

(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 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 9/28	(2006.01) C 12 N 9/28
C 12 N 1/21	(2006.01) C 12 N 1/21
C 11 D 3/386	(2006.01) C 11 D 3/386

請求項の数 17 (全 72 頁)

(21) 出願番号	特願2000-519071 (P2000-519071)	(73) 特許権者	500586299 ノボザイムス アクティーゼルスカブ デンマーク国, デーコー-2880 バグ スバエルト, クロシェイバイ 36
(86) (22) 出願日	平成10年10月30日(1998.10.30)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(65) 公表番号	特表2001-521739 (P2001-521739A)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(43) 公表日	平成13年11月13日(2001.11.13)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(86) 國際出願番号	PCT/DK1998/000471	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 國際公開番号	W01999/023211	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治
(87) 國際公開日	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)		

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<sup>2+</sup>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。 10

## 【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。

## 【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。

10

## 【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。

20

## 【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〕

30

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、でんぶ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W090/11352, W095/10603, W095/26397, W096/23873及びW096/23874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、W096/23874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W096/23874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。

40

## 〔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】

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。20

#### 酵素活性に対する温度の影響

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\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G184\*, 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; 10  
 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\*, A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V; 20  
 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; 30  
 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.

## 【0009】

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\*; R181Q, N, S; G182T, S, N; D183\*; G184\*; 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; K458R; P459T; T461P; Q174\*; 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。

## 【0010】

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ぶんの融解において、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\* 又は A30\* 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)\* 又は (A30-N3 20 3)と表す。

#### 【 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、\*36Asp 又は \*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. amyloli quefaciens 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。その他の相同的なアミラーゼには、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 (19 88), 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。

#### 【 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)、Spezyme 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、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、

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、任意の通常のアルゴリズム、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GAPプログラムを用いて、その場合、GAP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、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(Gaboriaud et al., (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155)及びリバーススレッディング(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

10

20

30

40

50

エスタンプロッティング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當な条件は、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度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度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度(低ストリンジエント性)、好ましくは50度(中ストリンジエント性)、より好ましくは65度(高ストリンジエント性)、さらに好ましくは~75度(超高ストリンジエント性)、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。

10

#### 【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。

20

#### 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せを含んで成るアミラーゼであってよい。

#### 【0022】

30

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、少くとも1つのTermamyl様アミラーゼと少くとも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、少くとも1つのTermamyl様アミラーゼと少くとも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。

40

#### 【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. stearothermophilus*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

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】

10

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。

20

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】

30

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。この様な 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、ブタ臍臍 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）。

40

## 【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

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つ以上の下記の位置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; 10  
 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; 20  
 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.

### 【0031】

好みの高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ュミ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。このシュミ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。

WO96/23874 (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)の中の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 )。

#### 【0034】

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。

#### 【0035】

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\*, 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;  
 D183\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V; 20  
 G184\*, 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. 30

#### 【0036】

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\*; G184\*; 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の配列を有するバチルス菌株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。

#### 【0037】

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1つの置換を有するバチルス菌株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\*; G184\*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N195F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、特には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

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つ以上の下記の置換を有する：

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; 10  
 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\*, A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 D183\*, A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
 G184\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V; 20  
 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; 30  
 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】

好みしい変異体は、1つ以上の下記の置換又は欠失を有する：Q174\*, D183\*, G184\*, 40  
 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

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 】**

この様な変異は、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。

20

**【 0 0 4 3 】**

本発明には、2つ以上の上記概説した修飾を組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。この様な位置は、(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;  
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。

40

**【 0 0 4 5 】**

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、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を有し、*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 10 当でない。

#### 【 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を有する。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、*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を有する。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を有する。従つて、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を有する。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。

#### 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 haloplancis*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制変異体の活性は、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 haloplancis*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. haloplancis* アミラーゼ (AHA) (図4の整列中の第5番) は、ブタ臍臍 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 3D 構造 50

は知られており、Brookhavenデータベースから1OSE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 haloplancis*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。

#### 【0053】

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 haloplancis*アミラーゼの安定性を改良する特定の変異は、T6P, 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に由来する染色体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、相同的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、より低いストリングエ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。

#### 【0054】

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ブレートに、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。

#### 【0055】

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。

#### 【0056】

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. Saiki 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。

#### 【0057】

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込まれ、そして組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、適當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 coeli color* のアガラーゼ遺伝子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* xyIA及びxyIB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。10

#### 【0059】

本発明の発現ベクターは、適當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。その様な配列の例は、プラスミドpUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1及びpIJ702内の複製起点である。30

#### 【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W091/17243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バ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。40

#### 【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有する適當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)。50

## 【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】

10

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 laetus, 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】

20

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のカタログに記載されたもの)に従って調製してもよい。

30

## 【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。

40

## 【0068】

多数の変異体が、でんぶんからの甘味料及びエタノール生産、及び/又は纖維品の糊抜きのために、特に有用である。通常のでんぶん変換、例えばでんぶんの液化及び/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

50

及びW097/07202を参照する。

#### 【0069】

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、洗浄組成物中に組込み得る。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0.00001～1mg（純粋な活性酵素タンパク質として）に相当する量で組込み得ると考えられる。

#### 【0070】

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。

#### 【0071】

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、例えは95%まで、特には95%相同である必要がある。

#### 【0072】

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：W095/10603参照

##### 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>

##### ライプラリーベクター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SP72)を不活性化した。順方向プライマー：5'-gacctgcagttaggcaacta-3'及び逆方向プライマー：5'-tagagtcgacactgcaggcat-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 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 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度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。10

#### 【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%でんぶん及びグリシン/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。でんぶ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。20

#### 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度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。30

#### 【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%でんぶん及び炭酸塩/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。でんぶ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。40

#### 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ドメイン

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、参考値(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ぶ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、5mlの50mM Britton-Robinson 緩衝液(50mM酢酸、50mMリン酸、50mMホウ酸、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、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1mlを、5mlの50mM Britton-Robinson 緩衝液に加える。でんぶ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・ペールの法則)。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1mg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5ml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5mL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20μlを96ウェルマイクロタイプレートに加え、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。

#### 【0079】

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。

#### 【0080】

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かが、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：

#### 【0081】

#### 【数1】

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

#### 【0082】

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かが、

10

20

30

40

50

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の数 + 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 Mont 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：

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か、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、 $\exp [1000 \times [\text{新しい評価点} - \text{その時の評価点}]]$ である。

#### 【0084】

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、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。

#### 【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える。

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

10

20

30

40

50

場合 ( WO96/23874 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、Berendsen 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 :

10

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、分子動力学的シュミレーションを行う。この分子動力学的シュミレーションを、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。このシュミレーションを、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。

20

【0087】

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ュミ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。

30

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。

【0088】

この様な領域は、以下の 2 つの分子動力学シュミ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。

40

【0089】

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

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。この様な領域及びそこの残基が、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、は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) コドンを決定するために、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も示す。

30

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 t11g 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の鑄型は、プラスミドpJE1である。このPCR断片を、大腸菌/バチルス菌シャトルベクターpDorK101にクローニングする(「材料と方法」参照)ことで、大腸菌で変異誘発し、即座にバチルス・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。大腸菌内でクローニング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、その様にしてバ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。バチルス・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

#### 【0090】

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B1(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、同一の鑄型に対して 2 回目のPCR を行った。

生じた約1080bpの断片を、制限酵素BstEIIとAflI I I I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)

10

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)を鑄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、

20

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。

30

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×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AflI I I I I 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 × 2 : (配列番号22)

40

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×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AflI I I I I 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)

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。

#### 【0095】

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、バチルス・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。

10

#### 【0096】

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。

#### 【0097】

生じた約920bpの断片を、制限酵素NgoMI及びAatIIによって切斷し、生じた約170bpのDNA断片を精製し、同酵素で切斷した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、コンピテントなバチルス・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。

20

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' GCATTGGATGCTTTGAACAAACCG 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。

30

#### 【0098】

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によって切斷し、同酵素で切斷した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）：

40

5' GTGATGAACCACSWAGGTGGAGCTGATGC 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。

#### 【0099】

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）：

50

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。

【0100】

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' GGGATCAATCACGAAATTCCAAAATCGTATC 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' GGGATCAATCACGACTTCCAAAATCGTATC 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' GGAAATTATGATTATCATGTATGCAGATGTAG 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' GCTGAATTTGGTCAATGATTAGGTGCC 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' GCTGAATTTGGTCAATGATTAGGTGCC 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' GAATTTGGAAAGTACGATTAGGTGG 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' GGAAAAACGATTRYCGGTGCCTTGGAGAAC 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。

【0101】

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' GATTTAGGTGCCTRYCAGAACTATTAA 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' CCCCCCTTCATGAGAACATTTATAACG 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' GAATCCGAACCTCATTACACATTTCG 3'

プライマーDA05（配列番号40）：

5' CGGATGGACTCGAGAAGGAAATACCACG 3'

プライマーDA10（配列番号41）：

5' CGTAGGGCAAAATCAGGCCGGTCAAGTTGG 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' CATAACTGGAAATCGCCCCGGAACAGTTACG 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' CTGGAAATAAWCCGGAACAGTTACG 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' GGAAATAAACCGAGGACCCGTTACGATCAATGC 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' GAGGCTTGGACTAGGTTGATTTCCAG 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' GCTGAATTTGGCGCAATGATTAGGTGCC 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 b11：

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 b12：

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
△ (D183-G184) +M323L	56%	44%
△ (D183-G184) +M323L +R181S	67%	55%
△ (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
△ (D183-G184)	4%
△ (D183-G184) +P459T	25%
△ (D183-G184) +K458R	31%
△ (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
△ (T183-G184)	32%	19%
△ (T183-G184) +A186T	36%	23%
△ (T183-G184) +K185R +A186T	45%	29%
△ (T183-G184) +A186I	35%	20%
△ (T183-G184) +N195F	44%	n. d.

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。

30

【 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
△ (D183-G184) +M323L	21%	13%
△ (D183-G184) +M323L +R181S	32%	19%
△ (D183-G184) +M323L +A186T	28%	17%
△ (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
△ (D183-G184)	30%	20%
△ (D183-G184) +N195F	55%	44%

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。

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
△ (D183-G184)	0 %
△ (D183-G184) +P459T	19%
△ (D183-G184) +K458R	18%
△ (D183-G184) +T461P	13%
△ (D183-G184) +E346Q +K385R	4 %

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。

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**

10

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Ph adebas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°C	NU/mg 37°C	NU (25°C) / NU (37°C)
SP690	1440	35000	4.1%
△ (T183-G184)	2900	40000	7.3%
△ (T183-G184) +K269S	1860	12000	15.5%
△ (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Ph adebas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。

30

変異体	NU/mg 37°C	NU/mg 50°C	NU (37°C) / NU (50°C)
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Ph adebas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。

40

**【 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	NU/mg	NU (25°C) /
	25°C	37°C	NU (37°C)
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Ph adebas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 10 .3) を用いて37 °C で、そして50mM CAPS 緩衝液 (pH10.5) を用いて60 °C で測定した。

## 【 0 1 2 0 】

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 °C での活性に対する37 °C での活性の比率%を示している。

変異体	NU/mg 37°C	NU/mg 60°C	NU (37°C) / NU (60°C)
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。

## 【 0 1 2 1 】

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ぶ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ニングを選択した。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ニング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ニングを単離した。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。

## 【 0 1 2 2 】

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

切斷断片サイズ : 389bp

10

20

30

40

50

## 【 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

20

## 【 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, Pvul  
 切断断片サイズ : 576

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  
 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

30

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 Publications, 20  
 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：

- 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) (pH9における)、及びB. licheniformis アミラーゼ (配列番号4) (pH7.3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、pH10における温度活性曲線を示す。

10

20

30

40

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 : ブタ臍臓 アミラーゼ (PPA) (amyp\_pig)
- 4 : ヒト アミラーゼ (amyp\_human)
- 5 : A. haloplancis 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 Gin 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

10

20

30

40

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	

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

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				10
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 Gin 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				20
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				30
465		470	475	480
Ile Trp Val Lys Arg				
485				

## (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:

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  
 10  
 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  
 20  
 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  
 30  
 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

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

## (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

10

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	75	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	155	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	235	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 Tyr Asp Met			
290	295	300	
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser			
305	310	315	320
Val Thr Phe Val 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



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	10
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	20
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 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	30
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			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:

10

(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

20

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

30

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

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		

10

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			

20

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			

30

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

10

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

20

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

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 CAATATTCTG AATGGTATTT GCCAAATGAC 60

GGGAATCATT GGAACAGGTT GAGGGATGAC GCAGCTAACT TAAAGAGTAA AGGGATAACA 120

GCTGTATGGA TCCCACCTGC ATGGAAGGGG ACTTCCAGA ATGATGTAGG TTATGGAGCC 180

30

TATGATTAT ATGATCTTGG AGAGTTAAC CAGAAGGGG CGGTCGTAC AAAATATGGA 240

ACACGCAACC AGCTACAGGC TCGGGTGACC TCTTAAAAA ATAACGGCAT TCAGGTATAT 300

GGTGATGTCG TCATGAATCA TAAAGGTGGA GCAGATGGTA CGGAAATTGT AAATGCGGTA 360

GAAGTGAATC GGAGCAACCG AAACCAGGAA ACCTCAGGAG AGTATGCAAT AGAAGCGTGG 420

ACAAAGTTG ATTTCTGG AAGAGGAAAT AACCATTCCA GCTTTAAGTG GCGCTGGTAT 480

CATTTGATG GGACAGATTG GGATCAGTCA CGCCAGCTTC AAAACAAAAT ATATAAATTC 540

AGGGGAACAG GCAAGGCCTG GGACTGGAA GTCGATACAG AGAATGGCAA CTATGACTAT	600
CTTATGTATG CAGACGTGGA TATGGATCAC CCAGAAAGTAA TACATGAAC TAGAAACTGG	660
GGAGTGTGGT ATACGAATAC ACTGAACCTT GATGGATTG GAATAGATGC AGTGAACAT	720
ATAAAATATA GCTTTACGAG AGATTGGCTT ACACATGTGC GTAACACCAC AGGTAAACCA	780
ATGTTTGCAG TGGCTGAGTT TTGGAAAAAT GACCTTGGTG CAATTGAAAA CTATTGAAAT	840
AAAACAAGTT GGAATCACTC GGTGTTGAT GTTCCCTCTCC ACTATAATTT GTACAATGCA	900
TCTAATAGCG GTGGTTATTA TGATATGAGA AATATTTAA ATGGTTCTGT GGTGCAAAAA	960
CATCCAACAC ATGCCGTTAC TTTTGTGAT AACCATGATT CTCAGCCCGG GGAAGCATTG	1020
GAATCCTTTG TTCAACAATG GTTAAACCA CTTGCATATG CATTGGTTCT GACAAGGGAA	1080
CAAGGTTATC CTTCCGTATT TTATGGGGAT TACTACGGTA TCCCAACCCA TGGTGTCCG	1140
GCTATGAAAT CTAAAATAGA CCCTCTCTG CAGGCACGTC AAACTTTGC CTATGGTACG	1200
CAGCATGATT ACTTTGATCA TCATGATATT ATCGGTTGGA CAAGAGAGGG AAATAGCTCC	1260
CATCCAAATT CAGGCCTTGC CACCATTATG TCAGATGGTC CAGGTGGTAA CAAATGGATG	1320
TATGTGGGGA AAAATAAACG GGGACAAGTT TGGAGAGATA TTACCGGAAA TAGGACAGGC	1380
ACCGTCACAA TTAATGCAGA CGGATGGGT AATTCTCTG TTAATGGAGG GTCCGTTCG	1440
GTGGGTGA AGCAA	1455

## (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
GGAATCACT GGAATAGATT AAGAGATGAT GCTAGTAATC TAAGAAATAG AGGTATAACC	120
GCTATTTGGA TTCCGCCTGC CTGGAAAGGG ACTTCGCAAA ATGATGTGGG GTATGGAGCC	180
TATGATCTT ATGATTTAGG GGAATTAAAT CAAAAGGGGA CGGTTCTGAC TAAGTATGGG	240
ACACGTAGTC AATTGGAGTC TGCCATCCAT GCTTAAAGA ATAATGGCGT TCAAGTTAT	300
GGGGATGTAG TGATGAACCA TAAAGGAGGA GCTGATGCTA CAGAAAACGT TCTTGCTGTC	360
GAGGTGAATC CAAATAACCG GAATCAAGAA ATATCTGGGG ACTACACAAT TGAGGCTTGG	420
ACTAAGTTG ATTTCCAGG GAGGGTAAT ACATACTCAG ACTTTAAATG GCGTTGGTAT	480
CATTCGATG GTGTAGATTG GGATCAATCA CGACAATTCC AAAATCGTAT CTACAAATTC	540

CGAGGTGATG	GTAAGGCATG	GGATTGGAA	GTAGATTCCG	AAAATGGAAA	TTATGATTAT	600
TTAATGTATG	CAGATGTAGA	TATGGATCAT	CCGGAGGTAG	TAAATGAGCT	TAGAAGATGG	660
GGAGAATGGT	ATACAAATAC	ATTAATCTT	GATGGATTAA	GGATCGATGC	GGTGAAGCAT	720
ATTAATATA	GCTTTACACG	TGATTGGTTG	ACCCATGTAA	GAAACGCAAC	GGGAAAAGAA	780
ATGTTTGCTG	TTGCTGAATT	TTGGAAAAAT	GATTAGGTG	CCTTGGAGAA	CTATTTAAAT	840
AAAACAAACT	GGAATCATT	TGTCTTGAT	GTCCCCCTTC	ATTATAATCT	TTATAACGCG	900
TCAAATAGTG	GAGGCAACTA	TGACATGGCA	AAACTTCTTA	ATGGAACGGT	TGTTCAAAAG	960
CATCCAATGC	ATGCCGTAAC	TTTGTTGGAT	AATCACGATT	CTCAACCTGG	GGAATCATT	1020
GAATCATTG	TACAAGAATG	GTTTAAGCCA	CTTGCTTATG	CGCTTATTTT	AAACAGAGAA	1080
CAAGGCTATC	CCTCTGTCTT	CTATGGTGAC	TACTATGGAA	TTCCAACACA	TAGTGTCCC	1140
GCAATGAAAG	CCAAGATTGA	TCCAATCTTA	GAGGCGCGTC	AAAATTTGC	ATATGGAACA	1200
CAACATGATT	ATTTTGACCA	TCATAATATA	ATCGGATGGA	CACGTGAAGG	AAATACCACG	1260
CATCCCAATT	CAGGACTTGC	GACTATCATG	TCGGATGGGC	CAGGGGGAGA	GAAATGGATG	1320
TACGTAGGGC	AAAATAAAGC	AGGTCAAGTT	TGGCATGACA	TAACGGAAA	AAACCAGGA	1380
ACAGTTACGA	TCAATGCAGA	TGGATGGCT	AATTTTCAG	AAATGGAGG	ATCTGTTCC	1440
ATTTGGGTGA	AACGA					1455

## (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	TATTTGAAT	GGTACTTGCC	GGATGATGGC	60
ACGTTATGGA	CCAAAGTGGC	CAATGAAGCC	AAACAACTTAT	CCAGCCTTGG	CATCACCGCT	120
CTTGGCTGC	CGCCCGCTTA	CAAAGGAACA	AGCCGCAGCG	ACGTAGGGTA	CGGAGTATAAC	180
GACTTGTATG	ACCTCGGCAG	ATTCAATCAA	AAAGGGACCG	TCCGCACAAA	ATACGGAAACA	240
AAAGCTCAAT	ATCTTCAAGC	CATTCAAGCC	GCCCACGCCG	CTGGAAATGCA	AGTGTACGCC	300
GATGTCGTGT	TCGACCATAA	AGGCGCGCT	GACGGCACGG	AATGGGTGGA	CGCCGTCGAA	360
GTCAATCCGT	CCGACCGCAA	CCAAGAAATC	TCGGGCACCT	ATCAAATCCA	AGCATGGACG	420
AAATTGATT	TTCCCGGGCG	GGGCAACACC	TACTCCAGCT	TTAAGTGGCG	CTGGTACCAT	480

TTTGACGGCG TTGATTGGGA CGAAAGCCGA AAATTGAGCC GCATTTACAA ATTCCGCGGC	540
ATCGGCAAAG CGTGGGATTG GGAAGTAGAC ACGGAAAACG GAAACTATGA CTACTTAATG	600
TATGCCGACC TTGATATGGA TCATCCGAA GTCGTGACCG AGCTGAAAAA CTGGGGGAAA	660
TGGTATGTCA ACACAACGAA CATTGATGGG TTCCGGCTTG ATGCCGTCAA GCATATTAAG	720
TTCAGTTTT TTCCTGATTG GTTGTCTAT GTGCGTTCTC AGACTGGCAA GCCGCTATTT	780
ACCGTCGGGG AATATTGGAG CTATGACATC AACAGTTGC ACAATTACAT TACGAAAACA	840
GACGGAACGA TGTCTTGTT TGATGCCCG TTACACAAACA AATTTATAC CGCTTCCAAA	900
TCAGGGGGCG CATTGATAT GCGCACGTTA ATGACCAATA CTCTCATGAA AGATCAACCG	960
ACATTGGCCG TCACCTTCGT TGATAATCAT GACACCGAAC CC GGCCAAAGC GCTGCAGTCA	1020
TGGGTCGACC CATGGTTCAA ACCGTTGGCT TACGCCCTTA TTCTAACTCG GCAGGAAGGA	1080
TACCCGTGCG TCTTTATGG TGACTATTAT GGCATTCCAC AATATAACAT TCCTTCGCTG	1140
AAAAGCAAAA TCGATCCGCT CCTCATCGCG CGCAGGGATT ATGCTTACGG AACGCAACAT	1200
GATTATCTTG ATCACTCCGA CATCATCGGG TGGACAAGGG AAGGGGGCAC TGAAAAACCA	1260
GGATCCGGAC TGGCCGCACT GATCACCGAT GGGCCGGAG GAAGCAAATG GATGTACGTT	1320
GGCAAACAAAC ACGCTGGAAA AGTGTCTAT GACCTTACCG GCAACCGGAG TGACACCGTC	1380
ACCATCAACA GTGATGGATG GGGGAATTG AAAGTCAATG GCGGTTCGGT TTGGTTTGG	1440
GTTCCTAGAA AAACGACCGT TTCTACCATC GCTCGGCCGA TCACAACCCG ACCGTGGACT	1500
GGTGAATTAG TCCGTTGGAC CGAACACCGG TTGGTGGCAT GGCCTTGA	1548

## (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 GTTCGAGAT GCTGCTGAAG	120
AGATTATTAA AAAGCTGAAA GCAAAAGGCT ATCAATTGGT AACTGTATCT CAGCTTGAAG	180
AAGTGAAGAA GCAGAGAGGC TATTGAATAA ATGAGTAGAA GCGCCATATC GGCGCTTTTC	240

TTTGGAAGA AAATATAGGG AAAATGGTAC TTGTTAAAAA TTCGGAATAT TTATACAACA	300
TCATATGTTT CACATTGAAA GGGGAGGAGA ATCATGAAAC AACAAAAACG GCTTTACGCC	360
CGATTGCTGA CGCTGTTATT TGCCTCCTGC CTCATTCTGC AGCAGCGCG	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
10 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
20 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
30 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

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 AATCCGTTT	1912
TTTATTTT	1920

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

10

- (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 GATGATTG	60
CTGAAGAACT GGATCGATTG TTTGAGAAAA GAAGAAGACC ATAAAAATAC CTTGTCTGTC	120
ATCAGACAGG GTATTTTTA TGCTGTCCAG ACTGTCCGCT GTGTAAAAAT AAGGAATAAA	180
GGGGGGTTGT TATTATTTA CTGATATGTA AAATATAATT TGTATAAGAA AATGAGAGGG	240
AGAGGAAACA TGATTCAAAA ACGAAAGCGG ACAGTTCGT 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

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 AAG 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 CTTGGAGGTG CGTTTATTTT	1854
TTCAGCCGTA TGACAAGGTC GGCATCAGGT GTGACAAATA CGGTATGCTG GCTGTCATAG	1914
GTGACAAATC CGGGTTTGC GCCGTTGGC TTTTCACAT GTCTGATTT TGTATAATCA	1974
ACAGGCACGG AGCCGGAATC TTTCGCCCTG GAAAAATAAG CGGGCATCGT AGCTGCTTCC	2034
AATATGGATT GTTCATCGGG ATCGCTGCTT TTAATCACAA CGTGGGATCC	2084

## (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 CAATATTCG AATGGTATTT GCCAAATGAC	60
GGGAATCATT GGAACAGGT GAGGGATGAC GCAGCTAACT TAAAGAGTAA AGGGATAACA	120
GCTGTATGCA TCCCACCTGC ATGGAAGGGG ACTTCCCAGA ATGATGTAGG TTATGGAGCC	180
TATGATTTAT ATGATCTTGG AGAGTTAAC CAGAAGGGG CGGTCGTAC AAAATATGGA	240
ACACCGCAACC AGCTACAGGC TGCGGTGACC TCTTAAAAA ATAACGGCAT TCAGGTATAT	300
GGTGATGTCG TCATGAATCA TAAAGGTGGA GCAGATGGTA CGGAAATTGT AAATGCGGTA	360
GAAGTGAATC GGAGCAACCG AAACCAGGAA ACCTCAGGAG AGTATGCAAT AGAACCGTGG	420
ACAAAAGTTG ATTTTCTTGG AAGAGGAAAT AACCATTCCA GCTTTAAGTG GCGCTGGTAT	480
CATTTGATG GGACAGATTG GGATCAGTCA CGCCAGCTTC AAAACAAAAT ATATAAATTC	540
AGGGGAACAG GCAAGGCCTG GGACTGGAA GTCGATACAG AGAATGGCAA CTATGACTAT	600
CTTATGTATG CAGACGTGGA TATGGATCAC CCAGAAGTAA TACATGAACT TAGAAACTGG	660
GGAGTGTGGT ATACGAATAC ACTGAACCTT GATGGATTAA GAATAGATGC AGTGAACAT	720
ATAAAATATA GCTTTACGAG AGATTGGCTT ACACATGTGC GTAACACCAC AGGTAAACCA	780
ATGTTTGCAG TGGCTGAGTT TTGGAAAAAT GACCTTGGTG CAATTGAAAA CTATTGAAT	840
AAAACAAGTT GGAATCACTC GGTGTTGAT GTTCCTCTCC ACTATAATT GTACAATGCA	900
TCTAATAGCG GTGGTTATTA TGATATGAGA AATATTTAA ATGGTTCTGT GGTGCAAAAA	960
CATCCAACAC ATGCCGTTAC TTTGTTGAT AACCATGATT CTCAGCCCGG GGAAGCATTG	1020
GAATCCTTTG TTCAACAATG GTTTAAACCA CTTGCATATG CATTGGTTCT GACAAGGGAA	1080
CAAGGTTATC CTTCCGTATT TTATGGGAT TACTACGTA TCCCAACCCA TGGTGTCCG	1140
GCTATGAAAT CTAAAATAGA CCCTCTCTG CAGGCACGTC AAACTTTGC CTATGGTACG	1200
CAGCATGATT ACTTTGATCA TCATGATATT ATCGGTTGGA CAAGAGAGGG AAATAGCTCC	1260
CATCCAAATT CAGGCCCTGC CACCATTATG TCAGATGGTC CAGGTGGTAA CAAATGGATG	1320
TATGTGGGAA AAAATAAAGC GGGACAAGTT TGGAGAGATA TTACCGGAAA TAGGACAGGC	1380
ACCGTCACAA TTAATGCAGA CGGATGGGT AATTCTCTG TTAATGGAGG GTCCGTTCG	1440
GTGGGTGA AGCAA	1455

## (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)

## (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
TATGATCTT ATGATTTAGG GGAATTTAAT CAAAAGGGG CGGTTCTAC TAAGTATGGG	240
ACACGTAGTC AATTGGAGTC TGCCATCCAT GCTTAAAGA ATAATGGCGT TCAAGTTAT	300
GGGGATGTAG TGATGAACCA TAAAGGAGGA GCTGATGCTA CAGAAAACGT TCTTGCTGTC	360
GAGGTGAATC CAAATAACCG GAATCAAGAA ATATCTGGG ACTACACAAT TGAGGCTTGG	420
ACTAAGTTG ATTTCCAGG GAGGGTAAT ACATACTCAG ACTTTAAATG GCGTTGGTAT	480
CATTTCGATG GTGTAGATTG GGATCAATCA CGACAATTCC AAAATCGTAT CTACAAATTC	540
CGAGGTGATG GTAAGGCATG GGATTGGAA GTAGATTGG AAAATGGAAA TTATGATTAT	600
TTAATGTATG CAGATGTAGA TATGGATCAT CCGGAGGTAG TAAATGAGCT TAGAAGATGG	660
GGAGAATGGT ATACAAATAC ATAAATCTT GATGGATTAA GGATCGATGC GGTGAAGCAT	720
ATAAATATA GCTTACACG TGATTGGTTG ACCCATGTAA GAAACGCAAC GGGAAAAGAA	780
ATGTTTGTG TTGCTGAATT TTGGAAAAAT GATTTAGTG CCTTGGAGAA CTATTTAAAT	840
AAAACAAACT GGAATCATTC TGTCTTGAT GTCCCCCTTC ATTATAATCT TTATAACGCG	900
TCAAATAGTG GAGGCAACTA TGACATGGCA AAACCTCTTA ATGGAACGGT TGTCAAAAG	960
CATCCAATGC ATGCCGTAAC TTTTGTGGAT AATCACGATT CTCAACCTGG GGAATCATTA	1020
GAATCAATTG TACAAGAATG GTTAAAGCCA CTTGCTTATG CGCTTATTTT ACAAGAGAA	1080
CAAGGCTATC CCTCTGTCTT CTATGGTGAC TACTATGGAA TTCCAACACA TAGTGTCCC	1140
GCAATGAAAG CCAAGATTGA TCCAATCTTA GAGGCGCGTC AAAATTTGC ATATGGAACA	1200
CAACATGATT ATTTGACCA TCATAATATA ATCGGATGGA CACGTGAAGG AAATACCACG	1260
CATCCCAATT CAGGACTTGC GACTATCATG TCGGATGGGC CAGGGGGAGA GAAATGGATG	1320
TACGTAGGGC AAAATAAACG AGGTCAAGTT TGGCATGACA TAACTGGAAA TAAACCAGGA	1380
ACAGTTACGA TCAATGCAGA TGGATGGCT AATTTTCAG TAAATGGAGG ATCTGTTCC	1440
ATTTGGGTGA AACGA	1455

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 60 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single

10

20

30

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

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

caaaatcgta tctacaaaatt c123456a7g 8910tgggatt  
 11ggaagtaga ttccggaaaat  
 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:

20

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:

30

CGATTGCTGA CGCTGTTATT TGCG 24

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

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:

CTTGTCCCT TGTCAGAAC C 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:

CCCAGTCCCC CGTACGTCCC CTGAATTATATA 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:

CCCAGTCCCC GNTCTTCCCC CTGAATTATAT ATATTTTG

38

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

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: 10  
 (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:

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 20  
 (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 CTTTTGAACA ACCG

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 30  
 (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:

CCCAAAATGA 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  
 (iii) 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 ATAACTCACG 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 ATCTCTCACG 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 ACGAAATTTC 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:

GCTGAATTTC GGTCGAATGA TTTAGGTGCC

30

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 34:		
(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 DA11"		
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 34:		
GCTGAATTT GGTCGAATGA TTTAGGTGCC	30	10
2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 35:		
(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 DA21"		
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 35:		
GAATTGGAA AGTACGATT AGGTCGG	27	
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 36:		
(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:		
(B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA12"		
(ix) FEATURE:		
(A) NAME/KEY: misc-feature		
(B) LOCATION: 12,13		
(D): OTHER INFORMATION: /Note:R= mixture of A and G Y= mixture of C and T		
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 36:		
GGAAAAACGA TRYCGGTGCC TTGGAGAAC	29	20
(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"		

(ix) FEATURE:  
 (A) NAME/KEY: misc-feature  
 (B) LOCATION: 14,15  
 (D): OTHER INFORMATION: /Note:R= mixture of A and G  
                           Y= mixture of C and T  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 37

GATTTAGGTG CCTRYCAGAA CTATTTA

27

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 38:

(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 DA08"  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 38:

CCCCCTTCAT GAGAACATTT ATAACCG

26

10

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 39:

(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 DA04"  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 39:

GAATCCGAAC CTCATTACAC ATTG

25

20

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 38 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 DA05"  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 40:

CGGATGGACT CGAGAAGGAA ATACCACG

38

30

2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 41:

(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:

40

(A) NAME/KEY: misc-feature:  
 (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA10"  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 41:  
 CGTAGGGCAA AATCAGGCCG GTCAAGTTG 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:  
   (A) NAME/KEY: misc-feature:  
   (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA22"  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 42:  
 CATAACTGGA AATCGCCCGG GAACAGTTAC G 31 10

(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:  
   (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 20

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  
 (ix) FEATURE:  
   (A) NAME/KEY: misc-feature:  
   (B) OTHER INFORMATION: /desc = "Primer DA23"  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 44:  
 GGAAATAAAC CAGGACCCGT TACGATCAAT GC 30 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  
 (ix) FEATURE: 40

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

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 GGCGCAATGA 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 TGAGAATTAA 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 TAAGAATTAA 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"

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 49:  
GTGTTGACG TCCCGCTTCA TGCCAATTAA 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 GATACCCTGA GGTTTTCTAC 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:

GTATGATTAA GGAGAATTCC

20

20

【図 1】

1	HNGNNTMM QYFWYIPLND GHINWNLRRD ASNLENRGKT AWIPPAWKG 2 ..NNGNNTMM QYFWYIPLND GHINWNLRSQ ASNLENRGKT AWIPPAWKG 3 HNGNNTMM QYFWYIPLND GHINWNLRRD ASNLENRGKT AWIPPAWKG 4 ...YNGTMM QYFWYIPLND GHINWNLRRD ASNLENRGKT AWIPPAWKG 5 ..ANLNGTMM QYFWYIPLND GHINWNLQND ASNLENRGKT AWIPPAWKG 6 .APPNNGTMM QYFWYIPLND GHINWNLQND ASNLENRGKT AWIPPAWKG	50
51	TSQNDVGYA YDLVIDGEFN QKGTVRTKYQ TRSQLEAIIH ALKNQGQVY 2 ASNDVGYA YDLVIDGEFN QKGTVRTKYQ TINQQLQAVN ALKNQGQVY 3 TSQNDVGYA YDLVIDGEFN QKGTVRTKYQ TINQQLQAVT SIKNQGQVY 4 LSQSDNGYGF YDLVIDGEFH QKGTVRUKYQ TKEQDQALG SLSRNQVY 5 TSDADVGYA YDLVIDGEFH QKGTVRUKYQ TKEQDQALK SLHSDRDNVY 6 TSRSNDVGYA YDLVIDGEFN QKGTVRTKYQ TRAQQLQAIQ RAHAGQVY	100
101	GDVVMNHKGK ADATENVIAT EVNPNNRQNQ LGSDNTIAEW TKFDPGRGN 2 GDVVMNHKGK ADATENVIAT EVNPNNRQNQ VEGETIATW TKFDPGRGN 3 GDVVMNHKGK ADGETIVNAW EVNPNNRQNQ TSEPAIATW TKFDPGRGN 4 GDVVLNHKGK ADATEDVPAV EVNPNNRQNQ TSEETQIATW TKFDPGRGN 5 GDVVTNHKGK ADATEDVPAV EVPAPDRNRY ISGENLILKAW THEFPERGS 6 ADVFEDHKKG AGTGEWDAV EVNPNNRQNQ ISGTQIQAWE TKFDPGRGN	150
151	TYSDEKHWY HFDGVMDQH RQFQRIYKF RGDKDADWE VDSENGNYDY 2 THNSFKHWY HFDGVMDQH RQLNKKYKF RGDKDADWE VDSENGNYDY 3 NHSSFKHWY HFDGVMDQH RQLNKKYKF RGDKDADWE VDSENGNYDY 4 TYSDEKHWY HFDGVMDQH RKL.BRIKF RGDKDADWE VDSENGNYDY 5 TYSDEKHWY HFDGVMDQH RKL.NRIYKF .QCKADADWE VDSENGNYDY 6 TYSSEKHWY HFDGVMDQH RKL.SRIYKF RGDKDADWE VDSENGNYDY	200
201	1 LMYADLMDH PEVNNELRW GEMYNTINL DGFRLDAVKH IKYSFTRDWL 2 LMYADLMDH PEVNNELRNW GHWYNTINL DGFRLDAVKH IKYSFTRDWL 3 LMYADLMDH PEVTHELRNW GHWYNTINL DGFRLDAVKH IKYSFTRDWL 4 LMYADLMDH PDVVAETKRW GHWYNEELSL DGFRLDAVKH IKYSFTRDWL 5 LMYADLMDH PDAEAEIKRW GHWYNEELOL DGFRLDAVKH IKYSFTRDWL 6 LMYADLMDH PEVYTELKRW GHWYNTINL DGFRLDAVKH IKYSFTRDWL	250
251	1 THVRNATGKE MFVAAEFWKW DLGALENYLN KTGNRHSYED VPHYQHLYNA 2 IHRSATGKN MFVAAEFWKW DLGATELYLN KTGNRHSYED VPHYHNFYNA 3 THVRNATGKP MFVAAEFWKW DLGAEIENYN KTISWHSAED VPHYHNUYNA 4 ORVROTAKKE MFTVAEYWN NACKLENYN KTISPNQSYED VPHENLQAA 5 NHVREKTKKE MFTVAEYWN DLGALENYLN KTGNRHSYED VPHYQHRAA 6 SYVRSQTGKP LFTVGEYWSY DINKLNHYIT KTDGTMMSLFD APLHNKFYTA	300

Fig. 1 (continued)

Fig. 1

301 SNSGGNYDMA KLINGTIVQK HEMHATVFD NHDSQFGESL ESTFVQFWFP  
 1 SKSGGYIDMR QINNGTVYOR HEMHATVFD NHDSQFGEAL ESTFVQFWFP  
 2 SNSGGYIDMR NLLNGSVQK HETHATVFD NHDSQFGEAL ESTFVQFWFP  
 3 SNSGGYIDMR RULLGTVUSR HEPKATVFE NHDTQFQSL ESTFVQFWFP  
 4 STQGGYIDMR KLINGTIVSK HPLKSVTVE NHDTQFQSL ESTFVQFWFP  
 5 SKSGGAFDMR TLMNTMLKD QFTLAVTFD NHDTPEQSL QSWWDWFWFP  
 6

351 400  
 1 LAYAFLITRE QGPSPFYGD YYGIPTHG.. .VPAMKSKID PILEAQONFA  
 2 LAYAFLITRE QGPSPFYGD YYGIPTHG.. .VPAMKSKID PILEAQONFA  
 3 LAYAFLITRE QGPSPFYGD YYGIPTHG.. .VPAMKSKID PIIQANTEA  
 4 LAYAFLITRE SGCPQFYGD MYGTTGTFPK EIPALKONIE PILKAREYA  
 5 LAYAFLITRE SGCPQFYGD MYGTTGDSQR EIPALKONIE PILKARKOJA  
 6 LAYAFLITRQ EGPCVFYGD YYGIPQYN.. .IPSLSKSKID PLIARRDYA

401 450  
 1 YGTQHDXFDH HNLTIGWTREG NTHPNNSGLA TIMSDGPGGE KNNYVGONKA  
 2 YGRQN... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
 3 YGTQHDXFDH HDITGWTREG NSHNSGLA TIMSDGPGGN KNNYVGONKA  
 4 YGPQHDXFDH PDVIGWTREG DSAAKNSGLA ALITDGPGGS KNNYAGLNA  
 5 YGAQHDXFDH HDIVGWTREG DSSVANSGLA ALITDGPGGA KNNYVRQNA  
 6 YGTQHDXFDH SDITGWTREG GTEKPSGGLA ALITDGPGGS KNNYVGQHA

Fig.1 (continued)

Fig. 1 (continued)

【図2】

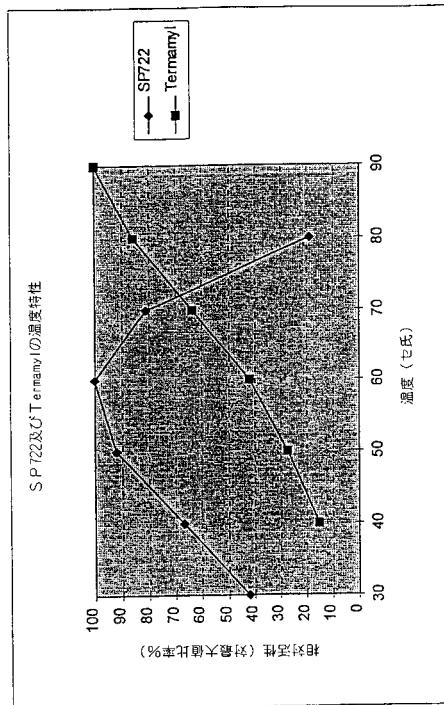


Fig. 2

【図3】

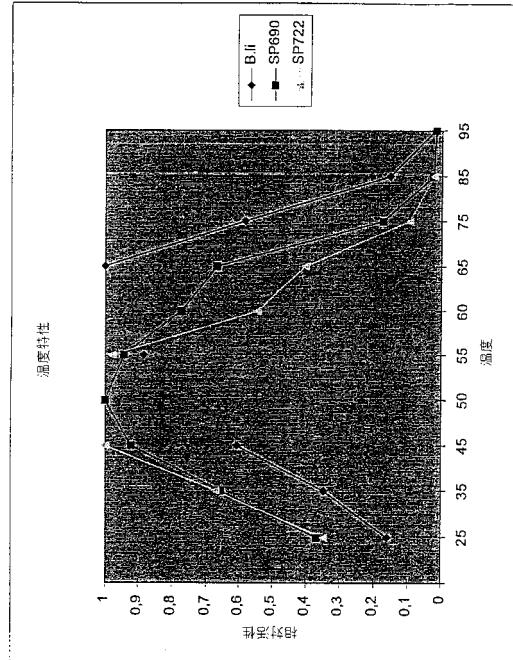


Fig. 3

351	4.00	1	MKFVLLISLI	GFCWAQYDHP	TSDG -RTAV HLFERWWDI AKCECYLAP	1	MKFVLLISLI	GFCWAQYDHP	TSDG -RTAV HLFERWWDI AKCECYLAP
352	4.00	2	FTRMSSYR NWRFNQNGDQ NDWIGPNNN GVTKEVTINA DTTGGRWVC	GFWAQYDHP	TADG RTAV HLFERWWDI AKCECYLAP	2	LISLI	GFWAQYDHP	TADG RTAV HLFERWWDI AKCECYLAP
353	4.00	3	FTRMSSYR TRAFQNGDQ NDWIGPNNN GVTKEVTINA DTTGGRWVC	... . . . .	... . . . .	3	... . . . .	... . . . .	... . . . .
354	4.00	4	FTRMSSYR ARNFNGEDV NDWIGPNNN GVIKEVTINA DTTGGRWVC	... . . . .	... . . . .	4	MKFLLIFTI	GFCWAQYSPN	TQOG RTAV HLFERWWDI AKCECYLAP
355	4.00	5	FTRMSSYR PROFQGNDV NDWIGPNNN GVIKEVTINA DTTGGRWVC	... . . . .	... . . . .	5	MKLNKLITTA	GLSGLGILPS	IRATATPEV HLFERWWDQV AQCECYLGP
356	4.00	1	YPRMSSY . . . DEHJDTDA GSPRYFVANN GNLE . . . . .	... . . . .	... . . . .				
357	4.00	1	EHRMRQIRNM VAFRNVNGQ . PFSNWDDNN SNOVAFSRGN RGFTIVPNDD	PNENVVVHNP	SEPPWERTQPQ ISYKLCTRSG NEEDEFRMVT	1	KGFGQYQVSP	PNENVVVHNP	SEPPWERTQPQ ISYKLCTRSG NEEDEFRMVT
358	4.00	2	EHRMRQIRNM VAFRNVNGQ . PFAWWDDNG SNOVAFSRGN RGFTIVPNDD	KGFGQYQVSP	PHENILINNP SRPWERTQPQ ISYKLCTRSG NEEDEFRMVT	2	KGFGQYQVSP	KGFGQYQVSP	PHENILINNP SRPWERTQPQ ISYKLCTRSG NEEDEFRMVT
359	4.00	3	EHRMRQIRNM VAFRNVNGQ . PFAWWDDNG SNOVAFSRGN RGFTIVPNDD	KGFGQYQVSP	PNENVVUTNP SRPWERTQPQ VSYKLCTRSQ NEEDEFRMVT	3	KGFGQYQVSP	KGFGQYQVSP	PNENVVUTNP SRPWERTQPQ VSYKLCTRSQ NEEDEFRMVT
360	4.00	4	EHRMRQIRNM VAFRNVNGQ . PFTWYDNG SNOVAFSRGN RGFTIVPNDD	KGFGQYQVSP	PNENVVATYP PRPWERTQPQ VSYKLCTRSQ NEEDEFRMVT	4	KGFGQYQVSP	KGFGQYQVSP	PNENVVATYP PRPWERTQPQ VSYKLCTRSQ NEEDEFRMVT
361	4.00	5	EHRMRQIRNM VAFRNVNGQ . PFTWYDNG SNOVAFSRGN RGFTIVPNDD	KGFGQYQVSP	PNEHL . . . T GSQWNTTQPQ VSYKLCTRSQ NEEDEFRMVT	5	KGFGQYQVSP	KGFGQYQVSP	PNEHL . . . T GSQWNTTQPQ VSYKLCTRSQ NEEDEFRMVT
362	4.00	1	WALSATLQTG LPACTYCDV SGDKVUD . N CTGLRVNGS DGKAHFJISN	101	RCNNVGVR	VDAVINHMCG AGNPACTSST CGSYLNPNNR EFPAVPSAW	1	RCNNVGVR	VDAVINHMCG AGNPACTSST CGSYLNPNNR EFPAVPSAW
363	4.00	2	WALSATLQTG LPACTYCDV SGDKVUD . N CTGLRVNGS DGKAHFJISN	101	RCNNVGVR	SNSAGTGST CGSYLNPNNR EFPAVPSAW	2	RCNNVGVR	SNSAGTGST CGSYLNPNNR EFPAVPSAW
364	4.00	3	WLSSTLQTG LPACTYCDV SGDKVUD . S CTGIKVYSS DGKAHFJISN	101	RCNNVGVR	SQAAAGTGTT CGSYLNPNNR EFPAVPSAW	3	RCNNVGVR	SQAAAGTGTT CGSYLNPNNR EFPAVPSAW
365	4.00	4	WLSSTLQTG LPACTYCDV SGDKVUD . S CTGIKVYSS DGKAHFJISN	101	RCNNVGVR	NMSAGTGST CGSYLNPNNR EFPAVPSAW	4	RCNNVGVR	NMSAGTGST CGSYLNPNNR EFPAVPSAW
366	4.00	5	STLATVQTD MASSQYCNVL KGLSLADAK CSQEYLTVNS DGTINLIGA	101	RCNNVGVR	RCNNVGVR	5	RCNNVGVR	RCNNVGVR
367	4.00	1	SAEDPFIAH ADSKL . . . . .	151	RCNNVGVR	RCNNVGVR	1	DENDNKCN .	RCNNVGVR
368	4.00	2	SAEDPFIAH ADSKL . . . . .	151	RCNNVGVR	RCNNVGVR	2	YDNUNKCN .	RCNNVGVR
369	4.00	3	SAEDPFIAH AESKL . . . . .	151	RCNNVGVR	RCNNVGVR	3	DENDKCKTA	RCNNVGVR
370	4.00	4	SAEDPFIAH AESKL . . . . .	151	RCNNVGVR	RCNNVGVR	4	DENDKCKTA	RCNNVGVR
371	4.00	5	WDA . . . MAIH KOKNLNTSSA S	151	RCNNVGVR	RCNNVGVR	5	DFFHS . CTIN NSDG . . .	RCNNVGVR
372	4.00	1	SAEDPFIAH ADSKL . . . . .	200	RCNNVGVR	RCNNVGVR	1	DENDNKCN .	RCNNVGVR
373	4.00	2	SAEDPFIAH ADSKL . . . . .	200	RCNNVGVR	RCNNVGVR	2	YDNUNKCN .	RCNNVGVR
374	4.00	3	SAEDPFIAH AESKL . . . . .	200	RCNNVGVR	RCNNVGVR	3	DENDKCKTA	RCNNVGVR
375	4.00	4	SAEDPFIAH AESKL . . . . .	200	RCNNVGVR	RCNNVGVR	4	DENDKCKTA	RCNNVGVR
376	4.00	5	WDA . . . MAIH KOKNLNTSSA S	200	RCNNVGVR	RCNNVGVR	5	DFFHS . CTIN NSDG . . .	RCNNVGVR

Fig. 4

Fig. 4 (continued)

		250
201	1 HLDIGVAGF RLDAKENWPP RDIKAVLDKL HLNLNTKWFQ SGDPIFEDEV 2 NLIDIGVAGF RLDAKENWPP GDIKAVLDKL HLNLNTKWFQ SGDPIFEDEV 3 KLIDIGVAGF RLDAKENWPP GDIKAVLDKL HLNLNTKWFQ SGDPIFEDEV 4 HLDIGVAGF RLDAKENWPP GDIKAVLDKL HLNLNSNWPPA GSKPIFEDEV 5 DLQIGVCFK REPADSKHVA SDIQSMARY N ..... . GSPVVEQEV	300
251	1 IDLGGEAIKG SEYFGNCRVT EFKYGAKLGT VIKRGNGEKM SYLKWNGBGW 2 IDLGGEAIKG SEYFGNCRVT EFKYGAKLGT VIKRGNGEKM SYLKWNGBGW 3 IDLGGEAIKS GEYFSNCRVT EFKYGAKLGT VIKRGNGEKM SYLKWNGBGW 4 IDLGGEPIKS SDYFGNCRVT EFKYGAKLGT VIKRGNGEKM SYLKWNGBGW 5 IDQGEEAYA SEVLSTLGVLT EFKYSTELGN TFR .. . NGSL AWLSNFGGW	350
301	1 GLVPSDRALV FVDNHNDQRG HGAGGSSILT FDADMVKMA VGEMLAHYG 2 GFVPDTRALV FVDNHNDQRG HGAGGSSILT FDADMVKMA VGEMLAHYG 3 GFMPSSDRALV FVDNHNDQRG HGAGGSSILT FDADMVKMA VGEMLAHYG 4 GFVPSDRALV FVDNHNDQRG HGAGGSSILT FDADMVKMA VGEMLAHYG 5 GFMPSSSAV FVDNHNDQRG HGAGGSSILT FDADMVKMA VGEMLAHYG	350

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- 2880 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
イーゼルスカブ  
(72)発明者 スペンセン, アラン  
デンマーク国, デーコー- 2880 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
イーゼルスカブ  
(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- 2880 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
イーゼルスカブ  
(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- 2880 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
イーゼルスカブ  
(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- 2880 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
イーゼルスカブ  
(72)発明者 キヤエルルフ, セーレン  
デンマーク国, デーコー- 2880 バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクテ  
イーゼルスカブ

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