

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4287149号
(P4287149)

(45) 発行日 平成21年7月1日(2009.7.1)

(24) 登録日 平成21年4月3日(2009.4.3)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 1 D 3/386 (2006.01)

C 1 1 D 3/386

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 13 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-563310 (P2002-563310)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月7日(2002.2.7)
 (65) 公表番号 特表2004-517639 (P2004-517639A)
 (43) 公表日 平成16年6月17日(2004.6.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2002/000084
 (87) 国際公開番号 W02002/062973
 (87) 国際公開日 平成14年8月15日(2002.8.15)
 審査請求日 平成17年1月18日(2005.1.18)
 (31) 優先権主張番号 PA 2001 00195
 (32) 優先日 平成13年2月7日(2001.2.7)
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)

(73) 特許権者 500586299
 ノボザイムス アクティーゼルスカブ
 デンマーク国、デーコーー 2 8 8 0 バグ
 スバエルト、クロシェイバイ 3 6
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リパーゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リパーゼ活性を有するポリペプチドの生産方法であって、

a) i) リパーゼ活性を有し、且つ配列番号: 2 に対する同一性が少なくとも90%のアミノ酸配列を有する親ポリペプチド、及び

ii) 該親ポリペプチドのC末端に付加したHTPSSGRGGHR、HTPSSGRGG、HTPSSGR、HTPS S、HTP、LVY、RHT、SVF及びTADから成る群から選択されるペプチド延長鎖、を含むアミノ酸配列を有する1以上のポリペプチドを調製するステップ;

b) リパーゼ活性を有し、かつ親ポリペプチドに比して

i) 短鎖脂肪アシルエステル対長鎖脂肪アシルエステルに対する活性比が低く、

ii) 中性pH対アルカリ性pHでの活性比が低く、そして/又は

iii) 脂肪で汚れた繊維製品小切れを該ポリペプチド入りの酵素で洗濯したときに異臭を形成する傾向が低い、

ポリペプチドを選択するステップ; 及び

c) 該選択されたポリペプチドを生産するステップ;
 を含む方法。

【請求項 2】

前記ペプチドが、配列番号: 2 に対して少なくとも95%又は少なくとも98%のアミノ酸配列の同一性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、親ポリペプチドをコードするプラスミドと2～15個のアミノ酸からなる延長鎖に対応する終止コドンをもつオリゴヌクレオチドとを使用して突然変異誘発法により調製される請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

リパーゼ活性を有し、かつ

a) リパーゼ活性を有し、且つ配列番号: 2 に対する同一性が少なくとも90%のアミノ酸配列を有する親ポリペプチド、及び

b) 該親ポリペプチドのC末端に付加したHTPSSGRGGHR、HTPSSGRGG、HTPSSGR、HTPSS、HTP、LVY、RHT、SVF及びTADから成る群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチド延長鎖、

を含むアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項5】

前記ペプチドが、配列番号: 2 に対して少なくとも95%又は少なくとも98%のアミノ酸配列の同一性を有する、請求項4に記載のポリペプチド。

【請求項6】

前記親ポリペプチドが、配列番号: 2 に比べて、E1又はQ249の15オングストロム() 以内の立体構造表面の非荷電又は負荷電アミノ酸の正荷電アミノ酸による置換を含む請求項4又は5に記載のポリペプチド。

【請求項7】

前記親ポリペプチドが、配列番号: 2 に比べて、位置1～11、90、95、169、171～175、192～211、213～226、228～258又は260～262のいずれかに対応する位置の非荷電又は負荷電アミノ酸の置換を含む、請求項4～6のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項8】

前記親ポリペプチドが、配列番号: 2 に比べて、位置90～101に対応する領域に、負荷電アミノ酸と組み合わせられたE99Kに対応する置換を含む、請求項4～7のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項9】

前記親ポリペプチドが、配列番号: 2 の位置E210に対応する位置に負荷電アミノ酸を含む、請求項4～8のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項10】

前記親ポリペプチドが、配列番号: 2 の位置90～101に対応する領域に負荷電アミノ酸を含む請求項4～9のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項11】

前記親ポリペプチドが、配列番号: 2 のN94に対応する位置に非荷電又は負荷電アミノ酸を含み、そして/又は配列番号: 2 の位置90～101に対応する領域に負の又は電氣的に中性の正味電荷を含む、請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項12】

界面活性剤と請求項4～11のいずれか1項に記載のポリペプチドとを含む洗剤組成物。

【請求項13】

請求項4～11のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、臭気発生の可能性が小さいリパーゼ変異体に、また該変異体の製造方法に関連する。本発明は特に洗剤組成物への使用に適した変異体に、とりわけ乳脂肪で汚れた衣類の洗濯に際して一次洗浄効果と低い臭気発生傾向とを示すサーモミセス・ラヌギノサス(*Thermomyces lanuginosus*) リパーゼ変異体に関連する。

【0002】

発明の背景技術

リパーゼはたとえば、衣類などの繊維製品から油汚れを落とす洗剤用酵素として、パンな

10

20

30

40

50

どベーカリー製品の生地への添加剤として有用である。たとえばサーモミセス・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) (異名フミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*))、欧州特許第258068号及び305216号)に由来するリパーゼは洗剤用としてLipolase(登録商標)(Novo Nordisk A/S商品)の商品名で販売されている。WO 00/60063は洗浄液中で特に優れた一次洗浄効果を発揮するサーモミセス・ラヌギノサス (*T. lanuginosus*) リパーゼ変異体を開示している。WO 97/04079、WO 97/07202及びWO 00/32758もまたサーモミセス・ラヌギノサス (*T. lanuginosus*) リパーゼ変異体を開示している。

【0003】

用途次第では臭気を発生させる短鎖脂肪酸の形成を極力抑えることが重要である。たとえばリパーゼ入り洗濯洗剤では周知のように牛乳で汚れた衣類に付着した残留臭気が残ることもある(欧州特許第430315号)。

10

【0004】

発明の要約

本発明者はリパーゼのC末端アミノ酸にペプチド延長鎖を付加すると臭気形成傾向が弱まることを発見した。この発見は、比較的短鎖(たとえばC₈以下)の脂肪アシル基を含む脂肪たとえばバター脂肪を含む乳製品又はやし油やパーム核油などのような熱帯植物油で汚れた繊維製品を洗濯しても臭気あまり発生しないリパーゼ変異体の開発につながるであろう。そうした変異体は短鎖アシル基よりも長鎖アシル基に対する特異性が強い、及び/又は中性pHよりもアルカリ性pHでの活性比が大きいすなわち洗浄液のpHに近いアルカリ性pH(たとえばpH 9又は10)でのリパーゼ活性に比してすすぎ洗い時の中性pHでのリパーゼ活性が相対的に低いであろう。

20

【0005】

従って本発明は、親リパーゼのC末端へのペプチド延長鎖を付加し、そしてその結果得られるポリペプチドを上記のうちいずれかの性質の改善を伴うリパーゼについてスクリーニングすることによりリパーゼを生産する方法を提供する。

本発明はまた、リパーゼ活性を有し、かつリパーゼ活性をもつ親ポリペプチドと親ポリペプチドのC末端に付加されたペプチド延長鎖とを含むアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。

本発明はさらに、前記の性質を有するリパーゼを使用した洗剤組成物及び洗剤製造方法を提供する。

30

【0006】

発明の詳細な説明

親リパーゼ

親リパーゼは、配列番号:2に示すサーモミセス・ラヌギノサス (*T. lanuginosus*) の配列との同一性が50%以上のアミノ酸配列を有する真菌リパーゼでもよい。

たとえば親リパーゼは、本明細書中のDNA配列を基礎にして設計されたプローブを使用してタラロミセス (*Talaromyces*) 属又はサーモミセス (*Thermomyces*) 属、特にタラロミセス・サーモフィルス (*Talaromyces thermophilus*)、サーモミセス・イバダネンシス (*Thermomyces ibadanensis*)、タラロミセス・エメルソニル (*Talaromyces emersonii*) 又はタラロミセス・ピソクラミドイデス (*Talaromyces byssochlamydoides*) の菌株から取り出してよい。

40

【0007】

より詳細には、親リパーゼは下記の生物から単離された、表示のアミノ酸配列を有するリパーゼでもよい。対応する遺伝子を含む大腸菌 (*Escherichia coli*) 株はブダペスト条約に基づきDSMZに次のとおり寄託した:

【0008】

【表1】

表1

ソース生物	遺伝子とポリペプチドの配列	クローン寄託番号	寄託年月日
サーモシス・ラヌギノサス(T. lanuginosus) DSM 4109	配列番号:1 & 2		
テロモシス・サーモフィルス(T. thermophilus) ATCC 10518	配列番号:3 & 4	DSM14051	2001年2月8日
サーモシス・イバダネンシス(T. ibadanensis) CBS 281.67	配列番号:5 & 6	DSM14049	2001年2月8日
テロモシス・エメルソニル(T. emersonii) UAMH 5005	配列番号:7 & 8	DSM14048	2001年2月8日
テロモシス・ビソコリア・マイドイデス(T. Byssochlamydoidea) CBS 413.71	配列番号:9 & 10	DSM14047	2001年2月8日

【0009】

以上のソース生物は以下の菌株保存機構から商業ベースで自由に分譲が受けられる:
DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell-kulturen GmbH), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig DE

ATCC (American Type Culture Collection), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands.

UAMH(University of Alberta Herbarium & Culture Collection), Devonian Botanic Garden, Edmonton, Alberta, Canada, T6G 3G1.

【0010】

あるいは、親リパーゼは以上のうち任意のリパーゼのアミノ酸配列を改変することにより得られる変異体、特にWO 00/60063に記載の、又は本明細書で以下に記載する一次洗浄活性を有する変異体でもよい。

【0011】

C末端のペプチド延長鎖

本発明は親リパーゼのC末端アミノ酸への(たとえば配列番号:2に示すサーモシス・ラヌギノサス(T. lanuginosus)リパーゼのL269への)、ペプチド結合によるペプチド延長鎖の付加を提供する。このペプチド延長鎖は部位指定又はランダム突然変異誘発で付加してもよい。

C末端のペプチド延長鎖は2~15個のアミノ酸残基、特に2~11個又は3~10個たとえば2、3、4、5、7、9又は11個の残基からなってもよい。

【0012】

延長鎖は特に(本来のC末端から数えた)表示された位置に次の残基を有してもよい:

- ・ 第1位に負荷電アミノ酸残基(E又はDなど)
- ・ 第2位及び/又は第3位に小さな非荷電アミノ酸残基(S、T、V又はLなど)、及び/又は
- ・ 第3~7位、特に第4、5又は6位に、正荷電アミノ酸残基(H又はKなど)。

ペプチド延長鎖はHTPSSGRGGR、又はその短縮形たとえばHTPSSGRGG、HTPSSGR、HTPSS又はHTPでもよい。他の例はKV、EST、LVY、RHT、SVF、SVT、TAD、TPA、AGVF及びPGLPFKRVなどである。

【0013】

ペプチド延長鎖は、親ポリペプチドをコードするベクター(プラスミド)とC末端からアミノ酸2~15個分の延長鎖に対応する終止コドンを含むオリゴヌクレオチドとを使用して突然変異誘発法によって付加してもよい。C末端と終止コドンの間のヌクレオチドはランダムでよいし、前述のアミノ酸の側に偏ってもよい。これを行う1つの方法は、所望のランダム突然変異を含むと同時に目的遺伝子の3末端とのハイブリダイゼーションに必要な配列を有するDNAオリゴを設計することであろう。このDNAオリゴは、(周知の)逆方向DNA鎖とハイブリダイズしうるオリゴと共にPCRに使用する。次いでPCR断片を所望の場合(発現ベクター)にクローニングする。

【0014】

長鎖/短鎖特異性の増大

本発明のリパーゼは親酵素に比して長鎖/短鎖特異性が大きくても[たとえば長鎖(C_{16} - C_{20})トリグリセリドに対する活性と短鎖(たとえば C_4 - C_8)トリグリセリドに対する活性の比が大きくても]よい。これは基質としてのオリブ油のSLUと基質としてのトリブチリンのLUの比として測定されよう(測定方法については後述)。

【0015】

アルカリ性/中性活性比の増大

本発明のリパーゼは親酵素に比してアルカリ性/中性活性比すなわちアルカリ性pH (たとえばpH 9~10)でのリパーゼ活性の中性pH (pH 7程度)での活性に対する比が大きくてもよい。これは後述のように基質としてのトリブチリンを使用して測定されよう。

【0016】

正荷電アミノ酸による置換

親リパーゼは、配列番号:2のE1又はQ249に対応する位置付近の非荷電又は負荷電アミノ酸の正荷電アミノ酸による1又は複数(たとえば2~4、特に2)の置換を含んでもよい。正荷電アミノ酸はK、R又はHでもよい。非荷電又は負荷電アミノ酸は他の任意のアミノ酸でよい。

【0017】

前記置換は、配列番号:2のE1又はQ249から15 以内の立体構造表面に、たとえば位置1~11、90、95、169、171~175、192~211、213~226、228~258又は260~262のいずれかに対応する位置に存在する。

前記置換は、E1又はQ249から10 以内、たとえば位置1~7、10、175、195、197~202、204~206、209、215、219~224、230~239又は242~254のいずれかに対応する位置に存在してもよい。

【0018】

前記置換は、E1から15 以内、たとえば位置1~11、169、171、192~199、217~225、228~240、243~247、249、261~262のいずれかに対応する位置に存在してもよい。

前記置換は、最も好ましくはE1から10 以内、たとえば位置1~7、10、219~224及び230~239のいずれかに対応する位置に存在する。

たとえば、若干の特定の置換はS3R、S224R、P229R、T231R、N233R、D234R及びT224Rに対応する。

【0019】

位置90~101及び210のアミノ酸

親リパーゼは特に、位置90~101及び210の荷電アミノ酸に対する特定の制限条件を満たす場合もある。この電荷制限を満たすリパーゼは陰イオン分が高い洗剤に特に有効である。たとえばアミノ酸210は負荷電でもよい。E210は不変のままでも、又は置換体E210D/C/Y特にE210Dでもよい。

前記リパーゼは位置90~101 (特に94~101)のうちの任意の位置たとえばD96及び/又はE99に負荷電アミノ酸を含んでもよい。

【0020】

さらに、前記リパーゼは位置N94に非荷電又は負荷電アミノ酸すなわちN94 (非荷電又は負

10

20

30

40

50

荷電)たとえばN94N/D/Eを含んでもよい。

また、前記リパーゼは領域90～101（特に94～101）の正味電荷が負又は中立でもよい、すなわち「負荷電アミノ酸の数」が「正荷電アミノ酸の数」と同じか又は大きくてもよい。たとえば、前記領域はLipolaseのまま無変化で、2個の負荷電アミノ酸(D96とE99)と1個の正荷電アミノ酸(K98)を有してもよく、1個の非荷電アミノ酸(N94)を有してもよく、あるいは1又は複数の置換を含んでもよい。

【0021】

あるいは3個のアミノ酸N94、N96及びE99のうち2個が負の又は無変化の電荷を有してもよい。従って3アミノ酸がすべて無変化のままでもよいし、保存的置換又は負荷電置換により変化してもよい、すなわちN94(非荷電又は負荷電)、D(負荷電)及びE99(負荷電)となつてもよい。例はN94D/E及びD96Eである。

10

さらに3個のアミノ酸N94、N96及びE99のうち1個が置換により電荷を増して、N94(正荷電)、D96(非荷電又は正荷電)又はE99(非荷電又は正荷電)となってもよい。例はN94K/R、D96I/L/N/S/W又はE99N/Q/K/R/Hである。

【0022】

親リパーゼは、E99Kに対応する置換と位置99～101に対応する領域内の1負荷電アミノ酸たとえばD96D/Eとを含んでもよい。

非荷電アミノ酸の負荷電アミノ酸による置換(N94D/DE)は陰イオン洗剤の性能を向上させよう。非荷電アミノ酸の正荷電アミノ酸による置換(N94K/R)は陰イオン洗剤と陰イオン/非イオン洗剤(全界面活性剤中の陰イオン比率がたとえば40～70%の洗剤)の両方で優れた性能を発揮する変異体リパーゼをもたらすであろう。

20

【0023】

他位置のアミノ酸

親リパーゼは随意に他アミノ酸の置換を、特に10個未満又は5個未満のそうした置換を含んでもよい。例は配列番号:2中のQ249R/K/H、R209P/S及びG91Aに対応する置換である。周知の原理に従ってさらなる置換たとえばWO 92/05249、WO 94/25577、WO 95/22615、WO 97/04079及びWO 97/07202に記載の置換を行ってもよい。

【0024】

親リパーゼ変異体

親リパーゼは、配列番号:2に、G91G/A+E99E/D/R/K+ T231T/S/R/K+N233N/Q/R/K+Q249Q/N/R/Kに対応する置換を含んでもよい。若干の具体例は下記に対応する置換を含む変異体である:

30

【0025】

【表2】

表 2

T231R+N233R
D96L+ T231R+N233R
G91A+E99K+ T231R+N233R+Q249R
R209P+ T231R+N233R
E87K+G91D+D96L+G225P+ T231R+N233R+Q249R+N251D
G91A+E99K+T189G+ T231R+N233R+Q249R
D102G+ T231R+N233R+Q249R
N33Q+N94K+D96L+ T231R+N233R+Q249R
N33Q+D96S+ T231R+N233R+Q249R
N33Q+D96S+V228I+ T231R+N233R+Q249R
D62A+S83T+G91A+E99K+ T231R+N233R+Q249R
E99N+N101S+ T231R+N233R+Q249R
R84W+G91A+E99K+ T231R+N233R+Q249R
V60G+D62E+G91A+E99K+ T231R+N233R+Q249R
E99K+ T231R+N233R+Q249R
T231R+N233R+Q249R

10

20

【 0 0 2 6 】

アミノ酸改変の命名法

本書で突然変異の識別に使用した命名法は基本的にWO 92/05249に準拠している。たとえばT231Rは位置231におけるTがRにより置換されていることを表わす。

30

270PGLPFKRVは配列番号:2のC末端(L269)に付加したペプチド延長鎖を表わす。

【 0 0 2 7 】

アミノ酸のグループ分け

本明細書ではアミノ酸を、洗剤で一般的なpH 10での電荷をもとに負荷電、正荷電又は非荷電(電気的中性)に区分する。たとえば負荷電アミノ酸はE、D、C(システイン)及びY特にEとDである。正荷電アミノ酸はR、K及びH特にRとHである。非荷電アミノ酸はG、A、V、L、I、P、F、W、S、T、M、N、Q及びジスルフィド結合の一部としてのCである。同じグループ(負荷電、正荷電又は非荷電)内の他アミノ酸による置換は保存的置換という。

非荷電アミノ酸は疎水性又は非極性(G、A、V、L、I、P、F、W及びジスルフィド結合の一部としてのC)と親水性又は極性(S、T、M、N、Q)に分けてもよい。

40

【 0 0 2 8 】

アミノ酸の同一性

親リパーゼはサーモミセス・ラヌギノサス(T. lanuginosus)リパーゼ(配列番号:2)とのアミノ酸同一性が50%以上、特に55%以上、60%以上、75%以上、85%以上、90%以上、95%超又は98%超である。

この同一性は周知のコンピュータープログラムたとえばGCGプログラムパッケージ(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)(Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. 1970, Journal of Molecular Biology, 48, 443-45)中のGAPを用いて、ポリペプチド配列比較のための設定をギャップ挿入ペナルティ=3.0、ギャップ延長ペナルティ

50

ー0.1として決定するのが適当であろう。

【0029】

アミノ酸配列のアラインメント

本明細書では配列番号:2を基準にしてアミノ酸残基を識別する。他リパーゼ配列中の対応位置を求めるには、GAPアラインメントを用いて配列番号:2に該配列を合わせる。GAPはGC Gプログラムパッケージ(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)(Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. 1970, Journal of Molecular Biology, 48, 443-45)に入っている。ポリペプチド配列比較には次の設定を用いる:ギャップ挿入ペナルティー3.0、ギャップ延長ペナルティー0.1。

10

【0030】

DNA配列、発現ベクター、宿主細胞、リパーゼの産生

本発明は本発明のリパーゼをコードするDNA配列、該DNA配列を収めた発現ベクター、及び該DNA配列又は発現ベクターを導入した形質転換宿主細胞を提供する。これらは周知の方法により得られよう。

本発明はまた、リパーゼの産生につながるような条件下で形質転換宿主細胞を培養し培養液からリパーゼを回収することによりリパーゼを生産する方法を提供する。該方法は周知の原理に従って実行されよう。

【0031】

リパーゼ活性

20

中性及びアルカリ性pHでのトリブチリンに対するリパーゼ活性 (単位: LU7及びLU9)
アラビアゴムを乳化剤としてトリブチリン(グリセリントリブチラート)を乳化し、リパーゼの基質を調整する。pHスタット滴定試験で30、pH7又は9でのトリブチリンの加水分解を追跡する。1単位のリパーゼ活性(1 LU7又は1 LU9)はpH7又は9で1 μ mol 酪酸毎分を遊離しうる酵素量に等しい。LU7は単にLUともいう。

中性及びアルカリ性pHでの相対リパーゼ活性はLU9/LU7として表示されよう。これは2.0以上であろう。

【0032】

トリオレインに対するリパーゼ活性(単位: SLU)

安定化オリーブ油乳濁液(Sigmaカタログ番号800-1)を基質として、40mM NaClと5mM塩化カルシウムとを添加した5mMトリス緩衝液中でリパーゼ活性を30、pH9で測定する。2.5mlの基質を12.5mlの緩衝液と混合し、pHを9に調整し、0.5mlの希釈リパーゼ試料を添加し、オレイン酸形成量をpHスタット滴定試験で追跡する。

30

【0033】

1 SLUはこれらの条件下で1 μ mol 滴定可能オレイン酸毎分を遊離するリパーゼ量である。本発明のリパーゼは特に少なくとも4000又は5000 SLU/mg-酵素タンパク質の活性を有するであろう。

アルカリ性pHでのトリグリセリドの長鎖及び短鎖アシル結合に対する相対活性はSLU/LU9比として表示されよう。SLU/LU9は2.0以上、3.0以上又は4.0以上であろう。

【0034】

40

一次洗浄効果

リパーゼの一次洗浄効果は次の要領で測定する:

Style 400綿布を95 の脱イオン水で洗濯し、9×9cmの小切れにカットする。各小切れの中心に50 μ lのラード/スーダンレッド(0.75mg-色素/g-ラード)を付着させ、この汚染小切れを70 で25分間加熱処理し、一晚置く。7枚の汚染小切れを、硬度15° dH ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 4:1)の水に試験洗剤4g/Lを溶かした1000mlの洗浄液(30)によりTerg-0-Tometer洗浄試験用洗濯機で20分間洗濯し、次いで水道水で15分間すすぎ洗いし、一晚干す。

【0035】

洗浄液へのリパーゼ添加量は0.25mg-酵素タンパク質/Lとする。コントロール洗浄液はリパーゼ無添加で調製する。

50

一次洗浄サイクル後に460nmでの反射率を測定して汚れ落ちを評価し、その結果を、同じ条件で、ただしリパーゼ無添加で洗浄したブランクの反射率を差し引いて ΔR として表示する。

【0036】

試験洗剤

【表3】

表3

本明細書で使用した試験洗剤の組成は次のとおりである(単位は重量%):

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、 $C_{10}-C_{13}$	12.6
アルキル硫酸塩、 $C_{16}-C_{18}$	3.2
脂肪酸、 $C_{16}-C_{18}$ 、18:2	0.9
アルコールエトキシラート、 $C_{12}-C_{18}$ 、6.7 EO	13.2
ゼオライト	35.2
炭酸ナトリウム	1.2
炭酸水素ナトリウム	1.3
ケイ酸ナトリウム	4.8
硫酸ナトリウム	1.9
四ホウ酸ナトリウム	2.7
リン酸塩[1-ヒドロキシエタン-1,2-ジイルビス(ホスホン酸)]	0.1
過ホウ酸ナトリウム一水和物	11.2
テトラアセチルエチレンジアミン(TAED)	6.3
Copoly(アクリル酸/マレイン酸)	4.3
SRP(防汚性ポリマー)	1.2

【0037】

洗剤添加剤

本発明のリパーゼは一般に洗剤組成物に添加剤として使用されよう。この添加剤は非飛散型顆粒、安定化液、懸濁液又は被防護酵素などとして調製すると好都合である。その調製法は周知である。

【0038】

洗剤組成物

本発明の洗剤組成物はたとえば洗濯用添加剤組成物や汚れた布地の前処理用組成物を含めた手洗い及び機械洗い用洗濯洗剤組成物、すすぎ洗い用柔軟剤組成物、及び家庭用硬質表面クリーニング・食器洗い用組成物などとして調製してもよい。

【0039】

本発明の洗剤組成物は本発明のリパーゼと界面活性剤とを含む。また随意に、ビルダー、別の酵素、泡止め剤、柔軟剤、色移り防止剤、及び洗剤に通常使用される他の成分たとえば汚れ懸濁剤、汚れ遊離剤、蛍光増白剤、研磨剤、殺菌剤、変色防止剤、色素剤、及び/又はカプセル入り又は非カプセル入り香料などを含んでもよい。

【 0 0 4 0 】

本発明の洗剤組成物は液体、ペースト、ゲル、バー、タブレット又は顆粒タイプとすることができる。pH(使用濃度の水溶液で測定)は通常、中性又はアルカリ性たとえば7~11特に9~11であろう。本発明の顆粒状組成物は「コンパクトタイプ」でもよい、すなわち550~950g/lという通常の顆粒状洗剤よりも高密度にしてもよい。

【 0 0 4 1 】

本発明のリパーゼ又は随意に別のリパーゼ(酵素タンパク質)の洗剤組成物中の含量は通常、組成物重量の0.00001%~2%、好ましくは0.0001%~1%、なお好ましくは0.001%~0.5%、さらになお好ましくは0.01%~0.2%である。

本発明の洗剤組成物は1~5,000 LU/g-洗剤、好ましくは2~500 LU/gたとえば10~100LU/gに相当する量のリパーゼを含んでもよい。洗剤は水に溶かして、2.5~1,500 LU/リットル-洗浄液特に10~500 LU/lたとえば30~200 LU/lに相当する量のリパーゼを含む洗浄液としてもよい。リパーゼタンパク質の量は0.001~10 mg/g-洗剤又は0.001~100 mg/l-洗浄液としてもよい。

【 0 0 4 2 】

界面活性剤系は非イオン、陰イオン、陽イオン、両性、及び/又は双性イオン界面活性剤を含んでもよい。前述のように、本発明のリパーゼ変異体は陰イオン界面活性剤70~100重量%と非イオン界面活性剤0~30重量%の、特に陰イオン界面活性剤80~100重量%と非イオン界面活性剤0~20重量%の混合物を含む洗剤に特に好適である。さらに前述のように、本発明のある種の好ましいリパーゼは40~70%の陰イオン界面活性剤と30~60%の非イオン界面活性剤とを含む洗剤にも好適である。界面活性剤の含量は一般に0.1~60重量%、たとえば1~40重量%特に10~40重量%、好ましくは約3~約20重量%である。以下、界面活性剤の若干例を挙げる。

【 0 0 4 3 】

陰イオン界面活性剤の例はアルキル硫酸塩、アルキルエトキシスルファート、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルアルコキシル化硫酸塩などである。

非イオン界面活性剤の例は酸化ポリアルキレン(たとえば酸化ポリエチレン)、アルキルフェノール縮合物、第一級及び第二級脂肪族アルコールの酸化エチレンとの縮合生成物、アルキルフェノールの酸化ポリエチレン縮合物、第一級及び第二級脂肪族アルコールの縮合生成物、アルキル多糖類、アルキルフェノールエトキシラート及びアルコールエトキシラートなどである。

さらに詳細には、本発明のリパーゼはWO 97/04079、WO 97/07202、WO 97/41212、WO 98/08939及びWO 97/43375で開示されている洗剤組成物に使用してもよい。

【 0 0 4 4 】

実施例実施例1. C末端ライブラリーを使用したリパーゼ変異体の調製ライブラリーの創出

目的はC末端に3個の追加アミノ酸を付加することであった。C末端上の追加アミノ酸は短鎖トリグリセリドに対する活性に比して長鎖グリセリドに対する活性を増し、またpH10での活性に比してpH7での活性を妨げ、もって洗剤中のリパーゼに起因する臭いを洗濯中及び洗濯後に減じる可能性がある。

【 0 0 4 5 】

配列番号:2に示すアミノ酸配列に、置換G91A+E99K+T231R+ N233R+Q249Rを導入したリパーゼをコードする遺伝子でプラスミドpENi1576を構築した。

pENi1576を鋳型とし、オリゴ19671及び991222j1 (配列番号: 11及び12)及びPWOポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)を用いて全量10 µlの反応液中でPCR反応を行った。オリゴ99122j1はC末端に3個の追加アミノ酸を付加する。

PCR断片をBioradカラムで精製し、BamHI/SacIIで切断した。

プラスミドpENi1861をBamHI/SacIIで切断した。

【 0 0 4 6 】

PCR断片とプラスミドベクターを1%ゲルから精製した。

ベクターとPCR断片を一晩ライゲートし、大腸菌 (E. coli) 株DH10Bに電気穿孔法で導入して123,000個の独立大腸菌 (E. coli) 形質転換体を生成した。

10個の独立クローンを配列解析すると、満足な多様性を示すことが判明した。

すべてのクローンからDNAを調製した。

【 0 0 4 7 】

Aspergillusの形質転換とスクリーニング

約5 µgのDNAプラスミドを(WO 00/24883に記載の)Jal355に導入した。PEGを加えて20分間インキュベートした後、プロトプラストを(CaCl₂の除去を目的に)1.2Mソルビトール、10mMトリスpH7.5で2回洗った。

プロトプラストをアルギン酸塩溶液(1.5%アルギン酸塩、1%デキストラン、1.2Mソルビトール、10mMトリスpH7.5)に混ぜた。ポンプ(Ole Dich 110ACR.80G38.CH5A)を使用して、このアルギン酸塩溶液を15cmの高さからCaCl₂溶液(1.2Mソルビトール、10mMトリスpH7.5、0.2M CaCl₂)中に滴下した。これによりおよそ2個に1個の割合で1個の形質転換プロトプラストを収めた径2.5mm程度のビーズが形成され、55,000個程度の形質転換体が生成した。

【 0 0 4 8 】

形成後のビーズを1.2Mソルビトール、10mMトリスpH7.5、10mM CaCl₂に移し、30 で一晩培養した。ビーズを滅菌水で2回洗った後、1×ボーゲル培地(炭素源なし。炭素源はアルギン酸塩ビーズ中にデキストランとして既に存在)に移し、30 で一週間培養した。一週間培養後ビーズを、TIDEとオリーブ油を添加したプレート(1g/Lアガロース、0.1MトリスpH 9.0、5mM CaCl₂、25ml/Lオリーブ油、1.4g/L TIDE、0.004%ブリリアントグリーン)に塗った。プレートを37 で一晩培養した。

【 0 0 4 9 】

384個の陽性ビーズを、各ウェルに150 µl 1×ボーゲルと2%マルトースとを入れた96穴マイクロタイタープレート×4に、移した。

プレートを34 で3日間培養した。

この培地をpH7.5での吉草酸PNP(p-ニトロフェノール)とパルミチン酸PNPに対する活性のスクリーニング検査にかけた。長鎖基質(パルミチン酸PNP)に対する最高活性及び短鎖基質(吉草酸PNP)に対する低活性を有する64個のクローンを小プレート上で単離し、そこから各ウェルに200 µl 1×ボーゲルと2%マルトース入れた96穴マイクロタイタープレートに移した。

【 0 0 5 0 】

34 で3日間培養後、培地を再びpH7.5での吉草酸PNPとパルミチン酸PNPに対する活性並びにpH10でのパルミチン酸PNPに対する活性のスクリーニング検査にかけた。

10個のクローンがpH10でのパルミチン酸PNPに対する高活性とpH7.5での吉草酸PNPに対する低活性を示した。

1個の変異体は偶然にもDNAオリゴに欠失が生じたために、C末端に3個ではなく11個の追加アミノ酸残基が付加された。

【 0 0 5 1 】

1回目陽性と判明した変異体

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270SVT

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270TPA

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270SVF

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSSGRGGHR

【 0 0 5 2 】

アスペルギルス (Aspergillus) の形質転換及びスクリーニング手順を再び繰り返し、以下の変異体を陽性と判定した:

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270LVY

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270EST

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270KV
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270RHT
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270TAD

【 0 0 5 3 】

実施例2．臭気と洗浄効果の評価

配列番号:2に由来する以下のリパーゼ変異体を評価した:

N94K+D96L+T231R+N233R+Q249R+270PGLPFKRV
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270AGVF
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSSGRGGHR
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSSGRGG
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSSGR
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSS
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTP
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270SVF
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270LVY
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270EST
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270RHT
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270TAD

10

20

【 0 0 5 4 】

ラード/スーダンレッドとバター/スーダンレッドという異なる汚れを付着させた綿布の小切れを対象に洗浄試験を実施した。ラード汚染小切れとバター汚染小切れを25分間70℃に加熱し、一晩置いた。これらの汚染小切れを、硬度15° dHの水に試験洗剤4g/Lを溶かした洗浄液(30℃)によりTerg-0-Tometer洗浄試験用洗濯機で20分間洗濯し、次いで水道水で15分間すすぎ洗いし、一晩干した。

洗浄液へのリパーゼ変異体添加量は0.25又は1.0 mg-酵素タンパク質/リットルとした。リパーゼ変異体無添加でコントロール洗浄液を調製し、またペプチド延長鎖を欠く同一アミノ酸配列のリパーゼ変異体で基準実験を行った。

【 0 0 5 5 】

小切れの二次洗浄はリパーゼ無添加で行った。

以下の要領で洗浄効果を評価した:

- ・ 洗浄後のバター汚染小切れを検査時まで密閉バイアルに保存しておき、臭気発生をパネル官能検査で評価した。
- ・ 洗浄効果は一次又は二次洗浄後のラード汚染小切れの反射率を測定して評価した。いずれの変異体もこの1サイクル洗浄試験で有意の効果を示した。
- ・ 効果/弊害比を「ラード汚染小切れに関する一次又は二次洗浄効果」÷「バター汚染小切れに関する臭気」として計算した。効果/弊害比の改善は、基準より高レベルでリパーゼを使用すれば臭気を抑えながら基準と同レベルの効果があげられることを示唆する。試験した変異体はいずれも、同じリパーゼC末端にペプチド延長鎖の付加がないものと比較して臭気発生の低減及び/又は効果/弊害比の改善を示した。

30

40

【 0 0 5 6 】

実施例3．一次洗浄効果、アルカリ性/中性pHでの活性、長鎖/短鎖活性

配列番号:2に由来する以下のリパーゼ変異体を評価した:

G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSSGRGGHR
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSSGRGG
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSSGR
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270HTPSS
 G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270EST

前述の要領で一次洗浄効果を評価したが、各リパーゼ変異体の反射率の増分(ΔR)は3.0を

50

上回ることが判明した。

リパーゼ活性は前述の方法によりLU7、LU9及びSLUとして測定した。各リパーゼ変異体はLU9/LU7比が2.0を上回り、またSLU/LU9比が2.0を上回ると判明した。

【 0 0 5 7 】

【表 4】

表 4

原本(提出用)－2002年2月7日午前09時30分02秒に作成

0-1	様式PCT/R0/134 (EASY)	
0-1-1	預託された微生物及び他生物材料に関する表示(PCT規則13bis) 作成に使用したソフトウェア	PCT-EASY Version 2.92 (アップデート01.01.2002)
0-2	国際出願番号	PC1/DK02/00084
0-3	出願人又は代理人の書類整理番号	10124-W0
1	以下の表示は本明細書中、下記の頁と行で言及している寄託された微生物及び他生物材料に関連する:	
1-1	頁	2
1-2	行	13-19
1-3	寄託の確認	
1-3-1	寄託機関名	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	寄託機関所在地	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	寄託年月日	2001年2月8日 (08.02.2001)
1-3-4	受託番号	DSMZ 14047
1-4	追加の表示	なし
1-5	表示を行う対象となる指定国	全指定国
1-6	別途提供の表示 これらの表示は後日、国際事務局に提出される。	なし
2	以下の表示は本明細書中、下記の頁と行で言及した寄託微生物及び他生物材料に関連する:	
2-1	頁	2
2-2	行	13-19

【 0 0 5 8 】

【表 5】

表 5

2-3	寄託の確認	
2-3-1	寄託機関名	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	寄託機関所在地	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	寄託年月日	2001年2月8日 (08. 02. 2001)
2-3-4	受託番号	DSMZ 14048
2-4	追加の表示	なし
2-5	表示を行う対象となる指定国	全指定国
2-6	別途提供の表示 これらの表示は後日、国際事務局に提出される。	なし
3	以下の表示は本明細書中、下記の頁と行で言及した寄託微生物及び他生物材料に関連する:	
3-1	頁	2
3-2	行	13-19
3-3	寄託の確認	
3-3-1	寄託機関名	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
3-3-2	寄託機関所在地	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
3-3-3	寄託年月日	2001年2月8日 (08. 02. 2001)
3-3-4	受託番号	DSMZ 14049
3-4	追加の表示	なし
3-5	表示を行う対象となる指定国	全指定国
3-6	別途提供の表示 これらの表示は後日、国際事務局に提出される。	なし

10

20

30

【 0 0 5 9 】

【 表 6 】

表 6

4	以下の表示は本明細書中、下記の頁と 行で言及した寄託微生物及び他生物材 料に関連する：	
4-1	頁	3
4-2	行	13-19
4-3	寄託の確認	
4-3-1	寄託機関名	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mi kroorganismen und Zell-kultur en GmbH
4-3-2	寄託機関所在地	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
4-3-3	寄託年月日	2001年2月8日 (08. 02. 2001)
4-3-4	受託番号	DSMZ 14051
4-4	追加の表示	なし
4-5	表示を行う対象となる指定国	全指定国
4-6	別途提供の表示 これらの表示は後日、国際事務局に提 出される。	なし
受理官庁専用欄		
0-4	本様式は国際出願と併せて受理した： (yes or no)	Yes
0-4-1	担当官	署名
国際事務局専用欄		
0-5	本様式は国際事務局が に受理した	
0-5-1	担当官	

10

20

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novozymes A/S

<120> Lipolytic enzymes

<130> 10130

<160> 12

10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 918

<212> DNA

<213> Thermomyces lanuginosus

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(873)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(66)

<223>

30

<220>

<221> mat_peptide

<222> (67)..()

<223>

<400> 1

atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

48

gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc Ala Ser -5 Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe 10	96	
aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn 15 20 25	144	
gat gcc cca gct ggt aca aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro 30 35 40	192	
gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser 45 50 55	240	
gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys 60 65 70	288	10
ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile 75 80 85 90	336	
ggg aat ctt aac ttc gac ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly 95 100 105	384	
tgc agg gga cat gac ggc ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp 110 115 120	432	
acg tta agg cag aag gtg gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr 125 130 135	480	20
cgc gtg gtg ttt acc gga cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val 140 145 150	528	
gcc gga gca gac ctg cgt gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser 155 160 165 170	576	
tat ggc gcc ccc cga gtc gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr 175 180 185	624	
gta cag acc ggc gga aca ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile 190 195 200	672	
gtc cct aga ctc ccg ccg cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro 205 210 215	720	30
gag tac tgg atc aaa tct gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp 220 225 230	768	
atc gtg aag ata gaa ggc atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro 235 240 245 250	816	
aac att ccg gat atc cct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly 255 260 265	864	

aca tgt ctt tagtggccgg cgcggtggg tccgactcta gcgagctcga gatct
 Thr Cys Leu

918

<210> 2

<211> 291

<212> PRT

<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 2

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

10

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 -5 -1 1 5 10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 15 20 25

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 30 35 40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 45 50 55

20

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
 75 80 85 90

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
 95 100 105

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 110 115 120

30

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 140 145 150

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 175 180 185

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 205 210 215

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 220 225 230

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 235 240 245 250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
 255 260 265

10

Thr Cys Leu

<210> 3

<211> 1083

<212> DNA

<213> Talaromyces thermophilus

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(67)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (139)..(307)

<223>

30

<220>

<221> CDS

<222> (370)..(703)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (778)..(1080)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (67)..()

<223>

10

<400> 3

atg agg agc tcg ctc gtg ctg ttc ttc gtt tct gcg tgg acg gcc ttg 48
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

gcc agt cct gtc cga cga g gtatgtaaata cacgggggtat acttttcatg 97
 Ala Ser Pro Val Arg Arg
 -5 -1

cattgcatgt cgaacctgct gtactaagat tgcgcgcaca g ag gtc tcg cag gat 152
 Glu Val Ser Gln Asp
 5

ctg ttt gac cag ttc aac ctc ttt gcg cag tac tcg gcg gcc gca tac 200
 Leu Phe Asp Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr
 10 15 20

20

tgc gcg aag aac aac gat gcc ccg gca ggt ggg aac gta acg tgc agg 248
 Cys Ala Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Gly Asn Val Thr Cys Arg
 25 30 35

gga agt att tgc ccc gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac 296
 Gly Ser Ile Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr
 40 45 50

tcg ttt gag ga gtaggtgtca acaagagtac aggcacccgt agtagaaata 347
 Ser Phe Glu Asp
 55

gcagactaac tgggaaatgt ag t tct gga gtt ggc gat gtc acc ggg ttc 397
 Ser Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe
 60 65

ctt gct ctc gac aac acg aac aga ctg atc gtc ctc tct ttc cgc ggc 445
 Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Arg Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly
 70 75 80

30

tct cgt tcc ctg gaa aac tgg atc ggg aat atc aac ttg gac ttg aaa 493
 Ser Arg Ser Leu Glu Asn Trp Ile Gly Asn Ile Asn Leu Asp Leu Lys
 85 90 95

gga att gac gac atc tgc tct ggc tgc aag gga cat gac ggc ttc act 541
 Gly Ile Asp Asp Ile Cys Ser Gly Cys Lys Gly His Asp Gly Phe Thr
 100 105 110

tcc tcc tgg agg tcc gtt gcc aat acc ttg act cag caa gtg cag aat 589
 Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asn Thr Leu Thr Gln Gln Val Gln Asn
 115 120 125 130

gct gtg agg gag cat ccc gac tac cgc gtc gtc ttc act ggg cac agc 637

Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser 135 140 145		
ttg ggt ggt gca ttg gca act gtg gcc ggg gca tct ctg cgt gga aat Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Ser Leu Arg Gly Asn 150 155 160	685	
ggg tac gat ata gat gtg gtatgttagga aaaatgatcc ccgtggagcg Gly Tyr Asp Ile Asp Val 165	733	
gtcatgtgga aatgtgcagg ggtgtctaata acacagacca acag ttc tca tat ggc Phe Ser Tyr Gly 170	789	
gct ccc cgc gtc gga aac agg gct ttt gcg gaa ttc ctg acc gca cag Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Ala Gln 175 180 185	837	10
acc ggc ggc acc ttg tac cgc atc acc cac acc aat gat att gtc ccc Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro 190 195 200	885	
aga ctc ccg cca cgc gaa ttg ggt tac agc cat tct agc cca gag tat Arg Leu Pro Pro Arg Glu Leu Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr 205 210 215 220	933	
tgg atc acg tct gga acc ctc gtc cca gtg acc aag aac gat atc gtc Trp Ile Thr Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Lys Asn Asp Ile Val 225 230 235	981	
aag gtg gag ggc atc gat tcc acc gat gga aac aac cag cca aat acc Lys Val Glu Gly Ile Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Pro Asn Thr 240 245 250	1029	20
ccg gac att gct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tca atg gcg acg tgt Pro Asp Ile Ala Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Ser Met Ala Thr Cys 255 260 265	1077	
ttg taa Leu	1083	
<210> 4		
<211> 291		
<212> PRT		
<213> Talaromyces thermophilus		30
<400> 4		
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu -20 -15 -10		
Ala Ser Pro Val Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asp Gln Phe -5 -1 1 5 10		
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ala Lys Asn Asn 15 20 25		

Asp Ala Pro Ala Gly Gly Asn Val Thr Cys Arg Gly Ser Ile Cys Pro
30 35 40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
45 50 55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Arg
60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Leu Glu Asn Trp Ile
75 80 85 90

Gly Asn Ile Asn Leu Asp Leu Lys Gly Ile Asp Asp Ile Cys Ser Gly
95 100 105

10

Cys Lys Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asn
110 115 120

Thr Leu Thr Gln Gln Val Gln Asn Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
140 145 150

Ala Gly Ala Ser Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155 160 165 170

20

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
175 180 185

Ala Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Leu Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
205 210 215

Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Lys Asn Asp
220 225 230

Ile Val Lys Val Glu Gly Ile Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Pro
235 240 245 250

30

Asn Thr Pro Asp Ile Ala Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Ser Met Ala
255 260 265

Thr Cys Leu

<210> 5

<211> 1070

<212> DNA

<213> *Thermomyces ibadanensis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(67)

<223>

<220>

10

<221> CDS

<222> (128)..(296)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (357)..(690)

<223>

20

<220>

<221> CDS

<222> (765)..(1067)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (67)..()

<223>

30

<400> 5

atg	cgg	agc	tcc	ctc	gtg	ctg	ttc	ttc	ctc	tct	gcg	tgg	acg	gcc	ttg	48
Met	Arg	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Ala	Trp	Thr	Ala	Leu	
		-20					-15					-10				

gcg	cgg	cct	gtt	cga	cga	g	gtatgtagca	aggacacta	ttacatgttg	97
Ala	Arg	Pro	Val	Arg	Arg					
	-5			-1						

accttggtga	ttctaagact	gcatgcgcag	cg	gtt	ccg	caa	gat	ctg	ctc	gac	150
			Ala	Val	Pro	Gln	Asp	Leu	Leu	Asp	
						5					

cag ttt gaa ctc ttt tca caa tat tcg gcg gcc gca tac tgt gcg gca Gln Phe Glu Leu Phe Ser Val Gln Tyr Ser Ala Ala Tyr Cys Ala Ala 10 15 20	198	
aac aat cat gct cca gtg ggc tca gac gta acg tgc tcg gag aat gtc Asn Asn His Ala Pro Val Gly Ser Asp Val Thr Cys Ser Glu Asn Val 25 30 35 40	246	
tgc cct gag gta gat gcg gcg gac gca acg ttt ctc tat tct ttt gaa Cys Pro Glu Val Asp Ala Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu 45 50 55	294	
ga gtgggtgtcg acaaagcaca gagacagtag tagagacagc agtctaactg Asp	346	
agatgtgcag t tct gga tta ggc gat gtt acc ggc ctt ctc gct ctc gac Ser Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Leu Leu Ala Leu Asp 60 65 70	396	10
aac acg aat aaa ctg atc gtc ctc tct ttc cgc ggc tct cgc tca gta Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Val 75 80 85	444	
gag aac tgg atc gcg aac ctc gcc gcc gac ctg aca gaa ata tct gac Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Ala Asp Leu Thr Glu Ile Ser Asp 90 95 100	492	
atc tgc tcc ggc tgc gag ggg cat gtc ggc ttc gtt act tct tgg agg Ile Cys Ser Gly Cys Glu Gly His Val Gly Phe Val Thr Ser Trp Arg 105 110 115	540	
tct gta gcc gac act ata agg gag cag gtg cag aat gcc gtg aac gag Ser Val Ala Asp Thr Ile Arg Glu Gln Val Gln Asn Ala Val Asn Glu 120 125 130	588	20
cat ccc gat tac cgc gtg gtc ttt acc gga cat agc ttg gga ggc gca His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala 135 140 145 150	636	
ctg gca act att gcc gca gca gct ctg cga gga aat gga tac aat atc Leu Ala Thr Ile Ala Ala Ala Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asn Ile 155 160 165	684	
gac gtg gtatgtggga agaagccacc cagacaaaca attatgtgga aacatgcaag Asp Val	740	
gatggctaata acacgggtcca acag ttc tca tat ggc gcg ccc cgc gtc ggt Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly 170 175	791	
aac agg gca ttt gca gaa ttc ctg acc gca cag acg ggc ggc acc ctg Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Ala Gln Thr Gly Gly Thr Leu 180 185 190	839	30
tat cgc atc acc cat acc aat gat atc gtc cct aga ctc cct cct cga Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg 195 200 205	887	
gac tgg ggt tac agc cac tct agc ccg gag tac tgg gtc acg tct ggt Asp Trp Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Val Thr Ser Gly 210 215 220 225	935	
aac gac gtc cca gtg acc gca aac gac atc acc gtc gtg gag ggc atc Asn Asp Val Pro Val Thr Ala Asn Asp Ile Thr Val Val Glu Gly Ile 230 235 240	983	

gat tcc acc gac ggg aac aac cag ggg aat atc cca gac atc cct tcg 1031
 Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Gly Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ser 255

cat cta tgg tat ttc ggt ccc att tca gag tgt gat tag 1070
 His Leu Trp Tyr Phe Gly Pro Ile Ser Glu Cys Asp 260 265

<210> 6

<211> 291

<212> PRT

<213> *Thermomyces ibadanensis*

10

<400> 6

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Leu Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

Ala Arg Pro Val Arg Arg Ala Val Pro Gln Asp Leu Leu Asp Gln Phe
 -5 -1 1 5 10

Glu Leu Phe Ser Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ala Ala Asn Asn
 15 20 25

His Ala Pro Val Gly Ser Asp Val Thr Cys Ser Glu Asn Val Cys Pro
 30 35 40

20

Glu Val Asp Ala Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 45 50 55

Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Leu Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Val Glu Asn Trp Ile
 75 80 85 90

Ala Asn Leu Ala Ala Asp Leu Thr Glu Ile Ser Asp Ile Cys Ser Gly
 95 100 105

30

Cys Glu Gly His Val Gly Phe Val Thr Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 110 115 120

Thr Ile Arg Glu Gln Val Gln Asn Ala Val Asn Glu His Pro Asp Tyr
 125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Ile
 140 145 150

Ala Ala Ala Ala Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asn Ile Asp Val Phe Ser
 155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 175 180 185
 Ala Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 190 195 200
 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Asp Trp Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 205 210 215
 Glu Tyr Trp Val Thr Ser Gly Asn Asp Val Pro Val Thr Ala Asn Asp
 220 225 230
 Ile Thr Val Val Glu Gly Ile Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Gly
 235 240 245 250
 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ser His Leu Trp Tyr Phe Gly Pro Ile Ser
 255 260 265
 Glu Cys Asp

10

<210> 7
 <211> 1064
 <212> DNA
 <213> *Talaromyces emersonii*

20

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(88)
 <223>

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (88)..()
 <223>

30

<220>
 <221> CDS
 <222> (142)..(310)
 <223>

<220>

<221> CDS

<222> (362)..(695)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (756)..(1061)

<223>

10

<400> 7

atg ttc aaa tcg gcc gct gtg cgg gcc att gct gcc ctc gga ctg act 48
 Met Phe Lys Ser Ala Ala Val Arg Ala Ile Ala Ala Leu Gly Leu Thr
 -25 -20 -15

gcg tca gtc ttg gct gct cct gtt gaa ctg ggc cgt cga g gtaaggaagc 98
 Ala Ser Val Leu Ala Ala Pro Val Glu Leu Gly Arg Arg
 -10 -5 -1

atgacggaga gaacaccctg tgcgacctgc tgacatcctt cag at gtt tct cag 152
 Asp Val Ser Gln

gac ctc ttc gac cag ctc aat ctt ttc gag cag tac tcg gcg gct gcg 200
 Asp Leu Phe Asp Gln Leu Asn Leu Phe Glu Gln Tyr Ser Ala Ala Ala
 5 10 15 20

20

tac tgt tca gct aac aat gag gcc tct gcc ggc acg gca atc tct tgc 248
 Tyr Cys Ser Ala Asn Asn Glu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Ile Ser Cys
 25 30 35

tcc gca ggc aat tgc ccg ttg gtc cag cag gct gga gca acc atc ctg 296
 Ser Ala Gly Asn Cys Pro Leu Val Gln Gln Ala Gly Ala Thr Ile Leu
 40 45 50

tat tca ttc aac aa gtgggtgtca cggaaaagat tgttgatacc aacatgttga 350
 Tyr Ser Phe Asn Asn

cggtgtgtca g c att ggc tct ggc gat gtg acg ggt ttt ctc gct ctc 398
 Ile Gly Ser Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu
 60 65

30

gac tcg acg aat caa ttg atc gtc ttg tca ttc cgg gga tca gag act 446
 Asp Ser Thr Asn Gln Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Glu Thr
 70 75 80 85

ctc gaa aac tgg atc gct gac ctg gaa gct gac ctg gtc gat gcc tct 494
 Leu Glu Asn Trp Ile Ala Asp Leu Glu Ala Asp Leu Val Asp Ala Ser
 90 95 100

gcc atc tgt tcc ggc tgt gaa gca cac gat ggg ttc ctt tca tcc tgg 542
 Ala Ile Cys Ser Gly Cys Glu Ala His Asp Gly Phe Leu Ser Ser Trp
 105 110 115

aat tca gtc gcc agc act ctg aca tcc aaa atc tcg tcg gcc gtc aac 590

Asn Ser Val Ala Ser Thr Leu Thr Ser Lys Ile Ser Ser Ala Val Asn 120 125 130		
gaa cat ccc agc tac aag ctg gtc ttc acc ggc cac agt ctc gga gcc Glu His Pro Ser Tyr Lys Leu Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Ala 135 140 145	638	
gcc ttg gct aca ctt gga gcc gtt tct ctt aga gag agc gga tat aat Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Val Ser Leu Arg Glu Ser Gly Tyr Asn 150 155 160 165	686	
att gac ctc gtaagtttcc ggcacgggcg tcgtcatcat cgagcggaaa Ile Asp Leu	735	
gactgaccgg ttaactgcag tac aat tat ggc tgc ccc cgg gtc ggt aac acc Tyr Asn Tyr Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Thr 170 175	788	10
gcg ctc gca gac ttc atc acc acg caa tcc gga ggc aca aat tac cgc Ala Leu Ala Asp Phe Ile Thr Thr Gln Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Arg 180 185 190 195	836	
gtc acg cat tcc gat gac cct gtc ccc aag ctg cct ccc agg agt ttt Val Thr His Ser Asp Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Pro Arg Ser Phe 200 205 210	884	
gga tac agc caa ccg agc cca gag tac tgg atc acc tca ggg aac aat Gly Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Asn 215 220 225	932	
gta act gtt caa ccg tcc gac atc gag gtc atc gaa ggc gtc gac tcc Val Thr Val Gln Pro Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Val Asp Ser 230 235 240	980	20
act gca ggc aac gac ggc acc cct gct ggc ctt gac att gat gct cat Thr Ala Gly Asn Asp Gly Thr Pro Ala Gly Leu Asp Ile Asp Ala His 245 250 255	1028	
cgg tgg tac ttt gga ccc att agc gca tgt tcg tga Arg Trp Tyr Phe Gly Pro Ile Ser Ala Cys Ser 260 265 270	1064	
<210> 8		
<211> 299		
<212> PRT		
<213> Talaromyces emersonii		30
<400> 8		
Met Phe Lys Ser Ala Ala val Arg Ala Ile Ala Ala Leu Gly Leu Thr -25 -20 -15		
Ala Ser Val Leu Ala Ala Pro val Glu Leu Gly Arg Arg Asp Val Ser -10 -5 -1 1		
Gln Asp Leu Phe Asp Gln Leu Asn Leu Phe Glu Gln Tyr Ser Ala Ala 5 10 15		

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

10

20

30

<210> 9

<211> 1074

<212> DNA

<213> Talaromyces byssochlamydoides

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(85)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (150)..(318)

<223>

10

<220>

<221> CDS

<222> (376)..(709)

<223>

20

<220>

<221> CDS

<222> (760)..(1071)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (85)..()

<223>

30

<400> 9

atg	ttc	aaa	tca	act	gtc	cgg	gcc	atc	gcc	gcc	ctc	gga	ctg	acc	tcg	48
Met	Phe	Lys	Ser	Thr	Val	Arg	Ala	Ile	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Thr	Ser	
		-25						-20					-15			

tca	gtc	ttt	gct	gct	cct	atc	gaa	ctg	ggc	cgt	cga	g	gtaaggggca	95
Ser	Val	Phe	Ala	Ala	Pro	Ile	Glu	Leu	Gly	Arg	Arg			
		-10				-5				-1				

tgaaaactcc	ctgtatggca	tctcatctgg	cagcatatct	actgacatcc	tcag	at	151
						Asp	

gtt tct gag cag ctc ttc aac cag ttc aat ctc ttc gag cag tat tcc Val Ser Glu Gln Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Glu Gln Tyr Ser 5 10 15	199	
gcg gct gcg tac tgt cca gcc aac ttt gag tcc gct tcc ggc gcg gca Ala Ala Ala Tyr Cys Pro Ala Asn Phe Glu Ser Ala Ser Gly Ala Ala 20 25 30	247	
att tct tgt tcc aca ggc aat tgc ccg ctc gtc caa cag gct ggc gca Ile Ser Cys Ser Thr Gly Asn Cys Pro Leu Val Gln Gln Ala Gly Ala 35 40 45	295	
acc acc ctg tat gca ttc aac aa gtgagtgtca tggaaaggct tgttggtaca Thr Thr Leu Tyr Ala Phe Asn Asn 50 55	348	
ccgtacgggt atgttgactg tcatcag c atc ggc tct ggc gat gtg acg ggt Ile Gly Ser Gly Asp Val Thr Gly 60 65	400	10
ttt ctt gct gtc gat ccg acc aac cga ctc atc gtc ttg tct ttc ccg Phe Leu Ala Val Asp Pro Thr Asn Arg Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg 70 75 80	448	
ggg tca gag agt ctc gag aac tgg atc act aat ctc agc gcc gac ctg Gly Ser Glu Ser Leu Glu Asn Trp Ile Thr Asn Leu Ser Ala Asp Leu 85 90 95	496	
gtc gat gcc tct gca atc tgt tcc ggg tgt gaa gcc cat gac gga ttc Val Asp Ala Ser Ala Ile Cys Ser Gly Cys Glu Ala His Asp Gly Phe 100 105 110	544	
tat tct tct tgg caa tca gtt gcc agc act ctg acc tcc caa atc tct Tyr Ser Ser Trp Gln Ser Val Ala Ser Thr Leu Thr Ser Gln Ile Ser 115 120 125	592	20
tct gcc ctc tct gca tat cca aac tac aag ctg gtc ttc acc ggc cac Ser Ala Leu Ser Ala Tyr Pro Asn Tyr Lys Leu Val Phe Thr Gly His 130 135 140 145	640	
agt ctc gga gcc gcc tta gct aca ctt gga gct gtc tct ctc agg gag Ser Leu Gly Ala Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Val Ser Leu Arg Glu 150 155 160	688	
agt gga tac aat atc gac ctc gtaagttcct ggcattgccca tcatggaaag Ser Gly Tyr Asn Ile Asp Leu 165	739	
agactcacag ttaactgtag tac aac ttt ggc tgt ccc ccg gtc ggc aac act Tyr Asn Phe Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Thr 170 175	792	
gcg ctc gca gac ttt att acc aac caa acc ggt ggc aca aat tac ccg Ala Leu Ala Asp Phe Ile Thr Asn Gln Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Arg 180 185 190 195	840	30
gta acg cat tac gag gac cct gtc ccc aag ctg cct ccc agg agt ttt Val Thr His Tyr Glu Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Pro Arg Ser Phe 200 205 210	888	
gga tac agc caa cct agc ccg gaa tac tgg atc acg tct gga aac aat Gly Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Asn 215 220 225	936	
gtg act gtg act tct tcc gac atc gat gtc gtc gtg ggt gtc gac tct Val Thr Val Thr Ser Ser Asp Ile Asp Val Val Val Gly Val Asp Ser 230 235 240	984	

act gca ggc aac gac ggg acg cct gat ggc ctt gac act gct gcc cat 1032
 Thr Ala Gly Asn Asp Gly Thr Pro Asp Gly Leu Asp Thr Ala Ala His
 245 250 255

agg tgg tat ttt gga cct act acc gaa tgt tcg tcg tca tga 1074
 Arg Trp Tyr Phe Gly Pro Thr Thr Glu Cys Ser Ser Ser
 260 265 270

<210> 10

<211> 300

<212> PRT

<213> Talaromyces byssochlamydoides

10

<400> 10

Met Phe Lys Ser Thr Val Arg Ala Ile Ala Ala Leu Gly Leu Thr Ser
 -25 -20 -15

Ser Val Phe Ala Ala Pro Ile Glu Leu Gly Arg Arg Asp Val Ser Glu
 -10 -5 -1 1

Gln Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Glu Gln Tyr Ser Ala Ala Ala
 5 10 15 20

Tyr Cys Pro Ala Asn Phe Glu Ser Ala Ser Gly Ala Ala Ile Ser Cys
 25 30 35

20

Ser Thr Gly Asn Cys Pro Leu Val Gln Gln Ala Gly Ala Thr Thr Leu
 40 45 50

Tyr Ala Phe Asn Asn Ile Gly Ser Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala
 55 60 65

Val Asp Pro Thr Asn Arg Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Glu
 70 75 80

Ser Leu Glu Asn Trp Ile Thr Asn Leu Ser Ala Asp Leu Val Asp Ala
 85 90 95 100

30

Ser Ala Ile Cys Ser Gly Cys Glu Ala His Asp Gly Phe Tyr Ser Ser
 105 110 115

Trp Gln Ser Val Ala Ser Thr Leu Thr Ser Gln Ile Ser Ser Ala Leu
 120 125 130

Ser Ala Tyr Pro Asn Tyr Lys Leu Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly
 135 140 145

Ala Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Val Ser Leu Arg Glu Ser Gly Tyr
 150 155 160

Asn Ile Asp Leu Tyr Asn Phe Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Thr Ala
165 170 175 180

Leu Ala Asp Phe Ile Thr Asn Gln Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Arg Val
185 190 195

Thr His Tyr Glu Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Pro Arg Ser Phe Gly
200 205 210

Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Asn Val
215 220 225

Thr Val Thr Ser Ser Asp Ile Asp Val Val Val Gly Val Asp Ser Thr
230 235 240

10

Ala Gly Asn Asp Gly Thr Pro Asp Gly Leu Asp Thr Ala Ala His Arg
245 250 255 260

Trp Tyr Phe Gly Pro Thr Thr Glu Cys Ser Ser Ser
265 270

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> oligo 19671

<400> 11

ctcccttctc tgaacaataa accc

24

<210> 12

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> oligo 99122211

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(57)

<223> n is C or G or T or A

<400> 12

cctctagatc tcgagctcgg tcaccggtgg cctccgcggc cgctgctawn nwnwnnaag

60

acatgtccca attaacc

77

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
C 1 2 N	9/20	(2006.01)	C 1 2 N 9/20

- (72)発明者 ムンク, シグネ
デンマーク国, デーコー - 1 0 5 4 ケベンハウン コー, 3 . テーホー, ペデル スクラムス
ガーデ 2 7
- (72)発明者 ビンズ, イェスベル
デンマーク国, デーコー - 3 5 0 0 ベルレーセ, ヘイレバッケン 2 0
- (72)発明者 ボルチ, キム
デンマーク国, デーコー - 3 4 6 0 ビルケレズ, バンズトルンスバイ 1 8
- (72)発明者 パトカル, シャムカント アナント
デンマーク国, デーコー - 2 8 0 0 リュングビュー, クリストフェルス アレ 9 1
- (72)発明者 グラズ, サンネ オー . シュレーデル
デンマーク国, デーコー - 2 7 5 0 バルレルブ, ビゴ バルフォエズ アレ 5 9
- (72)発明者 スペンセン, アラン
デンマーク国, デーコー - 2 9 7 0 ヘルショルム, オベアザムスバイ 1 3

審査官 新留 豊

- (56)参考文献 国際公開第00 / 0 6 0 0 6 3 (WO, A 1)
国際公開第00 / 0 3 2 7 5 8 (WO, A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- | | |
|------|--------------|
| C12N | 1/00-15/90 |
| C07K | 14/00-14/825 |
| C11D | 3/386 |