

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7680902号  
(P7680902)

(45)発行日 令和7年5月21日(2025.5.21)

(24)登録日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 P 21/06 (2006.01)	C 1 2 P 21/06	
C 1 2 C 1/027(2006.01)	C 1 2 C 1/027	Z
C 1 2 N 9/58 (2006.01)	C 1 2 N 9/58	
C 1 2 N 15/57 (2006.01)	C 1 2 N 15/57	Z N A

請求項の数 9 (全78頁)

(21)出願番号	特願2021-126487(P2021-126487)	(73)特許権者	513207806
(22)出願日	令和3年8月2日(2021.8.2)		インターナショナル エヌアンドエイチ
(62)分割の表示	特願2017-567286(P2017-567286)		デンマーク エーピーエス
原出願日	平成28年6月27日(2016.6.27)		デンマーク王国、2 8 0 0 コンゲンス
(65)公開番号	特開2021-184723(P2021-184723)	(74)代理人	110003579
	A)		弁理士法人山崎国際特許事務所
(43)公開日	令和3年12月9日(2021.12.9)	(74)代理人	100118647
審査請求日	令和3年8月2日(2021.8.2)		弁理士 赤松 利昭
審判番号	不服2023-10322(P2023-10322/J)	(74)代理人	100123892
	1)		弁理士 内藤 忠雄
審判請求日	令和5年6月21日(2023.6.21)	(74)代理人	100169993
(31)優先権主張番号	62/185,503		弁理士 今井 千裕
(32)優先日	平成27年6月26日(2015.6.26)	(74)代理人	100173978
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 朴 志恩
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質加水分解用アミノペプチダーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質性基質を、アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドに曝すことを含むタンパク質加水分解物の生成方法であって、

前記アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、N 末端から番号を付与したときの 2 の位置にプロリン残基を有するポリペプチドを加水分解する、単離ポリペプチドである、方法。

【請求項 2】

前記タンパク質性基質をエンドペプチダーゼに曝すことをさらに含む請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記加水分解物は Leu、Gly、Glu、Ser、Asp、Asn、Pro、Cys、Ala および / または Glu に富んでいる請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記加水分解物は Glu および / または Glu に富んでいる請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記タンパク質基質はホエータンパク質分離物、カゼイン、ダイズタンパク質分離物、およびグルテンから選択される、請求項 1 に記載の方法。 20

## 【請求項 6】

タンパク性基質から、遊離グルタミン酸および/またはグルタミン酸残基を結合したペプチドに富むタンパク質加水分解物を得る方法であって、前記基質を脱アミドプロセスに供し、かつアミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドに曝すことを含む方法であって、

前記アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、N 末端から番号を付与したときの 2 の位置にプロリン残基を有するポリペプチドを加水分解する、単離ポリペプチドである、方法

## 【請求項 7】

前記基質を 1 種以上の非特異的に作用するエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素に曝すことをさらに含む請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

a) 穀物を準備する工程、  
b) モルト生成プロセス中に前記穀物に、アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドを有効量添加する工程、および  
c) モルト化された穀物を得る工程  
を含み、

前記アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、N 末端から番号を付与したときの 2 の位置にプロリン残基を有するポリペプチドを加水分解する、単離ポリペプチドである、モルト化穀物の製造方法。

## 【請求項 9】

醸造中に遊離アミノ態窒素 (FAN) を生成する方法であって、醸造プロセス中に、アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドを有効量添加する工程を含む方法であって、

前記アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、N 末端から番号を付与したときの 2 の位置にプロリン残基を有するポリペプチドを加水分解する、単離ポリペプチドである、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2015年6月26日に出願された米国仮特許出願第62/185503号および2015年10月1日に出願された同第62/235937号の優先権および利益を主張するものであり、各仮出願の発明の名称は「新規のタンパク質加水分解用アミノペプチダーゼ」である。

## 【0002】

配列表の参照による組み込み

2016年6月10日に作成され、本明細書とともに提出された、192,505バイトのサイズを有する「20160610\_\_NB40989 - PCT sequence listing prj\_\_ST25.txt」という名のファイルに示された配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【背景技術】

## 【0003】

各種食品および飼料製品にはタンパク質加水分解物が含まれている。この加水分解は、従来、化学的加水分解により行われてきた。しかしながら、そのような化学的加水分解は、加水分解中に得られるアミノ酸を大量に分解し、また、化学反応の過程で有害な副生物を生成する。化学的加水分解により得られるタンパク質加水分解物を使用することの懸念

10

20

30

40

50

の増大が、酵素を使用した加水分解プロセスの開発に繋がっている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

タンパク性物質の酵素による加水分解プロセスは、高い加水分解度を得ることを目標としている。アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドは、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質のN末端からの1つ以上のアミノ酸残基の除去を触媒する。所望の特性および高い加水分解度を有するタンパク質加水分解物を生成するには、一般に、ペプチダーゼ活性物を混合して使用する必要がある。単独で、または他の酵素と組み合わせられて、食品および飼料製品に使用されるタンパク質加水分解物の特性および加水分解度の改善に有用な活性を有する単一成分のペプチダーゼ酵素を提供することが望まれる。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、アミノペプチダーゼ活性が高い新規なポリペプチド、ならびに、望ましい品質および高い加水分解度を有するタンパク質加水分解物を得る方法を提供する。

【0006】

本発明の特徴および利点は、発明の原理が用いられている実施形態を記載した以下の説明、およびその添付図面を参照することにより、より深く理解できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、pepN<sub>2</sub>酵素をコードする合成遺伝子の全体的な設計を上にし、内因性分泌シグナル配列の代わりに使用されたリーダー配列を下にクローズアップして示す。

20

【図2】図2は、グルテン加水分解における、ネオサルトリア・フィッシェリ(Neosartorya fischeri)由来のPepN<sub>2</sub>のグルタミン酸遊離のpH依存性(加水分解中のpH調節なし)を示す。

【図3】図3は、グルテン加水分解における、ネオサルトリア・フィッシェリ(Neosartorya fischeri)由来のPepN<sub>2</sub>のグルタミン酸遊離の温度依存性(加水分解中のpH調節なし)を示す。

【図4】図4は、異なるPepN<sub>2</sub>のグルタミン酸遊離を示す。

30

【図5】図5は、WHWLQLKPGQPMY(配列番号26)の加水分解を示す。

【図6】図6は、KPGQPMY(配列番号27)の加水分解を示す。

【図7】図7は、QPMY(配列番号28)の加水分解を示す。

【図8】図8は、基質および開裂生成物のペプチド配列を、Skylineに入力し、それぞれの試料の強度を算出したことを示す。

【図9】図9は、いくつかのPepN<sub>2</sub>酵素の配列アライメントを列挙した、図9A~9Fの6枚のパネルの空間的配置を示す。

【図10】図10は、TRI032、TRI035、TRI063(アスペルギルス・オリゼ(A.oryzae))およびCOROLASE(登録商標)LAP(真菌エキソペプチダーゼ)によるTPAAR(配列番号29)の加水分解。

40

【発明を実施するための形態】

【0008】

本開示はアミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する。本発明はまた、そのポリペプチドをコードする核酸配列、その核酸配列を含む核酸コンストラクト、ベクターおよび宿主細胞、ならびに、そのポリペプチドを生成する方法に関する。本開示はまた、タンパク性基質から加水分解物を得る方法であって、タンパク性物質を、単独の、またはプロテアーゼ、例えばエンドペプチダーゼと組み合わせたアミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドに曝すことを含む方法に関する。本開示はまた、タンパク性基質から、遊離グルタミン酸および/またはグルタミン酸残基を結合したペプチドに富む加水分解物を得る方法であって、基質を、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドに曝すこと

50

を含む方法に関する。本開示はさらに、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドを含む風味改善組成物に関する。組成物はさらに、追加の酵素活性を含んでもよい。

#### 【0009】

他の態様において、本明細書に記載の方法は、ベーキングなど、食品関連用途で風味を向上させるために使用され得る。あるいは、食品における風味改善は、本発明の方法によって得られる加水分解物の添加によって達成され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のアミノペプチダーゼを使用して生成される加水分解物はまた、未処理の加水分解物に比べて、苦味を低減することができる。

#### 【0010】

いくつかの実施形態において、本発明は、新しい真菌アミノペプチダーゼ (PepN) 、産生宿主 (例えば、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) ) におけるそれらの高収率での産生、ならびに、例えば苦味除去用、およびグルタミン酸生成用のタンパク質加水分解物を生成するためのそれらの使用を提供する。実施例9に示すように、本発明の2型アミノペプチダーゼは、1型アミノペプチダーゼと比べて、グルタミン酸の放出が向上した。初期の結果は、驚くべきことに、これらのPepNが、他の既知のアミノペプチダーゼと比べて、P1中のプロリンに対し、耐性を有することを示唆している。したがって、本発明において使用するために教示されるプロリン耐性アミノペプチダーゼは、広範なペプチドおよび/またはタンパク質基質に作用し得、そのような広い基質特異性を有することに起因して、特定のアミノ酸 (例えば、プロリンおよび/またはリジンおよび/またはアルギニンおよび/またはグリシン) に富む基質の開裂を容易

10

20

#### 【0011】

驚いたことに、本発明者らは、2型アミノペプチダーゼが1型アミノペプチダーゼより優れた能力を有することを見出した。さらに、本発明者らは、驚いたことに、良好な能力を有する一群の真菌2型アミノペプチダーゼを見出した。この一群の真菌2型アミノペプチダーゼは、それらの成熟アミノ酸配列中に長いN末端を有している。図9は、いくつかの2型アミノペプチダーゼのアミノ酸配列のアライメントを示している。

#### 【0012】

「アミノペプチダーゼ活性」という用語は、本明細書においては、ペプチド、オリゴペプチドまたはタンパク質のN末端からのアミノ酸の切断を触媒するペプチダーゼ活性と定義される。一般的な定義では、アミノペプチダーゼ活性は、ペプチド、オリゴペプチドまたはタンパク質のN末端からアミノ酸X (ここで、Xは、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValからなる群から選択されるアミノ酸残基、少なくともLeu、Glu、Gly、Ala、および/またはProの残基であり得る) を開裂することができる。本発明のアミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドが、ペプチド、ポリペプチド基質のN末端から開裂させるアミノ酸に関し非特異的であり得ることは理解されよう。

30

#### 【0013】

いくつかの実施形態において、本発明は、図9の配列アライメントに示すように、67位の保存残基I/VのN末端側に13を超える残基を含む予測成熟配列を有する、アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチド、またはそのフラグメントに関し、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。

40

#### 【0014】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号1の成熟アミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド (以下、「相同ポリペプチド」) に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリ

50

ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号1を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号1のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から1個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号18の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列を有する。

10

## 【0015】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号2の成熟アミノ酸配列に対し少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド（以下、「相同ポリペプチド」）に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号2のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から1個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号19の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号2のアミノ酸配列を有する。

20

30

## 【0016】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号3の成熟アミノ酸配列に対し少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド（以下、「相同ポリペプチド」）に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号3のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から1個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号20の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号3のアミノ酸配列を有する。

40

50

## 【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号 4 の成熟アミノ酸配列に対し少なくとも約 5 0 %、好ましくは少なくとも約 6 0 %、好ましくは少なくとも約 7 0 %、より好ましくは少なくとも約 8 0 %、より一層好ましくは少なくとも約 9 0 %、最も好ましくは少なくとも約 9 5 %、さらに最も好ましくは少なくとも約 9 7 % の相同性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド（以下、「相同ポリペプチド」）に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列と、5 個のアミノ酸、好ましくは 4 個のアミノ酸、より好ましくは 3 個のアミノ酸、より一層好ましくは 2 個のアミノ酸、最も好ましくは 1 個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号 4 のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から 1 個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号 2 1 の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号 4 のアミノ酸配列を有する。

10

## 【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号 5 の成熟アミノ酸配列に対し少なくとも約 5 0 %、好ましくは少なくとも約 6 0 %、好ましくは少なくとも約 7 0 %、より好ましくは少なくとも約 8 0 %、より一層好ましくは少なくとも約 9 0 %、最も好ましくは少なくとも約 9 5 %、さらに最も好ましくは少なくとも約 9 7 % の相同性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド（以下、「相同ポリペプチド」）に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列と、5 個のアミノ酸、好ましくは 4 個のアミノ酸、より好ましくは 3 個のアミノ酸、より一層好ましくは 2 個のアミノ酸、最も好ましくは 1 個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号 5 のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から 1 個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号 2 2 の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号 5 のアミノ酸配列を有する。

20

30

## 【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号 6 の成熟アミノ酸配列に対し少なくとも約 5 0 %、好ましくは少なくとも約 6 0 %、好ましくは少なくとも約 7 0 %、より好ましくは少なくとも約 8 0 %、より一層好ましくは少なくとも約 9 0 %、最も好ましくは少なくとも約 9 5 %、さらに最も好ましくは少なくとも約 9 7 % の相同性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド（以下、「相同ポリペプチド」）に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列と、5 個のアミノ酸、好ましくは 4 個のアミノ酸、より好ましくは 3 個のアミノ酸、より一層好ましくは 2 個のアミノ酸、最も好ましくは 1 個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。

40

50

いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号6のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から1個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号23の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号6のアミノ酸配列を有する。

#### 【0020】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号7の成熟アミノ酸配列に対し少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド（以下、「相同ポリペプチド」）に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号7のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から1個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号24の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号7のアミノ酸配列を有する。

#### 【0021】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号8の成熟アミノ酸配列に対し少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド（以下、「相同ポリペプチド」）に関する。いくつかの実施形態において、相同ポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列、成熟アミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含み、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。配列番号8のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端から1個以上のアミノ酸が削除されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、フラグメントは配列番号25の配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは配列番号8のアミノ酸配列を有する。

#### 【0022】

好ましくは、フラグメントは、少なくとも330個のアミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも380個のアミノ酸残基、最も好ましくは、430個のアミノ酸残基を含む。

#### 【0023】

対立遺伝子変異型は、同じ染色体座位を占める遺伝子の2以上の代替形態のいずれかを

10

20

30

40

50

示す。対立遺伝子変異は、突然変異によって自然に生じ、集団内で表現型多型をもたらし得る。

【0024】

本明細書で使用される「親酵素」は、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8に示すポリペプチドのアミノ酸残基の全てを有するアミノペプチダーゼである。この点に関し、例えば、親は変異ポリペプチドの修飾（これは、変異型により、0、1もしくはそれ以上であり得る）の全てを有するであろう。

【0025】

いくつかの実施形態では、本発明は、低ストリンジェンシーな条件下で、より好ましくは、中位のストリンジェンシーな条件下で、最も好ましくは、高ストリンジェンシーな条件下で、オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションを行う核酸配列によってコードされる、アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチド、またはそのポリペプチドの対立遺伝子変異型およびフラグメント（このフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する）に関し、オリゴヌクレオチドプローブは、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16、またはその相補鎖の核酸配列のポリペプチドコード化部分と同じ条件下でハイブリダイゼーションを行う（J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York）。

【0026】

ハイブリダイゼーションとは、核酸配列が、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16に示す核酸配列のポリペプチドコード化部分に対応するオリゴヌクレオチドプローブに、低～高ストリンジェンシーな条件下（すなわち、5X SSPE、0.3% SDS、200Pg/ml断片処理済みの変性サケ精子DNA、ならびに、それぞれ低、中および高ストリンジェンシーで25、35または50%のホルムアミド中、42でプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション）で、標準サザンプロット法にしたがいハイブリダイズすることを示す。

【0027】

配列番号1、もしくは配列番号2、もしくは配列番号3、もしくは配列番号4、もしくは配列番号5、配列番号6、もしくは配列番号7、もしくは配列番号8のアミノ酸配列、またはその部分配列は、オリゴヌクレオチドプローブを設計するために使用され得、あるいは例えば、配列番号9、もしくは配列番号10、もしくは配列番号11、もしくは配列番号12、もしくは配列番号13、配列番号14、もしくは配列番号15、もしくは配列番号16の核酸配列のポリペプチドコード化部分などの、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列、またはその部分配列は、当該技術分野でよく知られた方法にしたがい、異なる属または種の菌株からアミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを同定またはクローン化するために使用され得る特に、そのようなプローブは、その中の対応する遺伝子を同定および単離するために、標準サザンプロット法にしたがって、目的の属または種のゲノムまたはcDNAとハイブリダイゼーションするために使用することができる。そのようなプローブは、全配列より相当に短い可能性があるが、長さが少なくとも15個、好ましくは少なくとも25個、より好ましくは少なくとも40個のヌクレオチドでなければならない。より長いプローブもまた使用することができる。DNAプローブおよびRNAプローブの両方を使用できる。これらのプローブは、通常、対応する遺伝子を検出するために（例えば、32P、3H、35S、ビオチンまたはアビジンを用いて）標識される。

【0028】

したがって、そのような他の生物から調製されたゲノム、cDNAまたは組み合わせ化

10

20

30

40

50

学ライブラリーによって、上記プローブとハイブリダイズし、かつアミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAをスクリーニングすることができる。そのような他の生物からのゲノムまたは他のDNAは、アガロースもしくはポリアクリルアミドゲル電気泳動法、または他の分離技術によって分離することができる。ライブラリー由来のDNAまたは分離DNAは、ニトロセルロースまたは他の好適な担体材料に移して固定化することができる。配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16の核酸配列のポリペプチドコード化部分と相同のクローンまたはDNAを同定するために、サザンブロットにおいて担体材料が使用され、その担体材料は、30分間に、最終的に3回、それぞれ、 $2 \times SSC$ 、 $0.2\% SDS$ を使用し、好ましくは少なくとも50、より好ましくは少なくとも55、より好ましくは少なくとも60、より好ましくは少なくとも65、より一層好ましくは少なくとも70、最も好ましくは少なくとも75で洗浄される。オリゴヌクレオチドプローブがこれらの条件下でハイブリダイズする分子は、X線フィルムを使用して検出される。

#### 【0029】

本明細書で使用される「修飾している」および「修飾」という用語は、最も近い同一性の野生型アミノペプチダーゼポリペプチド配列と比較したときの置換を指す。比較は、変異体アミノペプチダーゼポリペプチドと、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8として示されているレファレンス配列を有する野生型アミノペプチダーゼの2つをアライニングすることによって行われる。

#### 【0030】

同様に、本明細書で使用される「等価修飾」は、他のアミノペプチダーゼ中の等価位置にあるアミノ酸に同じ修飾（通常、置換）を行うことを指す。

#### 【0031】

一態様において、本発明のアミノペプチダーゼ配列は、単離形態である。「単離された」という用語は、アミノペプチダーゼ配列が天然で、天然に会合し、天然において見出される少なくとも1つの他の構成成分を少なくとも実質的に含まないことを意味する。本発明のアミノペプチダーゼ配列は、他の場合に物質が会合し得る1つ以上の汚染物質を実質的に含まない形態で提供され得る。したがって、例えば、それは、1つ以上の潜在的に汚染するポリペプチドおよび/または核酸分子を実質的に含まないことがある。

#### 【0032】

一態様において、本発明のアミノペプチダーゼ配列は、精製された形態である。「精製された」という用語は、所与の構成成分が高レベルで存在していることを意味する。構成成分は、組成物中に存在する主要な構成成分であることが望ましい。アミノペプチダーゼは、少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%のレベルで存在していることが好ましく、前記レベルは、考慮される総組成物に対する乾燥重量/乾燥重量基準で測定される。

#### 【0033】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上特に明記されない限り、複数形を含む。別途指示のない限り、核酸は5'から3'の方向に左から右へと記載し、アミノ酸配列はアミノからカルボキシの方向に左から右へと記載する。別段の指示がない限り、本開示が本明細書に記載の特定の方法、プロトコルおよび試薬に限定されないことに留意されたい。

#### 【0034】

定義されていない用語および略語は、当該技術分野において使用されるそれらの通常の意味を有するものとする。本明細書において他に特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解する意味と同一の意味を有する。別途指示のない限り、本開示の実施には、分子生物学、タンパク質工学および微生物学において通常使用される従来技術が含まれる。本明細書に記載のものと類似の、または等価

10

20

30

40

50

な方法および材料が本開示の実施に使用されるが、いくつかの好適な方法および材料を本明細書に記載する。この直下に定義した用語は、明細書全体を参照することにより、より十分に定義される。

【0035】

ヌクレオチド配列

本発明の範囲は、本明細書中に定義した特定の特性を有するアミノペプチダーゼをコードするヌクレオチド配列を包含する。

【0036】

いくつかの実施形態では、核酸配列は、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、例えばアスペルギルス・クラバタス (*Aspergillus clavatus*) から得られるポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、核酸配列は、ネオサルトリア属 (*Neosartorya*)、例えばアスペルギルス・フィッシャーリ (*Neosartorya fischeri*) から得られるポリペプチドをコードする。

10

【0037】

いくつかの実施形態において、本発明は、図9の配列アライメントに示すように、67位の保存残基 I / V のN末端側に13を超える残基を含む予測成熟配列を有する、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド、またはそのフラグメントをコードする核酸に関し、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。

【0038】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、例示したポリヌクレオチドに対し特定の核酸相同性を有するポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16の核酸配列のポリペプチドコード化部分に対し、少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16からなる群から選択される核酸配列を含む。他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドはまた、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16からなる群から選択される核酸配列に相補的な核酸配列を有し得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換えポリペプチドまたはその活性フラグメントをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、組換えポリペプチドまたはその活性フラグメントをコードする核酸配列を含む。相同性は、アミノ酸配列アライメントにより、例えば、本明細書に記載のBLAST、ALIGN、またはCLUSTALなどのプログラムを使用して決定することができる。

20

30

40

【0039】

本発明はまた、遺伝コードの縮退によって配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8と異なる、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列を包含する。本発明はまた、アミノペプチダーゼ活性を有する配列番号1、または配列番号2、または配列番号

50

3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8のフラグメントをコードする、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16の部分配列に関する。配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16の部分配列は、5'末端および/または3'末端から1個以上のヌクレオチドが欠失していることを除けば、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16によって包含される核酸配列である。部分配列は、好ましくは少なくとも990個、より好ましくは少なくとも1140個、最も好ましくは少なくとも1290個のヌクレオチドを含有する。

10

【0040】

本明細書において使用される「ヌクレオチド配列」という用語は、オリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列、ならびに、それらの変異体、相同体、フラグメントおよび誘導體（例えば、それらの一部）を指す。ヌクレオチド配列は、ゲノムまたは合成または組換え起源のものであり得、それは、センス鎖を表すかアンチセンス鎖を表すかにかかわらず二本鎖または一本鎖であり得る。

【0041】

本発明に関する「ヌクレオチド配列」という用語には、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、およびRNAが含まれる。好ましくは、それは本発明をコードするDNAを意味し、より好ましくは、cDNA配列を意味する。

20

【0042】

好ましい実施形態において、本発明に関し、本発明それ自体の範囲により包含されるヌクレオチド配列は、その天然環境中に存在する場合、およびそれがその天然に会合する配列（それもその天然環境中に存在する）に結合している場合、本発明による天然ヌクレオチド配列を含まない。参照の容易性のため、本出願人は、この好ましい実施形態を「非天然ヌクレオチド配列」と称する。これに関して、「天然ヌクレオチド配列」という用語は、天然環境中に存在し、天然に会合するプロモーター（プロモーターもその天然環境中に存在する）全体に作動可能に結合している場合、ヌクレオチド配列全体を意味する。しかしながら、本発明の範囲に包含されるアミノ酸配列は、その天然生物中のヌクレオチド配列の発現後に単離および/または精製することができる。しかしながら、好ましくは、本発明の範囲に包含されるアミノ酸配列は、その天然生物中のヌクレオチド配列により発現させることができるが、そのヌクレオチド配列は、それがその生物内で天然に会合するプロモーターの制御下でない。

30

【0043】

通常、本発明の範囲に包含されるヌクレオチド配列は、組換えDNA技術（すなわち、組換えDNA）を使用して調製される。しかしながら、本発明の代替的实施形態においては、ヌクレオチド配列は、当該技術分野においてよく知られる化学的方法を使用して全部または一部を合成することができる（Caruthers MH et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23、およびHorn T et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232を参照）。

40

【0044】

本発明はまた、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16の核酸配列に、少なくとも約50%、好ましくは約60%、好ましくは約70%、好ましくは約80%、より好ましくは約90%、より一層好ましくは約95%、最も好ましくは約97%の相同性を有する核酸配列に関する。本発明の目的のために、2つの核酸配列間の相同性の程度は、CLUSTAL法（Higgins, 1989, 上記を参照）により、同一テーブル、ギャップペナルティ10、およびギャップレングスペナルティ10を用

50

いて決定される。

【0045】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列の修飾は、そのポリペプチドに実質的に類似したポリペプチドの合成に必要であり得る。ポリペプチドに「実質的に類似した」という用語は、非自然発生のポリペプチドの形態を指す。これらのポリペプチドは、何らかの工学的な方法が加えられている点で、天然源から単離されたポリペプチドと相異し得る。例えば、比活性、熱安定性、最適pHなどが、異なるポリペプチドの変異体を、例えば部位特異的変異誘発法によって合成することは興味深いことであり得る。類似配列は、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16の核酸配列のポリペプチドコード化部分、例えば、その部分配列として示された核酸配列に基づき、かつ/または核酸配列によってコードされるポリペプチドの他のアミノ酸配列を生じさせないが、酵素の生成を目的とした宿主生物のコードンの使用に対応するヌクレオチド置換の導入によって、もしくは、異なるアミノ酸配列を生じさせ得るヌクレオチド置換の導入によって構築し得る。ヌクレオチド置換の概要については、例えば、Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95 - 107を参照されたい。

10

【0046】

そのような置換が分子機能に不可欠な領域外でなされ、活性ポリペプチドを依然としてもたらし得ることは、当業者には明らかであろう。本発明の単離核酸配列によってコードされ、したがって、好ましくは置換を受けることのないポリペプチドの活性に必須のアミノ酸残基は、部位特異的変異誘発法またはアラニン置換誘発法などの当該技術分野で知られる手順によって特定することができる(例えば、Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081 - 1085を参照)。後者の手法では、分子中の正電荷を持つ全ての残基に変異を導入し、得られた分子のアミノペプチダーゼ活性を試験して、分子の活性に不可欠なアミノ酸残基を特定する。基質と酵素との相互作用部位もまた、核磁気共鳴分析法、結晶構造解析法または光親和性標識法のような手法によって決定される三次元構造の解析によって決定される(例えば、de Vos et al., 1992, Science 255: 306 - 312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899 - 904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59 - 64を参照)。

20

30

【0047】

組成物

一態様において、本発明はまた、本明細書に記載のアミノペプチダーゼ、ならびにアミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列を含む組成物に関する。

【0048】

いくつかの実施形態では、本発明は、図9の配列アライメントに示すように、67位の保存残基I/VのN末端側に13を超える残基を含む予測成熟配列を有する、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド、またはそのフラグメントを提供し、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、図9の配列アライメントに示すように、67位の保存残基I/VのN末端側に13を超える残基を含む予測成熟配列を有する、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドに対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の相同性を有するポリペプチドを含む。

40

【0049】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ま

50

しくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号1のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号1のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号1のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号1のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

10

**【0050】**

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号2のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号2のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号2のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号2のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

20

**【0051】**

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号3のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号3のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号3のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号3のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号3のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

30

40

**【0052】**

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸

50

配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号4のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号4のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号4のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号4のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

10

**【0053】**

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号5のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号5のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号5のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号5のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号5のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

20

**【0054】**

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号6のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号6のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号6のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号6のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

30

40

**【0055】**

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号7のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号7のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好まし

50

くは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号7のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号7のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号7のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号7のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

**【0056】**

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列に対し、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらに最も好ましくは少なくとも約97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも1種のアミノペプチダーゼを含む一般組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号8のアミノ酸配列と、5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、より一層好ましくは2個のアミノ酸、最も好ましくは1個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する相同ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号8のアミノ酸配列または対立遺伝子変異型；およびそのフラグメントを含むが、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は配列番号8のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号8のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有するアミノペプチダーゼを含むが、但し、そのフラグメントはアミノペプチダーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号8のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

**【0057】**

いくつかの実施形態では、組成物は、例示したポリヌクレオチドに対し特定の核酸相同性を有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16の核酸配列のポリペプチドコード化部分の核酸配列に対し、少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16からなる群から選択される核酸配列を含む。他の実施形態では、組成物は、配列番号9、または配列番号10、または配列番号11、または配列番号12、または配列番号13、配列番号14、または配列番号15、または配列番号16からなる群から選択される核酸配列に相補的な核酸配列を有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換えポリペプチドまたはその活性フラグメントをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、配列番号6、または配列番号7、または配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、組換えポリペプチドまたはその活性フラグメントをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む。

**【0058】**

いくつかの実施形態において、組成物は、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒ

10

20

30

40

50

ドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリン・グリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、アルファ・ガラクトシダーゼ、ベータ・ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、アルファ・グルコシダーゼ、ベータ・グルコシダーゼ、ハロペルオキダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペプチドグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼまたはキシラナーゼなどの多数の酵素活性を含み得る。さらなる酵素は、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、好ましくはアスペルギルス・アクレアタス (*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) もしくはアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、またはトリコデルマ属 (*Trichoderma*)、またはフミコーラ属 (*Humicola*)、好ましくはフミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、またはフザリウム属 (*Fusarium*)、好ましくはフザリウム・バクトリジオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フザリウム・セラリス (*Fusarium cerealis*)、フザリウム・クルークウェレンセ (*Fusarium crookwellense*)、フザリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*)、フザリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、フザリウム・グラミンム (*Fusarium graminum*)、フザリウム・ヘテロスポルム (*Fusarium heterosporum*)、フザリウム・ネグンジ (*Fusarium negundi*)、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・レチクラツム (*Fusarium reticulatum*)、フザリウム・ロセウム (*Fusarium roseum*)、フザリウム・サンブシナム (*Fusarium sambucinum*)、フザリウム・サルコクロウム (*Fusarium sarcocroum*)、フザリウム・スポロトリキオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、フザリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フザリウム・トルロスム (*Fusarium torulosum*)、フザリウム・トリコテシオイデス (*Fusarium trichothecioides*) もしくはフザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*) に属する微生物によって産生され得る。

【0059】

いくつかの実施形態では、発明は、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチド、および好適な担体を含む組成物に関する。本明細書中に記載のものを含む、当該技術分野で知られる好適な担体が使用され得る。他の実施形態では、組成物は、さらにエンドペプチダーゼを含む。いくつかの実施形態では、組成物はさらに、1種以上の非特異的に作用するエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素を含む。いくつかの実施形態では、組成物はさらに、1種以上の特異的に作用するエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、特異的に作用するタンパク質分解酵素は、グルタミルエンドペプチダーゼ (EC 3.4.21.19)；リシルエンドペプチダーゼ (EC 3.4.21.50)；ロイシルエンドペプチダーゼ (EC 3.4.21.57)；グリシルエンドペプチダーゼ (EC 3.4.22.25)；プロリルエンドペプチダーゼ (EC 3.4.21.26)；トリプシン (EC 3.4.21.4) もしくはトリプシン様 (リシン/アルギニン特異性) エンドペプチダーゼ、またはペプチジル - Aspメタロエンドペプチダーゼ (EC 3.4.24.33) などのエンドペプチダーゼである。

【0061】

いくつかの実施形態では、エキソペプチダーゼ酵素は、トリペプチジルアミノペプチダーゼ、ジペプチジルアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチナーゼおよび他のアミノペプ

10

20

30

40

50

チダーゼからなる群から選択される。

【0062】

いくつかの実施形態では、1種以上のエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素は、真菌性酸性エンドペプチダーゼ、中性メタロエンドペプチダーゼ、アルカリ性セリンエンドペプチダーゼ、サブチリシン、プロメライン、熱に安定な細菌性中性エンドペプチダーゼ、アルカリ性セリンエンドペプチダーゼ（重複）からなる群から選択される。

【0063】

いくつかの実施形態では、本発明において使用されるエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素は、下記の1つ以上の市販品中の1種以上のプロテアーゼであ

10

【0064】

20

30

40

50

【表 1】

市販品	会社	プロテアーゼの種類	プロテアーゼ源
ALPHALASE® AFP	Genencor/DuPont	真菌性酸性 エンドペプチダーゼ	トリコデルマ・リーゼイ ( <i>Trichoderma reesei</i> )
FOODPRO® PAL	Genencor/DuPont	真菌性酸性 エンドペプチダーゼ	アスペルギルス・ニガー ( <i>Aspergillus niger</i> )
FOODPRO® PNL	Genencor/DuPont	中性メタロ エンドペプチダーゼ	バチルス・アミロリクエファシエ ンス( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )
FOODPRO® Alkaline Protease	Genencor/DuPont	アルカリ性 セリンエンドペプチダーゼ	バチルス・リケニフォルミス ( <i>Bacillus licheniformis</i> )
FOODPRO® PBR	Genencor/DuPont	プロメライン	アナナス・コモスス( <i>Ananas comosus</i> )
FOODPRO® PHIT	Genencor/DuPont	熱に安定な細菌性中性 エンドペプチダーゼ	ゲオバチルス属( <i>Geobacillus sp.</i> )
FOODPRO® 30L	Genencor/DuPont	アルカリ性セリンエンドペプ チダーゼ	
FOODPRO® 51FP	Genencor/DuPont	エンド/エキソペプチダーゼ	
FOODPRO® PXT	Genencor/DuPont	サブチリシン	バチルス・レントス( <i>B. lentus</i> )
ESPERASE® 8.0L	Novozymes	プロテアーゼ	バチルス属( <i>Bacillus sp.</i> )
EVERLASE® 16.0		サブチリシン	バチルス属( <i>Bacillus sp.</i> )
ALCALASE® 2.4	Novozymes	サブチリシン	バチルス属( <i>Bacillus sp.</i> )
NEUTRASE® 0.8L	Novozymes	プロテアーゼ	バチルス・アミロリクエファシエ ンス( <i>B. amyloliquefaciens</i> )
Allzyme FD	Alltech	セリンプロテアーゼ*	アスペルギルス・ニガー ( <i>Aspergillus niger</i> )
Arazyme Onc-Q	Insect Biotech Co.	メタロプロテアーゼ	セラチア・プロテアマキュラン ス( <i>Serratia proteamacula ns</i> ) HY-3
SAVINASE®	Novozymes	サブチリシン	バチルス属( <i>Bacillus sp.</i> )
RONOZYME® ProAct	DSM/Novozymes	アルカリ性セリンプロテア ーゼ	バチルス・リケニフォルミス ( <i>Bacillus licheniformis</i> )中で 発現したノカルディオプシス・プ ラシナ( <i>Nocardioopsis prasina</i> )遺伝子
VALKERASE®/CIBEN ZA® IND900	Novus	ケラチナーゼ	バチルス・リケニフォルミス ( <i>Bacillus licheniformis</i> )

## 【0065】

追加的に、または選択的に、エンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素は、次の商業的に入手可能な製品の1つ以上に含まれるものであってよい：KANNA SE(商標)、NOVOCARNETM Tender、およびNovozym 37020、NOVO-PROTM D(いずれもNovozymesから入手可能)；BioSorb-ACDP(Noor Creations, India)；ANGEL(登録商標)Acid Protease(Angel Yeast Co., Ltd., China)またはCOROLASE(登録商標)LAP(AB Enzymesから)。

## 【0066】

いくつかの実施形態では、発明はまた、本明細書に記載のアミノペプチダーゼの少なくとも1種を含む飼料添加物組成物および/または食品添加物組成物を提供する。

## 【0067】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本発明の加水分解物を含む組成物および/または飼料添加組成物および/または食品添加組成物が提供される。好適には、そのような食品添加組成物および/または飼料添加組成物は、さらにアミノペプチダーゼを（任意選択的に、エンドプロテアーゼと組み合わせられて）含み得る。

#### 【0068】

酵素含有液体には、液体組成物の特性を改善する物質を添加してもよい。そのような添加剤の非限定的な例としては、塩（例えば、アルカリ塩、土類金属塩、付加的塩化物塩、硫酸塩、硝酸塩、炭酸塩（ここで、対イオンの例は、カルシウム、カリウムおよびナトリウムイオンである）、無機鉱物またはクレー（例えば、ゼオライト、カオリン、ベントナイト、タルクおよび/またはケイ酸塩）、炭水化物（例えば、スクロースおよび/またはデンプン）、着色顔料（例えば、二酸化チタン）、殺生物剤（例えば、RODALON（登録商標）、PROXEL（登録商標））分散剤、消泡剤、還元剤、酸性剤、アルカリ性剤、酵素安定剤（グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトールなどのポリオール、無機塩、糖類、糖もしくは糖アルコール、乳酸、ホウ酸、またはホウ酸誘導体、およびこれらの組み合わせ）、酵素阻害剤、保存料（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンゾエート、ソルベート、または他の食品に認可されている保存料）、ならびに、これらの組み合わせが挙げられる。本調製物/組成物に使用し得る賦形剤としては、マルトース、スクロース、グルコースシロップもしくは乾燥グルコースシロップなどのグルコース、加工済みデンプン、ゼラチン化デンプン、L-乳酸、パルミチン酸アスコルビル、トコフェロール、レシチン、クエン酸、クエン酸塩、リン酸、リン酸塩、アルギン酸ナトリウム、カラゲナン、ローカストビーンガム、グアーガム、キサントガム、ペクチン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、モノグリセリドおよびジグリセリド、モノグリセリドおよびジグリセリドのクエン酸エステル、スクロースエステル、二酸化炭素、アルゴン、ヘリウム、窒素、亜酸化窒素、酸素、水素、ならびにオクテニルコハク酸デンプンナトリウムが挙げられる。本明細書中の実施例7に示すように、本発明によるアミノペプチダーゼは、塩化ナトリウムを含む組成物中で酵素活性を保持し得る。

#### 【0069】

形態

本発明の生成物および/または組成物は、単独で使用されようと組成物中に含まれようと、任意の好適な形態で使用し得る。同様に、本発明のアミノペプチダーゼは、例えば、エキソプロテアーゼおよび/またはエンドプロテアーゼと併用した場合、食品産業において食品加工助剤または食品添加物（すなわち、食品成分、機能性食品成分または医薬品成分などの成分）として使用するのに適した任意の形態で使用し得る。

#### 【0070】

形態の好適な例としては、即時放出、遅延放出、調節放出、持続放出、パルス放出、または制御放出用途のための錠剤、丸剤、カプセル剤、オビュール剤、液剤、または懸濁剤のうちの1種以上が挙げられ、これらは香味料または着色剤を含有することができる。

#### 【0071】

一例として、本生成物および/または組成物が錠剤の形態で使用される場合（機能性成分として使用する場合など）、その錠剤はまた、微結晶セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、二塩基性リン酸カルシウム、およびグリシンなどの賦形剤；デンプン（好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ、またはタピオカのデンプン）、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、およびある種の複雑ケイ酸塩などの崩壊剤；ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、スクロース、ゼラチン、およびアカシアゴムなどの造粒用結合剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ペヘン酸グリセリル、およびタルクなどの滑沢剤の1種以上を含有することができる。

#### 【0072】

これら剤形の調製に際して使用される栄養学的に許容される担体の例としては、例えば、水、食塩水、アルコール、シリコーン、ワックス、ワセリン、植物油、ポリエチレング

リコール、プロピレングリコール、リポソーム、糖、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、界面活性剤、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペトロエスラル脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

【0073】

剤形用の好ましい賦形剤としては、ラクトース、デンプン、セルロース、乳糖、または高分子量ポリエチレングリコールが挙げられる。

【0074】

水性懸濁剤および/またはエリキシル剤の場合、本発明のアミノペプチダーゼおよび/または組成物は、様々な甘味剤または香味剤、着色物質または染料と、また乳化剤および/または懸濁化剤と、また水、エタノール、プロピレングリコール、およびグリセリンなどの希釈剤と、ならびにこれらの組合せと併用することができる。

【0075】

剤形としては、また、ゼラチンカプセル、ファイバーカプセル、ファイバー錠などが挙げられる。

【0076】

方法

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、タンパク質加水分解物の生成において、例えば、加水分解度の増大のため、タンパク質加水分解物の一般的な苦味除去のため、および風味発生の増進のため、グルタミン酸塩の生成のため、ならびに/または、モルト生成もしくは醸造中のFAN生成のようなその他の目的で使用することができる。

【0077】

本発明はさらに、タンパク質に富む材料の加水分解度を高めるため、本発明のポリペプチドをプロテアーゼ（例えば、エンドペプチダーゼ）と併用して使用方法に関する。この方法は、タンパク質性基質を本ポリペプチドおよびエンドペプチダーゼで処理することを含む。基質は、それらの酵素で同時に処理してもよく連続的に処理してもよい。

【0078】

本発明のポリペプチドは、タンパク質加水分解プロセスで従来使用されている有効量でタンパク質性基質に添加される。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、タンパク質性基質に、タンパク質100g当たり、約0.1~約100,000アミノペプチダーゼ単位の範囲、またはタンパク質100g当たり約1~約10,000アミノペプチダーゼ単位の範囲で添加される。本明細書で定義されるように、1アミノペプチダーゼ単位(APU)は、特定の条件下、Ala-p-ニトロアニリド(Sigma Chemical Co., St. Louis MO)から1分当たり1マイクロモルのp-ニトロアニリドを放出するのに必要な酵素量である。アミノペプチダーゼアッセイでは、ペプチド基質H-Ala-ニトロアニリドの加水分解をp-ニトロアニリド(pNA)の放出によって測定する。pNAの波長405nmの吸光度をELISAリーダーにより測定する。20mMのCPBバッファー180μl、希釈酵素15μlおよび基質20μlにより、30で反応を進める。CPBバッファーは20mMクエン酸、20mMリン酸塩、20mMホウ酸で構成され、pH9.0に調節される。基質は、1mlのDMSO(SIGMA製のジメチルスルホキシド(カタログ番号D2650))中のBACHEM製のH-Ala-pNA(L-1070)20mgである。

【0079】

エンドペプチダーゼは、バチルス(Bacillus)株、好ましくはバチルス・リケニホルミス(Bacillus licheniformis)もしくはバチルス・サブチリス(Bacillus subtilis)株、スタフィロコッカス(Staphylococcus)株、好ましくはスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)株、ストレプトミセス(Streptomyces)、好ましくはストレプトミセス・サーモバラリス(Streptomyces thermovularis)もしくはストレプトミセス・グリセウス(Streptomyces

10

20

30

40

50

griseus) 株、アスペルギルス (Aspergillus) 株、好ましくはアスペルギルス・アクレアタス (Aspergillus aculeatus)、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori)、アスペルギルス・フェチヅス (Aspergillus foetidus)、アスペルギルス・ニドゥランス (Aspergillus nidulans)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) もしくはアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 株、またはトリコデルマ (Trichoderma) 株、好ましくはトリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) 株、フザリウム (Fusarium) 株、好ましくはフザリウム・ベネナツム (Fusarium venenatum) 株から得ることができる。いくつかの実施形態では、エンドペプチダーゼは、ALPHALASE (登録商標) AFP、FOODPRO (登録商標) PAL、FOODPRO (登録商標) PNL、FOODPRO (登録商標) Alkaline Protease、FOODPRO (登録商標) PXT、FOODPRO (登録商標) PBR、FOODPRO (登録商標) PHT、FOODPRO (登録商標) 30L、およびFOODPRO (登録商標) 51FP からなる群から選択される。

10

#### 【0080】

本発明のエンドペプチダーゼは、タンパク質加水分解プロセスで従来使用されている有効量で、好ましくは約0.05~約15AU/100gタンパク質の範囲で、より好ましくは約0.1~約8AU/100gタンパク質の範囲で、タンパク質性基質に添加される。1AU(アンソン単位)は、標準条件下(すなわち、25℃、pH7.5および反応時間10分)、1分当たりフェノール試薬で1ミリグラム当量のチロシンと同じ色を示す量のTCA可溶性生成物を遊離するような初速度でヘモグロビンを消化する酵素の量と定義される。いくつかの実施形態では、エンドプロテアーゼは、タンパク質基質1kg当たり約10~約3000mgの酵素、例えば、タンパク質基質1メートルトン(MT)当たり0.01から3gの酵素の量で投与することができる。

20

#### 【0081】

酵素による処理、すなわち、酵素製剤と共にする基質のインキュベーションは、酵素製剤が不活化しない都合の良い温度、好ましくは約20~約70℃の範囲の温度で行うことができる。通常の手順に従えば、酵素製剤は、インキュベーション混合物の温度を、酵素が不活化する温度、例えば、約70℃超にまで上昇させることによって、またはインキュベーション混合物のpHを、酵素が不活化する程度、例えば、約4.0未満にまで低下させることによって、適切に不活化することができる。

30

#### 【0082】

さらに、本発明の方法は、タンパク質性基質の加水分解度を増大させる。本明細書で使用されるとき、加水分解度(DH)は、タンパク質分解酵素によって加水分解されたタンパク質中のアミノ結合の総数の割合である。一態様においては、本発明による酵素は、タンパク質性基質のDHを少なくとも約5、7、10、12、15、17、20、22、25、27、30、35、40、45または50%上昇または増大させる。一例において、この上昇は1型アミノペプチダーゼと比べてのものであるが、いかなる好適な比較も可能である。好ましい実施形態では、タンパク質加水分解物は、Leu、Gly、Glu、Ser、Asp、Asn、Pro、Cys、Alaおよび/またはGlnの含有量が、例えば1.1倍に増大する。

40

#### 【0083】

いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Gluの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Leuの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Glyの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Serの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Aspの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Asnの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Proの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Gluの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Leuの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Glyの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Serの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Aspの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Asnの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Proの含有量が増大する。

50

解物は、Cysの含有量が増大する。いくつかの実施形態では、タンパク質加水分解物は、Alaの含有量が増大する。他のより好ましい実施形態では、タンパク質加水分解物は、Glnの含有量が増大する。

【0084】

本発明によるアミノペプチダーゼ酵素は、酵素反応生成物による阻害を減少し得る。本明細書の実施例8に示すように、本発明による2種類のPepN2酵素は、アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae)RIB40由来のロイシニアミノペプチダーゼ2酵素(NCBIレファレンス配列:XP\_001819545.1)(配列番号17として以下に示す)より、低い生成物阻害を示した。

【化1】

```

1 mrsllwasll sgvlagralv spdefpediq ledllegsqq ledfayaype rnrvfggkah
61 ddtvnylyee lkktgyydvvy kqpqvhlwn adqtlkvgde eieaktmtys psvevtadva
121 vvknlgcsea dypsdvegkv alikrgecpf gdksvlaaka kaaasivynn vagsmagtig
181 aaqsdkgpys aivgisledg qkliklaeag svsvdlwvds kqenrttynv vaqtkggdgn
241 nvvalgghtd sveagpgind dgsgiiisnlv iakaltqysv knavrflfwf aeefgllgsn
301 yyvshlnate lnkirlylnf dmiaspnayl miydgdgdsaf nqsgpagsaq ieklfedyyd
361 sidlphiptq fdgrsdyeaf ilngipsqql ftgaegimse enasrwggqa gvaydanyha
421 agdnmtlnlh eaflinskat afavatyang lssipkrntt sslhrrartm rpfgkrapkt
481 hahvsgsgcw hsqvea

```

【0085】

したがって、一実施形態では、発明は、配列番号17(本明細書中ではTRI063ともいう 例えば、実施例を参照)のアミノペプチダーゼと比較して生成物阻害が低減した、アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドを提供する。特に、本発明によるアミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドは、2、3、4または5mM超の生成物阻害定数(Ki)値を有し得る。好ましい実施形態では、アミノペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドは、2型アミノペプチダーゼ酵素である。さらなる好ましい実施形態では、2型アミノペプチダーゼ酵素は、本明細書で定義される配列番号1~8のいずれか、特に配列番号1または5に示すとおりである。

【0086】

本発明によるアミノペプチダーゼ酵素は、N末端から番号を付与したときの2の位置にプロリン残基を有するポリペプチドを加水分解することができ得る。特に、本発明によるアミノペプチダーゼ酵素は、N末端から番号を付与したときの2の位置にプロリン残基を有するポリペプチドを、2時間のインキュベーションで出発濃度の半分超の濃度にまで加水分解することができ得る加水分解度は当該技術分野で知られた任意の好適なプロトコル、例えば、実施例10で示した方法で測定することができる。実施例10に示すように、本発明による2種類のPepN2酵素(TRI032およびTRI035)は、ペプチドTPAAARを徐々に加水分解して、2時間のインキュベーションで濃度を半分未満にまで低下させることができるが、TRI063(アスペルギルス・オリゼ(A.oryzae))およびCOROLASE(登録商標)LAPは、12時間以内にTPAAARの加水分解を示すことはない。

【0087】

本発明はまた、遊離グルタミン酸および/またはグルタミン酸残基を結合したペプチドに富む加水分解物を得る方法であって、基質を、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの作用に曝すことを含む方法に関する。本発明はまた、遊離グルタミンもしくは遊離グルタミン酸および/またはグルタミンもしくはグルタミン酸残基を結合したオリゴペプチドに富む加水分解物を得る方法であって、基質を、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの作用に曝すことを含む方法に関する。

【0088】

本発明はまた、タンパク質加水分解物の苦味を除去する方法であって、基質を、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの作用に曝すことを含む方法に関する。

【0089】

いくつかの実施形態では、方法はさらに、基質を脱アミドプロセスに供することを含む方法に関する。脱アミドプロセスは、基質を、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの作用に曝すのと同時に、前にまたは後に行うことができる。

【0090】

いくつかの実施形態において、本発明の方法によれば、遊離したものであれ、結合したオリゴペプチドであれ、グルタミン酸 (Glu) がタンパク質加水分解物の香味および食味重要な役割を果たすため、香味が強化されたタンパク質加水分解物が生成される。いくつかの実施形態では、本方法により、機能性が向上した、特に、溶解性、乳化性が向上し、加水分解度が上昇し、かつ、起泡性が向上したタンパク質加水分解物もまた生成される。

10

【0091】

アンモニアの放出によるアミド (グルタミンまたはアスパラギン) の荷電酸 (グルタミン酸またはアスパラギン酸) への変換は、脱アミドとして知られている。脱アミドは、非酵素的脱アミドプロセスとして、または酵素的脱アミドプロセスとして行い得る。

【0092】

いくつかの実施形態では、脱アミドは、酵素的脱アミドプロセスとして、例えば基質をグルタミナーゼ、トランスグルタミナーゼおよび/またはペプチドグルタミナーゼに曝すことによって行われる。

20

【0093】

いくつかの実施形態では、グルタミナーゼは、グルタミナーゼSD-C100STM (Amano、日本) である。

【0094】

いくつかの実施形態では、グルタミナーゼは、基質タンパク質 1 g 当たり約 1 mg ~ 20 mg の量で投与することができる。いくつかの実施形態では、グルタミナーゼは、基質タンパク質 1 g 当たり約 5 mg ~ 15 mg の量で投与することができる。いくつかの実施形態では、グルタミナーゼは、基質タンパク質 1 g 当たり約 10 mg の量で投与することができる。

30

【0095】

本発明はまた、グルタミン酸塩を生成する方法であって、タンパク質基質を、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの作用に曝すことを含む方法に関する。

【0096】

トランスグルタミナーゼは、哺乳動物などの都合のよい供給源からのもの (例えば、JP 1050382 および JP 5023182 を参照) であっても、活性化第 X I I I 因子 (例えば、国際公開第 93/15234 号パンフレットを参照) であっても、魚由来のもの (例えば、EP 555,649 を参照) であっても、微生物から得られたもの (例えば、EP 379,606、国際公開第 96/06931 号パンフレット、国際公開第 96/22366 号パンフレットを参照) であってもよい。いくつかの実施形態では、トランスグルタミナーゼは、卵菌、例えば、フィトフトラ属 (phytophthora)、好ましくはフィトフトラ・カクトルム (phytophthora cactorum) 株、または、ピシウム属 (Pythium)、好ましくはピシウム・イレグラレ (Pythium irregulare) 株、ピシウム・スピノサム (Pythium sp.) 株、ピシウム・インテルメディアム (Pythium intermedium) 株、ピシウム・ウルチナム (Pythium ultimum) 株、またはピシウム・ペリイラム (Pythium perillium) (もしくは、ピシウム・ペリクロカム (Pythium periplocum)) 株から得られる。いくつかの実施形態では、トランスグルタミナーゼは、細菌起源のものであり、バチルス属 (Bacillus)、好ましくはバチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) 株、ストレプトベルテ

40

50

イシリウム属 (*Streptoverticillium*)、好ましくは、ストレプトベルティシリウム・モバラエンシス (*Streptoverticillium mobaraensis*) 株、ストレプトベルティシリウム・グリセオバーティシラタム (*Streptoverticillium griseoverticillatum*) 株、またはストレプトベルティシリウム・シンナモネウム (*Streptoverticillium cinnamoneum*) 株、およびストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、好ましくはストレプトミセス・リディカス (*Streptomyces lydicus*) 株から得られる。

【0097】

ペプチドグルタミナーゼは、ペプチドグルタミナーゼ I (ペプチジル - グルタミナーゼ; EC. 3.5.1.43)、またはペプチドグルタミナーゼ II (タンパク質 - グルタミングルタミナーゼ; EC. 3.5.1.44) であっても、あるいはこれらの混合物であってもよい。ペプチドグルタミナーゼは、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、好ましくはアスペルギルス・ヤポニカス (*Aspergillus japonicus*) 株、バチルス属 (*Bacillus*)、好ましくはバチルス・サー克蘭ス (*Bacillus circulans*) 株、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、好ましくはクリプトコッカス・アルビダス (*Cryptococcus albidus*)、またはデバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、好ましくはデバリオミセス・クロエケリ (*Debaryomyces kloecheri*) 株から得ることができる。

【0098】

トランスグルタミナーゼはタンパク質性基質に、脱アミドプロセスで従来使用されている有効量で、好ましくは、基質量に対し酵素製剤約 0.01 ~ 約 5 重量% の範囲で、より好ましくは、約 0.1 ~ 約 1 重量% の範囲で添加される。

【0099】

ペプチドグルタミナーゼはタンパク質性基質に、脱アミドプロセスで従来使用されている有効量で、好ましくは、基質 100 g に対し約 0.01 ~ 約 100,000 ペプチドグルタミナーゼ単位の範囲で、より好ましくは、約 0.1 ~ 約 10,000 ペプチドグルタミナーゼ単位の範囲で添加される。

【0100】

ペプチドグルタミナーゼ活性は、Cedrangoro et al. (1965, *Enzymologia* Vol. 29 143 頁) の手順にしたがって測定することができる。この手順においては、1 N の NaOH で pH 6.5 に調節した酵素試料 0.5 ml を小さな容器に投入する。その後、この容器に pH 10.8 のホウ酸塩緩衝液 1 ml を加える。放出されるアンモニアを 5 N の硫酸で吸収させ、ネスラー試薬を用いて、混合物を発色させ、420 nm で測定する。1 ペプチドグルタミナーゼ単位は、これらの条件下で 1 分あたり 1 マイクロモルのアンモニアを生成することができる酵素量である。

【0101】

本発明はまた、モルト生成および/または醸造中に遊離アミノ窒素 (FAN) を生成する方法であって、モルト生成および/または醸造プロセス中に、基質を、アミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの作用に曝すことを含む方法に関する。

【0102】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、タンパク質基質は本発明のポリペプチドに曝される。本発明のペプチドグルタミナーゼは、タンパク質性基質に、タンパク質の加水分解プロセスで従来使用されている有効量で、好ましくは約 0.001 ~ 約 0.5 AU / 100 g 基質の範囲で、より好ましくは約 0.01 ~ 約 0.1 AU / 100 g 基質の範囲で添加される。

【0103】

他の実施形態において、本発明の遊離グルタミン酸および/またはグルタミン酸残基を結合したペプチドに富む加水分解物を生成する方法は、基質を、1 種以上の非特異的に作

10

20

30

40

50

用するエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素に曝すことを含む。この工程は、タンパク質基質を本発明のポリペプチドに曝す工程と同時に行ってよく、後に行ってもよい。

【0104】

より好ましい実施形態では、非特異的に作用するエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 株、またはバチルス (*Bacillus*) 株から得られる。

【0105】

非特異的に作用するエンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼ酵素は、タンパク質の加水分解プロセスで従来使用されている有効量で、好ましくは約 ~ の範囲で、基質に添加される。

10

【0106】

いくつかの実施形態では、エンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼは、タンパク質基質 1 kg 当たり約 50 ~ 約 3000 mg の酵素、例えば、タンパク質基質 1 メートルトン (MT) 当たり 0.05 から 3 g の酵素の量で投与することができる。

【0107】

好適には、エンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼは、タンパク質基質 1 MT 当たり約 4.0 g 未満の酵素の量で投与することができる。

【0108】

他の実施形態において、エンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼは、タンパク質基質 1 MT 当たり約 0.5 g ~ 約 5.0 g の酵素で投与することができる。好適には、エンドペプチダーゼおよび/またはエキソペプチダーゼは、タンパク質基質 1 MT 当たり約 0.5 g ~ 約 3.0 g の酵素で投与することができる。より好適には、エンドプロテアーゼは、タンパク質基質 1 MT 当たり約 1.0 g から約 2.0 g の酵素において投与することができる。

20

【0109】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、タンパク質基質ならびに/または食品および/もしくは飼料添加物組成物 1 kg 当たり約 0.5 mg ~ 約 2 g の酵素量で投与することができる。好適には、本発明のポリペプチドは、タンパク質基質ならびに/または食品および/もしくは飼料添加物組成物 1 kg 当たり約 1 mg ~ 約 2 g の酵素量で投与することができる。より好適には、タンパク質基質ならびに/または食品および/もしくは飼料添加物組成物 1 kg 当たり約 5 mg ~ 約 1.5 g の酵素量である。

30

【0110】

加水分解物の調製において、本発明のポリペプチドは、タンパク質基質 1 kg 当たり約 0.5 mg ~ 約 2 g の酵素量で投与することができる。好適には、本発明のポリペプチドは、タンパク質基質 1 kg 当たり約 1 mg ~ 約 2 g の酵素量で投与することができる。より好適には、タンパク質基質 1 kg 当たり約 5 mg ~ 約 1.5 g の酵素量である。

【0111】

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、タンパク質基質 1 kg 当たり約 5 mg ~ 約 500 mg の酵素量で投与することができる。好適には、本発明のポリペプチドは、タンパク質基質 1 kg 当たり約 50 mg ~ 約 500 mg の酵素量で投与することができる。好適には、本発明のポリペプチドは、タンパク質基質 1 kg 当たり約 100 mg ~ 約 450 mg の酵素量で投与することができる。

40

【0112】

酵素による各処理は、酵素製剤が不活化されない温度、好ましくは、約 20 ~ 約 70 の範囲の温度で行うことができる。酵素製剤は、その後、温度を、例えば約 70 を超える温度にまで上昇させることによって、または pH を、例えば約 4.0 未満にまで低下させることによって不活化させることができる。

【0113】

本発明の方法に使用されるタンパク質性基質は、無傷タンパク質、予め加水分解された

50

タンパク質（すなわち、ペプチド）、またはこれらの混合物から構成され得る。タンパク質性基質は、野菜起源のものであっても動物起源のものであってもよい。いくつかの実施形態では、タンパク質性基質は、野菜起源のもの、例えば、ダイズタンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテン、トウモロコシグルテン、大麦、ライ麦、オート麦、コメ、ゼイン、ハウチワマメ、綿実タンパク質、ラッカセイ、アルファルファタンパク質、エンドウ豆タンパク質、豆類タンパク質（*fabaceous bean protein*）、ゴマタンパク質またはヒマワリ起源のものである。動物起源のタンパク質性基質は、ホエータンパク質、カゼイン、食肉タンパク質、魚タンパク質、赤血球、卵白、ゼラチン、ラクトアルブミン、毛髪タンパク質または羽毛タンパク質であり得る。

【0114】

本発明はまた、これらの方法で生成されたタンパク質加水分解物に関する。

【0115】

ヌクレオチド配列の調製

本明細書に定義される特定の特性を有するタンパク質、または改変に好適なタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、前記タンパク質を産生する任意の細胞または生物から同定および/または単離および/または精製することができる。当該技術分野においては、ヌクレオチド配列の同定および/または単離および/または精製に関し、様々な方法がよく知られている。

一例として、好適な配列が同定および/または単離および/または精製されたなら、より多くの配列を調製するPCR増幅技術を使用することができる。

【0116】

さらなる例として、酵素を産生する生物からの染色体DNAまたはメッセンジャーRNAを使用して、ゲノムDNAおよび/またはcDNAライブラリーを構築することができる。酵素のアミノ酸配列がわかれば、標識オリゴヌクレオチドプローブを合成し、これを用いて、生物から調製されたゲノムライブラリーから酵素をコードするクローンを同定することができる。

あるいは、別の既知の酵素遺伝子と相同の配列を含有する標識オリゴヌクレオチドプローブを使用して、酵素をコードするクローンを同定することができる。後者の場合、より低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。

【0117】

あるいは、酵素をコードするクローンは、プラスミドなどの発現ベクターにゲノムDNAの断片を挿入し、得られたゲノムDNAライブラリーにより酵素陰性細菌を形質転換し、次いで、この形質転換された細菌を、酵食用基質（すなわち、マルトース）を含有する寒天プレート上に形質転換された細菌をプレーティングし、これにより酵素を発現するクローンの同定を可能とすることにより同定することができる。

【0118】

またさらなる代替例においては、酵素をコードするヌクレオチド配列は、確立された標準的方法、例えば、Beucage S. L. et al., (1981) *Tetrahedron Letters* 22, p 1859 - 1869に記載されるホスホラミダイト法、またはMatthes et al., (1984) *EMBO J.* 3, p 801 - 805に記載される方法による合成によって調製することができる。ホスホラミダイト法においては、オリゴヌクレオチドを、例えば、自動DNA合成装置で合成し、精製し、アニールし、ライゲートし、そして適切なベクターにクローニングする。

【0119】

ヌクレオチド配列は、標準的技術により合成、ゲノムまたはcDNA起源（適宜）の断片をライゲートすることにより調製される混合ゲノムおよび合成起源、混合合成およびcDNA起源、または混合ゲノムおよびcDNA起源のものであり得る。ライゲートされた各断片は、ヌクレオチド配列全体の種々の部分に対応する。DNA配列はまた、例えば、米国特許第4,683,202号明細書またはSaiki R. K. et al., (*Science* (1988) 239, pp 487 - 491)に記載されるような、特異的プ

10

20

30

40

50

ライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により調製することができる。

【0120】

アミノ酸配列

本発明の範囲には、本明細書中に定義した特定の特性を有する酵素のアミノ酸配列もまた包含される。

【0121】

本明細書において使用される用語「アミノ酸配列」は、用語「ポリペプチド」および/または用語「タンパク質」と同義である。一部の例では、用語「アミノ酸配列」、用語「ペプチド」と同義である。一部の例では、用語「アミノ酸配列」は、用語「酵素」と同義である。

10

【0122】

アミノ酸配列は、好適な資源から調製/単離することができ、または、合成により作製することができ、または、組換えDNA技術の使用により調製することができる。

【0123】

本発明に包含されるタンパク質は他のタンパク質、特に、プロリンエンドプロテアーゼ、トリペプチジルエキソペプチダーゼ、および他の形態のエンドプロテアーゼまたはエキソプロテアーゼと共に使用することができる。したがって、本発明はまた、タンパク質の組合せであって、本発明のアミノペプチダーゼ、および本発明の他のアミノペプチダーゼであり得る他の酵素を含む組み合わせをカバーする。この態様は、後述のセクションにおいて考察する。

20

【0124】

好ましくは、本発明に関し、本発明それ自体の範囲に包含されるアミノ酸配列は、天然酵素ではない。これに関し、「天然酵素」という用語は、その天然環境中に存在し、その天然ヌクレオチド配列により発現された酵素全体を意味する。

【0125】

配列同一性または配列相同性

本発明はまた、本明細書に定義される特定の特性を有するポリペプチドのアミノ酸配列とある程度の配列同一性または配列相同性を有する配列、またはそのようなポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列（以下、「相同配列」と称する）の使用を包含する。ここで、「相同体」という用語は、対象アミノ酸配列および対象ヌクレオチド配列とある相同性を有する実体を意味する。ここで、「相同性」という用語は、「同一性」と同じであると見なすことができる。

30

【0126】

相同アミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列は、アミノペプチダーゼの機能活性を保持し、かつ/またはアミノペプチダーゼの活性を向上させるポリペプチドを提供および/またはコードするはずである。

【0127】

本文脈においては、相同配列は、対象配列と少なくとも75、85または90%同一、好ましくは、少なくとも95または98%同一であり得るアミノ酸配列を含むと解釈される。通常、相同体は、対象アミノ酸配列と同一の活性部位などを含むであろう。相同性は類似性（すなわち、類似の化学的特性/機能を有するアミノ酸残基）の観点から考慮することもできるが、本発明との関連では、配列同一性の観点から相同性を表現することが好ましい。

40

【0128】

本文脈においては、相同配列は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（対象配列）と少なくとも75、80、85または90%同一、好ましくは、少なくとも95または98%同一であり得るヌクレオチド配列を含むと解釈される。通常、相同体は、対象配列と同じ、活性部位などをコードする配列を含むであろう。相同性は類似性（すなわち、類似の化学的特性/機能を有するアミノ酸残基）の観点から考慮することもできるが、本発明との関連では、配列同一性の観点から相同性を表現することが好ましい。

50

## 【0129】

相同性の比較は、目視により、またはより一般的には、容易に利用可能な配列比較プログラムを使用して行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の相同性率を計算することができる。

## 【0130】

相同性率は、連続配列にわたり計算することができ、すなわち、ある1つの配列を他の配列とアラインし、ある1つの配列中の各アミノ酸を他の配列中の対応するアミノ酸と1回に1残基、直接比較する。これは「ギャップなし」アライメントと称される。通常、このようなギャップなしアライメントは、比較的少数の残基にわたってのみ実施される。

## 【0131】

これは非常に簡易で一貫した方法であるが、例えば、配列の他の同一ペアにおいて、ある挿入または欠失が後続のアミノ酸残基をアライメントから外すことを考慮し得ず、したがって、グローバルアライメントを実施した場合に相同性率を大きく低下させる可能性がある。このような理由から、ほとんどの配列比較法は、全相同性スコアを過度にペナルティ化せず、あり得る挿入および欠失を考慮する最適なアライメントを作成するように設計される。これは、配列アライメント中に「ギャップ」を挿入して局所的相同性の最大化を試みることにより達成される。

## 【0132】

しかしながら、これらのより複雑な方法は、同数の同一アミノ酸について、可能な限り少ないギャップを有する配列アライメント（2つの比較配列間のより高い関係性を反映する）が、多くのギャップを有するものより高いスコアを達成するように、そのアライメント中で生じる各ギャップに対して「ギャップペナルティ」を割り当てる。通常、あるギャップの存在に対して比較的高いコストを課し、そのギャップ中の後続の各残基に対してより小さいペナルティを課す「アフラインギャップコスト」が使用される。これは、最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然ながら、より少数のギャップを有する最適化されたアライメントを生成するであろう。大多数のアライメントプログラムは、ギャップペナルティが修飾されることを許容する。しかし、配列比較のためにそのようなソフトウェアを使用する場合には、デフォルト値を使用することが好ましい。

## 【0133】

したがって、最大相同性率の計算には、最初にギャップペナルティを考慮して最適なアライメントを作成することが要求される。このようなアライメントの実施に好適なコンピュータプログラムは、Vector NTI (Invitrogen Corp.) である。配列比較を実施し得るソフトウェアの例としては、例えば、BLASTパッケージ (Ausubel et al. 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18を参照)、BLAST 2 (FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8およびtachiana@ncbi.nlm.nih.govを参照)、FASTA (Altschul et al, 1990 J. Mol. Biol. 403-410)、およびAlignXが挙げられるが、これらに限定されない。少なくともBLAST、BLAST 2およびFASTAは、オフラインおよびオンライン検索で入手可能である (Ausubel et al. 1999、上記、7-58~7-60頁を参照)。

## 【0134】

最終相同性率を同一性に関して計測することができるが、アライメントプロセスそれ自体は、通常は、オールオアナッシングのペア比較に基づくものではない。代わりに、化学的類似性または進化的距離に基づきそれぞれのペアワイズ比較にスコアを割り当てる数値換算類似度 (scaled similarity) スコア行列が一般に使用される。一般に使用されるそのような行列の一例は、BLOSUM62行列 (BLASTプログラムスイートのためのデフォルト行列) である。Vector NTIプログラムは、一般に

10

20

30

40

50

、パブリックデフォルト値、または供給されている場合にはカスタムシンボル比較表を使用する（さらなる詳細については、ユーザマニュアルを参照）。一部の用途については、Vector NTIパッケージにためのデフォルト値を使用することが好ましい。

【0135】

あるいは、相同性率は、CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73 (1), 237-244) と類似するアルゴリズムに基づくVector NTI (Invitrogen Corp.) における多重アライメント特徴を使用して算出することができる。

【0136】

ソフトウェアが最適なアライメントを生成すれば、相同性率、好ましくは、配列同一性を算出することが可能である。ソフトウェアは、通常、これを配列比較の一部として実行し、数的結果を生成する。

10

【0137】

配列同一性を決定する場合にギャップペナルティを使用するのであれば、ペアワイズアライメントに以下のパラメータを使用することが好ましい：

【0138】

【表2】

BLAST用	
ギャップオープン	0
ギャップエクステンション	0

20

CLUSTAL用	DNA	タンパク質	
ワードサイズ	2	1	Kトリプル
ギャップペナルティ	15	10	
ギャップエクステンション	6.66	0.1	

【0139】

一実施形態において、CLUSTALは、上記定義のとおり設定されたギャップペナルティおよびギャップエクステンションを用いて使用することができる。

30

【0140】

好適には、ヌクレオチド配列に関する同一性の程度は、少なくとも20個の連続ヌクレオチドにわたり、好ましくは、少なくとも30個の連続ヌクレオチドにわたり、好ましくは、少なくとも40個の連続ヌクレオチドにわたり、好ましくは、少なくとも50個の連続ヌクレオチドにわたり、好ましくは、少なくとも60個の連続ヌクレオチドにわたり、好ましくは、少なくとも100個の連続ヌクレオチドにわたり決定される。

【0141】

好適には、ヌクレオチド配列に関する同一性の程度は、全配列にわたり決定することができる。

40

【0142】

変異体 / 相同体 / 誘導体

本発明はまた、タンパク質の任意のアミノ酸配列、またはそのようなタンパク質をコードする任意のヌクレオチド配列の、変異体、相同体および誘導体の使用を包含する。

【0143】

ここで、「相同体」という用語は、対象アミノ酸配列および対象ヌクレオチド配列とある相同性を有する実体を意味する。ここで、「相同性」という用語は、「同一性」と同じであると見なすことができる。

【0144】

本文脈においては、相同配列は、対象配列と少なくとも75、80、85または90%

50

同一、好ましくは、少なくとも95、96、97、98または99%同一であり得るアミノ酸配列を含むと解釈される。通常、相同体は、対象アミノ酸配列と同一の活性部位などを含むであろう。相同性は類似性(すなわち、類似の化学的特性/機能を有するアミノ酸残基)の観点から考慮することもできるが、本発明との関連では、配列同一性の観点から相同性を表現することが好ましい。

#### 【0145】

本文脈においては、相同配列は、本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列(対象配列)と少なくとも75、80、85または90%同一、好ましくは、少なくとも95、96、97、98または99%同一であり得るヌクレオチド配列を含むと解釈される。通常、相同体は、対象配列と同じ、活性部位などをコードする配列を含むであろう。相同性は類似性(すなわち、類似の化学的特性/機能を有するアミノ酸残基)の観点から考慮することもできるが、本発明との関連では、配列同一性の観点から相同性を表現することが好ましい。

10

#### 【0146】

相同性の比較は、目視により、またはより一般的には、容易に利用可能な配列比較プログラムを使用して行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の相同性率を計算することができる。相同性率は、連続配列にわたり計算することができ、すなわち、ある1つの配列を他の配列とアラインし、ある1つの配列中の各アミノ酸を他の配列中の対応するアミノ酸と1回に1残基、直接比較する。これは「ギャップなし」アライメントと称される。通常、このようなギャップなしアライメントは、比較的少数の残基にわたってのみ実施される。

20

#### 【0147】

これは非常に簡易で一貫した方法であるが、例えば、配列の他の同一ペアにおいて、ある挿入または欠失が後続のアミノ酸残基をアライメントから外すことを考慮し得ず、したがって、グローバルアライメントを実施した場合に相同性率を大きく低下させる可能性がある。このような理由から、ほとんどの配列比較法は、全相同性スコアを過度にペナルティ化せずに、あり得る挿入および欠失を考慮する最適なアライメントを作成するように設計される。これは、配列アライメント中に「ギャップ」を挿入して局所的相同性の最大化を試みることにより達成される。

#### 【0148】

しかしながら、これらのより複雑な方法は、同数の同一アミノ酸について、可能な限り少ないギャップを有する配列アライメント(2つの比較配列間のより高い関係性を反映する)が、多くのギャップを有するものより高いスコアを達成するように、そのアライメント中で生じる各ギャップに対して「ギャップペナルティ」を割り当てる。通常、あるギャップの存在に対して比較的高いコストを課し、そのギャップ中の後続の各残基に対してより小さいペナルティを課す「アフラインギャップコスト」が使用される。これは、最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然ながら、より少数のギャップを有する最適化されたアライメントを生成するであろう。大多数のアライメントプログラムは、ギャップペナルティが修飾されることを許容する。しかし、配列比較のためにそのようなソフトウェアを使用する場合には、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを使用する場合、アミノ酸配列のためのギャップペナルティのデフォルトは、ギャップが-12および各エクステンションが-4である。

30

40

#### 【0149】

したがって、最大相同性率の計算には、最初にギャップペナルティを考慮して最適なアライメントを作成することが要求される。このようなアライメントの実施に好適なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ(Devreux et al 1984 Nuc. Acids Research 12 p 387)である。配列比較を実施し得る他のソフトウェアの例としては、例えば、BLASTパッケージ(Ausubel et al., 1999, 上記を参照)、FASTA

50

(Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 403-410) および GENEWORKS 比較ツールスイートが挙げられるが、これらに限定されない。BLAST および FASTA の両者は、オフラインおよびオンライン検索で入手可能である (Ausubel et al., 1999、上記を参照)。しかしながら、一部の用途では、GCG Bestfit プログラムを使用することが好ましい。BLAST 2 Sequences と称する新しいツールもまた、タンパク質およびヌクレオチド配列の比較に利用可能である。

【0150】

最終相同性率を同一性に関して計測することができるが、アライメントプロセスそれ自体は、通常は、オールオアナッシングのペア比較に基づくものではない。代わりに、化学的類似性または進化的距離に基づきそれぞれのペアワイス比較にスコアを割り当てる数値換算類似度 (scaled similarity) スコア行列が一般に使用される。一般に使用されるそのような行列の一例は、BLOSUM62 行列 (BLAST プログラムスイートのためのデフォルト行列) である。GCG Wisconsin プログラムは、一般に、パブリックデフォルト値、または供給されている場合にはカスタムシンボル比較表を使用する (さらなる詳細については、ユーザマニュアルを参照)。一部の用途では、GCG パッケージのためのパブリックデフォルト値、または他のソフトウェアの場合には、BLOSUM62 などのデフォルト行列を使用することが好ましい。

10

【0151】

あるいは、相同性率は、CLUSTAL (Higgins DG & Sharp P M (1988)、上記を参照) と類似するアルゴリズムに基づく DNASIS (商標) (Hitachi Software) における多重アライメント特徴を使用して算出することができる。

20

【0152】

ソフトウェアが最適なアライメントを生成すれば、相同性率、好ましくは、配列同一性率を算出することが可能である。ソフトウェアは、通常、これを配列比較の一部として実行し、数的結果を生成する。

【0153】

配列は、サイレント変化を生成し、機能的に同等の物質をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入または置換も有し得る。意図的なアミノ酸置換は、その物質の二次的結合活性が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性の性質の類似性に基づいて行うことができる。例えば、負荷電アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ；正荷電アミノ酸としては、リシンおよびアルギニンが挙げられ；また、類似の親水性値を有する非荷電極性頭部基を持つアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。

30

【0154】

保存的置換は、例えば、以下の表にしたがってすることができる。第2列の同一ブロックの、好ましくは、第3列の同一行のアミノ酸を互いに置換することができる：

【0155】

40

【表 3】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性 - 非荷電	CSTM
		NQ
	極性 荷電	DE
KR		
芳香族		HFVY

10

## 【0156】

本発明はまた、起こり得る相同置換（置換（substitution）および取り換え（replacement））はいずれも、本明細書中では、既存のアミノ酸残基を代替の残基と置き換えることを意味するのに使用される）、すなわち、塩基性のものと塩基性のもの、酸性のものと酸性のもの、極性のものと極性のものなどの同種置換を包含する。非相同置換、すなわち、ある分類の残基から他の分類の残基へ、または、オルニチン（以下、Zと称する）、ジアミノ酪酸オルニチン（以下、Bと称する）、ノルロイシンオルニチン（以下、Oと称する）、ピリジルアラニン、チエニルアラニンおよびフェニルグリシンなどの非天然アミノ酸の混入を伴う置換もまた起こり得る。

20

## 【0157】

取り換えはまた、非天然アミノ酸によりすることができ、そのようなアミノ酸としては、アルファ\*およびアルファ二置換\*アミノ酸、N-アルキルアミノ酸\*、乳酸\*、天然アミノ酸のハロゲン化誘導体、例えば、トリフルオロチロシン\*、p-Cl-フェニルアラニン\*、p-Br-フェニルアラニン\*、p-I-フェニルアラニン\*、L-アリルグリシン\*、-アラニン\*、L--アミノ酪酸\*、L--アミノ酪酸\*、L--アミノイソ酪酸\*、L--アミノカプロン酸#、7-アミノヘプタン酸\*、L-メチオニンスルホン\*、L-ノルロイシン\*、L-ノルバリン\*、p-ニトロ-L-フェニルアラニン\*、L-ヒドロキシプロリン#、L-チオプロリン\*、フェニルアラニン（Phe）のメチル誘導体、例えば、4-メチル-Phe\*、ペンタメチル-Phe\*、L-Phe（4-アミノ）#、L-Tyr（メチル）\*、L-Phe（4-イソプロピル）\*、L-Tic（1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸）\*、L-ジアミノプロピオン酸およびL-Phe（4-ベンジル）\*が挙げられる。記号\*は、誘導体の疎水性を示すために上記考察の目的（相同または非相同置換に関する）に利用されており、一方、#は、誘導体の親水性を示すために利用されており、#\*は、両親媒性を示す。

30

## 【0158】

変異アミノ酸配列は、配列の任意の2つのアミノ酸残基間に挿入することができる好適なスペーサー基、例として、アルキル基、例えばメチル基、エチル基またはプロピル基を、アミノ酸スペーサー、例えばグリシンまたは-アラニン残基に加えて含み得る。変異のさらなる形態は、ペプチド形態の1つ以上のアミノ酸残基の存在を含むが、当業者には十分に理解されよう。疑義を回避するため、「ペプチド形態」は、炭素置換基が炭素ではなく残基の窒素原子上に存在する変異アミノ酸残基を指すために使用される。ペプチド形態のペプチドを調製する方法は当該技術分野、例えば、Simon R J e t a l . , P N A S ( 1 9 9 2 ) 8 9 ( 2 0 ) , 9 3 6 7 - 9 3 7 1、およびH o r w e l l D C , T r e n d s B i o t e c h n o l . ( 1 9 9 5 ) 1 3 ( 4 ) , 1 3 2 - 1 3 4において知られている。

40

## 【0159】

本発明において使用されるヌクレオチド配列は、それらの範囲内に、合成または修飾又

50

クレオチドを含み得る。オリゴヌクレオチドに対する多数の異なるタイプの修飾が、当該技術分野において知られている。これらとしては、メチルホスホネートおよびホスホロチオエート骨格、ならびに / または分子の 3' および / もしくは 5' 末端におけるアクリジンもしくはポリリジン鎖の付加が挙げられる。本発明の目的のため、本明細書に記載のヌクレオチド配列が当該技術分野において利用可能な任意の方法により修飾し得ることを理解すべきである。このような修飾は、本発明のヌクレオチド配列のインビボ活性または寿命を向上させるように実施することができる。

#### 【0160】

本発明はまた、本明細書に提示される配列に相補的なヌクレオチド配列、またはその任意の誘導体、断片もしくは誘導体の使用を包含する。配列がその断片に相補的である場合、その配列をプローブとして使用して他の生物における類似のコード配列を同定することができる。

10

#### 【0161】

本発明の配列と 100% 相同でないが、本発明の範囲内であるポリヌクレオチドは、多数の手法で得ることができる。本明細書に記載の配列の他の変異体は、例えば、一連の個体、例えば、異なる集団からの個体から作製された DNA ライブラリーをプロービングすることにより得ることができる。さらに、他の相同体を得ることができ、そのような相同体およびその断片は、一般に、本明細書の配列表に示す配列に選択的にハイブリダイズし得る。このような配列は、他の動物種から作製された cDNA ライブラリー、または他の動物種からのゲノム DNA ライブラリーをプロービングし、中～高ストリンジェンシーの条件下で付属の配列表の配列のいずれか 1 つの全部または一部を含むプローブによりそのようなライブラリーをプロービングすることにより得ることができる。類似の考察は、本発明のポリペプチドまたはヌクレオチド配列の種相同体および対立遺伝子変異体を得ることに適用される。

20

#### 【0162】

変異体および株 / 種相同体はまた、本発明の配列内の保存アミノ酸配列をコードする変異体および相同体内の配列を標的とするように設計されたプライマーを使用する縮重 PCR を使用して得ることができる。保存配列は、例えば、いくつかの変異体 / 相同体からのアミノ酸配列をアラインすることにより予測することができる。配列アライメントは、当該技術分野で知られるコンピュータソフトウェアを使用して実施することができる。例えば、GCG Wisconsin PileUp プログラムが広く使用される。

30

#### 【0163】

縮重 PCR において使用されるプライマーは、1 つ以上の縮重位置を含有し、既知の配列に対する単一配列プライマーを用いる配列のクローニングに使用されるものよりも低いストリンジェンシー条件において使用される。

#### 【0164】

あるいは、このようなポリヌクレオチドは、特徴付けされた配列の部位特異的突然変異誘発により得ることができる。これは、例えば、ポリヌクレオチド配列が発現する特定の宿主細胞についてのコドン選好性を最適化するためにサイレントコドン配列変化が要求される場合に有用であり得る。制限酵素認識部位を導入するため、またはポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの特性もしくは機能を変更するために他の配列変化が望まれることがある。

40

#### 【0165】

本発明のポリヌクレオチド (ヌクレオチド配列) は、プライマー、例えば、PCR プライマー、代替増幅反応のためのプライマー、プローブ、例えば、放射性もしくは非放射性標識を使用する慣用の手段による顕示標識で標識されたものを産生するために使用することができる、またはポリヌクレオチドをベクター中にクローニングすることができる。このようなプライマー、プローブおよび他の断片は、少なくともとも 15、好ましくは、少なくともとも 20、例えば、少なくともとも 25、30 または 40 ヌクレオチド長であり、これらもまた、本明細書において使用されるポリヌクレオチドという用語に包含される。

50

## 【0166】

本発明によるDNAポリヌクレオチドおよびプローブなどのポリヌクレオチドは、組換えにより、合成により、または当業者に利用可能な任意の手段により產生することができる。これらはまた、標準的手法によりクローニングすることもできる。

## 【0167】

一般に、プライマーは、所望の核酸配列の1回1ヌクレオチドの段階的製造を含む合成手段により產生される。自動化技術を使用してこれらを達成するための技術は、当該技術分野において容易に利用可能である。

## 【0168】

より長いポリヌクレオチドは、一般に、組換え手段を使用して、例えば、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）クローニング技術を使用して產生される。プライマーは、増幅されたDNAを好適なクローニングベクター中にクローニングできるように、好適な制限酵素認識部位を含有するように設計することができる。

10

## 【0169】

## ハイブリダイゼーション

本発明はまた、本発明の核酸配列に相補的な配列、または本発明の配列もしくは本発明の配列に相補的な配列にハイブリダイズすることができる配列を包含する。

## 【0170】

本明細書において使用される「ハイブリダイゼーション」という用語は、「核酸鎖が塩基対合を介して相補鎖と結合するプロセス」、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術において実施される増幅のプロセスを含む。

20

## 【0171】

本発明はまた、本明細書に提示される配列に相補的な配列にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列、またはその任意の誘導體、断片もしくは誘導體の使用を包含する。

## 【0172】

「変異体」という用語は、本明細書に提示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズし得る配列に相補的な配列も包含する。

## 【0173】

好ましくは、「変異体」という用語は、本明細書に提示されるヌクレオチド配列にストリンジエンシーな条件（例えば、50 および  $0.2 \times SSC \{ 1 \times SSC = 0.15 M \text{ の } NaCl, 0.015 M \text{ のクエン酸 } Na_3, pH 7.0 \}$ ）下でハイブリダイズし得る配列に相補的な配列を包含する。

30

## 【0174】

より好ましくは、「変異体」という用語は、本明細書に提示されるヌクレオチド配列に高ストリンジエンシーな条件（例えば、65 および  $0.1 \times SSC \{ 1 \times SSC = 0.15 M \text{ の } NaCl, 0.015 M \text{ のクエン酸 } Na_3, pH 7.0 \}$ ）下でハイブリダイズし得る配列に相補的な配列を包含する。

## 【0175】

本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列（本明細書に提示される配列に相補的な配列を含む）にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列に関する。

40

## 【0176】

本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列（本明細書に提示される配列に相補的な配列を含む）にハイブリダイズし得る配列に相補的なヌクレオチド配列に関する。

## 【0177】

中位～最大のストリンジエンシー条件下で本明細書に提示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズし得るポリヌクレオチド配列もまた本発明の範囲内に含まれる。

## 【0178】

好ましい態様においては、本発明は、ストリンジエンシーな条件（例えば、50 および  $0.2 \times SSC$ ）下で本発明のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列、またはその相補体をカバーする。

50

## 【0179】

より好ましい態様においては、本発明は、高ストリンジェンシーな条件（例えば、65 および  $0.1 \times SSC$ ）下で本発明のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列、またはその相補体をカバーする。

## 【0180】

## 分子進化

非限定的な例として、インビボまたはインビトロでヌクレオチド配列中に多数の部位特異的またはランダムな変異を産生すること、および、続いて種々の手段によりコードされるポリペプチドの改善された機能性についてスクリーニングすることが可能である。

## 【0181】

さらに、ポリヌクレオチド配列の変異または天然変異体を、野生型、または他の変異もしくは天然変異体により組換えて、新たな変異体を産生することができる。このような新たな変異体もまた、コードされるポリペプチドの改善された機能性についてスクリーニングされ得る。新たな好ましい変異体の産生は、当該技術分野において十分に確立された種々の方法、例えば、エラー閾値変異誘発（Error Threshold Mutagenesis）（国際公開第92/18645号パンフレット）、オリゴヌクレオチド媒介ランダム変異誘発（米国特許第5,723,323号明細書）、DNAシャッフリング（米国特許第5,605,793号明細書）、エキソ媒介遺伝子アセンブリ、国際公開第00/58517号パンフレットにより達成することができる。これらおよび類似のランダム指向分子進化法の適用により、タンパク質の構造または機能のいかなる予備知識もなしで好ましい特徴を有する本発明の酵素の変異体の同定および選択が可能となり、予測可能でないが、有益な変異または変異体の産生が可能となる。当該技術分野において、酵素活性の最適化または改変のための分子進化の適用例が数多くあり、そのような例として、

限定はされないが、以下の1つ以上が挙げられる：  
 宿主細胞またはインビトロにおける発現および/または活性の最適化、  
 酵素活性の増大、基質および/または生成物特異性の改変、  
 酵素安定性または構造安定性の増大または低減、好ましい環境条件、例えば温度、pH、  
 基質における酵素の活性/特異性の改変。

## 【0182】

## 部位特異的変異誘発

タンパク質コードヌクレオチド配列を単離したなら、または推定タンパク質コードヌクレオチド配列を同定したなら、本発明のタンパク質を調製するために配列を変異させることが望ましい場合がある。

## 【0183】

変異は、合成オリゴヌクレオチドを使用して導入することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、所望の変異部位をフランキングするヌクレオチド配列を含有する。

## 【0184】

好適な方法は、Morinaga et al., (Biotechnology (1984) 2, p 646 - 649) に開示されている。酵素コードヌクレオチド配列中に突然変異を導入する他の方法は、Nelson and Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147 - 151) に記載されている。

## 【0185】

## 組換え体

一態様において、本発明において使用される配列は、組換え配列、すなわち、組換えDNA技術を使用して調製された配列である。

## 【0186】

これらの組換えDNA技術は、当業者の技能の範囲内である。そのような技術は、文献、例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory M

10

20

30

40

50

annual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press に説明されている。

【0187】

#### 合成物

一態様において、本発明において使用される配列は、合成配列、すなわち、インピトロ化学または酵素的合成により調製された配列である。これとしては、限定されるものではないが、宿主生物、例えば、メチロトローフ酵母のピキア属 (*Pichia*) およびハンセンラ属 (*Hansenula*) に最適なコドン使用頻度を用いて作製された配列が挙げられる。

【0188】

#### 発現

##### 酵素の発現

本発明において使用されるヌクレオチド配列は、組換え複製ベクター中に取り込むことができる。ベクターは、ヌクレオチド配列を複製し、タンパク質/酵素形態で、適合性の宿主細胞中で、および/または適合性の宿主細胞から発現させるために使用することができる。

【0189】

発現は、制御配列、例えば、調節配列を使用して制御することができる。

【0190】

ヌクレオチド配列の発現により宿主組換え細胞により産生されるタンパク質は、使用される配列および/またはベクターに応じて、分泌、または、細胞内に含有させることができる。コード配列は、特定の原核または真核細胞膜を介する物質コード配列の分泌を指示するシグナル配列を用いて設計することができる。

【0191】

#### 発現ベクター

「発現ベクター」という用語は、インピボまたはインピトロで発現し得るコンストラクトを意味する。

【0192】

好ましくは、発現ベクターは、好適な宿主生物のゲノム中に取り込まれる。「取り込まれる」という用語は、好ましくは、ゲノム中への安定した取り込みをカバーする。

【0193】

本発明のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列が、好適な宿主生物によるヌクレオチド配列の発現を提供し得る調節配列に作動可能に結合しているベクター中に存在し得る。

【0194】

本発明において使用されるベクターは、本発明のポリペプチドの発現を提供するように下記の好適な宿主細胞中に形質転換することができる。

【0195】

ベクター、例えば、プラスミド、コスミド、またはファージベクターの選択は、それを導入すべき宿主細胞に依存することが多い。

【0196】

本発明において使用されるベクターは、1つ以上の選択マーカー遺伝子、例えば、抗生物質耐性、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールまたはテトラサイクリン耐性を付与する遺伝子を含むし得る。あるいは、選択は、同時形質転換（国際公開第91/17243号パンフレットに記載）により達成することができる。

【0197】

ベクターは、例えばRNAの産生にインピトロで使用することができ、または宿主細胞を形質移入し、形質転換し、形質導入し、または感染させるために使用することができる。

【0198】

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、複製ベクター中に本発明のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列を導入し、適合性の宿主細胞中にベクターを導入し、ベクターの複製を生じさせる条件下で宿主細胞を増殖させることにより、本発明のヌクレオチド配列を作製する方法を提供する。

【0199】

ベクターは、当該宿主細胞中のベクターの複製を可能とするヌクレオチド配列をさらに含み得る。このような配列の例は、プラスミド pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1 および pIJ702 の複製起源である。

【0200】

調節配列

一部の適用では、本発明において使用されるヌクレオチド配列は、例えば、選択された宿主細胞によるヌクレオチド配列の発現を提供し得る調節配列に作動可能に結合している。例として、本発明は、そのような調節配列に作動可能に結合している本発明のヌクレオチド配列を含むベクターをカバーする。すなわち、ベクターは発現ベクターである。

10

【0201】

「作動可能に結合している」という用語は、記載の構成成分が、それらの意図した態様でそれらを機能させる関係にある並置を指す。コード配列に「作動可能に結合している」調節配列は、コード配列の発現が制御配列と適合する条件下で達成されるような手法でライゲートされる。

【0202】

「調節配列」という用語は、プロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の発現調節シグナルを含む。

20

【0203】

「プロモーター」という用語は、当該技術分野における通常の意味で使用され、例えば、RNAポリメラーゼ結合部位である。

【0204】

本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列の発現の向上はまた、異種調節領域、例えば、プロモーター、分泌リーダーおよびターミネーター領域の選択により達成することができる。

【0205】

好ましくは、本発明によるヌクレオチド配列は、少なくともプロモーターに作動可能に結合している。

30

【0206】

他のプロモーターを使用して、本発明のポリペプチドの発現を指向させることもできる。

【0207】

細菌、真菌または酵母宿主中のヌクレオチド配列の転写の指向に好適なプロモーターの例は、当該技術分野においてよく知られている。

【0208】

プロモーターは、好適な宿主中における発現を確保または増加させるための特徴部をさらに含むことができる。例えば、特徴部は、プリブノーボックスまたは TATA ボックスなどの保存領域であり得る。

40

【0209】

コンストラクト

「コンストラクト」という用語（「コンジュゲート」、「カセット」および「ハイブリッド」などの用語と同義である）は、プロモーターに直接または間接的に付着している本発明により使用されるヌクレオチド配列を含む。

【0210】

間接的付着の一例は、プロモーターと本発明のヌクレオチド配列との間の、イントロン配列、例えば Sh1 - イントロンまたは ADH イントロンなどの、好適なスパーサー群の提供である。同じことが、直接または間接的付着を含む、本発明に関連する「融合してい

50

る」という用語にも当てはまる。一部の場において、これらの用語は、野生型遺伝子プロモーターと通常会合するタンパク質をコードするヌクレオチド配列の天然の組合せを、それらがいずれも天然環境に存在する場合には、カバーしない。

【0211】

コンストラクトは、遺伝子コンストラクトの選択を可能とするマーカーも含有または発現し得る。

【0212】

一部の適用では、好ましくは、本発明のコンストラクトは、少なくとも、プロモーターに作動可能に結合している本発明のヌクレオチド配列を含む。

【0213】

宿主細胞

「宿主細胞」という用語は、本発明との関連では、上記のヌクレオチド配列または発現ベクターを含み、本明細書に定義される特定の特性を有するタンパク質の組換え産生に使用される任意の細胞を含む。

【0214】

したがって、本発明のさらなる実施形態は、本発明のタンパク質を発現するヌクレオチド配列により形質転換または形質移入された宿主細胞を提供する。細胞は、前記ベクターと適合するように選択され、例えば、原核（例えば、細菌）、真菌、酵母または植物細胞であり得る。

【0215】

好適な細菌宿主生物の例は、グラム陽性またはグラム陰性細菌種である。

【0216】

本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の性質、および/または発現タンパク質のさらなるプロセッシングについての所望度に応じて、酵母または他の真菌などの真核宿主が好ましいことがある。一般に、酵母細胞は、操作がより容易なため、真菌細胞よりも好ましい。しかしながら、タンパク質のなかには、酵母細胞からの分泌が乏しかったり、一部の場、適切にプロセッシングされなかったりする（例えば、酵母の超グリコシル化）ものがある。これらの例においては、異なる真菌宿主生物を選択すべきである。

【0217】

好適な宿主細胞、例えば、酵母、真菌および植物宿主細胞の使用は、本発明の組換え発現産物に最適な生物学的活性を付与することが必要であり得る場合に、翻訳後修飾（例えば、ミリスチル化、グリコシル化、トランケーション、脂質化、およびチロシン、セリンまたはトレオニンリン酸化）を提供し得る。

【0218】

宿主細胞は、アミノペプチダーゼ欠損株またはアミノペプチダーゼマイナス株であってもよい。本発明はまた、親細胞の変異細胞を産生する方法であって、ポリペプチドをコードする核酸配列、またはその制御配列を破壊または欠失させ、それにより変異細胞中のポリペプチドの産生量を親細胞より減少させることを含む方法に関する。

【0219】

アミノペプチダーゼ活性が低下した株の構築は、細胞中のアミノペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの発現に必要な核酸配列を修飾または不活化することによって首尾よく行うことができる。

【0220】

生物

「生物」という用語は、本発明との関連では、本発明によるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列および/もしくはそれから得られた産物を含み得、かつ/またはプロモーターが生物中に存在する場合に本発明によるヌクレオチド配列の発現を可能とし得る任意の生物を含む。

【0221】

好適な生物としては、原核、真菌、酵母または植物を挙げることができる。

10

20

30

40

50

## 【0222】

「トランスジェニック生物」という用語は、本発明との関連では、本発明によるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列および/もしくはそれから得られた産物を含み、かつ/またはプロモーターが生物内の本発明によるヌクレオチド配列の発現を可能とし得る任意の生物を含む。好ましくは、ヌクレオチド配列は、生物のゲノム中に取り込まれる。

## 【0223】

「トランスジェニック生物」という用語は、天然ヌクレオチドコード配列がその天然プロモーター（これもその天然環境中に存在する）の制御下にある場合、天然環境中の天然ヌクレオチドコード配列をカバーしない。

## 【0224】

したがって、本発明のトランスジェニック生物は、本発明によるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、本発明によるコンストラクト、本発明によるベクター、本発明によるプラスミド、本発明による細胞、本発明による組織、またはそれらの産物の1つ、または組合せを含む生物を含む。

## 【0225】

例えば、トランスジェニック生物はまた、異種プロモーターの制御下で本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み得る。

## 【0226】

## 宿主細胞 / 生物の形質転換

上記のとおり、宿主生物は、原核または真核生物であり得る。好適な原核宿主の例としては、エシェリキア・コリ (*E. coli*) およびバチルス・サブティリス (*Bacillus subtilis*) が挙げられる。

## 【0227】

原核宿主の形質転換に関する技術は、当該技術分野でよく報告されており、例えば、Sambrook et al (上記を参照) を参照されたい。原核宿主を使用する場合、ヌクレオチド配列は、形質転換前に、イントロンの除去などにより、好適に改変する必要がある。

## 【0228】

糸状菌細胞は、当該技術分野で知られた種々の方法、例えば、知られた方法でのプロトプラスト形成およびプロトプラストの形質転換、そしてそれに続く細胞壁の再生を含む方法により形質転換することができる。宿主微生物としてのアスペルギルス属 (*Aspergillus*) の使用が、欧州特許第0238023号明細書に記載されている。

## 【0229】

他の宿主生物は、植物であり得る。植物の形質転換に使用される一般的技術の概要は、Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42: 205-225) およびChristou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994* 17-27) の論文に見出すことができる。植物形質転換に関するさらなる教示は、欧州特許第0449375号明細書に見出すことができる。

## 【0230】

真菌、酵母および植物の形質転換に関する一般的教示は、以下のセクションに提示する。

## 【0231】

## 形質転換される真菌

宿主生物は、真菌、例えばカビであり得る。好適なそのような宿主の例としては、サーモミセス属 (*Thermomyces*)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、ペニシリニウム属 (*Penicillium*)、ムコル属 (*Mucor*)、ニューロスポラ属 (*Neurospora*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*) などに属するメンバーが挙げられる。

## 【0232】

10

20

30

40

50

一実施形態では、宿主生物は、糸状菌であり得る。

【0233】

糸状菌の形質転換は、糸状菌の形質転換の標準的技術を記載した米国特許第5741665号明細書で考察されており、真菌の培養は、当該技術分野においてよく知られている。アカパンカビ (*N. crassa*) に適用される技術の広範な概説は、例えば、Davis and de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17 A: 79 - 143に見出される。

【0234】

糸状菌の形質転換にも利用することができるさらなる教示は、米国特許第5674707号明細書に概説されている。

10

【0235】

さらに、糸状菌における遺伝子発現は、Punt et al. (2002) *Trends Biotechnol* 2002 May; 20(5): 200 - 6, Archer & Peberdy, *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17(4): 273 - 306に教示されている。

【0236】

本発明は、これらの標準的技術の使用により調製される本発明によるトランスジェニック糸状菌の生産を包含する。

【0237】

一態様において、宿主生物は、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) であり得る。

20

【0238】

本発明によるトランスジェニックアスペルギルス (*Aspergillus*) はまた、例えば、Turner, G. 1994 (*Vectors for genetic manipulation. In: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (Editors) Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology vol 29. Elsevier Amsterdam 1994. pp. 641 - 666*) の教示にしたがって調製することができる。

【0239】

一態様において、宿主生物は、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、例えばトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma Reesei*) であり得る。

30

【0240】

形質転換される酵母

他の実施形態において、トランスジェニック生物は、酵母であり得る。

【0241】

酵母中の異種遺伝子発現の原理の概説は、例えば、*Methods Mol Biol* (1995), 49: 341 - 54、および *Curr Opin Biotechnol* (1997) Oct; 8(5): 554 - 60で提供される。

【0242】

これに関して、酵母、例えば、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (*FEMS Microbiol Rev* (2000) 24(1): 45 - 66を参照) の種は、異種遺伝子発現のためのビヒクルとして使用することができる。

40

【0243】

サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中の異種遺伝子発現および遺伝子産物の分泌の原理の概説は、E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Ha*

50

rrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.) に示されている。

【0244】

酵母の形質転換のため、いくつかの形質転換プロトコルが開発されている。例えば、本発明によるトランスジェニックサッカロミセス (*Saccharomyces*) は、Hinnen et al., (1978, PNAS USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, 275, 104); および Ito, H et al (1983, J Bacteriology 153, 163 - 168) の教示にしたがって調製することができる。

【0245】

形質転換された酵母細胞は、種々の選択マーカー、例えば、栄養要求性マーカー、ドミナント抗生物質耐性マーカーを使用して選択することができる。

【0246】

培養および産生

本発明のヌクレオチド配列により形質転換された宿主細胞は、コードされるポリペプチドの産生をもたらし、細胞および/または培養培地からのポリペプチドの回収を容易にする条件下で培養することができる。

【0247】

細胞を培養するために使用される培地は、当該宿主細胞の増殖およびポリペプチドの発現の取得に好適な従来の任意の培地であってよい。

【0248】

組換え細胞により産生されたタンパク質は、細胞の表面上でディスプレイすることができる。

【0249】

タンパク質は、宿主細胞から分泌させることができ、よく知られた手順で培養培地から簡便に回収することができる。

【0250】

分泌

タンパク質は、発現宿主から、タンパク質をより容易に回収することができる培養培地中に分泌されることが望ましいことが多い。本発明によれば、分泌リーダー配列を所望の発現宿主に基づき選択することができる。ハイブリッドシグナル配列も、本発明に関連して使用することができる。

【0251】

異種分泌リーダー配列の典型的な例は、真菌アミログルコシダーゼ (AG) 遺伝子 (glA - 例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) からの18アミノ酸型および24アミノ酸型の両方)、a 因子遺伝子 (酵母、例えば、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*) およびハンセンラ属 (*Hansenula*))、または - アミラーゼ遺伝子 (バチルス属 (*Bacillus*)) に由来するものである。

【0252】

例として、エシェリキア・コリ (*E. coli*) 中の異種タンパク質の分泌は、Methods Enzymol (1990) 182: 132 - 43 に概説されている。

【0253】

検出

アミノ酸配列の発現を検出および測定するための種々のプロトコルは、当該技術分野において知られている。例としては、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) および蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) が挙げられる。

【0254】

広範な標識およびコンジュゲーション技術が当業者により知られており、種々の核酸およびアミノ酸アッセイにおいて使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0255】

多数の会社、例えば、Pharmacia Biotech ( Piscataway , NJ )、Promega ( Madison , WI )、および US Biochemical Corp ( Cleveland , OH ) が市販のキットおよびそれらの手順についてのプロトコルを供給している。

## 【0256】

好適なレポーター分子または標識としては、それらの放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤または発色剤、ならびに、基質、補因子、阻害剤、磁気粒子などが挙げられる。このような標識の使用を教示する特許としては、米国特許第 3 , 8 1 7 , 8 3 7 号 ; 米国特許第 8 5 0 , 7 5 2 号 ; 米国特許第 3 , 9 3 9 , 3 5 0 号 ; 米国特許第 3 , 9 9 6 , 3 4 5 号 ; 米国特許第 4 , 2 7 7 , 4 3 7 号 ; 米国特許第 4 , 2 7 5 , 1 4 9 号および米国特許第 US 4 , 3 6 6 , 2 4 1 号が挙げられる。

10

## 【0257】

また、組換え免疫グロブリンは、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号明細書に示されるように産生することができる。

## 【0258】

## 融合タンパク質

本発明において使用されるアミノ酸配列は、例えば、抽出および精製を補助する融合タンパク質として産生することができる。融合タンパク質パートナーの例としては、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( GST )、6 x His、GAL4 ( DNA 結合および / または転写活性化ドメイン ) および ( - ガラクトシダーゼ ) が挙げられる。融合タンパク質パートナーおよび目的タンパク質配列間にタンパク質分解開裂部位を含めて融合タンパク質配列の取り出しを可能とすることも好都合であり得る。

20

## 【0259】

好ましくは、融合タンパク質は、タンパク質配列の活性を妨害しない。

## 【0260】

エシェリキア・コリ ( E . coli ) 中の遺伝子融合発現系は、Curr Opin Biotechnol ( 1995 ) 6 ( 5 ) : 501 - 6 に概説されている。

## 【0261】

本発明の他の実施形態においては、アミノ酸配列を、異種配列にライゲートして融合タンパク質をコードさせることができる。例えば、物質活性に影響し得る薬剤についてのペプチドライブラリーのスクリーニングのため、市販の抗体により認識される異種エピトープを発現するキメラ物質をコードさせることが有用であり得る。

30

## 【0262】

## 追加の目的タンパク質 ( POI )

本発明において使用される配列はまた、1種以上の追加の目的タンパク質 ( POI ) または目的ヌクレオチド配列 ( NOI ) と併用してもよい。

## 【0263】

POI の非限定的な例としては、デンプンの代謝に関与するタンパク質または酵素、グリコーゲンの代謝に関与するタンパク質または酵素、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、 - ガラクトシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、 - グルカナーゼ、グルカンリアーゼ、エンド - - グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、 - グルコシダーゼ、 - グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、トリペプチジルエキソペプチダーゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクテートリアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポリメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、

40

50

プロリンエンドプロテアーゼ、ラムノガラクトナーゼ、リボヌクレアーゼ、タウマチン、トランスフェラーゼ、エキソプロテアーゼ、トランスポートタンパク質、トランスグルタミナーゼ、アミノペプチダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ(D-ヘキソース:O<sub>2</sub>-オキシドレダクターゼ、EC 1.1.3.5)、またはこれらの組み合わせが挙げられる。NOIは、それらの配列のいずれかのアンチセンス配列であってさえもよい。

【0264】

POIは、例えば、抽出および精製を補助する融合タンパク質であってさえもよい。

【0265】

POIは分泌配列に融合させることさえも可能である。

【0266】

他の配列はまた、分泌を促進、または分泌POIの収量を増大させることができる。そのような配列は、例えば、英国特許出願第9821198.0号明細書に記載されるアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) cypB遺伝子の産物としてのシャペロンタンパク質をコードすることができる。

【0267】

NOIは、例えば、限定はされないが、その発現産物のプロセッシングおよび/または発現を変える改変などの多くの理由から、その活性を改変するために操作することができる。さらなる例として、NOIはまた、特定の宿主細胞における発現を最適化するために修飾され得る。他の配列の変化は、制限酵素認識部位を導入するために所望され得る。

【0268】

NOIには、合成または修飾ヌクレオチド、例えば、メチルホスホネートおよびホスホロチオエート骨格をその中に含み得る。

【0269】

NOIは、細胞内の安定性および半減期を向上させるために修飾し得る。可能な修飾としては、限定はされないが、分子の5'および/または3'末端のフランキング配列の付加、または分子骨格におけるホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が挙げられる。

【0270】

一般的組換えDNA方法の技術

本発明は、特に記載のない限り、当業者の技能の範囲内である化学、分子生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の慣用技術を用いる。このような技術は、文献に説明されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New, York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and, A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; および D. M. J. Lilley, and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA in Methods in Enzymology*, Academic Pressを参照されたい。これらのテキスト全般はそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0271】

10

20

30

40

50

以下の実施例で本開示をさらに詳しく説明するが、それらの実施例は、本開示の請求の範囲を決して限定するものではない。添付の図面は、本開示の明細および説明に組み込まれたそれらの一部と見なされるべきである。以下の実施例は、請求の範囲に記載の開示を説明するために提示されたものであって、その開示を限定するものではない。

#### 【0272】

実施例1 - TRI031、TRI032、TRI033、TRI034、TRI035、TRI036、TRI037、TRI038のクローニングおよび形質転換

トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) での発現のためのコドン最適化遺伝子として、真菌2型アミノペプチダーゼ (pepN\_2、MeropsファミリーM28.008.に属する; merops.sanger.ac.uk/) をコードする合成遺伝子 (TRI031、TRI032、TRI033、TRI034、TRI035、TRI036、TRI037、TRI038) を、Geneart (Life Technologies) から受注した。TRI031は、ネオサルトリア・フィッシュェリ (*Neosartorya fischeri*) NRRL181由来のNCBIアクセッション番号: XP\_001258675に対応し; TRI032は、ミセリオフトラ・テルモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) ATCC (登録商標) 42464由来のNCBIアクセッション番号: XP\_003667354に対応し; TRI033はフザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) Fo5176由来のNCBIアクセッション番号: EGU74500に対応し; TRI034はフザリウム・オキシスポルム分化型クベンス (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) レース1由来のNCBIアクセッション番号: ENH69875に対応し; TRI035はアスペルギルス・クラバタス (*Aspergillus clavatus*) NRRL1由来のNCBIアクセッション番号: XP\_001273779に対応する; TRI036はケトミウム・テルモフィルム (*Chaetomium thermophilum*) 変種テルモフィルム (*thermophilum*) DSM1495からのNCBIアクセッション番号: EGS23402に対応し; TRI037はアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) NIH2624由来のNCBIアクセッション番号: XP\_001217759に対応し; かつTRI038はアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) FGSC A4由来のNCBIアクセッション番号: XP\_681714に対応する。

#### 【0273】

遺伝子は、コード領域にフランキングするGateway - 特異的組換え部位 (attB1およびattB2) (Life Technologies) を有するように発注し、pDonr221 Gatewayベクター (Life Technologies) 中のプラスミドストックとして納品された。TRI031、TRI032、TRI033、TRI034、TRI035、TRI036、TRI037、TRI038のアミノ酸配列は、予測分泌シグナル配列 (SignalP 4.0: 膜貫通領域からシグナルペプチドを区別する。Thomas Nordahl Petersen, Soren Brunak, Gunnar von Heijne & Henrik Nielsen. Nature Methods, 8: 785-786, 2011) を有しており、これらの内因性シグナル配列を、コザック配列を含有するリーダー配列、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 酸性真菌プロテアーゼ (AFP) からの分泌シグナル配列およびトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) グルコアミラーゼ遺伝子 (TrGA1) からのイントロンで置き換えた (図1を参照)。

#### 【0274】

LR CLONASE (商標) 酵素ミックス (Life Technologies) を使用してpDonr221ベクター中の合成遺伝子をdestination vector pTrex8gMに組み換え、発現ベクターpTrex8gM\_TRI031 (

配列番号：9)、pTrex 8 g M\_\_TRI032 (配列番号10)、pTrex 8 g M\_\_TRI033 (配列番号11)、pTrex 8 g M\_\_TRI034 (配列番号12)、pTrex 8 g M\_\_TRI035 (配列番号13)、pTrex 8 g M\_\_TRI036 (配列番号14)、pTrex 8 g M\_\_TRI037 (配列番号15)、およびpTrex 8 g M\_\_TRI038 (配列番号16)を得た。

【0275】

基本的には(米国特許第8,592,194 B2号明細書)に記載のように、PEG 仲介プロトプラスト形質転換法を使用し、1.5 - 17  $\mu$ g の発現ベクターでトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 株 Cellulight (商標) を個々に形質転換した。記載のように、形質転換には、僅かに変更したPEG-プロトプラスト法を用いた。プロトプラストの調製には、10 mM ウリジンで pyr 栄養要求性を補完したトリコデルマ (*Trichoderma*) 発芽培地により、胞子を26 で約18時間成長させた。(トリコデルマ (*Trichoderma*)) 発芽培地：40 ml の50% グルコース、2 g/L のペプトン、15 g/L の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、5 g/L の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.4 ml の1M  $\text{MgSO}_4$ 、4.1 ml の1M  $\text{CaCl}_2$ 、1 ml の400x トリコデルマ・リーゼイ (*T. reesei*) 微量元素溶液 { 200 g/L の  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、16 g/L の  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.4 g/L の  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 、3.2 g/L の  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.8 g/L の  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、175 g/L のクエン酸 } 振盪速度 200 rpm で。発芽胞子を遠心分離により回収し、洗浄し、45 mg/ml の溶解酵素溶液 (トリコデルマ・ハルジアヌム (*Trichoderma harzianum*), Sigma カタログ番号 L1412) により処理して真菌細胞壁を溶解させた。さらに、Penttilae ら (Gene 61 (1987) 155 - 164) の記載のように、標準法によりプロトプラストを調製した。

【0276】

一般に、200  $\mu$ L の全容量中に1.5 - 17  $\mu$ g のDNA および約  $5 \times 10^7$  のプロトプラストを含有する形質転換混合物は、2 mL の25% PEG 溶液で処理し、2 容量の1.2 M のソルビトール / 10 mM の Tris、pH 7.5 / 10 mM の  $\text{CaCl}_2$  溶液で希釈し、3% の選択的トップアガロース、1 M のソルビトール、10 mM の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、1 x MM 溶液 (2 x MM 溶液：30 g/L の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、20 mL の1M アセトアミド、20 ml の1M  $\text{CsCl}$ 、6 ml の20%  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、6 ml の20%  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 、2 mL のトリコデルマ・リーゼイ (*T. reesei*) 微量元素溶液 (400x)、80 mL の50% グルコース、全量を1リットルとし、pH 4.5) と混合し、10 mM の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を含むMMプレート (MMプレート 2% 寒天、1 x MM 溶液) に注ぎ入れた。形質転換体は、MMプレート (ウリジン欠失) で原栄養成長するものを選択した。胞子が形成されるまで28 で5 ~ 7日間、プレートをインキュベートした。より良好な胞子形成のために、安定に見える形質転換体を10 mM の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を含む新しいMMプレートに移した。胞子が形成されたなら、0.85%  $\text{NaCl}$ 、0.015% Tween (登録商標) 80 の溶液を使用して胞子を採取した。液体培養物を24 ウェルMTPフォーマット (スクリーニング用)、または振盪フラスコ (有効性確認試験) に植菌するために胞子懸濁液を使用した。前培養は3 mL のYEG培地 (5 g/L の酵母エキス、22 g/L のグルコース、 $\text{H}_2\text{O}$ ) 中。本培養は次の生産培地中 (生産培地：35 g/L の61% グルコース / ソホロース混合物、9 g/L のカザミノ酸、5 g/L の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、4.5 g/L の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1 g/L の  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/L の  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、33 g/L のPIPPSバッファー、pH 5.5、2.5 mL/L の400x トリコデルマ・リーゼイ (*T. reesei*) 微量元素 (175 g/L のクエン酸、200 g/L の  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、16 g/L の  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.2 g/L の  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.4 g/L の  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 、0.8 g/L のホウ酸) pH 5.5。変異体を生成するために、3 mL の生産培地を24 ウェルMTPに加えた。振盪フラスコでは、容量をスケールアップした。

【0277】

10

20

30

40

50

培養物を、28 および80%の湿度で、180rpmで振盪しながら7日間増殖させた。真空ろ過により培養上清を採取し、それらのパフォーマンスおよび発現レベルを試験するために使用した。

【0278】

pepN\_2 酵素のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を以下に示す：

【0279】

配列番号1 = TRI031のアミノ酸配列。図1に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている：

【化2】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAANGPGWDWKPVHPKVLPMIHLWDLMHGAQKLEDFAYAYPERNRFVGG  
PAHEDTVNYLYRELKKTGYDVKQPQVHQWTRADQALTVDGKSYVATTMTYSPSVNVTAPLAVVNNL  
GCVESDYPADLKGKIALVSRGECPFATKSVLSAKAGAAAALVYNNIEGSMAGTLGGPTSELGPYAPIAGISL  
ADGQALIQMIQAGTVTANLWIDSKVENRTTYNVIAQTKGGDPNNVVALGGHTDSVEAGPGINDDGSGHISN  
LVVAKALTRFSVKNVRFVCFWTAEEFGLLGSSYYVNSLNATEKAKIRLYLNFDMIASPNYALMIYDGDGS  
AFNLTGPAGSAQIERLFEDYYKSIRKPFVPTFNGRSDYEAFILNGIPAGGIFTGAEAIKTEEQAKLFGGQAG  
VALDANYHAKGDNMTNLNREAFLLNSKATAFAVATYANSLDIPSRLNMSTVVKRSQLEQAKKSTPHHTG  
GTGCYKDRVEQ (配列番号1)

10

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号18である。

【0280】

配列番号2 = TRI032のアミノ酸配列。図1に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている。

【化3】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAAGGHGGSSGLGCDSQRPLVSSEKLQSLIKKEDLLAGSQELQDIATAHGGHRA  
FGSSGHNATVDFLYYTLKALDYYNVTKQPFKEIFSSGTGSLTVDGEDIEAETLTYTPSGSATDKPVVVVAN  
VGDAADYPAEVAGNIALIKRGTCFSQKSVNAKAAGAVAAIYNNNAEGKLSGTLGQPFLDYAPVLGITLE  
AGEALLAKLAGGPVTATLQIDALVEERVTYNVIAETKEGDHSNVLVLGGHTDSVPAGPGINDDGSGTIGML  
TVAKALTKFRVKNAVRFVAFWSAEYGLLGSYAYIKSINSSAAELSKIRAYLNFDMIASPNYIYGIYDGDGNA  
FNLTGPAGSDVIERNFENFFKRKHTPSVPTFSGRSDYAAFIENGIPSGGLFTGAEVLKTEREAELFGGRAGV  
AYDVNYHQAGDTVDNLALDAFLNNTKAIADSVATYALSFDGLPRVDGKKRRWDAHRARMLKRSAGSHG  
HAHLHSGPCGGGASI (配列番号2)

30

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号19である。

【0281】

配列番号3 = TRI033のアミノ酸配列。図1に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている。

40

50

## 【化4】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAATKKPLVNELKLQKDINIKDLMAGAQLQDIAEANGNTRVFGGAGHNATV  
 DYLYKTLKATGYYNVKKQPFTELYSAGTASIKVDGDDITAAIMTYTPAGEATGPLVVAENL.GCEASDFPA  
 ESEGKVVLVLRGECPFSSQKSTNGKTAGAAAIVIVYNNVPGELAGTLGEPFGEFAPIVGISQEDGQAILAKTKA  
 GEVTVDLKVDATVENRVTFNVIAETKEGDHDNVLVVGGHSDSVAAGPGINDDGSIGILKVAQALTKYR  
 VKNAVRFGFWSAEEFGLLSYAYMKSINGSDAEVAKIRAYLNFDMIASPNYVYGIYDGDGSAFNLTGPAG  
 SDAIEKDFERFFKTKRLGYVPSEFSGRSDYAAFIENGIPSGGLFTGAEQLKTEEEAKKFGGEAGVAYDINYH  
 KIGDDINLNLNKEAFLVNTQAIANSVARYAKTWKSLPKVTHNTRRWDAEVASVLKRSSGSHSHAGGPCGSVS  
 V (配列番号3)

10

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号20である。

## 【0282】

配列番号4 = T R I 0 3 4 のアミノ酸配列。図1に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている。

## 【化5】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAALQIPLNLQVPKLSWNLFGDDLPLVDTKELQKSIKPENLEARAKDLYEIAKN  
 GEEYGHPTRVIGSEHGLTSLYIHAELAKLGGYYSVSNQQFPAVSGNVFESRLVIGDSVPKQASPMGLTTP  
 TKNKEPVHGTLLVLDNEGCDASDYPEAVKGNIALILRGTCFPGTKSGNAGKAGAVAAVVYNYEKDEVH  
 TLGTPSPDHVAIFGLGGEEGKAVAKKLDGKVDIAIYIDAEVKFISTTNIQAQTRGGDPDNCVMLGGHSD  
 SVAEGPGINDDGSISISVLEVAVQLTKYRVNNCVRFWAAAEGLLGS DHYVSVLPEDENRKIRLFMDY  
 DMMA SPNFAYQIYNATNAENPKGSEELRDLYVNWYEEQGLNYTFIPDGRSDYDGFIRGGIPAGGIATGAE  
 GVKTEDEVEMFGGEAGVWYDKNYHQIGDDL TNVNYTAWEVNTKLIASVATYAKSFKGFPEREIVTSVQ  
 TYSDKTKYHGSKLFI (配列番号4)

20

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号21である。

## 【0283】

配列番号5 = T R I 0 3 5 のアミノ酸配列。図1に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている。

## 【化6】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAANAPGGPGGHGRKLPVNPKTFPNEIRLKDLLHGSQKLEDFAYAYPERNRV  
 GGQAHLDTVNYLYRELKKTGYVDVYKQPQVHQWTRADQSLTLGGDSIQASTMTYSPSVNVTAPLSLVSK  
 LGCAEGDYSADVKGKIALVSRGEC SFAQKSVLSAKAGAVATIVYNNVDGSLAGTLGGATSELGPYSPIIGIT  
 LAAGQDLVARLQAAPTEVSLWIDSKVENRTTYNVIAQTKGGDPNNVVALGGHTDSVENPGINDDGS  
 SNLVVAKALTRYSVKNAVRFCFWTAEFGLLSNYVDNLSPAELAKIRLYLNFDMIASPNYALMIYDGD  
 GSAFNLTGPPGSAQIESLFENYYKSIKQGFVPTAFDGRSDYEGFILKGPAGGVFTGAESLKTEEQARLFGGQ  
 AGVALDANYHAKGDNMTNLNKAFLINSRATAFAVATYANNLSSIPPRNATVVKRESMKWTKREEPHTH  
 GADTGCFASRVKE (配列番号5)

40

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号22である。

## 【0284】

配列番号6 = T R I 0 3 6 のアミノ酸配列。図1に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている。

50

## 【化 7】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAAGGPHGFGLPKIDLRPMVSSNRLQSMITLKDLMGAKKLQDIATKNGGNRA  
 FGGAGHNATVDYLYKTLTSLGGY YTVKKQPFKEIFSSGSGSLIVDGGQIDAGIMTYTPGGSATANLVQVAN  
 LGCEDEDYPAEVAGNIALISRGSC TFSSKSLKAKAAGAVGAIVYNNVPGELSGTLGTPFLDYAPIVGISQED  
 GQVILEKLAAGPVTATLNIDAIVEERTTYNVIAETKEGDHNNVLIVGGHSDSVAAGPGINDDGSGTIGILTV  
 AKALAKANVRIKNAVRF AFWSAEFGLLSYAYMKSLNESEAEVAKIRAYLNFDMIASPNYIYGIYDGDG  
 NAFNLTGPAGSDIIEKDFEDFFKKKKTPSVPTFEFSGRSDYAAFIENGIPSGGLFTGAEVLKTEEEAKLFGGKA  
 GVAYDVNYHKAGDTVDNLAKDAFLNNTKAIANSVAKYAASWAGFPKPSAVRRRYDADMAQLLKRSGGV  
 HGHGPHTHSGPCGGDLL (配列番号6)

10

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号 23 である。

## 【0285】

配列番号 7 = T R I 0 3 7 のアミノ酸配列。図 1 に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている。

## 【化 8】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAAEGLGNHGRKLDPNKFTKDIKLDLLKGSQKLEDFAYAYPERNRVFGGKAH  
 QDTVNWIYNELKKTGYD VYKQPQVHLWSNAEQSLTVDGEAIDATTMTYSPSLKETTAEVVVVPGLGCT  
 AADYPADVAGKIALIQRGSC TFGEKSVYAAAANAAAIVYNNVDGSLSGTLGAATSELGPYAPIVGISLAD  
 GQNLVSLAQAGPLTVDLYINSQMENRTTHNVIKSKGGDPNNVIVIGHSDAVNQGPVNDGSGIISNLV  
 IAKALTKYSLKNSVTWAFWTAEEFGLLGSEFYVNSLSAAEKDKIKLYLNFDMIASPNYALMIYDGDGSTFN  
 MTGPAGSAEIEHLFEDYYKSRGLSYIPTAFDGRSDYEAFILNGIPAGGLFTGAEQIKTEEQVAMFGGQAGVA  
 YDPNYHAAGDNMTNLSEEAFILNSKATAFAVATYANSLESIPPRNATMSIQTRSASRRRAAHRRAAKPHSH  
 SGGTGCWHTRVEL (配列番号7)

20

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号 24 である。

## 【0286】

配列番号 8 = T R I 0 3 8 のアミノ酸配列。図 1 に記載のリーダー配列によりコードされる分泌シグナルには、アンダーラインが付されている。

## 【化 9】

MQTFGAFLVSFLAASGLAAAGKHKPLVTPREALQDLITLDDLLAGSQQQLQDFAYAYPERNRVFGGRAHDDT  
 VNWL YRELKRTGYH VYKQPQVHLYSNAEESLTVNGEAIEATTMTYSPSANASAE LAVISGLGCSPADFA  
 SDVAGKVVLVQRGNCTFGEKSVYAAAADAAA TIVYNNVEGSLSGTLGAAQSEQGPYSGIVGISLADGEAL  
 LALAE EGPVHVDLWIDSVMENRTTYNVIAQTKGGDPDNVVTLGHS DSV EAGPGINDDGSGIISNLVIARA  
 LTKFSTKHAVRFFFWTAEEFGLLGSDYYVSSLSPAELAKIRLYLNFDMIASPNYGLLLYDGDGSAFNLTGPA  
 GSDAIEKLFYDYFQSIGQATVETEF DGRSDYEAFILNGIPAGGVFTGAE EIKSEEEVALWGGEAGVAYDANY  
 HQVGD TIDNLNTEAYLLNSKATAFAVATYANDLSTIPKREMTTAVKRANVNGHMHRRTMPKKRQTAHRH  
 AAKGCFHSRVEQ (配列番号8)

40

アンダーラインが付されたリーダー配列が存在しない配列は、配列番号 25 である。

## 【0287】

配列番号 9 = p T r e x 8 g M \_ T R I 0 3 1 発現コンストラクトのヌクレオチド配列

。

50



【化 1 0 - 3】

ACCCAAGGCAGAACTCATCTTGAAGATTGCTAGAGTGATTTTACCGCTGATGAAATGACTGGACTCCCTCCTCCTGCTCTTATAC  
 GAAAAATTCCTGACTCTGCAAAGGTGTTTGTCTTGGGAAGATGATGTGCCCCCCCATCGCTCTTATCTCATACCCCGCCATCTTTC  
 TAGATTCTCATCTTCAACAAGAGGGGCAATCCATGATCTGGCATCCAGATGTGCTTCTGGCCCTACACTCTGCCCTCAGGTTGATG  
 TTCACTTAATTGGTGACGAAATCAGCTGATTTGCTGCAGTATGCTTTGTGTGGTTCTTCCAGGCTTGTGCCAGCCATGAGCGCTT  
 TGAGAGCATGTTGTACCTATAAACTCGAGTAACGGCCACATAATTGTTCACTACTTGAATCACATACCTAATTTTGATAGAATTGA  
 CATGTTTAAAGAGCTGAGGTAGCTTTAATGCCTCTGAAAGTATTGTGACACAGCTTCTCACAGAGTGAGAATGAAAAAGTTGGACTC  
 CCCCTAATGAAGTAAAAGTTTCGTCTCTGAACGGTGAAGAGCATAGATCCGGCATCAACTACCTGGCTAGACTACGACGTCAATT  
 CTGCGGCTTTTGACCTTATAATATGTCATTAATGCAATAGATCTCTTGGCC  
 AATTTCCGAGATCAAAGTGGACGTTATAGCATCATAACTAAGTCAAGTTCGCTGAGGGGAAGCCGCTACTACCTTAGCCCATCCATC  
 CAGCTCCATACCTTGATACCTTAGACGTGAAGCAATCACACTGTACGTCCTCCGAGCTCTCTTCCCGCTCTTGGCTTCCCCACTGGG  
 GTCCATGGTGGTGTATCTGTCCTCTTAATTAAGGCCATTAAGGCCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA  
 GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGGAAGCTC  
 CCTCGTGCCTCTCCTGTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAG  
 CTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCTCAGCCCGACCGCT  
 GCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT  
 TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT  
 ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG  
 GTTTTTTGTGTGCAAGCAGCAGATFACCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCCTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT  
 CAGTGAACGAAAATCACGTTAAGGCTGCAGGCGCATTTGGTTCATGAGATTAACAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTT  
 AAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA  
 CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTCACTCATAGTTGCCGTGACTCCCGTCTGTGAGATAACTACGAACGCGGAGGGCTTACC  
 ATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGG  
 GCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCTCCAACAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGC  
 AGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACCGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGG  
 TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCTTCCGTTCCGATCGTTGTGACAGAA  
 GTAAGTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTG  
 TGACTGTTGAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGGCAUCGAGTTGCTCTTGCCTGGGCTCAATACGGGATAA  
 TACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCAAAAATCTCAAGGATCTTACCGCTG  
 TTGAGATCCAGTTCTGATGTAAACCACTCTGTCACCCAACTGATCTTACAGCATCTTTACTTTTACCACGCGTTTCTGGGTGAGCAA  
 AACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGCACCGGAAATGTGGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATAATTA  
 TGAAGCATTTATCAGGGTATTGTCTCATGGCCATTTAGGCCT (配列番号9)

10

20

30

【 0 2 8 8】

配列番号 10 = p T r e x 8 g M \_\_ T R I 0 3 2 発現コンストラクトのヌクレオチド配列。

【化 1 1 - 1】

CTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTGCATCTAAACTCCGAAGCTGCTGCCAACCCTGGAGAATC  
 GAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATAGCATGAAAGGCTATGAGAAATCTGAGACGGCTTGTGAATCATGG  
 CGTTCCATCTCTGACAAGCAAAGCGTCCGTCGCAGTAGCAGGCACTCAATCCCGAAAAAACCTGGAGATTCCCTAAGTAGCGAT  
 GGAACCGGAATAATAATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCCTGACGCTTGAATGCAGGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCC  
 GTACCCACCTCTCTCAACCTTTGGCGTTTTCCCTGATTACGCTACCCGTACAAGTCGTAATCACTATTAACCCAGACTGACCGG  
 ACGTGTTTGCCCTTCATTTGGAGAAAATAATGTCATTGCGATGTGTAATTTGCCTGCTTGACCGACTGGGGCTGTTCGAAGCCCGA  
 ATGTAGGATGTTATCCGAACCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGTCCGGCAGGACACGCTCGAAGGTTACGGCAA  
 GGGAAACCACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACTGTAAAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGAAAAATCAAACCAATGGCTAAAA  
 GTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCCTAATTTGCCAA  
 CGGCTTGTGGGGTTCGAGAAGCAACGGCAAAAGCCCACTTCCCGACGTTGTCTTCTCACCTCAGTCCAAATCTCAGCTGGTGTATCCC

40

50

【化 1 1 - 2】

CCAATTGGGTCCGTTGTTTGTCCGGTGAAGTGAAAGAAGACAGAGGTAAGAATGTCFGACTCGGAGCGTTTGCATACAACCAA  
 GGGCAGTGATGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGGTTTGT  
 CTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACTTCGATGAAGTGGTCCATAITGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCCAAAAGAT  
 TGAGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCCCTCGGGCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAATGCAAAGTGTG  
 GTAGGATCGAACACACICTGCTGCCITFACCAAGCAGCTGAGGGTATGTTGATAGGCCAAATGTTACGGGGCCACTGCATGGTTTCGAA  
 TAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCCTCATTAAACGGAATGAGCTAGTAGGCCAAAGTCAGCGAAT  
 GTGTATATATAAAGGTTTCGAGGTCCGTGCCCTCCCTCATGCTCTCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCCTCCAGGAGACTTGTACA  
 CCATCTTTTGAGGCACAGAAACCAATAGTCAACCATCACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCACCATGCAGACCCTTCGGTGC  
 TTTTCTGTTTCTTCCCTCGCCGCCAGGTAAGTTGGCTTGTATGAACCATATCATATATCGCCGAGAAAGTGGACCGCGTGTGTAGA  
 CTGAGACAGCGGCCCTGGCCGCGCCGGTGGACATGGTGGATCTTCAGGCCCTCGGCTGCGACAGCCAGCCGCCCTTTGTGAGCAGC  
 GAGAAGCTTCAGAGCTGTATCAAGAAGGAAGATCTCTCCCGCCAGCCAAAGGCTTCAGGACATTCGCCACTGCCACGGCCGGC  
 CACCAGCCCTTTGGAAGCTTCGGCCACAACGCCACCGTCGACTTTCCTACTACACCTCAAGGCCCTCGACTACTACAACGTCAC  
 CAAGCAGCCCTTCAAGGAAATCTTCAGCAGCGCCACCGCCAGCCCTACCCGTGGACGGCGAGGACATCGAGGCCGAGACTCTCAC  
 CTACACCCCCAGCGGCAGCGCCACCGACAAGCTGTCTGCTGCTGCGCAACGTCGGCTGCGACGCCGCCGATTACCTGCTGAG  
 GTCGCCGGCAACATTCGCTCATCAAGCGCGGCACGTGCACCTTCAGCCAGAAGTCCGTCAACGCCAAGGCCCTGGCCGCCGTG  
 CCGCATCATCTACAACAACCGCGAGGGCAAGCTCAGCGGAACCTTCGGCCAGCCCTTCTCGACTACGCTCCCCTCCCTGGCAT  
 CACCCTTGAGGCCGGCAGGCCCTCTCGCCAAGCTCGCTGGTGGCCCTGTCACCGCCACCCTCCAGATTGACGCCCTCGTCGAG  
 GAACCGCTACCTACAACGTCATTGCGGAGACTAAGGAAGGCCAGCCACAGCAACGTCCTCGTCTCGCGGCCACACCCGATAGC  
 GTCCCTGCTGGCCCTGGCATCAACGACGACGGCAGCGGCCACCACTCGGCACTGCTCACTGTCGCCAAGGCCCTCACCAAGTTCGCG  
 TCAAGAACGCCCTCCGCTTCGCGCTTCGGTCCGCGGAGGAATACGGCCCTCTCGGCCAGCTACCGCTACATCAAGAGCATCAACAG  
 CTCTGCCGCGGAGCTGAGCAAGATCCGCGCTACCTCAACTTCGACATGATCGCCAGCCCAAATACATCTACGGCATCTACGAC  
 GGGCAGGCCAACGCTTCAACCTCACTGGCCCTGCGGCAGCGACGTCATCGAGCGCAACTTCGAGAACTTCTCAAGCGCAAGC  
 ACACCCCTTCGGTCCCAACCGAGTTTACGGCCGATCTGACTACGCGCCCTTCACTCGAGAACGGCATCCCAAGCGGGGACTCTTC  
 ACTGGCCCGGAGGTCTCAAGACCGAGCGGAGGCTGAGCTGTTTGGCGGCGAGCTGGCGTCCGCTACGACGTCAACTACCACC  
 AGGCCGGGACACCGTCGACAACCTCGCCCTCGACGCTCTCTGCTCAACACCAAGGCCATTGCCGACAGCGTCCGCCACTACGC  
 CCTCAGCTTTGACGGCTCCCTTCGGCTCGACGGCAAGAAGCGACGTTGGGACGCTCACCGAGCCCGCATGCTCAAGCGAICTGCT  
 GGCTCTCAGGCCACGCCACCTTCACTCTGGCCCTTTGGCGGGGGAGCCAGCATTAAGACCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGT  
 GATCGGCCAGCTTCGTCGGAAGGCTGACGCAACCGGTAGATCTTTGGTGAACCCGTATCATGACGGCGGGGGAGCTACATGGC  
 CCCGGGTGATTTATTTTTTTGTATCTACTTCTGACCCTTTCAAATATACGGTCAACTCATCTTTCACTGGAGATGGCGCTGCTTG  
 GATTTGCGATGTTGTCAGCTTGGCAAATTTGGCTTTTCGAAAAACAAAAACAACATCCCGTTCATAACCCGTAGAATCGCCGCTCTCGGCTAGCTAG  
 ATAGAAGAAAGAGAAATTAATAAAAAAAAAAAAAACAACATCCCGTTCATAACCCGTAGAATCGCCGCTCTCGGCTAGCTAG  
 TTACGCTTGTATTTTACGACAAGATCTAGAAGATTTCAGATAGAATAATAATAATAACAACAATTTGCCCTCTCTTCCACCTTTT  
 CAGTCTTACTCTCCCTCTGACATTTGAACGCCCTCAATCAGTCAAGTCGCTTGTACTTGGACGGTAATCCTCCGTTCTTTGATATC  
 CTCAGGGGTAGCAAAGCCCTTCATGCCATCGATAATGTATCCAGAGTGAGGATGGCAAAGATGGGGATGCCGTACTCCTTCTC  
 AGCTCGCCAATGGCACTCGGTCCAGGCTTGGAGTCTGCGCATCCGACGGGGAGCTTCTCCATGGGTCAGGGCCACGACGA  
 TGCCGGCGACGATGCCGCCCTCCTTGGTGTCTTCTCAATGGCGTCCCTCTTGGCGGTGCCGGCGGTGATGACGTCGTGACAATC  
 AGGACCCCTCTTGCCTTIGAGCGAAGCGCGACGATGTTGCCGCCCTTCGCGTGGTCTTGGCCCTCTTGGCTCAAACGAGTAGG  
 AGACCGGTCCAGGTTCTGGGGGCCAGCTCGCCGAGCTTGTGTTGATGGCGGAGCACAGCGGGATGCCCTTGTAGGCCGGC  
 CGAAGACGATGTCGAACCTTAGGCCGGCTTCTCTTGGGCTCGATGATGGTCTTTGCAAAGGGCGAGGGGATGGCCGCCGGCAG  
 GCGCCCGTGTGGAAITCGCCCGCTTGAAGAAGTAGGGGATACTCGCTTGGACTTGGAGCTCGAAGCTTGCACAACTTGGAGGAGC  
 CCGCCGTGATGGCGAATTTGAGGAAGTCTGCTTGTAGGACAGGCTGGGAGGTTGGTAGCCATCTGTTGGATTGGATAGTGT  
 TCCITATCTCTGATTTGAACAGTAGATCAGGACGAGTGGAGGGATGCAGAGGTTGGAITGGAGTGGTTGAGCTATAAAATTTA  
 GAGGCGCGCCGATCGAGTTTTACATGGAAGTCAAAGCGTACAGTGGAGCTTGTACGTTGGTCTTAGTATCCCAACAGCTTCTG  
 TCTAGGTATGATGATGGCTATAAGTACCCAAAGGCAGAACTCATCTTGAAGAATGTTCTAGAGTGTATTTACCGCTGATGAAATGAC  
 TGGACTCCCTCCTCTGCTTTATACGAAAAATTCCTGACTCTGCAAAGGTTGTTTGTCTTGGAAAGATGATGTCCCCCCCATCGC  
 TCTTATCTCATACCCCGCACTTTCTAGATTTCTATCTTCAACAAGAGGGCAATCCATGATCTCGCATCCAGATGTCTTCTGCGC  
 CTCATACTCTGCCTCAGGTTGATGTTCACTTAATTTGGTGACGAATTCAGCTGATTTGTGTCAGTATGCTTTGTGTTGGTCTTCTC

10

20

30

40

50

【化 1 1 - 3】

AGGCTTGTGCCAGCCATGAGCGCTTTGAGAGCATGTTGTCACCTATAAACTCGAGTAACGGCCACATATTGTTCACTACTTGAATC  
ACATACCTAAATTTGATAGAAATTGACATGTTTAAAGAGCTGAGGTAGCTTTAATGCCCTCGAAGTATTTGTGACACAGCTTCTCACA  
GAGTGAGAAATGAAAAGTTGGACTCCCCCTAATGAAGTAAAAGTTTCGTCTCTGAAACGGTGAAGAGCATAGATCCGGCATCAACTA  
CCTGGCTAGACTACGACGTCAATTTCTGGGCCCTTTGACCTTTATATATGTCATTAAATGCAATAGATTCTTTTTTTTTTTTTTTTT  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAATTTCCGAGATCAAAGTGGACGTTATAGCATCATAACTAAGCTCAGTTGCTGAGGGAAG  
CCGTCTACTACCTTAGCCCATCCAGCTCCATACCTTTGATACTTAGACGTTGAAGCAATTCACACIGTACGTCTCGCAGCTCTC  
CTTCCCGCTCTTGCCTTCCCCACTGGGGTCCATGGTGGTGTATCGTCCCTCTTAATTAAGGCCATTTAGGCCGTTGCTGGCGTTT  
TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGA  
TACCAGGCGTTTCCCTCGTGGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCTTCCCGCTTACCGGATACTGTCCGCTTTCTCCCT  
TCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCGTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCA  
CGAACCCCGCTTACGCCCAGCGCTGGCCCTTATCCGGTAACTATCGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTATCGCCAC  
TGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGG  
CTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAITCCGGCA  
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTT  
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCAGCTTAAAGCCCTGCAGGGCCGATTTTGGTCAFGAGATTATCAA  
AAAGGATCTTACCITAGATCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAAGAGTAAACTTTGGTCTGACAGT  
TACCAAATGCTTAAATCAGTGGAGGACCTTATCTCAGCGATCTGCTTATTCTGTTTCCATCCATAGTTGCCITGACTCCCGTCTGTAGATA  
ACTACGATACGGGAGGGCTTACCACTTGGCCCGAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAG  
CAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTGAACCTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG  
GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTAAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAITGGTGGTGCACGCTCGTGT  
TTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCC  
TTCCGTTCTCCGATCGTTGTGAGAAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCCTCATGGTTATGGCAGCAGTGCATAAATCTCTTACTGTC  
ATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCAATTTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCCAGTTGCTC  
TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGGCCACATAGCAGAATTTAAAAGTGTCTATCATTTGGAAAAAGCTTCTCCGGGGCGA  
AAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACAGCATTTTTACTTTC  
ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC  
ATACTTCTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTATTGCTCATGGCCATTTAGGCCT (配列番号10)

10

20

【0 2 8 9】

配列番号 1 1 = p T r e x 8 g M \_ T R I 0 3 3 発現コンストラクトのヌクレオチド配列。

30

【化 1 2 - 1】

CTAGAGTGTGAAGTCGGTAAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCACTCTAAATACCTCCGAAGCTGCTGCGAACCCGGAGAACT  
GAGATGTGCTGGAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATAGCATGAAAGGCTATGAGAAATCTGGAGACGGCTTGTGAATCATGG  
CGTTCCATCTTTCGACAAGCAAAGCGTCCGTCGCAGTAGCAGGCACTCATTCCCGAAAAAACTCGGAGATCTCTAAGTAGCGAT  
GGAAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTTGAGTTGCCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCC  
GTACCCCACTCTTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTCAGCGTACCCGTAACAAGTCGTAATCACTATTAACCCAGACTGACCGG  
ACGTGTTTTGCCCTTCAATTTGGAGAAAATATGTCATTGCGATGTGTAATTTGCCCTGCTTGACCGACTGGGGCTGTTGGAAGCCCGA  
ATGTAGGATTTGTATCCGAACCTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAAATCTGTGTGCGGGCAGGACACGCTCGAAGGTTACAGGCAA  
GGGAAACCACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAATGCAGCACTCACTGGAAAAATACAAACCAATGGCTAAAA  
GTACATAAGTTAATGCCATAAAGAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAA  
CGGCTTGTGGGGTTCGAGAAGCAAACGGCAAAGCCACCTTCCCCACGTTTGTTCCTCAGTCCAAATCTCAGCTGGTGTATCCC  
CCAATTTGGGTGCTTTGTTTCCGGTGAAGTGAAGAAGACAGAGGTAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTTGCATACAACCAA  
GGGCAGTGAATGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGTATTTAGCCAGGGAATGCTTGTAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGT  
CTGCCGATACGCAATACTGTATAGTCACTTCTGATGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCCGCACTGAAACAGGCAAAAAGAT  
TGAGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCTTCCGGCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAGTGTG

40

50



【化 1 2 - 3】

TATAGCATCATAACTAAGCTCAGTTGCTGAGGGAAGCCGCTACTACCTTAGCCCATCCATCCAGCTCCATAACCTTGATACTTATAG  
 ACGTGAAGCAATTCACACTGTACGTCTCGCAGCTCTCCTTCCCCTCTTGCTTCCCCTGAGGGTCCATGGTGGTGTATCGTCCCC  
 TCCTTAATTAAGGCCATTTAGGCCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAA  
 GTACAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTGGCGCTCTCCTGTTCCGAC  
 CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC  
 GGTGTAGGTTCGTTCCGCTCCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCTGTTACGCCGACCGCTGGCGCTTATCCGGTAACATCGTTC  
 TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCG  
 GTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGGCGCTCTGTGAAGCCAGTT  
 ACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGA  
 TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTA  
 AGGCCITGCAGGGCCGATTTTGGTTCATGAGATTAATCAAAAAGGATCTTACCTTAGATCCTTTTAAATFAAAAATGAAGTTTTAAATC  
 AATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTC  
 GTTCATCCATAGTTGCCGTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA  
 CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTTGCA  
 ACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTAATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGT  
 TGCCATTTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA  
 CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGCAAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCA  
 CTCATGGTTATGGCAGCAGTGCATAATTCCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAA  
 GTCATTTCTGAGAAATAGTGTATGCGGGCAGCCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA  
 TTTAAAAGTGTCTATCATTGGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAACC  
 CACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCA  
 AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTG  
 TCTCATGGCCATTTAGGCCCT (配列番号11)

10

20

【0 2 9 0】

配列番号 1 2 = p T r e x 8 g M \_ T R I 0 3 4 発現コンストラクトのヌクレオチド配列。

【化 1 3 - 1】

CTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGAACCCGGAGAATC  
 GAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAGAAATCTGGAGACGGCTTGTGAAATCATGG  
 CGTTCCATTCTTCGACAAGCAAAGCGTTCCGTCGCAGTAGCAGGCACTCATTCCCGAAAAAACTCGGAGATTCCTAAGTAGCGAT  
 GGAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCCTGACGGTTGCAATGCAAGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCC  
 GTACCCCACTCTTCTCAACCTTGGCGTTTCCCTGATTCAGCGTACCCGTACAAGTCGTAAATCACTATTAACCCAGACTGACCGG  
 ACGTGTTTTCCCTTTCATTTGGAGAAATAATGTCATTGGCATGTGTAATTTGCCCTGCTTGACCGACITGGGGCTGTCGAAGCCCGA  
 ATGTAGGATTGTTATCCGAACCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGTCCGGCAGGACACGCTCGAAGGTTACCGGCAA  
 GGGAAACCCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAATGCAGCATCACITGGAAAAATACAAACCAATGGCTAAAA  
 GTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAA  
 CGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCCACTTCCCCACGTTTGTCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGTATCCC  
 CCAATTTGGGTCGCTTGTGTTCCGGTGAAGTGAAAGAACAGAGGTAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTTGCATACAACCAA  
 GGGCAGTGAAGGACAGTGAATGTTGACATTCAAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGTGATCGTGTGTAAGGAGGTTTTGT  
 CTGCCGATACGACGAACTACTGTATAGTCACTTCTGATGAAGTGGTCCAATAITGAAATGTAAGTCCGGCACTGAACAGGCAAAAAGAT  
 TGAGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCTTCCGGCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAITGCAAAGTGTG  
 GTAGGATCGAACACACTGCTGCCTTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAAAATGTTCAAGGGCCACTGCATGGTTTCGAA  
 TAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCTTCATTAACCGGAATGAGCTAGTAGGCAAAAGTACGCGAAT  
 GTGTATAATAAAGGTTTCGAGGTTCCGTGCTTCCCTCATGCTCTCCCATCTACTCATCAACTCAGATCTCCAGGAGACTTGTACAC  
 CCATCTTTTGGGACACAGAAACCCCAATAGTCAACCATCACAAAGTTGTACAAAAAGCAGGCTTACCATGCAGACCTTCGGTGC

30

40

50

【化 1 3 - 2】

TTTCTCGTTTCCCTCCFCGCCGCCAGGTAAGTGGCCCTTGATGAACCAFAICATAFATCGCCGAGAAGTGGACCGCGTGCJGAGA  
 CTGAGACAGCGGCCTGGCCCGGGCCCTCCAGATTCTCTCAACCTCCAGGTCCCAAGCTCAGCTGGAACCTCTTCGGCGACGAC  
 CTCCCCCTGGTCGACACCAAGGAACCTCCAGAAGTCCATCAAGCCCGAGAACCTTGAGGCCGAGCCAAGGACCTCTACGAGATCG  
 CCAAGAACGGCGAGGAAGAGTACGGCCACCCACCCCGCTCAITGGCTCTGAGGGCCACCTCGGCACCCCTCAGCTACATCCACGC  
 CGAGCTGGCTAAGCTCGCGGGCTACTACAGCGTACAGCAACCAGCAGTTCCTCCCGCTCAGCGGCAACGCTCTTGAGAGCCGCCTC  
 GTCATCGCGCAGAGCTCCCTAAGCAGGCCAGCCCTATGGCCCTCACCCCCCAACAAGAACAGGAACCCGTCACGGCACCC  
 TCGTCTCTGTCGACAACGAGGGCTGCGACGCCAGCGACTACCCCGAGGGTGTCAAGGGCAACATTGCCCTCATCTCCCGGGCAC  
 GTGCCCTTCGGCACCAAGTCTGGCAACGCCGGCAAGGCTGGCGCGTCTGCTGTCTCAACTACGAGAAGGACGAGGTC  
 CACGGCACGCTGGGCACCCCTAGCCCTGATCAGCTCGCCACCTTTGGCCCTCGCGGGCAAGAGGGCAAGGCCGTCGCAAGAAG  
 CTCAAGGACGGCGAAGAGGTCGACGCCATTGCCATATTGACGCCGAGGTCAGACCATCAGCACCAACATCATTGCCAG  
 ACCCGAGGGCGGCAACCCGACAACCTGCGTTATGCTTGGCGGCCACAGCGCAGCGCTGCTGAGGGCCCTGGCATCAACGACGAT  
 GGCAGCGCACGATCAGCGTCTTGAGGTCGCCGTCACGCTACCAAGTACCGCTCAACAACCTGCTCGCTTCGCTGTGGTGG  
 CCGCTGAGGAAGAGGGCCCTCTTGGCAGCGACCACTACGTCAGCGTCTCTCCCGAGGACGAGAACCAGCAAGATCCGCTCTTCAT  
 GGACTACGACAIGATGGCCAGCCCAACTTCGGCTACCAGATCTACAACGCCCAACCGCCGAGAACCCCAAGGGCAGCGAGGA  
 ACTCGCGACCTCTACGTCACCTGGTACGAGGAACAGGGCTCAACTACACTTCTATTCCCTTCGACGGCCGCGAGCGACTACGAC  
 GGTCTTATCCGAGGGCCGATCCCGCTGGCGGCAITGCTACTGGCGCTGAGGGGCTCAAGACCGGACGAGGTCGAGATGTTCCG  
 GCGCGGAGGCCGGCTCTGGTACGACAAGAACTACCACAGATITGGCGACGACCTGACCAACGTCAACTACACCGCTTGGGAGG  
 TCAACACCAAGCTGATCGCCACAGCGTTCGCCACCTACGCCAAGAGCTTCAAGGGCTTCCTCCGAGCGGAGATCGAGACTAGCGT  
 CCAGACCTACAGCGACAAGACCAAGTACCACGGCAGCAAGCTGTCTACTAAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGTATCGCG  
 CCAGCTCCGTGCGAAAGCTGACGCACCCGGTAGATTCTTGGTGTAGCCGATCATGACGGCGGGGGAGCTACATGGCCCGGGT  
 GATTTATTTTTTTGTATCTACTTCTGACCCCTTTCAAATATACGGTCAACTCATCTTCACTGGAGATGCGGCCCTGCTTGGTATTGC  
 GATGTTGTGAGCTTGGCAAATTGTGGCTTTCGAAAACACAAAACGATTCTTAGTAGCCATGCATTTTAAAGATAACGGAATAGAA  
 GAAAGAGGAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAACATCCCGTTCATAACCCGTAGAAATCGCCGCTCTTCGGCTAGCTAGTTACGC  
 TTGTTTTATTACGACAAGATCTAGAAGATTTCGAGATAGAATAATAATAACAACAATTTGCCTCTTCTTCCACCTTTCCAGTCT  
 TACTCTCCCTCTGACATTGAACGCCCTCAATCAGTCAGTCGCCCTGTACTTGGCACGGTAATCTCCGCTGTCTTGATATCTCAGG  
 GGTAGCAAAGCCCTTCAIGCCATCGATAATGTCATCCAGAGTGGGATGGCAAAGATGGGGATGCGGTACTTCTTCTCAGCTCG  
 CCAATGGCACTCGGTCCAGGCTTGGAGTCTGTCGCCATCCGAGCGGGGAGCTTCTCCATGCGGTCCAGGGCCACGACGATGCCGG  
 CGACGATGCGCCCTCTTGGTGTATCTCTCAATGGCGTCCCTTTGGCGGTGCCGGCGTGTATGACGTCGTCGACAACTCAGGACC  
 CTCTTGGCCCTTGAGCGAAGCGCCGACGATGTTGCCGCCCTCGCCGTGGTCTTGGCCCTCTTGGCGTCAAACGAGTAGGAGACGC  
 GGJCCAGGTCTCGGGGGCCAGCTCGCCGAGCTTGTATGGTGTATGGCGGAGCACAGCGGGAAGCCCTTGTAGGCCGGGCGAAGA  
 CGATGTCGAACTTAGGCCGGCTTCTCTCTGGCCCTGATGATGGTCTTGTCAAAGGGCGGAGGCGATGGCCCGGGCAGGGCGCGC  
 CGTGTGGAATTCCGCCCGCTTGAAGAAGTAGGGGGATATCCGCTTGGACTTGAGCTCGAAGCTGCCAAACTTAGGACCGCCGCCG  
 TCGATGGCGGATTTGAGGAAGTCTGCTTGTAGGCAGGCAGCTGGGAGGTGGTAGCCATTCTGTTGGATTTGGATAGTGTCTTAT  
 TCTCTGATTTGAACAGTAGATCAGGACGAGTGTAGAGGGATGACAGAGGTTGGATTGGAGTGGTTGAGCTATAAAATTTAGAGGGCG  
 GCCGTATCGAGTTTTACATGGAAGTCAAAGCGTACAGTGGCAGCTTGTACGTTGGTCTTAGTATCCACAAAGCTTCTGTCTAGGT  
 ATGATGATGGCTATAAGTCAACCAAGGCAGAACTCATCTGAAGATTGTCTAGAGTGATTTTACCCTGATGAAATGACTGGA  
 CCTTCTCTCTGCTCTTATACGAAAAATGCCTGACTCTGCAAAGGTTGTITGCTTGGAAAGATGATGTGCCCCCACTCGCTCTTAT  
 CTCATACCCCGCACTCTTCTAGATCTCTATCTTCAACAAGAGGGCAATCCAATGATCTGCGATCCAGATGTCTTGGCCCTCAT  
 ACTTGCCTTCAGGTTGATGTFCACTTAAITGGTGGACAAITCAGCTGATTTGCTGCAATATGCTTGTGTTGGTCTTCTCCAGGCT  
 TGTGCCAGCCATGAGCGCTTGTAGAGCAFGTGTGACCTATAAATCGAGTAAACGGCCACATAITGTTCACTACTTGAATCACATA  
 CCTAATTTGATAGAAITGACATGTTTAAAGAGCTGAGGTAGCTTAAATGCCTCTGAAGTATGTGACACAGCTTCTCACAGAGTG  
 AGAATGAAAAGTTGGACTCCCTTAATGAAGTAAAAGTTCGCTCTTGAACGGTGAAGAGCATAGATCCGGCATCAACTACCITGG  
 CTAGACTACGACGTCAAITCTCGCGCCCTTTGACCTTATATATGTCCATTAATGCAATAGATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAATTTGCGAGATCAAAGTGGACGTTATAGCATCAACTAAGCTCAGTTGCTGAGGGAAGCCGCT  
 ACTACCTTAGCCCATCCATCCAGCTCCATACCTTGATACTTJTAGACGTGAAGCAATTCACACTGTACGCTCTCGCAGCTCTCCTTCCC  
 GCTCTTGTCTCCCACTGGGGTCCATGGTGCCTGTATGCTCCCTCTTAATTAAGGCCATTTAGGCCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT  
 AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTACAGGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAAG

10

20

30

40

50

【化 1 3 - 3】

CGGTTTCCCCGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCGACCCGCGCTTACCGGATACCTGTCGCCCCTTCTCCCTCGGGA  
 AGCGTGGCGCTTCTCATAGCTACCGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGTCCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC  
 CCCCCTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG  
 CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
 TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTATCCGGCAACAA  
 ACCACCGTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTTGAAGCAGCAGATTACCGCGAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT  
 TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGCCTGCAGGGCCGATTITGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA  
 TCTTACCTTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAAGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA  
 TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG  
 ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAA  
 ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTATTCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTGTCCGGGAAGC  
 TAGAGTAAAGTAGTTCGCCAGTAAATAGTTTGGCAACGTTGTGTCCATGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTGGTA  
 TGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCACACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGT  
 CCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTCATGCC  
 ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATCGCGGACCGAGTTGCTCTTGCC  
 CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACT  
 CTCAAGGATCTTACCCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAG  
 CGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACT  
 CTTCCTTTTCAATATTAATGAAGCAATTAATCAGGGTATTGTTCTCATGGCCATTTAGGCCT (配列番号12)

10

20

【 0 2 9 1】

配列番号 1 3 = p T r e x 8 g M \_ T R I 0 3 5 発現コンストラクトのヌクレオチド配列。

【化 1 4 - 1】

CTAGAGTGTGAAGTGGTAAATCCCGTGTATAGFAATACGAGTTCGCATCFAAATACFCCGAAGCTGCTGCGAAACCCGGAGAACT  
 GAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATAGCATGAAAGGCTATGAGAAATCTGGAGACGGCTTGTGAATCATGG  
 CGTTCCTATTCTTCGACAAGCAAAGCGTCCGTCGCACTAGCAGGCACCTCATTTCCCGAAAAAAGCTCGGAGATTCTTAAGTAGCGAT  
 GGAACCCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCC  
 GTACCCCACTCTTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTCAGCGTACCCGTACAAGTCGTAATCACTATTAACCCAGACTGACCGG  
 ACGTGTTTTGCCTTCAATTTGGAGAAATAATGTCAATGGCATGTGTAAATTTGCCTGCTTGACCGACTGGGGCTGTTGGAAGCCCGA  
 ATGTAGGATTGTTATCCGAACTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGTGCGGGCAGGACACGCTCGAAGGTTACGGCAA  
 GGGAAACCACCGAATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGAAAAATACAAACCAATGGCTAAAA  
 GFACATAGGTTAATGCCTAAAGAAGTCAJAJACCAGCGGCTAATAATITGJACAATCAAGTGGCTAAACGTAACCGTAAATTTGCCAA  
 CGGCTTGTGGGGTTCGAGAAGCAACGGCAAAGCCCACTTCCCAAGTTTGTTCCTTCACTCAGTCCAACTCAGCTGGTGAATCCC  
 CCAATTTGGTTCGCTTGTTTGTTCCGGTGAAGTGAAGAAGACAGAGGTAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTTGCATACAACCAA  
 GGGCAGTGAATGGAAGACAGTGAATGTTGACATCAAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCTGTGTAAGGAGGTTGTG  
 CTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACTTCTGATGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCCGCACTGAACAGGCAAAAGAT  
 TGAGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAAGTGTG  
 GTAGGATCGAACACACTGCTGCCCTTACCAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAAAATGTTACGGGGCCACTGCAITGGTTTCGAA  
 TAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTAACCGGAATGAGCTAGTAGGCAAAAGTCAGCGAAT  
 GTGTATATAATAAGGTTTCGAGGTCCGTGCTTCCCTCATGCTCTCCCACTTACTCATCAACTCAGATCTCCAGGAGACTTGTACA  
 CCATCTTTTGGGACAGAAACCCAATAGTCAACCATCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACCATGACAGACTTCCGTGCTG  
 TTTCTCGTTCCTTCGCGCCAGGTAAGTTGGCCITJGATGAACCAATATCATATATCGCCGAGAAGTGGACCGCGTGTGAGA  
 CTGAGACAGCGGCTGGCCGCGGCAACGCTCTGGTGGACCTGGTGGTCACGGCCGCAAGCTCCCGTCAACCCCAAGACCTTC  
 CCCAACGAGATCCGCTCAAGGACCTCTCCACGGCAGCCAGAAGCTCGAAGATTTCCGCTACGCTTACCCCGAGCGCAACCCGCG  
 TCTTTGGCGGCCAGGCCACCTCGACACCGTCAACTACCTTACCAGGCTGAAGAAGACCGGCTACTACGACGCTTACAAGCA  
 GCCCCAGGTGCACAGTGGACCCGAGCCGACAGTCTCTCACTCTCGGGCGGACAGCATCCAGGCCAGCACCATGACCTACAGC  
 CCCAGCGTCAACGTCACCGCCCTCTCAGCCTCGTCAGCAAGCTCGGCTCGCCGAGGGCGACTACAGCGCCGATGTCAAGGGCA

30

40

50

【化 1 4 - 2】

AGATCGCCCTCGTCAGCCGAGGCGAGTGCAGCTTCGCCAGAAAGTCCGTCCTCAGCGCCAAGGCTGGCGCCGTCGCCACCATCGT  
CTACAACAACGTCGACGGCAGCCTCGCCGGCACCCCTTGGCGGAGCTACTTCTGAGCTGGGCCCTACTCCCCCAATCATCGGCATC  
ACTCTCGCCGCTGGCCAGGACCTCGTCGCCCGACTTCAGGCCGCTCCTACCAGGTCAGCCTCTGGATCGACAGCAAGGTCGAGA  
ACCCACCACCTACAACGTCATTGCCAGACCAAGGGCGGGACCCCAACAACGTCGTCGCTCTGGCGGGCCACCCGACAGCGT  
TGAGAACGGCCCTGGCATCAACGACGACGGCTCCGGCGTCATCAGCAACCTCGTCGTCGCCAAGGCCCTCACCCGCTACAGCGTC  
AAGAACGCCGTCGCTTCTGCTTCTGGACCCGGAAGAGTTGGCCCTCCTCGGCAGCAACTACTACGTCGACAACCTCAGCCCTG  
CCGAGCTGGCCAAGATCCGCTCTACCTCAACTTCGACATGATCGCCAGCCCCAACTACGCCCTCATGATCTACGACGGCGACGG  
CAGCGCTTCAACTCACTGGACCCCTGGCAGCGCCAGATCGAGAGCCTCTTCGAGAACTACTACAAGAGCATCAAGCAGGGC  
TTCGTCGCCACCGCTTCGACGGCCGATCTGACTACGAGGGCTTCACTCTCAAGGGCATCCCCGCTGGCGGGCTCTTACTGGCGC  
CGAGAGCCTCAAGACCGAGGAACAGGCCCGCTTTCGGCGGCCAGGCTGGCGTTGCTCTCGACGCCAACTACCACGCAAGGG  
CGACAACATGACCAACCTCAACCACAAGGCCCTTCTCATCAACAGCCGCGCCACGGCTTTCGCCGTCGCTACTACGCCAACAAC  
CTCAGCAGCATCCCCCTCGCAACGCCACCGTCGTCAGCGCGAGAGCATGAAGTGGACCAAGCGCGAGGAACCCACACCCAC  
GGCGCGGACACTGGCTGCTTTCAGCCGCGCTCAAGGAGTAAGACCCAGCTTCTTTGTACAAAGTGGTGATCGCGCCAGCTCCGT  
GCGAAAGCCTGACGCACCGGTAGATTCTTGGTGAGCCGATCATGACGGCGGGGAGCTACATGGCCCCGGTGATTTATTTT  
TTTTGTATCTACTTCTGACCTTTTCAAATATACGGTCAACTCATCTTCTACTGGAGATGCGGCCGCTGGTATTGCGATGTGTG  
AGCTTGGCAAATTTGGCTTTCGAAAACACAAAACGATTCCCTTAGTAGCCATGCATTTAAGATAACGGAATAGAAGAAAGAGGA  
AATTAATAAAAAAAAAAAAAACAAACATCCCGTTCATAACCCGTAGAATCGCCGCTCTTCGGCTAGCTAGTTACGCTTGTATTATA  
CGACAAGATCTAGAAGATTCGAGATAGAATAATAATAAACAACAATTTGCCTCTTCTTCCACCTTTTCAGTCTTACTCTCCCTT  
CTGACATGGAACGCTCAATCAGTCAGTCGCTTGTACTTGGCACGGTAACTCTCCGTTCTTTGATATCCTCAGGGGTAGCAAAG  
CCCTTCATGCCATCGATAATGTCATCCAGAGTGAGGATGGCAAAGATGGGGATGCCGTACTCCTTCCTCAGCTCGCAAATGGCAC  
TCGGTCCAGGCTTGGAGTCGTCGCCATCCGCAGCGGGGAGCTTCTCCATGCGGTCCAGGGCCACGACGATCGCGCGACGATGCC  
GCCCTCCTTGGTGATCTTCTCAATGGCGTCCCTCTTGGCGGTGCCGGCGGTGATGACGTCGTCGACAATCAGGACCCCTTTGCCCT  
TGAGCGAAGCGCCGACGATGTTCGCCCTCGCCGTTGGCTTCTTGGCGTCAAACGAGTAGGAGACCGGGTCCAGGTT  
CTGGGGCGCCAGCTCGCCGAGCTTGATGGTGATGGCGGAGCACAGCGGGATGCCCTTGATAGGCCGGGCGAAGACGATGTCGAA  
CTTAGGCCCGCCCTTCTCTGGCCCTCGATGATGGTCTTTGCAAAGGCGGAGGCGATGGCGCCGGCGAGGCGCGCCGTGTGGAAT  
TCGCCCGCGTTGAAGAAGTAGGGGGATATCCGCTTGGACTTGGCTCGAAGCTGCCAAACTTGAGGACGCCCGCGTCGATGGCGG  
ATTTGAGGAAGTCTGCTTGTAGGCAGGACGCTGGGAGGTTGAGCCATCTGTTGGATTGGATAGTGCTTATTCTCTGATT  
GAACAGTAGATCAGGACGAGTGAGAGGGATGCAGAGGTGGATGGAGTGGTGGAGCTATAAAATTTAGAGGCCCGCCGATCG  
AGTTTTACATGGAAGTCAAAGCGTACAGTCCGAGCTGTACGTTGGTCTTAGTATCCACAAGCTTGTCTAGGTATGATGATG  
GCTATAAGTCACCCAAGGCAGAACCTATCTGAAGAATGTCTAGAGTGAATTTACCCTGATGAAATGACTGGACTCCCTCTCTCT  
GCTTTATACGAAAATTCCTGACTCTGCAAAAGTTGTTGCTTGGAAAGATGATGTCCCCCATCGCTTTATCTCATACCC  
GCCATCTTCTAGATTCTCATCTTCAAACAAGAGGGGAATCCATGATCTGCCATCCAGATGTGCTTCTGGCCATAACTCGCTTC  
AGGTTGATGTTCACTTAATGGTGACGAAATCAGCTGATTGCTGCAGTATGCTTTGTGTTGGTTCTTCCAGGCTTGTGCCAGCCA  
TGAGCGCTTGAGAGCATGTTGTCACCTATAAACTCGAGTAACGGCCACATATTGTTCACTACTTGAATCACATACCTAATTTGA  
TAGAATTGACATGTTTAAAGAGCTGAGGTAGCTTTAATGCCTTGAAGTATTTGTGACACAGCTTCTCACAGAGTGAGAATGAAAA  
GTTGGACTCCCCCTAATGAAGTAAAGTTTCGTCTCTGAACGGTGAAGAGCATAGATCCGGCATCAACTACCTGGCTAGACTACG  
ACGTCAAATTCGCGCCCTTTGACCTTTATATATGTCCTAATTAAGCAATFAGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
TTTTTTGCCAAATTCGAGATCAAAGTGGACGTTATAGCATCAACTAAGCTCAGTTGCTGAGGGAAGCCGCTACTACCTAG  
CCCATCCATCCAGCTCCATACCTTGATACCTTAGACGTTGAAGCAATTCACACTGACGTCCTCGCAGCTCTCCCTCCCGCTCTGCT  
CCCCACTGGGGTCCATGGTGGCTGATCGTCCCTCTTAAATTAAGCCATTTAGGCCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCC  
CCCCGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC  
CTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTCTGTTCCGACCCGCGCTTACCGGATACCCTGCTCCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCTGGCGC  
TTTCTCATAGCTCACGCTGATGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTCAG  
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG  
GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCCGTTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGA  
CAGTATTTGGTATCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACTTCCGAAAAAGAGTTGGTACGCTTGTATCCGGCAAACAACCACCGCT  
GGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGG

10

20

30

40

50

【化 1 4 - 3】

GTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGCCTGCAGGGCCGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT  
 AGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC  
 AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCCATAGTTGGCTGACTCCCCGTGTTGATAGATAACTACGATACGGGA  
 GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCAGCCA  
 GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTTCCTGCAACTTTAATCCGCCCTCCATCCAGTCTAATTAATTGTTGGCCGGGAAGCTAGAGTAA  
 GTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAT  
 TCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGGCAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATC  
 GTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTATGGCAGCACTGCATAATTCCTTACTGTCATGCCATCCGTAAG  
 ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCCGAGTTGCTTTCGCCGGCGTCAA  
 TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAAGTGTCTAATTCATTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTTCFAAGGAT  
 CTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCCATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGG  
 GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTT  
 TCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTAATGTCTCATGGCCATTTAGGCCCT (配列番号13)

10

【 0 2 9 2】

配列番号 1 4 = p T r e x 8 g M \_ T R I 0 3 6 発現コンストラクトのヌクレオチド配列。

【化 1 5 - 1】

CTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCCGATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGAACCCGGAGAATC  
 GAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAAATAGCATGAAAGGCTATGAGAAATTCGGAGACGGCTTGTGAATCATGG  
 CGTTCCATTTCTCGACAAGCAAAGCGTTCGGTCCGAGTAGCAGGCACCTCATTTCCCGAAAAAACTCGGAGATTCTTAAGTAGCGAT  
 GGAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGGTAAGTACTGAGCTTGGACATAACTGTCC  
 GTACCCACCCTCTTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTCAGCGTACCCGTAACAAGTCGTAATCACTATTAAACCCAGACTGACCGG  
 ACGTGTTTTGGCCTTCATTTGGAGAAATAATGTCAATGGCATGTGTAATTTGCCCTGCTTGACCGACTGGGGCTGTTGGAAGCCCGA  
 ATGTAGGAATGTATCCGAACCTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGTGCGGGCAGGACACGCCTCGAAGGTTACCGGCAA  
 GGGAAACCACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAGGCGCAAATGCAGCATCACTGGAAAAATACAAACCAATGGCTAAAA  
 GTACATAAGTAAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCCTAATTTGCCAA  
 CGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCCACTTCCCCACGTTTGTCTTCTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCC  
 CCAAATGGGTGCGTGTGTTGTTCGGTGAAGTGAAGAAGACAGAGGTAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTGTGCAATACAACCAA  
 GGGCAGTGATGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGGTTTGT  
 CTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACTTCTGATGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCCGGCACTGAACAGGCAAAAGAT  
 TGAGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAATGCAAAGTGTG  
 GTAGGATCGAACACACTGCTGCCCTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAAAATGTTGAGGGGCCACTGCATGGTTTCGAA  
 TAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCCTCATFAAACGGAAATGAGCTAGTAGGCAAAGTACGCGAAT  
 GTGTATATATAAAGTTTCGAGGTCCGTGCTCCTCATGCTCTCCCATCTACTCATCAACTCAGATCTCCAGGAGACTTGTACA  
 CCAATCTTTTGGAGGCACAGAAACCCAATAGTCAACCATCACAAAGTGTGTACAAAAAGCAGGCTTACCATGCAGACCTTCGGTGC  
 TTTTCTCGTTTCTTCTCCTCGCCGCCAGGTAAGTTGGCCTTGATGAACCATATCATATATCGCCGAGAAGTGGACCGCGTGTGAGA  
 CTGAGACAGCGGCCTGGCCGCGCGGCGGTGGCCCTCATGGATTTGGCTCCCCAAGATCGACCTCCGCCCTATGGTCAAGCAGCAAC  
 CGCTCCAGAGCATGATCACCTCAAGGACCTCATGGACGGCGCCAAAGCTCCAGGACATTTGCCACCAAGAACGGCGGCAAC  
 CGCGCCTTTGGCGGCGCTGGCCACAACGCCACTGTGACTACCTTACAAGACCCCTCACCAGCTCGGGCGGCTACTACACCGTCA  
 AGAAGCAGCCCTTCAAGGAAATCTTACGAGCGGCAGCGGCAGCCTCATCGTGCAGCGCCAGGGCATCGACGCCGGCATCATGA  
 CCTATACCCCTGGCGGCAGCGCCACCGCCAACTCGTCCAGGTTGCTAACCTCGGCTGCGAGGACGAGGACTACCTGCCGAGGT  
 CGCCGGCAACATTGGCCTCATTAGCCGCGCAGCTGCACCTTACGAGCAAGAGCCTCAAGGCCAAGGCGCTGGCGCGCTCGGC  
 GCTATCGTCTACAACAACGTTCCCGGCGAGCTGAGCGGAAACCTCGGCAACCCCTTTCTGACTACGCCCCATCGTCCGGCATCAG  
 CCAAGAGGACGGCCAGGTCATCCTTGAGAAGCTCGCCGCTGGCCCGTACCGCCACCTCAACATCGACGCCATCGTCGAGGAA  
 CGCACCACCTACAACGTCATTTGCCGAGACTAAGGAAGGCGACCACAACAACGTCATTTGTGGCGGCCACAGCGACAGCGTT

20

30

40

50

【化 1 5 - 2】

GCTGCCGGCCCTGGCA1CAACGACGACGGCTCTGGCACCATCCGGCATCCACCCGTCGCCAAGGCCCTCGCCAAGGCCAACGTC  
 GCATCAAGAACGCCGTCCGCTTTCGCCCTTCTGGTCCGCCGAAGAGTTCCGGCTCCTCGGCAGCTACGCCATACATGAAGTCCCTCAAC  
 GAGAGCGAGGCCGAGG1GGCCAAGA1CCGCCCTFACCTCAACTTCGACATGATCGCCAGCCCAACTACATCTACGGCATCTACG  
 ACGCGACGGCAACGCCITCAACCTCACTGGCCCTGCCGGCAGCGACATCA1CGAGAAGGACTTCGAGGACTTCTCAAGAAGAA  
 GAAGACCCCGAGCTCCCAACCGAGTTAGCGGCCGATCTGACTACGCCCTTCA1CGAGAAGGACTTCGCCAGCGGGGACTC  
 TTCACTGGCGCCGAGGTCCTCAAGACCGAGGAAGAGGCCAAGCTGTTCGGCGGCAAGGCCGGCTCGCCACGACGTCACCTAC  
 CACAAGGCCGGGACACCGTCGACAACTCGCCAAGGACGCCCTTCTGCTCAACACCAAGGCCAATTGCCAACAGCGTCGCCAAGT  
 ACGCCGCCAGCTGGGCCGGCTTCTTAAGCCCTTTCGCCGTCCGCCGACGCTACGACGCCGATA1GGCCAGCTCCTCAAGCGCTCT  
 GGCGGCTTCA1GGCCACGCCCTCACACTCATAGCGGCCCTTGTGGCGGGTGA1CTCCTTAAGACCCAGCTTCTTTGTACAA  
 AGTGGTGATCGCCAGCTCCGTGCGAAAGCC1GACGCACCCGGTAGATTCTTGGTGAGCCCGTATCATGACGGCGGGGAGCTA  
 CATGGCCCCGGGTGATTTATTTTTTTTGTATCTACTTCGACCCTTTTCAAATAACGGTCAACTCATCTTCACTGGAGATGGCC  
 CTGCTTGGTATTGCGATGTTGTCAGCTTGGCAAATGTGGCTTCGAAAACACAAAACGATTCCTTAGTAGCCATGCATTTAAGA  
 TAACGGAATAGAAGAAAGAGGAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAACATCCCGTTCATAACCCGTAGAATCGCCGCTCTTCGGC  
 TAGCTAGTTACGCTTGTATTATTAACGACAAGATCTAGAAGA1TCGAGATAGAATAAATAAFAATAACAACAAATTTGCCCTCTCTTC  
 CACTTTTCAGTCTTACTCTCCCTTCGACAT1TGAACGCC1CAATACGTCAGTGGCTTGTACTTGGCACGGTAA1CTCCGTTCTC  
 TTGATA1CTCAGGGGTAGCAACGCC1TCATGCCATCGATAA1GT1CATCCAGAG1GAGGATGGCAAAGATGGGGATGGCGTACT  
 CTCTCCAGCTCGCCAATGGCACTCGGTCCAGGCT1GGAGTCGTCCCATCCGCACGCGGGGAGCTTCTCCATGGCGTCCAGGGCC  
 ACGACGATGCCGGCGACGATGCCGCCCTCC1TGGTGATCTTCTCAATGGCGTCCCTCTTGGCGGTGCCGGCGGTGATGACGTCGTC  
 GACAATCAGACCCCTCTTGGCTT1GAGCGAAGCGCCGACGATGTTGCCGCCCTCGCCGTGGTCTTGGCTCCTTGGGTTCAAACG  
 AGTAGGAGACGCGGTCAGGTTCTGGGGCGCCAGCTCGCCGAGCTT1GATGGTGATGGCGGAGCACAGCGGGATGCCCTTGTAGG  
 CCGGCCGAAGACGATGTCGAACCTTAGGCCGGCTTCTCCTGGGCTCGATGATGGTCTTTGCAAAGCGGGAGGCGATGGCGCC  
 GCGAGGCGCGCCGTGGAATTCGCCCGCTTGAAGAAGTAGGGGGATATCCGCTTGGACTT1GAGCTCGAAGCTGCCAACTTG  
 AGGACGCGCGCTCGATGGCGGATTTGAGGAAGTCTGCTTGTAGGACGGCAGCTGGGAGGTGGTAGCCATTCTGTTGGATTGG  
 ATAGTGCTTATTCTCTGATTTGAACAGTAGATCAGGACGAGTGAGAGGGATGCAGAGGTTGGATTGGAGTGGTTGAGCTATAA  
 AA1TTAGAGGCGCCGCTATCGAGTTT1CACATGGAAGTCAAAGCG1ACAG1GCGAGCTTGTACGTTGGTCT1AGTATCCACAA  
 GCTCTGTCTAGGTATGATGATGGCFATAAGT1CACCCAAGGCAGAACTCATCTTGAAGAT1GCTAGAGTGA1TTTACCGT1GATG  
 AAATGACTGGACTCCCTCCTCTGCTCTTATACGAAAAAT1GCTGACTCTGCAAAGGTTGT1TGTCTTGAAGATGATGTCGCC  
 CCCATCGCTCTTATCTATAACCCGCCATCTTCTAGATCTCATCTTCAAACAAGAGGGGCAATCCATGATCTGCGATCCAGATGT  
 GCTCTGGCCCTAC1CTTGCCTCAGGTTGATGTTAC1TAA1TGGT1GACGAAT1CAGCT1GATTTGCTGACGAT1GCT1TGTGTTG  
 GTTCTTCCAGGCTT1GCCAGCCATGAGCGCTT1GAGAGCATG1T1TACCTATAAACTCGAG1AACGGCCACA1A1TGT1CACT  
 ACTTGAATCACATACTAA1TTT1GATAGAATTGACATGTTTAAAGAGCTGAGGTAGCTTAA1TGCCTCTGAAGTATTGTGACACAG  
 CTCTCACAGAGTGAGAATGAAAAGTTGGACTCCCCCTAATGAAGTAAAAGTTTCGTCTCTGAACGGTGAAGAGCATAGATCCGG  
 CATCAACTACCTGGCTAGACTACGACGTCATTTCTGCCGCTTTT1GACCTTTATATATGTCATTAA1TGAATAGATTCTTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAA1TTCGACAGTCAAAGTGGACGTTATAGCATATAACTAAGCTCAGTTGCT  
 GAGGGAAGCCGCTACTACCTTAGCCATCCATCCAGCTCCATACCTT1GATACTTTAGACGTGAAGCAATTCACACTGTACGTCCTC  
 GCAGCTCTCCTTCCGCTCTGCTTCCCACTGGGTCATGTTGCGTGTATCTGTCCTCCTTAATTAAGGCCATTTAGGCCGTTG  
 CTGGCGTTTTTCCATAGGCTCGCCCTCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGT1CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC  
 TATAAGATAACAGGCGTTTCCCC1GGAAGCT1CCCTCGTGCGCTCTCC1GT1CCGACCC1GCCGCT1ACCGGATACCT1GTCCGCC  
 TTTCTCCCTCGGGAAGGCTGGCGCTTCTCATAGCTACGGTGTAGGATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGG  
 TGTGTGACGAACCCCGCT1CAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCT1GAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTT  
 ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGAT1TAGCAGAGCGAGGTA1GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT1GAAGTGGTGGCT  
 AACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT1TGGTATCT1GCGCTCTGCT1GAAGCCAGT1ACCT1CGGAAAAGAGT1GGT1AGCTCT  
 GATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGTGTTGCAAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGA  
 AGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAAC1CACGTTAAAGCC1GACGGCCGATTTGGTCA1GAG  
 ATTAATAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAAACTTGGT  
 CTGACAGTTACCAATGCTAATCAGT1GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCA1TCCATAGTTGCCTGACTCCCGCTC  
 TGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAACCGCTCCAGA

10

20

30

40

50



【化 1 6 - 2】

AAGACCGAGGAACAGGTTCGCCATGTTCCGGCGGCCAGGCTGGCGTCCGCTACGACCCCAACTATCAGCCCGCTGGCGACAACATG  
 ACCAACCTCAGCGAGGAAGCCCTCCCTCATCAACAGCAAGGCCACCCGCCCTTCGCGCTCGCCACCTACGCCAACAGCCCTTGAGAGCA  
 TCCCCCCTCGCAACGCCACCATGAGCATCCAGACCCGCTCTGCCTCTCGCCGAGCCGCTGCTCATCGACGAGCCGCCAAGCCCTCAC  
 TCTACTCTGGCGGCACTGGCTGCTGGCACACCCGAGTCGAGCTGTAAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATCGCGCCAG  
 CTCCGTGCGAAAGCCTGAGCCACCCGGTAGATTCTTGGTGAGCCCGTATCATGACGGCGCGGGAGCTACATGGCCCCGGGTGATT  
 TATTTTTTTGTATCTACTTCTGACCCTTTTCAAATATACGGTCAACTCATCTTTCACTGGAGATGCGGCCCTGCTTGGTATTGCGATG  
 TTGTCAGCTTGGCAAATTTGGCTTTCGAAAACACAAAACGATTCCTTAGTAGCCATGCAATTTAAGATAACGGAATAGAAGAAA  
 GAGGAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAACATCCCGTTCATAACCCGTAAGATCGCCGCTTTCGGCTAGCTAGTTACGCTTGTT  
 TATTTACGACAAGATCTAGAAGATTGAGATAGAATAATAATAATAACAACAAATTCGCTCTTCTTCCACCTTTTACGCTTACTC  
 TCCCTCTGACATTTGAACGCCCTCAATCAGTCAGTCGCCCTTGACITGGCACGGTAAATCCCTCCGTGTCTTGATAJCCCTCAGGGGTAG  
 CAAAGCCCTTCATGCCATCGATAATGTCATCCAGAGTGAGGATGGCAAAGATGGGGATGCGGTACTCCCTTCTCCTCAGCTCGCCAAT  
 GGCACCTCGTTCAGGCTTGGAGTCGTCGCCATCCGCAGCGGGGAGCTTCCTCATGCGGTCCAGGGCCACGACGATGCGCGGCACG  
 ATGCCGCCCTCTTGGTGATCTTCAATGGCTCCCTCTTGGCGGTGCCGGCGGTGATGACGTCGTCGACAATCAGGACCCCTT  
 GCCCTTGAGCGAAGCGCCGACGATGTTGCCGCCCTCGCCCTGGTCTTGGCTCCTTGCCTGCAACGAGTAGGAGACCGCGGTCC  
 AGGTTCTGGGGCGCCAGCTCGCCGAGCTTGATGGTGATGGCGGAGCACAGCGGATGCCCTTGATGGCCGGGCGAAGACGATG  
 TCGAACTTAGGCCGGCCTTCTCTGGGCCCTCGATGATGGTCTTTGCAAAGGCGGAGGCGATGGCGCCGGCGAGGCGCGCCGTGT  
 GGAATTCGCCCCGTTGAAGAAGTAGGGGGATATCCGCTTGGACTTGAGCTCGAAGCTGCCAAACTTGAGGACGCCCGCTCGAT  
 GCGGATTTGAGGAAGTCTGCTTGTAGGCAGGCAGCTGGGAGGTGGTAGCCATTTCTTGGATTGGATAGTGTCTTATTCTCT  
 GATTTGAACAGTAGATCAGGACGAGTGAAGGGATGACAGAGGTGGATGGAGTGGTTGAGCTATAAAAATTTAGAGGCGCGCCG  
 TATCGAGTTTTCACATGGAAGTCAAAGCGTACAGTGGCAGCTTGTACGTTGGTCTTAGTATCCCAAGCTTCTGTCTAGGTATGA  
 TGATGGCTATAAGTACCCCAAGGCAGAACTCATCTTGAAGATTGCTAGAGTGATTTTACCCTGATGAATGACTGGACTCCCTC  
 CTCTGCTCTTATACGAAAAATTGCCTGACTCTGCAAAGGTTGTTGTCTTGAAGATGATGTGCCCCCCATCGCTCTTATCTCAT  
 ACCCCGCCATCTTCTAGATTCCTCATCTTCAACAAGAGGGGCAATCCATGATCTGCGATCCAGATGTCCTTCTGGCCCTACATCT  
 GCCCTCAGTTGATGTTACTTAATTTGGTGACGAATTCAGCTGATTTGCTGCAGTATGCTTTTGTGTGGTCTTTCCAGGCTTGTGC  
 CAGCCATGAGCCGTTGAGAGCATGTTGTCACCTAATAACTCGATAACGGCCACATATTGTTCACTACTGAATCAGATCAGTAACTAA  
 TTTTGTAGAAATGCAATGTTTAAAGAGTGAAGTAGCTTTAATGCCCTGGAAGTATTGTCACAGCTTCTCACAGAGTGAAGAT  
 GAAAAGTTGGACTCCCCCTAATGAAGTAAAAGTTTCGTCTCTGAACGGTGAAGAGCATAGATCCGGCATCAACTACCTGGCTAGA  
 CTACGACGTCAAATCTGCGGCCCTTTGACCTTTATATATGTCATTAATGCAATAGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTGCCTAATTCGACAGTCAAAGTGGACGTTATAGCATCATAACTAAGCTCAGTTGCTGAGGGAAAGCCGTCTACTAC  
 CTTAGCCATCCATCCAGCTCCATACCTTGTACTTTAGACGTGAAGCAATTCACACTGTACGCTTCGACGCTCTCCCTCCCGCTCT  
 TGCCTCCCACTGGGGTCCAATGGTGGTGTATCTGCTCCCTCCCTTAAATTAAGGCCATTTAGGCCGTGCTGGCGTFTTCCATAGGCT  
 CCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT  
 TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT  
 GCGGCTTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCG  
 TTCAGCCCGACCCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGGTCCAAACCCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC  
 ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA  
 GGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCAC  
 CGCTGGTAGCGTGGTFTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATPACGGCGAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCFTTGAATCTTTCTA  
 CGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTACGTTAAGGCTGACGGCCGATTTGGTTCATGAGATATCAAAAAAGGATCTTC  
 ACCTAGATCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT  
 AATCAGTGAAGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTTCTGTTACATCCATAGTTGCTGACTCCCTGCTGTTAGATAACTACGATA  
 GGGAGGGCTTACCACTTGGCCCGAGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACA  
 GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCCGAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCCGGGAAGCTAGA  
 GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCAAGCTGCTGCTTGGTATGGC  
 TTCATTAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTCCGGTCTC  
 CGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCATGCCATCC  
 GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCTGGC

10

20

30

40

【化 1 6 - 3】

GTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGGCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCA  
 AGGATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACCTCGTGCACCCAACTGATCTTACAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTT  
 TCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC  
 CTTTTCAATAATATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCCTCATGGCCATTTAGGCCCT (配列番号15)

【 0 2 9 4】

配列番号 1 6 = p T r e x 8 g M \_ T R I 0 3 8 発現コンストラクトのヌクレオチド配

50

列。

【化 1 7 - 1】

CTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCCAACC CGGAGAATC  
GAGATGTCGTCGGAAAGCTCTAGCGAGCGGCATAAATTAGCATGAAAGGCTATGAGAAAATCTGGAGACGGCTTGTGTGAATCATGG  
CGTTCCATTCTTCGACAAAGCAAAGCGTCCCGTCGCAGTAGCAGGCACTCATTCCCGAAAAAACTCGGAGATTCCCTAAGTAGCGAT  
GGAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGGTAAGTACTGAGCTTGGACATAACTGTCC  
GTACCCCACTCTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTCAGCGTACCCGTACAAGTCGTAATCACTAITAAACCCAGACTGACCGG  
ACGTGTITTTGCCCTTCATTTGGAGAAAATAATGTCAITGGGATGTGFAAATTTGCCCTGCTTGACCGACTGGGGCTGTTCGAAGCCCGA  
ATGTAGGATTGTTATCCGAACTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGTCGGGCAGGACACGCCCTCGAAGGTTACGGCAA  
GGGAAACCACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGAAAATACAAACCAATGGCTAAAA  
GTACATAAGTTAATGCCATAAAGAGTCATATACCAGCGGCTAATAATITGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAAATTTGCCAA  
CGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAAACGGCAAAGCCCACTTCCCCACGTTTGTTCCTCACCTCAGTCCAAATCTCAGCTGGTGAITCCC  
CCAATTGGGTTCGCTGTTTGTTCGGTGAAGTAAAGAAGACAGAGGTAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTTGCATACAACCAA  
GGGCAGTGTGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGT  
CTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACTTCTGATGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGAT  
TGAGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAGTGTG  
GTAGGATCGAAACACTGCTGCCTTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAAAATGTTCAAGGGCCACTGCATGGTTTCGAA  
TAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAAGAACATAGCCGATAAAGATAGCCCTATTAAACGGAAATGAGCTAGTAGGCAAAAGTCAGCGAAT  
GTGTATATATAAAGGTTCGAGGTCCTGCTCCCTCATGCTCTCCCATCTACTCACTCAACTCAGATCCTCCAGGAGACTTGTACA  
CCATCTTTTGAGGCACAGAAACCCAAATAGTCAACCATCACAAAGTITGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGCAGACCTTCGGTGC  
TTTTCTCGTTTCTTCTCGCCGCCAGGTAAGTTGGCCTTGTGTAACCATATCATATATCGCCGAGAAGTGGACCGCGTGTGAGA  
CTGAGACAGCGGCCCTGGCCCGGGCCGCAAGCACAAGCCCTTGTACACCCCTGAGGGCCCTCCAGGACCTGATTAACCTCGACGAC  
CTCCTCGCCGGCAGCCAGCAGCTCCAGGACTTCGCCCTAGCCCTACCCCGAGCGCAACCGCTTCTTTGGCGGCCGAGCCACGACG  
ACACCGTCAACTGGTCTACCCGCGAGCTGAAGCGCACCGGCTACTACCACGTCTACAAGCAGCCCCAGGTCCACCTCTACAGCAA  
CGCCGAGGAAAGCCTCACCGTCAACGGCGAGGCCATCGAGGCCACCACCATGACCTACAGCCCCAGCGCAACCGCTCTGCCGA  
GCTGGCTGTATCAGCGCCCTTGGCTGCTCTCCCGCGACTTCGCCCTGACGTGCGCGGCAAGGTCGTCCTCGTCCAGCGAGGCA  
ACTGCACCTTCGGCGAGAAGTCCGTCTACCGCGCTGCCCGGATGCCCGCTACGATCGTCTACAACAACGTGAGGGCAGCCT  
CAGCGGCACCCCTCGCGCTGCTCAGTCTGAGCAAGGCCCTACAGCGCATCGTCGGCATCAGCCTCGCTGACGGCGAGGCCCTC  
CTCGCCCTTGTGAGGAAGCCCTGTCCACGTGACCTCTGGATCGACAGCGTATGGAAAACCGCACCACTACAACGTCAATTG  
CCCAGACCAAGGGCGGGCAGCCCGACAACGTGTCCTTGGCGGCCACAGCGACAGCGTTCGAGGCTGGCCCTGGCATCAACG  
ACGACGGCAGCGGCACTCAGCAACCTCGTCAATTTGCCGAGCCCTACCAAGTTTACGACCAAGCAGCCGTCGGCTTCTTTCTTC  
TGGACCGCCGAAGAGTTCGGCTTCTCGGCAAGCAGCTACTACGTACGAGCCCTCAGCCCGCTGAGCTGGCCAAGATCCGCCTCT  
ACCTCAACTTCGACATGATCGCCAGCCCAACTACGGCTCTCTCTTACGATGGCGACGGCAGCGCCTTCAACCTCACTGGCCCT  
GCTGGCAGCGACGCCATCGAGAAGCTGTCTACGACTACTTCCAGAGCATCGGCCAGGCCACCGTTCGAGACTGAGTTCGACGGCC  
GCAGCGACTACGAGGCCCTCATCTCAACGGCATCCCGCTGGCGGGCTTTTACTGGCGCGAGGAAATCAAGAGCGAGGAAG  
AGGTCGCCCTCTGGGGCGGAGAGGCTGGCGTCGCCCTACGACGCCAACTACCACAGGTCGGCGACACCACTCGACAACCTCAACA  
CCGAGGCCACTCTCAACAGCAAGGCCACCGCTTCCCGCTCGCCACCTACGCCAACGACCTCAGCACCATCCCAAGCCCGA  
GATGACCACCGCCGTAAGCGAGCCAACGTCAACGGCCACATGACCCGCCGACCATGCCCAAGAAAGCGCCAGACTGCCACCG  
CCACGCTGCCAAGGGCTGCTTTACAGCCCGCTCGAGCAGTAAGACCCAGCTTTCTGTACAAAGTGGTGTATCGGCCAGCTCCG  
TGC GAAAGCCTGACGCACCGGTAGATTCTTGGTGAAGCCGATCATGACGGCGCGGGAGCTACATGGCCCCGGGTGATTTATTT  
TTTTGTATCTACTTCTGACCCTTTTCAAATATACGGTCAACTCATCTTTACTGGAGATGCGGCCCTGCTTGGTATTGCGATGTTGT

10

20

30

40

50



ルタミナーゼ (Amano、日本) で処理した。さらに、グルテンを、Food Pro Alkaline Protease、Food Pro PNL および PepN 2 (ネオサルトリア・フィッシェリ (Neosartorya fischeri)) で処理した。20 時間後、限外ろ過により加水分解を停止させた (カットオフ 10 kDa、Sartorius Stedium Biotech、Goettingen、Germany)。酵素によるグルタミン酸分析に透過性を使用した (酵素による L-グルタミン酸分析キット、Roche、Mannheim、Germany)。図 2 に示すように、PepN 2 は pH 6.0 と比較して pH 範囲 7.0 ~ 9.0 でより高い効率を示した。

#### 【0296】

グルタミン酸およびグルタミンの遊離の観点から、グルテンの加水分解に適用した温度の影響を調べるために、グルテン懸濁液を 15 ~ 30 分で液化し、その直後に 1 M の HCl でグルテン加水分解の初期 pH を pH 7.0 に調節した。図 3 に示すように、40 ~ 60 の温度範囲を使用した。グルテンをグルタミナーゼ (Amano、日本) と混合した。さらに、グルテンを Food Pro (登録商標) Alkaline Protease、Food Pro (登録商標) PNL および PepN 2 (ネオサルトリア・フィッシェリ (Neosartorya fischeri)) と混合した。加水分解を始めて 20 時間後、限外ろ過により加水分解を停止させた (カットオフ 10 kDa、Sartorius Stedium、Goettingen、Germany)。酵素によるグルタミン酸分析に透過性を使用した (酵素による L-グルタミン酸分析キット、Roche、Mannheim、Germany)。ネオサルトリア・フィッシェリ (Neosartorya fischeri) 由来の PepN 2 は、60 で最も高い効率を示した。

#### 【0297】

実施例 3 - 加水分解度の観点からの、ネオサルトリア・フィッシェリ (Neosartorya fischeri) 由来の PepN 2 (TRI031) と、アスペルギルス・クラバタス (Aspergillus clavatus) 由来の PepN 2 (TRI035) との比較

加水分解度 (DH) は、同量のタンパク質について、例えば、6 M の HCl 中、約 120 で約 24 時間行った酸加水分解と比較して、開裂したペプチド結合の相対量を表す。したがって、PepN 1 型または PepN 2 型などの一般的な PepN のアミノ酸遊離効率の評価には、DH がより高いことが適用され得る。無細胞培養ブロス濃縮液 (カットオフ 10 kDa、Sartorius、Goettingen、Germany)、製造業者の説明通り使い捨て脱塩カラム (PD10、GE、Munich、Germany) を使用して脱塩した。基質として、予備加水分解した 10% (w/w) Na-カゼイン塩 (DMK、Germany)、ホエータンパク質分離物 (WPI; Arla、Viby、Denmark)、ダイズタンパク質分離物 (SPI; SUPRO (登録商標) 760、DuPont、Brabrand、Denmark) およびグルテン懸濁液を使用した。予備加水分解は、Na-カゼイン塩、WPI および SPI 懸濁液に対し、1% (w/w タンパク質) の FOODPRO (登録商標) Alkaline Protease、1% (w/w タンパク質) の FOODPRO (登録商標) PNL を用いて行った。予備加水分解は全て 55 で 18 時間行い、その後、95 で 20 分間不活化処理を行った。使用した各 PepN 2 は、培養ブロスから最終加水分解へのアミノ酸のキャリアーオーバー除去の対照として、また、使用したエンドペプチダーゼを十分に不活化するために、95 で 15 分間不活化した。加水分解は、96 ウェルマイクロタイタープレートフォーマット中に行い、下記表 1 に示すように、50  $\mu$ L の PepN 2 原液と混合した 150  $\mu$ L の予備加水分解タンパク質懸濁液から構成された。加水分解は 50 で 20 時間行い、その後、20  $\mu$ L の 2 M TCA (トリクロロ酢酸、Sigma-Aldrich、Schneidldorf、Germany) の添加により加水分解を停止させた。ネオサルトリア・フィッシェリ (Neosartorya fischeri) およびアスペルギルス・クラバタス (Aspergillus clavatus) 由来の PepN 2 型の

アミノ酸遊離効率を表1 (B) および (A) に示す。特に、Na - カゼイン塩、WPI およびSPIの基質では、ネオサルトリア・フィッシェリ (*N. fischeri*) およびアスペルギルス・クラバタス (*A. clavatus*) 由来のPepN 2型を使用すると、非常に高いDHが達成された。さらに、PepN 2型原液濃度で達成されたDHは、著しい増加であると考えられる。グルテンの加水分解では、0.02 ~ 0.3 mg/mL PepN 2のタンパク質範囲でDHが増加することがわかった。

【0298】

【表4】

表1: ネオサルトリア・フィッシェリ(*N. fischeri*)およびアスペルギルス・クラバタス(*A. clavatus*)由来のPepN 2型の加水分解度の比較。

A												
ネオサルトリア・フィッシェリ( <i>Neosartorya fischeri</i> )由来のPepN 2 (mg/mL)												
基質	水	最大濃度 における 不活化 酵素	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35
加水分解度 [%]												
カゼイン	7	8	14	15	16	20	19	21	23	22	24	24
WPI	7	8	17	19	19	21	23	28	24	26	27	29
SPI	5	6	11	13	14	15	17	18	19	19	19	22
グルテン	3	4	10	13	15	14	17	18	19	19	21	20

B												
アスペルギルス・クラバタス( <i>Aspergillus clavatus</i> )由来のPepN 2 (mg/mL)												
基質	水	最大濃度 における 不活化 酵素	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35
加水分解度 [%]												
カゼイン	8	8	16	19	19	20	21	23	24	24	24	27
WPI	7	8	19	20	21	22	23	27	25	28	29	29
SPI	6	6	11	12	13	14	16	15	17	21	21	21
グルテン	3	4	12	14	15	15	17	18	17	19	19	22

【0299】

実施例4 - 2種のエンドペプチダーゼを、PepN 2の候補のTRI032、TRI033、TRI034、TRI035、TRI037およびTRI038と組み合わせて使用したグルテンの加水分解

FOODPRO (登録商標) Alkaline Protease (FPAP) および

FOODPRO (登録商標) PNL (FPPNL) の添加によって予備加水分解したグルテンの懸濁液を調製した。加水分解は55で行った。約18時間後、90に10分間加熱することにより、加水分解を停止させた。50に冷却後、グルテンにグルタミナーゼを使用した。その後、150 $\mu$ Lの予備加水分解したグルテンを96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移した。50 $\mu$ L (タンパク質濃度: 0.5mg/mL) のTRI032、TRI033、TRI034、TRI035、TRI037およびTRI038を使用してグルタミン酸の遊離を行った。加水分解は18時間行い、20 $\mu$ Lの2M TCAの添加により停止させた。停止させた加水分解物をろ過(0.22mm)し、酵素によるグルタミン酸分析キット(Roche, Mannheim, Germany)によりさらに分析した。遊離したグルタミン酸の濃度を図4に示す。

10

## 【0300】

実施例5 - プロリン含有ペプチドの加水分解

ペプチドWHWLQLKPGQPMYをTRI031およびTRI035で加水分解した。20mMのCPB-バッファー(20mMクエン酸、20mMリン酸塩、20mMホウ酸)中、55で、1 $\mu$ g/mLのアミノペプチダーゼと共に、ペプチド(1mg/mL)をインキュベートした。示された時点で50 $\mu$ Lの5%TFAでアリコット(50 $\mu$ L)を停止させ、LC-MS分析に供した。

## 【0301】

この結果は、TRI031およびTRI035が、ペプチドWHWLQLKPGQPMY(図5)をKPGQPMY(図6)へと、さらにQPMY(図7)へと加水分解できることを示している。これはアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)のPepN<sub>2</sub>について以前に記載されていること(A.M. Blinkovskiy et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1480(2000)171-181、ここでは、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)のPepN<sub>2</sub>は、ペプチドWHWLQLKPGQPMYのものを含め、調査したいかなるX-Pro結合も加水分解しないと主張された。)とは対照的である。しかしながら、我々はまた、それらの酵素がペプチドをQPMYに開裂することを見出している(図7)。

20

## 【0302】

データ収集: LTQ Orbitrap Classicハイブリッド質量分析計(Thermo Scientific, Bremen, Germany)と接続したAgilent 1100 LCシステム(Agilent Technologies)を使用してキャピラリーLC-MS/MS分析を行った。試料を15cmのPhenomenix Jupiter 4 $\mu$  Proteo 90A、C4分析用カラムに注入した。IONMAX(登録商標)イオン源(Thermo Scientific, San Jose)への流量16 $\mu$ L/minで、10分間の0~40%溶媒B H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH(50/950/0.65、v/v/v)の勾配を使用して分離した。LTQ Orbitrap Classic装置をデータ依存MS/MSモードで操作した。ペプチド質量をOrbitrap(MSのスキャンは、m/z400において60000の分解能で行った)により測定し、最大強度ペプチドのm/zを2つまで選択し、リニアイオントラップ(LTQ)中でCIDを使用して断片化に供した。動的排除は、500質量のリストサイズ、40秒の持続時間、およびリスト上の質量に対して $\pm$ 10ppmの排除質量幅により有効とした。

30

40

## 【0303】

無標識定量: クロマトグラムを構築するためにMS1強度を使用する、プログラムSkylines 2.6.0.7176(MacLean, B., et al., 「Skylines: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomic experiments」, *Bioinformatics*, 2010, 26(7): p. 966-8)を用いて生のファイルにアクセスした(Schilling, B.,

50

et al., 「Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation」, Mol Cell Proteomics, 2012.11(5): p.202-14)。プレカーサー同位体インポートフィルターを分解能60,000の3つのカウント(M、M+1およびM+2)に設定し、最大強度の電荷状態を使用した。基質および開裂生成物のペプチド配列を、Skylineに入力し、それぞれの試料の強度を計算した。図はプログラムから直接コピーした(図8を参照)。

10

#### 【0304】

実施例6：アスペルギルス・クラバタス(A. clavatus)由来のPepN 2の加水分解度の、アスペルギルス・オリゼ(A. oryzae)およびラクトバチルス・ヘルベティカス(L. helveticus) ATCC 12046由来のPepNの加水分解度との比較

Stressler, Eisele et al. (2013、下記)にしたがって、PepN 1ラクトバチルス・ヘルベティカス(Lactobacillus helveticus) ATCC (登録商標) 12046、PepN 1アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae)、およびアスペルギルス・クラバタス(Aspergillus clavatus) (TRI035)由来のPepN 2の酵素活性を測定した。ラクトバチルス・ヘルベティカス(L. helveticus)からPepN 1を発現させ、Stressler、Eisele et al. (2013、下記)に記載のように精製した。

20

#### 【0305】

アスペルギルス・オリゼ(A. oryzae)由来のPepN 1を、FLAVOUR ZYME (登録商標) 500L (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) から、20mMのビス-トリス、pH6.5で平衡化したPD10カラムで脱塩した後、精製した。アニオン交換クロマトグラフィーにより、Source Q15、XK26/15 (SQ15)カラム(GE-Lifesciences, USA)を使用して試料を精製し、20mMのビス/トリス、pH6.5(バッファーA)で平衡化させた。流量7mL/minで試料(30mL)をカラムに注入した。カラムをバッファーAで洗浄し、結合したタンパク質を、0~0.5MのNaCl(20mM Bis/Tris(pH6.5)中)の直線勾配により溶出させた(50分間)。全操作期間中に約13mLの画分を回収し、氷上に保管した。アミノペプチダーゼ活性が最も高い画分をまとめて、PD10(20mMのBis-Tris(pH6.0)中)で脱塩し、20mMのBis/Tris、pH6.0(バッファーA)により平衡化したPoros Q20 HR26/10、XK26/10カラム(GE-Lifesciences, USA)による2回目の精製に供した。流量4mL/minでPepN1試料をカラムに注入した。カラムをバッファーAで洗浄し、結合したタンパク質を、0~0.25MのNaCl(20mM Bis/Tris(pH6.0)中)の直線勾配により溶出させた(30分間)。全操作期間中に約8mLの画分を回収し、氷上に保管した。精製したアスペルギルス・オリゼ(A. oryzae)由来のPepN 1は、SDS-PAGE電気泳動法により約40kDaの分子量を有することがわかった。

30

40

#### 【0306】

PepN 1およびPepN 2アミノペプチダーゼを2.5-200nkat\*mL<sup>-1</sup>の活性化範囲に標準化した。タンパク質の加水分解のために、1%(w/w<sub>WPI</sub>) FOODPRO (登録商標) Alkaline Protease (DuPont, Brabrand, Denmark) および1%(w/w<sub>WPI</sub>) FOODPRO (登録商標) PNL (DuPont, Brabrand, Denmark) を、初期pH7.0でホエー乳漿タンパク質分離物懸濁液(WPI; LACPRODAN (登録商標) 9224、

50

Arla Ingredients, Viby, Denmark)に加えた。エンドペプチダーゼの添加後、WPIを加え、200 μLを96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移した。その後、表2に示すように、5 μLのPepN溶液を加えた。加水分解を50、pH無制御で行い、18時間後に20 μLの2M TCAを添加して停止させた。DHの測定(Nielsen, Petersen et al., 2001、下記)に先立って、全試料を0.22 μmでろ過した。

【0307】

アスペルギルス・クラバタス(A. clavatus)由来のPepN 2は、アスペルギルス・オリゼ(A. oryzae)由来のPepN 1より、全ての用量で高いDHを示し、ラクトバチルス・ヘルベティカス(L. helveticus)由来のPepN 1より、試験した4つの最大活性用量で高いDHを示すことがわかった。そして、2つの最大用量で、アスペルギルス・クラバタス(A. clavatus)由来のPepN 2は、PepN 1アミノペプチダーゼより、少なくとも25%高いDHを示した。

10

【0308】

【表5】

表2:アスペルギルス・クラバタス(A. clavatu)由来のPepN 2の加水分解度の、ラクトバチルス・ヘルベティカス(L. helveticus)およびアスペルギルス・オリゼ(A. oryzae)由来のPepN 1の加水分解度との比較

原液中の PepN 用量 [nkat/mL] in									
0	2,5	5	10	25	50	75	100	200	
加水分解度 [%]									
14	14	15	16	16	18	16	21	19	PepN 1: アスペルギルス・オリゼ(A. oryzae)
13	18	18	20	23	23	24	28	27	PepN 1: ラクトバチルス・ヘルベティカス(L. helveticus)
14	15	17	17	20	24	26	35	36	PepN 2: アスペルギルス・クラバタス(A. clavatus)

20

【0309】

実施例7：ダイズおよびグルテンの加水分解における、グルタミン酸の遊離に対する塩化ナトリウムの影響

30

食品工業では、タンパク質の加水分解時の微生物による汚染のリスクを減じるために、しばしば塩化ナトリウムを使用する。1% (w/wタンパク質) FOODPRO (登録商標) Alkaline Protease (DuPont, Brabrand, Denmark) および1% (w/wタンパク質) FOODPRO (登録商標) PNL (DuPont, Brabrand, Denmark) を添加することにより、予備加水分解した10% (w/w) ダイズ (SuPro (登録商標) 760, DuPont, Brabrand, Denmark) およびグルテン (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) を調製した。加水分解を、50、pH7.0 (pH無制御) で18時間行った (18時間後、熱による不活化; 90 ; 10分)。その後、加水分解物を、塩化ナトリウム含有 (185 mM) 加水分解物と塩非含有加水分解物に分割した。予備加水分解した各タンパク質懸濁液150 μLを、表3に示すように、異なる方法で標準化したアスペルギルス・クラバタス (Aspergillus clavatus) PepN 2と混合した。50、pH無制御で加水分解を行い、18時間後に20 μLの2M TCAを添加して停止させた。DHの測定(Nielsen, Petersen et al., 2001、下記)に先立って、全試料を0.22 μmでろ過した。表3に示すように、185 mMのNaClの添加は、ダイズおよびグルテンの加水分解における加水分解度の測定値に全く影響しなかった。

40

【0310】

50

## 【表 6】

表 3: ダイズにおける加水分解度およびグルテンにおける加水分解度に対する 185 mM NaCl の影響

タンパク質												
ダイズ					グルテン							
タンパク質濃度 [mg/mL]												
水	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5		
加水分解度												
1	1	11	12	12	12	14	16	17	16	17	18	リファランス
1	1	10	11	11	12	14	15	15	16	17	18	185 mM NaCl

10

20

## 【0311】

Nielsen, P. M., et al. (2001), Journal of Food Science 66 (5): 642 - 646。

## 【0312】

Stressler, T., et al. (2013), PLoS ONE 8 (7)

## 【0313】

実施例 8: PepN2 TRI031 および TRI035 対 TRI063 (アスペルギルス・オリゼ (A. oryzae)) の生成物による阻害

この試験では、基質 H-Ala-ニトロアニリド (pNA) の加水分解により酵素活性を測定した。放出された pNA の波長 405 nm における吸光度を、マイクロタイタープレートリーダーを使用して経時的に測定した。

30

## 【0314】

これらの物質のバッファーとして、20 mM の CPB バッファー (20 mM の Na-クエン酸塩、Na-リン酸塩および Na-ホウ酸塩) pH 9.0 を使用した。酵素試料として PepN2 TRI031 および TRI035 を使用した。20 mg の H-Ala-pNA 基質 (BACHEM、L-1070) を 1 mL の DMSO (ジメチルスルホキシド; Sigma カタログ番号 D2650) 中で可溶化した。96 ウェルプレートの Costar assay plate 9017 (Corning Inc) を使用し、これらのプレートを Molecular Devices の VERSAMAX (登録商標) リーダーで読み取った。阻害試験用に、各アミノ酸、すなわちリシン、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファン、プロリン、グリシン、セリン、アスパラギン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸の 20 mg/mL 溶液 10 mL を調製した。トリプトファンおよびプロリンは DMSO に溶解した。他のアミノ酸は全て、バッファーに溶解した。500 μL の各アミノ酸溶液を混合して、最終の阻害混合物を調製した。

40

## 【0315】

96 ウェルプレートを氷上に置き、180 μL のバッファー、15 μL の希釈した酵素、および 20 μL の阻害混合物をプレートのウェルに加え、混合した。各プレートには、0.017、0.085、0.128、0.170、0.426、0.851、1.702、2.553 mg/mL の阻害混合物濃度で、4 種の酵素を全て含有させた。20 μL

50

の基質を添加することにより、反応を開始させた。1つのプレートに、1つの基質濃度を使用した。反応開始後、30 に設定したマイクロプレートリーダーにできるだけ早くプレートを入れ、405 nmにおける吸光度を30秒間隔で30分間測定した。各プレートに1つの基質濃度(0.017、0.170、0.426、0.851、1.702、2.553 mg/mLのいずれか)とした6枚のプレートについて測定した。見かけの阻害定数( $K_i$ )を決定するために、データをGraphPad Prismにエクスポートし、これにより阻害物質の濃度毎にミカエリス・メンテン曲線にフィッティングし、これに基づいて、 $K_i$ をmg/mLの単位で算出した。阻害物質の平均分子量133.9 g/molを使用して、単位をmMに変換した。異なる酵素についての、生成物による阻害のみかけの $K_i$ 値、およびそれぞれの標準偏差(SD)を表4に記す。

10

【0316】

【表7】

表4

	$K_i$ (mM)	SD
TRI031	5.67	0.85
TRI035	3.06	0.59
TRI063(アスペルギルス・オリゼ(A. oryzae))	1.20	0.36

20

【0317】

表4から、PepN 2 TRI031およびTRI035は、生成物による阻害に対し、最大の見かけの $K_i$ 値を有していることがわかる。それは、アスペルギルス・オリゼ(A. oryzae)由来のTRI063と比較して、それらが生成物によって阻害されにくいことを意味している。

【0318】

実施例9：Glu-pNAおよびGln-pNA基質に対するPepN2およびPepN1の活性

30

基質としてH-Glu-ニトロアニリド(pNA)およびH-Gln-ニトロアニリド(pNA)を使用し、p-ニトロアニリド(pNA)の放出を405 nmにおける吸光度により測定した。バッファーとして20 mMのCPB-バッファー(20 mMのクエン酸、20 mMのNa-リン酸塩、20 mMのホウ酸) pH 9.0を使用した。10 mgのH-Glu-pNAおよびH-Gln-pNA(BACHEMまたはSchaefer N; Copenhagen, Denmarkから)を1 mlのDMSO(SIGMA製のジメチルスルホキシド; カタログ番号D2650)に溶解した。

【0319】

試験を実施するために、Costar assay plate 9017(Corning Inc.)中の、80  $\mu$ Lのバッファー、10  $\mu$ LのH-Glu-pNAまたはH-Gln-pNA基質、および10  $\mu$ Lの適切に希釈したPepN 2を45 でインキュベートし、SoftMax Pro 5.4.1ソフトウエアで稼働するVERSAMAX(登録商標)マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で、30秒毎に30分間、405 nmで測定した。10の時点から求めた曲線における直線部分の最大傾斜として、活性を決定した。

40

【0320】

試験は、PepN 2 TRI031およびTRI035の精製試料、ならびに精製PepN 1ラクトバチルス・ヘルベティカス(L. helveticus)(Stressler, Eisele et al., 上記)、さらに、非精製PepN 1アスペル

50

ギルス・ソイエ (*A. sojae*) (COROLASE (登録商標) LAP、AB Enzymes) について行ったが、これらは、Ala-pNA または Leu-pNA については全て同等の活性を有した (実施例 H の Ala-pNA についての記載と同様ではあるが、阻害物非存在下で行った)。表 5 に示すように、2 種の PepN 2 アミノペプチダーゼは、有意な活性を示さなかった 2 種の PepN 1 酵素とは対照的に、Glu-pNA および Gln-pNA に対して活性を示した。これは、PepN 2 アミノペプチダーゼが、Glu および Gln の放出に関して、PepN 1 アミノペプチダーゼよりはるかに有効であることを示している。

【0321】

【表 8】

10

表 5. Glu-pNA および Gln-pNA 基質に対する PepN 2 および PepN 1 の活性

	Vmax (mU/分)	
	Glu-pNA	Gln-pNA
PepN 2 TRI031	50.8	75.9
PepN 2 TRI035	20.1	98.7
PepN 1 L. (ラクトバチルス・ヘルベティカス ( <i>L. helveticus</i> ))	0.02	0
PepN 1 コローゼ LAP	0	0

20

【0322】

実施例 10 - 2 位にプロリンを有するペプチドの加水分解

ペプチドライブラリー X P A A A R (X は全てシステイン以外のアミノ酸) を酵素試料 TRI032、TRI035、TRI063 (アスペルギルス・オリゼ (*A. oryzae*)) および COROLASE (登録商標) LAP で加水分解した。3 × 20 mM の CPB - バッファー (20 mM クエン酸、20 mM リン酸塩、20 mM ホウ酸) 中、55 °C で 1 μg/mL のアミノペプチダーゼと共に、ペプチドライブラリー X P A A A R (1 mg/mL) をインキュベートした。示された時点で 50 μL の 5% TFA で 50 μL のアリコットを停止させ、LC-MS 分析に供した。

30

【0323】

データ収集: LTQ Orbitrap Classic ハイブリッド質量分析計 (Thermo Scientific, Bremen, Germany) と接続した Agilent 1100 LC システム (Agilent Technologies) を使用してキャピラリー LC-MS/MS 分析を行った。試料を 15 cm の Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90 A、C4 分析用カラムに注入した。IONMAX (登録商標) イオン源 (Thermo Scientific, San Jose) への流量 16 μL/min で、10 分間の 0 ~ 40% 溶媒 B H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / HCOOH (50 / 950 / 0.65, v/v/v) の勾配を使用して分離した。LTQ Orbitrap Classic 装置をデータ依存 MS/MS モードで操作した。ペプチド質量を Orbitrap (MS のスキャンは、m/z 400 において 60000 の分解能で行った) により測定し、最大強度ペプチドの m/z を 2 つまで選択し、リニアイオントラップ (LTQ) 中で CID を使用して断片化に供した。動的排除は、500 質量のリストサイズ、40 秒の持続時間、およびリスト上の質量に対して ± 10 ppm の排除質量幅により有効とした。

40

【0324】

無標識定量: クロマトグラムを構築するために MS1 強度を使用する、プログラム Skyline 2.6.0.7176 (MacLean, B., et al., 上記) を用いて生のファイルにアクセスした (Schilling, B., et al., 上記を参照)。プレカーサー同位体インポートフィルターを分解能 60,000 の 3 つのカウント (

50

M、M + 1 および M + 2 ) に設定し、最大強度の電荷状態を使用した。基質および開裂生成物のペプチド配列を、S k y l i n e に入力し、それぞれの試料の強度を計算した。3種の同位体 ( M、M + 1、および M + 2 ) のピーク面積の合計を基に図 10 を作成した。基質標準曲線 ( S t d 3 . 1 2 5 から S t d 5 0 へ連続して 2 倍の濃度増加 ) を含めており、これは基質濃度とピーク面積に直線関係があることを示している。

【 0 3 2 5 】

L C - M S の結果 ( 図 1 0 ) は、T R I 0 3 2 および T R I 0 3 5 では、ペプチド T P A A A R を時間とともに加水分解し、2 時間のインキュベーションで濃度を半分未満にまで低下させることができるが、T R I 0 6 3 ( アスペルギルス・オリゼ ( A . o r y z a e ) ) および C O R O L A S E ( 登録商標 ) L A P では、1 2 時間で T P A A A R の加水分解を引き起こさないことを示している。

10

【 0 3 2 6 】

本明細書中に、本発明の好ましい実施形態を示し、説明してきたが、当業者であれば、そのような実施形態が例示のためにのみ提供されていることは明らかであろう。今や当業者には、本発明から逸脱することなく、多くの変形、変更および置換が想起されるであろう。本発明を実施するにあたり、本明細書に記載の本発明の実施形態に対し、様々な代替を使用し得ることは理解されるべきである。以下の請求項が本発明の範囲を定義し、また、これらの請求項の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの等価物が本発明の範囲によりカバーされることを意図している。

20

30

40

50



【 図 5 】

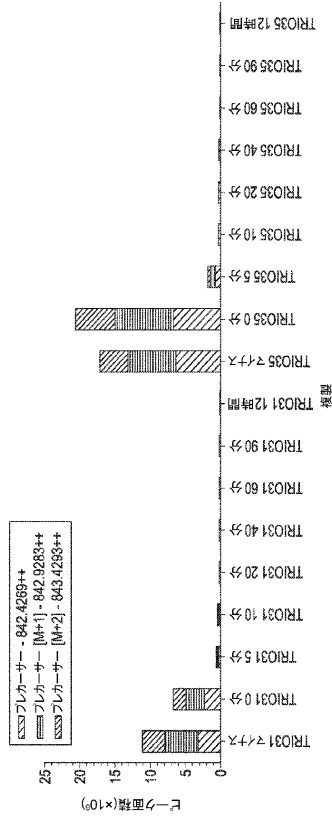


FIG. 5

【 図 6 】

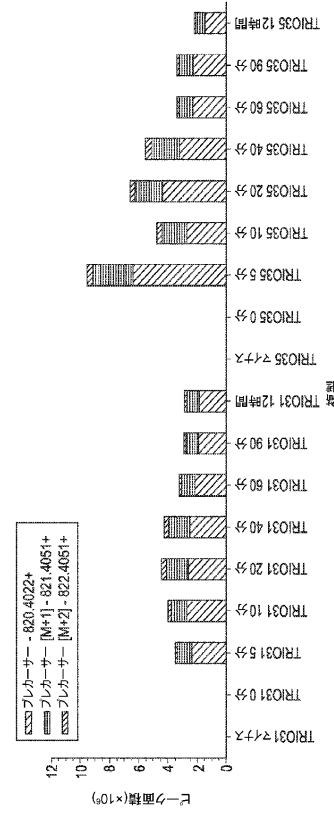


FIG. 6

【 図 7 】

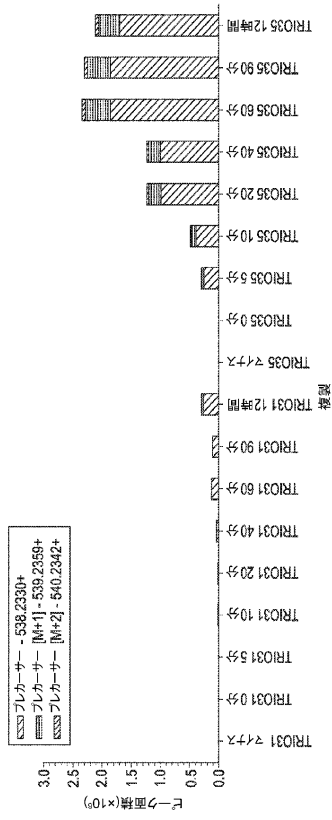


FIG. 7

【 図 8 A 】

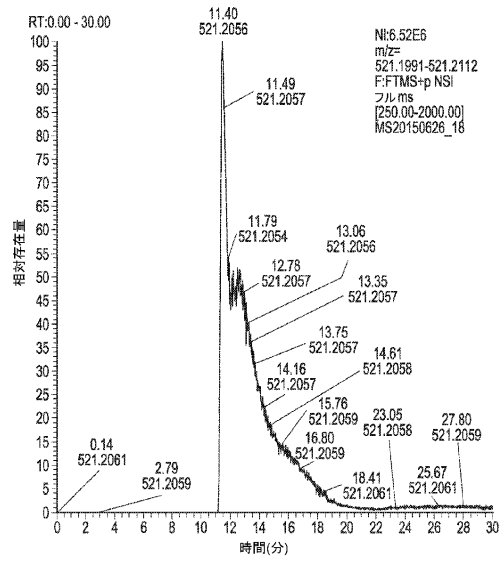


FIG. 8A

10

20

30

40

50

【 図 8 B 】

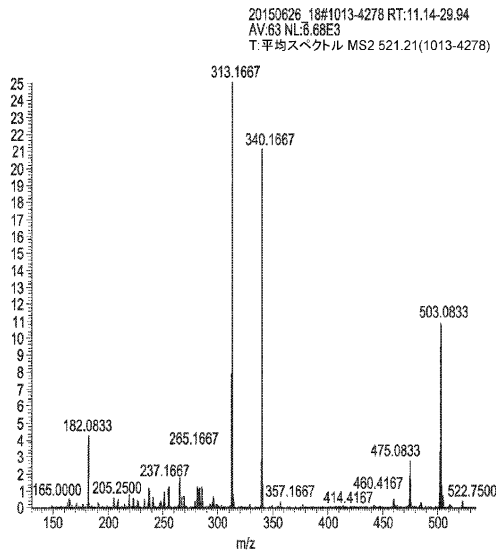


FIG. 8B

【 図 8 C 】

MS/MS断片化-C24 H32 N4 O7 S1		MS/MS断片化-C24 H32 N4 O7 S1	
質量	相対強度	質量	相対強度
84.045	112.040	181.098	209.093
181.098	209.093	312.138	340.133
312.138	340.133	410.174	436.154
410.174	436.154	503.083	522.750
503.083	522.750		

FIG. 8C

【 図 9 】

FIG. 9A	FIG. 9B
FIG. 9C	FIG. 9D
FIG. 9E	FIG. 9F

FIG. 9

【 図 9 A 】

1	10
③1. TRI030(手動で入れた新しいタンパク質配列)	
2. EEH10739 (アゼロミセス・カプスラツス(Ajellomyces capsulatus) G186AR-EEH10739)	
3. EGC45708 (アゼロミセス・カプスラツス(Ajellomyces capsulatus) H88-EGC145703)	
4. EQL38596 (アゼロミセス・デルマトチデイス(Ajellomyces dermatitidis) ATCC 26199 - EQL38596)	
5. EEQ88518 (アゼロミセス・デルマトチデイス(Ajellomyces dermatitidis) ER-3-eeq88518)	
6. XP_002627256 (アゼロミセス・デルマトチデイス(Ajellomyces dermatitidis) SLH14081-XP_002627256)	
7. EGE77314 (アゼロミセス・デルマトチデイス(Ajellomyces dermatitidis) ATCC 18188 - EGE77314)	
8. EEH19247 (パラコクシディオイデス・ブラジリエンシス(Paracoccidioides brasiliensis) Pco3 - EEH19247)	
9. EEH37734 (パラコクシディオイデス属の種ルツワイ(Paracoccidioides sp. 'lutzi) Pco1 - EEH37734)	
③10. TRI031(手動で入れた新しいタンパク質配列)	
11. XP_001258675 (ネオサルトリ・フィツペン(Neosartorya fischeri) NRRL 181 - XP_001258675)	
12. XP_748386 (アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus) A293-XP_748386)	
13. AAR96059 (アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus) AAR96059)	
③14. TRI035(手動で入れた新しいタンパク質配列)	
15. XP_001273779 (アスペルギルス・クラバツス(Aspergillus clavatus) NRRL 1 - XP_001273779)	
③16. TRI063(手動で入れた新しいタンパク質配列)	
17. XP_001819545 (アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae) RIB10-XP_001819545)	
18. AAN94152_novo_特許	
19. KGO56599 (ペニシリウム・エクサンサム(Penicillium expansum) - KGO56599)	
20. KGO44619 (ペニシリウム・エクサンサム(Penicillium expansum) - KGO44619)	
21. KGO68951 (ペニシリウム・イタリクム(Penicillium italicum) - KGO68951)	
22. XP_002567159 (ペニシリウム・ルベンスウィスコンシン(Penicillium rubens Wisconsin) 54N1255-XP_002567159)	
23. CDM29328 (ペニシリウム・ロケフォルティ(Penicillium roqueforti) FM164 - CDM29328)	
24. EPS27203 (ペニシリウム・オキサリクム(Penicillium oxalicum) 114-2 EPS27203)	
③25. TRI037(手動で入れた新しいタンパク質配列)	
26. XP_001217759 (アスペルギルス・テラウス(Aspergillus terreus) NIH2624 - XP_001217759)	
③27. TRI038(手動で入れた新しいタンパク質配列)	
28. XP_681714 (アスペルギルス・ニドゥラレンス(Aspergillus nidulans) FGSC A4-XP_681714)	
29. XP_002844235 (アルシロデルマ・オタエ(Arthroderma otae) CBS 113490 - XP_002844235)	
30. EZF31821 (トリコフィトン・インターディギタレ(Trichophyton interdigitale) H6-EZF3181821)	
31. A7U109 (トリコフィトン・エキヌム(Trichophyton equinum) - A7U109)	
32. A7U110 (トリコフィトン・トンスランシス(Trichophyton tonsurans) - A7U110)	
33. XP_003024240 (トリコフィトン・ヴェルコスム(Trichophyton verucosum) HKI 0517-XP_003024240)	
34. XP_003013309 (アルシロデルマ・ベンハミエ(Arthroderma benhamiae) CBS 112371-XP_003013309)	
35. XP_003231107 (トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) CBS 118892-XP_003231107)	
36. XP_002582878 (ウンシノカルプス・レスシ(Unicombocarpus reesi) 1704-XP-002582878)	
37. XP_001240466 (コクジディオイデス・イミツシ(Coccidioides immitis) RS - XP_001240466)	
38. XP_003068016 (コクジディオイデス・ポサダシ(Coccidioides posadasii) C735 デルタ SQWg-p-x)	

FIG. 9A

10

20

30

40

50





## フロントページの続き

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/235,937

(32)優先日 平成27年10月1日(2015.10.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 クラーウ、カーステン・マティーアス

デンマーク王国、8 2 7 0 ホイビエルグ、マズビエルグパルケン 2 1

(72)発明者 ホーニン、スヴェン

デンマーク王国、8 4 6 4 ガルデン、スチェーア、トゥヤヴァイ 3

(72)発明者 メインヨハンス、エアnst

デンマーク王国、1 8 0 1 フレゼレクスベア シー、ティーエイチ、ラーベクス・アレ 2 シー

(72)発明者 アイセル、トマス

デンマーク王国、コペンハーゲン ケー 1 4 1 1、ランゲプロゲイド 1

(72)発明者 ダイン、ピーダ・イズヴァト

デンマーク王国、8 2 5 0 イーイオー、ススヴィンゲット 2 4

(72)発明者 バク、ステフェン・ユーズ

デンマーク王国、8 2 0 0 オーフス エヌ、ブレンドストロブヴァイ 7 0

合議体

審判長 中村 浩

審判官 中根 知大

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 4 / 0 8 1 7 0 0 ( W O , A 1 )

特表2 0 0 0 - 5 0 4 5 7 1 ( J P , A )

Database NCBI Protein[online], Accession No. XP\_003667354, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/367036144?sat=46&satkey=73623056> 04-JAN-2012uploaded, [retrieved 25 August 2022], Berka,R.M.,et al. Definition: peptidase [Thermothelomyces thermophila AT CC 42464]

Biochimica et Biophysica Acta, 2000年, Vol.1480, p.171-181

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 P 2 1 / 0 6

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq