物、合成由来とcDNA由来の混合物、又はゲノム由来とcDNA由来の混合物であってよく、これらは、合成由来、ゲノム由来又はcDNA由来の断片（完全な当DNA 配列の種々の部域に対応する適当な断片としてのもの）を、標準的な方法に従って連結することによって調製され得る。当DNA 配列を、特定のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR) によって、例えばUS 4,683,202又は R.K. Sasaki et al. (1988) に記載されている通りに、調製してもよい。

#### アミラーゼ変異体の発現

本発明では、上記方法又は当業界で既知の代替方法によって作成された変異体をコードするDNA 配列を、典型的には、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル、及び、場合によってリプレッサー遺伝子又は種々のアクチベーター遺伝子を含んだ発現ベクターを用いて、酵素の形で発現させることができる。

#### 【 0 0 5 7 】

本発明の アミラーゼ変異体をコードするDNA 配列を運搬する組換え発現ベクターは、DNA 組換え技術を簡便に施すことが可能な任意のベクターであってよく、当ベクターの選択

10

20

30

40

50

は、それを導入する宿主細胞にしばしば依存する。従って、当ベクターは、自律複製するベクター、すなわち染色体外に全体が存在して、染色体複製とは独立に複製するベクター、例えばプラスミド、バクテリオファージ又は染色体外要素、ミニ染色体又は人工染色体であり得る。あるいは、当ベクターは、宿主細胞内に導入された場合、その宿主細胞ゲノム中に組み込まれ、そして組み込まれた染色体と共に複製するベクターであり得る。

#### 【0058】

ベクター内では、当DNA配列は、適当なプロモーター配列に作用可能に連結される必要がある。このプロモーターは、選択した宿主細胞において転写活性を示す任意のDNA配列であり、その宿主細胞に対して同種性又は異種性のタンパク質をコードする遺伝子から得られるものでよい。本発明のアミラーゼ変異体をコードするDNA配列の転写を指令するために適したプロモーターの例は、選択した宿主細胞において転写活性を示し、その宿主細胞に対して同種性又は異種性のタンパク質をコードする遺伝子から得られ得る配列である。本発明のアミラーゼ変異体をコードするDNA配列の転写を指令するために適したプロモーターの、特に細菌宿主における例は、*E. coli* のlacオペロン、*Streptomyces coelicolor* のアガラゼ遺伝子dagAのプロモーター、*Bacillus licheniformis* アミラーゼ遺伝子(amyL)のプロモーター、*Bacillus stearothermophilus* マルトース生成アミラーゼ遺伝子(amyM)のプロモーター、*Bacillus amyloliquefaciens* アミラーゼ(amyQ)のプロモーター、*Bacillus subtilis* xylA及びxylB遺伝子のプロモーターなどである。真菌宿主での転写に有用なプロモーターの例は、*A. oryzae* TAKAアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*A. niger* 中性アミラーゼ、*A. niger* 酸安定性アミラーゼ、*A. niger* グルコアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* リパーゼ、*A. oryzae* アルカリプロテアーゼ、*A. oryzae* トリオースリン酸イソメラーゼ、又は*A. nidulans* アセトアミダーゼ、をコードする遺伝子に由来するものである。

#### 【0059】

本発明の発現ベクターは、適当な転写ターミネーター、そして真核生物の場合には、ポリアデニル化配列を含み得、これらは、本発明のアミラーゼ変異体をコードするDNA配列に作用可能に連結される。この停止配列及びポリアデニル化配列を、プロモーターと同一の起源から適切に得ることができる。

当ベクターは、更に、問題の宿主細胞中で当ベクターを複製可能にするDNA配列を含んでよい。そのような配列の例は、プラスミドpUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1及びpIJ702内の複製起点である。

#### 【0060】

当ベクターは、更に、選択マーカー、例えば、宿主細胞内の欠損を補完する産物の遺伝子、例えば、*B. subtilis* 又は*B. licheniformis*由来のdal遺伝子、あるいはアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール又はテトラサイクリンなどの抗生物質への耐性を付与する遺伝子、を含んでもよい。更に、当ベクターは、アスペルギルス菌の選択マーカー、例えばamdS、argB、niaD及びsC、すなわちハイグロマイシン耐性を付与するマーカーを含んでもよいし、あるいは、例えばWO91/17243に記載の通り、共(同時)形質転換を介して選択を行ってもよい。

#### 【0061】

ある観点で、例えば宿主細胞として細菌を用いる場合、細胞内発現が有利であるかもしれないが、一般的には、細胞外発現が好ましい。一般に、本明細書に記載されているパチルス菌アミラーゼは、培地中に発現プロテアーゼを分泌させる前領域を含む。希望する場合、この前領域を、異なる前領域又はシグナル配列によって置換してもよい。これは、各々の前領域をコードするDNA配列の置換によって簡便に達成される。

#### 【0062】

アミラーゼ変異体をコードする本発明のDNA構成体、プロモーター、ターミネーター及びその他の要素を各々連結する方法、並びに、それらを、複製に必要な情報を含む適当なベクターに挿入する方法は、当業者に周知である(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989)。

## 【0063】

前記通りの本発明のDNA 構成体又は発現ベクターのいずれかを含んでいる本発明の細胞を、本発明の アミラーゼ変異体の組換え生産において、宿主細胞として使用することが有利である。この細胞は、本変異体をコードする本発明のDNA 構成体によって形質転換され得る。これは、宿主染色体に、そのDNA 構成体を（1以上のコピー数で）組込むことによって簡便になされる。この組込みは、そのDNA 配列が細胞内で安定に維持される可能性がより高いので、一般に有利であるだろう。宿主染色体へのDNA 構成体の組込みは、従来の方法に従い、例えば相同又は非相同組換えによって、行なわれ得る。あるいは、異なるタイプの宿主細胞において、前記の発現ベクターによって細胞を形質転換してもよい。

## 【0064】

適当な細菌の例は、グラム陽性菌、例えば*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*、又は*Streptomyces lividans* 若しくは*Streptomyces murinus*、あるいはグラム陰性菌、例えば*E. coli* である。細菌の形質転換は、例えば、プロトプラスト又はコンピテント細胞を用いて、既知の方法に従って行われ得る。

## 【0065】

酵母菌を、好ましくは*Saccharomyces* 又は*Schizosaccharomyces* の菌種、例えば*Saccharomyces cerevisiae*から選択し得る。糸状真菌は、アスペルギルス菌種、例えば*A. oryzae* 又は*A. niger*が有利であろう。真菌の形質転換は、既知の方法に従い、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換、そして細胞壁の再生を含んで成る方法で行われ得る。アスペルギルス菌宿主細胞の形質転換に適する方法が、EP 238023 に記載されている。

## 【0066】

更に別の点として、本発明は、本発明の アミラーゼ変異体を生産する方法に関し、この方法は、その変異体の生産を誘導する条件下で前記宿主細胞を培養すること、そしてその細胞及び/又は培地から当変異体を回収することを含んで成る。

当細胞を培養する培地は、問題の宿主細胞を増殖させて、そして本発明の アミラーゼ変異体を発現させるために適した任意の通常の培地でよい。適当な培地を、業者から購入できるし、又は報告された組成（例えばAmerican Type Culture Collectionのカatalogに記

## 【0067】

その宿主細胞から分泌された アミラーゼ変異体を、その培地から周知の方法によって簡便に回収することができ、その方法には、遠心又は濾過による培地からの細胞の分離、塩、例えば硫酸アンモニウムによる培地中タンパク質成分の沈殿、そしてクロマトグラフィー、例えばイオン交換クロマトグラフィー又は親和性クロマトグラフィーなどの使用が含まれる。

産業上の利用性

本発明の アミラーゼ変異体は、産業において様々に利用されるための貴重な特性を有する。特に、本発明の酵素変異体は、洗浄用、食器洗浄用及び硬質表面洗浄用の洗浄組成物における成分として使用可能である。

## 【0068】

多数の変異体が、でんぷんからの甘味料及びエタノール生産、及び/又は繊維品の糊抜きのために、特に有用である。通常のでんぷん変換、例えばでんぷんの液化及び/又は糖化、の条件が、例えばUS 3,912,590、並びにEP特許公報 252,730及び63,909に記載されている。

洗浄組成物

前記通り、本発明の変異体を、適当に洗浄組成物中に組込むことができる。洗浄組成物（例えば洗濯用又は食器用洗剤）中の適当な成分、その様な洗浄組成物に本変異体を配合する適当な方法に関して、そして適当な種類の洗浄組成物の例に関して、例えばWO96/23874

10

20

30

40

50



及びWO97/07202を参照する。

#### 【 0 0 6 9 】

本発明の変異体を含有する洗浄組成物は、更に、1種以上の他の酵素、例えばリパーゼ、クチナーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ又はラッカーゼ、及び/又はその他の アミラーゼを含んでよい。

本発明の アミラーゼ変異体を、通常使用される濃度になる様に、洗浄組成物中に組み得る。現在、本発明の変異体を、洗剤の通常の添加レベルに従って、洗浄/食器洗浄液1リッターあたり 0.00001 ~ 1 mg (純粋な活性酵素タンパク質として) に相当する量で組み得ると考えられる。

#### 【 0 0 7 0 】

本発明は、また、1) 至適pHが変化した、及び/又は、2) 至適温度が変化した、及び/又は、3) 安定性が向上した、 アミラーゼを提供する方法に関し、本方法は、以下の過程を含んで成る：

i) pH、温度及び/又は安定性の実質的に異なる特性を有する2つ以上の アミラーゼの3D構造の分子動態を比較することによって、その アミラーゼの変異のための標的位置及び/又は領域を同定すること；

ii) それらの同定された位置及び/又は領域において、1つ以上のアミノ酸を置換、付加及び/又は欠損すること。

#### 【 0 0 7 1 】

本発明の態様では、中温 アミラーゼを、高温 アミラーゼと比較する。別の態様では、低温 アミラーゼを、中温又は高温 アミラーゼのいずれかと比較する。

比較する アミラーゼは、相互に、好ましくは少くとも70%、好ましくは80%、90%まで、例えば95%まで、特には95%相同である必要がある。

#### 【 0 0 7 2 】

比較する アミラーゼは、前記通り、Termamyl様 アミラーゼでよい。特定の態様では、比較する アミラーゼは、配列番号1 ~ 8に示す アミラーゼである。

別の態様では、比較する問題の アミラーゼの安定性の特性は、Ca<sup>2+</sup>依存的な特性である。

#### 〔 材料と方法 〕

##### 酵素

SP722 (配列番号2、Novo Nordiskから購入可)

Termamyl (配列番号4、Novo Nordiskから購入可)

SP690 (配列番号1、Novo Nordiskから購入可)

バチルス・ズブチリスSHA273 : WO95/10603 参照

##### プラスミド

pJE1は、SP722 アミラーゼの変異体、すなわち、その成熟タンパク質のアミノ酸D183 - G184に対応する6ヌクレオチドが欠失した変異体をコードする遺伝子を含む。そのJE1遺伝子の転写は、amyLプロモーターに支配される。このプラスミドは、更に、プラスミドpUB110 (Gryczan, TJ et al. (1978) J. Bact. 134 : 318-329) に由来する複製起点、及びカナマイシン耐性を付与するcat 遺伝子を含む。

##### < 方法 >

##### ライブラリーベクターpDorK101の構築

大腸菌中で アミラーゼを発現させることなく変異を導入し、そしてバチルス菌中で アミラーゼが活性を示す様に修飾するために、大腸菌/バチルス菌シャトルベクターpDorK101(下記)を使用し得る。このベクターを下記の様に構築した。pJE1において、大腸菌の複製起点を含有する1.2kb断片によって、配列番号2の5'コード領域にあるPstI部位のところで遺伝子を中断することによって、JE1コード遺伝子(D183 - G184を欠失したSP722)を不活性化した。順方向プライマー : 5'-gacctgcagtcaggcaacta-3'及び逆方向プライマー : 5'-tagagtcgacctgcaggcat-3'を用いて、pUC19 (GenBankアクセスNo. X02514) から、PCR によって前記断片を増幅した。PCR 増幅断片及びpJE1ベクターを、PstIによって37

10

20

30

40

50

で2時間消化した。そのpJE1ベクター断片とPCR断片とを、室温で1時間連結し、それによって大腸菌を電気的な方法で形質転換した。できたベクターをpDorK101と称する。

#### フィルタースクリーニング検査

この検査法を用いて、親酵素に比べて高pHにおいて安定性が向上したTermamyl様 アミラーゼ変異体を、並びに、スクリーニング時の設定温度に応じて、親酵素に比べて高pH及び中温において安定性が向上したTermamyl様 アミラーゼ変異体をスクリーニングし得る。

#### 高pHフィルター検査

バチルス菌ライブラリーを、カナマイシン10 µg / mlを含有するTYアガープレート上の酢酸セルロースフィルター (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) とニトロセルロースフィルター (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) とのサンドイッチフィルター上にまき、少くとも21時間37 °Cでインキュベーションする。酢酸セルロース層をTYアガープレートにのせる。

#### 【0073】

プレートにまいた後、フィルター上で陽性変異体の位置を決めるために、インキュベーション前に、各サンドイッチフィルターに針で目印を付ける。変異体が結合したニトロセルロースフィルターを、グリシン / NaOH緩衝液 (pH8.6 ~ 10.6) が入った容器に移し、そして15分間室温で (10 ~ 60 °C の範囲で変更可能) インキュベーションする。コロニーが結合した酢酸セルロースフィルターを、使用するまで、室温でTYプレート上で保存する。インキュベーション後、1 % アガロース、0.2 % でんぷん及びグリシン / NaOH緩衝液 (pH8.6 ~ 10.6) を含んで成るプレート上で、残存する活性を検出する。そのニトロセルロースフィルターをのせた検査用プレートに、前記サンドイッチフィルターの場合と同様に、目印を付け、そして2時間室温でインキュベーションする。フィルターを除いた後、その検査用プレートを、10 % Lugol 溶液で染色する。でんぷんを分解する変異体を、暗青色の背景に白点として検出し、そして保存プレート上で同定する。陽性変異体を、1回目のスクリーニング法と同一条件で、2度再スクリーニングする。

#### 低カルシウムフィルター検査

バチルス菌ライブラリーを、適当な抗生物質、例えばカナマイシン又はクロラムフェニコールを含有するTYアガープレート上の酢酸セルロースフィルター (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) とニトロセルロースフィルター (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) とのサンドイッチフィルター上にまき、少くとも21時間37 °Cでインキュベーションする。酢酸セルロース層をTYアガープレートにのせる。

#### 【0074】

プレートにまいた後、フィルター上で陽性変異体の位置を決めるために、インキュベーション前に、各サンドイッチフィルターに針で目印を付ける。変異体が結合したニトロセルロースフィルターを、炭酸塩 / 重炭酸塩緩衝液 (pH8.5 ~ 10) 及び異なった濃度の EDTA (0.001mM ~ 100mM) が入った容器に移す。そのフィルターを1時間室温でインキュベーションする。コロニーが結合した酢酸セルロースフィルターを、使用するまで、室温でTYプレート上で保存する。インキュベーション後、1 % アガロース、0.2 % でんぷん及び炭酸塩 / 重炭酸塩緩衝液 (pH8.5 ~ 10) を含んで成るプレート上で、残存する活性を検出する。そのニトロセルロースフィルターをのせた検査用プレートに、前記サンドイッチフィルターの場合と同様に、目印を付け、そして2時間室温でインキュベーションする。フィルターを除いた後、その検査用プレートを、10 % Lugol 溶液で染色する。でんぷんを分解する変異体を、暗青色の背景に白点として検出し、そして保存プレート上で同定する。陽性変異体を、1回目のスクリーニング法と同一条件で、2度再スクリーニングする。

#### 注目する領域を得る方法

3つの細菌 アミラーゼの3D構造が既知である。その中に、2つのB. licheniformis アミラーゼ、Brookhavenデータベースの1BPL (Machius et al. (1995), J. Mol. Biol. 246, p. 545-559) 及び1VJS (Song et al. (1996), Enzymes for Carbohydrate 163 Engineering (Prog. Biotechnol. V 12) ) がある。これらの2つの構造では、2つのカルシウムイオン及び1つのナトリウムイオンの結合部位の周辺領域において、いわゆるBドメイ

10

20

30

40

50

ンから構造内の重要な断片が欠失している。従って、本発明者は、アミラーゼ BA2 (WO 96/23874 ; BAN (配列番号 5) と B. licheniformis アミラーゼ (配列番号 4) とのハイブリッド) の 3D 構造を用いた。その構造を基にして、B. licheniformis アミラーゼ及び SP722 アミラーゼのモデルを構築した。

#### アミラーゼ変異体の発酵と精製

当業界に周知の方法によって、発酵と精製を行い得る。

#### 安定性の決定

全ての安定性試験を、同一の設定で行う。その方法を以下に示す。適当な条件下 (1 ~ 4) で、当酵素をインキュベーションする。種々の時点で、例えば 0, 5, 10, 15 及び 30 分後に試料を採取し、検査用緩衝液 (0.1M 50mM Britton 緩衝液 pH7.3) 中に 25 倍希釈する。pH7.3, 37 の標準条件下で Phadebas 検査 (Pharmacia) によって、活性を測定する。

10

#### 【0075】

インキュベーション前 (0 分時) に測定した活性を、参照値 (100%) として用いる。減少 % を、インキュベーション時間の関数として計算する。表では、例えばインキュベーション 30 分後の残存活性を示す。

#### 比活性の決定

Phadebas 検査 (Pharmacia) を用いて、活性 / mg 酵素として比活性を決定する。その製造業者の取扱説明に従う (次の「アミラーゼ活性の検査」を参照する)。

#### アミラーゼ活性の検査

##### 1. Phadebas 検査

20

基質として Phadebas (登録商標) 錠剤を用いる方法によって、アミラーゼ活性を決定する。Phadebas 錠剤 (Phadebas Amylase Test, Pharmacia Diagnostic) は、ウシ血清アルブミン及び緩衝剤と混合した架橋不溶性青色でんぷんポリマーを含んだ錠剤である。

#### 【0076】

1 回の測定毎に、1 錠を、5 ml の 50mM Britton-Robinson 緩衝液 (50mM 酢酸、50mM リン酸、50mM ホウ酸、0.1mM  $\text{CaCl}_2$ 、そして NaOH で pH を設定値に合わせる) を含んだ試験管に懸濁する。設定温度の水浴中で検査を行う。検査する対象のアミラーゼを、x ml の 50mM Britton-Robinson 緩衝液中に希釈する。このアミラーゼ溶液 1 ml を、5 ml の 50mM Britton-Robinson 緩衝液に加える。でんぷんがアミラーゼによって加水分解され、可溶性青色断片が生じる。生じた青色溶液を 620nm で分光光度計で測定した吸光度が、アミラーゼ活性の関数である。

30

#### 【0077】

インキュベーション 10 分又は 15 分後 (検査時間) に測定した 620nm の吸光度が、0.2 ~ 2 吸光単位の範囲にあることが重要である。この吸光度の範囲において、活性と吸光度との間に比例関係が存在する (ランベルト・ベールの法則)。従って、この基準に合う様に、酵素の希釈を調整する必要がある。特定の条件設定 (温度、pH、反応時間、緩衝液条件) 下で、あるアミラーゼ 1 mg が、一定量の基質を加水分解し、そして青色が生じる。この色の強度を 620nm で測定する。一定の条件設定下では、測定された吸光度は、問題のアミラーゼの比活性 (活性 / mg 純粋アミラーゼタンパク質) に正比例する。

##### 2. 代替方法

40

PNP-G7 を基質として使用する方法によって、アミラーゼ活性を決定する。PNP-G7 (p-ニトロフェニル-, D-マルトヘプタオシドの略称) は、エンドアミラーゼによって切断され得る保護化オリゴ糖である。切断後、キットに含まれるグルコシダーゼによって、その基質が消化されて、遊離の PNP 分子が放出される。この分子は黄色であり、波長 405nm (400 ~ 420nm) の可視分光光度計によって測定される。PNP-G7 基質及びグルコシダーゼを含有するキットが、Boehringer-Mannheim 社 (カタログ番号 1054635) から製造販売されている。

#### 【0078】

その基質を調製するために、基質 1 ボトル (BM 1442309) を 5 ml 緩衝液 (BM 1442309) に加える。グルコシダーゼを調製するために、グルコシダーゼ 1 ボトル (BM 1462309)

50

を45ml緩衝液 (BM 1442309) に加える。この グルコシダーゼ溶液 5 mlと基質溶液 0.5mlとを混合して、作業溶液を作る。

この検査では、酵素溶液20 μ lを96ウェルマイクロタイタープレートに加え、25 でインキュベーションする。25 の作業溶液 200mlを追加する。この溶液を混合し、1分間インキュベーションしてから、405nmの吸光度を、3分間に亘って15秒毎に測定する。

#### 【 0 0 7 9 】

一定の条件設定下では、その吸光度の時間変化曲線の傾きは、問題の アミラーゼの比活性 (活性 / mg酵素) に正比例する。

#### DOPEプログラムを用いたランダム変異誘発の一般方法

以下の過程に従って、ランダム変異誘発を行い得る：

- 1．親酵素において、修飾のための注目領域を選択する；
- 2．選択領域において、変異部位と非変異部位を決定する；
- 3．誘発する変異の種類を、例えば、構築する変異体の希望する安定性及び / 又は性能に応じて、決定する；
- 4．構造的に合理的な変異を選択する；
- 5．過程4に応じて過程3に従って選択される残基を調整する；
- 6．適当なdopeアルゴリズムに従って、ヌクレオチド分布を分析する；
- 7．必要がある場合には、必要とされる残基を遺伝子コードの実際に合わせる (例えば、(例えば停止コドンの導入を避けるために) 遺伝子コードから生じる制約を考慮する) (あるコドンの組合せが実際には使用できないことが当業者に知られており、従って調整が必要となる)；
- 8．プライマーを作る；
- 9．そのプライマーを用いて、ランダム変異誘発を行う；
- 10．希望する特性の向上をスクリーニングすることによって、生じた アミラーゼ変異体を選択する。

#### 【 0 0 8 0 】

過程6で使用するために適したdopeアルゴリズムは、当業界に周知である。1つのアルゴリズムが、Tomandl, D. et al., Journal of Computer-Aided Molecular Design, 11 (1997), pp. 29-38) に記載されている。もう1つのアルゴリズムDOPEについて、以下に記す。

#### dopeプログラム

「DOPE」プログラムは、必要とされるアミノ酸分布に最も近似するアミノ酸分布をコードする様に、三連コドンのヌクレオチド組成を最適化するために有用なコンピュータプログラムである。可能な分布のうちのいずれが、必要とされるアミノ酸分布に最も近似しているかを評価するために、評価関数が必要である。「DOPE」プログラムでは、以下の関数が適すると認められた：

#### 【 0 0 8 1 】

#### 【数1】

$$S \equiv \prod_{i=1}^N \left( \frac{x_i^{y_i} (1 - x_i)^{1-y_i}}{y_i^{y_i} (1 - y_i)^{1-y_i}} \right)^{w_i}$$

#### 【 0 0 8 2 】

式中、 $x_i$  は、当プログラムによって計算して得られた、アミノ酸及びアミノ酸の基の量であり、 $y_i$  は、当プログラムの使用者によって決められた、アミノ酸及びアミノ酸の基の必要とされる量であり (例えば、通常の20アミノ酸又は停止コドンのうちのいずれが、

例えばある割合（例えば90% Ala, 3% Ile, 7% Val）にて、導入されることが必要とされるかを特定する）、そして $w_i$ は、当プログラムの使用者によって決められた、割当の荷重係数である（例えば、問題の位置に挿入される特定のアミノ酸残基を有することの重要性に依存する）。Nは、当プログラムの使用者によって決められたアミノ酸基数+21である。この関数のために、 $0^0$ を1とする。

#### 【0083】

この関数の最大値を見い出すために、Monte-Carlo アルゴリズム（1つの例が、Valleau, J.P. & Whittington, S.G. (1977) A guide to Monte Carlo for statistical mechanics : 1 Highways。In "Statistical Mechanics, Part A" Equilibrium Techniques ed. B.J. Berne, New York : Plenumに記載されている）を用いる。各反復において、以下の過程が行われる：

10

1. 各塩基において、新しいランダムなヌクレオチド組成が選択され、その場合、その時の組成と新しい組成との間の絶対差が、当コドンの3つの全ての位置が、4つのヌクレオチドG, A, T, Cの各々である場合のdよりも小さいか、又は等しい（dの定義は下記参照のこと）。

2. 新しい組成の評価点と、その時の組成の評価点とを、前記の関数sを用いて比較する。新しい評価点が、その時の評価点よりも大きい、又は等しい場合には、新しい組成を保持し、その時の組成を新しい組成に変える。新しい評価点がより小さい場合には、新しい組成を保持する確率は、 $\exp [1000 \text{ [新しい評価点 - その時の評価点]}]$ である。

#### 【0084】

20

1サイクルは、標準的には、前記の反復過程1000回から成り、その場合、dは、1から0へ直線的に減少する。最適化においては、100回以上のサイクルを行う。最高の評価点を得たヌクレオチド組成が、最後に提示される。

#### 〔実施例〕

実施例 1 :

#### Termamylの相同性構築の例

B. licheniformis アミラーゼ（以下Termamylとする）の、その他のTermamyl様 アミラーゼに対する総体的な相同性は高く、そしてその相似率は極端に高い。GCG プログラム（University of Wisconsin Genetics Computer Group's program）を用いて計算された、BSG（配列番号3を有するB. stearothermophilus アミラーゼ）、及びBAN（配列番号5を有するB. awyloliquefaciens アミラーゼ）に対するTermamylの相似率は、各々89%及び78%であった。Termamylは、BAN 及びBSG と比べて、残基G180とK181との間の2残基が欠失している。BSG は、BAN 及びTermamylと比べて、G371とI372との間の3残基が欠失している。N末端において、BSG と比べて、BAN は2残基少く、そしてTermamylは1残基少い。

30

#### 【0085】

B. licheniformis アミラーゼ（Termamyl）及びB. awyloliquefaciens アミラーゼ（BAN）の各構造のモデルが、WO96/23974の付表1に開示されている構造に基づいて構築された。他のTermamyl様 アミラーゼ（例えば本明細書に開示したもの）の構造も、同様なやり方で構築し得る。

40

構造を解明するために用いられる アミラーゼと比べて、Termamylは、178~182 付近の2つの残基が欠失している点で、異なっている。モデル構造において、これを補うために、BIOSYMのHOMOLOGYプログラムを用いて、欠失点を除いて、当構造の相当する位置（構造的に保存された領域だけでなく）における残基を置換した。Termamyl（BAN）におけるG179（G177）とK180（K180）との間でペプチド結合を成立させた。解明された構造とモデル構造との間の構造上の密接な関係（従って後者の有効性）が、モデルにおいて相互にあまりに近接していることが判明した原子が、非常にほんの少ししか存在しないことから指摘される。

#### 【0086】

次にINSIGHT プログラムによって、この非常に粗いTermamylの構造に、解明された構造の

50

場合 (W096/23874の付表 1 参照) と同じ座標で、その解明された構造に由来する全ての水 (605個) 及びイオン (4カルシウムと1ナトリウム) を付け加えた。この場合、ほんの少しの重複しか認められず、すなわち非常に良好な適合が認められた。次に、このモデル構造を、200 過程の急勾配降下 (Steepest descent) 及び600 過程の共役勾配 (Conjugated gradient) によって最小化した (Brooks et al., 1983, J. Computational Chemistry 4, p. 187-217)。次に、この最小化構造に分子動力学を適用し、35psを超えて 200psの平衡まで、5 psの加熱を行った。この動力学は、Verletアルゴリズムに従って運用され、Behrendsenによる水環境との共役 (Berendsen et al., 1984, J. Chemical Physics 81, p. 3684-3690) に従って平衡温度 300 Kを維持した。ピコ秒毎に回転と並進を取り出した。

実施例 2 :

pH安定性の向上及び温度依存的な活性の変化を示す アミラーゼ変異体を同定するために重要な領域を導き出す方法

注目の酵素、ここではSP722 とTermamyl、の X 線解析構造及び / 又はモデル構築構造に対して、分子動力学的シミュレーションを行う。この分子動力学的シミュレーションを、CHARMM (Molecular simulations (MSI)) プログラム又はその他の適当なプログラム、例えば DISCOVER (MSI) によって行う。この分子動力学的分析を、孤立状態、あるいは、より好ましくは、結晶水を含んだ状態、又は、水中に、例えば水球若しくは水箱中に埋め込まれた状態、の酵素に対して行う。このシミュレーションを、300ピコ秒 (ps) 又はそれ以上、例えば 300 ~ 1200psの期間運用する。前記構造の C 炭素に関して、等方性振動を取り出し、前記構造間で比較する。一方の配列中に欠失及び / 又は挿入がある場合、他方の構造に由来する等方性振動をはめ込み、等方性変動の差を 0 にする。等方性振動の説明に関して、CHARMMの使用説明書 (MSI から入手できる) を参照すること。

【 0 0 8 7 】

荷電性アミノ酸に対する標準的な荷電に従って、この分子動力学的シミュレーションを行うことができる。すなわち、Asp 及びGlu は陰性荷電され、そしてLys 及びArg は陽性荷電される。この条件は、約 7 の中性pHを近似する。より高い又は低いpHで分析するために、標準滴定可能な残基の変化したpKa を通常pH 2 ~ 10の範囲内で得て、当分子の滴定を行うことができる。この様な残基は、Lys, Arg, Asp, Glu, Tyr 及びHis である。また、Ser, Thr及びCys は滴定可能であるが、ここでは考慮しない。ここで、pHのために変化した荷電に関して、高pHでは、Asp 及びGlu は陰性であり、Arg 及びLys は非荷電である。これは、約10 ~ 11のpHを近似していて、この場合、Lys 及びArg の標準pKa が約 9 ~ 11であるとして、これらの残基の滴定を開始する。

1 . 高pH安定性を有する アミラーゼ変異体を同定するために重要な領域を導き出すために用いる方法 :

pH安定性が改良された変異体を構築するために重要な領域は、極端なpHにおいて最良の運動性を示す領域、すなわち最大の等方性振動を有する領域である。

【 0 0 8 8 】

この様な領域は、以下の 2 つの分子動力学シミュレーションを行うことによって同定される : i ) 塩基性アミノ酸Lys 及びArg が中性であり (すなわちプロトン化されていない) 、そして酸性アミノ酸Asp 及びGlu が荷電 ( - 1 ) を有する高pHでの運用、並びに、ii ) 塩基性アミノ酸Lys 及びArg が正味の荷電 ( + 1 ) を有し、そして前記酸性アミノ酸が荷電 ( - 1 ) を有する中性pHでの運用。

【 0 0 8 9 】

この 2 つの運用を比較して、中性pHに比べて高pHにて相対的により高い運動性を示す領域を同定した。

一般的な安定性、例えば水素結合、を向上させる残基、その領域をより硬直にする (例えば、グリシン残基のプロリン置換などの変異による) 残基、あるいは、荷電又は残基間相互作用を向上させる残基を導入することによって、当酵素の高pH安定性が向上する。

2 . 中温での活性が増加した アミラーゼ変異体を同定するための領域を取り出す方法 : 中温での活性が増加した変異体を構築するために重要な領域を、SP722 とTermamylとの等

10

20

30

40

50

方性振動の差、すなわちSP722 での C の等方性振動からTermamylでのものを引いた差から、見い出した。その等方性振動の運動性が最大である領域を選択した。このような領域及びその残基が、中温での活性を増加させると期待された。それらの残基に適切な運動性が存在する場合には、アミラーゼの活性が発現するだけである。それらの残基の運動性があまりに低い場合、活性は低下又は消滅する。

実施例 3 :

局所的ランダムdope変異誘発法による、親酵素と比べて中温でのCa<sup>2+</sup>安定性が向上したTermamyl様 アミラーゼの構築

低カルシウム濃度における アミラーゼの安定性を改良するために、予じめ選択した領域で、ランダム変異誘発を行った。

10

領域 : SAI

残基 : R181-W189

停止コドンの量を最小化する様に、SAI 領域において示唆された各変異のための導入 (spiked) コドンを決断するために、DOPEプログラム (「材料と方法」参照) を用いた (表 1)。示唆された一群のアミノ酸変異を得るために、そのコドンの 3 つの位置において、ヌクレオチドの正確な分布を計算した。希望の残基にする確率を高くするために、指示された位置において特異的に対象領域を処理したが、それでもなお他の可能性もあり得る。

表 1 :

各位置におけるアミノ酸残基の分布

20

---

R181: 72% R, 2% N, 7% Q, 4% H, 4% K, 11% S  
 G182: 73% G, 13% A, 12% S, 2% T  
 K185: 95% K, 5% R  
 A186: 50% A, 4% N, 6% D, 1% E, 1% G, 1% K, 5% S, 31% T  
 W187: 100% W  
 D188: 100% D  
 W189: 92% W, 8% S

---

表 2 に、得られた処理済みオリゴヌクレオチド鎖をセンス鎖として示し、それと共に、野生型のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに各処理位置におけるヌクレオチド分布

30

も示す。

表 2 :

---

位置 181 182 185 186 187 188 199  
 アミノ酸配列 Arg Gly Lys Ala Thr Asp Thr  
 野生型ヌクレオチド配列 cga ggt aaa gct tgg gat tgg  
 順方向プライマー（配列番号15）：  
 FSA: 5'-caa aat cgt atc tac aaa ttc 123 456 a7g 8910 tgg  
 gat tllg gaa gta gat tcg gaa aat-3'

各処理位置におけるヌクレオチド分布

1 : 35% A, 65% C

2 : 83% G, 17% A

3 : 63% G, 37% T

4 : 86% G, 14% A

5 : 85% G, 15% C

6 : 50% T, 50% C

7 : 95% A, 5% G

8 : 58% G, 37% A, 5% T

9 : 86% C, 13% A, 1% G

10 : 83% T, 17% G

11 : 92% G, 8% C

逆方向プライマー（配列番号16）：

RSA: 5'-gaa ttt gta gat acg att ttg-3'

---

10

20

#### ランダム変異誘発

表 2 から明白な導入（spiked）オリゴヌクレオチド（FSA とする）及びSAI 領域のための逆方向プライマー-RSA、並びにSacII 部位からDraII 部位までのSP722（配列番号2）特異的プライマーを用いて、21塩基対の重複による重複伸長方法（Horton et al., Gene 77（1989）, pp. 61-68）によって、PCR ライブラリー断片を作成する。このPCR の鋳型は、プラスミドpJE1である。このPCR 断片を、大腸菌ノパチルス菌シャトルベクターpDorK101にクローン化する（「材料と方法」参照）ことで、大腸菌で変異誘発し、即座にパチルス・ズブチリスで発現させることが可能となり、従って大腸菌内でのアミラーゼの致死的な集積を回避する。大腸菌内でクローン化PCR 断片を確立した後、そのプラスミドから修飾されたpUC19 断片を切り出し、そしてプロモーターと、変異Termamyl遺伝子とを自然に連結し、その様にしてパチルス菌内での発現が可能となる。

30

#### スクリーニング

「材料と方法」で記載した通り、このライブラリーを低カルシウムフィルター検査でスクリーニングし得る。

実施例 4：

#### 配列番号 1 のアミラーゼ (SP690) の変異体の構築

配列番号 1 のアミラーゼをコードする遺伝子は、W096/23873に記載されているプラスミド pTVB106 中に存在する。パチルス・ズブチリス内で、この構成体のamyLプロモーターから、そのアミラーゼを発現させる。

40

【 0 0 9 0 】

当タンパク質の 1 つの変異体は、デルタ（T183 - G184）+ Y243F + Q391E + K444Q である。この変異体の構築は、W096/23873に記載されている。

Sarkar and Sommer, (1990), BioTechniques 8 : 404-407に記載されたメガプライマー法によるデルタ（T183 - G184）+ N195F の構築を以下に示す。

遺伝子特異的プライマー B 1（配列番号17）及び変異生成プライマー101458（配列番号19）を用いて、pTVB106 様プラスミド（配列番号 1 のアミラーゼをコードする遺伝子中にデルタ（T183 - G184）変異を有するもの）から、約 645bpのDNA 断片を、PCR によって増幅した。

50



## 【 0 0 9 1 】

この 645bp断片をアガロースゲルから精製し、これをメガプライマーとして、プライマー Y 2 (配列番号18) と共に用いて、同一の鋳型に対して 2 回目のPCR を行った。

生じた約1080bpの断片を、制限酵素BstEIIとAflIIIとで切断し、生じた約 510bpのDNA 断片を精製し、同酵素で切断したpTVB106 様プラスミド (配列番号 1 のアミラーゼをコードする遺伝子中にデルタ (T183 - G184) 変異を有するもの) に連結した。この連結物によって、コンピテントなバチルス・ズブチリスSHA273細胞を形質転換し、そのクロラムフェニコール耐性の形質転換体を、DNA 配列決定によって検査して、プラスミド上に適切な変異が存在することを確認した。

プライマー B 1 : (配列番号17)

5' CGA TTG CTG ACG CTG TTA TTT GCG 3'

プライマー Y 2 : (配列番号18)

5' CTT GTT CCC TTG TCA GAA CCA ATG 3'

プライマー101458 : (配列番号19) :

5' GT CAT AGT TGC CGA AAT CTG TAT CGA CTT C 3'

変異体デルタ (T183 - G184) + K185R + A186T を、変異生成プライマー101638を用いること以外は、先と同様にして構築した。

プライマー101638 : (配列番号20)

5' CC CAG TCC CAC GTA CGT CCC CTG AAT TTA TAT ATT TTG 3'

変異体 : デルタ (T183 - G184) + A186T 、デルタ (T183 - G184) + A186I 、デルタ (T183 - G184) + A186S 、デルタ (T183 - G184) + A186N を、pTVB106 様プラスミド (変異体デルタ (T183 - G184) + K185R + A186T を有する) を鋳型及びクローニングベクターとして用いること以外は、先と同様にして構築する。そのための変異生成オリゴヌクレオチド (オリゴ1) は、

5' CC CAG TCC CAG NTCTTT CCC CTG AAT TTA TAT ATT TTG 3' (配列番号21)

である。

## 【 0 0 9 2 】

Nは、この変異生成オリゴヌクレオチドの合成時に、4つの塩基 : A , C , G 及び T の混合物を使用したことを意味する。形質転換体のDNA 配列決定によって、その成熟タンパク質のアミノ酸位置186 における適正なコドンを確認する。

変異体デルタ (T183 - G184) + K185R + A186T + N195F を以下の様にして構築する。

## 【 0 0 9 3 】

pTVB106 様プラスミド (デルタ (T183 - G184) + K185R + A186T の変異を有するもの) に対してプライマー x 2 (配列番号22) 及びプライマー101458 (配列番号19) を用いてPCR を行う。できたDNA 断片をメガプライマーとして、プライマー Y 2 (配列番号18) と共に用いて、pTVB106 様プラスミド (デルタ (T183 - G184) + N195F の変異を有するもの) に対してPCR を行う。この2 回目のPCR 産物を、制限エンドヌクレアーゼAcc65I 及びAflIII によって切断し、同酵素によって切断したpTVB106 様プラスミド (デルタ (T183 - G184) + N195F) 中にクローン化した。

プライマー x 2 : (配列番号22)

5' GCG TGG ACA AAG TTT GAT TTT CCT G 3'

変異体 : デルタ (T183 - G184) + K185R + A186T + N195F + Y243F + Q391E + K444Q を以下の様にして構築する。

## 【 0 0 9 4 】

pTVB106 様プラスミド (デルタ (T183 - G184) + K185R + A186T の変異を有するもの) に対してプライマー x 2 及びプライマー101458を用いて、PCR を行う。できたDNA 断片をメガプライマーとして、プライマー Y 2 と共に用いて、pTVB106 様プラスミド (デルタ (T183 - G184) + Y243F + Q391E + K444Q) の変異を有するもの) に対してPCR を行う。この2 回目のPCR 産物を、制限エンドヌクレアーゼAcc65I 及びAflIII によって切断し、同酵素によって切断したpTVB106 様プラスミド (デルタ (T183 - G184) + Y243F + Q391E + K444Q)

10

20

30

40

50

中にクローン化した。

#### 実施例 5

親酵素SP722 アミラーゼ（配列番号 2）における部位特異的 アミラーゼ変異体の構築  
配列番号 2 のアミラーゼ (SP722) の変異体を以下の様にして構築する。

##### 【 0 0 9 5 】

配列番号 2 のアミラーゼをコードする遺伝子は、W096/23873に記載のプラスミドpTVB112中に存在する。このアミラーゼは、パチルス・ズブチリス内で、この構成体のamyLプロモーターから発現される。

Sarkar and Sommer, 1990 (BioTechniques 8 : 404-407) に記載されたメガプライマー法によるデルタ (D183 - G184) + V56Iの構築を以下に示す。

##### 【 0 0 9 6 】

遺伝子特異的プライマー-DA03及びメガプライマー-DA07を用いて、pTVB112 様プラスミド (配列番号 2 の アミラーゼをコードする遺伝子中にデルタ (D183 - G184) の変異を有するもの) から、約 820bpのDNA 断片をPCR によって増幅する。

この 820bp断片をアガロースゲルから精製し、これをメガプライマーとして、プライマー-DA01と共に用いて、同一の鋳型に対して 2 回目のPCR を行う。

##### 【 0 0 9 7 】

生じた約 920bpの断片を、制限酵素NcoI 及びAatII によって切断し、生じた約 170bpのDNA 断片を精製し、同酵素で切断したpTVB112 様プラスミド (配列番号 2 のアミラーゼをコードする遺伝子中にデルタ (D183 - G184) 変異を有するもの) に連結する。この連結物によって、コンピテントなパチルス・ズブチリスSHA273細胞 (低アミラーゼ及び低プロテアーゼ) を形質転換し、そのクロラムフェニコール耐性の形質転換体を、DNA 配列決定によって検査して、プラスミド上に適切な変異が存在することを確認する。

プライマー-DA01 : (配列番号23)

5' CCTAATGATGGGAATCACTGG 3'

プライマー-DA03 : (配列番号24)

5' GCATTGGATGCTTTTGAACAACCG 3'

プライマー-DA07 : (配列番号25)

5' CGCAAAATGATATCGGGTATGGAGCC 3'

変異体 : デルタ (D183 - G184) + K108L 、デルタ (D183 - G184) + K108Q 、デルタ (D183 - G184) + K108E 、デルタ (D183 - G184) + K108V を、Sarkar and Sommer, 1990 (BioTechniques 8 : 404-407) に記載されたメガプライマー法によって構築した。

##### 【 0 0 9 8 】

プライマー-DA03及び変異生成プライマー-DA20を用いてpTVB112 様プラスミド (デルタ (D183 - G184) の変異を有するもの) に対してPCR を行う。生じたDNA 断片をメガプライマーとして、プライマー-DA01と共に用いて、pTVB112 様プラスミド (デルタ (D183 - G184) の変異を有するもの) に対してPCR を行う。2 回目のPCR で生じた約 920bpの断片を、制限酵素AatII 及びMluIによって切断し、同酵素で切断したpTVB112 様プラスミド (デルタ (D183 - G184) 変異を有するもの) に連結する。

プライマー-DA20 : (配列番号26) :

5' GTGATGAACCAACSWAGGTGGAGCTGATGC 3'

S は、変異生成オリゴヌクレオチドを合成する際に、2つの塩基C及びGの混合物を用いること、そしてWは、その際に、2つの塩基A及びTの混合物を用いることを意味する。形質転換体の配列決定によって、成熟アミラーゼのアミノ酸位置108 に適切なコドンが存在することを確認する。

##### 【 0 0 9 9 】

変異体 : デルタ (D183 - G184) + D168A 、デルタ (D183 - G184) + D168I 、デルタ (D183 - G184) + D168V 、デルタ (D183 - G184) + D168T を、変異生成プライマー-DA14を用いること以外は同様にして、構築する。

プライマー-DA14 (配列番号27) :

5' GATGGTGTATGGRYCAATCACGACAATTCC 3'

R は、変異生成オリゴヌクレオチドを合成する際に、2つの塩基 A 及び G の混合物を用いること、そして Y は、その際に、2つの塩基 C 及び T の混合物を用いることを意味する。形質転換体の配列決定によって、成熟アミラーゼのアミノ酸位置168 に適切なコドンが存在することを確認する。

【 0 1 0 0 】

変異体：デルタ (D183 - G184) + Q169N を、変異生成プライマー-DA15を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA15 (配列番号28) :

5' GGTGTATGGGATAACTCACGACAATTCC 3'

10

変異体：デルタ (D183 - G184) + Q169L を、変異生成プライマー-DA16を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA16 (配列番号29) :

5' GGTGTATGGGATCTCTCACGACAATTCC 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + Q172N を、変異生成プライマー-DA17を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA17 (配列番号30) :

5' GGGATCAATCACGAAATTTCCAAAATCGTATC 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + Q172L を、変異生成プライマー-DA18を用いること以外は同様にして構築する。

20

プライマー-DA18 (配列番号31) :

5' GGGATCAATCACGACTCTTCCAAAATCGTATC 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + L201I を、変異生成プライマー-DA06を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA06 (配列番号32) :

5' GGAAATTATGATTATATCATGTATGCAGATGTAG 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + K269S を、変異生成プライマー-DA09を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA09 (配列番号33) :

5' GCTGAATTTTGGTGAATGATTTAGGTGCC 3'

30

変異体：デルタ (D183 - G184) + K269Q を、変異生成プライマー-DA11を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA11 (配列番号34) :

5' GCTGAATTTTGGTGAATGATTTAGGTGCC 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + N270Y を、変異生成プライマー-DA21を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA21 (配列番号35) :

5' GAATTTTGAAGTACGATTTAGGTCCG 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + L272A 、デルタ (D183 - G184) + L272I 、デルタ (D183 - G184) + L272V 、デルタ (D183 - G184) + L272T を、変異生成プライマー-DA12を用いること以外は同様にして構築する。

40

プライマー-DA12 (配列番号36) :

5' GGAAAAACGATRYCGGTGCCTTGAGAAC 3'

R は、変異生成オリゴヌクレオチドを合成する際に、2つの塩基 A 及び G の混合物を用いること、そして Y は、その際に、2つの塩基 C 及び T の混合物を用いることを意味する。形質転換体の配列決定によって、成熟アミラーゼのアミノ酸位置272 に適切なコドンが存在することを確認する。

【 0 1 0 1 】

変異体：デルタ (D183 - G184) + L275A 、デルタ (D183 - G184) + L275I 、デルタ (D183 - G184) + L275V 、デルタ (D183 - G184) + L275T を、変異生成プライマー-DA13を用いる

50

こと以外は同様にして構築する。

プライマー-DA13 (配列番号37) :

5' GATTTAGGTGCCTRYCAGAACTATTTA 3'

R は、変異生成オリゴヌクレオチドを合成する際に、2つの塩基 A 及び G の混合物を用いること、そして Y は、その際に、2つの塩基 C 及び T の混合物を用いることを意味する。形質転換体の配列決定によって、成熟アミラーゼのアミノ酸位置275 に適切なコドンが存在することを確認する。

【0102】

変異体：デルタ (D183 - G184) + Y295E を、変異生成プライマー-DA08を用いること以外は同様にして構築する。

10

プライマー-DA08 (配列番号38) :

5' CCCCTTCATGAGAATCTTTATAACG 3'

Sarkar and Sommer, 1990 (BioTechniques 8 : 404-407) に記載されたメガプライマー法によるデルタ (D183 - G184) + K446Q の構築を以下に示す。

【0103】

停止コドンの下流 214 ~ 231bp にアニールする遺伝子特異的プライマー-DA04及び変異生成プライマー-DA10を用いて、pTVB112 様プラスミド (配列番号2のアミラーゼをコードする遺伝子中にデルタ (D183 - G184) の変異を有するもの) から、約 350bpのDNA 断片をPCR によって増幅した。

生じたDNA 断片をメガプライマーとして、プライマー-DA05と共に用いて、pTVB112 様プラスミド (デルタ (D183 - G184) の変異を有するもの) に対してPCR を行う。この2回目のPCR による約 460bpの産物を、制限酵素SnaBI 及びNotIによって切断し、そして同酵素によって切断されたpTVB112 様プラスミド (デルタ (D183 - G184) ) 中にクローン化する。

20

プライマー-DA04 (配列番号39) :

5' GAATCCGAACCTCATTACACATTCG 3'

プライマー-DA05 (配列番号40) :

5' CGGATGGACTCGAGAAGGAAATACACG 3'

プライマー-DA10 (配列番号41) :

5' CGTAGGGCAAAATCAGGCCGGTCAAGTTTGG 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + K458R を、変異生成プライマー-DA22を用いること以外は同様にして構築する。

30

プライマー-DA22 (配列番号42) :

5' CATAACTGGAAATCGCCCGGAACAGTTACG 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + P459S 及びデルタ (D183 - G184) + P459T を、変異生成プライマー-DA19を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA19 (配列番号43) :

5' CTGGAAATAAAWCCGGAACAGTTACG 3'

Wは、変異生成プライマーを合成する際に、2つの塩基 A 及び T の混合物を用いることを意味する。形質転換体の配列決定によって、成熟アミラーゼのアミノ酸位置459 に適切なコドンが存在することを確認する。

40

【0104】

変異体：デルタ (D183 - G184) + T461P を、変異生成プライマー-DA23を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA23 (配列番号44) :

5' GGAAATAAACAGGACCCGTTACGATCAATGC 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + K142R を、変異生成プライマー-DA32を用いること以外は同様にして構築する。

プライマー-DA32 (配列番号45) :

5' GAGGCTTGGACTAGTTTGATTTTCCAG 3'

変異体：デルタ (D183 - G184) + K269R を、変異生成プライマー-DA31を用いること以外は

50

同様にして構築する。

プライマー-DA31（配列番号46）：

5' GCTGAATTTTGGCGCAATGATTAGGTGCC 3'

#### 実施例 6

親のTermamyl アミラーゼ（配列番号4）における部位特異的 アミラーゼ変異体の構築  
Termamyl アミラーゼをコードするamyL遺伝子は、W095/10603（Novo Nordisk）に記載されたプラスミドpDN1528中に存在する。この親に各々が由来する置換変異体N265R及びN265Dを、W097/41213に記載の方法又は前記の「メガプライマー」法によって構築する。変異生成プライマーは、以下の通りである：

N265R 置換のためのプライマー b 11：

5' PCC AGC GCG CCT AGG TCA CGC TGC CAA TAT TCA G（配列番号56）

N265D 置換のためのプライマー b 12：

5' PCC AGC GCG CCT AGG TCA TCC TGC CAA TAT TCA G（配列番号57）

P はリン酸基を表す。

#### 実施例 7

配列番号2のアミノ酸配列を有する親 アミラーゼに由来する変異体におけるアルカリpHでのpH安定性の決定

この一連の分析では、精製酵素試料を用いた。pH10.5に合わせた100mM CAPS緩衝液による各変異体溶液を用いて、測定を行った。この溶液を75 でインキュベーションした。

【0105】

20分及び30分間インキュベーションした後、PNP-G7検査（「材料と方法」参照）によって残存活性を測定した。試料中の残存活性を、Britton Robinson緩衝液（pH7.3）を用いて測定した。高pH及び75 でインキュベーションしなかった同酵素の対応参照溶液の0分時点と比較して、残存活性の減少を測定した。

以下の表では、親酵素（配列番号2）及び問題の変異体において、初期活性の関数として、それに対する比率%を示している。

【0106】

変異体	20分後の残存活性	30分後の残存活性
Δ (D183-G184) +M323L	56%	44%
Δ (D183-G184) +M323L +R181S	67%	55%
Δ (D183-G184) +M323L +A186T	62%	50%

もう1つの一連の分析では、培養上清を用いた。pH10.5に合わせた100mM CAPS緩衝液による各変異体溶液を用いて、測定を行った。この溶液を80 でインキュベーションした。

【0107】

30分間インキュベーションした後、Phadebas検査（「材料と方法」参照）によって、残存活性を測定した。試料中の残存活性を、Britton Robinson緩衝液（pH7.3）を用いて測定した。高pH及び80 でインキュベーションしなかった同酵素の対応参照溶液の0分時点と比較して、残存活性の減少を測定した。

以下の表では、親酵素（配列番号2）及び問題の変異体において、初期活性の関数として、それに対する比率%を示している。

【0108】

変異体	30分後の残存活性
Δ (D183-G184)	4 %
Δ (D183-G184) +P459T	25%
Δ (D183-G184) +K458R	31%
Δ (D183-G184) +K311R	10%

## 実施例 8

配列番号 1 , 2 及び 4 のアミノ酸配列を有する親 アミラーゼに由来する変異体におけるアルカリpHでのカルシウム安定性の決定

10

## A . 配列番号 1 の配列の変異体におけるカルシウム安定性

pH10.5に合わせた100mM CAPS緩衝液による各変異体溶液を用いて、測定を行った。この溶液に ( t = 0 時点で ) 終濃度 2400ppmになる様にポリリン酸を加えた。この溶液を50 でインキュベーションした。

【 0 1 0 9 】

20分及び30分間インキュベーションした後、PNP-G7検査 ( 前記 ) によって、残存活性を測定した。試料中の残存活性を、Britton Robinson緩衝液 (pH7.3) を用いて測定した。高pH及び50 でインキュベーションしなかった同酵素の対応参照溶液の 0 分時点と比較して、残存活性の減少を測定した。

20

以下の表では、親酵素 ( 配列番号 1 ) 及び問題の変異体において、初期活性の関数として、それに対する比率 % を示している。

【 0 1 1 0 】

変異体	20分後の残存活性	30分後の残存活性
Δ (T183-G184)	32%	19%
Δ (T183-G184) +A186T	36%	23%
Δ (T183-G184) +K185R +A186T	45%	29%
Δ (T183-G184) +A186I	35%	20%
Δ (T183-G184) +N195F	44%	n. d.

30

n. d. = 未決定

## B . 配列番号 2 の配列の変異体におけるカルシウム安定性

この一連の分析では、精製酵素試料を用いた。pH10.5に合わせた100mM CAPS緩衝液による各変異体溶液を用いて、測定を行った。この溶液に ( t = 0 時点で ) 終濃度 2400ppmになる様にポリリン酸を加えた。この溶液を50 でインキュベーションした。

【 0 1 1 1 】

20分及び30分間インキュベーションした後、PNP-G7検査 ( 前記 ) によって、残存活性を測定した。試料中の残存活性を、Britton Robinson緩衝液 (pH7.3) を用いて測定した。高pH及び50 でインキュベーションしなかった同酵素の対応参照溶液の 0 分時点と比較して、残存活性の減少を測定した。

40

以下の表では、親酵素 ( 配列番号 2 ) 及び問題の変異体において、初期活性の関数として、それに対する比率 % を示している。

【 0 1 1 2 】

変異体	20分後の残存活性	30分後の残存活性
Δ (D183-G184) +M323L	21%	13%
Δ (D183-G184) +M323L +R181S	32%	19%
Δ (D183-G184) +M323L +A186T	28%	17%
Δ (D183-G184) +M323L +A186R	30%	18%

変異体	20分後の残存活性	30分後の残存活性
Δ (D183-G184)	30%	20%
Δ (D183-G184) +N195F	55%	44%

10

もう1つの一連の分析では、培養上清を用いた。pH10.5に合わせた100mM CAPS緩衝液による各変異体溶液を用いて、測定を行った。この溶液に（t = 0時点で）終濃度 2400ppmになる様にポリリン酸を加えた。この溶液を50 でインキュベーションした。

#### 【 0 1 1 3 】

30分間インキュベーションした後、前記のPhadebas検査によって、残存活性を測定した。試料中の残存活性を、Britton Robinson緩衝液(pH7.3)を用いて測定した。高pH及び50 でインキュベーションしなかった同酵素の対応参照溶液の0分時点と比較して、残存活性の減少を測定した。

20

以下の表では、親酵素（配列番号2）及び問題の変異体において、初期活性の関数として、それに対する比率%を示している。

#### 【 0 1 1 4 】

変異体	30分後の残存活性
Δ (D183-G184)	0 %
Δ (D183-G184) +P459T	19%
Δ (D183-G184) +K458R	18%
Δ (D183-G184) +T461P	13%
Δ (D183-G184) +E346Q +K385R	4 %

30

#### C . 配列番号4の配列の変異体におけるカルシウム安定性

pH10.5に合わせた100mM CAPS緩衝液による各変異体溶液を用いて、測定を行った。この溶液に（t = 0時点で）終濃度 2400ppmになる様にポリリン酸を加えた。この溶液を60 でインキュベーションした。

#### 【 0 1 1 5 】

20分間インキュベーションした後、PNP-G7検査（前記）によって、残存活性を測定した。試料中の残存活性を、Britton Robinson緩衝液(pH7.3)を用いて測定した。高pH及び60 でインキュベーションしなかった同酵素の対応参照溶液の0分時点と比較して、残存活性の減少を測定した。

40

以下の表では、親酵素（配列番号4）及び問題の変異体において、初期活性の関数として、それに対する比率%を示している。

#### 【 0 1 1 6 】

変異体	20分後の残存活性
Termamyl (配列番号 4)	17%
N265R	28%
N265D	25%

#### 実施例 9

#### 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する アミラーゼにおける中温での活性の測定

##### A . 配列番号 1 の配列の変異体における アミラーゼ活性

pH7.3 に合わせた50mM Britton Robinson 緩衝液による各変異体溶液を用いて、前記のPhadebas検査によって測定を行った。試料中の活性を、50mM Britton Robinson 緩衝液(pH7.3)を用いて37 で、そして50mM CAPS 緩衝液(pH10.5)を用いて25 で測定した。

【 0 1 1 7 】

以下の表では、親酵素(配列番号 1)及び問題の変異体において、温度依存的な活性、並びに、37 での活性に対する25 での活性の比率%を示している。

変異体	NU/mg 25℃	NU/mg 37℃	NU (25℃) / NU (37℃)
SP690	1440	35000	4.1%
Δ (T183-G184)	2900	40000	7.3%
Δ (T183-G184) +K269S	1860	12000	15.5%
Δ (Q174)	3830	38000	7.9%

pH7.3 に合わせた50mM Britton Robinson 緩衝液による各変異体溶液を用いて、前記のPhadebas検査によってもう1つの測定を行った。試料中の活性を、50mM Britton Robinson 緩衝液(pH7.3)を用いて37 及び50 で測定した。

【 0 1 1 8 】

以下の表では、親酵素(配列番号 1)及び問題の変異体において、温度依存的な活性、並びに、50 での活性に対する37 での活性の比率%を示している。

変異体	NU/mg 37℃	NU/mg 50℃	NU (37℃) / NU (50℃)
SP690 (配列番号 1)	13090	21669	60%
K269Q	7804	10063	78%

##### B . 配列番号 2 の配列の変異体における アミラーゼ活性

pH7.3 に合わせた50mM Britton Robinson 緩衝液による各変異体溶液を用いて、前記のPhadebas検査によって測定を行った。試料中の活性を、50mM Britton Robinson 緩衝液(pH7.3)を用いて25 及び37 で測定した。

【 0 1 1 9 】

以下の表では、親酵素(配列番号 2)及び問題の変異体において、温度依存的な活性、並びに、37 での活性に対する25 での活性の比率%を示している。



変異体	NU/mg 25℃	NU/mg 37℃	NU (25℃) / NU (37℃)
Δ (D183-G184) +M323L	3049	10202	30%
Δ (D183-G184) +M323L +R181S	18695	36436	51%

### C. 配列番号4の配列の変異体における アミラーゼ活性

pH7.3 に合わせた50mM Britton Robinson 緩衝液による各変異体溶液を用いて、前記のPhadebas検査によって測定を行った。試料中の活性を、50mM Britton Robinson 緩衝液(pH7.3)を用いて37℃で、そして50mM CAPS 緩衝液(pH10.5)を用いて60℃で測定した。

#### 【0120】

以下の表では、親酵素(配列番号4)及び問題の変異体において、温度依存的な活性、並びに、60℃での活性に対する37℃での活性の比率%を示している。

変異体	NU/mg 37℃	NU/mg 60℃	NU (37℃) /NU (60℃)
Termamyl	7400	4350	170%
Q264S	10000	4650	215%

### 実施例10

#### BAN:1-300/Termamyl:301-483から成る親のハイブリッド アミラーゼに由来する変異体の構築

プラスミドpTVB191は、BAN:1-300/Termamyl:301-483からなるハイブリッド アミラーゼをコードする遺伝子と共に、バチルス・ズブチリス内で機能する複製起点、及びクロラムフェニコール耐性を付与するcat 遺伝子を含んでいる。

#### 【0121】

変異体BM4 (F290E)を、プラスミドpTVB191を鋳型としてメガプライマー法(Sarkar and Sommer, 1990)によって構築した。

プライマー p 1 (配列番号52)及び変異生成オリゴヌクレオチドbm4 (配列番号47)を用いて標準条件下でPCRを行って、444bp断片を増幅した。この断片をアガロースゲルから精製して、これをメガプライマーとして、プライマー p 2 (配列番号53)と共に用いて2回目のPCRを行い、531bp断片を得た。この断片を制限エンドヌクレアーゼHindIII及びTth111Iによって切断した。これによって生じた389bp断片を、同酵素で切断したプラスミドpTVB191内に連結した。できたプラスミドによってバチルス・ズブチリスSHA273を形質転換した。クロラムフェニコール及び不溶性でんぷんを含有したプレート上で増殖させることによって、クロラムフェニコール耐性クローンを選択した。そのプレートをヨウ素蒸気で染色した後、染色輪を形成したクローンを選択することによって、活性 アミラーゼを発現するクローンを単離した。DNA配列の決定によって、導入された変異の存在を確認した。

#### 【0122】

変異体BM5 (F290K), BM6 (F290A), BM8 (Q360E)及びBM11 (N102D)を同様にして構築した。それらの構築の詳細を以下に記す。

変異体: BM5 (F290K)

変異生成オリゴヌクレオチド: bm5 (配列番号48)

プライマー(1回目 PCR): p 1 (配列番号52)

生成断片サイズ: 444bp

プライマー(2回目 PCR): p 2 (配列番号53)

制限エンドヌクレアーゼ: HindIII, Tth111I

切断断片サイズ: 389bp

## 【 0 1 2 3 】

変異体：BM6 (F290A)  
 変異生成オリゴヌクレオチド：bm6 (配列番号49)  
 プライマー (1回目 PCR)：p 1 (配列番号52)  
 生成断片サイズ：444bp  
 プライマー (2回目 PCR)：p 2 (配列番号53)  
 制限エンドヌクレアーゼ：HindIII, Tth111I  
 切断断片サイズ：389bp

10

## 【 0 1 2 4 】

変異体：BM8 (Q360E)  
 変異生成オリゴヌクレオチド：bm8 (配列番号50)  
 プライマー (1回目 PCR)：p 1 (配列番号52)  
 生成断片サイズ：230bp  
 プライマー (2回目 PCR)：p 2 (配列番号53)  
 制限エンドヌクレアーゼ：HindIII, Tth111I  
 切断断片サイズ：389bp

## 【 0 1 2 5 】

変異体：BM11 (N102D)  
 変異生成オリゴヌクレオチド：bm11 (配列番号51)  
 プライマー (1回目 PCR)：p 3 (配列番号54)  
 生成断片サイズ：577  
 プライマー (2回目 PCR)：p 4 (配列番号55)  
 制限エンドヌクレアーゼ：HindIII, PvuI  
 切断断片サイズ：576

20

変異生成オリゴヌクレオチド

bm4 (配列番号47)：F290E  
 プライマー 5' GTG TTT GAC GTC CCG CTT CAT GAG AAT TTA CAG G

30

bm5 (配列番号48)：F290K  
 プライマー 5' GTG TTT GAC GTC CCG CTT CAT AAG AAT TTA CAG G

bm6 (配列番号49)：F290A  
 プライマー 5' GTG TTT GAC GTC CCG CTT CAT GCC AAT TTA CAG G

bm8 (配列番号50)：Q360E  
 プライマー 5' AGG GAA TCC GGA TAC CCT GAG GTT TTC TAC GG

bm11 (配列番号51)：N102D  
 プライマー 5' GAT GTG GTT TTG GAT CAT AAG GCC GGC GCT GAT G

その他のプライマー

p 1：5' CTG TTA TTA ATG CCG CCA AAC C (配列番号52)  
 p 2：5' G GAA AAG AAA TGT TTA CGG TTG CG (配列番号53)  
 p 3：5' G AAA TGA AGC GGA ACA TCA AAC ACG (配列番号54)  
 p 4：5' GTA TGA TTT AGG AGA ATT CC (配列番号55)

40

## 実施例11

BAN:1-300/Termamyl:301-483から成る親のハイブリッド アミラーゼに由来する変異体におけるアルカリpHでの アミラーゼ活性

各酵素溶液を用いて、Phadebas検査 (前記) によって測定を行った。NaOHによって指示したpHに合わせた50mM Britton-Robinson 緩衝液中で30 にて15分間インキュベーションした後に、活性を測定した。

NU / mg酵素

50

pH	wt	Q360E	F290A	F290K	F290E	N102D
8.0	5300	7800	8300	4200	6600	6200
9.0	1600	2700	3400	2100	1900	1900

## 【 0 1 2 6 】

## 引用文献

- Klein, C., et al., *Biochemistry* 1992, 31, 8740-8746,
- Mizuno, H., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 234, 1282-1283,
- Chang, C., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 229, 235-238,
- Larson, S.B., *J. Mol. Biol.* (1994) 235, 1560-1584,
- Lawson, C.L., *J. Mol. Biol.* (1994) 236, 590-600, 10
- Qian, M., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 231, 785-799,
- Brady, R.L., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 527-535,
- Swift, H.J., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 535-544
- A. Kadziola, Ph.D. Thesis: "An alpha-amylase from Barley and its Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray Crystallography", Department of Chemistry University of Copenhagen 1993
- MacGregor, E.A., *Food Hydrocolloids*, 1987, Vol.1, No. 5-6, p. B. Diderichsen and L. Christiansen, Cloning of a maltogenic -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS Microbiol. letters*: 56: pp. 53-60 (1988)
- Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition (1989), Blackwell Scientific 20 Publications,
- Sambrook et al., *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989
- S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869
- Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, pp. 801-805.
- R.K. Saiki et al., *Science* 239, 1988, pp. 487-491.
- Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2 : 646-639)
- Nelson and Long, *Analytical Biochemistry* 180, 1989, pp. 147-151
- Hunkapiller et al., 1984, *Nature* 310 : 105-111
- R. Higuchi, B. Krummel, and R.K. Saiki (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 16 : 7351-7367. 30
- Dubnau et al., 1971, *J. Mol. Biol.* 56, pp. 209-221.
- Gryczan et al., 1978, *J. Bacteriol.* 134, pp. 318-329.
- S.D. Erlich, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, pp. 1680-1682.
- Boel et al., 1990, *Biochemistry* 29, pp. 6244-6249.

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 6つの親のTermamyl様 アミラーゼのアミノ酸配列の整列を示す。左端の数字は、以下の通り、各アミノ酸配列を示す： 40

- 1 : 配列番号 2
- 2 : Kaoamyl
- 3 : 配列番号 1
- 4 : 配列番号 5
- 5 : 配列番号 4
- 6 : 配列番号 3

【図 2】 SP722 (配列番号 2) (pH 9 における)、及び *B. licheniformis* アミラーゼ (配列番号 4) (pH 7.3 における) の温度活性曲線を示す。

【図 3】 SP690 (配列番号 1)、SP722 (配列番号 2)、及び *B. licheniformis* アミラーゼ (配列番号 4) の、pH 10 における温度活性曲線を示す。 50

【図4】 5つの アミラーゼのアミノ酸配列の整列を示す。左端の数字は、以下の通り、各アミノ酸配列を示す：

- 1：マウス アミラーゼ ( amyp\_mouse )
- 2：ラット アミラーゼ ( amyp\_rat )
- 3：ブタ膵臓 アミラーゼ ( PPA ) ( amyp\_pig )
- 4：ヒト アミラーゼ ( amyp\_human )
- 5：A. haloplanctis アミラーゼ ( AHA ) ( amy\_altha )

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: NOVO NORDISK A/S
- (B) STREET: Novo Alle
- (C) CITY: DK-2880 Bagsvaerd
- (E) COUNTRY: Denmark
- (F) POSTAL CODE (ZIP): DK-2880
- (G) TELEPHONE: +45 44 44 88 88
- (H) TELEFAX: +45 44 49 32 56

(ii) TITLE OF INVENTION:  $\alpha$ -amylase mutants

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 46

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 485 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

```

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1          5          10          15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
20          25          30

Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35          40          45

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50          55          60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65          70          75          80

Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
85          90          95

Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
100         105         110

Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
115         120         125

Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
130         135         140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145         150         155         160

```

His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys  
 165 170 175  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205  
 Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr  
 245 250 255  
 Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320  
 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380  
 Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr  
 385 390 395 400  
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430  
 Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445  
 Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

10

20

30

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480

Val Trp Val Lys Gln  
 485

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 485 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser  
 20 25 30

Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80

Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly  
 85 90 95

Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110

Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
 115 120 125

Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160

His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg  
 165 170 175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190

Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205

Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr  
 210 215 220

Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His

10

20

30

40

225                      230                      235                      240  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala  
                                  245                      250                      255  
 Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
                                  260                      265                      270  
 Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
                                  275                      280                      285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
                                  290                      295                      300  
 Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys  
 305                                   310                      315                      320  
 His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
                                  325                      330                      335  
 Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
                                  340                      345                      350  
 Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
                                  355                      360                      365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala  
                                  370                      375                      380  
 Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr  
 385                                   390                      395                      400  
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
                                  405                      410                      415  
 Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
                                  420                      425                      430  
 Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly  
                                  435                      440                      445  
 Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile  
                                  450                      455                      460  
 Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465                                   470                      475                      480  
 Ile Trp Val Lys Arg  
                                  485

10

20

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 514 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: peptide

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

40

Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn  
 20 25 30  
 Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys  
 35 40 45  
 Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp  
 50 55 60  
 Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Ala Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met  
 85 90 95  
 Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly  
 100 105 110  
 Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln  
 115 120 125  
 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe  
 130 135 140  
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr  
 165 170 175  
 Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu  
 180 185 190  
 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His  
 195 200 205  
 Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Ser Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn  
 210 215 220  
 Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Asp Val Arg Ser Gln Thr Gly  
 245 250 255  
 Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys  
 260 265 270  
 Leu His Asn Tyr Ile Met Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp  
 275 280 285  
 Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Thr  
 290 295 300

10

20

30



Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln  
 325 330 335  
 Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val  
 405 410 415  
 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430  
 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val  
 435 440 445  
 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp  
 465 470 475 480  
 Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Trp Ser Ile Thr Thr  
 485 490 495  
 Arg Pro Trp Thr Asp Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val  
 500 505 510  
 Ala Trp

10

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 483 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: protein

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu  
 20 25 30  
 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly

30

40

35	40	45
Thr Ser Gln Ala Asp Val	Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp	Leu Tyr Asp Leu
50	55	60
Gly Glu Phe His Gln Lys	Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr	Gly Thr Lys
65	70	80
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile	Lys Ser Leu His Ser Arg Asp	Ile Asn
85	90	95
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile	Asn His Lys Gly Gly Ala Asp	Ala Thr
100	105	110
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu	Val Asp Pro Ala Asp Arg	Asn Arg Val
115	120	125
Ile Ser Gly Glu His Leu Ile	Lys Ala Trp Thr His Phe His	Phe Pro
130	135	140
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser	Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr	His Phe
145	150	160
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu	Ser Arg Lys Leu Asn Arg	Ile Tyr Lys
165	170	175
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp	Trp Glu Val Ser Asn Glu	Asn Gly Asn
180	185	190
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala	Asp Ile Asp Tyr Asp His	Pro Asp Val
195	200	205
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp	Gly Thr Trp Tyr Ala Asn	Glu Leu Gln
210	215	220
Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp	Ala Val Lys His Ile Lys	Phe Ser Phe
225	230	240
Leu Arg Asp Trp Val Asn His	Val Arg Glu Lys Thr Gly	Lys Glu Met
245	250	255
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp	Gln Asn Asp Leu Gly Ala	Leu Glu Asn
260	265	270
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe	Asn His Ser Val Phe Asp	Val Pro Leu
275	280	285
His Tyr Gln Phe His Ala Ala	Ser Thr Gln Gly Gly Gly	Tyr Asp Met
290	295	300
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr	Val Val Ser Lys His Pro	Leu Lys Ser
305	310	320
Val Thr Phe Val Asp Asn His	Asp Thr Gln Pro Gly Gln	Ser Leu Glu
325	330	335
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe	Lys Pro Leu Ala Tyr Ala	Phe Ile Leu
340	345	350

10

20

30

40

Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly  
 355 360 365

Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile  
 370 375 380

Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His  
 385 390 395 400

Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp  
 405 410 415

Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430

Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr  
 435 440 445

Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser  
 450 455 460

Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr  
 465 470 475 480

Val Gln Arg

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 480 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp  
 1 5 10 15

Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp  
 20 25 30

Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser  
 35 40 45

Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu  
 50 55 60

Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu  
 65 70 75 80

Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr  
 85 90 95

Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp  
 100 105 110

30

Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser  
 115 120 125  
 Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg  
 130 135 140  
 Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg  
 165 170 175  
 Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn  
 180 185 190  
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val  
 195 200 205  
 Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met  
 245 250 255  
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn  
 260 265 270  
 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu  
 275 280 285  
 His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met  
 290 295 300  
 Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala  
 305 310 315 320  
 Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu  
 325 330 335  
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu  
 340 345 350  
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly  
 355 360 365  
 Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile  
 370 375 380  
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp  
 405 410 415  
 Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro

10

20

30

40

420                      425                      430  
 Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr  
     435                      440                      445  
 Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser  
     450                      455                      460  
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr  
     465                      470                      475                      480

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 485 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: peptide

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1                      5                      10                      15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser  
     20                      25                      30  
 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
     35                      40                      45  
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
     50                      55                      60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
     65                      70                      75                      80  
 Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly  
     85                      90                      95  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
     100                      105                      110  
 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
     115                      120                      125  
 Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp  
     130                      135                      140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
     145                      150                      155                      160  
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg  
     165                      170                      175  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
     180                      185                      190

10

20

30

40

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met  
 195 200 205  
 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala  
 245 250 255  
 Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Asn Tyr Asp Met Arg Asn Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg  
 305 310 315 320  
 His Pro Ser His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Arg Ser  
 370 375 380  
 Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys  
 385 390 395 400  
 Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430  
 Gly Ala Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445  
 Gln Val Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460  
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 Ile Trp Val Asn Lys  
 485

10

20

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 485 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

```

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1           5           10           15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
          20           25           30

Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
          35           40           45

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
          50           55           60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65           70           75           80

Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
          85           90           95

Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
          100          105          110

Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
          115          120          125

Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
          130          135          140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145          150          155          160

His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
          165          170          175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
          180          185          190

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
          195          200          205

Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
210          215          220

Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225          230          235          240

Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
          245          250          255

```

10

20

30

Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320  
 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380  
 Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr  
 385 390 395 400  
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430  
 Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445  
 Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460  
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 Val Trp Val Lys Gln  
 485

10

20

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 485 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser

40



20	25	30
Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp 35 40 45		
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr 50 55 60		
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly 65 70 75 80		
Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly 85 90 95		
Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp 100 105 110		
Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn 115 120 125		
Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp 130 135 140		
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr 145 150 155 160		
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg 165 170 175		
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp 180 185 190		
Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met 195 200 205		
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr 210 215 220		
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His 225 230 235 240		
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala 245 250 255		
Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu 260 265 270		
Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val 275 280 285		
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly 290 295 300		
Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys 305 310 315 320		
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro 325 330 335		

10

20

30

40

Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala  
 370 375 380  
 Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr  
 385 390 395 400  
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430  
 Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445  
 Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460  
 Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 Ile Trp Val Lys Arg  
 485

10

20

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    - (A) LENGTH: 1455 base pairs
    - (B) TYPE: nucleic acid
    - (C) STRANDEDNESS: single
    - (D) TOPOLOGY: linear
  - (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
  - (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

CATCATAATG GAACAAATGG TACTATGATG CAATATTTTCG AATGGTATTT GCCAAATGAC 60  
 GGGAAATCATT GGAACAGGTT GAGGGATGAC GCAGCTAACT TAAAGAGTAA AGGGATAACA 120  
 GCTGTATGGA TCCCACCTGC ATGGAAGGGG ACTTCCCAGA ATGATGTAGG TTATGGAGCC 180  
 TATGATTAT ATGATCTTGG AGAGTTTAAAC CAGAAGGGGA CGGTTCGTAC AAAATATGGA 240  
 ACACGCAACC AGCTACAGGC TGCGGTGACC TCTTTAAAAA ATAACGGCAT TCAGGTATAT 300  
 GGTGATGTCC TCATGAATCA TAAAGGTGGA GCAGATGGTA CGGAAATTGT AAATGCGGTA 360  
 GAAGTGAATC GGAGCAACCG AAACCAGGAA ACCTCAGGAG AGTATGCAAT AGAAGCGTGG 420  
 ACAAAGTTTG ATTTTCCTGG AAGAGGAAAT AACCATTCCA GCTTTAAGTG GCGCTGGTAT 480  
 CATTTTGATG GGACAGATTG GGATCAGTCA CGCCAGCTTC AAAACAAAAT ATATAAATTC 540

30

AGGGGAACAG GCAAGGCCTG GGACTGGGAA GTCGATACAG AGAATGGCAA CTATGACTAT 600  
 CTTATGTATG CAGACGTGGA TATGGATCAC CCAGAAGTAA TACATGAACCT TAGAAACTGG 660  
 GGAGTGTGGT ATACGAATAC ACTGAACCTT GATGGATTGA GAATAGATGC AGTGAAACAT 720  
 ATAAAATATA GCTTTACGAG AGATTGGCTT ACACATGTGC GTAACACCAC AGGTAAACCA 780  
 ATGTTTGCAG TGGCTGAGTT TTGGAAAAAT GACCTTGGTG CAATGAAAA CTATTGAAT 840  
 AAAACAAGTT GGAATCACTC GGTGTTTGAT GTTCCTCTCC ACTATAATTT GTACAATGCA 900  
 TCTAATAGCG GTGGTTATTA TGATATGAGA AATATTTTAA ATGGTTCTGT GGTGCAAAAA 960  
 CATCCAACAC ATGCCGTTAC TTTTGTGAT AACCATGATT CTCAGCCCGG GGAAGCATTG 1020  
 GAATCCTTTG TTCAACAATG GTTTAAACCA CTTGCATATG CATTGGTTCT GACAAGGGAA 1080  
 CAAGGTTATC CTTCCGTATT TTATGGGGAT TACTACGTA TCCCAACCCA TGGTGTTCG 1140  
 GCTATGAAAT CTAAAAATA CCCTCTTCTG CAGGCACGTC AAACCTTTGC CTATGGTACG 1200  
 CAGCATGATT ACTTTGATCA TCATGATATT ATCGGTTGGA CAAGAGAGGG AAATAGCTCC 1260  
 CATCCAAATT CAGGCCCTGC CACCATTATG TCAGATGGTC CAGGTGGTAA CAAATGGATG 1320  
 TATGTGGGGA AAAATAAAGC GGGACAAGTT TGGAGAGATA TTACCGGAAA TAGGACAGGC 1380  
 ACCGTCACAA TTAATGCAGA CGGATGGGGT AATTTCTCTG TTAATGGAGG GTCCGTTTCG 1440  
 GTTTGGGTGA AGCAA 1455

10

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1455 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

CATCATAATG GGACAAATGG GACGATGATG CAATACTTTG AATGGCACTT GCCTAATGAT 60  
 GGGAATCACT GGAATAGATT AAGAGATGAT GCTAGTAATC TAAGAAATAG AGGTATAACC 120  
 GCTATTTGGA TTCCGCCTGC CTGGAAAGGG ACTTCGCAA ATGATGTGGG GTATGGAGCC 180  
 TATGATCTTT ATGATTTAGG GGAATTTAAT CAAAAGGGGA CGGTTTCGTAC TAAGTATGGG 240  
 ACACGTAGTC AATTGGAGTC TGCCATCCAT GCTTTAAAGA ATAATGGCGT TCAAGTTTAT 300  
 GGGGATGTAG TGATGAACCA TAAAGGAGGA GCTGATGCTA CAGAAAACGT TCTTGCTGTC 360  
 GAGGTGAATC CAAATAACCG GAATCAAGAA ATATCTGGGG ACTACACAAT TGAGGCTTGG 420  
 ACTAAGTTT ATTTTCCAGG GAGGGGTAAT ACATACTCAG ACTTTAAATG GCGTTGGTAT 480  
 CATTTCGATG GTGTAGATTG GGATCAATCA CGACAATTCC AAAATCGTAT CTACAAATTC 540

30

40

CGAGGTGATG GTAAGGCATG GGATTGGGAA GTAGATTCGG AAAATGGAAA TTATGATTAT 600  
 TTAATGTATG CAGATSTAGA TATGGATCAT CCGGAGGTAG TAAATGAGCT TAGAAGATGG 660  
 GGAGAATGGT ATACAAATAC ATTAAATCTT GATGGATTTA GGATCGATGC GGTGAAGCAT 720  
 ATTAAATATA GCTTTACACG TGATTGGTGT ACCCATGTAA GAAACGCAAC GGGAAAAGAA 780  
 ATGTTTGCTG TTGCTGAATT TTGAAAAAT GATTTAGGTG CCTTGGAGAA CTATTTAAAT 840  
 AAAACAACT GGAATCATTC TGTCTTTGAT GTCCCCCTTC ATTATAATCT TTATAACGCG 900  
 TCAAATAGTG GAGGCAACTA TGACATGGCA AAACCTCTTA ATGGAACGGT TGTCAAAAG 960  
 CATCCAATGC ATGCCGTAAC TTTTGTGGAT AATCACGATT CTCAACCTGG GGAATCATT 1020  
 GAATCATTTG TACAAGAATG GTTTAAGCCA CTTGCTTATG CGCTTATTTT AACAAGAGAA 1080  
 CAAGGCTATC CCTCTGTCTT CTATGGTGAC TACTATGGAA TTCCAACACA TAGTGTCCCA 1140  
 GCAATGAAAG CCAAGATTGA TCCAATCTTA GAGGCGCGTC AAAATTTTGC ATATGGAACA 1200  
 CAACATGATT ATTTTGACCA TCATAATATA ATCGGATGGA CACGTGAAGG AAATACCACG 1260  
 CATCCAATT CAGGACTTGC GACTATCATG TCGGATGGGC CAGGGGGAGA GAAATGGATG 1320  
 TACGTAGGGC AAAATAAAGC AGGTCAAGTT TGGCATGACA TAACTGGAAG TAAACCAGGA 1380  
 ACAGTTACGA TCAATGCAGA TGGATGGGCT AATTTTTCAG TAAATGGAGG ATCTGTTTCC 1440  
 ATTTGGGTGA AACGA 1455

10

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1548 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

GCCGCACCGT TTAACGGCAC CATGATGCAG TATTTTGAAT GGTACTTGCC GGATGATGGC 60  
 ACGTTATGGA CCAAGTGGC CAATGAAGCC AACCACTTAT CCAGCCTTGG CATCACCGCT 120  
 CTTTGGCTGC CGCCCGCTTA CAAAGGAACA AGCCGAGCG ACGTAGGGTA CGGAGTATAC 180  
 GACTTGTATG ACCTCGGCGA ATTCAATCAA AAAGGGACCG TCCGCACAAA ATACGGAACA 240  
 AAAGCTCAAT ATCTTCAAGC CATTCAAGCC GCCACGCGG CTGGAATGCA AGTGATCGCC 300  
 GATGTCGTGT TCGACCATAA AGGCGGCGCT GACGGCACGG AATGGGTGGA CGCCGTCGAA 360  
 GTCAATCCGT CCGACCGCAA CCAAGAAATC TCGGGCACCT ATCAAATCCA AGCATGGACG 420  
 AAATTTGATT TTCCCGGGCG GGGCAACACC TACTCCAGCT TTAAGTGGCG CTGGTACCAT 480

30

TTTGACGGCG TTGATTGGGA CGAAAGCCGA AAATTGAGCC GCATTTACAA ATTCCGCGGC 540  
 ATCGGCAAAG CGTGGGATTG GGAAGTAGAC ACGGAAAACG GAAACTATGA CTACTTAATG 600  
 TATGCCGACC TTGATATGGA TCATCCCGAA GTCGTGACCG AGCTGAAAAA CTGGGGGAAA 660  
 TGGTATGTCA ACACAACGAA CATTGATGGG TTCCGGCTTG ATGCCGTCAA GCATATTAAG 720  
 TTCAGTTTTT TTCTGATTG GTTGTCGTAT GTGCGTTCTC AGACTGGCAA GCCGCTATTT 780  
 ACCGTCGGGG AATATTGGAG CTATGACATC AACAGTTGC ACAATTACAT TACGAAAACA 840  
 GACGGAACGA TGTCTTTGTT TGATGCCCCG TTACACAACA AATTTTATAC CGCTTCCAAA 900  
 TCAGGGGGCG CATTGATAT GCGCACGTTA ATGACCAATA CTCTCATGAA AGATCAACCG 960  
 ACATTGGCCG TCACCTTCGT TGATAATCAT GACACCGAAC CCGGCCAAGC GCTGCAGTCA 1020  
 TGGGTCGACC CATGGTTCAA ACCGTTGGCT TACGCCITTA TTCTAACTCG GCAGGAAGGA 1080  
 TACCCGTGCG TCTTTTATGG TGACTATTAT GGCATTCCAC AATATAACAT TCCTTCGCTG 1140  
 AAAAGCAAAA TCGATCCGCT CCTCATCGCG CGCAGGGATT ATGCTTACGG AACGCAACAT 1200  
 GATTATCTTG ATCACTCCGA CATCATCGGG TGGACAAGGG AAGGGGGCAC TGAAAAACCA 1260  
 GGATCCGGAC TGGCCGCACT GATCACCAGT GGGCCGGGAG GAAGCAAATG GATGTACGTT 1320  
 GGCARAACAAC ACGCTGGAAA AGTGTCTAT GACCTTACCG GCAACCGGAG TGACACCGTC 1380  
 ACCATCAACA GTGATGGATG GGGGGAATTC AAAGTCAATG GCGGTTGCGT TTCGGTTTGG 1440  
 GTTCCTAGAA AAACGACCGT TTCTACCATC GTCGGGCCGA TCACAACCCG ACCGTGGACT 1500  
 GGTGAATTCG TCCGTTGGAC CGAACCACGG TTGGTGGCAT GGCCTTGA 1548

10

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1920 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 421..1872

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

CGGAAGATTG GAAGTACAAA AATAAGCAAA AGATTGTCAA TCATGTCATG AGCCATGCGG 60  
 GAGACGGAAA AATCGTCTTA ATGCACGATA TTTATGCAAC GTTCGCAGAT GCTGCTGAAG 120  
 AGATTATTAA AAAGCTGAAA GCAAAAGGCT ATCAATTGGT AACTGTATCT CAGCTTGAAG 180  
 AAGTGAAGAA GCAGAGAGGC TATTGAATAA ATGAGTAGAA GCGCCATATC GGCGCTTTTC 240

30

TTTTGGAAGA AAATATAGGG AAAATGGTAC TTGTTAAAAA TTCGGAATAT TTATACAACA	300
TCATATGTTT CACATTGAAA GGGGAGGAGA ATCATGAAC AACAAAAACG GCTTTACGCC	360
CGATTGCTGA CGCTGTTATT TCGCTCATC TTCTTGCTGC CTCATTCTGC AGCAGCGGCG	420
GCA AAT CTT AAT GGG ACG CTG ATG CAG TAT TTT GAA TGG TAC ATG CCC	468
AAT GAC GGC CAA CAT TGG AGG CGT TTG CAA AAC GAC TCG GCA TAT TTG	516
GCT GAA CAC GGT ATT ACT GCC GTC TGG ATT CCC CCG GCA TAT AAG GGA	564
ACG AGC CAA GCG GAT GTG GGC TAC GGT GCT TAC GAC CTT TAT GAT TTA	612
GGG GAG TTT CAT CAA AAA GGG ACG GTT CGG ACA AAG TAC GGC ACA AAA	660
GGA GAG CTG CAA TCT GCG ATC AAA AGT CTT CAT TCC CGC GAC ATT AAC	708
GTT TAC GGG GAT GTG GTC ATC AAC CAC AAA GGC GGC GCT GAT GCG ACC	756
GAA GAT GTA ACC GCG GTT GAA GTC GAT CCC GCT GAC CGC AAC CGC GTA	804
ATT TCA GGA GAA CAC CTA ATT AAA GCC TGG ACA CAT TTT CAT TTT CCG	852
GGG CGC GGC AGC ACA TAC AGC GAT TTT AAA TGG CAT TGG TAC CAT TTT	900
GAC GGA ACC GAT TGG GAC GAG TCC CGA AAG CTG AAC CGC ATC TAT AAG	948
TTT CAA GGA AAG GCT TGG GAT TGG GAA GTT TCC AAT GAA AAC GGC AAC	996
TAT GAT TAT TTG ATG TAT GCC GAC ATC GAT TAT GAC CAT CCT GAT GTC	1044
GCA GCA GAA ATT AAG AGA TGG GGC ACT TGG TAT GCC AAT GAA CTG CAA	1092
TTG GAC GGT TTC CGT CTT GAT GCT GTC AAA CAC ATT AAA TTT TCT TTT	1140
TTG CGG GAT TGG GTT AAT CAT GTC AGG GAA AAA ACG GGG AAG GAA ATG	1188
TTT ACG GTA GCT GAA TAT TGG CAG AAT GAC TTG GGC GCG CTG GAA AAC	1236
TAT TTG AAC AAA ACA AAT TTT AAT CAT TCA GTG TTT GAC GTG CCG CTT	1284
CAT TAT CAG TTC CAT GCT GCA TCG ACA CAG GGA GGC GGC TAT GAT ATG	1332
AGG AAA TTG CTG AAC GGT ACG GTC GTT TCC AAG CAT CCG TTG AAA TCG	1380
GTT ACA TTT GTC GAT AAC CAT GAT ACA CAG CCG GGG CAA TCG CTT GAG	1428
TCG ACT GTC CAA ACA TGG TTT AAG CCG CTT GCT TAC GCT TTT ATT CTC	1476
ACA AGG GAA TCT GGA TAC CCT CAG GTT TTC TAC GGG GAT ATG TAC GGG	1524
ACG AAA GGA GAC TCC CAG CGC GAA ATT CCT GCC TTG AAA CAC AAA ATT	1572
GAA CCG ATC TTA AAA GCG AGA AAA CAG TAT GCG TAC GGA GCA CAG CAT	1620
GAT TAT TTC GAC CAC CAT GAC ATT GTC GGC TGG ACA AGG GAA GGC GAC	1668

10

20

30

AGC TCG GTT GCA AAT TCA GGT TTG GCG GCA TTA ATA ACA GAC GGA CCC	1716
GGT GGG GCA AAG CGA ATG TAT GTC GGC CGG CAA AAC GCC GGT GAG ACA	1764
TGG CAT GAC ATT ACC GGA AAC CGT TCG GAG CCG GTT GTC ATC AAT TCG	1812
GAA GGC TGG GGA GAG TTT CAC GTA AAC GGC GGG TCG GTT TCA ATT TAT	1860
GTT CAA AGA TAG AAGAGCAGAG AGGACGGATT TCCTGAAGGA AATCCGTTTT	1912
TTTATTTT	1920

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2084 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 343..1794

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

GCCCCGCACA TACGAAAAGA CTGGCTGAAA ACATTGAGCC TTTGATGACT GATGATTGG	60
CTGAAGAAGT GGATCGATTG TTTGAGAAAA GAAGAAGACC ATAAAAATAC CTTGTCTGTC	120
ATCAGACAGG GTATTTTTTA TGCTGTCCAG ACTGTCCGCT GTGTAAAAAT AAGGAATAAA	180
GGGGGGTTGT TATTATTTTA CTGATATGTA AAATATAATT TGTATAAGAA AATGAGAGGG	240
AGAGGAAACA TGATTCAAAA ACGAAAGCGG ACAGTTTCGT TCAGACTTGT GCTTATGTGC	300
ACGCTGTTAT TTGTCAGTTT GCCGATTACA AAAACATCAG CC GTA AAT GGC ACG	354
CTG ATG CAG TAT TTT GAA TGG TAT ACG CCG AAC GAC GGC CAG CAT TGG	402
AAA CGA TTG CAG AAT GAT GCG GAA CAT TTA TCG GAT ATC GGA ATC ACT	450
GCC GTC TGG ATT CCT CCC GCA TAC AAA GGA TTG AGC CAA TCC GAT AAC	498
GGA TAC GGA CCT TAT GAT TTG TAT GAT TTA GGA GAA TTC CAG CAA AAA	546
GGG ACG GTC AGA ACG AAA TAC GGC ACA AAA TCA GAG CTT CAA GAT GCG	594
ATC GGC TCA CTG CAT TCC CGG AAC GTC CAA GTA TAC GGA GAT GTG GTT	642
TTG AAT CAT AAG GCT GGT GCT GAT GCA ACA GAA GAT GTA ACT GCC GTC	690
GAA GTC AAT CCG GCC AAT AGA AAT CAG GAA ACT TCG GAG GAA TAT CAA	738
ATC AAA GCG TGG ACG GAT TTT CGT TTT CCG GGC CGT GGA AAC ACG TAC	786
AGT GAT TTT AAA TGG CAT TGG TAT CAT TTC GAC GGA GCG GAC TGG GAT	834
GAA TCC CGG AAG ATC AGC CGC ATC TTT AAG TTT CGT GGG GAA GGA AAA	882

10

20

30

40

GCG TGG GAT TGG GAA GTA TCA AGT GAA AAC GGC AAC TAT GAC TAT TTA	930
ATG TAT GCT GAT GTT GAC TAC GAC CAC CCT GAT GTC GTG GCA GAG ACA	978
AAA AAA TGG GGT ATC TGG TAT GCG AAT GAA CTG TCA TTA GAC GGC TTC	1026
CGT ATT GAT GCC GCC AAA CAT ATT AAA TTT TCA TTT CTG CGT GAT TGG	1074
GTT CAG GCG GTC AGA CAG GCG ACG GGA AAA GAA ATG TTT ACG GTT GCG	1122
GAG TAT TGG CAG AAT AAT GCC GGG AAA CTC GAA AAC TAC TTG AAT AAA	1170
ACA AGC TTT AAT CAA TCC GTG TTT GAT GTT CCG CTT CAT TTC AAT TTA	1218
CAG GCG GCT TCC TCA CAA GGA GGC GGA TAT GAT ATG AGG CGT TTG CTG	1266
GAC GGT ACC GTT GTG TCC AGG CAT CCG GAA AAG GCG GTT ACA TTT GTT	1314
GAA AAT CAT GAC ACA CAG CCG GGA CAG TCA TTG GAA TCG ACA GTC CAA	1362
ACT TGG TTT AAA CCG CTT GCA TAC GCC TTT ATT TTG ACA AGA GAA TCC	1410
GGT TAT CCT CAG GTG TTC TAT GGG GAT ATG TAC GGG ACA AAA GGG ACA	1458
TCG CCA AAG GAA ATT CCC TCA CTG AAA GAT AAT ATA GAG CCG ATT TTA	1506
AAA GCG CGT AAG GAG TAC GCA TAC GGG CCC CAG CAC GAT TAT ATT GAC	1554
CAC CCG GAT GTG ATC GGA TGG ACG AGG GAA GGT GAC AGC TCC GCC GCC	1602
AAA TCA GGT TTG GCC GCT TTA ATC ACG GAC GGA CCC GGC GGA TCA AAG	1650
CGG ATG TAT GCC GGC CTG AAA AAT GCC GGC GAG ACA TGG TAT GAC ATA	1698
ACG GGC AAC CGT TCA GAT ACT GTA AAA ATC GGA TCT GAC GGC TGG GGA	1746
GAG TTT CAT GTA AAC GAT GGG TCC GTC TCC ATT TAT GTT CAG AAA TAA	1794
GGTAATAAAA AAACACCTCC AAGCTGAGTG CGGGTATCAG CTGGAGGTG CGTTTATTTT	1854
TTCAGCCGTA TGACAAGGTC GGCATCAGGT GTGACAAATA CGGTATGCTG GCTGTCATAG	1914
GTGACAAATC CGGGTTTTGC GCCGTTTGGC TTTTTCACAT GTCTGATTTT TGTATAATCA	1974
ACAGGCACGG AGCCGGAATC TTTCGCCTTG GAAAAATAAG CGGCGATCGT AGCTGCTTCC	2034
AATATGGATT GTTCATCGGG ATCGCTGCTT TTAATCACAA CGTGGGATCC	2084

10

20

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1455 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:



CATCATAATG GAACAAATGG TACTATGATG CAATATTTTCG AATGGTATTT GCCAAATGAC 60  
 GGGAAATCATT GGAACAGGTT GAGGGATGAC GCAGCTAACT TAAAGAGTAA AGGGATAACA 120  
 GCTGTATGGA TCCCACCTGC ATGGAAGGGG ACTTCCCAGA ATGATGTAGG TTATGGAGCC 180  
 TATGATTTAT ATGATCTTGG AGAGTTTAAAC CAGAAGGGGA CGGTTCGTAC AAAATATGGA 240  
 ACACGCAACC AGCTACAGGC TCGGGTGACC TCTTTAAAAA ATAACGGCAT TCAGGTATAT 300  
 GGTGATGTCG TCATGAATCA TAAAGGTGGA GCAGATGGTA CGGAAATTGT AAATGCGGTA 360  
 GAAGTGAATC GGAGCAACCG AAACCAGGAA ACCTCAGGAG AGTATGCAAT AGAAGCGTGG 420  
 ACAAAGTTTG ATTTTCCTGG AAGAGGAAAT AACCATTCCA GCTTTAAGTG GCGCTGGTAT 480  
 CATTTTGATG GGACAGATTG GGATCAGTCA CGCCAGCTTC AAAACAAAAT ATATAAATTC 540  
 AGGGGAACAG GCAAGGCCCTG GGAAGTGGAA GTCGATACAG AGAATGGCAA CTATGACTAT 600  
 CTTATGTATG CAGACGTGGA TATGGATCAC CCAGAAGTAA TACATGAACT TAGAAACTGG 660  
 GGAGTGTGGT ATACGAATAC ACTGAACCTT GATGGATTTA GAATAGATGC AGTGAAACAT 720  
 ATAAAATATA GCITTACGAG AGATTGGCTT ACACATGTGC GTAACACCAC AGGTAAACCA 780  
 ATGTTTGAGT TGGCTGAGTT TTGGAAAAAT GACCTTGGTG CAATTGAAAA CTATTTGAAT 840  
 AAAACAAGTT GGAATCACTC GGTGTTTGAT GTTCCTCTCC ACTATAATTT GTACAAATGCA 900  
 TCTAATAGCG GTGGTTATTA TGATATGAGA AATATTTTAA ATGGTTCTGT GGTGCAAAAA 960  
 CATCCAACAC ATGCCGTTAC TTTTGTGAT AACCATGATT CTCAGCCCGG GGAAGCATTG 1020  
 GAATCCTTTG TTCAACAATG GTTTAAACCA CTTGCATATG CATTGGTTCT GACAAGGGAA 1080  
 CAAGTTATC CTTCCGTATT TTATGGGGAT TACTACGGTA TCCAACCCA TGGTGTTCG 1140  
 GCTATGAAAT CTAAAATAGA CCCTCTTCTG CAGGCACGTC AAACTTTTCG CTATGGTACG 1200  
 CAGCATGATT ACTTTGATCA TCATGATATT ATCGGTTGGA CAAGAGAGGG AAATAGCTCC 1260  
 CATCCAAATT CAGGCCTTGC CACCATTATG TCAGATGGTC CAGGTGGTAA CAAATGGATG 1320  
 TATGTGGGGA AAAATAAAGC GGGACAAGTT TGGAGAGATA TTACCGGAAA TAGGACAGGC 1380  
 ACCGTCACAA TTAATGCAGA CGGATGGGGT AATTTCTCTG TTAATGGAGG GTCCGTTTCG 1440  
 GTTGGGTGA AGCAA 1455

10

20

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1455 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

CATCATAATG GGACAAATGG GACGATGATG CAATACTTTG AATGGCACTT GCCTAATGAT	60
GGGAATCACT GGAATAGATT AAGAGATGAT GCTAGTAATC TAAGAAATAG AGGTATAACC	120
GCTATTTGGA TTCCGCCTGC CTGGAAAGGG ACTTCGCAAA ATGATGTGGG GTATGGAGCC	180
TATGATCTTT ATGATTTAGG GGAATTTAAT CAAAAGGGGA CGGTTCGTAC TAAGTATGGG	240
ACACGTAGTC AATTGGAGTC TGCCATCCAT GCTTTAAAGA ATAATGGCGT TCAAGTTTAT	300
GGGGATGTAG TGATGAACCA TAAAGGAGGA GCTGATGCTA CAGAAAACGT TCTTGCTGTC	360
GAGGTGAATC CAAATAACCG GAATCAAGAA ATATCTGGGG ACTACACAAT TGAGGCTTGG	420
ACTAAGTTTG ATTTTCCAGG GAGGGGTAAT ACATACTCAG ACTTTAAATG GCGTTGGTAT	480
CATTTGATG GTGTAGATTG GGATCAATCA CGACAATTCC AAAATCGTAT CTACAAATTC	540
CGAGGTGATG GTAAGGCATG GGATTGGGAA GTAGATTCGG AAAATGGAAA TTATGATTAT	600
TTAATGTATG CAGATGTAGA TATGGATCAT CCGGAGGTAG TAAATGAGCT TAGAAGATGG	660
GGAGAATGGT ATACAAATAC ATTAAATCTT GATGGATTTA GGATCGATGC GGTGAAGCAT	720
ATTAAATATA GCTTTACACG TGATTGTTG ACCCATGTAA GAAACGCAAC GGGAAAAGAA	780
ATGTTTGCTG TTGCTGAATT TTGGAAAAAT GATTTAGGTG CCTTGGAGAA CTATTTAAAT	840
AAAACAACT GGAATCATTC TGTCTTTGAT GTCCCCCTTC ATTATAATCT TTATAACGCG	900
TCAAATAGTG GAGGCAACTA TGACATGGCA AAACCTCTTA ATGGAACGGT TGTTCAAAAG	960
CATCCAATGC ATGCCGTAAC TTTTGTGGAT AATCACGATT CTCAACCTGG GGAATCATT	1020
GAATCATTTG TACAAGAATG GTTTAAGCCA CTTGCTTATG CGCTTATTTT AACAAGAGAA	1080
CAAGGCTATC CCTCTGTCTT CTATGGTGAC TACTATGGAA TTCCAACACA TAGTGTCCCA	1140
GCAATGAAAG CCAAGATTGA TCCAATCTTA GAGGCGCGTC AAAATTTTGC ATATGGAACA	1200
CAACATGATT ATTTTGACCA TCATAATATA ATCGGATGGA CACGTGAAGG AAATACCACG	1260
CATCCCAATT CAGGACTTGC GACTATCATG TCGGATGGGC CAGGGGGAGA GAAATGGATG	1320
TACGTAGGGC AAAATAAAGC AGGTCAAGTT TGGCATGACA TAACTGGAAA TAAACCAGGA	1380
ACAGTTACGA TCAATGCAGA TGGATGGGCT AATTTTTCAG TAAATGGAGG ATCTGTTTCC	1440
ATTTGGGTGA AACGA	1455

10

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 60 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

40

(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/ KEY: misc-feature:  
        (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Forward Primer FSA"  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/KEY: misc-feature  
(B) LOCATION: 22-27,29,31-33,41  
(D): OTHER INFORMATION: /Note= 1: 35% A, 65% C  
                            2: 83% G, 17% A  
                            3: 63% G, 37% T  
                            4: 86% G, 14% A  
                            5: 85% G, 15% C  
                            6: 50% T, 50% C  
                            7: 95% A, 5% G  
                            8: 58% G, 37% A, 5% T  
                            9: 86% C, 13% A, 1% G  
                           10: 83% T, 17% G  
                           11: 92% G, 8% C  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

caaaatcgta tctacaaatt c123456a7g 8910tgggatt  
llggaagtaga ttcggaat  
60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 21 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/KEY: misc-feature:  
        (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Reverse Primer RSA"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

gaattttag atacgatttt g  
21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 24 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/KEY: misc-feature:  
        (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer B1"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

CGATTGCTGA CGCTGTATT TGCG

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 24 base pairs

10

20

30

40

(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer Y2"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:

CTTGTTCCCT TGTCAGAACC AATG 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 30 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer 101458"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19:

GTCATAGTTG CCGAAATCTG TATCGACTTC 30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 35 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer 101638"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:

CCCAGTCCCA CGTACGTCCC CTGAATTTATATA TTTTG 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 21 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Oligo 1"  
(A) NAME/KEY: misc-feature  
(B) LOCATION: 12  
(D): OTHER INFORMATION: /Note=N= 25% A, 25% C, 25% G, 25% T.  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:

CCCAGTCCCA GNTCTTTCCC CTGAATTTAT ATATTTTG 38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

20

30

40

(A) LENGTH: 25 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/KEY: misc-feature:  
        (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer X2"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:

GCGTGGACAA AGTTTGATTT TCCTG

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 21 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/KEY: misc-feature:  
        (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA01"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:

10

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 24 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/KEY: misc-feature:  
        (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA03"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24:  
GCATTGGATG CTTTGAACA ACCG

20

24

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 26 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
    (A) NAME/KEY: misc-feature:  
        (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA07"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:

30

CGCAAAATGA TATCGGGTAT GGAGCC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 29 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid

40

(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/ KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA20"  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature  
(B) LOCATION: 13,14  
(D): OTHER INFORMATION: /Note:S= mixture of C and G  
W= mixture of A and T  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:  
GTGATGAACC ACSWAGGTGG AGCTGATGC 29

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 30 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/ KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA14"  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature  
(B) LOCATION: 13,14  
(D): OTHER INFORMATION: /Note:R= mixture of A and G  
Y= mixture of C and T  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:  
GATGGTGTAT GGRYCAATCA CGACAATTCC 30

20

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 28 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA15"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:  
GGTGTATGGG ATAACACACG ACAATTCC 28

30

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 28base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA16"

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:  
GGTGTATGGG ATCTCTCAG ACAATTCC

28

## 2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
    (A) LENGTH: 32 base pairs  
    (B) TYPE: nucleic acid  
    (C) STRANDEDNESS: single  
    (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc-feature:  
    (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA17"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:

GGGATCAATC ACGAAATTTT CAAAATCGTA TC

32

10

## 2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
    (A) LENGTH: 32 base pairs  
    (B) TYPE: nucleic acid  
    (C) STRANDEDNESS: single  
    (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc-feature:  
    (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA18"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:

GGGATCAATC ACGACTCTTC CAAAATCGTA TC

32

20

## 2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
    (A) LENGTH: 34 base pairs  
    (B) TYPE: nucleic acid  
    (C) STRANDEDNESS: single  
    (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc-feature:  
    (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA06"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

GGAAATTATG ATTATATCAT GTATGCAGAT GTAG

34

30

## 2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 33:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
    (A) LENGTH: 30 base pairs  
    (B) TYPE: nucleic acid  
    (C) STRANDEDNESS: single  
    (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc-feature:  
    (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA09"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 33:

GCTGAATTTT GGTCGAATGA TTAGGTGCC

30

30

27

29

```
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 37:
  (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
      (A) LENGTH: 27 base pairs
      (B) TYPE: nucleic acid
      (C) STRANDEDNESS: single
      (D) TOPOLOGY: linear
  (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
  (ix) FEATURE:
      (A) NAME/ KEY: misc-feature:
          (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA13"
```



27

26

25

38

40

(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA10"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 41:  
CGTAGGGCAA AATCAGGCCG GTCAAGTTTG G 31

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 42:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 31 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE: 10  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA22"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 42:  
CATAACTGGA AATCGCCCGG GAACAGTTAC G 31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 43:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 29 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/ KEY: misc-feature: 20  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA19"  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature  
(B) LOCATION: 12  
(D): OTHER INFORMATION: /Note:W= mixture of A and T  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 43  
CTGGAAATAA AWCCGGAACA GTTACG 36

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 44:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 32 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid 30  
(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA23"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 44:  
GGAAATAAAC CAGGACCCGT TACGATCAAT GC 32

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 45:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 28 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid 40  
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA32"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 45:  
GAGGCTTGGA CTAGGTTTGA TTTCCAG

28

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 46:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 30 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA31"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 46:  
GCTGAATTTT GCGCAATGA TTTAGGTGCC

30

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 47:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 34 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer bm4"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 47:  
GTGTTTGACG TCCCGCTTCA TGAGAATTTA CAGG

34

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 48:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 34 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer bm5"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 48:  
GTGTTTGACG TCCCGCTTCA TAAGAATTTA CAGG

34

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 49:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 34 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc-feature:  
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer bm6"

10

20

30

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 49:  
GTGTTTGACG TCCCGCTTCA TGCCAATTGA CAGG 34

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 50:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 32 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
    (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
    (ix) FEATURE:  
        (A) NAME/KEY: misc-feature:  
            (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer bm8"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 50:  
AGGGAATCCG GATACCTGA GGTTCCTAC GG 32

10

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 51:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 34 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
    (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
    (ix) FEATURE:  
        (A) NAME/KEY: misc-feature:  
            (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer bm11"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 51:  
GATGTGGTTT TGGATCATAA GGCCGGCGCT GATG 34

20

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 52:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 22 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
    (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
    (ix) FEATURE:  
        (A) NAME/KEY: misc-feature:  
            (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer p1"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 52:  
CTGTTATTAA TGCCGCCAAA CC 22

30

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 53:  
    (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
        (A) LENGTH: 24 base pairs  
        (B) TYPE: nucleic acid  
        (C) STRANDEDNESS: single  
        (D) TOPOLOGY: linear  
    (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
    (ix) FEATURE:  
        (A) NAME/KEY: misc-feature:  
            (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer p2"  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 53:

GGAAAAGAAA TGTTTACGGT TGCG

24

## 2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 54:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc-feature:

(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer p3"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 54:

GAAATGAAGC GGAACATCAA ACACG

25

10

## 2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 55:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc-feature:

(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer p4"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 46:

GTATGATTTA GGAGAATTCC

20

20

## 【 1 】

1	HUNGNGTMM	QYFEWHLFND	GNHWNLRDD	ASNLNRGIT	ALWIPPAWG	50
2	..NGTNGTMM	QYFEWYLPND	GNHWNLRSD	ASNLKDKGIS	AVWIPPAWG	
3	HUNGNGTMM	QYFEWYLPND	GNHWNLRDD	AAALKSKGIT	AVWIPPAWG	
4	...VNGTLM	QYFEWYTPND	GQHWRLQND	AGHLSDIGIT	AVWIPPAWG	
5	..ANLGTLM	QYFEWYMPND	GQHWRLQND	SAVLAHGIT	AVWIPPAWG	
6	.AAPFNGTMM	QYFEWYLPDD	GTLWTKVNE	ANLSSLGIT	ALWIPPAWG	
51	TSQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKY	TRSOLESAIH	ALKNNGVQVY	100
1	ASQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKY	TRNQLQRAVN	ALKSNGLOVY	
2	TSQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKY	TRNQLQRAVT	SLKNGNGLOVY	
3	LSQSDVGYGF	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKY	TKSELQDAIG	SLHRSNDVQVY	
4	TSQADVGYGA	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKY	TKSELQDAIK	SLHRSNDVQVY	
5	TSQSDVGYGV	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKY	TKAQYLQAIQ	AAHAAGVQVY	
6	TSRSDVGYGV	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKY	TKAQYLQAIQ	AAHAAGVQVY	
101	GDVNNHKGK	ADATENYLA	EVNPNRNQ	ISGTYTIEAW	TKEDFPGRGN	150
1	GDVNNHKGK	ADATENYLA	EVNPNRNQ	ISGTYTIEAW	TKEDFPGRGN	
2	GDVNNHKGK	ADATENYLA	EVNPNRNQ	VSGETYIEAW	TKEDFPGRGN	
3	GDVNNHKGK	ADTEIYNVAV	EVNPNRNQ	TSGEYATIEAW	TKEDFPGRGN	
4	GDVNNHKGK	ADATEDVTAV	EVNPNRNQ	TSEYQIKAW	TDFRFPGRGN	
5	GDVNNHKGK	ADATEDVTAV	EVNPNRNQ	ISGEHLIKAW	TDFRFPGRGN	
6	ADVFDHKGK	ADGTEWYDA	EVNPNRNQ	ISGTYQIQAW	TKEDFPGRGN	
151	TYSDFKRWY	HFQGVDMQDS	RQFONRIYK	RGDGKAWDE	VDSENGNDY	200
1	TYSDFKRWY	HFQGVDMQDS	RQFONRIYK	RGDGKAWDE	VDSENGNDY	
2	THSNFKRWY	HFQGVDMQDS	RKLNNRIYK	RGDGKAWDE	VDTEGNDY	
3	NHSSEKRWY	HFQGVDMQDS	RQLOKRIYK	RGDGKAWDE	VDTEGNDY	
4	TYSDFKRWY	HFQGVDMQDS	RKL.SRIYK	RGDGKAWDE	VDSENGNDY	
5	TYSDFKRWY	HFQGVDMQDS	RKL.NRIYK	..OGKAWDE	VSNENGNDY	
6	TYSDFKRWY	HFQGVDMQDS	RKL.SRIYK	RGDGKAWDE	VDTEGNDY	
201	LMYADVDMDH	PEVVELNRW	GEWYNTLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL	250
1	LMYADVDMDH	PEVVELNRW	GEWYNTLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL	
2	LMYADIDMDH	PEVVELNRW	GWYNTLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL	
3	LMYADVDMDH	PEVVELNRW	GWYNTLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL	
4	LMYADVDMDH	PDVAAETKRW	GIWYANELSL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL	
5	LMYADIDMDH	PDVAAETKRW	GIWYANELSL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL	
6	LMYADIDMDH	PEVVELNRW	GWYNTLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL	
251	THVRNATGKE	MEVAEAFWKN	DLGALENYLN	KTNNHSHVFD	VPLHNYLYNA	300
1	THVRNATGKE	MEVAEAFWKN	DLGALENYLN	KTNNHSHVFD	VPLHNYLYNA	
2	THVRNATGKE	MEVAEAFWKN	DLGALENYLN	KTNNHSHVFD	VPLHNYLYNA	
3	THVRNATGKE	MEVAEAFWKN	DLGALENYLN	KTNNHSHVFD	VPLHNYLYNA	
4	QAVRQATGKE	MEVAEAFWKN	DLGALENYLN	KTNNHSHVFD	VPLHNYLYNA	
5	NHVRQATGKE	MEVAEAFWKN	DLGALENYLN	KTNNHSHVFD	VPLHNYLYNA	
6	SYVRSQATGKE	MEVAEAFWKN	DLGALENYLN	KTNNHSHVFD	VPLHNYLYNA	

Fig. 1 (continued)

Fig. 1

```

301  SNSGGYDMA KLLNGTVVQK HPMHATVFD NHDSPQESL ESFVQWEKFP 350
1   SKSGGYDMR QIENGTVVQK HPMHATVFD NHDSPQEEAL ESFVEEWKFP
2   SNSGGYDMR NIILNGTVVQK HPMHATVFD NHDSPQEEAL ESFVQWEKFP
3   SSQGGYDMR RLLDGTVVSR HPEKATVFE NHDTPQQLS ESTVQWEKFP
4   STQGGYDMR KLLNGTVVSK HPLKSVTFD NHDTPQQLS ESTVQWEKFP
5   SKSGGAFDMR TLMNTLMKD QPTLAVTFD NHDTPQQLS QSWVDWEKFP
6   SKSGGAFDMR TLMNTLMKD QPTLAVTFD NHDTPQQLS QSWVDWEKFP

351  LAYALILTRE QGYPSVFGD YGIEPHTS...VPAMKAKID PILEARQNPA 400
1   LAYALILTRE QGYPSVFGD YGIEPHTG...VPAMKSKID PILEARQKPA
2   LAYALILTRE QGYPSVFGD YGIEPHTG...VPAMKSKID PILEARQKPA
3   LAYALILTRE QGYPSVFGD YGIEPHTG...VPAMKSKID PILEARQKPA
4   LAYALILTRE QGYPSVFGD YGIEPHTG...VPAMKSKID PILEARQKPA
5   LAYALILTRE QGYPSVFGD YGIEPHTG...VPAMKSKID PILEARQKPA
6   LAYALILTRE QGYPSVFGD YGIEPHTG...VPAMKSKID PILEARQKPA

401  YGTQHDYFDH HNLIGWTREG NTHPNISGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNK 450
1   YGTQHDYFDH HNLIGWTREG NTHPNISGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNK
2   YGTQHDYFDH HNLIGWTREG NTHPNISGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNK
3   YGTQHDYFDH HNLIGWTREG NTHPNISGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNK
4   YGTQHDYFDH HNLIGWTREG NTHPNISGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNK
5   YGTQHDYFDH HNLIGWTREG NTHPNISGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNK
6   YGTQHDYFDH HNLIGWTREG NTHPNISGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNK

```

Fig.1 (continued)

```

451  GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK... 500
1   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
2   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
3   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
4   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
5   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
6   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...

501  GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK... 519
1   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
2   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
3   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
4   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
5   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...
6   GQVWHDTGN KPGVITINAD GWANFSVNGG SVSIWVRK...

```

Fig. 1 (continued)

【図 2】

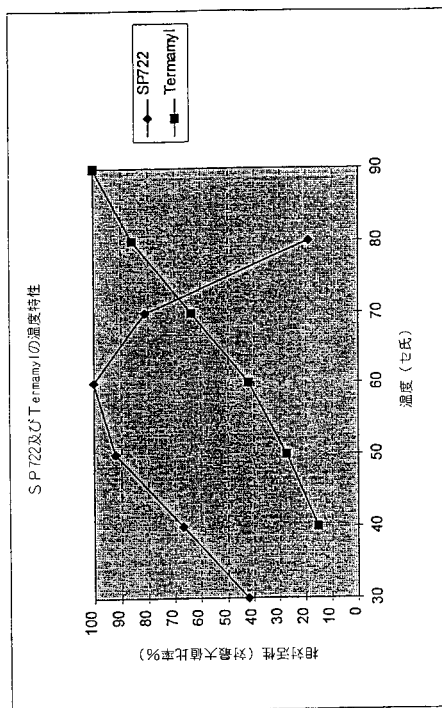


Fig. 2

【図 3】

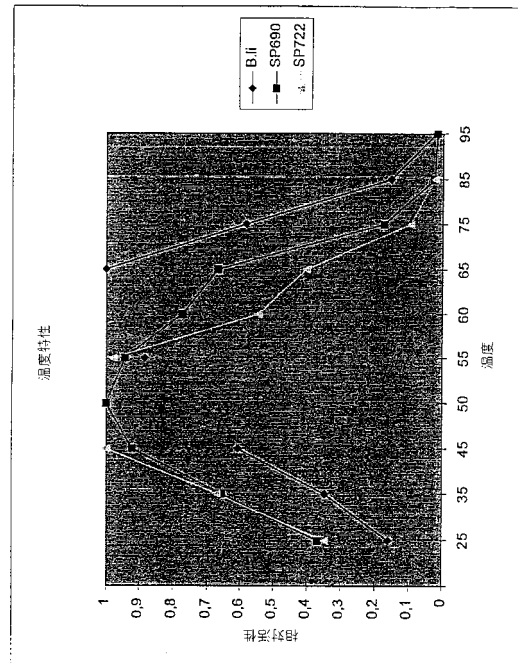


Fig. 3

1 MKFVLLLSLI GFCWAQYDPH TSDG. RTAIV HLFERWWDI AKECERYLAP 50  
 2 ....LLSLI GFCWAQYDPH TADG. RTAIV HLFERWADI AKECERYLAP  
 3 ..... QYAPQ TQSG. RTDIV HLFERWADI AKECERYLAP  
 4 MKFVLLLSLI GFCWAQYSPN TQSG. RTSIV HLFERWWDI AKECERYLAP  
 5 MKNLKIITTA GLSLGLLPS IATAPTTTFV HLFERNWQDV AQECQYLG 50  
 51  
 1 KFGGVQVSP PNEVTVVNP SRPWERYQP ISYKICTRSG NEDERFDMVT 100  
 2 KFGGVQVSP PNEIINNPP SRPWERYQP ISYKICTRSG NEDERFDMVT  
 3 KFGGVQVSP PNEVTVVNP SRPWERYQP VSYKLCSTRSG NEDERFDMVT  
 4 KFGGVQVSP PNEVTVVNP SRPWERYQP VSYKLCSTRSG NEDERFDMVT  
 5 KGVAQVQVSP PNEHI....T GSQWWTYQP VSYELQSRGG NRAQFIDMVN  
 101  
 1 RCNNVGVRIY VDAVINHMCG AGNPAGTSST CGSYLNPNNR EPFAPYPSAW 150  
 2 RCNNVGVRIY VDAVINHMCG SGNAGTHST CGSYFNPNNR EPFAPYPSAW  
 3 RCNNVGVRIY VDAVINHMCG SGAAAGTGTT CGSYCNPNR EPFAPYPSAW  
 4 RCNNVGVRIY VDAVINHMCG NAVSAGTSST CGSYFNPGRS DFFAPYPSGW  
 5 RCSAAGVDIY VDTLINHM...AAGSGTGTA GNSF...GNK SPFI..YSPQ  
 151  
 1 DFNDNKN...GEIDNYDA YQVRNCRJLT LLDIALEKDY VRTKVADTMN 200  
 2 YFNDNKN...GEIDNYDA YQVRNCRJLT LLDIALEKDY VRTKVADTMN  
 3 DFNDGCKTA SGIESYNPD YQVRDQCLVG LLDIALEKDY VRSMIADYN  
 4 DFNDGCKTG SGDIENYDA TVRDCRLJTG LLDIALEKDY VRSMIADYN  
 5 DFHES.CTIN NSDYG..NDR YVQNCCLVG LADLDTASNY VQNTIAAYIN  
 201  
 1 HLIDIGVAGF RLDAAKHMP RDIKAVLDKL HNLNTKWFQ GSREPIFQEV 250  
 2 NLIDIGVAGF RLDAAKHMP GDIKAVLDKL HNLNTKWFQ GSREPIFQEV  
 3 KLIDIGVAGF RLDAAKHMP GDIKAVLDKL HNLNTKWFQ GSREPIFQEV  
 4 HLIDIGVAGF RLDAAKHMP GDIKAVLDKL HNLNTKWFQ GSREPIFQEV  
 5 DLQAGVKG FPDASKHVA SDOQLMAK N.....GSEVVFQEV  
 251  
 1 IDLGEAIG SEYFNGRVT EPKYGAKLGT VIRKNGEKM SYLKNWGEW 300  
 2 IDLGEAIG SEYFNGRVT EPKYGAKLGT VIRKNGEKM SYLKNWGEW  
 3 IDLGEAIG SEYFNGRVT EPKYGAKLGT VIRKNGEKM SYLKNWGEW  
 4 IDLGEAIG SEYFNGRVT EPKYGAKLGT VIRKNGEKM SYLKNWGEW  
 5 IDQGEAVGA SEXLSTGLVT EPKYSTELGN TFR...NGSL AWLSNFBEGW  
 301  
 1 GLVPSDRALV FVDNHNQRG HGAGGSILT FWDARMYKMA YGFMLAHPYG 350  
 2 GFVPTDRALV FVDNHNQRG HGAGGSILT FWDARMYKMA YGFMLAHPYG  
 3 GFVPSDRALV FVDNHNQRG HGAGGSILT FWDARMYKMA YGFMLAHPYG  
 4 GFVPSDRALV FVDNHNQRG HGAGGSILT FWDARMYKMA YGFMLAHPYG  
 5 GFVPSDRALV FVDNHNQRG HGAGGSILT FWDARMYKMA YGFMLAHPYG

Fig. 4 (continued)

351  
 1 FTRVMSYRW NRNFQNGKDQ NDWIGPPNNM GVIKEVTINA DTTCCGNDWVC 400  
 2 FTRVMSYRW TRNFQNGKDQ NDWIGPPNNM GVIKEVTINA DTTCCGNDWVC  
 3 FTRVMSYRW ARNFQNGEDV NDWIGPPNNM GVIKEVTINA DTTCCGNDWVC  
 4 FTRVMSYRW PROFQNGDV NDWIGPPNNM GVIKEVTINA DTTCCGNDWVC  
 5 YEKVMSY...DFHGDITDA GGRVFPVHNN GNLE.....CFASNWK  
 401  
 1 EHRWQIRNM VAFRNVNGQ .PFSNWDNN SNQVAFSRGN RGFIVFNDD 450  
 2 EHRWQIRNM VAFRNVNGQ .PFSNWDNN SNQVAFSRGN RGFIVFNDD  
 3 EHRWQIRNM VAFRNVNGQ .PFSNWDNN SNQVAFSRGN RGFIVFNDD  
 4 EHRWQIRNM VAFRNVNGQ .PFSNWDNN SNQVAFSRGN RGFIVFNDD  
 5 EHRWQIRNM VAFRNVNGQ .PFSNWDNN SNQVAFSRGN RGFIVFNDD  
 451  
 1 WALSLTLQTG LPAGTYCDVI SGDKVNG..N CTGLRVNVGS DGKAHFSIN 500  
 2 WALSLTLQTG LPAGTYCDVI SGDKVNG..N CTGLRVNVGS DGKAHFSIN  
 3 WALSLTLQTG LPAGTYCDVI SGDKVNG..S CTGLRVNVGS DGKAHFSIN  
 4 WALSLTLQTG LPAGTYCDVI SGDKVNG..N CTGLRVNVGS DGKAHFSIN  
 5 WALSLTLQTG LPAGTYCDVI SGDKVNG..N CTGLRVNVGS DGKAHFSIN  
 501  
 1 SAEDPFIAT ADSKL..... 521  
 2 SAEDPFIAT ADSKL.....  
 3 SAEDPFIAT ADSKL.....  
 4 SAEDPFIAT ADSKL.....  
 5 WDA...MAIH KNAKLNTSSA S

Fig. 4 (continued)

## フロントページの続き

- (74)代理人 100108110  
弁理士 日野 あけみ
- (74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (72)発明者 ボルケルト, トルベン ベデル  
デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
ィーゼルスカブ
- (72)発明者 スベンセン, アラン  
デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
ィーゼルスカブ
- (72)発明者 アンデルセン, カルステン  
デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
ィーゼルスカブ
- (72)発明者 ニールセン, ビャルネ レンフェルト  
デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
ィーゼルスカブ
- (72)発明者 ニッセン, トルベン ラウエスガールド  
デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
ィーゼルスカブ
- (72)発明者 キャエルルフ, セーレン  
デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
ィーゼルスカブ

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第96/023873(WO, A1)  
特表平09-503916(JP, A)  
国際公開第96/023874(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09  
C11D 3/386  
C12N 1/21  
C12N 9/28  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
PubMed