

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-513199
(P2022-513199A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/60 (2006.01)	C 1 2 N	15/60	Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31		4 C 0 8 4
C 1 2 N	9/88 (2006.01)	C 1 2 N	9/88		4 C 2 0 6
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全145頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-533201(P2021-533201)	(71)出願人	502427921		
(86)(22)出願日	令和1年12月6日(2019.12.6)		コデクシス, インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和3年8月6日(2021.8.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/064891		6 3, レッドウッド シティ, ペノブ		
(87)国際公開番号	WO2020/123286		スコット ドライブ 2 0 0		
(87)国際公開日	令和2年6月18日(2020.6.18)	(74)代理人	100078282		
(31)優先権主張番号	62/779,647		弁理士 山本 秀策		
(32)優先日	平成30年12月14日(2018.12.14)	(74)代理人	100113413		
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 森下 夏樹		
	米国(US)	(72)発明者	リウ, ジョイス		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		6 3, レッドウッド シティ, ペノブ		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		スコット ドライブ 2 0 0		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR	(72)発明者	デラス, ニッキ		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0		
	最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 操作されたチロシンアンモニアリアーゼ

(57)【要約】

本発明は、操作されたチロシンアンモニアリアーゼ（T A L）ポリペプチドおよびその組成物を提供する。一部の実施形態では、操作されたT A Lポリペプチドは、タンパク質分解に対する感受性を低下させ、酸性p Hレベルに対する耐容性を増加させる一方で、増強された触媒活性をもたらすように最適化されている。本発明は、治療および産業目的での、操作されたT A Lポリペプチドを含む組成物の利用のための方法も提供する。一部の実施形態では、本発明は、本質的に同じ条件下で野生型T A L酵素および／または参照T A Lポリペプチドと比較した場合に、改善された特性を有する、操作されたT A Lポリペプチド（本明細書では、「組換えT A Lポリペプチド」とも称される）ならびにその生物学的に活性な断片およびアナログを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む、組換えチロシンアンモニアリアーゼおよび／または生物学的に活性な組換えチロシンアンモニアリアーゼ断片。

【請求項 2】

79 / 95 / 107、79 / 107、79 / 107 / 410、79 / 410、95 / 107 / 184、95 / 107 / 184 / 534、95 / 184 / 534、99 / 107 / 184、107 / 184 / 534、および 107 / 401 / 534 から選択される位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 2 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

10

【請求項 3】

28、29、33、33 / 34 / 37 / 46 / 279 / 554、33 / 34 / 37 / 90 / 554、33 / 34 / 46 / 66 / 90 / 289、33 / 34 / 90 / 289 / 554、33 / 34 / 279 / 289、33 / 66、33 / 66 / 289、33 / 66 / 289 / 554、34 / 37 / 46 / 289、34 / 37 / 66 / 279 / 289、34 / 46 / 34 / 56 / 90、34 / 56 / 90 / 289、34 / 66 / 289、34 / 90 / 289 / 554、34 / 90 / 519、36 / 70 / 234 / 302 / 461 / 500、36 / 79、36 / 79 / 304 / 407、36 / 79 / 407 / 461 / 500 / 531、36 / 111 / 304 / 461 / 531、36 / 407 / 461 / 500 / 531、37、46、46 / 66 / 289 / 519 / 554、49、56、66、66 / 90 / 279 / 289 / 554、66 / 90 / 289 / 554、69、70 / 79 / 234 / 361 / 407、70 / 111 / 461 / 500 / 531、70 / 304 / 407 / 461、72、79 / 111 / 234 / 361 / 500、79 / 111 / 234 / 531、79 / 111 / 361、79 / 111 / 531、79 / 304 / 361、79 / 304 / 461 / 531、79 / 407 / 461、88、90 / 289 / 519、90 / 289 / 554、131、142、198、201、272、278、279 / 289 / 554、289 / 519 / 554、289 / 554、295、304 / 361、305、350、361 / 500 / 531、461 / 500、490、491、499、510、518、519、521、522、523、524、531、540、541、544、547、548、554、557、558、および 560 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 14 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

20

30

【請求項 4】

28 / 34 / 49 / 70 / 234 / 289 / 544 / 554、33 / 34 / 49 / 234 / 531 / 547 / 554、33 / 34 / 66 / 70 / 519 / 531、33 / 34 / 66 / 289 / 522 / 531、33 / 34 / 70 / 234 / 289 / 519、33 / 34 / 70 / 234 / 518 / 519 / 547 / 554、33 / 34 / 70 / 289 / 522 / 554、33 / 34 / 289 / 522 / 531、34 / 49 / 66 / 531、34 / 49 / 234 / 531 / 554、34 / 49 / 289 / 544 / 547、34 / 66 / 70 / 234 / 518 / 519 / 547、34 / 66 / 531 / 554、34 / 66 / 554、34 / 70 / 234 / 289 / 522、34 / 70 / 234 / 554、34 / 70 / 289 / 522、34 / 234 / 522 / 554、34 / 289、34 / 289 / 522 / 531、34 / 289 / 522 / 544 / 554、34 / 522、34 / 544、66 / 70 / 234、および 234 / 531 / 544 / 547 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 86 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

40

50

【請求項 5】

3 1、3 7 / 4 9 / 5 6 / 6 6 / 1 1 1、3 7 / 4 9 / 5 6 / 2 3 4 / 5 5 7、3 7 / 4 9 / 5 6 / 5 0 0 / 5 2 4、3 7 / 4 9 / 6 6 / 1 1 1 / 2 3 4、3 7 / 4 9 / 1 1 1 / 5 2 4、3 7 / 1 1 1、3 7 / 1 1 1 / 3 6 1 / 5 0 0 / 5 5 7 / 5 5 8、3 7 / 2 3 4、4 3 / 5 9 / 9 3 / 5 0 6、4 3 / 3 0 6、4 3 / 3 0 6 / 5 0 6、4 9 / 5 6 / 6 6 / 1 1 1 / 1 5 3 / 2 3 4 / 5 0 0 / 5 2 4、4 9 / 6 6、5 6 / 1 1 1 / 2 3 4、5 6 / 2 3 4 / 5 0 0、6 1、6 5、6 5 / 3 3 6、6 6、6 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 0 0、9 3 / 5 0 6、9 5、1 0 3、1 0 3 / 1 0 7 / 4 1 7 / 4 2 1、1 0 3 / 3 0 6 / 5 0 6、1 0 3 / 4 2 1、1 0 4 / 1 0 5、1 0 7、1 0 7 / 4 1 7 / 4 2 1、1 1 1 / 2 3 4 / 5 4 8 / 5 5 8、1 1 1 / 3 6 1、1 4 5、1 4 6、1 5 5、1 7 2、1 9 7、2 1 1、2 3 4、2 3 4 / 5 2 4、2 3 7 / 2 3 8 / 5 0 6、2 8 6、3 0 4、3 0 6、3 0 6 / 5 0 6、3 2 8、3 3 6、3 6 1 / 5 2 4 / 5 5 7 / 5 5 8、4 0 7、4 1 7 / 4 2 1、4 2 1、4 7 1、5 0 4、5 0 6、5 4 9、および 5 5 8 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 3 3 4 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

10

【請求項 6】

3 1 / 6 1 / 9 5 / 2 8 6 / 3 2 8、3 1 / 6 1 / 9 5 / 4 0 7 / 5 0 4、3 1 / 6 1 / 9 5 / 4 7 1 / 5 0 4、3 1 / 6 1 / 4 0 7 / 5 0 4、3 1 / 9 5 / 1 5 5 / 2 8 6 / 5 0 4 / 5 4 9、3 1 / 9 5 / 2 3 7 / 5 0 4 / 5 4 7 / 5 4 9、3 1 / 9 5 / 2 8 6 / 5 0 4、3 1 / 9 5 / 2 8 6 / 5 0 4 / 5 4 9、3 1 / 9 5 / 3 2 8 / 5 0 4、3 1 / 9 5 / 5 0 4、3 1 / 9 5 / 5 4 9、3 7 / 4 9 / 5 6 / 5 9 / 1 4 5、3 7 / 1 0 3 / 1 1 1 / 1 4 5 / 4 2 1 / 5 0 0 / 5 2 4、4 9 / 5 6 / 5 9 / 2 3 4 / 5 0 0、4 9 / 5 9 / 6 6 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4、4 9 / 5 9 / 1 4 5 / 2 3 4 / 4 2 1、5 6 / 5 9 / 6 6 / 2 3 4、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 1 4 5、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 4 2 1、5 6 / 6 6 / 1 4 5 / 5 0 0、5 6 / 1 0 3 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 5 0 0、5 9 / 1 0 3 / 1 4 5 / 2 3 4 / 4 2 1 / 5 0 0、5 9 / 1 0 3 / 2 3 4 / 4 2 1、5 9 / 1 4 5、5 9 / 2 3 4、6 1、6 1 / 9 5 / 1 5 5 / 2 8 6 / 4 0 7 / 4 7 1、6 1 / 9 5 / 1 5 5 / 4 0 7、6 1 / 9 5 / 2 8 6、6 1 / 9 5 / 2 8 6 / 3 2 8 / 5 0 4、6 1 / 9 5 / 3 2 8 / 4 0 7、6 1 / 9 5 / 3 2 8 / 5 4 9、6 1 / 9 5 / 4 0 7、6 1 / 9 5 / 5 0 4 / 5 4 7、6 1 / 2 8 6 / 4 0 7、6 1 / 3 2 8、6 1 / 3 2 8 / 5 0 4、6 1 / 3 2 8 / 5 0 4 / 5 4 9、6 1 / 4 0 7、6 1 / 5 0 4、6 6 / 1 0 3 / 1 4 5 / 2 3 4 / 4 2 1、9 5 / 1 5 5 / 2 8 6 / 3 2 8 / 4 0 7 / 5 0 4、9 5 / 1 5 5 / 2 8 6 / 5 4 9、9 5 / 2 8 6、9 5 / 2 8 6 / 3 2 8 / 4 0 7 / 5 0 4、9 5 / 2 8 6 / 3 2 8 / 5 0 4、9 5 / 2 8 6 / 5 4 7、9 5 / 2 8 7 / 5 0 4 / 5 4 9、9 5 / 3 2 8 / 5 0 4、9 5 / 4 0 7、9 5 / 4 0 7 / 5 0 4、9 5 / 5 0 4 / 5 4 7、9 5 / 5 4 9、1 0 3 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 4 2 1、1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4、1 1 1 / 2 3 4、1 4 5 / 2 3 4 / 5 0 0、2 8 6 / 3 2 8 / 4 0 7 / 5 0 4 / 5 4 9、および 5 4 9 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 3 8 8 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

20

30

40

【請求項 7】

1 4 / 5 6 / 1 1 4、1 4 / 1 1 4 / 2 8 3 / 2 8 9、1 4 / 1 1 4 / 2 8 3 / 2 8 9 / 2 9 1、1 4 / 1 1 4 / 2 8 3 / 2 8 9 / 5 6 2、1 4 / 1 1 4 / 2 9 1 / 5 1 8 / 5 6 2、1 4 / 1 1 4 / 5 1 8、1 4 / 2 3 4 / 2 8 3 / 2 9 1 / 3 0 5、1 4 / 2 8 3 / 2 8 9 / 5 6 2、2 9 / 6 6 / 1 1 1、2 9 / 6 6 / 1 1 1 / 5 4 0、2 9 / 1 1 1、2 9 / 1 1 1 / 5 2 3、3 3 / 4 6 / 4 9、3 3 / 4 6 / 4 9 / 3 3 6 / 5 1 9 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 4 6 / 4 9 / 5 4 9、3 3 / 4 6 / 5 1 8 / 5 3 4 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 4 6 / 5 1 9、3 3 / 4 9 / 3 3 6、3 3 / 3 3 6 / 5 1 9、3 6 / 3 7 / 5 6 / 5 9 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8、3 6 / 3 7 / 5 9 / 1 3 1 / 5 3 1、3 6 / 3 7 / 1 0 3 /

50

2 3 4、3 6 / 3 7 / 1 3 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8、3 6 / 3 7 / 1 4 5 / 2 3 4、
 3 6 / 3 7 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8 / 4 7 1 / 5 3 1、3 6 / 3 7 / 2 3 4 / 3 2 8 /
 5 3 1、3 6 / 5 6 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8、3 6 / 5 9 / 2 3 4 / 3 2 8、3 6 / 5
 9 / 5 3 1、3 6 / 1 0 3 / 1 4 5 / 3 2 8 / 5 3 1、3 6 / 1 3 1、3 6 / 2 3 4 / 5
 3 1、3 7 / 5 6 / 5 9 / 1 0 3 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8 / 4 7 1 / 5 3 1、3 7 / 5
 6 / 5 9 / 2 3 4 / 3 2 8 / 5 2 4 / 5 3 1、3 7 / 5 6 / 5 9 / 2 3 4 / 5 3 1、3 7
 / 5 6 / 2 3 4 / 5 3 1、3 7 / 5 9 / 2 3 4、3 7 / 2 3 4 / 4 7 1、4 6 / 4 9、4
 6 / 4 9 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 8 / 5 4 9、4 6 / 4 9 / 5 1 9、4 6 / 1 5 5、4 6
 / 5 4 8、4 9 / 5 1 9、5 6、5 6 / 5 9 / 1 0 3 / 4 7 1 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 4
 7 1 / 5 3 1、5 6 / 1 1 4 / 2 0 6 / 2 8 3、5 6 / 1 1 4 / 2 9 1、5 6 / 1 1 4 /
 2 9 1 / 5 1 8 / 5 6 2、5 6 / 1 1 4 / 5 1 8、5 6 / 5 1 8、5 9 / 3 2 8 / 5 2 4
 / 5 3 1、6 6 / 5 4 0、1 1 1、1 1 1 / 5 1 0 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 1 / 5 5 8、
 1 1 1 / 5 2 3 / 5 5 7、1 1 4、1 1 4 / 2 0 6 / 2 8 3 / 2 8 9 / 5 6 2、1 1 4 /
 2 8 3 / 2 8 9 / 2 9 1、1 1 4 / 2 8 3 / 2 8 9 / 3 0 5 / 5 1 8、1 1 4 / 2 8 3 /
 2 9 1、1 1 4 / 2 8 9、1 1 4 / 2 8 9 / 5 6 2、1 1 4 / 2 9 1、1 1 4 / 2 9 1 /
 5 1 8、1 1 4 / 5 1 8 / 5 6 2、1 1 4 / 5 6 2、1 3 1 / 2 3 4 / 3 2 8、2 3 4、
 2 3 4 / 3 2 8、2 3 4 / 3 2 8 / 4 7 1、2 3 4 / 5 3 1、2 8 9 / 5 6 2、3 0 5、
 3 3 6 / 5 1 9、5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 8 / 5 4 9、5 1 9、5 2 1、5 2 3、5 3 1、
 5 4 1、5 4 8 / 5 4 9、および 5 4 9 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置
 セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 6 0 4 を参照して番号付け
 されている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアライアーゼ。

10

20

【請求項 8】

2 0 / 4 9 / 5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 9 1、2 0 / 5 9 / 2 3 4 / 5 1 8 / 5 4 9 / 5 6
 2、4 9 / 5 6 / 5 9 / 6 6 / 2 9 1 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 5
 4 9、4 9 / 5 6 / 6 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 9 1 / 5 1 8、4 9 / 5 6 / 6 6 / 2 3 4
 、4 9 / 5 9 / 6 6 / 1 4 5 / 2 3 4、4 9 / 5 9 / 6 6 / 2 8 9、4 9 / 5 9 / 2 8 9
 / 5 6 2、4 9 / 6 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 9 1 / 5 1 8 / 5 6 2、4 9 / 1 1 1 / 5 3
 1、4 9 / 2 3 4、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 3 4
 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 8 3 / 5 1 8 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 9 1
 、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 9 1 / 5 1 8 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 1 4 5 / 2 8 9 / 5 1 8
 / 5 6 2、5 6 / 5 9 / 2 3 4、5 6 / 5 9 / 2 3 4 / 5 1 8、5 6 / 5 9 / 5 1 8、5
 6 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 3 1 / 5 6 2、5 6 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4
 / 5 1 8 / 5 4 9 / 5 6 2、5 6 / 1 1 1 / 5 1 8 / 5 4 9、5 6 / 2 3 4 / 2 9 1、5
 9、5 9 / 1 1 1、5 9 / 1 4 5 / 2 3 4 / 2 9 1、5 9 / 2 3 4 / 2 9 1、5 9 / 2 3
 4 / 2 9 1 / 3 8 7 / 5 4 9 / 5 6 2、1 1 1 / 1 4 5、1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 2 9
 1 / 5 6 2、1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 5 6 2、1 1 1 / 2 3 4、1 1 1 / 2 8 9、1 1
 1 / 2 9 1、1 1 1 / 5 1 8、2 3 4、2 3 4 / 5 1 8 / 5 4 9、2 9 1 / 5 1 8 / 5 4
 9、5 1 8、5 1 8 / 5 3 1 / 5 4 9 / 5 6 2、5 3 1、および 5 4 9 から選択される少
 なくとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列
 番号 7 3 6 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニア
 リアーゼ。

30

40

【請求項 9】

3 3 / 3 7、3 3 / 3 7 / 4 6 / 3 0 5、3 3 / 3 7 / 1 0 3、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3
 0 5、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 1 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3
 0 5 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3
 3 6 / 5 1 8 / 5 4 1 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 4 7 1 / 5 1 9 / 5 4 8、3 3 /
 3 7 / 1 0 3 / 5 1 8 / 5 2 3 / 5 4 1、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 5 1 9 / 5 2 3、3 3 /
 3 7 / 1 0 3 / 5 2 3、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 5 4 0、3 3 / 3 7 / 3 0 5、3 3 / 3 7
 / 3 0 5 / 3 2 8、3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 2 8 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6
 / 4 7 1 / 5 4 1、3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 2 3、3 3 / 3 7 / 3 0 5

50

/ 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 4 8、 3
 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 1、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 2 1 / 5 4 8、 3
 3 / 3 7 / 3 0 5 / 5 2 3 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 3 0 5
 / 5 4 1、 3 3 / 3 7 / 3 3 6、 3 3 / 3 7 / 3 3 6 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 3 3 6 / 5
 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 4 7 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 5 1 8 / 5
 2 1 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 5 1 8 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 5 1 8 / 5 4 8、 3
 3 / 3 7 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 5 2 3、 3 3 / 3 7 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8
 、 3 3 / 3 7 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 5 4 8、 3 3 / 4 6、 3 3 / 4 6 / 6 6 / 3 0 5 /
 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 1
 9 / 5 4 0、 3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 3 0
 5 / 5 4 0、 3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 3 0 5、 3 3 / 4 6 /
 3 0 5 / 3 3 6、 3 3 / 4 6 / 3 0 5 / 5 1 8 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 /
 4 7 1 / 5 1 9 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 / 5 2 1、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 /
 5 2 1 / 5 2 3、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 / 5 4 0、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、
 3 3 / 4 6 / 5 1 8 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 5 2
 3、 3 3 / 4 6 / 5 4 1、 3 3 / 4 6 / 5 4 8、 3 3 / 1 0 3 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 2 1
 / 5 4 8、 3 3 / 4 7 1 / 5 2 3 / 5 4 1、 3 7、 3 7 / 1 0 3、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5
 / 3 3 6、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 1
 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 4 7 1、 3 7 / 1 0 3
 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 4 1 / 5 4 8、
 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 4 0、 3 7 / 1 0 3 / 3 2 8 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 2 3 / 5 4
 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 2 8 / 5 2 1 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 3 6、 3 7 / 1
 0 3 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 4 1、 3 7 / 1 0 3 / 5 1 9 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3
 / 5 4 0、 3 7 / 1 0 3 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6、 3 7
 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、
 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7
 / 3 0 5 / 4 7 1、 3 7 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 4
 7 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 1 9 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 2 3
 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 4 0、 3 7 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 4 1 / 5
 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 2 3 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 4 1、 3 7 / 3 0 5 /
 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 4 8、 3 7 / 3 3 6、 3 7 / 3 3 6 / 4 7 1 / 5 4 1
 / 5 4 8、 3 7 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3、 3 7 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 8、 3
 7 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 3 3 6 / 5 4 0、 3 7 / 3 3 6 / 5 4 8、 3 7 / 4
 7 1、 3 7 / 4 7 1 / 5 1 8、 3 7 / 4 7 1 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 2 3、 3 7 / 4 7 1 /
 5 2 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 5 1 9、 3 7 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 5 2 1
 / 5 4 0、 3 7 / 5 2 3 / 5 4 1、 3 7 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 5 4 0、 3 7 / 5 4 0
 / 5 4 8、 3 7 / 5 4 1、 3 7 / 5 4 8、 4 6、 4 6 / 4 9 / 5 9 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5
 3 1 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 4 3 6 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1
 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 3 1 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6、 4 6 /
 4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1 1 1 / 3 3 6 / 5 4 9
 、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3
 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 / 5 4 0 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 / 5 4 9、 4 6 /
 4 9 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9 / 5 6 2、 4 6 / 4 9 / 5 3 1 / 5 4 9、 4 6 /
 5 9 / 2 3 4、 4 6 / 5 9 / 5 4 9 / 5 6 2、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5、 4 6 / 1 0 3 / 3
 0 5 / 3 3 6 / 4 7 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 3、 4 6
 / 1 0 3 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 2 0 / 5 4 0、
 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 5 2 3 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 5 4 0
 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 5 4 1、 4 6 / 1 0 3 / 5 4 1 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 5 4
 8、 4 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 3 1 / 5 4 9、 4 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 1 /
 5 4 9、 4 6 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、 4 6 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 4 9、 4 6

10

20

30

40

50

/ 2 3 4 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 0 / 5 4 9、4 6 / 2 3 4 / 5 4 9、4 6 / 2
 8 9 / 5 4 9、4 6 / 3 0 5、4 6 / 3 0 5 / 3 3 6、4 6 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 1 8、
 4 6 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 2、4 6 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 8、4 6 / 3 0 5 / 4 7 1
 、4 6 / 3 0 5 / 5 2 3 / 5 4 8、4 6 / 3 0 5 / 5 4 8、4 6 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2
 3、4 6 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、4 6 / 3 3 6 / 5 4 0、4 6 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5
 4 8、4 6 / 5 2 1 / 5 2 3、4 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0、4 6 / 5 2 1 / 5 2 3 /
 5 4 9、4 6 / 5 2 1 / 5 4 8、4 6 / 5 2 3 / 5 4 0、4 6 / 5 2 3 / 5 4 1 / 5 4 8
 、4 6 / 5 4 1、4 6 / 5 4 1 / 5 4 8、4 6 / 5 4 8、4 6 / 5 4 9、4 9、4 9 / 5
 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 1、4 9 / 5 9 / 1 1 1 / 2 8 9 / 5 2 3、4 9 / 5
 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6、4 9 / 5 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 3 1 / 10
 5 4 9、4 9 / 5 9 / 2 8 9 / 3 0 5 / 3 3 6、4 9 / 5 9 / 2 8 9 / 3 3 6、4 9 / 5
 9 / 3 3 6、4 9 / 5 9 / 5 2 1 / 5 3 1、4 9 / 1 1 1、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4、4 9
 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 /
 2 8 9 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9 / 5 6 2、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5
 2 3 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4
 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 3 1、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 1
 1 1 / 2 3 4 / 5 3 1、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 2 8 9、4 9 /
 1 1 1 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、4
 9 / 1 1 1 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 2 3 4、4 9 / 2 3 4 / 2 8 9、4 9 / 2 3 4 / 2
 8 9 / 3 3 6 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3、4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 20
 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 0、4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 4 9、4 9 / 2 3 4 / 3
 0 5 / 5 4 9、4 9 / 2 3 4 / 5 2 1、4 9 / 2 3 4 / 5 4 9、4 9 / 2 8 9 / 3 0 5 /
 3 3 6 / 5 2 3、4 9 / 2 8 9 / 3 3 6、4 9 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 3 1、4 9
 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 6 2、4 9 / 5 2 1 / 5 3 1 / 5 4 9 / 5 6 2、4 9 / 5 2 1 / 5
 4 9、4 9 / 5 2 3 / 5 4 9、4 9 / 5 4 9、5 9、5 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3
 0 5 / 3 3 6 / 5 4 9、5 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 0 5 / 5 4 9、5 9 / 1 1 1
 / 2 8 9、5 9 / 1 1 1 / 3 3 6、5 9 / 5 4 9、1 0 3、1 0 3 / 3 3 6 / 5 1 9 / 5
 4 8、1 0 3 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0、1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9、1 1 1 / 2 3 4 / 2
 8 9 / 5 2 3、1 1 1 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 1、1 1 1 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5
 4 9、1 1 1 / 3 3 6 / 5 6 2、1 1 1 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 9、2 3 4、2 3 4 / 2 30
 8 9、2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 3、2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9 / 5
 6 2、2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 4 9、2 3 4 / 2 8 9 / 5 3 1、2 3 4 / 2 8 9 / 5
 4 9、2 3 4 / 3 3 6、2 3 4 / 3 3 6 / 5 3 1 / 5 6 2、2 3 4 / 5 2 1 / 5 2 3、2
 3 4 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 9、2 3 4 / 5 2 3 / 5 3 1、2 3 4 / 5 3 1 / 5 4 9、2
 3 4 / 5 4 0、2 3 4 / 5 4 9、2 3 4 / 5 6 2、2 8 9、2 8 9 / 3 3 6 / 5 4 9、2
 8 9 / 5 2 1 / 5 2 3、2 8 9 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0、2 8 9 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5
 4 9、2 8 9 / 5 2 3、3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 1 / 5 4 8、3 3 6 / 5 4 8、5 1 9 / 5
 4 8、5 2 1、5 2 1 / 5 4 8、5 2 1 / 5 4 9、5 2 1 / 5 6 2、5 2 3、5 3 1 / 5
 4 9、5 4 0、および 5 4 9 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置セットに少
 なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 7 3 6 を参照して番号付けされている 40
 、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 10】

2 4 / 4 4 / 4 6 4、2 4 / 2 0 1 / 2 0 2 / 3 5 1 / 5 0 7、2 4 / 2 0 2 / 3 5 1、
 3 3 / 3 7 / 4 6 / 5 6 / 1 0 3 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 3 7 / 4 6
 / 5 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 3、3 3 / 3 7 / 4 6 / 5 6 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 4 0、
 3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 0 3 / 1 1 1 / 2 3 4、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 0 3 / 1 1 1 / 5 4
 8 / 5 4 9、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 0 3 / 5 2 3、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 1 1 / 2 3 4 /
 3 2 8 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 1 1 / 3 3 6 / 5 4 0、3 3 /
 3 7 / 4 6 / 2 3 4 / 5 2 3、3 3 / 3 7 / 4 6 / 3 3 6、3 3 / 3 7 / 4 6 / 5 4 8 /
 5 4 9、3 3 / 3 7 / 5 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 5 50

6 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6 /
 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 /
 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 4 0、3 3
 / 3 7 / 1 1 1 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 3 7 /
 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 4 6、3 3 / 4 6 / 5 6 / 1 1 1 / 5 4 8、3 3 / 4 6
 / 5 6 / 2 3 4 / 2 4 8 / 5 4 9、3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 5 2 3 / 5 4 9、3 3 / 5 6 /
 1 0 3 / 1 1 1、3 3 / 1 0 3 / 1 1 1 / 2 3 4、3 3 / 1 0 3 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3
 6 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 1 0 3 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 4 0 / 5 4 9、3 3 / 1 0 3 /
 1 1 1 / 3 3 6、3 3 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 4 8、3 3 / 2 3 4 / 3 2 8 / 5 2 3 / 5 4
 0 / 5 4 9、3 3 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 2 3 4 /
 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 2 3 4 / 5 4 0 / 5 4
 8 / 5 4 9、3 3 / 3 3 6、3 3 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 3
 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 3 6 / 5 4 9、3 7、3 7 / 4 6 / 5 6 / 5 2 3、3 7
 / 4 6 / 2 3 4、3 7 / 4 6 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 7 / 4 6 / 3 3 6 /
 5 4 0 / 5 4 8、3 7 / 5 6 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 7
 / 5 6 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 7 / 1 0 3 / 3 3 6 / 5 4 8 / 5 4 9、3
 7 / 1 1 1 / 5 2 3、3 7 / 2 3 4 / 3 2 8 / 3 3 6 / 5 2 3、3 7 / 3 3 6、3 7 / 5
 4 8 / 5 4 9、4 4、4 6 / 1 0 3 / 3 2 8 / 3 3 6 / 5 2 3、4 6 / 1 0 3 / 3 3 6、
 4 6 / 2 3 4 / 3 3 6、4 6 / 2 3 4 / 5 4 0 / 5 4 8、4 6 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 9
 、2 0 2、2 0 2 / 3 3 2 / 4 0 8、2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 6
 / 5 2 3、4 0 8、および 5 2 3 / 5 4 8 から選択される少なくとも 1 つの位置または位
 置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 7 9 0 を参照して番号付
 けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

7 4、1 0 2、2 1 0、3 1 3、3 9 1、3 9 2、4 0 2、4 1 5、4 1 7、4 1 8、4
 2 0、4 2 4、5 0 6、および 5 3 0 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置セ
 ットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 7 9 0 を参照して番号付けさ
 れている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 1 2】

2 4、2 4 / 4 4、2 4 / 4 4 / 4 6 / 2 0 2 / 3 9 1、2 4 / 4 4 / 1 1 1 / 2 0 2 /
 4 6 4 / 5 0 6、2 4 / 4 4 / 2 0 2 / 3 1 3 / 3 9 1 / 5 4 0、2 4 / 4 4 / 5 4 9、
 2 4 / 4 6 / 1 0 2 / 3 1 3 / 5 0 6、2 4 / 4 6 / 1 0 3 / 1 1 1 / 4 6 4 / 5 0 6 /
 5 4 9、2 4 / 4 6 / 1 0 3 / 3 9 1 / 5 0 6、2 4 / 4 6 / 1 1 1 / 3 1 3 / 3 9 1、
 2 4 / 4 6 / 1 1 1 / 3 1 3 / 5 4 9、2 4 / 4 6 / 1 1 1 / 5 0 6、2 4 / 4 6 / 2 0
 2 / 3 9 1 / 5 0 6、2 4 / 4 6 / 5 4 9、2 4 / 1 0 3 / 2 0 2、2 4 / 2 0 2、4 4
 / 4 6 / 1 0 2 / 2 0 2 / 3 1 3 / 4 1 7、4 4 / 4 6 / 1 0 3 / 1 1 1 / 3 9 1、4 4
 / 4 6 / 1 0 3 / 2 0 2 / 3 1 3 / 3 9 1、4 4 / 4 6 / 1 0 3 / 2 0 2 / 4 1 7 / 4 6
 4、4 4 / 1 0 3 / 1 1 1 / 3 1 3 / 3 9 1 / 5 4 0、4 4 / 1 1 1 / 4 6 4 / 5 0 6、
 4 6 / 1 0 3 / 5 0 6、4 6 / 1 1 1 / 4 1 7、4 6 / 1 1 1 / 5 0 6、4 6 / 2 0 2、
 4 6 / 2 0 2 / 5 0 6 / 5 4 9、4 6 / 3 1 3 / 3 9 1 / 5 4 0、1 0 3 / 3 1 3 / 5 4
 9、1 1 1、1 1 1 / 2 0 2、1 1 1 / 2 0 2 / 3 1 3 / 3 9 1 / 4 6 4、1 1 1 / 2 0
 2 / 3 1 3 / 3 9 1 / 5 0 6、1 1 1 / 2 0 2 / 3 1 3 / 4 1 7 / 5 4 0 / 5 4 9、1 1
 1 / 2 0 2 / 3 9 1、1 1 1 / 2 0 2 / 3 9 1 / 5 4 0、1 1 1 / 4 6 4 / 5 4 0 / 5 4
 9、2 0 2 / 3 1 3 / 3 9 1 / 5 4 9、2 0 2 / 4 1 7 / 4 6 4 / 5 4 0 / 5 4 9、2 0
 2 / 4 6 4 / 5 0 6、2 0 2 / 5 0 6 / 5 4 0、2 0 2 / 5 0 6 / 5 4 0 / 5 4 9、3 1
 3 / 3 9 1 / 5 4 0 / 5 4 9、および 4 1 7 から選択される少なくとも 1 つの位置または
 位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 1 4 5 4 を参照して番
 号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 1 3】

2 0 / 4 4 / 2 0 2 / 5 0 6、2 0 / 1 0 3 / 1 1 1 / 4 7 1 / 5 0 6、2 0 / 2 0 2 /

3 1 3 / 4 7 1 / 5 0 6、2 4、2 7、3 3、3 6、4 1、4 4、4 4 / 1 1 1 / 2 0 2
 / 4 6 4 / 4 7 1 / 5 0 6 / 5 4 9、4 4 / 2 0 2 / 4 6 4 / 5 0 6、4 6、4 8、5 0
 、5 1、5 5、5 6 / 1 1 1 / 5 0 6、5 6 / 5 0 6、5 9、6 6、6 6 / 5 2 8、1 0
 3 / 1 1 1 / 2 0 2 / 4 6 4 / 4 7 1、1 0 3 / 1 1 1 / 4 7 1、1 0 3 / 2 0 2 / 5 4
 0、1 0 3 / 4 6 4 / 5 4 9、1 0 3 / 4 7 1、1 1 1、1 1 1 / 2 0 2 / 3 1 3 / 3 1
 6、1 1 1 / 2 0 2 / 3 1 3 / 4 7 1 / 5 0 6、1 1 1 / 2 0 2 / 4 7 1、1 1 1 / 5 0
 6、1 9 7、2 0 2、2 0 2 / 3 1 3 / 4 6 4 / 4 7 1 / 5 0 6、2 0 2 / 4 6 4 / 5 0
 6、2 0 2 / 4 6 4 / 5 0 6 / 5 4 9、2 0 8、2 7 2、2 8 9、2 9 2 / 5 5 3、3 0
 5、3 1 2 / 5 5 9、3 1 3 / 4 6 4 / 4 7 1 / 5 0 6、3 3 1、3 3 2、4 3 2、4 3
 5、4 6 4、4 6 4 / 5 0 6、4 7 0、5 0 0、5 0 4、5 0 6、5 0 6 / 5 4 9、5 1
 8、5 1 9、5 2 3、5 4 0、5 4 3、5 4 7、5 4 7 / 5 5 3、5 5 5、5 5 6、およ
 び5 5 9から選択される少なくとも1つの位置または位置セットに少なくとも1つの置換
 を含み、前記位置が、配列番号1 5 7 8を参照して番号付けされている、請求項1に記載
 の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

10

【請求項14】

2 0、2 0 / 4 4 / 2 0 8 / 2 7 2 / 5 1 9、2 0 / 1 1 1 / 2 0 8 / 2 7 2 / 4 1 0 /
 4 3 2、2 0 / 1 9 7 / 4 3 2 / 5 1 9、2 4、2 4 / 4 6 / 4 1 0 / 4 3 5 / 5 1 8、
 3 6 / 5 5 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0、3 6 / 6 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7、
 3 6 / 6 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 4 1 0、3 6 / 6 6 / 3 0 5、3 6 / 6 6 / 3 0 5 / 3 3
 2 / 4 1 0、3 6 / 6 6 / 3 0 5 / 5 0 0、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5、3 6 / 1 9 7 / 3 0
 5 / 3 3 2 / 4 1 0、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0 / 5 0 0、3 6 / 1 9 7 /
 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0 / 5 5 9、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 5 0 0、3 6 / 1 9
 7 / 3 0 5 / 4 1 0、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 5 0 0、3 6 / 3 0 5、3 6 / 3 0 5 / 3
 3 2、3 6 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0、3 6 / 3 0 5 / 4 1 0、4 1 / 4 4 / 4 6 / 1 1
 1 / 2 7 2、4 1 / 4 3 2 / 5 2 6、4 4 / 4 6 / 1 1 1 / 2 0 8、4 4 / 4 6 / 1 1 1
 / 4 3 2 / 5 1 9、4 4 / 1 1 1 / 4 3 2 / 5 1 9 / 5 2 6、4 4 / 2 0 8 / 4 3 2 / 4
 3 5、4 6 / 1 1 1 / 2 0 8 / 2 7 2 / 4 3 5 / 5 2 6、4 6 / 2 0 8 / 2 7 2 / 4 3 2
 / 4 3 5 / 5 2 6、4 6 / 4 3 2 / 4 7 1、5 5 / 3 0 5、5 5 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 5
 7 / 5 4 3 / 5 4 7、5 5 / 3 0 5 / 5 0 0 / 5 5 9、6 6 / 3 0 5、6 6 / 3 0 5 / 3
 3 2、1 1 1、1 1 1 / 2 7 2 / 4 3 2 / 4 3 5、1 1 1 / 2 7 2 / 4 7 1 / 5 2 6、1
 1 1 / 2 7 2 / 5 1 9、1 1 1 / 4 3 2 / 4 3 5、1 1 1 / 4 3 2 / 5 2 6、1 1 1 / 5
 2 6、1 3 4 / 2 0 2 / 3 0 5、1 9 7 / 3 0 5、1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0、1
 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 5 0 0 / 5 4 3 / 5 4 7、1 9 7 / 3 0 5 / 4 1 0、1 9 7 / 3
 0 5 / 5 0 0、2 0 8、2 0 8 / 2 7 2 / 4 3 2、2 0 8 / 4 1 0 / 4 3 5、2 0 8 / 4
 3 5 / 5 1 9、2 1 1 / 4 1 0、2 7 2、2 7 2 / 4 3 5 / 5 2 6、2 9 8 / 4 1 0、3
 0 5、3 0 5 / 3 3 2、3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0、3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0 / 5 0 0、3
 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7、3 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7 / 5 0 0、3 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7 / 5
 5 5、3 0 5 / 3 3 2 / 5 0 0、3 0 5 / 4 1 0、3 0 5 / 5 0 0 / 5 4 3 / 5 4 7、4
 1 0、4 3 2 / 5 2 6、4 3 5、4 3 5 / 5 1 8、4 3 5 / 5 1 9 / 5 2 6、4 7 1、4
 7 1 / 5 2 6、および5 1 9から選択される少なくとも1つの位置または位置セットに少
 なくとも1つの置換を含み、前記位置が、配列番号1 6 6 0を参照して番号付けされてい
 る、請求項1に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

20

30

40

【請求項15】

2 4 / 5 9 / 1 1 1 / 2 8 9 / 5 0 4、2 4 / 1 1 1 / 2 8 9、2 4 / 1 1 1 / 2 8 9 /
 5 0 0 / 5 0 4、2 4 / 1 1 1 / 4 3 2、2 4 / 1 1 1 / 4 3 5 / 5 0 0、2 4 / 2 8 9
 、2 4 / 4 3 2 / 4 3 5 / 5 0 4、4 1 / 4 4 / 2 0 8 / 5 4 7、4 1 / 5 1 / 4 1 0 /
 5 4 3、4 1 / 2 0 8 / 4 1 0 / 5 4 3 / 5 4 7、4 1 / 2 0 8 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4
 7、4 1 / 2 0 8 / 5 4 7、4 1 / 4 1 0 / 5 1 8 / 5 4 3、4 1 / 4 1 0 / 5 1 8 / 5
 4 7、4 1 / 5 4 3、4 4 / 2 0 8 / 5 1 8 / 5 4 7、5 1 / 5 1 9、5 9 / 6 6 / 1 1
 1 / 2 8 9 / 4 3 2 / 5 0 0、5 9 / 6 6 / 1 1 1 / 4 3 2 / 5 0 0、5 9 / 6 6 / 1 1

50

1 / 4 3 2 / 5 0 4、5 9 / 6 6 / 2 8 9 / 5 0 0 / 5 0 4 / 5 5 6、5 9 / 1 1 1、5
 9 / 1 1 1 / 4 3 2 / 5 0 0、5 9 / 2 8 9、5 9 / 2 8 9 / 4 3 5、5 9 / 4 3 2、5
 9 / 4 3 2 / 4 3 5 / 5 0 4 / 5 5 6、6 6 / 1 1 1、1 1 1、1 1 1 / 2 8 9、1 1 1
 / 2 8 9 / 4 3 5、1 1 1 / 2 8 9 / 4 3 5 / 5 0 0、1 1 1 / 2 8 9 / 5 0 0、1 1 1
 / 3 3 1 / 4 3 2 / 5 0 4、1 1 1 / 3 3 1 / 4 3 5 / 5 0 0、1 1 1 / 4 3 2、1 1 1
 / 4 3 2 / 5 0 0、1 1 1 / 5 0 0 / 5 0 4、2 0 8、2 0 8 / 2 1 1 / 4 1 0 / 5 1 9
 、2 0 8 / 2 1 1 / 5 4 7、2 1 1、2 1 1 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 7、2 1 1 / 5 4 7
 、2 8 9、2 8 9 / 4 3 2、2 8 9 / 4 3 2 / 4 3 5、2 8 9 / 4 3 5、2 8 9 / 4 3 5
 / 5 0 0 / 5 0 4、2 8 9 / 4 3 5 / 5 0 4 / 5 5 6、2 8 9 / 5 0 4、4 1 0、4 3 2
 、4 3 5 / 5 0 4、5 0 4、5 0 4 / 5 5 6、5 1 9、および 5 4 7 から選択される少な
 くとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番
 号 1 8 4 4 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニア
 リアーゼ。

10

【請求項 1 6】

4、8、1 1、1 3、1 3 / 2 2 / 4 5 / 5 1 2、1 3 / 4 5、1 3 / 4 5 / 5 1 2、1
 7、1 9、4 5、4 5 / 2 4 4 / 3 2 4 / 5 1 3、4 5 / 4 3 6 / 5 1 2 / 5 1 3、4 5
 / 5 1 2、1 4 4、2 5 1、3 2 4、3 2 7、3 4 1、および 4 2 8 から選択される少な
 くとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番
 号 2 0 3 0 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニア
 リアーゼ。

20

【請求項 1 7】

2、4、4 / 8 / 1 1 / 1 3 / 2 2 / 1 1 1 / 5 0 4、4 / 8 / 1 1 / 1 7 / 3 2 4 / 4
 2 8 / 5 0 4、4 / 8 / 1 1 / 2 2 / 1 1 1、4 / 8 / 2 2 / 1 1 1 / 5 0 4、4 / 1 7
 / 2 4 1 / 5 1 9 / 5 4 7、4 / 3 2 4、4 / 4 2 8、6、7、8 / 1 1 / 1 3 / 3 2 4
 、8 / 1 1 / 1 7 / 2 2 / 3 2 4 / 5 0 4 / 5 1 9、8 / 1 1 / 1 1 1 / 5 0 4、1 0、
 1 1 / 1 3 / 5 0 4、1 1 / 1 7 / 2 2 / 3 2 4、1 4、1 6、3 9、5 7、2 2 8、2
 2 8 / 2 5 9、2 3 6、3 0 5 / 3 0 7 / 4 2 5、3 1 6、3 8 5、4 2 5、4 3 0、4
 3 7、4 7 8、および 5 0 5 から選択される少なくとも 1 つの位置または位置セットに少
 なくとも 1 つの置換を含み、前記位置が、配列番号 2 1 1 4 を参照して番号付けされてい
 る、請求項 1 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

30

【請求項 1 8】

4 / 7 / 5 7 / 1 1 1、4 / 7 / 1 1 1 / 1 1 4 / 4 3 7 / 5 4 7、4 / 1 6 / 3 8 5 /
 4 7 8、4 / 5 7 / 1 1 1 / 4 3 7、7 / 3 8 5 / 5 4 7、1 0 / 1 6 / 4 3 7、1 6、
 1 6 / 4 1 / 5 7 / 1 1 1 / 3 8 5 / 5 4 7、1 6 / 4 1 / 5 7 / 4 3 7 / 4 7 8、1 6
 / 4 1 / 4 3 7、1 6 / 5 7、1 6 / 2 4 1 / 4 3 7、1 6 / 3 8 5、1 6 / 3 8 5 / 4
 3 7、1 6 / 3 8 5 / 4 7 8 / 5 4 7、1 6 / 4 3 7、2 0 / 3 8 5 / 4 3 7 / 4 7 8 /
 5 4 7、5 7、5 7 / 1 1 1 / 1 1 4、5 7 / 1 1 1 / 4 7 8 / 5 4 7、5 7 / 4 3 7、
 1 1 1 / 1 1 4 / 2 0 2 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 0 5 / 3 1 3 / 3 2 4 / 3 3 2 / 3 3 6 /
 4 1 0 / 4 3 2 / 4 3 5 / 4 6 4 / 5 0 4 / 5 1 2 / 5 1 9 / 5 2 3 / 5 4 8 / 5 4 9、
 1 1 1 / 2 4 1 / 4 3 7 / 4 7 8、1 1 1 / 4 7 8、2 4 1、2 4 1 / 3 8 5、2 4 1 /
 3 8 5 / 4 7 8、2 4 1 / 3 8 5 / 4 7 8 / 5 4 7、2 4 1 / 4 3 7、3 8 5、3 8 5 /
 4 3 7、3 8 5 / 4 3 7 / 4 7 8 / 5 4 7、4 3 7、4 3 7 / 4 7 8、および 4 7 8 から
 選択される少なくとも 1 つの位置または位置セットに少なくとも 1 つの置換を含み、前記
 位置が、配列番号 2 1 5 6 を参照して番号付けされている、請求項 1 に記載の組換えチロ
 シンアンモニアリアーゼ。

40

【請求項 1 9】

表 1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1、9-1、9-2
 、10-1、10-2、11-1、12-1、13-1、14-1、15-1、16-1
 、および 17-1 に提供されるいずれかのバリエーションを含む、請求項 1 に記載の組換えチ
 ロシンアンモニアリアーゼバリエーション。

50

【請求項 20】

配列番号 2 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を含む、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の組換えチロシンリアーゼバリエーション。

【請求項 21】

配列番号 10～2290 の偶数番号の配列の少なくとも 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を含む組換えチロシンリアーゼバリエーション。

【請求項 22】

前記組換えチロシンアンモニアリアーゼのポリペプチドが、配列番号 10～2290 の偶数番号の配列のうちの 1 つを含む、請求項 21 に記載の組換えチロシンリアーゼバリエーション。

10

【請求項 23】

配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 のポリペプチド配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である配列を含む、組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 24】

熱安定性である、請求項 1 から 23 のいずれかに記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

20

【請求項 25】

タンパク質分解に対して耐性である、請求項 1 から 24 のいずれかに記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 26】

少なくとも 1 つの消化管プロテアーゼに対して耐性である、請求項 25 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 27】

前記消化管プロテアーゼが、キモトリプシン、トリプシン、カルボキシペプチダーゼ、およびエラスターゼから選択される、請求項 26 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

30

【請求項 28】

酸安定性である、請求項 1 から 27 のいずれかに記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 29】

酸安定性かつタンパク質分解に対して耐性である、請求項 1 から 28 のいずれかに記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 30】

精製されている、請求項 1 から 29 のいずれかに記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

【請求項 31】

参照配列と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対して低下した感受性、iii) 酸性 pH に対して増加した耐容性、iv) 低減した凝集、v) チロシンに関する低下した Km、vi) 低減した免疫原性、または i)、ii)、iii)、iv)、v)、および／もしくは vi) のいずれかの組合せから選択される少なくとも 1 つの改善された特性を示す、請求項 1 から 30 のいずれかに記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

40

【請求項 32】

前記参照配列が、配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 から選択される、請求項 31 に記載の組換えチロシンアンモニアリアーゼ。

50

【請求項 33】

請求項 1 から 32 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換えチロシンアンモニアリアーゼを含む組成物。

【請求項 34】

請求項 1 から 32 のいずれかに示された少なくとも 1 つの組換えチロシンアンモニアリアーゼをコードする組換えポリヌクレオチド配列。

【請求項 35】

コドン最適化されている、請求項 34 に記載の組換えポリヌクレオチド配列。

【請求項 36】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 9 ～ 2289 の奇数番号の配列の少なくとも 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を含む、請求項 34 および／または 35 に記載の組換えポリヌクレオチド配列。

10

【請求項 37】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 9 ～ 2289 の奇数番号の配列を含む、請求項 36 に記載の組換えポリヌクレオチド配列。

【請求項 38】

請求項 1 から 32 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換えチロシンアンモニアリアーゼをコードする組換えポリヌクレオチド配列を含む発現ベクター。

【請求項 39】

前記組換えポリヌクレオチド配列が、制御配列に作動可能に連結されている、請求項 38 に記載の発現ベクター。

20

【請求項 40】

前記制御配列が、プロモーターである、請求項 39 に記載の発現ベクター。

【請求項 41】

前記プロモーターが、異種プロモーターである、請求項 40 に記載の発現ベクター。

【請求項 42】

請求項 38 から 41 のいずれかに記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 43】

原核生物のものである、請求項 42 に記載の宿主細胞。

【請求項 44】

真核生物のものである、請求項 42 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 45】

組換えチロシンアンモニアリアーゼを産生する方法であって、前記組換えポリヌクレオチドによってコードされた前記組換えチロシンアンモニアリアーゼが産生される条件下で、請求項 42 から 44 のいずれかに記載の宿主細胞を培養するステップを含む、方法。

【請求項 46】

前記組換えチロシンアンモニアリアーゼを回収するステップをさらに含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記組換えチロシンアンモニアリアーゼを精製するステップをさらに含む、請求項 45 または 46 に記載の方法。

40

【請求項 48】

請求項 33 に記載の組成物を含む、チロシン血症の処置のための医薬組成物。

【請求項 49】

薬学的に許容される担体および／または賦形剤をさらに含む、請求項 48 に記載の医薬組成物。

【請求項 50】

ヒトへの経口投与に好適である、請求項 48 および／または 49 に記載の医薬組成物。

【請求項 51】

丸剤、錠剤、カプセル剤、ゲルキャップ剤、液剤、または乳剤の形態である、請求項 48

50

から 50 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 52】

ニチシノンと共投与される、請求項 48 から 51 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 53】

ニチシノンを含む、請求項 52 に記載の医薬組成物。

【請求項 54】

前記丸剤、錠剤、カプセル剤、またはゲルキャップ剤が、腸溶コーティングをさらに含む、請求項 51 に記載の医薬組成物。

【請求項 55】

ヒトへの非経口注射に好適である、請求項 48 から 54 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 56】

対象においてチロシン血症またはアルカプトン尿症の症状を処置および／または防止するための方法であって、チロシン血症またはアルカプトン尿症を有する対象を準備するステップと、請求項 48 から 55 のいずれかに記載の医薬組成物を前記対象に提供するステップとを含む、方法。

【請求項 57】

チロシン血症またはアルカプトン尿症の前記症状が改善される、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記対象が、チロシン血症またはアルカプトン尿症の症状を示す対象によって必要とされる食事よりも、フェニルアラニンおよび／またはチロシン含有量の制限が少ない食事を摂食することができる、請求項 56 および／または 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記対象が、乳児または小児である、請求項 56 から 58 のいずれかに記載の方法。

【請求項 60】

前記対象が、成人または若年成人である、請求項 56 から 59 のいずれかに記載の方法。

【請求項 61】

Ｌ－チロシンおよび／またはＬ－チロシン誘導体の産生のための方法であって、請求項 1 から 24 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換えチロシンアンモニアリアーゼおよび好適な基質を準備するステップと、Ｌ－チロシンおよび／または少なくとも 1 つのＬ－チロシン誘導体が産生される条件下で、前記組換えチロシンアンモニアリアーゼと前記基質を組み合わせるステップとを含む、方法。

【請求項 62】

クマル酸の産生のための方法であって、請求項 1 から 32 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換えチロシンアンモニアリアーゼおよび好適な基質を準備するステップと、クマル酸が産生される条件下で、前記組換えチロシンアンモニアリアーゼと前記基質を組み合わせるステップとを含む、方法。

【請求項 63】

請求項 33、および／または 48 から 55 のいずれかにおいて提供される組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、参照によりすべての目的でその全体が本明細書に組み込まれる、2018年12月14日に提出された米国仮出願第62／779,647号に対する優先権を主張する。

A S C I Iテキストファイルとして提出された「配列表」、表、またはコンピュータプログラムリスト付属物の参照

【0002】

2018年12月14日に作成され、サイズ7.80MB、マシンフォーマットIBM-PC、MS-Windows（登録商標）オペレーティングシステムのファイルCX7-

10

20

30

40

50

1 8 2 W O 2 __ S T 2 5 . T X T に書き込まれた配列表は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、操作されたチロシンアンモニアリアーゼ（TAL）ポリペプチドおよびその組成物を提供する。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、タンパク質分解に対する感受性を低下させ、酸性pHレベルに対する耐容性を増加させる一方で、増強された触媒活性をもたらすように最適化されている。本発明は、治療および産業目的での、操作されたTALポリペプチドを含む組成物の利用のための方法も提供する。

【背景技術】

【0004】

チロシンアンモニアリアーゼ（TAL；チラーゼ、L-チロシンアンモニアリアーゼ、および「L-チロシンアンモニアリアーゼ [trans-p-ヒドロキシシナメート (hydroxycinnamate) を形成する]」とも称される）は、ヒスチジンアンモニアリアーゼ（HAL）およびフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）と共に、芳香族アミノ酸リアーゼファミリーのメンバーである（EC 4.3.1.23～1.25 および 4.3.1.3）。TAL 活性を有する酵素は、現在、EC 4.3.1.23 に分類されている（以前は EC 4.3.1.5 に分類されていた）。TAL は、L-チロシンからのp-クマル酸の形成を触媒する。

【0005】

チロシン血症（「遺伝性チロシン血症」および「高チロシン血症」とも称される）は、肝臓におけるチロシンの異化に必要とされる酵素の欠損によるチロシンの血中レベルの上昇によって特徴付けられる遺伝性障害である。処置されない場合、チロシンおよび他の代謝物は罹患した個体の組織および器官中に蓄積し、重大な医学的問題をもたらす。チロシン血症は、常染色体劣性パターンで遺伝する先天性代謝異常である。それぞれ異なる酵素の欠損を原因とする3つの種類のチロシン血症が存在する。現在使用される処置方法は、関与するチロシン血症の種類に応じて異なる。低タンパク食が使用されることが多い。

【0006】

チロシン血症I型（「FAH欠損」、「フマリルアセトアセターゼ欠損」、「フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ欠損」、「遺伝性乳児チロシン血症 (hereditary infantile tyrosinemia)」および「肝腎チロシン血症」とも称される）は、fah遺伝子の変異によるフマリルアセト酢酸ヒドロラーゼの欠損によって引き起こされる。これは、この疾患の最も重篤な形態であり、一般的に、成長障害、下痢、血便、嘔吐、黄疸、肝腫大、打撲しやすい傾向、嗜眠、過敏、発熱、および他の症状、例えば皮膚および尿のキャベツ特有の臭いを含む、通常生後数ヶ月で現れる症状を伴う。一部の罹患した乳児は、重度の下肢痛、ならびに精神状態の変化、腹痛、および呼吸不全によって特徴付けられる急性多発ニューロパチーの神経学的エピソードを繰り返す。急性形態を有する乳児は、典型的には出生時に罹患し、発達遅延、脾腫大、腹水、腎疾患、および血液凝固異常をもたらす可能性のある症状が急速に開始する。処置されなければ、このことにより、肝不全および腎不全、神経系の問題、ならびに肝がん（例えば、肝細胞癌）のリスクの増加をもたらされる可能性がある。一部の場合には、高血圧および肥大型心筋症が存在する。処置されなければ、この疾患は致命的となり得る。あまり一般的ではない慢性形態では、症状はより段階的な開始を示し、重症度も低い傾向にある。罹患した乳児は、最初に、嘔吐、下痢、肝腫大および脾腫大、ならびに成長障害を示す。最終的には、進行性肝硬変が起こり、慢性肝不全、発達遅延、および腎ファンコニー症候群（骨の弱化および軟化 [くる病]、嘔吐、脱水、衰弱、および発熱によって特徴付けられる稀な腎障害）を引き起こす。一部の場合には、最も有効な処置は、完全または部分的な肝移植である。世界では、この形態は、ヒトの出生数のおよそ10万分の1に影響を及ぼす (Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine)。

【0007】

チロシン血症ⅠⅠ型（「掌蹠角化症－角膜ジストロフィー」、「眼皮膚チロシン血症」、「リヒナー・ハンハルト症候群（Richner-Hanhart syndrome）」、「TAT欠損によるチロシン血症」、および「チロシンアミノ基転移酵素欠損によるチロシン血症」とも称される）は、tat遺伝子の変異によるチロシンアミノ基転移酵素の欠損によって引き起こされる。これは、眼、皮膚、および精神の発達に影響を及ぼす。チロシン血症Ⅰ型と同様に、症状は通常若齢期に始まり、涙の過剰分泌、羞明、眼痛および眼充血、ならびに手掌と足の裏の痛みを伴う皮膚病変を含む。罹患した個体の約半数は、あるレベルの知的障害を有する。この形態は、25万人のうちの1人未満で起こる（Genetics Home Reference、上掲）。

【0008】

チロシン血症ⅠⅠⅠ型（「4－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ欠損によるチロシン血症」、「4－ヒドロキシフェニルピルビン酸オキシダーゼ（4-hydroxyphenylpyruvate oxidase）欠損によるチロシン血症」、および「HPD欠損によるチロシン血症」とも称される）は、hpd遺伝子の変異による4－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼの欠損によって引き起こされる稀な障害である。この形態の症状は、知的障害、発作、および間欠性失調を含む。この形態は非常に稀であり、数件の症例が報告されているだけである（Genetics Home Reference、上掲）。

【0009】

未熟な肝臓の酵素をもたらずビタミンC欠乏または早産などの非遺伝的要因により、一時的にチロシンレベルが上昇するさらなる症例が存在する。鑑別診断を使用して、チロシン血症Ⅰ、ⅠⅠ、またはⅠⅠⅠからこれらの一過性の症例を識別する。

【0010】

チロシン血症に加えて、不十分なチロシン代謝またはチロシン代謝の非存在と関連する他の疾患が存在する。例えば、アルカプトン尿症（alcaptonuria）とも称されるアルカプトン尿症（alkaptonuria）は、チロシン分解に関与する酵素であるホモゲンチジン酸1，2－ジオキシゲナーゼの欠損によって引き起こされる疾患である。この酵素は、HGD遺伝子にコードされる。この酵素の不十分な活性は、ホモゲンチジン酸の蓄積をもたらす。過剰なホモゲンチジン酸および関連する化合物は結合組織内に沈着し、軟骨および皮膚を黒くさせる。経時的に、罹患した個体の関節内にホモゲンチジン酸および関連する代謝物が蓄積することにより関節炎が生じる場合がある。ホモゲンチジン酸は尿中にも排出され、尿を黒変させる。アルカプトン尿症は、世界で25万人から100万人のうちの1人が罹患する稀な疾患である（Genetics Home Reference、上掲を参照されたい）。

【0011】

これらの疾患の処置は、ほとんどがフェニルアラニン制限食およびチロシン制限食を終生使用することである。ニチシノン（NTBC；2－（2－ニトロ－4－トリフルオロメチルベンゾール）－1，3－シクロヘキサジオン；Orfadin（登録商標））による処置は、4－ヒドロキシフェニルピルビン酸オキシダーゼ経路をそれが阻害することによって起因して、チロシン血症Ⅰ型およびアルカプトン尿症に対して有益であることが報告されている。しかし、NTBCは、肝不全と発癌の両方を防止するために、困難かつ費用のかかるフェニルアラニン制限およびチロシン制限食と組み合わせて使用されなければならない。当技術分野では、これらの疾患の症状を改善し、患者に正常食を利用させるのに有効な処置（複数可）を容易に投与することに対する必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、操作されたチロシンアンモニアリアーゼ（TAL）ポリペプチドおよびその組成物を提供する。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、タンパク質分解に対する感受性を低下させ、酸性pHレベルに対する耐容性を増加させる一方で、増強

10

20

30

40

50

された触媒活性をもたらすように最適化されている。本発明は、治療および産業目的での、操作されたTALポリペプチドを含む組成物の利用のための方法も提供する。

【0013】

一部の実施形態では、本発明は、本質的に同じ条件下で野生型TAL酵素および／または参照TALポリペプチドと比較した場合に、改善された特性を有する、操作されたTALポリペプチド（本明細書では、「組換えTALポリペプチド」とも称される）ならびにその生物学的に活性な断片およびアナログを提供する。本発明は、治療用組成物および／または産業用組成物中で、操作されたTALポリペプチドならびにその生物学的に活性な断片およびアナログを使用する方法をさらに対象とする。

【0014】

本発明は、配列番号2に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む、組換えチロシンアンモニアリアーゼおよび／または生物学的に活性な組換えチロシンアンモニアリアーゼ断片を提供する。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、79/95/107、79/107、79/107/410、79/410、95/107/184、95/107/184/534、95/184/534、99/107/184、107/184/534、および107/401/534から選択される位置または位置セットに少なくとも1つの置換を含み、位置は、配列番号2を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、79T/95A/107S、79T/107S、79T/107S/410K、79T/410K、95A/107A/184S、95A/107S/184S/534S、95A/184S/534S、99H/107A/184S、107A/184S/534S、および107S/401P/534Sから選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号2を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、S79T/K95A/V107S、S79T/V107S、S79T/V107S/P410K、S79T/P410K、K95A/V107A/Y184S、K95A/V107S/Y184S/A534S、K95A/Y184S/A534S、N99H/V107A/Y184S、V107A/Y184S/A534S、およびV107S/A401P/A534Sから選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号2を参照して番号付けされている。

【0015】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、28、29、33、33/34/37/46/279/554、33/34/37/90/554、33/34/46/66/90/289、33/34/90/289/554、33/34/279/289、33/66、33/66/289、33/66/289/554、34/37/46/289、34/37/66/279/289、34/46、34/56/90、34/56/90/289、34/66/289、34/90/289/554、34/90/519、36/70/234/302/461/500、36/79、36/79/304/407、36/79/407/461/500/531、36/111/304/461/531、36/407/461/500/531、37、46、46/66/289/519/554、49、56、66、66/90/279/289/554、66/90/289/554、69、70/79/234/361/407、70/111/461/500/531、70/304/407/461、72、79/111/234/361/500、79/111/234/531、79/111/361、79/111/531、79/304/361、79/304/461/531、79/407/461、88、90/289/519、90/289/554、131、142、198、201、272、278、279/289/554、289/519/554、289/554

10

20

30

40

50

、295、304／361、305、350、361／500／531、461／500
 、490、491、499、510、518、519、521、522、523、524
 、531、540、541、544、547、548、554、557、558、および
 560から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換
 セットを含み、位置は、配列番号14を参照して番号付けされている。一部の実施形態で
 は、チロシンアンモニアリアーゼは、28A、28C、28G、28N、28T、29A
 、29E、29G、29R、29W、33D／34E／37S／46R／279S／55
 4Q、33D／34E／37S／90S／554Q、33D／34E／46R／66N／
 90S／289R、33D／34E／90S／289R／554Q、33D／34E／2
 79S／289R、33D／66N、33D／66N／289R、33D／66N／28
 9R／554Q、33N、34E／37R／46R／289R、34E／37S／66N
 ／279S／289R、34E／46R、34E／56G／90S、34E／56G／9
 0S／289R、34E／66N／289R、34E／90S／289R／554Q、3
 4E／90S／519P、36V／70K／234H／302M／461M／500T、
 36V／79T、36V／79T／304G／407V、36V／79T／407V／4
 61M／500T／531D、36V／111K／304G／461M／531D、36
 V／407V／461M／500T／531D、37A、37D、46R、46R／66
 N／289R／519P／554Q、46T、49D、49N、56G、56R、66N
 ／90S／279D／289R／554Q、66N／90S／289R／554Q、66
 R、66S、69S、70K／79T／234H／361M／407V、70K／111
 K／461M／500T／531D、70K／304G／407V／461M、72T、
 79T／111K／234H／361M／500T、79T／111K／234H／53
 1D、79T／111K／361M、79T／111K／531D、79T／304G／
 361M、79T／304G／461M／531D、79T／407V／461M、88
 E、88Q、90S／289R／519P、90S／289R／554Q、131G、1
 31M、131S、131W、142R、198R、201R、272S、278S、2
 79S／289R／554Q、289R／519P／554Q、289R／554Q、2
 95Q、304G／361M、305H、350G、361M／500Q／531D、4
 61M／500T、490A、490I、490S、490V、491L、491V、4
 99T、510K、518E、518V、519D、519E、519L、519P、5
 19Q、521D、522G、522K、522R、522V、522Y、523A、5
 23D、523H、523I、523S、524A、524I、524L、524Q、5
 24T、524Y、531D、540E、540R、541A、544E、544G、5
 44R、544S、547A、547C、547G、547K、547Q、547R、5
 47S、548A、548G、548K、548Q、548R、548T、554E、5
 54R、554S、554Y、557E、557R、558A、558D、558H、5
 58S、560G、560M、560R、および560Tから選択される少なくとも1つ
 の置換または置換セットを含み、位置は、配列番号14を参照して番号付けされている。
 一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、K28A、K28C、K28G、
 K28N、K28T、P29A、P29E、P29G、P29R、P29W、K33D／
 K34E／Q37S／L46R／Q279S／K554Q、K33D／K34E／Q37
 S／T90S／K554Q、K33D／K34E／L46R／Q66N／T90S／A2
 89R、K33D／K34E／T90S／A289R／K554Q、K33D／K34E
 ／Q279S／A289R、K33D／Q66N、K33D／Q66N／A289R、K
 33D／Q66N／A289R／K554Q、K33N、K34E／Q37R／L46R
 ／A289R、K34E／Q37S／Q66N／Q279S／A289R、K34E／L
 46R、K34E／K56G／T90S、K34E／K56G／T90S／A289R、
 K34E／Q66N／A289R、K34E／T90S／A289R／K554Q、K3
 4E／T90S／A519P、A36V／S70K／Y234H／R302M／L461
 M／C500T、A36V／S79T、A36V／S79T／E304G／S407V、

10

20

30

40

50

A 3 6 V / S 7 9 T / S 4 0 7 V / L 4 6 1 M / C 5 0 0 T / N 5 3 1 D、A 3 6 V / Q 1 1 1 K / E 3 0 4 G / L 4 6 1 M / N 5 3 1 D、A 3 6 V / S 4 0 7 V / L 4 6 1 M / C 5 0 0 T / N 5 3 1 D、Q 3 7 A、Q 3 7 D、L 4 6 R、L 4 6 R / Q 6 6 N / A 2 8 9 R / A 5 1 9 P / K 5 5 4 Q、L 4 6 T、T 4 9 D、T 4 9 N、K 5 6 G、K 5 6 R、Q 6 6 N / T 9 0 S / Q 2 7 9 D / A 2 8 9 R / K 5 5 4 Q、Q 6 6 N / T 9 0 S / A 2 8 9 R / K 5 5 4 Q、Q 6 6 R、Q 6 6 S、A 6 9 S、S 7 0 K / S 7 9 T / Y 2 3 4 H / L 3 6 1 M / S 4 0 7 V、S 7 0 K / Q 1 1 1 K / L 4 6 1 M / C 5 0 0 T / N 5 3 1 D、S 7 0 K / E 3 0 4 G / S 4 0 7 V / L 4 6 1 M、E 7 2 T、S 7 9 T / Q 1 1 1 K / Y 2 3 4 H / L 3 6 1 M / C 5 0 0 T、S 7 9 T / Q 1 1 1 K / Y 2 3 4 H / N 5 3 1 D、S 7 9 T / Q 1 1 1 K / L 3 6 1 M、S 7 9 T / Q 1 1 1 K / N 5 3 1 D、S 7 9 T / E 3 0 4 G / L 3 6 1 M、S 7 9 T / E 3 0 4 G / L 4 6 1 M / N 5 3 1 D、S 7 9 T / S 4 0 7 V / L 4 6 1 M、V 8 8 E、V 8 8 Q、T 9 0 S / A 2 8 9 R / A 5 1 9 P、T 9 0 S / A 2 8 9 R / K 5 5 4 Q、H 1 3 1 G、H 1 3 1 M、H 1 3 1 S、H 1 3 1 W、Q 1 4 2 R、E 1 9 8 R、K 2 0 1 R、P 2 7 2 S、A 2 7 8 S、Q 2 7 9 S / A 2 8 9 R / K 5 5 4 Q、A 2 8 9 R / A 5 1 9 P / K 5 5 4 Q、A 2 8 9 R / K 5 5 4 Q、L 2 9 5 Q、E 3 0 4 G / L 3 6 1 M、Q 3 0 5 H、A 3 5 0 G、L 3 6 1 M / C 5 0 0 Q / N 5 3 1 D、L 4 6 1 M / C 5 0 0 T、K 4 9 0 A、K 4 9 0 I、K 4 9 0 S、K 4 9 0 V、I 4 9 1 L、I 4 9 1 V、Q 4 9 9 T、L 5 1 0 K、K 5 1 8 E、K 5 1 8 V、A 5 1 9 D、A 5 1 9 E、A 5 1 9 L、A 5 1 9 P、A 5 1 9 Q、S 5 2 1 D、E 5 2 2 G、E 5 2 2 K、E 5 2 2 R、E 5 2 2 V、E 5 2 2 Y、E 5 2 3 A、E 5 2 3 D、E 5 2 3 H、E 5 2 3 I、E 5 2 3 S、R 5 2 4 A、R 5 2 4 I、R 5 2 4 L、R 5 2 4 Q、R 5 2 4 T、R 5 2 4 Y、N 5 3 1 D、A 5 4 0 E、A 5 4 0 R、L 5 4 1 A、A 5 4 4 E、A 5 4 4 G、A 5 4 4 R、A 5 4 4 S、T 5 4 7 A、T 5 4 7 C、T 5 4 7 G、T 5 4 7 K、T 5 4 7 Q、T 5 4 7 R、T 5 4 7 S、S 5 4 8 A、S 5 4 8 G、S 5 4 8 K、S 5 4 8 Q、S 5 4 8 R、S 5 4 8 T、K 5 5 4 E、K 5 5 4 R、K 5 5 4 S、K 5 5 4 Y、N 5 5 7 E、N 5 5 7 R、Q 5 5 8 A、Q 5 5 8 D、Q 5 5 8 H、Q 5 5 8 S、V 5 6 0 G、V 5 6 0 M、V 5 6 0 R、および V 5 6 0 T から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 1 4 を参照して番号付けされている。

10

20

30

40

50

【0016】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 8 / 3 4 / 4 9 / 7 0 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 4 4 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 4 9 / 2 3 4 / 5 3 1 / 5 4 7 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 6 6 / 7 0 / 5 1 9 / 5 3 1、3 3 / 3 4 / 6 6 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 3 1、3 3 / 3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 1 9、3 3 / 3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 7 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 7 0 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 3 1、3 4 / 4 9 / 6 6 / 5 3 1、3 4 / 4 9 / 2 3 4 / 5 3 1 / 5 5 4、3 4 / 4 9 / 2 8 9 / 5 4 4 / 5 4 7、3 4 / 6 6 / 7 0 / 2 3 4 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 7、3 4 / 6 6 / 5 3 1 / 5 5 4、3 4 / 6 6 / 5 5 4、3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 2、3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 5 5 4、3 4 / 7 0 / 2 8 9 / 5 2 2、3 4 / 2 3 4 / 5 2 2 / 5 5 4、3 4 / 2 8 9、3 4 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 3 1、3 4 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 4 4 / 5 5 4、3 4 / 5 2 2、3 4 / 5 4 4、6 6 / 7 0 / 2 3 4、および 2 3 4 / 5 3 1 / 5 4 4 / 5 4 7 から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 8 6 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 8 / 3 4 / 4 9 / 7 0 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 4 4 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 4 9 / 2 3 4 / 5 3 1 / 5 4 7 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 6 6 / 7 0 / 5 1 9 / 5 3 1、3 3 / 3 4 / 6 6 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 3 1、3 3 / 3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 1 9、3 3 / 3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 7 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 7 0 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 5 4、3 3 / 3 4 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 3 1、3 4 / 4 9 / 6 6 / 5 3 1、3 4 / 4 9 / 2 3 4 / 5 3 1 / 5 5 4、3 4 / 4 9 / 2 8 9 / 5 4 4 / 5 4 7、3 4 / 6 6 / 7 0 / 2 3 4 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 7、3 4 / 6 6 / 5 3 1 / 5 5 4、3 4 / 6 6 / 5 5 4、3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5

2 2、3 4 / 7 0 / 2 3 4 / 5 5 4、3 4 / 7 0 / 2 8 9 / 5 2 2、3 4 / 2 3 4 / 5 2
 2 / 5 5 4、3 4 / 2 8 9、3 4 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5 3 1、3 4 / 2 8 9 / 5 2 2 / 5
 4 4 / 5 5 4、3 4 / 5 2 2、3 4 / 5 4 4、6 6 / 7 0 / 2 3 4、および 2 3 4 / 5 3
 1 / 5 4 4 / 5 4 7 から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置
 は、配列番号 8 6 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモ
 ニアリアーゼは、2 8 N / 3 4 E / 4 9 N / 7 0 S / 2 3 4 Y / 2 8 9 R / 5 4 4 E / 5
 5 4 Q、3 3 D / 3 4 E / 6 6 N / 7 0 S / 5 1 9 P / 5 3 1 D、3 3 D / 3 4 E / 6 6
 N / 2 8 9 R / 5 2 2 K / 5 3 1 D、3 3 D / 3 4 E / 7 0 S / 2 3 4 Y / 2 8 9 R / 5
 1 9 P、3 3 D / 3 4 E / 7 0 S / 2 3 4 Y / 5 1 8 V / 5 1 9 P / 5 4 7 Q / 5 5 4 Q
 、3 3 D / 3 4 E / 7 0 S / 2 8 9 R / 5 2 2 K / 5 5 4 Q、3 3 D / 3 4 E / 2 8 9 R
 / 5 2 2 K / 5 3 1 D、3 3 N / 3 4 E / 4 9 N / 2 3 4 Y / 5 3 1 D / 5 4 7 Q / 5 5
 4 Q、3 4 E / 4 9 N / 6 6 N / 5 3 1 D、3 4 E / 4 9 N / 2 3 4 Y / 5 3 1 D / 5 5
 4 Q、3 4 E / 4 9 N / 2 8 9 R / 5 4 4 E / 5 4 7 Q、3 4 E / 6 6 N / 7 0 S / 2 3
 4 Y / 5 1 8 V / 5 1 9 P / 5 4 7 Q、3 4 E / 6 6 N / 5 3 1 D / 5 5 4 Q、3 4 E /
 6 6 N / 5 5 4 Q、3 4 E / 7 0 S / 2 3 4 Y / 2 8 9 R / 5 2 2 K、3 4 E / 7 0 S /
 2 3 4 Y / 5 5 4 Q、3 4 E / 7 0 S / 2 8 9 R / 5 2 2 K、3 4 E / 2 3 4 Y / 5 2 2
 K / 5 5 4 Q、3 4 E / 2 8 9 R、3 4 E / 2 8 9 R / 5 2 2 K / 5 3 1 D、3 4 E / 2
 8 9 R / 5 2 2 K / 5 4 4 E / 5 5 4 Q、3 4 E / 5 2 2 K、3 4 E / 5 4 4 E、6 6 N
 / 7 0 S / 2 3 4 Y、および 2 3 4 Y / 5 3 1 D / 5 4 4 E / 5 4 7 Q から選択される少
 なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 8 6 を参照して番号付け
 されている。

10

20

【0 0 1 7】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、3 1、3 7 / 4 9 / 5 6 / 6 6 /
 1 1 1、3 7 / 4 9 / 5 6 / 2 3 4 / 5 5 7、3 7 / 4 9 / 5 6 / 5 0 0 / 5 2 4、3 7
 / 4 9 / 6 6 / 1 1 1 / 2 3 4、3 7 / 4 9 / 1 1 1 / 5 2 4、3 7 / 1 1 1、3 7 / 1
 1 1 / 3 6 1 / 5 0 0 / 5 5 7 / 5 5 8、3 7 / 2 3 4、4 3 / 5 9 / 9 3 / 5 0 6、4
 3 / 3 0 6、4 3 / 3 0 6 / 5 0 6、4 9 / 5 6 / 6 6 / 1 1 1 / 1 5 3 / 2 3 4 / 5 0
 0 / 5 2 4、4 9 / 6 6、5 6 / 1 1 1 / 2 3 4、5 6 / 2 3 4 / 5 0 0、6 1、6 5、
 6 5 / 3 3 6、6 6、6 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 0 0、9 3 / 5 0 6、9 5、1 0 3、1
 0 3 / 1 0 7 / 4 1 7 / 4 2 1、1 0 3 / 3 0 6 / 5 0 6、1 0 3 / 4 2 1、1 0 4 / 1
 0 5、1 0 7、1 0 7 / 4 1 7 / 4 2 1、1 1 1 / 2 3 4 / 5 4 8 / 5 5 8、1 1 1 / 3
 6 1、1 4 5、1 4 6、1 5 5、1 7 2、1 9 7、2 1 1、2 3 4、2 3 4 / 5 2 4、2
 3 7 / 2 3 8 / 5 0 6、2 8 6、3 0 4、3 0 6、3 0 6 / 5 0 6、3 2 8、3 3 6、3
 6 1 / 5 2 4 / 5 5 7 / 5 5 8、4 0 7、4 1 7 / 4 2 1、4 2 1、4 7 1、5 0 4、5
 0 6、5 4 9、および 5 5 8 から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも
 1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 3 3 4 を参照して番号付けされて
 いる。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、3 1 S、3 7 D / 4 9 N /
 5 6 G / 6 6 N / 1 1 1 K、3 7 D / 4 9 N / 5 6 G / 2 3 4 Y / 5 5 7 E、3 7 D / 4
 9 N / 5 6 G / 5 0 0 T / 5 2 4 Q、3 7 D / 4 9 N / 6 6 N / 1 1 1 K / 2 3 4 Y、3
 7 D / 4 9 N / 1 1 1 K / 5 2 4 Q、3 7 D / 1 1 1 K、3 7 D / 1 1 1 K / 3 6 1 L /
 5 0 0 T / 5 5 7 E / 5 5 8 D、3 7 D / 2 3 4 Y、4 3 T / 5 9 A / 9 3 Q / 5 0 6 R
 、4 3 T / 3 0 6 L、4 3 T / 3 0 6 L / 5 0 6 R、4 9 N / 5 6 G / 6 6 N / 1 1 1 K
 / 1 5 3 N / 2 3 4 Y / 5 0 0 T / 5 2 4 Q、4 9 N / 6 6 N、5 6 G / 1 1 1 K / 2 3
 4 Y、5 6 G / 2 3 4 Y / 5 0 0 T、6 1 V、6 5 M、6 5 N / 3 3 6 V、6 6 N、6 6
 N / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 5 0 0 T、9 3 Q / 5 0 6 R、9 5 K、9 5 V、1 0 3 L、1
 0 3 W、1 0 3 W / 1 0 7 T / 4 1 7 A / 4 2 1 S、1 0 3 W / 3 0 6 L / 5 0 6 R、1
 0 3 W / 4 2 1 S、1 0 4 F / 1 0 5 M、1 0 7 T、1 0 7 T / 4 1 7 A / 4 2 1 A、1
 1 1 K / 2 3 4 Y / 5 4 8 K / 5 5 8 D、1 1 1 K / 3 6 1 L、1 4 5 V、1 4 6 K、1
 5 5 L、1 5 5 S、1 7 2 S、1 9 7 T、2 1 1 K、2 3 4 Y、2 3 4 Y / 5 2 4 Q、2
 3 7 R / 2 3 8 V / 5 0 6 R、2 8 6 Q、2 8 6 R、3 0 4 N、3 0 6 L、3 0 6 L / 5

30

40

50

06R、328A、336V、361L／524Q／557E／558D、407K、407T、417A／421S、421S、471Y、504R、506R、506V、549D、および558Dから選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号334を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、T31S、Q37D／T49N／K56G／Q66N／Q111K、Q37D／T49N／K56G／H234Y／N557E、Q37D／T49N／K56G／C500T／R524Q、Q37D／T49N／Q66N／Q111K／H234Y、Q37D／T49N／Q111K／R524Q、Q37D／Q111K、Q37D／Q111K／M361L／C500T／N557E／Q558D、Q37D／H234Y、A43T／S59A／L93Q／L506R、A43T／P306L、A43T／P306L／L506R、T49N／K56G／Q66N／Q111K／T153N／H234Y／C500T／R524Q、T49N／Q66N、K56G／Q111K／H234Y、K56G／H234Y／C500T、C61V、A65M、A65N／I336V、Q66N、Q66N／Q111K／H234Y／C500T、L93Q／L506R、A95K、A95V、R103L、R103W、R103W／A107T／G417A／T421S、R103W／P306L／L506R、R103W／T421S、Y104F／H105M、A107T、A107T／G417A／T421A、Q111K／H234Y／S548K／Q558D、Q111K／M361L、E145V、T146K、H155L、H155S、A172S、P197T、L211K、H234Y、H234Y／R524Q、Q237R／N238V／L506R、A286Q、A286R、E304N、P306L、P306L／L506R、S328A、I336V、M361L／R524Q／N557E／Q558D、V407K、V407T、G417A／T421S、T421S、Q471Y、A504R、L506R、L506V、G549D、およびQ558Dから選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号334を参照して番号付けされている。

10

20

30

40

50

【0018】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、31／61／95／286／328、31／61／95／407／504、31／61／95／471／504、31／61／407／504、31／95／155／286／504／549、31／95／237／504／547／549、31／95／286／504、31／95／286／504／549、31／95／328／504、31／95／504、31／95／549、37／49／56／59／145、37／103／111／145／421／500／524、49／56／59／234／500、49／59／66／111／145／234、49／59／145／234／421、56／59／66／234、56／59／111／145、56／59／111／145／234／421、56／66／145／500、56／103／111／145／234／500、59／103／145／234／421／500、59／103／234／421、59／145、59／234、61、61／95／155／286／407／471、61／95／155／407、61／95／286、61／95／286／328／504、61／95／328／407、61／95／328／549、61／95／407、61／95／504／547、61／286／407、61／328、61／328／504、61／328／504／549、61／407、61／504、66／103／145／234／421、95／155／286／328／407／504、95／155／286／549、95／286、95／286／328／407／504、95／286／328／504、95／286／547、95／287／504／549、95／328／504、95／407、95／407／504、95／504／547、95／549、103／111／145／234／421、111／145／234、111／234、145／234／500、286／328／407／504／549、および549から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号388を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、31

S / 6 1 V / 9 5 K / 2 8 6 Q / 3 2 8 A、3 1 S / 6 1 V / 9 5 K / 4 0 7 T / 5 0 4 R、3 1 S / 6 1 V / 9 5 K / 4 7 1 Y / 5 0 4 R、3 1 S / 6 1 V / 4 0 7 T / 5 0 4 R、3 1 S / 9 5 K / 1 5 5 S / 2 8 6 Q / 5 0 4 R / 5 4 9 D、3 1 S / 9 5 K / 2 3 7 K / 5 0 4 R / 5 4 7 Q / 5 4 9 D、3 1 S / 9 5 K / 2 8 6 Q / 5 0 4 R、3 1 S / 9 5 K / 2 8 6 Q / 5 0 4 R / 5 4 9 D、3 1 S / 9 5 K / 3 2 8 A / 5 0 4 R、3 1 S / 9 5 K / 5 0 4 R、3 1 S / 9 5 K / 5 4 9 D、3 7 D / 4 9 N / 5 6 G / 5 9 A / 1 4 5 V、3 7 D / 1 0 3 L / 1 1 1 K / 1 4 5 V / 4 2 1 S / 5 0 0 T / 5 2 4 Q、4 9 N / 5 6 G / 5 9 A / 2 3 4 Y / 5 0 0 T、4 9 N / 5 9 A / 6 6 N / 1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y、4 9 N / 5 9 A / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 4 2 1 S、5 6 G / 5 9 A / 6 6 N / 2 3 4 Y、5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K / 1 4 5 V、5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 4 2 1 S、5 6 G / 6 6 N / 1 4 5 V / 5 0 0 T、5 6 G / 1 0 3 L / 1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 5 0 0 T、5 9 A / 1 0 3 L / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 4 2 1 S / 5 0 0 T、5 9 A / 1 0 3 L / 2 3 4 Y / 4 2 1 S、5 9 A / 1 4 5 V、5 9 A / 2 3 4 Y、6 1 V、6 1 V / 9 5 K / 1 5 5 S / 2 8 6 Q / 4 0 7 T / 4 7 1 Y、6 1 V / 9 5 K / 1 5 5 S / 4 0 7 T、6 1 V / 9 5 K / 2 8 6 Q、6 1 V / 9 5 K / 2 8 6 Q / 3 2 8 A / 5 0 4 R、6 1 V / 9 5 K / 3 2 8 A / 4 0 7 T、6 1 V / 9 5 K / 3 2 8 A / 5 4 9 D、6 1 V / 9 5 K / 4 0 7 T、6 1 V / 9 5 K / 5 0 4 R / 5 4 7 Q、6 1 V / 2 8 6 Q / 4 0 7 T、6 1 V / 3 2 8 A、6 1 V / 3 2 8 A / 5 0 4 R、6 1 V / 3 2 8 A / 5 0 4 R / 5 4 9 D、6 1 V / 4 0 7 T、6 1 V / 5 0 4 R、6 6 N / 1 0 3 L / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 4 2 1 S、9 5 K / 1 5 5 S / 2 8 6 Q / 3 2 8 A / 4 0 7 T / 5 0 4 R、9 5 K / 1 5 5 S / 2 8 6 Q / 5 4 9 D、9 5 K / 2 8 6 Q、9 5 K / 2 8 6 Q / 3 2 8 A / 4 0 7 T / 5 0 4 R、9 5 K / 2 8 6 Q / 3 2 8 A / 5 0 4 R、9 5 K / 2 8 6 Q / 5 4 7 Q、9 5 K / 2 8 7 S / 5 0 4 R / 5 4 9 D、9 5 K / 3 2 8 A / 5 0 4 R、9 5 K / 4 0 7 T、9 5 K / 4 0 7 T / 5 0 4 R、9 5 K / 5 0 4 R / 5 4 7 Q、9 5 K / 5 4 9 D、1 0 3 L / 1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 4 2 1 S、1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y、1 1 1 K / 2 3 4 Y、1 4 5 V / 2 3 4 Y / 5 0 0 T、2 8 6 Q / 3 2 8 A / 4 0 7 T / 5 0 4 R / 5 4 9 D、および 5 4 9 D から選択される少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 3 8 8 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、T 3 1 S / C 6 1 V / A 9 5 K / A 2 8 6 Q / S 3 2 8 A、T 3 1 S / C 6 1 V / A 9 5 K / V 4 0 7 T / A 5 0 4 R、T 3 1 S / C 6 1 V / A 9 5 K / Q 4 7 1 Y / A 5 0 4 R、T 3 1 S / C 6 1 V / V 4 0 7 T / A 5 0 4 R、T 3 1 S / A 9 5 K / H 1 5 5 S / A 2 8 6 Q / A 5 0 4 R / G 5 4 9 D、T 3 1 S / A 9 5 K / Q 2 3 7 K / A 5 0 4 R / T 5 4 7 Q / G 5 4 9 D、T 3 1 S / A 9 5 K / A 2 8 6 Q / A 5 0 4 R、T 3 1 S / A 9 5 K / A 2 8 6 Q / A 5 0 4 R / G 5 4 9 D、T 3 1 S / A 9 5 K / S 3 2 8 A / A 5 0 4 R、T 3 1 S / A 9 5 K / A 5 0 4 R、T 3 1 S / A 9 5 K / G 5 4 9 D、Q 3 7 D / T 4 9 N / K 5 6 G / S 5 9 A / E 1 4 5 V、Q 3 7 D / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / T 4 2 1 S / C 5 0 0 T / R 5 2 4 Q、T 4 9 N / K 5 6 G / S 5 9 A / H 2 3 4 Y / C 5 0 0 T、T 4 9 N / S 5 9 A / Q 6 6 N / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y、T 4 9 N / S 5 9 A / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / T 4 2 1 S、K 5 6 G / S 5 9 A / Q 6 6 N / H 2 3 4 Y、K 5 6 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V、K 5 6 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / T 4 2 1 S、K 5 6 G / Q 6 6 N / E 1 4 5 V / C 5 0 0 T、K 5 6 G / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / C 5 0 0 T、S 5 9 A / R 1 0 3 L / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / T 4 2 1 S / C 5 0 0 T、S 5 9 A / R 1 0 3 L / H 2 3 4 Y / T 4 2 1 S、S 5 9 A / E 1 4 5 V、S 5 9 A / H 2 3 4 Y、C 6 1 V、C 6 1 V / A 9 5 K / H 1 5 5 S / A 2 8 6 Q / V 4 0 7 T / Q 4 7 1 Y、C 6 1 V / A 9 5 K / H 1 5 5 S / V 4 0 7 T、C 6 1 V / A 9 5 K / A 2 8 6 Q、C 6 1 V / A 9 5 K / A 2 8 6 Q / S 3 2 8 A / A 5 0 4 R、C 6 1 V / A 9 5 K / S 3 2 8 A / V 4 0 7 T、C 6 1 V / A 9 5 K / S 3 2 8 A / G 5 4 9 D、C 6 1 V / A 9 5 K / V 4 0 7 T、C 6 1 V / A 9 5 K / A 5 0 4 R / T 5 4 7 Q、C 6 1 V / A 2 8 6 Q / V 4 0 7 T、C 6 1 V /

10

20

30

40

50

S 3 2 8 A、C 6 1 V / S 3 2 8 A / A 5 0 4 R、C 6 1 V / S 3 2 8 A / A 5 0 4 R /
 G 5 4 9 D、C 6 1 V / V 4 0 7 T、C 6 1 V / A 5 0 4 R、Q 6 6 N / R 1 0 3 L / E
 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / T 4 2 1 S、A 9 5 K / H 1 5 5 S / A 2 8 6 Q / S 3 2 8 A /
 V 4 0 7 T / A 5 0 4 R、A 9 5 K / H 1 5 5 S / A 2 8 6 Q / G 5 4 9 D、A 9 5 K /
 A 2 8 6 Q、A 9 5 K / A 2 8 6 Q / S 3 2 8 A / V 4 0 7 T / A 5 0 4 R、A 9 5 K /
 A 2 8 6 Q / S 3 2 8 A / A 5 0 4 R、A 9 5 K / A 2 8 6 Q / T 5 4 7 Q、A 9 5 K /
 G 2 8 7 S / A 5 0 4 R / G 5 4 9 D、A 9 5 K / S 3 2 8 A / A 5 0 4 R、A 9 5 K /
 V 4 0 7 T、A 9 5 K / V 4 0 7 T / A 5 0 4 R、A 9 5 K / A 5 0 4 R / T 5 4 7 Q、
 A 9 5 K / G 5 4 9 D、R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / T 4 2 1 S
 、Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y、Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y、E 1 4 5 V / H 2 3
 4 Y / C 5 0 0 T、A 2 8 6 Q / S 3 2 8 A / V 4 0 7 T / A 5 0 4 R / G 5 4 9 D、お
 よび G 5 4 9 D から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、
 配列番号 3 8 8 を参照して番号付けされている。

10

【0019】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、1 4 / 5 6 / 1 1 4、1 4 / 1 1
 4 / 2 8 3 / 2 8 9、1 4 / 1 1 4 / 2 8 3 / 2 8 9 / 2 9 1、1 4 / 1 1 4 / 2 8 3 /
 2 8 9 / 5 6 2、1 4 / 1 1 4 / 2 9 1 / 5 1 8 / 5 6 2、1 4 / 1 1 4 / 5 1 8、1 4
 / 2 3 4 / 2 8 3 / 2 9 1 / 3 0 5、1 4 / 2 8 3 / 2 8 9 / 5 6 2、2 9 / 6 6 / 1 1
 1、2 9 / 6 6 / 1 1 1 / 5 4 0、2 9 / 1 1 1、2 9 / 1 1 1 / 5 2 3、3 3 / 4 6 /
 4 9、3 3 / 4 6 / 4 9 / 3 3 6 / 5 1 9 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 4 6 / 4 9 / 5 4 9
 、3 3 / 4 6 / 5 1 8 / 5 3 4 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 4 6 / 5 1 9、3 3 / 4 9 / 3
 3 6、3 3 / 3 3 6 / 5 1 9、3 6 / 3 7 / 5 6 / 5 9 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8、3 6
 / 3 7 / 5 9 / 1 3 1 / 5 3 1、3 6 / 3 7 / 1 0 3 / 2 3 4、3 6 / 3 7 / 1 3 1 / 1
 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8、3 6 / 3 7 / 1 4 5 / 2 3 4、3 6 / 3 7 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3
 2 8 / 4 7 1 / 5 3 1、3 6 / 3 7 / 2 3 4 / 3 2 8 / 5 3 1、3 6 / 5 6 / 1 4 5 / 2
 3 4 / 3 2 8、3 6 / 5 9 / 2 3 4 / 3 2 8、3 6 / 5 9 / 5 3 1、3 6 / 1 0 3 / 1 4
 5 / 3 2 8 / 5 3 1、3 6 / 1 3 1、3 6 / 2 3 4 / 5 3 1、3 7 / 5 6 / 5 9 / 1 0 3
 / 1 4 5 / 2 3 4 / 3 2 8 / 4 7 1 / 5 3 1、3 7 / 5 6 / 5 9 / 2 3 4 / 3 2 8 / 5 2
 4 / 5 3 1、3 7 / 5 6 / 5 9 / 2 3 4 / 5 3 1、3 7 / 5 6 / 2 3 4 / 5 3 1、3 7 /
 5 9 / 2 3 4、3 7 / 2 3 4 / 4 7 1、4 6 / 4 9、4 6 / 4 9 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4
 8 / 5 4 9、4 6 / 4 9 / 5 1 9、4 6 / 1 5 5、4 6 / 5 4 8、4 9 / 5 1 9、5 6、
 5 6 / 5 9 / 1 0 3 / 4 7 1 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 4 7 1 / 5 3 1、5 6 / 1 1 4 / 2
 0 6 / 2 8 3、5 6 / 1 1 4 / 2 9 1、5 6 / 1 1 4 / 2 9 1 / 5 1 8 / 5 6 2、5 6 /
 1 1 4 / 5 1 8、5 6 / 5 1 8、5 9 / 3 2 8 / 5 2 4 / 5 3 1、6 6 / 5 4 0、1 1 1
 、1 1 1 / 5 1 0 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 1 / 5 5 8、1 1 1 / 5 2 3 / 5 5 7、1 1 4
 、1 1 4 / 2 0 6 / 2 8 3 / 2 8 9 / 5 6 2、1 1 4 / 2 8 3 / 2 8 9 / 2 9 1、1 1 4
 / 2 8 3 / 2 8 9 / 3 0 5 / 5 1 8、1 1 4 / 2 8 3 / 2 9 1、1 1 4 / 2 8 9、1 1 4
 / 2 8 9 / 5 6 2、1 1 4 / 2 9 1、1 1 4 / 2 9 1 / 5 1 8、1 1 4 / 5 1 8 / 5 6 2
 、1 1 4 / 5 6 2、1 3 1 / 2 3 4 / 3 2 8、2 3 4、2 3 4 / 3 2 8、2 3 4 / 3 2 8
 / 4 7 1、2 3 4 / 5 3 1、2 8 9 / 5 6 2、3 0 5、3 3 6 / 5 1 9、5 1 8 / 5 1 9
 / 5 4 8 / 5 4 9、5 1 9、5 2 1、5 2 3、5 3 1、5 4 1、5 4 8 / 5 4 9、および
 5 4 9 から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換
 セットを含み、位置は、配列番号 6 0 4 を参照して番号付けされている。一部の実施形態
 では、チロシンアンモニアリアーゼは、1 4 S / 5 6 R / 1 1 4 P、1 4 S / 1 1 4 P /
 2 8 3 D / 2 8 9 Q、1 4 S / 1 1 4 P / 2 8 3 D / 2 8 9 Q / 2 9 1 V、1 4 S / 1 1
 4 P / 2 8 3 S / 2 8 9 Q / 5 6 2 S、1 4 S / 1 1 4 P / 2 9 1 V / 5 1 8 Q / 5 6 2
 S、1 4 S / 1 1 4 P / 5 1 8 Q、1 4 S / 2 3 4 L / 2 8 3 D / 2 9 1 V / 3 0 5 E、
 1 4 S / 2 8 3 D / 2 8 9 Q / 5 6 2 S、2 9 E / 6 6 N / 1 1 1 K / 5 4 0 R、2 9 E
 / 1 1 1 K、2 9 E / 1 1 1 K / 5 2 3 D、2 9 G / 6 6 N / 1 1 1 K、3 3 N / 4 6 R
 / 4 9 D / 5 4 9 D、3 3 N / 4 6 T / 4 9 D、3 3 N / 4 6 T / 4 9 D / 3 3 6 V / 5

20

30

40

50

1 9 E / 5 4 8 K / 5 4 9 D、3 3 N / 4 6 T / 4 9 D / 5 4 9 D、3 3 N / 4 6 T / 5
 1 8 V / 5 3 4 S / 5 4 8 K / 5 4 9 D、3 3 N / 4 6 T / 5 1 9 E、3 3 N / 4 9 D /
 3 3 6 V、3 3 N / 3 3 6 V / 5 1 9 P、3 6 V / 3 7 A / 5 6 G / 5 9 A / 1 4 5 V /
 2 3 4 Y / 3 2 8 S、3 6 V / 3 7 A / 5 9 A / 1 3 1 M / 5 3 1 D、3 6 V / 3 7 A /
 1 0 3 L / 2 3 4 Y、3 6 V / 3 7 A / 1 3 1 M / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 3 2 8 S、3 6
 V / 3 7 A / 1 4 5 V / 2 3 4 Y、3 6 V / 3 7 A / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 3 2 8 S / 4
 7 1 Y / 5 3 1 D、3 6 V / 3 7 A / 2 3 4 Y / 3 2 8 Q / 5 3 1 D、3 6 V / 5 6 G /
 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 3 2 8 S、3 6 V / 5 9 A / 2 3 4 Y / 3 2 8 S、3 6 V / 5 9 A
 / 5 3 1 D、3 6 V / 1 0 3 L / 1 4 5 V / 3 2 8 S / 5 3 1 D、3 6 V / 1 3 1 M、3
 6 V / 2 3 4 Y / 5 3 1 D、3 7 A / 5 6 G / 5 9 A / 1 0 3 L / 1 4 5 V / 2 3 4 Y /
 3 2 8 Q / 4 7 1 Y / 5 3 1 D、3 7 A / 5 6 G / 5 9 A / 2 3 4 Y / 3 2 8 S / 5 2 4
 L / 5 3 1 D、3 7 A / 5 6 G / 5 9 A / 2 3 4 Y / 5 3 1 D、3 7 A / 5 6 G / 2 3 4
 Y / 5 3 1 D、3 7 A / 5 9 A / 2 3 4 Y、3 7 A / 2 3 4 Y / 4 7 1 Y、4 6 R / 4 9
 D、4 6 R / 4 9 D / 5 1 8 V / 5 1 9 E / 5 4 8 K / 5 4 9 D、4 6 R / 4 9 D / 5 1
 9 P、4 6 R / 1 5 5 L、4 6 T / 4 9 D / 5 1 9 E、4 6 T / 5 4 8 K、4 9 D / 5 1
 9 P、5 6 G / 5 9 A / 1 0 3 L / 4 7 1 Y / 5 3 1 D、5 6 G / 5 9 A / 4 7 1 Y / 5
 3 1 D、5 6 R、5 6 R / 1 1 4 P / 2 0 6 P / 2 8 3 D、5 6 R / 1 1 4 P / 2 9 1 V
 、5 6 R / 1 1 4 P / 2 9 1 V / 5 1 8 Q / 5 6 2 S、5 6 R / 1 1 4 P / 5 1 8 Q、5
 6 R / 5 1 8 Q、5 9 A / 3 2 8 Q / 5 2 4 L / 5 3 1 D、6 6 R / 5 4 0 R、1 1 1 K
 、1 1 1 K / 5 1 0 K / 5 2 1 D / 5 2 3 A / 5 4 1 A / 5 5 8 D、1 1 1 K / 5 2 3 A
 / 5 5 7 E、1 1 4 P、1 1 4 P / 2 0 6 P / 2 8 3 S / 2 8 9 Q / 5 6 2 S、1 1 4 P
 / 2 8 3 D / 2 8 9 Q / 2 9 1 V、1 1 4 P / 2 8 3 D / 2 8 9 Q / 3 0 5 E / 5 1 8 Q
 、1 1 4 P / 2 8 3 D / 2 9 1 V、1 1 4 P / 2 8 9 Q、1 1 4 P / 2 8 9 Q / 5 6 2 S
 、1 1 4 P / 2 9 1 V、1 1 4 P / 2 9 1 V / 5 1 8 Q、1 1 4 P / 5 1 8 Q / 5 6 2 S
 、1 1 4 P / 5 6 2 S、1 3 1 M / 2 3 4 Y / 3 2 8 Q、2 3 4 Y、2 3 4 Y / 3 2 8 Q
 、2 3 4 Y / 3 2 8 S / 4 7 1 Y、2 3 4 Y / 5 3 1 D、2 8 9 Q / 5 6 2 S、3 0 5 E
 、3 3 6 V / 5 1 9 P、5 1 8 V / 5 1 9 E / 5 4 8 K / 5 4 9 D、5 1 9 P、5 2 1 D
 から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号604
 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、
 F 1 4 S / K 5 6 R / S 1 1 4 P、F 1 4 S / S 1 1 4 P / E 2 8 3 D / R 2 8 9 Q、F
 1 4 S / S 1 1 4 P / E 2 8 3 D / R 2 8 9 Q / I 2 9 1 V、F 1 4 S / S 1 1 4 P / E
 2 8 3 S / R 2 8 9 Q / I 5 6 2 S、F 1 4 S / S 1 1 4 P / I 2 9 1 V / K 5 1 8 Q /
 I 5 6 2 S、F 1 4 S / S 1 1 4 P / K 5 1 8 Q、F 1 4 S / H 2 3 4 L / E 2 8 3 D /
 I 2 9 1 V / Q 3 0 5 E、F 1 4 S / E 2 8 3 D / R 2 8 9 Q / I 5 6 2 S、P 2 9 E /
 Q 6 6 N / Q 1 1 1 K / A 5 4 0 R、P 2 9 E / Q 1 1 1 K、P 2 9 E / Q 1 1 1 K / E
 5 2 3 D、P 2 9 G / Q 6 6 N / Q 1 1 1 K、K 3 3 N / L 4 6 R / T 4 9 D / G 5 4 9
 D、K 3 3 N / L 4 6 T / T 4 9 D、K 3 3 N / L 4 6 T / T 4 9 D / I 3 3 6 V / A 5
 1 9 E / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、K 3 3 N / L 4 6 T / T 4 9 D / G 5 4 9 D、K 3 3
 N / L 4 6 T / K 5 1 8 V / A 5 3 4 S / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、K 3 3 N / L 4 6 T
 / A 5 1 9 E、K 3 3 N / T 4 9 D / I 3 3 6 V、K 3 3 N / I 3 3 6 V / A 5 1 9 P、
 A 3 6 V / Q 3 7 A / K 5 6 G / S 5 9 A / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 S、A 3
 6 V / Q 3 7 A / S 5 9 A / H 1 3 1 M / N 5 3 1 D、A 3 6 V / Q 3 7 A / R 1 0 3 L
 / H 2 3 4 Y、A 3 6 V / Q 3 7 A / H 1 3 1 M / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 S
 、A 3 6 V / Q 3 7 A / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y、A 3 6 V / Q 3 7 A / E 1 4 5 V / H
 2 3 4 Y / A 3 2 8 S / Q 4 7 1 Y / N 5 3 1 D、A 3 6 V / Q 3 7 A / H 2 3 4 Y / A
 3 2 8 Q / N 5 3 1 D、A 3 6 V / K 5 6 G / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 S、A
 3 6 V / S 5 9 A / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 S、A 3 6 V / S 5 9 A / N 5 3 1 D、A 3 6
 V / R 1 0 3 L / E 1 4 5 V / A 3 2 8 S / N 5 3 1 D、A 3 6 V / H 1 3 1 M、A 3 6
 V / H 2 3 4 Y / N 5 3 1 D、Q 3 7 A / K 5 6 G / S 5 9 A / R 1 0 3 L / E 1 4 5 V
 / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 Q / Q 4 7 1 Y / N 5 3 1 D、Q 3 7 A / K 5 6 G / S 5 9 A /

10

20

30

40

50

H 2 3 4 Y / A 3 2 8 S / R 5 2 4 L / N 5 3 1 D、Q 3 7 A / K 5 6 G / S 5 9 A / H
 2 3 4 Y / N 5 3 1 D、Q 3 7 A / K 5 6 G / H 2 3 4 Y / N 5 3 1 D、Q 3 7 A / S 5
 9 A / H 2 3 4 Y、Q 3 7 A / H 2 3 4 Y / Q 4 7 1 Y、L 4 6 R / T 4 9 D、L 4 6 R
 / T 4 9 D / K 5 1 8 V / A 5 1 9 E / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9 D /
 A 5 1 9 P、L 4 6 R / H 1 5 5 L、L 4 6 T / T 4 9 D / A 5 1 9 E、L 4 6 T / S 5
 4 8 K、T 4 9 D / A 5 1 9 P、K 5 6 G / S 5 9 A / R 1 0 3 L / Q 4 7 1 Y / N 5 3
 1 D、K 5 6 G / S 5 9 A / Q 4 7 1 Y / N 5 3 1 D、K 5 6 R、K 5 6 R / S 1 1 4 P
 / E 2 0 6 P / E 2 8 3 D、K 5 6 R / S 1 1 4 P / I 2 9 1 V、K 5 6 R / S 1 1 4 P
 / I 2 9 1 V / K 5 1 8 Q / I 5 6 2 S、K 5 6 R / S 1 1 4 P / K 5 1 8 Q、K 5 6 R
 / K 5 1 8 Q、S 5 9 A / A 3 2 8 Q / R 5 2 4 L / N 5 3 1 D、Q 6 6 R / A 5 4 0 R 10
 、Q 1 1 1 K、Q 1 1 1 K / L 5 1 0 K / S 5 2 1 D / E 5 2 3 A / L 5 4 1 A / Q 5 5
 8 D、Q 1 1 1 K / E 5 2 3 A / N 5 5 7 E、S 1 1 4 P、S 1 1 4 P / E 2 0 6 P / E
 2 8 3 S / R 2 8 9 Q / I 5 6 2 S、S 1 1 4 P / E 2 8 3 D / R 2 8 9 Q / I 2 9 1 V
 、S 1 1 4 P / E 2 8 3 D / R 2 8 9 Q / Q 3 0 5 E / K 5 1 8 Q、S 1 1 4 P / E 2 8
 3 D / I 2 9 1 V、S 1 1 4 P / R 2 8 9 Q、S 1 1 4 P / R 2 8 9 Q / I 5 6 2 S、S
 1 1 4 P / I 2 9 1 V、S 1 1 4 P / I 2 9 1 V / K 5 1 8 Q、S 1 1 4 P / K 5 1 8 Q
 / I 5 6 2 S、S 1 1 4 P / I 5 6 2 S、H 1 3 1 M / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 Q、H 2 3
 4 Y、H 2 3 4 Y / A 3 2 8 Q、H 2 3 4 Y / A 3 2 8 S / Q 4 7 1 Y、H 2 3 4 Y / N
 5 3 1 D、R 2 8 9 Q / I 5 6 2 S、Q 3 0 5 E、I 3 3 6 V / A 5 1 9 P、K 5 1 8 V
 / A 5 1 9 E / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、A 5 1 9 P、S 5 2 1 D、E 5 2 3 D、N 5 3 20
 1 D、L 5 4 1 A、S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、および G 5 4 9 D から選択される少なくと
 も 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 6 0 4 を参照して番号付けされ
 ている。

【0020】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 0 / 4 9 / 5 6 / 5 9 / 1 1 1
 / 2 9 1、2 0 / 5 9 / 2 3 4 / 5 1 8 / 5 4 9 / 5 6 2、4 9 / 5 6 / 5 9 / 6 6 / 2
 9 1 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 5 4 9、4 9 / 5 6 / 6 6 / 1 1 1
 / 2 3 4 / 2 9 1 / 5 1 8、4 9 / 5 6 / 6 6 / 2 3 4、4 9 / 5 9 / 6 6 / 1 4 5 / 2
 3 4、4 9 / 5 9 / 6 6 / 2 8 9、4 9 / 5 9 / 2 8 9 / 5 6 2、4 9 / 6 6 / 1 1 1 /
 2 3 4 / 2 9 1 / 5 1 8 / 5 6 2、4 9 / 1 1 1 / 5 3 1、4 9 / 2 3 4、5 6 / 5 9 / 30
 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 1 1 1 /
 2 8 3 / 5 1 8 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 9 1、5 6 / 5 9 / 1 1 1 / 2 9 1 /
 5 1 8 / 5 3 1、5 6 / 5 9 / 1 4 5 / 2 8 9 / 5 1 8 / 5 6 2、5 6 / 5 9 / 2 3 4、
 5 6 / 5 9 / 2 3 4 / 5 1 8、5 6 / 5 9 / 5 1 8、5 6 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 2
 8 9 / 5 3 1 / 5 6 2、5 6 / 1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 5 1 8 / 5 4 9 / 5 6 2、5 6
 / 1 1 1 / 5 1 8 / 5 4 9、5 6 / 2 3 4 / 2 9 1、5 9、5 9 / 1 1 1、5 9 / 1 4 5
 / 2 3 4 / 2 9 1、5 9 / 2 3 4 / 2 9 1、5 9 / 2 3 4 / 2 9 1 / 3 8 7 / 5 4 9 / 5
 6 2、1 1 1 / 1 4 5、1 1 1 / 1 4 5 / 2 3 4 / 2 9 1 / 5 6 2、1 1 1 / 1 4 5 / 2
 3 4 / 5 6 2、1 1 1 / 2 3 4、1 1 1 / 2 8 9、1 1 1 / 2 9 1、1 1 1 / 5 1 8、2
 3 4、2 3 4 / 5 1 8 / 5 4 9、2 9 1 / 5 1 8 / 5 4 9、5 1 8、5 1 8 / 5 3 1 / 5 40
 4 9 / 5 6 2、5 3 1、および 5 4 9 から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸位置に少
 なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 7 3 6 を参照して番号付
 けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 0 G / 4 9 D /
 5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K / 2 9 1 V、2 0 G / 5 9 A / 2 3 4 Y / 5 1 8 Q / 5 4 9 D
 / 5 6 2 S、4 9 D / 5 6 G / 5 9 A / 6 6 N / 2 9 1 V / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 9 D
 / 5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K / 5 4 9 D、4 9 D / 5 6 G / 6 6 N / 1 1 1 K / 2 3 4 Y
 / 2 9 1 V / 5 1 8 Q、4 9 D / 5 6 G / 6 6 N / 2 3 4 Y、4 9 D / 5 9 A / 6 6 N /
 1 4 5 V / 2 3 4 Y、4 9 D / 5 9 A / 6 6 N / 2 8 9 Q、4 9 D / 5 9 A / 2 8 9 Q /
 5 6 2 S、4 9 D / 6 6 N / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 9 1 V / 5 1 8 Q / 5 6 2 S、4 9
 D / 1 1 1 K / 5 3 1 D、4 9 D / 2 3 4 Y、5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 50

8 9 Q、5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 5 3 1 D、5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K /
 2 8 3 D / 5 1 8 Q / 5 3 1 D、5 6 G / 5 9 A / 1 1 1 K / 2 9 1 V、5 6 G / 5 9 A
 / 1 1 1 K / 2 9 1 V / 5 1 8 Q / 5 3 1 D、5 6 G / 5 9 A / 1 4 5 V / 2 8 9 Q / 5
 1 8 Q / 5 6 2 S、5 6 G / 5 9 A / 2 3 4 Y、5 6 G / 5 9 A / 2 3 4 Y / 5 1 8 Q、
 5 6 G / 5 9 A / 5 1 8 Q、5 6 G / 1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 3 1
 D / 5 6 2 S、5 6 G / 1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 5 1 8 Q / 5 4 9 D / 5 6 2 S
 、5 6 G / 1 1 1 K / 5 1 8 Q / 5 4 9 D、5 6 G / 2 3 4 Y / 2 9 1 V、5 9 A、5 9
 A / 1 1 1 K、5 9 A / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 2 9 1 V、5 9 A / 2 3 4 Y / 2 9 1 V、
 5 9 A / 2 3 4 Y / 2 9 1 V / 3 8 7 T / 5 4 9 D / 5 6 2 S、1 1 1 K / 1 4 5 V、1
 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 2 9 1 V / 5 6 2 S、1 1 1 K / 1 4 5 V / 2 3 4 Y / 5
 6 2 S、1 1 1 K / 2 3 4 Y、1 1 1 K / 2 8 9 Q、1 1 1 K / 2 9 1 V、1 1 1 K / 5
 1 8 Q、2 3 4 Y、2 3 4 Y / 5 1 8 Q / 5 4 9 D、2 9 1 V / 5 1 8 Q / 5 4 9 D、5
 1 8 Q、5 1 8 Q / 5 3 1 D / 5 4 9 D / 5 6 2 S、5 3 1 D、および 5 4 9 D から選択
 される少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 7 3 6 を参照し
 て番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、D 2 0 G
 / T 4 9 D / R 5 6 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K / I 2 9 1 V、D 2 0 G / S 5 9 A / H 2
 3 4 Y / K 5 1 8 Q / G 5 4 9 D / I 5 6 2 S、T 4 9 D / R 5 6 G / S 5 9 A / Q 6 6
 N / I 2 9 1 V / N 5 3 1 D / G 5 4 9 D、T 4 9 D / R 5 6 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K
 / G 5 4 9 D、T 4 9 D / R 5 6 G / Q 6 6 N / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / I 2 9 1 V /
 K 5 1 8 Q、T 4 9 D / R 5 6 G / Q 6 6 N / H 2 3 4 Y、T 4 9 D / S 5 9 A / Q 6 6
 N / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y、T 4 9 D / S 5 9 A / Q 6 6 N / R 2 8 9 Q、T 4 9 D /
 S 5 9 A / R 2 8 9 Q / I 5 6 2 S、T 4 9 D / Q 6 6 N / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / I
 2 9 1 V / K 5 1 8 Q / I 5 6 2 S、T 4 9 D / Q 1 1 1 K / N 5 3 1 D、T 4 9 D / H
 2 3 4 Y、R 5 6 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q、R 5 6 G / S 5
 9 A / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / N 5 3 1 D、R 5 6 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K / E 2 8
 3 D / K 5 1 8 Q / N 5 3 1 D、R 5 6 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K / I 2 9 1 V、R 5 6
 G / S 5 9 A / Q 1 1 1 K / I 2 9 1 V / K 5 1 8 Q / N 5 3 1 D、R 5 6 G / S 5 9 A
 / E 1 4 5 V / R 2 8 9 Q / K 5 1 8 Q / I 5 6 2 S、R 5 6 G / S 5 9 A / H 2 3 4 Y
 、R 5 6 G / S 5 9 A / H 2 3 4 Y / K 5 1 8 Q、R 5 6 G / S 5 9 A / K 5 1 8 Q、R
 5 6 G / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q / N 5 3 1 D / I 5 6 2 S、
 R 5 6 G / Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / K 5 1 8 Q / G 5 4 9 D / I 5 6 2 S
 、R 5 6 G / Q 1 1 1 K / K 5 1 8 Q / G 5 4 9 D、R 5 6 G / H 2 3 4 Y / I 2 9 1 V
 、S 5 9 A、S 5 9 A / Q 1 1 1 K、S 5 9 A / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / I 2 9 1 V、
 S 5 9 A / H 2 3 4 Y / I 2 9 1 V、S 5 9 A / H 2 3 4 Y / I 2 9 1 V / I 3 8 7 T /
 G 5 4 9 D / I 5 6 2 S、Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V、Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4
 Y / I 2 9 1 V / I 5 6 2 S、Q 1 1 1 K / E 1 4 5 V / H 2 3 4 Y / I 5 6 2 S、Q 1
 1 1 K / H 2 3 4 Y、Q 1 1 1 K / R 2 8 9 Q、Q 1 1 1 K / I 2 9 1 V、Q 1 1 1 K /
 K 5 1 8 Q、H 2 3 4 Y、H 2 3 4 Y / K 5 1 8 Q / G 5 4 9 D、I 2 9 1 V / K 5 1 8
 Q / G 5 4 9 D、K 5 1 8 Q、K 5 1 8 Q / N 5 3 1 D / G 5 4 9 D / I 5 6 2 S、N 5
 3 1 D、および G 5 4 9 D から選択される少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み
 、位置は、配列番号 7 3 6 を参照して番号付けされている。

【0021】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、3 3 / 3 7、3 3 / 3 7 / 4 6 /
 3 0 5、3 3 / 3 7 / 1 0 3、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3 0
 5 / 3 3 6 / 5 4 1 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 3
 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 4 1 / 5 4 8、
 3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 4 7 1 / 5 1 9 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 5 1 8 / 5 2 3 /
 5 4 1、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 5 1 9 / 5 2 3、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 5 2 3、3 3 / 3
 7 / 1 0 3 / 5 4 0、3 3 / 3 7 / 3 0 5、3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 2 8、3 3 / 3 7 /
 3 0 5 / 3 2 8 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 4 7 1 / 5 4 1、3 3 / 3 7 /

3 0 5 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 2 3、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4
 8、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4
 1、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 5 2 3 / 5 4
 0、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 3 0 5 / 5 4 1、 3 3 / 3 7 / 3 3 6、
 3 3 / 3 7 / 3 3 6 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 4 7
 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 5 1 8 / 5 2 1 / 5 4 0、 3 3 / 3 7 / 5 1
 8 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 5 1 8 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3
 / 3 7 / 5 2 3、 3 3 / 3 7 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 3 7 / 5 4 0、 3 3 / 3
 7 / 5 4 8、 3 3 / 4 6、 3 3 / 4 6 / 6 6 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8
 、 3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 0、 3 3 / 4 6 / 1 0 3 10
 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 4 0、 3 3 / 4 6 / 1 0 3
 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 3 0 5、 3 3 / 4 6 / 3 0 5 / 3 3 6、 3 3 / 4 6 / 3
 0 5 / 5 1 8 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 / 4 7 1 / 5 1 9 / 5 2 3 / 5 4 8
 、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 / 5 2 1、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3、 3 3 / 4 6 / 3
 3 6 / 5 4 0、 3 3 / 4 6 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 5 1 8 / 5 2 1 / 5
 4 8、 3 3 / 4 6 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 4 6 / 5 2 3、 3 3 / 4 6 / 5 4 1、 3 3 /
 4 6 / 5 4 8、 3 3 / 1 0 3 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 2 1 / 5 4 8、 3 3 / 4 7 1 / 5 2 3
 / 5 4 1、 3 7、 3 7 / 1 0 3、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5
 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 3 /
 5 4 0、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 4 7 1、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 4 0 / 5 4 20
 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 4 0、
 3 7 / 1 0 3 / 3 2 8 / 3 3 6 / 5 1 8 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 2 8 / 5 2
 1 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3 / 3 3 6、 3 7 / 1 0 3 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 4 1、
 3 7 / 1 0 3 / 5 1 9 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 1 0 3 / 5 4 0、 3 7 / 1 0 3 / 5 4 1
 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 4
 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 0 /
 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 4 7 1、 3 7 / 3 0 5
 / 4 7 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3
 0 5 / 5 1 9 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5
 / 5 2 1 / 5 4 0、 3 7 / 3 0 5 / 5 2 1 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 2 3 / 5 30
 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 / 5 4 1、 3 7 / 3 0 5 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 0 5 /
 5 4 8、 3 7 / 3 3 6、 3 7 / 3 3 6 / 4 7 1 / 5 4 1 / 5 4 8、 3 7 / 3 3 6 / 5 2 1
 / 5 2 3、 3 7 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、 3
 7 / 3 3 6 / 5 4 0、 3 7 / 3 3 6 / 5 4 8、 3 7 / 4 7 1、 3 7 / 4 7 1 / 5 1 8、 3
 7 / 4 7 1 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 2 3、 3 7 / 4 7 1 / 5 2 1 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 /
 5 1 9、 3 7 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 5 2 1 / 5 4 0、 3 7 / 5 2 3 / 5 4 1
 、 3 7 / 5 2 3 / 5 4 8、 3 7 / 5 4 0、 3 7 / 5 4 0 / 5 4 8、 3 7 / 5 4 1、 3 7 /
 5 4 8、 4 6、 4 6 / 4 9 / 5 9 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1 1
 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 4 3 6 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 3 1 /
 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6、 4 6 / 4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6 / 40
 5 2 3 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 1 1 1 / 3 3 6 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 /
 3 3 6、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 /
 5 4 0 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 2 3 4 / 5 4 9、 4 6 / 4 9 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 3 1 /
 5 4 9 / 5 6 2、 4 6 / 4 9 / 5 3 1 / 5 4 9、 4 6 / 5 9 / 2 3 4、 4 6 / 5 9 / 5 4
 9 / 5 6 2、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 4 7 1 / 5 4 0 /
 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 3、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 4 7 1 / 5 4
 0 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 2 0 / 5 4 0、 4 6 / 1 0 3 / 3 0 5 / 5 4 8、
 4 6 / 1 0 3 / 5 2 3 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 5 4 0 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 5 4 1
 、 4 6 / 1 0 3 / 5 4 1 / 5 4 8、 4 6 / 1 0 3 / 5 4 8、 4 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8
 9 / 5 3 1 / 5 4 9、 4 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 1 / 5 4 9、 4 6 / 1 1 1 / 5 2 3 / 50

5 3 1 / 5 4 9、4 6 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 4 9、4 6 / 2 3 4 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 3
 1 / 5 4 0 / 5 4 9、4 6 / 2 3 4 / 5 4 9、4 6 / 2 8 9 / 5 4 9、4 6 / 3 0 5、4
 6 / 3 0 5 / 3 3 6、4 6 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 1 8、4 6 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 2、
 4 6 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 8、4 6 / 3 0 5 / 4 7 1、4 6 / 3 0 5 / 5 2 3 / 5 4 8
 、4 6 / 3 0 5 / 5 4 8、4 6 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3、4 6 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4
 8、4 6 / 3 3 6 / 5 4 0、4 6 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、4 6 / 5 2 1 / 5 2 3、4
 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0、4 6 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 9、4 6 / 5 2 1 / 5 4 8、
 4 6 / 5 2 3 / 5 4 0、4 6 / 5 2 3 / 5 4 1 / 5 4 8、4 6 / 5 4 1、4 6 / 5 4 1 /
 5 4 8、4 6 / 5 4 8、4 6 / 5 4 9、4 9、4 9 / 5 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5
 2 1、4 9 / 5 9 / 1 1 1 / 2 8 9 / 5 2 3、4 9 / 5 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6、4
 9 / 5 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 5 9 / 2 8 9 / 3
 0 5 / 3 3 6、4 9 / 5 9 / 2 8 9 / 3 3 6、4 9 / 5 9 / 3 3 6、4 9 / 5 9 / 5 2 1
 / 5 3 1、4 9 / 1 1 1、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3
 6 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 3 1
 / 5 4 9 / 5 6 2、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 2
 3 4 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 2 3、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 3 1、4 9
 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 3 1、4 9 / 1
 1 1 / 2 3 4 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 2 8 9、4 9 / 1 1 1 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 1
 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9、4 9 / 1 1 1 / 5 3 1 / 5 4 9、4
 9 / 2 3 4、4 9 / 2 3 4 / 2 8 9、4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 3 1 / 5 4 9、
 4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3、4 9 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 0、4 9
 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 4 9、4 9 / 2 3 4 / 3 0 5 / 5 4 9、4 9 / 2 3 4 / 5
 2 1、4 9 / 2 3 4 / 5 4 9、4 9 / 2 8 9 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 2 3、4 9 / 2 8 9 /
 3 3 6、4 9 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 3 1、4 9 / 3 3 6 / 5 2 1 / 5 6 2、4 9
 / 5 2 1 / 5 3 1 / 5 4 9 / 5 6 2、4 9 / 5 2 1 / 5 4 9、4 9 / 5 2 3 / 5 4 9、4
 9 / 5 4 9、5 9、5 9 / 1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 0 5 / 3 3 6 / 5 4 9、5 9 / 1
 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 3 0 5 / 5 4 9、5 9 / 1 1 1 / 2 8 9、5 9 / 1 1 1 / 3 3 6
 、5 9 / 5 4 9、1 0 3、1 0 3 / 3 3 6 / 5 1 9 / 5 4 8、1 0 3 / 5 2 1 / 5 2 3 /
 5 4 0、1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9、1 1 1 / 2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3、1 1 1 / 2 8 9 /
 3 3 6 / 5 2 1、1 1 1 / 2 8 9 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 9、1 1 1 / 3 3 6 / 5 6 2、
 1 1 1 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 9、2 3 4、2 3 4 / 2 8 9、2 3 4 / 2 8 9 / 3 3 6 /
 5 2 3、2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 / 5 3 1 / 5 4 9 / 5 6 2、2 3 4 / 2 8 9 / 5 2 3 /
 5 4 9、2 3 4 / 2 8 9 / 5 3 1、2 3 4 / 2 8 9 / 5 4 9、2 3 4 / 3 3 6、2 3 4 /
 3 3 6 / 5 3 1 / 5 6 2、2 3 4 / 5 2 1 / 5 2 3、2 3 4 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 9、
 2 3 4 / 5 2 3 / 5 3 1、2 3 4 / 5 3 1 / 5 4 9、2 3 4 / 5 4 0、2 3 4 / 5 4 9、
 2 3 4 / 5 6 2、2 8 9、2 8 9 / 3 3 6 / 5 4 9、2 8 9 / 5 2 1 / 5 2 3、2 8 9 /
 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 0、2 8 9 / 5 2 1 / 5 2 3 / 5 4 9、2 8 9 / 5 2 3、3 0 5 /
 3 3 6 / 5 4 1 / 5 4 8、3 3 6 / 5 4 8、5 1 9 / 5 4 8、5 2 1、5 2 1 / 5 4 8、
 5 2 1 / 5 4 9、5 2 1 / 5 6 2、5 2 3、5 3 1 / 5 4 9、5 4 0、および 5 4 9 から
 選択される 1 つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換または置換セットを含
 み、位置は、配列番号 7 3 6 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロ
 シンアンモニアリアーゼは、3 3 N / 3 7 A、3 3 N / 3 7 A / 4 6 R / 3 0 5 E、3 3
 N / 3 7 A / 1 0 3 L、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3
 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 4 1 A / 5 4 8 K、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E /
 5 2 3 D / 5 4 8 K、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 5 4 8 K、3 3 N / 3 7 A
 / 1 0 3 L / 3 3 6 V / 5 1 8 V / 5 4 1 A / 5 4 8 K、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 4
 7 1 Y / 5 1 9 P / 5 4 8 K、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 5 1 8 V / 5 2 3 D / 5 4 1
 A、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 5 1 9 P / 5 2 3 D、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 5 2
 3 D、3 3 N / 3 7 A / 1 0 3 L / 5 4 0 R、3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E、3 3 N / 3 7
 A / 3 0 5 E / 3 2 8 Q、3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 3 2 8 Q / 5 4 8 K、3 3 N / 3

10

20

30

40

50

7 A / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 4 7 1 Y / 5 4 1 A、 3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 3 3 6 V
 / 5 1 8 V / 5 2 3 D、 3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5
 4 8 K、 3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 4 8 K、 3 3 N / 3 7 A /
 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 4 1 A、 3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 4 7 1 Y / 5 2 1 D / 5 4
 8 K、 3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 5 2 3 D / 5 4 0 R、 3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 5
 4 0 R、 3 3 N / 3 7 A / 3 0 5 E / 5 4 1 A、 3 3 N / 3 7 A / 3 3 6 V、 3 3 N / 3
 7 A / 3 3 6 V / 5 4 0 R、 3 3 N / 3 7 A / 3 3 6 V / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 3 N /
 3 7 A / 4 7 1 Y / 5 2 3 D / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 3 N / 3 7 A / 5 1 8 V / 5 2 1
 D / 5 4 0 R、 3 3 N / 3 7 A / 5 1 8 V / 5 2 1 D / 5 4 8 K、 3 3 N / 3 7 A / 5 1
 8 V / 5 4 8 K、 3 3 N / 3 7 A / 5 2 1 D / 5 4 8 K、 3 3 N / 3 7 A / 5 2 3 D、 3
 3 N / 3 7 A / 5 2 3 D / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 3 N / 3 7 A / 5 4 0 R、 3 3 N / 3
 7 A / 5 4 8 K、 3 3 N / 4 6 R、 3 3 N / 4 6 R / 6 6 K / 3 0 5 E / 5 2 1 D / 5 2
 3 D / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 3 N / 4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 1 8 V
 / 5 1 9 P / 5 4 0 R、 3 3 N / 4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 4 8 K、 3
 3 N / 4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 5 4 0 R、 3 3 N / 4 6 R / 1 0 3 L / 5 4 0 R /
 5 4 8 K、 3 3 N / 4 6 R / 3 0 5 E、 3 3 N / 4 6 R / 3 0 5 E / 3 3 6 V、 3 3 N /
 4 6 R / 3 0 5 E / 5 1 8 V / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 3 N / 4 6 R / 3 3 6 V / 4 7 1
 Y / 5 1 9 P / 5 2 3 D / 5 4 8 K、 3 3 N / 4 6 R / 3 3 6 V / 5 2 1 D、 3 3 N / 4
 6 R / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 2 3 D、 3 3 N / 4 6 R / 3 3 6 V / 5 4 0 R、 3 3 N /
 4 6 R / 3 3 6 V / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 3 N / 4 6 R / 5 1 8 V / 5 2 1 D / 5 4 8

10

20

K、 3 3 N / 4 6 R / 5 2 1 D / 5 4 8 K、 3 3 N / 4 6 R / 5 2 3 D、 3 3 N / 4 6 R
 / 5 4 1 A、 3 3 N / 4 6 R / 5 4 8 K、 3 3 N / 1 0 3 L / 3 3 6 V / 5 1 8 V / 5 2
 1 D / 5 4 8 K、 3 3 N / 4 7 1 Y / 5 2 3 D / 5 4 1 A、 3 7 A、 3 7 A / 1 0 3 L、
 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 2
 1 D / 5 2 3 D / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 2 3
 D / 5 4 0 R、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 4 7 1 Y、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E /
 4 7 1 Y / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 5 2 1 D / 5 4 1 A / 5
 4 8 K、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 5 4 0 R、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 2 8 Q / 3 3 6
 V / 5 1 8 V / 5 2 3 D / 5 4 8 K、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 2 8 Q / 5 2 1 D / 5 4 1 A
 / 5 4 8 K、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 3 6 V、 3 7 A / 1 0 3 L / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5
 4 1 A、 3 7 A / 1 0 3 L / 5 1 9 P / 5 4 1 A / 5 4 8 K、 3 7 A / 1 0 3 L / 5 4 0
 R、 3 7 A / 1 0 3 L / 5 4 1 A / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E、 3 7 A / 3 0 5 E / 3
 3 6 V、 3 7 A / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5
 E / 3 3 6 V / 5 2 3 D / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 4 0 R / 5 4 8 K
 、 3 7 A / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 4 1 A / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E / 4 7 1 Y、 3
 7 A / 3 0 5 E / 4 7 1 Y / 5 2 3 D / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E / 4 7 1
 Y / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E / 5 1 9 P / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E /
 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E / 5 2 1 D / 5 4 0 R、 3
 7 A / 3 0 5 E / 5 2 1 D / 5 4 1 A / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E / 5 2 3 D / 5 4 1
 A / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 0 5 E / 5 4 1 A、 3 7 A / 3 0 5 E / 5 4 1 A / 5 4 8 K、
 3 7 A / 3 0 5 E / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 3 6 V、 3 7 A / 3 3 6 V / 4 7 1 Y / 5 4 1
 A / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 2 3 D、 3 7 A / 3 3 6 V / 5 2 1 D /
 5 2 3 D / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 3 6 V / 5 2 3 D / 5 4 8 K、 3 7 A / 3 3 6 V / 5 4
 0 R、 3 7 A / 3 3 6 V / 5 4 8 K、 3 7 A / 4 7 1 Y、 3 7 A / 4 7 1 Y / 5 1 8 V、
 3 7 A / 4 7 1 Y / 5 1 8 V / 5 1 9 P / 5 2 3 D、 3 7 A / 4 7 1 Y / 5 2 1 D / 5 4
 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 5 1 9 P、 3 7 A / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 8 K、 3 7 A /
 5 2 1 D / 5 4 0 R、 3 7 A / 5 2 3 D / 5 4 1 A、 3 7 A / 5 2 3 D / 5 4 8 K、 3 7
 A / 5 4 0 R、 3 7 A / 5 4 0 R / 5 4 8 K、 3 7 A / 5 4 1 A、 3 7 A / 5 4 8 K、 4
 6 R、 4 6 R / 4 9 D / 5 9 A / 1 1 1 K / 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D、 4 6 R / 4

30

40

50

9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 4 3 6 V / 5 4 9 D、4 6 R / 4 9 D / 1 1 1 K
/ 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 6 R / 4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 3
3 6 V、4 6 R / 4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 3 3 6 V / 5 2 3 D / 5 4 9 D、4 6 R
/ 4 9 D / 1 1 1 K / 3 3 6 V / 5 4 9 D、4 6 R / 4 9 D / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 3
6 V、4 6 R / 4 9 D / 2 3 4 Y / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 9 D、4 6 R /
4 9 D / 2 3 4 Y / 5 4 0 R / 5 4 9 D、4 6 R / 4 9 D / 2 3 4 Y / 5 4 9 D、4 6 R
/ 4 9 D / 2 8 9 Q / 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D / 5 6 2 S、4 6 R / 4 9 D / 5 3
1 D / 5 4 9 D、4 6 R / 5 9 A / 2 3 4 Y、4 6 R / 5 9 A / 5 4 9 D / 5 6 2 S、4
6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E、4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 4 7 1 Y / 5 4 0
R / 5 4 8 K、4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 2 3 D、4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 4 7 1 Y / 5 4 0
R / 5 4 8 K、4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 5 4 8 K、4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 5 2 0 Q / 5
4 0 R、4 6 R / 1 0 3 L / 3 0 5 E / 5 4 8 K、4 6 R / 1 0 3 L / 5 2 3 D / 5 4 8
K、4 6 R / 1 0 3 L / 5 4 0 R / 5 4 8 K、4 6 R / 1 0 3 L / 5 4 1 A、4 6 R / 1
0 3 L / 5 4 1 A / 5 4 8 K、4 6 R / 1 0 3 L / 5 4 8 K、4 6 R / 1 1 1 K / 2 3 4
Y / 2 8 9 Q / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 6 R / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 5 2 1 D / 5 4 9 D
、4 6 R / 1 1 1 K / 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 6 R / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5
4 9 S、4 6 R / 2 3 4 Y / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 0 R / 5 4 9 D、4 6
R / 2 3 4 Y / 5 4 9 D、4 6 R / 2 8 9 Q / 5 4 9 D、4 6 R / 3 0 5 E、4 6 R / 3
0 5 E / 3 3 6 V、4 6 R / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 1 8 V、4 6 R / 3 0 5 E / 3 3 6
V / 5 2 2 E、4 6 R / 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 4 8 K、4 6 R / 3 0 5 E / 4 7 1 Y、
4 6 R / 3 0 5 E / 5 2 3 D / 5 4 8 K、4 6 R / 3 0 5 E / 5 4 8 K、4 6 R / 3 3 6
V / 5 2 1 D / 5 2 3 D、4 6 R / 3 3 6 V / 5 2 3 D / 5 4 8 K、4 6 R / 3 3 6 V /
5 4 0 R、4 6 R / 3 3 6 V / 5 4 0 R / 5 4 8 K、4 6 R / 5 2 1 D / 5 2 3 D、4 6
R / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 0 R、4 6 R / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 9 D、4 6 R /
5 2 1 D / 5 4 8 K、4 6 R / 5 2 3 D / 5 4 0 R、4 6 R / 5 2 3 D / 5 4 1 A / 5 4
8 K、4 6 R / 5 4 1 A、4 6 R / 5 4 1 A / 5 4 8 K、4 6 R / 5 4 8 K、4 6 R / 5
4 9 D、4 9 D、4 9 D / 5 9 A / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 2 1 D、4 9 D /
5 9 A / 1 1 1 K / 2 8 9 Q / 5 2 3 D、4 9 D / 5 9 A / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 3 6
V、4 9 D / 5 9 A / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 3 6 V / 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D、
4 9 D / 5 9 A / 2 8 9 Q / 3 0 5 E / 3 3 6 V、4 9 D / 5 9 A / 2 8 9 Q / 3 3 6 V
、4 9 D / 5 9 A / 3 3 6 V、4 9 D / 5 9 A / 5 2 1 D / 5 3 1 D、4 9 D / 1 1 1 K
、4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y、4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 3 6 V / 5
2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 2 1 D / 5 2
3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D / 5 6 2 S、4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 2 3
D / 5 4 9 D、4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 2 3 D、4 9 D /
1 1 1 K / 2 3 4 Y / 3 3 6 V / 5 2 3 D / 5 3 1 D、4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 5
2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 9 D / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 5 3 1 D、4 9 D / 1 1 1
K / 2 3 4 Y / 5 4 9 D、4 9 D / 1 1 1 K / 2 8 9 Q、4 9 D / 1 1 1 K / 2 8 9 Q /
3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 4 9 D、4 9 D / 1 1 1 K / 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4
9 D / 1 1 1 K / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 9 D / 2 3 4 Y、4 9 D / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q
、4 9 D / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 3 6 V / 5 3 1 D / 5 4 9 D、4 9 D / 2 3 4 Y / 2
8 9 Q / 5 2 3 D、4 9 D / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 0 R、4 9
D / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 2 3 D / 5 4 9 D、4 9 D / 2 3 4 Y / 3 0 5 E / 5 4 9 D
、4 9 D / 2 3 4 Y / 5 2 1 D、4 9 D / 2 3 4 Y / 5 4 9 D、4 9 D / 2 8 9 Q / 3 0
5 E / 3 3 6 V / 5 2 3 D、4 9 D / 2 8 9 Q / 3 3 6 V、4 9 D / 2 8 9 Q / 3 3 6 V
/ 5 2 1 D / 5 3 1 D、4 9 D / 3 3 6 V / 5 2 1 D / 5 6 2 S、4 9 D / 5 2 1 D / 5
3 1 D / 5 4 9 D / 5 6 2 S、4 9 D / 5 2 1 D / 5 4 9 D、4 9 D / 5 2 3 D / 5 4 9
D、4 9 D / 5 4 9 D、5 9 A、5 9 A / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 0 5 E / 3
3 6 V / 5 4 9 D、5 9 A / 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 0 5 E / 5 4 9 D、5 9
A / 1 1 1 K / 2 8 9 Q、5 9 A / 1 1 1 K / 3 3 6 V、5 9 A / 5 4 9 D、1 0 3 L、

1 0 3 L / 3 3 6 V / 5 1 9 P / 5 4 8 K、1 0 3 L / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 0 R、
 1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q、1 1 1 K / 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 2 3 D、1 1 1 K /
 2 8 9 Q / 3 3 6 V / 5 2 1 D、1 1 1 K / 2 8 9 Q / 3 3 6 V / 5 2 3 D / 5 4 9 D、
 1 1 1 K / 3 3 6 V / 5 6 2 S、1 1 1 K / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 9 D、2 3 4 Y、
 2 3 4 Y / 2 8 9 Q、2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 3 3 6 V / 5 2 3 D、2 3 4 Y / 2 8 9 Q /
 5 2 3 D / 5 3 1 D / 5 4 9 D / 5 6 2 S、2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 2 3 D / 5 4 9 D、
 2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 3 1 D、2 3 4 Y / 2 8 9 Q / 5 4 9 D、2 3 4 Y / 3 3 6 V、
 2 3 4 Y / 3 3 6 V / 5 3 1 D / 5 6 2 S、2 3 4 Y / 5 2 1 D / 5 2 3 D、2 3 4 Y /
 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 9 D、2 3 4 Y / 5 2 3 D / 5 3 1 D、2 3 4 Y / 5 3 1 D /
 5 4 9 D、2 3 4 Y / 5 4 0 R、2 3 4 Y / 5 4 9 D、2 3 4 Y / 5 6 2 S、2 8 9 Q、
 2 8 9 Q / 3 3 6 V / 5 4 9 D、2 8 9 Q / 5 2 1 D / 5 2 3 D、2 8 9 Q / 5 2 1 D /
 5 2 3 D / 5 4 0 R、2 8 9 Q / 5 2 1 D / 5 2 3 D / 5 4 9 D、2 8 9 Q / 5 2 3 D、
 3 0 5 E / 3 3 6 V / 5 4 1 A / 5 4 8 K、3 3 6 V / 5 4 8 K、5 1 9 P / 5 4 8 K、
 5 2 1 D、5 2 1 D / 5 4 8 K、5 2 1 D / 5 4 9 D、5 2 1 D / 5 6 2 S、5 2 3 D、
 5 3 1 D / 5 4 9 D、5 4 0 R、および 5 4 9 D から選択される少なくとも 1 つの置換ま
 たは置換セットを含み、位置は、配列番号 7 3 6 を参照して番号付けされている。一部の
 実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、K 3 3 N / Q 3 7 A、K 3 3 N / Q 3 7
 A / L 4 6 R / Q 3 0 5 E、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L、K 3 3 N / Q 3 7 A / R
 1 0 3 L / Q 3 0 5 E、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / L
 5 4 1 A / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / E 5 2 3 D / S
 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3
 7 A / R 1 0 3 L / I 3 3 6 V / K 5 1 8 V / L 5 4 1 A / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3
 7 A / R 1 0 3 L / Q 4 7 1 Y / A 5 1 9 P / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0
 3 L / K 5 1 8 V / E 5 2 3 D / L 5 4 1 A、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L / A 5 1
 9 P / E 5 2 3 D、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L / E 5 2 3 D、K 3 3 N / Q 3 7 A
 / R 1 0 3 L / A 5 4 0 R、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0 5 E、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q
 3 0 5 E / A 3 2 8 Q、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / A 3 2 8 Q / S 5 4 8 K、K
 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / Q 4 7 1 Y / L 5 4 1 A、K 3 3 N / Q 3
 7 A / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / K 5 1 8 V / E 5 2 3 D、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0
 5 E / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0
 5 E / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / I 3 3
 6 V / L 5 4 1 A、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / Q 4 7 1 Y / S 5 2 1 D / S 5 4
 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R、K 3 3 N / Q 3 7 A
 / Q 3 0 5 E / A 5 4 0 R、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / L 5 4 1 A、K 3 3 N /
 Q 3 7 A / I 3 3 6 V、K 3 3 N / Q 3 7 A / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R、K 3 3 N / Q 3
 7 A / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 4 7 1 Y / E 5 2
 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / K 5 1 8 V / S 5 2 1 D / A 5 4
 0 R、K 3 3 N / Q 3 7 A / K 5 1 8 V / S 5 2 1 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A
 / K 5 1 8 V / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / S 5 2 1 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N /
 Q 3 7 A / E 5 2 3 D、K 3 3 N / Q 3 7 A / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K
 3 3 N / Q 3 7 A / A 5 4 0 R、K 3 3 N / Q 3 7 A / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R
 、K 3 3 N / L 4 6 R / Q 6 6 K / Q 3 0 5 E / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R /
 S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / K 5 1 8 V /
 A 5 1 9 P / A 5 4 0 R、K 3 3 N / L 4 6 R / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V /
 S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / A 5 4 0 R、K 3 3 N / L
 4 6 R / R 1 0 3 L / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / Q 3 0 5 E、K 3
 3 N / L 4 6 R / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V、K 3 3 N / L 4 6 R / Q 3 0 5 E / K 5 1 8
 V / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / I 3 3 6 V / Q 4 7 1 Y / A 5 1 9
 P / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D、K 3 3 N
 /

10

20

30

40

50

L 4 6 R / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D、K 3 3 N / L 4 6 R / I 3 3 6 V / A
5 4 0 R、K 3 3 N / L 4 6 R / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4
6 R / K 5 1 8 V / S 5 2 1 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / S 5 2 1 D / S 5 4
8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / E 5 2 3 D、K 3 3 N / L 4 6 R / L 5 4 1 A、K 3 3 N /
L 4 6 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / R 1 0 3 L / I 3 3 6 V / K 5 1 8 V / S 5 2 1 D /
S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 4 7 1 Y / E 5 2 3 D / L 5 4 1 A、Q 3 7 A、Q 3 7 A / R
1 0 3 L、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q
3 0 5 E / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A /
R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R、Q 3 7 A / R 1 0 3 L 10
/ Q 3 0 5 E / Q 4 7 1 Y、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / Q 4 7 1 Y / A 5 4 0
R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / S 5 2 1 D / L 5 4 1 A / S 5 4
8 K、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E / A 5 4 0 R、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / A 3 2
8 Q / I 3 3 6 V / K 5 1 8 V / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / A 3
2 8 Q / S 5 2 1 D / L 5 4 1 A / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / I 3 3 6 V、Q
3 7 A / R 1 0 3 L / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D / L 5 4 1 A、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / A
5 1 9 P / L 5 4 1 A / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / A 5 4 0 R、Q 3 7 A / R
1 0 3 L / L 5 4 1 A / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / I
3 3 6 V、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、
Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / 20
I 3 3 6 V / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / L 5 4 1 A
/ S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / Q 4 7 1 Y、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / Q 4 7 1 Y
/ E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / Q 4 7 1 Y / A 5 4 0
R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / A 5 1 9 P / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5
E / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / S 5 2
1 D / A 5 4 0 R、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / S 5 2 1 D / L 5 4 1 A / S 5 4 8 K、Q 3
7 A / Q 3 0 5 E / E 5 2 3 D / L 5 4 1 A / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / L 5
4 1 A、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / L 5 4 1 A / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 3 0 5 E / S 5
4 8 K、Q 3 7 A / I 3 3 6 V、Q 3 7 A / I 3 3 6 V / Q 4 7 1 Y / L 5 4 1 A / S 5
4 8 K、Q 3 7 A / I 3 3 6 V / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D、Q 3 7 A / I 3 3 6 V / S 5 30
2 1 D / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、Q
3 7 A / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R、Q 3 7 A / I 3 3 6 V / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / Q 4
7 1 Y、Q 3 7 A / Q 4 7 1 Y / K 5 1 8 V、Q 3 7 A / Q 4 7 1 Y / K 5 1 8 V / A 5
1 9 P / E 5 2 3 D、Q 3 7 A / Q 4 7 1 Y / S 5 2 1 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q
3 7 A / A 5 1 9 P、Q 3 7 A / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / S 5
2 1 D / A 5 4 0 R、Q 3 7 A / E 5 2 3 D / L 5 4 1 A、Q 3 7 A / E 5 2 3 D / S 5
4 8 K、Q 3 7 A / A 5 4 0 R、Q 3 7 A / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / L 5 4
1 A、Q 3 7 A / S 5 4 8 K、L 4 6 R、L 4 6 R / T 4 9 D / S 5 9 A / Q 1 1 1 K /
E 5 2 3 D / N 5 3 1 D / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9 D / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y /
R 2 8 9 Q / L 4 3 6 V / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9 D / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / 40
R 2 8 9 Q / N 5 3 1 D / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9 D / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y /
I 3 3 6 V、L 4 6 R / T 4 9 D / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D /
G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9 D / Q 1 1 1 K / I 3 3 6 V / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T
4 9 D / H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q / I 3 3 6 V、L 4 6 R / T 4 9 D / H 2 3 4 Y / I 3
3 6 V / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9 D / H 2 3 4 Y / A 5
4 0 R / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9 D / H 2 3 4 Y / G 5 4 9 D、L 4 6 R / T 4 9
D / R 2 8 9 Q / E 5 2 3 D / N 5 3 1 D / G 5 4 9 D / I 5 6 2 S、L 4 6 R / T 4 9
D / N 5 3 1 D / G 5 4 9 D、L 4 6 R / S 5 9 A / H 2 3 4 Y、L 4 6 R / S 5 9 A /
G 5 4 9 D / I 5 6 2 S、L 4 6 R / R 1 0 3 L / Q 3 0 5 E、L 4 6 R / R 1 0 3 L /
Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / Q 4 7 1 Y / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、L 4 6 R / R 1 0 3 L 50

/Q305E/I336V/E523D、L46R/R103L/Q305E/Q471
Y/A540R/S548K、L46R/R103L/Q305E/P520Q/A54
0R、L46R/R103L/Q305E/S548K、L46R/R103L/E52
3D/S548K、L46R/R103L/A540R/S548K、L46R/R10
3L/L541A、L46R/R103L/L541A/S548K、L46R/R10
3L/S548K、L46R/Q111K/H234Y/R289Q/N531D/G5
49D、L46R/Q111K/H234Y/S521D/G549D、L46R/Q1
11K/E523D/N531D/G549D、L46R/H234Y/R289Q/G
549S、L46R/H234Y/S521D/E523D/N531D/A540R/
G549D、L46R/H234Y/G549D、L46R/R289Q/G549D、
L46R/Q305E、L46R/Q305E/I336V、L46R/Q305E/I
336V/K518V、L46R/Q305E/I336V/K522E、L46R/Q
305E/I336V/S548K、L46R/Q305E/Q471Y、L46R/Q
305E/E523D/S548K、L46R/Q305E/S548K、L46R/I
336V/S521D/E523D、L46R/I336V/E523D/S548K、
L46R/I336V/A540R、L46R/I336V/A540R/S548K、
L46R/S521D/E523D、L46R/S521D/E523D/A540R、
L46R/S521D/E523D/G549D、L46R/S521D/S548K、
L46R/E523D/A540R、L46R/E523D/L541A/S548K、
L46R/L541A、L46R/L541A/S548K、L46R/S548K、L
46R/G549D、T49D、T49D/S59A/Q111K/H234Y/R28
9Q/S521D、T49D/S59A/Q111K/R289Q/E523D、T49
D/S59A/H234Y/R289Q/I336V、T49D/S59A/H234Y
/R289Q/I336V/E523D/N531D/G549D、T49D/S59A
/R289Q/Q305E/I336V、T49D/S59A/R289Q/I336V
、T49D/S59A/I336V、T49D/S59A/S521D/N531D、T
49D/Q111K、T49D/Q111K/H234Y、T49D/Q111K/H2
34Y/R289Q/I336V/E523D/N531D/G549D、T49D/Q
111K/H234Y/R289Q/S521D/E523D/N531D/G549D
/I562S、T49D/Q111K/H234Y/R289Q/E523D/G549
D、T49D/Q111K/H234Y/I336V/S521D/E523D、T49
D/Q111K/H234Y/I336V/E523D/N531D、T49D/Q11
1K/H234Y/E523D/N531D/G549D、T49D/Q111K/H2
34Y/N531D、T49D/Q111K/H234Y/G549D、T49D/Q1
11K/R289Q、T49D/Q111K/R289Q/I336V/S521D/G
549D、T49D/Q111K/E523D/N531D/G549D、T49D/Q
111K/N531D/G549D、T49D/H234Y、T49D/H234Y/R
289Q、T49D/H234Y/R289Q/I336V/N531D/G549D、
T49D/H234Y/R289Q/E523D、T49D/H234Y/R289Q/
E523D/N531D/A540R、T49D/H234Y/R289Q/E523D
/G549D、T49D/H234Y/Q305E/G549D、T49D/H234Y
/S521D、T49D/H234Y/G549D、T49D/R289Q/Q305E
/I336V/E523D、T49D/R289Q/I336V、T49D/R289Q
/I336V/S521D/N531D、T49D/I336V/S521D/I562
S、T49D/S521D/N531D/G549D/I562S、T49D/S521
D/G549D、T49D/E523D/G549D、T49D/G549D、S59A
、S59A/Q111K/H234Y/R289Q/Q305E/I336V/G549
D、S59A/Q111K/H234Y/R289Q/Q305E/G549D、S59
A/Q111K/R289Q、S59A/Q111K/I336V、S59A/G549
D、R103L、R103L/I336V/A519P/S548K、R103L/S5

10

20

30

40

50

2 1 D / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R、Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q、Q 1 1 1 K /
H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q / E 5 2 3 D、Q 1 1 1 K / R 2 8 9 Q / I 3 3 6 V / S 5 2 1
D、Q 1 1 1 K / R 2 8 9 Q / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / G 5 4 9 D、Q 1 1 1 K / I 3
3 6 V / I 5 6 2 S、Q 1 1 1 K / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / G 5 4 9 D、H 2 3 4 Y、
H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q、H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D、H 2 3 4
Y / R 2 8 9 Q / E 5 2 3 D / N 5 3 1 D / G 5 4 9 D / I 5 6 2 S、H 2 3 4 Y / R 2
8 9 Q / E 5 2 3 D / G 5 4 9 D、H 2 3 4 Y / R 2 8 9 Q / N 5 3 1 D、H 2 3 4 Y /
R 2 8 9 Q / G 5 4 9 D、H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V、H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V / N 5 3 1
D / I 5 6 2 S、H 2 3 4 Y / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D、H 2 3 4 Y / S 5 2 1 D / E 5
2 3 D / G 5 4 9 D、H 2 3 4 Y / E 5 2 3 D / N 5 3 1 D、H 2 3 4 Y / N 5 3 1 D /
G 5 4 9 D、H 2 3 4 Y / A 5 4 0 R、H 2 3 4 Y / G 5 4 9 D、H 2 3 4 Y / I 5 6 2
S、R 2 8 9 Q、R 2 8 9 Q / I 3 3 6 V / G 5 4 9 D、R 2 8 9 Q / S 5 2 1 D / E 5
2 3 D、R 2 8 9 Q / S 5 2 1 D / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R、R 2 8 9 Q / S 5 2 1 D /
E 5 2 3 D / G 5 4 9 D、R 2 8 9 Q / E 5 2 3 D、Q 3 0 5 E / I 3 3 6 V / L 5 4 1
A / S 5 4 8 K、I 3 3 6 V / S 5 4 8 K、A 5 1 9 P / S 5 4 8 K、S 5 2 1 D、S 5
2 1 D / S 5 4 8 K、S 5 2 1 D / G 5 4 9 D、S 5 2 1 D / I 5 6 2 S、E 5 2 3 D、
N 5 3 1 D / G 5 4 9 D、A 5 4 0 R、および G 5 4 9 D から選択される少なくとも1つ
の置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 7 3 6 を参照して番号付けされている。

10

【0022】

20

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 4 / 4 4 / 4 6 4、2 4 / 2 0
1 / 2 0 2 / 3 5 1 / 5 0 7、2 4 / 2 0 2 / 3 5 1、3 3 / 3 7 / 4 6 / 5 6 / 1 0 3
/ 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 3 7 / 4 6 / 5 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 3
、3 3 / 3 7 / 4 6 / 5 6 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 4 0、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 0 3 / 1 1
1 / 2 3 4、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 0 3 / 1 1 1 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 3 7 / 4 6 /
1 0 3 / 5 2 3、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 2 8 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8
、3 3 / 3 7 / 4 6 / 1 1 1 / 3 3 6 / 5 4 0、3 3 / 3 7 / 4 6 / 2 3 4 / 5 2 3、3
3 / 3 7 / 4 6 / 3 3 6、3 3 / 3 7 / 4 6 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 3 7 / 5 6 / 1 1
1 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 5 6 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5
4 8、3 3 / 3 7 / 1 0 3 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1
0 3 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0
/ 5 4 8、3 3 / 3 7 / 1 1 1 / 5 2 3 / 5 4 0、3 3 / 3 7 / 1 1 1 / 5 4 8、3 3 /
3 7 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 3 7 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 /
4 6、3 3 / 4 6 / 5 6 / 1 1 1 / 5 4 8、3 3 / 4 6 / 5 6 / 2 3 4 / 2 4 8 / 5 4 9
、3 3 / 4 6 / 1 0 3 / 5 2 3 / 5 4 9、3 3 / 5 6 / 1 0 3 / 1 1 1、3 3 / 1 0 3 /
1 1 1 / 2 3 4、3 3 / 1 0 3 / 1 1 1 / 2 3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 1 0
3 / 1 1 1 / 2 3 4 / 5 4 0 / 5 4 9、3 3 / 1 0 3 / 1 1 1 / 3 3 6、3 3 / 1 1 1 /
2 3 4 / 5 4 8、3 3 / 2 3 4 / 3 2 8 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 9、3 3 / 2 3 4 / 3 3
6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 /
2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 8、3 3 / 2 3 4 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 3 3 6、3 3
/ 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、3 3 / 3
3 6 / 5 4 9、3 7、3 7 / 4 6 / 5 6 / 5 2 3、3 7 / 4 6 / 2 3 4、3 7 / 4 6 / 3
3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8、3 7 / 4 6 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 8、3 7 / 5 6 / 2
3 4 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 7 / 5 6 / 3 3 6 / 5 2 3 / 5 4 0
/ 5 4 8、3 7 / 1 0 3 / 3 3 6 / 5 4 8 / 5 4 9、3 7 / 1 1 1 / 5 2 3、3 7 / 2 3
4 / 3 2 8 / 3 3 6 / 5 2 3、3 7 / 3 3 6、3 7 / 5 4 8 / 5 4 9、4 4、4 6 / 1 0
3 / 3 2 8 / 3 3 6 / 5 2 3、4 6 / 1 0 3 / 3 3 6、4 6 / 2 3 4 / 3 3 6、4 6 / 2
3 4 / 5 4 0 / 5 4 8、4 6 / 3 3 6 / 5 4 0 / 5 4 9、2 0 2、2 0 2 / 3 3 2 / 4 0
8、2 3 4 / 5 2 3 / 5 4 0 / 5 4 8 / 5 4 9、3 3 6 / 5 2 3、4 0 8、および 5 2 3
/ 5 4 8 から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置

30

40

50

換セットを含み、位置は、配列番号 790 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、24T/44R/464Q、24T/201N/202R/351N/507R、24T/202R/351N、33N/37A/46R/56G/103L/523D/540R/548K/549D、33N/37A/46R/56G/111K/234Y/523D、33N/37A/46R/56G/111K/523D/540R、33N/37A/46R/103L/111K/234Y、33N/37A/46R/103L/111K/548K/549D、33N/37A/46R/103L/523D、33N/37A/46R/111K/234Y/328Q/523D/540R/548K、33N/37A/46R/111K/336V/540R、33N/37A/46R/234Y/523D、33N/37A/46R/336V、33N/37A/46R/548K/549D、33N/37A/56G/111K/234Y/523D/540R/548K、33N/37A/56G/234Y/523D/540R/548K、33N/37A/103L/111K/234Y/336V/540R/548K、33N/37A/103L/336V/523D/540R/548K、33N/37A/111K/234Y/523D/540R/548K、33N/37A/111K/523D/540R、33N/37A/111K/548K、33N/37A/234Y/336V/523D/548K、33N/37A/523D/540R/548K、33N/46R、33N/46R/56G/111K/548K、33N/46R/56G/234Y/248V/549D、33N/46R/103L/523D/549D、33N/56G/103L/111K、33N/103L/111K/234Y、33N/103L/111K/234Y/336V/523D/548K、33N/103L/111K/234Y/540R/549D、33N/103L/111K/336V、33N/111K/234Y/548K、33N/234Y/328Q/523D/540R/549D、33N/234Y/336V/523D/540R/548K/549D、33N/234Y/523D/540R/548K、33N/234Y/523D/548K、33N/234Y/540R/548K/549D、33N/336V、33N/336V/523D/540R/548K/549D、33N/336V/540R/548K、33N/336V/549D、37A、37A/46R/56G/523D、37A/46R/234Y、37A/46R/336V/523D/540R/548K、37A/46R/336V/540R/548K、37A/56G/234Y/336V/523D/540R/548K/549D、37A/56G/336V/523D/540R/548K、37A/103L/336V/548K/549D、37A/111K/523D、37A/234Y/328Q/336V/523D、37A/336V、37A/548K/549D、44R、46R/103L/328Q/336V/523D、46R/103L/336V、46R/234Y/336V、46R/234Y/540R/548K、46R/336V/540R/549D、202R、202R/332Q/408E、234Y/523D/540R/548K/549D、336V/523D、408E、および 523D/548K から選択される少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 790 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、I24T/K44R/R464Q、I24T/K201N/L202R/G351N/Q507R、I24T/L202R/G351N、K33N/Q37A/L46R/R56G/R103L/E523D/A540R/S548K/G549D、K33N/Q37A/L46R/R56G/Q111K/H234Y/E523D、K33N/Q37A/L46R/R56G/Q111K/E523D/A540R、K33N/Q37A/L46R/R103L/Q111K/H234Y、K33N/Q37A/L46R/R103L/Q111K/S548K/G549D、K33N/Q37A/L46R/R103L/E523D、K33N/Q37A/L46R/Q111K/H234Y/A328Q/E523D/A540R/S548K、K33N/Q37A/L46R/Q111K/I336V/A540R、K33N/Q37A/L46R/H234Y/E523D、K33N/Q37A/L4

10

20

30

40

50

6 R / I 3 3 6 V、K 3 3 N / Q 3 7 A / L 4 6 R / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 5 6 G / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 5 6 G / H 2 3 4 Y / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / R 1 0 3 L / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 1 1 1 K / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R、K 3 3 N / Q 3 7 A / Q 1 1 1 K / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / Q 3 7 A / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R、K 3 3 N / L 4 6 R / R 5 6 G / Q 1 1 1 K / S 5 4 8 K、K 3 3 N / L 4 6 R / R 5 6 G / H 2 3 4 Y / A 2 4 8 V / G 5 4 9 D、K 3 3 N / L 4 6 R / R 1 0 3 L / E 5 2 3 D / G 5 4 9 D、K 3 3 N / R 5 6 G / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K、K 3 3 N / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y、K 3 3 N / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、K 3 3 N / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / I 3 3 6 V、K 3 3 N / Q 1 1 1 K / H 2 3 4 Y / S 5 4 8 K、K 3 3 N / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 Q / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、K 3 3 N / H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、K 3 3 N / H 2 3 4 Y / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / H 2 3 4 Y / E 5 2 3 D / S 5 4 8 K、K 3 3 N / H 2 3 4 Y / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、K 3 3 N / I 3 3 6 V、K 3 3 N / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、K 3 3 N / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、K 3 3 N / I 3 3 6 V / G 5 4 9 D、Q 3 7 A、Q 3 7 A / L 4 6 R / R 5 6 G / E 5 2 3 D、Q 3 7 A / L 4 6 R / H 2 3 4 Y、Q 3 7 A / L 4 6 R / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / L 4 6 R / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / R 5 6 G / H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、Q 3 7 A / R 5 6 G / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、Q 3 7 A / R 1 0 3 L / I 3 3 6 V / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、Q 3 7 A / Q 1 1 1 K / E 5 2 3 D、Q 3 7 A / H 2 3 4 Y / A 3 2 8 Q / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D、Q 3 7 A / I 3 3 6 V、Q 3 7 A / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、K 4 4 R、L 4 6 R / R 1 0 3 L / A 3 2 8 Q / I 3 3 6 V / E 5 2 3 D、L 4 6 R / R 1 0 3 L / I 3 3 6 V、L 4 6 R / H 2 3 4 Y / I 3 3 6 V、L 4 6 R / H 2 3 4 Y / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K、L 4 6 R / I 3 3 6 V / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、L 2 0 2 R、L 2 0 2 R / K 3 3 2 Q / D 4 0 8 E、H 2 3 4 Y / E 5 2 3 D / A 5 4 0 R / S 5 4 8 K / G 5 4 9 D、I 3 3 6 V / E 5 2 3 D、D 4 0 8 E、および E 5 2 3 D / S 5 4 8 K から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号790を参照して番号付けされている。

10

20

30

【0023】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、74、102、210、313、391、392、402、415、417、418、420、424、506、および530から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号790を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、74A、102P、210T、313I、313M、391N、392A、402A、415F、417A、418V、420L、424A、506C、および530Vから選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号790を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、I74A、M102P、L210T、L313I、L313M、T391N、M392A、S402A、L415F、G417A、L418V、I420L、S424A、R506C、およびD530Vから選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号790を参照して番号付けされている。

40

【0024】

50

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、24、24/44、24/44/
 46/202/391、24/44/111/202/464/506、24/44/2
 02/313/391/540、24/44/549、24/46/102/313/5
 06、24/46/103/111/464/506/549、24/46/103/3
 91/506、24/46/111/313/391、24/46/111/313/5
 49、24/46/111/506、24/46/202/391/506、24/46
 /549、24/103/202、24/202、44/46/102/202/313
 /417、44/46/103/111/391、44/46/103/202/313
 /391、44/46/103/202/417/464、44/103/111/31
 3/391/540、44/111/464/506、46/103/506、46/1
 11/417、46/111/506、46/202、46/202/506/549、
 46/313/391/540、103/313/549、111、111/202、1
 11/202/313/391/464、111/202/313/391/506、1
 11/202/313/417/540/549、111/202/391、111/2
 02/391/540、111/464/540/549、202/313/391/5
 49、202/417/464/540/549、202/464/506、202/5
 06/540、202/506/540/549、313/391/540/549、お
 よび417から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または
 置換セットを含み、位置は、配列番号1454を参照して番号付けされている。一部の実
 施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、24T、24T/44R、24T/44R
 /46R/202R/391N、24T/44R/111K/202R/464Q/50
 6C、24T/44R/202R/313M/391N/540R、24T/44R/5
 49D、24T/46R/102P/313M/506C、24T/46R/103L/
 111K/464Q/506C/549D、24T/46R/103L/391N/50
 6C、24T/46R/111K/313M/391N、24T/46R/111K/3
 13M/549D、24T/46R/111K/506C、24T/46R/202R/
 391N/506C、24T/46R/549D、24T/103L/202R、24T
 /202R、44R/46R/102P/202R/313M/417A、44R/46
 R/103L/111K/391N、44R/46R/103L/202R/313M/
 391N、44R/46R/103L/202R/417A/464Q、44R/103
 L/111K/313M/391N/540R、44R/111K/464Q/506C
 、46R/103L/506C、46R/111K/417A、46R/111K/50
 6C、46R/202R、46R/202R/506C/549D、46R/313M/
 391N/540R、103L/313M/549D、111K、111K/202R、
 111K/202R/313M/391N/464Q、111K/202R/313M/
 391N/506C、111K/202R/313M/417A/540R/549D、
 111K/202R/391N、111K/202R/391N/540R、111K/
 464Q/540R/549D、202R/313M/391N/549D、202R/
 417A/464Q/540R/549D、202R/464Q/506C、202R/
 506C/540R、202R/506C/540R/549D、313M/391N/
 540R/549D、および417Aから選択される少なくとも1つの置換または置換セ
 ットを含み、位置は、配列番号1454を参照して番号付けされている。一部の実施形態
 では、チロシンアンモニアリアーゼは、I24T、I24T/K44R、I24T/K4
 4R/L46R/L202R/T391N、I24T/K44R/Q111K/L202
 R/R464Q/R506C、I24T/K44R/L202R/L313M/T391
 N/A540R、I24T/K44R/G549D、I24T/L46R/M102P/
 L313M/R506C、I24T/L46R/R103L/Q111K/R464Q/
 R506C/G549D、I24T/L46R/R103L/T391N/R506C、
 I24T/L46R/Q111K/L313M/T391N、I24T/L46R/Q1
 11K/L313M/G549D、I24T/L46R/Q111K/R506C、I2

10

20

30

40

50

4 T / L 4 6 R / L 2 0 2 R / T 3 9 1 N / R 5 0 6 C、I 2 4 T / L 4 6 R / G 5 4 9 D、I 2 4 T / R 1 0 3 L / L 2 0 2 R、I 2 4 T / L 2 0 2 R、K 4 4 R / L 4 6 R / M 1 0 2 P / L 2 0 2 R / L 3 1 3 M / G 4 1 7 A、K 4 4 R / L 4 6 R / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / T 3 9 1 N、K 4 4 R / L 4 6 R / R 1 0 3 L / L 2 0 2 R / L 3 1 3 M / T 3 9 1 N、K 4 4 R / L 4 6 R / R 1 0 3 L / L 2 0 2 R / G 4 1 7 A / R 4 6 4 Q、K 4 4 R / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / L 3 1 3 M / T 3 9 1 N / A 5 4 0 R、K 4 4 R / Q 1 1 1 K / R 4 6 4 Q / R 5 0 6 C、L 4 6 R / R 1 0 3 L / R 5 0 6 C、L 4 6 R / Q 1 1 1 K / G 4 1 7 A、L 4 6 R / Q 1 1 1 K / R 5 0 6 C、L 4 6 R / L 2 0 2 R、L 4 6 R / L 2 0 2 R / R 5 0 6 C / G 5 4 9 D、L 4 6 R / L 3 1 3 M / T 3 9 1 N / A 5 4 0 R、R 1 0 3 L / L 3 1 3 M / G 5 4 9 D、Q 1 1 1 K、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / L 3 1 3 M / T 3 9 1 N / R 4 6 4 Q、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / L 3 1 3 M / T 3 9 1 N / R 5 0 6 C、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / L 3 1 3 M / G 4 1 7 A / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / T 3 9 1 N、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / T 3 9 1 N / A 5 4 0 R、Q 1 1 1 K / R 4 6 4 Q / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、L 2 0 2 R / L 3 1 3 M / T 3 9 1 N / G 5 4 9 D、L 2 0 2 R / G 4 1 7 A / R 4 6 4 Q / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、L 2 0 2 R / R 4 6 4 Q / R 5 0 6 C、L 2 0 2 R / R 5 0 6 C / A 5 4 0 R、L 2 0 2 R / R 5 0 6 C / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、L 3 1 3 M / T 3 9 1 N / A 5 4 0 R / G 5 4 9 D、および G 4 1 7 A から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 1 4 5 4 を参照して番号付けされている。

10

20

【0025】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアライゼは、2 0 / 4 4 / 2 0 2 / 5 0 6、2 0 / 1 0 3 / 1 1 1 / 4 7 1 / 5 0 6、2 0 / 2 0 2 / 3 1 3 / 4 7 1 / 5 0 6、2 4、2 7、3 3、3 6、4 1、4 4、4 4 / 1 1 1 / 2 0 2 / 4 6 4 / 4 7 1 / 5 0 6 / 5 4 9、4 4 / 2 0 2 / 4 6 4 / 5 0 6、4 6、4 8、5 0、5 1、5 5、5 6 / 1 1 1 / 5 0 6、5 6 / 5 0 6、5 9、6 6、6 6 / 5 2 8、1 0 3 / 1 1 1 / 2 0 2 / 4 6 4 / 4 7 1、1 0 3 / 1 1 1 / 4 7 1、1 0 3 / 2 0 2 / 5 4 0、1 0 3 / 4 6 4 / 5 4 9、1 0 3 / 4 7 1、1 1 1、1 1 1 / 2 0 2 / 3 1 3 / 3 1 6、1 1 1 / 2 0 2 / 3 1 3 / 4 7 1 / 5 0 6、1 1 1 / 2 0 2 / 4 7 1、1 1 1 / 5 0 6、1 9 7、2 0 2、2 0 2 / 3 1 3 / 4 6 4 / 4 7 1 / 5 0 6、2 0 2 / 4 6 4 / 5 0 6、2 0 2 / 4 6 4 / 5 0 6 / 5 4 9、2 0 8、2 7 2、2 8 9、2 9 2 / 5 5 3、3 0 5、3 1 2 / 5 5 9、3 1 3 / 4 6 4 / 4 7 1 / 5 0 6、3 3 1、3 3 2、4 3 2、4 3 5、4 6 4、4 6 4 / 5 0 6、4 7 0、5 0 0、5 0 4、5 0 6、5 0 6 / 5 4 9、5 1 8、5 1 9、5 2 3、5 4 0、5 4 3、5 4 7、5 4 7 / 5 5 3、5 5 5、5 5 6、および 5 5 9 から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 1 5 7 8 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアライゼは、2 0 G / 4 4 R / 2 0 2 R / 5 0 6 R、2 0 G / 1 0 3 L / 1 1 1 K / 4 7 1 Y / 5 0 6 R、2 0 G / 2 0 2 R / 3 1 3 L / 4 7 1 Y / 5 0 6 R、2 4 E、2 4 K、2 4 Q、2 4 S、2 7 S、3 3 E、3 6 S、3 6 T、4 1 A、4 1 H、4 1 L、4 1 N、4 1 Q、4 1 S、4 4 E、4 4 P、4 4 R、4 4 R / 1 1 1 K / 2 0 2 R / 4 6 4 Q / 4 7 1 Y / 5 0 6 R / 5 4 9 D、4 4 R / 2 0 2 R / 4 6 4 Q / 5 0 6 R、4 4 S、4 6 A、4 6 S、4 8 A、4 8 G、5 0 M、5 1 A、5 1 H、5 5 S、5 6 G / 1 1 1 K / 5 0 6 R、5 6 G / 5 0 6 R、5 9 N、5 9 S、6 6 H / 5 2 8 R、6 6 K、6 6 N、6 6 T、1 0 3 L / 1 1 1 K / 2 0 2 R / 4 6 4 Q / 4 7 1 Y、1 0 3 L / 1 1 1 K / 4 7 1 Y、1 0 3 L / 2 0 2 R / 5 4 0 R、1 0 3 L / 4 6 4 Q / 5 4 9 D、1 0 3 L / 4 7 1 Y、1 1 1 K、1 1 1 K / 2 0 2 R / 3 1 3 L / 3 1 6 Q、1 1 1 K / 2 0 2 R / 3 1 3 L / 4 7 1 Y / 5 0 6 R、1 1 1 K / 2 0 2 R / 4 7 1 Y、1 1 1 K / 5 0 6 R、1 9 7 V、2 0 2 R、2 0 2 R / 3 1 3 L / 4 6 4 Q / 4 7 1 Y / 5 0 6 R、2 0 2 R / 4 6 4 Q / 5 0 6 R、2 0 2 R / 4 6 4 Q / 5 0 6 R / 5 4 9 D、2 0 8 M、2 7 2 A、2 8 9 L、2 9 2 L / 5 5 3 S、3 0 5 D、3 0 5 E、3 1 2 C / 5 5 9 Y、3 1 3 L / 4 6 4 Q /

30

40

50

4 7 1 Y / 5 0 6 R、3 3 1 G、3 3 2 N、4 3 2 L、4 3 2 T、4 3 5 A、4 3 5 T、
 4 6 4 N、4 6 4 Q / 5 0 6 R、4 6 4 S、4 7 0 I、4 7 0 T、5 0 0 L、5 0 4 A、
 5 0 4 L、5 0 6 E、5 0 6 R、5 0 6 R / 5 4 9 D、5 1 8 S、5 1 9 E、5 1 9 K、
 5 1 9 P、5 1 9 T、5 2 3 H、5 4 0 H、5 4 0 R、5 4 3 T、5 4 3 V、5 4 7 G、
 5 4 7 M / 5 5 3 I、5 5 5 S、5 5 6 L、5 5 6 V、5 5 9 C、5 5 9 H、5 5 9 I、
 5 5 9 L、5 5 9 M、および5 5 9 Yから選択される少なくとも1つの置換または置換セ
 ットを含み、位置は、配列番号1 5 7 8を参照して番号付けされている。一部の実施形態
 では、チロシンアンモニアリアーゼは、D 2 0 G / K 4 4 R / L 2 0 2 R / C 5 0 6 R、
 D 2 0 G / R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / Q 4 7 1 Y / C 5 0 6 R、D 2 0 G / L 2 0 2 R /
 M 3 1 3 L / Q 4 7 1 Y / C 5 0 6 R、T 2 4 E、T 2 4 K、T 2 4 Q、T 2 4 S、D 2
 7 S、N 3 3 E、A 3 6 S、A 3 6 T、Y 4 1 A、Y 4 1 H、Y 4 1 L、Y 4 1 N、Y 4
 1 Q、Y 4 1 S、K 4 4 E、K 4 4 P、K 4 4 R、K 4 4 R / Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R /
 R 4 6 4 Q / Q 4 7 1 Y / C 5 0 6 R / G 5 4 9 D、K 4 4 R / L 2 0 2 R / R 4 6 4 Q
 / C 5 0 6 R、K 4 4 S、R 4 6 A、R 4 6 S、T 4 8 A、T 4 8 G、K 5 0 M、E 5 1
 A、E 5 1 H、Q 5 5 S、R 5 6 G / Q 1 1 1 K / C 5 0 6 R、R 5 6 G / C 5 0 6 R、
 A 5 9 N、A 5 9 S、Q 6 6 H / W 5 2 8 R、Q 6 6 K、Q 6 6 N、Q 6 6 T、R 1 0 3
 L / Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / R 4 6 4 Q / Q 4 7 1 Y、R 1 0 3 L / Q 1 1 1 K / Q 4
 7 1 Y、R 1 0 3 L / L 2 0 2 R / A 5 4 0 R、R 1 0 3 L / R 4 6 4 Q / G 5 4 9 D、
 R 1 0 3 L / Q 4 7 1 Y、Q 1 1 1 K、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / M 3 1 3 L / L 3 1 6
 Q、Q 1 1 1 K / L 2 0 2 R / M 3 1 3 L / Q 4 7 1 Y / C 5 0 6 R、Q 1 1 1 K / L 2
 0 2 R / Q 4 7 1 Y、Q 1 1 1 K / C 5 0 6 R、P 1 9 7 V、L 2 0 2 R、L 2 0 2 R /
 M 3 1 3 L / R 4 6 4 Q / Q 4 7 1 Y / C 5 0 6 R、L 2 0 2 R / R 4 6 4 Q / C 5 0 6
 R、L 2 0 2 R / R 4 6 4 Q / C 5 0 6 R / G 5 4 9 D、L 2 0 8 M、P 2 7 2 A、Q 2
 8 9 L、R 2 9 2 L / V 5 5 3 S、Q 3 0 5 D、Q 3 0 5 E、S 3 1 2 C / V 5 5 9 Y、
 M 3 1 3 L / R 4 6 4 Q / Q 4 7 1 Y / C 5 0 6 R、A 3 3 1 G、K 3 3 2 N、Y 4 3 2
 L、Y 4 3 2 T、S 4 3 5 A、S 4 3 5 T、R 4 6 4 N、R 4 6 4 Q / C 5 0 6 R、R 4
 6 4 S、Q 4 7 0 I、Q 4 7 0 T、C 5 0 0 L、R 5 0 4 A、R 5 0 4 L、C 5 0 6 E、
 C 5 0 6 R、C 5 0 6 R / G 5 4 9 D、K 5 1 8 S、A 5 1 9 E、A 5 1 9 K、A 5 1 9
 P、A 5 1 9 T、D 5 2 3 H、A 5 4 0 H、A 5 4 0 R、A 5 4 3 T、A 5 4 3 V、T 5
 4 7 G、T 5 4 7 M / V 5 5 3 I、A 5 5 5 S、I 5 5 6 L、I 5 5 6 V、V 5 5 9 C、
 V 5 5 9 H、V 5 5 9 I、V 5 5 9 L、V 5 5 9 M、およびV 5 5 9 Yから選択される少
 なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号1 5 7 8を参照して番号
 付けされている。

10

20

30

【0 0 2 6】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 0、2 0 / 4 4 / 2 0 8 / 2 7
 2 / 5 1 9、2 0 / 1 1 1 / 2 0 8 / 2 7 2 / 4 1 0 / 4 3 2、2 0 / 1 9 7 / 4 3 2 /
 5 1 9、2 4、2 4 / 4 6 / 4 1 0 / 4 3 5 / 5 1 8、3 6 / 5 5 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4
 1 0、3 6 / 6 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7、3 6 / 6 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 4
 1 0、3 6 / 6 6 / 3 0 5、3 6 / 6 6 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0、3 6 / 6 6 / 3 0 5
 / 5 0 0、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0、3 6 / 1 9
 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0 / 5 0 0、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0 / 5 5 9
 、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 5 0 0、3 6 / 1 9 7 / 3 0 5 / 4 1 0、3 6 / 1 9
 7 / 3 0 5 / 5 0 0、3 6 / 3 0 5、3 6 / 3 0 5 / 3 3 2、3 6 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4
 1 0、3 6 / 3 0 5 / 4 1 0、4 1 / 4 4 / 4 6 / 1 1 1 / 2 7 2、4 1 / 4 3 2 / 5 2
 6、4 4 / 4 6 / 1 1 1 / 2 0 8、4 4 / 4 6 / 1 1 1 / 4 3 2 / 5 1 9、4 4 / 1 1 1
 / 4 3 2 / 5 1 9 / 5 2 6、4 4 / 2 0 8 / 4 3 2 / 4 3 5、4 6 / 1 1 1 / 2 0 8 / 2
 7 2 / 4 3 5 / 5 2 6、4 6 / 2 0 8 / 2 7 2 / 4 3 2 / 4 3 5 / 5 2 6、4 6 / 4 3 2
 / 4 7 1、5 5 / 3 0 5、5 5 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7 / 5 4 3 / 5 4 7、5 5 / 3 0
 5 / 5 0 0 / 5 5 9、6 6 / 3 0 5、6 6 / 3 0 5 / 3 3 2、1 1 1、1 1 1 / 2 7 2 /
 4 3 2 / 4 3 5、1 1 1 / 2 7 2 / 4 7 1 / 5 2 6、1 1 1 / 2 7 2 / 5 1 9、1 1 1 /

40

50

4 3 2 / 4 3 5、1 1 1 / 4 3 2 / 5 2 6、1 1 1 / 5 2 6、1 3 4 / 2 0 2 / 3 0 5、
 1 9 7 / 3 0 5、1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0、1 9 7 / 3 0 5 / 3 3 2 / 5 0 0 /
 5 4 3 / 5 4 7、1 9 7 / 3 0 5 / 4 1 0、1 9 7 / 3 0 5 / 5 0 0、2 0 8、2 0 8 /
 2 7 2 / 4 3 2、2 0 8 / 4 1 0 / 4 3 5、2 0 8 / 4 3 5 / 5 1 9、2 1 1 / 4 1 0、
 2 7 2、2 7 2 / 4 3 5 / 5 2 6、2 9 8 / 4 1 0、3 0 5、3 0 5 / 3 3 2、3 0 5 /
 3 3 2 / 4 1 0、3 0 5 / 3 3 2 / 4 1 0 / 5 0 0、3 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7、3 0 5 /
 3 3 2 / 4 5 7 / 5 0 0、3 0 5 / 3 3 2 / 4 5 7 / 5 5 5、3 0 5 / 3 3 2 / 5 0 0、
 3 0 5 / 4 1 0、3 0 5 / 5 0 0 / 5 4 3 / 5 4 7、4 1 0、4 3 2 / 5 2 6、4 3 5、
 4 3 5 / 5 1 8、4 3 5 / 5 1 9 / 5 2 6、4 7 1、4 7 1 / 5 2 6、および 5 1 9 から
 選択される 1 つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換または置換セットを含
 み、位置は、配列番号 1 6 6 0 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チ
 ロシンアンモニアリアーゼは、2 0 G、2 0 G / 4 4 E / 2 0 8 M / 2 7 2 A / 5 1 9 K
 、2 0 G / 1 1 1 K / 2 0 8 M / 2 7 2 A / 4 1 0 M / 4 3 2 T、2 0 G / 1 9 7 V / 4
 3 2 T / 5 1 9 K、2 4 E、2 4 E / 4 6 S / 4 1 0 M / 4 3 5 T / 5 1 8 S、3 6 S /
 5 5 S / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0 M、3 6 S / 6 6 N / 1 9 7 V / 3 0 5 D / 3 3 2
 N / 4 5 7 S、3 6 S / 6 6 N / 1 9 7 V / 3 0 5 D / 4 1 0 M、3 6 S / 6 6 N / 3 0
 5 D、3 6 S / 6 6 N / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0 M、3 6 S / 6 6 N / 3 0 5 D / 5
 0 0 L、3 6 S / 1 9 7 V / 3 0 5 D、3 6 S / 1 9 7 V / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0
 M、3 6 S / 1 9 7 V / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0 M / 5 0 0 L、3 6 S / 1 9 7 V /
 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0 M / 5 5 9 I、3 6 S / 1 9 7 V / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 5
 0 0 L、3 6 S / 1 9 7 V / 3 0 5 D / 4 1 0 M、3 6 S / 1 9 7 V / 3 0 5 D / 5 0 0
 L、3 6 S / 3 0 5 D、3 6 S / 3 0 5 D / 3 3 2 N、3 6 S / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4
 1 0 M、3 6 S / 3 0 5 D / 4 1 0 M、4 1 L / 4 4 E / 4 6 S / 1 1 1 K / 2 7 2 A、
 4 1 L / 4 3 2 T / 5 2 6 L、4 4 E / 4 6 S / 1 1 1 K / 2 0 8 M、4 4 E / 4 6 S /
 1 1 1 K / 4 3 2 T / 5 1 9 K、4 4 E / 1 1 1 K / 4 3 2 L / 5 1 9 K / 5 2 6 L、4
 4 E / 2 0 8 M / 4 3 2 T / 4 3 5 T、4 6 S / 1 1 1 K / 2 0 8 M / 2 7 2 A / 4 3 5
 T / 5 2 6 L、4 6 S / 2 0 8 M / 2 7 2 A / 4 3 2 L / 4 3 5 T / 5 2 6 L、4 6 S /
 4 3 2 L / 4 7 1 Y、5 5 S / 3 0 5 D、5 5 S / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 5 7 S / 5 4
 3 V / 5 4 7 G、5 5 S / 3 0 5 D / 5 0 0 L / 5 5 9 I、6 6 N / 3 0 5 D、6 6 N /
 3 0 5 D / 3 3 2 N、1 1 1 K、1 1 1 K / 2 7 2 A / 4 3 2 T / 4 3 5 T、1 1 1 K /
 2 7 2 A / 4 7 1 Y / 5 2 6 L、1 1 1 K / 2 7 2 A / 5 1 9 K、1 1 1 K / 4 3 2 L /
 4 3 5 T、1 1 1 K / 4 3 2 T / 5 2 6 L、1 1 1 K / 5 2 6 L、1 3 4 C / 2 0 2 L /
 3 0 5 D、1 9 7 V / 3 0 5 D、1 9 7 V / 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0 M、1 9 7 V /
 3 0 5 D / 3 3 2 N / 5 0 0 L / 5 4 3 V / 5 4 7 G、1 9 7 V / 3 0 5 D / 4 1 0 M、
 1 9 7 V / 3 0 5 D / 5 0 0 L、2 0 8 M、2 0 8 M / 2 7 2 A / 4 3 2 L、2 0 8 M /
 4 1 0 M / 4 3 5 T、2 0 8 M / 4 3 5 T / 5 1 9 K、2 1 1 Q / 4 1 0 I、2 7 2 A、
 2 7 2 A / 4 3 5 T / 5 2 6 L、2 9 8 G / 4 1 0 I、3 0 5 D、3 0 5 D / 3 3 2 N、
 3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0 M、3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 1 0 M / 5 0 0 L、3 0 5 D /
 3 3 2 N / 4 5 7 S、3 0 5 D / 3 3 2 N / 4 5 7 S / 5 0 0 L、3 0 5 D / 3 3 2 N /
 4 5 7 S / 5 5 5 S、3 0 5 D / 3 3 2 N / 5 0 0 L、3 0 5 D / 4 1 0 M、3 0 5 D /
 5 0 0 L / 5 4 3 V / 5 4 7 G、4 1 0 L、4 3 2 L / 5 2 6 L、4 3 5 T、4 3 5 T /
 5 1 8 S、4 3 5 T / 5 1 9 K / 5 2 6 L、4 7 1 Y、4 7 1 Y / 5 2 6 L、および 5 1
 9 K から選択される少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 1
 6 6 0 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアー
 ゼは、D 2 0 G、D 2 0 G / K 4 4 E / L 2 0 8 M / P 2 7 2 A / A 5 1 9 K、D 2 0 G
 / Q 1 1 1 K / L 2 0 8 M / P 2 7 2 A / P 4 1 0 M / Y 4 3 2 T、D 2 0 G / P 1 9 7
 V / Y 4 3 2 T / A 5 1 9 K、T 2 4 E、T 2 4 E / R 4 6 S / P 4 1 0 M / S 4 3 5 T
 / K 5 1 8 S、A 3 6 S / Q 5 5 S / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / P 4 1 0 M、A 3 6 S /
 Q 6 6 N / P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / G 4 5 7 S、A 3 6 S / Q 6 6 N / P
 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / P 4 1 0 M、A 3 6 S / Q 6 6 N / Q 3 0 5 D、A 3 6 S / Q 6

10

20

30

40

50

6 N / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / P 4 1 0 M、A 3 6 S / Q 6 6 N / Q 3 0 5 D / C 5 0
 0 L、A 3 6 S / P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D、A 3 6 S / P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / K 3 3
 2 N / P 4 1 0 M、A 3 6 S / P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / P 4 1 0 M / C 5
 0 0 L、A 3 6 S / P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / P 4 1 0 M / V 5 5 9 I、A
 3 6 S / P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / C 5 0 0 L、A 3 6 S / P 1 9 7 V / Q
 3 0 5 D / P 4 1 0 M、A 3 6 S / P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / C 5 0 0 L、A 3 6 S / Q
 3 0 5 D、A 3 6 S / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N、A 3 6 S / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / P
 4 1 0 M、A 3 6 S / Q 3 0 5 D / P 4 1 0 M、Y 4 1 L / K 4 4 E / R 4 6 S / Q 1 1
 1 K / P 2 7 2 A、Y 4 1 L / Y 4 3 2 T / Y 5 2 6 L、K 4 4 E / R 4 6 S / Q 1 1 1
 K / L 2 0 8 M、K 4 4 E / R 4 6 S / Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 T / A 5 1 9 K、K 4 4 E
 / Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L / A 5 1 9 K / Y 5 2 6 L、K 4 4 E / L 2 0 8 M / Y 4 3 2
 T / S 4 3 5 T、R 4 6 S / Q 1 1 1 K / L 2 0 8 M / P 2 7 2 A / S 4 3 5 T / Y 5 2
 6 L、R 4 6 S / L 2 0 8 M / P 2 7 2 A / Y 4 3 2 L / S 4 3 5 T / Y 5 2 6 L、R 4
 6 S / Y 4 3 2 L / Q 4 7 1 Y、Q 5 5 S / Q 3 0 5 D、Q 5 5 S / Q 3 0 5 D / K 3 3
 2 N / G 4 5 7 S / A 5 4 3 V / T 5 4 7 G、Q 5 5 S / Q 3 0 5 D / C 5 0 0 L / V 5
 5 9 I、Q 6 6 N / Q 3 0 5 D、Q 6 6 N / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N、Q 1 1 1 K、Q 1
 1 1 K / P 2 7 2 A / Y 4 3 2 T / S 4 3 5 T、Q 1 1 1 K / P 2 7 2 A / Q 4 7 1 Y /
 Y 5 2 6 L、Q 1 1 1 K / P 2 7 2 A / A 5 1 9 K、Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L / S 4 3 5
 T、Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 T / Y 5 2 6 L、Q 1 1 1 K / Y 5 2 6 L、S 1 3 4 C / R 2
 0 2 L / Q 3 0 5 D、P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D、P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N /
 P 4 1 0 M、P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / C 5 0 0 L / A 5 4 3 V / T 5 4 7
 G、P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / P 4 1 0 M、P 1 9 7 V / Q 3 0 5 D / C 5 0 0 L、L 2
 0 8 M、L 2 0 8 M / P 2 7 2 A / Y 4 3 2 L、L 2 0 8 M / P 4 1 0 M / S 4 3 5 T、
 L 2 0 8 M / S 4 3 5 T / A 5 1 9 K、L 2 1 1 Q / P 4 1 0 I、P 2 7 2 A、P 2 7 2
 A / S 4 3 5 T / Y 5 2 6 L、S 2 9 8 G / P 4 1 0 I、Q 3 0 5 D、Q 3 0 5 D / K 3
 3 2 N、Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / P 4 1 0 M、Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / P 4 1 0 M /
 C 5 0 0 L、Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / G 4 5 7 S、Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / G 4 5 7
 S / C 5 0 0 L、Q 3 0 5 D / K 3 3 2 N / G 4 5 7 S / A 5 5 5 S、Q 3 0 5 D / K 3
 3 2 N / C 5 0 0 L、Q 3 0 5 D / P 4 1 0 M、Q 3 0 5 D / C 5 0 0 L / A 5 4 3 V /
 T 5 4 7 G、P 4 1 0 L、Y 4 3 2 L / Y 5 2 6 L、S 4 3 5 T、S 4 3 5 T / K 5 1 8
 S、S 4 3 5 T / A 5 1 9 K / Y 5 2 6 L、Q 4 7 1 Y、Q 4 7 1 Y / Y 5 2 6 L、およ
 び A 5 1 9 K から選択される少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配
 列番号 1 6 6 0 を参照して番号付けされている。

10

20

30

40

50

【0027】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 4 / 5 9 / 1 1 1 / 2 8 9 / 5
 0 4、2 4 / 1 1 1 / 2 8 9、2 4 / 1 1 1 / 2 8 9 / 5 0 0 / 5 0 4、2 4 / 1 1 1 /
 4 3 2、2 4 / 1 1 1 / 4 3 5 / 5 0 0、2 4 / 2 8 9、2 4 / 4 3 2 / 4 3 5 / 5 0 4
 、4 1 / 4 4 / 2 0 8 / 5 4 7、4 1 / 5 1 / 4 1 0 / 5 4 3、4 1 / 2 0 8 / 4 1 0 /
 5 4 3 / 5 4 7、4 1 / 2 0 8 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 7、4 1 / 2 0 8 / 5 4 7、4 1
 / 4 1 0 / 5 1 8 / 5 4 3、4 1 / 4 1 0 / 5 1 8 / 5 4 7、4 1 / 5 4 3、4 4 / 2 0
 8 / 5 1 8 / 5 4 7、5 1 / 5 1 9、5 9 / 6 6 / 1 1 1 / 2 8 9 / 4 3 2 / 5 0 0、5
 9 / 6 6 / 1 1 1 / 4 3 2 / 5 0 0、5 9 / 6 6 / 1 1 1 / 4 3 2 / 5 0 4、5 9 / 6 6
 / 2 8 9 / 5 0 0 / 5 0 4 / 5 5 6、5 9 / 1 1 1、5 9 / 1 1 1 / 4 3 2 / 5 0 0、5
 9 / 2 8 9、5 9 / 2 8 9 / 4 3 5、5 9 / 4 3 2、5 9 / 4 3 2 / 4 3 5 / 5 0 4 / 5
 5 6、6 6 / 1 1 1、1 1 1、1 1 1 / 2 8 9、1 1 1 / 2 8 9 / 4 3 5、1 1 1 / 2 8
 9 / 4 3 5 / 5 0 0、1 1 1 / 2 8 9 / 5 0 0、1 1 1 / 3 3 1 / 4 3 2 / 5 0 4、1 1
 1 / 3 3 1 / 4 3 5 / 5 0 0、1 1 1 / 4 3 2、1 1 1 / 4 3 2 / 5 0 0、1 1 1 / 5 0
 0 / 5 0 4、2 0 8、2 0 8 / 2 1 1 / 4 1 0 / 5 1 9、2 0 8 / 2 1 1 / 5 4 7、2 1
 1、2 1 1 / 5 1 8 / 5 1 9 / 5 4 7、2 1 1 / 5 4 7、2 8 9、2 8 9 / 4 3 2、2 8
 9 / 4 3 2 / 4 3 5、2 8 9 / 4 3 5、2 8 9 / 4 3 5 / 5 0 0 / 5 0 4、2 8 9 / 4 3

5 / 5 0 4 / 5 5 6、2 8 9 / 5 0 4、4 1 0、4 3 2、4 3 5 / 5 0 4、5 0 4、5 0 4 / 5 5 6、5 1 9、および 5 4 7 から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 1 8 4 4 を参照して番号付けされている。

【0028】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 4 K / 5 9 S / 1 1 1 K / 2 8 9 L / 5 0 4 A、2 4 K / 1 1 1 K / 2 8 9 L、2 4 K / 1 1 1 K / 2 8 9 L / 5 0 0 L / 5 0 4 A、2 4 K / 1 1 1 K / 4 3 2 L、2 4 K / 1 1 1 K / 4 3 5 T / 5 0 0 L、2 4 K / 2 8 9 L、2 4 K / 4 3 2 L / 4 3 5 T / 5 0 4 A、4 1 Q / 4 4 P / 2 0 8 M / 5 4 7 G、4 1 Q / 5 1 A / 4 1 0 L / 5 4 3 V、4 1 Q / 2 0 8 M / 4 1 0 L / 5 4 3 V / 5 4 7 G、4 1 Q / 2 0 8 M / 5 1 8 S / 5 1 9 T / 5 4 7 G、4 1 Q / 2 0 8 M / 5 4 7 G、4 1 Q / 4 1 0 L / 5 1 8 S / 5 4 3 V、4 1 Q / 4 1 0 L / 5 1 8 S / 5 4 7 G、4 1 Q / 5 4 3 V、4 4 R / 2 0 8 M / 5 1 8 S / 5 4 7 G、5 1 A / 5 1 9 T、5 9 S / 6 6 T / 1 1 1 K / 2 8 9 L / 4 3 2 L / 5 0 0 L、5 9 S / 6 6 T / 1 1 1 K / 4 3 2 L / 5 0 0 L、5 9 S / 6 6 T / 1 1 1 K / 4 3 2 L / 5 0 4 A、5 9 S / 6 6 T / 2 8 9 L / 5 0 0 L / 5 0 4 A / 5 5 6 L、5 9 S / 1 1 1 K、5 9 S / 1 1 1 K / 4 3 2 L / 5 0 0 L、5 9 S / 2 8 9 L、5 9 S / 2 8 9 L / 4 3 5 T、5 9 S / 4 3 2 L、5 9 S / 4 3 2 L / 4 3 5 T / 5 0 4 A / 5 5 6 L、6 6 T / 1 1 1 K、1 1 1 K、1 1 1 K / 2 8 9 L、1 1 1 K / 2 8 9 L / 4 3 5 T、1 1 1 K / 2 8 9 L / 4 3 5 T / 5 0 0 L、1 1 1 K / 2 8 9 L / 5 0 0 L、1 1 1 K / 3 3 1 G / 4 3 2 L / 5 0 4 A、1 1 1 K / 3 3 1 G / 4 3 5 T / 5 0 0 L、1 1 1 K / 4 3 2 L、1 1 1 K / 4 3 2 L / 5 0 0 L、1 1 1 K / 5 0 0 L / 5 0 4 A、2 0 8 M、2 0 8 M / 2 1 1 Q / 4 1 0 L / 5 1 9 T、2 0 8 M / 2 1 1 Q / 5 4 7 G、2 1 1 Q、2 1 1 Q / 5 1 8 S / 5 1 9 T / 5 4 7 G、2 1 1 Q / 5 4 7 G、2 8 9 L、2 8 9 L / 4 3 2 L、2 8 9 L / 4 3 2 L / 4 3 5 T、2 8 9 L / 4 3 5 T、2 8 9 L / 4 3 5 T / 5 0 0 L / 5 0 4 A、2 8 9 L / 4 3 5 T / 5 0 4 A / 5 5 6 L、2 8 9 L / 5 0 4 A、4 1 0 L、4 3 2 L、4 3 5 T / 5 0 4 A、5 0 4 A、5 0 4 A / 5 5 6 L、5 1 9 T、および 5 4 7 G から選択される少なくとも 1 つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 1 8 4 4 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、T 2 4 K / A 5 9 S / Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L / R 5 0 4 A、T 2 4 K / Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L、T 2 4 K / Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L / C 5 0 0 L / R 5 0 4 A、T 2 4 K / Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L、T 2 4 K / Q 1 1 1 K / S 4 3 5 T / C 5 0 0 L、T 2 4 K / Q 2 8 9 L、T 2 4 K / Y 4 3 2 L / S 4 3 5 T / R 5 0 4 A、Y 4 1 Q / K 4 4 P / L 2 0 8 M / T 5 4 7 G、Y 4 1 Q / E 5 1 A / M 4 1 0 L / A 5 4 3 V、Y 4 1 Q / L 2 0 8 M / M 4 1 0 L / A 5 4 3 V / T 5 4 7 G、Y 4 1 Q / L 2 0 8 M / K 5 1 8 S / A 5 1 9 T / T 5 4 7 G、Y 4 1 Q / L 2 0 8 M / T 5 4 7 G、Y 4 1 Q / M 4 1 0 L / K 5 1 8 S / A 5 4 3 V、Y 4 1 Q / M 4 1 0 L / K 5 1 8 S / T 5 4 7 G、Y 4 1 Q / A 5 4 3 V、K 4 4 R / L 2 0 8 M / K 5 1 8 S / T 5 4 7 G、E 5 1 A / A 5 1 9 T、A 5 9 S / Q 6 6 T / Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L / Y 4 3 2 L / C 5 0 0 L、A 5 9 S / Q 6 6 T / Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L / C 5 0 0 L、A 5 9 S / Q 6 6 T / Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L / R 5 0 4 A、A 5 9 S / Q 6 6 T / Q 2 8 9 L / C 5 0 0 L / R 5 0 4 A / I 5 5 6 L、A 5 9 S / Q 1 1 1 K、A 5 9 S / Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L / C 5 0 0 L、A 5 9 S / Q 2 8 9 L、A 5 9 S / Q 2 8 9 L / S 4 3 5 T、A 5 9 S / Y 4 3 2 L、A 5 9 S / Y 4 3 2 L / S 4 3 5 T / R 5 0 4 A / I 5 5 6 L、Q 6 6 T / Q 1 1 1 K、Q 1 1 1 K、Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L、Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L / S 4 3 5 T、Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L / S 4 3 5 T / C 5 0 0 L、Q 1 1 1 K / Q 2 8 9 L / C 5 0 0 L、Q 1 1 1 K / A 3 3 1 G / Y 4 3 2 L / R 5 0 4 A、Q 1 1 1 K / A 3 3 1 G / S 4 3 5 T / C 5 0 0 L、Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L、Q 1 1 1 K / Y 4 3 2 L / C 5 0 0 L、Q 1 1 1 K / C 5 0 0 L / R 5 0 4 A、L 2 0 8 M、L 2 0 8 M / L 2 1 1 Q / M 4 1 0 L / A 5 1 9 T、L 2 0 8 M / L 2 1 1 Q / T 5 4 7 G、L 2 1 1 Q、L 2 1 1 Q / K 5 1 8 S / A 5 1 9 T / T 5 4 7 G、

10

20

30

40

50

L 2 1 1 Q / T 5 4 7 G、Q 2 8 9 L、Q 2 8 9 L / Y 4 3 2 L、Q 2 8 9 L / Y 4 3 2 L / S 4 3 5 T、Q 2 8 9 L / S 4 3 5 T、Q 2 8 9 L / S 4 3 5 T / C 5 0 0 L / R 5 0 4 A、Q 2 8 9 L / S 4 3 5 T / R 5 0 4 A / I 5 5 6 L、Q 2 8 9 L / R 5 0 4 A、M 4 1 0 L、Y 4 3 2 L、S 4 3 5 T / R 5 0 4 A、R 5 0 4 A、R 5 0 4 A / I 5 5 6 L、A 5 1 9 T、および T 5 4 7 G から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 1 8 4 4 を参照して番号付けされている。

【0029】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、4、8、11、13、13 / 2 2 / 4 5 / 5 1 2、13 / 4 5、13 / 4 5 / 5 1 2、17、19、45、45 / 2 4 4 / 3 2 4 / 5 1 3、45 / 4 3 6 / 5 1 2 / 5 1 3、45 / 5 1 2、144、251、324、327、341、および 428 から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 2 0 3 0 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、4 D、8 D、8 G、8 R、11 A、11 D、11 G、11 K、11 S、13 Q / 4 5 V / 5 1 2 V、13 R、13 S / 2 2 T / 4 5 V / 5 1 2 V、13 S / 4 5 V、17 Q、19 H、45 V、45 V / 2 4 4 M / 3 2 4 V / 5 1 3 R、45 V / 4 3 6 I / 5 1 2 V / 5 1 3 R、45 V / 5 1 2 V、144 L、251 V、324 R、327 M、341 A、および 428 V から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 2 0 3 0 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、A 4 D、Q 8 D、Q 8 G、Q 8 R、T 11 A、T 11 D、T 11 G、T 11 K、T 11 S、K 13 Q / A 4 5 V / I 5 1 2 V、K 13 R、K 13 S / V 2 2 T / A 4 5 V / I 5 1 2 V、K 13 S / A 4 5 V、T 17 Q、S 19 H、A 4 5 V、A 4 5 V / L 2 4 4 M / A 3 2 4 V / K 5 1 3 R、A 4 5 V / L 4 3 6 I / I 5 1 2 V / K 5 1 3 R、A 4 5 V / I 5 1 2 V、I 1 4 4 L、L 2 5 1 V、A 3 2 4 R、I 3 2 7 M、V 3 4 1 A、および L 4 2 8 V から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 2 0 3 0 を参照して番号付けされている。

10

20

【0030】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2、4、4 / 8 / 11 / 13 / 2 2 / 1 1 1 / 5 0 4、4 / 8 / 11 / 17 / 3 2 4 / 4 2 8 / 5 0 4、4 / 8 / 11 / 2 2 / 1 1 1、4 / 8 / 2 2 / 1 1 1 / 5 0 4、4 / 17 / 2 4 1 / 5 1 9 / 5 4 7、4 / 3 2 4、4 / 4 2 8、6、7、8 / 11 / 13 / 3 2 4、8 / 11 / 17 / 2 2 / 3 2 4 / 5 0 4 / 5 1 9、8 / 11 / 1 1 1 / 5 0 4、10、11 / 13 / 5 0 4、11 / 17 / 2 2 / 3 2 4、14、16、39、57、228、228 / 259、236、305 / 307 / 425、316、385、425、430、437、478、および 505 から選択される1つまたは複数のアミノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 2 1 1 4 を参照して番号付けされている。

30

【0031】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、2 G、2 T、4 D、4 D / 8 D / 11 G / 17 P / 3 2 4 V / 4 2 8 V / 5 0 4 A、4 D / 8 D / 2 2 T / 1 1 1 K / 5 0 4 A、4 D / 8 R / 11 D / 13 R / 2 2 T / 1 1 1 K / 5 0 4 A、4 D / 8 R / 11 D / 2 2 T / 1 1 1 K、4 D / 17 Q / 2 4 1 S / 5 1 9 T / 5 4 7 A、4 D / 3 2 4 V、4 D / 4 2 8 V、6 G、7 Q、8 D / 11 D / 13 R / 3 2 4 V、8 D / 11 D / 17 Q / 2 2 T / 3 2 4 V / 5 0 4 A / 5 1 9 T、8 D / 11 D / 1 1 1 K / 5 0 4 A、10 G、11 D / 17 Q / 2 2 T / 3 2 4 V、11 G / 13 R / 5 0 4 A、14 G、16 Q、16 T、39 S、57 I、228 M、228 M / 259 H、236 V、305 E / 307 N / 425 V、316 T、385 A、425 V、430 E、437 G、478 L、および 505 S から選択される少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号 2 1 1 4 を参照して番号付けされている。一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、I 2 G、I 2 T、A 4 D、A 4 D / Q 8 D / T 11 G / T 17 P / A 3 2 4 V / L 4 2 8 V / R 5 0 4 A、A 4 D / Q 8 D / V 2 2 T / Q 1 1 1 K / R 5 0 4 A、A 4 D

40

50

／Q 8 R／T 1 1 D／K 1 3 R／V 2 2 T／Q 1 1 1 K／R 5 0 4 A、A 4 D／Q 8 R／
T 1 1 D／V 2 2 T／Q 1 1 1 K、A 4 D／T 1 7 Q／A 2 4 1 S／A 5 1 9 T／T 5 4
7 A、A 4 D／A 3 2 4 V、A 4 D／L 4 2 8 V、Q 6 G、T 7 Q、Q 8 D／T 1 1 D／
K 1 3 R／A 3 2 4 V、Q 8 D／T 1 1 D／T 1 7 Q／V 2 2 T／A 3 2 4 V／R 5 0 4
A／A 5 1 9 T、Q 8 D／T 1 1 D／Q 1 1 1 K／R 5 0 4 A、F 1 0 G、T 1 1 D／T
1 7 Q／V 2 2 T／A 3 2 4 V、T 1 1 G／K 1 3 R／R 5 0 4 A、S 1 4 G、H 1 6 Q
、H 1 6 T、A 3 9 S、V 5 7 I、I 2 2 8 M、I 2 2 8 M／Q 2 5 9 H、A 2 3 6 V、
D 3 0 5 E／I 3 0 7 N／I 4 2 5 V、L 3 1 6 T、V 3 8 5 A、I 4 2 5 V、T 4 3 0
E、T 4 3 7 G、M 4 7 8 L、およびT 5 0 5 Sから選択される少なくとも1つの置換ま
たは置換セットを含み、位置は、配列番号2 1 1 4を参照して番号付けされている。

10

【0032】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、4／7／5 7／1 1 1、4／7／
1 1 1／1 1 4／4 3 7／5 4 7、4／1 6／3 8 5／4 7 8、4／5 7／1 1 1／4 3
7、7／3 8 5／5 4 7、1 0／1 6／4 3 7、1 6、1 6／4 1／5 7／1 1 1／3 8
5／5 4 7、1 6／4 1／5 7／4 3 7／4 7 8、1 6／4 1／4 3 7、1 6／5 7、1
6／2 4 1／4 3 7、1 6／3 8 5、1 6／3 8 5／4 3 7、1 6／3 8 5／4 7 8／5
4 7、1 6／4 3 7、2 0／3 8 5／4 3 7／4 7 8／5 4 7、5 7、5 7／1 1 1／1
1 4、5 7／1 1 1／4 7 8／5 4 7、5 7／4 3 7、1 1 1／1 1 4／2 0 2／2 3 4
／2 8 9／3 0 5／3 1 3／3 2 4／3 3 2／3 3 6／4 1 0／4 3 2／4 3 5／4 6 4
／5 0 4／5 1 2／5 1 9／5 2 3／5 4 8／5 4 9、1 1 1／2 4 1／4 3 7／4 7 8
、1 1 1／4 7 8、2 4 1、2 4 1／3 8 5、2 4 1／3 8 5／4 7 8、2 4 1／3 8 5
／4 7 8／5 4 7、2 4 1／4 3 7、3 8 5、3 8 5／4 3 7、3 8 5／4 3 7／4 7 8
／5 4 7、4 3 7、4 3 7／4 7 8、および4 7 8から選択される1つまたは複数のアミ
ノ酸位置に少なくとも1つの置換または置換セットを含み、位置は、配列番号2 1 5 6を
参照して番号付けされている。

20

【0033】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、4 D／7 Q／5 7 I／1 1 1 K、
4 D／7 Q／1 1 1 K／1 1 4 S／4 3 7 G／5 4 7 G、4 D／1 6 Q／3 8 5 A／4 7
8 L、4 D／5 7 I／1 1 1 K／4 3 7 G、7 Q／3 8 5 A／5 4 7 G、1 0 G／1 6 Q
／4 3 7 G、1 6 Q、1 6 Q／4 1 Q／5 7 I／1 1 1 K／3 8 5 A／5 4 7 G、1 6 Q
／4 1 Q／5 7 I／4 3 7 G／4 7 8 L、1 6 Q／4 1 Q／4 3 7 G、1 6 Q／5 7 I、
1 6 Q／2 4 1 S／4 3 7 G、1 6 Q／3 8 5 A、1 6 Q／3 8 5 A／4 3 7 G、1 6 Q
／3 8 5 A／4 7 8 L／5 4 7 G、1 6 Q／4 3 7 G、2 0 G／3 8 5 A／4 3 7 G／4
7 8 L／5 4 7 G、5 7 I、5 7 I／1 1 1 K／1 1 4 S、5 7 I／1 1 1 K／4 7 8 L
／5 4 7 G、5 7 I／4 3 7 G、1 1 1 K／1 1 4 S／2 0 2 L／2 3 4 H／2 8 9 Q／
3 0 5 Q／3 1 3 L／3 2 4 A／3 3 2 K／3 3 6 I／4 1 0 P／4 3 2 Y／4 3 5 S／
4 6 4 R／5 0 4 R／5 1 2 I／5 1 9 A／5 2 3 E／5 4 8 S／5 4 9 G、1 1 1 K／
2 4 1 S／4 3 7 G／4 7 8 L、1 1 1 K／4 7 8 L、2 4 1 S、2 4 1 S／3 8 5 A、
2 4 1 S／3 8 5 A／4 7 8 L、2 4 1 S／3 8 5 A／4 7 8 L／5 4 7 G、2 4 1 S／
4 3 7 G、3 8 5 A、3 8 5 A／4 3 7 G、3 8 5 A／4 3 7 G／4 7 8 L／5 4 7 G、
4 3 7 G、4 3 7 G／4 7 8 L、および4 7 8 Lから選択される少なくとも1つの置換ま
たは置換セットを含み、位置は、配列番号2 1 5 6を参照して番号付けされている。

30

40

【0034】

一部の実施形態では、チロシンアンモニアリアーゼは、A 4 D／T 7 Q／V 5 7 I／Q 1
1 1 K、A 4 D／T 7 Q／Q 1 1 1 K／P 1 1 4 S／T 4 3 7 G／T 5 4 7 G、A 4 D／
H 1 6 Q／V 3 8 5 A／M 4 7 8 L、A 4 D／V 5 7 I／Q 1 1 1 K／T 4 3 7 G、T 7
Q／V 3 8 5 A／T 5 4 7 G、F 1 0 G／H 1 6 Q／T 4 3 7 G、H 1 6 Q、H 1 6 Q／
Y 4 1 Q／V 5 7 I／Q 1 1 1 K／V 3 8 5 A／T 5 4 7 G、H 1 6 Q／Y 4 1 Q／V 5
7 I／T 4 3 7 G／M 4 7 8 L、H 1 6 Q／Y 4 1 Q／T 4 3 7 G、H 1 6 Q／V 5 7 I
、H 1 6 Q／A 2 4 1 S／T 4 3 7 G、H 1 6 Q／V 3 8 5 A、H 1 6 Q／V 3 8 5 A／

50

T 4 3 7 G、H 1 6 Q / V 3 8 5 A / M 4 7 8 L / T 5 4 7 G、H 1 6 Q / T 4 3 7 G、
D 2 0 G / V 3 8 5 A / T 4 3 7 G / M 4 7 8 L / T 5 4 7 G、V 5 7 I、V 5 7 I / Q
1 1 1 K / P 1 1 4 S、V 5 7 I / Q 1 1 1 K / M 4 7 8 L / T 5 4 7 G、V 5 7 I / T
4 3 7 G、Q 1 1 1 K / P 1 1 4 S / R 2 0 2 L / Y 2 3 4 H / L 2 8 9 Q / D 3 0 5 Q
/ M 3 1 3 L / V 3 2 4 A / N 3 3 2 K / V 3 3 6 I / M 4 1 0 P / L 4 3 2 Y / T 4 3
5 S / Q 4 6 4 R / A 5 0 4 R / V 5 1 2 I / T 5 1 9 A / D 5 2 3 E / K 5 4 8 S / D
5 4 9 G、Q 1 1 1 K / A 2 4 1 S / T 4 3 7 G / M 4 7 8 L、Q 1 1 1 K / M 4 7 8 L
、A 2 4 1 S、A 2 4 1 S / V 3 8 5 A、A 2 4 1 S / V 3 8 5 A / M 4 7 8 L、A 2 4
1 S / V 3 8 5 A / M 4 7 8 L / T 5 4 7 G、A 2 4 1 S / T 4 3 7 G、V 3 8 5 A、V
3 8 5 A / T 4 3 7 G、V 3 8 5 A / T 4 3 7 G / M 4 7 8 L / T 5 4 7 G、T 4 3 7 G
、T 4 3 7 G / M 4 7 8 L、および M 4 7 8 L から選択される少なくとも1つの置換また
は置換セットを含み、位置は、配列番号 2 1 5 6 を参照して番号付けされている。

10

【0035】

本発明は、表 1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1、9-
1、9-2、10-1、10-2、11-1、12-1、13-1、14-1、15-1
、16-1、および / または 17-1 に提供されるバリエーションも提供する。一部の実施形
態では、バリエーションは、配列番号 2 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、91
%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同
一性を含む。一部の実施形態では、組換えチロシンリアーゼバリエーションは、配列番号 2 に
対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、
96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を含む。一部の追加の実施形態では
、組換えチロシンリアーゼバリエーションは、配列番号 10 ~ 2290 の偶数番号の配列の少
なくとも 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を含む。一部の追加の実施形態では
、組換えチロシンアンモニアリアーゼバリエーションのポリペプチドは、配列番号 10 ~ 22
90 の偶数番号の配列のうちの 1 つを含む。一部のさらなる実施形態では、組換えチロシ
ンアンモニアリアーゼは、配列番号 2、14、86、334、388、604、736、
790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および / また
は 2156 のポリペプチド配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、9
2%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である配列
を含む。

20

30

【0036】

一部の追加の実施形態では、本明細書において提供される組換えチロシンアンモニアリア
ーゼは、熱安定性である。一部のさらなる実施形態では、組換えチロシンアンモニアリア
ーゼは、タンパク質分解に対して耐性である。さらに一部の追加の実施形態では、組換え
チロシンアンモニアリアーゼは、少なくとも 1 つの消化管プロテアーゼに対して耐性であ
る。一部の実施形態では、消化管プロテアーゼは、キモトリプシン、トリプシン、カルボ
キシペプチダーゼ、およびエラスターゼから選択される。一部のさらなる実施形態では、
組換えチロシンアンモニアリアーゼは、酸安定性である。一部の追加の実施形態では、組
換えチロシンアンモニアリアーゼは、酸安定性かつタンパク質分解に対して耐性である。
さらに一部の追加の実施形態では、組換えチロシンアンモニアリアーゼは、精製されてい
る。一部のさらなる実施形態では、組換えチロシンアンモニアリアーゼは、参照配列と比
較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対して低下した感受性、iii)
酸性 pH に対して増加した耐容性、iv) 低減した凝集、v) チロシンに関する低下
した Km、vi) 低減した免疫原性、または i)、ii)、iii)、iv)、v)、お
よび / もしくは vi) のいずれかの組合せから選択される少なくとも 1 つの改善された特
性を示す。一部の実施形態では、参照配列は、配列番号 2、14、86、334、388
、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、21
14、および / または 2156 から選択される。

40

【0037】

本発明は、本明細書において提供される少なくとも 1 つの組換えチロシンアンモニアリア

50

ーゼを含む組成物も提供する。一部の実施形態では、組成物は、本明細書において提供される1つの組換えチロシンアンモニアリアーゼを含む。

【0038】

本発明は、本明細書において提供される少なくとも1つの組換えチロシンアンモニアリアーゼをコードする組換えポリヌクレオチド配列も提供する。一部の実施形態では、組換えポリヌクレオチド配列は、1つの組換えチロシンアンモニアリアーゼをコードする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、コドン最適化されている。一部の追加の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号9～2289の奇数番号の配列の少なくとも1つに対して少なくとも90%の配列同一性を含む。さらに一部のさらなる実施形態では、組換えポリヌクレオチド配列は、配列番号9～2289の奇数番号の配列を含む。

10

【0039】

本発明は、本明細書において提供される組換えチロシンアンモニアリアーゼをコードする少なくとも1つの組換えポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターも提供する。一部の実施形態では、発現ベクターは、本明細書において提供される組換えチロシンアンモニアリアーゼをコードする組換えポリヌクレオチド配列を含む。発現ベクターの一部の実施形態では、組換えポリヌクレオチド配列は、制御配列に作動可能に連結されている。発現ベクターの一部の追加の実施形態では、制御配列は、プロモーターを含む。発現ベクターの一部の追加の実施形態では、制御配列は、プロモーターである。発現ベクターの一部の実施形態では、プロモーターは、異種プロモーターである。

【0040】

本発明は、本明細書において提供される少なくとも1つの発現ベクターを含む宿主細胞も提供する。一部の実施形態では、宿主細胞は、本明細書において提供される1つの発現ベクターを含むが、一部の代替の実施形態では、宿主細胞は、本明細書において提供される2つまたはそれより多い発現ベクターを含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、原核生物のものであるが、一部の代替の実施形態では、宿主細胞は、真核生物のものである。

20

【0041】

本発明は、組換えチロシンアンモニアリアーゼを産生する方法であって、組換えポリヌクレオチドにコードされたチロシンアンモニアリアーゼが産生される条件下で、本明細書において提供される少なくとも1種の宿主細胞を培養するステップを含む、方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、組換えチロシンアンモニアリアーゼを回収するステップをさらに含む。一部の追加の実施形態では、方法は、組換えチロシンアンモニアリアーゼを精製するステップをさらに含む。

30

【0042】

本発明は、本明細書において提供される少なくとも1つの組換えチロシンアンモニアリアーゼを含む、チロシン血症の処置のための医薬組成物も提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体および／または賦形剤をさらに含む。一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、ヒトへの経口投与に好適である。一部の実施形態では、医薬組成物は、丸剤、錠剤、カプセル剤、ゲルキャップ剤（gel cap）、液剤、または乳剤の形態である。さらに一部のさらなる実施形態では、医薬組成物は、ニチシノンと共投与される。一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、ニチシノンを含む。一部の実施形態では、丸剤、錠剤、カプセル剤、またはゲルキャップ剤は、腸溶コーティングをさらに含む。一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、ヒトへの非経口注射に好適である。さらに一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼと共投与される。一部のさらなる実施形態では、医薬組成物は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、腸溶コーティングをさらに含む丸剤、錠剤、カプセル剤、またはゲルキャップ剤を含む。さらに一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、ニチシノンおよびフェニルアラニンアンモニアリアーゼの両方と共投与される。一部のさらなる実施形態では、医薬組成物は、ニチシノンとフェニルアラニンアンモニアリアーゼの両方を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、腸溶コーティングをさらに含む丸剤、錠剤、カプセル剤、またはゲルキャップ剤を含む。

40

50

【0043】

本発明は、対象においてチロシン血症またはアルカプトン尿症の症状を処置および／または防止するための方法であって、チロシン血症またはアルカプトン尿症を有する対象を準備するステップと、本明細書において提供される少なくとも1つの医薬組成物を対象に提供するステップとを含む、方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、本明細書において提供される1つより多い組成物または医薬組成物を対象に投与するステップを含む。一部の代替の実施形態では、ただ一つの組成物または医薬組成物が対象に投与される。一部の実施形態では、チロシン血症またはアルカプトン尿症の症状が改善される。さらに一部のさらなる実施形態では、対象は、チロシン血症またはアルカプトン尿症の症状を示す対象によって必要とされる食事よりも、フェニルアラニン、メチオニン、および／またはチロシン含有量の制限が少ない食事を摂食することができる。一部の実施形態では、対象は、乳児または小児であるが、一部の代替の実施形態では、対象は、成人または若年成人である。

10

【0044】

本発明は、L-チロシンおよび／またはL-チロシン誘導体の産生のための方法であって、本明細書において提供される少なくとも1つの組換えチロシンアンモニアリアーゼ（複数可）および好適な基質を準備するステップと、L-チロシンおよび／または少なくとも1つのL-チロシン誘導体が産生される条件下で、組換えチロシンアンモニアリアーゼ（複数可）と基質を組み合わせるステップとを含む、方法も提供する。一部の実施形態では、ただ一つの組換えチロシンアンモニアリアーゼがこの方法において利用されるが、一部の代替の実施形態では、少なくとも2つの組換えチロシンアンモニアリアーゼが利用される。

20

【0045】

本発明は、クマル酸の産生のための方法であって、少なくとも1つの組換えチロシンアンモニアリアーゼ（複数可）および好適な基質を準備するステップと、クマル酸が産生される条件下で、組換えチロシンアンモニアリアーゼと基質を組み合わせるステップとを含む、方法も提供する。一部の実施形態では、ただ一つの組換えチロシンアンモニアリアーゼがこの方法において利用されるが、一部の代替の実施形態では、少なくとも2つの組換えチロシンアンモニアリアーゼが利用される。

【0046】

本発明は、本明細書において提供される組成物および医薬組成物の使用も提供する。

30

【発明を実施するための形態】

【0047】

本発明は、操作されたチロシンアンモニアリアーゼ（TAL）ポリペプチドおよびその組成物を提供する。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、タンパク質分解に対する感受性を低下させる一方で、増強された触媒活性および増強された酸安定性をもたらすように最適化されている。本発明は、治療および産業目的での、操作されたTALポリペプチドを含む組成物の利用のための方法も提供する。

略語および定義：

【0048】

別段に定義されていない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、一般に、この発明に関する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。一般に、本明細書において使用される命名法ならびに以下に記載される細胞培養、分子遺伝学、微生物学、有機化学、分析化学および核酸化学の実験手順は、当技術分野で周知であり、一般的に用いられる。このような技法は周知であり、当業者に周知の多数の教科書および参考資料に記載されている。標準的技法、またはその修正は、化学合成および化学分析のために使用される。本明細書において言及されるすべての特許、特許出願、論文および刊行物は、上記のものも下記のものも両方、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

40

【0049】

50

本明細書に記載のものに類似するかまたは均等な任意の好適な方法および材料について本発明の実践における用途が見出されるが、一部の方法および材料は本明細書に記載される。記載された特定の方法論、プロトコール、および試薬は、これらが当業者によって使用される状況に応じて変わる場合があるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。したがって、すぐ下に定義される用語は、本出願を全体として参照してより十分に記載される。本明細書において言及されるすべての特許、特許出願、論文および刊行物は、上記のものも下記のものも両方、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0050】

また、本明細書で使用される場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈がそうでないことを明白に示していない限り、複数の指示対象を含む。

10

【0051】

数値範囲は、範囲を規定する数値を含む。よって、本明細書に開示されるすべての数値範囲は、このようなより広い数値範囲内にあるすべてのより狭い数値範囲を、このようなより狭い数値範囲がすべて本明細書に明示的に書かれているかのように包含することを意図する。本明細書に開示されるすべての最大の（または最小の）数値限定は、すべてのより低い（またはより高い）数値限定を、このようなより低い（またはより高い）数値限定が本明細書において明示的に書かれているかのように含むことも意図される。

【0052】

用語「約」は、特定の値についての許容誤差を意味する。一部の事例では、「約」は、所与の値範囲の0.05%、0.5%、1.0%、または2.0%以内を意味する。一部の事例では、「約」は、所与の値の1、2、3、または4標準偏差以内を意味する。一部の事例では、「約」は、所与の値の2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、または10%以内である値を包含する。

20

【0053】

さらに、本明細書において提供される見出しは、本出願を全体として参照して有することができる本発明の様々な態様または実施形態についての限定ではない。したがって、すぐ下に定義される用語は、本出願を全体として参照してより十分に定義される。それでもなお、本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語を以下に定義する。

30

【0054】

別段の指示がない限り、それぞれ、核酸は、5'から3'方向で左から右に書かれ、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ方向で左から右に書かれる。

【0055】

本明細書で使用される場合、用語「含む(comprising)」およびその同語源語は、それらの包括的な意味で使用される（すなわち、用語「含む(including)」およびその対応する同語源語と同等である）。

【0056】

「EC」番号は、国際生化学・分子生物学連合(International Union of Biochemistry and Molecular Biology)の命名法委員会(Nomenclature Committee)(NC-IUBMB)の酵素命名法を指す。IUBMB生化学的分類は、酵素についての、それらが触媒する化学反応に基づく数値分類システムである。

40

【0057】

「ATCC」は、アメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)を指し、そのバイオレポジトリコレクションは、遺伝子および株を含む。

【0058】

「NCBI」は、国立生物学情報センター(National Center for

50

Biological Information) およびその中で提供される配列データベースを指す。

【0059】

本明細書で使用される場合、用語「チロシンアンモニアリアーゼ (tyrosine ammonia-lyase)」「チロシンアンモニアリアーゼ (tyrosine ammonia-lyase)」、「チロシンアンモニアリアーゼポリペプチド」および「TAL」は、ヒスチジンアンモニアリアーゼ、およびフェニルアラニンアンモニアリアーゼも含む芳香族アミノ酸リアーゼファミリー (EC 4.3.1.23、EC 4.3.1.24 および EC 4.3.1.25) 内の酵素のクラスを指す。

【0060】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」は、長さまたは翻訳後修飾 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) にかかわらず、アミド結合によって共有結合されている少なくとも2つのアミノ酸のポリマーを表すために、本明細書において互換的に使用される。

【0061】

「アミノ酸」は、本明細書において、それらの一般的に公知の三文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会により推奨される一文字記号のいずれかによって言及される。ヌクレオチドは、同様に、それらの一般的に許容される一文字コードによって言及され得る。「アミノ酸」は、本明細書において、それらの一般的に公知の三文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会により推奨される一文字記号のいずれかによって言及される。ヌクレオチドは、同様に、それらの一般的に許容される一文字コードによって言及され得る。遺伝的にコードされたアミノ酸について使用される略語は慣例的なものであり、以下の通りである：アラニン (Ala または A)、アルギニン (Arg または R)、アスパラギン (Asn または N)、アスパラギン酸 (Asp または D)、システイン (Cys または C)、グルタミン酸 (Glu または E)、グルタミン (Gln または Q)、ヒスチジン (His または H)、イソロイシン (Ile または I)、ロイシン (Leu または L)、リシン (Lys または K)、メチオニン (Met または M)、フェニルアラニン (Phe または F)、プロリン (Pro または P)、セリン (Ser または S)、トレオニン (Thr または T)、トリプトファン (Trp または W)、チロシン (Tyr または Y)、およびバリン (Val または V)。三文字の略語が使用される場合、「L」もしくは「D」が具体的に前に付いていないかまたは略語が使用される文脈から明らかでない限り、アミノ酸は、 α -炭素 (C_{α}) についてL-配置であってもD-配置であってもよい。例えば、「Ala」は α 炭素についての配置を指定することなくアラニンを示すが、「D-Ala」および「L-Ala」は、それぞれD-アラニンおよびL-アラニンを示す。一文字の略語が使用される場合、大文字は α -炭素についてL-配置のアミノ酸を示し、小文字は α -炭素についてD-配置のアミノ酸を示す。例えば、「A」はL-アラニンを示し、「a」はD-アラニンを示す。ポリペプチド配列が、一文字または三文字の略語 (またはこれらの混合) の文字列として示される場合、この配列は、一般的な慣例に従って、アミノ (N) からカルボキシ (C) の方向で示される。

【0062】

遺伝的にコードされたヌクレオシドについて使用される略語は慣例的なものであり、以下の通りである：アデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、チミジン (T)、およびウリジン (U)。特に明記されない限り、略されたヌクレオシドは、リボヌクレオシドまたは2'-デオキシリボヌクレオシドのいずれかであり得る。ヌクレオシドは、個々にまたは一括に、リボヌクレオシドまたは2'-デオキシリボヌクレオシドのいずれかであると特定することができる。核酸配列が一文字の略語の文字列として示される場合、一般的な慣例に従って、配列は5'から3'の方向に示され、リン酸は示されない。

【0063】

用語「操作された」、「組換え」、「天然に存在しない」、および「バリエーション」は、細胞、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに関連して使用される場合、別段自然界には存

10

20

30

40

50

在しないか、またはそれと同一であるが、合成材料からおよび／もしくは組換え技法を使用する操作によって産生もしくは得られる方法で改変された、材料またはその材料の自然もしくは天然形態に対応する材料を指す。

【0064】

本明細書で使用される場合、「野生型」および「天然に存在する」は、自然界で見られる形態を指す。例えば、野生型ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然界の供給源から単離することができ、ヒトの操作によって意図的に改変されていない生物に存在する配列である。

【0065】

「脱免疫化」は、本明細書で使用される場合、野生型タンパク質または参照タンパク質ほど免疫原性ではないバリエーションを作出するタンパク質の操作を指す。一部の実施形態では、バリエーションタンパク質が、バリエーションタンパク質が投与される患者における免疫応答を刺激しないという点において、脱免疫化は完全である。この応答は、タンパク質投与の際の、抗薬物抗体の存在もしくは存在量、中和抗体の存在もしくは存在量、アナフィラキシー応答の存在、またはサイトカイン放出の普及もしくは強度を含むがこれらに限定されない、様々な方法によって測定することができる。一部の実施形態では、バリエーションタンパク質は、野生型タンパク質または参照タンパク質よりも免疫原性が低い。一部の実施形態では、脱免疫化は、T細胞受容体によって認識されるタンパク質（例えば、エピトープ）の改変に関与する。一部の実施形態では、脱免疫化されたバリエーションタンパク質を産生するために、T細胞エピトープが、野生型タンパク質または参照タンパク質から除去される。一部の実施形態では、脱免疫化されたタンパク質は、樹状細胞T細胞活性化アッセイ、またはヒト白血球抗原（HLA）ペプチド結合アッセイを含む、ヒト免疫学的応答の生化学的および細胞生物学的予測因子においてより低いレベルの応答を示す。

【0066】

「コード配列」は、タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸の部分（例えば、遺伝子）を指す。

【0067】

用語「パーセント（％）配列同一性」は、本明細書において、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド間の比較を指すために使用され、比較ウィンドウにわたり2つの最適に整列させた配列を比較することにより決定され、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適アライメントのための参照配列と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、両方の配列に同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を決定し、マッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割り、この結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算することができる。あるいは、パーセンテージは、両方の配列に同一の核酸塩基もしくはアミノ酸残基が存在するか、または核酸塩基もしくはアミノ酸残基がギャップと共に整列される位置の数を決定し、マッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割り、この結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算することができる。当業者であれば、2つの配列の整列に利用できる多くの確立されたアルゴリズムが存在することを認識する。比較のための配列の最適アライメントは、例えば、本技術分野において公知のように、SmithおよびWatermanの局所的相同性アルゴリズム（Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 [1981]）、NeedlemanおよびWunschの相同性アライメントアルゴリズム（Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 [1970]）、PearsonおよびLipmanの類似性探索方法（Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]）、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装（例えば、GCG Wisconsin Software PackageにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFA

S T A)、または目視検査によって行うことができる。パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに好適なアルゴリズムの例としては、以下に限定されないが、A l t s c h u l rにより記載されるB L A S TおよびB L A S T 2.0アルゴリズム(それぞれ、A l t s c h u l e t a l., J. M o l. B i o l., 215: 403-410 [1990]、およびA l t s c h u l e t a l., 1977, N u c l e i c A c i d s R e s., 3389-3402 [1977]を参照されたい)が挙げられる。B L A S T分析を実行するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター(N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n)のウェブサイトから公共に利用可能である。このアルゴリズムは、先ず、データベース配列において同じ長さのワードと整列させたときに、ある正の値の閾値スコアTにマッチするかまたはそれを満たす、クエリ配列における長さWの短いワードを同定することによって、高スコアリング配列ペア(H S P)を同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値と称される(A l t s c h u l e t a l., 上掲を参照されたい)。これらの初期隣接ワードヒットは、これらを含むより長いH S Pを発見するための探索を開始するためのシードとして作用する。次いで、ワードヒットは、累積的アライメントスコアが増加できるところまで、各配列に沿って両方向に伸長される。累積的スコアは、ヌクレオチド配列に関して、パラメーターM(マッチする残基対のためのリワードスコア; 常に> 0)およびN(ミスマッチ残基のためのペナルティスコア; 常に< 0)を使用して計算される。アミノ酸配列に関して、スコアリングマトリックスを使用して累積的スコアを計算する。累積的アライメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ減少する、1つもしくは複数の負のスコアリング残基アライメントの蓄積により、累積的スコアがゼロもしくはそれを下回る、またはいずれかの配列の末端に達した場合に、各方向におけるワードヒットの伸長は停止する。B L A S TアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アライメントの感度およびスピードを決定する。B L A S T Nプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルトとして、ワード長(W) 11、期待値(E) 10、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列について、B L A S T Pプログラムは、デフォルトとして、ワード長(W) 3、期待値(E) 10、およびB L O S U M 62スコアリングマトリックス(H e n i k o f f a n d H e n i k o f f, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 89: 10915 [1989]を参照されたい)を使用する。配列アライメントおよび%配列同一性の例示的な決定は、提供されるデフォルトパラメーターを使用して、G C G W i s c o n s i n S o f t w a r eパッケージ(A c c e l r y s, M a d i s o n W I)におけるB E S T F I TまたはG A Pプログラムを用いることができる。

10

20

30

40

50

【0068】

「参照配列」は、配列比較のための基準として使用される定義された配列を指す。参照配列は、より大きな配列のサブセット、例えば、全長遺伝子またはポリペプチド配列のセグメントであってもよい。一般に、参照配列は、少なくとも20ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基長、少なくとも25残基長、少なくとも50残基長、少なくとも100残基長であるか、または核酸もしくはポリペプチドの全長である。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドはそれぞれ、(1) 2つの配列間で類似の配列(すなわち、完全配列の一部)を含み、(2) 2つの配列間で多岐にわたる配列をさらに含むことができるため、2つ(またはそれより多い)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列比較は、典型的には、「比較ウィンドウ」にわたり2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列を比較して、配列類似性の局所的領域を同定および比較することによって実施される。一部の実施形態では、「参照配列」は、参照配列が一次配列に1つまたは複数の変化を有し得る配列である一次アミノ酸配列に基づいてもよい。

【0069】

「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20個の連続ヌクレオチドの位置またはアミノ酸残基の概念的セグメントを指し、配列は、少なくとも20個の連続ヌクレオチドまたはアミノ酸の参照配列と比較することができ、比較ウィンドウにおける配列の一部は、2つの配

列の最適アライメントのための参照配列（付加も欠失も含まない）と比較して、20パーセントまたはそれに満たない付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。比較ウィンドウは、20個の連続残基よりも長くなる場合があり、必要に応じて30、40、50、100、またはそれよりも長いウィンドウを含む。

【0070】

「に相当する」、「を参照して」または「と比較して」は、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列の番号付けの文脈において使用される場合に、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列が参照配列と比較される場合の指定の参照配列の残基の番号付けを指す。換言すると、所与のポリマーの残基番号または残基位置は、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列内の残基の実際の数値位置ではなく、参照配列を参照して指定される。例えば、操作されたTALの配列などの所与のアミノ酸配列は、ギャップを導入して、2つの配列間の残基マッチを最適化することによって、参照配列に対して整列することができる。これらの場合には、ギャップは存在するが、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列における残基の番号付けは、それに対して整列させた参照配列に対してなされる。

10

【0071】

「アミノ酸の差異」または「残基の差異」は、参照配列の相当する位置におけるアミノ酸残基と比較した、ポリペプチド配列の位置におけるアミノ酸残基の差異を指す。アミノ酸の差異の位置は、一般に、本明細書において、「X_n」（式中、nは、残基の差異が基準とする参照配列における相当する位置を指す）と称される。例えば、「配列番号2と比較した位置X₉₃における残基の差異」は、配列番号2の位置93に相当するポリペプチド位置におけるアミノ酸残基の差異を指す。よって、配列番号2の参照ポリペプチドが位置93にロイシンを有する場合、次いで、「配列番号2と比較した位置X₉₃における残基の差異」は、配列番号2の位置93に相当するポリペプチドの位置にロイシン以外のいずれかの残基のアミノ酸置換を有する。本明細書における大部分の事例では、ある位置における特定のアミノ酸残基の差異は、「X_nY」（式中、「X_n」は、上記のように、相当する位置を指定し、「Y」は、操作されたポリペプチドに見られるアミノ酸の一字識別子（すなわち、参照ポリペプチドのものとは異なる残基）である）と示される。一部の事例では、本開示は、従来の表示法「A_nB」（式中、Aは、参照配列における残基の一字識別子であり、「n」は、参照配列における残基位置の番号であり、Bは、操作されたポリペプチドの配列における残基置換の一字識別子である）によって表示される、特定のAミノ酸の差異も提供する。一部の事例では、本開示のポリペプチドは、参照配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸残基の差異を含むことができ、これは、参照配列と比較して残基の差異が存在する特定の位置のリストによって示される。一部の実施形態では、ポリペプチドの特定の残基位置において2つ以上のアミノ酸が使用され得る場合、使用され得る様々なアミノ酸残基は、「/」によって隔てられる（例えば、X₃₀₇H/X₃₀₇PまたはX₃₀₇H/X₃₀₇P）。本出願は、保存的アミノ酸置換と非保存的アミノ酸置換のいずれか/または両方を含む、1つまたは複数のアミノ酸の差異を含む操作されたポリペプチド配列を含む。

20

30

【0072】

「保存的アミノ酸置換」は、同様の側鎖を有する異なる残基による残基の置換を指し、よって、典型的には、同一または同様の定義されたアミノ酸クラス内のアミノ酸による、ポリペプチドにおけるアミノ酸の置換を含む。例として限定することなく、脂肪族側鎖を有するアミノ酸は、別の脂肪族アミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン）で置換することができ；ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸は、ヒドロキシル側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、セリンおよびトレオニン）で置換され；芳香族側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびヒスチジン）で置換され；塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性（basic）側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、リシンおよびアルギニン）で置換され；酸性側鎖を有するアミノ酸は、酸性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）で置換され；および/または疎水性もしくはは親水

40

50

性アミノ酸は、それぞれ別の疎水性もしくは親水性アミノ酸で置き換えられる。

【0073】

「非保存的置換」は、有意に異なる側鎖特性を有するアミノ酸による、ポリペプチドにおけるアミノ酸の置換を指す。非保存的置換は、定義された群内ではなく群間のアミノ酸を使用することができ、(a) 置換（例えば、グリシンに対してプロリン）の区域におけるペプチド骨格の構造、(b) 電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖の嵩に影響を与える。例として限定することなく、例示的な非保存的置換は、塩基性アミノ酸または脂肪族アミノ酸で置換された酸性アミノ酸；小型のアミノ酸で置換された芳香族アミノ酸；および疎水性アミノ酸で置換された親水性アミノ酸であってもよい。

【0074】

「欠失」は、参照ポリペプチドからの1つまたは複数のアミノ酸の除去による、ポリペプチドに対する改変を指す。欠失は、酵素活性を保持するおよび／または操作されたトランスアミナーゼ酵素の改善された特性を保持する一方で、1つもしくは複数のアミノ酸、2つもしくはそれより多いアミノ酸、5つもしくはそれより多いアミノ酸、10個もしくはそれより多いアミノ酸、15個もしくはそれより多いアミノ酸、または20個もしくはそれより多いアミノ酸、参照酵素を構成するアミノ酸総数の最大10%、または該アミノ酸総数の最大20%の除去を含み得る。欠失は、ポリペプチドの内部部分および／または末端部分を対象とし得る。様々な実施形態では、欠失は、連続セグメントを含んでもよく、または非連続であってもよい。

【0075】

「挿入」は、参照ポリペプチドからの1つまたは複数のアミノ酸の付加による、ポリペプチドに対する改変を指す。挿入は、ポリペプチドの内部部分におけるものであっても、またはカルボキシもしくはアミノ末端に対するものであってもよい。挿入は、本明細書で 사용되는場合、当技術分野で公知の融合タンパク質を含む。挿入は、アミノ酸の連続セグメントであっても、または天然に存在するポリペプチドにおけるアミノ酸のうちの1つまたは複数によって隔てられていてもよい。

【0076】

本明細書において互換的に使用される「機能的断片」または「生物学的に活性な断片」は、アミノ末端および／もしくはカルボキシ末端の欠失（複数可）ならびに／または内部欠失を有するが、残存するアミノ酸配列が、これと比較されている配列（例えば、本発明の全長の操作されたTAL）における相当する位置と同一であり、全長ポリペプチドの活性を実質的にすべて保持する、ポリペプチドを指す。

【0077】

「単離されたポリペプチド」は、天然においてこれに付随する他の夾雑物（例えば、タンパク質、脂質、およびポリヌクレオチド）から実質的に分離されたポリペプチドを指す。この用語は、その天然に存在する環境または発現系（例えば、宿主細胞または*in vitro*合成）から除去または精製されたポリペプチドを包含する。組換えTALポリペプチドは、細胞内に存在するか、細胞培地に存在するか、またはライセートもしくは単離された調製物などの様々な形態で調製することができる。このようなものとして、一部の実施形態では、組換えTALポリペプチドは、単離されたポリペプチドであってもよい。

【0078】

「実質的に純粋なポリペプチド」は、ポリペプチド種が、存在する優勢種である（すなわち、モルまたは重量基準で、組成物中の他のいかなる個々の高分子種よりも豊富に存在する）組成物を指し、対象種が、モルまたは%重量で存在する高分子種の少なくとも約50パーセントを構成する場合、一般に、実質的に精製された組成物である。一般に、実質的に純粋なTAL組成物は、モルまたは%重量で組成物中に存在する全高分子種の約60%またはそれより多く、約70%またはそれより多く、約80%またはそれより多く、約90%またはそれより多く、約95%またはそれより多く、および約98%またはそれより多くを含む。一部の実施形態では、対象種は、本質的に均一となるまで（すなわち、従来の検出方法によって組成物中に夾雑物種を検出できなくなるまで）精製され、組成物は、

10

20

30

40

50

単一の高分子種から本質的になる。溶媒種、小分子（500ダルトン未満）、および元素イオン種は、高分子種とみなされない。一部の実施形態では、単離された組換えTALポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

【0079】

「改善された酵素特性」は、参照TALポリペプチドおよび／または野生型PALポリペプチド（例えば、配列番号2の野生型配列）または別の操作されたTALポリペプチドと比較して、いずれかの酵素特性における改善を示す操作されたTALポリペプチドを指す。改善された特性としては、以下に限定されないが、増加したタンパク質発現、増加した熱活性、増加した熱安定性、増加したpH活性、増加した安定性、増加した酵素活性、増加した基質特異性または親和性、増加した比活性、基質または最終産物阻害に対して増加した耐性、増加した化学的安定性、改善された化学選択性、改善された溶媒安定性、酸性pHに対して増加した耐容性、タンパク質分解活性に対して増加した耐容性（すなわち、タンパク質分解に対して低下した感受性）、低減した凝集、増加した溶解度、低減した免疫原性、および変更された温度プロファイルなどの特性が挙げられる。

10

【0080】

「増加した酵素活性」または「増強された触媒活性」は、操作されたTALポリペプチドの改善された特性を指し、これは、参照TAL酵素と比較した、比活性（例えば、産生される産物／時間／重量タンパク質）の増加または基質から産物へのパーセント変換の増加（例えば、指定された量のTALを使用する指定された期間における基質の出発量から産物へのパーセント変換）によって表すことができる。酵素活性を決定するための例示的な方法は、実施例に提示される。その変化が酵素活性の増加をもたらし得る、 K_m 、 V_{max} または k_{cat} の古典的酵素特性を含む、酵素活性に関するいずれかの特性が影響されてもよい。酵素活性における改善は、相当する野生型酵素の酵素活性の約1.1倍から、TALポリペプチドが由来する天然に存在するTALまたは別の操作されたTALの2倍、5倍、10倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍またはそれを上回る程の酵素活性であってもよい。

20

【0081】

一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、少なくとも0.1／秒、少なくとも0.2／秒、少なくとも0.3／秒、少なくとも0.5／秒、少なくとも1.0／秒、一部の好ましい実施形態では、1.0／秒を上回る k_{cat} を有する。一部の実施形態では、 K_m は、約1 μ Mから約5mMの範囲内、約5 μ Mから約2mMの範囲内、約10 μ Mから約2mMの範囲内、または約10 μ Mから約1mMの範囲内にある。一部の特定の実施形態では、操作されたTAL酵素は、参照TAL酵素（例えば、野生型TALまたは任意の他の参照TAL）のものの1.5から10倍、1.5から25倍、1.5から50倍、1.5から100倍またはそれを上回る範囲内の改善された酵素活性を示す。TAL活性は、当技術分野で公知の任意の好適な方法によって測定することができる（例えば、反応物または産物の分光光度的特性の変化のモニタリングなどの標準的アッセイ）。一部の実施形態では、産生された産物の量は、直接的にまたはオーフタルジアルデヒド（OPA）誘導体化後に、UV吸光度または蛍光検出と組み合わせた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分離により測定することができる。一部の実施形態では、クマル酸産物を追跡することなどの他の方法が使用される（例えば、その産物を追跡するために290nmまたは310nmのUV吸光度を使用する）。一部の他の実施形態では、アンモニアの産生は、市販のキット（例えば、Megazyme急速アンモニアアッセイキット [Megazyme International, Wicklow, Ireland]）を使用してアッセイされる。酵素活性の比較は、本明細書において詳細にさらに記載されているように、定義された酵素調製物、設定条件下での定義されたアッセイ、および1種または複数種の定義された基質を使用してなされる。一般に、ライセートが比較される場合、宿主細胞によって産生され、ライセート中に存在する酵素の量の変動を最小限にするために、同一発現系および同一宿主細胞を使用すると共に、細胞数およびアッセイされるタンパク質の量が決定される。

30

40

50

【0082】

用語「熱的に安定な」および「熱安定性の」は、例えば、変更された温度に曝露された場合に、酵素の使用中に一般的な条件下で、所与の期間にわたり特定された温度に曝露した後の指定された量の酵素活性、一次、二次、三次および四次構造を保持する本発明の酵素を指す。「変更された温度」は、上昇または低下した温度を含む。一部の実施形態では、酵素は、所与の期間、例えば少なくとも約60分、約120分、約180分、約240分、約300分などにわたり、変更された温度に曝露された後に、少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約92%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の酵素活性を保持する。

【0083】

用語「酸性pHに対する改善された耐容性」は、本発明による組換えTALが、参照TALまたは別の酵素と比較して、増加した安定性を有する（特定された期間（1時間、最大24時間）酸性pHに曝露した後、約pH7.0においてより高い活性を保持する）ことを意味する。

【0084】

「生理的pH」は、本明細書で使用される場合、対象（例えば、ヒト）の小腸に一般に見られるpH範囲を意味する。通常、幽門括約筋から大腸へと、約5.0～7.5のpH勾配が存在する。

【0085】

用語「酸性pH」（例えば、酸性pH条件に対する改善された安定性または酸性pHに対して増加した耐容性に関連して使用される）は、約1.5から6.8のpH範囲を意味する。

【0086】

本明細書において互換的に使用される用語「タンパク質分解活性」および「タンパク質分解」は、タンパク質のより小さいポリペプチドまたはアミノ酸への分解を指す。タンパク質の分解は、一般に、プロテアーゼ（プロテイナーゼ）酵素によるペプチド結合の加水分解の結果である。プロテアーゼ酵素としては、以下に限定されないが、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、カルボキシペプチダーゼAおよびB、ペプチダーゼ（例えば、アミノペプチダーゼ、ジペプチダーゼおよびエンテロペプチダーゼ）が挙げられる。

【0087】

本明細書において互換的に使用される語句「タンパク質分解に対する感受性を低下させる」および「タンパク質分解の感受性を低下させる」は、本発明による操作されたTALポリペプチドが、1つまたは複数のプロテアーゼで処理した後に、標準的アッセイにおいて参照TALおよび／または別の酵素と比較してより高い酵素活性を有することを意味する。例示的アッセイは、実施例に提示される。

【0088】

「凝集」は、TALポリペプチドの集塊または沈殿を意味する。凝集は、酵素の不活性化、および／または免疫原性の増加をもたらす場合がある。用語「低減した凝集」は、操作されたTALポリペプチドが、凝集しにくいまたは参照TALおよび／もしくは別の酵素よりも凝集する傾向が低くなることを意味する。凝集を決定するための方法は、適切な色素（例えば、チオフラビンTまたはナイルレッド）による蛍光顕微鏡法、動的光散乱、適切な色素（例えば、ボディパイ）によるフローサイトメトリー、濾過およびSDS-PAGEまたはウエスタンブロッティングによる分析、蛍光相関分光法、ならびに電子顕微鏡法を含むがこれらに限定されない、任意の数のアッセイを使用することによって、当業者によって決定され得る。凝集を評価するための市販のキットが存在する（例えば、PROTEOSTAT（登録商標）タンパク質凝集アッセイキット[Enzo]）。

【0089】

「変換」は、基質（複数可）の、相当する産物（複数可）への酵素変換（または生体内変換）を指す。「パーセント変換」は、特定の条件下で、ある期間内に産物へと変換される

10

20

30

40

50

基質のパーセントを指す。よって、T A Lポリペプチドの「酵素活性」または「活性」は、特定の期間における基質の産物への「パーセント変換」として表すことができる。

【0090】

「ハイブリダイゼーションストリンジェンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションにおける洗浄条件などのハイブリダイゼーション条件に関する。一般に、ハイブリダイゼーション反応は、より低いストリンジェンシーの条件下で実施され、続いて変動するがより高いストリンジェンシーの洗浄がなされる。用語「中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、標的DNAに対して約60%の同一性、好ましくは約75%の同一性、約85%の同一性を有し、標的ポリヌクレオチドに対して約90%を上回る同一性を有する相補的核酸に、標的DNAが結合することを可能にする条件を指す。例示的な中程度にストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.2%のSDSにおける42℃のハイブリダイゼーションと、その後の0.2×SSPE、0.2%のSDSにおける42℃の洗浄に等価な条件である。「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」は、一般に、定義されたポリヌクレオチド配列のための溶液条件下で決定される熱融解温度 T_m から約10℃またはそれより低い条件を指す。一部の実施形態では、高ストリンジェンシー条件は、0.018MのNaClにおいて65℃で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す（すなわち、本明細書で企図される場合、0.018MのNaClにおいて65℃でハイブリッドが安定的でない場合、ハイブリッドは高ストリンジェンシー条件下で安定的ではない）。高ストリンジェンシー条件は、例えば、50%のホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.2%のSDS、42℃に等価な条件におけるハイブリダイゼーションと、その後の0.1×SSPE、および0.1%のSDS中65℃での洗浄によって提供することができる。別の高ストリンジェンシー条件は、0.1%（w：v）のSDSを含有する5×SSCにおける65℃でのハイブリダイズに等価な条件におけるハイブリダイズおよび0.1%のSDSを含有する0.1×SSCにおける65℃での洗浄である。他の高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、中程度にストリンジェントな条件と共に、上に引用された参考文献に記載されている。

【0091】

「コドン最適化」は、コードされたタンパク質が、目的の生物においてより効率的に発現されるように、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンをも、特定の生物において優先的に使用されるコドンに変化させることを指す。「同義語（synonyms）」または「同義（synonymous）」コドンと呼ばれるいくつかのコドンによって大部分のアミノ酸が表されるという点において、遺伝暗号は縮重するが、特定の生物によるコドン使用頻度がランダムではなく、特定のコードトリプレットに偏向していることが周知である。このようなコドン使用頻度バイアスは、所与の遺伝子、共通の機能または祖先起源の遺伝子、高度に発現されるタンパク質対低コピー数タンパク質、および生物のゲノムの凝集したタンパク質コード領域に関してより高くなり得る。一部の実施形態では、T A L酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現のために選択された宿主生物からの最適な産生のためにコドン最適化されてもよい。

【0092】

「制御配列」は、本明細書において、本出願のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現に必要なまたは有利なすべての構成成分を含むことを指す。各制御配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列に対してネイティブであっても外来性であってもよい。このような制御配列としては、以下に限定されないが、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター配列、シグナルペプチド配列、開始配列および転写ターミネーターが挙げられる。最小でも、制御配列は、プロモーター、ならびに転写および翻訳停止シグナルを含む。制御配列は、制御配列とポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域とのライゲーションを容易にする特定の制限部位を導入するために、リンカーと共に提供され得る。

【0093】

「作動可能に連結した」は、本明細書において、制御配列が目的のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を指示または調節するように、制御配列が、目的のポリヌクレオチドに応じた位置に適切に（すなわち、機能的関係で）配置される構成として定義される。

【0094】

「プロモーター配列」は、コード配列などの目的のポリヌクレオチドの発現のために宿主細胞によって認識される核酸配列を指す。プロモーター配列は、目的のポリヌクレオチドの発現を媒介する転写制御配列を含有する。プロモーターは、変異型、短縮型、およびハイブリッドプロモーターを含む、選択した宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列であってもよく、宿主細胞と同種または異種のいずれかの細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られてもよい。

10

【0095】

「好適な反応条件」は、本出願のTALポリペプチドが、基質を所望の産物化合物に変換することが可能な、酵素変換反応溶液における条件を指す（例えば、酵素負荷の範囲、基質負荷、温度、pH、バッファー、共溶媒など）。例示的な「好適な反応条件」は、本出願に提示され、実施例によって例証される。「化合物負荷」または「酵素負荷」などの「負荷」は、反応開始の際の反応混合物における構成成分の濃度または量を指す。酵素変換反応プロセスの文脈における「基質」は、TALポリペプチドによって作用される化合物または分子を指す。酵素変換プロセスの文脈における「産物」は、基質におけるTALポリペプチドの作用に起因する化合物または分子を指す。

20

【0096】

本明細書で使用される場合、用語「培養」は、任意の好適な条件下（例えば、液体、ゲルまたは固体培地を使用する）での微生物細胞の集団の成長を指す。

【0097】

組換えポリペプチドは、当技術分野で公知の任意の好適な方法を使用して産生することができる。目的の野生型ポリペプチドをコードする遺伝子を、ベクター、例えばプラスミド中にクローニングし、所望の宿主、例えばE. coliなどにおいて発現させることができる。組換えポリペプチドのバリエーションは、当技術分野で公知の様々な方法によって生成することができる。実際に、当業者に周知の多種多様な異なる変異誘発技法が存在する。加えて、多くの商業的分子生物学供給者から変異誘発キットを入手することもできる。定義されたアミノ酸における特異的な置換（部位特異的）、遺伝子の局在化された領域における特異的もしくはランダム変異（位置特異的）、または遺伝子全体にわたるランダム変異誘発（例えば、飽和変異誘発）を作製するための方法を利用することができる。PCRを使用する一本鎖DNAもしくは二本鎖DNAの部位特異的変異誘発、カセット変異誘発、遺伝子合成、エラープロードPCR、シャッフリング、および化学的飽和変異誘発、または当技術分野で公知の任意の他の好適な方法を含むがこれらに限定されない、酵素バリエーションを生成するための多数の好適な方法が当業者に公知である。DNAおよびタンパク質操作のために使用される方法の非限定的な例は、以下の特許に提示される：米国特許第6,117,679号；米国特許第6,420,175号；米国特許第6,376,246号；米国特許第6,586,182号；米国特許第7,747,391号；米国特許第7,747,393号；米国特許第7,783,428号；および米国特許第8,383,346号。バリエーションが産生された後に、バリエーションは、任意の所望の特性に関してスクリーニングされ得る（例えば、高いもしくは増加した活性、または低いもしくは低下した活性、増加した熱活性、増加した熱安定性、および／または酸性pH安定性など）。一部の実施形態では、「組換えTALポリペプチド」（本明細書において、「操作されたTALポリペプチド」、「バリエーションTAL酵素」、および「TALバリエーション」とも称される）は、用途を見出す。

30

40

【0098】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、細胞中にDNA配列を導入するためのDNA構築物である。一部の実施形態では、ベクターは、DNA配列にコードされたポリペ

50

チドの好適な宿主において発現をもたらすことが可能な好適な制御配列に作動可能に連結されている発現ベクターである。一部の実施形態では、「発現ベクター」は、宿主細胞において発現を駆動するために、DNA配列（例えば、導入遺伝子）に作動可能に連結したプロモーター配列を有し、一部の実施形態では、転写ターミネーター配列も含む。

【0099】

本明細書で使用される場合、用語「発現」は、転写、転写後修飾、翻訳、および翻訳後修飾を含むがこれらに限定されない、ポリペプチドの産生に関与する任意のステップを含む。一部の実施形態では、この用語は、細胞からのポリペプチドの分泌も包含する。

【0100】

本明細書で使用される場合、用語「産生」は、細胞によるタンパク質および／または他の化合物の産生を指す。この用語が、転写、転写後修飾、翻訳、および翻訳後修飾を含むがこれらに限定されない、ポリペプチドの産生に関与する任意のステップを包含することを意図する。一部の実施形態では、この用語は、細胞からのポリペプチドの分泌も包含する。

10

【0101】

本明細書で使用される場合、アミノ酸またはヌクレオチド配列（例えば、プロモーター配列、シグナルペプチド、ターミネーター配列など）が、これと作動可能に連結されている別の配列と本質的に関連していない場合、この2つの配列は「異種」である。

【0102】

本明細書で使用される場合、用語「宿主細胞」および「宿主株」は、本明細書において提供されるDNA（例えば、TALバリエーションをコードするポリヌクレオチド）を含む発現ベクターに対して好適な宿主を指す。一部の実施形態では、宿主細胞は、当技術分野で公知の組換えDNA技法を使用して構築されたベクターにより形質転換またはトランスフェクトされた原核生物または真核生物の細胞である。

20

【0103】

用語「アナログ」は、参照ポリペプチドと70%を上回る配列同一性を有するが100%に満たない配列同一性（例えば、75%、78%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を上回る配列同一性）を有するポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、アナログは、天然に存在するアミノ酸と共に、ホモアルギニン、オルニチンおよびノルバリンを含むがこれらに限定されない、1つまたは複数の天然に存在しないアミノ酸残基を含有するポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、アナログは、1つまたは複数のD-アミノ酸残基、および2つまたはそれより多いアミノ酸残基間の非ペプチド連結も含む。

30

【0104】

用語「治療薬」は、有益なまたは望ましい医学的効果を有する、病理の徴候または症状を示す対象に投与される化合物を指す。

【0105】

用語「医薬組成物」は、本発明に包含される薬学的に有効量の操作されたTALポリペプチド、および許容される担体を含む、哺乳動物対象（例えば、ヒト）における医薬用途に好適な組成物を指す。

40

【0106】

用語「有効量」は、所望の結果を生じるために十分な量を意味する。当業者であれば、日常の実験法を使用することによって、有効量について決定することができる。

【0107】

用語「単離された」および「精製された」は、天然に関連している少なくとも1つの他の構成成分から取り出された分子（例えば、単離された核酸、ポリペプチドなど）または他の構成成分を指すために使用される。用語「精製された」は、絶対的な純度を要求するものではなく、むしろ相対的な定義として意図される。

【0108】

用語「対象」は、ヒト、非ヒト霊長類、家畜、伴侶動物、および研究用動物（例えば、齧

50

歯類およびウサギ目動物)などの哺乳動物を包含する。この用語は、雌と雄とを包含することが意図される。

【0109】

本明細書で使用される場合、用語「患者」は、疾患について評価されている、処置されている、またはこれを経験している任意の対象を意味する。

【0110】

用語「乳児」は、生後1カ月からおよそ(1)歳の期間の小児を指す。本明細書で使用される場合、用語「新生児」は、出生から生後28日目の期間の小児を指す。用語「未熟児」は、妊娠期間満20週目の後に、ただし満期の前に産まれた、一般に、出生時に約500から約2499グラムの体重の乳児を指す。「極低出生時体重の乳児」は、出生時に1500g未満の体重の乳児である。

10

【0111】

本明細書で使用される場合、用語「小児」は、処置または研究手順の同意のための法定年齢に達していない人を指す。一部の実施形態では、この用語は、出生時と青年期との間の人を指す。

【0112】

本明細書で使用される場合、用語「成人」は、関連する法域(jurisdiction)の法定年齢に達した人を指す(例えば、米国では18歳)。一部の実施形態では、この用語は、いずれかの完全に成長し、成熟した生物を指す。一部の実施形態では、用語「若年成人」は、18歳未満の、ただし性的成熟に達した人を指す。

20

【0113】

本明細書で使用される場合、「組成物」および「製剤」は、任意の好適な使用(例えば、医薬組成物、食事/栄養補助食品、飼料など)を意図した、本発明の少なくとも1つの操作されたTALを含む製品を包含する。

【0114】

組成物の「投与」およびこれを「投与する」という用語は、本発明の組成物を対象(例えば、チロシン血症またはアルカプトン尿症の影響を被る人)に与えることを意味する。

【0115】

用語「担体」は、医薬組成物に関して使用される場合、安定化剤、保存剤、およびアジュバントなどの標準医薬品担体、バッファー、および賦形剤のいずれかを意味する。

30

【0116】

用語「薬学的に許容される」は、いかなる望ましくない生物学的作用を引き起こすことなく、またはこれが含有される構成成分のいずれとも有害な様式で相互作用することなく対象に投与することができ、所望の生物活性を保有する材料を意味する。

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「賦形剤」は、活性医薬品成分(API;例えば、本発明の操作されたTALポリペプチド)以外の、任意の薬学的に許容される添加物、担体、希釈剤、アジュバント、または他の成分を指す。賦形剤は、典型的には、製剤化および/または投与目的のために含まれる。

【0118】

用語「治療有効量」は、疾患/状態の症状に関して使用される場合、疾患/状態の1つもしくは複数の症状を改善、減弱、もしくは排除する、または症状(複数可)の開始を防止するもしくは遅延させる、化合物(例えば、操作されたTALポリペプチド)の量および/または濃度を指す。

40

【0119】

用語「治療有効量」は、疾患/状態に関して使用される場合、疾患/状態を改善、減弱、または排除する組成物(例えば、操作されたTALポリペプチド)の量および/または濃度を指す。一部の実施形態では、この用語は、研究者、医師、獣医師、または他の臨床医によって探索される、組織、系、または動物対象による生物学的(例えば、医学的)応答を誘発する組成物の量に関する使用である。

50

【0120】

用語「処置している」、「処置する」および「処置」は、防止的（例えば、予防的）、および待機的処置を包含することが意図される。

操作されたTALポリペプチド：

【0121】

操作されたTALポリペプチドを生成するために使用される親酵素は、*Stanieria cyanosphaera*（配列番号2）、*Chroogloeocystis siderophila*（配列番号4）、*Flavobacterium johnsoniae*（配列番号6）、および*Rhodotorula glutinis*（配列番号8）から得られる酵素から選択される。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、*S. cyanosphaera*からの定向進化によって誘導される。さらに、特定のTALバリエーション（操作されたTALポリペプチド）が、野生型TAL、野生型PAL、野生型HALまたは別のTALの配列における特定のアミノ酸残基の改変を参照して言及される場合、均等な位置（複数可）（それぞれのアミノ酸配列間の必要に応じたアミノ酸配列アライメントから決定される）において改変された別のTALのバリエーションが本明細書に包含されることが理解されるべきである。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、保存された活性部位Ala164-Ser165-Gly166を含み、配列番号2に対して少なくとも70%（少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも97%）の配列同一性を含む。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、TAL活性を含むだけでなく、フェニルアラニンおよび／またはヒスチジン基質に関して活性であってもよい。一部の実施形態では、少なくとも1つの重要な残基において少なくとも1つの変異を含むTALバリエーションが開発される（例えば、WO2008/069958、米国出願第2009/011140号、およびWatts et al., Chem. Biol., 13:1317-26 [2006]を参照されたい）。

【0122】

一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、少なくとも1つの操作されたTALポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を含む微生物を、操作されたTALポリペプチド（複数可）の産生の助けになる条件下で培養することによって産生される。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、得られた培養培地および／または細胞から回収される。

【0123】

本発明は、TAL活性を有する例示的な操作されたTALポリペプチドを提供する。実施例は、操作されたTALポリペプチドの機能的活性と特定のアミノ酸配列の特徴を相関させる、配列構造情報を示す表を提供する。この構造-機能相関情報は、実施例に示されるように、参照の操作されたポリペプチドと比較した特定のアミノ酸残基の差異の形態で提供される。実施例は、例示的な操作されたTALポリペプチドに関する実験的に決定された活性データをさらに提供する。

【0124】

一部の実施形態では、TAL活性を有する本発明の操作されたTALポリペプチドは、a) 参照配列である配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156に対して少なくとも約85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、b) 1つまたは複数のアミノ酸位置に、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c) 配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156、ならびに／または別の参照配列と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解の低下した感受性、iii) 酸性pHに対して増加した耐容性、iv) 低減した凝集またはi)、ii)、iii) もしくはiv) のい

いずれかの組合せから選択される改善された特性を示す。

【0125】

一部の実施形態では、改善された特性を示す操作されたTALは、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%のアミノ酸配列同一性、ならびに1つまたは複数のアミノ酸位置（例えば、配列番号2、または配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%もしくはそれを上回るアミノ酸配列同一性を有する配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20またはそれよりも多いアミノ酸位置）に、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態では、1つまたは複数の位置における、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較した残基の差異は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも多い保存的アミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、改善された特性を示す操作されたTALは、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0126】

一部の実施形態では、TAL活性を有する本発明の操作されたTALポリペプチドは、a) 参照配列である配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156に対して少なくとも約85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、b) 1つまたは複数のアミノ酸位置に、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c) 配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156、ならびに／または別の参照配列と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解の低下した感受性、iii) 酸性pHに対して増加した耐容性、iv) 低減した凝集またはi)、ii)、iii) もしくはiv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す。

【0127】

一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、表1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1、9-1、9-2、10-1、10-2、11-1、12-1、13-1、14-1、15-1、16-1、および／または17-1に列挙されたポリペプチドである。

【0128】

一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、本発明に包含される操作されたTALポリペプチドの機能的断片を含む。機能的断片は、由来する操作されたTALポリペプチド（すなわち、親の操作されたTAL）の活性の少なくとも約95%、96%、97

10

20

30

40

50

%、98%、または99%を有する。機能的断片は、操作されたTALの親配列の少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%およびさらに99%を含む。一部の実施形態では、機能的断片は、5未満、10未満、15未満、10未満、25未満、30未満、35未満、40未満、45未満、および50未満のアミノ酸だけ短縮される。

タンパク質分解に対して低下した感受性を有するバリエーション：

【0129】

一部の実施形態では、TAL活性を有する本発明の操作されたTALポリペプチドは、a) 参照配列である配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、b) 1つまたは複数のアミノ酸位置に、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c) 配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156、ならびに／または別の参照配列と比較して、タンパク質分解に対して低下した感受性を示す。

10

【0130】

一部の実施形態では、タンパク質分解に対して低下した感受性を示す操作されたTALは、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを上回るアミノ酸配列同一性、ならびに1つまたは複数のアミノ酸位置（例えば、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156、または配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%もしくはそれを上回るアミノ酸配列同一性を有する配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20またはそれよりも多いアミノ酸位置）に、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を有する。

20

30

【0131】

一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドのタンパク質分解の感受性は、本質的に同じ条件下で、配列番号2の野生型 *Stania cyanosphaera* の酵素、および／または少なくとも1つの参照TALポリペプチドと比較して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%および少なくとも85%低下する。タンパク質分解の感受性は、以下に限定されないが、実施例に記載されるアッセイを含む任意の好適なアッセイ系を使用して測定することができる。

40

【0132】

一部の実施形態では、タンパク質分解に対して低下した感受性を有する操作されたTALポリペプチドは、参照TALと低下した感受性を有する操作されたTALの両方を比較し、本質的に同じ条件下で、本質的に同じ量および種類のプロテアーゼに曝露した場合に、以下に限定されないが、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダー

50

ゼ A および B、ペプチダーゼ（例えば、アミノペプチダーゼ、ジペプチダーゼおよびエンテロペプチダーゼ）などの 1 つまたは複数のプロテアーゼを含む組成物に対して低下した感受性を有する。

【0133】

一部の実施形態では、タンパク質分解に対して低下した感受性を有する操作された T A L ポリペプチドは、参照 T A L の酵素活性の約 1.0 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、25 倍、50 倍、75 倍、100 倍、150 倍、200 倍またはそれを上回る酵素活性を有する。一部の実施形態では、操作されたポリペプチドは、活性が 4.5 から 7.5 の pH 範囲で測定される場合、活性が 4.5 から 6.5 の pH 範囲で測定される場合、活性が 5.0 から 7.5 の pH 範囲で測定される場合、活性が 5.0 から 6.5 の pH 範囲で測定される場合、活性が 5.5 から 7.5 の pH 範囲で測定される場合、および活性が 5.5 から 6.5 の pH 範囲で測定される場合にも、より高い酵素活性（参照 T A L と比較して）を有する。他の実施形態では、操作された T A L ポリペプチドは、1 μ M から 5 mM の範囲の K_m を有する。

酸性 pH に対して増加した耐容性を有するバリエーション：

【0134】

一部の実施形態では、T A L 活性を有する本発明の操作された T A L ポリペプチドは、a) 参照配列である配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは 2156 に対して少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはその断片、b) 1 つまたは複数のアミノ酸位置に、配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c) 配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは 2156、ならびに／または別の参照配列と比較して、酸性 pH に対して増加した耐容性を示す。

【0135】

一部の実施形態では、酸性 pH に対して増加した耐容性を示す操作された T A L は、配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 と少なくとも約 85%、少なくとも約 88%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、またはそれを上回るアミノ酸配列同一性、および 1 つまたは複数のアミノ酸位置（例えば、配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは 2156、または配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは 2156 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくはそれを上回るアミノ酸配列同一性を有する配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20 またはそれよりも多いアミノ酸位置）に、配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。

【0136】

一部の実施形態では、T A L 活性を有する本発明の操作された T A L ポリペプチドは、a) 参照配列である配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは 2156 に対して少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはその断片、b

）１つまたは複数のアミノ酸位置に、配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、および／または２１５６と比較したアミノ酸残基の差異を含み、ｃ）配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、および／もしくは２１５６、ならびに／または別の参照配列と比較して、酸性ｐＨに対して増加した耐容性を示す。

【０１３７】

一部の実施形態では、酸性ｐＨに対して増加した耐容性を示す操作されたＴＡＬは、配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、および／または２１５６と少なくとも８５％、少なくとも８８％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれを上回るアミノ酸配列同一性、ならびに１つまたは複数のアミノ酸位置（例えば、配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、および／もしくは２１５６、または配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、および／もしくは２１５６と少なくとも８５％、少なくとも８８％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％もしくはそれを上回るアミノ酸配列同一性を有する配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、２０またはそれよりも多いアミノ酸位置）に、配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、および／または２１５６と比較したアミノ酸残基の差異を有する。

【０１３８】

一部の実施形態では、すべての他のアッセイ条件が本質的に同一である場合、操作されたＴＡＬポリペプチドは、参照ＴＡＬポリペプチドと比較して、酸性ｐＨに対して増加した耐容性を有する。操作されたペプチドは、１．５から６．５の間、および１．５から５．０の間、および２．０から５．５の間、および３．０から６．８の間、３．０から５．５の間、４．０から６．５の間、４．０から４．５の間、４．５から５．０の間（between 4.5 and between 5.0）、４．５から５．５の間、４．５から６．０の間、４．５から６．５の間、５．０から６．５の間、５．０から６．０の間、５．０から５．５の間、５．５から６．０の間、６．０から６．５の間および６．５から７．０の間のｐＨ範囲で増加した耐容性を有する。一部の実施形態では、酸性ｐＨに対して増加した耐容性は、約３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０および６．５のｐＨで示される。

【０１３９】

一部の実施形態では、酸性ｐＨに対して増加した耐容性を有する操作されたＴＡＬポリペプチドは、以下に限定されないが、実施例において記載されるアッセイを含む任意の標準的アッセイによって測定される場合、参照ＴＡＬと比較して、より大きなＴＡＬ活性を示す。

改善された活性を有するバリエーション：

【０１４０】

一部の実施形態では、ＴＡＬ活性を有する本発明の操作されたＴＡＬポリペプチドは、
ａ）参照配列である配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、および／もしくは２１５６に対して少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはその断片、
ｂ）１つまたは複数のアミノ酸位置に、配列番号２、１４、８６、３３４、３８８、６０４、７３６、７９０、１４５４、１５７８、１６６０、１８４４、２０３０、２１１４、お

よび／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c) 配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156、ならびに／または別の参照配列と比較して、改善された活性を示す。

【0141】

一部の実施形態では、改善された活性を示す操作されたTALは、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれを上回るアミノ酸配列同一性、ならびに1つまたは複数のアミノ酸位置（例えば、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156、または配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156と少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれを上回るアミノ酸配列同一性を有する配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20またはそれより多いアミノ酸位置）に、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を有する。

10

20

【0142】

一部の実施形態では、TAL活性を有する本発明の操作されたTALポリペプチドは、a) 参照配列である配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはその断片、b) 1つまたは複数のアミノ酸位置に、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c) 配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156、ならびに／または別の参照配列と比較して、改善された活性を示す。

30

【0143】

一部の実施形態では、改善された活性を示す操作されたTALは、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを上回るアミノ酸配列同一性、ならびに1つまたは複数のアミノ酸位置（例えば、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156、または配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%もしくはそれを上回るアミノ酸配列同一性を有する配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20またはそれより多いアミノ酸位置）に、配列番

40

50

号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。

【0144】

一部の実施形態では、すべての他のアッセイ条件が本質的に同一である場合、操作された T A L ポリペプチドは、参照 T A L ポリペプチドと比較して改善された活性を有する。一部の実施形態では、この活性は、飽和レベルのチロシンでの酵素活性をモニターする条件下で測定され、よって、酵素の最大活性 (k c a t) を評価することができる。他の実施形態では、この活性は、最大活性の 2 分の 1、5 分の 1、10 分の 1 またはそれより低い活性をもたらす基質濃度の下で測定することができる。いずれかの分析方法の下で、操作されたポリペプチドは、参照 T A L の酵素活性の約 1.0 倍、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、25 倍、50 倍、75 倍、100 倍、またはそれを上回る改善された活性レベルを有する。一部の実施形態では、実施例において記載されるアッセイを含むがこれらに限定されない、任意の標準的アッセイによって測定した場合に、操作された T A L ポリペプチドは、参照 T A L と比較して改善された活性を有する。

10

【0145】

本明細書において提供されるガイダンスに照らして、例示的な操作されたポリペプチド (例えば、配列番号 10 ~ 2290 ; 特に、配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156) のいずれかを、例えば、本明細書に記載の他のポリペプチドおよび他の残基位置からの様々なアミノ酸の差異の新たな組合せを付加することによる次の進化によって、他の操作された T A L ポリペプチドを合成するための開始アミノ酸配列として使用することができることがさらに企図される。さらなる改善は、以前の進化の繰り返しを通して変化せずに維持されてきた残基位置にアミノ酸の差異を含むことによって生じ得る。

20

操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞：

【0146】

本発明は、本明細書に記載の操作された T A L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現することが可能な組換えポリヌクレオチドを作出するために、遺伝子発現を制御する 1 つまたは複数の異種調節配列に作動可能に連結されている。操作された T A L ポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含有する発現構築物は、適切な宿主細胞の中に導入され、相当する T A L ポリペプチドを発現することができる。

30

【0147】

当業者に明らかであるように、タンパク質配列の利用能および様々なアミノ酸に対応するコドンの知識は、対象ポリペプチドをコードすることが可能なすべてのポリヌクレオチドの説明を提供する。同じアミノ酸が、代替的または同義コドンにコードされた遺伝暗号の縮重は、そのすべてが操作された T A L ポリペプチドをコードする極めて多数の核酸が作製されることを可能にする。よって、特定のアミノ酸配列の知識を有すれば、当業者は、タンパク質のアミノ酸配列を変化させないように、1 つまたは複数のコドンの配列を単に改変することによって、任意の数の異なる核酸を作製することができる。この点では、本発明は、可能なコドンの選択に基づいて組合せを選択することによって、本明細書に記載のポリペプチドをコードすることができるありとあらゆる可能なポリヌクレオチドの変形形態を具体的に企図し、このような変形形態のすべては、表 1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1、9-1、9-2、10-1、10-2、11-1、12-1、13-1、14-1、15-1、16-1、および／または 17-1 に提供されるバリエーション、ならびに配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 を含む、本明細書に記載のいずれかのポリペプチドについても具体的に開示されているとみなされるべきである。

40

50

【0148】

様々な実施形態では、コドンは、タンパク質が産生されている宿主細胞に適合するように選択されるのが好ましい。例えば、細菌において使用される好ましいコドンは、細菌における発現のために使用される。結果的に、操作されたTALポリペプチドをコードするコドン最適化されたポリヌクレオチドは、全長コード領域のコドンの位置の約40%、50%、60%、70%、80%、または90%を上回って好ましいコドンを含む。

【0149】

一部の実施形態では、上記のように、ポリヌクレオチドは、本明細書に開示された特性と共にTAL活性を有する操作されたポリペプチドをコードし、ポリペプチドは、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156から選択される参照配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列、または表1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1、9-1、9-2、10-1、10-2、11-1、12-1、13-1、14-1、15-1、16-1、および／もしくは17-1に開示されたいずれかのバリエーションのアミノ酸配列、ならびに配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは2156の参照ポリペプチド、または表1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1、9-1、9-2、10-1、10-2、11-1、12-1、13-1、14-1、15-1、16-1、および／もしくは17-1に開示されたいずれかのバリエーションのアミノ酸配列と比較した1つまたは複数の残基の差異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも多いアミノ酸残基位置）を含む。一部の実施形態では、参照配列は、配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156から選択される。

【0150】

一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号3、13、85、333、387、603、735、789、1453、1577、1659、1843、2029、2113、および／または2155をコードするポリヌクレオチド配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号3、13、85、333、387、603、735、789、1453、1577、1659、1843、2029、2113、および／または2155に対して少なくとも80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチド残基の同一性を有する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、高度にストリンジェントな条件下で、配列番号3、13、85、333、387、603、735、789、1453、1577、1659、1843、2029、2113、および／もしくは2155から選択される参照ポリヌクレオチド配列、またはその相補体、または本明細書において提供されるバリエーションTALポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることが可能である。

【0151】

一部の実施形態では、本明細書において提供される操作されたTALポリペプチドのいずれかをコードする単離されたポリヌクレオチドは、種々の方式で操作され、ポリペプチドの発現をもたらす。一部の実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、1つまたは複数の制御配列がポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を調節するために存在する発現ベクターとして提供される。ベクターへのその挿入の前の単離されたポリヌクレオチドの操作は、発現ベクターに応じて変わることが望ましいかまたはそうなることが必要である場合がある。組換えDNA法を利用してポリヌクレオチドおよび核酸配列を改変するための技法は当技術分野で周知である。

10

20

30

40

50

【0152】

一部の実施形態では、制御配列は、他の配列の中でもとりわけ、プロモーター、リーダー配列、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、シグナルペプチド配列、および転写ターミネーターを含む。当技術分野で公知のように、好適なプロモーターは、使用される宿主細胞に基づいて選択することができる。細菌宿主細胞としては、本出願の核酸構築物の転写を誘導するのに好適なプロモーターとしては、以下に限定されないが、*E. coli* の *lac* オペロン、*Streptomyces coelicolor* のアガラーゼ遺伝子 (*dagA*)、*Bacillus subtilis* のレバンスクラーゼ遺伝子 (*sacB*)、*Bacillus licheniformis* のアルファアミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、*Bacillus stearothermophilus* のマルトース生成型アミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、*Bacillus amyloliquefaciens* のアルファアミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、*Bacillus licheniformis* のペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、*Bacillus subtilis* の *xyIA* および *xyIB* 遺伝子、ならびに原核生物ベクターラクタマーゼ遺伝子から得られるプロモーター（例えば、Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 75:3727-3731 [1978] を参照されたい）と共に、*tac* プロモーター（例えば、DeBoer et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 80:21-25 [1983] を参照されたい）が挙げられる。糸状菌宿主細胞のための例示的なプロモーターとしては、*Aspergillus oryzae* の TAKA アミラーゼ、*Rhizomucor miehei* のアスパラギン酸プロテイナーゼ、*Aspergillus niger* の中性アルファアミラーゼ、*Aspergillus niger* の酸安定性アルファアミラーゼ、*Aspergillus niger* または *Aspergillus awamori* のグルコアミラーゼ (*glA*)、*Rhizomucor miehei* のリパーゼ、*Aspergillus oryzae* のアルカリプロテアーゼ、*Aspergillus oryzae* のトリオースリン酸イソメラーゼ、*Aspergillus nidulans* のアセトアミダーゼ、および *Fusarium oxysporum* のトリプシン様プロテアーゼについての遺伝子から得られるプロモーター（例えば、WO96/00787 を参照されたい）と共に、NA2-tpi プロモーター (*Aspergillus niger* の中性アルファアミラーゼおよび *Aspergillus oryzae* のトリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子由来のプロモーターのハイブリッド)、ならびにこれらの変異型、短縮型、およびハイブリッドプロモーターが挙げられる。例示的な酵母細胞プロモーターは、*Saccharomyces cerevisiae* のエノラーゼ (*ENO-1*)、*Saccharomyces cerevisiae* のガラクトキナーゼ (*GAL1*)、*Saccharomyces cerevisiae* のアルコール脱水素酵素／グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (*ADH2/GAP*)、および *Saccharomyces cerevisiae* の3-ホスホグリセリン酸キナーゼの遺伝子由来であり得る。酵母宿主細胞のための他の有用なプロモーターは、当技術分野で公知である（例えば、Romanos et al., Yeast 8:423-488 [1992] を参照されたい）。

【0153】

一部の実施形態では、制御配列は、転写を終結させるために宿主細胞によって認識される配列である、好適な転写ターミネーター配列である。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作動可能に連結されている。選択した宿主細胞において機能的である任意のターミネーターは、本発明において用途を見出す。例えば、糸状菌宿主細胞のための例示的な転写ターミネーターは、*Aspergillus oryzae* の TAKA アミラーゼ、*Aspergillus niger* のグルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* のアントラニル酸合成酵素、*Aspergillus niger* のアルファグルコシダーゼ、および *Fusarium oxysporum* のトリプシン様プロテアーゼについての遺伝子から得ることができる。酵母宿

主細胞のための例示的なターミネーターは、*Saccharomyces cerevisiae*のエノラーゼ、*Saccharomyces cerevisiae*のチトクロムC (CYC1)、および*Saccharomyces cerevisiae*のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞のための他の有用なターミネーターは、当技術分野で公知である（例えば、Romanos et al.、上掲を参照されたい）。

【0154】

一部の実施形態では、制御配列は、好適なリーダー配列、すなわち宿主細胞による翻訳に重要なmRNAの非翻訳領域である。リーダー配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に作動可能に連結されている。選択した宿主細胞において機能的であるいずれかのリーダー配列が使用されてもよい。糸状菌宿主細胞のための例示的なリーダーは、*Aspergillus oryzae*のTAKAアミラーゼおよび*Aspergillus nidulans*のトリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞に好適なリーダーとしては、以下に限定されないが、*Saccharomyces cerevisiae*エノラーゼ (ENO-1)、*Saccharomyces cerevisiae*の3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、*Saccharomyces cerevisiae*のアルファ因子、および*Saccharomyces cerevisiae*のアルコール脱水素酵素／グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (ADH2 / GAP) の遺伝子から得られるものが挙げられる。

【0155】

制御配列は、ポリアデニル化配列、すなわち、核酸配列の3'末端に作動可能に連結された配列であって、転写されると、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するためのシグナルとして宿主細胞によって認識される配列であってもよい。選択した宿主細胞において機能的である任意のポリアデニル化配列は、本発明において使用されてもよい。糸状菌宿主細胞のための例示的なポリアデニル化配列としては、以下に限定されないが、*Aspergillus oryzae*のTAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger*のグルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans*のアントラニル酸合成酵素、*Fusarium oxysporum*のトリブシン様プロテアーゼ、および*Aspergillus niger*のアルファグルコシダーゼの遺伝子由来のものが挙げられる。酵母宿主細胞に有用なポリアデニル化配列はまた、当技術分野で公知である（例えば、Guo and Sherman, Mol. Cell. Biol., 15: 5983-5990 [1995] を参照されたい）。

【0156】

一部の実施形態では、制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に連結され、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路へと方向付ける、アミノ酸配列をコードするシグナルペプチドコード領域である。核酸配列のコード配列の5'末端は、翻訳リーディングフレーム内で分泌されたポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと天然に連結されたシグナルペプチドコード領域を固有に含有してもよい。あるいは、コード配列の5'末端は、コード配列にとって外来性であるシグナルペプチドコード領域を含有してもよい。選択した宿主細胞の分泌経路へと発現されたポリペプチドを方向付ける任意のシグナルペプチドコード領域は、本明細書において提供される操作されたTALポリペプチドの発現のための用途を見出す。細菌宿主細胞のための有効なシグナルペプチドコード領域としては、以下に限定されないが、*Bacillus NC1B 11837*のマルトース生成型アミラーゼ、*Bacillus stearothermophilus*のアルファアミラーゼ、*Bacillus licheniformis*のスプチリシン、*Bacillus licheniformis*のベーターラクタマーゼ、*Bacillus stearothermophilus*の中性プロテアーゼ (nprT、nprS、nprM)、および*Bacillus subtilis*のprSAの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられる。さらなるシグナルペプチドは、当技術分野で公知である（例えば、Simonen and Palva, Microbiol. Rev.

、 57:109-137 [1993] を参照されたい)。糸状菌宿主細胞のための有効なシグナルペプチドコード領域としては、以下に限定されないが、*Aspergillus oryzae* の TAKA アミラーゼ、*Aspergillus niger* の中性アミラーゼ、*Aspergillus niger* のグルコアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* のアスパラギン酸プロテイナーゼ、*Humicola insolens* のセルラーゼ、および *Humicola lanuginosa* のリパーゼの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられる。酵母宿主細胞のための有用なシグナルペプチドとしては、以下に限定されないが、*Saccharomyces cerevisiae* のアルファ因子および *Saccharomyces cerevisiae* のインベルターゼの遺伝子由来のものが挙げられる。

10

【0157】

一部の実施形態では、制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に配置されたアミノ酸配列をコードする、プロペプチドコード領域である。その結果得られるポリペプチドは、一部の場合には、「プロ酵素」、「プロポリペプチド」、または「チモーゲン」と称される。プロポリペプチドは、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒性または自己触媒性の切断によって、成熟活性ポリペプチドへと変換され得る。プロペプチドコード領域としては、以下に限定されないが、*Bacillus subtilis* のアルカリプロテアーゼ (aprE)、*Bacillus subtilis* の中性プロテアーゼ (nprT)、*Saccharomyces cerevisiae* のアルファ因子、*Rhizomucor miehei* のアスパラギン酸プロテイナーゼ、および *Myceliophthora thermophila* のラクターゼの遺伝子が挙げられる (例えば、WO 95/33836 を参照されたい)。ポリペプチドのアミノ末端にシグナルペプチドおよびプロペプチド領域の両方が存在する場合、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の隣に位置し、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の隣に位置する。

20

【0158】

一部の実施形態では、調節配列も利用される。これらの配列は、宿主細胞の成長と比較して、ポリペプチドの発現の調節を容易にする。調節系の例は、調節化合物の存在を含む化学的または物理的刺激に応答して遺伝子の発現をオンまたはオフにする調節系である。原核生物の宿主細胞において、好適な調節配列としては、lac、tac、および trp オペレーター系が挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞において、好適な調節系としては、ADH2系または GAL1系が挙げられるがこれらに限定されない。糸状菌において、好適な調節配列としては、TAKA アルファアミラーゼプロモーター、*Aspergillus niger* のグルコアミラーゼプロモーター、および *Aspergillus oryzae* のグルコアミラーゼプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0159】

別の態様では、本発明は、操作された TAL ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、これらを導入しようとする宿主の種類に応じて、プロモーターおよびターミネーターなどの1つまたは複数の発現調節領域、複製起点などを含む組換え発現ベクターも提供する。一部の実施形態では、上記の様々な核酸および制御配列と一緒に接合されて、このような部位にバリエーション TAL ポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換を可能にする、1つまたは複数の簡便な制限部位を含む組換え発現ベクターを産生する。あるいは、本発明のポリヌクレオチド配列 (複数可) は、ポリヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列を含む核酸構築物を発現のための適切なベクターへと挿入することによって発現される。発現ベクターを作出する際に、コード配列は、このコード配列が、発現のための適切な制御配列と作動可能に連結されるように、ベクター内に配置される。

40

【0160】

組換え発現ベクターは、組換え DNA 手順に簡便に供することができ、バリエーション TAL ポリヌクレオチド配列の発現をもたらすことができる任意のベクター (例えば、プラスミ

50

ドまたはウイルス)であってもよい。ベクターの選択は、典型的には、ベクターと、このベクターが導入される宿主細胞との適合性に依存する。ベクターは、直鎖状または閉環状プラスミドであってもよい。

【0161】

一部の実施形態では、発現ベクターは、自律的に複製するベクター(すなわち、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体、または人工染色体などの染色体外の実体として存在するベクターであり、その複製は、染色体の複製から独立している)である。ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含有してもよい。一部の代替の実施形態では、ベクターは、宿主細胞の中に導入されると、ゲノム内に組み込まれ、それが組み込まれた染色体(複数可)と一緒に複製されるベクターであってもよい。さらに、単一のベクターもしくはプラスミドまたは宿主細胞のゲノム内に導入される全DNAと一緒に含有する2つもしくはそれより多いベクターもしくはプラスミド、またはトランスポゾンが使用されてもよい。

10

【0162】

一部の実施形態では、発現ベクターは、形質転換された細胞の容易な選択を可能にする、1つまたは複数の選択可能なマーカーを含有するのが好ましい。「選択可能なマーカー」は、その産物が、殺生物剤またはウイルス耐性、重金属に対する耐性、栄養要求株への原栄養性などをもたらす遺伝子である。細菌の選択可能なマーカーの例としては、以下に限定されないが、*Bacillus subtilis*もしくは*Bacillus licheniformis*由来の*dal*遺伝子、またはアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールもしくはテトラサイクリン耐性などの抗生物質耐性を付与するマーカーが挙げられる。酵母宿主細胞のための好適なマーカーとしては、以下に限定されないが、*ADE2*、*HIS3*、*LEU2*、*LYS2*、*MET3*、*TRP1*、および*URA3*が挙げられる。糸状菌宿主細胞において使用するための選択可能なマーカーとしては、以下に限定されないが、*amdS*(アセトアミダーゼ)、*argB*(オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、*bar*(ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)、*hph*(ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、*niaD*(硝酸レダクターゼ)、*pyrG*(オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ)、*sC*(硫酸アデニルトランスフェラーゼ)、および*trpC*(アントラニル酸合成酵素)、ならびにこれらの均等物が挙げられる。別の態様では、本発明は、本出願の少なくとも1つの操作されたTALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、宿主細胞における操作されたTAL酵素(複数可)の発現のための1つまたは複数の制御配列に作動可能に連結されている、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。本発明の発現ベクターにコードされたポリペプチドの発現において使用するための宿主細胞は、当技術分野で周知であり、その例としては、以下に限定されないが、*E. coli*、*Vibrio fluvialis*、*Streptomyces*および*Salmonella typhimurium*細胞などの細菌細胞；酵母細胞(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*または*Pichia pastoris*(ATCC受託番号201178))などの真菌細胞；*Drosophila S2*および*Spodoptera Sf9*細胞などの昆虫細胞；*CHO*、*COS*、*BHK*、*293*、および*Bowes*メラノーマ細胞などの動物細胞；なら

20

30

40

【0163】

したがって、別の態様では、本発明は、操作されたTALポリペプチドを産生するための方法であって、ポリペプチドの発現に好適な条件下で、操作されたTALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現することが可能な宿主細胞を培養するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、本明細書に記載されているTALポリペプチドを単離および／または精製するステップをさらに含む。

【0164】

上記宿主細胞のための適切な培養培地および成長条件は、当技術分野で周知である。T A

50

L ポリペプチドの発現のためのポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の様々な方法によって細胞内に導入することができる。技法としては、とりわけ、電気穿孔、微粒子銃衝撃、リボソーム媒介性トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクション、およびプロトプラスト融合が挙げられる。

【0165】

本明細書に開示される特性を有する操作されたTALは、天然に存在するかまたは操作されたTALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを当技術分野で公知の、および本明細書に記載されている変異誘発および／または定向進化方法に供することによって得ることができる。例示的な定向進化技法は、変異誘発および／またはDNAシャッフリングである（例えば、Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 [1994]; WO95/22625; WO97/0078; WO97/35966; WO98/27230; WO00/42651; WO01/75767および米国特許第6,537,746号を参照されたい）。使用することができる他の定向進化手順としては、とりわけ、互い違い伸長プロセス（staggered extension process）（STEP）、in vitro組換え（例えば、Zhao et al., Nat. Biotechnol., 16:258-261 [1998]を参照されたい）、変異原性PCR（例えば、Caldwell et al., PCR Methods Appl., 3:S136-S140 [1994]を参照されたい）、およびカセット変異誘発（例えば、Black et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3525-3529 [1996]を参照されたい）が挙げられる。

10

20

【0166】

例えば、変異誘発および定向進化方法は、ポリヌクレオチドに容易に適用して、発現、スクリーニング、およびアッセイすることができるバリエーションライブラリーを生成することができる。変異誘発および定向進化方法は、当技術分野で周知である（例えば、そのすべてが参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252、5,837,458、5,928,905、6,096,548、6,117,679、6,132,970、6,165,793、6,180,406、6,251,674、6,265,201、6,277,638、6,287,861、6,287,862、6,291,242、6,297,053、6,303,344、6,309,883、6,319,713、6,319,714、6,323,030、6,326,204、6,335,160、6,335,198、6,344,356、6,352,859、6,355,484、6,358,740、6,358,742、6,365,377、6,365,408、6,368,861、6,372,497、6,337,186、6,376,246、6,379,964、6,387,702、6,391,552、6,391,640、6,395,547、6,406,855、6,406,910、6,413,745、6,413,774、6,420,175、6,423,542、6,426,224、6,436,675、6,444,468、6,455,253、6,479,652、6,482,647、6,483,011、6,484,105、6,489,146、6,500,617、6,500,639、6,506,602、6,506,603、6,518,065、6,519,065、6,521,453、6,528,311、6,537,746、6,573,098、6,576,467、6,579,678、6,586,182、6,602,986、6,605,430、6,613,514、6,653,072、6,686,515、6,703,240、6,716,631、6,825,001、6,902,922、6,917,882、6,946,296、6,961,664、6,995,017、7,024,312、7,058,515、7,105,297、7,148,054、7,220,566、7,288,375、7,384,387、7,421,347、7,430,477、7,462,469、7,534,564、7,620,500、7,620,502、7,629,170、7,702,

30

40

50

464、7、747、391、7、747、393、7、751、986、7、776、
598、7、783、428、7、795、030、7、853、410、7、868、
138、7、783、428、7、873、477、7、873、499、7、904、
249、7、957、912、7、981、614、8、014、961、8、029、
988、8、048、674、8、058、001、8、076、138、8、108、
150、8、170、806、8、224、580、8、377、681、8、383、
346、8、457、903、8、504、498、8、589、085、8、762、
066、8、768、871、9、593、326、9、684、771、9、665、
694；およびWO95/22625；WO97/0078；WO97/35966；W
O98/27230；WO00/42651；WO01/75767；WO2009/1
52336、WO2013/138339、WO2015/048572、およびWO2
015/048573ならびにこれらの列挙された特許および出願の関連するすべての米
国および米国以外の対応物；Ling et al., Anal. Biochem.
, 254:157-78 [1997]；Dale et al., Meth. M
ol. Biol., 57:369-74 [1996]；Smith, Ann.
Rev. Genet., 19:423-462 [1985]；Botstein
et al., Science, 229:1193-1201 [1985]；Ca
rter, Biochem. J., 237:1-7 [1986]；Kramer
et al., Cell, 38:879-887 [1984]；Wells et
al., Gene, 34:315-323 [1985]；Minshull et
al., Curr. Op. Chem. Biol., 3:284-290 [1
999]；Christians et al., Nat. Biotechnol.
, 17:259-264 [1999]；Cramer et al., Natu
re, 391:288-291 [1998]；Cramer et al.,
Nat. Biotechnol., 15:436-438 [1997]；Zhan
g et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.,
94:4504-4509 [1997]；Cramer et al., Nat.
Biotechnol., 14:315-319 [1996]；Stemmer,
Nature, 370:389-391 [1994]；およびStemmer, P
roc. Nat. Acad. Sci. USA, 91:10747-10751
[1994]を参照されたい)。

【0167】

一部の実施形態では、変異誘発処理後に得られる酵素クローンは、酵素を規定の温度（または他のアッセイ条件）に供し、熱処理または他のアッセイ条件後に残存する酵素活性の量を測定することによってスクリーニングされる。次いで、TALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するクローンを遺伝子から単離し、配列決定して、ヌクレオチド配列の変化（存在する場合）を同定し、宿主細胞における酵素の発現に使用する。発現ライブラリーからの酵素活性の測定は、当技術分野で公知の任意の好適な方法（例えば、HPLC分析などの標準生化学技法）を使用して実施することができる。

【0168】

公知配列の操作されたポリペプチドに関して、酵素をコードするポリヌクレオチドは、公知の合成方法に従って、標準固相方法により調製することができる。一部の実施形態では、最大約100塩基の断片を個々に合成し、次いで、接合させ（例えば、酵素もしくは化学的ライゲーション（*ligation*）方法、またはポリメラーゼに媒介される方法によって）、任意の所望の連続配列を形成することができる。例えば、本明細書に開示されるポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、自動合成方法において典型的に実施されることから、古典的ホスホラミダイト方法（例えば、Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859-69 [1981]；およびMatthes et al., EMBO J., 3:801-05 [1984]を参照されたい）を使用する化学合成により調製することができる。ホスホラミダイト方法

に従って、オリゴヌクレオチドは、合成（例えば、自動DNA合成機において）、精製、アニール、ライゲーションおよび適切なベクター中にクローニングされる。

【0169】

したがって、一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドを調製するための方法は：（a）表1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1、9-1、9-2、10-1、10-2、11-1、12-1、13-1、14-1、15-1、16-1、および／または17-1、ならびに配列番号2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または2156に提供されるいずれかのバリエーションのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを合成するステップと、（b）ポリヌクレオチドにコードされたTALポリペプチドを発現させるステップとを含むことができる。本方法の一部の実施形態では、ポリヌクレオチドにコードされたアミノ酸配列は、1つまたはいくつかの（例えば、最大3、4、5個、または最大10個）のアミノ酸残基の欠失、挿入および／または置換を必要に応じて有してもよい。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～15、1～20、1～21、1～22、1～23、1～24、1～25、1～30、1～35、1～40、1～45、または1～50個のアミノ酸残基の欠失、挿入および／または置換を必要に応じて有する。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、30、35、40、45、または50個のアミノ酸残基の欠失、挿入および／または置換を必要に応じて有する。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸残基の欠失、挿入および／または置換を必要に応じて有する。一部の実施形態では、置換は、保存的または非保存的置換であってもよい。

10

20

【0170】

発現された操作されたTALポリペプチドは、本明細書に記載のアッセイおよび条件を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の好適なアッセイを使用して、任意の所望の改善された特性（例えば、活性、選択性、安定性、酸耐容性、プロテアーゼ感受性など）について測定することができる。

30

【0171】

一部の実施形態では、宿主細胞において発現された操作されたTALポリペプチドのいずれかは、とりわけ、リゾチーム処理、超音波処理、濾過、塩析、超遠心、およびクロマトグラフィーを含む、タンパク質精製のための周知の技法のうちのいずれか1つまたは複数を使用して、細胞および／または培養培地から回収される。

【0172】

TALポリペプチドの単離のためのクロマトグラフィー技法は、とりわけ、逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、およびアフィニティークロマトグラフィーを含む。特定の酵素を精製するための条件は、部分的に、例えば正味電荷、疎水性、親水性、分子量、分子形状などの因子に依存し、当業者にとって明らかである。一部の実施形態では、親和性技法を使用して、改善されたバリエーションTAL酵素を単離してもよい。一部の実施形態では、アフィニティークロマトグラフィー精製を利用して、バリエーションTALポリペプチドに特異的に結合するいずれかの抗体は、用途を見出す。抗体の産生のために、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない様々な宿主動物が、TALポリペプチド（例えば、TALバリエーション）、またはその断片の注射によって免疫化される。一部の実施形態では、TALポリペプチドまたは断片は、側鎖官能基または側鎖官能基に結合したリンカーによって、BSAなどの好適な担体に結合している。

40

【0173】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている操作されたTALポリペプチドをコード

50

するポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞（例えば、E. coli 株）を、操作された T A L ポリペプチドの産生の助けになる条件下で培養するステップと、細胞および／または培養培地から操作された T A L ポリペプチドを回収するステップとを含む方法によって、操作された T A L ポリペプチドは、宿主細胞において産生される。

【0174】

一部の好ましい実施形態では、本発明は、操作された T A L ポリペプチドを産生する方法であって、参照配列である配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／または 2156 に対して少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性、ならびに整列させた場合に配列番号 2、14、86、334、388、604、736、790、1454、1578、1660、1844、2030、2114、および／もしくは 2156、ならびに／またはこれらの組合せと比較した 1 つまたは複数のアミノ酸残基の差異を有する操作された T A L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換え細菌細胞を、操作された T A L ポリペプチドの産生を可能にする好適な培養条件下で培養するステップと、培養物および／または培養された細菌細胞から操作された T A L ポリペプチドを必要に応じて回収するステップとを含む、方法を包含する。

10

【0175】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞または細胞培養物から操作された T A L ポリペプチドが回収されたら、当技術分野で公知の任意の好適な方法（複数可）によってこれらをさらに精製する。一部の追加の実施形態では、精製された T A L ポリペプチドは、他の成分および化合物と組み合わせて、異なる適用および使用（例えば、医薬組成物）に適切な、操作された T A L ポリペプチドを含む組成物および製剤をもたらす。

20

組成物：

医薬組成物

【0176】

本発明は、医薬組成物および食事／栄養補助食品などの他の組成物において使用するのに好適な操作された T A L ポリペプチドを提供する。

【0177】

投与方式に応じて、本発明による治療有効量の操作された T A L を含む組成物は、固体、半固体、ゲル、または液体の形態である。一部の実施形態では、組成物は、希釈剤、バッファー、賦形剤、塩、乳化剤、保存剤、安定化剤、充填剤、および他の成分などの他の薬学的に許容される構成成分を含む。製剤および投与のための技法に関する詳細は、当技術分野で周知であり、文献に記載されている。

30

【0178】

一部の実施形態では、操作された T A L ポリペプチドは、経口医薬組成物における使用のために製剤化される。操作された T A L ポリペプチドを送達する際に使用するための任意の好適な形式は、本発明における用途を見出し、以下に限定されないが、丸剤、錠剤、ジェルタブ、カプセル剤、ロゼンジ剤、糖衣錠、粉剤・散剤（powder）、ソフトゲル剤、ゾルーゲル剤、ゲル剤、乳剤、埋込剤、パッチ剤、スプレー剤、軟膏剤、リニメント剤、クリーム剤、ペースト剤、ゼリー剤、ペイント剤、エアロゾル剤、チューインガム剤、粘滑剤、スティック剤、懸濁剤（油ベースの懸濁剤、水中油型乳剤などを含むがこれらに限定されない）、スラリー剤、シロップ剤、制御放出製剤、坐剤などを含む。一部の実施形態では、操作された T A L ポリペプチドは、注射に好適な形式で提供される（すなわち、注射用製剤において）。一部の実施形態では、操作された T A L ポリペプチドは、シリカベースの（例えば、オキシシラン）ゾルーゲルを含むゾルーゲルなどの生体適合性マトリックス中に提供される。一部の実施形態では、操作された T A L ポリペプチドは、カプセル包埋される。一部の代替の実施形態では、操作された T A L ポリペプチドは、ナノ構造（例えば、ナノチューブ、ナノ細管、ナノカプセル、またはマイクロカプセル、マイクロスフェア、リポソームなど）の中にカプセル包埋される。実際に、本発明が、いずれ

40

50

かの特定の送達製剤および／または送達手段に限定されることは意図されない。操作されたTALポリペプチドが、以下に限定されないが、非経口、経口、局所、経皮、鼻腔内、眼内、髄腔内、埋込剤経路などを含む、当技術分野で公知の任意の好適な手段によって投与されることが意図される。

【0179】

一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、グリコシル化、ペグ化（すなわち、ポリエチレングリコール[PEG]または活性化されたPEGなどにより修飾された）または他の化合物によって化学修飾されている（例えば、Ikeda, Amino Acids 29:283-287 [2005]；米国特許第7,531,341号、同第7,534,595号、同第7,560,263号、および同第7,53,653号；米国特許出願公開第2013/0039898号、同第2012/0177722号などを参照されたい）。実際に、本発明がいずれかの特定の送達方法および／または機構に限定されることを意図するものではない。

10

【0180】

一部の追加の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、マトリックスにより安定化された酵素結晶を含む製剤中に提供される。一部の実施形態では、製剤は、架橋された結晶性の操作されたTAL酵素と、酵素結晶に接着する反応性部分を有するポリマーとを含む。本発明は、ポリマーにおける操作されたTALポリペプチドも提供する。

【0181】

一部の実施形態では、本発明の操作されたTALポリペプチドを含む組成物は、以下に限定されないが、糖（例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、および／またはソルビトール）、デンプン（例えば、トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモ、または他の植物のデンプン）、セルロース（例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム）、ガム（例えば、アラビア、トラガント、グアーなど）および／またはタンパク質（例えば、ゼラチン、コラーゲンなど）を含む、1つまたは複数の一般的に使用される担体化合物を含む。経口製剤における追加の構成成分は、着色剤および／または甘味剤（例えば、グルコース、スクロース、およびマンニトール）および滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム）、ならびに腸溶コーティング（例えば、メタクリレートポリマー、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、および／または当技術分野で公知の任意の他の好適な腸溶コーティング）を含むことができる。一部の実施形態では、崩壊剤または可溶化剤が含まれる（例えば、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはアルギン酸ナトリウムなどのその塩）。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、以下に限定されないが、保存剤、懸濁化剤、増粘剤、湿潤剤、アルコール、脂肪酸、および／または乳化剤（特に液体製剤において）を含む、様々な追加の構成成分と組み合わせられる。一部の実施形態では、操作されたTALポリペプチドは、NTBC、ニチシノン、制酸剤（例えば、オメプラゾール、エソメプラゾールおよび他のプラゾール）、および任意の他の好適な化合物を含むがこれらに限定されない、チロシン血症および／またはアルカプトン尿症の処置において使用される他の化合物と組み合わせて対象に投与される。一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、ヒトへの非経口注射に好適である。さらに一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼと共投与される。一部のさらなる実施形態では、医薬組成物は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、腸溶コーティングをさらに含む丸剤、錠剤、カプセル剤、またはゲルキャップ剤を含む。さらに一部の追加の実施形態では、医薬組成物は、ニチシノンおよびフェニルアラニンアンモニアリアーゼの両方と共投与される。一部のさらなる実施形態では、医薬組成物は、ニチシノンとフェニルアラニンアンモニアリアーゼの両方を含む。

20

30

40

【0182】

一部の実施形態では、本発明は、血液、脳脊髄液などの流体におけるチロシンの濃度を低下させる際に使用するのに好適な操作されたTALポリペプチドを提供する。動物に投与

50

される操作されたT A Lポリペプチド（複数可）の投与量は、動物の状態または疾患、全身状態、および当業者に公知の他の因子に依存する。一部の実施形態では、組成物は、動物への単回または複数回の投与を意図される。一部の実施形態では、動物（例えば、チロシン血症またはアルカプトン尿症を有するヒト）に投与される組成物（複数可）中の操作されたT A Lポリペプチド（複数可）の濃度は、疾患の症状（例えば、チロシン血症もしくはアルカプトン尿症および／またはチロシン血症もしくはアルカプトン尿症に関連する状態、疾患および／または症状）を有効に処置、改善および／または防止するのに十分であることが企図される。一部の実施形態では、操作されたT A Lポリペプチドは、他の医薬組成物および／または食事組成物と組み合わせて投与される。

産業用組成物

10

【0183】

本発明の操作されたT A Lポリペプチドが、産業用組成物における用途を見出すことが企図される。一部の実施形態では、操作されたT A Lポリペプチドは、化学物質（例えば、クマル酸）の産生において用途を見出す。一部の実施形態では、操作されたT A Lポリペプチドは、食品および／または飼料産業における使用のために製剤化される。一部の実施形態では、操作されたT A Lポリペプチドは、追加の酵素（例えば、セルラーゼ、ラッカーゼ、およびアミラーゼ）などの動物飼料構成成分と混合される、顆粒化またはペレット化された産物において製剤化される。

【0184】

一部の代替の実施形態では、操作されたT A Lポリペプチドは、液体の動物飼料組成物（例えば、水性または油ベースのスラリー）において使用される。よって、一部の実施形態では、本発明の操作されたT A Lバリエーションは、ペレットおよび他の加工飼料／食品を生産するために使用される処理に耐えるのに十分に熱耐容性および熱安定性である。一部のさらなる実施形態では、操作されたT A Lバリエーションは、チロシンおよび／またはチロシン誘導体を産生するために使用される。

20

【0185】

本明細書において提供される操作されたT A Lポリペプチドは、農業適用においても用途を見出す。実際に、T A L活性を有する組換えポリペプチドを使用することによるT A L活性のモジュレーションによって、有効な除草剤がもたらされることが企図される。

【0186】

本発明の前述および他の態様は、以下の非限定例と併せて、よりよく理解することができる。実施例は、単なる説明目的のために提供されており、決して本発明の範囲の限定を意図するものではない。

30

【実施例】

【0187】

実験

実験および達成された結果を含む以下の実施例は、単なる説明目的のために提供されており、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【0188】

以下の実験の開示において、次の略語が適用される：p p m（百万分率）；M（モル濃度）；m M（ミリモル濃度）、u Mおよびμ M（マイクロモル濃度）；n M（ナノモル濃度）；m o l（モル）；g mおよびg（グラム）；m g（ミリグラム）；u gおよびμ g（マイクログラム）；Lおよびl（リットル）；m lおよびm L（ミリリットル）；c m（センチメートル）；m m（ミリメートル）；u mおよびμ m（マイクロメートル）；s e c．（秒）；m i n（分）；hおよびh r（時間）；U（単位）；M W（分子量）；r p m（毎分回転数）；°C（セ氏温度）；C D S（コード配列）；D N A（デオキシリボ核酸）；R N A（リボ核酸）；E . c o l i W 3 1 1 0（一般的に使用される研究用E . c o l i株、C o l i G e n e t i c S t o c k C e n t e r [C G S C]、N e w H a v e n、C Tから入手可能）；L B（L u r i a - B u r t a n i）；T B（テリフィックブロス）；H P L C（高圧液体クロマトグラフィー）；S D S - P A G E（ドデシ

40

50

ル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動) ; P E S (ポリエーテルスルホン) ; C F S E (カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル) ; I P T G (イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド) ; P M B S (硫酸ポリミキシンB) ; N A D P H (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート) ; F I O P C (陽性対照を上回る倍数改善) ; P H E および P h e (フェニルアラニン) ; T Y R および T y r (チロシン) ; P B M C (末梢血単核細胞) ; L B (ルリアブロス) ; M e O H (メタノール) ; A t h e n s R e s e a r c h (A t h e n s R e s e a r c h T e c h n o l o g y , A t h e n s , G A) ; P r o S p e c (P r o S p e c T a n y T e c h n o g e n e , E a s t B r u n s w i c k , N J) ; S i g m a - A l d r i c h (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) ; R a m S c i e n t i f i c (R a m S c i e n t i f i c , I n c . , Y o n k e r s , N Y) ; P a l l C o r p . (P a l l , C o r p . , P t . W a s h i n g t o n , N Y) ; M i l l i p o r e (M i l l i p o r e , C o r p . , B i l l e r i c a M A) ; D i f c o (D i f c o L a b o r a t o r i e s , B D D i a g n o s t i c S y s t e m s , D e t r o i t , M I) ; M o l e c u l a r D e v i c e s (M o l e c u l a r D e v i c e s , L L C , S u n n y v a l e , C A) ; K u h n e r (A d o l f K u h n e r , A G , B a s e l , S w i t z e r l a n d) ; M i c r o f l u i d i c s (M i c r o f l u i d i c s C o r p . , W e s t w o o d , M A) ; T h e r m o t r o n (T h e r m o t r o n , I n c . , H o l l a n d , M I) ; C a m b r i d g e I s o t o p e L a b o r a t o r i e s (C a m b r i d g e I s o t o p e L a b o r a t o r i e s , I n c . , T e w k s b u r y , M A) ; A p p l i e d B i o s y s t e m s (A p p l i e d B i o s y s t e m s , L i f e T e c h n o l o g i e s , C o r p . の一部、G r a n d I s l a n d , N Y) ; G r e i n e r B i o - O n e (G r e i n e r B i o - O n e N o r t h A m e r i c a , M o n r o e , N C) ; A g i l e n t (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s , I n c . , S a n t a C l a r a , C A) ; T h e r m o S c i e n t i f i c (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , W a l t h a m の一部、M A) ; C o r n i n g (C o r n i n g , I n c . , P a l o A l t o , C A) ; M e g a z y m e (M e g a z y m e I n t e r n a t i o n a l , W i c k l o w , I r e l a n d) ; E n z o (E n z o L i f e S c i e n c e s , I n c . , F a r m i n g d a l e , N Y) ; G E H e a l t h c a r e (G E H e a l t h c a r e B i o - S c i e n c e s , P i s c a t a w a y , N J) ; P i e r c e (P i e r c e B i o t e c h n o l o g y (現在 T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c の一部)、R o c k f o r d , I L) ; P h e n o m e n e x (P h e n o m e n e x , I n c . , T o r r a n c e , C A) ; O p t i m a l (O p t i m a l B i o t e c h G r o u p , B e l m o n t , C A) ; および B i o - R a d (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , H e r c u l e s , C A) 。

10

20

30

40

50

(実施例1)

チロシンアンモニアリアーゼ (T A L) 活性を有する T A L 酵素の合成およびアッセイ
【0189】

この実施例では、チロシンアンモニアリアーゼ活性に関する T A L 酵素の合成およびアッセイにおいて使用する方法について記載する。

T A L 遺伝子の獲得および発現ベクターの構築
【0190】

S t a n i e r i a c y a n o s p h a e r a (配列番号2)、C h r o o g l o e o c y s t i s s i d e r o p h i l a (配列番号4)、F l a v o b a c t e r i u m j o h n s o n i a e (配列番号6)、および R h o d o t o r u l a g l u t i n i s (配列番号8) 由来のフェニルアラニンおよびチロシンアンモニアリアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号1、3、5、および7の遺伝子として合成した。これらの合成遺伝子を p C K 1 1 0 9 0 0 ベクター系へとクローニングし (例え

ば、そのすべてが参照により組み込まれる、米国特許第7,629,157号および米国特許出願公開第2016/0244787号、および同第2006/0195947号を参照されたい)、次に、W3110に由来するE.coli株において発現させた。一部の実施形態では、抗微生物耐性マーカーを欠く発現ベクターが用途を見出す。

TAL酵素を発現する培養物のハイスループット(HTP)成長

【0191】

1%のグルコースおよび30μg/mLのクロラムフェニコールを含有するLB寒天プレート上にプレーティングすることによって、形質転換したE.coli細胞を選択した。37℃で一晩のインキュベーション後に、1%のグルコースおよび30μg/mLのクロラムフェニコールを補充した180μL/ウェルのLB培地で満たしたNUNC(商標)(Thermo-Scientific)の96ウェル浅型平底プレート上にコロニーをピックアップした。培養物をシェーカー中で18~20時間、一晩成長させた(200rpm、30℃、および相対湿度85%;Kuhner)。一晩成長させた試料(20μL)を30μg/mLのクロラムフェニコールを補充した380μLのTBで満たしたCostarの96ウェル深型プレート中に移した。培養物をシェーカー中で2~3時間インキュベートし(250rpm、30℃、および相対湿度85%;Kuhner)、次いで、滅菌水中10mMのIPTG40μLで誘導し、シェーカー中で20~24時間一晩インキュベートした(250rpm、30℃、および相対湿度85%;Kuhner)。細胞をペレット化し(4000rpm×10分)、上清を廃棄し、分析の前に細胞を-80℃で凍結させた。

HTP細胞ペレットの溶解

【0192】

E.coli細胞ペレットを溶解緩衝液(150mMのNaClを含む20mMのリン酸ナトリウム(pH8)中1mg/mLのリゾチーム+0.5g/LのPMBS)250μLで溶解した。混合物を室温で2時間攪拌し、ペレット化し(4000rpm×10分)、その後、清澄化ライセートを本明細書に記載のHTPアッセイにおいて使用した。

清澄化ライセートのHTP活性分析

【0193】

チロシンまたはフェニルアラニンに関するTALバリエーションの活性を、290nmでの吸光度の経時的な変化によって決定した場合、それぞれ、クマル酸または桂皮酸の形成を測定することによってアッセイした。200mMのリン酸ナトリウムおよび40μLの清澄化ライセート中に溶解した2.5mMのチロシンまたはフェニルアラニン160μLを96ウェルUV-STAR(登録商標)プレート(Greiner Bio-One)に添加することによって、反応物を調製した。反応物を短時間に混合し、SPECTRAMAX(登録商標)Plus 384またはSPECTRAMAX(登録商標)190(Molecular Devices)の吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmでの吸光度を経時的に(10分にわたって14~37秒ごとに)追跡することによって活性を決定した。チロシンに関する活性を、表1-1に示したように、配列番号4、2、6、および8について検出した。一部の酵素は、フェニルアラニンに関しても検出可能な活性を有した。

10

20

30

40

50

【表 1】

表1-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエントの活性 ¹		
配列番号 (nt/aa)	2 mM Tyr 活性	2 mM Phe 活性
1/2	++++	
3/4	++	
5/6	+++	
7/8	+	+
¹ 初期活性のレベル(ミリ吸光度単位/分)は以下のように定義する:「+」>10; 「++」>20;「+++」>50;および「++++」>100。		

10

(実施例 2)

振盪フラスコ粉末 (SFP) の生産および TAL および TAL バリエントに関する特徴付けアッセイ

【0194】

20

この実施例では、チロシンアンモニアリアーゼ活性を有する TAL 酵素の振盪フラスコ粉末の調製および特徴付けのために使用する方法について記載する。

振盪フラスコ粉末 (SFP) の生産

【0195】

TAL バリエントを含有するプラスミドで形質転換した *E. coli* の培養物を 1% のグルコース、一部の事例では 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールを含む LB 寒天プレート上にプレーティングし、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩成長させた。各培養物から単一のコロニーを、1% のグルコースおよび 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールを含む 5 mL のルリアブロス (LB) に適宜移した。培養物を 250 rpm で、30 $^{\circ}\text{C}$ で 18 時間成長させ、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールを含む 250 mL の TB 中におよそ 1:50 で継代培養した。培養物を 250 rpm で、30 $^{\circ}\text{C}$ でおよそ 3~4 時間、OD₆₀₀ が 0.6~0.8 となるまで成長させ、1 mM の IPTG で誘導した。培養物を 250 rpm で、30 $^{\circ}\text{C}$ で 20 時間成長させた。遠心分離 (7000 rpm $\times$ 10 分、4 $^{\circ}\text{C}$) によって細胞を収集し、上清を廃棄した。ペレットを、一部の事例では、150 mM の NaCl を含む 20 mM のリン酸ナトリウム (pH 8.0) 30 mL 中に再懸濁させ、110 psi でマイクロフリューダイザー (Microfluidics) に 1 回通過させて溶解した。ライセートをペレット化し (10,000 $\times$ rpm、30 分、4 $^{\circ}\text{C}$)、再度ペレット化する (10,000 $\times$ rpm、1 時間、4 $^{\circ}\text{C}$) 前に、上清を水槽中で 60~65 $^{\circ}\text{C}$ で 1~2 時間加熱した。次いで、得られた上清を凍結および凍結乾燥させ、発現した酵素を含有する粉末を生成した。

30

40

チロシンおよびフェニルアラニンへの活性に関する SFP 特徴付けアッセイ

【0196】

10~20 g/L の粉末を得るために振盪フラスコ粉末を再構成し、0.08~10 g/L まで段階的に希釈した。次いで、これらのストック 20 μL を 96 ウェル UV-STAR (登録商標) プレート (Greiner Bio-One) 中 200 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 中に溶解した 2.5 mM のチロシンまたはフェニルアラニン 180 μL に添加した。反応物を短時間に混合し、SPECTRAMAX (登録商標) Plus 384 または SPECTRAMAX (登録商標) 190 (Molecular Devices) の吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 nm での吸光度を経時的に (5 分にわたって 14~37 秒ごとに) 追跡することによって活性を決定した。配列番

50

号 2 および 6 に関する結果を表 2-1 に示す。

【0197】

一部の場合には、フェニルアラニンに関する T A L 酵素の活性は、より長期間にわたって測定した。希釈した振盪フラスコ粉末溶液 20 μ L を 200 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 中に溶解した 2.5 または 12.5 mM のフェニルアラニン 180 μ L に添加することによって、反応物を調製した。反応物を短時間に混合し、このアッセイを水中で 10 倍希釈し、S P E C T R A M A X (登録商標) P l u s 384 または S P E C T R A M A X (登録商標) 190 (M o l e c u l a r D e v i c e s) の吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 nm での吸光度を測定することによって、初期吸光度を決定した。T H E R M O T R O N (登録商標) (I N F O R S) のタイタープレート振盪機 (400 rpm) 中 37°C で 1~4 時間のインキュベーション後に、最終吸光度を同様にして測定した。最終吸光度から初期吸光度を減算することによって活性を決定した。

10

プロテアーゼに対する耐性に関する S F P 特徴付けアッセイ

【0198】

代表的なプロテアーゼに対する進化した酵素の相対的安定性を評価するために、ブタトリプシン (S i g m a A l d r i c h) とウシキモトリプシン (S i g m a A l d r i c h) の混合物を 100 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 中に、それぞれの濃度が 8 g/L となるまで溶解し、段階的に 2 倍希釈した。次いで、0.5~1 g/L の T A L の S F P を T H E R M O T R O N (登録商標) (I N F O R S) タイタープレート振盪機中で 400 rpm で 37°C で 1~2 時間、0~4 g/L とインキュベートした。インキュベーション後に、20~40 μ L のプロテアーゼで処理した S F P を 200 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 中に溶解した 2.5 mM のチロシン 160~180 μ L に添加し、上記のように酵素初期活性を測定した。対照 (すなわち、プロテアーゼ処理なし) 試料に対して残存する活性のパーセンテージとしてプロテアーゼ耐性を計算した。配列番号 2 および 6 に関する結果を表 2-1 に示す。

20

pH 耐容性に関する S F P 特徴付けアッセイ

【0199】

酸性 pH に対する進化した酵素の相対的耐容性を評価するために、S F P を再構成して 10 g/L の粉末を得て、M c I l v a i n e 緩衝液 (pH 4.0~7.0) 中に 10 倍希釈した。混合物を T H E R M O T R O N (登録商標) (I N F O R S) タイタープレート振盪機中で 37°C で 1 時間、400 rpm で 1~1.5 時間インキュベートした。インキュベーション後に、酵素溶液を短時間に遠心分離し、溶液 20 μ L を 200 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 中に溶解した 2.5 mM のチロシン 180 μ L に添加した。上記のように酵素活性を決定し、対照 (すなわち、pH 7.0) 試料に対する残存する活性のパーセンテージとして pH 耐容性を計算した。

30

動態パラメーターの決定に関する S F P 特徴付けアッセイ

【0200】

T A L バリエーションの変異が動態を変更したかどうかを評価するために、M i c h a e l i s 定数 (K_m) および最大速度 (V_{max}) を各バリエーションについて決定した。アッセイするために、1 g/L に希釈した T A L バリエーション 20 μ L および 2 倍に段階的に希釈したチロシン (200 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 中 0~2.48 mM のチロシン) 180 μ L を 96 ウェル U V - S T A R (登録商標) プレート (G r e i n e r B i o - O n e) のウェルに添加した。反応物を短時間に混合し、S P E C T R A M A X (登録商標) P l u s 384 または S P E C T R A M A X (登録商標) 190 (M o l e c u l a r D e v i c e s) の吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 nm での吸光度を経時的に (5 分にわたって 14~37 秒ごとに) 追跡することによって活性を決定した。それぞれ試験した T A L バリエーションに関する V_{max} および K_m は、データを非線形回帰を使用するミカエリスメンテン式に当てはめることによって決定した。配列番号 2 および 6 に関する結果を表 2-1 に示す。

40

50

熱安定性に関する S F P 特徴付けアッセイ

【 0 2 0 1 】

改善された熱安定性は、酵素治療薬の製造および保存に有用な貴重な形質であり、他の安定化の試みの副産物として生じることが多い。本発明の開発中に生じたバリエーションの相対的安定性を評価するために、バリエーションの熱安定性を以下のように評価した：1 g / L の T A L バリエーション 1 0 0 μ L を、サーモサイクラー中 6 0 ~ 8 0 ° C で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後に、試料を短時間に遠心分離し、熱処理した S F P 2 0 μ L を 2 0 0 m M のリン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中に溶解した 2 . 5 m M のチロシン 1 8 0 μ L に添加した。上記のように酵素活性を決定し、対照 (すなわち、6 0 ° C) 試料に対する残存する活性のパーセンテージとして熱安定性を計算した。配列番号 2 および 6 に関する結果を表 2 - 1 に示す。

10

【表 2】

表2-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエーションの活性				
配列番号 (nt/aa)	Tyr Vmax (mAU/ 分) ¹	Tyr Km (mM) ²	プロテアーゼ耐性 (0.5g/Lプロテアーゼでの%残存活性)	熱安定性 (60°Cでの%残存活性)
1/2	+++	+	+	+++
5/6	+	++		++++
¹ Tyr Vmaxは以下のように定義される:「+」=0.5~1;「++」>1;および「+++」>5。 ² Tyr Kmは以下のように定義される:「+」=0.15~0.05;および「++」<0.05。プロテアーゼおよび熱安定性負荷に関する%残存活性は以下のように定義される:「+」=5~50%;「++」>50%;「+++」>75%;および「++++」>90%。				

20

(実施例 3)

配列番号 2 の T A L バリエーション

【 0 2 0 2 】

この実施例では、改善されたチロシン活性およびフェニルアラニン活性についての、配列番号 2 に由来する T A L バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 1 にコードされた T A L の定向進化を当技術分野で公知の方法を使用して、バリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

30

清澄化ライセートの H T P 活性分析：

【 0 2 0 3 】

T A L バリエーションを発現する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 1 に記載したように実施した。チロシンおよびフェニルアラニンに関する T A L バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 1 に記載したようにアッセイした：水中で 1 0 倍希釈した H T P ライセート 2 0 μ L を 2 . 2 m M のチロシンで 5 分間アッセイし、希釈していない H T P ライセート 2 0 μ L を 0 . 1 m M のチロシンで 1 0 分間アッセイし、希釈していない H T P ライセート 5 0 μ L を 1 0 . 5 m M のフェニルアラニンで 1 0 分間アッセイした。アッセイの結果を表 3 - 1 に示す。これらの結果に基づき、さらなる定向進化のために配列番号 1 4 を選択した。

40

50

【表 3】

表3-1 様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエントの相対的活性(配列番号2と比較) ¹			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2と比較)	2 mM Tyr FIOPC (配列番号2 と比較)	2 mM Phe FIOPC (配列番号2 と比較)
9/10	N99H/V107A/Y184S	+	+++
11/12	S79T/V107S/P410K	+	++++
13/14	K95A/V107A/Y184S	++	++++
15/16	S79T/P410K	+	+++
17/18	V107S/A401P/A534S	+	+++
19/20	S79T/K95A/V107S	+	++++
21/22	S79T/V107S	+	+++
23/24	K95A/Y184S/A534S	+	+++
25/26	V107A/Y184S/A534S	++	+++
27/28	K95A/V107S/Y184S/A534S	++	+++
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号2と比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;「+++」>2;および「++++」>4。			

10

20

(実施例 4)

配列番号 14 の T A L バリエント

【0204】

この実施例では、改善されたチロシン活性、フェニルアラニン活性、およびプロテアーゼ耐性についての、配列番号 14 に由来する T A L バリエントの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 13 にコードされた T A L の定向進化をバリエントの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

30

T A L 酵素を発現する培養物のハイスループット (H T P) 成長

【0205】

1%のグルコースを含有する L B 寒天プレート上にプレーティングすることによって、形質転換した E . c o l i 細胞を選択した。37℃で一晩のインキュベーション後に、1%のグルコースを補充した 180 μ L / ウェルの L B 培地で満たした N U N C (商標) (T h e r m o - S c i e n t i f i c) の 96 ウェル浅型平底プレート上にコロニーをピックアップした。培養物をシェーカー中で 18 ~ 20 時間、一晩成長させた (200 r p m、30℃、および相対湿度 85%; K u h n e r)。一晩成長させた試料 (20 μ L) を 30 μ g / m L のクロラムフェニコールを補充した 380 μ L の T B で満たした C o s t a r の 96 ウェル深型プレート中に移した。培養物をシェーカー中で 2 ~ 3 時間インキュベートし (250 r p m、30℃、および相対湿度 85%; K u h n e r)、次いで、滅菌水中 10 m M の I P T G 40 μ L で誘導し、シェーカー中で 20 ~ 24 時間一晩インキュベートした (250 r p m、30℃、および相対湿度 85%; K u h n e r)。細胞をペレット化し (4000 r p m × 10 分)、上清を廃棄し、分析の前に細胞を -80℃で凍結させた。

40

H T P 細胞ペレットの溶解

50

【0206】

E. coli 細胞ペレットを溶解緩衝液（150mMのNaClを含む20mMのリン酸ナトリウム（pH8）中1mg/mLのリゾチーム+0.5g/LのPMBS）400μLで溶解した。混合物を室温で1.5～2時間攪拌し、ペレット化し（4000rpm×10分）、その後、清澄化ライセートをHTPアッセイにおいて使用するか、またはTHERMOTRON（登録商標）（INFORS）タイタープレート振盪機（400rpm）中で65℃で2時間ブレインキュベートした。熱処理したライセートをペレット化し（4000rpm×10分）、上清をHTPアッセイにおいて使用した。

清澄化ライセートのHTP活性分析

【0207】

290nmでの吸光度の経時的な変化によって決定したクマル酸の形成を測定することによって、TALバリエーションの活性をアッセイした。200mMのリン酸ナトリウム、0.125または2.5mMのチロシン（pH7.0）180μL、および熱処理した清澄化ライセート（希釈していない0.125mMのチロシンまたは5倍希釈した2.5mMのチロシン）20μLを96ウェルUV-STAR（登録商標）プレート（Greiner Bio-One）に添加することによって反応物を調製した。反応物を短時間に混合し、SPECTRA（登録商標）Plus 384またはSPECTRAMAX（登録商標）190（Molecular Devices）の吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmでの吸光度を経時的に（5分にわたって14～37秒ごとに）追跡することによって活性を決定した。これらのアッセイの結果を表4-1に示し、さらなる定向進化のために配列番号86を選択した。

【0208】

290nmでの吸光度の経時的な変化によって決定した桂皮酸の形成を測定することによって、フェニルアラニンに関するTALバリエーションの活性をアッセイした。200mMのリン酸ナトリウム、12mMのフェニルアラニン（pH7.0）160μL、および熱処理した清澄化ライセート40μLを96ウェルUV-STAR（登録商標）プレート（Greiner Bio-One）に添加することによって反応物を調製した。反応物を短時間に混合し、SPECTRAMAX（登録商標）Plus 384またはSPECTRAMAX（登録商標）190（Molecular Devices）の吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmでの吸光度を測定することによって、初期吸光度を決定した。THERMOTRON（登録商標）（INFORS）タイタープレート振盪機（400rpm）中で37℃で1.5～3時間のインキュベーション後に、同様の様式で最終吸光度を測定した。最終吸光度から初期吸光度を減算することによって活性を決定し、結果を表4-1に示す。

プロテアーゼで前処理した清澄化ライセートのHTP活性分析

【0209】

TALバリエーションにキモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、下腸の環境を刺激した。最初に、100mMのリン酸ナトリウム（pH7.0）中50μLのプロテアーゼミックス（0.25mg/mLのキモトリプシン（Sigma Aldrich）、0.25mg/mLのトリプシン（Sigma Aldrich））および熱処理した清澄化ライセート50μLを96ウェル丸底プレート（Costar）に添加した。プレートを密封し、分析の前に、THERMOTRON（登録商標）（INFORS）タイタープレート振盪機（400rpm）中で37℃で1時間インキュベートした。96ウェルUV-STAR（登録商標）プレート（Greiner Bio-One）中で、プロテアーゼ処理したライセート40μLを200mMのリン酸ナトリウム、2.5mMのチロシン（pH7.0）160μLに添加することによって、残存する活性を決定した。反応物を短時間に混合し、実施例3に記載したように活性を決定した。このアッセイの結果を表4-1に示す。

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表4-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号14と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号14と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	10 mM Phe FIOPC
29/30	K33D/K34E/Q37S/T90S/K554Q	++	+++	++	++
31/32	A289R/K554Q	++	++	++	++
33/34	K33D/Q66N/A289R/K554Q	++	+++	++	++
35/36	K34E/L46R	+++	+++	++	++
37/38	K33D/Q66N/A289R	++	++	++	++
39/40	K33D/K34E/T90S/A289R/K554 Q	++	+++	++	++
41/42	K33D/Q66N	++	++	++	++
43/44	K34E/T90S/A289R/K554Q	++	++	++	++
45/46	K34E/K56G/T90S/A289R	++	++	++	++
47/48	Q66N/T90S/Q279D/A289R/K55 4Q	++	++	++	++
49/50	T90S/A289R/K554Q	++	++	++	++
51/52	K34E/Q66N/A289R	++	++	++	++
53/54	K33D/K34E/Q37S/L46R/Q279S /K554Q	++	+++	++	++
55/56	K33D/K34E/L46R/Q66N/T90S/ A289R	++	++	++	++
57/58	K34E/Q37R/L46R/A289R	++	+++	++	++
59/60	K33D/K34E/Q279S/A289R	++	+++	++	++
61/62	K34E/K56G/T90S	++	++	++	++
63/64	K34E/Q37S/Q66N/Q279S/A289 R	++	++	++	++
65/66	Q279S/A289R/K554Q	++	++	++	++
67/68	T90S/A289R/A519P	++	++	++	+
69/70	K34E/T90S/A519P	++	++	++	++
71/72	Q66N/T90S/A289R/K554Q	++	++	++	++
73/74	A289R/A519P/K554Q	++	++	++	++
75/76	L46R/Q66N/A289R/A519P/K55 4Q	++	++	++	++
77/78	S79T/E304G/L361M	++	+++	++	+
79/80	S79T/Q111K/N531D	++	+++	++	++
81/82	S79T/S407V/L461M	++	+++	+	++
83/84	S79T/Q111K/Y234H/L361M/C5 00T	++	++++	+	++

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

表4-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号14と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号14と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	10 mM Phe FIOPC
85/86	S70K/S79T/Y234H/L361M/S407V	++	++++	+	++
87/88	E304G/L361M	++	+++	++	+
89/90	S79T/E304G/L461M/N531D	++	+++	++	+
91/92	S70K/E304G/S407V/L461M	++	+++	++	++
93/94	S79T/Q111K/Y234H/N531D	++	+++	++	++
95/96	A36V/S407V/L461M/C500T/N531D	++	++	++	++
97/98	A36V/Q111K/E304G/L461M/N531D	++	++	++	+
99/100	L461M/C500T	++	++	++	++
101/102	S70K/Q111K/L461M/C500T/N531D	++	+++	++	++
103/104	L361M/C500Q/N531D	++	++	++	+
105/106	A36V/S79T/S407V/L461M/C500T/N531D	++	++++	++	++
107/108	A36V/S70K/Y234H/R302M/L461M/C500T	++	+++	++	
109/110	A36V/S79T	+	+++	+	++
111/112	A36V/S79T/E304G/S407V	+	+++	++	+
113/114	N531D	++	++	++	++
115/116	S79T/Q111K/L361M	++	++++	++	++
117/118	S548R	++	+++	++	++
119/120	A544E	++	+++	++	++
121/122	K28G	+++	+++	+++	++
123/124	E522K	++	++++	++	++
125/126	A540R	++	+++	++	++
127/128	A544G	++	+++	++	++
129/130	T547S	++	+++	++	++
131/132	Q558A	++	++	++	++
133/134	A544S	++	+++	+++	++
135/136	R524Y	++	++	++	++
137/138	L295Q	+++	++	+++	+
139/140	T547C	++	++	++	++
141/142	L541A	++	+++	++	++
143/144	I491V	++	++	++	++
145/146	E522G	++	+++	++	++
147/148	Q66S	++	++	++	++
149/150	S548Q	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

表4-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号14と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号14と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	10 mM Phe FIOPC
151/152	K518E	++	+++	++	++
153/154	P29E	++	+++	++	++
155/156	E522R	++	++++	++	++
157/158	T547Q	+++	+++	++	++
159/160	S548T	++	+++	++	++
161/162	K490I	+++	++	+++	++
163/164	K518V	+++	+++	++	++
165/166	V88Q	+++	++	+++	++
167/168	E522V	++	+++	++	++
169/170	K201R	++	++	++	++
171/172	K554S	++	+++	++	++
173/174	K28N	++	+++	++	++
175/176	K28C	++	+++	++	++
177/178	A278S	++	++	++	++
179/180	I491L	++	++	++	++
181/182	K33N	++	+++	++	++
183/184	P29R	++	++	++	++
185/186	A540E	++	+++	++	++
187/188	R524Q	+++	+++	+++	++
189/190	T547A	+++	+++	++	++
191/192	H131M	+++	++	+++	++
193/194	S548K	++	+++	++	++
195/196	E522Y	++	++	++	++
197/198	P29A	++	++	++	++
199/200	K554Y	++	++	++	+
201/202	V560R	++	++	++	++
203/204	K490A	+++	++	+++	++
205/206	T49N	++	+++	++	++
207/208	K28A	++	++	++	++
209/210	T547K	++	+++	++	++
211/212	A519Q	++	+++	+++	++
213/214	L46R	++	++	++	++
215/216	R524A	++	++	++	++
217/218	Q558H	++	++	++	++
219/220	R524T	++	++	++	++
221/222	Q66R	+++	+++	+++	++
223/224	V88E	+++	++	++	+
225/226	Q37A	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

表4-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエントの相対的活性(配列番号14と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号14と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	10 mM Phe FIOPC
227/228	S548A	++	++	++	++
229/230	V560T	++	++	++	++
231/232	P272S	++	++	++	++
233/234	A519L	++	++	++	++
235/236	K490V	++	++	++	++
237/238	K554R	++	+++	++	++
239/240	L510K	++	+++	++	++
241/242	T547G	++	++	++	++
243/244	S548G	++	+++	++	++
245/246	R524L	+++	+++	+++	++
247/248	Q558S	+++	+++	++	++
249/250	T547R	+++	+++	+++	++
251/252	N557E	+++	+++	+++	+++
253/254	T49D	+++	+++	+++	+++
255/256	E72T	+++	++	++	+
257/258	Q558D	+++	+++	+++	+++
259/260	V560G	++	++	++	++
261/262	E523D	++	+++	++	++
263/264	P29G	++	++	++	+++
265/266	E523I	+	+	+	+
267/268	A519E	+++	+++	++	++
269/270	E523S	++	++	++	++
271/272	K554E	++	+++	++	++
273/274	L46T	++	++	++	++
275/276	R524I	+++	++	++	++
277/278	Q305H	+++	++	+++	++
279/280	V560M	++	+++	++	++
281/282	Q142R	++	++	++	++
283/284	A519D	++	++	++	++
285/286	E523A	++	++	++	++
287/288	E523H	++	++	++	++
289/290	H131S	++	++	++	++
291/292	K28T	++	++	++	++
293/294	H131W	++	++	++	++
295/296	A69S	++	++	++	++
297/298	K490S	++	+	++	++
299/300	P29W	++	++	++	++
301/302	A519P	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

表4-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエントの相対的活性(配列番号14と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号14と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	10 mM Phe FIOPC
303/304	Q37D	+++	+++	+++	+++
305/306	H131G	+	+++	++	++++
307/308	A350G	+++	+++	++	++
309/310	K56R	++	++	++	++
311/312	E198R	+	+	++	+
313/314	S521D	+++	+++	++	++
315/316	Q499T	++	++	++	++
317/318	K56G	+++	+++	+++	+++
319/320	N557R	++	++	++	++
321/322	A544R	+++	+++	++	++
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号14と比較して決定した。増加した活性 のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.1;「++」>1.1;「+++」>2;および「++++」>3					

10

20

(実施例 5)

配列番号 86 の T A L バリエント

【0210】

この実施例では、改善されたチロシン活性、フェニルアラニン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 86 に由来する T A L バリエントの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 85 にコードされた T A L の定向進化を当技術分野で公知の方法を使用して、バリエントの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

30

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0211】

T A L バリエントを発現する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンおよびフェニルアラニンに関する T A L バリエントの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした：水中で 4 または 5 倍希釈した H T P ライセート 20 μ L を 2 . 2 m M のチロシンで 5 分間アッセイし、希釈していない H T P ライセート 20 μ L を 0 . 1 m M のチロシンで 5 分間アッセイし、希釈していない H T P ライセート 20 μ L を 10 . 8 m M のフェニルアラニンで 2 時間アッセイした。アッセイの結果を表 5 - 1 に示す。さらなる定向進化のために配列番号 334 を選択した。プロテアーゼで前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

40

【0212】

T A L バリエントにキモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、熱処理した清澄化ライセート 50 μ L を 100 m M のリン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 8 m g / m L のキモトリプシン (S i g m a A l d r i c h) および 8 m g / m L のトリプシン (S i g m a A l d r i c h) からなるプロテアーゼミックス 50 μ L と共にインキュベートした。チロシンに関する残存する活性を実施例 4 に記載したように測定し、このアッセイの結果を表 5 - 1 に示す。

酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0213】

T A L バリエントに酸性緩衝液を負荷し、胃環境を刺激した。最初に、M c I l v a i n

50

e 緩衝液 (pH 4 または 4.2) 50 μ L および熱処理した清澄化ライセート 50 μ L を 96 ウェル丸底プレート (Costar) に添加した。プレートを密封し、分析の前に、THERMOTRON (登録商標) (INFORS) タイタープレート振盪機 (400 rpm) 中で 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後に、ライセート溶液を短時間に遠心分離し、96 ウェル UV-STAR (登録商標) プレート (Greiner Bio-One) 中で、酸性緩衝液で処理したライセート 40 μ L を 200 mM のリン酸ナトリウム、2.5 mM のチロシン (pH 7.0) 160 μ L に添加することによって、残存する活性を決定した。反応物を短時間に混合し、実施例 4 に記載したように活性を決定した。このアッセイの結果を表 5-1 に示す。

【表 5-1】

10

表5-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号86と比較) ¹						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号86 と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	10 mM Phe FIOPC
323/324	K33D/K34E/Q66N/A289R/E522 K/N531D	++	++	++	++++	++
325/326	K33D/K34E/K70S/H234Y/A289 R/A519P	++	++	++	++++	++
327/328	K34E/Q66N/K70S/H234Y/K518 V/A519P/T547Q	+++	+++	++	++++	++
329/330	K33N/K34E/T49N/H234Y/N531 D/T547Q/K554Q	++	++	++	++++	++
331/332	K34E/Q66N/N531D/K554Q	+++	+++	++	+++	++
333/334	K34E/A289R/E522K/A544E/K55 4Q	+++	++	+++	++++	++
335/336	K33D/K34E/K70S/H234Y/K518 V/A519P/T547Q/K554Q	++	++	++	+++	++
337/338	Q66N/K70S/H234Y	++	++	+	+++	+
339/340	K34E/H234Y/E522K/K554Q	++	++	+++	++++	++
341/342	K34E/K70S/A289R/E522K	++	++	++	++	+
343/344	K34E/A289R	++	++	++	+++	++
345/346	H234Y/N531D/A544E/T547Q	++	++	++	+++	++

20

30

40

50

【表 5 - 2】

表5-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関するTALバリエントの相対的活性(配列番号86と比較) ¹						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号86と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテアーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	10 mM Phe FIOPC
347/348	K33D/K34E/Q66N/K70S/A519P/N531D	+++	+++	+	+++	++
349/350	K34E/T49N/Q66N/N531D	+++	++	++	+++	++
351/352	K34E/K70S/H234Y/A289R/E522K	++	++	++	++++	+
353/354	K28N/K34E/T49N/K70S/H234Y/A289R/A544E/K554Q	+++	++	++	+++	++
355/356	K33D/K34E/K70S/A289R/E522K/K554Q	+++	++	++	+++	++
357/358	K33D/K34E/A289R/E522K/N531D	+++	++	++	++++	++
359/360	K34E/K70S/H234Y/K554Q	+++	++	++	++++	++
361/362	K34E/T49N/A289R/A544E/T547Q	+++	++	+++	+++	++
363/364	K34E/A289R/E522K/N531D	+++	+++	++	++++	++
365/366	K34E/Q66N/K554Q	+++	++	+++	+++	++
367/368	K34E/A544E	++	++	+++	+++	++
369/370	K34E/T49N/H234Y/N531D/K554Q	+++	+++	+++	++++	++
371/372	K34E/E522K	++	++	+++	+++	++
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号86と比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;「+++」>2;および「++++」>3。						

10

20

30

(実施例 6)

配列番号 334 の T A L バリエント

40

【0214】

この実施例では、改善されたチロシン活性、フェニルアラニン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 334 に由来する T A L バリエントの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 333 にコードされた T A L の定向進化をバリエントの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0215】

T A L バリエントを発現する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載

50

したように実施した。チロシンに関するTALバリエーションの活性を以下の条件で、実施例4に記載したようにアッセイした：水中で4～10倍希釈したHTPLyセート20μLを2.2mMのチロシンで5分間アッセイし、希釈していないHTPLyセート20μLを0.1mMのチロシンで5分間アッセイした。フェニルアラニンに関するTALバリエーションの活性を以下の条件で、実施例1および4に記載したようにアッセイした：希釈していないHTPLyセート20μLを2.2mMのフェニルアラニンで室温で5分間または37℃で1～3時間アッセイした。アッセイの結果を表6-1に示す。さらなる定向進化のために配列番号388を選択した。

プロテアーゼで前処理した清澄化ライセートのHTP活性分析

【0216】

TALバリエーションに、実施例4に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、熱処理した清澄化ライセート50μLを8g/Lのプロテアーゼミックス50μLと37℃で1時間または4g/Lのプロテアーゼミックス50μLと共に37℃で2時間インキュベートした。96ウェルUV-Star（登録商標）プレート（Greiner Bio-One）中で、プロテアーゼ処理したライセート20μLを200mMのリン酸ナトリウム、2.5mMのチロシン（pH7.0）180μLに添加することによって、残存する活性を決定した。反応物を短時間に混合し、実施例4に記載したように活性を決定した。このアッセイの結果を表6-1に示す。

酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートのHTP活性分析

【0217】

TALバリエーションに、実施例5に記載したように、酸性緩衝液を負荷し、熱処理した清澄化ライセート50μLをMcIlvaine緩衝液（pH4）50μLと共にインキュベートした。実施例5に記載したように残存する活性を決定し、このアッセイの結果を表6-1に示す。

【表6-1】

表6-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号334と比較) ¹						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号334と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	2 mM Phe FIOPC
373/374	I336V	++	++	+	++	+
375/376	L506R	++	+	+	+	+
377/378	A43T/S59A/L93Q/L506R	+	+	+	+	+
379/380	Q237R/N238V/L506R	+	+	+	+	+
381/382	A65N/I336V	++	+	+	+	+
383/384	P306L/L506R	++	+	+	++	+
385/386	A43T/P306L	++		+	++	+

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

表6-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号334と比較) ¹						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号334 と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	2 mM Phe FIOPC
387/388	L93Q/L506R	+	++	+	+	+
389/390	P306L	++	+	+	++	+
391/392	A43T/P306L/L506R	+		+	+	+
393/394	R103W/P306L/L506R	+	+	+	++	+
395/396	K56G/H234Y/C500T	+	++	+	++	+
397/398	Q37D/T49N/K56G/C500T/R524Q	++	++	+	+	+
399/400	Q66N	++	++	++	++	+
401/402	Q37D/T49N/Q111K/R524Q	++	+	++	++	+
403/404	Q66N/Q111K/H234Y/C500T	+	++	+	+	+
405/406	T49N/K56G/Q66N/Q111K/T153N/H234Y/C500T/R524Q	+	+	+	++	+
407/408	Q37D/Q111K	++	++	+	+	+
409/410	H234Y	++		++	++	+
411/412	Q37D/H234Y	+	+	+	++	+
413/414	Q37D/T49N/Q66N/Q111K/H234Y	+	++	+	+	+
415/416	Q111K/M361L	++		+	++	+
417/418	Q558D	+	++	+	++	+
419/420	T49N/Q66N	++	+	+	++	+
421/422	Q37D/T49N/K56G/Q66N/Q111K	+	+	+	++	+
423/424	M361L/R524Q/N557E/Q558D	+	+	+	+	+
425/426	Q37D/T49N/K56G/H234Y/N557E	++	+	+	++	+
427/428	Q37D/Q111K/M361L/C500T/N557E/Q558D	++	++	++	++	+
429/430	Q111K/H234Y/S548K/Q558D	++	++	++	+	+
431/432	H234Y/R524Q	++	++	++	+	+

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

表6-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号334と比較) ¹						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号334と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテアーゼ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	2 mM Phe FIOPC
433/434	K56G/Q111K/H234Y	++	+	++	++	+
435/436	T421S	++		++	+	+
437/438	A107T/G417A/T421A	+				+
439/440	G417A/T421S	++	++	+	+	++
441/442	A107T	++	+	++	++	+
443/444	R103W/T421S		+	+	+	++
445/446	A172S					+
447/448	R103W/A107T/G417A/T421S	+	+	+	++	+
449/450	R103W		+	+	+	+
451/452	Y104F/H105M					++++
453/454	A504R	+	+	+	+	+
455/456	S328A	+	+	+	+	+
457/458	E145V	+	+	+	+	+
459/460	Q471Y	+	+	+		+
461/462	R103L	+	+	+	+	++
463/464	G549D	+	+	+	+	+
465/466	C61V		++	+		+
467/468	E304N		++			+
469/470	V407T	+		+	+	+
471/472	L211K	+				+
473/474	H155S	+	+	+	+	+
475/476	T146K	+	+	++	+	+
477/478	A95K	+	+	+	+	
479/480	A65M			+		+
481/482	A286Q	+	+	+	+	+
483/484	A95V	+		++	+	+
485/486	T31S	+	+	+		+
487/488	P197T	+		+		+
489/490	V407K	+	+	+		+

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

表6-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号334と比較) ¹						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号334と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテアーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	2 mM Phe FIOPC
491/492	H155L	+	+	+		+
493/494	A286R	+		+		+
495/496	L506V	+	+	++	+	+
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号334と比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;「+++」>2;および「++++」>3。						

10

(実施例 7)

配列番号 388 の T A L バリエーション

【0218】

この実施例では、改善されたチロシン活性、フェニルアラニン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 388 に由来する T A L バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 387 にコードされた T A L の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

20

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0219】

T A L バリエーションを発見する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する T A L バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした: 水中で 10 倍希釈した H T P ライセート 20 μ L を 2 . 2 mM のチロシンで 5 分間アッセイし、希釈していない H T P ライセート 20 μ L を 0 . 1 mM のチロシンで 5 分間アッセイした。フェニルアラニンに関する T A L バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした: 希釈していない H T P ライセート 20 μ L を 2 . 2 mM のフェニルアラニンで室温で 5 分間または 37 °C で 2 時間アッセイした。アッセイの結果を表 7 - 1 に示す。さらなる定向進化のために配列番号 604 を選択した。

30

プロテアーゼで前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0220】

T A L バリエーションに、実施例 4 に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、熱処理した清澄化ライセート 50 μ L を 8 g / L のプロテアーゼミックス 50 μ L と共に 37 °C で 2 時間インキュベートした。実施例 6 に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 7 - 1 に示す。

40

酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0221】

T A L バリエーションに、実施例 5 に記載したように、酸性緩衝液を負荷し、熱処理した清澄化ライセート 50 μ L を M c I l v a i n e 緩衝液 (pH 4) 50 μ L と共にインキュベートした。96 ウェル U V - S t a r (登録商標) プレート (G r e i n e r B i o - O n e) 中で、酸性緩衝液で処理したライセート 20 μ L を 200 mM のリン酸ナトリウム、2 . 5 mM のチロシン (pH 7 . 0) 180 μ L に添加することによって、残存する活性を決定した。反応物を短時間に混合し、実施例 4 に記載したように活性を決定した。

50

このアッセイの結果を表 7 - 1 に示す。

【表 7 - 1】

表7-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号388と比較) ¹						
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号388 と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	2 mM Phe FIOPC
497/498	Q66N/R103L/E145V/H234Y/ T421S	++	++	++	++++	++
499/500	S59A/E145V	++	++	++	++++	++
501/502	T49N/S59A/Q66N/Q111K/E1 45V/H234Y	++	+++	++	++++	+
503/504	Q111K/E145V/H234Y	++	++	++	++++	+
505/506	K56G/Q66N/E145V/C500T	++	++	++	++++	+
507/508	K56G/S59A/Q66N/H234Y	++	+++	++	++++	++
509/510	R103L/Q111K/E145V/H234Y /T421S	++	++	++	++++	++
511/512	Q111K/H234Y	++	++	++	++++	++
513/514	K56G/S59A/Q111K/E145V/H 234Y/T421S	++	++	++	++++	++
515/516	T49N/K56G/S59A/H234Y/C5 00T	++	+++	++	++++	++
517/518	S59A/H234Y	++	++	++	++++	++
519/520	E145V/H234Y/C500T	++	++	++	++++	+
521/522	K56G/R103L/Q111K/E145V/ H234Y/C500T	++	+++	++	++++	++
523/524	Q37D/R103L/Q111K/E145V/ T421S/C500T/R524Q	++	++	++	++++	++
525/526	K56G/S59A/Q111K/E145V	++	++	++	++++	+

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

表7-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号388と比較) ¹						
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号388 と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	2 mM Phe FIOPC
527/528	S59A/R103L/E145V/H234Y/ T421S/C500T	++	++	++	++++	++
529/530	T49N/S59A/E145V/H234Y/T 421S	++	++	++	++++	++
531/532	Q37D/T49N/K56G/S59A/E14 5V	++	+++	++	++	++
533/534	S59A/R103L/H234Y/T421S	++	++	++	++++	++
535/536	C61V/V407T	+	++	+		++
537/538	A286Q/S328A/V407T/A504R /G549D	++	++	++	++++	+
539/540	C61V/S328A/A504R	+	++	+	++++	++
541/542	A95K/V407T	++	++	++		+
543/544	T31S/A95K/A286Q/A504R/G 549D	++	++	+	++++	+
545/546	C61V/A95K/S328A/V407T	++	+++	++	++	+
547/548	T31S/A95K/S328A/A504R	++	++	++	+	+
549/550	C61V/A95K/V407T	++	+++	++	++	++
551/552	G549D	++	++	+	++++	++
553/554	A95K/A286Q	++	++	++		+
555/556	C61V/A504R	+	++	+	++++	++
557/558	A95K/A286Q/S328A/A504R	++	++	++	++++	+
559/560	A95K/H155S/A286Q/G549D	++	++	++	++++	+
561/562	T31S/A95K/H155S/A286Q/A 504R/G549D	++	++	++	++++	+
563/564	T31S/A95K/G549D	++	++	++	++++	+
565/566	C61V/A95K/A504R/T547Q	++	+++	++	+++	++
567/568	A95K/H155S/A286Q/S328A/ V407T/A504R	++	++	++	+++	+
569/570	T31S/A95K/A504R	++	++	++	++	+
571/572	A95K/A286Q/T547Q	++	++	++		+

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

表7-1.様々な条件下でのチロシンおよびフェニルアラニンに関する TALバリエントの相対的活性(配列番号388と比較) ¹						
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号388 と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC	2 mM Phe FIOPC
573/574	C61V/S328A/A504R/G549D	+	+++	+	++++	++
575/576	T31S/C61V/A95K/Q471Y/A5 04R	++	+++	++	++++	++
577/578	C61V/A286Q/V407T	+	+++	++	++	++
579/580	A95K/S328A/A504R	++	++	++	++	+
581/582	A95K/V407T/A504R	++	++	++	++	+
583/584	T31S/C61V/V407T/A504R	+	++	+	++	++
585/586	A95K/G549D	++	+++	++	++++	+
587/588	T31S/A95K/A286Q/A504R	++	++	++	++	+
589/590	T31S/A95K/Q237K/A504R/T 547Q/G549D	++	+++	++	++++	+
591/592	C61V	+	+++	+	++	++
593/594	C61V/A95K/S328A/G549D	++	+++	++	++++	++
595/596	C61V/A95K/A286Q	++	+++	++	+	++
597/598	C61V/A95K/A286Q/S328A/A 504R	++	+++	++	++++	++
599/600	C61V/A95K/H155S/A286Q/V 407T/Q471Y	++	++	++	++++	+
601/602	T31S/C61V/A95K/V407T/A5 04R	++	++	++	++	++
603/604	A95K/A286Q/S328A/V407T/ A504R	++	++	++	+++	+
605/606	A95K/G287S/A504R/G549D	++	++	++	++++	+
607/608	T31S/C61V/A95K/A286Q/S3 28A	++	+++	++	+	++
609/610	C61V/S328A	+	++	+	++	++
611/612	A95K/A504R/T547Q	++	++	++	+	+
613/614	C61V/A95K/H155S/V407T	++	++	+	++++	+
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号388と比較して決定した。増加した活性の レベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;「+++」>2;および「++++」>3。						

10

20

30

40

(実施例 8)

配列番号 604 の T A L バリエント

【0222】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 604 に由来する T A L バリエントの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 603 にコードされた T A L の定向進化をバリエントの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

50

清澄化ライセートのH T P 活性分析

【 0 2 2 3 】

T A L バリエーションを発見する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する T A L バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした：水中で 1 0 倍希釈した H T P ライセート 2 0 μ L を 2 . 2 m M のチロシンで 5 分間アッセイし、希釈していない H T P ライセート 2 0 μ L を 0 . 1 m M のチロシンで 5 分間アッセイした。アッセイの結果を表 8 - 1 に示す。さらなる定向進化のために配列番号 7 3 6 を選択した。

プロテアーゼで前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【 0 2 2 4 】

T A L バリエーションに、実施例 4 に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、5 0 μ L の 2 倍希釈した H T P ライセートを 3 g / L のプロテアーゼミックス 5 0 μ L と共に 3 7 ° C で 1 時間インキュベートした。実施例 4 に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 8 - 1 に示す。

酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【 0 2 2 5 】

T A L バリエーションに、実施例 5 に記載したように、酸性緩衝液を負荷し、熱処理した清澄化ライセート 4 0 μ L を M c I l v a i n e 緩衝液 (p H 4) 6 0 μ L と共にインキュベートした。実施例 5 に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 8 - 1 に示す。

【表 8 - 1】

表8-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号604と比較)					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号604と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
615/616	N531D	++	+	++	++
617/618	Q37A/K56G/S59A/H234Y/N5 31D	++	++	++	++++
619/620	A36V/H131M	+	+	++	++++

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

表8-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号604と比較)					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号604と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
621/622	Q37A/K56G/S59A/R103L/E14 5V/H234Y/A328Q/Q471Y/N53 1D	++	++	++	++++
623/624	A36V/Q37A/H131M/E145V/H 234Y/A328S	+	+	+	++++
625/626	A36V/Q37A/E145V/H234Y	+	++	++	++++
627/628	K56G/S59A/R103L/Q471Y/N5 31D	+	+	++	+++
629/630	A36V/S59A/H234Y/A328S		+	+	++++
631/632	Q37A/H234Y/Q471Y	+	++	++	++++
633/634	A36V/K56G/E145V/H234Y/A 328S	+	++	++	++++
635/636	H234Y/N531D	++	+	++	++++
637/638	A36V/Q37A/R103L/H234Y	+	++	+	++++
639/640	H234Y/A328Q	++	++	++	++++
641/642	H234Y/A328S/Q471Y	+	++	++	++++
643/644	Q37A/K56G/H234Y/N531D	+	+	+	++++
645/646	A36V/R103L/E145V/A328S/N 531D	+	++	++	++++
647/648	A36V/Q37A/S59A/H131M/N5 31D	++	+	++	++++
649/650	A36V/S59A/N531D	+	++	++	++++
651/652	K56G/S59A/Q471Y/N531D	++	++	++	+++
653/654	Q37A/K56G/S59A/H234Y/A3 28S/R524L/N531D			+	++++
655/656	H234Y			+	++++
657/658	S59A/A328Q/R524L/N531D	++	+	++	++++
659/660	A36V/H234Y/N531D	+	+	++	++++
661/662	A36V/Q37A/K56G/S59A/E145 V/H234Y/A328S	+	++	+	++++
663/664	Q37A/S59A/H234Y	+	+	+	++++

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

表8-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号604と比較)					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号604と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
665/666	A36V/Q37A/H234Y/A328Q/N 531D	+	+	++	++++
667/668	H131M/H234Y/A328Q	+++		++	++++
669/670	A36V/Q37A/E145V/H234Y/A 328S/Q471Y/N531D	+	+	++	++++
671/672	K518V/A519E/S548K/G549D	++	++	++	++++
673/674	L46T/T49D/A519E	+++	++	++	++
675/676	L46R/H155L	++	++	++	+
677/678	K33N/L46T/K518V/A534S/S5 48K/G549D	++	++	++	++++
679/680	I336V/A519P	++	++	++	+++
681/682	T49D/A519P	+++	+++	++	++
683/684	K33N/L46T/T49D/G549D	++	++	+	++++
685/686	S548K/G549D	+	+	++	++++
687/688	L46T/S548K	+++	++	++	+++
689/690	G549D	++	++	++	++++
691/692	K33N/T49D/I336V	+++	+++	++	+++
693/694	K33N/L46T/T49D/I336V/A519 E/S548K/G549D	++	++	+	++++
695/696	K33N/L46T/T49D	+++	+++	++	++
697/698	A519P	++	+	++	++
699/700	L46R/T49D/A519P	+++	+++	++	+++
701/702	K33N/L46R/T49D/G549D	+++	+++	++	++++
703/704	K33N/I336V/A519P	++	++	++	+++
705/706	L46R/T49D/K518V/A519E/S5 48K/G549D	++	++	++	++++
707/708	L46R/T49D	++	++	++	++
709/710	K33N/L46T/A519E	++	+	++	++
711/712	L541A			+	+
713/714	S521D	++	++	++	++
715/716	Q66R/A540R	++	+	++	+++

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

表8-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号604と比較)					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号604と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
717/718	E523D	+		+	+
719/720	P29E/Q66N/Q111K/A540R	++	++	++	+
721/722	Q111K	++	++	++	+++
723/724	Q111K/E523A/N557E	++	++	++	++
725/726	P29E/Q111K	+	+	+	
727/728	P29G/Q66N/Q111K	+	+	+	
729/730	P29E/Q111K/E523D	+	+	+	
731/732	Q111K/L510K/S521D/E523A/ L541A/Q558D	++	+	++	+++
733/734	F14S/S114P/E283D/R289Q	++	++	++	++++
735/736	F14S/K56R/S114P	++	++	++	++++
737/738	K56R/S114P/I291V	++	++	++	++++
739/740	F14S/S114P/K518Q	++	++	++	++++
741/742	K56R/S114P/E206P/E283D	++	++	++	++++
743/744	F14S/E283D/R289Q/I562S	++	++	++	+
745/746	S114P/E283D/I291V	++	++	++	++++
747/748	K56R/S114P/I291V/K518Q/I5 62S	++	+	++	++++
749/750	S114P/I562S	++	++	++	++++
751/752	K56R/S114P/K518Q	+++	++	++	++++
753/754	F14S/S114P/E283S/R289Q/I56 2S	++	++	++	++++
755/756	S114P/E283D/R289Q/Q305E/ K518Q	+++	++	++	++++
757/758	S114P/R289Q/I562S	++	++	++	++++
759/760	S114P/K518Q/I562S	++	++	++	++++
761/762	F14S/S114P/E283D/R289Q/I29 1V	++	++	++	++++
763/764	S114P/I291V/K518Q	++	++	++	++++
765/766	F14S/H234L/E283D/I291V/Q3 05E	++	++	++	++++
767/768	K56R/K518Q	++	++	++	+

10

20

30

40

50

【表 8 - 5】

表8-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエントの相対的活性 (配列番号604と比較)					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号604と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
769/770	S114P/E283D/R289Q/I291V	++	++	++	++++
771/772	S114P/I291V	++	+	++	++++
773/774	S114P/R289Q	++	++	++	++++
775/776	S114P	++	++	++	++++
777/778	F14S/S114P/I291V/K518Q/I56 2S	++	+	++	++++
779/780	Q305E	++	++	++	+
781/782	S114P/E206P/E283S/R289Q/I5 62S	++	++	++	++++
783/784	K56R	++	++	++	++
785/786	R289Q/I562S	++	++	++	++
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号604と比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;「+++」>2;および「++++」>3。					

(実施例 9)

配列番号 7 3 6 の T A L バリエント

【0 2 2 6】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 7 3 6 に由来する T A L バリエントの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 7 3 5 にコードされた T A L の定向進化をバリエントの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0 2 2 7】

T A L バリエントを発現する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する T A L バリエントの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした：水中で 1 0 倍希釈した H T P ライセート 2 0 μ L を 2 . 2 m M のチロシンで 5 分間アッセイし、希釈していない H T P ライセート 1 0 μ L を 0 . 1 m M のチロシンで 5 分間アッセイした。アッセイの結果を表 9 . 1 および 9 . 2 に示す。さらなる定向進化のために配列番号 7 9 0 を選択した。

プロテアーゼで前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0 2 2 8】

T A L バリエントに、実施例 7 に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、実施例 6 に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 9 - 1 および 9 - 2 に示す。

酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0 2 2 9】

T A L バリエントに、実施例 8 に記載したように、酸性緩衝液を負荷し、実施例 7 に記載

したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 9 - 1 および 9 - 2 に示す。

【表 9 - 1】

表9-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC
787/788	G549D	+	+	++
789/790	T49D/S59A/R289Q/I562S	+	++	+
791/792	S59A/E145V/H234Y/I291V	+	+	++
793/794	T49D/S59A/Q66N/R289Q	+	++	+
795/796	R56G/H234Y/I291V		+	+
797/798	R56G/S59A/Q111K/H234Y/N531D	+	+	++
799/800	T49D/Q111K/N531D	+	+	+
801/802	Q111K/I291V	+		+
803/804	K518Q/N531D/G549D/I562S	+	+	++
805/806	R56G/S59A/E145V/R289Q/K518Q/I562S	++	++	+
807/808	I291V/K518Q/G549D	+		++
809/810	R56G/S59A/H234Y	+	++	++
811/812	R56G/Q111K/E145V/H234Y/R289Q/N531D/I562S	+	+	++
813/814	K518Q	+	+	+
815/816	Q111K/E145V	+		++
817/818	T49D/R56G/Q66N/H234Y	+	++	+
819/820	H234Y	+	+	++
821/822	T49D/R56G/Q66N/Q111K/H234Y/I291V/K518Q	+	+	+
823/824	T49D/R56G/S59A/Q66N/I291V/N531D/G549D	+	+	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

表9-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC
825/826	Q111K/E145V/H234Y/I291V/I562S	+	+	++
827/828	Q111K/E145V/H234Y/I562S	+	+	++
829/830	T49D/R56G/S59A/Q111K/G549D	+	++	++
831/832	Q111K/R289Q	+	+	++
833/834	S59A	+	+	++
835/836	R56G/Q111K/K518Q/G549D	+	+	+
837/838	T49D/Q66N/Q111K/H234Y/I291V/K518Q/I562S	+	+	++
839/840	N531D	+	+	+
841/842	R56G/S59A/Q111K/I291V/K518Q/N531D	+		+
843/844	R56G/S59A/Q111K/E283D/K518Q/N531D	+	+	+
845/846	T49D/H234Y	+	+	++
847/848	S59A/H234Y/I291V	+	+	++
849/850	Q111K/H234Y	+	+	++
851/852	D20G/S59A/H234Y/K518Q/G549D/I562S		+	++
853/854	R56G/S59A/K518Q	+	+	+
855/856	R56G/S59A/Q111K/H234Y/R289Q	+	++	++
857/858	D20G/T49D/R56G/S59A/Q111K/I291V		+	
859/860	S59A/H234Y/I291V/I387T/G549D/I562S	+		+
861/862	T49D/S59A/Q66N/E145V/H234Y	+		
863/864	Q111K/K518Q	+	+	+
865/866	H234Y/K518Q/G549D	+	+	++
867/868	S59A/Q111K/	+	+	++
869/870	R56G/Q111K/E145V/H234Y/K518Q/G549D/I562S	+	+	++
871/872	R56G/S59A/H234Y/K518Q	+	+	++
873/874	R56G/S59A/Q111K/I291V	+	+	+
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号736と比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;「+++」>2;および「++++」>3。				

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTAL/バリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
875/876	K33N/Q37A/K518V/S521D/S548K	++	++	++	++
877/878	Q37A/R103L/Q305E/I336V/E523D/A540R	++	++	++	+++
879/880	K33N/L46R/E523D	++	++	++	++
881/882	Q37A/R103L/Q305E/S521D/L541A/S548K	++	++	++	+++
883/884	Q37A/Q305E/I336V/A540R/S548K	++	+	++	+++
885/886	L46R/R103L/Q305E/S548K	++	+	++	+++
887/888	Q37A/R103L/L541A/S548K	++	++	++	+++
889/890	Q37A/I336V/A540R	++	++	++	+++
891/892	Q37A/S548K	++	++	++	++
893/894	K33N/L46R/I336V/S521D/E523D	++	++	++	++
895/896	K33N/Q37A/E523D/A540R/S548K	++	++	++	+++
897/898	L46R/R103L/Q305E/Q471Y/A540R/S548K	++	+	++	+++
899/900	E523D	++	++		++
901/902	K33N/L46R/K518V/S521D/S548K	++	++		++
903/904	K33N/Q37A/I336V/A540R/S548K	++	++	++	+++
905/906	L46R/Q305E/E523D/S548K	++	+	++	++
907/908	K33N/L46R	++	++	++	++
909/910	Q37A/L541A	+	++	+	++
911/912	K33N/L46R/Q305E/I336V	++	++	++	++
913/914	L46R/Q305E/I336V/K522E	++	+	++	++
915/916	L46R/R103L/Q305E	++	+	++	+++
917/918	K33N/Q37A/Q305E/A328Q/S548K	++	++	++	+++
919/920	L46R/Q305E/Q471Y	++	+	++	++
921/922	Q37A/Q305E/E523D/L541A/S548K	++	+	++	+++
923/924	Q37A/Q305E/L541A/S548K	++	+	++	++
925/926	L46R/I336V/E523D/S548K	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
927/928	K33N/Q37A/R103L/A519P/E523D	++	++	++	+++
929/930	K33N/L46R/S548K	++	++	++	++
931/932	K33N/L46R/L541A	++	++	++	++
933/934	Q37A/Q305E/Q471Y/A540R/S548K	++	+	++	++
935/936	Q37A/E523D/L541A	++	++	++	++
937/938	Q37A/I336V/Q471Y/L541A/S548K	+	++	++	++
939/940	K33N/L46R/R103L/Q305E/A540R	++	++	++	+++
941/942	K33N/Q37A/R103L/K518V/E523D/L541A	++	++	++	++
943/944	K33N/Q37A/Q471Y/E523D/A540R/S548K	++	++	++	++
945/946	K33N/Q37A/R103L/Q471Y/A519P/S548K	++	++	++	+++
947/948	L46R/R103L/Q305E/I336V/E523D	+	+	++	+++
949/950	Q37A/Q471Y/S521D/A540R/S548K	++	++	++	++
951/952	K33N/Q37A/S548K	++	++	++	++
953/954	Q37A/S521D/E523D/S548K	++	++	++	++
955/956	K33N/L46R/I336V/S521D	+	++	+	++
957/958	L46R/I336V/A540R/S548K	++	++	++	++
959/960	Q37A/Q305E/I336V/E523D/S548K	++	+	++	+++
961/962	K33N/Q37A/Q305E/I336V/S521D/S548K	++	++	++	+++
963/964	Q37A/Q305E/I336V/S521D/A540R/S548K	++	++	++	+++
965/966	K33N/Q37A/Q305E/A540R	++	++	++	+++
967/968	Q37A/Q305E/S548K	++	++	++	+++
969/970	Q37A/Q305E/Q471Y/E523D/A540R/S548K	++	+	++	++
971/972	K33N/Q37A/R103L/Q305E	++	++	++	+++
973/974	K33N/Q37A/I336V/A540R	++	++	++	+++
975/976	K33N/Q37A/K518V/S521D/A540R	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 5】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
977/978	K33N/Q37A/I336V	++	++	++	++
979/980	K33N/Q37A/Q305E/A328Q	++	++	++	++
981/982	Q37A/A540R/S548K	++	++	++	++
983/984	Q37A/I336V/S548K	++	++	++	++
985/986	L46R/R103L/L541A/S548K	++	++	++	+++
987/988	K33N/Q37A	++	++	++	++
989/990	Q37A/R103L/A519P/L541A/S548K	++	++	++	+++
991/992	Q37A/R103L/A328Q/S521D/L541A/S548K	++	++	++	+++
993/994	L46R/S521D/E523D	++	++	++	++
995/996	K33N/Q37A/R103L/Q305E/E523D/S548K	++	++	++	+++
997/998	L46R/R103L/Q305E/P520Q/A540R	++	+	++	+++
999/1000	L46R/Q305E/I336V/K518V	++	+	++	++
1001/1002	K33N/Q37A/R103L/Q305E/S548K	++	+	++	+++
1003/1004	Q37A/A519P	++	++	++	++
1005/1006	Q37A/Q471Y	++	++	++	++
1007/1008	L46R/Q305E	++	+	++	++
1009/1010	R103L	++	++	++	+++
1011/1012	L46R/E523D/L541A/S548K	++	++	++	++
1013/1014	K33N/Q37A/K518V/S548K	++	++	++	++
1015/1016	Q37A/Q471Y/K518V	++	++	++	++
1017/1018	K33N/L46R/R103L/A540R/S548K	++	++	++	+++
1019/1020	Q37A/S521D/A540R	++	++	++	++
1021/1022	K33N/L46R/R103L/Q305E/I336V/S548K	++	+	++	+++
1023/1024	L46R/Q305E/S548K	++	++	++	++
1025/1026	Q37A/Q305E/A519P/S548K	++	+	++	++
1027/1028	Q37A/I336V/S521D/E523D/S548K	++	++	++	+++
1029/1030	Q37A/E523D/S548K	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1031/1032	K33N/Q37A/R103L/Q305E/I336V/L541 A/S548K	++	++	++	++++
1033/1034	Q37A/R103L/Q305E/Q471Y/A540R/S5 48K	++	++	++	+++
1035/1036	K33N/Q37A/Q305E/L541A	++	++	++	++
1037/1038	Q37A/Q305E/I336V	++	++	++	+++
1039/1040	Q37A/Q305E/S521D/A540R	++	+	++	++
1041/1042	S521D/S548K	++	+	++	++
1043/1044	K33N/Q37A/R103L/A540R	++	++	++	+++
1045/1046	R103L/S521D/E523D/A540R	+	++	+	+++
1047/1048	K33N/L46R/I336V/A540R/S548K	++	++	++	+++
1049/1050	Q37A/I336V	++	++	++	++
1051/1052	K33N/Q37A/Q305E/Q471Y/S521D/S54 8K	++	++	++	++
1053/1054	K33N/L46R/Q305E	++	+	++	++
1055/1056	Q37A/R103L/A328Q/I336V/K518V/E5 23D/S548K	++	++	++	+++
1057/1058	L46R/R103L/Q305E/I336V/Q471Y/A54 0R/S548K	++	++	++	+++
1059/1060	K33N/L46R/R103L/Q305E/I336V/K518 V/A519P/A540R	++	++	++	+++
1061/1062	L46R/S548K	++	++	++	++
1063/1064	Q37A/R103L	++	++	+	+++
1065/1066	Q37A/R103L/Q305E/Q471Y	++	++	++	+++
1067/1068	K33N/L46R/I336V/A540R	++	++	++	+++
1069/1070	Q37A/Q305E/L541A	++	+		++
1071/1072	L46R/Q305E/I336V/S548K	++	+	++	++
1073/1074	K33N/Q37A/S521D/S548K	++	++	++	++
1075/1076	Q37A	++	++	++	++
1077/1078	K33N/Q37A/Q305E/E523D/A540R	++	++	++	+++
1079/1080	L46R/Q305E/I336V	++	+	++	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 7】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTAL/バリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1081/1082	K33N/Q37A/R103L/I336V/K518V/L541A/S548K	++	++	++	+++
1083/1084	L46R	++	++	++	++
1085/1086	K33N/Q37A/A540R	++	++	++	+++
1087/1088	Q37A/R103L/A540R	++	++	++	+++
1089/1090	K33N/Q37A/Q305E	++	++	++	++
1091/1092	Q37A/R103L/I336V/S521D/L541A	+	++	+	+++
1093/1094	K33N/L46R/Q66K/Q305E/S521D/E523D/A540R/S548K		+	++	+++
1095/1096	K33N/Q37A/E523D	++	++	++	++
1097/1098	L46R/E523D/A540R	++	++	++	++
1099/1100	Q37A/R103L/Q305E/A540R	++	++	++	+++
1101/1102	K33N/Q37A/R103L	++	++	++	+++
1103/1104	L46R/S521D/S548K	++	++	++	++
1105/1106	Q37A/I336V/S521D/E523D	++	++	++	++
1107/1108	L46R/R103L/S548K	++	++	++	+++
1109/1110	Q37A/R103L/I336V	++	++	++	+++
1111/1112	L46R/L541A/S548K	++	++	+	++
1113/1114	Q37A/Q305E	++	++	++	++
1115/1116	Q37A/R103L/Q305E/I336V/S521D/E523D/A540R/S548K	++	+	++	+++
1117/1118	K33N/L46R/Q305E/K518V/A540R/S548K	++	+	++	++
1119/1120	L46R/I336V/S521D/E523D	++	++	++	++
1121/1122	K33N/Q37A/Q305E/I336V/S521D/E523D/S548K	++	++	++	++
1123/1124	Q305E/I336V/L541A/S548K	++	+	++	++
1125/1126	L46R/R103L/E523D/S548K	++	++	++	++
1127/1128	Q37A/Q305E/I336V/L541A/S548K	++	+	++	++
1129/1130	Q37A/R103L/Q305E/I336V	++	+	++	+++

10

20

30

40

50

【表 9 - 8】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1131/1132	K33N/Q37A/Q305E/I336V/K518V/E523D	++	+	++	++
1133/1134	L46R/R103L/L541A	++	++	+	+++
1135/1136	I336V/S548K	+	++	+	++
1137/1138	R103L/I336V/A519P/S548K	++	++	+	+++
1139/1140	Q37A/Q471Y/K518V/A519P/E523D	++	++	++	++
1141/1142	A519P/S548K	+	+	+	++
1143/1144	K33N/Q37A/Q305E/I336V/Q471Y/L541A	++	++	++	++
1145/1146	K33N/Q37A/L46R/Q305E	++	+	++	++
1147/1148	Q37A/Q305E/S521D/E523D/A540R/S548K	++	+	++	++
1149/1150	K33N/L46R/S521D/S548K	++	++	++	++
1151/1152	Q37A/Q305E/Q471Y	++	+	++	++
1153/1154	Q37A/I336V/E523D/S548K	+	+	+	++
1155/1156	Q37A/Q305E/S521D/L541A/S548K	++	+	++	++
1157/1158	K33N/R103L/I336V/K518V/S521D/S548K	++	++	++	++
1159/1160	K33N/Q37A/Q305E/I336V/L541A	++	+	++	++
1161/1162	K33N/Q471Y/E523D/L541A	++	++	++	++
1163/1164	L46R/R103L/A540R/S548K	+	+	+	++
1165/1166	K33N/Q37A/R103L/E523D	+	++	+	++
1167/1168	L46R/I336V/A540R	++	++	++	++
1169/1170	L46R/S521D/E523D/A540R	++	++	++	++
1171/1172	L46R/L541A	++	++	++	+
1173/1174	K33N/L46R/I336V/Q471Y/A519P/E523D/S548K	++	++	++	++
1175/1176	Q37A/A540R	++	++	++	++
1177/1178	L46R/T49D/N531D/G549D	+	+	+	++
1179/1180	R289Q/S521D/E523D	+	+	+	

10

20

30

40

50

【表 9 - 9】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1181/1182	H234Y/R289Q/E523D/N531D/G549D/I 562S	+	+	+	+++
1183/1184	R289Q	+	+	+	+
1185/1186	S521D	+	+	+	+
1187/1188	L46R/T49D/Q111K/H234Y/I336V	+	+	+	+++
1189/1190	L46R/T49D/Q111K/H234Y/R289Q/L43 6V/G549D	+	+	+	++
1191/1192	L46R/T49D/H234Y/G549D	+	+	+	+++
1193/1194	T49D	+	+	+	
1195/1196	T49D/R289Q/Q305E/I336V/E523D	+	+	+	
1197/1198	T49D/Q111K/H234Y/R289Q/I336V/E5 23D/N531D/G549D	+	+	+	++
1199/1200	S59A/G549D	+	+	+	+++
1201/1202	T49D/S59A/H234Y/R289Q/I336V/E523 D/N531D/G549D	+	+		++
1203/1204	L46R/H234Y/R289Q/G549S	+	+	+	+++
1205/1206	T49D/H234Y/R289Q/E523D	+	+	+	++
1207/1208	S59A/Q111K/R289Q	+	+	+	+++
1209/1210	R289Q/I336V/G549D	+	+	+	++
1211/1212	T49D/Q111K/H234Y	+	+	+	+++
1213/1214	T49D/H234Y/Q305E/G549D	+	+	+	+++
1215/1216	H234Y/S521D/E523D/G549D	+	+		++
1217/1218	L46R/T49D/R289Q/E523D/N531D/G54 9D/I562S	+	+	+	++
1219/1220	T49D/Q111K/E523D/N531D/G549D	++	+	+	++
1221/1222	T49D/H234Y/G549D	+	++	+	+++
1223/1224	T49D/H234Y/R289Q	+	++	+	++
1225/1226	L46R/Q111K/H234Y/R289Q/N531D/G 549D	+	+	+	+++
1227/1228	Q111K/R289Q/I336V/S521D	+	+	+	++
1229/1230	T49D/H234Y	+	++	+	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 0】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1231/1232	T49D/E523D/G549D	+	++	+	++
1233/1234	L46R/T49D/Q111K/H234Y/I336V/E523 D/G549D	+	++	+	+++
1235/1236	T49D/Q111K/R289Q	+	++	+	+
1237/1238	T49D/S59A/Q111K/R289Q/E523D	+	++	+	++
1239/1240	H234Y/I562S	+	+	+	++
1241/1242	S59A/Q111K/H234Y/R289Q/Q305E/I3 36V/G549D	+	+	+	++++
1243/1244	L46R/S59A/G549D/I562S/	+	++	+	+++
1245/1246	T49D/Q111K/H234Y/I336V/S521D/E52 3D	+	+	+	++
1247/1248	H234Y/R289Q/N531D	+	+	+	++
1249/1250	H234Y/G549D	+	+	+	+++
1251/1252	H234Y/R289Q/G549D	+	+	+	+++
1253/1254	T49D/Q111K/H234Y/R289Q/S521D/E5 23D/N531D/G549D/I562S	+	+	+	++
1255/1256	H234Y/A540R	+	+	+	+++
1257/1258	T49D/Q111K/H234Y/I336V/E523D/N5 31D	+	+	+	++
1259/1260	H234Y/R289Q	+	+	+	++
1261/1262	T49D/S521D/G549D	+	++	+	++
1263/1264	R289Q/S521D/E523D/G549D	+	+	+	+++
1265/1266	T49D/S59A/Q111K/H234Y/R289Q/S52 1D	+	++	+	+++
1267/1268	T49D/R289Q/I336V/S521D/N531D	+	+	+	
1269/1270	T49D/S59A/S521D/N531D	+	+	+	++
1271/1272	Q111K/H234Y/R289Q	+	+	+	+++
1273/1274	L46R/R289Q/G549D	+	+	+	+++
1275/1276	T49D/S59A/H234Y/R289Q/I336V	+	+	+	++
1277/1278	H234Y/I336V/N531D/I562S	+	+	+	+++
1279/1280	T49D/I336V/S521D/I562S	+	+	+	+

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 1】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTAL/バリエントの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1281/1282	L46R/Q111K/H234Y/S521D/G549D	+	+	+	+++
1283/1284	Q111K/S521D/E523D/G549D	+	+	+	+++
1285/1286	L46R/T49D/H234Y/I336V/S521D/E523 D/G549D	+	+	+	+++
1287/1288	T49D/S59A/I336V	+	+	+	++
1289/1290	S521D/I562S	+	+	+	+
1291/1292	H234Y/R289Q/E523D/G549D	+	+	+	+++
1293/1294	L46R/T49D/H234Y/R289Q/I336V	+	+	+	++
1295/1296	T49D/S521D/N531D/G549D/I562S	+	+	+	++
1297/1298	T49D/Q111K/H234Y/G549D	+	++	+	+++
1299/1300	S59A/Q111K/I336V	+	+	+	+++
1301/1302	L46R/T49D/S59A/Q111K/E523D/N531 D/G549D	+	+	+	+++
1303/1304	L46R/T49D/Q111K/I336V/G549D	+	+	+	+++
1305/1306	T49D/H234Y/R289Q/I336V/N531D/G5 49D	+	+	+	++
1307/1308	Q111K/H234Y/R289Q/E523D	+	+	+	+++
1309/1310	L46R/T49D/Q111K/H234Y/R289Q/N53 1D/G549D	+	+	+	+++
1311/1312	L46R/H234Y/G549D	+	+	+	+++
1313/1314	S59A	+	+	+	++
1315/1316	T49D/H234Y/R289Q/E523D/N531D/A5 40R	+	+	+	++
1317/1318	T49D/S59A/R289Q/I336V	+	++	+	++
1319/1320	T49D/Q111K/H234Y/R289Q/E523D/G5 49D	+	++	+	++
1321/1322	L46R	+	+	+	+
1323/1324	R289Q/S521D/E523D/A540R	+	+	+	+
1325/1326	G549D	+	+	+	++
1327/1328	L46R/Q111K/E523D/N531D/G549D	+	+	+	++
1329/1330	T49D/S59A/R289Q/Q305E/I336V	++	+	+	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 2】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1331/1332	L46R/S59A/H234Y	+	+	+	+++
1333/1334	T49D/G549D	+	++	+	++
1335/1336	H234Y/N531D/G549D	+	+	+	+++
1337/1338	T49D/Q111K/H234Y/E523D/N531D/G 549D	+	+	+	+++
1339/1340	T49D/R289Q/I336V	+	+	+	
1341/1342	S59A/Q111K/H234Y/R289Q/Q305E/G5 49D	+	+	+	++++
1343/1344	N531D/G549D	+	+	+	++
1345/1346	Q111K/R289Q/I336V/E523D/G549D	+	+	+	+++
1347/1348	H234Y/R289Q/I336V/E523D	+	+	+	++
1349/1350	H234Y/I336V	+	+	+	++
1351/1352	A540R	+	+	+	+
1353/1354	T49D/Q111K/H234Y/N531D	+	+	+	++
1355/1356	H234Y	+	+	+	++
1357/1358	T49D/Q111K	+	+	+	+
1359/1360	T49D/Q111K/N531D/G549D	+	+	+	++
1361/1362	L46R/G549D	+	+	+	++
1363/1364	Q111K/I336V/I562S	+	++	+	++
1365/1366	H234Y/E523D/N531D	+	+	+	++
1367/1368	T49D/H234Y/R289Q/E523D/G549D	+	++	+	++
1369/1370	T49D/Q111K/R289Q/I336V/S521D/G5 49D	+	++	+	++
1371/1372	T49D/H234Y/S521D	+	+	+	++
1373/1374	L46R/T49D/H234Y/A540R/G549D	+	+	+	+++
1375/1376	L46R/S521D/E523D/G549D	+	+	+	++
1377/1378	S521D/G549D	+	+	+	++
1379/1380	L46R/H234Y/S521D/E523D/N531D/A5 40R/G549D	+	+	+	+++
1381/1382	R289Q/E523D	+	+	+	+

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 3】

表9-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号736と比較) ¹					
配列 番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号736と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	0.1 mM Tyr FIOPC	pH 4 FIOPC
1383/1384	H234Y/S521D/E523D	+	+	+	++
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号736と比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;「+++」>2;および「++++」>3。					

10

(実施例 10)

配列番号 790 の T A L バリエーション

【0230】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 790 に由来する T A L バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 790 にコードされた T A L の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

20

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0231】

T A L バリエーションを発現する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する T A L バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした：水中で 10 倍希釈した H T P ライセート 20 μ L を 2 . 2 mM のチロシンで 5 分間アッセイした。アッセイの結果を表 10 - 1 および 10 - 2 に示す。さらなる定向進化のために配列番号 1454 を選択した。

プロテアーゼおよび／または酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

30

【0232】

T A L バリエーションにキモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、それによって、50 μ L の 2 倍希釈した H T P ライセートを T H E R M O T R O N (登録商標) (I N F O R S) タイタープレート振盪機 (400 rpm) 中で 4 g / L のプロテアーゼミックス 50 μ L と共に 37 °C で 2 時間インキュベートした。プロテアーゼミックスは、100 mM のリン酸ナトリウム (pH 8.0) 中 4 mg / mL のキモトリプシン (S i g m a A l d r i c h) および 4 mg / mL のトリプシン (S i g m a A l d r i c h) からなった。96 ウェル U V - S T A R (登録商標) プレート (G r e i n e r B i o - O n e) 中で、プロテアーゼ処理したライセート 40 μ L を 200 mM のリン酸ナトリウム、2.5 mM のチロシン (pH 7.0) 160 μ L に添加することによって、残存する活性を決定した。反応物を短時間に混合し、実施例 4 に記載したように活性を決定した。このアッセイの結果を表 10 - 1 および 10 - 2 に示す。

40

【0233】

T A L バリエーションに酸性緩衝液を負荷し、それによって、熱処理した清澄化ライセート 90 μ L を T H E R M O T R O N (登録商標) (I N F O R S) タイタープレート振盪機 (400 rpm) 中で M c I l v a i n e 緩衝液 (pH 4) 90 μ L と共に 37 °C で 1 ~ 2 時間インキュベートした。インキュベーション後に、ライセート溶液を短時間に遠心分離し、96 ウェル U V - S T A R (登録商標) プレート (G r e i n e r B i o - O n e) 中で、酸性緩衝液で処理したライセート 20 μ L を 200 mM のリン酸ナトリウム、2.5 mM のチロシン (pH 7.0) 180 μ L に添加することによって、残存する活性を

50

決定した。反応物を短時間に混合し、実施例 4 に記載したように活性を決定した。このアッセイの結果を表 10-1 および 10-2 に示す。

【0234】

一部の事例では、pH とプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、上記の酸性緩衝液で処理したライセートにプロテアーゼをさらに負荷した。酸性緩衝液での前処理後に、ライセート溶液を短時間に遠心分離し、75 μ L の上清を THERMOTRON (登録商標) (INFORS) タイタープレート振盪機 (400 rpm) 中で、200 mM のリン酸二ナトリウム中に溶解した 4 g/L のプロテアーゼミックス 75 μ L と共に 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。前処理したライセート 40 μ L を 96 ウェル UV-STAR (登録商標) プレート (Greiner Bio-One) 中で 200 mM のリン酸ナトリウム、2.5 mM のチロシン (pH 7.0) 160 μ L に添加することによって、残存する活性を決定した。反応物を短時間に混合し、実施例 4 に記載したように活性を決定した。このアッセイの結果を表 10-1 に示す。

【表 10-1】

表10-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの 相対的活性(配列番号790と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号790と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
1385/1386	L202R/K332Q/D408E	++	++	++	+
1387/1388	K44R	+	+	+	+
1389/1390	D408E	++	++	+	+
1391/1392	I24T/L202R/G351N	+	++	+	++
1393/1394	I24T/K44R/R464Q	+	++	+	+
1395/1396	I24T/K201N/L202R/G351N/Q507R	+	++	+	++
1397/1398	L202R	+	++	+	+
1399/1400	K33N/Q37A/Q111K/S548K	+	++	+	+
1401/1402	K33N/R56G/R103L/Q111K	+	++	+	+
1403/1404	L46R/I336V/A540R/G549D	+	++	++	++
1405/1406	K33N/I336V/G549D	+	++	+	+
1407/1408	K33N/I336V/A540R/S548K	+	+	+	+
1409/1410	K33N/Q37A/L46R/R103L/Q111K/ H234Y	+	++	++	++
1411/1412	Q37A/L46R/R56G/E523D	+	++	+	+
1413/1414	K33N/I336V	+	++	+	+
1415/1416	K33N/Q37A/E523D/A540R/S548K	++	++	+	+

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

表10-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの 相対的活性(配列番号790と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号790と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1417/1418	K33N/Q37A/L46R/Q111K/I336V/A 540R	+	+	++	++
1419/1420	K33N/L46R/R56G/H234Y/A248V/ G549D	+	++	+	++
1421/1422	K33N/R103L/Q111K/H234Y	+	++	+	+
1423/1424	K33N/Q37A/L46R/R56G/R103L/E5 23D/A540R/S548K/G549D	+	++	+	++
1425/1426	K33N/Q37A/L46R/R56G/Q111K/H 234Y/E523D	+	++	+	++
1427/1428	K33N/Q37A/L46R/R103L/Q111K/S 548K/G549D	+	++	+	++
1429/1430	Q37A/L46R/H234Y	+	++	++	++
1431/1432	L46R/H234Y/A540R/S548K	+	+	+	++
1433/1434	Q37A/Q111K/E523D	+	++	+	+
1435/1436	K33N/L46R	+	++	+	++
1437/1438	K33N/L46R/R103L/E523D/G549D	+	++	++	++
1439/1440	K33N/H234Y/I336V/E523D/A540R /S548K/G549D	+	++	+	++
1441/1442	Q37A/R56G/H234Y/I336V/E523D/ A540R/S548K/G549D	+	+++	+	++
1443/1444	K33N/Q111K/H234Y/S548K	+	++	+	++
1445/1446	K33N/R103L/Q111K/H234Y/I336V /E523D/S548K	+	++	+	++
1447/1448	K33N/R103L/Q111K/I336V	+	++	+	+
1449/1450	H234Y/E523D/A540R/S548K/G549 D	+	++	++	++
1451/1452	K33N/H234Y/E523D/S548K	+	++	+	++
1453/1454	K33N/Q37A/H234Y/I336V/E523D/ S548K	+	++	+	+
1455/1456	Q37A/L46R/I336V/E523D/A540R/S 548K	+	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 10 - 3】

表10-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号790と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号790と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
1457/1458	Q37A/I336V	+	++	+	+
1459/1460	Q37A	+	++	+	+
1461/1462	Q37A/L46R/I336V/A540R/S548K		+	+	++
1463/1464	K33N/Q37A/R56G/Q111K/H234Y/ E523D/A540R/S548K	+	++	+	++
1465/1466	K33N/Q37A/L46R/I336V	+	++	+	++
1467/1468	E523D/S548K	+	+	+	+
1469/1470	K33N/Q37A/R56G/H234Y/E523D/ A540R/S548K	+	++	+	++
1471/1472	L46R/R103L/A328Q/I336V/E523D	+	++	++	++
1473/1474	K33N/Q37A/Q111K/E523D/A540R	+	++	+	+
1475/1476	K33N/L46R/R56G/Q111K/S548K	+	++	+	++
1477/1478	K33N/H234Y/A540R/S548K/G549 D	+	++	++	++
1479/1480	Q37A/S548K/G549D	+	++	+	++
1481/1482	K33N/H234Y/E523D/A540R/S548 K	+	++	++	++
1483/1484	K33N/Q37A/L46R/R56G/Q111K/E 523D/A540R	+	++	+	++
1485/1486	K33N/Q37A/L46R/S548K/G549D	+	++	++	++
1487/1488	K33N/Q37A/L46R/Q111K/H234Y/ A328Q/E523D/A540R/S548K	+	++	++	++
1489/1490	I336V/E523D	+	++	+	+
1491/1492	K33N/Q37A/R103L/Q111K/H234Y/ I336V/A540R/S548K	+	++	+	++
1493/1494	L46R/H234Y/I336V	++	++	++	++
1495/1496	K33N/R103L/Q111K/H234Y/A540 R/G549D	+	++	+	++
1497/1498	K33N/Q37A/Q111K/H234Y/E523D /A540R/S548K	+	++	+	++
1499/1500	Q37A/R103L/I336V/S548K/G549D	+	++	+	++

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

表10-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号790と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号790と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1501/1502	Q37A/H234Y/A328Q/I336V/E523D	+	++	+	+
1503/1504	K33N/H234Y/A328Q/E523D/A540 R/G549D	+	++	+	++
1505/1506	K33N/Q37A/L46R/H234Y/E523D	+	++	++	++
1507/1508	K33N/I336V/E523D/A540R/S548K/ G549D	+	++	++	++
1509/1510	L46R/R103L/I336V	+	++	++	++
1511/1512	K33N/Q37A/L46R/R103L/E523D	+	++	++	++
1513/1514	K33N/Q37A/R103L/I336V/E523D/ A540R/S548K	+	++	+	++
1515/1516	Q37A/R56G/I336V/E523D/A540R/ S548K	+	++	+	++
¹ すべての活性は、配列番号790の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;および「+++」>2					

【表 10 - 5】

表10-2.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性(配列番号790と比較) ¹				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号790と比較)	2 mM tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC
1517/1518	S424A	+		
1519/1520	M102P		+++	+
1521/1522	G417A	++	++	+
1523/1524	L418V	++	+	+
1525/1526	I420L	+	+	+
1527/1528	S402A	+	++	+
1529/1530	T391N	+	++	+
1531/1532	M392A	+	+	+
1533/1534	L313M	++	+	+
1535/1536	L210T	++	++	+
1537/1538	D530V	++	++	+

10

20

30

40

50

【表 10 - 6】

表10-2.様々な条件下でのチロシンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号790と比較) ¹				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号790と比較)	2 mM tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC
1539/1540	L313I	++	++	++
1541/1542	I74A	++	++	+
1543/1544	L415F	++		+
1545/1546	R506C	+	+	+
¹ すべての活性は、配列番号790の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;および「+++」>2。				

10

(実施例 11)

配列番号 1454 の TAL バリエーション

【0235】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐性についての、配列番号 1454 に由来する TAL バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 1454 にコードされた TAL の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

20

清澄化ライセートの HTP 活性分析

【0236】

TAL バリエーションを発見する E. coli 細胞の HTP 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する TAL バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした: 水中で 10 倍希釈した HTP ライセート 20 μL を 2.2 mM のチロシンで 5 分間アッセイした。アッセイの結果を表 11-1 に示し、さらなる定向進化のために配列番号 1578 を選択した。

30

プロテアーゼおよび／または酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの HTP 活性分析
【0237】

TAL バリエーションに、実施例 10 に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷した。実施例 10 に記載したように残存する活性を決定し、このアッセイの結果を表 11-1 に示す。

【0238】

TAL バリエーションに酸性緩衝液を負荷し、それによって、熱処理した清澄化ライセート 50 μL を、THERMOTRON (登録商標) (INFORS) タイタープレート振盪機 (400 rpm) 中で、McIlvaine 緩衝液 (pH 3.8) 50 μL と共に 37 °C で 1.5 時間インキュベートした。インキュベーション後に、ライセート溶液を短時間に遠心分離し、96 ウェル UV-STAR (登録商標) プレート (Greiner Bio-One) 中で、酸性緩衝液で処理したライセート 40 μL を 200 mM のリン酸ナトリウム、2.5 mM のチロシン (pH 7.0) 160 μL に添加することによって、残存する活性を決定した。反応物を短時間に混合し、実施例 10 に記載したように活性を決定した。このアッセイの結果を表 11-1 に示す。

40

【0239】

一部の事例では、pH とプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、酸性緩衝液で処理したライセートにプロテアーゼをさらに負荷した。熱処理した清澄化ライセート 30 μL を McIlvaine 緩衝液 (pH 3.8) 30 μL と共に 37 °C で 1.5 時間インキ

50

ュベートした後に、200 mMのリン酸二ナトリウム中に溶解した4 g / Lのプロテアーゼミックス60 μLを添加し、得られた溶液をTHERMOTRON（登録商標）（INFORS）タイタープレート振盪機（400 rpm）中で37℃で2時間インキュベートした。実施例10に記載したように残存する活性を決定し、このアッセイの結果を表11-1に示す。

【表11-1】

表11-1.様々な条件下でのチロシンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号1454と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1454と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1547/1548	I24T/K44R/G549D		++	++	+
1549/1550	I24T/L46R/Q111K/R506C	+	++	++	+
1551/1552	I24T/K44R/L46R/L202R/T391N		++	++	+
1553/1554	Q111K/L202R/L313M/G417A/A540R/G549D	+	++	+++	+
1555/1556	K44R/R103L/Q111K/L313M/T391N/A540R		++	++	+
1557/1558	L313M/T391N/A540R/G549D		++		+
1559/1560	I24T/K44R/L202R/L313M/T391N/A540R		++	++	+
1561/1562	I24T/L46R/R103L/T391N/R506C		++	++	+
1563/1564	K44R/L46R/R103L/Q111K/T391N		++	++	+
1565/1566	Q111K/L202R/T391N		++	++	+
1567/1568	I24T/K44R/Q111K/L202R/R464Q/R506C	+	+	++	+
1569/1570	L202R/L313M/T391N/G549D		++	++	+
1571/1572	L46R/Q111K/R506C	+	++	++	+
1573/1574	L202R/R506C/A540R/G549D		+	+++	+
1575/1576	R103L/L313M/G549D	+	+	+	++
1577/1578	I24T/L46R/M102P/L313M/R506C	+	++	++	++
1579/1580	I24T/L202R	+	++	++	+

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

表11-1.様々な条件下でのチロシンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号1454と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1454と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
1581/1582	Q111K/L202R/L313M/T391N/R506C	+	++	++	+
1583/1584	I24T/L46R/R103L/Q111K/R464Q/ R506C/G549D	+	++	+++	++
1585/1586	G417A	+	++	+	+
1587/1588	L202R/R506C/A540R	+	+	+++	+
1589/1590	Q111K	+	++	+	++
1591/1592	I24T	+	++	+	+
1593/1594	I24T/L46R/Q111K/L313M/T391N		+	++	+
1595/1596	Q111K/L202R/L313M/T391N/R464Q	+	++	++	+
1597/1598	L46R/R103L/R506C	+	+	+++	+
1599/1600	L202R/G417A/R464Q/A540R/G549D	+	++	+++	++
1601/1602	K44R/L46R/R103L/L202R/L313M/ T391N	+	++	++	++
1603/1604	I24T/R103L/L202R	+	++	+++	++
1605/1606	I24T/L46R/L202R/T391N/R506C		++	+	+
1607/1608	I24T/L46R/G549D	+	++	+++	++
1609/1610	K44R/L46R/R103L/L202R/G417A/ R464Q	+	+	++	+
1611/1612	L46R/L313M/T391N/A540R	+	++	++	+
1613/1614	L46R/L202R/R506C/G549D		+	+++	+
1615/1616	Q111K/L202R/T391N/A540R		++	++	+
1617/1618	K44R/Q111K/R464Q/R506C	+	+	++	+
1619/1620	Q111K/L202R	++	++	+++	++
1621/1622	I24T/K44R	+	+	++	+
1623/1624	L202R/R464Q/R506C	+	++	++	+
1625/1626	L46R/Q111K/G417A	+	++	++	+
1627/1628	L46R/L202R	+	++	+++	++

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

表11-1.様々な条件下でのチロシンに関する TALバリエーションの相対的活性(配列番号1454と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1454と比較)	2 mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1629/1630	I24T/L46R/Q111K/L313M/G549D	+	+	+++	++
1631/1632	Q111K/R464Q/A540R/G549D	+	++	+	++
1633/1634	K44R/L46R/M102P/L202R/L313M /G417A	+	++	++	++
¹ すべての活性は、参照ポリペプチドである配列番号1454と比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;および「+++」>2					

10

(実施例 1 2)

配列番号 1 5 7 8 の T A L バリエーション

【0 2 4 0】

20

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐性についての、配列番号 1 5 7 8 に由来する T A L バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 1 5 7 8 にコードされた T A L の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0 2 4 1】

T A L バリエーションを発現する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する T A L バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした：水中で 8 倍希釈した H T P ライセート 2 0 μ L を 2 . 2 m M のチロシンで 5 分間アッセイした。アッセイの結果を表 1 2 - 1 に示す。この結果に基づき、さらなる定向進化のために配列番号 1 6 6 0 を選択した。

30

プロテアーゼおよび／または酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0 2 4 2】

T A L バリエーションに、実施例 1 0 に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷した。実施例 1 0 に記載したように、残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 1 2 - 1 に示す。

【0 2 4 3】

T A L バリエーションに酸性緩衝液を負荷し、それによって、熱処理した清澄化ライセート 7 0 μ L を T H E R M O T R O N (登録商標) (I N F O R S) タイタープレート振盪機 (4 0 0 r p m) 中で M c I l v a i n e 緩衝液 (p H 4) 7 0 μ L と共に 3 7 ° C で 1 . 5 時間インキュベートした。実施例 1 0 に記載したように、残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 1 2 - 1 に示す。

40

【0 2 4 4】

一部の事例では、p H とプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、酸性緩衝液で処理したライセートにプロテアーゼをさらに負荷した。具体的には、上記のように酸性緩衝液を負荷したライセートを遠心分離し、5 0 μ L の上清を 1 0 0 m M のリン酸ナトリウム (p H 8) 中に溶解した 4 g / L のプロテアーゼミックス 5 0 μ L と共にインキュベートした。得られた溶液を T H E R M O T R O N (登録商標) (I N F O R S) タイタープレ

50

ート振盪機（４００rpm）中で３７℃で２時間インキュベートし、実施例１０に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表１２－１に示す。

【表１２－１】

表12-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1578と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1578と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1635/1636	D20G/K44R/L202R/C506R	++	++	++	++
1637/1638	R103L/L202R/A540R	++	++	++	++
1639/1640	Q111K	++	++	++	++
1641/1642	R103L/R464Q/G549D	+	++	+	++
1643/1644	Q111K/C506R	++	++	++	++
1645/1646	K44R/L202R/R464Q/C506R	++	++	++	++
1647/1648	R464Q/C506R	++	++	++	++
1649/1650	Q111K/L202R/M313L/Q471Y/C506R	++	++	++	++
1651/1652	C506R	++	++	++	++
1653/1654	R103L/Q471Y	++	++	+	++
1655/1656	M313L/R464Q/Q471Y/C506R	+	++	+	++
1657/1658	L202R/R464Q/C506R	++	++	++	++
1659/1660	L202R/R464Q/C506R/G549D	++	++	++	++
1661/1662	R103L/Q111K/Q471Y	++	++	+	++
1663/1664	R56G/Q111K/C506R	++	++	++	++
1665/1666	C506R/G549D	+	++	++	++
1667/1668	R103L/Q111K/L202R/R464Q/Q471Y	++	++	++	++
1669/1670	D20G/L202R/M313L/Q471Y/C506R	++	++	++	++
1671/1672	L202R	++	++	++	++
1673/1674	Q111K/L202R/Q471Y	++	++	++	++
1675/1676	R56G/C506R	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

表12-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1578と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1578と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
1677/1678	K44R/Q111K/L202R/R464Q/Q471 Y/C506R/G549D	++	++	++	++
1679/1680	D20G/R103L/Q111K/Q471Y/C506 R	++	++	++	++
1681/1682	L202R/M313L/R464Q/Q471Y/C50 6R	++	++	++	++
1683/1684	Q111K/L202R/M313L/L316Q	++	++	+	+
1685/1686	T24S	++	++	++	++
1687/1688	R504A	++	++	++	++
1689/1690	Y41L	++	++	++	++
1691/1692	R464S	++	++	++	++
1693/1694	A540R	++	++	++	++
1695/1696	Y41N	++	++	++	++
1697/1698	R464N	++	++	++	++
1699/1700	R504L	++	++	++	++
1701/1702	Y41H	++	++	+	++
1703/1704	Q66K	++	++	++	++
1705/1706	E51H	++	++	++	++
1707/1708	Q305E	++	++	++	++
1709/1710	R46S	++	++	++	++
1711/1712	A59S	++	++	++	++
1713/1714	K44E	++	++	++	++
1715/1716	Q66T	++	++	++	++
1717/1718	T24K	++	++	++	++
1719/1720	Q305D	++	++	++	++
1721/1722	Y41S	++	++	+	++
1723/1724	K44R	++	++	++	++
1725/1726	Y41Q	++	++	+	++
1727/1728	T48A	++	++	+	+
1729/1730	D523H	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 3】

表12-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1578と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1578と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
1731/1732	Q66N	++	++	++	++
1733/1734	A36S	++	++	++	+
1735/1736	A59N	++	++	++	+
1737/1738	K50M	++	++	++	++
1739/1740	K44S	++	++	++	+
1741/1742	A519P	++	++	++	++
1743/1744	A519E	++	++	++	+
1745/1746	D27S	++	++	++	+
1747/1748	A36T	++	++	++	+
1749/1750	A519K	++	++	++	++
1751/1752	K44P	++	++	++	++
1753/1754	T24E	++	++	++	++
1755/1756	K518S	++	++	++	++
1757/1758	C500L	++	++	++	++
1759/1760	T48G	++	++	+	+
1761/1762	A540H	++	++	++	++
1763/1764	L208M	++	++	++	++
1765/1766	Q66H/W528R	++	++	++	++
1767/1768	T547G	++	++	++	++
1769/1770	A519T	++	++	++	+
1771/1772	Y41A	++	++	+	++
1773/1774	T24Q	++	++	+	++
1775/1776	R46A	++	++	+	+
1777/1778	Q55S	++	++	++	++
1779/1780	E51A	++	++	++	++
1781/1782	P197V	++	++	+	++
1783/1784	N33E	++	++	++	++
1785/1786	T547M/V553I	++	++	++	++
1787/1788	P272A	++	++	++	++
1789/1790	A331G	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 4】

表12-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1578と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1578と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1791/1792	A543T	++	++	++	++
1793/1794	A543V	++	++	++	++
1795/1796	I556L	++	++	++	++
1797/1798	A555S	++	++	++	++
1799/1800	Q470I	++	++	++	++
1801/1802	V559Y	++	++	++	++
1803/1804	Q289L	++	++	++	++
1805/1806	K332N	++	++	++	++
1807/1808	R292L/V553S	+	++	+	+
1809/1810	Q470T	++	++	++	++
1811/1812	Y432L	++	++	++	++
1813/1814	S435T	++	++	++	++
1815/1816	C506E	++	++	++	++
1817/1818	V559C	++	++	++	++
1819/1820	I556V	++	++	++	++
1821/1822	V559I	++	++	++	++
1823/1824	V559H	++	++	++	++
1825/1826	V559M	++	++	++	++
1827/1828	Y432T	++	++	++	++
1829/1830	V559L	++	++	++	++
1831/1832	S312C/V559Y	++	++	++	++
1833/1834	S435A	++	++	++	++
¹ すべての活性は、配列番号1578の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;および「++」>1.2。					

(実施例 1 3)

配列番号 1 6 6 0 の T A L バリエーション

【 0 2 4 5 】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 1 6 6 0 に由来する T A L バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 1 6 6 0 にコードされた T A L の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの H T P 活性分析

10

20

30

40

50

【0246】

TALバリエントを発現するE. coli細胞のHTP成長および溶解を実施例4に記載したように実施した。チロシンに関するTALバリエントの活性を以下の条件で、実施例4に記載したようにアッセイした：水中で8倍希釈したHTPライセート20μLを2.2mMのチロシンで5分間アッセイした。アッセイの結果を表13-1に示す。この結果に基づき、さらなる定向進化のために配列番号1844を選択した。

プロテアーゼおよび／または酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートのHTP活性分析

【0247】

TALバリエントにキモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、それによって、2または2.5倍希釈したHTPライセート50μLをTHERMOTRON（登録商標）（INFORS）タイタープレート振盪機（400rpm）中で4g/Lのプロテアーゼミックス50μLと共に37℃で2時間インキュベートした。プロテアーゼミックスは、100mMのリン酸ナトリウム（pH8.0）中4mg/mLのキモトリプシン（Sigma Aldrich）および4mg/mLのトリプシン（Sigma Aldrich）からなった。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表13-1に示す。

【0248】

TALバリエントに、実施例12に記載したように、酸性緩衝液を負荷した。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表13-1に示す。

【0249】

一部の事例では、実施例12に記載したように、pHとプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、酸性緩衝液で処理したライセートにプロテアーゼをさらに負荷した。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表13-1に示す。

【表13-1】

表13-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエントの相対的活性 (配列番号1660と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1660と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1835/1836	A36S/P197V/Q305D/K332N/C500 L	++	++	++	++
1837/1838	Q305D/K332N/G457S/C500L	++	++	++	++
1839/1840	A36S/Q55S/Q305D/K332N/P410M	+++	++	++	++
1841/1842	A36S/P197V/Q305D/K332N/P410 M	++	++	++	++
1843/1844	A36S/Q305D/K332N/P410M	+++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

表13-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1660と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1660と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1845/1846	A36S/Q305D/P410M	++	++	++	++
1847/1848	A36S/P197V/Q305D/K332N/P410 M/V559I	++	++	++	++
1849/1850	Q305D/K332N/P410M	+++	++	++	++
1851/1852	Q305D	++	++	++	++
1853/1854	A36S/Q66N/P197V/Q305D/K332N /G457S	++	++	++	++
1855/1856	Q55S/Q305D/K332N/G457S/A543 V/T547G	++	++	++	++
1857/1858	Q66N/Q305D/K332N	++	++	++	++
1859/1860	A36S/P197V/Q305D/P410M	++	++	++	++
1861/1862	Q305D/C500L/A543V/T547G	++	++	++	++
1863/1864	Q305D/K332N/P410M/C500L	+++	++	+++	++
1865/1866	P197V/Q305D	++	++	++	++
1867/1868	A36S/Q66N/P197V/Q305D/P410M	+++	++	++	++
1869/1870	A36S/P197V/Q305D	++	++	++	++
1871/1872	A36S/Q66N/Q305D/K332N/P410 M	+++	++	+++	++
1873/1874	P197V/Q305D/P410M	+++	++	+++	++
1875/1876	Q305D/K332N	++	++	++	++
1877/1878	A36S/P197V/Q305D/C500L	++	+++	++	++
1879/1880	A36S/Q305D/K332N	++	++	++	++
1881/1882	A36S/Q66N/Q305D/C500L	++	++	++	++
1883/1884	Q55S/Q305D/C500L/V559I	++	++	++	++
1885/1886	Q305D/K332N/C500L	++	++	++	++
1887/1888	P197V/Q305D/K332N/P410M	+++	++	++	++
1889/1890	Q305D/P410M	+++	++	+++	++
1891/1892	A36S/P197V/Q305D/K332N/P410 M/C500L	+++	++	+++	++
1893/1894	Q55S/Q305D	++	++	++	++
1895/1896	A36S/Q305D	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 13 - 3】

表13-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1660と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1660と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1897/1898	P197V/Q305D/K332N/C500L/A54 3V/T547G	++	++	++	++
1899/1900	Q66N/Q305D	++	++	++	++
1901/1902	A36S/Q66N/Q305D	++	++	++	++
1903/1904	P197V/Q305D/C500L	++	++	++	++
1905/1906	S134C/R202L/Q305D	++	++	++	++
1907/1908	Q305D/K332N/G457S/A555S	++	++	++	+
1909/1910	Q305D/K332N/G457S	++	++	++	++
1911/1912	P272A/S435T/Y526L	++	++	++	++
1913/1914	L208M/P272A/Y432L	++	++	++	+
1915/1916	R46S/Q111K/L208M/P272A/S435 T/Y526L	++	++	++	++
1917/1918	Q111K/P272A/Q471Y/Y526L	++	++	++	++
1919/1920	L208M	++	++	++	++
1921/1922	Q111K/P272A/Y432T/S435T	++	++	++	++
1923/1924	Y432L/Y526L	++	++	++	++
1925/1926	D20G/P197V/Y432T/A519K	++	++	++	++
1927/1928	K44E/R46S/Q111K/L208M	++	++	++	++
1929/1930	Q111K/Y526L	++	+	++	+
1931/1932	Q111K	+	+	+	+
1933/1934	S435T	+	+	+	+
1935/1936	Q471Y	+	+	+	+
1937/1938	R46S/Y432L/Q471Y	+	+	+	+
1939/1940	K44E/R46S/Q111K/Y432T/A519K	+	+	+	+
1941/1942	Q111K/P272A/A519K	+	+	+	+
1943/1944	L208M/P410M/S435T	++	+	++	++
1945/1946	Y41L/Y432T/Y526L	++	++	++	+
1947/1948	T24E/R46S/P410M/S435T/K518S	++	++	++	++
1949/1950	D20G	++	++	++	++
1951/1952	L208M/S435T/A519K	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

表13-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1660と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1660と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1953/1954	S435T/A519K/Y526L	++	++	++	++
1955/1956	R46S/L208M/P272A/Y432L/S435 T/Y526L	++	++	++	++
1957/1958	P272A	++	++	+	++
1959/1960	K44E/Q111K/Y432L/A519K/Y526 L	++	++	++	++
1961/1962	D20G/K44E/L208M/P272A/A519 K	+	++	+	+
1963/1964	T24E	+	++	+	+
1965/1966	D20G/Q111K/L208M/P272A/P410 M/Y432T	++	++	++	++
1967/1968	Q111K/Y432T/Y526L	++	++	++	+++
1969/1970	Q471Y/Y526L	++	++	++	++
1971/1972	A519K	++	++	++	++
1973/1974	K44E/L208M/Y432T/S435T	++	++	++	++
1975/1976	S435T/K518S	++	++	++	++
1977/1978	Q111K/Y432L/S435T	++	++	+	++
1979/1980	Y41L/K44E/R46S/Q111K/P272A	++	++	++	+
1981/1982	L211Q/P410I	+	+	+	+
1983/1984	S298G/P410I	++	++	++	+
1985/1986	P410L	+	+	+	+
¹ すべての活性は、配列番号1660の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;および「+++」>2。					

(実施例 1 4)

配列番号 1 8 4 4 の T A L バリエーション

【 0 2 5 0 】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 1 8 4 4 に由来する T A L バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 1 8 4 4 にコードされた T A L の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【 0 2 5 1 】

T A L バリエーションを発見する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載

したように実施した。チロシンに関するTALバリエーションの活性を以下の条件で、実施例4に記載したようにアッセイした：水中で10倍希釈したHTPLysoate 20 µLを2.2 mMのチロシンで5分間アッセイした。アッセイの結果を表14-1に示す。この結果に基づき、さらなる定向進化のために配列番号2030を選択した。

プロテアーゼおよび／または酸性緩衝液で前処理した清澄化LysoateのHTPL活性分析【0252】

TALバリエーションにキモトリプシンおよびトリプシンを負荷し、それによって、50 µLの2.5倍希釈したHTPLysoateをTHERMOTRON（登録商標）（INFORS）タイタープレート振盪機（400 rpm）中で4 g/Lのプロテアーゼミックス50 µLと共に37℃で2時間インキュベートした。プロテアーゼミックスは、100 mMのリン酸ナトリウム（pH 8.0）中4 mg/mLのキモトリプシン（Sigma Aldrich）および4 mg/mLのトリプシン（Sigma Aldrich）からなった。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表14-1に示す。

【0253】

TALバリエーションに、実施例12に記載したように、酸性緩衝液を負荷した。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表14-1に示す。

【0254】

一部の事例では、pHとプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、酸性緩衝液で処理したLysoateにプロテアーゼをさらに負荷した。具体的には、上記のように酸性緩衝液を負荷したLysoateを遠心分離し、40 µLの上清を100 mMのリン酸ナトリウム（pH 8）中に溶解した4 g/Lのプロテアーゼミックス60 µLと共にインキュベートした。得られた溶液をTHERMOTRON（登録商標）（INFORS）タイタープレート振盪機（400 rpm）中で37℃で2時間インキュベートし、実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表14-1に示す。

【表14-1】

表14-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1844と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1844と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1987/1988	Q111K/Q289L	+++	+++	++	+++
1989/1990	Q289L/R504A	+++	+++	++	+++
1991/1992	A59S/Q289L/S435T	+++	+++	++	+++
1993/1994	Q111K/Q289L/C500L	+++	+++	++	+++

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

表14-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1844と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1844と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
1995/1996	Q111K/Y432L	+++	+++	++	+++
1997/1998	Q289L/S435T/R504A/I5 56L	+++	+++	++	+++
1999/2000	A59S/Q289L	+++	+++	++	+++
2001/2002	Q111K	+++	+++	++	++
2003/2004	Q289L	+++	+++	++	+++
2005/2006	Q111K/Y432L/C500L	++	++	++	++
2007/2008	Q289L/S435T/C500L/R5 04A	+++	+++	++	+++
2009/2010	A59S/Y432L/S435T/R50 4A/I556L	++	++	++	++
2011/2012	A59S/Q66T/Q289L/C500 L/R504A/I556L	++	++	++	++
2013/2014	S435T/R504A	++	++	++	++
2015/2016	Q289L/Y432L	++	++	++	++
2017/2018	Q111K/Q289L/S435T/C5 00L	++	++	++	++
2019/2020	A59S/Q66T/Q111K/Q28 9L/Y432L/C500L	++	++	++	++
2021/2022	A59S/Q111K/Y432L/C5 00L	+++	++	++	++
2023/2024	T24K/A59S/Q111K/Q28 9L/R504A	++	++	++	++
2025/2026	Q66T/Q111K	+++	++	++	++
2027/2028	T24K/Q111K/Q289L	++	++	++	++
2029/2030	Q289L/Y432L/S435T	++	+++	++	++
2031/2032	T24K/Q289L	++	++	++	++
2033/2034	T24K/Q111K/Q289L/C5 00L/R504A	++	++	++	++
2035/2036	T24K/Q111K/S435T/C50 0L	+++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

表14-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1844と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1844と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
2037/2038	R504A/I556L	++	++	++	++
2039/2040	Q111K/A331G/Y432L/R 504A	++	++	++	+++
2041/2042	Q111K/C500L/R504A	+++	++	++	++
2043/2044	Q111K/A331G/S435T/C 500L	++	++	++	++
2045/2046	A59S/Q66T/Q111K/Y43 2L/C500L	+++	++	++	++
2047/2048	A59S/Q66T/Q111K/Y43 2L/R504A	+++	+++	++	++
2049/2050	T24K/Q111K/Y432L	++	++	++	++
2051/2052	A59S/Y432L	++	+++	++	+++
2053/2054	Q111K/Q289L/S435T	++	+++	++	++
2055/2056	R504A	++	+++	++	++
2057/2058	Q289L/S435T	++	+++	++	++
2059/2060	T24K/Y432L/S435T/R50 4A	++	++	++	++
2061/2062	A59S/Q111K	++	+++	++	++
2063/2064	Y432L	++	++	++	++
2065/2066	L211Q/K518S/A519T/T5 47G	+++	++	++	++
2067/2068	Y41Q/L208M/T547G	+++	++	++	++
2069/2070	L208M/L211Q/T547G	++	++	++	++
2071/2072	Y41Q/E51A/M410L/A54 3V	++	++	++	++
2073/2074	E51A/A519T	++	++	++	++
2075/2076	L208M	++	++	++	++
2077/2078	L211Q/T547G	++	++	++	++
2079/2080	L211Q	++	++	++	++
2081/2082	Y41Q/L208M/K518S/A5 19T/T547G	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

表14-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号1844と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号1844と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 4 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
2083/2084	Y41Q/M410L/K518S/T5 47G	++	++	+	++
2085/2086	T547G	++	++	++	++
2087/2088	L208M/L211Q/M410L/A 519T	++	++	++	++
2089/2090	Y41Q/K44P/L208M/T54 7G	++	++	++	++
2091/2092	K44R/L208M/K518S/T5 47G	++	++	++	++
2093/2094	Y41Q/L208M/M410L/A 543V/T547G	++	++	++	++
2095/2096	Y41Q/M410L/K518S/A5 43V	++	++	+	++
2097/2098	A519T	++	++	++	++
2099/2100	M410L	++	++	+	++
2101/2102	Y41Q/A543V	+++	++	++	++
¹ すべての活性は、配列番号1844の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;および「+++」>2。					

(実施例 1 5)

配列番号 2 0 3 0 の T A L バリエーション

【 0 2 5 5】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐容性についての、配列番号 2 0 3 0 に由来する T A L バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 2 0 3 0 にコードされた T A L の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの H T P 活性分析

【 0 2 5 6】

T A L バリエーションを発見する E . c o l i 細胞の H T P 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する T A L バリエーションの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした: 水中で 1 0 倍希釈した H T P ライセート 2 0 μ L を 2 . 2 m M のチロシンで 5 分間アッセイした。アッセイの結果を表 1 5 - 1 に示す。この結果に基づき、さらなる定向進化のために配列番号 2 1 1 4 を選択した。

プロテアーゼおよび / または酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの H T P 活性分析

【0257】

TALバリエーションに、実施例14に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷した。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表15-1に示す。

【0258】

ライセートをMcIlvaine緩衝液(pH3.8)と共にインキュベートしたことを除いて、TALバリエーションに、実施例12に記載したように、酸性緩衝液を負荷した。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表15-1に示す。

【0259】

一部の事例では、pHとプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、酸性緩衝液で処理したライセートにプロテアーゼをさらに負荷した。具体的には、上記のように酸性緩衝液を負荷したライセートを遠心分離し、50μLの上清を100mMのリン酸ナトリウム(pH8)中に溶解した4g/Lのパンクレアチン50μLと共にインキュベートした。得られた溶液をTHERMOTRON(登録商標)(INFORS)タイタープレート振盪機(400rpm)中で37℃で2時間インキュベートし、実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表15-1に示す。

【表15-1】

表15-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号2030と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2030と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
2103/2104	A45V/L244M/A324V/K513R	+	++	+	+
2105/2106	A45V/L436I/I512V/K513R	+	++	+	+
2107/2108	K13Q/A45V/I512V	+	++	+	+
2109/2110	K13S/V22T/A45V/I512V	+	++	+	+
2111/2112	K13S/A45V	+	++	+	+
2113/2114	A45V/I512V	+	++	+	+
2115/2116	Q8D	++	++	+	+
2117/2118	L428V	++	++	+	+
2119/2120	T11G	+	++	+	+
2121/2122	A4D	++	++	+	+
2123/2124	A45V	+	++	+	+

【表 15 - 2】

表15-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエントの相対的活性 (配列番号2030と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2030と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
2125/2126	T17Q	+	++	+	+
2127/2128	L251V	+	++	+	+
2129/2130	T11D	++	++	+	++
2131/2132	K13R	+	++	+	+
2133/2134	T11A	+	++	+	+
2135/2136	T11S	+	++	+	+
2137/2138	Q8R	++	++	+	+
2139/2140	T11K	+	+	+	+
2141/2142	V341A	+	+	+	+
2143/2144	S19H	+	+	+	+
2145/2146	A324R	+	+	+	+
2147/2148	Q8G	+	+	+	+
2149/2150	I144L		+		+
2151/2152	I327M	+	+	+	+
¹ すべての活性は、配列番号2030の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;および「++」>1.2。					

10

20

30

(実施例 16)

配列番号 2114 の TAL バリエント

【0260】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐性についての、配列番号 2114 に由来する TAL バリエントの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 2114 にコードされた TAL の定向進化をバリエントの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの HTP 活性分析

40

【0261】

TAL バリエントを発現する *E. coli* 細胞の HTP 成長および溶解を実施例 4 に記載したように実施した。チロシンに関する TAL バリエントの活性を以下の条件で、実施例 4 に記載したようにアッセイした：水中で 10 倍希釈した HTP ライセート 20 μ L を 2.2 mM のチロシンで 5 分間アッセイした。アッセイの結果を表 16-1 に示す。この結果に基づき、さらなる定向進化のために配列番号 2156 を選択した。

プロテアーゼおよび／または酸性緩衝液で前処理した清澄化ライセートの HTP 活性分析

【0262】

TAL バリエントに、実施例 15 に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷した。実施例 10 に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を

50

表 16-1 に示す。

【0263】

TAL バリエーションに、実施例 15 に記載したように、酸性緩衝液を負荷した。実施例 10 に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 16-1 に示す。

【0264】

一部の事例では、実施例 15 に記載したように、pH とプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、酸性緩衝液で処理したライセートにプロテアーゼをさらに負荷し、実施例 10 に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表 16-1 に示す。

【表 16-1】

10

表16-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号2114と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2114と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
2153/2154	Q8D/T11D/Q111K/R504A	++	++	++	++
2155/2156	Q8D/T11D/T17Q/V22T/A324V/ R504A/A519T	++	++	++	++
2157/2158	A4D	++	++	++	++
2159/2160	A4D/L428V	++	++	++	++
2161/2162	A4D/Q8R/T11D/K13R/V22T/Q1 11K/R504A	++	++	++	++
2163/2164	A4D/A324V	++	++	++	++
2165/2166	T11D/T17Q/V22T/A324V	++	++	++	++
2167/2168	A4D/Q8D/T11G/T17P/A324V/L 428V/R504A	++	++	++	++
2169/2170	A4D/Q8D/V22T/Q111K/R504A	++	++	++	++
2171/2172	A4D/T17Q/A241S/A519T/T547 A	++	++	+	++
2173/2174	T11G/K13R/R504A	++	++	++	++
2175/2176	Q8D/T11D/K13R/A324V	++	++	++	++
2177/2178	A4D/Q8R/T11D/V22T/Q111K	++	++	++	++

20

30

40

50

【表 16-2】

表16-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号2114と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2114と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
2179/2180	A236V	++	++	+	+
2181/2182	I228M	++	++	+	+
2183/2184	H16Q	++	++	+	++
2185/2186	T437G	++	++	+	++
2187/2188	F10G	++	++	++	++
2189/2190	L316T	+	++		
2191/2192	I2T	++	++	++	++
2193/2194	I228M/Q259H	++	++	+	+
2195/2196	D305E/I307N/I425V	++	++	+	+
2197/2198	V385A	++	++	+	++
2199/2200	T7Q	++	++	+	+
2201/2202	I2G	++	++	+	+
2203/2204	T430E	+	++	+	+
2205/2206	M478L	+	++	+	+
2207/2208	Q6G	++	++	+	+
2209/2210	V57I	++	++	+	+
2211/2212	A39S	++	++	+	+
2213/2214	I425V	++	++	+	+
2215/2216	H16T	++	+	+	+
2217/2218	T505S	+	+	+	+
2219/2220	S14G	++	+	+	+
¹ すべての活性は、配列番号2114の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;「++」>1.2;および「+++」>2。					

(実施例 17)

配列番号 2156 の TAL バリエーション

【0265】

この実施例では、改善されたチロシン活性、プロテアーゼ耐性、および低 pH 耐性についての、配列番号 2156 に由来する TAL バリエーションの進化およびスクリーニングに関する実験について記載する。配列番号 2156 にコードされた TAL の定向進化をバリエーションの遺伝子のライブラリーを構築することによって実行した。次いで、これらのライブラリーを以下に記載した方法を使用して、プレーティングし、成長させ、スクリーニングした。

清澄化ライセートの HTP 活性分析

【0266】

TALバリエントを発現するE. coli細胞のHTP成長および溶解を実施例4に記載したように実施した。チロシンに関するTALバリエントの活性を以下の条件で、実施例4に記載したようにアッセイした：水中で10倍希釈したHTPライセート20μLを2.2mMのチロシンで5分間アッセイした。アッセイの結果を表17-1に示す。
【0267】

TALバリエントに、実施例15に記載したように、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷した。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表17-1に示す。
【0268】

TALバリエントに、実施例15に記載したように、酸性緩衝液を負荷した。実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表17-1に示す。
【0269】

一部の事例では、実施例15に記載したように、pHとプロテアーゼを組み合わせたアッセイにおいて、酸性緩衝液で処理したライセートにプロテアーゼをさらに負荷し、実施例10に記載したように残存する活性を決定した。このアッセイの結果を表17-1に示す。
【表17-1】

表17-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエントの相対的活性 (配列番号2156と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2156と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
2221/2222	Q111K/M478L	+	+	+	
2223/2224	A241S/V385A/M478L		+		+
2225/2226	H16Q/V57I		+	+	+
2227/2228	V57I/Q111K/P114S	+	+	+	+
2229/2230	T437G	+	+	+	
2231/2232	H16Q/V385A/M478L/T547G		+		+
2233/2234	A241S/V385A/M478L/T547G		+		+
2235/2236	H16Q/V385A/T437G	+	++	+	+
2237/2238	Q111K/A241S/T437G/M478L	+	+	+	+
2239/2240	A241S/V385A	+	++	+	+

【表 17-2】

表17-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号2156と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2156と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテ アーゼの組合せ FIOPC
2241/2242	D20G/V385A/T437G/M478L/ T547G	+	++		+
2243/2244	V57I	+	+	+	+
2245/2246	V385A	+	++	+	+
2247/2248	V385A/T437G/M478L/T547G	+	+		+
2249/2250	H16Q/A241S/T437G	+	++	+	+
2251/2252	H16Q	++	++	+	+
2253/2254	A241S/T437G	+	++	+	+
2255/2256	V57I/T437G	+	+	+	+
2257/2258	H16Q/V385A	+	++	+	+
2259/2260	T437G/M478L	+	+	+	+
2261/2262	A4D/H16Q/V385A/M478L	+	++	+	+
2263/2264	A4D/V57I/Q111K/T437G	++	++	+	+
2265/2266	Q111K/P114S/R202L/Y234H/ L289Q/D305Q/M313L/V324A/ N332K/V336I/M410P/L432Y/ T435S/Q464R/A504R/V512I/T 519A/D523E/K548S/D549G	+	+	+	+
2267/2268	H16Q/Y41Q/T437G	++	+	+	+
2269/2270	F10G/H16Q/T437G	+	+	+	+
2271/2272	A4D/T7Q/V57I/Q111K	++	++	+	++
2273/2274	T7Q/V385A/T547G	+	+	+	+
2275/2276	H16Q/Y41Q/V57I/T437G/M47 8L	+	+		+
2277/2278	M478L	+	+	+	+
2279/2280	A241S	++	+	+	+
2281/2282	H16Q/Y41Q/V57I/Q111K/V38 5A/T547G	+	+		+
2283/2284	H16Q/T437G	+	+	+	+
2285/2286	A4D/T7Q/Q111K/P114S/T437 G/T547G	+	+	+	+

10

20

30

40

50

【表 17-3】

表17-1.様々な条件下でのチロシンに関するTALバリエーションの相対的活性 (配列番号2156と比較) ¹					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸の差異 (配列番号2156と比較)	2mM Tyr FIOPC	プロテ アーゼ FIOPC	pH 3.8 FIOPC	pHとプロテア ーゼの組合せ FIOPC
2287/2288	V57I/Q111K/M478L/T547G	+	+	+	+
2289/2290	V385A/T437G	+	+	+	+
¹ すべての活性は、配列番号2156の参照ポリペプチドと比較して決定した。増加した活性のレベルは以下のように定義される:「+」=0.9から1.2;および「++」>1.2。					

10

【0270】

特定の実施形態に関連して本発明について記載してきたが、様々な変更を行うことができ、均等物に置換して、特定の状況、材料、組成物、プロセス、プロセスステップ（単数または複数）に適応させることができ、これにより、特許請求の範囲から逸脱することなく、本発明の利益を達成することができる。

20

【0271】

アメリカ合衆国におけるあらゆる目的のために、本開示で引用されたありとあらゆる刊行物および特許文書は、このような刊行物または文書がそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれることを具体的かつ個々に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。刊行物および特許文書の引用は、このような文書のいずれかが関連する先行技術であることを示すものとして意図されず、また、その内容または日付に関する承認を構成するものでもない。

【配列表】

2022513199000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/64891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 31/122, A61K 38/51, A61K 9/00 (2020.01)

CPC - C12P 7/42, C12P 13/225, C12N 15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y ----- A	US 2017/0159038 A1 (CODEXIS, INC) 08 June 2017 (08.06.2017) para [0015]; [0107]; [0212]; SEQ ID NO: 6	1 ----- 20/1, 21, 23 ----- 2, 19, 20/(2,19), 22
Y ----- A	UniProtKB Accession No K9XQ92 "Histidine ammonia-lyase" 06 March 2013 [online]. [Retrieved on 23 March 2020]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/K9XQ92 > Entire document	20/1, 21, 23 ----- 2, 19, 20/(2,19), 22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 March 2020

Date of mailing of the international search report

14 APR 2020

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/64891

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 24-63
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

—continued on first extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 19, 20(in part), 21-23 limited to SEQ ID NO: 2 with substitutions at S79/K95/N107

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 19/64891

--continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking--

Group I+, claims 1-23, directed to a recombinant tyrosine ammonia lyase and/or biologically active fragment thereof. The lyase will be searched to the extent that the lyase amino acid sequence encompasses substitutions at positions S79/K95/N107 relative to SEQ ID NO: 2 (note, this is the first claimed set of substituted positions, and corresponds to SEQ ID NO: 20). It is believed that claims 1, 2, 19, 20(in part), and 21-23 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the lyase encompasses SEQ ID NO: 2 with a substitutions of S79/K95/N107. Additional lyase variant sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected lyase variant sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a lyase comprising substitutions at positions S79/N107 relative to SEQ ID NO: 2 (note, this is the second claimed set of substituted positions, and corresponds to SEQ ID NO: 22), (claims 1, 2, 19, 20(in part), 21-23).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique lyase amino acid sequence. Each amino acid sequence encodes a unique lyase peptide, and is considered a distinct technical feature.

No technical features are shared between the lyase amino acid sequences of Group I+ and accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Group I+ were considered to share the technical features of including: a recombinant tyrosine ammonia lyase and/or biologically active recombinant tyrosine ammonia lyase fragment comprising an amino acid sequence, these shared technical features are previously disclosed by US 2017/0159038 A1 to Codexis, Inc. (hereinafter Codexis).

Codexis teaches a recombinant tyrosine ammonia lyase comprising a substitution in an amino acid sequence (para [0015] "the present invention provides recombinant tyrosine ammonia lyases comprising at least one mutation at position 18, 47, 54, 59, 64, 73, 77...").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Items 4 above: claims 24-63 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	38/51 (2006.01)	A 6 1 K	38/51
A 6 1 P	13/02 (2006.01)	A 6 1 P	13/02
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 K	31/122 (2006.01)	A 6 1 K	31/122

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 2 0 0

(72)発明者 ジェンヌ, スティーブン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
2 0 0

F ターム (参考) 4B050 CC04 DD02 DD04 FF01 FF03E LL01
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA72X AA72Y AA90X AB01 BA02 CA27 CA44
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA53 DC26 MA02 MA17
MA22 MA27 MA35 MA37 MA52 MA66 NA14 ZA811 ZC211
4C206 AA01 EA02 KA01 MA02 MA04 MA86 NA05 ZA81 ZC21