

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4086207号  
(P4086207)

(45) 発行日 平成20年5月14日(2008.5.14)

(24) 登録日 平成20年2月29日(2008.2.29)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/56	(2006.01)	C 1 2 N 9/56	
C 1 2 R 1/125	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
		C 1 2 R 1:125	

請求項の数 7 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-512013  
 (86) (22) 出願日 平成6年10月13日(1994.10.13)  
 (65) 公表番号 特表平9-504170  
 (43) 公表日 平成9年4月28日(1997.4.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1994/011562  
 (87) 国際公開番号 W01995/010615  
 (87) 国際公開日 平成7年4月20日(1995.4.20)  
 審査請求日 平成13年9月11日(2001.9.11)  
 (31) 優先権主張番号 08/137,240  
 (32) 優先日 平成5年10月14日(1993.10.14)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500284580  
 ジェネンコー・インターナショナル・イン  
 ク  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ  
 ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
 (74) 代理人 100071010  
 弁理士 山崎 行造  
 (72) 発明者 グレイカー, トーマス ピー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 940  
 44, パシフィカ, マンザニタ 1166  
 (72) 発明者 ボット, リチャード アール.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 940  
 10, バーリンゲーム, ヒルサイド ドラ  
 イブ 3032

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ズブチリシン変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

先駆体ズブチリシンに由来する、天然では見いだせないアミノ酸配列を有するズブチリシン変異体であって、バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンのN76D/S103A、N76D/V104I、N76D/I107V、又はN76D/S99D/S101Rに相当するアミノ酸残基の置換を含んで成る変異体であって、前記ズブチリシン変異体が前記先駆体カルボニルヒドロラーゼにおけるバチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンと比較した場合、改善された洗浄性能を有することを特徴とする、カルボニルヒドロラーゼ変異体。

【請求項2】

前記バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの  
 N76D/S99D/S103A、N76D/S101R/S103A、N76D/S101R/V104I、N76D/S103A/V104I、N76D/V104I/I107V、N76D/S99D/S101R/S103A、N76D/S99D/S101R/V104I、N76D/S101R/S103A/V104I、N76D/S103A/V104I/S128G、N76D/S103A/V104I/D197E、N76D/S103A/V104I/S105A、N76D/S103A/V104I/L135I、N76D/S103A/V104I/L126F、N76D/S103A/V104I/P210I、に相当するアミノ酸残基の置換を含む、請求項1のズブチリシン変異体。

## 【請求項 3】

バチルス・ズブチリシンに由来する、請求項 1 又は 2 に記載のズブチリシン変異体。

## 【請求項 4】

バチルス・レントス・ズブチリシンに由来する、請求項 3 に記載のズブチリシン変異体。

## 【請求項 5】

請求項 1 又は 2 に記載のズブチリシン変異体をコードする DNA。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載の DNA をコードする発現ベクター。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

10

## 【発明の詳細な説明】

関連出願のクロスリファレンス

本願は1993年10月14日に提出され(係属中)、そして引用することで全体を本明細書に組入れる米国出願08/137,240号の一部継属出願である。

発明の分野

本発明に新規のカルボニルヒドロラーゼ変異体であって、先駆体カルボニルヒドロラーゼの複数のアミノ酸残基、詳しくはバチルス・アミロリケファシエンス(*Bacillus amyloliquefaciens*)ズブチリシンにおける残基+76、それとの組合せにおける+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及び/又は+274より成る群から選ばれる1又は複数の残基に対応又は相当する位置にある複数のアミノ酸残基が別のアミノ酸により置換されているアミノ酸配列を有するカルボニルヒドロラーゼ変異体に関する。一般に、かかる突然変異体/変異体カルボニルヒドロラーゼは、天然又は組換えカルボニルヒドロラーゼをコードする先駆体DNA配列を、先駆体アミノ酸配列の複数の上記のアミノ酸残基置換をコードするように、*in vitro*修飾することによって得られるものであり、ここでこの置換は単独でも、先駆体アミノ酸配列のその他の置換、挿入もしくは欠失と組合せてもよい。

20

発明の背景

セリンプロテアーゼはカルボニルヒドロラーゼのサブグループである。これらは幅広い特異性及び生物学的機能を有する多種多様なクラスの酵素を含んで成る。Stroud, R. *Sci. Amer.*, 131: 74-88。その機能の多様性にもかかわらず、セリンプロテアーゼの触媒機構は少なくとも2種類の遺伝子的に異なる酵素のファミリーによりアプローチされている: 即ち、ズブチリシン及び哺乳動物キモトリプシンに近縁且つ相同性の細菌セリンプロテアーゼ(例えば、トリプシン及び*S. gresius*(*S. gresius*)トリプシン)。これら2ファミリーのセリンプロテアーゼは著しく類似し触媒機構を示す。Kraut, J. (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 331-358。更に、一次構造は近縁でないが、これら2種の酵素ファミリーの三次構造は共にセリ、ヒスチジン及びアスパラギン酸より成るアミノ酸の保存性触媒トリアドを寄せ集めている。

30

ズブチリシンは多種多様なバチルス種及びその他の微生物から大量に分泌されるセリンエンドプロテアーゼ(MW 27,500)である。ズブチリシンのタンパク質配列は少なくとも4種類のバチルス種から決定されている。Markland, F.S.ら(1983), *Honne-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364: 1537-1540。バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの2.5解像度での三次元結晶グラフィック培養も報告されている。Wright, C.S.ら(1969), *Nature*, 221: 235-242; Drenth, J.,ら(1972) *Eur. J. Biochem.*, 26: 177-181。これらの研究は、ズブチリシンが哺乳動物セリンプロテアーゼとは遺伝的に近縁しているが、それは似たような活性部位構造を有することを示唆している。共有結合ペプチドインヒビターを含むズブチリシン(Robertus, J.D.ら(1972), *Biochemistry*, 11: 2439-2449)又は生成複合物(Robertus, J.D.ら(1976), *J. Biol. Chem.*, 251: 1097-1103)のX線結晶構造も、ズブチリシンの活性部位及び推定の基質結合性クレフト(裂目)についての情報を提供する。更に、ズブチリシンについての数多くの動力学的及び化学的修飾研究が報告されており(Ph

40

50

ilipp, M.ら (1983), Mol. Cell. Biochem., 51: 5-32; Svendsen, B. (1976), Carlsberg Res. Comm., 41: 237-291; Markland, F.S. (Id))、また少なくとも一人は、ズブチリンの残基22にあるメチオニンの側鎖を過酸化水素によりメチオニン - スルホキシドに変換すること (Stauffer, D.C., ら (1965), J. Biol. Chem., 244: 5333-5338) 及び残基221にあるセリンの側鎖を化学修飾によりシステインに変換すること (Polgarら (1981), Biochimica et Biophysica Acta, 667: 351-354) を報告している。

米国特許第4,760,025号 (RE 34,606) は、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリンのチロシン - 1、アスパラギン酸 + 32、アスパラギン + 155、チロシン + 104、メチオニン + 222、グリシン + 166、ヒスチジン + 64、グリシン + 169、フェニルアラニン + 189、セリン + 33、セリン + 221、チロシン + 217、グルタミン酸 + 156及びアラニン + 152の位置に対応するズブチリンアミノ酸残基の修飾を開示している。米国特許第5,182,204号は、有用なズブチリンの突然変異体又は変異体を形成するための、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリンのアミノ酸 + 224残基及びその他のズブチリンの相当位置の修飾を開示しており、これは置換、挿入又は欠失により修飾され、そして米国特許第4,760,025号 (RE 34,606) に示されている残基への修飾と組合せることができる。米国特許第5,155,033号は B . アミロリケファシエンス・ズブチリンの + 225に相当する位置に修飾を有する類似の突然変異ズブチリンを開示する。米国特許第5,185,258号及び5,204,015号は位置 + 123及び / 又は + 274に修飾を有する突然変異ズブチリンを開示する。これらの特許の開示内容、同様にズブチリン内の数多くのアミノ酸残基、例えば特に + 99, + 101, + 103, + 107, + 126, + 128, + 135, + 197及び + 204の残基の修飾を開示する米国出願 SN07 / 898,382号の開示内容を引用することで本明細書に組入れる。これらの特許 / 出願は全て共有のものである。米国特許第4,914,031号は位置 + 76において修飾されたズブチリンを含む一定のズブチリン類似体を開示する。この特許の開示内容も引用することで本明細書に組入れる。しかしながら、本明細書に記載の特定の残基及び / 又は本願の請求の範囲に係る特定の組合せはこれらの文献の中で特定されていない。

従って、本発明の目的は、カルボニルヒドロラーゼ (好ましくはズブチリン) 変異体であって、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリンの位置 + 76、それとの組合せにおける + 99, + 101, + 103, + 104, + 107, + 123, + 27, + 105, + 109, + 126, + 128, + 135, + 156, + 166, + 195, + 197, + 204, + 206, + 210, + 216, + 217, + 218, + 222, + 260, + 265及び / 又は + 274の群から選ばれる 1 又は数の位置に対応する、先駆体カルボニルヒドロラーゼをコードするDNAにおける複数のアミノ酸残基の置換を含む変異体の提供にある。かかる変異体は一般に、この変異体のアミノ酸配列が由来しているカルボニルヒドロラーゼ先駆体の同種の特性と異なる少なくとも一種の特性を有する。

更なる目的はかかるカルボニルヒドロラーゼ変異体をコードするDNA配列、及びかかる変異DNA配列を含む発現ベクターの提供にある。

更に、本発明の別の目的は、かかるベクターで形質転換された宿主細胞、並びに細胞内的又は細胞外的にカルボニルヒドロラーゼ変異体を産生するようにかかるDNAを発現できる宿主細胞の提供にある。

上記の文献は単に本件の出願日前のその開示内容を紹介するために提供したものであり、そして本願のいづれの事項も、本発明者が先願に基づく先の発明又は優先権によるかかる開示内容の遡及効の資格を有する許可と考えるべきではない。

#### 本発明の概要

本発明は、非天然カルボニルヒドロラーゼ変異体であって、その変異体のアミノ酸配列が由来している先駆体カルボニルヒドロラーゼのそれとは異なるタンパク質分解活性、安定性、基質特異性、pHプロファイル及び / 又は性能特性を有する変異体を含む。この先駆体カルボニルヒドロラーゼは天然カルボニルヒドロラーゼ又は組換えヒドロラーゼであってよい。特に、かかるカルボニルヒドロラーゼ変異体は天然では見いだされないアミノ酸配列を有しており、それは先駆体カルボニルヒドロラーゼの複数のアミノ酸残基の別のアミノ酸による交換に由来する。先駆体酵素の複数のアミノ酸残基は位置 + 76、それとの組合せにおける 1 又は複数の下記の残基 + 99, + 101, + 103, + 104, + 107, + 123, + 27, + 105, +

10

20

30

40

50

109, + 126, + 128, + 135, + 156, + 166, + 195, + 197, + 204, + 206, + 210, + 216, + 217, + 218, + 222, + 260, + 265及び / 又は + 274に対応し、ここで番号位置は、パチルス・アミロリケファシエンス由来の天然ズブチリシン又はパチルス・レントス (*Bacillus lentus*) ズブチリシンの如くその他のカルボニルヒドロラーゼ又はズブチリシンの相当アミノ酸残基に対応する。本発明のカルボニルヒドロラーゼ変異体はアミノ酸残基 + 76の交換、それとの組合せにおける 1 又は複数の異なる修飾を含んで成る。好ましくは、本発明の変異酵素は下記の組合せにおけるアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を含んで成る：

76 / 99 ; 76 / 101 ; 76 / 103 ; 76 / 104 ; 76 / 107 ; 76 / 123 ; 76 / 99 / 101 ; 76 / 99 / 103 ; 76 / 99 / 104 ; 76 / 101 / 103 ; 76 / 101 / 104 ; 76 / 103 / 104 ; 76 / 104 / 107 ; 76 / 104 / 123 ; 76 / 107 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 ; 76 / 99 / 101 / 104 ; 76 / 99 / 103 / 104 ; 76 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 104 / 107 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 99 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 103 / 104 / 128 ; 76 / 103 / 104 / 260 ; 76 / 103 / 104 / 265 ; 76 / 103 / 104 / 197 ; 76 / 103 / 104 / 105 ; 76 / 103 / 104 / 135 ; 76 / 103 / 104 / 126 ; 76 / 103 / 104 / 107 ; 76 / 103 / 104 / 210 ; 76 / 103 / 104 / 126 / 265及び / 又は76 / 103 / 104 / 222。最も好ましくは、本発明の変異酵素は B . アミロリケファシエンス・ズブチリシンの下記の残基組合せにおけるアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を含んで成る：76 / 99 ; 76 / 104 ; 76 / 99 / 104 ; 76 / 103 / 104 ; 76 / 104 / 107 ; 76 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104及び76 / 101 / 104。

本発明はまたかかるカルボニルヒドロラーゼ又はズブチリシン変異体をコードする変異DNA配列を含む。これらの変異DNA配列は天然又は組換え先駆体酵素をコードする先駆体DNA配列に由来する。この変異DNA配列は、先駆体DNA配列を、パチルス・アミロリケファシエンスの位置76, 99, 101, 103, 104, 107, 123, 27, 105, 109, 126, 128, 135, 156, 166, 195, 197, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265及び / もしくは274又は任意のそれらの組合せに対応する、先駆体DNA配列によりコードされる 1 又は複数の特定のアミノ酸残基の置換をコードするように修飾することにより誘導される。本明細書で特定するアミノ酸残基は B . アミロリケファシエンスに適用できる番号付けに従って特定しているが (これは全てのズブチリシンにおける残基位置を特定するための慣用法となっている)、本発明において有用な好適なる先駆体DNA配列は図 6 に示すパチルス・レントスのDNA配列である (Seq ID No.11)。

本発明の変異DNA配列はアミノ酸残基76での挿入又は置換、それとの組合せにおける 1 又は複数の追加の修飾をコードする。好ましくは、この変異DNA配列は下記の組合せにおけるアミノ酸残基の置換又は挿入をコードする：76 / 99 ; 76 / 101 ; 76 / 103 ; 76 / 104 ; 76 / 107 ; 76 / 123 ; 76 / 99 / 101 ; 76 / 99 / 103 ; 76 / 99 / 104 ; 76 / 101 / 103 ; 76 / 101 / 104 ; 76 / 103 / 104 ; 76 / 104 / 107 ; 76 / 104 / 123 ; 76 / 107 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 ; 76 / 99 / 101 / 104 ; 76 / 99 / 103 / 104 ; 76 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 104 / 107 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 99 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 103 / 104 / 128 ; 76 / 103 / 104 / 260 ; 76 / 103 / 104 / 265 ; 76 / 103 / 104 / 197 ; 76 / 103 / 104 / 105 ; 76 / 103 / 104 / 135 ; 76 / 103 / 104 / 126 ; 76 / 103 / 104 / 107 ; 76 / 103 / 104 / 210 ; 76 / 103 / 104 / 126 / 265及び / 又は76 / 103 / 104 / 222。最も好ましくは、この変異DNA配列は下記の残基の組合せの修飾をコードする：76 / 99 ; 76 / 104 ; 76 / 99 / 104 ; 76 / 103 / 104 ; 76 / 104 / 107 ; 76 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104及び76 / 101 / 104。これらの組換えDNA配列は、新規のアミノ酸配列を有し、且つ先駆体カルボニルヒドロラーゼDNA配列によりコードされる酵素の同種の特性とは実質的に異なる少なくとも一種の特性を一般に有するカルボニルヒドロラーゼ変異体をコードする。かかる特性にはタンパク質分解活性、基質特異性、安定性、改変pHプロフィール及び / 又は向上した性能特性が含まれる。

本発明は表示のアミノ酸残基の位置にある19個の天然 L - アミノ酸のいずれかの置換を包括する。かかる置換は先駆体ズブチリシン (原核系、真核系、哺乳動物、等) において施してよい。好ましくは、特定する各アミノ酸残基の位置で施す置換には、限定することなく、以下が含まれる：

10

20

30

40

50

位置76でのD, H, E, G, F, K, P及びNを含む置換；

位置99でのD, T, N, Q, G及びSを含む置換；

位置101でのG, D, K, L, A, E, S及びRを含む置換；

位置103でのQ, T, D, E, Y, K, G, R, S及びAを含む置換；

位置104での19個全ての天然アミノ酸を含む置換；

位置107でのV, L, M, Y, G, E, F, T, S, A, N及びIを含む置換；

位置123でのN, T, I, G, A, C及びSを含む置換；

位置27でのK, N, C, V及びTを含む置換；

位置105でのA, D, G, R及びNを含む置換；

位置107でのA, L, V, Y, G, F, T, S及びAを含む置換；

10

位置109でのS, K, R, A, N及びDを含む置換；

位置126でのA, F, I, V及びGを含む置換；

位置128でのG, L及びAを含む置換；

位置135でのA, F, I, S及びVを含む置換；

位置156でのD, E, A, G, Q及びKを含む置換；

位置166での19個全ての天然アミノ酸を含む置換；

位置195でのEを含む置換；

位置197でのEを含む置換；

位置204でのA, G, C, S, 及びDを含む置換；

位置206でのL, Y, N, D及びEを含む置換；

20

位置210でのL, I, S, C及びFを含む置換；

位置216でのV, E, T及びKを含む置換；

位置217での19個全ての天然アミノ酸を含む置換；

位置218でのS, A, G, T及びVを含む置換；

位置222での19個全ての天然アミノ酸を含む置換；

位置260でのP, N, G, A, S, C, K及びDを含む置換；

位置265でのN, G, A, S, C, K, Y及びHを含む置換；並びに

位置274でのA及びSを含む置換。

かかる各位置において置換すべき特に好適なアミノ酸を以下の表Iに示す。特定のアミノ酸は表Iに示しているが、特定した残基において任意のアミノ酸が置換されることが理解されるであろう。

30

## 表 I

## アミノ酸残基

## 置換／挿入するのに好適なアミノ酸

+76	D, H	
+99	D, T, N, G	
+101	R, G, D, K, L, A, E	
+103	A, Q, T, D, E, Y, K, G, R	
+104	I, Y, S, L, A, T, G, F, M, W, D, V, N	
+107	V, L, Y, G, F, T, S, A, N	
+123	S, T, I	
+27	K	
+105	A, D,	10
+109	S, K, R	
+126	A, I, V, F	
+128	G, L	
+135	I, A, S	
+156	E, D, Q	
+166	D, G, E, K, N, A, F, I, V, L	
+195	E	
+197	E	
+204	A, G, C	
+206	L	
+210	I, S, C	
+216	V	
+217	H, I, Y, C, A, G, F, S, N, E, K	20
+218	S	
+222	A, Q, S, C, I, K	
+260	P, A, S, N, G	
+265	N, A, G, S	
+274	A, S	

更に、本発明はかかる変異カルボニルヒドロラーゼDNA配列を含む発現ベクター、及びかかる変異体を産生できるかかるベクターで形質転換された宿主細胞を含む。本発明はまた本発明のカルボニルヒドロラーゼ変異体を含んで成る洗剤に関する。

## 【図面の簡単な説明】

図1 A～Cはバチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンについてのDNA及びアミノ酸配列、並びにこの遺伝子の部分的制限地図を示す (Seq ID No. 6)。 30

図2はバチルス・アミロリケファシエンス (BPN) 及びバチルス・レントス (野生) 由来のズブチリシンの中の保存アミノ酸配列を示す。

図3 A及び3 Bは4種のズブチリシンのアミノ酸配列を示す。第1列はバチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシン由来のズブチリシン (時折りズブチリシンBPN とも呼ぶ) のアミノ酸配列を示す (Seq ID No. 7)。第2列はバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 由来のズブチリシンのアミノ酸配列を示す (Seq ID No. 8)。第3列は *B. リシェニホルミス* (*B. licheniformis*) 由来のズブチリシンのアミノ酸配列を示す (Seq ID No. 9)。第4列はバチルス・レントス由来のズブチリシン (PCT WO 89/06276においてズブチリシン309とも呼ばれている) のアミノ酸配列を示す (Seq ID No. 10)。記号はズブチリシンBPN と対比させた特定のアミノ酸残基の欠落を示す。 40

図4はプラスミドGGA274の構築を示す。

図5はGGT274の構築を示し、これは本用途において用いる一定の発現プラスミドの中間体である。

図6 A及び6 Bはバチルス・レントス由来のズブチリシンのDNA及びアミノ酸配列を示す (Seq ID No. 11)。成熟ズブチリシンタンパク質はAlaに相当するコドンCGC (334 - 336) で始まるコドンによりコードされる。

図7 A及び7 Bは本発明の好適な態様のDNA及びアミノ酸配列を示す (N76D / S103A / V104I) (Seq ID No. 12)。この図の中のDNAは位置76においてアスパラギン酸、位置103においてアラニン及び位置104においてイソロイシンをコードするように記載の方法により修飾されている。この成熟ズブチリシン変異タンパク質はAlaに相当するコドンGCG (334 - 3 50

36) で始まるコドンによりコードされる。

図 8 はベクター pBCDAICAT の構築を示す。

図 9 はベクター pUCCATFNA の構築を示す。

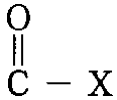
図 10 は液体洗剤の中での、野生型と比較した好適な突然変異酵素の安定性を示す。

発明の詳細な説明

バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの +76 に相当する B・レントス・ズブチリシンにおけるアミノ酸残基の *in vitro* 突然変異は、先駆体ズブチリシンに勝る改変された安定性（例えば改良された自己タンパク質分解安定性）を示すズブチリシン変異体をもたらすことが発見された（表 IV 及び VI 参照のこと）。

また、バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンにおける +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 及び / 又は +274 に相当する残基での *in vitro* 突然変異は、単独で、又は互いとの組合せで、且つ +76 突然変異との組合せにおいて、改変されたタンパク質分解活性、改変された熱安定性、改変された pH プロフィール、改変された基質特異性及び / 又は改変された性能特性を示すズブチリシン変異体をもたらすことが発見された。

カルボニルヒドロラーゼは



結合を含む化合物を加水分解する（ここで X は酸素又は窒素である）。これらには天然のカルボニルヒドロラーゼ及び組換カルボニルヒドロラーゼが含まれる。天然カルボニルヒドロラーゼは主としてヒドロラーゼ、例えばペプチドヒドロラーゼ、例えばズブチリシン又はメタロプロテアーゼを含む。ペプチドヒドロラーゼには - アミノアシルペプチドヒドロラーゼ、ペプチジルアミノ酸ヒドロラーゼ、アシルアミノヒドロラーゼ、セリンカルボキシペプチダーゼ、メタロカルボキシペプチダーゼ、チオールプロテイナーゼ、カルボキシルプロテイナーゼ及びメタロプロテイナーゼが含まれる。セリン、メタロ、チオール及び酸性プロテアーゼ、並びにエンド及びエキソ - プロテアーゼも含まれる。

「組換カルボニルヒドロラーゼ」とは、天然カルボニルヒドロラーゼをコードする DNA 配列が、カルボニルヒドロラーゼアミノ酸配列の中の 1 又は複数のアミノ酸の置換、挿入又は欠失をコードする突然 DNA 配列となるように修飾されている場合におけるカルボニルヒドロラーゼを意味する。適当な修飾法は、本明細書、並びに引用することで本明細書に組入れる米国特許第 4,760,025 号 (RE 34,606)、米国特許第 5,204,015 号及び米国特許第 5,185,258 号に開示されている。

ズブチリシンはタンパク質又はペプチドのペプチド結合を解裂するように一般的に働く細菌又は菌類カルボニルヒドロラーゼである。天然ズブチリシンのシリーズが産生されることで知られ、そして往々にして様々な微生物種により分泌される。このシリーズの構成員のアミノ酸配列は全体が相同性であるわけではない。しかしながら、このシリーズのズブチリシンは同一又は類似のタンパク質分解活性を示す。このクラスのセリンプロテアーゼは触媒トリアドを規定する共通のアミノ酸配列を共有しており、このトリアドはそれらをキモトリプシン近縁のセリンプロテアーゼクラスと差別化する。ズブチリシン及びキモトリプシン近縁セリンプロテアーゼは共にアスパラギン酸、ヒスチジン及びセリンを含んで成る触媒トリアドを有する。ズブチリシン近縁プロテアーゼにおいては、これらのアミノ酸の相対順序は、アミノ末端からカルボキシ末端にかけて、アスパラギン酸 - ヒスチジン - セリンである。ところが、キモトリプシン近縁プロテアーゼにおいては、相対順序は、ヒスチジン - アスパラギン酸 - セリンである。即ち、本明細書におけるズブチリシンはズブチリシン近縁プロテアーゼの触媒トリアドを有するセリンプロテアーゼを意味する。その例には、限定することなく、本願の図 3 の中に特定しているズブチリシンが含まれる。

「組換ズブチリシン」とは、ズブチリシンをコードする DNA 配列が、天然ズブチリシンアミノ酸配列の中の 1 又は複数のアミノ酸の置換、欠失又は挿入をコードする変異（又は突

10

20

30

40

50

然変異) DNA配列となるように修飾されている場合におけるズブチリシンを意味する。かかる修飾を施す適当な方法及び本明細書に開示の方法と組合せることのできる方法には、米国特許第4,760,025号( RE 34,606)、米国特許第5,204,015号及び米国特許第5,185,258号に開示されているものが含まれる。

「非ヒトカルボニルヒドロラーゼ」及びそれをコードするDNAは数多くの原核及び真核生物から獲得できうる。原核生物の適当な例には、グラム陰性生物、例えばE. コリ(E. coli)又はシュードモナス(Pseudomonas)及びグラム陽性菌、例えばマイクロコッカス(Micrococcus)又はバチルスが含まれる。カルボニルヒドロラーゼ及びその遺伝子が獲得できうる真核生物の例には、酵母、例えばサッカロマイセス・セレビジエ(Saccharomyces cerevisiae)、菌類、例えばアスペルギルス種、及び非ヒト哺乳動物起源、例えばウシが含まれ、それからはカルボニルヒドロラーゼキモシンをコードする遺伝子が獲得できる。ズブチリシンと同様に、カルボニルヒドロラーゼのシリーズが様々な近縁種から獲得でき、これはそのシリーズの構成員間では全体が相同性でないが、にもかかわらず、同一又は類似のタイプの生物活性を示すアミノ酸配列を有する。即ち、ここで利用する非ヒトカルボニルヒドロラーゼとは、原核及び真核起源と直接又は間接的に結びつけられたカルボニルヒドロラーゼを意味する機能的な定義を有している。

「カルボニルヒドロラーゼ変異体」は先駆体カルボニルヒドロラーゼのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を有する。先駆体カルボニルヒドロラーゼ(例えばズブチリシン)には天然カルボニルヒドロラーゼ(ズブチリシン)及び組換えカルボニルヒドロラーゼ(ズブチリシン)が含まれる。カルボニルヒドロラーゼ変異体のアミノ酸配列は、先駆体ヒドロラーゼアミノ酸配列から、この先駆体アミノ酸配列の1又は複数個のアミノ酸の置換、欠失又は挿入によって、「誘導」されている。かかる修飾は、先駆体カルボニルヒドロラーゼ(ズブチリシン)酵素を操作するよりも、先駆体カルボニルヒドロラーゼ(ズブチリシン)のアミノ酸配列をコードする「先駆体DNA配列」に施す。先駆体DNA配列のかかる操作のために適当な方法には、本明細書開示の方法、並びに当業者に公知の方法が含まれる(例えばEP 0,328,299号、WO 89/06279号、並びに既に引用している米国特許及び出願を参照のこと)。

バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの位置+76、それとの組合せにおける1又は複数の下記の位置+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及び/又は+274に対応する特定の残基を突然変異のためにここで特定する。好ましくはこの修飾残基は下記の組合せにより選ばれる:

76 / 99 ; 76 / 101 ; 76 / 103 ; 76 / 104 ; 76 / 107 ; 76 / 123 ; 76 / 99 / 101 ; 76 / 99 / 103 ; 76 / 99 / 104 ; 76 / 101 / 103 ; 76 / 101 / 104 ; 76 / 103 / 104 ; 76 / 104 / 107 ; 76 / 104 / 123 ; 76 / 107 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 ; 76 / 99 / 101 / 104 ; 76 / 99 / 103 / 104 ; 76 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 104 / 107 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 99 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104 / 123 ; 76 / 103 / 104 / 128 ; 76 / 103 / 104 / 260 ; 76 / 103 / 104 / 265 ; 76 / 103 / 104 / 197 ; 76 / 103 / 104 / 105 ; 76 / 103 / 104 / 135 ; 76 / 103 / 104 / 126 ; 76 / 103 / 104 / 107 ; 76 / 103 / 104 / 210 ; 76 / 103 / 104 / 126 / 265及び/又は76 / 103 / 104 / 222 ; そして最も好ましくは76 / 99 ; 76 / 104 ; 76 / 99 / 104 ; 76 / 103 / 104 ; 76 / 104 / 107 ; 76 / 101 / 103 / 104 ; 76 / 99 / 101 / 103 / 104及び76 / 101 / 104である。これらのアミノ酸の位置番号は図1に紹介する成熟バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシン配列について認定されたものに関する。しかしながら、本発明のこの特定のズブチリシンの突然変異に限定されず、バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの中の特別の特定残基に「相当する」位置にアミノ酸残基を含む先駆体カルボニルヒドロラーゼにまで及び。本発明の好適な態様において、この先駆体ズブチリシンはバチルス・ズブチリシンであり、置換、欠失又は挿入はB. レンタスにおける上記に挙げた残基に対応する相当アミノ酸残基において施されている。

先駆体カルボニルヒドロラーゼの残基(アミノ酸)は、以下の場合、バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの残基に相当する。バチルス・アミロリケファシエンス・

10

20

30

40

50

ズブチリシンの特定の残基又はその残基の一部と相同性（即ち、一次又は三次構造のいずれかにおける位置で対応する）又は類似である場合（即ち、結合、反応又は化学相互作用するのに同一又は類似の機能を有する）。

一次構造に対する相同性を樹立するため、先駆体カルボニルヒドロラーゼのアミノ酸配列を、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの一次配列、そして特に配列のわかっているズブチリシンにおいて不変であることで知られる残基のセットと直接対比させる。本明細書の図2はB・アミロリケファシエンス・ズブチリシン及びB・レントス・ズブチリシンの間での保存残基を示す。整合性を維持するのに（即ち、任意の欠失及び挿入を介する保存残基の削除を避けるのに）必須の挿入及び欠失を可能にする保存残基の整合の後、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの一次配列の中の特定のアミノ酸に相当する残基を特定する。保存残基の整合はかかる残基を100%保存すべきである。しかしながら、75%より高い、又は50%ほどに低い保存残基の整合性も相当残基を規定するのに適する。触媒トリアドAsp32/His64/Ser221の保存は維持されているべきである。例えば、図3において、パチルス・アミロリケファシエンス、パチルス・スブチリス、パチルス・リシェニホルミス（カールスパーゲンシス）（carlsbergensis）及びパチルス・レントス由来のズブチリシンのアミノ酸配列を整合させ、アミノ酸配列間の相同性の最大値を得た。これらの配列の対比は、各配列の中に多数の保存残基が含まれていることを示す。これらの保存残基（BPN 及びB・レントス間として）を図2に示す。

従って、これらの保存残基を、本明細書における好適なズブチリシン先駆体酵素であるパチルス・レントス由来のズブチリシン（1988年7月13日公開のPCT公開No.WO 89/06279号）又は好適なパチルス・レントス・ズブチリシンに対して高度に相同性であるPB92と称されるズブチリシン（EP 0,328,299号）の如くその他のカルボニルヒドロラーゼにおけるパチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの対応の相当アミノ酸残基を規定するのに用いることができる。これらのズブチリシンの一定のアミノ酸配列を図3A及び3Bの中で、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの配列と整合させ、保存残基の最大相同性を得ている。ここでわかる通り、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンと対比して、パチルス・レントスの配列の中には多くの欠失がある。従って、例えば、その他のズブチリシンにおけるパチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの中のVal165に関する相当アミノ酸は、B・レントス及びB・リシェニホルミスについてのイソロイシンである。

従って、例えば、位置+76におけるアミノ酸は、B・アミロリケファシエンス及びB・レントス・ズブチリシンの両方においてアスパラギン酸（N）である。しかしながら、本発明の好適なズブチリシン変異体において、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの中の+76に相当するアミノ酸はアスパラギン酸（D）によって置換されている。置換のためのここで特定する一定のアミノ酸残基と、かかる位置それぞれのための最も好適な置換との対比を例示の目的で表IIに示す。

表 II

	<u>+76</u>	<u>+99</u>	<u>+101</u>	<u>+103</u>	<u>+104</u>	<u>+107</u>	<u>+123</u>
B. アミロリケファシエンス (野生)	N	D	S	Q	Y	I	N
B. レントス (野生)	N	S	S	S	V	I	N
最も好適な置換	D	D	R	A	I/Y	V	S

相当残基は、三次構造がX-線結晶グラフィーにより決定されている先駆体カルボニルヒドロラーゼについての三次構造のレベルにおいて相同性を決定することによっても特定されうる。相当残基とは、先駆体カルボニルヒドロラーゼ及びパチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの特定のアミノ酸残基の2個以上の主鎖原子（N上のN、CA上のCA、C上のC及びO上のO）の原子配位（atomic coordinate）が、整合の後、0.13nm以内

10

20

30

40

50

、そして好ましくは0.1nm以内であるものとして定義する。整合は、バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンについての注目のカルボニルヒドロラーゼの水素以外のタンパク質原子の原子配位の最大重複が得られるように最良のモデルが配向及び配置された後に達成される。最良のモデルは得られる最大の解像度での実験回析データに関して最低のR係数を供する結晶グラフィックモデルである。

$$R \text{ 係数} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの特定の残基と機能的に類似の相当残基は、先駆体カルボニルヒドロラーゼのアミノ酸であって、バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの特定の残基により規定される及びそれに帰する状況でタンパク質の構造、基質結合能又は触媒能を改変、改良又は貢献するようなコンホメーションを帯びることのできる先駆体カルボニルヒドロラーゼのアミノ酸と規定される。更に、これらは下記に示す程度にまで類似の位置を占めている先駆体カルボニルヒドロラーゼの残基である（それについて、三次構造はX線結晶グラフィックにより得られる）：即ち、たとえ一定の残基の主鎖原子が相同な位置の占拠に基づく等価性の基準に合っていないとしても、この残基の少なくとも2個の側鎖原子の原子配位はバチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの対応の0.13nmの側鎖原子に収まっている。バチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの三次構造の配位はEPO公開No.0,251,446号に記載され（米国特許出願SN 08/212,291号に相当；その開示内容は引用することで本明細書に組入れる）、そして三次構造のレベルに基づき相当残基を決定するために上記で概略した通りに利用できる。

置換、挿入又は欠失のために同定された一部の残基は保存残基であり、一方その他はそうではない。保存型でない残基の場合、1又は複数個のアミノ酸の交換は、天然では見い出せるものに相当しないアミノ酸配列を有する変異体を生み出す。保存型残基の場合、かかる交換は天然配列をもたらさないであろう。本発明のカルボニルヒドロラーゼ変異体は成熟形態のカルボニルヒドロラーゼ変異体、並びにかかるヒドロラーゼ変異性のプロ-及びプレプロ-形態を含む。プレプロ-形態が好適な構築体であり、なぜならこれはカルボニルヒドロラーゼ変異体の発現、分泌及び成熟を助長するからである。

「プロ配列」とは、成熟形態のカルボニルヒドロラーゼのN-末端部分に結合したアミノ酸配列であって、外れたとき、このカルボニルヒドロラーゼの「成熟」形態の出現をもたらす配列を意味する。多くのタンパク質分解酵素は翻訳プロ酵素生成物のままで見い出され、そして後翻訳プロセッシングされないと、この形態で発現される。カルボニルヒドロラーゼ変異体、特にズブチリシン変異体を生成するための好適なプロ配列はバチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンの推定プロ配列であるが、その他のズブチリシンが利用できる。実施例1及び2において、バチルス・レントス(ATCC 21536)由来のズブチリシンからの推定プロ配列を利用した。

「シグナル配列」又は「プレ配列」とは、カルボニルヒドロラーゼのN-末端部分又はプロヒドロラーゼのN-末端部分に結合したアミノ酸の任意の配列であって、ヒドロラーゼの成熟形態又はプロ形態の分泌に関与しうる配列を意味する。このシグナル配列の定義は機能的な事項であり、天然の条件下でのズブチリシン又はその他のカルボニルヒドロラーゼの分泌の成就に関与する。ズブチリシン遺伝子のN-末端部分によりコードされる全てのアミノ酸配列又はその他の分泌性カルボニルヒドロラーゼを含むことを意味している。本発明はここに定義した通りカルボニルヒドロラーゼ変異体の分泌を及ぼすかかる配列を利用する。本実施例において用いた好適なシグナル配列は、バチルス・スブチリス・ズブチリシン由来のシグナル配列の最初の7個のアミノ酸を含んで成り、これはバチルス・レントス(ATCC 21536)由来のズブチリシンのシグナル配列の残り部と融合している。

カルボニル・ヒドロラーゼ変異体の「プレプロ」形態は、ヒドロラーゼのアミノ末端に作動連結したプロ配列と、プロ配列のアミノ末端に作動連結した「プレ」又は「シグナル」配列とを有する成熟形態のヒドロラーゼより成る。

10

20

30

40

50

「発現ベクター」は、適当な宿主の中での前記DNAの発現を及ぼすことのできる適当なコントロール配列に作動連結したDNA配列を含むDNA構築体を意味する。かかるコントロール配列は転写を及ぼすプロモーター、かかる転写をコントロールする任意的なオペレーター配列、適当なmRNAリボソーム結合性部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終了をコントロールする配列を含む。適当な宿主に一旦形質転換できたら、このベクターは宿主ゲノムとは独立して複製及び機能することができ、又はある状況においては、ゲノム自体に組込んでよい。本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は時折り同義語として用い、なぜならプラスミドが現状最も一般的に用いられているベクター形態であるからである。しかしながら、本発明は、同等の機能を担い、且つ当業界に公知である、又は公知となるその他の形態の発現ベクターを含むことを意図している。

10

本発明において用いられる「宿主細胞」は一般に原核又は真核系宿主であって、好ましくは米国特許第4,760,025号( RE 34,606 )に開示の方法により酵素的に活性なエンドプロテアーゼを分泌できないように操作されている宿主である。ズブチリシンを発現するのに好適な宿主細胞は酵素的に活性な中性プロテアーゼ及びアルカリ性プロテアーゼ(ズブチリシン)を欠くバチルス株BG2036である。株BG2036の構築は米国特許第5,264,366号に詳細されている。ズブチリシンを発現するためのその他の宿主細胞には、バチルス・ズブチリス1168(米国特許第4,760,025号( RE 34,606 )及び米国特許第5,264,366号にも記載; その開示内容は引用することで本明細書に組入れる)、及び任意の適当なバチルス株、例えばB・リシェニホルミス、B・レントス等が含まれる。

宿主細胞は組換えDNA技術を利用して構築したベクターにより形質転換又はトランスフェクションせしめる。かかる形質転換宿主細胞はカルボニルヒドロラーゼ変異体をコードするベクターを複製できるか、又は所望のカルボニルヒドロラーゼ変異体を発現できる。カルボニルヒドロラーゼ変異体のプレ-又はプレプロ形態をコードするベクターの場合、かかる変異体は、発現されたとき、一般に宿主細胞から宿主細胞用培地へと分泌される。

20

「作動連結」とは、2つのDNA領域間の関係を述べているとき、単にそれらが互いと機能的に関係し合っていることを意味する。例えば、プレ配列は、それがシグナル配列として機能し、最も可能としてはシグナル配列の切断に關与するタンパク質の成熟形態に關与するとき、ペプチドと作動連結している。プロモーターは、それが配列の転写をコントロールするなら、コード配列に作動連結している。リボソーム結合部位は、それが翻訳を可能とするように配置されているなら、コード配列に作動連結している。

30

天然先駆体カルボニルヒドロラーゼをコードする遺伝子は当業者に公知の一般方法に従って得られうる。この方法は一般に、注目のヒドロラーゼの領域をコードする推定配列を有するラベル化プローブを合成し、このヒドロラーゼを発現する生物からゲノムライブラリーを調製し、そしてプローブに対するハイブリダイゼーションによって注目の遺伝子についてライブラリーをスクリーニングにかけることを含んで成る。陽性ハイブリダイズクローンを次にマッピングし、そして配列決定する。実施例において用いたB・レントス遺伝子は米国特許第5,185,258号のExample 1に記載され、その開示内容は引用することで本明細書に組入れる。実施例5において用いたBPN 遺伝子はRE 34,606のExample 1に記載の通りにしてクローニングした。その開示内容は引用することで本明細書に組入れる。

次にクローニングしたカルボニルヒドロラーゼを宿主細胞を形質転換するのに用いてヒドロラーゼを発現させる。次いでヒドロラーゼ遺伝子を高コピー数プラスミドの中にライゲーションする。このプラスミドはプラスミド複製にとって必須の以下の周知の要素を含むので、宿主の中で複製する:注目の遺伝子に作動連結したプロモーター(これは、宿主により認識、即ち、転写されるなら、遺伝子自体の同族プロモーターとして供給されうる);外生であるか、又はヒドロラーゼ遺伝子の内生ターミネーター領域により供給される転写終止及びポリアダニル化領域(これは一定の真核宿主細胞中でヒドロラーゼ遺伝子から宿主により転写されたmRNAの安定のために必須である);及び所望するには、抗生物質含有培地の中での増殖によりプラスミド感染化宿主細胞の連続培養維持を可能とする選択遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子。高コピー数プラスミドは宿主にとっての複製起点も含み、従って染色体の制約を受けることなく細胞質の中に大量のプラスミドを作ることがで

40

50

きる。しかしながら、ヒドロラーゼ遺伝子の多数のコピーを宿主ゲノムの中に組み込むことは本発明に属する。これは相同組換えに極めて敏感な原核及び真核生物により助長される。

本例において用いる遺伝子は天然のB・レントラス遺伝子及び天然のB・アミロリケファシエンス遺伝子である。他方、天然又は突然変異先駆体カルボニルヒドロラーゼ(ズブチリシン)をコードする合成遺伝子を生成してよい。かかる手法において、先駆体ヒドロラーゼ(ズブチリシン)のDNA及び/又はアミノ酸配列を決定する。その後、多数の重複合成一本鎖DNAフラグメントが合成され、それはハイブリダイゼーション及びライゲーションにより、先駆体ヒドロラーゼをコードする合成DNAをもたらす。合成遺伝子の構築の例は米国特許第5,204,015号のExample 3に記載され、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる。

10

天然又は合成先駆体カルボニルヒドロラーゼ遺伝子をクローニングできたら、天然先駆体カルボニルヒドロラーゼの合成ではあり得ないほどに遺伝子の利用性を高めるためにいくつかの修飾を施す。かかる修飾には米国特許第4,760,025号(RE 34,606)及びEPO公開No. 0,251,446に開示の組換えカルボニルヒドロラーゼの製造、並びに本明細書記載のカルボニルヒドロラーゼ変異体の製造が含まれる。

以下のカセット突然変異誘発法を、本発明のカルボニルヒドロラーゼ変異体の構築及び同定を助長するために用いてよいが、しかしながら部位特異的突然変異誘発を含むその他の方法も利用できる。第一に、ヒドロラーゼをコードする天然遺伝子を獲得し、そして全体的又は部分的に配列決定する。次いでこの配列を、コード化酵素の中の1又は複数個のアミノ酸の突然変異(欠失、挿入又は置換)を施すことを所望する位置において、スキャンにかける。この位置に隣接する配列を、発現されたならば様々な突然変異をコードするであろうようなオリゴヌクレオチドプールにより、短い遺伝子セグメントの交換用制限部位の存在について評価する。かかる制限部位は好ましくは、遺伝子セグメントの交換を助長するため、ヒドロラーゼ遺伝子内の固有部位である。しかしながら、制限消化により作られる遺伝子フラグメントが適当な順序で再集成できるなら、ヒドロラーゼ遺伝子が過度に豊富でない任意の慣用の制限部位を使用してよい。選定した位置から好都合な距離内(10~15ヌクレオチド)の位置に制限部位がないなら、かかる部位は、リーディングフレームもコード化アミノ酸も最終構造において変化させたまわらないような状況で遺伝子のヌクレオチドを置換することによって作り上げる。所望の配列に適合するように配列を変えるための遺伝子の突然変異は一般に公知の方法に従うM13プライマー伸長によって成し遂げる。適当な隣接領域の位置決め及び必要な変更が2つの好都合な制限部位配列にあることの評価の作業は、遺伝子コードの冗長度、遺伝子の制限酵素地図及び多種多様な制限酵素によりルーチンに行われる。好都合な隣接制限部位が得られたなら、上記の方法は部位を含まない隣接領域との関係においてのみ利用する必要があることに注意すべきである。

20

30

天然DNA又は合成DNAをクローニングできたら、突然変異すべき位置に隣接する制限部位を同系制限酵素で消化し、そして複数の末端終結相補性オリゴヌクレオチドカセットを遺伝子にライゲーションさせる。突然変異誘発はこの方法により簡単となり、なぜなら全てのオリゴヌクレオチドが同じ制限部位を有するように合成でき、そして制限酵素を作り上げるのに合成リンカーを必要としないからである。

40

本明細書で用いるタンパク質分解活性とは、活性酵素mg当りのペプチド結合の加水分解率として定義する。タンパク質分解活性を測定するための数多くの公知の手順がある(K.M. Kalisz, 「Microbial Proteinases」 *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, A. Fiechter編, 1988)。改良タンパク質分解活性に加えて、又はそれに代えて、本発明の変異酵素はその他の改良特性、例えば $K_m$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_{cat}/K_m$ 比及び/又は改良基質特異性及び/又は改良pH活性プロファイルを有しうる。これらの酵素は存在するものと期待される特定の基質、例えばペプチドの調製における基質又は加水分解工程、例えば洗濯用途のための基質のために仕立てることができる。

本発明の一の観点において、その目的は先駆体カルボニルヒドロラーゼと比べて改変されたタンパク質分解活性を有する変異体カルボニルヒドロラーゼを確保することであり、なぜ

50

ならかかる活性を強める（数学的に高くなる）ことは、酵素の利用が標的基質に対して一層有効に作用することを可能にするからである。更に関心がもたれるのは先駆体と比べて改変された安定性及び／又は改変された基質特異性を有する変異酵素である。好ましくは、突然変異すべきカルボニルヒドロラーゼはズブチリシンである。ズブチリシン型カルボニルヒドロラーゼの中で、パチルス・アミロリケファシエンス・ズブチリシンにおける +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及び／もしくは +274又は任意のその組合せに相当する残基においてかかる結果を獲得するのに有用な特定のアミノ酸を実施例の中で紹介する。ある状況においては、低めのタンパク質分解活性が所望されることがあり、例えばカルボニルヒドロラーゼの合成活性（ペプチドの合成のため）を所望する場合、タンパク質分解活性の低下が有用でありうる。ある場合には、かかる合成生成物を破壊してしまうタンパク質分解活性の低下を所望しうる。逆に、ある状況においては、先駆体に比して変異酵素のタンパク質分解活性を強めることが所望されうる。更に、変異体のアルカリ又は熱安定性のいずれかの安定性の増強又は減少（改変）が所望されうる。K<sub>cat</sub>、K<sub>m</sub>又はK<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>の増強又は減少は、このような反応速度論パラメータを決定するのに用いた基質に対して特異的である。

本発明の別の観点において、ズブチリシンにおける +76に相当する残基、それとの組合せにおけるその他のいくつかの修飾は酵素の総合的な安定性及び／又はタンパク質分解活性を調節するのに重要である。即ち、実施例の中に記載してある通り、パチルス・レントス・ズブチリシンにおける相当位置 +76にあるアスパラギン（N）は、好適な態様において、以下のアミノ酸残基

+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及び／又は +274の1又は複数個の修飾との組合せにおいて、アスパラギン酸（D）により置換され、結果としての突然変異酵素の高められた安定性及び／又は高められた活性を生み出すことができる。

本発明の最も好適な態様を実施例に記載した。それらには下記の特定の置換残基の組合せが含まれる：

N76D / S99D ; N76D / V104I ; N76D / S99D / V104I ; N76D / S103A / V104I ; N76D / V104I / I107V ; N76D / V104Y / I107V及びN76D / S101R / S103A / V104I。更に、実施例に記載してあるのは全て本発明の請求の範囲記載の突然変異の組合せである。これらの置換は好ましくはパチルス・レントス（組換又は天然型）ズブチリシンの中で施しているが、しかし任意のパチルス・ズブチリシンの中でこの置換を施してよい。

この変異体ズブチリシン及びその他の変異体ズブチリシンにより得られる結果を基礎に、パチルス・アミロリケファシエンスの中の位置 +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及び／又は +274に相当するカルボニルヒドロラーゼ（好ましくはズブチリシン）の中の残基は、これらの酵素のタンパク質分解活性、性能及び／又は安定性、並びにかかる変異体酵素の清浄又は洗浄性能に重要であることが明らかである。

本発明の数多くのカルボニルヒドロラーゼ変異体、特にズブチリシンは様々な洗剤に配合せしめるのに有用である。数多くの公知の化合物が、本発明のカルボニルヒドロラーゼ突然変異体を含んで成る組成物において有用な適当な界面活性剤である。これらには非イオン、アニオン、カチオン、アニオン又は双イオン性洗剤が含まれ、Barry J. AndersonのUS 4,404,128号及びJiri FloraらUS 4,261,868号に開示されている。適当な洗剤は米国特許第5,204,015号（先に引用）Example 7に記載のものである。当業者は洗浄組成物として利用できる様々な製剤に練れ親しんでいる。典型的な洗浄組成物に加えて、本発明のズブチリシン変異体は天然又は野生型ズブチリシンを利用する任意の目的のために利用されうる。即ち、これらの変異体は、例えばパー又は液体石けん用途、食器洗剤、コンタクトレンズ洗浄溶液又は製品、ペプチド加水分解、廃棄処理、繊維用途、タンパク質製造にお

10

20

30

40

50

ける融合 - 分解酵素として、等に利用できる。本発明の変異体は洗剤の高められた性能（先駆体と比べ）を含んで成りうる。本明細書で用いる洗剤の高められた性能とは、標準の洗浄サイクルを経た通常の評価による決定に従う、草又は血液の如くの一定の酵素感受性汚染の強められた洗浄力と定義する。

本発明のズブチリシンは約0.01～約5重量%（好ましくは0.1～0.5重量%）のレベルで、6.5～12.0のpHを有する公知の粉末又は液体洗剤の中に配合してよい。このような洗浄用組成物はその他の酵素、例えば公知のプロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ又はエンドグリコシダーゼ、並びにビルダー及び安定剤をも含むうる。

慣用の洗浄組成物への本発明のズブチリシンの添加は任意の特別な用途制限をもたらさない。換言すれば、洗剤にとって適当な任意の温度及びpHは、そのpHが上記の範囲内であり、且つそのpHが記載のズブチリシンの変性温度より低いなら、本組成物にとっても適当である。更に、本発明のズブチリシンは洗剤抜きの洗浄組成物に、単独で、又はビルダー及び安定剤と組合せて使用できる。

以下は例示の目的で提供し、本請求の範囲を限定するものと考えべきではない。

#### 実施例 1

##### B . スブチリスにおけるGG36遺伝子の発現のための構築

B . レンタス由来のズブチリシン遺伝子の発現のためのクローニング及び構築は米国特許第5,185,258号に記載と本質的に同じようにして実施した。プラスミドGGA274（本明細書の図4に記載）を図5に示す以下の方法で更に修飾した。GGA274プラスミドの構築中に導入したPst I 部位を下記に示す配列を有するオリゴヌクレオチドにより、以下に記載のオリゴヌクレオチド依存性突然変異誘発により除去した：

5 - GAAGCTGCAACTCGTAAA - 3 （Seq ID No. 1）。下線の「A」残基は制限酵素Pst I の認識配列を排除し、そして位置274の対応のアミノ酸残基アラニンのスレオニンへと変えてしまった。位置274のスレオニンはクローニングされたB . レンタス・ズブチリシン遺伝子配列の中にもとからある野生型の残基である。ズブチリシンをコードするDNAセグメントをプラスミドGGA274又はその誘導体（図5に示すGGT274）からEcoR I 及びBamH I 消化により切り出した。このDNAフラグメントをバクテリオファージM13 - ベースベクター、例えばMP19に、突然変異誘発のためにサブクローニング返還した。突然変異誘発の後、EcoR I 及びHindIII消化、それに続くクローニングを行って、突然変異ズブチリシンタンパク質の発現及び回収のために発現プラスミド、例えばGGA274の中に突然変異ズブチリシン遺伝子を戻した。

#### 実施例 2

##### オリゴヌクレオチド依存性突然変異誘発

オリゴヌクレオチド依存性突然変異誘発はZoller, M.ら（1983）Methods Enzymol., 100 ; 468 - 500に記載の通りにして実施した。例えば、配列5 GCTGCTCTAGACAATTCG 3 （Seq ID No. 2）の合成オリゴヌクレオチドを、位置76にあるアミノ酸残基のアスパラギン（N）をアスパラギン酸（D）（又はN76D）へと変えるために用いた。下線の「G」及び「C」残基は野生型遺伝子配列からの変更を示す。CAは位置+75のロイシンを保持させ、そしてXba I 制限部位酵素のXba I 認識部位（TCTAGA）の導入のためにアミノ酸配列を変化させ、一方、GACでの変更は+76のアスパラギンをアスパラギン酸に変える。

位置99, 101, 103及び104での突然変異誘発のため、様々なオリゴヌクレオチドを所望の突然変異組合せに依存して利用してよい。例えば、5 GTATTAGGGGCGGACGGTCTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3 （Seq. ID No. 3）のオリゴヌクレオチドは単一のズブチリシン分子の中で同時に以下の変化を施すために用いた：S99D；S101R；S103A及びV104I。同様に配列5 TCAGGTTCTCGAGCGTTGCCAAGGATTG 3 （Seq. ID No. 4）及び5 CACGTTGCTAGCTTGA GTTTAG 3 （Seq. ID. No 5）のオリゴヌクレオチドをI107V及びN123Sをそれぞれに作るために用いた。ここでも、下線の残基は、アミノ酸配列又は制限酵素認識配列のいずれかの所望の変化を生み出す野生型配列からの変更を示す。

#### 実施例 3

##### ズブチリシン変異体のタンパク質分解活性

実施例 2 の方法に従い、表 III に挙げる変異体を作った。これらのズブチリシン変異体それぞれのタンパク質分解活性を表 III に示す。

P. Bonneau ら (1991) *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 113, No. 3, p1030 記載の方法を利用して合成ペプチド基質スクシニル-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-ニトロアニリドの加水分解についての反応速度論パラメーター  $K_{cat}$ ,  $K_M$  及び  $K_{cat}/K_M$  を測定した。簡単には、ズブチリシン変異体ストック溶液の少量のアリコートをし、0.1M のトリス-HCl バッファー pH8.6 の中に溶かした基質を含む 1 cm のキュベットに加えた。そして 25 °C に恒温とした。反応進行を 410nm での反応生成物 p-ニトロアニリンの吸収をモニターすることにより光学的に追った。反応速度論パラメーターは、各反応の反応速度及び生成物濃度をミカエリス-メンテン式にフィットさせるよう、非線形回帰アルゴリズムを利用して得た。

表 III

バチルス・レントス・ズブチリシン及び変異体について測定された反応速度論パラメーター  $K_{cat}$ ,  $K_M$  及び  $K_{cat}/K_M$

酵 素	$K_{cat} (s^{-1})$	$K_M (M)$	$K_{cat}/K_M (s^{-1}M^{-1})$
B. レントス・ズブチリシン	170	0.00078	$2.18 \times 10^5$
N76D	219	0.0008	$2.74 \times 10^5$
N76D/S99D	88	0.00061	$1.44 \times 10^5$
N76D/S103A	400	0.0014	$2.86 \times 10^5$
N76D/V104I	459	0.0011	$4.17 \times 10^5$
N76D/I107V	219	0.0011	$1.99 \times 10^5$
N76D/N123S	115	0.0018	$6.40 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R	146	0.00038	$3.84 \times 10^5$
N76D/S99D/S103A	157	0.0012	$1.31 \times 10^5$
N76D/S99D/V104I	247	0.00097	$2.55 \times 10^5$
N76D/S101R/S103A	405	0.00069	$5.90 \times 10^5$
N76D/S101R/V104I	540	0.00049	$1.10 \times 10^6$
N76D/S103A/V104I	832	0.0016	$5.20 \times 10^5$
N76D/V104I/I107V	497	0.00045	$1.10 \times 10^6$
N76D/V104Y/I107V	330	0.00017	$1.90 \times 10^6$
N76D/V104I/N123S	251	0.0026	$9.65 \times 10^4$
N76D/I107V/N123S	147	0.0035	$4.20 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R/S103A	242	0.00074	$3.27 \times 10^5$
N76D/S99D/S101R/V104I	403	0.00072	$5.60 \times 10^5$
N76D/S99D/S103A/V104I	420	0.0016	$2.62 \times 10^5$
N76D/S101R/S103A/V104I	731	0.00065	$1.12 \times 10^6$
N76D/S103A/V104I/N123S	321	0.0026	$1.23 \times 10^5$
N76D/V104I/I107V/N123S	231	0.003	$7.70 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0.00098	$6.37 \times 10^5$
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0.0043	$4.51 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0.0023	$1.35 \times 10^5$

表 III に挙げる結果は、試験したズブチリシン変異体全てがタンパク質分解活性を保持することを示した。更に、データの詳細な分析は、バチルス・レントス・ズブチリシンについてのタンパク質分解活性が、バチルス・アミロリケファシエンスの位置 76, 99, 101, 103, 104, 107 及び 123 に相当するアミノ酸残基での様々な置換の組合せによって有意に変わることを示した。

実施例 4

### ズブチリシン変異体の熱安定性

実施例2により行った。パチルス・レントス・ズブチリシン及び本発明の変異体について観察される熱安定性の対比を表IVに示す。50mMのCaCl<sub>2</sub>を有する又は有さない0.1Mのグリシン、0.01%のTween 80 pH10.0中の15 μg/mlの精製酵素を小さなチューブの中に小分けし、そして10 °Cで5分、1分かけて10 から60 、そして60 で20分インキュベートした。次いでチューブを氷の上に10分置いた。チューブ由来のアリコート、25 に恒温とした0.1Mのトリス-HClバッファー、pH 8.6の中に溶解した合成ペプチド基質スクシニル-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-ニトロアニリド1.2mMを含む1cmのキュベットに加えることにより酵素活性についてアッセイした。初期の線形反応速度を、経時的に410nmで反応生成物p-ニトロアニリンの吸収をモニターすることにより光学的に追った。データは加熱前の%活性として表わす。表IVに挙げる結果は、変異体の大多数が、50mMのCaCl<sub>2</sub>を添加した試験条件においてパチルス・レントス・ズブチリシンに匹敵する熱安定性を示すことを示した(26のうち24)。50mMのCaCl<sub>2</sub>を添加していない条件では、大多数の変異体(26のうちの19)はパチルス・レントス・ズブチリシンよりも有意に安定であった。更に変異体N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V及びN76D/S101R/S103A/V104Iは、50mMのCaCl<sub>2</sub>を加えていない試験条件において単一置換変異体N76Dよりも有意に安定であった。

表 IV

pH10、60°C、+/-50mM CaCl<sub>2</sub>添加でのバチルス・レンタス・ズブチリシン及び変異体について測定した熱安定性

酵 素	% 残留初期活性		
	- CaCl <sub>2</sub>	+ CaCl <sub>2</sub>	
B. レンタス・ズブチリシン	2	96	10
N76D	34	97	
N76D/S99D	49	98	
N76D/S103A	26	92	
N76D/V104I	58	98	
N76D/I107V	32	96	
N76D/N123S	0	97	
N76D/S99D/S101R	30	100	
N76D/S99D/S103A	36	100	
N76D/S99D/V104I	48	97	
N76D/S101R/S103A	26	100	
N76D/S101R/V104I	38	100	20
N76D/S103A/V104I	58	100	
N76D/V104I/I107V	60	97	
N76D/V104Y/I107V	48	74	
N76D/V104I/N123S	0	98	
N76D/I107V/N123S	16	100	
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100	
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100	
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98	
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99	
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98	
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99	30
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99	
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95	
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100	

## 実施例 5

ファージミドから作った一本鎖DNA鋳型によるオリゴヌクレオチド依存性突然変異誘発

## A . B . レンタス変異体の構築

突然変異プロトコールは実施例 2 に記載と本質的に同じである。一本鎖DNA鋳型とファージミド法により作った。一本鎖DNA鋳型を作るためのファージミドベクターを構築するため、我々はまずベクター-pBCDAICATを構築した。ベクター構築のフローチャートを図 8 に概略した。まず、pC194プラスミド由来のCAT遺伝子をコードするCla I ~ Cla I フラグメント (Horinouchi, S. 及び Weisblum, B., *J. Bacteriol.*, 150:8-15, 1982) を pUC19 (New England BioLabs, Beverly, MA) のポリリンカー領域の Acc I 部位の中にクローニングしてプラスミド pUCCHL を作り、次いで GG36DAI コード DNA の 5' 末端由来の EcoR I - Dra I 0.6KB フラグメントを pBSKS プラスミド (Stratagene, Inc., San Diego, CA) の EcoR I 及び EcoR V 部位の中にクローニングして pBC2SK5 を作った。プラスミド pBC2SK5 の一つの EcoR I 部位を EcoR I 消化により排除し、次いで T4 DNA ポリメラーゼにより触媒してフィル・インし、そして再ライゲーションして EcoR I 部位をもたないプラスミド pBC2SK-5R を作った。pBCSK-5R の中にクローニングした EcoR I - Dra I フラグメントを Pst I - HindIII フラグメントとして

40

50

単離し、そしてpUCCHL (pUC19のポリリンカーの一部) のPst I - HindIII部位の中にクローニングしてプラスミドpUCCHL5Rを作った。GG36DAI遺伝子のコード配列をEcoR I - BamH Iフラグメントとして切り出し、そしてpUCCHL5RのEcoR I - BamH I部位にクローニングしてpUCCATを作った。pUCCATの大型EcoR I - HindIIIフラグメントをBS2KS<sup>+</sup>のEcoR I及びHindIII部位にクローニングしてプラスミドpBCDAICATを作った。

一本鎖DNAを作るため、pBCDAICATを含むE. コリをファージR408 (Stratagene, San Diego, CAより入手) で感染せしめ、Russel, M. Kidd, S. 及びKelley, M. R., GENE 45: 333-338, 1986に記載のプロトコールを行った。一本鎖DNA鋳型が入手できたら、実施例2に記載の通りにして上記の標準突然変異誘発法を実施した。一定の突然変異体の構築を以下に例示の目的で詳細する。

B. レンタス (GG36) N76D / S103A / V104I / L217Hの構築のため、GG36 N76D / S103A / V104IをコードするEcoR I - BamH I DNAフラグメントをpUCCATの構築に用い (図8参照)、プラスミドpBCDAICATを作った。上記のプロトコールに従って一本鎖DNA鋳型が出来た後、下記の配列

\* \* \* \* \* x Cla I

5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3' (Seq. ID No. 13)

を有する突然変異誘発プライマーをL217Hを作るために用いた。上記のように、下線残基は施したヌクレオチド変更を示し、そしてx Cla Iは現存のCla I部位が突然変異誘発の後に排除されたことを示す。突然変異誘発プロトコールを実施例2に記載する。突然変異誘発の後、プラスミドDNAをCla I部位の排除についてスクリーニングし、そしてCla I部位を失ったクローニングをDNA配列分析にかけて、217番目のアミノ酸残基でのLからHへの変化の施されたDNA配列を確認した。

B. BPN 変異体の構築及びB. スプチリスにおけるその発現

B. アミロリケファシエンス (BPN ) N76D / Q103A / Y104I / Y217Lの構築を、2段連続工程であることを除き、同じようにして行った。N76DをまずBPN Y217Lに導入してBPN N76D / Y217Lを作り、次いで第二突然変異誘発を行ってBPN N76D / Y217LをBPN N76D / Q103A / Y104I / Y217Lへと変換させた。第一突然変異誘発のための一本鎖DNA鋳型を作るため、BPN Y217LズブチリシンをコードするEcoR I - BamH Iフラグメント (Wells, J.ら、PNAS, 84, 5167, 1087に記載のY217Lプラスミド由来) をプラスミドpUCCATFNAを構築するのに用いた (図9参照)。BPN Y217Lを含むpUCCATFNAプラスミドをpBCFNACATプラスミドを構築するのに用いた (図9)。一本鎖DNAを上記の通りに作った。BPN N76D / Y217Lを作るため、配列

\* \* \* \* \* x Xba I

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3' (Seq. ID No. 14)

を有するオリゴヌクレオチドプライマーを変化N76Dを作るために利用した。次いで一本鎖DNAをBPN N76D / Y217Lを含むpBCFNACATプラスミド (N76D突然変異誘発後のpBCFNACATプラスミド) から調製し、そして配列

\* \* \* \* \* x Pvu II

5' GCT GAC GGT<sup>1</sup> TCC GGC GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3' (Seq. ID No. 15)

を有する別のオリゴヌクレオチドで突然変異させてBPN N76D / Q103A / Y104I / Y217Lを得た。クローニング、一本鎖DNAの調製、突然変異誘発及び突然変異体のスクリーニングに

10

20

30

40

50

関する工程は全て上記の通りに実施した。BPN 遺伝子及びその変異体の発現はプラスミドDNA (種々の変異体BPN遺伝子を含むpBCFNACAT) をRE 34,606に記載のとおりにしてパチルス・スブチリスのプロテアーゼ欠損株の中に直接組込むことによって達成できた。数多くの変異体を実施例2及び5の教示に従って作った。反応速度論データ及び安定性データをかかるとなる変異体のために作った。反応速度論データは実施例3に記載の方法を利用して作製し、そして表Vに提供する。安定性データを本明細書に詳細にする。結果を表VIに示す。

#### 熱安定性アッセイ手順

精製酵素を0.1MのグリシンpH10.0、0.01%のTween 80に、その酵素をこのバッファーで平衡にした。Sephadex G-25より成るカラムに載せ、そしてその酵素を同じバッファーを用いてカラムから溶出させることによってバッファー交換した。

10

60 に恒温となった0.1Mのグリシン、0.01%のTween 80、pH10.0を含むチューブに、バッファー交換済み酵素を15 µg / mlの最終酵素となるように加えた。

様々な時間において60 のインキュベーション物からアリコートを取り出し、そして酵素活性について、25 に恒温とした0.1Mのトリス - HClバッファー、pH 8.6に溶かした合成ペプチド基質スクシニル - L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p - ニトロアニリド1.2mMを含む1 cm キュベットに加えることにより、直ちにアッセイした。初期線形反応速度を経時的に410nmでの反応生成物 p - ニトロアニリンの吸収をモニターすることにより光学的に追った。

50%の酵素の失活のために必要な時間の長さである半減期を、60 でのインキュベーション時間の関数としての反応速度の一次プロットから決定した。

20

データは表VIの中に、同一の条件下でパチルス・レントス・ズブチリシン (GG36) について決定された半減期の%として表わす。

表 V

酵素	kcat (s <sup>-1</sup> )	KM (mM)	kcat/KM (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
B. レンタス・スチリシ	170	0.78	2.20E+05
N76D/S103G/V104I*	380	1.4	2.70E+05
N76D/S103A/V104F	730	0.33	2.20E+06
N76D/S103A/V104N	790	2.8	2.80E+05
N76D/S103A/V104S	170	0.83	2.00E+05
N76D/S103A/V104T	370	1.9	2.00E+05
N76D/S103A/V104W	880	0.31	2.80E+06
N76D/S103A/V104Y	690	0.5	1.40E+06
K27R/N76D/V104Y/N123S	500	1.2	4.20E+05
N76D/S101G/S103A/V104I*	620	1.3	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/S105A*	550	1.3	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/S105D*	440	1.7	2.60E+05
N76D/S103A/V104T/I107A*	120	5.7	2.10E+04
N76D/S103A/V104T/I107L*	310	3.2	9.70E+04
N76D/S103A/V104I/L126A	90	2.2	4.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126F	180	1.9	9.50E+04
N76D/S103A/V104I/L126I	100	2.4	4.20E+04
N76D/S103A/V104I/L126V	64	3.2	2.00E+04
N76D/S103A/V104I/S128G*	560	1.7	3.30E+05
N76D/S103A/V104I/S128L*	430	3.8	1.10E+05
N76D/S103A/V104I/L135A	140	0.76	1.80E+05
N76D/S103A/V104I/L135F	390	0.69	5.70E+05
N76D/S103A/V104I/L135I	110	0.73	1.50E+05
N76D/S103A/V104I/L135V	140	0.86	1.60E+05
N76D/S103A/V104I/S156E*	170	2.6	6.50E+04
N76D/S103A/V104I/S166D*	160	3.5	4.60E+04
N76D/S103A/V104I/D197E	510	1.4	3.60E+05
N76D/S103A/V104I/N204A*	530	1.1	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/N204G*	580	1.4	4.10E+05
N76D/S103A/V104I/N204C*	370	1.3	2.90E+05
N76/S103A/V104I/P210I*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/L217H*	80	0.63	1.30E+05
N76D/S103A/V104I/M222A	70	3.1	2.30E+04
N76D/S103A/V104I/M222S	80	3.1	2.60E+04
N76D/S103A/V104I/T260P	660	1.5	4.40E+05
N76D/S103A/V104I/S265N	590	1.3	4.50E+05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	220	1.4	1.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	430	1.1	3.90E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	400	1.1	3.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	760	0.98	7.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	410	1.2	3.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3.90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2.1	8.10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6.3	6.40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0.98	4.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0.66	8.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0.79	9.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0.99	6.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0.78	7.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0.89	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0.65	7.10E+05
B. アミロリケアジシス・スチリシ (BPN')	50	0.14	3.60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

\* これらの突然変異体は実施例 5 に従って作り、他の全ては実施例 2 に従って作った。

## 表 VI

酵 素	熱 安 定 性 (%天然酵素の半減期)	
B. レンタス・ズブチリシン	100	
N76D	590	
N76D/S99D	840	
N76D/S103A	390	
N76D/V104I	660	
N76D/I107V	710	10
N76D/N123S	70	
N76D/S99D/S101R	610	
N76D/S99D/S103A	590	
N76D/S99D/V104I	910	
N76D/S101R/S103A	930	
N76D/S101R/V104I	500	
N76D/S103A/V104I	460	
N76D/S103G/V104I*	370	
N76D/S103A/V104F	480	
N76D/S103A/V104N	230	
N76D/S103A/V104S	230	20
N76D/S103A/V104T	370	
N76D/S103A/V104W	280	
N76D/S103A/V104Y	400	
N76D/V104I/I107V	940	
N76D/V104Y/I107V	820	
N76D/V104I/N123S	80	
N76D/I107V/N123S	150	
K27R/N76D/V104Y/N123S	100	
N76D/S99D/S101R/S103A	570	
N76D/S99D/S101R/V104I	1000	
N76D/S99D/S103A/V104I	680	30
N76D/S101G/S103A/V104I*	390	
N76D/S101R/S103A/V104I	470	
N76D/S103A/V104I/S105A*	360	
N76D/S103A/V104I/S105D*	370	
N76D/S103A/V104T/I107A*	270	
N76D/S103A/V104T/I107L*	230	
N76D/S103A/V104I/N123S	110	
N76D/V104I/I107V/N123S	220	
N76D/S103A/V104I/L126A	270	
N76D/S103A/V104I/L126F	950	
N76D/S103A/V104I/L126I	410	40

N76D/S103A/V104I/L126V	320	
N76D/S103A/V104I/S128G*	640	
N76D/S103A/V104I/S128L*	760	
N76D/S103A/V104I/L135A	230	
N76D/S103A/V104I/L135F	200	
N76D/S103A/V104I/L135I	510	
N76D/S103A/V104I/L135V	500	
N76D/S103A/V104I/S156E*	120	
N76D/S103A/V104I/S166D*	590	
N76D/S103A/V104I/D197E	460	
N76D/S103A/V104I/N204A*	230	10
N76D/S103A/V104I/N204G*	240	
N76D/S103A/V104I/N204C*	500	
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370	
N76D/S103A/V104I/L217H*	60	
N76D/S103A/V104I/M222A	520	
N76D/S103A/V104I/M222S	490	
N76D/S103A/V104I/T260P	490	
N76D/S103A/V104I/S265N	360	
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210	
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120	
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110	20
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380	
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140	
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270	
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40	
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60	
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590	
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110	
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810	
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220	
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90	
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250	30
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270	
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460	
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400	
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310	
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180	
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90	
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	230	
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	240	
B. アミロリケファッション・ズブチリシン(BPN' )		
BPN'-N76D/Y217L*	100	
	420	40

\* これらの突然変異体は実施例 5 に従って作り、他の全ては実施

例 2 に従って作った。

実施例 6

#### 洗淨性能試験

先の実施例に記載の変異体の洗淨性能を、EMPA 116 (血液 / ミルク / カーボンブラック付き綿) 布地見本 (Test fabrics, Inc., Middlesex, NJ 07030) からの汚れの除去を測定することにより評価した。

波形縁を有する 3 × 4 1/2 インチに切った 6 枚の EMPA 116 見本を、1000ml の水、15ppg の硬度 (Ca<sup>++</sup>:Mg<sup>++</sup>::3:1::w:w)、7g の洗剤、及び適宜酵素を含む Model 7243 S Terg

-O-Tometer (United States Testing Co., Inc., Hoboken, NJ) の各ポットに入れた、洗剤ベースはwfk-Testgewebe GmbH, Adlerstrasse 42, Postfach 13 07 62, D-47759 Krefeld, Germany由来のWFKI洗剤とした:

成 分	最終配合%
ゼオライト A	25 %
硫酸ナトリウム	25 %
ソーダ灰	10 %
線形アルキルベンゼンスルホネート	8.8 %
アルコールエトキシレート	4.5 %
ナトリウム石けん	3 %
珪酸ナトリウム ( $\text{SiO}_2 : \text{Na}_2\text{O} :: 3.3 : 1$ )	3 %

10

このベース洗剤に、以下の添加物を加えた。

成 分	最終配合%
過ホウ酸ナトリウム - 水和物	13 %
コポリマー (Sokalan CP5)	4 %
TAED (Mykon ATC Green)	3 %
酵 素	0.5 %
漂白剤	0.2 %

20

過ホウ酸ナトリウム - 水和物はDegussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07660より入手した。Sokalan CP5はBASF Corporation, Parsippany, NJ 07054より入手した。Mykon ATC Green (TAED, テトラアセチルエチレンジアミン) はWarwick International, Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, Englandより入手した。Tinopal AMS GXはCiba-Geigy Corporation, Greensboro, NC 27419より入手した。

6枚のEMPA 116見本を酵素含有洗剤で60℃で30分洗い、そして1000mlの水で5分づつ、2回すすいだ。標準曲線のために酵素を0.05~1ppmの濃度で加えて、そしてルーチン分析のためには0.25ppmとした。見本を乾かし、そして加圧し、そして見本からの反射率はMinolta Chroma Meter, Model CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ 67446) のL a bスケールに基づくL値を利用して測定した。性能を、B・レントラス (GG36) プロテアーゼの性能の%として報告し、そして同程度の汚れ除去性能×100を供するのに必要な量の変異体プロテアーゼによりB・レントラス (GG36) の量を除することによって計算した。

30

40

表 VII

酵 素	洗 浄 性 能	
B. レンタス・ズブチリシン	100	
N76D	310	
N76D/S103A	230	
N76D/V104I	130	
N76D/I107V	160	
N76D/S99D/S101R	370	
N76D/S99D/S103A	290	10
N76D/S101R/S103A	130	
N76D/S101R/V104I	300	
N76D/S103A/V104I	320	
N76D/S103G/V104I	160	
N76D/S103A/V104F	210	
N76D/S103A/V104N	110	
N76D/S103A/V104T	170	
N76D/V104I/I107V	210	
N76D/S99D/S101R/S103A	220	
N76D/S99D/S101R/V104I	140	
N76D/S101G/S103A/V104I	170	20
N76D/S101R/S103A/V104I	150	
N76D/S103A/V104I/S105A	170	
N76D/S103A/V104T/I107A	120	
N76D/S103A/V104T/I107L	110	
N76D/S103A/V104I/L126F	110	
N76D/S103A/V104I/S128G	280	
N76D/S103A/V104I/L135I	160	
N76D/S103A/V104I/L135V	160	
N76D/S103A/V104I/D197E	170	
N76D/S103A/V104I/N204A	160	
N76D/S103A/V104I/N204G	150	30
N76D/S103A/V104I/P210I	470	
N76D/S103A/V104I/M222A	100	
N76D/S103A/V104I/T260P	280	
N76D/S103A/V104I/S265N	190	

## 実施例 7

液体洗剤中でのプロテアーゼの安定性

液体洗剤の中で失活に至るプロテアーゼ安定性の比較をバチルス・レンタス・ズブチリシン及びその変異酵素N76D/S103A/V104Iについて、ここに概略の手順に従って行った。この研究のために用いた洗剤はProcter & Gamle Companyより米国で作られたTide Ultra液体洗濯洗剤の市販のボトルのものとした。洗剤の熱処理が、プロテアーゼをin-situで失活させるのに必要とされた。これは96 ℃で4.5時間の洗剤のインキュベーションにより成し遂げられた。B. レンタス・ズブチリシン及びN76D/S103A/V104I変異体の20 g / lの酵素の範囲での濃縮調製品を熱処理したTide Ultraに、室温で、洗剤中で0.3 g / lの酵素の最終濃度となるように加えた。プロテアーゼの添加した熱処理洗剤を50 ℃に恒温とした湯浴の中でインキュベートした。インキュベーションチューブから0, 24, 46, 76及び112時間のインターバルでアリコートを取り出し、そし25 ℃に恒温とした0.1Mのトリスバッファ-pH 8.6に溶かした合成ペプチド基質suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p - ニトロアニリド1.2 mMを含む1 cmのキュベットに加えることにより、酵素活性についてアッセイした。初期線形反応速度を経時的に410nmでの反応生成物 p - ニトロアニリンの吸収をモニターすることにより光学的に追った。図10に示す通り、N76D/S103A/V104I変異体は天然B. レンタ

10

20

30

40

50

ス・酵素よりも失活に対して有意に安定であることが観察された。この2つの酵素の、特定の試験条件下でのTide Ultra洗剤の中での失活についての推定半減期は、B・レンタ変異体に関しては45時間、そしてN76D/S103A/V104I変異体については125時間であった。本明細書全体にわたり、様々なアミノ酸についての言及は一般の1文字及び3文字コードによる。かかるコードはDale, J.W. (1989) の Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., 付録Bに記載されている。

本発明の好適な態様を上述したきたが、本発明は、本発明の範囲を逸脱することなく、全体的に、様々な変更及び均等物改良を施すことができることを当業者は理解するであろう。

#### 配列表

10

(1) 一般情報:

(i) 出願人: Graycar, Thomas P

Bott, Richard R

Wilson, Lori J

(ii) 発明の名称: ズブチリシン変異体

(iii) 配列の数: 15

(iv) 連絡先:

(A) 宛先: Genencor International, Inc

(B) 通り: 180 Kimball Way

(C) 市: So. San Francisco

(D) 州: CA

(E) 国: USA

(F) 郵便番号: 94080

(v) コンピューター読取フォーム:

(A) 媒体タイプ: Floppy disk

(B) コンピューター: IBM PC compatible

(C) 作動システム: PC-DOS / MS-DOS

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

(vi) 現出願データー:

(A) 出願番号:

(B) 出願日: 13-OCT-1994

(C) 分類:

(viii) 代理人/代理店情報:

(A) 名称: Horn, Margaret A.

(B) 登録番号: 33,401

(C) 参照番号/事件番号: GC235-2

(ix) 通信情報:

(A) 電話: (415) 742-7536

(B) ファックス: (415) 742-7217

(2) SEQ ID NO: 1 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 19塩基対

(B) タイプ: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子のタイプ: DNA (ゲノム)

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 1

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA

19

(2) SEQ ID NO: 2 についての情報:

(i) 配列の特徴:

50

- ( A ) 長さ : 18塩基対  
 ( B ) タイプ : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖  
 ( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )  
 ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 2  
 GCTGCTCTAG ACAATTCC 18
- ( 2 ) SEQ ID NO : 3 についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 39塩基対 10  
 ( B ) タイプ : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖  
 ( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )  
 ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 3  
 GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT 39
- ( 2 ) SEQ ID NO : 4 についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 33塩基対  
 ( B ) タイプ : 核酸 20  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖  
 ( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )  
 ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 4  
 TCAGGTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG 33
- ( 2 ) SEQ ID NO : 5 についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 22塩基対  
 ( B ) タイプ : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖 30  
 ( D ) トポロジー : 直鎖  
 ( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )  
 ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 5  
 CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG 22
- ( 2 ) SEQ ID NO : 6 についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 1497塩基対  
 ( B ) タイプ : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖 40  
 ( D ) トポロジー : 直鎖  
 ( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )  
 ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 6

GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG	60	
TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA	120	
GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC	180	
AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA	240	
GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA	300	
AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT	360	
TGAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC	420	
AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA	480	10
CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT	540	
TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA	600	
ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT	660	
TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACCTTACG CTGTAAGAGT TCTCGGTGCT GACGGTCCG	720	
GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA	780	
TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG	840	
CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT	900	
CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA	960	20
GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG	1020	
GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCTGGAA ACAAAATACGG GCGGTACAAC GGTACGTCAA	1080	
TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA	1140	
CAAACACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT	1200	
ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAAATA AAAAACCGGC	1260	
CTTGCCCGG CCGGTTTTTTT APTATTTTTT TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT	1320	
CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC	1380	
CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT	1440	30
GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCTGATA CCGGAGACG GCATTTCGTAA TCGGATC	1497	

( 2 ) SEQ ID NO : 7 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 275 アミノ酸

( B ) タイプ : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : タンパク質

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 7

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

10

20

30

( 2 ) SEQ ID NO : 8 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 275アミノ酸

( B ) タイプ : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : タンパク質

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 8

40

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

10

20

30

40

( 2 ) SEQ ID NO : 9 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 274アミノ酸

( B ) タイプ : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : タンパク質

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 9

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

10

20

30

Ala Gln

( 2 ) SEQ ID NO : 10 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 269 アミノ酸

( B ) タイプ : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : タンパク質

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 10

40

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60  
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95 10

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175 20

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255 30

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

( 2 ) SEQ ID NO : 11 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1140塩基対

( B ) タイプ : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 11

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTT TGTGCTTTT	60	
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT	120	
GAGCAGGAAG CTGTCACTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCCGATT	180	
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT	240	
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTCT	300	
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGAATTAGC	360	
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT	420	
GTCCTCGATA CAGGTATTTT CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT	480	10
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG	540	
ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC	600	
GCTGTAAAG TATTAGGGGC GAGCGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG	660	
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA	720	
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTGTAGCG	780	
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG	840	
GCAGTCGGAG CTA CTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG	900	
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACCGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC	960	20
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA	1020	
CAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG	1080	
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGA CTGTGCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC	1140	

( 2 ) SEQ ID NO : 12 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1140塩基対

( B ) タイプ : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 12

10

20

30

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60  
 AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAAGAAA AATATTAAAT TGGCTTTAAT 120  
 GAGCAGGAAG CTGTCAAGTA GTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180  
 CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240  
 TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300  
 TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAAATTAGC 360  
 CGTGTGCAAG CCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420  
 GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480  
 GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540  
 ATTGCTGCTT TAGACAATC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACATAC 600  
 GCTGTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660  
 GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720  
 AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780  
 GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840  
 GCAGTCGGAG CTAAGTACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTACAGTA TGGCGCAGGG 900  
 CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACCGT CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC 960  
 AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020  
 CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080  
 AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGAAGTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

10

20

( 2 ) SEQ ID NO : 13 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 30塩基対

( B ) タイプ : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )

30

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 13

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT

30

( 2 ) SEQ ID NO : 14 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 31塩基対

( B ) タイプ : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 14

40

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T

31

( 2 ) SEQ ID NO : 15 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 33塩基対

( B ) タイプ : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子のタイプ : DNA ( ゲノム )

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 15

GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT

33

50





161 S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A  
 170 S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A  
 180 S T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G A E L E V M A  
 \* \* \* I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S Q Y G A G L D I V A

201 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N  
 220 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N  
 230 P G A G V Y S T Y P P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N  
 P G V N V Q S T Y P P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L L V K Q K N P S

241 W T N T Q V R S S L E N T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q  
 250 W T N A Q V R R D R L L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q  
 260 L S A S Q V R R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q  
 270 W S N V Q I R R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R

FIG.-3B

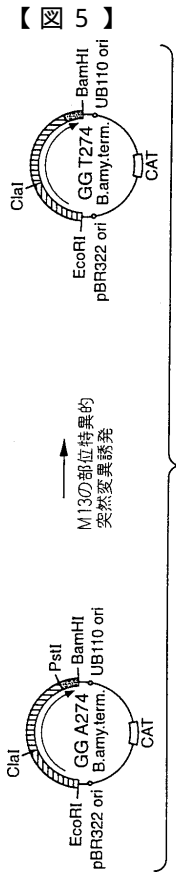
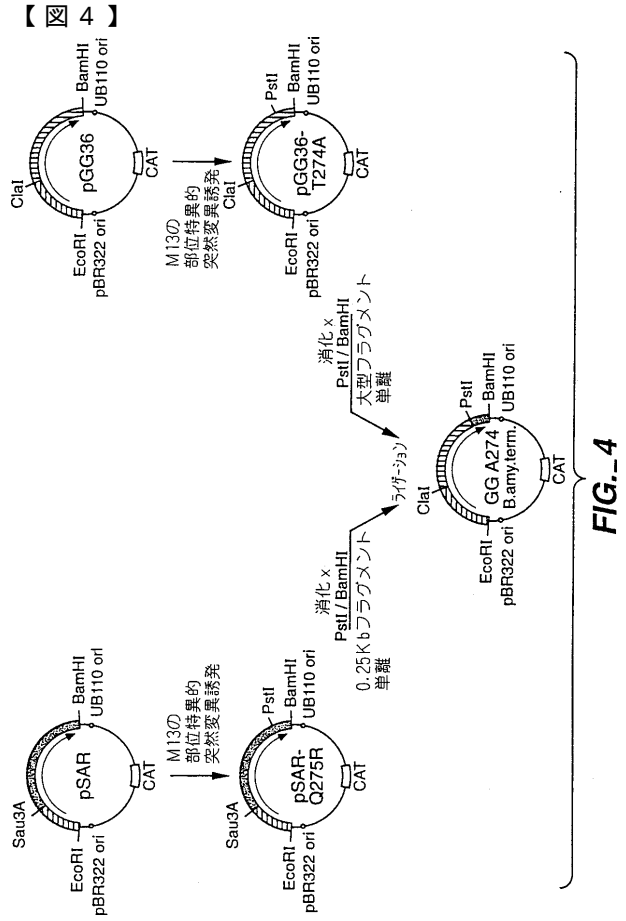


FIG.-5

10 ATCAGAAACCGTTGGGAAAATTGTCGACGACCGACTACTCATTTCTGTGCTTTT  
 30 MetLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe  
 50  
 70 AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGGAAGACCAAAAATATTAATTGGCTTTAAT  
 90 SerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn  
 110  
 130 GACGAGAGCTGTCAGTGCAGTTGTAGAACCAAGTAGAGGCAATGACGAGTCCGCATT  
 150 GluGlnAlaIleValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle  
 170  
 190 CTCCTCAGGAGAGGAGTCCGAAATTCATGATTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT  
 210 LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal  
 230  
 250 TTATCCGTTGAGTTAAGCCACAGATGTGCACGCGCTTGAACCTCCAGCATTTCT  
 270 LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer  
 290  
 310 TATATTGACGAGGATGCAGACGACCAATGCGGCAATCAGTCCATCGGGAATTAGC  
 330 TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValPheTrpGlyIleSer  
 350  
 370 CGTGTCCAGCCCGTCCCATACCGTGTGATGACAGTTCTGCTGTAAGTGTCT  
 390 ArgValGlnAlaProAlaAlaIleAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValIleValAla  
 410

FIG.-6A

FIG.-4

430 GTCTCGATACAGGTATTTCCACATCCAGACTTAATAATTCCTGGGCGGTAGCTTT  
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyAlaSerPhe 450 470  
 490 GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGCAATGGCATGGCAGCATGTGGCGGGAGC 510 530  
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr 550 590  
 ATTCTGCTTTAAACAATTCGATTTGGCGCTTCTGGCGTAGCCGCGAGCGCGGAACATATAC  
 IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr 570 610  
 610 GCTGTTAAAGTATTAGGGGAGCGGTTCCAGGTTCCGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG  
 AlaValIysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu 630 650  
 670 GAATGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTAGTTAGGAGCCCTTCGCCCA  
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMethHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro 690 710  
 730 AGTCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGGACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCG  
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValAla 750 770  
 790 GCATCTGGCAATTCAGGTGCGAGGCTCAATCAGCTATCCGCGCCCTTATGCCAAGCATG  
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet 810 830

FIG.-6B

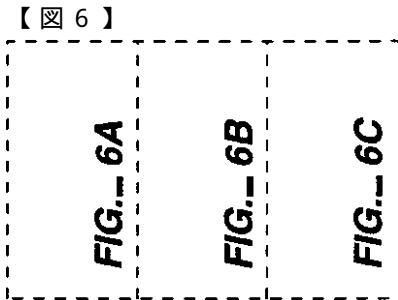


FIG.-6

850 GCAGTCGAGCTACTGACCAAAACACACCGCGCAGCTTTTACACAGTATGGCGCAGGG 870 890  
 AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly 910 930  
 970 AGCTTAAACCGTACATCGATGCTACTCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTAAA  
 SerLeuAsnGlyThrSerMetalaThrProHisValAlaGlyAlaAlaLeuValIys 990 1010  
 1030 CAAAAGAACCCATCTTGTCCATGTACAAATCCGCAATCTCAAGATACGGAACG  
 GlnIysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuIysAsnThrAlaThr 1050 1070  
 1090 AGCTTAGGAAGCAGCAACTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAGCGGCAACACG  
 SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg 1110 1130

FIG.-6C

10 ATGAAGAAACCGTTGGGAAAATTTGCGCAAGCAGCCGCACTACTCAATTCGTGCTTTT  
 MetLysIysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe 30 50  
 70 AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAGCAAAAGAAAATAATTAATGGCTTAAT  
 SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlalysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn 90 110  
 130 GAGCAGGAAGCTGTCAGTGTGTTGTAGACAAGTAGAGGCAAAATGACAGGTGCGCAT  
 GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle 150 170  
 190 CTCTCTGAGGAAGAGGAGTCCGAAATTTGATGCTTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGT  
 LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal 210 230  
 250 TTATCCGTTGAGTTAAGCCAGAGATGTGACGGCTTGAACCTCGATCCAGCGATTCT  
 LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer 270 290  
 310 TATATTGAAGAGGATGCAGAGTAACACAAATGGCGCAATCAGTGCATCGGGAATTAGC  
 TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetalaGlnSerValProTrpGlyIleSer 330 350  
 370 CGTGTGACAGCCCGCCATACCCTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT  
 ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValIysValAla 390 410

FIG.-7A

430 450 470  
 GTCTCGATACAGGTATTTCCACATCCAGACTCAATAAATATTCTGGTGGCGGTAGCTTT  
 ValLeuaspThrGlyIleSerThrHisProaspLeuasnIleArgGlyAlaSerPhe

490 510 530  
 GTACCGGGRAACCACTCCACTCAAGATGGGAATGGGATGGCAGCATGTGGCGGGACG  
 ValProGlyGluProSerThrGlnaspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

550 570 590  
 ATTCTGCTTTAGACAACACTCGATTGGCGTCTTGGCGTAGCGCGGCGGAACTATAC  
 IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

610 630 650  
 GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGGCGTTCCAGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG  
 AlaValIysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

670 690 710  
 GAATGGCAGGAAACAAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTAGGAAGCCCTCGCCA  
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMethHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

730 750 770  
 AGTCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGGACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCG  
 SerAlaThrLeuGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

790 810 830  
 GCATCTGGAAATTCAGGTGCGAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCTTATGGCAAGCCATG  
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

FIG.-7B

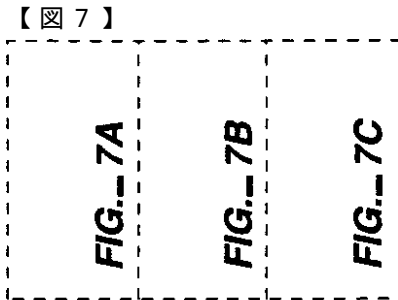


FIG.-7

850 870 890  
 GCAGTCGAGCTACTGACCAAAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG  
 AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

910 930 950  
 CTTGACATTTCCGACAGGTAAAGTGCAGAGCACATACCAGGTTCAACGATGCGC  
 LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

970 990 1010  
 AGCTTAAACGGTACATCGATGCTCCTCATGTTGCAGGTGCGAGCCCTTGTAAA  
 SerLeuAsnGlyThrSerMetalaThrProHisValAlaGlyAlaAlaLeuValIys

1030 1050 1070  
 CAAAGAACCCTTTGTCATGTCACAAATCCCAATCATCTAAAGATATACGGCAACG  
 GlnIysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuIysAsnThrAlaThr

1090 1110 1130  
 AGCTTAGGAACGACGAACTGTATGGAAGCGGACTGTCAATGCGAAGCGCAACACCG  
 SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg

FIG.-7C

FIG.-8A

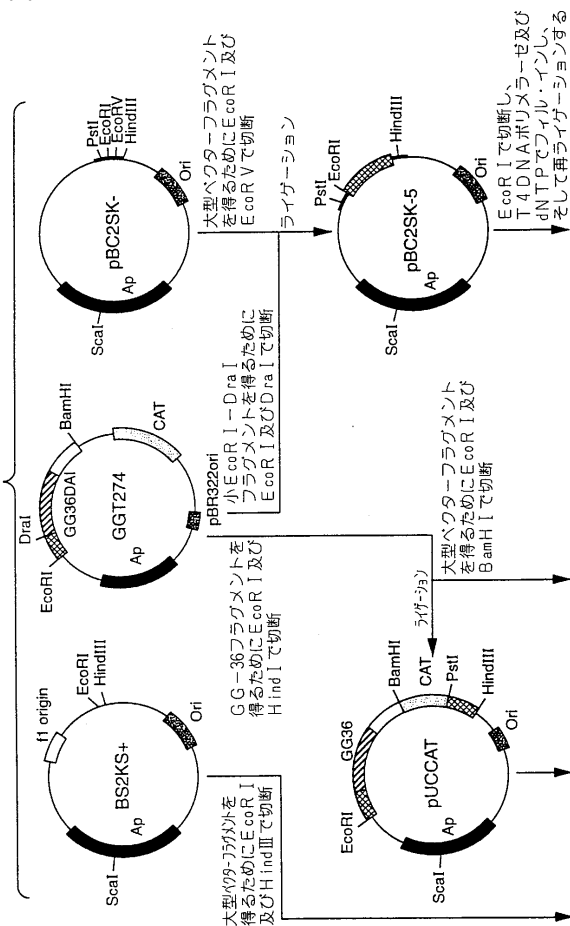
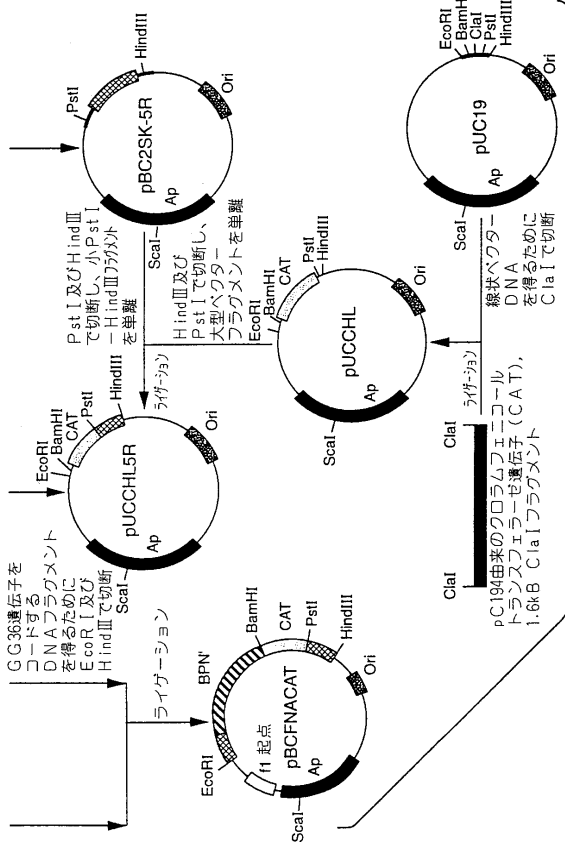


FIG.-8A



【 図 9 B 】



【 図 10 】

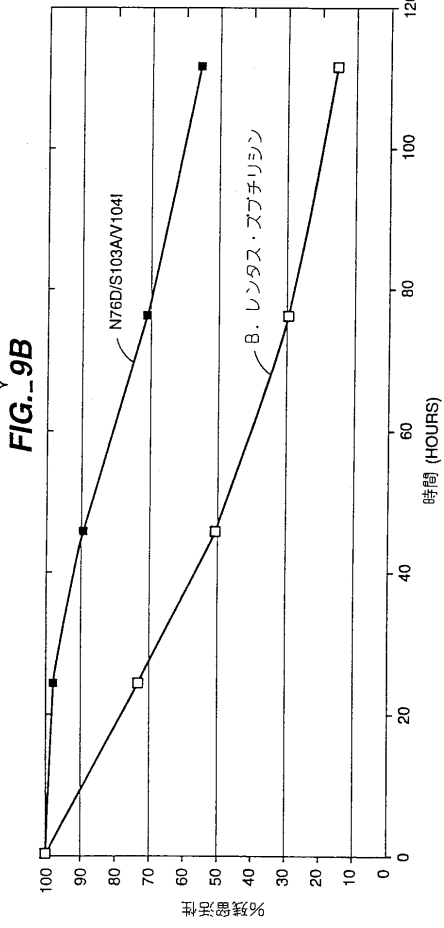


FIG.\_10

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N 9/56

C 1 2 R 1:125

(72)発明者 ウィルソン, ロリー ジェイ.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 0 3 0 , ミルブラウ, イーエル ポニート ウェイ 3 3

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特表平03 - 505976 (JP, A)

特開平01 - 085075 (JP, A)

Biochemistry, 1989年, Vol.28, p. 7205-7213

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987年, Vol.84, p. 1219-1223

Ann. New York Academy of Sciences, 1992年, Vol.672, p. 71-79

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 90

C07K 14/00 - 16/46

C12P 21/00 - 08

C12N 1/00 - 9/99

G01N 33/50 - 98

C12Q 1/00 - 70

PubMed, MEDLINE(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq

UniProt/GeneSeq