

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6858487号
(P6858487)

(45) 発行日 令和3年4月14日 (2021.4.14)

(24) 登録日 令和3年3月26日 (2021.3.26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 9/54 (2006.01)

C 1 2 N 9/54 Z N A

C 1 1 D 3/386 (2006.01)

C 1 1 D 3/386

C 1 1 D 7/42 (2006.01)

C 1 1 D 7/42

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/31

請求項の数 6 (全 189 頁)

(21) 出願番号 特願2015-540875 (P2015-540875)
 (86) (22) 出願日 平成25年11月5日 (2013.11.5)
 (65) 公表番号 特表2015-534820 (P2015-534820A)
 (43) 公表日 平成27年12月7日 (2015.12.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/068590
 (87) 国際公開番号 W02014/071410
 (87) 国際公開日 平成26年5月8日 (2014.5.8)
 審査請求日 平成28年11月4日 (2016.11.4)
 審判番号 不服2019-1456 (P2019-1456/J1)
 審判請求日 平成31年2月4日 (2019.2.4)
 (31) 優先権主張番号 61/722,660
 (32) 優先日 平成24年11月5日 (2012.11.5)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 509240479
 ダニスコ・ユーエス・インク
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
 304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ
 ード 925
 (74) 代理人 100071010
 弁理士 山崎 行造
 (74) 代理人 100118647
 弁理士 赤松 利昭
 (74) 代理人 100123892
 弁理士 内藤 忠雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サーモリシンプロテアーゼ変異体を含む組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の置換を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、前記置換は生産的位置で生じ、

前記生産的位置及びアミノ酸の前記置換が Q 2 8 3 E、A 1 8 0 E、I 2 4 4 T 及び T 4 8 E からなる群から選択され、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号 3 で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている、サーモリシン酵素変異体又はその活性断片。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のサーモリシン酵素変異体を少なくとも 1 種含む、クリーニング組成物。

【請求項 3】

前記クリーニング組成物が洗剤組成物である、請求項 2 に記載のクリーニング組成物。

【請求項 4】

前記クリーニング組成物が、洗濯洗剤組成物、食器用洗剤組成物、又は硬質表面用クリーニング組成物である、請求項 2 又は 3 に記載のクリーニング組成物。

【請求項 5】

少なくとも 1 種の漂白剤、又はアシルトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アミラーゼ、ガラクトシダーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ガラクトシダー

ゼ、カラギナーゼ、カタラーゼ、セロピオヒドロラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンド - 1、4 - グルカナーゼ、エンド - マンナーゼ、エステラーゼ、エクソマンナーゼ、ガラクタナーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、リボキシゲナーゼ、マンナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ブルナーゼ、レダクターゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、グルカナーゼ、タンナーゼ、トランスグルタミナーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、キシラナーゼ、キシログルカナーゼ、キシロシダーゼ、メタロプロテアーゼ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1種の追加の酵素を更に含む、請求項2～4のいずれか一項に記載のクリーニング組成物。

10

【請求項6】

表面又は物品を、請求項1に記載のサーモリシン酵素変異体を少なくとも1種含むクリーニング組成物と接触させる工程を含む、クリーニング方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(関連出願の相互参照)

本出願は、2012年11月5日出願の米国仮特許出願番号第61/722、660号に基づく優先権にかかる利益を主張するものであって、前記公報はそのすべてが参照として本明細書に組み込まれる。

20

【背景技術】**【0002】**

バチルス属は、産業上有用な酵素を数多く分泌するグラム陽性菌であって、これらの酵素は発酵により大量に安価に製造することができる。分泌されたバチルス属の酵素の例は、サブチリシンセリンプロテアーゼ、亜鉛含有中性プロテアーゼ、アミラーゼ、及びセルラーゼである。バチルス属プロテアーゼは、繊維工業、洗濯業及び家内工業において広く用いられている (Galante, Current Organic Chemistry, 7:1399~1422頁、2003年、及び Showell, Handbook of Detergents, Part D: Formulation, Hubbard (ed.), NY: Taylor and Francis Group, 2006年)。微生物において見出されるプロテアーゼは、その触媒メカニズムに基づいて分類されて次の4グループに分けられる。すなわち、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、システインプロテアーゼ及びアスパルギン酸プロテアーゼ。セリンプロテアーゼはアルカリ性領域に至適pHを有し、メタロプロテアーゼは中性付近で至適活性を有し、そしてシステインプロテアーゼは酸性領域に至適pHを有する (Biotechnology Handbooks, Bacillus, vol. 2, edited by Harwood, 1989年 Plenum Press, New York)。セリンプロテアーゼは産業用酵素の技術分野において古くから既知であるが、特定の条件及び用途に適した工学操作されたプロテアーゼが今なお必要とされている。

30

40

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0003】**

本開示は、特に、サーモリシン酵素、サーモリシン酵素をコードする核酸、並びにその製造及び使用に関する組成物及び方法を提供する。

【課題を解決するための手段】**【0004】**

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシン酵素に対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変はサーモリシン酵素変異体の

50

生産的位置で生じ、生産的位置で試験された改変のうち少なくとも75%は、次の評価基準[すなわち、a)親酵素サーモリシン酵素に対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本(microswatch)の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数(PI)が0.9以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.0以上である、位置、b)親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数(PI)が0.8以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.2以上である、位置、c)親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数(PI)が0.5以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.5以上である、位置]のうち少なくとも1つを満たしており、並びに生産的位置が、2位、26位、47位、49位、53位、65位、87位、91位、96位、108位、118位、128位、154位、179位、196位、197位、198位、199位、209位、211位、217位、219位、225位、232位、256位、257位、259位、261位、265位、267位、272位、276位、277位、286位、289位、290位、293位、295位、298位、299位、300位、301位、303位、305位、308位、311位、及び316位からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0005】

一部の実施形態では、改変が、2位(T, F, L, P, S, V, W, Y, Q, A, C, I, K, M)、26位(T, K, L, R, V, Y, W, F, G, H, I, M, C, D)、47位(R, A, C, H, K, N, D, E, G, L, M, Q, T)、49位(T, A, D, F, H, I, S, W, L, N, Q, V, E, M, Y)、53位(S, F, H, I, M, Q, T, W, K, R, A, N, V, C, L)、65位(S, I, M, Q, V, L, T, W, A, D, E, P, Y)、87位(V, D, E, G, I, S, P, R, T, C, K, L, M, N, Q, W, Y)、91位(L, D, E, F, K, M, P, Q, S, A, N, R, W, Y)、96位(N, C, D, I, V, F, T, G, H, Q, R, S, W, K, L, Y)、108位(Q, C, E, F, H, A, D, I, K, N, L, M)、118位(S, C, G, E, A, D, M, Q, R, T, V)、128位(Q, C, D, E, R, S, V, I, K, A, L, Y)、154位(G, L, Q, S, T, D, I, W, C, N, A, H, K, M, Y)、179位(Y, A, D, H, M, N, Q, S, T, W, F)、196位(G, D, E, T, K, R, V, H, L, Y, A, W)、197位(I, D, K, L, T, V, W, Y, A, H, N, E, Q, R, F, C)、198位(S, C, E, F, G, H, I, P, Q, T, V, M, N, R, W, A, K)、199位(G, C, E, F, H, Q, S, T, W, L, A, Y)、209位(A, D, E, L, S, T, V, G, I, K, P, R, Y, C, M)、211位(Y, A, C, D, F, G, H, I, L, N, Q, S, T, E, R)、217位(Y, Q, S, T, V, W, G, A, F, M, N, C, L)、219位(K, D, F, G, H, I, M, N, Q, T, A, E, R, S)、225位(Q, D, G, H, I, P, V, W, A, M, R, C, E, K, L, S)、232位(I, C, E, F, K, M, N, Q, W, G, L, R, S, T, V, Y)、256位(V, L, T, K, A, D, F, G, H, R, S, N)、257位(G, C, D, E, L, N, P, Q, S, T, Y, K, R)、259位(G, A, C, E, F, H, L, M, W, K, R, N, S, T)、261位(D, A, N, P, V, W, G, H, I, S)、265位(K, A, C, D, M, P, Q, S, G, I, L, R, N)、267位(F, E, G, N, S, V, W, A, C, H, I, K, L, M, T, Y)、272位(T, E, L, V, W, P, Y, C, F, N, Q, A, K)、276位(T, C, F, I, P, Q, W, H, A, L, V, Y)、277位(P, Q, S, T, E, F, G, H, N, R, V, W, A, D, Y)、286位(A, D, E, F, G, H, I, S, P, C, Q, R, T, K, L, M, N, Y)、289

位 (V , C , E , F , G , I , N , S , W , R , T , L , M , Y , A)、290位 (Q , C , D , F , G , L , W , Y , R , T , V , A , H , N)、293位 (T , C , E , F , G , H , Q , S , N , V , W , A , I , K , L , M , Y)、295位 (L , C , I , N , T , V , F , G , A , K , M , W)、298位 (S , C , T , W , Y , E , N , P , A , G , K , M , R)、299位 (T , C , F , L , M , R , W , P , D , Q , N , A , K)、300位 (S , C , K , M , R , Y , I , L , H , P , V , W , A , G , T , D , N)、301位 (Q , E , H , P , R , L , C , F , G , W , M , S , T , V , K)、303位 (V , C , H , G , K , L , R , W , A , P , Y)、305位 (S , G , I , L , N , W , Y , Q , H , T , V , A , K , M)、308位 (Q , C , D , F , G , I , M , R , V , W , Y , A , L)、311位 (D , C , E , F , G , I , Q , S , T , A , K , L , M , V , W , Y)、及び316位 (K , D , E , F , G , H , L , N , P , Q , R , S , V , W , Y , A , M) からなる群から選択される (ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0006】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変はサーモリシン酵素変異体の生産的位置で生じ、生産的位置で試験された改変のうち少なくとも40%でかつ75%未満はa、b及びc (上記参照) に挙げた評価基準のうち少なくとも一つを満たしており、並びに生産的位置が、1位、4位、17位、25位、40位、45位、56位、58位、61位、74位、86位、97位、101位、109位、149位、150位、158位、159位、172位、181位、214位、216位、218位、221位、222位、224位、250位、253位、254位、258位、263位、264位、266位、268位、271位、273位、275位、278位、279位、280位、282位、283位、287位、288位、291位、297位、302位、304位、307位、及び312位からなる群から選択される (ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0007】

一部の実施形態では、改変が、1位 (I , K , M , V , A , H , W , Y , C , L)、4位 (T , E , A , N , R , V , K , L , M , Y)、17位 (Q , I , W , Y , C , R , V , T , L)、25位 (S , D , F , A , C , K , M , R)、40位 (F , E , G , M , Q , S , Y , W , A , K , L)、45位 (K , E , L , S , F , H , Q , Y , A , G , M)、56位 (A , K , Q , V , W , H , I , Y , E , M)、58位 (A , N , Y , C , V , E , L)、61位 (Q , M , R , W , F , V , C , I , L)、74位 (H , E , L , V , C , F , M , N , Q , W)、86位 (N , L , S , Y , A , C , E , F , G , K , D)、97位 (N , K , C , R , S , Y , E , M)、101位 (R , T , C , L , S , H)、109位 (G , A , L , S , E , M , R , W)、149位 (T , M , V , A , L , D , S , N)、150位 (D , A , F , K , N , Q , T , V , S)、158位 (Q , A , K , M , N , L , R , Y , S)、159位 (N , R , W , A , C , G , M , T , S , Y)、172位 (F , G , L , M , Q , S , V , W , Y , D , H)、181位 (N , L , A , G , K , M , T , S)、214位 (P , C , G , K , S , N , A , R)、216位 (H , C , E , S , T , R , A)、218位 (S , K , L , Y , F , G , T , V)、221位 (Y , K , N , Q , R , S , T , V , A , F , G , M)、222位 (T , C , D , L , Y , I , V , A , M , K)、224位 (T , K , M , F , L , P , Q , V , Y , E , H)、250位 (H , A , C , K , M , N , P , Q , R , V , Y)、253位 (V , N , T , I , R , Y , M , Q)、254位 (S , A , M , R , Y , K , L , N , V , W)、258位 (I , E , L , M , N , R , S , A , C , K , Q , V)、263位 (L , C , I , Q , T , H , K , N , V , A , M)、264位 (G , C , R , A , N , P , Q , S , T)、266位 (I , A , F , L , S , C , M , T , V)、268位 (Y , M , Q , V , A , S , K)、271

10

20

30

40

50

位 (L , A , D , F , I , N , Y , H)、273位 (Q , A , H , Y , C , S , W , E , G , N)、275位 (L , I , M , V , C , Q , S , T)、278位 (T , G , K , R , Y , C , H , M , N , Q , S)、279位 (S , A , D , I , L , M , N , Q , T , G)、280位 (N , A , C , D , E , G , Q , H , T)、282位 (S , K , N , R , A , H , L , M , T)、283 (Q , K , L , P , R , W , Y , S)、287位 (A , I , L , N , V , Y , K , R , T , D , C)、288位 (A , C , I , S , T , V , Y , N , L , M)、291位 (S , E , I , L , M , N , V , A , T)、297位 (G , A , M , R , Y , C , F , K , T , D , N)、302位 (E , K , L , G , T , V , D , Q , A)、304位 (A , C , D , L , N , R , S , T , W , E , K , Y)、307位 (K , A , C , G , I , M , N , Q , R , W , Y , H)、及び312位 (A , G , M , V , L , N , R , T , C) からなる群から選択される (ここで、サーモリシン酵素変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

10

【0008】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシン酵素に対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変はサーモリシン酵素変異体の生産的位置で生じ、生産的位置で試験された改変のうち少なくとも15%でかつ40%未満はa、b及びc (上記参照) に挙げた評価基準のうち少なくとも一つを満たしており、そして生産的位置が、5位、9位、11位、19位、27位、31位、33位、37位、46位、64位、73位、76位、79位、80位、85位、89位、95位、98位、99位、107位、127位、129位、131位、137位、141位、145位、148位、151位、152位、155位、156位、160位、161位、164位、168位、171位、176位、180位、182位、187位、188位、205位、206位、207位、210位、212位、213位、220位、227位、234位、235位、236位、237位、242位、244位、246位、248位、249位、252位、255位、270位、274位、284位、294位、296位、306位、309位、310位、313位、314位、及び315位からなる群から選択される (ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

20

【0009】

一部の実施形態では、改変が、5位 (S , D , N , P , H , L)、9位 (V , L , T , I)、11位 (R , I , Y , K)、19位 (N , L , Y , K , S)、27位 (Y , W , A , M , V , C , L)、31位 (Q , A , K , V , I , C , Y)、33位 (N , S , T , K , A , C , L , M)、37位 (N , D , Q , R , L , K)、46位 (Y , L , H , N , C)、64位 (A , H , Q , T , D , E)、73位 (A , I , F , L , M , W)、76位 (Y , H , L , M , Q , T)、79位 (V , L , Q , T , A , N , S)、80位 (T , I , D , A , L , N)、85位 (K , E , A , L , N , R , S)、89位 (N , L , M , H)、95 (G , A , D , H , M , N , S)、98位 (A , C , E , H , R , Y , K , V)、99位 (A , E , K , P , R , S)、107位 (S , D , K , Y , A , G)、127位 (G , C , D , E)、129位 (T , I , R , E , Y , L , M)、131位 (I , Y , W , L)、137位 (I , P , A , E , T , V , L)、141位 (A , S , C , G)、145位 (T , A , C , E , G , M , N , Q)、148位 (V , L , N , Y , M , A , Q)、151位 (Y , K , G , H , S , W)、152位 (T , S , L , M , G)、155位 (L , C , I , M)、156位 (I , M , T , L , Q)、160位 (E , L , Y , Q)、161位 (S , A , N , P , T)、164位 (I , L , N , S , T , V , C , A)、168位 (I , A , M , T , L)、171位 (I , C , E , F , L , S , G)、176位 (V , L , N , C)、180位 (A , E , G , K , T , S)、182位 (K , L , A , W)、187位 (E , L , D)、188位 (I , L , V)、205位 (M , L , A , V , Q)、206位 (S , A , C , K , L , M , R)、207位 (D , A , H , N)、210位 (K , I , L , V)、212位 (G , Y , A , D , Q)、213位 (D , N , S , L , A , G , W)

30

40

50

、220位(R, K, V, A)、227位(N, D, L, Y, A)、234位(S, D, N, A, C)、235位(G, M, C, Q, S, A)、236位(I, M, A, C)、237位(I, N, F, M)、242位(Y, C, F, N, V)、244位(I, T, V, F, A, M, L)、246位(Q, E, N, T, L, C, D)、248位(G, A, E, S)、249位(T, K, M, N, L, Y, P)、252位(G, K, Y, A, S, T, W)、255位(V, L, P, A, Y, M, N)、270位(A, C, F, I, L, S, G)、274位(Y, F, H, A, C, Q, T, M)、284位(L, V, W, A, M, Y)、294位(D, A, V, Q, N)、296位(Y, N, L, R, H, W, M)、306位(V, A, S, F, I, L, T)、309位(A, G, S, T, V, C)、310位(F, A, C, W, M)、313位(V, T, A, G, L, I, C)、314位(G, A, E, H, M, S, W, Q)、及び315位(V, A, C, I, M, L, T)からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

10

【0010】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変はサーモリシン酵素変異体の生産的位置で生じ、生産的位置で試験された改変のうち少なくとも1つの改変でかつ15%未満はa、b及びc(上記参照)に挙げた評価基準のうち少なくとも一つを満たしており、そして生産的位置が、3位、6位、7位、20位、23位、24位、44位、48位、50位、57位、63位、72位、75位、81位、92位、93位、94位、100位、102位、103位、104位、110位、117位、120位、134位、135位、136位、140位、144位、153位、173位、174位、175位、178位、183位、185位、189位、193位、201位、223位、230位、238位、239位、241位、247位、251位、260位、262位、269位、及び285位からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

20

【0011】

一部の実施形態では、改変が、3位(G, Y)、6位(T, C, V)、7位(V, L, I)、20位(I, L, V)、23位(T, F, W)、24位(Y, W)、44位(A, C)、48位(T, E, D)、50位(L, P)、57位(D, K)、63位(F, Y, C)、72位(D, F, W)、75位(Y, A)、81位(Y, F)、92位(S, L)、93位(Y, T, C)、94位(D, T)、100位(I, L, V)、102位(S, G, N)、103位(S, T)、104位(V, A)、110位(Y, L)、117位(G, H)、120位(M, L)、134位(S, A, P)、135位(G, A)、136位(G, A, S)、140位(V, D)、144位(L, T)、153位(A, T)、173位(G, A, C)、174位(T, C, A)、175位(L, H, S)、178位(F, H, Y)、183位(N, S)、185位(D, E)、189位(G, A)、193位(Y, F)、201位(S, C, A)、223位(G, D, K)、230位(V, A)、238位(N, L, M)、239位(K, A)、241位(A, L, S)、247位(G, A, S)、251位(Y, M)、260位(R, A, N)、262位(K, A)、269位(R, V, K)、及び285位(R, K, Y)からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

30

40

【0012】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変は組み合わせ可能な活性を有する変異体であって、組み合わせ可能な活性を有する位置で試験された改変のうち少なくとも1つの改変が、次の評価基準[すなわち、親酵素サーモリシンに対して、発現及び洗剤安定性又は熱安定性に関する最小性能指数(PI)が0.5以上であり、そして親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGL

50

A - N b a に対する活性に関する最小性能指数 (P I) が 1 . 5 以上である、位置] を満たし、また、組み合わせ可能な活性を有する位置は、17 位、19 位、24 位、25 位、31 位、33 位、40 位、48 位、73 位、79 位、80 位、81 位、85 位、86 位、89 位、94 位、109 位、117 位、140 位、141 位、150 位、151 位、152 位、153 位、156 位、158 位、159 位、160 位、161 位、168 位、171 位、174 位、175 位、176 位、178 位、180 位、181 位、182 位、183 位、189 位、205 位、206 位、207 位、210 位、212 位、213 位、214 位、218 位、223 位、224 位、227 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、241 位、244 位、246 位、248 位、249 位、250 位、251 位、252 位、253 位、254 位、255 位、258 位、259 位、260 位、261 位、262 位、266 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、276 位、278 位、279 位、280 位、282 位、283 位、294 位、295 位、296 位、297 位、300 位、302 位、306 位、310 位、及び 312 位からなる群から選択される (ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号 3 で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0013】

一部の実施形態では、改変が、17 位 (E , F , P)、19 位 (A , D , H , I , R , T , V)、24 位 (F , H)、25 位 (H)、31 位 (L)、33 位 (Q)、40 位 (C)、48 位 (A , R)、73 位 (Y)、79 位 (C)、80 位 (C , R)、81 位 (H)、85 位 (C , M , Y)、86 位 (V)、89 位 (K , R , T , V)、94 位 (E)、109 位 (D)、117 位 (A , K , R , T)、140 位 (S)、141 位 (T)、150 位 (E , M , W)、151 位 (A , C , E , I)、152 位 (D)、153 位 (V)、156 位 (H , R)、158 位 (F , G , I , V)、159 位 (F , I , K)、160 位 (S)、161 位 (Y)、168 位 (N)、171 位 (D)、174 位 (S , V)、175 位 (C , E , F , G , I)、176 位 (E , Q)、178 位 (C , M)、180 位 (L , W)、181 位 (Y)、182 位 (F , R)、183 位 (H , I , L , M , Q , R , T)、189 位 (C)、205 位 (C , F)、206 位 (F , H , I , T , V , Y)、207 位 (T)、210 位 (A , E , F , G , H , T)、212 位 (F , H , K , M , N , R , S , T)、213 位 (I , K , R , V , Y)、214 位 (Q)、218 位 (R)、223 位 (Y)、224 位 (I , R)、227 位 (C , E , G , K , Q , R , S , T , V)、235 位 (D , L , T)、236 位 (P)、237 位 (A , Q)、238 位 (A , C , D , E , R , S)、239 位 (C , G , H , L , Q , R , S , V , Y)、241 位 (E , F , G , I , T , V)、244 位 (Q)、246 位 (K , R)、248 位 (C , H)、249 位 (G , V)、250 位 (F , S)、251 位 (H)、252 位 (F , I , L)、253 位 (A , D , E , P)、254 位 (C , F , G , H , I , P)、255 位 (F , Q)、258 位 (F)、259 位 (I)、260 位 (C , D , I)、261 位 (K , R , T)、262 位 (C , F , H , L , P , R)、266 位 (W)、268 位 (F , R)、269 位 (P , T , W , Y)、270 位 (M , N , P , V)、271 位 (V)、272 位 (R)、273 位 (R)、274 位 (D , E)、276 位 (G , S)、278 位 (V)、279 位 (E)、280 位 (P , R , V)、282 位 (P)、283 位 (A , C , E , G , H , T , V)、294 位 (T)、295 位 (R)、296 位 (E , I)、297 位 (I , V)、300 位 (Q)、302 位 (W)、306 位 (Y)、310 位 (I , N)、及び 312 位 (Q) からなる群から選択される (ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号 3 で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0014】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、サーモリシン酵素変異体は、親酵素サーモリシンに比べて改善された pH 6 又は pH 8 での P A S - 38 微小布見本の洗浄、A b z - A G L A - N b a に対する活性、又は洗剤安定性若しくは熱安定性を有しており、改変が、配列番号 3 で示されるサーモリシンのアミノ酸配列中の残基全てに関する主鎖平

10

20

30

40

50

均温度因子よりも観測された分散の1.5倍分より大きい温度因子を有する位置で生じ、並びに残基位置が、1位、2位、127位、128位、180位、181位、195位、196位、197位、198位、199位、211位、223位、224位、298位、299位、300位、及び316位からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0015】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、サーモリシン酵素変異体は、親酵素サーモリシンに比べて改善された洗剤安定性又は熱安定性を有しており、そして改変が、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列中の残基全てに関する主鎖平均温度因子よりも観測された分散の1.5倍分より大きい温度因子を有する位置で生じ、改変が、1位(I, V)、2位(T, C, I, M, P, Q, V)、127位(G, C)、128位(Q, C, E, F, I, L, V, Y)、180位(A, E, N)、181位(N, A, G, Q, S)、196位(G, L, Y)、197位(I, F)、198位(S, A, C, D, E, H, I, M, P, Q, T, V, Y)、211位(Y, A, C, E, F, H, I, Q, S, T, V, W)、224位(T, D, H, Y)、298位(S, A, C, E, F, G, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y)、299位(T, A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W)、及び316位(K, A, D, E, H, M, N, P, Q, S, T, V, Y)からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0016】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変が、サーモリシン酵素変異体の生産的位置で生じ、生産的位置で試験された改変のうち少なくとも75%は次の評価基準[すなわち、a)親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数(PI)が0.9以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.0以上である、位置、b)親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数(PI)が0.8以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.2以上である、位置、c)親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数(PI)が0.5以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.5以上である、位置]のうち少なくとも1つを満たしており、並びに生産的位置が、2、87、96、198、277、293、295、298及び301からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0017】

1.更なる実施形態では、生産的位置が、2位(T, F, L, P, S, V, W, Y, Q, A, C, I, K, M)、87位(V, D, E, G, I, S, P, R, T, C, K, L, M, N, Q, W, Y)、96位(N, C, D, I, V, F, T, G, H, Q, R, S, W, K, L, Y)、198位(S, C, E, F, G, H, I, P, Q, T, V, M, N, R, W, A, K)、277位(P, Q, S, T, E, F, G, H, N, R, V, W, A, D, Y)、293位(T, C, E, F, G, H, Q, S, N, V, W, A, I, K, L, M, Y)、295位(L, C, I, N, T, V, F, G, A, K, M, W)、298位(S, C, T, W, Y, E, N, P, A, G, K, M, R)、301位(Q, E, H, P, R, L, C, F, G, W, M, S, T, V, K)からなる群から選択される(ここで、サー

10

20

30

40

50

モリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0018】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変は生産的位置であり、生産的位置で試験された改変が次の評価基準[すなわち、親酵素サーモリシンに対して、発現、洗剤安定性、熱安定性、PAS-38微小布見本の洗浄活性、又はAbz-AGLA-Nbaに対する活性のパラメータのうち少なくとも3つに関する最小性能指数(PI)が1以上である、位置]を満たしており、並びに生産的位置は278位、283位、180位、244位、48位及び63位からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

10

【0019】

更なる実施形態では、生産的位置が、T278R、Q283E、A180E、I244T、T48E及びF63Cからなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0020】

一部の実施形態では、本発明は、親酵素サーモリシンに対するアミノ酸の改変を含むサーモリシン酵素変異体又はその活性断片であって、改変が、生産的位置で生じ、生産的位置で試験された改変のうち少なくとも1つの改変が、次の評価基準[すなわち、親酵素サーモリシン酵素に対して、発現、洗剤安定性、熱安定性、PAS-38微小布見本の洗浄活性、又はAbz-AGLA-Nbaに対する活性のパラメータの少なくとも全てに関する最小性能指数(PI)が0.5以上であるが、前記パラメータのうち一つ以下が0.8未満である、位置]を満たし、並びに生産的位置が、019位、025位、026位、063位、091位、096位、097位、101位、109位、118位、131位、140位、158位、159位、175位、180位、219位、225位、232位、244位、246位、261位、277位、293位、300位、301位、301位、303位、305位、及び311位からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

20

30

【0021】

更なる実施形態では、生産的位置が、N019D、S025A、T026R、S065A、L091M、N096Q、N096R、N096Y、N097K、R101M、G109A、S118A、I131L、V140D、Q158A、N159E、N159K、L175V、A180R、G196T、G196Y、K219S、Q225E、I232R、I244L、Q246D、D261N、P277G、T293Y、S300G、Q301F、Q301M、V303R、S305A、D311Aからなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

40

【0022】

一部の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、M4ペプチダーゼである。一部の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、MAクランの一メンバーである。一部の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、PepeSY~ペプチダーゼ__M4~ペプチダーゼ__M4__Cファミリーの一メンバーである。一部の実施形態では、変異体は、配列番号3で示されるサーモリシンと少なくとも50%の同一性を有する。一部の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、パチルス属、ゲオパチルス種、アリシクロパチルス属、乳酸桿菌、エクシグオバクテリウム属、ブレビパチルス属、パエニパチルス属、ヘルペトシフォン属、オセアノパチルス属、シュワネラ属、クロストリジウム属、ブドウ球菌属、フラボバクテリウム属、スチグマテラ属、ミクソコッカス属、ビブリオ属、メタノサルシナ属、ク

50

リセオバクテリウム属、ストレプトマイセス属、クリベラ属、ジャニバクター属、ノカルジオイデス属、ザンタモナス属 (Xanthamonas)、ミクロモノスポラ属、バークホルデリア属、デハロコッコイデス属、クロセイバクター、コルジア属、マイクロシーラ属、サーモアクチノミセス属、クロロフレクサス属、リステリア属、プレシオシスチス属、ハリスコメノバクター属、サイトファーガ属、ハヘラ属、アルスロバクター属、ブラキバクテリウム属、クラビバクター属、マイクロバクテリウム属 (Microbacterium)、イントラスポランギウム属、フランキア属、メイオテルムス属、シュードモナス属、トウゴマ属、カテヌリスポラ属、アナベナ属、ノストック属、ハロモナス属、クロモハロバクター属、ボルデテラ属、バリオボラックス属、ディケヤー属、ペクトバクテリウム属、シトロバクター属、エンテロバクター属、サルモネラ属、エルウィニア属、パントエア属、ラーネラ属、セラチア属、ゲオデルマトフィルス属、ゲンマタ属、ゼノラブダス属、フォトラブダス属、アスペルギルス属、ネオサルトリア属、ピレノフォラ属、サッカロポリスポラ属、ネクトリア属、ジベレラ属、メタリジウム属、ワドリア属、シアノセイス属、セルロファーガ属、プロビデンシア属、ブラディリゾビウム属、アグロバクテリウム属、ムシラジニバクター (Mucilaginibacter)、セラチア属、ソランジウム属、ストレプトスポランジウム属、レニバクテリウム属、アエロモナス属、レイネケア属、クロモバクテリウム属、モリテラ属、ハリアンギウム属、カンギエラ属、マリノモナス属、ビブリオナレス属、リストネラ属、サリニビブリオ属、フォトバクテリウム属、アルテロモナダーレス属、レジオネラ属、テレディニバクター属、レイネケア属、ヒドロゲニビルガ属、及びシュードアルテロモナス属からなる群から選択される一つの細菌属由来のものである。一部の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、バチルス属、ゲオバチルス種、アリシクロバチルス属、乳酸桿菌、エクシグオバクテリウム属、ブレビバチルス属、パエニバチルス属、ヘルペトシフォン属、オセアノバチルス属、シュワネラ属、クロストリジウム属、ブドウ球菌属、フラババクテリウム属、スチグマテラ属、ミクソコッカス属、ビブリオ属、メタノサルシナ属、クリセオバクテリウム属、及びシュードアルテロモナス属からなる群から選択される一つの細菌属由来のものである。一部の実施形態では、サーモリシン酵素は、バチルス属由来のものである。

【 0 0 2 3 】

一部の実施形態では、本発明は、先に挙げたような少なくとも1つの変異体を含むクリーニング組成物である。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、粒状、粉末、固形、棒状、液体、錠剤型、ゲル又はペースト組成物である。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、洗剤組成物である。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、洗濯洗剤組成物、食器用洗剤組成物、又は硬質表面クリーニング組成物である。一部の実施形態では、食器用洗剤は、食器手洗い用洗剤組成物又は自動食器洗浄用洗剤組成物である。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、洗濯洗剤組成物である。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、少なくとも1種の漂白剤を更に含む。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、リン酸塩を含まない。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、リン酸塩を含有する。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、少なくとも1種の追加の酵素を更に含む。一部の実施形態では、少なくとも1種の追加の酵素は、アシルトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アミラーゼ、ガラクトシダーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ガラクトシダーゼ、カラギナーゼ、カタラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンド - 1、4 - グルカナーゼ、エンド - マンナーゼ、エステラーゼ、エクソマンナーゼ、ガラクタナーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、リボキシゲナーゼ、マンナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、プルナーゼ、レダクターゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、グルカナーゼ、タンナーゼ、トランスグルタミナーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、キシラナーゼ、キシログルカナーゼ、およびキシロシダーゼ、

追加の酵素メタロプロテアーゼ酵素並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0024】

一部の実施形態では、本発明は、先に挙げたようなクリーニング組成物を用いたクリーニング方法である。表面又は物品を、請求項1～33のいずれか一項に記載のサーモリシン酵素変異体を少なくとも1種含むクリーニング組成物と接触させる工程を含む、クリーニング方法。一部の実施形態では、方法は、表面又は物品を、上述のクリーニング組成物と接触させる工程を含む。一部の実施形態では、前記表面又は物品をそれぞれ前記クリーニング組成物と接触させた後に、前記表面又は物品をすすぐ工程を含む。一部の実施形態では、物品は食器である。一部の実施形態では、物品は布である。一部の実施形態では、方法は、前記表面又は物品をそれぞれ前記クリーニング組成物と接触させた後に、前記表面又は物品をすすぐ工程を含む。一部の実施形態では、方法は、前記表面又は物品をすすいだ後に、前記表面又は物品を乾燥させる工程を含む。一部の実施形態では、方法は、上述のクリーニング組成物およびクリーニングが必要な表面又は物品を準備する工程と、クリーニング組成物を、クリーニングが必要な表面又は物品と、表面又は物品のクリーニングに適した条件下で接触させて、クリーニングされた表面又は物品を生じる工程と、を含む。一部の実施形態では、方法は、クリーニングされた表面又は物品をすすいで、すすがれた表面又は物品を生じる工程を含む。一部の実施形態では、方法は、すすがれた表面又は物品を乾燥する工程を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】pHPLT-プロテイナーゼTのプラスミドマップを表す。

【図2A】メンバー数424のMEROPSファミリーM4の系統樹を示している。X軸の位置は図2Aが正しく、一方、図2B及び図2CのX軸は操作により移動している。

【図2B】メンバー数424のMEROPSファミリーM4の系統樹を示している。X軸の位置は図2Aが正しく、一方、図2B及び図2CのX軸は操作により移動している。

【図2C】メンバー数424のMEROPSファミリーM4の系統樹を示している。X軸の位置は図2Aが正しく、一方、図2B及び図2CのX軸は操作により移動している。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、改善されたメタロプロテアーゼ酵素、特に洗剤組成物に有用な酵素を提供する。具体的には、本発明は、親酵素メタロプロテアーゼと比べると、置換などの改変を1つ以上有するメタロプロテアーゼ酵素変異体を提供する。これは、酵素に改良を加えることにより、すなわち洗浄性能、洗剤組成物中での酵素の安定性及び/又は酵素の熱安定性を改善して洗浄サイクル中における酵素の有効性を増強することにより、達成することが可能である。本発明は、サーモリシンメタロプロテアーゼ酵素変異体が挙げられるが、これに限定されない、メタロプロテアーゼ酵素変異体であって、様々なクリーニング用途に特にうまく適合しかつ有用なメタロプロテアーゼ酵素変異体を提供する。本発明は、本明細書に前述したメタロプロテアーゼ酵素変異体（例えば、サーモリシン変異体）を少なくとも1種含む組成物を包含する。このような組成物のうち一部のものは、洗剤組成物を含む。本発明は、バチルス及びゲオバチルス種を包含する様々な種のメタロプロテアーゼ酵素変異体、並びにかかるサーモリシン変異体を1種以上含む組成物を提供する。本発明のメタロプロテアーゼ酵素変異体は、洗剤組成物に有用な他の酵素と組み合わせることが可能である。本発明はまた、本発明のメタロプロテアーゼ酵素変異体を用いたクリーニング方法も提供する。

【0027】

本発明は、親酵素メタロプロテアーゼからの改変を1つ以上有するメタロプロテアーゼ酵素変異体を包含する。この酵素変異体は、洗浄性能、洗剤組成物中での酵素の安定性及び酵素の熱安定性に関する最小性能指数を有し、これらの特性のうち少なくとも1種が親酵素メタロプロテアーゼよりも改善されたことにより、洗剤組成物中で有用となり得る。

【 0 0 2 8 】

さらに、本発明は、洗剤組成物中で有用となり得るメタロプロテアーゼ酵素中の1つ以上のアミノ酸位置に、置換などの改変を付与するものであり、好ましい改変は結果として、洗浄性能、洗剤組成物中での酵素の安定性及び酵素の熱安定性に関する最小性能指数を提供すると同時に、これらの特性のうち少なくとも1種を親酵素メタロプロテアーゼよりも改善することとなる。これら改変は、本発明の好適な改変とみなされる。これらのアミノ酸の位置は、親酵素メタロプロテアーゼに対する改変の組み合わせに有用な位置であると考えられ得る。有用な位置であることが分かっているメタロプロテアーゼ酵素のアミノ酸位置は、洗剤組成物での使用に適した複数の改変を有することを更に特徴とすることができる。それぞれの位置では、好適な改変の見込まれる数が多いほど、特定の位置の生産力が高いことを意味する。

10

【 0 0 2 9 】

更に、本発明はこれらのメタロプロテアーゼ変異体を含む組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、これらのメタロプロテアーゼ変異体のうちの少なくとも1種を含むクリーニング組成物を提供する。

【 0 0 3 0 】

これら本発明の特定の特徴は、明確にするために個別の実施形態に照らして上記及び以降で説明するが、一つの実施形態において組み合わせて提供されうると認識されるべきである。その逆に、手短に説明するためにただ一つの実施形態に照らして説明された本発明の様々な特徴もまた、別個に又は任意のサブコンビネーションで提供される場合もある。

20

【 0 0 3 1 】

用語の定義

特に指定しない限り、本発明の実施は、当該技術分野内の分子生物学、タンパク質工学、微生物学及び組み換えDNAにおいて通常使用される従来技術を伴う。このような技術は当業者に既知のものであり、当業者に広く知られている数多くの文献及び参考文献に記載されている。本明細書の上述の及び以降に記載されるすべての特許、特許出願、論文及び刊行物は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【 0 0 3 2 】

本明細書において別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術及び科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同様の意味を持つ。多くの専門用語辞典が当業者に既知である。本明細書に記載されているものと類似した又は等価な任意の方法及び材料が本発明の実施に使用されるが、本明細書には一部の好適な方法及び材料を記載する。したがって、以降で定義される用語は、総じて本明細書を参照することでより詳しく説明される。同様に、本明細書で使用する時、単数形「a」、「an」及び「the」には、文脈で明示されない限り、対象物が複数個ある場合も含まれる。数範囲は、範囲を定義する数を包含する。別途記載のない限り、核酸(の塩基配列)は5'側から3'側へ向かって左から右に表示され、そしてアミノ酸配列はアミノ基からカルボキシ基へ向かって左から右に表示される。本発明は、記載される特定の方法論、プロトコル、及び試薬に制限されるものではなく、これらは当業者により使用される文脈に応じて変動し得ると解されるべきである。

30

40

【 0 0 3 3 】

本発明の実施は、別途記載のない限り、タンパク質精製、分子生物学、微生物学、組み換えDNA技術及びタンパク質配列決定の従来技術を採用し、これらはすべて、当該技術分野内のものである。

【 0 0 3 4 】

加えて、本明細書で提供される見出しは本発明の様々な態様又は実施形態を制限するものではなく、総じて本明細書において参照として用いられ得るものである。したがって、以降で定義される用語は、総じて本明細書を参照することでより詳しく定義される。それでもなお、本発明に対する理解を容易にする目的で、数多くの用語を以下に定義する。

【 0 0 3 5 】

50

本明細書全体を通じて記載されているあらゆる最大数値限度には、それよりも小さいあらゆる数値限度が、あたかもこうしたより小さい数値限度が本明細書に明確に記載されているかのように包含されることが意図される。本明細書の全体を通じて記載されているあらゆる最小数値限度には、それよりも大きいあらゆる数値限度が、あたかもこうしたより大きい数値限度が本明細書に明確に記載されているかのように包含される。本明細書の全体を通じて記載されているあらゆる数値範囲には、このような広い数値的範囲に含まれるより狭いあらゆる数値的範囲が、あたかもこうしたより狭い数値範囲がすべて本明細書に明確に記載されているかのように包含される。

【0036】

本明細書で使用するとき、用語「プロテアーゼ」及び「プロテイナーゼ」は、他のタンパク質を分解する能力を有する酵素タンパク質を指す。プロテアーゼは、タンパク質を形成するペプチド鎖又はポリペプチド鎖中のアミノ酸を連結するペプチド結合を加水分解することにより、タンパク質の異化を開始する、「タンパク質分解」の実行能を有する。プロテアーゼの、タンパク質消化酵素としてのこのような活性は、「タンパク質分解活性」と呼ばれる。タンパク質分解活性の測定には多くの周知の手順が存在する（例えば、Kalisz, 「Microbial Proteinases,」 In: Fiechter (ed.) *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, (1988年)を参照されたい)。例えば、タンパク質分解活性は、各プロテアーゼが市販の基質を加水分解する能力を解析する比較アッセイにより確認することができる。プロテアーゼ活性又はタンパク質分解活性の解析に有用な代表的な基質としては、限定するものではないが、ジメチルカゼイン (Sigma C-9801)、ウシコラーゲン (Sigma C-9879)、ウシエラスチン (Sigma E-1625)、及びウシケラチン (ICN Biomedical 902111) が挙げられる。これらの基質を用いる比色分析が当該技術分野において周知である（例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれるPCT国際特許出願公開第WO 99/34011号及び米国特許第6,376,450号を参照されたい）。同様に、pNAアッセイ（例えば、Del Mar et al., *Anal. Biochem.* 99:316~320頁(1979年)を参照されたい）も、勾配溶出時に回収される分画中の活性な酵素濃度の測定に有用である。このアッセイは、可溶性の合成基質、スクシニル-アラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド (suc-AAPF-pNA) を酵素が加水分解する際に放出されるp-ニトロアニリンの放出速度を測定する。加水分解反応による黄色の生成速度を分光光度計で410nmにて測定するが、この速度は活性酵素濃度に比例する。加えて、280ナノメートル(nm)での吸光度測定を使用して、総タンパク質濃度を測定することができる。活性酵素/総タンパク質比によって酵素純度が与えられる。

【0037】

本明細書で使用するとき、用語「サーモリシン」とは、MEROPS (ペプチダーゼデータベース) (Rawlings et al., *MEROPS: the peptidase database*, *Nucl Acids Res*, 34 Database issue, D270~272頁[2006年]を参照されたい)に掲載されているM4プロテアーゼファミリーの任意のメンバーを指し、そのプロトタイプがサーモリシン (TLN; EC 3.4.24.27) である。サーモリシン (EC 3.4.24.27) (バチルス・サーモプロテオリティカスから分泌される中性のメタロエンドペプチダーゼ) のアミノ酸配列については、Titani et al.によって最初に報告された (Titani et al., *Amino-acid sequence of thermolysin*, *Nature New Biol.* 238:35~37頁(1972年))。その後、O'Donohue et alはこの酵素の遺伝子をクローニングして (O'Donohue, M. J., *Cloning and expression in Bacillus subtilis of the npr gene from Bacillus thermoproteolyticus Rokko codin*

10

20

30

40

50

g for the thermostable metalloprotease thermolysin. *Biochem. J.* 300: 599~603頁(1994))、その配列はUniProtKB/Swiss-Protの受託番号P00800(配列番号4)として記載された。Titani et alが公表したタンパク質配列とO'Donohue et alが公表したタンパク質配列は、37位のAsn(Aspの代わり)及び119位のGln(Gluの代わり)のみが相違する。そのため、用語「サーモリシン」、「ステアロリシン」、「バシロリシン」、「プロテイナーゼT」、「PrT」、「サーモリシン様プロテアーゼ」、及び「TLP」は、バチルス・サーモプロテオリティカスの中性メタロプロテアーゼ酵素を指すものとして本明細書ではほぼ同じ意味で使用する。

10

【0038】

本明細書で使用する時、用語「ポリペプチド変異体」は、親又は基準ポリペプチド(限定するものではないが野生型ポリペプチドが挙げられる)のアミノ酸配列と少なくとも1つのアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

【0039】

本明細書で使用する時、「バチルス(Bacillus)属」としては、当業者に既知の「バチルス(Bacillus)」属のすべての種を包含し、限定するものではないが、例えば、枯草菌(*B. subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス(*B. licheniformis*)、バチルス・レントラス(*B. lentus*)、バチルス・ブレビス(*B. brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス(*B. stearothermophilus*)、バチルス・アルカロフィルス(*B. alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・クラウシイ(*B. clausii*)、バチルス・ハロデュランス(*B. halodurans*)、バチルス・メガテリウム(巨大菌、*B. megaterium*)、バチルス・コアギュランス(*B. coagulans*)、バチルス・サークルランス(*B. circulans*)、バチルス・ロータス(*B. lautus*)、及びバチルス・チューリングエンシス(*B. thuringiensis*)が挙げられる。バチルス属は分類学上の再構築を絶えず受けているものと認識される。したがって、この属は、再分類された種を包含することを意図し、例えば、限定するものではないが、現在は「ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス」と命名されているバチルス・ステアロサーモフィルス(*B. stearothermophilus*)のような生物を包含する。酸素存在下での耐性芽胞の生成は、バチルス属を決定付ける特徴と考えられるが、この特徴は最近命名されたアリシクロバチルス属(*Alicyclobacillus*)、アンフィバチルス属(*Amphibacillus*)、アニューリニバチルス属(*Aneurinibacillus*)、アノキシバチルス属(*Anoxybacillus*)、ブレビバチルス属(*Brevibacillus*)、フィロバチルス属(*Filobacillus*)、グラシリバチルス属(*Gracilibacillus*)、ハロバチルス属(*Halobacillus*)、パエニバチルス属(*Paenibacillus*)、サリバチルス属(*Salibacillus*)、サーモバチルス属(*Thermobacillus*)、ウレイバチルス属(*Ureibacillus*)、及びバージバチルス属(*Virgibacillus*)にも当てはまる。

20

30

【0040】

用語「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、本明細書ではほぼ同じ意味で使用され、ヌクレオチドモノマーが鎖状に共有結合している任意の長さのポリマーを指す。デオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであるDNA(デオキシリボ核酸)、及びリボヌクレオチドポリマーであるRNA(リボ核酸)は、異なる生物学的機能を有するポリヌクレオチド又は核酸の例である。ポリヌクレオチド又は核酸としては、限定するものではないが、一本鎖、二本鎖、又は三本鎖DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、DNA-RNAハイブリッド、又はプリン塩基及びピリミジン塩基、若しくは他の天然の、化学的に改変された、生化学的に改変された、非天然の、若しくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが挙げられる。次のものはポリヌクレオチドの非限定例である：遺伝子、遺伝子断片、染色体断片、発現配列タグ(EST)、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、リボザイム、相補的DNA(cDNA)、組み換えポリヌクレオチド、分枝鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の

40

50

単離RNA、核酸プローブ、及びプライマー。

【0041】

本明細書で使用するとき、用語「変異」は、基準とするアミノ酸配列又は核酸配列に生じた変化を指す。この用語には、置換、挿入及び欠失が包含されることを意図する。

【0042】

本明細書で使用するとき、用語、「ベクター」は、核酸を標的細胞又は組織の中に導入する又は移入するために使用される核酸構築物を指す。ベクターは、典型的には、外来DNAを細胞又は組織に導入するために使用される。ベクターとしては、プラスミド、クローニングベクター、バクテリオファージ、ウイルス（例えば、ウイルスベクター）、コスミド、発現ベクター、シャトルベクターなどが挙げられる。典型的には、ベクターは複製開始点、マルチクローニング部位、及び選択マーカーを備えている。ベクターを標的細胞に挿入するプロセスは、典型的に形質転換と呼ばれる。一部の実施形態では、本発明は、メタロプロテアーゼポリペプチド（例えば、前駆体又は成熟メタロプロテアーゼポリペプチド）をコードするDNA配列を含むベクターを包含するものであり、当該DNA配列は、好適な宿主内でのDNA配列の発現、並びに組み換えポリペプチド鎖のフォールディング及び転座を行うことができる好適なプロ配列（例えば、分泌性のシグナルペプチド配列など）に機能的に連結される。

10

【0043】

本明細書で使用するとき、用語「発現カセット」、「発現プラスミド」又は「発現ベクター」は、対象とする核酸を標的細胞で発現させるための組み換え又は合成により生成される核酸構築物又はベクターを指す。発現ベクター又は発現カセットは、典型的には外来核酸の発現を促進するプロモーターヌクレオチド配列を含む。また、典型的には発現ベクター又はカセットは、標的細胞で特定の核酸の転写を可能にする任意の他の指定された核酸エレメントを包含する。組み換え型発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス、又は核酸断片に組み込むことができる。多くの原核及び真核細胞発現ベクターが、市販されている。

20

【0044】

一部の実施形態では、配列の両末端は、DNA構築物が閉環を形成するように閉じている。当業者に周知である技術を用いてDNA構築物に組み込まれる、対象とする核酸配列は、野生型、変異型、又は修飾型核酸であり得る。一部の実施形態では、DNA構築物は、宿主細胞染色体と相同である核酸配列を1種以上含む。他の実施形態においては、DNA構築物は、非相同的なヌクレオチド配列を1種以上含む。DNA構築物はインビトロでアセンブルされた後、例えば：1）非相同配列を宿主細胞の所望の標的配列に挿入するために、及び/又は2）宿主細胞染色体領域に変異を誘発する（すなわち、内因性配列を非相同配列と置き換える）ために、3）標的遺伝子を欠失させるために、及び/又は4）複製プラスミドを宿主に導入するために用いられうる。「DNA構築物」は、本明細書において「発現カセット」とほぼ同じ意味で使用される。

30

【0045】

本明細書で使用するとき、「プラスミド」は、染色体DNAとは独立して複製することのできる染色体外DNA分子を指す。プラスミドは二本鎖（ds）であり、環状であってもよく、典型的にはクローニングベクターとして使用される。

40

【0046】

本明細書で、核酸配列を細胞に導入する文脈において使用するとき、用語「導入」は、核酸配列を細胞に移入するのに好適な任意の方法を指す。かかる導入方法としては、限定するものではないが、プロトプラスト融合、トランスフェクション、形質転換、電気穿孔、コンジュゲーション、及び形質導入が挙げられる（例えば、Ferrari et al., 「Genetics」, in Hardwood et al (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57~72頁 [1989年]を参照されたい）。

【0047】

50

形質転換は、遺伝子材料（例えば、DNA）の取り込み、任意でゲノムへの組み込み、及び発現により生じる、細胞の遺伝的变化を指す。

【0048】

本明細書で使用する時、核酸は、別の核酸配列と機能的に関連を持つよう配置された場合に、別の核酸配列と「機能的に連結」される。例えば、プロモーターがコード配列の転写に影響を与える場合、プロモーター又はエンハンサーは、ヌクレオチドコード配列に機能的に連結される。リボソーム結合部位は、コード配列の翻訳を促進するように配置される場合、コード配列に機能的に連結され得る。通常、「機能的に連結された」DNA配列は隣接している。ただし、エンハンサーは、隣接する必要はない。連結は、好都合な制限部位におけるライゲーションにより達成される。このような部位が存在しない場合には、従来の実践に従い、合成オリゴヌクレオチドアダプタ又はリンカーが用いられ得る。

10

【0049】

本明細書で使用する時、用語「遺伝子」は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、DNAセグメント）を指し、コード領域の前及び後に続く領域、並びに個々のコード配列（エクソン）の間に存在する介在配列（イントロン）を包含する。

【0050】

本明細書で使用する時、細胞を参照して使用する場合の「組み換え」は、典型的には、その細胞が外来核酸配列の導入により改変されていること、あるいは、その細胞がそのように改変された細胞から誘導されることを指す。例えば、組み換え細胞は、ネイティブ（非組み換え型）型の細胞において同一の形で見られない遺伝子を含み得るか、又は組み換え細胞は、改変されて細胞に再導入されているネイティブ遺伝子（ネイティブ型の細胞で見られる遺伝子）を含み得る。組み換え細胞は、細胞から核酸を除去することなく改変されている細胞に対して内因性の核酸を含み得るが、このような改変としては、遺伝子置換、部位特異的変異、及び当業者に既知の関連技術によって生じる改変が挙げられる。組み換えDNA技術には、インビトロで組み換えDNAを生産する技術、及び組み換えDNAが発現され得る又は増加し得る細胞に組み換えDNAを移入して、それによって組み換えポリペプチドが産生される技術が挙げられる。ポリヌクレオチド又は核酸の「組み換え（Recombination）」、「組換する（recombining）」及び「組み換えられた（recombined）」は、概して、2つ以上の核酸若しくはポリヌクレオチド鎖若しくは断片をアセンブル又は結合させて新しいポリヌクレオチド又は核酸を生成することを指す。組み換えポリヌクレオチド又は核酸は、時にキメラと呼ばれる。核酸又はポリペプチドは、人工的であるか又は操作されている場合、「組み換え型」である。

20

30

【0051】

本明細書で使用する時、核酸又は遺伝子の「増幅」といった用語は、増幅させた核酸又は遺伝子が、ゲノム中に最初に存在していたコピー数よりもより多くのコピー数で存在するように、特異的DNA配列を不釣り合いに複製させるプロセスを指す。一部の実施形態では、薬剤（例えば、阻害可能な酵素の阻害剤）の存在下で増殖させることによる細胞選別の結果、薬剤の存在下での増殖に必要とされる遺伝子産物をコードする内因性遺伝子が増幅されるか、又はこの核酸若しくは遺伝子産物又はこれら両方をコードする外因性の（すなわち、導入）配列が増幅されることになる。

40

【0052】

「増幅」は鋳型特異性を伴う核酸複製の特殊例である。これは非特異的な鋳型複製（すなわち、鋳型依存的であるが、特定の鋳型に依存しない複製）と対比をなす。ここで、鋳型特異性は、複製の忠実度（すなわち、適切なポリヌクレオチド配列が合成される度合い）及びヌクレオチド（リボ又はデオキシリボヌクレオチド）の特異性とは区別される。鋳型特異性は、しばしば「標的」特異性に関して記載される。標的配列は、他の核酸から選別されることが求められるという意味での「標的」である。増幅技術は主にこの選別のために設計されている。

【0053】

本明細書で使用する時、用語「プライマー」は、精製された制限酵素消化物として天

50

然に存在するか、又は合成により生成されるかによらず、核酸鎖に対して相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件（すなわち、ヌクレオチド、及びDNAポリメラーゼなどの誘導物質の存在下で、かつ好適な温度及びpH）下に置かれた場合に、合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチド（ヌクレオチド残基のポリマー）を指す。好ましくは、プライマーは増幅効率を最大にするために一本鎖であるが、あるいは、二本鎖であってもよい。二本鎖の場合、プライマーを最初に処理してその鎖を分離した後、伸長産物を調製するために使用する。一部の実施形態では、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、誘導物質の存在下で伸長産物の合成を開始するのに十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマー供給源、及び使用方法などの様々な要因に依存する。

10

【0054】

本明細書で使用する時、用語「プローブ」は、精製された制限酵素消化物として天然に存在するか、又は合成、組み換え、若しくはPCR増幅により生成されるかによらず、典型的に対象とする他のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを指す。プローブは一本鎖又は二本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、及び単離に有用である。本発明で用いられる任意のプローブは、限定するものではないが酵素（例えば、ELISA、並びに酵素を用いる組織化学アッセイ）、蛍光、放射活性、及び発光システムなどの任意の検出システムで検出され得るように、任意の「リポーター分子」により標識されると想到される。本発明は、任意の特定の検出システム又は標識に制限されないと意図される。

20

【0055】

本明細書で使用する時、用語「標的」は、ポリメラーゼ連鎖反応に関し使用する場合、ポリメラーゼ連鎖反応に使用されるプライマーが結合する核酸領域を指す。したがって、「標的」は他の核酸配列から選別されることが求められる。ヌクレオチド「セグメント」は、標的核酸配列内の核酸領域である。

【0056】

本明細書で使用する時、用語「ポリメラーゼ連鎖反応」（PCR）は、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、及び同第4,965,188号（これらは参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法を指し、クローニング又は精製することなくゲノムDNA混合物中の標的配列セグメントの濃度を増加させる方法を包含する。標的配列のこの増幅プロセスは当業者に周知である。

30

【0057】

本明細書で使用する時、用語「増幅試薬」は、プライマー、核酸鋳型、及び増幅酵素を除く、増幅に必要とされる試薬を指す（例えば、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、緩衝液など）。典型的に、増幅試薬は他の反応成分と共に反応容器（試験管、マイクロウェルなど）に入れて、その中に含まれる。

【0058】

本明細書で使用する時、用語「制限エンドヌクレアーゼ」又は「制限酵素」は、制限部位として知られる特異的ヌクレオチド配列又はその近傍で二本鎖又は一本鎖DNAを切断することのできる酵素（例えば、細菌酵素）を指す。制限部位を含むヌクレオチド配列は、所定の制限エンドヌクレアーゼ又は制限酵素により認識及び開裂され、しばしばDNA断片の挿入部位になる。制限部位は、発現ベクター又はDNA構築物中に工学操作することができる。

40

【0059】

「相同的組換え」は、同一の若しくはほとんど同一のヌクレオチド配列部位での2つのDNA分子又は染色体対の間で生じるDNA断片の交換を指す。一部の実施形態では、染色体への組み込みは相同的組換えである。

【0060】

核酸又はポリヌクレオチドは、ネイティブな状態にせよ又は当業者に既知の手法により工学操作された場合にせよ、転写及び/又は翻訳されてポリペプチド又はそれらの断片を

50

産生できるのであれば、ポリペプチドを「コードする」と言われる。このような核酸のアンチセンス鎖も、同様に、配列をコードすると言われる。

【 0 0 6 1 】

「宿主株」又は「宿主細胞」は、対象とするDNA配列を含む発現ベクターにとって好適な宿主を指す。

【 0 0 6 2 】

「タンパク質」又は「ポリペプチド」は、アミノ酸残基のポリマー配列からなる。「タンパク質」及び「ポリペプチド」なる用語は、本明細書ではほぼ同じ意味で使用される。IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) に従い定義されるアミノ酸の一字表記及び三文字表記を、本開示全体を通して使用する。一字のXは、20種のアミノ酸のうちのいずれかを指す。ポリペプチドは、遺伝子コードの縮重により1種以上のヌクレオチド配列によりコードされる場合があることも理解されたい。変異は、親アミノ酸の1文字表記、続いて位置番号、次に変異アミノ酸を表す1文字表記により記載される。例えば、87位でのグリシン(G)のセリン(S)への変異は、「G087S」又は「G87S」と表される。変異は、また、アミノ酸の3文字表記に続いて、ポリペプチド鎖のN末端から数えた位置により記載されることがあり、例えば、10位のアラニンはAla10で記載される。複数の変異は、「-」を変異の間に挿入することで示される。87位及び90位での変異は、「G087S-A090Y」若しくは「G87S-A90Y」、又は「G87S+A90Y」若しくは「G087S+A090Y」のいずれかとして表される。欠失については、一字コード「Z」を使用する。親配列に対する挿入については、一字コード「Z」を位置番号の左側に記載する。欠失については、一字コード「Z」を位置番号の右側に記載する。挿入については、位置番号は、挿入されるアミノ酸の前の位置番号にアミノ酸毎に0.01を加えた番号である。例えば、3種のアミノ酸アラニン(A)、セリン(S)及びチロシン(Y)を位置87と88の間に挿入する場合は、「Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y」として示される。そのため、上記の全ての変異と100位での欠失とを組み合わせると、「G087S-Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z」となる。改変を記載する場合、位置番号の後に括弧で括られたアミノ酸記号が続くと、括弧で括られたアミノ酸のうちいずれかによるその位置での置換のリストを表す。例えば、6(L,I)とは、6位がロイシン又はイソロイシンで置換され得ることを意味する。

【 0 0 6 3 】

「プロ配列」又は「プロペプチド配列」とは、適切なフォールディング及びプロテアーゼの分泌にとって必要な、シグナルペプチド配列と成熟型プロテアーゼ配列との間のアミノ酸配列を指す。これらは、分子内シャペロン分子と称されることもある。プロ配列又はプロペプチド配列の開裂により、成熟型活性プロテアーゼを生じる。細菌メタロプロテアーゼは、プロ酵素と表現されることが多い。

【 0 0 6 4 】

用語「シグナル配列」又は「シグナルペプチド」は、成熟型又は前駆体型タンパク質の分泌又は直接輸送に関与し得るアミノ酸残基の配列を指す。シグナル配列は、典型的に、前駆体型又は成熟型タンパク質配列のN末端に位置する。シグナル配列は内因性又は外来性であり得る。シグナル配列は通常、成熟型タンパク質には存在しない。シグナル配列は、典型的には、タンパク質の輸送後にシグナルペプチダーゼによりタンパク質から開裂される。

【 0 0 6 5 】

用語「成熟型」タンパク質、ポリペプチド又はペプチドとは、シグナルペプチド配列及びプロペプチド配列を持たないタンパク質、ポリペプチド又はペプチドの機能的形態を指す。

【 0 0 6 6 】

用語「前駆体」型タンパク質又はペプチドとは、タンパク質のアミノ末端又はカルボニ

10

20

30

40

50

ル末端に機能的に連結されたプロ配列を有する成熟型タンパク質を指す。前駆体型タンパク質又はペプチドは、プロ配列のアミノ末端に、機能的に連結された「シグナル」配列を有する場合もある。前駆型タンパク質又はペプチドは、翻訳後活性に関係する追加のポリペプチド（例えば、前駆体から開裂されて、成熟型のタンパク質又はペプチドを後に残すポリペプチド）を有する場合もある。

【0067】

アミノ酸配列又は核酸配列に関する用語「野生型」は、そのアミノ酸配列又は核酸配列がネイティブ又は天然起源の配列であることを示す。本明細書で使用する時、用語「天然起源」とは、自然界で見出される任意のもの（例えば、タンパク質、アミノ酸、又は核酸配列）を指す。

10

【0068】

本明細書で使用する時、用語「非天然起源」とは、自然界で見出されない任意のもの（例えば、研究室で産生された組み換え型核酸及びタンパク質配列）を指す。

【0069】

本明細書でアミノ酸残基の位置に関して使用する時、「対応する（「corresponding to」又は「corresponds to」又は「corresponds」）」とは、タンパク質若しくはペプチド中の列挙された位置にあるアミノ酸残基、又はタンパク質若しくはペプチド中の列挙された残基と類似、相同、若しくは等価であるアミノ酸残基を指す。本明細書で使用する時、「対応する領域」とは、概して、関連するタンパク質又は基準タンパク質における類似の位置を指す。

20

【0070】

本明細書で使用する時、用語「に由来する」及び「から得られる」とは、当該生物株により産生されるあるいは産生され得るタンパク質だけでなく、このような株から単離されるDNA配列によってコードされ、このようなDNA配列を含有している宿主生物で産生されるタンパク質も指す。更にこれらの用語は、合成DNA配列及び/又はcDNA起源のDNA配列によりコードされかつ当該タンパク質の識別特徴を有するタンパク質を指す。例示すると、「パチルス属に由来するプロテアーゼ」は、パチルス属により自然に生産されたタンパク質分解活性を有する酵素、並びにパチルス属供給源により生産される酵素と類似であるが、遺伝子工学技術を使用することにより、セリンプロテアーゼをコードする核酸によって形質転換された非パチルス生物によって生産されるセリンプロテアーゼを指す。

30

【0071】

2つの核酸又はポリペプチド配列の文脈において、用語「同一」は、以下の配列比較又は解析アルゴリズムのうちの1つを用いて測定する際に、最大限一致するように整列させたときに同じである2つの配列中の残基を指す。

【0072】

本明細書で使用する時、用語「相同な遺伝子」は、互いに対応し、かつ互いに同一であるか又は非常に類似している、異なるが通常は近縁種からの一対の遺伝子を指す。この用語は、種分化（すなわち、新種の発生）により分離される遺伝子（例えば、オルソログ遺伝子）、並びに遺伝子複製により分離されている遺伝子（例えば、パラログ遺伝子）を包含する。

40

【0073】

本明細書で使用する時、「同一性（%）又は同一性パーセント」とは、配列類似性を指す。同一性パーセントは、当該技術分野で既知の標準的な方法を用いて求めることができる（例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482頁[1981年]、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443頁[1970年]、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444頁[1988年]、software programs such as GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics

50

Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI)、及び Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12: 387~395 頁 [1984 年] を参照されたい)。有用なアルゴリズムの一例は、PILEUP である。PILEUP は、プログレッシブペアワイズアラインメント法を用いて、関連する配列群から複数の配列のアラインメントを作成する。PILEUP は、アラインメントを作成するのに使用されるクラスタリング関連性を示す系統樹をプロットすることもできる。PILEUP は、Feng 及び Doolittle のプログレッシブアラインメント法を単純化したものを使用する (Feng 及び Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351~360 頁 [1987 年] を参照されたい)。この方法は、Higgins 及び Sharp により記載されたものと類似のものである (Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151~153 頁 [1989 年] を参照されたい)。有用な PILEUP パラメータとしては、3.00 のデフォルトギャップ重み (default gap weight)、0.10 のデフォルトギャップ長重み (default gap length weight) 及び重み付きエンドギャップ (weighted end gaps) が挙げられる。他の有用なアルゴリズムには、Altschul が記載している BLAST アルゴリズムがある (See, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403~410 頁 [1990 年]、及び Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873~5787 頁 [1993 年])。BLAST プログラムは、そのほとんどがデフォルト値に設定される複数の検索パラメータを使用する。

10

20

【0074】

NCBI BLAST アルゴリズムは、生物学的類似性の観点から最も関連性がある配列を見出すが、残基数が 20 未満の問い合わせ配列には推奨されない (Altschul, S. F. et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389~3402 頁 (1997 年)、及び Schaffer, A. A. et al., Nucleic Acids Res. 29: 2994~3005 頁 (2001 年))。核酸配列の検索におけるデフォルトの BLAST パラメータ例は次の通りである。

- ・隣接ワード閾値: 11
- ・E 値カットオフ: 10
- ・スコア行列: NUC. 3.1 (マッチ = 1、ミスマッチ = -3)
- ・ギャップ開始ペナルティ: 5
- ・ギャップ伸長ペナルティ: 2
- ・また、アミノ酸配列検索におけるデフォルトの BLAST パラメータ例は次の通りである。

30

- ・ワードサイズ: 3
- ・E 値カットオフ: 10
- ・スコア行列: BLOSUM62
- ・ギャップ開始ペナルティ: 11
- ・ギャップ伸長ペナルティ: 1

【0075】

アミノ酸配列同一性パーセント (%) は、最適 / 最大のアラインメントが得られるようにプログラムによって作成された任意のギャップを含む「基準」配列の残基総数で、マッチする同一残基数を除ることによって決定される。配列が配列番号 A と 90% 同一である場合、配列番号 A は「基準」配列である。BLAST アルゴリズムでは、「基準」配列を「問い合わせ」配列と呼ぶ。

40

【0076】

CLUSTAL W アルゴリズムは、別の配列アラインメントアルゴリズム例である。Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22: 4673~4680 頁 (1994) を参照されたい。CLUSTAL W アルゴリズムのデフォルトパラメータは、次の通りである。

50

【 0 0 7 7 】

【表 1】

ギャップ開始ペナルティ :	1 0 . 0	
ギャップ伸長ペナルティ :	0 . 0 5	
タンパク質重み行列 (Protein weight matrix) :	B L O S U M 系 列	
DNA重み行列 (DNA weight matrix) :	I U B	
相違配列の遅延時間 (Delay divergent sequences) % :	4 0	
ギャップ分離距離 (Gap separation distance) :	8	10
DNAトランジション重み (DNA transitions weight) :	0 . 5 0	
親水性残基のリスト (List hydrophilic residues) :	G P S N D Q E K R	
負行列の使用 (Use negative matrix) :	なし	
残基特定のペナルティの切り替え (Toggle Residue specific penalties) :	あり	
親水性ペナルティの切り替え (Toggle hydrophilic penalties) :	あり	
エンドギャップ分離ペナルティの切り替え :	なし	

20

【 0 0 7 8 】

C L U S T A L アルゴリズムでは、どちらか一方の末端に存在する欠失を含める。例えば、5 0 0 個のアミノ酸からなるポリペプチドのどちらか一方の末端で (又はポリペプチド内に) アミノ酸 5 個の欠失を有する変異体は、「基準」ポリペプチドに対して 9 9 % の配列同一性パーセントを有する (同一残基 4 9 5 個 / 5 0 0 個 \times 1 0 0)。このような変異体は、ポリペプチドに対して「少なくとも 9 9 % の配列同一性」を有する変異体に包含されるであろう。

【 0 0 7 9 】

対象とするポリペプチドが基準ポリペプチドのアミノ酸配列に対して少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 9 . 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む場合、対象とするポリペプチドは基準ポリペプチドと「実質上同一である」と言われ得る。2 つのこのようなポリペプチド間の同一性 (%) は、最適に整列させた 2 つのポリペプチド配列を目視することにより、又は標準的なパラメータを用いるソフトウェアプログラム若しくはアルゴリズム (例えば、B L A S T , A L I G N , C L U S T A L) を使用することにより、決定することができる。第一のポリペプチドが第二のポリペプチドと免疫学的に交差反応することは、2 つのポリペプチドが実質的に同一であるの 1 つの指標になる。典型的に、保存的アミノ酸置換が異なるポリペプチドは、免疫学的に交差反応する。したがって、例えば、2 つのペプチドが、保存的アミノ酸置換のみが異なる、又は 1 つ以上の保存的アミノ酸置換のみが異なる場合、ポリペプチドは第二のポリペプチドと実質的に同一である。

30

40

【 0 0 8 0 】

対象とする核酸が基準核酸のヌクレオチド配列に対して少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は少なくとも約 9 9 . 5 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む場合、対象とする核酸は基準核酸と「実質上

50

同一である」と言われうる。2つのこのような核酸間の同一性(%)は、最適に整列させた2つの核酸配列を目視することにより、又は標準的なパラメータを用いるソフトウェアプログラム又はアルゴリズム(例えば、BLAST、ALIGN、CLUSTAL)を使用することにより、決定することができる。ストリンジェントな条件下(例えば、中程度から高ストリンジェンシーまでの範囲)で、2つの核酸分子が互いにハイブリダイズすることは、2つの核酸配列が実質的に同一であることの1つの指標になる。

【0081】

核酸又はポリヌクレオチドが、例えば他のタンパク質、核酸、細胞等が挙げられるがこれらに限定されない他の成分から少なくとも部分的又は完全に分離されているとき、核酸又はポリヌクレオチドは「単離され」ている。同様に、ポリペプチド、タンパク質又はペプチドが、例えば他のタンパク質、核酸、細胞等が挙げられるがこれらに限定されない他の成分から少なくとも部分的又は完全に分離されているとき、ポリペプチド、タンパク質又はペプチドは「単離され」ている。単離された種は、モルベースで、組成物中に他の種よりも豊富に含まれている。例えば、単離された種は、含まれている全ての高分子種の(モルベースで)少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99又は約100%を構成し得る。好ましくは、対象とする種は、本質的に均一に精製される(すなわち、通常の検出手法により組成物中で汚染種が検出されることはない)。純度及び均一性は、当該技術分野で周知の多数の技術、例えば核酸又はタンパク質試料のそれぞれアガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動後の染色による可視化を用いて決定することができる。必要に応じて、高解像度の技術、例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)又は同様の手法を用いて材料を精製することができる。

【0082】

「ハイブリダイゼーション」とは、核酸の一つの鎖が、相補鎖と二本鎖、すなわち塩基対を形成するプロセスを指す。中等度～高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件下で2つの配列が互いに特異的にハイブリダイズする場合、核酸配列は基準核酸配列に「選択的にハイブリダイズ可能」であるものと見なされる。ハイブリダイゼーション条件は、核酸結合複合体又はプローブの融解温度(T_m)に基づく。例えば一般的に、「最高のストリンジェンシー」はおおよそ $T_m - 5$ (プローブの T_m よりも5低い温度)で起こり、「高ストリンジェンシー」は T_m よりも約5～10低い温度で起こり、「中等度のストリンジェンシー」はプローブの T_m よりも約10～20低い温度で起こり、そして「低ストリンジェンシー」は T_m よりも約20～25低い温度で起こる。機能上、最高限度のストリンジェンシー条件は、ハイブリダイゼーションプローブと厳密な同一性又はほぼ厳密な同一性を有する配列を同定するために用いられ、一方、中等度又は低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチド配列同族体を同定又は検出するために用いられ得る。

【0083】

中度及び高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野において周知である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、次の条件下でのハイブリダイゼーションにより例示される: 65 及び 0.1 x SSC (ここで、1 x SSC = 0.15 M NaCl、0.015 M クエン酸 Na_3 、pH 7.0)。ハイブリダイズした二本鎖核酸は、ハイブリダイズした核酸の半分が相補鎖と塩基対を形成していない融解温度(T_m)で特徴づけられる。二本鎖核酸中にミスマッチ核酸があれば、 T_m が低下する。非常にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、68 及び 0.1 x SSC を要する。メタロプロテアーゼ変異体をコードする核酸は、配列番号4の核酸とその同一の相補体との間に形成された二重鎖核酸に比べて1～3 以上低い T_m を有し得る。

【0084】

高ストリンジェンシー条件の別の例としては、50%ホルムアミド、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS及び100 µg/ml変性キャリアDNA中、約42でのハイブリダイゼーションの後、室温において2×SSC及び0.5% SDSで2回洗浄し、そして42において0.1×SSC及び0.5% SDSで更に2回洗浄することが挙げられる。中等度のハイブリダイゼーション条件の例としては、20%ホルムアミド、5×SSC(150 mM NaCl、15 mMクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20 mg/ml断片処理済の変性サケ精子DNAを含む溶液中、37において一晚インキュベーションした後、フィルターを約37~50において1×SSCで洗浄することが挙げられる。プローブ長などの要因を適応させるために、温度、イオン強度などを調節する方法は当業者に既知である。

10

【0085】

核酸又はポリペプチドに使用される場合、用語「精製された」は、概して、当業者に周知の解析技術により決定したときに、核酸又はポリペプチドが他の成分を本質的に含まないことを意味する(例えば、精製ポリペプチド又はポリヌクレオチドは、電気泳動ゲル、クロマトグラフィー溶出液、及び/又は密度勾配遠心分離にかけた培養液中で、別個のバンドを形成する)。例えば、電気泳動ゲル中で本質的に1つのバンドを生じる核酸又はポリペプチドは、「精製され」ている。精製された核酸又はポリペプチドの純度(例えば、モルベースの重量%)は、少なくとも約50%、通常は少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%、約99.6%、約99.7%、約99.8%又はそれ以上である。これに関連し、本発明は、本発明の1つ以上のポリペプチド又はポリヌクレオチドのような本発明の分子1つ以上について組成物を濃縮する方法を提供する。精製又は濃縮技術の適用後に分子の濃度を実質的に増加している場合、組成物はその分子について濃縮されている。本発明の実質的に純粋なポリペプチド又はポリヌクレオチド(例えばそれぞれ、実質的に純粋なメタロプロテアーゼポリペプチド、又は本発明のメタロプロテアーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)は、典型的には、特定の組成物中ですべての高分子種の(モルベースで)少なくとも約55重量%、約60重量%、約65重量%、約70重量%、約75重量%、約80重量%、約85重量%、約90重量%、約91重量%、約92重量%、約93重量%、約94重量%、約95重量%、約96重量%、約97重量%、約98重量%、約99重量%、又は約99.5重量%又はそれ以上を構成する。

20

30

【0086】

用語「濃縮された」とは、化合物、ポリペプチド、細胞、核酸、アミノ酸、又は他の特定の材料若しくは成分が開始組成物よりも高い相対濃度又は絶対濃度で組成物中に存在することを指す。

【0087】

これに関連して、本発明は、1つ以上の本発明の分子、例えば1つ以上の本発明のポリペプチド(例えば、1つ以上の本発明のメタロプロテアーゼポリペプチド)又は1つ以上の本発明の核酸(例えば、1つ以上の本発明のメタロプロテアーゼポリペプチドをコードする1つ以上の核酸)について組成物を濃縮する方法を提供する。精製又は濃縮技術の適用後に分子の濃度を実質的に増加している場合、組成物はその分子について濃縮されている。実質的に純粋なポリペプチド又はポリヌクレオチドは、典型的には、特定の組成物中で、すべての高分子種の(モルベースで)少なくとも約55重量%、約60重量%、約65重量%、約70重量%、約75重量%、約80重量%、約85重量%、約90重量%、約91重量%、約92重量%、約93重量%、約94重量%、約95重量%、約96重量%、約97重量%、約98重量%、約99重量%、約99.5重量%又はそれ以上を構成する。

40

【0088】

本明細書で使用するとき、用語「コンビナトリアル変異導入」又は「コンビナトリアル

50

」とは、基準核酸配列の核酸変異体のライブラリを作成する方法を指す。これらのライブラリでは、変異体は既定の変異の組から選択された1つ以上の変異を含有している。この方法は、既定の変異の組のメンバーではないランダム変異を導入する手段も提供する。このような方法のうちのいくつかのものは、米国特許第6,582,914号に記載されており、この特許は参照により本明細書に組み込まれる。このようなコンビナトリアル変異導入法のうち一部のものには、市販のキット（例えば、QUIKCHANGE（登録商標）多部位特異的変異導入キット（Stratagene）、PCR融合/伸長PCR）で具体化される方法が挙げられ、及び/又は包含される。

【0089】

本明細書で使用する時、変異体プロテアーゼに関連して使用される「改善された特性を有する」とは、対応する基準プロテアーゼ（例えば、野生型又は天然起源のプロテアーゼ）と比較した場合に、変異型プロテアーゼの洗浄性能若しくはクリーニング性能が改善又は増強されていること、及び/又は場合により洗浄若しくはクリーニング性能は保持されたまま安定性が改善又は増強されている変異体プロテアーゼを意味する。変異体プロテアーゼの特性の改善には、洗浄若しくはクリーニング性能の改善及び/又は安定性の改善が含まれ得る。一部の実施形態では、本発明は、次の特性のうち1つ以上を呈する本発明の変異型プロテアーゼを提供する：基準プロテアーゼ（例えば、野生型サーモリシンなどの、野生型プロテアーゼ）と比較した場合に、手洗いの洗浄性能の改善、食器手洗い性能若しくは手動食器洗浄性能の改善、自動食器洗浄性能の改善、洗濯性能の改善、及び/又は安定性の改善。

【0090】

本明細書で使用する時、用語「機能的アッセイ」は、タンパク質活性の指標を提供するアッセイを指す。一部の実施形態では、この用語は、タンパク質を、通常的能力範囲で機能できるかに関して解析するアッセイ系を指す。例えば、酵素の場合、機能的アッセイは、反応を触媒する酵素の有効性を決定することを包含する。

【0091】

本明細書で使用する時、用語「標的特性」は、開始遺伝子から変化させることになる特性を指す。本発明は、任意の特定の標的特性に制限されないと意図される。しかしながら、一部の実施形態では、標的特性は遺伝子産物の安定性（例えば、変性、タンパク質分解又は他の分解要因に対する抵抗性）である一方、他の実施形態では、生産宿主による生産レベルが変化する。

【0092】

本明細書で使用する時、核酸に関する文脈における用語「特性」又はそれらの文法的に等価な表現は、選別又は検出が可能な核酸の任意の特性若しくは属性を指す。これらの特性としては、限定するものではないが、ポリペプチドに対する結合に影響する特性、特定の核酸を含む細胞に与えられる特性、遺伝子の転写に影響を与える特性（例えば、プロモーター強度、プロモーター認識、プロモーター制御、エンハンサー機能）、RNAのプロセッシングに影響を与える特性（例えば、RNAスプライシング、RNA安定性、RNAコンフォメーション、及び転写後修飾）、翻訳に影響を与える特性（例えば、mRNAのレベル、調節、リボソームタンパク質に対する結合、翻訳後修飾）が挙げられる。例えば、核酸における、転写因子、ポリメラーゼ、制御因子などの結合部位を変化させることで、所望の特性を生じる、又は望ましくない特性を同定することができる。

【0093】

本明細書で使用する時、（タンパク質を含む）ポリペプチドに関する文脈における用語「特性」又はそれらの文法的に等価な表現は、選別又は検出が可能なポリペプチドの任意の特徴又は属性を指す。これらの特性としては、限定するものではないが、酸化安定性、基質特異性、触媒活性、酵素活性、熱安定性、アルカリ安定性、pH活性プロファイル、タンパク質分解に対する抵抗性、 K_M 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_M 比、タンパク質フォールディング、免疫応答の誘導、リガンドに対する結合能、受容体に対する結合能、分泌され得るか否か、細胞の表面に提示され得るか否か、オリゴマー形成能、シグナル伝達能

、細胞増殖の刺激能、細胞増殖の阻害能、アポトーシス誘導能、リン酸化又はグリコシル化により改変され得るか否か、及び/又は疾患の治療能などが挙げられる。

【0094】

本明細書で使用する時、用語「スクリーニング」は、当該技術分野で通常使用される意味を有する。スクリーニングプロセスの一例では、変異核酸、又はこの核酸によってコードされるポリペプチド変異体が提供されて、変異核酸又はポリペプチド変異体の特性がそれぞれ評価又は決定される。変異核酸又はポリペプチド変異体について決定された特性を、それぞれ、対応する核酸前駆体（親核酸）の特性又は対応する親ポリペプチドの特性と比較することもできる。

【0095】

特性が変化した核酸又はタンパク質を得る際のスクリーニング手順は、変異核酸の生成により、その改変が促進されると意図される開始材料の特性に依存することは当業者には明白である。したがって、本発明はスクリーニングされる任意の特定の特性に制限されるものではなく、また、以下の特性に関する記載は例証のみを掲載していることを、当業者は認識するであろう。任意の特定の特性に関するスクリーニング方法は、一般的に当該技術分野で記載されているものである。例えば、ある方法は、変異の前後の結合、pH、特異性などを測定することができ、それらの変化が変更の指標である。好ましくは、スクリーニングは、同時にスクリーニングされる多数の試料を含むハイスループット方式で実施されるものであって、例えば、限定するものではないが、チップ、ファージディスプレイ、並びに複数の基質及び/又は指示薬を利用するアッセイが挙げられる。

【0096】

本明細書で使用する時、一部の実施形態では、スクリーニングプロセスは、対象とする変異体を、変異体集団から濃縮する選別工程を一工程以上包含する。これらの実施形態の例としては、宿主生物に増殖優位性を与える変異体の選別、並びにファージディスプレイ法又は任意の他のディスプレイ法が挙げられるが、これらの方法では、変異体の結合特性又は触媒特性に基づき、変異体を変異体集団から捕捉することができる。一部の実施形態では、変異体ライブラリをストレス（例えば、熱、変性など）に曝露して、続いてインタクトなままの変異体を、スクリーニングにより同定するか、又は選別により濃縮する。この用語は、選別に関する任意の好適な手段を包含することを意図するものである。実際のところ、本発明は、任意の特定のスクリーニング方法に制限されることを意図しない。

【0097】

用語「改変核酸配列」及び「改変遺伝子」は、天然起源の（すなわち、野生型の）核酸配列の欠失、挿入又は中断を包含する核酸配列を指すために、本明細書においてほぼ同じ意味で使用される。一部の実施形態では、改変された核酸配列の発現産物は、切断型タンパク質である（例えば、改変が配列の欠失又は中断である場合）。一部の実施形態では、切断型タンパク質は生物活性を保持している。代替的な実施形態では、改変された核酸配列の発現産物は、伸長型タンパク質である（例えば、改変が核酸配列への挿入を含む場合）。一部の実施形態では、核酸配列にヌクレオチドを挿入することで切断型タンパク質が得られる（例えば、挿入により終止コドンが形成される場合）。したがって、挿入によって、切断型タンパク質又は伸長型タンパク質のいずれかが発現産物として生じ得る。

【0098】

「変異体」核酸配列は、典型的には、変異体核酸配列の発現産物が、野生型タンパク質と比較してアミノ酸配列が変化しているタンパク質であるよう、宿主細胞の野生型配列に存在する少なくとも1つのコドンの変化を有する核酸配列を指す。発現産物は、変化した機能的能力（例えば、酵素活性の増強）を有し得る。

【0099】

本明細書で使用する時、語句「基質特異性の変化」は、酵素の基質特異性に生じる変化を指す。一部の実施形態では、基質特異性の変化は、酵素の変異、又は反応条件の変化により生じる、特定の基質に関する k_{cat} 及び/又は K_m の変化として定義される。酵素の基質特異性は、その酵素が示す触媒効率を異なる基質と比較することで決定される。

概して、対象とする基質の k_{cat} / K_m 比がより大きい変異体酵素を生産することが所望されることから、これらの決定は、変異体酵素の効率を評価する際に特に有用である。しかしながら、本発明は、いかなる特定の基質組成物又は基質特異性にも制限されないと意図される。

【0100】

本明細書で使用するとき、「表面特性」は、静電荷、並びにタンパク質の表面が示す疎水性及び親水性などの特性に関して使用される。

【0101】

本明細書で使用するとき、用語「実効電荷」は、分子中に存在するすべての電荷の合計として定義される。親タンパク質分子の「実効電荷を変化」させることで、親分子とは異なる実効電荷を有する変異体が得られる（すなわち、変異体は親分子と同じではない実効電荷を有する）。例えば、中性アミノ酸を負電荷を持つアミノ酸に置き換えるか、又は正電荷を持つアミノ酸を中性アミノ酸に置き換えることで、親分子と比較して実効電荷が - 1 になる。正電荷を持つアミノ酸を負電荷を持つアミノ酸に置き換えることで、親分子と比較して実効電荷が - 2 になる。中性アミノ酸を正電荷を持つアミノ酸に置き換えるか、又は負電荷を持つアミノ酸を中性アミノ酸に置き換えることで、親分子と比較して実効電荷が + 1 になる。負電荷を持つアミノ酸を正電荷を持つアミノ酸に置き換えることで、親分子と比較して実効電荷が + 2 になる。親タンパク質の実効電荷は、電荷を持つアミノ酸の欠失及び / 又は挿入によっても変化し得る。

【0102】

用語「熱的に安定な」及び「熱安定性の」及び「熱安定性」は、変化した温度に曝露されているがタンパク質分解、加水分解、クリーニング、又は本発明の他のプロセスの際に一般的に適用される条件下で、所定の時間にわたって特定の温度に曝露された後でも、明記された量の酵素活性を保持するプロテアーゼを意味する。「変化した温度」は、温度の上昇又は低下を包含する。一部の実施形態では、プロテアーゼは、変化した温度に、例えば少なくとも約 60 分、約 120 分、約 180 分、約 240 分、約 300 分などの所定の時間にわたって曝露した後に、少なくとも約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 92 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、又は約 99 % のタンパク質分解活性を保持する。

【0103】

酸化安定性、キレート剤安定性、熱安定性及び / 又は pH 安定性のプロテアーゼに関する文脈において、用語「安定性の強化」は、他のプロテアーゼ（例えば、サーモリシンプロテアーゼ）及び / 又は野生型酵素と比較した場合に、時間が経過しても保持されるタンパク質分解活性が高いことを意味する。

【0104】

酸化安定性、キレート化安定性、熱安定性及び / 又は pH 安定性のプロテアーゼに関する文脈において、用語「安定性の低下」は、他のプロテアーゼ（例えば、サーモリシンプロテアーゼ）及び / 又は野生型酵素と比較した場合に、時間が経過するにつれて保持されるタンパク質分解活性が低下することを意味する。

【0105】

用語「クリーニング活性」は、タンパク質分解、加水分解、クリーニング、又は本発明の他のプロセスの際に一般的に適用される条件下で、プロテアーゼ変異体又は基準プロテアーゼにより得られるクリーニング性能を指す。一部の実施形態では、プロテアーゼ変異体又は基準プロテアーゼのクリーニング性能は、物品又は表面上の 1 種以上の様々な酵素反応性の染み（例えば、食物、草類、血液、インク、牛乳、油及び / 又は卵タンパク質による染み）をクリーニングするための様々なアッセイを用いることで決定され得る。プロテアーゼ変異体又は基準プロテアーゼのクリーニング性能は、物品又は表面上の染みを標準的な洗浄条件に晒す工程、及び染みが除去される程度を、様々なクロマトグラフィー、分光光度法、又はその他の定量法を用いて評価する工程によって決定され得る。例示的なクリーニングアッセイ及び方法は当該技術分野において既知であり、かつ限定されるもの

ではないが、例えば、PCT国際特許出願公開第WO 99/34011号及び米国特許第6,605,458号（これら公報はいずれも参照により本明細書に組み込まれる）に記載のもの、並びに本明細書のこれより以降に提供される実施例に包含されるクリーニングアッセイ及びクリーニング方法が挙げられる。

【0106】

プロテアーゼ変異体又は基準プロテアーゼの「クリーニング有効量」という表現は、特定のクリーニング組成物中で、所望のレベルの酵素活性を達成するプロテアーゼの量を指す。このような有効量は、当業者によって容易に確認され、使用される特定のプロテアーゼ、クリーニング用途、クリーニング組成物の具体的な組成、及び必要とされる組成物が液体又は乾燥形態（例えば、粒状、錠剤、バー状）のいずれであるのか、などの多くの要因に基づくものである。

10

【0107】

用語「クリーニング助剤」は、クリーニング組成物に包含される、本発明の変異体プロテアーゼ以外の任意の液体、固体、又はガス状の材料を指す。一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、1種以上のクリーニング助剤を包含する。各クリーニング助剤は、典型的には、クリーニング組成物の特定のタイプ及び形態（例えば、液体、粒状、粉末、バー状、ペースト、スプレー、錠剤、ゲル、フォーム、又はその他の構成）に応じて選択される。好ましくは、各クリーニング助剤は、組成物に使用されるプロテアーゼ酵素と適合性である。

【0108】

20

クリーニング活性の文脈における表現「性能の強化」は、標準的な洗浄サイクル及び/又は複数回の洗浄サイクル後に通常の評価により決定されたときに、卵、牛乳、草類、インク、油、及び/又は血液などの特定の酵素反応性の染みに対する酵素によるクリーニング活性が増加又はより大きいことを指す。

【0109】

クリーニング活性の文脈における表現「性能の低下」は、標準的な洗浄サイクル後に通常の評価により決定されたときに、卵、牛乳、草類又は血液などの特定の酵素反応性の染みに対する酵素によるクリーニング活性が低下又はより低いことを指す。

【0110】

クリーニング性能は、標準的な洗浄サイクル条件後に通常の分光光度法又は分析技法により決定されたときに、草類、血液、インク、油、及び/又は牛乳などの酵素反応性の染みに関する様々なクリーニングアッセイにおいて、本発明のプロテアーゼ変異体を基準プロテアーゼと比較することで決定することができる。

30

【0111】

本明細書で使用するとき、用語「消費者製品」は、布地ケア製品及びホームケア製品を意味する。本明細書で使用するとき、用語「布地ケア製品及びホームケア製品」又は「布地ケア及び家庭用ケア製品」は、販売される形態で使用又は消費されることが一般的に意図され、かつ布地、硬質表面及び任意の他の表面を処理するための製品、非生物表面のケア及びクリーニングの全般に関するクリーニング系、並びに布地コンディショナー製品及び布地のケア及び維持のために特に設計されたその他の製品、エアケア製品（例えば、エアフレッシュナー及び香り送達系など）、カーケア、ペットケア、家畜ケア、パーソナルケア、ジュエリーケア、食器洗浄、布地コンディショニング（例えば、柔軟化及び/又はフレッシュニングなど）、洗濯洗剤、洗濯及びすすぎ添加剤及び/又はケア剤、前処理クリーニング組成物、硬質表面クリーニング及び/又は処理剤（例えば、床及び便器クリーナー、ガラスクリーナー及び/又は処理剤、タイルクリーナー及び/又は処理剤、セラミッククリーナー及び/又は処理剤など）、並びに消費者若しくは業務用の他のクリーニング剤を包含する。一部の実施形態では、布地ケア製品及びホームケア製品は、創傷部及び/又は皮膚への使用に好適である。「布地ケア製品及びホームケア製品」としては、消費者製品及び業務用製品が挙げられる。

40

【0112】

50

本明細書で使用する時、用語「非布地用ケア製品及びホームケア製品」は、他の組成物に添加することで布地ケア製品及びホームケア製品となり得る最終製品を生成する組成物を指す。

【0113】

本明細書で使用する時、用語「業務用クリーニング組成物」は、限定するものではないが、学校、病院、工場、商店、企業、建造物、飲食店、総合オフィスビル、加工及び／又は製造プラント、動物病院、畜産場、大牧場などの施設での使用に好適な製品を指す。

【0114】

本明細書で使用する時、用語「クリーニング及び／又は処理組成物」は、別途記載のない限り、物品のクリーニング及び／又は処理に好適な組成物などが挙げられる、布地ケア及びホームケア製品に属する組成物である。このような製品としては、限定するものではないが、次のような布地処理用の製品、硬質面処理用の製品、並びに布地ケア及びホームケアの領域の任意の他の表面処理用の製品が挙げられる：エアフレッシュナー及び香り送達系などの空気ケア、カーケア、食器洗浄、布地コンディショニング（例えば、柔軟化及び／又はフレッシュニングなど）、洗濯洗浄、洗濯及びすすぎ添加剤及び／又はケア剤、硬質表面クリーナー及び／又は処理剤（例えば、床及び便器クリーナーなど）、粒状又は粉末形態の万能又は「強力」洗浄剤（特にクリーニング用洗剤）、液体、ゲル、又はペースト形態の万能洗浄剤（特にいわゆる強力液体型万能洗浄剤）、おしやれ着用液体洗剤、食器手洗い用洗剤又はライトデューティ食器洗浄剤（特に高起泡型のもの）、食器洗浄機用食器洗浄剤（家庭用及び業務用の、様々な錠剤型、粒状、液体及びすすぎ補助型洗浄剤）：車又はカーペット洗浄剤、便器クリーナーを含む風呂場クリーナー、並びにクリーニング補助剤（漂白添加剤及び「染み抜きスティック」又は前処理型、或いは乾燥機用シートなどの、基材添加製品（substrate-laden product））。

【0115】

実際には、本明細書で使用する時、本発明の「クリーニング組成物」又は「クリーニング配合物」は、クリーニングされる物体、物品又は表面から化合物（例えば望ましくない化合物）を除去又は排除するのに有用な本発明の任意の組成物を指し、クリーニングされる物体、物品又は表面としては、これらに限定するものではないが、例えば、布地、布地物品、食器類、食卓用食器類、ガラス製品類、コンタクトレンズ、その他の固体基材、毛髪（シャンプー）（ヒト又は動物の毛髪を包含する）、皮膚（石鹸及び／又はクリーム）、歯（マウスウォッシュ、歯磨き粉）、物品又は対象物の表面（例えば、テーブルの硬質表面、テーブルトップ、壁、家具、床、天井、皿以外の物品、食卓用食器以外の物品などの硬質表面）、フィルター、薄膜（例えば、限外濾過膜を含むがこれに限定されない濾過膜）等が挙げられる。上記の用語は、組成物に使用されるプロテアーゼ及びその他の酵素とその組成物が適合する限り、所望の特定の種類のクリーニング組成物及び所望の特定の形態の製品（例えば、液体、ゲル、粒状、スプレー、又はその他の構成）のために選択されるいかなる材料及び／又は添加化合物も包含する。クリーニング組成物材料の具体的な選別は、クリーニングされる表面、物体、物品、又は布地を考慮することにより、及び使用時のクリーニング条件に所望される組成物の形態を考慮することにより、容易に行われる。

【0116】

クリーニング組成物及びクリーニング配合物は、任意の対象物、物品、及び／又は表面をクリーニング、漂白、消毒、及び／又は殺菌するのに好適な任意の組成を含む。このような組成物及び配合物としては、限定するものではないが、液体及び／又は固体組成物、例えば、クリーニング又は洗剤組成物（例えば、液体、錠剤、ゲル、バー状、粒状、及び／又は固体洗濯洗浄又は洗剤組成物、並びにおしやれ着用洗剤組成物など）；硬質表面クリーニング組成物及び配合物（例えば、ガラス、木材、セラミック及び金属製のカウンター甲板及び窓用のもの）；カーペットクリーナー；オープンクリーナー；布地フレッシュナー；布地柔軟剤；及び繊維製品、洗濯洗浄性能増進用クリーニング又は洗剤組成物、洗濯用添加型クリーニング組成物、及び洗濯物のシミ抜き前処理用クリーニング組成物；食

器手洗い用又は食器手動洗浄用組成物（例えば、食器「手洗い」用又は食器「手動」洗浄用の洗剤）及び自動食器洗浄機用組成物（例えば、「自動食器洗浄機用の洗剤」）を包含する食器洗浄用組成物などが挙げられる。

【0117】

本明細書で使用するとき、クリーニング組成物又はクリーニング配合物としては、別途記載のない限り、粒状又は粉末状万能又は強力洗浄剤、特に、クリーニング洗剤；液状、粒状、ゲル状、固形、錠剤型又はペースト状万能洗浄剤、特にいわゆる強力液体（HDL）洗剤又は強力粉末洗剤（HDD）型；おしゃれ着用液体洗剤；高起泡型のものを含む食器手洗い又は食器手動洗浄剤；食器手洗い又は食器手動洗浄、食器自動洗浄、或いは家事用及び業務用の様々な錠剤、粉末、固形、粒状、液状、ゲル状及びすすぎ助剤型の食器類若しくは食卓用食器類洗浄剤；抗菌性手洗い用液体クリーニング及び殺菌剤、固形石鹸、マウスウォッシュ、義歯クリーナー、車洗浄剤、カーペット洗浄剤、風呂場クリーナーなどの液体クリーニング及び殺菌剤；人間及び他の動物用毛髪用シャンプー及び／又は毛髪用リンス；シャワージェル及びバブルバス、並びに金属製品クリーナー；加えて、漂白添加剤及び「染み抜きスティック」又は前処理型などのクリーニング補助剤が挙げられる。一部の実施形態では、粒状組成物は「コンパクト」形態であり；一部の実施形態では、液体組成物は「濃縮」形態である。

10

【0118】

本明細書で使用するとき、「布地クリーニング組成物」としては、洗濯用添加型組成物などの手洗い用及び洗濯機用洗剤組成物、並びに染みの付いた布地（例えば、衣類、リネン類、及び他の繊維材料）の浸け置き及び／又は前処理に使用するのに好適な組成物が挙げられる。

20

【0119】

本明細書で使用するとき、「非布地用クリーニング組成物」としては、限定するものではないが、例えば、食器手洗い用若しくは手動食器洗浄用又は自動食器洗浄用洗剤組成物、口腔洗浄用組成物、義歯洗浄用組成物、及びパーソナルクレンジング組成物などの、非繊維製品（すなわち、非布地）表面用のクリーニング組成物が挙げられる。

【0120】

本明細書で使用するとき、用語「布地及び／又は硬質表面用のクリーニング及び／又は処理組成物」は、別途記載のない限り、粒状又は粉末状の万能又は「強力」洗浄剤、特にクリーニング用洗剤、液体、ゲル、又はペースト状の万能洗浄剤、特にいわゆる強力液体洗浄剤、おしゃれ着用液体洗剤、食器手洗い用洗浄剤又はライトデューティ食器洗浄剤（特に高起泡型のもの）、家庭用及び業務用の各種の錠剤型、粒状、液体、及びすすぎ補助型を含む食器洗浄機用洗剤、液体洗浄剤及び殺菌剤、車又はカーペット洗浄剤、便器クリーナーを含む浴室クリーナー、液体、固体、及び／又は乾燥機用シート形態であり得る柔軟化及び／又はフレッシュニングを含む布地コンディショニング製品、並びに漂白剤添加型及び「染み抜きスティック」又は前処理型そして乾燥機用シート（dryer added sheet）などの基材添加製品（substrate-laden product）のようなクリーニング補助剤を包含する、クリーニング及び処理組成物に属する組成物である。適用可能であるこのような製品の全ては、標準形態又は濃縮形態であってよく、又は特定の態様では、このような製品は、更には非水性となり得る程度まで高濃縮された形態であってよい。

30

40

【0121】

本明細書で使用するとき、用語「洗剤組成物」又は「洗剤配合物」は、特定の布地及び／又は非布地製の物体又は物品などの、汚れた又は泥のついた物体を洗浄するために洗浄媒質中で使用することが意図される組成物に関して使用される。本発明のこのような組成物は、任意の特定の洗剤組成物又は配合物に限定されない。実際に、一部の実施形態では、本発明の洗剤は、少なくとも1種の本発明のプロテアーゼ変異体に加え、界面活性剤、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、酸化還元酵素、ビルダー（例えば、ビルダー塩など）、漂白剤、漂白活性化剤、ブルーイング剤、蛍光染料、ケーキング防止剤、マスキング剤、酵素活性化剤、抗酸化物質、及び／又は可溶化剤を1種以上含有する。場合によって

50

は、ビルダー塩はケイ酸塩とリン酸塩の混合物であり、好ましくはケイ酸塩（例えば、メタケイ酸ナトリウム）をリン酸塩（例えば、トリポリリン酸ナトリウム）よりも多く含む。例えば、限定するものではないが、クリーニング組成物又は洗剤組成物などの、本発明の一部の組成物は、リン酸塩（例えば、リン酸塩又はリン酸塩ビルダー）を含まない。

【0122】

本明細書で使用する時、用語「漂白」は、材料の増白（すなわち、ホワイティング）及び／若しくはクリーニングを行うために十分な時間及び／又は適切なpH及び／又は温度条件下での物質（例えば、布地、洗濯物、パルプなど）又は表面の処理を指す。漂白に好適な化学物質の例としては、限定するものではないが、例えば、 ClO_2 、 H_2O_2 、過酸、 NO_2 、などが挙げられる。

10

【0123】

本明細書で使用する時、プロテアーゼ（例えば、本発明のプロテアーゼ変異体）の「洗浄性能」は、組成物にプロテアーゼ変異体を加えていない洗剤と比較して、追加のクリーニング性能を洗剤に付与するプロテアーゼ変異体の洗浄への貢献を指す。洗浄性能は、関連する洗浄条件下で比較される。一部の試験系では、洗剤組成物、泡濃度、水硬度、洗浄機構、時間、pH、及び／又は温度などの他の関連する要因を、特定のマーケットセグメントにおける家事用途に典型的な条件（例えば、食器手洗い又は食器手動洗浄、自動食器洗浄、食器クリーニング、食卓用食器類クリーニング、及び布地クリーニングなど）を模倣するように調節することができる。

【0124】

20

本明細書において、用語「関連する洗浄条件」は、食器手洗い、自動食器洗浄、又は洗濯洗剤のマーケットセグメントに含まれる家事で実際に使用される条件であって、具体的には、洗浄温度、時間、洗浄機構、泡濃度（sud concentration）、洗剤のタイプ及び水硬度などの条件を意味する。

【0125】

用語「洗浄性能の改善」は、関連する洗浄条件下で、染み除去において、より良好な仕上がり結果が得られること、又は対応する野生型若しくは開始親プロテアーゼと比較して同様の仕上がり結果を得るにあたり必要とされるプロテアーゼ変異体が重量ベースでより少量ですむことを表すのに使用される。

【0126】

30

本明細書で使用する時、用語、「消毒」は、汚染物質を表面から除去すること、並びに、物品の表面上の微生物の阻害又は死滅を指す。本発明は、任意の特定の表面、物品、又は除去される汚染物若しくは微生物に限定されないと意図される。

【0127】

本明細書では、「コンパクト」形態のクリーニング組成物は、密度によって最善に表され、組成の点で言えば無機塩充填剤の量によって最善に表される。無機塩充填剤は、粉末形態の洗剤組成物の通常の成分である。通常の洗剤組成物では、無機塩充填剤は、相当量で、典型的には組成物全体の約17～約35重量%で存在する。対照的に、コンパクト組成物では、塩充填剤は、組成物全体の約15重量%以下の量で存在する。一部の実施形態では、無機塩充填剤は、組成物の約10重量%以下、より好ましくは約5%重量以下の量で存在する。一部の実施形態では、無機塩充填剤は、硫酸アルカリ塩及びアルカリ土類金属塩、並びにアルカリ塩化物及びアルカリ土類金属塩化物から選択される。一部の実施形態では、塩充填剤は硫酸ナトリウムである。

40

【0128】

所与のアミノ酸配列中のアミノ酸残基の位置は、本明細書では典型的には、配列番号3に示されるゲオバチルス・カルドプロテオリティカス（*G. caldoproteolyticus*）サーモリシンのアミノ酸配列における対応するアミノ酸残基の位置に割り振られた番号を用いて番号付けされる。すなわち、配列番号3に示されるゲオバチルス・カルドプロテオリティカスサーモリシンのアミノ酸配列は、基準配列となる。本明細書に記載されるプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列などの、所与のアミノ酸配列は、本明細書に記載されるアライン

50

メントアルゴリズムを使用してゲオバチルス・カルドプロテオリティカスの配列（配列番号3）と整列させることができ、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスの配列中のアミノ酸残基と整列する（好ましくは最適に整列する）所与のアミノ酸配列中のアミノ酸残基を、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスサーモリシンの配列中の対応するアミノ酸残基を参照することで、都合よく番号付けすることができる。

【0129】

概して、本明細書で使用する命名法、並びに以下に記載される細胞培養、分子遺伝学、分子生物学、核酸化学、及びタンパク質化学的な実験手順の多くは周知のものであり、当業者により一般的に採用される。組み換え核酸の製造及び操作法、核酸合成法、細胞培養法、及びトランスジーンの組み込み法（例えば、トランスフェクション、電気穿孔法）は当業者に既知のものであり、様々な一般的な文献に記載されている。オリゴヌクレオチドの合成工程及び精製工程は、典型的には本明細書に従って実施される。概して技術及び手順は、当業者に周知の従来法、並びに本明細書を通して提供される様々な一般参考文献に従って実施される。それらの手順は当業者に周知のものであると考えられ、読み手には便宜のため提供される。

10

【0130】

本発明のサーモリシン酵素

本明細書で使用するとき、サーモリシン酵素には、酵素、ポリポリペプチド又はタンパク質、或いはその活性断片が包含される。これにはペプチダーゼファミリーM4のファミリーメンバーも包含され、そのプロトタイプがサーモリシン（TLN；EC 3.4.2 4.27）である。

20

【0131】

サーモリシン酵素の生産的位置

本発明は、洗剤組成物において有用となり得るサーモリシン酵素におけるアミノ酸位置であって、当該アミノ酸位置における好ましい改変によって、洗浄性能、洗剤組成物中の酵素安定性、および酵素の熱安定性に関する最小性能指数が得られ、更には親酵素サーモリシンよりもこれらの特性のうち少なくとも1つが改善された、アミノ酸位置を提供する。これらの改変は、本発明の好適な改変と考えられる。

【0132】

本発明のサーモリシン酵素の安定性は、標準の、例えば配列番号3のゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンの安定性と比較することができる。

30

【0133】

「熱的安定性」及び「熱安定性」なる用語は、脂肪分解プロセス、加水分解プロセス、クリーニングプロセス、又は本明細書において開示される他のプロセスの際に一般に使用される条件下で一定の時間にわたって特定の温度に曝された後に（例えば、変化した温度に曝されている間に）、所定量の酵素活性を維持する本開示のサーモリシンを指す。変化した温度には、温度の上昇又は低下が含まれる。一部の実施形態では、サーモリシン変異体（variant thermolysin variant）は、例えば、少なくとも約60分、約120分、約180分、約240分、約300分などの所定の時間にわたって変化した温度に晒された後でも、少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約92%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%のサーモリシン活性を保持する。

40

【0134】

本明細書で使用するとき、特性が改善されたサーモリシン変異体としては、対応する親酵素サーモリシン（例えば、野生型又は天然起源のサーモリシン酵素）と比較してその洗浄性能若しくはクリーニング性能が改善又は増強された、並びに/又は任意選択で洗浄若しくはクリーニング性能は保持されているが安定性が改善又は増強された、プロテアーゼ変異体が挙げられる。サーモリシン酵素変異体の特性の改善には、洗浄若しくはクリーニング性能の改善及び/又は安定性の改善が含まれ得る。一部の実施形態では、本発明は、次の特性のうち1つ以上を示す本発明のサーモリシン酵素変異体を提供する。すなわち、

50

基準とする親酵素サーモリシン（例えば、配列番号3の配列を有する野生型サーモリシンなどの、野生型サーモリシン酵素）と比較して、手洗い洗浄性能の改善、食器手洗い性能又は手動食器洗浄性能の改善、自動食器洗浄機洗浄性能の改善、洗濯性能の改善、並びに/又は安定性の改善。

【0135】

生産的位置は、特性の改善を示すコンビナトリアル変異体を作製するのに最も有用な分子内の位置として記載されており、この位置では、少なくとも1つの組み合わせ可能な変異が許容される。組み合わせ可能な変異は、コンビナトリアル変異体を作製するのに使用することのできる分子内の置換として記載され得る。組み合わせ可能な変異は、少なくとも1つの所望の分子特性を改善する一方で、発現、活性又は安定性をいずれも有意に低下させないものである。

10

【0136】

組み合わせ可能な変異は、少なくとも1つの所望の分子特性を改善する一方で、発現、活性又は安定性をいずれも有意に低下させないものである。例えば、サーモリシンにおける組み合わせ可能な変異は、実施例1に記載のアッセイ（Abz-AGLA-Nbaプロテアーゼアッセイ（活性）、PAS-38微小布見本アッセイ（活性）、洗剤安定性及び熱安定性アッセイ、並びにタンパク質定量（発現））によって得られる性能指数（PI）値を利用して決定することができる。

【0137】

組み合わせ可能な変異の他に、サーモリシンの第二の群の変異は、組み合わせ可能な活性を有する変異である。組み合わせ可能な活性を有する変異とは、分子の少なくとも1つの活性特性を改善し、性能指数が1.5以上であり、発現又は安定性にかかるどちらのPI値をも0.5より下に低下させない変異である。この組み合わせ可能な活性を有する変異を利用することで、分子の他の既知の望ましい特性（例えば、発現又は安定性）を有意に低下させることなく所望の特性を達成できるように、分子を改変することができる。

20

【0138】

有用な位置であることが分かっているサーモリシン酵素のアミノ酸位置は、洗剤組成物で使用するのに好適な様々な改変を有し得る。改変としては、特定の位置での挿入、欠失又は置換を挙げることができる。一実施形態では、改変は置換である。各々の位置において、起こり得る好適な改変の数が多ければ、その位置での生産性スコアが高くなる。例えば、アミノ酸の位置は、好適な改変として生産的位置で試験された改変のうち少なくとも75%、40%又は15%を有し得るが、その場合、改変は、次の適合性基準のうち少なくとも1つを満たす。

30

a) 親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数（PI）が0.9以上であり、更に、これらの試験のうちのいずれか一つに関するPIが1.0以上である、位置、

b) 親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数（PI）が0.8以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.2以上である、位置、又は

40

c) 親酵素サーモリシンに対して、pH6又はpH8でのPAS-38微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nbaに対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数（PI）が0.5以上であり、更に、これら試験のうちいずれか一つに関するPIが1.5以上である、位置。

【0139】

本発明のサーモリシン酵素において、好適な改変として試験された改変のうち少なくとも75%が生じる位置としては、2位、26位、47位、49位、53位、65位、87位、91位、96位、108位、118位、128位、154位、179位、196位、197位、198位、199位、209位、211位、217位、219位、225位、

50

232位、256位、257位、259位、261位、265位、267位、272位、276位、277位、286位、289位、290位、293位、295位、298位、299位、300位、301位、303位、305位、308位、311位、及び316位が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。好適な改変としては、2位(T, F, L, P, S, V, W, Y, Q, A, C, I, K, M)、26位(T, K, L, R, V, Y, W, F, G, H, I, M, C, D)、47位(R, A, C, H, K, N, D, E, G, L, M, Q, T)、49位(T, A, D, F, H, I, S, W, L, N, Q, V, E, M, Y)、53位(S, F, H, I, M, Q, T, W, K, R, A, N, V, C, L)、65位(S, I, M, Q, V, L, T, W, A, D, E, P, Y)、87位(V, D, E, G, I, S, P, R, T, C, K, L, M, N, Q, W, Y)、91位(L, D, E, F, K, M, P, Q, S, A, N, R, W, Y)、96位(N, C, D, I, V, F, T, G, H, Q, R, S, W, K, L, Y)、108位(Q, C, E, F, H, A, D, I, K, N, L, M)、118位(S, C, G, E, A, D, M, Q, R, T, V)、128位(Q, C, D, E, R, S, V, I, K, A, L, Y)、154位(G, L, Q, S, T, D, I, W, C, N, A, H, K, M, Y)、179位(Y, A, D, H, M, N, Q, S, T, W, F)、196位(G, D, E, T, K, R, V, H, L, Y, A, W)、197位(I, D, K, L, T, V, W, Y, A, H, N, E, Q, R, F, C)、198位(S, C, E, F, G, H, I, P, Q, T, V, M, N, R, W, A, K)、199位(G, C, E, F, H, Q, S, T, W, L, A, Y)、209位(A, D, E, L, S, T, V, G, I, K, P, R, Y, C, M)、211位(Y, A, C, D, F, G, H, I, L, N, Q, S, T, E, R)、217位(Y, Q, S, T, V, W, G, A, F, M, N, C, L)、219位(K, D, F, G, H, I, M, N, Q, T, A, E, R, S)、225位(Q, D, G, H, I, P, V, W, A, M, R, C, E, K, L, S)、232位(I, C, E, F, K, M, N, Q, W, G, L, R, S, T, V, Y)、256位(V, L, T, K, A, D, F, G, H, R, S, N)、257位(G, C, D, E, L, N, P, Q, S, T, Y, K, R)、259位(G, A, C, E, F, H, L, M, W, K, R, N, S, T)、261位(D, A, N, P, V, W, G, H, I, S)、265位(K, A, C, D, M, P, Q, S, G, I, L, R, N)、267位(F, E, G, N, S, V, W, A, C, H, I, K, L, M, T, Y)、272位(T, E, L, V, W, P, Y, C, F, N, Q, A, K)、276位(T, C, F, I, P, Q, W, H, A, L, V, Y)、277位(P, Q, S, T, E, F, G, H, N, R, V, W, A, D, Y)、286位(A, D, E, F, G, H, I, S, P, C, Q, R, T, K, L, M, N, Y)、289位(V, C, E, F, G, I, N, S, W, R, T, L, M, Y, A)、290位(Q, C, D, F, G, L, W, Y, R, T, V, A, H, N)、293位(T, C, E, F, G, H, Q, S, N, V, W, A, I, K, L, M, Y)、295位(L, C, I, N, T, V, F, G, A, K, M, W)、298位(S, C, T, W, Y, E, N, P, A, G, K, M, R)、299位(T, C, F, L, M, R, W, P, D, Q, N, A, K)、300位(S, C, K, M, R, Y, I, L, H, P, V, W, A, G, T, D, N)、301位(Q, E, H, P, R, L, C, F, G, W, M, S, T, V, K)、303位(V, C, H, G, K, L, R, W, A, P, Y)、305位(S, G, I, L, N, W, Y, Q, H, T, V, A, K, M)、308位(Q, C, D, F, G, I, M, R, V, W, Y, A, L)、311位(D, C, E, F, G, I, Q, S, T, A, K, L, M, V, W, Y)、及び316位(K, D, E, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, V, W, Y, A, M)が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0140】

本発明のサーモリシン酵素において、好適な改変として試験された改変のうち少なくとも40%でかつ75%未満が生じる位置としては、1位、4位、17位、25位、40位

10

20

30

40

50

、45位、56位、58位、61位、74位、86位、97位、101位、109位、149位、150位、158位、159位、172位、181位、214位、216位、218位、221位、222位、224位、250位、253位、254位、258位、263位、264位、266位、268位、271位、273位、275位、278位、279位、280位、282位、283位、287位、288位、291位、297位、302位、304位、307位、及び312位が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。好適な改変としては、1位(I, K, M, V, A, H, W, Y, C, L)、4位(T, E, A, N, R, V, K, L, M, Y)、17位(Q, I, W, Y, C, R, V, T, L)、25位(S, D, F, A, C, K, M, R)、40位(F, E, G, M, Q, S, Y, W, A, K, L)、45位(K, E, L, S, F, H, Q, Y, A, G, M)、56位(A, K, Q, V, W, H, I, Y, E, M)、58位(A, N, Y, C, V, E, L)、61位(Q, M, R, W, F, V, C, I, L)、74位(H, E, L, V, C, F, M, N, Q, W)、86位(N, L, S, Y, A, C, E, F, G, K, D)、97位(N, K, C, R, S, Y, E, M)、101位(R, T, C, L, S, H)、109位(G, A, L, S, E, M, R, W)、149位(T, M, V, A, L, D, S, N)、150位(D, A, F, K, N, Q, T, V, S)、158位(Q, A, K, M, N, L, R, Y, S)、159位(N, R, W, A, C, G, M, T, S, Y)、172位(F, G, L, M, Q, S, V, W, Y, D, H)、181位(N, L, A, G, K, M, T, S)、214位(P, C, G, K, S, N, A, R)、216位(H, C, E, S, T, R, A)、218位(S, K, L, Y, F, G, T, V)、221位(Y, K, N, Q, R, S, T, V, A, F, G, M)、222位(T, C, D, L, Y, I, V, A, M, K)、224位(T, K, M, F, L, P, Q, V, Y, E, H)、250位(H, A, C, K, M, N, P, Q, R, V, Y)、253位(V, N, T, I, R, Y, M, Q)、254位(S, A, M, R, Y, K, L, N, V, W)、258位(I, E, L, M, N, R, S, A, C, K, Q, V)、263位(L, C, I, Q, T, H, K, N, V, A, M)、264位(G, C, R, A, N, P, Q, S, T)、266位(I, A, F, L, S, C, M, T, V)、268位(Y, M, Q, V, A, S, K)、271位(L, A, D, F, I, N, Y, H)、273位(Q, A, H, Y, C, S, W, E, G, N)、275位(L, I, M, V, C, Q, S, T)、278位(T, G, K, R, Y, C, H, M, N, Q, S)、279位(S, A, D, I, L, M, N, Q, T, G)、280位(N, A, C, D, E, G, Q, H, T)、282位(S, K, N, R, A, H, L, M, T)、283(Q, K, L, P, R, W, Y, S)、287位(A, I, L, N, V, Y, K, R, T, D, C)、288位(A, C, I, S, T, V, Y, N, L, M)、291位(S, E, I, L, M, N, V, A, T)、297位(G, A, M, R, Y, C, F, K, T, D, N)、302位(E, K, L, G, T, V, D, Q, A)、304位(A, C, D, L, N, R, S, T, W, E, K, Y)、307位(K, A, C, G, I, M, N, Q, R, W, Y, H)、及び312位(A, G, M, V, L, N, R, T, C)が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0141】

本発明のサーモリシン酵素において、好適な改変として試験された改変のうち少なくとも15%かつ40%未満が生じる位置としては、5位、9位、11位、19位、27位、31位、33位、37位、46位、64位、73位、76位、79位、80位、85位、89位、95位、98位、99位、107位、127位、129位、131位、137位、141位、145位、148位、151位、152位、155位、156位、160位、161位、164位、168位、171位、176位、180位、182位、187位、188位、205位、206位、207位、210位、212位、213位、220位、227位、234位、235位、236位、237位、242位、244位、246位、248位、249位、252位、255位、270位、274位、284位、294

位、296位、306位、309位、310位、313位、314位、及び315位からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。好適な改変としては、5位(S, D, N, P, H, L)、9位(V, L, T, I)、11位(R, I, Y, K)、19位(N, L, Y, K, S)、27位(Y, W, A, M, V, C, L)、31位(Q, A, K, V, I, C, Y)、33位(N, S, T, K, A, C, L, M)、37位(N, D, Q, R, L, K)、46位(Y, L, H, N, C)、64位(A, H, Q, T, D, E)、73位(A, I, F, L, M, W)、76位(Y, H, L, M, Q, T)、79位(V, L, Q, T, A, N, S)、80位(T, I, D, A, L, N)、85位(K, E, A, L, N, R, S)、89位(N, L, M, H)、95(G, A, D, H, M, N, S)、98位(A, C, E, H, R, Y, K, V)、99位(A, E, K, P, R, S)、107位(S, D, K, Y, A, G)、127位(G, C, D, E)、129位(T, I, R, E, Y, L, M)、131位(I, Y, W, L)、137位(I, P, A, E, T, V, L)、141位(A, S, C, G)、145位(T, A, C, E, G, M, N, Q)、148位(V, L, N, Y, M, A, Q)、151位(Y, K, G, H, S, W)、152位(T, S, L, M, G)、155位(L, C, I, M)、156位(I, M, T, L, Q)、160位(E, L, Y, Q)、161位(S, A, N, P, T)、164位(I, L, N, S, T, V, C, A)、168位(I, A, M, T, L)、171位(I, C, E, F, L, S, G)、176位(V, L, N, C)、180位(A, E, G, K, T, S)、182位(K, L, A, W)、187位(E, L, D)、188位(I, L, V)、205位(M, L, A, V, Q)、206位(S, A, C, K, L, M, R)、207位(D, A, H, N)、210位(K, I, L, V)、212位(G, Y, A, D, Q)、213位(D, N, S, L, A, G, W)、220位(R, K, V, A)、227位(N, D, L, Y, A)、234位(S, D, N, A, C)、235位(G, M, C, Q, S, A)、236位(I, M, A, C)、237位(I, N, F, M)、242位(Y, C, F, N, V)、244位(I, T, V, F, A, M, L)、246位(Q, E, N, T, L, C, D)、248位(G, A, E, S)、249位(T, K, M, N, L, Y, P)、252位(G, K, Y, A, S, T, W)、255位(V, L, P, A, Y, M, N)、270位(A, C, F, I, L, S, G)、274位(Y, F, H, A, C, Q, T, M)、284位(L, V, W, A, M, Y)、294位(D, A, V, Q, N)、296位(Y, N, L, R, H, W, M)、306位(V, A, S, F, I, L, T)、309位(A, G, S, T, V, C)、310位(F, A, C, W, M)、313位(V, T, A, G, L, I, C)、314位(G, A, E, H, M, S, W, Q)、及び315位(V, A, C, I, M, L, T)からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0142】

本発明のサーモリシン酵素において、少なくとも1つの改変でかつ好適な改変として試験された改変のうち15%未満が生じる位置としては、3位、6位、7位、20位、23位、24位、44位、48位、50位、57位、63位、72位、75位、81位、92位、93位、94位、100位、102位、103位、104位、110位、117位、120位、134位、135位、136位、140位、144位、153位、173位、174位、175位、178位、183位、185位、189位、193位、201位、223位、230位、238位、239位、241位、247位、251位、260位、262位、269位、及び285位からなる群から選択される(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。好適な改変としては、3位(G, Y)、6位(T, C, V)、7位(V, L, I)、20位(I, L, V)、23位(T, F, W)、24位(Y, W)、44位(A, C)、48位(T, E, D)、50位(L, P)、57位(D, K)、63位(F, Y, C)、72位(D, F, W)、75位(Y, A)、81位(Y, F)、

10

20

30

40

50

92位(S, L)、93位(Y, T, C)、94(D, T)、100位(I, L, V)、102位(S, G, N)、103位(S, T)、104位(V, A)、110位(Y, L)、117位(G, H)、120位(M, L)、134位(S, A, P)、135位(G, A)、136位(G, A, S)、140位(V, D)、144位(L, T)、153位(A, T)、173位(G, A, C)、174位(T, C, A)、175位(L, H, S)、178位(F, H, Y)、183位(N, S)、185位(D, E)、189(G, A)、193位(Y, F)、201位(S, C, A)、223位(G, D, K)、230位(V, A)、238位(N, L, M)、239位(K, A)、241位(A, L, S)、247位(G, A, S)、251位(Y, M)、260位(R, A, N)、262位(K, A)、269位(R, V, K)、及び285位(R, K, Y)が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

10

【0143】

これらアミノ酸の位置は、親酵素サーモリシンに対する改変を組み合わせるために有用な位置であると考えられる。したがって、本発明は、前記位置のいずれかにおいて1つ以上の改変を有するサーモリシン酵素を包含する。好適な改変としては、1位(I, V)、2位(T, C, I, M, P, Q, V)、127位(G, C)、128位(Q, C, E, F, I, L, V, Y)、180位(A, E, N)、181位(N, A, G, Q, S)、196位(G, L, Y)、197位(I, F)、198位(S, A, C, D, E, H, I, M, P, Q, T, V, Y)、211位(Y, A, C, E, F, H, I, Q, S, T, V, W)、224位(T, D, H, Y)、298位(S, A, C, E, F, G, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y)、299位(T, A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W)、及び316位(K, A, D, E, H, M, N, P, Q, S, T, V, Y)が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

20

【0144】

サーモリシン酵素の好適な改変

本発明は、親酵素サーモリシンに1つ以上の改変を生じさせて得られたサーモリシン酵素変異体を包含する。酵素変異体は、洗浄性能、洗剤組成物中の酵素の安定性及び酵素の熱安定性に関する最小性能指数を有し、更に、これらの特性のうち少なくとも一つが親酵素サーモリシンよりも改善されていることにより、洗剤組成物中で有用であり得る。

30

【0145】

親酵素サーモリシンに比べて改善された洗剤安定性又は熱安定性を有しており、そして改変が、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列中の残基全てに関する主鎖平均温度因子よりも観測された分散の1.5倍超大きい温度因子を有する位置で生じる本発明のサーモリシン酵素の位置は、例えば1位、2位、127位、128位、180位、181位、195位、196位、197位、198位、199位、211位、223位、224位、298位、299位、300位、及び316位が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

40

【0146】

好適なサーモリシン変異体は、高分子を構成する個々の原子の相対運動の尺度である結晶学的温度因子に基づいて、温度因子が増加する位置に改変を包含し得る。温度因子は、個々の結晶X線回折強度の最大値として与えられる回折パターン計算値が観測パターンと最も良くマッチするように結晶学的モデルを精密化した成果、生じるものである。運動性が高い原子が散乱角()の関数としての高分子凝集体全体の回折を減少させる効果があることを反映するように、次の式： $- \exp(-B \sin^2 /)$ (式中、Bは、温度因子である)を用いて温度因子を減衰係数として精密化することができる(Blundell, T. L. and Johnson L. N., Protein Crystallography, Academic Press, (1976年)121頁)。全体的に

50

運動性が高い領域は、折り畳まれた高分子の安定性が低い場所を表し、そのため、温度の増加又は変性剤によって分子がストレスを受けるとアンフォールディングが始まる場所を表す可能性が高い。さらに、全体的に運動性が高いこれらの領域は、平均温度因子が最も高い領域であるとも見込まれる。

【0147】

サーモリシンのコンセンサス柔軟性領域として算出された領域には、1位～2位、127位～128位、180位～181位、195位～199位、211位、223位～224位、298位～300位及び316位の領域が含まれる。これら各領域を利用することで、サーモリシンを改変して、熱安定性または洗濯性能の改善を達成することができる。高い温度因子（柔軟性の高い領域）を有する位置に改変を生じることによって熱安定性又は洗濯性能の改善のいずれかを付与する組み合わせ可能な変異体の位置としては、1位、2位、127位、128位、180位、181位、196位、197位、198位、211位、224位、298位、299位、及び316位が挙げられる。好適な改変としては、1位（I, V）、2位（T, C, I, M, P, Q, V）、127位（G, C）、128位（Q, C, E, F, I, L, V, Y）、180位（A, E, N）、181位（N, A, G, Q, S）、196位（G, L, Y）、197位（I, F）、198位（S, A, C, D, E, H, I, M, P, Q, T, V, Y）、211位（Y, A, C, E, F, H, I, Q, S, T, V, W）、224位（T, D, H, Y）、298位（S, A, C, E, F, G, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y）、299位（T, A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W）、316位（K, A, D, E, H, M, N, P, Q, S, T, V, Y）が挙げられる（ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている）。

【0148】

組み合わせ可能な活性を有する変異

組み合わせ可能な変異の他に、サーモリシンに関する第二の群の変異は、組み合わせ可能な活性を有する変異がある。組み合わせ可能な活性を有する変異とは、pH 6又はpH 8でのPAS-38微小布見本の洗浄を有し、Abz-AGLA-Nbaに対する活性が1.5以上であり、更に、洗剤安定性及び熱安定性に関するPI値を0.5より下に低下させないものである。組み合わせ可能な活性を有する変異の位置としては、17位、19位、24位、25位、31位、33位、40位、48位、73位、79位、80位、81位、85位、86位、89位、94位、109位、117位、140位、141位、150位、151位、152位、153位、156位、158位、159位、160位、161位、168位、171位、174位、175位、176位、178位、180位、181位、182位、183位、189位、205位、206位、207位、210位、212位、213位、214位、218位、223位、224位、227位、235位、236位、237位、238位、239位、241位、244位、246位、248位、249位、250位、251位、252位、253位、254位、255位、258位、259位、260位、261位、262位、266位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、276位、278位、279位、280位、282位、283位、294位、295位、296位、297位、300位、302位、306位、310位、及び312位からなる群から選択される位置が挙げられる（ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている）。組み合わせ可能な活性を有する変異としては、17位（E, F, P）、19位（A, D, H, I, R, T, V）、24位（F, H）、25位（H）、31位（L）、33位（Q）、40位（C）、48位（A, R）、73位（Y）、79位（C）、80位（C, R）、81位（H）、85位（C, M, Y）、86位（V）、89位（K, R, T, V）、94位（E）、109位（D）、117位（A, K, R, T）、140位（S）、141位（T）、150位（E, M, W）、151位（A, C, E, I）、152位（D）、153位（V）、156位（H, R）、158位（F,

G, I, V)、159位(F, I, K)、160位(S)、161位(Y)、168位(N)、171位(D)、174位(S, V)、175位(C, E, F, G, I)、176位(E, Q)、178位(C, M)、180位(L, W)、181位(Y)、182位(F, R)、183位(H, I, L, M, Q, R, T)、189位(C)、205位(C, F)、206位(F, H, I, T, V, Y)、207位(T)、210位(A, E, F, G, H, T)、212位(F, H, K, M, N, R, S, T)、213位(I, K, R, V, Y)、214位(Q)、218位(R)、223位(Y)、224位(I, R)、227位(C, E, G, K, Q, R, S, T, V)、235位(D, L, T)、236位(P)、237位(A, Q)、238位(A, C, D, E, R, S)、239位(C, G, H, L, Q, R, S, V, Y)、241位(E, F, G, I, T, V)、244位(Q)、246位(K, R)、248位(C, H)、249位(G, V)、250位(F, S)、251位(H)、252位(F, I, L)、253位(A, D, E, P)、254位(C, F, G, H, I, P)、255位(F, Q)、258位(F)、259位(I)、260位(C, D, I)、261位(K, R, T)、262位(C, F, H, L, P, R)、266位(W)、268位(F, R)、269位(P, T, W, Y)、270位(M, N, P, V)、271位(V)、272位(R)、273位(R)、274位(D, E)、276位(G, S)、278位(V)、279位(E)、280位(P, R, V)、282位(P)、283位(A, C, E, G, H, T, V)、294位(T)、295位(R)、296位(E, I)、297位(I, V)、300位(Q)、302位(W)、306位(Y)、310位(I, N)、及び312位(Q)が挙げられる(ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸の位置は、配列番号3で示されるサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされている)。

【0149】

本発明のポリペプチド

本発明は新規ポリペプチドを提供し、これらは集合的に「本発明のポリペプチド」と呼ばれ得る。本発明のポリペプチドは、例えば、酵素活性(例えば、サーモリシン活性)を有するサーモリシン酵素変異体ポリペプチドのような、単離された、組換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源のサーモリシン酵素変異体ポリペプチドを包含する。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、クリーニング用途に有用であり、クリーニングする必要のある物品又は表面(例えば、物品の表面)をクリーニングする方法に有用なクリーニング組成物中に組み込まれ得る。

【0150】

一部の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、バチリス属又はゲオバチルス種由来の親酵素サーモリシンの変異体であり得る。互いに高い同一性を有しかつ配列番号3で示されるサーモリシン酵素とも高い同一性を有する様々なサーモリシン酵素が、バチリス属又はゲオバチルス種において見出されている。例えば、実施例4の表4.1及び図4.1を参照されたい。他の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、表4.2に挙げる属のいずれかに由来する親酵素サーモリシンの変異体であってよく、前記属としては、バチリス属、ゲオバチルス種、アリシクロバチルス属、乳酸杆菌、エクシグオバクテリウム属、ブレバチルス属、パエニバチルス属、ヘルペトシフォン属、オセアノバチルス属、シュワネラ属、クロストリジウム属、ブドウ球菌属、フラボバクテリウム属、スチグマテラ属、ミクソコッカス属、ピプリオ属、メタノサルシナ属、クリセオバクテリウム属、ストレプトマイセス属、クリベラ属、ジャニバクター属、ノカルジオイデス属、ザンタモナス属(Xanthamonas)、ミクロモノスポラ属、バークホルデリア属、デハロコッコイデス属、クロセイバクター、コルジア属、マイクロシーラ属、サーモアクチノミセス属、クロロフレクサス属、リステリア属、プレシオシスチス属、ハリスコメノバクター属、サイトファーガ属、ハヘラ属、アルスロバクター属、プラキバクテリウム属、クラビバクター属、マイクロバクテリウム(Microbacterium)、イントラスポランギウム属、フランキア属、メイオテルムス属、シュードモナス属、トウゴマ属、カテヌリスポラ属、アナベナ属、ノストック属、ハロモナス属、クロモハロバクター属、ボルデテラ属、バリオボラックス属、

ディケヤー属、ペクトバクテリウム属、シトロバクター属、エンテロバクター属、サルモネラ属、エルウィニア属、パントエア属、ラーネラ属、セラチア属、ゲオデルマトフィルス属、ゲンマタ属、ゼノラブダス属、フォトラブダス属、アスペルギルス属、ネオサルトリア属、ピレノフォラ属、サッカロポリスポラ属、ネクトリア属、ジベレラ属、メタリジウム属、ワドリア属、シアノセイス属、セルロファーガ属、プロビデンシア属、ブラディリゾビウム属、アグロバクテリウム属、ムシラジニバクター (*Mucilaginibacter*)、セラチア属、ソランジウム属、ストレプトスポランジウム属、レニバクテリウム属、アエロモナス属、レイネケア属、クロモバクテリウム属、モリテラ属、ハリアンギウム属 (*Haliangium*)、カンギエラ属、マリノモナス属、ビブリオナレス属、リストネラ属、サリニビブリオ属、フォトバクテリウム属、アルテロモナダーレス属、レジオネラ属、テレディニバクター属、レイネケア属、ヒドロゲニビルガ属、及びシュードアルテロモナス属からなる群から選択される属が挙げられる。いくつかの実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、表 4 . 1 又は 4 . 2 に記載のいずれかの種に由来する親酵素サーモリシンの変異体であり得る。一部の実施形態では、サーモリシン変異体は、バチルス属、ゲオバチルス種、アリシクロバチルス属、乳酸杆菌、エクシグオバクテリウム属、ブレバチルス属、パエニバチルス属、ヘルペトシフォン属、オセアノバチルス属、シュワネラ属、クロストリジウム属、ブドウ球菌属、フラボバクテリウム属、スチグマテラ属、ミクソコッカス属、ビブリオ属、メタノサルシナ属、クリセオバクテリウム属、及びシュードアルテロモナス属からなる群から選択される属の親酵素サーモリシンの変異体であってよい。

10

【 0 1 5 1 】

20

一部の実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、バチルス属又はゲオバチルス種由来のサーモリシン酵素と 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有する変異体であり得る。いくつかの実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、表 4 . 1 に挙げた任意の属由来のサーモリシン酵素と 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有する変異体であり得る。いくつかの実施形態では、サーモリシン酵素変異体は、表 4 . 2 に挙げた任意の属由来のサーモリシン酵素と 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有する変異体であり得る。

【 0 1 5 2 】

30

特定の実施形態では、本発明は、バチルス属又はゲオバチルス種由来の酵素である。特定の実施形態では、本発明は、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカス種由来のサーモリシンから誘導される酵素である。

【 0 1 5 3 】

ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスからクローニングされたサーモリシンに関連する組成物及び方法について説明する。当該組成物及び方法は、クローニング及び発現されたサーモリシンが、洗剤組成物の存在下でタンパク質分解活性を有するという観察に一部基づいたものである。サーモリシンはまた、洗剤組成物中で優れた安定性を示す。こうしたサーモリシンの特徴により、サーモリシンは、酵素が、洗剤組成物に含まれている界面活性剤及び他の成分の存在下でタンパク質を加水分解することができる、様々なクリーニング用途で使用するのによく適している。

40

【 0 1 5 4 】

一態様では、本発明の組成物及び方法は、サーモリシン変異体ポリペプチドを提供する。親酵素サーモリシンポリペプチドは (配列番号 4) から単離された。成熟サーモリシンポリペプチドは、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する。同様に、実質的に同一のサーモリシンポリペプチドが、自然界、例えばゲオバチルス・カルドプロテオリティカスの他の株又は単離体に存在し得る。本発明の組成物及び方法には、これら及び他の組み換え型サーモリシンポリペプチドが含まれる。

【 0 1 5 5 】

一部の実施形態では、本発明は、サーモリシン活性を有する、単離された、組み換え型

50

の、実質的に純粋な、又は非天然起源のサーモリシン酵素変異体を包含するものであり、このポリペプチドは、本明細書で提供される親酵素サーモリシンと少なくとも約 85 %、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、少なくとも約 99.5 %、又は 100 % の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。

【0156】

一部の実施形態では、ポリペプチド変異体は、例証されるサーモリシンポリペプチドと明記された程度のアミノ酸配列相同性、例えば配列番号 3 又は 4 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は更には少なくとも 99 % の配列相同性を有する変異体である。相同性は、例えば本明細書において述べる BLAST、ALIGN、又は CLUSTAL などのプログラムを使用したアミノ酸配列アラインメントにより決定することができる。

【0157】

サーモリシン活性を有するサーモリシン変異体酵素をコードする単離された、組み換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源の配列も提供され、上記のサーモリシン酵素変異体（例えば、サーモリシン変異体）は、配列番号 4 のアミノ酸配列とは 50 個以下、40 個以下、30 個以下、35 個以下、25 個以下、20 個以下、19 個以下、18 個以下、17 個以下、16 個以下、15 個以下、14 個以下、13 個以下、12 個以下、11 個以下、10 個以下、9 個以下、8 個以下、7 個以下、6 個以下、5 個以下、4 個以下、3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を含む（ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸位置は、サーモリシン酵素変異体のアミノ酸配列とゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンアミノ酸配列とのアラインメントによって決定したときに配列番号 3 に示されるサーモリシンのアミノ酸配列における対応するアミノ酸の位置に割り振られた番号に従って番号付けされる）。

【0158】

上記のように、本発明のサーモリシン酵素変異体ポリペプチドは、酵素活性（例えば、サーモリシン活性）を有し、例えば、限定するものではないが、食器類、食卓用食器類、布地、及び硬質表面を有する物品（例えば、テーブル、卓上、壁、家具、床、天井などの硬質表面）をクリーニングする方法などといった、クリーニング用途に有用である。本発明のサーモリシン酵素変異体ポリペプチドを 1 つ以上含むクリーニング組成物の例を以下に記載する。本発明のサーモリシン酵素変異体ポリペプチドの酵素活性（例えば、サーモリシン酵素活性）は、当業者に周知の手順を用いて、容易に決定することができる。以下に記載の実施例では、酵素活性、クリーニング性能、洗剤安定性及び / 又は熱安定性の評価方法について説明する。染み（例えば、脂質による染み）の除去時、硬質表面のクリーニング時、又は洗濯物、食器類若しくは食卓用食器類のクリーニング時の本発明のサーモリシン酵素変異体の性能は、当業者に周知の手順を用いて、及び / 又は以降の実施例に記載の手順を用いて、容易に決定され得る。

【0159】

本発明のポリペプチドは、1 つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、及び / 又は保存的若しくは非保存的のいずれかの置換などといった様々な変化を受けることができ、このような変化としては、この変化によってポリペプチドの酵素活性が実質的に変更されないものが包含される。同様に、本発明の核酸は、様々な変化を受けることもでき、それらの変化には、例えば、特定のコドンが同一の又は異なるアミノ酸をコードするが、それによってサイレント変異（例えば、コードされるアミノ酸が核酸変異により変化しない場合では、ヌクレオチド配列中の変異によってアミノ酸配列中にサイレント変異が生じる）若しくは非サイレント変異が起こる 1 つ以上のコドンにおける 1 つ以上の核酸の 1 つ以上の置換、配列

中の1つ以上の核酸（又はコドン）の1つ以上の欠失、配列中の1つ以上の核酸（又はコドン）の1つ以上の付加若しくは挿入、及び／又は配列中の1つ以上の核酸（又はコドン）の1つ以上の開裂若しくは切断、などが挙げられる。核酸配列における多くのこのような変化は、結果として得られたコードされたサーモリシン酵素変異体の酵素活性を、元の核酸配列によりコードされたサーモリシン酵素変異体の酵素活性と比較して実質的に変化させなくてもよい。同様に、本発明の核酸は、発現系（例えば、細菌の発現系）で最適な発現をもたらすが、必要に応じてなおも同じアミノ酸をコードするコドンを1つ以上包含するように改変され得る。

【0160】

一部の実施形態では、本発明は、所望の酵素活性（例えば、サーモリシン酵素活性又はクリーニング性能活性）を有するサーモリシン酵素変異体ポリペプチドを含むポリペプチドの種類であって、本明細書に記載のアミノ酸置換を有する配列を含み、かつ保存的及び非保存的置換などのような1つ以上の更なるアミノ酸置換も含み、しかも所望の酵素活性（例えば、サーモリシン酵素変異体のクリーニング活性又はクリーニング性能に反映されるようなサーモリシン酵素活性又はタンパク質分解活性）を示し、維持し、又はおよそ維持するポリペプチドの種類を提供する。本発明に従うアミノ酸置換には、限定するものではないが、1つ以上の非保存的置換及び／又は1つ以上の保存的アミノ酸置換が包含され得る。保存的アミノ酸残基置換は、典型的には、アミノ酸残基の1機能分類に含まれるアミノ酸を、同一の機能分類に属する残基（同一のアミノ酸残基は、機能的に相同であるとみなされるか又は機能的相同性パーセントの算出において保存されている）と交換することを含む。保存的アミノ酸置換は、典型的には、アミノ酸配列中のアミノ酸を機能的に類似するアミノ酸により置換することを含む。例えば、アラニン、グリシン、セリン、及びトレオニンは機能的に類似するものであり、このため互いに保存的アミノ酸置換を提供し得る。アスパラギン酸及びグルタミン酸は、互いに保存的置換を提供し得る。アスパラギン及びグルタミンは、互いに保存的置換を提供し得る。アルギニン、リシン、及びヒスチジンは、互いに保存的置換を提供し得る。イソロイシン、ロイシン、メチオニン、及びバリンは、互いに保存的置換を提供し得る。フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンは、互いに保存的置換を提供し得る。

【0161】

他の保存的アミノ酸置換基も想定され得る。例えば、アミノ酸は、類似の機能又は化学構造又は組成（例えば、酸性、塩基性、脂肪族、芳香族、イオウ含有）により分類することができる。例えば、脂肪族基は、グリシン（G）、アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）を含み得る。互いに保存的置換であるとみなされるアミノ酸を含有する他の基としては、例えば、芳香族基としてのフェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；イオウ含有基としてのメチオニン（M）、システイン（C）；塩基性基としてのアルギニン（R）、リシン（K）、ヒスチジン（H）；酸性基としてのアスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；非極性非荷電残基としてのシステイン（C）、メチオニン（M）、及びプロリン（P）；親水性非荷電残基としてのセリン（S）、トレオニン（T）、アスパラギン（N）、及びグルタミン（Q）が包含される。アミノ酸のその他の分類も当業者に周知であり、様々な一般的な文献に記載されている。上記の置換基と共に、本明細書においてポリペプチド配列を列挙することで、保存的に置換されたすべてのポリペプチド配列の明白な一覧を提供する。

【0162】

上記のアミノ酸残基分類には、より保存的な置換が存在し、これらも同様に又は別法として好適であり得る。より保存的である保存的置換基としては：バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リシン - アルギニン、アラニン - バリン、及びアスパラギン - グルタミンが挙げられる。

【0163】

本発明のポリペプチド配列の保存的置換変異体（例えば、本発明のプロテアーゼ変異体）は、ポリペプチド配列中のアミノ酸のうち僅かな割合の、場合により25%未満、20

10

20

30

40

50

%未満、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、若しくは6%未満のアミノ酸、又はポリペプチド配列中のアミノ酸の5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、若しくは1%未満、又は10個未満、9個未満、8個未満、7個未満、6個未満、5個未満、4個未満、3個未満、2個未満、又は1個未満のアミノ酸と、同じ保存的置換基の保存的に選択されたアミノ酸との置換を包含する。

【0164】

本明細書内の他の箇所で更に詳細に記載されるように、及び本明細書で提供される実施例に記載されるように、本発明のポリペプチドは、既知のメタロプロテアーゼを包含する既知のプロテアーゼに匹敵し得るクリーニング能力を有し得る。

10

【0165】

一部の実施形態では、プロテアーゼ変異体は、1つ以上の変異を含み、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシン（配列番号3）と比較して-5、-4、-3、-2、-1、0、1、2、3、4、又は5の総実効電荷を有する。

【0166】

一部の実施形態では、上記のイオン強度の高いサーモリシンプロテアーゼ変異体は、典型的には、洗濯機内で、水で希釈されて伝導度が約3mS/cm～約30mS/cm、約3.5mS/cm～約20mS/cm、又は更には約4mS/cm～約10mS/cmの洗濯用洗浄液を形成する、洗剤組成物の一部を形成する。

【0167】

20

サーモリシンプロテアーゼ変異体の電荷は、配列番号3のアミノ酸配列を有する野生型のゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンプロテアーゼと比較して表現されるものである。1つの負電荷を付与するアミノ酸はD及びEであり、1つの正電荷を付与するアミノ酸はR、H及びKである。配列番号2と比較して電荷を変化させる任意のアミノ酸の変化を用いて、サーモリシンプロテアーゼ変異体の電荷を計算する。例えば、野生型の、電荷が中性である位置に負電荷の変異を導入すると、-1の実効電荷がサーモリシンプロテアーゼ変異体に加えられる一方で、野生型の正電荷を持つアミノ酸残基（R、H、又はK）に負電荷の変異（D又はE）を導入すると、-2の実効電荷が加えられることになる。配列番号3のアミノ酸配列を有する野生型のゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンプロテアーゼと比較した場合に異なっている、プロテアーゼ変異体のすべてのアミノ酸残基の電荷の変化を合計することで、プロテアーゼ変異体の電荷変化が得られる。電荷を正しく選択することにより、予想外にレベルが改善したサーモリシンクリーニング性能を得ることができる。「伝導度の低い洗濯洗剤溶液」は、約0.1mS/cm～約3mS/cm、約0.3mS/cm～約2.5mS/cm、又は更には約0.5mS/cm～約2mS/cmの伝導度を有するものとして定義される。「伝導度の高い洗濯洗剤溶液」は、約3mS/cm～約30mS/cm、約3.5mS/cm～約20mS/cm、又は更には約4mS/cm～約10mS/cmの伝導度を有するものとして定義される。上記の実施例は非限定的なものであることが意図される。サーモリシン性能をサーモリシンの性能を最適化させるために変異を組み合わせる場合、更なる位置に変異を導入することで、酵素の電荷平衡をとることもできる。

30

40

【0168】

一部の実施形態では、本発明は、タンパク質分解活性を有する単離された、組み換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源のプロテアーゼ変異体（例えば、サーモリシン変異体）を提供し、このプロテアーゼ変異体は、配列番号3に示されるアミノ酸配列とは50個以下、45個以下、40個以下、35個以下、30個以下、25個以下、20個以下、19個以下、18個以下、17個以下、16個以下、15個以下、14個以下、13個以下、12個以下、11個以下、10個以下、9個以下、又は8個以下のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を含む（ここで、アミノ酸位置は、プロテアーゼ変異体のアミノ酸配列と、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンのアミノ酸配列とのアラインメントによって決定したときに、配列番号3に示されるゲオバチルス・カルドプロテオリ

50

ティカスサーモリシンのアミノ酸配列の対応するアミノ酸の位置に割り振られた番号に従って番号付けされる)。

【0169】

一部の実施形態では、本発明は、タンパク質分解活性を有する単離された、組み換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源のプロテアーゼ変異体(例えば、サーモリシン変異体)を提供し、このプロテアーゼ変異体は、配列番号2に示されるアミノ酸配列とは50個以下、45個以下、40個以下、35個以下、30個以下、25個以下、20個以下、19個以下、18個以下、17個以下、16個以下、15個以下、14個以下、13個以下、12個以下、11個以下、10個以下、9個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、2個以下のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を含む(ここで、アミノ酸位置は、プロテアーゼ変異体のアミノ酸配列と、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンのアミノ酸配列とのアラインメントによって決定したとき、配列番号3に示されるゲオバチルス・カルドプロテオリティカスサーモリシンのアミノ酸配列の対応するアミノ酸の位置に割り振られた番号に従って番号付けされる)。

10

【0170】

本発明の核酸

本発明は、単離された、非天然起源の、又は組み換え型の核酸(本明細書では「ポリヌクレオチド」とも呼ばれる)を提供し、これは集合的に本発明のポリペプチドをコードする「本発明の核酸」又は「本発明のポリヌクレオチド」と呼ばれ得る。以下に記載のすべてのものを含む本発明の核酸は、典型的に、対象とするポリペプチドをコードする配列又はそれらの断片を含むプラスミド発現ベクターの発現を介した本発明のポリペプチドの組み換えによる産生(例えば発現)に有用である。上述のように、ポリペプチドには、酵素活性(例えば、タンパク質分解活性)を有するサーモリシン変異体ポリペプチドなどのプロテアーゼ変異体ポリペプチドであって、クリーニング用途、及びクリーニングする必要のある物品又は表面(例えば、物品の表面)をクリーニングするためのクリーニング組成物に有用である、プロテアーゼ変異体ポリペプチドが包含される。

20

【0171】

一部の実施形態では、本発明は、上記の表題「本発明のポリペプチド」と付けられた節及び本明細書の他の場所に記載される、任意のポリペプチド(任意の融合タンパク質などが包含される)をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された、組み換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源の核酸を提供する。本発明は、上記及び本明細書の他の箇所に記載の、本発明の任意のポリペプチドの2つ以上の組み合わせをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された、組み換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源の核酸も提供する。

30

【0172】

一部の実施形態では、本発明は、サーモリシン活性を有する、単離された、組み換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源のサーモリシン酵素変異体をコードするポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが、本明細書で提供される親酵素サーモリシンと少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、又は100%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。

40

【0173】

一部の実施形態では、ポリペプチド変異体は、例示されるサーモリシンポリペプチドと明記された程度のアミノ酸配列相同性を有する変異体であり、例えば配列番号3又は4のアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも99%の配列相同性を有する変異体である。相同性は、例

50

えば本明細書において述べるBLAST、ALIGN、又はCLUSTALなどのプログラムを使用した、アミノ酸配列アラインメントにより決定することができる。

【0174】

同様に、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含む、単離された、組み換え型の、実質的に純粋な、又は非天然起源の核酸も提供するものであって、前記プロテアーゼ変異体（例えば、サーモリシン変異体）は、配列番号2のアミノ酸配列と50個以下、40個以下、30個以下、35個以下、25個以下、20個以下、19個以下、18個以下、17個以下、16個以下、15個以下、14個以下、13個以下、12個以下、11個以下、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、2個以下、又は1個以下のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を含む（ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸位置は、プロテアーゼ変異体のアミノ酸配列と、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンのアミノ酸配列とのアラインメントによって決定したときに配列番号3に示されるゲオバチルス・カルドプロテオリティカスサーモリシンのアミノ酸配列の対応するアミノ酸の位置に割り振られた番号に従って番号付けされる）。

10

【0175】

本発明は、ゲオバチルス属又はバチルス属サーモリシンのサーモリシン変異体をコードする核酸を提供するものであり、このサーモリシン変異体は、タンパク質分解活性を有する成熟型であり、かつ本明細書全体を通じて列挙されているようなアミノ酸置換の組み合わせを含むアミノ酸配列を含む（ここで、サーモリシン変異体のアミノ酸位置は、配列番号3に示されるゲオバチルス・カルドプロテオリティカスサーモリシンのアミノ酸配列と対応させて番号付けされる）。

20

【0176】

本発明の核酸は、任意の好適な合成技術、操作技術、及び/又は単離技術、又はこれらの組み合わせを用いて作製できる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、当業者に周知の固相合成法などの標準的な核酸合成技術を用いて製造することもできる。このような技術では、典型的には50個まで又はそれ以上のヌクレオチド塩基の断片を合成して、次いで連結することで（例えば、酵素的若しくは化学的連結方法、又はポリメラーゼによる組み換え方法）、本質的に任意の所望の連続的な核酸配列が形成される。本発明の核酸の合成はまた、古典的なホスホロアミダイト法を用いる化学合成が挙げられるがこれに限定されない当該技術分野において既知の任意の好適な方法（例えば、Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22:1859~69頁[1981年]を参照されたい）により、又は自動合成方法で典型的に実施されるMatthes et al.に記載の方法(Matthes et al., EMBO J. 3:801~805頁[1984年]を参照されたい）により、促進（或いは達成）することができる。本発明の核酸は、自動DNA合成装置を使用しても作製できる。カスタマイズされた核酸を、各種供給業者（例えば、The Midland Certified Reagent Company、the Great American Gene Company、Operon Technologies Inc.及びDNA2.0）に発注することができる。他の核酸合成方法及び関連する原理も当業者には既知である（例えば、Itakura et al., Ann. Rev. Biochem. 53:323頁[1984年]、及びItakura et al., Science 198:1056頁[1984年]を参照されたい）。

30

40

【0177】

上記のように、核酸の改変に有用な、DNAの組み換え技術は、当該技術分野において周知である。例えば、制限エンドヌクレアーゼによる消化、ライゲーション、逆転写、及びcDNAの生産、並びにポリメラーゼ連鎖反応（例えば、PCR）などの技法が知られており、当業者により容易に使用される。本発明のヌクレオチドは、本発明のプロテアーゼ変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズすることのできる又は前記ポリヌクレオチドをPCRにより増幅することのできるオリゴヌクレオチドプロ

50

ープを1つ以上用い、cDNAライブラリ（例えば、本明細書に記載のものを含む、当該技術分野で一般的に使用される変異導入技術を用いて生成されたcDNAライブラリ）をスクリーニングすることでも得ることができる。cDNAクローンのスクリーニング及び単離手順、並びにPCRによる増幅手順は当業者に周知のものであり、当業者に既知の標準的な参考文献に記載されている。本発明の核酸のいくつかは、天然起源のポリヌクレオチド主鎖（例えば、酵素又は親プロテアーゼをコードするポリヌクレオチド主鎖）を、例えば既知の変異導入法（例えば、部位特異的変異導入法、部位飽和変異導入法、及びインビトロ組み換え）によって変化させることによって得ることができる。

【0178】

本発明の改変プロテアーゼ変異体の製造方法

10

本発明のプロテアーゼ変異体をコードする本発明の改変ポリヌクレオチドを生成するのに好適な様々な方法が当該技術分野において既知であり、こうした方法としては、限定するものではないが、例えば、部位飽和変異導入法、スキャニング変異導入法、挿入変異法、欠失変異法、ランダム変異導入法、部位特異的変異導入法、及び定向進化方法、並びに様々な他の組み換えアプローチが挙げられる。改変ポリヌクレオチド及びタンパク質（例えば、変異型プロテアーゼ）の製造方法としては、DNAシャフリング方法、遺伝子の非相同時的組み換えに基づく方法、例えばITCHY（Ostermeier et al., 7:2139~44頁[1999年]を参照されたい）、SCRACHY（Lutz et al., 98:11248~53頁[2001年]を参照されたい）、SHIPREC（Sieber et al., 19:456~60頁[2001年]を参照されたい）、及びNRR（Bittker et al., 20:1024~9頁[2001年]、Bittker et al., 101:7011~6頁[2004年]を参照されたい）、並びにランダム変異及び標的突然変異、欠失並びにノ又は挿入を組み込むためにオリゴヌクレオチドを使用することに基づく方法（Ness et al., 20:1251~5頁[2002年]、Coco et al., 20:1246~50頁[2002年]、Zha et al., 4:34~9頁[2003年]、Glaser et al., 149:3903~13頁[1992年]を参照されたい）が挙げられる。

20

【0179】

本発明のプロテアーゼ変異体を製造するためのベクター、細胞、及び方法

30

本発明は、本明細書に記載の少なくとも1種の本発明のポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載の本発明の変異型プロテアーゼをコードするポリヌクレオチド）を含む単離若しくは組み換え型のベクター、少なくとも1種の本発明の核酸又はポリヌクレオチドを含む単離若しくは組み換え型の発現ベクター又は発現カセット、少なくとも1種の本発明の核酸又はポリヌクレオチドを含む単離された、実質的に純粋な、又は組み換えDNA構築物、少なくとも1種の本発明のポリヌクレオチドを含む単離又は組み換え型細胞、少なくとも1種の本発明のポリヌクレオチドを含む細胞を含む細胞培養物、少なくとも1種の本発明の核酸又はポリヌクレオチドを含む細胞培養物、並びにこのようなベクター、核酸、発現ベクター、発現カセット、DNA構築物、細胞、細胞培養物、又はこれらの任意の組み合わせ若しくは混合物を1種以上含む組成物を提供する。

【0180】

40

一部の実施形態では、本発明は、本発明の少なくとも1種の核酸又はポリヌクレオチドを含む本発明のベクター（例えば、発現ベクター又はDNA構築物）を少なくとも1つ含む組み換え細胞を提供する。このような組み換え細胞の一部のものは、このような少なくとも1つのベクターにより形質転換又はトランスフェクトされる。このような細胞は、典型的には宿主細胞と呼ばれる。このような細胞の一部のものは、細菌細胞、例えば、限定するものではないが、枯草菌細胞などのバチルス種の細胞を含む。本発明は、本発明の少なくとも1種のプロテアーゼ変異体を含む組み換え細胞（例えば、組み換え宿主細胞）も提供する。

【0181】

一部の実施形態では、本発明は、本発明の核酸又はポリヌクレオチドを含むベクターを

50

提供する。一部の実施形態では、ベクターは、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする本発明のポリヌクレオチド配列が、効率的な遺伝子発現に必要とされる1つ又は追加の核酸セグメント（例えば、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする本発明のポリヌクレオチドに機能的に連結されるプロモーター）に機能的に連結される、発現ベクター又は発現力セットである。ベクターには、転写ターミネーター、及び/又は抗菌剤含有培地での増殖により、プラスミド感染宿主細胞の持続的な培養維持を可能にする、抗生物質耐性遺伝子などの選択遺伝子が包含され得る。

【0182】

発現ベクターは、プラスミド又はウイルスDNAから誘導され得るか、又は代替的な実施形態では、これらの両方の要素を含有する。例示的なベクターとしては、限定するものではないが、pXX、pC194、pJH101、pE194、pHP13が挙げられる（Harwood及びCutting[eds.], Chapter 3, Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons [1990年]（枯草菌に好適な複製プラスミドとしては92頁に記載されているものが挙げられる）、そして更に、Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in Bacillus subtilis, in Sonenshein et al., [eds.] Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993年] 615～624頁も参照されたい）。

【0183】

対象とするタンパク質（例えば、プロテアーゼ変異体）を細胞において発現及び生産する際、改変プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドを少なくとも1コピー及び好ましくは複数コピー含む発現ベクターを少なくとも1つ用い、プロテアーゼの発現に好適な条件下で細胞を形質転換する。本発明の一部の実施形態では、プロテアーゼ変異体（並びにベクターに含まれる他の配列）をコードするポリヌクレオチド配列は宿主細胞のゲノムに組み込まれ、一方、他の実施形態では、プロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含むプラスミドベクターは自律性の染色体外因子として細胞内に留まる。本発明は、染色体外の核酸エレメント、並びに宿主細胞のゲノムに組み込まれる移入ヌクレオチド配列の両方を提供する。本明細書に記載のベクターは、本発明のプロテアーゼ変異体の生産に有用である。一部の実施形態では、プロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド構築物は、プロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを細菌染色体に組み込み、そして場合により増幅することのできる組み込みベクターに存在する。組み込み部位の例は、当業者に周知である。一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドの転写は、選択された前駆体プロテアーゼのための野生型プロモーターであるプロモーターによりもたらされる。他の一部の実施形態では、プロモーターは、前駆体プロテアーゼとは異種であるものの、宿主細胞中で機能するものである。具体的には、細菌宿主細胞で使用するのに好適なプロモーターの例としては、限定するものではないが、例えば、amyE、amyQ、amyL、pstS、sacB、pSPAC、pAprE、pVeg、pHpaiプロモーター；並びにバチルス・ステアロサーモフィルスのマルトース生成型アミラーゼ遺伝子、バチルス・アミロリケファシエンス（BAN）アミラーゼ遺伝子、バチルス・サブチリスアルカリプロテアーゼ遺伝子、バチルス・クラウシイのアルカリプロテアーゼ遺伝子、バチルス・プミルスのキシロシダーゼ遺伝子、バチルス・チューリングエンシスのcryIII A、及びバチルス・リケニフォルミスのアミラーゼ遺伝子のプロモーターが挙げられる。追加のプロモーターとしては、限定するものではないが、A4プロモーター、並びにファージ P_R 又は P_L プロモーター、及び大腸菌lac、trp又はtacプロモーターが挙げられる。

【0184】

本発明のプロテアーゼ変異体は、細菌及び真菌を包含する任意の好適なグラム陽性微生物の宿主細胞で生産され得る。例えば、一部の実施形態では、プロテアーゼ変異体は真菌及び/又は細菌由来の宿主細胞で生産される。一部の実施形態では、宿主細胞は、バチルス種、ストレプトマイセス種 (*Streptomyces* sp.)、エシェリキア種 (*Escherichia* sp.)、又はアスペルギルス種 (*Aspergillus* sp.) である。一部の実施形態では、プロテアーゼ変異体は、バチルス種の宿主細胞により生産される。本発明のプロテアーゼ変異体の生産において有用であるバチルス種の宿主細胞の例としては、限定するものではないが、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントス、枯草菌、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・レントス、バチルス・プレビス、バチルス・ステアロサーモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアギュランス、バチルス・サー克蘭ス、バチルス・プミルス、バチルス・チューリンゲンシス、バチルス・クラウシイ、及びバチルス・メガテリウム、並びにバチルス (*Bacillus*) 属に属する他の生物が挙げられる。一部の実施形態では、枯草菌宿主細胞は、プロテアーゼ変異体の生産に使用される。米国特許第 5,264,366 号及び同第 4,760,025 号 (再発行特許第 34,606 号) は、本発明のプロテアーゼ変異体の生産に使用することができる様々なバチルス属の宿主株を記述しているが、他の好適な株も使用することができる。

【0185】

本発明のプロテアーゼ変異体の生産に使用することができるいくつかの工業用の細菌種としては、非組み換え型 (すなわち、野生型) のバチルス種株、並びに天然起源の株の変異体及び/又は組み換え株が挙げられる。一部の実施形態では、宿主株は組み換え株であり、宿主には、対象とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが導入されている。一部の実施形態では、宿主株は枯草菌宿主株であり、特に組み換え型枯草菌宿主株である。数多くの枯草菌株が既知であり、限定するものではないが、例えば、1A6 (ATCC 39085)、168 (1A01)、SB19、W23、Ts85、B637、PB1753~PB1758、PB3360、JH642、1A243 (ATCC 39,087)、ATCC 21332、ATCC 6051、MI113、DE100 (ATCC 39,094)、GX4931、PBT 110、及び PEP 211 株が挙げられる (例えば、Hoch et al., *Genetics* 73:215~228 頁 [1973 年]、また同様に、米国特許第 4,450,235 号及び同第 4,302,544 号、並びに欧州特許第 0134048 号を参照されたい。これら各公報は参照によりその全文が組み込まれる)。発現宿主細胞としての枯草菌の使用は当業者に周知である (例えば、Palva et al., *Gene* 19:81~87 頁 [1982 年]; Fahnestock and Fischer, *J. Bacteriol.*, 165:796~804 頁 [1986 年]; 並びに Wang et al., *Gene* 69:39~47 頁 [1988 年] を参照されたい)。

【0186】

一部の実施形態では、バチルス属の宿主細胞は、次の遺伝子: *degU*、*degS*、*degR* 及び *degQ* のうちの少なくとも 1 つの遺伝子において変異又は欠失を含むバチルス種の宿主細胞である。好ましくは変異は *degU* 遺伝子において生じ、より好ましくは変異は *degU* (Hy) 32 である (例えば、Msadek et al., *J. Bacteriol.* 172:824~834 頁 [1990 年]、及び Olmos et al., *Mol. Gen. Genet.* 253:562~567 頁 [1997 年] を参照されたい)。変異 *degU* 32 (Hy) を有する枯草菌は、1 つの好適な宿主株である。一部の実施形態では、バチルス属の宿主は、*scoc4* (例えば、Caldwell et al., *J. Bacteriol.* 183:7329~7340 頁 [2001 年] を参照されたい)、*spoIIIE* (例えば、Arigoni et al., *Mol. Microbiol.* 31:1407~1415 頁 [1999 年] を参照されたい)、及び/又は *oppA* 若しくは *opp* オペロンの他の遺伝子 (例えば、Perego et al., *Mol. Microbiol.* 5:173~185 頁 [1991 年] を参照されたい) に変異又は欠失を含む。実際に、*oppA* の遺伝子の変異と同じ表現型を生じる *opp* オペ

ロンにおけるいかなる変異も、本発明の変化したバチルス株に関する一部の実施形態において有用であろうと想到される。一部の実施形態では、これらの変異は単独で生じるが、他の実施形態では複数の変異が組み合わさって存在する。一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体の生産に使用することができる変化したバチルス属の宿主細胞株は、上記の遺伝子のうちの1つ以上に予め変異を包含しているバチルス属の宿主株である。加えて、内因性のプロテアーゼ遺伝子に関する変異及び/又は欠失を含むバチルス種の宿主細胞も有用である。一部の実施形態では、バチルス属の宿主細胞は、*aprE* 遺伝子及び *nprE* 遺伝子の欠失を含む。他の実施形態では、バチルス種の宿主細胞がプロテアーゼ遺伝子を5つ欠失している一方で、他の実施形態では、バチルス種の宿主細胞はプロテアーゼ遺伝子を9つ欠失している（例えば、米国特許出願公開第2005/0202535号を参照し、この公報は参照として本明細書に組み込まれる）。

10

【0187】

宿主細胞は、当該技術分野において既知の任意の好適な手段を用いて、本発明の少なくとも1種のプロテアーゼ変異体をコードする少なくとも1つの核酸により形質転換される。核酸がベクターに組み込まれるか、又はプラスミドDNAの非存在下で用いられるかによらず、核酸は、典型的には微生物に導入され、一部の実施形態では、好ましくは大腸菌細胞又はコンピテントバチルス細胞に導入される。プラスミドDNA構築物又はベクターを利用して、核酸（例えば、DNA）をバチルス属の細胞又は大腸菌細胞に導入する方法、及びこのようなプラスミドDNA構築物又はベクターによりそのような細胞を形質転換する方法は周知である。一部の実施形態では、プラスミドは、次に大腸菌細胞から単離され、バチルス属の細胞を形質転換する。しかしながら、大腸菌などの介在微生物を用いることは必須ではなく、一部の実施形態では、DNA構築物又はベクターは直接バチルス属の宿主に導入される。

20

【0188】

本発明の核酸又はポリヌクレオチド配列をバチルス属の細胞に導入する好適な方法は当業者には周知である（例えば、Ferrari et al., 「Genetics」, in Harwood et al. [eds.], *Bacillus*, Plenum Publishing Corp., 57~72頁[1989年]、Saunders et al., *J. Bacteriol.* 157: 718~726頁[1984年]、Hoch et al., *J. Bacteriol.* 93: 1925~1937頁[1967年]、Mann et al., *Current Microbiol.* 13: 131~135頁[1986年]、Holubova, *Folia Microbiol.* 30: 97頁[1985年]、Chang et al., *Mol. Gen. Genet.* 168: 11~115頁[1979年]、Vorobjeva et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 7: 261~263頁[1980年]、Smith et al., *Appl. Env. Microbiol.* 51: 634頁[1986年]、Fisher et al., *Arch. Microbiol.* 139: 213~217頁[1981年]、並びにMcDonald, *J. Gen. Microbiol.* 130: 203頁[1984年]を参照されたい）。実際に、プロトプラスト形質転換及び会合（congression）を包含する形質転換、形質導入、及びプロトプラスト融合などの方法は周知であり、本発明でも好適に使用される。本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含むDNA構築物又はベクターを宿主細胞に導入するために、形質転換法が使用される。当該技術分野において既知のバチルス属細胞の形質転換方法としては、部分的に相同な常在性プラスミドを保持するコンピテント細胞によるドナープラスミドの取り込みを伴う、プラスミドマーカーク救出形質転換などの方法が挙げられる（Contente et al., *Plasmid* 2: 555~571頁[1979年]、Haima et al., *Mol. Gen. Genet.* 223: 185~191頁[1990年]、Weinrauch et al., *J. Bacteriol.* 154: 1077~1087頁[1983年]、及びWeinrauch et al., *J. Bacteriol.* 169: 1205~1211頁[1987年]を参照されたい）。この方法では、組み込

30

40

50

まれるドナープラスミドは、染色体の形質転換を模倣するプロセスにおいて、常在性の「ヘルパー」プラスミドの相同領域と組み換えられる。

【0189】

一般的に使用される方法に加えて、一部の実施形態では、宿主細胞は、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含むDNA構築物又はベクターにより直接的に形質転換される（すなわち、宿主細胞への導入前に、DNA構築物又はベクターを増幅またはそうでなければ処理するために、中間細胞は用いられない）。本発明のDNA構築物又はベクターの宿主細胞への導入法には、核酸配列（例えば、DNA配列）を、プラスミド又はベクターに挿入することなく、宿主細胞に導入するための、当該技術分野において既知の物理的及び化学的方法が包含される。このような方法としては、限定するものではないが、塩化カルシウム沈殿、電気穿孔、裸のDNA、及びリポソームなどが挙げられる。更なる実施形態では、DNA構築物又はベクターは、プラスミドに挿入されることなく、プラスミドと共に同時形質転換される。更なる実施形態では、選択マーカーは、当該技術分野において既知の方法により、変化したパチルス属の株から欠失される（Stahl et al., J. Bacteriol. 158: 411~418頁[1984年]；及びPalmeros et al., Gene 247: 255~264頁[2000年]参照）。

10

【0190】

一部の実施形態では、本発明の形質転換細胞は、一般的な栄養培地で培養される。温度及びpHなどの好適な具体的な培養条件は当業者に既知であり、科学文献に詳しく記載されている。一部の実施形態では、本発明は、本発明の少なくとも1種のプロテアーゼ変異体又は本発明の少なくとも1種の核酸を含む培養物（例えば、細胞培養物）を提供する。同様に、本発明の核酸、ベクター、又はDNA構築物を少なくとも1つ含む組成物も提供する。

20

【0191】

一部の実施形態では、本発明の少なくとも1種のプロテアーゼ変異体をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列によって形質転換された宿主細胞を、本発明のプロテアーゼの発現を可能にする条件下で、好適な栄養培地で培養した後、得られたプロテアーゼを培養物から回収する。細胞培養に使用する培地には、宿主細胞を増殖させるのに好適な、適切な添加剤を含有している最少培地又は複合培地などといった任意の一般的な培地を含む。好適な培地は、販売元から入手することができ、又は公開されている処方に従って調製することもできる（例えば、the American Type Culture Collectionのカatalogを参照されたい）。一部の実施形態では、細胞により生産されたプロテアーゼは、限定するものではないが、例えば、遠心沈降又は濾過による培養液からの宿主細胞の分離、塩（例えば、硫酸アンモニウム）による上清又は濾液中のタンパク質様成分の沈殿、クロマトグラフィー精製（例えば、イオン交換、ゲル濾過、アフィニティなど）などの従来法により培地から回収される。プロテアーゼ変異体を回収又は精製するための任意の好適な方法が、本発明において有用である。

30

【0192】

一部の実施形態では、組み換え宿主細胞により生産されたプロテアーゼ変異体は、培養培地に分泌される。精製を促進するドメインをコードする核酸配列を使用して、可溶性タンパク質の精製を容易にすることもできる。プロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター又はDNA構築物は、プロテアーゼ変異体の精製を促進する精製促進ドメインをコードする核酸配列を更に含む（例えば、Kroll et al., DNA Cell Biol. 12: 441~453頁[1993年]を参照されたい）。このような精製促進ドメインとしては、限定されないが、例えば、固定された金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュールなどの金属キレート化ペプチド（Porath, Protein Expr. Purif. 3: 263~281頁[1992年]を参照されたい）、固定された免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、及びFLAG拡張/アフィニティ精製システムにおいて利用され

40

50

るドメイン（例えば、Immunex Corp. (Seattle, WA) から入手可能なプロテインAドメイン）が挙げられる。精製ドメインと非相同的なタンパク質との間に、凝固因子XA又はエンテロキナーゼなどの開裂可能なリンカー配列（例えば、Invitrogen (San Diego, CA) から入手可能な配列）を含めることも、精製を促進するために有用である。

【0193】

本発明のプロテアーゼ変異体などの酵素の酵素活性を検出及び測定するためのアッセイは周知である。プロテアーゼ（例えば、本発明の変異型プロテアーゼ）の活性を検出及び測定するための様々なアッセイも当業者には既知である。特に、当業者に周知であるように、280nmでの吸光度として又はフォーリン法を用いる比色法により測定した、カゼイン又はヘモグロビンからの酸可溶性ペプチドの放出に基づくアッセイを、プロテアーゼの活性を測定するのに利用できる。他の例示的なアッセイは、発色性基質の可溶化を伴う（例えば、Ward, 'Proteinases', in Fogarty (ed.), 'Microbial Enzymes and Biotechnology', Applied Science, London, [1983年], 251~317頁を参照されたい）。他の例示的なアッセイとしては、限定するものではないが、スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-パラニトロアニリドアッセイ(suc-AAPF-pNA)及び2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩アッセイ(TNBSアッセイ)が挙げられる。当業者に既知の多数の更なる参考文献にも、好適な方法が提示されている（例えば、Wells et al., 'Nucleic Acids Res.' 11:7911~7925頁[1983年]、Christianson et al., 'Anal. Biochem.' 223:119~129頁[1994年]、及びHsia et al., 'Anal. Biochem.' 242:221~227頁[1999年]を参照されたい）。

【0194】

宿主細胞での成熟プロテアーゼ（例えば、本発明の成熟型のプロテアーゼ変異体）の生産レベルを決定するために、様々な方法を使用することができる。このような方法としては、限定するものではないが、例えば、プロテアーゼに特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれかを利用する方法が挙げられる。例示的な方法としては、限定するものではないが、例えば、酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)、及び蛍光活性化セルソーティング(FACS)が挙げられる。これらのアッセイ及びその他のアッセイは当該技術分野において周知のものである（例えば、Maddox et al., 'J. Exp. Med.' 158:1211頁[1983年]を参照されたい）。

【0195】

他の一部の実施形態では、本発明は、本発明の成熟型のプロテアーゼ変異体を製造又は生産する方法を提供する。成熟型プロテアーゼ変異体は、シグナルペプチド配列又はプロペプチド配列を含有しない。この方法の一部のものは、例えば、バチルス種細胞（例えば、枯草菌細胞）などの、組み換え型細菌宿主細胞において、本発明のプロテアーゼ変異体を製造又は生産する工程を含む。一部の実施形態では、本発明は、本発明のプロテアーゼ変異体の生産方法を提供し、この方法は、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含む組み換え発現ベクターを含む組み換え宿主細胞を、プロテアーゼ変異体の生産を誘導する条件下で培養する工程を含む。このような方法の一部のものは、更に、培養物からプロテアーゼ変異体を回収する工程を含む。

【0196】

一部の実施形態では、本発明は、本発明のプロテアーゼ変異体の生産方法を提供し、方法は：(a)本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含む組み換え発現ベクターを細胞集団（例えば、枯草菌細胞などの細菌細胞）に導入する工程；及び(b)発現ベクターによりコードされるプロテアーゼ変異体の生産を誘導する条件下で、培養培地中で細胞を培養する工程、を含む。このような方法のうち一部のものは、(c)細胞又は培養培

地からプロテアーゼ変異体を単離する工程を更に含む。

【0197】

布地ケア及びホームケア製品

一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体は、補助材料及びプロテアーゼ変異体を含む組成物で 사용할 ことができ、ここで、組成物は布地ケア製品及びホームケア製品である。

【0198】

一部の実施形態では、少なくとも1種のサーモリシン変異体を含む布地ケア製品組成物及びホームケア製品組成物には、次の成分のうち1種以上（組成物の総重量に対して）、すなわち、約0.0005重量%～約0.1重量%、約0.001重量%～約0.05重量%、又は更に約0.002重量%～約0.03重量%の前記サーモリシンプロテアーゼ変異体、並びに約0.00003重量%～約0.1重量%の布地色調剤、約0.001重量%～約5重量%の芳香カプセル、約0.001重量%～約1重量%の冷水可溶性増白剤、約0.00003重量%～約0.1重量%の漂白触媒、約0.00003重量%～約0.1重量%の第1リパーゼ洗液、約0.00003重量%～約0.1重量%の細菌洗浄用セルラーゼ、及び/又は約0.05重量%～約20重量%のゲルベ非イオン性界面活性剤のうち1種以上が含まれる。

【0199】

一部の実施形態では、布地ケア製品組成物及びホームケア製品組成物は液体洗濯洗剤、食器用洗剤である。

【0200】

布地ケア製品及びホームケア製品は、流体又は固体を包含する任意の好適な形態で提供されることが意図される。布地ケア製品及びホームケア製品は、特に、液体形態の場合には1回用量パウチの形態であってよく、典型的には、布地ケア製品及びホームケア製品は、少なくとも一部が又は更には完全に水溶性パウチ中に封入される。加えて、少なくとも1種のプロテアーゼ変異体を含む布地ケア製品及びホームケア製品に関する一部の実施形態では、布地ケア製品及びホームケア製品は上記のパラメータ及び/又は特徴の任意の組み合わせを有し得る。

【0201】

クリーニング組成物

特に断りのない限り、本明細書に提供される成分又は組成物のレベルはすべて、成分又は組成物の活性レベルに関するものであり、市販の供給源に存在し得る不純物、例えば、残留溶媒又は副生成物は除外される。酵素成分の重量は活性タンパク質の合計に基づくものである。百分率（%）及び比率はすべて、別途記載のない限り、重量で計算している。百分率（%）及び比率はすべて、別途記載のない限り、全組成物を基準として計算している。例示された洗剤組成物において、酵素レベルは、組成物の合計重量に基づき純粋な酵素濃度として表現され、かつ特に断りのない限り、洗剤成分は組成物の合計重量に基づき表記される。

【0202】

本明細書で示されるように、一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、更に、限定するものではないが、界面活性剤、ビルダー、漂白剤、漂白活性化剤、漂白触媒、他の酵素、酵素安定化系、キレート剤、蛍光増白剤、汚れ剥離ポリマー、移染剤、分散剤、抑泡剤、染料、香料、着色剤、充填塩、ヒドロトロップ、光活性化剤、蛍光剤、布地コンディショナー、加水分解性界面活性剤、保存料、抗酸化剤、収縮防止剤、防皺剤、殺菌剤、防カビ剤、色スベックル、銀製品ケア剤、変色防止剤及び/又は防食剤、アルカリ度供給源、可溶化剤、キャリア、加工助剤、色素、及びpH調整剤などの補助材料を含む（例えば、米国特許第6,610,642号、同第6,605,458号、同第5,705,464号、同第5,710,115号、同第5,698,504号、同第5,695,679号、同第5,686,014号及び同第5,646,101号を参照し、これら公報はいずれも参照により組み込まれる）。特定のクリーニング組成物材料の具体例をは

以下に詳細に例示する。クリーニング助剤が、クリーニング組成物中で本発明の変異型プロテアーゼ変異体と適合しない実施形態では、2つの成分を組み合わせることが適切になるまでの間、クリーニング助剤及びプロテアーゼを分離した（すなわち、互いに接触させない）ままにしておくという好ましい手段が使用される。このような分離手法には、当該技術分野において既知の任意の好適な方法が包含される（例えば、ゲルキャップ法、カプセル封入、錠剤、物理的分離など）。

【0203】

本発明のクリーニング組成物は、例えば、洗濯用途、硬質表面クリーニング用途、食器洗浄用途、並びに義歯、歯、毛髪、及び皮膚などの美容的化粧用途に好都合に使用採用される。加えて、低温の溶液中で有効性作用が増大するという独特の利点によりを有することから、本発明の酵素は洗濯用途に理想的なものである。更に本発明の酵素は、粒状及び液体組成物において有用であるでの使用が見出される。

10

【0204】

本発明の変異型プロテアーゼ変異体は、クリーニング添加剤においても有用であるも使用される。一部の実施形態では、低温溶液を用いるクリーニング応用において有用である用途での使用が見出される。一部の実施形態では、本発明は、本発明の酵素を少なくとも1種含むクリーニング添加剤を提供し、当該クリーニング添加剤は、更に漂白効果が所望される場合に、洗浄プロセスに含めるために理想的に適している過程で包含させるのに理想的なものである。このような場合の例としては、限定するものではないが、例えば、低温溶液を用いるクリーニング応用が挙げられる。一部の実施形態では、添加剤は最も単純な形態の1種以上のプロテアーゼである。いくつかの実施形態では、添加剤は、洗浄プロセスに添加される剤形にパッケージングされる。一部の実施形態では、添加剤は、過酸化

物供給源が用いられかつ漂白効果の増加が所望されるクリーニングプロセスに添加される剤形にパッケージングされる。限定するものではないが、例えば、丸剤、錠剤、ゲルキャップ、又は予め計量された粉末若しくは液体などの他の一回用量単位が挙げられる、任意の好適な一回用量単位が、本発明において有用である。一部の実施形態では、このような組成物を増量するために充填剤又はキャリア材料を含める。好適な充填剤又はキャリア材料としては、限定するものではないが、例えば、様々な硫酸塩、炭酸塩及びケイ酸塩並びにタルク、及びクレイなどが挙げられる。液体組成物に好適な充填剤又はキャリア材料としては、限定するものではないが、例えば、水、又はポリオール及びジオールなどの低分子量の一級及び二級アルコールが挙げられる。このようなアルコールの例としては、限定するものではないが、メタノール、エタノール、プロパノール及びイソプロパノールが挙げられる。一部の実施形態では、組成物は、このような材料を約5%～約90%含有する。酸性充填剤はpHを低下させるために有用である。あるいは、一部の実施形態では、クリーニング添加剤として、以下により詳細に記載されるような補助成分が挙げられる。

20

30

【0205】

本発明のクリーニング組成物及びクリーニング添加剤は、本明細書で提供される少なくとも1種のプロテアーゼ変異体の有効量を単独で、あるいは他のプロテアーゼ及び/又は追加の酵素と組み合わせて必要とする。必要とされる酵素レベルは、本発明のプロテアーゼ変異体を1種以上加えることにより達成される。典型的には、本発明のクリーニング組成物は、少なくとも約0.0001重量%、約0.0001～約10重量%、約0.001～約1重量%、又は更には約0.01～約0.1重量%の、少なくとも1種の本発明のプロテアーゼ変異体を含む。

40

【0206】

本明細書のクリーニング組成物は、典型的には、水性クリーニング操作で使用した場合に、洗浄水のpHが約5.0～約11.5又は更には約7.5～約10.5となるように配合される。液体剤は、典型的には、約3.0～約9.0又は更には約3～約5の原液のpHを有するよう配合される。粒状洗濯製品は、典型的にはpHが約9～約11になるよう配合される。推奨される使用レベルでpHを調節する技術としては、緩衝剤、アルカリ、酸などの使用が挙げられ、これらは当業者には周知のものである。

50

【0207】

好適な「低pHのクリーニング組成物」は、典型的には、原液のpHが約3～約5のものであり、典型的には、このようなpH環境で加水分解される界面活性剤を含まない。このような界面活性剤としては、エチレンオキシド部分を少なくとも1つ又は更にはエチレンオキシド約1～約16モルを含むアルキル硫酸ナトリウム界面活性剤が挙げられる。このようなクリーニング組成物は、典型的には、原液のpHが約3～約5であるクリーニング組成物を提供するのに十分な量のpH調整剤、例えば、水酸化ナトリウム、モノエタノールアミン、又は塩酸などを含む。このような組成物は、典型的には、酸に安定な酵素を少なくとも1種含む。一部の実施形態では、組成物は液体であるが、他の実施形態では、組成物は固体である。このような液体組成物のpHは、典型的には原液のpHとして測定される。このような固形組成物のpHは、上記組成物の10%固体溶液として測定され、ここで、その溶媒は蒸留水である。これらの実施形態では、別途記載のない限り、pHの測定はすべて20で行われる。

10

【0208】

一部の実施形態では、プロテアーゼ変異体が粒状組成物又は液体組成物に使用される場合、保存時にプロテアーゼ変異体を粒状組成物の他の成分から保護するために、変異型プロテアーゼはカプセル封入粒子の形態であることが望ましい。加えて、カプセル封入は、クリーニングプロセスでプロテアーゼ変異体の利用能を制御する手段でもある。一部の実施形態では、カプセル封入は、プロテアーゼ変異体及び/又は追加の酵素の性能を向上させる。この観点から、本発明のプロテアーゼ変異体は、当該技術分野において既知の任意の好適な封入剤によりカプセル封入される。一部の実施形態では、封入剤は、典型的には、本発明のプロテアーゼ変異体に関する触媒の少なくとも一部を封入する。典型的には、封入剤は、水溶性及び/又は水分散性である。一部の実施形態では、封入剤のガラス転移温度(T_g)は0以上である。ガラス転移温度は、PCT国際特許出願公開第WO 97/11151号により詳細に記載されている。封入剤は、典型的には、炭水化物、天然又は合成ゴム、キチン、キトサン、セルロース及びセルロース誘導体、ケイ酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、パラフィンワックス、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される。封入剤が炭水化物である場合、典型的には、単糖、オリゴ糖、多糖、及びこれらの組み合わせから選択される。一部の典型的な実施形態では、封入剤はデンプンである(例えば、欧州特許第0 922 499号; 米国特許第4,977,252号、同第5,354,559号、及び同第5,935,826号を参照されたい)。一部の実施形態では、封入剤は、熱可塑性物質、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル及びこれらの混合物などのプラスチックから製造されるマイクロスフェアであり、有用な市販のマイクロスフェアとしては、限定するものではないが、EXPANCEL(登録商標)(Stockviksverken, Sweden)、並びにPM 6545、PM 6550、PM 7220、PM 7228、EXTENDOSPHERES(登録商標)、LUXSIL(登録商標)、Q-CEL(登録商標)、及びSPHERICEL(登録商標)(PQ Corp., Valley Forge, PA)として供給されるものが挙げられる。

20

30

40

【0209】

本明細書に記載のように、本発明のプロテアーゼ変異体は、限定するものではないが、洗濯用洗剤及び食器用洗剤などのクリーニング産業において特に有用である。これらの用途では、酵素を様々な環境ストレス下に置く。本発明のプロテアーゼ変異体は、様々な条件下で安定であることから、現在使用されている多数の酵素よりも有利である。

【0210】

実際に、多様な洗剤の配合、多様な洗浄水の容量、多様な洗浄水の温度、及び多様な洗浄時間の長さを含む各種洗浄条件が存在し、洗浄に關与するプロテアーゼはこれらの条件に晒される。加えて、異なる地域で使用される洗剤配合物では、洗浄水中に、関連する成分が異なる濃度で存在する。例えば、欧州の洗剤は一般的には4500～5000ppm

50

の洗剤成分を洗浄水中に有するが、日本の洗剤は一般的には667ppmの洗剤成分を洗浄水に有する。北アメリカ、特に合衆国では、一般的には約975ppmの洗剤成分を洗浄水中に有する。

【0211】

低濃度洗剤系には、約800ppm未満の洗剤成分が洗浄水に存在する洗剤が包含される。日本の洗剤は、洗浄水中におよそ667ppmの洗剤成分が存在していることから、一般に低濃度洗剤系とみなされる。

【0212】

中間濃度の洗剤には、約800ppm～約2000ppmの洗剤成分が洗浄水中に存在する洗剤が包含される。北アメリカの洗剤は、洗浄水中におよそ975ppmの洗剤成分が存在していることから、一般に中間濃度の洗剤系であるとみなされる。ブラジルでは、典型的に洗浄水中におよそ1500ppmの洗剤成分が存在する。

10

【0213】

高濃度洗剤系には、約2000ppm超の洗剤成分が洗浄水中に存在している洗剤が包含される。欧州の洗剤は、洗浄水中におよそ4500～5000ppmの洗剤成分が存在していることから、一般に高濃度洗剤系であるとみなされる。

【0214】

ラテンアメリカの洗剤は、概して高起泡性のリン酸塩ビルダー洗剤であり、洗浄水中に1500～6000ppmの範囲の洗剤成分が存在していることから、ラテンアメリカで使用されている洗剤の範囲は、中間濃度及び高濃度洗剤の両方に包含される。上記のように、ブラジルでは、洗浄水中に典型的におよそ1500ppmの洗剤成分が存在する。しかしながら、例えば、他のラテンアメリカの国々に限定されないが、高起泡性のリン酸ビルダー洗剤が使用されている他の地域では、洗浄水中に、洗剤成分が最大で約6000ppm存在している高濃度洗剤系が使用されている場合がある。

20

【0215】

前述の内容を考慮すると、世界中の典型的な洗浄液中の洗剤組成物の濃度は、約800ppm未満の洗剤組成物（「低濃度洗剤地域」）、例えば、日本の約667ppmのものから、約800ppm～約2000ppmの洗剤組成物（「中間濃度の洗剤地域」）、例えば、米国の約975ppm及びブラジルの約1500ppmのもの、そして約2000ppm超の洗剤組成物（「高濃度洗剤地域」）、例えば、欧州の約4500ppm～約5000ppmのもの、及び高起泡性リン酸ビルダーの地域では約6000ppmのものまでさまざまであることが明白である。

30

【0216】

典型的な洗浄液の濃度は経験的に決定される。例えば、米国では、典型的な洗濯機の洗浄液容量は約64.4Lである。したがって、洗浄溶液中に約975ppmの洗剤濃度得るためには、64.4Lの洗浄液に約62.79gの洗剤組成物を添加しなくてはならない。この量は、消費者が、洗剤に付属された計量カップを用いて洗浄水に量り入れる典型的な量である。

【0217】

更なる例として、異なる地域では異なる洗浄温度が使用される。日本で使用されている洗浄水の温度は、一般的に、欧州で使用する温度よりも低い。例えば、北アメリカ及び日本の洗浄水の温度は、典型的には約10～約30（例えば、約20）であるが、欧州の洗浄水の温度は、典型的には約30～約60（例えば、約40）である。しかしながら、エネルギーの節約の観点から、多くの消費者は冷水洗浄の使用に切り替えている。加えて、一部の更なる地域では、典型的に洗濯だけでなく食器洗浄用途にも冷水が使用されている。一部の実施形態では、本発明の「冷水洗浄」では、約10～約40、又は約20～約30、又は約15～約25、並びに約15～約35の範囲内のすべてのその他の組み合わせ、並びに10～40のすべての範囲の洗浄温度に好適な「冷水用洗剤」を用いる。

40

【0218】

50

更なる例として、異なる地域では、典型的に、異なる硬度の水が用いられている。水の硬度は、通常、 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ 合計のグレイン / ガロン単位で記述される。硬度は、水中のカルシウム (Ca^{2+}) 及びマグネシウム (Mg^{2+}) の量の尺度である。米国ではほとんどの水は硬水であるが、硬度の程度は様々である。中硬水 (60 ~ 120 ppm) ~ 硬水 (121 ~ 181 ppm) は、60 ~ 181 ppm (ppm をグレイン / US ガロン単位に変換する場合、ppm 数を 17.1 で除したものがグレイン / ガロンに相当する) の鉱物を含有する。

【0219】

【表2】

水	グラム / リットル (グレイン / ガロン)	ppm
軟水	0.02未満 (1.0未満)	17未満
弱硬水	0.02 ~ 0.06 (1.0 ~ 3.5)	17 ~ 60
中硬水	0.06 ~ 0.12 (3.5 ~ 7.0)	60 ~ 120
硬水	0.12 ~ 0.18 (7.0 ~ 10.5)	120 ~ 180
超硬水	0.18超 (10.5超)	180超

10

20

【0220】

欧州の水硬度は、一般的には約 0.180 (10.5) (例えば、 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ の合計が約 0.180 ~ 約 0.34 (10.5 ~ 約 20.0)) グラム / リットル (括弧内はグレイン / ガロン単位) を上回る (例えば、 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ の合計が約 0.26 グラム / リットル (15 グレイン / ガロン))。北アメリカの水硬度は、一般的には日本の水硬度よりも高いものの、欧州の水硬度より低い。例えば、北アメリカの水硬度は、約 0.2 ~ 約 0.7 グラム (grams) (3 ~ 約 10 グレイン (grains))、約 0.2 ~ 約 0.5 グラム (grams) 又は約 0.4 グラム (3 ~ 約 8 グレイン又は約 6 グレイン (grains)) であり得る。日本の水硬度は、一般的には北アメリカの水硬度よりも低く、通常 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ の合計が約 0.07 (4) 未満、例えば約 0.05 グラム / リットル (3 グレイン / ガロン) である。

30

【0221】

したがって、一部の実施形態では、本発明は少なくとも 1 組の洗浄条件 (例えば、水温、水の硬度、及び / 又は洗剤濃度) において驚くべき洗浄性能を示すプロテアーゼ変異体を提供する。一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体の洗浄性能は、他のサモリシンプロテアーゼの洗浄性能と同程度である。したがって、本発明の一部の実施形態では、本明細書に提供されるプロテアーゼ変異体は、強化された酸化安定性、強化された熱安定性、様々な条件下での強化されたクリーニング性能、及び / 又は強化されたキレート剤中の安定性を示す。加えて、本発明のプロテアーゼ変異体は、単独でも又はビルダー及び安定化剤との組み合わせとしても、洗剤を含まないクリーニング組成物において有用である。

40

【0222】

本発明の一部の実施形態では、クリーニング組成物は、組成物の重量に基づき、少なくとも約 0.00001 重量% ~ 約 10 重量% のレベルの少なくとも 1 種の本発明の変異体プロテアーゼと、クリーニング助剤を含む残部 (例えば、組成物の約 99.999 重量% ~ 約 90.0 重量%) と、を含む。本発明の他の一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、組成物の重量に基づき、約 0.00001 重量% ~ 約 10 重量%、約 0.001 重量% ~ 約 5 重量%、約 0.001 重量% ~ 約 2 重量%、約 0.005 重量% ~ 約 0

50

、5重量%のレベルの少なくとも1種の変異型プロテアーゼと、クリーニング助剤を含むクリーニング組成物の残部（例えば、約99.9999重量%～約90.0重量%、約99.9999重量%～約98重量%、約99.995重量%～約99.5重量%）と、を含む。

【0223】

一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、クリーニング性能及び/又は布地ケア及び/又は食器洗浄効果を提供する追加の洗剤用酵素を1種以上含む。好適な酵素の例としては、限定するものではないが、ヘミセルラーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、ケラチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、リグニナーゼ、プルナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ、マラナーゼ、 α -グルカナーゼ、アラビノシダーゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ、ラッカーゼ、及びアミラーゼ、或いはこれらの任意の組み合わせ又はこれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、プロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、及び/又はセルラーゼなどの一般的に適用可能な酵素をアミラーゼと共に含む酵素混合物（すなわち、「カクテル」）が使用される。

【0224】

本明細書で提供されるプロテアーゼ変異体に加えて、任意の他の好適なプロテアーゼが本発明の組成物において有用である。適当なプロテアーゼとしては、動物、植物又は微生物由来のものが挙げられる。一部の実施形態では、微生物由来のプロテアーゼが使用される。一部の実施形態では、化学物質により改変された又は遺伝子改変された変異体が包含される。一部の実施形態では、プロテアーゼはセリンプロテアーゼであり、好ましくはアルカリ性の微生物プロテアーゼ又はトリプシン様プロテアーゼである。アルカリ性プロテアーゼの例としては、サブチリシン、特にバチルス属由来のサブチリシンが挙げられる（例えば、サブチリシン、レントス、アミロリケファシエンス、サブチリシンカールスバーグ、サブチリシン309、サブチリシン147、及びサブチリシン168）。更なる例としては、米国再発行特許第34,606号、米国特許第5,955,340号、同第5,700,676号、同第6,312,936号、及び同第6,482,628号に記載されているプロテアーゼ変異体が挙げられる（これら公報はいずれも参照により本明細書に組み込まれる）。追加のプロテアーゼ例としては、例えば、限定するものではないが、トリプシン（例えば、ブタ又はウシ由来）、及びPCT国際特許出願公開第WO 89/06270号に記載のフサリウムプロテアーゼが挙げられる。一部の実施形態では、本発明に使用できる市販のプロテアーゼ酵素としては、限定するものではないが、MAXATASE（登録商標）、MAXACAL（商標）、MAXAPEM（商標）、OPTICLEAN（登録商標）、OPTIMASE（登録商標）、PROPERASE（登録商標）、PURAFECT（登録商標）、PURAFECT（登録商標）OXP、PURAMAX（商標）、EXCELLASE（商標）、及びPURAFAST（商標）（Genencor）；ALCALASE（登録商標）、SAVINASE（登録商標）、PRIMASE（登録商標）、DURAZYM（商標）、POLARZYME（登録商標）、OVOZYME（登録商標）、KANNAASE（登録商標）、LIQUANASE（登録商標）、NEUTRASE（登録商標）、RELASE（登録商標）及びESPERASE（登録商標）（Novozymes）；BLAP（商標）及びBLAP（商標）変異体（Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien（Duesseldorf, Germany））、並びにKAP（バチルス・アルカロフィルスサブチリシン；花王株式会社、日本国東京）が挙げられる。PCT国際特許出願公開第WO 95/23221号、同第WO 92/21760号、米国特許出願公報第2008/0090747、及び米国特許第5,801,039号、同第5,340,735号、同第5,500,364号、同第5,855,625号、米国債発行特許第34,606号、米国特許第5,955,340号、同第5,700,676号、同第6,312,936号、及び同第6,482,628、並びに様々な他の特許にも様々なプロテアーゼが記載

10

20

30

40

50

されている。一部の更なる実施形態では、本発明において有用であるメタロプロテアーゼとしては、限定するものではないが、PCT国際特許出願公開第WO 07/044993号に記載の中性のメタロプロテアーゼが挙げられる。

【0225】

加えて、任意の好適なリパーゼが本発明において有用である。好適なリパーゼとしては、限定するものではないが、細菌又は真菌由来のものが挙げられる。化学物質により改変された又は遺伝子改変された変異体は本発明に包含される。有用なリパーゼの例としては、ヒュミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) のリパーゼ (例えば、欧州特許第258068号及び同第305216号参照)、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) のリパーゼ (例えば、欧州特許第238023号参照)、カンジダ属のリパーゼ、例えば、カンジダ・アンタルクチカ (*C. antarctica*) のリパーゼ (例えば、カンジダ・アンタルクチカ (*C. antarctica*) のリパーゼA又はB; 例えば、欧州特許第214761号参照)、シュードモナス属のリパーゼ、例えば、シュードモナス・アルカリゲネスのリパーゼ及びシュードモナス・シュードアルカリゲネスのリパーゼ (例えば、欧州特許第218272号参照)、シュードモナス・セパシアのリパーゼ (例えば、欧州特許第331376号参照)、シュードモナス・スタッツェリ (*P. stutzeri*) のリパーゼ (例えば、英国特許第1,372,034号参照)、シュードモナス・フルオレッセンスのリパーゼ、バチルス属のリパーゼ (例えば、枯草菌のリパーゼ [Dartois et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1131:253~260頁 [1993年]])、バチルス・ステアロサーモフィルスのリパーゼ (例えば、特願昭64/744992号参照)、並びにバチルス・ブミルスのリパーゼ (例えば、PCT国際特許出願公開第WO 91/16422参照) が挙げられる。

【0226】

さらに、クローニングされた多数のリパーゼが、本発明の一部の実施形態において有用であり、限定するものではないが、ペニシリウム・カマンベルティ (*Penicillium camembertii*) のリパーゼ (Yamaguchi et al., *Gene* 103:61~67頁 [1991年] 参照)、ゲオトリクム・カンジズム (*Geotricum candidum*) のリパーゼ (Schimada et al., *J. Biochem.*, 106:383~388頁 [1989年] 参照)、及び様々なクモノスカビ属のリパーゼ、例えばリゾプス・デレマ (*R. delemar*) のリパーゼ (Hass et al., *Gene* 109:117~113頁 [1991年] 参照)、リゾプス・ニベウス (*R. niveus*) のリパーゼ (Kugimiya et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:716~719頁 [1992年]) 及びリゾプス・オリーゼ (*R. oryzae*) のリパーゼが挙げられる。

【0227】

クチナーゼなどの他の種類のサーモリシンも本発明の一部の実施形態において有用であり、限定するものではないが、例えば、シュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) 由来のクチナーゼ (PCT国際特許出願公開第WO 88/09367号参照)、及びフザリウム・ソラニ・ピシ (*Fusarium solani pisi*) 由来のクチナーゼ (PCT国際特許出願公開第WO 90/09446号参照) が挙げられる。

【0228】

その他の好適なリパーゼとしては、M1 LIPASE (商標)、LUMA FAST (商標)、及びLIPOMAX (商標) (Genencor); LIPEX (登録商標)、LIPOLEASE (登録商標) 及びLIPOLEASE (登録商標) ULTRA (Novozymes); 及びLIPASE P (商標) 「アマノ」 (天野エンザイム, 日本) などの市販のリパーゼが挙げられる。

【0229】

本発明の一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、組成物の重量に基づき約0.00001重量%~約10重量%の追加のリパーゼのレベルのリパーゼと、組成物の重量に基づき残部のクリーニング助剤と、を更に含む。本発明の他の一部の実施形態で

は、本発明のクリーニング組成物はまた、更にリパーゼを、組成物の重量に基づき約 0 . 0 0 0 1 重量% ~ 約 1 0 重量%、約 0 . 0 0 1 重量% ~ 約 5 重量%、約 0 . 0 0 1 重量% ~ 約 2 重量%、約 0 . 0 0 5 重量% ~ 約 0 . 5 重量% リパーゼのレベルで含む。

【 0 2 3 0 】

本発明の一部の実施形態では、任意の好適なアミラーゼが、本発明において有用である。一部の実施形態では、アルカリ性溶液に使用するのに好適である任意のアミラーゼ（例えば、及び/又は）も有用である。好適なアミラーゼとしては、限定するものではないが、細菌由来のもの又は真菌由来のものが挙げられる。一部の実施形態では、化学物質により改変された又は遺伝子改変された変異体が包含される。本発明において有用なアミラーゼとしては、限定するものではないが、パチルス・リケニフォルミスから得られる
- アミラーゼが挙げられる（例えば、英国特許第 1 , 2 9 6 , 8 3 9 号を参照されたい）。本発明において有用な市販のアミラーゼとしては、限定するものではないが、D U R A M Y L（登録商標）、T E R M A M Y L（登録商標）、F U N G A M Y L（登録商標）、S T A I N Z Y M E（登録商標）、S T A I N Z Y M E P L U S（登録商標）、S T A I N Z Y M E U L T R A（登録商標）、及び B A N（商標）（N o v o z y m e s）、並びに P O W E R A S E（商標）、R A P I D A S E（登録商標）及び M A X A M Y L（登録商標）P（G e n e n c o r）が挙げられる。

10

【 0 2 3 1 】

本発明の一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、組成物の重量に基づき約 0 . 0 0 0 0 1 重量% ~ 約 1 0 重量%の追加のアミラーゼのレベルのアミラーゼと、組成物の重量に基づき残部のクリーニング助剤と、を更に含む。同様に、本発明の一部の他の実施例では、本発明のクリーニング組成物はまた、更にアミラーゼを、組成物の重量に基づき約 0 . 0 0 0 1 重量% ~ 約 1 0 重量%、約 0 . 0 0 1 重量% ~ 約 5 重量%、約 0 . 0 0 1 重量% ~ 約 2 重量%、約 0 . 0 0 5 重量% ~ 約 0 . 5 重量% アミラーゼのレベルで含む。

20

【 0 2 3 2 】

一部の更なる実施形態では、任意の好適なセルラーゼが、本発明のクリーニング組成物において有用である。好適なセルラーゼとしては、限定するものではないが、細菌又は真菌由来のものが挙げられる。一部の実施例では、化学物質により改変された又は遺伝子改変された変異体が包含される。好適なセルラーゼとしては、限定するものではないが、ヒュミコラ・インソレンス（*Humicola insolens*）のセルラーゼが挙げられる（例えば、米国特許第 4 , 4 3 5 , 3 0 7 号を参照されたい）。特に好適なセルラーゼは、色ケア効果を有するセルラーゼである（例えば、欧州特許第 0 4 9 5 2 5 7 号を参照されたい）。本発明において有用である市販のセルラーゼとしては、限定するものではないが、C E L L U Z Y M E（登録商標）、C A R E Z Y M E（登録商標）（N o v o z y m e s）、及び K A C - 5 0 0（B）（商標）（花王株式会社）が挙げられる。一部の実施形態では、セルラーゼは、N 末端の一部が欠失している、成熟型の野生型又は変異型セルラーゼの一部又は断片として組み込まれる（例えば、米国特許第 5 , 8 7 4 , 2 7 6 号を参照されたい）。一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、組成物の重量に基づき約 0 . 0 0 0 0 1 重量% ~ 約 1 0 重量%の追加のセルラーゼのレベルのセルラーゼと、組成物の重量に基づき残部のクリーニング助剤と、を更に含む。本発明の他の一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物はまた、更にセルラーゼを、組成物の重量に基づいて約 0 . 0 0 0 1 重量% ~ 約 1 0 重量%、約 0 . 0 0 1 重量% ~ 約 5 重量%、約 0 . 0 0 1 重量% ~ 約 2 重量%、約 0 . 0 0 5 重量% ~ 約 0 . 5 重量% セルラーゼのレベルで含む。

30

40

【 0 2 3 3 】

洗剤組成物で使用するのに好適な任意のマンナーゼも同様に本発明において有用である。好適なマンナーゼとしては、限定するものではないが、細菌又は真菌由来のものが挙げられる。一部の実施例では、化学物質により改変された又は遺伝子改変された変異体が包含される。本発明において有用な様々なマンナーゼが既知である（例えば、米国特許第 6 , 5 6 6 , 1 1 4 号、同第 6 , 6 0 2 , 8 4 2 号、及び同第 6 , 4 4 0 , 9 9 1 号

50

を参照し、これら公報はいずれも参照により本明細書に組み込まれる)。本発明の一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、組成物の重量に基づき約0.00001重量%～約10重量%の追加のマンナナーゼのレベルのマンナナーゼと、組成物の重量に基づき残部のクリーニング助剤と、を更に含む。本発明の一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物はまた、更にマンナナーゼを、組成物の重量に基いて約0.00001重量%～約10重量%、約0.001重量%～約5重量%、約0.001重量%～約2重量%、約0.005重量%～約0.5重量%マンナナーゼのレベルで含む。

【0234】

一部の実施形態では、ペルオキシダーゼは過酸化水素又は過酸化水素供給源(例えば、過炭酸塩、過ホウ酸塩又は過硫酸塩)と組み合わせて本発明の組成物に使用される。一部の代替的な実施形態では、オキシダーゼは酸素と組み合わせて使用される。いずれのタイプの酵素も「溶液を漂白する」(すなわち、布地と一緒に洗浄液で洗浄する場合に、繊維製品の染料が、その染料で染色されている布から他の布へと色移りするのを予防する)ために、好ましくは増感剤と共に使用される(例えば、PCT国際特許出願公開第WO 94/12621号及び同第WO 95/01426号を参照されたい)。好適なペルオキシダーゼ/オキシダーゼとしては、限定するものではないが、植物、細菌又は真菌由来のものが挙げられる。一部の実施例では、化学物質により改変された又は遺伝子改変された変異体が包含される。一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、組成物の重量に基づき約0.00001重量%～約10重量%の追加のペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼのレベルのペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼと、組成物の重量に基づき残部のクリーニング助剤と、を更に含む。本発明の他の一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物はまた、更にペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼを、組成物の重量に基づき約0.00001重量%～約10重量%、約0.001重量%～約5重量%、約0.001重量%～約2重量%、約0.005重量%～約0.5重量%ペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼのレベルで含む。

【0235】

一部の実施形態では、有用である追加の酵素としては、限定するものではないがペルヒドロラーゼが挙げられる(例えば、PCT国際特許出願公開第WO 05/056782号を参照されたい)。加えて、一部の実施形態では、上述の酵素の混合物、特に、1種以上の追加のプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、マンナナーゼ、及び/又は少なくとも1種のセルラーゼなどの酵素の混合物が、本発明に包含される。実際に、これらの酵素の多様な混合物が本発明において有用であることは想到される。変異型プロテアーゼ及び1種以上の追加の酵素のレベルは、いずれも独立して約10%までの範囲で変化し、クリーニング組成物の残部はクリーニング助剤からなることも想到される。具体的なクリーニング助剤の選別は、クリーニングされる表面、物品、又は布地、並びに使用時(例えば、洗剤を用いた洗浄中)のクリーニング条件に所望される組成物の形態を考慮することで容易になされる。

【0236】

好適なクリーニング助剤の例としては、限定するものではないが、界面活性剤、ビルダー、漂白剤、漂白活性化剤、漂白触媒、他の酵素、酵素安定化系、キレート剤、蛍光増白剤、汚れ剥離ポリマー、移染剤、移染防止剤、触媒材料、過酸化水素、過酸化水素供給源、予形成された過酸、ポリマー型分散剤、泥汚れ除去剤、構造弾性化剤、分散剤、抑泡剤、染料、香料、着色剤、フィラー塩、ヒドロトロップ、光活性化剤、蛍光剤、布地コンディショナー、布地柔軟剤、キャリア、ヒドロトロップ、加工助剤、溶媒、色素、加水分解性界面活性剤、保存料、抗酸化剤、収縮防止剤、防皺剤、殺菌剤、防カビ剤、色スペックル、銀製品ケア剤、変色防止剤及び/又は防食剤、アルカリ供給源、可溶化剤、キャリア、加工助剤、色素、及びpH調整剤が挙げられる(例えば、米国特許第6,610,642号、同第6,605,458号、同第5,705,464号、同第5,710,115号、同第5,698,504号、同第5,695,679号、同第5,686,014号及び同第5,646,101号を参照されたい、これら公報はいずれも参照により本明細

書に組み込まれる)。クリーニング組成物材料の具体例は以下に詳細に例示する。クリーニング助剤が、クリーニング組成物中で本発明のプロテアーゼ変異体と適合性でない実施形態では、2つの成分を組み合わせることが適切になるまでの間、クリーニング助剤及びプロテアーゼを分離した(すなわち、互いに接触させない)ままにしておくという好ましい手段が使用される。このような分離手法には、当該技術分野において既知の任意の好適な方法が包含される(例えば、ゲルキャップ法、カプセル封入、錠剤、物理的分離など)。

【0237】

一部の実施形態では、本明細書で提供される1種以上のプロテアーゼ変異体の有効量は、タンパク質性の染みを除去する必要がある各種表面をクリーニングするのに有用な組成物中に含まれる。このようなクリーニング組成物としては、硬質表面、布地、及び皿のクリーニングなどの用途向けのクリーニング組成物が挙げられる。実際に、一部の実施形態では、本発明は布地クリーニング組成物を提供するが、他の実施形態では、本発明は非布地用クリーニング組成物を提供する。特に、本発明は、口腔ケア組成物(歯磨剤、歯磨き粉、マウスウォッシュなど、並びに義歯洗浄用組成物を包含する)、皮膚クリーニング組成物及び毛髪クリーニング組成物などのパーソナルケアに好適なクリーニング組成物も提供する。本発明は、任意の形態(すなわち、液体、粒状、バー状、半固形、ゲル、乳濁液、錠剤、カプセル剤など)の洗剤組成物を包含することを意図する。

【0238】

例として、本発明のプロテアーゼ変異体が有用である数種類のクリーニング組成物について、以降に更に詳細に説明する。本発明のクリーニング組成物が、洗濯機を用いる洗浄方法で使用するのに好適な組成物として配合される一部の実施形態では、本発明の組成物は、好ましくは少なくとも1種の界面活性剤と、少なくとも1種のビルダー化合物と、並びに好ましくは、有機高分子化合物、漂白剤、追加の酵素、抑泡剤、分散剤、石鹼カス分散剤、汚れ懸濁剤及び再付着防止剤、及び防食剤から選択される1種以上のクリーニング助剤と、を含有する。一部の実施形態では、洗濯用組成物は柔軟剤も含有する(すなわち、追加のクリーニング助剤として)。本発明の組成物は、固形又は液体形態の洗剤添加剤としても有用である。このような添加剤は、従来の洗剤組成物の性能を補う及び/又は強化することが意図されるものであり、クリーニングプロセスの任意の段階で添加できる。一部の実施形態では、20で測定した場合、本発明の洗濯洗剤組成物の密度は約400~約1200g/リットルの範囲であり、一方で他の実施形態では約500~約950g/リットルの範囲である。

【0239】

食器手洗い方式で使用する組成物として配合される実施形態では、本発明の組成物は、好ましくは少なくとも1種の界面活性剤と、好ましくは有機高分子化合物、起泡剤、第2族金属イオン、溶媒、ヒドロトロップ、及び追加の酵素から選択される少なくとも1種の追加のクリーニング助剤と、を含有する。

【0240】

一部の実施形態では、米国特許第6,605,458号に提供されるものなどの様々なクリーニング組成物は、本発明のプロテアーゼ変異体と共に使用される。したがって、一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含有する組成物は、コンパクトな粒状布地クリーニング組成物である一方、他の実施形態では、組成物は、着色された布地を洗濯するのに有用な粒状布地洗浄組成物であり、他の実施形態では、組成物は、洗浄能を通して柔軟効果を提供する粒状布地クリーニング組成物であり、更なる実施形態では、組成物は、強力液体布地クリーニング組成物である。一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含む組成物は、米国特許第6,610,642号及び同第6,376,450号に記載されるものなどの布地クリーニング組成物である。加えて、本発明のプロテアーゼ変異体は、欧州又は日本の洗浄条件下で特定の実用性を有する粒状洗濯洗剤組成物において有用である(例えば、米国特許第6,610,642号を参照されたい)。

【0241】

一部の代替的な実施形態では、本発明は、本明細書で提供されるプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含む硬質表面クリーニング組成物を提供する。したがって、一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含む組成物は、米国特許第6,610,642号、同第6,376,450号及び同第6,376,450号に記載されるものなどの硬質表面クリーニング組成物である。

【0242】

更に他の実施形態では、本発明は、本明細書で提供されるプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含む食器洗浄用組成物を提供する。したがって、一部の実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含む組成物は、米国特許第6,610,642号、及び同第6,376,450号に記載されるものなどの硬質表面クリーニング組成物である。更に他の一部の実施形態では、本発明は、本明細書で提供されるプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含む食器洗浄用組成物を提供する。一部の更なる実施形態では、本発明のプロテアーゼ変異体を少なくとも1種含む組成物は、米国特許第6,376,450号及び同第6,376,450号に記載のものなどの口腔ケア組成物を含む。化合物及びクリーニング助剤の配合及び説明は、上記の米国特許第6,376,450号、同第6,605,458号、同第6,605,458号、及び同第6,610,642号に包含され、本明細書で提供されるプロテアーゼ変異体と共に使用される。

【0243】

本発明のクリーニング組成物は、任意の好適な形態に調合されて、好ましくは配合者により選択される任意のプロセス、例えば、限定するものではないが米国特許第5,879,584号、同第5,691,297号、同第5,574,005号、同第5,569,645号、同第5,565,422号、同第5,516,448号、同第5,489,392号、及び同第5,486,303号に記載のものなどの任意のプロセスにより調製される。これら公報はいずれも参照により本明細書に組み込まれる。低pHのクリーニング組成物が所望される場合、かかる組成物のpHは、モノエタノールアミン又は酸性材料（例えば、HCl）などの追加の材料により調整される。

【0244】

本発明の目的には必須でないが、以下に例示される助剤の非限定的な一覧は、本発明のクリーニング組成物での使用に好適である。一部の実施形態では、これらの助剤は、例えば、クリーニング性能を補助又は強化させるために、クリーニングされる基材を処理するために、あるいは香料、着色剤、又は染料などの場合にはクリーニング組成物の美観を改善するために組み込まれる。これらの助剤が本発明のプロテアーゼ変異体に添加されることは理解されたい。このような追加的成分の正確な性質及びその添加レベルは、組成物の物理的形態、及び組成物が使用される洗浄操作の性質によって決まる。好適な補助剤としては、限定するものではないが、界面活性剤、ビルダー、キレート剤、移染防止剤、付着助剤、分散剤、追加の酵素、及び酵素安定化剤、触媒材料、漂白活性化剤、漂白増進剤、過酸化水素、過酸化水素供給源、予形成された過酸、高分子分散剤、泥汚れ除去/再付着防止剤、増白剤、抑泡剤、染料、香料、構造弾性化剤、布地柔軟剤、キャリア、ヒドロトロップ、加工助剤及び/又は色素が挙げられる。以下の開示に加え、このような他の補助剤の好適な例及び使用レベルは、米国特許第5,576,282号、同第6,306,812号、及び同第6,326,348号に記載されており、これら公報は参照により組み込まれる。上述の補助成分は、本発明のクリーニング組成物の残部を構成し得る。

【0245】

一部の実施形態では、本発明に従うクリーニング組成物は、少なくとも1種の界面活性剤及び/又は界面活性剤系を含み、界面活性剤は、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、双性イオン性界面活性剤、半極性非イオン性界面活性剤及びこれらの混合物から選択される。一部の低pHクリーニング組成物の実施形態（例えば、原液pHが約3～約5の組成物の場合）では、界面活性剤がこのような組成物の酸性成分により加水分解される恐れがあると考えられることから、典型的

には当該組成物はエトキシ化アルキル硫酸塩を含まない。一部の実施形態では、界面活性剤は、クリーニング組成物の重量に基づいて、約 0.1 重量% ~ 約 60 重量% のレベルで存在する一方、代替的な実施形態では約 1 重量% ~ 約 50 重量% のレベルで、あるいは更に他の実施形態では約 5 重量% ~ 約 40 重量% のレベルで存在する。

【0246】

一部の実施形態では、本発明の洗剤組成物は、1 種以上の洗剤ビルダー又はビルダー系を含む。少なくとも 1 種のビルダーを組み込む一部の実施形態では、クリーニング組成物は、クリーニング組成物の重量に基づいて、少なくとも約 1 重量%、約 3 重量% ~ 約 60 重量% 又は更には約 5 重量% ~ 約 40 重量% のビルダーを含む。ビルダーとしては、限定するものではないが、例えば、ポリリン酸のアルカリ金属塩、アンモニウム塩及びアルカ
10
ノールアンモニウム塩、ケイ酸アルカリ金属塩、炭酸のアルカリ土類金属塩及びアルカリ金属塩、アルミノケイ酸塩、ポリカルボン酸塩化合物、エーテルヒドロキシポリカルボン酸塩、無水マレイン酸とエチレン又はビニルメチルエーテルとのコポリマー、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼン-2, 4, 6-トリスルホン酸、及びカルボキシメチルオキシコハク酸、ポリ酢酸の様々なアルカリ金属塩、アンモニウム塩及び置換アンモニウム塩（例えば、エチレンジアミン四酢酸及びニトリロ三酢酸）、並びにメリト酸、コハク酸、クエン酸、オキシジコハク酸、ポリマレイン酸、ベンゼン 1, 3, 5-トリカルボン酸、カルボキシメチルオキシコハク酸、及びこれらの可溶性塩などのポリカルボン酸類が挙げられる。実際に、本発明の様々な実施形態では任意の好適なビルダーが有用であることが想
20
到される。

【0247】

一部の実施形態では、ビルダーは水溶性の硬度イオン錯体（例えば、金属イオン封鎖ビルダー）、例えば、クエン酸塩及びポリリン酸塩など（例えば、トリポリリン酸ナトリウム及びトリポリリン酸ナトリウム六水和物、トリポリリン酸カリウム、並びにトリポリリン酸ナトリウムとトリポリリン酸カリウムとの混合物など）を形成する。当該技術分野において既知のものが挙げられる（例えば、欧州特許第 2 100 949 号参照）、任意の好適なビルダーが、本発明において有用であることが想到される。

【0248】

一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は少なくとも 1 種のキレート剤を含有する。好適なキレート剤としては、銅、鉄及び / 又はマンガンキレート剤及びこれらの混合物が挙げられるがこれらに限定されない。少なくとも 1 種のキレート剤を使用する実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、対象とするクリーニング組成物の重量に基づいて、約 0.1 重量% ~ 約 15 重量% 又は更には約 3.0 重量% ~ 約 10 重量% のキ
30
レート剤を含む。

【0249】

一部の更なる実施形態では、本明細書で提供されるクリーニング組成物は、少なくとも 1 種の付着助剤を含有する。好適な付着助剤としては、限定するものではないが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリカルボン酸塩、ポリテレフタル酸などの汚れ剥離ポリマー、カオリナイトなどのクレイ、モンモリロナイト、アタパルジャイト (atapulgitite)、イライト、ベントナイト、ハロイサイト、及びこれらの混合物が挙げ
40
られる。

【0250】

本明細書に記載されるように、再付着防止剤は、本発明の一部の実施形態において有用である。一部の実施形態では、非イオン性界面活性剤は有用である。例えば、自動食器洗浄機の実施形態では、非イオン性界面活性剤は、表面改質の目的で、特にシーチングのために、フィルミングとスポットティングを防止するため、及び光沢を改善するために有用である。これらの非イオンの界面活性剤は、また、汚れの再付着の防止にも有用である。一部の実施形態では、再付着防止剤は、当該技術分野において既知の非イオン性界面活性剤である（例えば、欧州特許第 2 100 949 号を参照されたい）。

【0251】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、1種以上の移染防止剤を包含する。適当なポリマー移染防止剤としては、これらに限定されるものではないが、ポリビニルピロリドンポリマー、ポリアミンN-オキシドポリマー、N-ビニルピロリドンとN-ビニルイミダゾールとのコポリマー、ポリビニルオキサゾリドン、及びポリビニルイミダゾール、又はこれらの混合物が挙げられる。少なくとも1種の移染防止剤が使用される実施形態では、本発明のクリーニング組成物において、クリーニング組成物の重量に基づき約0.0001重量%～約10重量%、約0.01重量%～約5重量%、又は更には約0.1重量%～約3重量%を構成する。

【0252】

一部の実施形態では、ケイ酸塩が本発明の組成物に含まれる。このような一部の実施形態では、ケイ酸ナトリウム（例えば、二ケイ酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム、及び結晶質フィロケイ酸塩）は有用である。一部の実施形態では、ケイ酸塩は約1%～約20%のレベルで存在する。一部の実施形態では、ケイ酸塩は組成物の約5重量%～約15重量%のレベルで存在する。

【0253】

一部の更なる実施形態では、本発明のクリーニング組成物は分散剤も含有する。好適な水溶性有機材料には、ホモポリマー型若しくはコポリマー型の酸又はそれらの塩が挙げられるが、これらに限定されず、このうち、ポリカルボン酸は、炭素原子2個以内の程度で互いに離れている少なくとも2個のカルボキシルラジカルを含む。

【0254】

一部の更なる実施形態では、クリーニング組成物に使用される酵素は任意の好適な技術により安定化されている。一部の実施形態では、本明細書で使用される酵素は、最終組成物中にカルシウムイオン及び/又はマグネシウムイオンの水溶性供給源を存在させて、カルシウムイオン及び/又はマグネシウムイオンを酵素に供給することで安定化する。一部の実施形態では、酵素安定化剤としては、オリゴ糖類、多糖類、及び二価の無機金属塩、例えばアルカリ土類金属塩（カルシウム塩など）が挙げられる。酵素安定化に関する様々な技術が本発明において有用であると想到される。例えば、一部の実施形態では、本明細書で使用される酵素は、最終組成物中に、亜鉛（II）、カルシウム（II）及び/又はマグネシウム（II）イオンの水溶性供給源、並びに他の金属イオン（例えば、バリウム（II）、スカンジウム（II）、鉄（II）、マンガン（II）、アルミニウム（II）、スズ（II）、コバルト（II）、銅（II）、ニッケル（II）、及びオキソバナジウム（IV）イオン）の水溶性供給源を存在させて当該イオンを酵素に供給することで安定化される。塩化物及び硫酸塩もまた、本発明の一部の実施形態において有用である。好適なオリゴ糖類及び多糖類（例えば、デキストリン）の例は、当該技術分野において既知である（例えば、PCT国際特許出願公開第WO 07/145964号を参照されたい）。一部の実施形態では、例えば、ホウ素含有化合物（例えば、ホウ酸塩、4-ホルミルフェニルボロン酸）及び/又はトリペプチドアルデヒドなどの可逆的プロテアーゼ阻害剤もまた、所望により更に安定性を改善させるために有用である。

【0255】

一部の実施形態では、漂白剤、漂白活性化剤及び/又は漂白触媒が、本発明の組成物中に存在する。一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、無機及び/又は有機漂白化合物を含む。無機漂白剤としては、限定するものではないが、ペルハイドレート塩（例えば、過ホウ酸塩、過炭酸塩、過リン酸塩、過硫酸塩、及び過ケイ酸塩）が挙げられる。一部の実施形態では、無機ペルハイドレート塩はアルカリ金属塩である。一部の実施形態では、無機ペルハイドレート塩が、更なる保護はされずに結晶質の固体として含まれるが、他の一部の実施形態では、この塩はコーティングされる。当該技術分野において既知な任意の好適な塩が、本発明において有用である（例えば、欧州特許第2 100 949号を参照されたい）。

【0256】

一部の実施形態では、漂白活性化剤を本発明の組成物に使用する。漂白活性化剤は、典

10

20

30

40

50

型的には、60 以下の温度にてクリーニング過程で漂白作用を増強させる有機過酸前駆体である。本明細書に用いるのに好適な漂白活性化剤としては、過加水分解条件下で好ましくは約1～約10個の炭素原子、特に約2～約4個の炭素原子を有する脂肪族ペルオキシカルボン酸及び/又は任意に置換された過安息香酸を生じる化合物が挙げられる。更なる漂白活性化剤も当該技術分野において既知であり、本発明において有用である（例えば、欧州特許第2 100 949号を参照されたい）。

【0257】

加えて、一部の実施形態において及び本明細書に更に記載されるように、本発明のクリーニング組成物は、少なくとも1種の漂白触媒を更に含む。一部の実施形態では、マンガン
10 トリアザシクロノナン及び関連する錯体、並びにコバルト錯体、銅錯体、マンガン錯体、及び鉄錯体も有用である。その他の漂白触媒も本発明において有用である（例えば、米国特許第4,246,612号、同第5,227,084号、及び同第4,810,410号；PCT国際特許出願公開第WO 99/06521号；及び欧州特許第2 100 949号を参照されたい）。

【0258】

一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は1種以上の触媒型金属錯体を含有する。一部の実施形態では、金属系漂白触媒は有用である。一部の実施形態では、金属系漂白触媒には、所定の漂白触媒活性を有する遷移金属カチオン（例えば、銅、鉄、チタン、ルテニウム、タングステン、モリブデン又はマンガニカチオン）、漂白触媒活性をわず
20 かしが有さない又は全く有さない補助金属カチオン（例えば、亜鉛又はアルミニウムカチオン）、及び触媒型及び補助金属カチオンに関して所定の安定性定数を有する金属イオン封鎖剤、具体的には、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四（メチレンホスホン酸）及びこれらの水溶性塩を含む触媒系が含まれる（例えば、米国特許第4,430,243号を参照されたい）。一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物はマンガニ化合物により触媒される。このような化合物及び使用レベルは当該技術分野において周知である（例えば、米国特許第5,576,282号を参照されたい）。追加の実施形態では、コバルト漂白触媒は、本発明のクリーニング組成物において有用である。様々なコバルト漂白触媒が当該技術分野において既知であり（例えば、米国特許第5,597,936号及び同第5,595,967号を参照されたい）、既知の手順により容易に調製される。
30

【0259】

一部の更なる実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、マクロ多環式剛性配位子（MRL）の遷移金属錯体を含有する。実際問題として、制限を目的とするものではないが、一部の実施形態では、本発明により提供される組成物及びクリーニング方法は、水性洗淨媒質中に少なくとも1pphmの次数で活性MRL種を供給するように調整され、及び一部の実施形態では約0.005ppm～約25ppm、より好ましくは約0.05ppm～約10ppm、及び最も好ましくは約0.1ppm～約5ppmのMRLが洗淨液中に供給される。

【0260】

一部の実施形態では、本発明の遷移金属漂白触媒の遷移金属としては、限定するものではないが、例えば、マンガニ、鉄及びクロムが挙げられる。同様に、MRLとしては、限定するものではないが、例えば、特定の架橋型超剛性配位子（例えば、5,12-ジエチル-1,5,8,12-テトラアザビシクロ（6.6.2）ヘキサデカン）が挙げられる。
40 。好適な遷移金属MRLは、既知の手順により容易に調製される（例えば、PCT国際特許出願公開第WO第2000/32601号及び米国特許第6,225,464号を参照されたい）。

【0261】

一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、金属製品ケア剤を含有する。金属製品ケア剤は、アルミニウム、ステンレス鋼、及び非鉄金属（例えば、銀及び銅）を包含する金属の、変色、腐食、及び/又は酸化の予防及び/又は軽減に有用である。好適な
50

金属製品ケア剤としては、米国特許第2 1 0 0 9 4 9号、PCT国際特許出願公開第WO 9 4 / 2 6 8 6 0号、及び同第WO 9 4 / 2 6 8 5 9号に記載のものが挙げられる。一部の実施形態では、金属製品ケア剤は亜鉛塩である。一部の更なる実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、1種以上の金属製品ケア剤を約0.1重量%～約5重量%含む。

【0262】

一部の実施形態では、クリーニング組成物は、サーモリシン変異体プロテアーゼを有する高密度液体(HDL)組成物である。HDL洗濯剤は、アニオン性洗浄用界面活性剤(直鎖状又は分岐鎖状又はランダム鎖状の、置換又は非置換のアルキル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルアルコキシル化硫酸塩、アルキルリン酸塩、アルキルホスホン酸塩、アルキルカルボン酸塩、及び/又はそれらの混合物からなる群から選択されるもの)、及び場合により非イオン性界面活性剤(直鎖状又は分岐鎖状又はランダム鎖状の、置換又は非置換のアルキルアルコキシル化アルコール、例えば、 $C_8 \sim C_{18}$ アルキルエトキシル化アルコール、及び/又は $C_6 \sim C_{12}$ アルキルフェノールアルコキシラートからなる群から選択されるもの)を包含する洗浄用界面活性剤(10%～40%)を含んでいてよく、場合により、アニオン性洗浄用界面活性剤(6.0～9の親水性指標(HIC)を有する)と非イオン性洗浄用界面活性剤との重量比は、1:1超である。

【0263】

組成物には、場合により、両親媒性アルコキシル化グリース洗浄ポリマー(アルコキシル化ポリアルキレンイミンなどの、分岐鎖状で親水性及び疎水性特性を有するアルコキシル化ポリマーからなる群から0.05重量%～10重量%の範囲で選択される)、及び/又はランダムグラフトポリマー(典型的には、不飽和 $C_1 \sim C_6$ カルボン酸、エーテル、アルコール、アルデヒド、ケトン、エステル、糖単位、アルコキシ単位、マレイン酸無水物、グリセロールなどの飽和多価アルコール、及びこれらの混合物からなる群から選択されるモノマーを含む、親水性主鎖と、 $C_4 \sim C_{25}$ アルキル基、ポリプロピレン、ポリブチレン、飽和 $C_1 \sim C_6$ モノカルボン酸のビニルエステル、アクリル酸又はメタクリル酸の $C_1 \sim C_6$ アルキルエステル、及びこれらの混合物からなる群から選択される疎水性側鎖(1種又は複数種)とを含む)からなる、界面活剤の効果を増進するポリマーを含めることもできる。

【0264】

組成物には、追加ポリマー、例えば汚れ剥離ポリマー(アニオン性末端保護ポリエステル、例えば、SRP1、ランダム又はブロック構成で、単糖類、ジカルボン酸、ポリオール及びこれらの組み合わせから選択される少なくとも1種のモノマー単位を含むポリマー、ランダム又はブロック構成のエチレンテレフタレート系ポリマー及びそれらのコポリマーであって、例えば、Repel-o-tex SF、SF-2及びSRP6、Texcare SRA100、SRA300、SRN100、SRN170、SRN240、SRN300及びSRN325、Marloquest SLを含む)、再付着防止ポリマー(分子量500～100,000Daの範囲の、アクリル酸、マイレン酸(若しくはマレイン酸無水物)、フマル酸、イタコン酸、アコニット酸、メサコン酸、シトラコン酸、メチレンマロン酸、及びこれらの任意の混合物から選択される少なくとも1種のモノマーを含むポリマー、ビニルピロリドンホモポリマー、並びに/又はポリエチレングリコールなどのカルボキシレートポリマーを0.1重量%～10重量%含む)、セルロースポリマー(アルキルセルロース、アルキルアルコキシルアルキルセルロース、カルボキシアルキルセルロース、アルキルカルボキシアルキルセルロースであって、例えば、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、メチルカルボキシメチルセルロース、及びこれらの混合物などから選択されるものを含む)、並びに高分子カルボキシレート(マレイン酸/アクリル酸ランダムコポリマー又はポリアクリル酸ホモポリマーなど)などを含めることもできる。

【0265】

組成物は、飽和又は不飽和脂肪酸、好ましくは飽和又は不飽和 $C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪酸(

0重量%～10重量%)、及び付着補助剤を含んでもよく、付着補助剤の例としては、多糖類、好ましくはセルロース系ポリマー、ポリジアリルジメチルアンモニウムハロゲン化物(DADMAC)、及びDADMACと、ビニルピロリドン、アクリルアミド、イミダゾール、ハロゲン化イミダゾリニウム、及びそれらの混合物との、ランダム又はブロック構成のコポリマー、カチオン性グアーガム、カチオン性セルロース(例えば、カチオン性ヒドロキシエチル(hydroxyethyl)セルロースなど)、カチオン性デンプン、カチオン性ポリアシルアミド、並びにそれらの混合物が挙げられる。

【0266】

組成物には、更に、移染防止剤を含ませることもでき、移染防止剤としては、例えば、マンガンフタロシアニン、ペルオキシダーゼ、ポリビニルピロリドンポリマー、ポリアミンN-オキシドポリマー、N-ビニルピロリドンとN-ビニルイミダゾールとのコポリマー、ポリビニルオキサゾリドン及びポリビニルイミダゾール、並びに/又はこれらの混合物、キレート剤(例えば、エチレン-ジアミン-四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミンペンタメチレンホスホン酸(DTPMP)、ヒドロキシ-エタンジホスホン酸(HEDP)、エチレンジアミンN,N'-ニコハク酸(EDDS)、メチルグリシン二酢酸(MGDA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、プロピレンジアミン四酢酸(PDTA)、2-ヒドロキシピリジン-N-オキシド(HPNO)、又はメチルグリシン二酢酸(MGDA)が挙げられる)、グルタミン酸N,N-二酢酸(N,N-ジカルボキシメチルグルタミン酸四ナトリウム塩(GLDA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、4,5-ジヒドロキシ-m-ベンゼンジスルホン酸、クエン酸及びその任意の塩、N-ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、トリエチレンテトラアミン六酢酸(TTHA)、N-ヒドロキシエチルイミノ二酢酸(HEIDA)、ジヒドロキシエチルグリシン(DHEG)、エチレンジアミンテトラプロピオン酸(EDTP)、及びこれらの誘導体が挙げられる。

【0267】

組成物は、更に、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、クチナーゼ、ラッカーゼ、ホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼ、アシルトランスフェラーゼ、ペルヒドロラーゼ、アリアルエステラーゼ、及びこれらの任意の混合物から選択される酵素(約0.01重量%活性酵素～0.03重量%活性酵素)を含ませることもできる。組成物は、酵素安定化剤(例としては、プロピレングリコール若しくはグリセロールなどのポリオール類、糖若しくは糖アルコール、乳酸、可逆的プロテアーゼ阻害剤、ホウ酸、若しくは芳香族ホウ酸エステルなどのホウ酸誘導体、又は4-ホルミルフェニルボロン酸などのフェニルボロン酸誘導体が挙げられる)を含んでもよい。

【0268】

組成物は、更に、シリコーン又は脂肪酸系抑泡剤、色調染料、カルシウムカチオン及びマグネシウムカチオン、視覚に訴える成分(visual signaling ingredients)、消泡剤(0.001重量%～約4.0重量%)、及び/又は構造化剤/増粘剤(0.01重量%～5重量%、ジグセリド及びトリグリセリド、ジステアリン酸エチレングリコール、結晶セルロース、セルロース系材料、微小繊維状セルロース、バイオポリマー、キサンタンガム、ジェランガム、及びこれらの混合物からなる群から選択されるもの)を含ませることもできる。

【0269】

好適な洗浄用界面活性剤には、更に、カチオン性洗浄用界面活性剤(アルキルピリジニウム化合物、アルキル第四級アンモニウム化合物、アルキル第四級ホスホニウム化合物、アルキル第三級スルホニウム化合物、及び/又はこれらの混合物からなる群から選択される)、双性イオン性及び/又は両性洗浄用界面活性剤(アルカノールアミンスルホベタインからなる群から選択される)、両性界面活性剤、半極性非イオン性界面活性剤、並びにこれらの混合物も含まれる。

【0270】

10

20

30

40

50

組成物は任意の液体形態であってよく、例えば、液体又はジェル形態、あるいはこれらの組み合わせであってよい。組成物は、任意の一回用量形状、例えば、パウチに入れられてもよい。

【0271】

一部の実施形態では、クリーニング組成物は、サーモリシン変異体プロテアーゼを有する高密度粉末（HDD）組成物である。HDD粉末洗濯洗剤は、洗浄用界面活性剤、例えば、アニオン性洗浄用界面活性剤（例えば、直鎖状又は分岐鎖状又はランダム鎖状の、置換又は非置換のアルキル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルアルコキシ化硫酸塩、アルキルリン酸塩、アルキルホスホン酸塩、アルキルカルボン酸塩、及び／又はそれらの混合物からなる群から選択される）、非イオン性洗浄用界面活性剤（例えば、直鎖状又は分岐鎖状又はランダム鎖状の、置換又は非置換のC₈～C₁₈アルキルエトキシレート、及び／又はC₆～C₁₂アルキルフェノールアルコキシレートからなる群から選択される）、カチオン性洗浄用界面活性剤（例えば、アルキルピリジニウム化合物、アルキル第四級アンモニウム化合物、アルキル第四級ホスホニウム化合物、アルキル第三級スルホニウム化合物、及びそれらの混合物からなる群から選択される）、双性イオン性及び／又は両性洗浄用界面活性剤（アルカノールアミンスルホベタインからなる群から選択される）、両性界面活性剤、半極性非イオン性界面活性剤、及びそれらの混合物など；ビルダー、例えば、リン酸塩を含まないビルダー（例えば、0重量％～10重量％未満の範囲の、ゼオライトA、ゼオライトX、ゼオライトP及びゼオライトMAPなどのゼオライトビルダー）、リン酸塩ビルダー（例えば、0重量％～10重量％未満の範囲の、トリポリリン酸ナトリウムを包含する）、15重量％未満の範囲のクエン酸、クエン酸塩、及びニトリロ三酢酸又はその塩、ケイ酸塩（0重量％～10重量％未満の範囲のケイ酸ナトリウム若しくはケイ酸カリウム又はメタケイ酸ナトリウム、或いは層状ケイ酸塩（SKS-6））、炭酸塩（0重量％～10重量％未満の範囲の、炭酸ナトリウム及び／又は重炭酸ナトリウム）；並びに漂白剤（すなわち、フォトブリーチであって、例としては、スルホン化亜鉛フタロシアニン、スルホン化アルミニウムフタロシアニン、キサンテン染料、及びそれらの混合物が含まれる）、疎水性若しくは親水性の漂白活性剤（例えば、ドデカノイルオキシベンゼンスルホン酸塩、デカノイルオキシベンゼンスルホン酸塩、デカノイルオキシ安息香酸若しくはその塩、3,5,5-トリメチルヘキサノイルオキシベンゼンスルホン酸塩、テトラアセチルエチレンジアミン（TAED）、及びノナノイルオキシベンゼンスルホン酸塩（NOBS）、ニトリル四級アンモニウム塩、並びにこれらの混合物を含む）、過酸化水素、過酸化水素供給源（無機ペルハイドレート塩、例えば、過ホウ酸、過炭酸、過硫酸、過リン酸又は過ケイ酸のナトリウム塩一水和物又は四水和物を含む）、予形成された親水性及び／又は疎水性の過酸（過カルボン酸及びその塩、過炭酸及びその塩、ペルイミド酸及びその塩、ペルオキシ硫酸及びその塩からなる群から選択される）、並びにこれらの混合物及び／又は漂白触媒（例えば、イミニウムカチオン及びポリイオンを含むイミン漂白増進剤など、イミニウム双性イオン、変性アミン、変性アミノキシド、N-スルホニルイミン、N-ホスホニルイミン、N-アシルイミン、チアジアゾールジオキシド、ペルフルオロイミン、環状糖ケトン及びこれらの混合物、並びに金属含有漂白触媒（例えば、銅、鉄、チタン、ルテニウム、タングステン、モリブデン又はマンガンカチオンと、亜鉛又はアルミニウムなどの補助金属カチオン）が挙げられる）、並びにエチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四（メチレンホスホン酸）及びそれらの水溶性塩などの金属イオン封鎖剤を含ませることができる。

【0272】

組成物は、更に、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ／オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、クチナーゼ、ラッカーゼ、ホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼ、アシルトランスフェラーゼ、ペルヒドロラーゼ、アリアルエステラーゼ、及びそれらの任意の混合物からなる群から選択される酵素を含めることもできる。

【0273】

10

20

30

40

50

組成物は、更に、香料マイクロカプセル、デンプン封入香料アコード、色調剤、布地統合剤及びカチオン性ポリマーなどの追加のポリマー、染料固定成分 (dye lock ingredient)、布地柔軟剤、増白剤 (例えば、カラーインデックス (C. I.) 蛍光増白剤)、凝集剤、キレート剤、アルコキシ化ポリアミン、布地付着助剤、及び/又はシクロデキストリンを包含する追加の洗浄成分を含めてもよい。

【0274】

一部の実施形態では、クリーニング組成物は、サーモリシン変異体プロテアーゼを有する自動食器洗い機用 (ADW) 洗剤組成物である。ADW洗剤組成物は、0 ~ 10重量%の量で存在する2種以上の非イオン性界面活性剤であって、エトキシ化非イオン性界面活性剤、アルコールアルコキシ化界面活性剤、エポキシ化されたポリ (オキシアルキル化) アルコール、又はアミノオキシド界面活性剤から選択されるもの; 5 ~ 60%の範囲のビルダーであって、リン酸塩ビルダー (一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩又はオリゴマー化ポリリン酸塩、好ましくはトリポリリン酸ナトリウム (STPP)) 又はリン酸を含まないビルダー [アミノ酸系化合物、例えばMGDA (メチルグリシン二酢酸) 及びその塩並びにそれらの誘導体、GLDA (グルタミン酸-N, N-二酢酸) 及びその塩並びにそれらの誘導体、IDS (イミノニコハク酸) 及びその塩並びにそれらの誘導体、カルボキシメチルイヌリン及びその塩及びそれらの誘導体並びにこれらの混合物、ニトリロ三酢酸 (NTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、B-アラニン二酢酸 (B-ADA) 及びその塩を含む] のうちいずれかを含むビルダー; 約0.5重量% ~ 約50重量%の範囲の、ポリカルボン酸のホモポリマー及びコポリマー並びにそれらの部分中和した又は完全中和した塩、カルボン酸モノマー及びポリカルボン酸及びヒドロキシカルボン酸並びにそれらの塩; 約0.1重量% ~ 約50重量%の範囲の、スルホン化/カルボキシ化ポリマー (製品に寸法安定性を付与するためのもの); 約0.1重量% ~ 約10重量%の範囲の、乾燥補助剤 (ポリエステルから選択され、特にアニオン性ポリエステルであって、場合により、重縮合を促す3 ~ 6個の官能基、具体的には酸、アルコール又はエステル官能基を有する更なるモノマーを併せ持つもの、ポリカーボネート、ポリウレタン、及び/若しくはポリ尿素-ポリオルガノシロキサン化合物又はその反応性環状炭酸エステル及び尿素型の前駆体化合物); 約1重量% ~ 約20重量%の範囲のケイ酸塩 (ケイ酸ナトリウム又はケイ酸カリウム、例えば、二ケイ酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム及び結晶質フィロケイ酸塩など); 無機漂白剤 (例えば、過ホウ酸塩、過炭酸塩、過リン酸塩、過硫酸塩及び過ケイ酸塩などのペルハイドレート塩) 及び有機漂白剤 (例えば、過酸化ジアシル及びテトラアシル、特に、ジペルオキシドデカン二酸、ジペルオキシテトラデカン二酸 (diperoxytetradecanedioic acid)、及びジペルオキシヘキサデカン二酸 (diperoxyhexadecanedioic acid) などの有機ペルオキシ酸); 漂白活性剤 (即ち、約0.1重量% ~ 約10重量%の範囲の有機過酸前駆物質); 漂白触媒 (マンガニウム-トリアザシクロノナン及び関連する錯体、Co、Cu、Mn及びFeビスピリジルアミン及び関連する錯体、並びにペンタミン酢酸コバルト (III) 及び関連する錯体から選択されるもの); 約0.1重量% ~ 5重量%の範囲の金属製品ケア剤 (ベンゾトリアゾール (benzotriazole)、金属塩及び錯体、及び/又はケイ酸塩); 自動食器洗浄用洗剤組成物1グラム当たり活性酵素約0.01 ~ 5.0mgの範囲の酵素 (プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、クチナーゼ、ラッカーゼ、ホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼ、アシルトランスフェラーゼ、ペルヒドロラーゼ、アリアルエステラーゼ、及びそれらの任意の混合物などから選択されるもの); 並びに酵素安定化剤成分; (オリゴ糖、多糖類、及び二価の無機金属塩から選択されるもの) を含ませることができる。

【0275】

以下の表に、本発明の変異型サーモリシン変異体 (variant thermolysin variant) を有する組成物として有用な代表的な洗剤組成を示す。

【0276】

【表 3】

HD L 洗剤組成物	
成分	重量%
酵素（プロテアーゼ＋リパーゼ＋アミラーゼ）	3
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（HLAS）	10
平均エトキシ化度9のC12～14アルキルエトキシ化アルコール（AE9）	2
平均エトキシ化度3のC12～14アルキルエトキシ化アルコール（HAES）	23
C16～17アルキル中鎖分枝鎖アルキル硫酸塩	4
アミノオキシド	1
C12～18脂肪酸	2
PE20ポリマー	3
ポリエチレンイミンポリマー	3
キレート化剤	1.4
FW A 15増白剤	0.4
p-グリコール（溶媒）	8
DEG（溶媒）	0.5
エタノール	3
モノエタノールアミン	6
水	26
NaOH	0.3
香料	1
シリコーン抑泡剤	0.06
バイオレットDD染料	0.01
その他の染料	0.03
硬化ヒマシ油（構造化剤／増粘剤）	0.1
雲母	0.2
ギ酸カルシウム	0.1
ギ酸ナトリウム	0.2
その他の成分	100とする量

10

20

30

【0277】

【表 4】

HDD洗剤組成物				
成分	組成物A	組成物B	組成物C	組成物D
酵素(リパーゼ+ その他の酵素)	0.8重量%	0.8重量%	0.8重量%	0.8重量%
直鎖アルキル ベンゼン スルホン酸塩	9重量%	9重量%	12重量%	8重量%
平均エトキシル 化度0.5~3の アルキル エトキシル化 硫酸塩	3重量%	2重量%	1重量%	2重量%
カチオン性洗浄用 界面活性剤	0.5重量%	0.5重量%	0.5	0.5重量%
硫酸ナトリウム	55重量%	55重量%	55重量%	55重量%
炭酸ナトリウム	8重量%	10重量%	5重量%	8重量%
炭酸グリセロール オキサジリジニウ ム系漂白触媒	9重量%	12重量%	8重量%	10重量%
ケイ酸ナトリウム	0.005重量%	0.005重量%	0.005重量%	0.005重量%
カルボン酸 ポリマー	3重量%	0重量%	3重量%	0重量%
増白剤	2重量%	2重量%	2重量%	2重量%
増白剤	0.02重量%	0.02重量%	0.02重量%	0.02重量%
セルロース 系ポリマー	0.3重量%	0.3重量%	0.3重量%	0.3重量%
その他の成分 & 水分	100重量%とする量	100重量%とする量	100重量%とする量	100重量%とする量

10

20

【 0 2 7 8 】

【表 5 - 1】

HDD洗剤組成物						
成分	1(重量%)	2(重量%)	3(重量%)	4(重量%)	5(重量%)	6(重量%)
平均脂肪鎖長 C11～12の直鎖 アルキルベンゼン スルホン酸 ナトリウム	10.3	10.7	14	17	12.2	8.3
ラウリルスルホン 酸ナトリウム	0	3.5	0	1.4	1.2	0
C12～14 アルコール エトキシ-3-硫酸 ナトリウム	0	0	0.8	0	0	3
平均7モルが エトキシ化された C13～15オキソ アルコール エトキシレート (Lutensol (登録商標)A07)	1.57	0	0	0	1.2	0
平均7モルが エトキシ化された C10-ゲルベ(2- プロピルヘプタン- 1-オール) アルコール エトキシレート (Lutensol (登録商標)XP70)	0	1.5	0	0	1.2	0
平均7モルが エトキシ化された C16～18アルコー ルエトキシレート	0	0.5	0	0	0.3	0
平均5モルが エトキシ化された C12～18 アルコール エトキシレート	0	0.3	0	0	0	0
C12～14アルキル ヒドロキシエチル ジメチル アンモニウム クロリド (Praepagen (登録商標)HY)	0	0	0.7	0.54	0.1	1
トリポリリン酸 ナトリウム	0	0	0.6	0	1	0
ゼオライトA (ビルダー)	2.7	3.4	0	0	0.5	1.6
クエン酸	1.8	2	0	1.4	0	2
クエン酸ナトリウム	0	1.9	0	0	0	0
重炭酸ナトリウム	29	35	36.7	34	53	22
セスキカルボン酸 ナトリウム二水和物	0	0	1.2	0	0	0
炭酸ナトリウム	1.2	0	1.9	0	0	0

【 0 2 7 9 】

10

20

30

40

【表 5 - 2】

(上記表の続き)

HDD洗剤組成物						
成分	1(重量%)	2(重量%)	3(重量%)	4(重量%)	5(重量%)	6(重量%)
ポリアクリル酸 ナトリウム(MW 4000、Sokalan PA25 CL)	0	0	1	0	0	0
ポリアクリル酸 ナトリウム(MW 8000、Sokalan PA30 CL)	1.45	1.6	0	0.97	1	0
ポリアクリル酸 ナトリウム／ マレイン酸(比70: 30)コポリマーMW 70,000、 Sokalan (登録商標)CPS	0	0	0.3	0	0	3
ポリエチ レングリコール／ 酢酸ビニルランダム グラフトコポリマー	0	0	0.8	1	1	0
カルボキシメチル セルロース (Finnfix (登録商標)GDA)	1	0.9	0	0	0	0
カルボキシメチル セルロース (Finnfix (登録商標)V)	0	0	0	0.3	1.1	0.92
疎水変性 カルボキシメチル セルロース (Finnfix (登録商標)SH-I)	0	0	0.5	0	0	0
C. I. 蛍光 増白剤260	0.1	0.13	0.1	0.03	0.05	0.18
C. I. 蛍光 増白剤351 (Tinopal (登録商標)CBS)	0	0.06	0.08	0	0	0
ジエチレントリアミン 五酢酸	0	0	0.2	0.1	0.2	0
S. S- エチレンジアミン ニコハク酸 四ナトリウム	0	0	0	0.3	0	0.3
ジエチレントリアミン ペンタ(メチレン ホスホン酸) セナトリウム塩	0	0.2	0	0	0	0
1- ヒドロキシエタノー 1,1- ジホスホン酸	0.1	0.2	0.3	0	0.2	0.4

【0280】

【表 5 - 3】

(上記表の続き)

HDD洗剤組成物						
成分	1(重量%)	2(重量%)	3(重量%)	4(重量%)	5(重量%)	6(重量%)
2-ホスホノブタン 1, 2, 4- トリカルボン酸 (Bayhibit (登録商標)AM)	0	0	0	0.4	0	0
MgSO ₄	0	0	0	0.8	0	0.4
過炭酸ナトリウム	9	12	7	6	8	9
プロピレン グリコール ジアセテート	7	10	10.8	0	0	0
トリエチレン グリコール ジアセテート	0	0	0	5	7	3.9
オキサジリジニウム 塩(Oxaziridium) 系漂白増進剤	0.03	0	0.03	0.02	0.05	0.02
プロテアーゼ1	4.3	3.3	6.3	5.7	3.3	0
プロテアーゼ2	0	0	0	0	0	2.2
アミラーゼ	2.2	1.51	1	2.2	1.9	3.3
リパーゼ	0	0	3.6	0	0	2.7
エンドグルカナーゼ 1	0	0	5.3	3.3	0	0
エンドグルカナーゼ 2	2.1	1.3	0	0	0	2.4
マンナナーゼ	1.3	1.54	1.3	0	1.2	1.9
ペルヒドロラーゼ1	2	0	1.8	0	2.1	1.9
ペルヒドロラーゼ2	0	4.1	0	2.3	0	0
ダイレクト バイオレット9	0	0	0.0003	0.0004	0	0
ソルベント バイオレット13	0	0	0.002	0	0	0
Texcare (登録商標) SRA300F	0.3	1.2	0	1	0.33	0.3
染料固定成分	0.02	0.02	0	0	0	0
(Tinolux (登録商標)BMC)	0	0	0	0	0	0.0015
食用赤色3号(C.I. Food Red 14)	0	0	0.001	0	0	0.001
抑泡剤顆粒	0.2	0.2	0	0	0.3	0
水分	7	6.3	8.9	9.1	4.3	4.6
香料	0.2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3
硫酸ナトリウム	100%までの 残部	100%までの 残部	100%までの 残部	100%までの 残部	100%までの 残部	100%までの 残部

【0281】

【表 6】

食器自動洗浄用(ADW)洗剤組成物				
配合組成	1	2	3	4
成分	レベル (重量%)	レベル (重量%)	レベル (重量%)	レベル (重量%)
固体ADW洗剤組成物				
STPP	35	0	0	56
炭酸塩	24	45	40	18.5
メチルグリシン二酢酸(活性成分83%)	0	15	20	0
ケイ酸塩	7	7	7	1.5
TEAD(テトラアセチルエチレンジアミン)	0.5	0.5	0.5	3.8
炭酸亜鉛	0.5	0.5	0.5	0
SLF18	1.5	1.5	1.5	0
Plurafac LF224				0.6
ペンタアミンアセトコバルト(III)硝酸塩(活性成分1%)	0.5	0.5	0.5	0.6
過炭酸塩	15	15	15	11
スルホネートポリマー	10	4	3	5.1
アミラーゼ(活性成分14.4mg/g)	1.3	1.8	1.5	0.7
加工助剤、香料及び硫酸ナトリウム	残部	残部	残部	残部
液体食器自動洗浄用洗剤composition				
ジプロピレングリコール	45	45	45	25
SLF18	45	45	45	0
Neodol1-9	3	3	3	2.6
Lutensol T07				30
Plurafac LF224				32.4
アミノオキシド				3.6
グリセリン	2	2	2	4
加工助剤及び染料	残部	残部	残部	残部
第2の自動食器洗浄機用液体洗剤組成物(第2の自動食器洗浄機用液体洗剤組成物 (3つの区画からなる一回用量の一部))				

10

20

30

【 0 2 8 2 】

【表 7】

HDL洗剤組成物					
化合物	配合組成				
	I	II	III	IV	V
LAS	24	32	6	3	6
NaC ₁₆ ~C ₁₇ HSAS	—	—	—	5	—
C ₁₂ ~C ₁₅ AE _{1.8} S	—	—	8	7	5
C ₈ ~C ₁₀ プロピルジメチルアミン	2	2	2	2	1
C ₁₂ ~C ₁₄ アルキルジメチルアミンオキシド	—	—	—	—	2
C ₁₂ ~C ₁₅ ASアルキル硫酸塩	—	—	17	—	8
C ₁₂ ~C ₁₄ アルキルN-メチルグルカミド (CFAA)界面活性剤	—	5	4	4	3
C ₁₂ ~C ₁₄ 脂肪族アルコールエトキシレート	12	6	1	1	1
C ₁₂ ~C ₁₈ 脂肪酸	3	—	4	2	3
クエン酸(無水物)	4.5	5	3	2	1
DETPMP	—	—	1	1	0.5
モノエタノールアミン	5	5	5	5	2
水酸化ナトリウム	—	—	2.5	1	1.5
1N HCl水溶液	#1	#1	—	—	—
プロパンジオール	12.7	14.5	13.1	10	8
エタノール	1.8	2.4	4.7	5.4	1
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
ペクチンリアーゼ	—	—	—	0.005	—
アミラーゼ	0.001	0.002	—	—	—
セルラーゼ	—	—	0.0002	—	0.0001
リパーゼ	0.1	—	0.1	—	0.1
メタロプロテアーゼ1(任意選択的)	0.05	0.3	—	0.5	0.2
メタロプロテアーゼ2	—	—	0.08	—	—
プロテアーゼA(任意選択的)	—	—	—	—	0.1
アルドースオキシダーゼ	—	—	0.3	—	0.003
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.05	0.05	0.02
ギ酸カルシウム	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07
DETBCHD	—	—	0.02	0.01	—
SRP1(アニオン性末端保護されたポリエステル)	0.5	0.5	—	0.3	0.3
ホウ酸	—	—	—	—	2.4
キシレンスルホン酸ナトリウム	—	—	3	—	—
クメンスルホン酸ナトリウム	—	—	—	0.3	0.5
DC 3225C	1	1	1	1	1
2-ブチルーオクタノール	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
増白剤1	0.12	0.1	0.18	0.08	0.1
100%までの残部の量の芳香剤/染料及び/又は水					
#1:1N HCl水溶液を加えて、配合物の原液pHを約3~約5の範囲に調整した。 上記実施例(I)~(II)のpHは約5~約7であり、(III)~(V)のpHは約7.5~約8.5であった。					

【 0 2 8 3 】

【表 8】

HDL洗剤組成物						
化合物	配合組成					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11.5	11.5	9	—	4	—
C ₁₂ ~C ₁₅ AE _{2.85} S	—	—	3	18	—	16
C ₁₄ ~C ₁₅ E _{2.5} S	11.5	11.5	3	—	16	—
C ₁₂ ~C ₁₃ E ₉	—	—	3	2	2	1
C ₁₂ ~C ₁₃ E ₇	3.2	3.2	—	—	—	—
C ₁₂ ~C ₁₄ アルキルN-メチルグルカミド (CFAA)界面活性剤	—	—	—	5	—	3
TPKFA(抜頭した全留分の(topped whole cut)C ₁₂ ~C ₁₄ 脂肪酸)	2	2	—	2	0.5	2
クエン酸(無水物)	3.2	3.2	0.5	1.2	2	1.2
ギ酸カルシウム	0.1	0.1	0.06	0.1	—	—
ギ酸ナトリウム	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
クメンスルホン酸ナトリウム	4	4	1	3	1.2	—
ホウ酸塩	0.6	0.6	1.5	—	—	—
水酸化ナトリウム	6	6	2	3.5	4	3
エタノール	2	2	1	4	4	3
1,2-プロパンジオール	3	3	2	8	8	5
モノエタノールアミン	3	3	1.5	1	2.5	1
TEPAE(テトラエチレンペンタアミン エトキシレート)	2	2	—	1	1	1
メタロプロテアーゼ1(任意選択的)	0.03	0.05	—	0.03	—	0.02
メタロプロテアーゼ2	—	—	0.01	—	0.08	—
プロテアーゼA(任意選択的)	—	—	0.01	—	—	—
リパーゼ	—	—	—	0.002	—	—
アミラーゼ	—	—	—	—	0.002	—
セルラーゼ	—	—	—	—	—	0.0001
ペクチンリアーゼ	0.005	0.005	—	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	—	—	0.05	—	0.02
ガラクトースオキシダーゼ	—	0.04	—	—	—	—
ペンタアミン酢酸コバルト(III)塩PAAC	0.03	0.03	0.02	—	—	—
DETBCHD	—	—	—	0.02	0.01	—
SRP1(アニオン性末端保護された ポリエステル)	0.2	0.2	—	0.1	—	—
DTPA	—	—	—	0.3	—	—
ポリビニルピリジン-N-オキシド (PVNO)	—	—	—	0.3	—	0.2
増白剤1	0.2	0.2	0.07	0.1	—	—
シリコーン消泡剤	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1
100%までの残部の量の芳香剤/染料及び/又は水						

【0284】

【表 9】

食器手洗い用液体 (Hand Dish Liquid) 洗剤組成物						
化合物	配合組成					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ ~C ₁₅ AE _{1.8} S	30	28	25	—	15	10
LAS	—	—	—	5	15	12
パラフィンスルホネート	—	—	—	20	—	—
C ₁₀ ~C ₁₈ アルキルジメチルアミノオキシド	5	3	7	—	—	—
ベタイン	3	—	1	3	1	—
C ₁₂ ポリヒドロキシ脂肪酸アミド	—	—	—	3	—	1
C ₁₄ ポリヒドロキシ脂肪酸アミド	—	1.5	—	—	—	—
C ₁₁ E ₉	2	—	4	—	—	20
DTPA	—	—	—	—	0.2	—
クエン酸三ナトリウム二水和物 (ビルダー)	0.25	—	—	0.7	—	—
ジアミン (ジメチルアミノプロピルアミン、 1,6-ヘザンジアミン (hexane diamine)、 1,3-プロパンジアミン、2-メチル-1,5- ペンタンジアミン、1,3-ペンタンジアミン、 1-メチル-ジアミノプロパン)	1	5	7	1	5	7
MgCl ₂	0.25	—	—	1	—	—
メタロプロテアーゼ1 (任意選択的)	0.02	0.01	—	0.01	—	0.05
メタロプロテアーゼ2	—	—	0.03	—	0.02	—
プロテアーゼA (任意選択的)	—	0.01	—	—	—	—
アミラーゼ	0.001	—	—	0.002	—	0.001
アルドースオキシダーゼ	0.03	—	0.02	—	0.05	—
クメンシルホン酸ナトリウム	—	—	—	2	1.5	3
ペンタアミン酢酸コバルト (III) 塩	0.01	0.01	0.02	—	—	—
DETBCHD	—	—	—	0.01	0.02	0.01
100%までの残部の量の芳香剤/染料及び/又は水						
実施例 (I) ~ (VI) の pH は、約 8 ~ 約 11 である。						

【 0 2 8 5 】

【表 10】

自動食器洗浄用液体洗剤組成物					
化合物	配合組成				
	I	II	III	IV	V
STPP (トリポリリン酸ナトリウム)	16.00	16.00	18.00	16.00	16.00
硫酸カリウム	—	10.00	8.00	—	10.00
1,2-プロパンジオール	6.00	0.50	2.00	6.00	0.50
ホウ酸	—	—	—	4.00	3.00
CaCl ₂ 二水和物	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
非イオン性界面活性剤	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
メタロプロテアーゼ1 (任意選択的)	0.10	0.03	—	0.03	—
メタロプロテアーゼ2	—	—	0.05	—	0.06
プロテアーゼB (任意選択的)	—	—	—	0.01	—
アミラーゼ	0.02	—	0.02	0.02	—
アルドースオキシダーゼ	—	0.15	0.02	—	0.01
ガラクトースオキシダーゼ	—	—	0.01	—	0.01
ペンタアミン酢酸コバルト (III) 塩 PAAC (漂白触媒)	0.01	—	—	0.01	—
DETBCHD	—	0.01	—	—	0.01
100%までの残部の量の香料/染料及び/又は水					

【 0 2 8 6 】

【表 1 1】

粒状及び／又は錠剤型洗剤組成物					
化合物	配合組成				
	I	II	III	IV	V
C ₁₄ ～C ₁₅ AS又はTAS (獣脂アルキル硫酸ナトリウム塩)	8	5	3	3	3
LAS	8	—	8	—	7
C ₁₂ ～C ₁₅ AE ₃ S	0.5	2	1	—	—
C ₁₂ ～C ₁₅ E ₅ 又はE ₃	2	—	5	2	2
QAS(第四級アンモニウム塩)	—	—	—	1	1
ゼオライトA	20	18	11	—	10
SKS-6(乾燥付加)(層状ケイ酸塩)	—	—	9	—	—
MA/AA(アクリル酸/マレイン酸コポリマー)	2	2	2	—	—
AA(ポリアクリル酸ポリマー)	—	—	—	—	4
クエン酸三ナトリウム2H ₂ O	—	2	—	—	—
クエン酸(無水物)	2	—	1.5	2	—
DTPA	0.2	0.2	—	—	—
EDDS	—	—	0.5	0.1	—
HEDP	—	—	0.2	0.1	—
PB1(過ホウ酸ナトリウム水和物)	3	4.8	—	—	4
過炭酸塩	—	—	3.8	5.2	—
NOBS	1.9	—	—	—	—
NACA OBS	—	—	2	—	—
TAED	0.5	2	2	5	1
BB1(3-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム) プロパンスルホン酸塩(DIPS))	0.06	—	0.34	—	0.14
BB2 3-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム)- デカン-2-硫酸塩	—	0.14	—	0.2	—
無水炭酸ナトリウム	15	18	—	15	15
硫酸塩	5	12	5	17	3
ケイ酸塩	—	1	—	—	8
メタロプロテアーゼ1(任意選択的)	0.03	—	0.1	0.06	—
メタロプロテアーゼ2	—	0.05	—	—	0.1
プロテアーゼB(任意選択的)	—	0.01	—	—	—
プロテアーゼC(任意選択的)	—	—	—	0.01	—
リパーゼ	—	0.008	—	—	—
アミラーゼ	0.001	—	—	—	0.001
セルラーゼ	—	0.0014	—	—	—
ペクチンリアーゼ	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
アルドースオキシダーゼ	0.03	—	0.05	—	—
ペンタアミン酢酸コバルト(III)塩PAAC	—	0.01	—	—	0.05
100%までの残部の水分及び／又は微量成分*					
*香料、染料、増白剤/SRP1/カルボキシメチルセルロースナトリウム/フォトブリーチ/ MgSO4/PVPVI/抑泡剤/高分子量PEG/クレイ。					

【 0 2 8 7 】

【表 1 2】

自動食器洗浄機用高密度洗剤組成物						
化合物	配合組成					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP(トリポリリン酸ナトリウム)	—	45	45	—	—	40
クエン酸二ナトリウム2H ₂ O	17	—	—	50	40.2	—
炭酸ナトリウム	17.5	14	20	—	8	33.6
重炭酸塩	—	—	—	26	—	—
ケイ酸塩	15	15	8	—	25	3.6
メタケイ酸塩	2.5	4.5	4.5	—	—	—
PB1(過ホウ酸ナトリウム一水和物)	—	—	4.5	—	—	—
PB4(過ホウ酸ナトリウム四水和物)	—	—	—	5	—	—
過炭酸塩	—	—	—	—	—	4.8
BB1(3-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム)プロパンスルホン酸塩(DIPS))	—	0.1	0.1	—	0.5	—
BB2 3-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム)-デカン-2-硫黄塩	0.2	0.05	—	0.1	—	0.6
非イオン性洗剤	2	1.5	1.5	3	1.9	5.9
HEDP	1	—	—	—	—	—
DETPMP	0.6	—	—	—	—	—
ペンタアミン酢酸コバルト(III)塩PAAC	0.03	0.05	0.02	—	—	—
パラフィン油Winog 70	0.5	0.4	0.4	0.6	—	—
メタロプロテアーゼ1(任意選択的)	0.072	0.053	—	0.026	—	0.01
メタロプロテアーゼ2	—	—	0.053	—	0.059	—
プロテアーゼB(任意選択的)	—	—	—	—	—	0.01
アミラーゼ	0.012	—	0.012	—	0.021	0.006
リパーゼ	—	0.001	—	0.005	—	—
ペクチンリアーゼ	0.001	0.001	0.001	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
BTA(ベンゾトリアゾール)	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
ポリカルボン酸塩	6	—	—	—	4	0.9
香料	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
100%までの残部の水分及び／又は微量成分*						
* 香料／染料／SRP1／カルボキシメチルセルロースナトリウム／フォトブリーチ／MgSO ₄ ／PVPVI／抑泡剤／高分子量PEG／クレイ。 実施例(I)～(VI)のpHは約9.6～約11.3である。						

【 0 2 8 8 】

【表 13】

錠剤型洗剤組成物								
化合物	配合組成							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP(トリポリリン酸ナトリウム)	—	48.8	44.7	38.2	—	42.4	46.1	46
クエン酸三ナトリウム2H ₂ O	20	—	—	—	35.9	—	—	—
炭酸ナトリウム	20	5	14	15.4	8	23	20	—
ケイ酸塩	15	14.8	15	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
リパーゼ	0.001	—	0.01	—	0.02	—	—	—
プロテアーゼB	0.01	—	—	—	—	—	—	—
プロテアーゼC	—	—	—	—	—	0.01	—	—
メタロプロテアーゼ1 (任意選択式)	0.01	0.08	—	0.04	—	0.023	—	0.05
メタロプロテアーゼ2	—	—	0.05	—	0.052	—	0.023	—
アミラーゼ	0.012	0.012	0.012	—	0.015	—	0.017	0.002
ペクチンリナーゼ	0.005	—	—	0.002	—	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	—	0.03	—	0.02	0.02	—	0.03	—
PB1(過ホウ酸ナトリウム水和物)	—	—	3.8	—	7.8	—	—	4.5
過炭酸塩	6	—	—	6	—	5	—	—
BB1(3-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム)プロパンスルホン酸塩(DIPS))	0.2	—	0.5	—	0.3	0.2	—	—
BB2 3-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム)-デカン-2-硫酸塩	—	0.2	—	0.5	—	—	0.1	0.2
非イオン性界面活性剤	1.5	2	2	2.2	1	4.2	4	6.5
ペンタアミン酢酸コバルト(III)塩PAAC	0.01	0.01	0.02	—	—	—	—	—
DETBCHD	—	—	—	0.02	0.02	—	—	—
TAED	—	—	—	—	—	2.1	—	1.6
HEDP	1	—	—	0.9	—	0.4	0.2	—
DETPMP	0.7	—	—	—	—	—	—	—
パラフィン油Winog 70	0.4	0.5	0.5	0.5	—	—	0.5	—
BTA(ベンゾトリアゾール)	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	—
ポリカルボン酸塩	4	—	—	—	4.9	0.6	0.8	—
PEG 400~30,000	—	—	—	—	—	2	—	2
グリセロール	—	—	—	—	—	0.4	—	0.5
香料	—	—	—	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2
100%までの残部の水分及び又は微量成分*								
*増白剤／SRP1／カルボキシメチルセルロースナトリウム／フォトブリーチ／MgSO ₄ ／PVPVI／抑泡剤／高分子量PEG／クレイ。 実施例(I)～(VII)のpHは約10～約11.5であり、(VIII)のpHは8～10である。 実施例(I)～(VIII)の錠剤の重量は、約20グラム～約30グラムである。								

【0289】

10

20

30

40

【表 1 4】

硬質表面用液体洗剤組成物							
化合物	配合組成						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
$C_9 \sim C_{11}E_5$	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
$C_{12} \sim C_{14}E_5$	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
$C_7 \sim C_9E_6$	—	—	—	—	8	—	—
$C_{12} \sim C_{14}E_{21}$	1	0.8	4	2	2	1	2
LAS	—	—	—	0.8	0.8	—	0.8
クメンスルホン酸ナトリウム	1.5	2.6	—	1.5	1.5	1.5	1.5
Isachem(登録商標)AS(分枝鎖アルコールアルキル硫酸塩)	0.6	0.6	—	—	—	0.6	—
Na_2CO_3	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
クエン酸三ナトリウム $2H_2O$	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5
脂肪酸	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-ブチルオクタノール	0.3	0.3	—	0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000(登録商標)	0.4	—	0.3	0.35	0.5	—	—
PVP(ビニルピロリドンホモポリマー)	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	—	—
MME PEG(2000)(登録商標)	—	—	—	—	—	0.5	0.5
Jeffamine(登録商標)ED-2001 (保護されたポリエチレングリコール)	—	0.4	—	—	0.5	—	—
ペンタアミン酢酸コバルト(III)塩PAAC	—	—	—	0.03	0.03	0.03	—
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	—	—	—	—
メタロプロテアーゼ1(任意選択式)	0.07	—	0.08	0.03	—	0.01	0.04
メタロプロテアーゼ2	—	0.05	—	—	0.06	—	—
プロテアーゼB(任意選択的)	—	—	—	—	—	0.01	—
アミラーゼ	0.12	0.01	0.01	—	0.02	—	0.01
リパーゼ	—	0.001	—	0.005	—	0.005	—
ペクチンリアーゼ	0.001	—	0.001	—	—	—	0.002
$ZnCl_2$	0.02	0.01	0.03	0.05	0.1	0.05	0.02
ギ酸カルシウム	0.03	0.03	0.01	—	—	—	—
PB1(過ホウ酸ナトリウム-水和物)	—	4.6	—	3.8	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	—	0.03	—	0.02	0.02	0.05
100%までの残部の量の芳香剤/染料及び/又は水							
実施例(I)~(VII)のpHは約7.4~約9.5である。							

【0290】

【表 15】

HDL洗剤組成物				
成分	組成			
	(組成物に対する重量%)			
	1	2	3	4
C _{12~15} アルキルエトキシ(1.8)硫酸塩	14.7	11.6		16.31
C _{11.8} アルキルベンゼンスルホン酸塩	4.3	11.6	8.3	7.73
C _{16~17} 分枝鎖アルキル硫酸塩	1.7	1.29		3.09
C _{12~14} アルキル-9-エトキシレート	0.9	1.07		1.31
C ₁₂ ジメチルアミノオキシド	0.6	0.64		1.03
クエン酸	3.5	0.65	3	0.66
C _{12~18} 脂肪酸	1.5	2.32	3.6	1.52
ホウ酸ナトリウム(ホウ砂)	2.5	2.46	1.2	2.53
C _{12~14} アルキルエトキシ三硫酸ナトリウム (alkyl ethoxy 3 sulfate)			2.9	
C _{14~15} アルキル-7-エトキシレート			4.2	
C _{12~14} アルキル-7-エトキシレート			1.7	
ギ酸カルシウム	0.09	0.09		0.09
次の一般構造:ビス((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ - C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-ビス((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(式中、 nは20~30であり、xは3~8である。)を有する 化合物、又はこの硫酸化若しくはスルホン化変異体			1.2	
ランダムグラフトコポリマー ¹		1.46	0.5	
エトキシ化ポリエチレンイミン ²	1.5	1.29		1.44
ジエチレントリアミン五酢酸	0.34	0.64		0.34
ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸)			0.3	
Tinopal AMS-GX		0.06		
Tinopal CBS-X	0.2	0.17		0.29
両親媒性アルコキシル化グリース洗浄ポリマー ³	1.28	1	0.4	1.93
エタノール	2	1.58	1.6	5.4
プロピレングリコール	3.9	3.59	1.3	4.3
ジエチレングリコール	1.05	1.54		1.15
ポリエチレングリコール	0.06	0.04		0.1
モノエタノールアミン	3.05	2.41	0.4	1.26
NaOH	2.44	1.8		3.01
クメンスルホン酸ナトリウム			1	
ギ酸ナトリウム		0.11		0.09
水、審美剤(染料、香料)及び微量成分(酵素、溶媒、構造剤)	残部	残部	残部	残部
1 ランダムグラフトコポリマーは、ポリエチレンオキシド主鎖と複数のポリ酢酸ビニル側鎖とを有する、 ポリ酢酸ビニルグラフトポリエチレンオキシドコポリマーである。ポリエチレンオキシド主鎖の分子量は約 6000であり、ポリエチレンオキシドとポリ酢酸ビニルとの重量比は約40:60であり、エチレンオキシド 50単位当たりのグラフト点は1以下である。				
2 -NHにつき20個のエトキシレート基を有するポリエチレンイミン(MW=600)。				
3 両親媒性アルコキシル化グリース洗浄ポリマーは、-NHにつき24個のエトキシレート基、及び- NHにつき16個のプロポキシレート基を有するポリエチレンイミン(MW=600)である。				

【0291】

【表 16】

ライトデューティ食器洗浄用液体洗剤組成物				
組成	1	2	3	4
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩(1)	—	—	—	—
アルキルエトキシ硫酸塩(2)	18%	17%	17%	18%
パラフィンスルホネート(C15)	—	—	—	—
CAP=コアマミドプロピルベタイン	—	—	9%	5%
非イオン性(3)	—	—	1%	—
アミノキシド(4)	6%	5.50%	—	4%
アルキルポリグルコシド	—	—	—	4%
アルコール(5)	—	—	5%	7%
Pura=ポリエチレングリコール	1%	0.80%	—	—
クエン酸塩	—	—	0.30%	0.60%
塩(6)	1.20%	1.00%	—	0.50%
SCS=クメンスルホン酸ナトリウム	—	—	0.80%	—
グリセロール	15%	5%	3%	—
乳酸ナトリウム	—	—	—	5%
カチオン性ポリマー(7)	0.10%	0.10%	0.30%	0.20%
本発明のプロテアーゼ	0.0075	0.005	0.0025	0.03
Euperlan(登録商標)Cognis由来の グリコールジステアレート	0.4	0	0.4	0
硬化ヒマシ油Thixcin(登録商標)Elementis	0	0.1	0	0.1
雲母(BASF Mearlin superfine)	0	0.05	0	0.05
微量成分*	100%とする量の水			
pH	9	9	6	6
任意の微量成分*: 染料、乳白剤、香料、保存料、ヒドロトロブ、加工助剤、及び/又は安定化剤。				
(1)直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩: LAS: C11.4				
(2)アルキルエトキシスルフェートAExS:				
(3)非イオン性: アルキルエトキシレート				
(4)ココジメチルアルキルアミノキシド				
(5)アルコール: エタノール				
(6)塩: NaCl				
(7)カチオン変性ヒドロキシエチルセルロール(ポリクオタニウム-10-UCARE LR-400 ex Amerchol)。				

【0292】

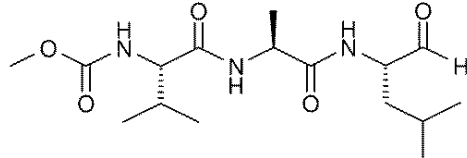
【表 17 - 1】

ドラム式 (front-loading) の自動洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物								
成分	組成							
	(組成物に対する重量%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
アルキルベンゼンスルホン酸	7	11	4.5	1.2	1.5	12.5	5.2	4
C ₁₂ ~ ₁₄ アルキルエトキシ三 硫酸ナトリウム	2.3	3.5	4.5	4.5	7	18	1.8	2
C ₁₄ ~ ₁₅ アルキル8- エトキシレート	5	8	2.5	2.6	4.5	4	3.7	2
C ₁₂ アルキルジメチル アミノオキシド	—	—	0.2	—	—	—	—	—
C ₁₂ ~ ₁₄ アルキルヒドロキシエチル ジメチルアンモニウムクロリド	—	—	—	0.5	—	—	—	—
C ₁₂ ~ ₁₈ 脂肪酸	2.6	4	4	2.6	2.8	11	2.6	1.5
クエン酸	2.6	3	1.5	2	2.5	3.5	2.6	2
プロテアーゼ*	0.05	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.02
アミラーゼ	0.1	0.2	0.15	—	0.05	0.5	0.1	0.2
マンナナーゼ	0.05	0.1	0.05	—	—	0.1	0.04	—
ランダムグラフトコポリマー ¹	1	0.2	1	0.4	0.5	2.7	0.3	1
次の一般構造:ビス((C ₂ H ₅ O) (C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)—N ⁺ — C _x H _{2x} —N ⁺ —(CH ₃)—ビス ((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(式中、 nは20~30であり、xは 3~8である)を有する 化合物、又はこの硫酸化若しくは スルホン化変異体。	0.4	2	0.4	0.6	1.5	1.8	0.7	0.3
エトキシル化ポリエチレンイミン ²	—	—	—	—	—	0.5	—	—
両親媒性アルコキシル化グリース 洗浄ポリマー ³	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3
ジエトキシル化ポリ(1,2- プロピレンテレフタレート)	—	—	—	—	—	—	0.3	—
ジエチレントリアミンペンタ (メチレンホスホン)酸	0.2	0.3	—	—	0.2	—	0.2	0.3
ヒドロキシエタンジホスホン酸	—	—	0.45	—	—	1.5	—	0.1
FWA(蛍光増白剤)	0.1	0.2	0.1	—	—	0.2	0.05	0.1

【0293】

【表 17 - 2】

(上記表の続き)

ドラム式 (front-loading) の自動洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物								
成分	組成							
	(組成物に対する重量%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
溶媒 (1, 2-プロパンジオール、エタノール)	3	4	1. 5	1. 5	2	4. 3	2	1. 5
硬化ヒマシ油誘導体	0. 4	0. 4	0. 3	0. 1	0. 3	—	0. 4	0. 5
ホウ酸	1. 5	2. 5		1. 5	1. 5	0. 5	1. 5	1. 5
ギ酸ナトリウム	—	—	—	1	—	—	—	—
可逆的プロテアーゼ阻害剤 ⁴	—	—	0. 002	—	—	—	—	—
香料	0. 5	0. 7	0. 5	0. 5	0. 8	1. 5	0. 5	0. 8
香料マイクロカプセルスラリー (30%am)	0. 2	0. 3	0. 7	0. 2	0. 05	0. 4	0. 9	0. 7
エトキシ化チオフェン色調染料 ⁵	0. 005	0. 007	0. 01	0. 008	0. 008	0. 007	0. 007	0. 008
緩衝剤 (水酸化ナトリウム、モノエタノールアミン)	pH 8. 2まで							
水及び微量成分 (消泡剤、審美剤)	100%までの残部							
¹ ランダムグラフトコポリマーは、ポリエチレンオキシド主鎖と複数のポリ酢酸ビニル側鎖とを有する、ポリ酢酸ビニルグラフトポリエチレンオキシドコポリマーである。ポリエチレンオキシド主鎖の分子量は約6000であり、ポリエチレンオキシドとポリ酢酸ビニルとの重量比は約40:60であり、エチレンオキシド50単位当たりのグラフト点は1以下である。								
² —NHにつき20個のエトキシレート基を有するポリエチレンジミン (MW=600)。								
³ 両親媒性アルコシル化グリース洗浄ポリマーは、—NHにつき24個のエトキシレート基、及び—NHにつき16個のプロポキシレート基を有する、ポリエチレンジミン (MW=600) である。								
⁵ エトキシ化チオフェン色調染料については米国特許第7, 208, 459 (B2) 号に記述されている。								
* 備考: 製品に添加した活性タンパク質の割合 (%) として表されるプロテアーゼを除き、すべての酵素レベルは酵素原材料の割合 (%) として表される。								
⁴ 次の構造を有する可逆的プロテアーゼ阻害剤:								
								

【0294】

10

20

30

【表 18 - 1】

タテ型 (top-loading) 自動洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物								
成分	組成							
	(組成物に対する重量%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C _{12~15} アルキルエトキシ (1.8)硫酸塩	20.1	15.1	20	15.1	13.7	16.7	10	9.9
C _{11.8} アルキルベン ゼンスルホン酸塩	2.7	2	1	2	5.5	5.6	3	3.9
C _{16~17} 分枝鎖 アルキル硫酸塩	6.5	4.9		4.9	3	9	2	
C _{12~14} アルキル9- エトキシレート	0.8	0.8	0.8	0.8	8	1.5	0.3	11.5
C ₁₂ ジメチルアミン オキシド			0.9					
クエン酸	3.8	3.8	3.8	3.8	3.5	3.5	2	2.1
C _{12~18} 脂肪酸	2	1.5	2	1.5	4.5	2.3		0.9
プロテアーゼ*	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
アミラーゼ1	0.7	0.3	0.6	0.3	0.6	0.4		
アミラーゼ2								1.1
マンナーゼ	0.1					0.1		
ペクチン酸リアーゼ	0.1					0.2		
ホウ砂	3	3			2	3	3	3.3
ギ酸ナトリウム及び カルシウム	0.2	0.2		0.2	0.2		0.7	
次の一般構造:ビス (C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n (CH ₃)-N ⁺ - C _x H _{2x} -N ⁺ - (CH ₃)-ビス((C ² H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n) (式中、nは20~ 30であり、xは3~ 8である)を有する 化合物、又はこの 硫酸化若しくは スルホン化変異体	1.6	1.6	3	1.6	2	1.6	1.3	1.2
ランダムグラフト コポリマー ¹	0.4	0.2	1	0.5	0.6	1	0.8	1
ジエチレ ントリアミン五酢酸	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.3	0.8	

【0295】

10

20

30

【表 18 - 2】

(上記表の続き)

タテ型(top-loading)自動洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物								
成分	組成							
	(組成物に対する重量%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tinopal AMS-GX (増白剤)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	
Tinopal CBS-X (増白剤)						0.1		0.2
両親媒性 アルコキシル化 グリース洗浄 ポリマー ³	1	1.3	1.3	1.4	1	1.1	1	1
Texcare 240N (Clariant)				1				
エタノール	2.6	2.6	2.6	2.6	1.8	3	1.3	
プロピレングリコール	4.6	4.6	4.6	4.6	3	4	2.5	
ジエチレングリコール	3	3	3	3	3	2.7	3.6	
ポリエチレン グリコール	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	1.4
モノエタノールアミン	2.7	2.7	2.7	2.7	4.7	3.3	1.7	0.4
トリエタノールアミン								0.9
NaOH	(pH 8.3まで)	(pH 8.3まで)	(pH 8.3まで)	(pH 8.3まで)	(pH 8.3まで)	(pH 8.3まで)	(pH 8.3まで)	(pH 8.5まで)
抑泡剤								
色素	0.01	0.01	0.01		0.01	0.01	0.01	0
香料	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.8	0.6
香料マイクロカプセル (30%am)	0.2	0.5	0.2	0.3	0.1	0.3	0.9	1
エトキシル化 チオフェン色調染料 ⁵	0.003	0.002	0.002	0.005	0.002	0.004	0.004	0.003
水	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部
¹ ランダムグラフトコポリマーは、ポリエチレンオキシド主鎖と複数のポリ酢酸ビニル側鎖とを有する、ポリ酢酸ビニルグラフトポリエチレンオキシドコポリマーである。ポリエチレンオキシド主鎖の分子量は約6000であり、ポリエチレンオキシドとポリ酢酸ビニルとの重量比は約40:60であり、エチレンオキシド50単位当たりのグラフト点は1以下である。								
³ 両親媒性グリース洗浄ポリマーは、-NHにつき24個のエトキシレート基、及び-NHにつき16個のプロポキシレート基を有するポリエチレンイミン(MW=600)である。								
⁵ エトキシル化チオフェン色調染料については米国特許第7,208,459(B2)号に記述されている。								
* 備考: 製品に添加した活性タンパク質の割合(%)として表されるプロテアーゼを除き、すべての酵素レベルは酵素原材料の割合(%)として表される。								

【0296】

【表 19】

粒状洗剤組成物						
成分	1	2	3	4	5	6
脂肪族炭素鎖長がC ₁₁ ～C ₁₂ の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩	15	12	20	10	12	13
他の界面活性剤	1.6	1.2	1.9	3.2	0.5	1.2
リン酸塩ビルダー	2	3	4			
ゼオライト		1		1	4	1
ケイ酸塩	4	5	2	3	3	5
炭酸ナトリウム	2	5	5	4	0	3
ポリアクリル酸(MW 4500)	1	0.6	1	1	1.5	1
カルボキシメチルセルロース(Finnfix BDA(CPKelco))	1	—	0.3	—	1.1	—
セルラーゼ	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
プロテアーゼ	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
アミラーゼ	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
蛍光増白剤(1種又は複数種)	0.16	0.06	0.16	0.18	0.16	0.16
ジエチレントリアミン五酢酸又はエチレンジアミン四酢酸	0.6		0.6	0.25	0.6	0.6
MgSO ₄	1	1	1	0.5	1	1
漂白剤及び漂白活性化剤	6.88		6.12	2.09	1.17	4.66
エトキシ化チオフェン色調染料 ⁵	0.002	0.001	0.003	0.003	—	—
Ciba Specialty Chemicals製のダイレクトバイオレット9				0.0006	0.0004	0.0006
硫酸塩／クエン酸／重炭酸ナトリウム／水分／香料	100%までの残部					

⁵エトキシ化チオフェン色調染料については米国特許第7,208,459(B2)号に記載されている。

【0297】

【表 20】

粒状洗濯洗剤組成物及びその成分						
成分	洗剤組成物					
	1	2	3	4	5	6
脂肪族炭素鎖長がC ₁₁ ～C ₁₂ の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩	15	12	20	10	12	13
他の界面活性剤	1.6	1.2	1.9	3.2	0.5	1.2
リン酸塩ビルダー	2	3	4			
ゼオライト		1		1	4	1
ケイ酸塩	4	5	2	3	3	5
炭酸ナトリウム	2	5	5	4	0	3
ポリアクリル酸(MW 4500)	1	0.6	1	1	1.5	1
カルボキシメチルセルロース	1	—	0.3	—	1.1	—
セルロース(15.6mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
プロテアーゼ	0.23	0.17	0.05	0.2	0.03	0.1
アミラーゼ(14mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
マンナーゼ(4mg/g)	0.1			0.1		0.1
リパーゼ(18.6mg/g)	0.2		0.1		0.3	
蛍光増白剤(1種又は複数種)	0.16	0.06	0.16	0.18	0.16	0.16
ジエチレントリアミン五酢酸又はエチレンジアミン四酢酸	0.6		0.6	0.25	0.6	0.6
MgSO ₄	1	1	1	0.5	1	1
漂白剤及び漂白活性化剤	6.88		6.12	2.09	1.17	4.66
エトキシル化チオフェン色調染料 ⁵	0.002	0.001	0.003	0.003	—	—
Ciba Specialty Chemicals製のダイレクトバイオレット9				0.0006	0.0004	0.0006
硫酸塩／クエン酸／重炭酸ナトリウム／水分／香料	100%までの残部					

⁵ エトキシル化チオフェン色調染料については米国特許第7,208,459(B2)号に記述されている。

【0298】

【表 2 1】

粒状洗濯洗剤組成物及びその成分					
成分	洗剤組成物				
	7	8	9	10	11
界面活性剤					
C ₁₆ ~17分枝鎖アルキルサルフェート	3.55	15.8			
C ₁₂ ~14アルキル硫酸塩			1.5		
脂肪族鎖長がC ₁₁ ~C ₁₂ の直鎖アルキルベンゼン スルホン酸ナトリウム	9.6		10.6	7.5	9
C ₁₄ /15アルコールエトキシ-3-硫酸ナトリウム	1.15			2.88	
C ₁₄ /15アルキル硫酸ナトリウム	2.37				
平均7モルがエトキシ化されたC ₁₄ /15 アルコールエトキシレート				1.17	1
モノ-C ₈ ~10アルキルモノ-ヒドロキシエチルジ- メチル第四級アンモニウムクロリド					0.45
ジメチルヒドロキシエチルラウリル アンモニウムクロリド			0.18		
ゼオライトA	13.9	4.7	0.01	2.9	1.8
ケイ酸ナトリウム(1.6比)	4	0.2		4	4
ケイ酸ナトリウム(2.35比)			8		
クエン酸				2.5	1.4
トリポリリン酸ナトリウム			5		
炭酸ナトリウム	24.1	30	16.9	24.4	21
ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸塩	5.78	2.81	0.96		
オキサジリジニウム(Oxaziridinium)系漂白増進剤				0.03	0.017
S, S, -エチレンジアミンニコハク酸四ナトリウム				0.2	
ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸) セナトリウム塩	0.61				0.33
ヒドロキシエタンジメチレンホスホン酸				0.29	0.45
エチレンジアミン四酢酸			0.27		
MgSO ₄			0.47	0.5994	0.782
過炭酸ナトリウム	7	4.4		15.9	19.1
テトラアセチルエチレンジアミン				3.3	4.6
過ホウ酸ナトリウム-水和物			1.2		
カルボキシメチルセルロース					
(例えば、Finnfix BDA(CPKelco))	0.1		0.17	1.69	0.23
アクリル酸/マイレン酸(70/30) コポリマーナトリウム塩	0.0236	3.8		2	2.5
ポリアクリル酸ナトリウム(Sokalan PA30 CL)	4		0.84		
テレフタル酸ポリマー				0.23	
ポリエチレングリコール/酢酸ビニルランダム グラフトコポリマー			0.89	0.89	0.91
フォトブリーチーフタロシアンテトラスルホン酸亜鉛			0.005	0.001	0.002
C. I. 蛍光増白剤260	0.11	0.15	0.04	0.23	0.15
C. I. 蛍光増白剤351(Tinopal(登録商標) CBS)			0.1		
抑泡剤顆粒		0.25		0.07	0.04
疎水変性カルボキシメチルセルロース (Finnifix(登録商標)SH-1)			0.019	0.028	
ベントナイト			8.35		
その他の成分(染料、香料、加工助剤、水分及び硫 酸ナトリウム)	残部	残部	残部	残部	残部

【0299】

【表 2 2】

一回用量の洗剤組成物					
成分	1	2	3	4	5
アルキルベンゼンスルホン酸C11～13(23.5%が2-フェニル異性体である)	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5
C ₁₂ ～ ₁₄ アルキルエトキシ三硫酸塩	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
C ₁₂ ～ ₁₄ アルキル7-エトキシレート	13	13	13	13	13
クエン酸	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
脂肪酸	14.8	14.8	14.8	14.8	14.8
酵素類(不活性原材料濃度(%)として)	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
本発明のプロテアーゼ(活性成分(%)として)	0.05	0.1	0.02	0.03	0.03
エトキシ化ポリエチレンイミン ¹	4	4	4	4	4
シリーズ1プロテアーゼGG36(活性成分(%))	0.02	0	0.01	0.02	0.03
ヒドロキシエタンジホスホン酸	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
増白剤	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
P-ジオール	15.8	13.8	13.8	13.8	13.8
グリセロール	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1
MEA(モノエタノールアミド)増白剤安定化剤	8	8	8	8	8
TIPA(トリイソプロパノールアミン)	—	—	2	—	—
TEA(トリエタノールアミン)	—	2	—	—	—
クメンスルホン酸塩	—	—	—	—	2
シクロヘキシルジメタノール	—	—	—	2	—
水	10	10	10	10	10
構造剤	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
香料	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
緩衝剤(モノエタノールアミン)	(pH 8.0まで)				
溶媒(1,2-プロパンジオール、エタノール)	100%までの残部				
¹ —NHにつき20個のエトキシレート基を有するポリエチレンイミン(MW=600)。					

多区画を含む一回用量の洗剤組成物	
ベース組成物1	%
成分	
グリセロール(純度最少99%)	5.3
1,2-プロパンジオール	10
クエン酸	0.5
モノエタノールアミン	10
苛性ソーダ	—
Dequest 2010	1.1
亜硫酸カリウム	0.2
非イオン性Marlipal C24EO7	20.1
HLAS(界面活性剤)	24.6
蛍光増白剤FWA49	0.2
C12～15脂肪酸	16.4
ポリマーLutensit Z96	2.9
ポリエチレンイミンエトキシレートPEI600 E20	1.1
MgCl2	0.2
溶媒(1,2-プロパンジオール、エタノール)	100%までの残部

【 0 3 0 0 】

【表 2 3】

多区画製剤							
組成	1				2		
区画	A	B	C		A	B	C
各区画の容量	40mL	5mL	5mL		40mL	5mL	5mL
活性材料(重量%)							
香料	1.6	1.6	1.6		1.6	1.6	1.6
染料	<0.01	<0.01	<0.01		<0.01	<0.01	<0.01
TiO ₂	0.1	—	—		—	0.1	—
亜硫酸ナトリウム	0.4	0.4	0.4		0.3	0.3	0.3
Acusol 305, Rohm&Haas	1.2				2	—	—
硬化ヒマシ油	0.14	0.14	0.14		0.14	0.14	0.14
ベース組成物1	100%まで 加える	100%まで 加える	100%まで 加える		100%まで 加える	100%まで 加える	100%まで 加える

10

【0301】

【表 2 4】

リン酸塩を含まない洗剤、IEC-60436 WFKタイプB(3g/LでのpH=10.4)	
成分	重量%
クエン酸ナトリウム無水物	30
マレイン酸/アクリル酸コポリマーナトリウム塩 (SOKALAN(登録商標)CP5(BASF))	12
過ホウ酸ナトリウム一水和物	5
TAED	2
ニケイ酸ナトリウム:Protil A(Cognis)	25
直鎖脂肪族アルコールエトキシレート	2
無水炭酸ナトリウム	100%まで加えた

20

【0302】

【表 2 5】

リン酸塩含有洗剤:IEC-60436 WFKタイプC(3g/LでのpH=10.5)	
成分	重量%
トリポリリン酸ナトリウム	23
クエン酸ナトリウム無水物	22.3
マレイン酸/アクリル酸共重合体ナトリウム塩	4
過ホウ酸ナトリウム一水和物	6
TAED	2
ニケイ酸ナトリウム:Protil A(Cognis)	5
直鎖脂肪族アルコールエトキシレート	2
無水炭酸ナトリウム	100%まで加えた

30

【0303】

40

【表 2 6】

タテ型 (top-loading) 自動洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物 (1 及び 2) 並びにドラム式 (front loading) 洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物 (3)。			
成分	組成		
	(組成物に対する重量%)		
	1	2	3
C _{12~15} アルキルエトキシ(1.8)硫酸塩	14.7	11.6	
C _{11.8} アルキルベンゼンスルホン酸塩	4.3	11.6	8.3
C _{16~17} 分枝鎖アルキル硫酸塩	1.7	1.29	
C _{12~14} アルキル9-エトキシレート	0.9	1.07	
C ₁₂ ジメチルアミノオキシド	0.6	0.64	
クエン酸	3.5	0.65	3
C _{12~18} 脂肪酸	1.5	2.32	3.6
ホウ酸ナトリウム(ホウ砂)	2.5	2.46	1.2
C _{12~14} アルキルエトキシ三硫酸ナトリウム			2.9
C _{14~15} アルキル7-エトキシレート			4.2
C _{12~14} アルキル7-エトキシレート			1.7
ギ酸カルシウム	0.09	0.09	
次の一般構造:ビス((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-ビス((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(式中、nは20~30であり、xは3~8である)を有する化合物、又はこの硫酸化若しくはスルホン化変異体			1.2
ランダムグラフトコポリマー ¹		1.46	0.5
エトキシ化ポリエチレンイミン ²	1.5	1.29	
ジエチレントリアミン五酢酸	0.34	0.64	
ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸)			0.3
Tinopal AMS-GX		0.06	
Tinopal CBS-X	0.2	0.17	
両親媒性アルコキシ化グリース洗浄ポリマー ³	1.28	1	0.4
エタノール	2	1.58	1.6
プロピレングリコール	3.9	3.59	1.3
ジエチレングリコール	1.05	1.54	
ポリエチレングリコール	0.06	0.04	
モノエタノールアミン	3.05	2.41	0.4
NaOH	2.44	1.8	
クメンスルホン酸ナトリウム			1
ギ酸ナトリウム		0.11	
水、審美剤(染料、香料)及び微量成分(酵素、溶媒、構造化剤)	残部	残部	残部
¹ ランダムグラフトコポリマーは、ポリエチレンオキシド主鎖と複数のポリ酢酸ビニル側鎖とを有する、ポリ酢酸ビニルグラフトポリエチレンオキシドコポリマーである。ポリエチレンオキシド主鎖の分子量は約6000であり、ポリエチレンオキシドとポリ酢酸ビニルとの重量比は約40:60であり、エチレンオキシド50単位当たりのグラフト点は1以下である。			
² -NHにつき20個のエトキシレート基を有するポリエチレンイミン(MW=600)。			
³ 両親媒性アルコキシ化グリース洗浄ポリマーは、-NHにつき24個のエトキシレート基、及び-NHにつき16個のプロポキシレート基を有するポリエチレンイミン(MW=600)である。			

【 0 3 0 4 】

【表 27】

タテ型 (top-loading) 自動洗濯機に好適な粒状洗濯洗剤組成物 (1~3) 及びドラム式 (front loading) 洗濯機に好適な粒状洗濯洗剤組成物 (4~5)。これら配合物に本発明のプロテアーゼを個別に添加する。					
成分	1	2	3	4	5
C _{16~17} 分枝鎖アルキル硫酸塩	3.55				
C _{12~14} アルキル硫酸塩			1.5		
脂肪鎖長がC ₁₁ ~C ₁₂ の直鎖アルキルベンゼン スルホン酸ナトリウム	9.6	15.8	10.6	7.5	9
C _{14/15} アルコールエトキシ三硫酸ナトリウム	1.15			2.88	
C _{14/15} アルキル硫酸ナトリウム	2.37				
平均7モルがエトキシ化されたC _{14/15} アルコールエトキシレート				1.17	1
モノ-C _{8~10} アルキルモノヒドロキシエチル ジメチル第四級アンモニウムクロリド					0.45
ジメチルヒドロキシエチルラウリルアンモニウムクロリド			0.18		
ゼオライトA	13.9	4.7	0.01	2.9	1.8
ケイ酸ナトリウム (1.6比)	4	0.2		4	4
ケイ酸ナトリウム (2.35比)			8		
クエン酸				2.5	1.4
トリポリリン酸ナトリウム			5		
炭酸ナトリウム	24.1	30	16.9	24.4	21
ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸塩	5.78	2.81	0.96		
オキサジリジン (Oxaziridinium) 系漂白増進剤				0.03	0.017
S, S, -エチレンジアミンニコハク酸四ナトリウム				0.2	
ジエチレントリアミンペンタ (メチレンホスホン酸) 七ナトリウム塩	0.61				0.33
ヒドロキシエタンジメチレンホスホン酸				0.29	0.45
エチレンジアミン四酢酸			0.27		
MgSO ₄			0.47	0.5994	0.782
過炭酸ナトリウム	7	4.4		15.9	19.1
テトラアセチルエチレンジアミン				3.3	4.6
過ホウ酸ナトリウム一水和物			1.2		
カルボキシメチルセルロース (例えば、Finnfix BDA (CPKelco))	0.1		0.17	1.69	0.23
アクリル酸/マイレン酸 (70/30) コポリマーナトリウム塩	0.0236	3.8		2	2.5
ポリアクリル酸ナトリウム (Sokalan PA30 CL)	4		0.84		
テレフタル酸ポリマー				0.23	
ポリエチレングリコール/酢酸ビニルランダムグラフト コポリマー			0.89	0.89	0.91
フォトブリーチーフタロシアンテトラスルホン酸亜鉛			0.005	0.001	0.002
C. I. 蛍光増白剤260	0.11	0.15	0.04	0.23	0.15
C. I. 蛍光増白剤351 (Tinopal (登録商標) CBS)			0.1		
抑泡剤顆粒		0.25		0.07	0.04
疎水変性カルボキシメチルセルロース (Finnifix (登録商標) SH-1)			0.019	0.028	
ベントナイト			8.35		
その他の成分 (染料、香料、加工助剤、水分及び 硫酸ナトリウム)	残部	残部	残部	残部	残部

【0305】

【表 28 - 1】

粒状洗濯洗剤組成物及びその成分。これら配合物に本発明のプロテアーゼを個別に添加する。														
界面活性剤成分	洗剤組成物													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
C ₁₀ 非イオン性(界面活性剤)				0.1843		0.1142	0.2894	0.1885	0.1846	0.1885	0.1979	0.1979	0.1979	0.1979
C _{16~17} 分枝鎖アルキルサルフェート	3.53	3.53	3.53											
C _{12~14} アルキル硫酸塩														
脂肪酸鎖長がC ₁₁ ~C ₁₂ の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	8.98	8.98	8.98	13.58	14.75	12.94	15.69	9.01	8.42	9.51	8.92	8.92	11.5	11.5
C _{14/15} アルコールエトキシシメチル硫酸ナトリウム	1.28	1.28	1.28								1.62	1.62	1.125	1.125
C _{12/15} アルキル硫酸ナトリウム	2.36	2.36	2.36											
平均7モルがエトキシ化されたC _{12/14} アルコールエトキシレート						2.9								
平均3モルがエトキシ化されたC _{12/14} アルコールエトキシレート									2.44					
平均7モルがエトキシ化されたC _{14/15} アルコールエトキシレート								0.97	1.17	0.97	1	1	1.5	1.5
モノ-C _{8~10} アルキルモノヒドロキシエチルジメチル第四級アンモニウムクロリド								0.45						
ジメチルヒドロキシエチルラウリルアンモニウムクロリド				0.1803			0.195			0.45				
ゼオライトA	15.31	15.31	15.31		4.47	2.01	0.39	1.83	2.58	0.59	1.63	1.63	2	2
ベントナイト				8.35										
ケイ酸ナトリウム(1.6比)					0.16			4.53	5.62	4.53	4.75	4.75	4.75	4.75
ケイ酸ナトリウム(2.0比)	3.72	3.72	3.72	8.41			10.1						0.06	0.06
ケイ酸ナトリウム(2.35比)						7.05								
クエン酸				0.0066				1.4	1.84	1	1.1	1.1	1.1	1.1
トリポリリン酸ナトリウム				5.06			5.73							
炭酸ナトリウム	26.1	26.18	26.1	15.9	29	12.65	15.93	21	27.31	20.2	23.3	23.3	23.3	23.3
ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸塩	5.78	5.78	5.78	1.17	1.86		1.73							
オキサジリジニウム(Oxaziridinium)系漂白増進剤	0.037	0.037	0.037					0.0168	0.0333	0.024	0.021	0.021	0.015	0.015
S、S-エチレンジアミンニコハク酸四ナトリウム											0.26	0.26	0.26	0.26

【0306】

【表 28 - 2】

(上記表の続き)

粒状洗濯洗剤組成物及びその成分。これら配合物に本発明のプロテアーゼを個別に添加する。														
界面活性剤成分	洗剤組成物													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
ジエチレントリアミンペンタ （メチレンホスホン酸） セナトリウム塩	0.62	0.62	0.62					0.327		0.3272				
ヒドロキシエタンジメチレン ホスホン酸								0.45	0.2911	0.45	0.47	0.47	0.47	0.47
エチレンジアミン四酢酸				0.2701			0.28		0.1957					
MgSO ₄	0.056	0.056	0.056	0.47			0.54	0.79	0.6494	0.793	0.83	0.83	0.82	0.82
過炭酸ナトリウム		7.06	7.06		3.64			19.1	15.85	22.5	19.35	19.35	19.35	19.35
テトラアセチルエチレンジアミン								4.554	3.71	5.24	4.51	4.51	4.51	4.51
過ホウ酸ナトリウム一水和物				1.47			5.55							
カルボキシメチルセルローズ （例えば、Finnfix BDA （CPKelco））	0.38	0.38	0.38	0.173		0.62	0.21	0.23	1.07	0.2622	1.01	1.01	1.01	1.01
アクリル酸／マレイン酸（70／30） コポリマーナトリウム塩	3.79	3.78	3.79		3.64	0.4	2.61	2.5	2	1.75	1.84	1.84	1.84	1.84
ポリアクリル酸ナトリウム （Sokalan PA30 CL）	3.78	3.78	3.78	0.842				0.0055	0.011	0.008	0.007	0.007	0.005	0.005
テレフタル酸ポリマー									0.231		0.179	0.179	0.179	0.179
ポリエチレングリコール／酢酸 ビニルランダムグラフトコポリマー				0.89		0.55	1.4	0.911	0.8924	0.911	0.96	0.96	0.96	0.96
フォトブリーチーフタロシアン テトラスルホン酸亜鉛														
C. I. 蛍光増白剤260	0.1125	0.1125	0.1125	0.043	0.15	0.1174	0.048	0.1455	0.2252	0.1455	0.153	0.153	0.171	0.171
C. I. 蛍光増白剤351 （Tinopal（登録商標）CBS）				0.0952			0.1049							
抑泡剤顆粒	0.015	0.015	0.015		0.031			0.04	0.0658	0.04	0.042	0.042	0.042	0.042
疎水性カルボキシメチル セルローズ（Finnifix（登録商標） SH-1）														
ベントナイト														
その他の成分（染料、香料、 加工助剤、水分及び 硫酸ナトリウム）	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部	残部

【0307】

10

20

30

40

【表 29】

食器洗浄用ゲル組成物					
成分	1	2	3	4	5
	(重量%)	(重量%)	(重量%)	(重量%)	(重量%)
Polytergent(登録商標) SLF-18	1	1.3	0.8	1	0.9
安息香酸ナトリウム (活性成分33%)	0.61	0.61	0.61	0.6	0.6
キサンタンガム	1	0.8	1.2	1	1.1
硫酸ナトリウム	10	10	10	8	10
香料	0.03	0.05	0.03	0.06	0.1
ケイ酸ナトリウム					2
クエン酸(活性成分50%)	12.5		12		
GLDA		7		8	
プロテアーゼ1(活性成分 44mg/g)	0.7		0.3		
4-ホルミルフェニル ボロン酸			0.05		
封入プロテアーゼ2 (10mg/g)		2		0.6	
プロテアーゼ3(活性成分 48mg/g)					0.5
プロテアーゼ4(活性成分 123mg/g)					
エタノール				0.3	
水酸カリウム(活性成分 45%)	14.6	14.6	14.6	14	
塩化カルシウム(活性成分 25%)	1.8	1.8	1.8	1.1	0.4
染料	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02
Proxcel GXL(商標) (活性成分19%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Acusol(商標)8209	0.34	0.34	0.3	0.35	0.3
Acusol(商標)425N (活性成分50%)	3	3	3.5	2.5	2
アミラーゼ(活性成分 25mg/g)	0.2	0.5	0.4	0.3	0.1
水及び他の 補助成分	100%までの 残部	100%までの 残部	100%までの 残部	100%までの 残部	100%までの 残部

10

20

30

【0308】

【表 3 0】

粉末状自動食器洗浄用組成物	
組成物 1	
成分	重量%
非イオン性界面活性剤	0.4～2.5%
メタケイ酸ナトリウム	0～20%
ニケイ酸ナトリウム	0～20%
トリリン酸ナトリウム	0～40%
炭酸ナトリウム	0～20%
過ホウ酸ナトリウム	2～9%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	1～4%
硫酸ナトリウム	5～33%
酵素	0.0001～0.1%
組成物 2	
成分	重量%
非イオン性界面活性剤 (例えば、アルコールエトキシレート)	1～2%
ニケイ酸ナトリウム	2～30%
炭酸ナトリウム	10～50%
ホスホン酸ナトリウム	0～5%
クエン酸三ナトリウム無水物	9～30%
ニトリロ三酢酸三ナトリウム (NTA)	0～20%
過ホウ酸ナトリウム一水和物	5～10%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	1～2%
ポリアクリル酸ポリマー (例えば、マレイン酸／アクリル酸コポリマー)	6～25%
酵素	0.0001～0.1%
香料	0.1～0.5%
水	5～10
組成物 3	
成分	重量%
非イオン性界面活性剤	0.5～2.0%
ニケイ酸ナトリウム	25～40%
クエン酸ナトリウム	30～55%
炭酸ナトリウム	0～29%
重炭酸ナトリウム	0～20%
過ホウ酸ナトリウム一水和物	0～15%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	0～6%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	0～5%
クレイ	1～3%
ポリアミノ酸	0～20%
ポリアクリル酸ナトリウム	0～8%
酵素	0.0001～0.1%

10

20

30

40

【表 3 1】

粉末状自動食器洗浄用組成物	
組成物 4	
成分	重量%
非イオン性界面活性剤	1～2%
ゼオライトMAP	0～42%
二ケイ酸ナトリウム	0～34%
クエン酸ナトリウム	0～12%
炭酸ナトリウム	0～20%
過ホウ酸ナトリウム一水和物	7～15%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	0～3%
ポリマー	0～4%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	0～5%
有機ホスホン酸塩	0～4%
クレイ	1～2%
酵素	0.0001～0.1%
硫酸ナトリウム	残部
組成物 5	
成分	重量%
非イオン性界面活性剤	1～7%
二ケイ酸ナトリウム	18～30%
クエン酸三ナトリウム	10～24%
炭酸ナトリウム	12～20%
一過硫酸塩 (2 KHSO ₅ ・KHSO ₄ ・K ₂ SO ₄)	15～21%
漂白安定化剤	0.1～2%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	0～6%
ジエチレントリアミン五酢酸五ナトリウム塩	0～2.5%
酵素	0.0001～0.1%
硫酸ナトリウム、水	残部

10

20

30

【0310】

【表 3 2】

界面活性剤洗浄系を含む粉末状及び液体食器洗浄用組成物	
成分	重量%
非イオン性界面活性剤	0～1.5%
オクタデシルジメチルアミンN-オキシド二水和物	0～5%
オクタデシルジメチルアミンN-オキシド二水和物とヘキサデシルジメチルアミンN-オキシド無水物とのC18/C16（重量比80：20）混合物	0～4%
オクタデシルビス（ヒドロキシエチル）アミンN-オキシド無水物とヘキサデシルビス（ヒドロキシエチル）アミンN-オキシド無水物とのC18/C16（重量比70：30）混合物	0～5%
平均エトキシ化度3のC13-C15アルキルエトキシスルフェート	0～10%
平均エトキシ化度3のC12-C15アルキルエトキシスルフェート	0～5%
平均エトキシ化度12のC13-C15エトキシ化アルコール	0～5%
平均エトキシ化度9のC12-C15エトキシ化アルコール混合物	0～6.5%
平均エトキシ化度30のC13-C15エトキシ化アルコール混合物	0～4%
二ケイ酸ナトリウム	0～33%
トリポリリン酸ナトリウム	0～46%
クエン酸ナトリウム	0～28%
クエン酸	0～29%
炭酸ナトリウム	0～20%
過ホウ酸ナトリウム一水和物	0～11.5%
テトラアセチルエチレンジアミン（TAED）	0～4%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	0～7.5%
硫酸ナトリウム	0～12.5%
酵素	0.0001～0.1%

10

20

【0311】

30

【表 3 3】

非水溶性自動食器洗浄用液体組成物	
成分	重量%
液体非イオン性界面活性剤（例えば、アルコールエトキシレート）	2.0～10.0%
ケイ酸アルカリ金属塩	3.0～15.0%
ホスホン酸アルカリ金属塩	0～40.0%
高級グリコール、ポリグリコール、ポリオキシド、グリコールエーテルから選択される液体キャリア	25.0～45.0%
安定化剤（例えば、リン酸とC16～C18アルカノールの部分エステル）	0.5～7.0%
抑泡剤（例えば、シリコーン）	0～1.5%
酵素	0.0001～0.1%

40

【0312】

【表 3 4】

非水溶性食器洗浄用液体組成物	
成分	重量%
液体非イオン性界面活性剤（例えば、アルコールエトキシレート）	2. 0～10. 0%
ケイ酸ナトリウム	3. 0～15. 0%
炭酸アルカリ金属塩	7. 0～20. 0%
クエン酸ナトリウム	0. 0～1. 5%
安定化剤系（例えば、微分散シリコーンと低分子量ジアルキルポリグリコールエーテルとの混合物）	0. 5～7. 0%
低分子量ポリアクリル酸ポリマー	5. 0～15. 0%
クレイゲル増粘剤（例えば、ベントナイト）	0. 0～10. 0%
ヒドロキシプロピルセルロースポリマー	0. 0～0. 6%
酵素	0. 0001～0. 1%
高級グリコール、ポリグリコール、ポリオキシド、及びグリコールエーテルから選択される、液体キャリア	残部

10

【0313】

【表 3 5】

20

チキソトロピー性自動食器洗浄用液体組成物	
成分	重量%
C12～C14脂肪酸	0～0. 5%
ブロックコポリマー系界面活性剤	1. 5～15. 0%
クエン酸ナトリウム	0～12%
トリポリリン酸ナトリウム	0～15%
炭酸ナトリウム	0～8%
トリスチアリン酸アルミニウム	0～0. 1%
クメンスルホン酸ナトリウム	0～1. 7%
ポリアクリル酸増粘剤	1. 32～2. 5%
ポリアクリル酸ナトリウム	2. 4～6. 0%
ホウ酸	0～4. 0%
ギ酸ナトリウム	0～0. 45%
ギ酸カルシウム	0～0. 2%
n-デシルジフェニルオキシドジスルホン酸ナトリウム	0～4. 0%
モノエタノールアミン（MEA）	0～1. 86%
（50%）水酸化ナトリウム	1. 9～9. 3%
1, 2-プロパンジオール	0～9. 4%
酵素	0. 0001～0. 1%
抑泡剤、染料、香料、水	残部

30

40

【0314】

【表 3 6】

自動食器洗浄用液体組成物	
成分	重量%
アルコールエトキシレート	0～20%
スルホン化脂肪酸エステル	0～30%
ドデシル硫酸ナトリウム	0～20%
アルキルポリグリコシド	0～21%
オレイン酸	0～10%
二ケイ酸ナトリウム一水和物	0～33%
クエン酸ナトリウム二水和物	0～33%
ステアリン酸ナトリウム	0～2.5%
過ホウ酸ナトリウム一水和物	0～13%
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED)	0～8%
マレイン酸／アクリル酸コポリマー	4～8%
酵素	0.0001～0.1%

10

【0315】

【表 3 7】

保護された漂白剤粒子を含有する自動食器洗浄用液体組成物	
成分	重量%
ケイ酸ナトリウム	5～10%
ピロリン酸四カリウム	0～25%
トリポリリン酸ナトリウム	0～2%
炭酸カリウム	4～8%
保護された漂白剤粒子、例えば塩素	5～10%
高分子系増粘剤	0.7～1.5%
水酸化カリウム	0～2%
酵素	0.0001～0.1%
水	残部

20

30

【0316】

【表 3 8】

化合物	モデル洗剤Aの組成:		モデル洗剤Bの組成:	
	量 (g/100g)	活性成分(%) 成分	量 (g/100g)	活性成分(%) 成分
界面活性剤				
Na-LAS(92%)(Nacconol90G) (アニオン性)(直鎖アルキルベンゼン スルホン酸塩)	10.87	10	10.87	10
STEOL CS-370E(70%) (アニオン性)、CH ₃ (CH ₂) _m - (OCH ₂ CH ₂) ₃ -OSO ₃ - (式中、 mは約11~13である。)	7.14	5	7.14	5
Bio-soft N25-7(99.5%) (非イオン性)、CH ₃ (CH ₂) _m - (OCH ₂ CH ₂) _n -OH(式中、 mは約11~14である。)	5	5	5	5
オレイン酸(脂肪酸)	2	2	2	2
溶媒				
H ₂ O	62	65	62	65
エタノール	0.5	0.5	0.5	0.5
STS(ポートルエンスルホン酸 ナトリウム(40%≒	3.75	1.5	3.75	1.5
モノプロピレングリコール	2	2	2	2
ビルダー				
クエン酸三ナトリウム	4	4	0	0
ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)	0	0	1.5	1.5
トリエタノールアミン(TEA)	0.5	0.5	0.5	0.5
安定化剤				
ホウ酸	1.5	1.5	1.5	1.5
微量成分				
10N NaOH(pH 8.5に 調節するためのもの)	0.8	0.8	0.8	0.8

【 0 3 1 7 】

【表 3 9】

液体洗剤及びクリーニング剤組成物								
成分	E1	E2	E3	C1	C2	C3	C4	C5
ジェランガム	0.2	0.2	0.15	0.15				
キサンタンガム			0.15		0.15	0.5	0.2	
ポリアクリル酸(Carbopol Aqua 30)	0.4	0.4					0.6	0.6
7EOを有するC ₁₂₋₁₄ 脂肪酸アルコール	22	10	10	10	10	10	10	10
C ₉₋₁₃ アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩		10	10	10	10	10	10	10
C ₁₂₋₁₄ アルキルポリグリコシド	1							
クエン酸	1.6	3	3	3	3	3	3	3
Dequest(登録商標)2010ヒドロキシエチリデン- 1,1-ジホスホン酸四ナトリウム塩(Solutia製)	0.5	1	1	1	1	1	1	1
2EOを有するラウリルエーテル硫酸ナトリウム	10	5	5	5	5	5	5	5
モノエタノールアミン	3	3	3	3	3	3	3	3
C ₁₂₋₁₄ 脂肪酸	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
プロピレングリコール		6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
クメンスルホン酸ナトリウム		2	2	2	2	2	2	2
酵素、染料、安定化剤	+	+	+	+	+	+	+	+
直径約2000μmのマイクロカプセル	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
水	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量
降伏値(Pa)	0.58	1.16	1.16	なし	なし	なし	あり	なし

【 0 3 1 8 】

【表 4 0】

万能アルカリ洗剤組成物(万能、ガラス用、キッチン用)硬質表面クリーニング洗剤組成物				
組成[重量%]	E1	E2	E3	E4
7EOを有するC12脂肪酸 アルコールエトキシレート	1	3	5	0.5
アルキルベンゼンスルホン酸 ナトリウム塩	3	1	2	4
オクチル硫酸塩	3	2	2	2
炭酸ナトリウム	1.5	0.5	1.0	1.5
クエン酸	0.5	0.5	0.5	0.5
脂肪酸	0.5	0.5	0.5	1.0
エタノール	5	3	5	3
香料	0.2	0.2	0.2	0.2
水	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

10

【0319】

【表 4 1】

酸性洗剤組成物(浴室、トイレ用)				
組成[重量%]	E5	E6	E7	E8
脂肪酸アルコールのC12-2EO エーテル硫酸ナトリウム塩	2	3	5	2
エタノール	3	3	3	3
クエン酸	3	10	3	10
増粘剤キサンタンガムKelzan ASX -T		0.05		0.05
香料	0.1	0.1	0.1	0.1
水	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

20

【0320】

【表 4 2】

クリーニングペースト組成物	
組成[重量%]	E9
C12脂肪酸アルコールの硫酸塩	20
25EOを有するC16~18脂肪酸 アルコールエトキシレート	20
C12~18脂肪酸モノエタノールアミド	10
硫酸ナトリウム	40
炭酸ナトリウム	5
セルロース	4.899
染料	0.001
香料	0.1

30

40

【0321】

【表 4 3】

自動発泡性粉末クリーニング組成物	
組成 [重量%]	E 1 0
C 1 2 脂肪族アルコールの硫酸塩	2
硫酸ナトリウム	3 7. 8 9 9
炭酸ナトリウム	2 5
クエン酸	3 5
染料	0. 0 0 1
香料	0. 1

10

【 0 3 2 2 】

【表 4 4】

降伏価を有する透明水性洗剤組成物及びクリーニング剤組成物						
成分	V1	E1	E2	E3	E4	E5
1, 2-プロパンジオール	8	0	2	6	4	2
ジプロピレングリコール	0	8	6	2	4	2
ポリアクリル酸 (Carbopol Aqua 30)	3	3	3	3	3	
ポリアクリル酸 (Polygel W301)	—	—	—	—	—	1. 8
7EOを有するC ₁₂ ~ ₁₄ 脂肪族アルコール	10	10	10	10	10	10
C ₉ ~ ₁₃ アルキルベンゼンスルホン酸 ナトリウム塩	10	10	10	10	10	—
クエン酸	3	3	3	3	3	2
Dequest(登録商標)2010 ヒドロキシエチリデン-1, 1- ジホスホン酸四ナトリウム塩 (Solutia製)	1	1	1	1	1	—
Dequest(登録商標)2066 ジエチレントリアミンペンタ (メチレンホスホン酸) 五ナトリウム塩(Solutia製)	—	—	—	—	—	0. 7
2EOを有するラウリルエーテル 硫酸ナトリウム塩	10	10	10	10	10	5
モノエタノールアミン	3	3	3	3	3	2
C ₁₂ ~ ₁₈ 脂肪酸ナトリウム塩	5. 5	5. 5	5. 5	5. 5	5. 5	5. 5
酵素、染料、安定化剤	+	+	+	+	+	+
直径約2000 μmの マイクロカプセル	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5
水	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量
降伏価(Pa・s)	0. 4	0. 6	0. 6	0. 8	1. 0	0. 6
外観	混濁	透明	透明	透明	透明	透明

20

30

【 0 3 2 3 】

【表 4 5】

液体洗濯洗剤	
成分	重量%
ABS (アルキルベンゼンスルホン酸塩)	10
FAEOS	5
C _{12/14} 7EO	10
C _{12/18} 脂肪酸	5
グリセロール	5
クエン酸ナトリウム	3
プロテアーゼ/アミラーゼ/セルラーゼ	1
Tinopal (登録商標) DMS-X (Ciba 製蛍光増白剤)	0.2
水	100とする量

10

【0324】

【表 4 6】

粉末洗濯洗剤	
成分	重量%
ABS (アルキルベンゼンスルホン酸塩)	11
C _{13/15} 7EO	3
炭酸ナトリウム	20
炭酸水素ナトリウム	5
硫酸ナトリウム	25
ケイ酸ナトリウム	5
過炭酸ナトリウム	13
TAED	5
ポリアクリル酸ナトリウム	4.5
酵素 (プロテアーゼ、アミラーゼ、及びセルラーゼ)	3.5
水	100とする量

20

30

【0325】

【表 4 7】

水性液体洗浄用製剤（FWM1 を含まず、FWM2 の 0.5% 超分岐ポリエステルアミドを含むもの		
組成配合	FWM1	FWM2
2EOを有するC _{12~14} 脂肪族アルコール	5	5
LAS	10	10
7EOを有するC _{12~18} 脂肪族アルコール	10	10
C _{12~18} 石けん	8	8
クエン酸塩	4	4
1, 2-プロパンジオール	5	5
Hybrane（登録商標）SIP 2100（DSM製）		0.5

10

【0326】

【表 4 8】

液体洗濯洗剤組成物			
洗剤組成	重量%		
	E1	E2	E3
7EOを有するC _{12~14} 脂肪族アルコール	5	4	10
C _{9~13} アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩	10	10	10
2EOを有するラウリルエーテル硫酸ナトリウム	—	—	8
活性物質（特定のポリカーボネート、ポリウレタンー及び／又は ポリ尿素ーポリオルガノシロキサン化合物、或いはそれらの、 反応性環状カーボネート及び尿素型の前駆体化合物	1	1	1
ポリアクリル酸増粘剤	—	—	1
過炭酸ナトリウム	15	18	—
TAED	3	3	—
C _{12~18} 脂肪酸ナトリウム塩	1	1.5	7.5
PVA／マレイン酸コポリマー	4.5	2	—
クエン酸ナトリウム	2.5	—	2
ホスホン酸ナトリウム	0.5	0.5	1
炭酸ナトリウム	10	20	—
プロパンジオール	—	—	6.5
ゼオライトA	25	25	—
ホウ酸ナトリウム	—	—	1.2
シリコーン消泡剤	2.5	1.3	0.1
酵素（プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ）	—	—	—
着色剤	—	—	—
香料	0.5	0.2	0.8
水	—	—	100とする量
硫酸ナトリウム	—	100とする量	—
重炭酸ナトリウム	100とする量	—	—

20

30

40

50

【 0 3 2 7 】

【表 4 9】

好ましい、リン酸塩を含まない自動食器洗浄剤の配合物例				
成分	配合物 1 (重量%)	配合物 2 (重量%)	配合物 3 (重量%)	配合物 4 (重量%)
クエン酸塩	5～60	10～55	15～50	15～50
過炭酸ナトリウム	1～20	2～15	4～10	4～10
漂白触媒	0.01～3	0.02～2	0.02～2	0.02～1
コポリマー ¹	0.1～30	0.5～25	1.0～20	1.0～20
非イオン性界面活性剤 ²	1～10	2～8	2～8	3～6
その他の成分	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

10

【 0 3 2 8 】

【表 5 0】

好ましい、リン酸塩を含まない自動食器洗浄剤の配合物例				
成分	配合物 5 (重量%)	配合物 6 (重量%)	配合物 7 (重量%)	配合物 8 (重量%)
クエン酸塩	5～60	10～55	15～50	15～50
過炭酸ナトリウム	1～20	2～15	4～10	4～10
ホスホン酸塩	2～8	2～8	2～8	2～8
コポリマー ¹	0.1～30	0.5～25	1.0～20	1.0～20
非イオン性界面活性剤 ²	1～10	2～8	2～8	3～6
その他の成分	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

好ましい、リン酸塩を含まない自動食器洗浄剤の配合物例				
成分	配合物 9 (重量%)	配合物 10 (重量%)	配合物 11 (重量%)	配合物 12 (重量%)
クエン酸塩	5～60	10～55	15～50	15～50
過炭酸ナトリウム	1～20	2～15	4～10	4～10
酵素	0.1～6	0.2～5	0.4～5	0.4～5
コポリマー ¹	0.1～30	0.5～25	1.0～20	1.0～20
非イオン性界面活性剤 ²	1～10	2～8	2～8	3～6
その他の成分	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

20

30

40

【 0 3 2 9 】

【表 5 1】

好ましい、リン酸塩を含まない自動食器洗浄剤の配合物例				
成分	配合物 1 3 (重量%)	配合物 1 4 (重量%)	配合物 1 5 (重量%)	配合物 1 6 (重量%)
クエン酸塩	5～60	10～55	15～50	15～50
炭酸塩／炭酸水素塩	2～40	2～40	2～40	2～40
ケイ酸塩	0～15	0～15	0～15	0.1～10
ホスホン酸塩	0～14	0～14	0～14	2～8
過炭酸ナトリウム	1～20	2～15	4～10	4～10
漂白触媒	0.01～3	0.02～2	0.02～2	0.02～1
コポリマー ¹	0.1～30	0.5～25	1.0～20	1.0～20
非イオン性界面活性剤 ²	1～10	2～8	2～8	3～6
酵素	0.1～6	0.2～5	0.4～5	0.4～5
その他の成分	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

10

¹ 次の成分を含むコポリマー。

i) モノ不飽和又はポリ不飽和カルボン酸からなる群から選択されるモノマー、

20

i i) 一般式： $R^1(R^2)C=C(R^3)-X-R^4$ で表されるモノマー（式中、 $R^1 \sim R^3$ は、互いに独立して、 $-H$ 、 $-CH_3$ 又は $-C_2H_5$ を表し、 X は、 $-CH_2-$ 、 $-C(O)O-$ 及び $-C(O)-NH-$ からなる群から選択される任意に含まれるスパーサー基を表し、そして R^4 は、炭素原子数 2～22 の直鎖又は分枝鎖飽和又は不飽和アルキル残基、好ましくは炭素原子数 6～22 の芳香族残基を表す。）

i i i) 場合により、追加モノマー。

² 次の一般式で表される非イオン性界面活性剤： $R^1-CH(OH)CH_2O-(AO)_w-(A'O)_x-(A''O)_y-(A'''O)_z-R_2$ （式中、 R^1 は直鎖又は分枝鎖の飽和又はモノ不飽和若しくはポリ不飽和 $C_6 \sim 24$ アルキル又はアルケニル残基を表し、 R^2 は炭素原子数 2～26 の直鎖又は分枝鎖炭化水素残基を表し、 A 、 A' 、 A'' 及び A''' は、互いに独立して、 $-CH_2CH_2$ 、 $-CH_2CH_2-CH_2CH_2$ 、 $-CH_2CH_2-CH(CH_3)$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2CH_2$ 、 $-CH_2-CH-(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH(CH_2-CH_3)$ からなる群から選択される残基を表し、そして w 、 x 、 y 及び z は 0.5～120 の範囲の値を表し、更に x 、 y 及び z は 0 であってもよい。）

30

【0330】

【表 5 2】

リン酸塩を含まない自動食器洗浄用洗剤組成物		
原材料	V 1	E 1
クエン酸塩	2 3	2 3
M G D A	8	8
コポリマー ¹	1 2	1 2
H E D P	2	2
重曹	2 8	2 8
過炭酸ナトリウム	1 0	1 0
T A E D	2. 4	2. 4
プロテアーゼ	2	2
アミラーゼ	1. 8	1. 8
非イオン性界面活性剤 ²	5	—
非イオン性界面活性剤 ³	—	5
その他の成分	1 0 0とする量	1 0 0とする量

10

【 0 3 3 1】

【表 5 3】

布地洗浄剤	
成分	純物質（重量%）
キサンタン	0. 3～0. 5
消泡剤	0. 2～0. 4
グリセロール	6～7
エタノール	0. 3～0. 5
F A E O S	4～7
非イオン性界面活性剤（特に、F A E O、A P G）	2 4～2 8
ホウ酸	1
クエン酸ナトリウム二水和物	1～2
重曹	2～4
ヤシ油脂肪酸	1 4～1 6
H E D P	0. 5
P V P	0～0. 4
蛍光増白剤	0～0. 0 5
染料	0～0. 0 0 1
香料	0～2
脱塩水	残部

20

30

40

【 0 3 3 2】

【表 5 4】

基材への適用に則した洗剤組成物例					
	重量% (活性成分%)				
成分	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	26.09	17.30	15.60	17.70	16.70
アルキルC _{14~15} /7EOエーテル硫酸ナトリウム	13.80	—	—	—	—
7EOを有するC _{14~15} 直鎖アルコールエトキシレート	13.44	5.4	14.6	5.5	5.2
ポリエチレングリコールPEG 75	2	1.4	1.3	1.4	1.4
ポリオキシエチレン(100)ステアシルエーテル	21.99	15.6	14.1	15.9	15.1
ケイ酸ナトリウム(SiO ₂ /Na ₂ O比=1.6~1.8)	3.72	16.6	15	17	16
ケイ酸ナトリウム(Britesil(登録商標)C24)	7	—	—	—	—
炭酸ナトリウム	—	6.5	5.9	6.7	6.3
四ホウ酸ナトリウム十水和物	—	11.9	10.8	12.2	11.5
ポリアクリル酸ナトリウム(MW約4500)	—	1.8	1.7	—	5.2
EDTA-四ナトリウム塩	—	0.1	0.1	0.1	0.1
蛍光増白剤(Tinopal(登録商標)CBS-X)	0.15	0.1	0.09	0.1	0.1
染料及び香料	0.9	0.9	0.81	1.01	0.91
水	10.92	22.10	19.90	22.4	21.5

10

20

【0333】

【表 5 5】

基材への適用に則した布地コンディショニング組成物例					
	重量% (活性成分%)				
成分	FS 1	FS 2	FS 3	FS 4	FS 5
ジ- (水素化獣脂) ジメチルアンモニウムメチル硫酸塩	33.6	33.2	44.4	22.2	33.2
不飽和トリアルキルグリセリド	16.8	16.6	22.2	11.1	16.6
水素化獣脂脂肪酸	16.8	16.6	22.2	11.1	16.6
C _{12~18} ヤシ油脂肪酸	11.2	11.1	—	11.1	—
C _{12~18} 脂肪族アルコールエトキシレート(7EO)	11.2	11.1	—	—	16.6
香油	10.4	11.4	11.2	11.2	17

30

40

50

【 0 3 3 4 】

【 表 5 6 】

自動食器洗浄剤例				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	1 2 ～ 5 0	1 5 ～ 4 0	1 2 ～ 5 0	1 5 ～ 4 0
ジカルボン酸	1 ～ 1 8	1 ～ 1 8	2 ～ 1 6	4 ～ 1 2
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量

10

【 0 3 3 5 】

【 表 5 7 】

自動食器洗浄剤の追加例				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	1 2 ～ 5 0	1 5 ～ 4 0	1 2 ～ 5 0	1 5 ～ 4 0
ジカルボン酸	1 ～ 1 8	1 ～ 1 8	2 ～ 1 6	4 ～ 1 6
炭酸塩	5 ～ 5 0	1 0 ～ 4 0	5 ～ 5 0	1 0 ～ 4 0
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量

20

【 0 3 3 6 】

【 表 5 8 】

自動食器洗浄剤の追加例				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	1 2 ～ 5 0	1 5 ～ 4 0	1 2 ～ 5 0	1 5 ～ 4 0
ジカルボン酸	1 ～ 1 8	1 ～ 1 8	2 ～ 1 6	4 ～ 1 2
炭酸塩	5 ～ 5 0	1 0 ～ 3 0	5 ～ 5 0	1 0 ～ 3 0
ホスホン酸塩	1 ～ 8	1 ～ 8	1 . 2 ～ 6	1 . 2 ～ 6
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量	1 0 0 とする 量

30

【 0 3 3 7 】

40

【表 5 9】

好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	1 2～5 0	1 5～4 0	1 2～5 0	1 5～4 0
ジカルボン酸	1～1 8	1～1 8	2～1 6	4～1 2
炭酸塩	0～5 0	0～3 0	0～3 0	0～3 0
ホスホン酸塩	0～8	0～8	0～8	0～8
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	1 0 0とする量	1 0 0とする量	1 0 0とする量	1 0 0とする量

10

【 0 3 3 8】

【表 6 0】

更に好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	1 2～5 0	1 5～4 0	1 2～5 0	1 5～4 0
マレイン酸	1～1 8	1～1 8	2～1 6	4～1 2
炭酸塩	5～5 0	1 0～3 0	5～5 0	1 0～3 0
ホスホン酸塩	1～8	1～8	1. 2～6	1. 2～6
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	1 0 0とする量	1 0 0とする量	1 0 0とする量	1 0 0とする量

20

【 0 3 3 9】

【表 6 1】

好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	1 2～5 0	1 5～4 0	1 2～5 0	1 5～4 0
ジカルボン酸	1～1 8	1～1 8	2～1 6	4～1 2
炭酸塩	0～5 0	0～3 0	0～3 0	0～3 0
ホスホン酸塩	0～8	0～8	0～8	0～8
非イオン性界面活性剤	0. 1～1 5	0. 1～1 5	0. 5～8	0. 5～8
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	1 0 0とする量	1 0 0とする量	1 0 0とする量	1 0 0とする量

30

40

【 0 3 4 0】

【表 6 2】

更に好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	12～50	15～40	12～50	15～40
マレイン酸	1～18	1～18	2～16	4～12
炭酸塩	5～50	10～30	5～50	10～30
ホスホン酸塩	1～8	1～8	1.2～6	1.2～6
非イオン性界面活性剤	0.1～15	0.1～15	0.5～8	0.5～8
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

10

【0341】

【表 6 3】

好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸	12～50	15～40	12～50	15～40
ジカルボン酸	1～18	1～18	2～16	4～12
炭酸塩	0～50	0～30	0～30	0～30
ホスホン酸塩	0～8	0～8	0～8	0～8
スルホ基含有コポリマー	0～20	0～20	0～20	0～20
非イオン性界面活性剤	0～15	0～15	0～8	0～8
酵素調製物	0.1～12	0.1～12	0.5～8	0.5～8
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量

20

30

【0342】

【表 6 4】

更に好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	12～50	15～40	12～50	15～40
マレイン酸	1～18	1～18	2～16	4～12
炭酸塩	5～50	10～30	5～50	10～30
ホスホン酸塩	1～8	1～8	1.2～6	1.2～6
スルホ基含有 コポリマー	0～20	0～20	0～20	0～20
非イオン性 界面活性剤	0.1～15	0.1～15	0.5～8	0.5～8
酵素調製物	0.1～12	0.1～12	0.5～8	0.5～8
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	100とする 量	100とする 量	100とする 量	100とする 量

10

【0343】

【表 6 5】

好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	12～50	15～40	12～50	15～40
ジカルボン酸	1～18	1～18	2～16	4～12
炭酸塩	0～50	0～30	0～30	0～30
ホスホン酸塩	0～8	0～8	0～8	0～8
スルホ基含有 コポリマー	0～20	0～20	0～20	0～20
非イオン性 界面活性剤	0～15	0～15	0～8	0～8
酵素調製物	0～12	0～12	0～8	0～8
有機溶媒	0.1～15	0.5～8	0.1～15	0.5～8
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	100とする 量	100とする 量	100とする 量	100とする 量

20

30

【0344】

【表 6 6】

更に好ましい自動食器洗浄剤				
成分	重量%			
	配合物 1	配合物 2	配合物 3	配合物 4
クエン酸塩	12～50	15～40	12～50	15～40
ジカルボン酸	1～18	1～18	2～16	4～12
炭酸塩	5～50	10～30	5～50	10～30
ホスホン酸塩	1～8	1～8	1.2～6	1.2～6
スルホ基含有 コポリマー	0～20	0～20	0～20	0～20
非イオン性 界面活性剤	0.1～15	0.1～15	0.5～8	0.5～8
酵素調製物	0.1～12	0.1～12	0.5～8	0.5～8
有機溶媒	0.1～15	0.5～8	0.1～15	0.5～8
リン酸塩	—	—	—	—
漂白剤	—	—	—	—
その他の成分	100とする 量	100とする 量	100とする 量	100とする 量

10

【 0 3 4 5 】

20

【表 6 7】

自動食器洗浄剤		
成分	重量%	
	C 1	E 1
クエン酸ナトリウム	9	9
水酸化カリウム	7	7
炭酸ナトリウム	14	14
マレイン酸	—	1
スルホ基含有ポリマー	4.2	4.2
HEDP	1.5	1.5
非イオン性界面活性剤	2	2
プロテアーゼ調製物	2	2
アミロース調製物	0.8	0.8
アルカノールアミン	1.5	1.5
増粘剤	2	2
水、その他の成分	100とする量	100とする量

30

【 0 3 4 6 】

40

【表 6 8】

手洗い用食器洗浄剤							
成分	重量%						
	本発明 1	本発明 2	本発明 3	本発明 4	本発明 5	本発明 6	本発明 7
脂肪族アルコールの エーテル硫酸塩	10	13. 33	12	12	13. 3	13. 3	13. 3
コカミドプロピルベタイン	2.5	3.3 3	3.1	3.1	3	3	3
S c e. アルカンスルホン酸 塩	2.5	3.3 3	2.9	2.9	3.7	3.7	3.7
脂肪族アルコールエトキシ レート	9	6	—	—	—	—	—
塩化ナトリウム	24	24	22	24	20	24	20
エタノール	—	—	2	2	2.5	2.5	4
香料	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
着色剤	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
水	51. 60	49. 51	57. 5	55. 5	57	53	55. 5

10

20

【 0 3 4 7 】

【表 6 9】

抗菌活性洗剤／クリーナー						
成分	V1	E1	E2	E3	E4	E5
7EOを有するC ₁₂ ~18 脂肪族アルコール	12	12	12	5	5	—
N-ココアルキル-N, N- ジメチルアミノオキシド	1.95	1.95	1.95	2	2	—
エステルクウォート(N- メチル-N-(2- ヒドロキシアチル)-N, N- (ジ獣脂アシルオキシエチル) アンモニウムメトサルフェート	—	—	—	—	—	15
AgNO ₃ ・H ₂ O	0.0043	0.0043	0.0043	0.004	0.004	0.004
C14脂肪酸	5	5	—	—	—	—
ファルネソール	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
ヤシ油脂肪酸	2.5	2.5	2.5	12	—	—
クエン酸	—	—	—	1.0	0.1	—
H ₂ O ₂	—	0.5	0.035	2	5	0.5
NaOH	0.35	0.35	0.35	1.9	—	—
NH ₄ OH	0.04	0.04	0.04	0.06	—	—
2-ブロパノール	—	—	—	—	—	1.67
塩化マグネシウム六水和物	—	—	—	—	—	0.01
香料A	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75
水	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量	100とする量
pH	8.5	8.5	8.5	8.5	5.5	2.6

30

40

【 0 3 4 8 】

【表 7 0】

白物用洗剤	
成分	M1 (重量%)
C _{9~13} アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩	10
2EOを有するラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩	5
7EOを有するC _{12~18} 脂肪族アルコール	10
C _{12~14} アルキルポリグリコシド	2
C _{12~18} 脂肪酸ナトリウム塩	8
グリセロール	5
クエン酸三ナトリウム	1
ポリアクリル酸	2
活性成分（アンチグレー剤ーポリカーボネートー、ポリウレタンー及び／又はポリ尿素ー ポリオルガノシロキサン化合物、或いはそれらの製造時に用いられる前駆体化合物）	1
酵素、染料、蛍光増白剤	+
水	100とする量

10

20

【 0 3 4 9 】

【表 7 1】

基材への適用に則した洗剤組成物例					
成分	重量百分率 (活性成分%)				
	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	26. 09	17. 30	15. 60	17. 70	27. 00
アルキルC _{14~15} /7EOエーテル硫酸ナトリウム	13. 80				14. 00
7EOを有するC _{14~15} 直鎖アルコールエトキシレート	13. 44	5.4 0	14. 60	5.5 0	14. 00
7EOを有するC _{12~20} 直鎖アルコールエトキシレート					23. 00
ポリエチレングリコール (PEG-75)	2.0 0	1.4 0	1.3 0	1.4 0	2.0 0
ポリオキシエチレン (100) ステアリルエーテル	21. 99	15. 60	14. 10	15. 90	
ケイ酸ナトリウム (SiO ₂ /Na ₂ O比=1.6~1.8)	3.7 2	16. 60	15. 00	17. 00	
ケイ酸ナトリウム (Britesil (登録商標) C24)	7.0 0				11. 00
炭酸ナトリウム		6.5 0	5.9 0	6.7 0	
四ホウ酸ナトリウム十水和物		11. 90	10. 80	12. 20	
ポリアクリル酸ナトリウム (MW約4,500)		1.8 0	1.7 0		
EDTA-四ナトリウム塩		0.1 0	0.1 0	0.1 0	
蛍光増白剤 (Tinopal (登録商標) CBS-X)	0.1 5	0.1 0	0.0 9	0.1 0	0.2 0
染料及び香料	0.9 0	0.9 0	0.8 1	1.0 1	0.3 5
水	10. 92	22. 10	19. 90	22. 40	9.5 5

10

20

30

【0350】

【表 7 2】

基材への適用に則した酵素含有組成物例					
成分	重量% (活性成分%)				
	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5
ポリエチレングリコール (PEG-75)	98.60	99.10			
脂肪酸系基剤 1			98.9		99.10
脂肪酸系基剤 2				98.80	
プロテアーゼ	0.10	0.10	0.12	0.10	0.10
マンナーゼ	0.02		0.02	0.02	
アミラーゼ	0.12	0.25	0.1	0.12	0.25
セルラーゼ	0.08		0.1	0.08	
リパーゼ	0.08			0.08	
ペクチン酸リアーゼ				0.05	
酵素安定化剤	1.00	0.55	0.75	0.75	0.55

10

【0351】

20

脂肪酸系基剤 1 は、ヤシ油脂肪酸のナトリウム塩 20 重量%、非高分子系のポリオール（ソルビトール、グリセリン、プロピレングリコール、サッカロース及びグルコース）50 重量%、アニオン性及び非イオン性界面活性剤 15 重量%、並びに水 15 重量%から構成される。

【0352】

脂肪酸系基剤 2 は、ステアリン酸のナトリウム塩 20 重量%、ラウリン酸のナトリウム塩 3 重量%、ミリスチン酸のナトリウム塩 3 重量%、非高分子系のポリオール（ソルビトール、グリセリン、及びプロピレングリコール）50 重量%、ラウリン酸 2 重量%、ステアリン酸 2 重量%、アニオン性界面活性剤 10 重量%、及び水 10 重量%から構成される。

30

【0353】

【表 7 3】

表 1 洗剤組成物	
成分	(重量%)
石けん (飽和 C _{12~24} 脂肪酸石けん及びオレイン酸石けん)	5.42
C _{12~14} アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	22.67
C _{14~16} 脂肪族アルコール硫酸ナトリウム	4.59
5EOを有する C _{12~18} 脂肪族アルコール	0.81
炭酸ナトリウム	4.55
ゼオライト A	29.86
ケイ酸ナトリウム	8.00
アクリル酸/マレイン酸コポリマー	16.16
蛍光増白剤	0.45
ホスホン酸塩	2.30
50% NaOH	0.63
水	3.88
上記以外の塩	0.68
表 2	
洗剤組成物	59.5%
コーティングされた漂白剤 (過炭酸ナトリウム)	23.3%
コーティングされた漂白活性剤 (TAED)	7%
クエン酸一水和物	10.2%

【0354】

【表 7 4】

粒状洗剤組成物	
成分	重量%
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	8.5
C _{12~15} 第一級アルコールの、エチレンオキシド7モルとの縮合物	4
ナトリウム-硬化菜種油石けん	1.5
トリリン酸ナトリウム	33
炭酸ナトリウム	5
ケイ酸ナトリウム	6
硫酸ナトリウム	20
水	9
蛍光剤、泥汚れ懸濁化剤、染料、香料	微量
過ホウ酸ナトリウム	12
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED) (顆粒)	2
タンパク質分解酵素 (Novo製、Savinase)	0.4

【0355】

【表 7 5】

洗剤組成物 A
アニオン性洗剤 9 %
非イオン性洗剤 1 %
トリポリリン酸ナトリウム 21.5 %
過ホウ酸ナトリウム 7 %
Savinase (タンパク質分解酵素) 0.6 %
残量の硫酸ナトリウム及び微量成分

10

【 0 3 5 6】

【表 7 6】

洗剤組成物 B
アニオン性洗剤 9 %
非イオン性洗剤 4 %
ゼオライト 28 %
ニトリロ三酢酸 4.5 %
過ホウ酸ナトリウム 5.5 %
テトラアセチルエチレンジアミン 3.5 %
Savinase 0.5 %
残量の硫酸ナトリウム及び微量成分

20

【 0 3 5 7】

【表 7 7】

洗剤組成物 C
アニオン性洗剤 5 %
非イオン性洗剤 4 %
石けん 1 %
ゼオライト 30 %
アクリル酸とマレイン (maleic) 酸無水物とのコポリマー 3. %
過ホウ酸ナトリウム 7.5 %
テトラアセチルエチレンジアミン 3 %
残量の硫酸ナトリウム及び微量成分

30

【 0 3 5 8】

【表 7 8】

洗剤組成物D
アニオン性合成洗剤 8 %
非イオン性合成洗剤 4 %
石けん 4 %
炭酸ナトリウム 3 5 . %
方解石粉末 2 0 %
過ホウ酸ナトリウム 6 %
テトラアセチルエチレンジアミン 2 %
S a v i n a s e 0 . 5 %
残量の硫酸ナトリウム及び微量成分

10

【 0 3 5 9】

【表 7 9】

洗濯洗剤組成物	
成分	重量部
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	8 . 5
C 1 2 ~ C 1 5 第一級アルコールの、エチレンオキシド 7 モルとの縮合物	4
硬化菜種油石けんナトリウム塩	1 . 5
トリリン酸ナトリウム	3 3
炭酸ナトリウム	5
ケイ酸ナトリウム	6
硫酸ナトリウム	2 0
水	9
蛍光剤、泥汚れ懸濁化剤、染料、香料	微量成分
過ホウ酸ナトリウム	1 2
テトラアセチルエチレンジアミン (TAED) (顆粒)	2
タンパク質分解酵素 (NOVO製、S a v i n a s e)	0 . 4

20

30

【 0 3 6 0】

【表 8 0】

洗濯洗剤組成物				
	A	B	C	D
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	9	9	9	9
C 1 3～C 1 5直鎖第一級アルコールの、エチレンオキシド 7モルとの縮合物（例えば、Synperonic A 7）	1	4	4	1
C 1 3～C 1 5直鎖第一級アルコールの、エチレンオキシド 3モルとの縮合物（例えば、Synperonic A 3）	3	0	0	3
トリポリリン酸ナトリウム	2 3	2 3	0	0
ゼオライト 4 A	0	0	2 4	2 4
アクリル酸とマレイン酸無水物とのコポリマー			4	4
ポリアクリル酸ナトリウム	2	2	0	0
ケイ酸アルカリ塩	5	5		
蛍光剤	0. 2 5	0. 2 5	0. 1 6	0. 1 6
EDTA	0. 1 5	0. 1 5	0. 1 8	0. 1 8
SCMC	0. 5	0. 5	0. 5 5	0. 5 5
塩	2	2		
硫酸ナトリウム	2 6. 8	2 6. 8	2 2. 3 1	2 2. 3 1
炭酸ナトリウム	0	0	1 0. 3	1 0. 3
水分	1 0	1 0	1 1	1 1
TAED	3	3	3. 3	3. 3
過ホウ酸ナトリウム一水和物	1 0	1 0	8	8
カルシウム（Dequest（登録商標）2047）	0. 7	0. 7	0. 3	0. 3
抑泡剤	3	3	2. 5	2. 5
香料	0. 2	0. 2	0	0
アルカリプロテアーゼ（Savinase（A）6T）	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4

10

20

30

【 0 3 6 1】

【表 8 1】

洗剤組成物				
成分	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4
材料	レベル (割合で表す)	レベル (割合で表す)	レベル (割合で表す)	レベル (割合で表す)
グリセロール	3.17	3.17	3.17	3.17
MPG	5.7	5.7	5.7	5.7
NaOH	2.13	2.13	2.13	2.13
TEA	2.05	2.05	2.05	2.05
Neodol 25-7	12.74	12.74	12.74	12.74
蛍光色素(F-Dye)	0.18	0.18	0.18	0.18
クエン酸	1.71	1.71	1.71	1.71
LAS(LAS酸換算)	8.49	8.49	8.49	8.49
脂肪酸	3.03	3.03	3.03	3.03
Empigen BB	1.5	1.5	1.5	1.5
SLES	4.24	4.24	4.24	4.24
Dequest 2066	0.875	0.875	0.875	0.875
パテントブルー	0.00036	0.00036	0.00036	0.00036
アシッドイエロー	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005
乳白剤	0.0512	0.0512	0.0512	0.0512
香料	0.734	0.734	0.734	0.734
ホウ砂	10	10	10	10
Savinase	2.362	2.362	2.362	2.362
ステインザイム	0.945	0.945	0.945	0.945
石けん	3.03	3.03	3.03	3.03
EPEI 20E0(日本触媒製)重量平均分子 量約600のポリエチレンイミンであって、 平均20のエチレンオキシド部分で アルコキシル化することにより変性したもの。	5.5	5.5	5.5	9
Lipex(登録商標)(Novozymes製)	3	3	3	3
Texcare SRN170(Clariant製)汚れ 剥離ポリマー	0	7.5	0	0
Sokolan CP5(BASF製)汚れ 剥離ポリマー	0	0	20	0

【0362】

上記のように、本発明のクリーニング組成物は、任意の好適な形態に配合されて、配合者により選択された任意のプロセスで調製される（非限定的な例については、米国特許第5,879,584号、同第5,691,297号、同第5,574,005号、同第5,569,645号、同第5,516,448号、同第5,489,392号、及び同第5,486,303号に記載されており、そしてこれら公報はいずれも参照により本明細書に組み込まれる。低pHのクリーニング組成物が所望される他の一部の実施形態では、このような組成物のpHは、HClなどの酸性材料を添加することで調整される。

【0363】

本明細書で開示されるクリーニング組成物は、部位のクリーニングにおいて有用である（例えば、表面、物品、食器類又は布地）。典型的には、このような部位の少なくとも一部を、原液又は洗浄液で希釈した本発明のクリーニング組成物と接触させ、そしてその後、場合により、その部位を洗浄及び/又はすすぎ洗いする。本発明の目的に関し、「洗浄」には、擦ること及び機械的攪拌が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、典型的には溶液中で約500ppm～約15,000ppmの濃度で使用される。洗浄溶媒が水である場合、水温は、典型的には、約5～約90の範囲であり、部位が布地を含む場合、水と布地との質量比は、典型的には、約1:1～約30:1である。

【0364】

クリーニング組成物の製造及び使用方法

本発明のクリーニング組成物は、任意の好適な形態に組成配合されて、配合者により選択された任意の好適なプロセスにより調製される（例えば、米国特許第同第5,879,584号、同第5,691,297号、同第5,574,005号、同第5,569,645号、同第5,565,422号、同第5,516,448号、同第5,489,392号、同第5,486,303号、同第4,515,705号、同第4,537,706号、同第4,515,707号、同第4,550,862号、同第4,561,998号、同第4,597,898号、同第4,968,451号、同第5,565,145号、同第5,929,022号、同第6,294,514号及び同第6,376,445号を参照されたい）。

【0365】

一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、錠剤、カプセル、分包剤、パウチ、及び多区画パウチなどの一回用量形状で提供される。一部の実施形態では、一回用量形式は、多区画パウチ（又は他の一回用量形式）内の成分を制御放出するように設計される。好適な一回用量形式及び制御放出形式は、当該技術分野において既知である（単位容量及び制御放出形式での使用に好適な材料に関しては、例えば、欧州特許第2,100,949号、PCT国際特許出願公開第WO 02/102955号、米国特許第4,765,916号及び同第4,972,017号、並びにPCT国際特許出願公開第WO 04/111178号を参照されたい）。一部の実施形態では、一回用量形状は、水溶性フィルムで包装された錠剤又は水溶性パウチとして提供される。様々な一回用量形式が欧州特許第2,100,947号に提示されており、当該技術分野においても既知である。

【0366】

使用方法

一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、表面（例えば、食器）、洗濯物、硬質表面、コンタクトレンズなどのクリーニングにおいて有用である。一部の実施形態では、表面の少なくとも一部を、原液又は洗浄液で希釈した本発明のクリーニング組成物の少なくとも一実施形態と接触させ、そしてその後、場合により、表面を洗浄及び/又はすすぎ洗いをする。本発明の目的に関し、「洗浄」には、擦ること及び機械的洗浄が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、本発明のクリーニング組成物は、溶液中約500ppm～約15,000ppmの濃度で使用される。洗浄溶媒が水である一部の実施形態では、水温は、典型的には約5～約90の範囲である。

【0367】

本発明は、クリーニングの必要がある物品又は表面（例えば、硬質表面）をクリーニング又は洗浄する方法を提供し、こうした方法としては、これらに限定するものではないが、食器類、食卓用食器類、布地物品、洗濯物物品、パーソナルケア物品等のクリーニング又は洗浄方法、及び硬質若しくは軟質表面（例えば、物品の硬質表面）のクリーニング又は洗浄方法が挙げられる。

【0368】

一部の実施形態では、本発明は、クリーニングする必要がある物品、対象物、又は表面をクリーニングするための方法を提供し、方法は、物品又は表面（又はクリーニングされることが所望される物品又は表面の一部）を本発明の少なくとも1種のサーモリシン変異体プロテアーゼ又は本発明の組成物と、物品、対象物若しくは表面を所望される程度まで洗浄するのに十分な時間にわたって及び/又はそうするのに好適な及び/又は有効な条件下で接触させることを含む。このような方法の一部は、物品、物体、又は表面を水ですすぐ工程を更に含む。このような方法の一部では、クリーニング組成物は食器洗剤組成物であり、クリーニングされる物品又は物体は食器類又は食卓用食器類である。本明細書で使用する時、「食器類」は、食品を給仕する際又は食べる際に一般的に使用される物品である。食器類は、これらに限定するものではないが、例えば深皿、平皿、カップ、碗等のようなものであり得る。本明細書で使用する時、「食卓用食器類」はより広義の用語であり、これらに限定するものではないが、例として深皿、金属食器、ナイフ、フォーク、スプーン、箸、ガラス食器、水差し、ソース入れ、飲用容器、給仕用具等が挙げられる。

「食卓用食器類」は食品を給仕する又は食べるための上記又は類似物品のいかなるものも包含することを意図する。このような方法の一部では、クリーニング組成物は、自動食器洗浄用洗剤組成物又は食器手洗い用洗剤組成物であり、クリーニングされる物品又は物体は、食器又は食卓用食器類である。このような方法の一部では、クリーニング組成物は、洗濯洗剤組成物（例えば、粉末洗濯洗剤組成物又は液体洗濯洗剤組成物）であり、クリーニングされる物品は布地物品である。その他の一部の実施形態では、クリーニング組成物は洗濯物前処理用組成物である。

【0369】

一部の実施形態では、本発明は、それぞれ所望によりクリーニング又は洗浄が必要な布地物品をクリーニング又は洗浄する方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、布地又は洗濯物洗浄組成物を包含する、プロテアーゼ変異体を含む組成物、及びクリーニングが必要な布地物品又は洗濯物物品を準備する工程と、この布地物品又は洗濯物物品（又はクリーニングが望ましい物品の一部）を、組成物に、布地又は洗濯物物品を望ましい程度までクリーニング又は洗浄するのに十分な又は有効な条件下で接触させる工程と、を含む。

【0370】

一部の実施形態では、本発明は、所望によりクリーニングする必要のある物品又は表面（例えば、硬質表面）をクリーニング又は洗浄するための方法を提供し、方法は、クリーニング又は洗浄される物品又は表面を準備する工程、並びに物品又は表面（又はクリーニング又は洗浄することが所望される物品又は表面の一部）を、本発明の少なくとも1種のサーモリシン変異体又はこのようなサーモリシン変異体を少なくとも1種含有する本発明の組成物に、所望される程度まで物品又は表面をクリーニング又は洗浄するのに十分な時間にわたって及び/又はそうするのに十分又は有効な条件下で接触させる工程を含む。このような組成物としては、これらに限定するものではないが、例えば、本発明のクリーニング組成物又は洗剤組成物（例えば、食器手洗い用洗剤組成物、食器手洗い用クリーニング組成物、洗濯洗剤又は布地洗剤又は洗濯物若しくは布地クリーニング組成物、液体洗濯洗剤、液体洗濯物クリーニング組成物、粉末洗濯洗剤組成物、粉末洗濯物クリーニング組成物、自動食器洗浄用洗剤組成物、洗濯用補助クリーニング又は洗剤組成物、洗濯物クリーニング添加剤、及び洗濯物シミ抜き前処理用組成物（laundry pre-spotter composition）等）が挙げられる。一部の実施形態では、本方法は、特に追加のクリーニング又は洗浄が望ましい場合に、1回以上繰り返される。例えば、場合によっては、本方法は任意で、その物品又は表面を望ましい程度までクリーニング又は洗浄するのに十分な又は有効な時間にわたって、物品又は表面を少なくとも1種のプロテアーゼ変異体又は組成物に接触させ続ける工程を更に含む。一部の実施形態では、本方法は、物品又は表面を水及び/又は別の液体ですすぐ工程を更に含む。一部の実施形態では、本方法は、物品又は表面を少なくとも1種の本発明のプロテアーゼ変異体又は本発明の組成物と再度接触させる工程と、その物品又は表面を望ましい程度までクリーニング又は洗浄するのに十分な又は有効な時間にわたって、物品又は表面を少なくとも1種のプロテアーゼ変異体又は組成物に接触させ続ける工程と、を更に含む。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、食器洗い用洗剤組成物であり、クリーニングされる物品は食器又は食卓用食器類である。本方法の一部の実施形態では、クリーニング組成物は、自動食器洗浄用洗剤組成物又は食器手洗い用洗剤組成物であり、クリーニングされる物品は食器又は食卓用食器類である。本方法の一部の実施形態では、クリーニング組成物は洗濯洗剤組成物であり、クリーニングされる物品は布地物品である。

【0371】

本発明はまた、自動食器洗浄機で食卓用食器類又は食器類をクリーニングする方法を提供し、この方法は、自動食器洗浄機を準備する工程、食卓用食器類又は食器類をクリーニングするのに十分な量の、本発明のサーモリシン変異体を少なくとも1種含有している自動食器洗浄機用組成物又は本発明の組成物を自動食器洗浄機内に（例えば、組成物を適切な又は食器洗浄機内に装備された洗剤区画若しくはディスペンサーに入れることにより）

10

20

30

40

50

入れる工程と、自動食器洗浄機内に食器類又は食卓用食器類を入れる工程と、食卓用食器類又は食器類がクリーニングされるよう自動食器洗浄機を操作する工程（例えば、製造元による取り扱い説明書に従って）と、を含む。一部の実施形態では、本方法は、本明細書に記載の任意の自動食器洗浄機用組成物を包含し、組成物は、限定するものではないが本明細書で提供されるサーモリシン変異体を少なくとも１種含む。自動食器洗浄用組成物の使用量は、製造元による取り扱い説明書又は提案に従って容易に決定することができ、本明細書に記載のものを含めて、本発明のプロテアーゼ変異体を少なくとも１種含むいかなる形態の自動食器洗浄用組成物（例えば、液体、粉末、固体、ゲル、錠剤等）も使用できる。

【０３７２】

本発明は、所望によりクリーニングする必要のある表面、物品又は対象物をクリーニングするための方法も提供し、本方法は、所望される程度まで物品又は表面をクリーニング又は洗浄するのに十分な時間にわたって及び／又はそうするのに十分な若しくは有効な条件下で、物品又は表面（又はクリーニングすることが所望される物品又は表面の一部）を、原液若しくは洗浄溶液に希釈した本発明の少なくとも１種のサーモリシン変異体又は本発明のクリーニング組成物と接触させる工程を含む。必要に応じて、その後、表面、物品、又は対象物を（任意に）洗浄し及び／又はすすいでもよい。本発明の目的に関し、「洗浄」には、例えば擦ること及び機械的攪拌が包含されるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、クリーニング組成物は、溶液（例えば水溶液）中で約 500 ppm ~ 約 15,000 ppm の濃度で使用される。洗浄溶媒が水である場合、水温は、典型的には、約 5 ~ 約 90 の範囲であり、表面、物品又は対象物が布地を含む場合、水と布地との質量比は、典型的には約 1 : 1 ~ 約 30 : 1 である。

【０３７３】

本発明は、洗濯物又は布地物品を洗濯機でクリーニングする方法も提供し、方法は、洗濯機を準備する工程と、洗濯物又は布地物品をクリーニングするのに十分な量の、本発明のサーモリシン変異体を少なくとも１種含む洗濯洗剤組成物を（例えば、組成物を洗濯機内の適切な又は備え付けの洗剤区画又はディスペンサーに入れることにより）洗濯機内に入れる工程と、洗濯機内に洗濯物又は布地物品を入れる工程と、及び洗濯物又は布地物品がクリーニングされるように洗濯機を（例えば、製造元の取扱説明書に従って）操作する工程と、を包含する。本発明の方法は、限定するものではないが、本明細書で提供される少なくとも１種の任意のサーモリシン変異体を含む、本明細書に記載の任意の洗濯物洗浄用洗剤組成物を包含する。洗濯洗剤組成物の使用量は、製造元の取扱説明書又は提案に従って容易に決定することができ、本明細書に記載のものを含めて、本発明の変異型プロテアーゼを少なくとも１種含むいかなる形態の洗濯洗剤組成物（例えば、固体、粉末、液体、錠剤、ゲル等）も使用できる。

【０３７４】

実験

【実施例】

【０３７５】

（実施例１）

アッセイ

以下のアッセイは、以下に記載の実施例に使用した標準アッセイ法である。場合により、特定のプロトコルは、これらの標準アッセイにあてはまらないこともある。この場合、以下のこれらの標準アッセイプロトコルから外れた部分については、実施例中で規定する。

【０３７６】

A．性能指数

性能指数（PI）は、同一タンパク質濃度下での変異体の性能（実測値）と標準酵素の性能（理論値）とを比較するものである。加えて、標準酵素のラングミュア等式のパラメータを用いることで、理論値が算出できる。

【0377】

1を超える性能指数(PI)(PI>1)は、標準(例えば、サーモリシン)に比べて改善された変異体による性能を示し、一方、PIが1の場合(PI=1)は、変異体の性能が標準と同じであることを示し、PIが1未満である場合(PI<1)は、変異体の性能が標準よりも劣ることを示す。

【0378】

B. 96穴マイクロタイタープレートにおけるAbz-AGLA-Nbaプロテアーゼアッセイ

サーモリシンメタロプロテアーゼ及びサーモリシンメタロプロテアーゼ変異体のプロテアーゼ活性を決定するために、2-アミノベンゾイル-L-アラニルグリシル-L-ロイシル-L-アラニノ-4-ニトロベンジルアミド(Abz-AGLA-Nba)の加水分解を測定する。

10

【0379】

使用する試薬溶液は次の通りである。

i) MES緩衝液(NaOHでpH 6.5に調整した52.6mM MESであって、2.6mM CaCl₂及び0.00526%(v/v)TWEEN(登録商標)-80を含有するもの)

ii) Abz-AGLA-Nba保存液(DMF中、48mM Abz-AGLA-Nba)(室温において遮光保存)

iii) プロピレングリコールを含む酵素希釈用緩衝液(10mM NaCl、0.1mM CaCl₂及び0.005%(v/v)TWEEN(登録商標)-80、10%プロピレングリコール)

20

【0380】

2.4mM Abz-AGLA-Nba実験溶液を調製するために、Abz-AGLA-Nba保存液1mLをMES緩衝液19mLに添加して、少なくとも10秒間にわたって十分に混合する。この溶液は室温において遮光保存しておく。

【0381】

プロテアーゼ溶液を調製するために。サーモリシン変異体の濾別した培養上清を、酵素希釈用緩衝液で50倍に希釈する。

【0382】

アッセイは、蛍光発光の読みに適した使い捨て用黒色ポリスチレン製平底96穴マイクロプレート(例えば、Greiner 655076)において行う。まず、2.4mM Abz-AGLA-Nba実験溶液195μLを96穴マイクロアッセイプレートの穴にそれぞれ加えた後、希釈したプロテアーゼ試料5μLを添加する、この溶液を5秒間混合し、動態測定モードにおいて25℃でマイクロプレート分光光度計(SpectraMAX Gemini EM、Molecular Devices)を用いて蛍光発光の変化を測定する(180秒間に9回読み取る。励起波長350nm、発光波長415nm、カットオフフィルターは使用せず)。蛍光発光の変化度(RFU/秒)(RFU=相対的蛍光度単位)により、プロテアーゼ活性の測定が得られる。

30

【0383】

C. 安定性試験

配列番号3のアミノ酸配列を有する野生型サーモリシン酵素に対するサーモリシン変異体の熱安定性は、プロテアーゼ試料をHES緩衝液又は洗剤溶液のいずれかにおいて定義された条件下でインキュベートすることにより決定される。インキュベーション温度は、インキュベーション後の野生型サーモリシンの残留活性が初期活性の約30%となるように選択する。初期活性及び残留サーモリシン活性は、上記B欄で説明したAbz-AGLA-Nbaアッセイを利用して決定する。

40

【0384】

使用する試薬溶液は次の通りである。

1. 2.4mM Abz-AGLA-Nba実験溶液(上記B参照)

50

2. 希釈用緩衝液: 10 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 、0.005% (v/v) TWEEN (登録商標) - 80

3. HEPES 緩衝液: 10 mM HEPES、0.1 mM CaCl_2 、0.005% (v/v) TWEEN (登録商標) - 80、pH 7.15

4. AT 処方洗剤 (pH 8) (21 °GH (総硬度) の水中、2.5 g/L)

5. Sun All-in-1 Turbo Gel 洗剤 (pH 6.3) (21 °GH (総硬度) の水中、3 g/L)

6. サーモリシン変異体の濾別した培養上清

【0385】

上記一連のアッセイで使用する装置は、Biomek FX Robot (Beckman Coulter)、SpectraMAX Gemini EM マイクロプレート蛍光分光計 (Molecular Devices) 及び Tetrad 2 Peltier サーマルサイクラー (Bio-Rad) を備えている。

10

【0386】

緩衝液中での熱安定性アッセイ:

サーモリシン変異体の培養上清を HEPES 緩衝液に約 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで希釈して、希釈酵素試料を 50 μl / 穴で 96 穴 PCR プレートへ移す。酵素試料 5 μL を、2.4 mM Abz-AGLA-Nba 基質溶液 195 μL を入れた黒色 96 穴アッセイマイクロプレート (例えば、Greiner 655076) に移すことにより、上記 B 欄で説明した通りに Abz-AGLA-Nba アッセイを利用して酵素試料の初期活性を測定する。残りの 45 μl / 穴の酵素試料を含む PCR プレートを接着剤箔シール (Bio-Rad B-シール) で密封し、Tetrad 2 サーマルサイクラーに入れて、83 で 15 分間インキュベートする。インキュベーション後、試料を含む PCR プレートを室温まで冷却させ、酵素試料 5 μL を、2.4 mM Abz-AGLA-Nba 基質溶液 195 μL を入れた黒色 96 穴アッセイマイクロプレート (例えば、Greiner 655076) に移すことにより、上記 B 欄で説明した通りに Abz-AGLA-Nba アッセイを利用して酵素試料の残留活性を測定する。

20

【0387】

熱安定性活性は、加熱インキュベーション後の酵素活性を加熱インキュベーション前の酵素活性で除したものに基づいて算出し、残留活性 (%) として表す。熱安定性に関する性能指数は、変異体酵素の活性比を、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する同様に処理した野生型サーモリシンの活性比と比較することで決定される。

30

【0388】

洗剤安定性試験:

サーモリシン変異体の洗剤安定性は、変異体をストレス条件下、Sun All-in-1 Turbo Gel (Unilever, The Netherlands) として商業的に既知の自動食器洗浄用液体洗剤の 0.3% (w/v) 溶液中及 AT 処方洗剤 (pH 8) (E 欄に記載のもの) の 0.25% (w/v) の溶液中、高温でインキュベートすることによりモニターする。市販の Sun All-in-1 Turbo Gel 洗剤中の酵素を、10% 洗剤溶液を 80 で 2 時間インキュベートすることで熱失活させる。インキュベーション終了時、測定された pH 値は 6.3 である。

40

【0389】

サーモリシン変異体の培養上清を洗剤溶液で約 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで希釈して、希釈された酵素試料を 96 穴 PCR プレートに 50 μl / 穴で移す。PCR プレートを接着剤箔シール (Bio-Rad-B シール) で密封させ、Tetrad 2 サーマルサイクラーに入れて 15 分間にわたってインキュベートする。インキュベーション温度は、インキュベーション後の野生型サーモリシンの残留活性が初期活性の約 30% となるように選択する。熱失活させた Sun All-in-1 Turbo Gel 中の試料を 81 で 15 分間インキュベートし、また、AT 処方洗剤 (pH 8) 中の試料を 69 で 15 分間インキュベートする。インキュベーション後、試料を含む PCR プレートを室温まで冷却し、酵

50

素試料 5 μ L を、2.4 mM Abz-AGLA-Nba 基質溶液 195 μ L を含む黒色 96 穴アッセイマイクロプレート（例えば、Greiner 655076）に移すことにより、B 欄で説明した通りに Abz-AGLA-Nba アッセイを利用して、酵素試料の残留活性を測定する。

【0390】

洗剤活性比は、熱インキュベーション後の洗剤溶液の酵素活性を熱インキュベーション前の HEPES 緩衝液中での酵素活性によって除したものに基いて算出し、残留活性（％）として表す。

【0391】

洗剤安定性に関する性能指数は、変異体酵素の活性比を、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する同様に処理された野生型サーモリシン酵素と比較することにより決定される。

10

【0392】

D.PAS-38 微小布見本アッセイ

サーモリシン変異体の洗浄性能を、予め卵黄と色素でシミをつけたポリアクリル織物片上での微小布見本アッセイ（Center for Test materials、CFT、The Netherlands）を利用して 96 穴マイクロプレート形式で試験する。プロテアーゼ洗浄性能アッセイの原理は、微小布見本に付けられた卵黄の加水分解に基づく卵黄粒子とカーボンブラック染料との遊離に基づいている。洗浄液の 405 nm での吸光度を測定することで、分析試料中のプロテアーゼ活性の測定が得られる（pH、温度及び洗剤などの所望の条件下）。

20

【0393】

使用した試薬及び溶液：

1. PAS-38 微小布見本（卵黄が付いたポリアクリル布を、エージングしてカーボンブラック染料で着色したもの；CFT-Vlaarding en、The Netherlands）

2. PAP を含む及び含まないクエン酸系洗剤（pH 8）（AT 処方、E 欄参照）

3. 熱失活させた市販の液体洗剤 Sun All-in-1 Turbo Gel

4. 100 mM CAPS 緩衝液（pH 10.2）（すすぎ用緩衝液）

5. ポリプロピレングリコールを含む希釈用緩衝液：10 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 、0.005% TWEEN（登録商標）80 溶液、10% プロピレングリコール

30

【0394】

洗剤及び条件：

プロテアーゼ試料（MTP プレート中で成長させた細菌培養物から濾別した上清）を、いくつかの条件下において好適な濃度で試験する。

- AT 処方洗剤（pH 6）、50、アッセイ中でのプロテアーゼ最終濃度約 0.3 μ g/ml

- AT 処方洗剤（pH 8）、50、アッセイ中でのプロテアーゼ最終濃度約 0.2 μ g/ml

- AT 処方洗剤（pH 8）+ PAP、50、アッセイ中でのプロテアーゼ最終濃度約 0.15 μ g/ml

40

- Sun All-in-1 Turbo Gel 洗剤（pH 6.3）、50、アッセイ中でのプロテアーゼ最終濃度約 0.5 μ g/ml

【0395】

方法

PAS-38 布見本を直径 5 mm 片に切断して、96 穴マイクロプレートの各穴に入れる。培養上清試料を希釈緩衝液で約 10 μ g/ml に希釈する。Biomek FX ピペティングロボットを利用して洗剤溶液及び希釈酵素試料を、PAS-38 微小布見本を入れた 96 穴マイクロプレートに最終容量 180 μ l/穴となるように加える。MTP を接着剤シールで密封し、iEMS インキュベータ/シェーカー（Thermo Scie

50

ntific)に入れて1150RPMで振とうさせながら50 30分間インキュベートする。インキュベーション後、各穴から得た洗浄液100μLを新たなMTPへ移し替えて、SpectraMAXマイクロプレート分光光度計(Molecular Devices)を利用して405nmでの吸光度を測定する。この吸光度値は「初期液体性能値」と呼ぶ。微小布見本プレートに残った洗浄液を破棄した後、微小布見本を水200μLで一回すすぐ。最後に、0.1M CAPS緩衝液180μLを各穴に加えて、MTPをiEMSインキュベータ/シェーカーにおいて1150RPMで振とうさせながら50 で更に10分間インキュベートする。インキュベーション工程後、液体100μLを再度新たなMTPに移し替えて、405nmでの吸光度をSpectraMAXマイクロプレート分光光度計(Molecular Devices)を利用して測定する。この吸光度値は「すすぎ液値」と呼ぶ。2つの測定値(「初期液体性能値」及び「すすぎ液値」)を足して、「全体性能値」とする。

10

【0396】

微小布見本と洗剤を含むが酵素を含まない対照用の穴も、バックグラウンド減算処理のために含める。

【0397】

洗浄性能の算出

吸光度測定値をブランク値(酵素の非存在下での微小標本のインキュベート後に得られたもの)に対して補正すると、得られた吸光度値は加水分解活性の測定である。各試料の性能指数(PI)を算出する。洗浄性能指数に関するPI計算では、野生型サーモリシンをベースとするラングミュアカーブフィットを利用する。変異体のタンパク質濃度を用い、カーブフィットに基づいて性能期待値を算出する。性能実測値を性能計算値で除して、次いで、この値を、配列番号3のアミノ酸配列を有する野生型サーモリシン酵素の性能値で除する。

20

【0398】

E. 洗剤:

次の2種類の洗剤を使用する。

1. Sun ALL-in-1 Turbo Gel(Unilever、The Netherlands)(2010年に市販されていたものを購入)

2. 以下の表1.1に示す成分の、AT処方洗剤

30

【0399】

【表82】

表1.1. AT処方洗剤の組成

成分	濃度 mg/ml
MGDA (メチルグリシン二酢酸)	0.143
クエン酸ナトリウム	1.86
クエン酸**	適宜変動あり
PAP* (過酸N,N-フタロイルアミノペルオキシカプロン酸)	0.057
Plurafac(登録商標)LF 301 (非イオン性界面活性剤)	0.029
クエン酸ビスマス	0.006
Bayhibit(登録商標)S (ホスホノブタントリカルボン酸ナトリウム塩)	0.006
Acusol(商標)587 (ポリリン酸カルシウム抑制剤)	0.029
PEG 6000	0.043
PEG 1500	0.1

40

* PAPは、AT処方にのみ添加して、AT処方洗剤(pH 8) + PAPを調製した

50

。 * * A T 処方洗剤の pH は、クエン酸によって所望の値に調節する。安定性試験及び洗浄性能アッセイではいずれも、21 ° G H 水中で 0 . 2 5 % の溶液を用いる。

【 0 4 0 0 】

F . タンパク質定量

培養上清からのサーモリシン変異体のタンパク質定量は、A g i l e n t 1 2 0 0 H P L C システムを用いて行う。希釈用緩衝液 (1 0 m M N a C l 、 0 . 1 m M C a C l ₂ 、 0 . 0 0 5 % T W E E N (登録商標) - 8 0 溶液、1 0 % プロピレングリコール) 中において、精製野生型サーモリシンタンパク質 (濃度は A 2 2 2 における吸光度を用いて求めた) を用いて検量線 (1 8 p p m ~ 4 0 0 p p m) を作成する。試料を全て 9 6 穴マイクロプレートに移し替えて、塩酸 (0 . 3 M 最終濃度) で前処理して、4 で 5 分間インキュベートする。オートサンプラーを用いて試料をサイズ排除クロマトグラフィーのカラム B i o S u i t e 2 5 0 (4 μ m U H R 、 4 . 6 × 3 0 0 m m (W a t e r s C o r p o r a t i o n 、 M i l f o r d 、 M a s s a c h u s e t t s)) に充填する前に、試料を最終濃度 2 % (w / v) のドデシル硫酸ナトリウム (S D S) によって処理する。2 5 m M リン酸ナトリウム (p H 6 、 2 % (w / v) の S D S 含有) を用いて、試料をカラムから溶出させる。流速は、1 4 分間の測定中、0 . 4 m L / 分とする。試料の吸光度を、U V 検出器を用いて 2 2 2 n m で測定し、タンパク質濃度を検量線に基づいて決定する。

【 0 4 0 1 】

酵素変異体の発現を、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するバチルス・サーモプロテオリティカスのサーモリシン酵素の発現と比較することにより、性能指数を判定する。

【 0 4 0 2 】

(実施例 2)

バチルス・サーモプロテオリティカスサーモリシン部位評価ライブラリ (「 S E L 」) の作製

サーモリシン様プロテアーゼ (T L P) は、ペプチダーゼファミリー M 4 のファミリーメンバーであって、そのプロトタイプがサーモリシン (T L N ; E C 3 . 4 . 2 4 . 2 7) である。バチルス・サーモプロテオリティカスから分泌された中性メタロエンドペプチダーゼであるサーモリシン (E C 3 . 4 . 2 4 . 2 7) のアミノ酸配列は、T i t a n i e t a l によって最初に報告された (T i t a n i e t a l . , A m i n o - a c i d s e q u e n c e o f t h e r m o l y s i n . N a t u r e N e w B i o l . 2 3 8 : 3 5 ~ 3 7 頁 (1 9 7 2 年)) 。その後、この酵素に関する遺伝子は O ' D o n o h u e e t a l によってクローニングされて (O ' D o n o h u e , M . J 著、C l o n i n g a n d e x p r e s s i o n i n B a c i l l u s s u b t i l i s o f t h e n p r g e n e f r o m B a c i l l u s t h e r m o p r o t e o l y t i c u s R o k k o c o d i n g f o r t h e t h e r m o s t a b l e m e t a l l o p r o t e a s e t h e r m o l y s i n . B i o c h e m . J . 3 0 0 : 5 9 9 ~ 6 0 3 頁 (1 9 9 4 年)) 、配列は U n i P r o t K B / S w i s s - P r o t の受託番号 P 0 0 8 0 0 (配列番号 4) として示された。T i t a n i e t a l と O ' D o n o h u e e t a l により報告されたタンパク質配列は、3 7 位の A s n (A s p の代わりとして) 及び 1 1 9 位の G l n (G l u の代わりとして) のみが相違することが確認されている。

【 0 4 0 3 】

バチルス・サーモプロテオリティカスのサーモリシンの完全長タンパク質 (O ' D o n o h u e , M . J 著、B i o c h e m . J . 3 0 0 : 5 9 9 ~ 6 0 3 頁 (1 9 9 4 年)) (配列番号 4 で表されるもの) は、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシン (C h e n e t a l . , E x t r e m o p h i l e s 8 : 4 8 9 ~ 4 9 8 頁 (2 0 0 4) 、及び P C T 国際特許出願公開第 W O 2 0 0 9 / 0 5 8 3 0 3 に記載されているもの) 、バチルス・ステアロサーモフィルスの n p r S 遺伝子の産物 (N i s h i y a

、Y. 及び Imanaka, T.、(1990年) J. Bacteriol. 172: 4861~4869頁)、及びバチルス・ステアロサーモフィルスの nprM 遺伝子 (M. Kubo 及び T. Imanaka, J. Gen. Microbiol. 134: 1883~1892頁、1988年) と 99% 超の同一性を示す。そのため、用語「サーモリシン」、「ステアロリシン」、「バシロリシン」、「プロテイナーゼ T」、「PrT」、「サーモリシン様プロテアーゼ」及び「TLP」は本明細書ではほぼ同じ意味で使用され、いずれもバチルス・サーモプロテオリティカスの中性メタロプロテアーゼ酵素を表す。

【0404】

バチルス・サーモプロテオリティカスのサーモリシンの完全長タンパク質 (配列番号 4) に係る配列とゲオバチルス・カルドプロテオリティカス (配列番号 5) に係る配列とは、115 位における Ser の代わりとしての Ala の存在 (プロ領域内) のみが相違し、これはその位置におけるコドン中の 1ヌクレオチドの変化に起因する (TCG から GCG)。

10

【0405】

部位評価ライブラリ (SEL) を作製するために、pHPLT - プロテイナーゼ T プラスミドを BaseClear (Leiden, The Netherlands) 社に提供した。このプラスミドは、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカスのサーモリシンタンパク質コード配列をコードする。完全長タンパク質アミノ酸配列 (配列番号 2) は、当初クローニングされた分子のプロ領域内のアミノ酸が 1つ異なるものである (配列番号 5) が、どちらもアミノ酸 316 個の同一の成熟タンパク質を産生する。サーモリシン成熟タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 3 で表される。サーモリシンの成熟タンパク質の各部位におけるポジショナルライブラリは、BaseClear 社により作製された。

20

【0406】

この枯草菌の発現プラスミドである pHPLT - プロテイナーゼ T は、以下に示すサーモリシン発現カセット、すなわちバチルス・リケニフォルミス LAT プロモーター (Plat) と、レプリカーゼ遺伝子 (reppUB) を包含する pUB110 の追加のエレメント (McKenzie et al., Plasmid, 15: 93~103頁、1986年) と、ネオマイシン/カナマイシン耐性遺伝子 (neo) 及びブレオマイシン耐性マーカー (bleo) と、を含んでいる (米国特許第 6,566,112 号、図 4 を参照)。pHPLT - プロテイナーゼ T のプラスミドマップを図 1 に示す。サーモリシン発現カセットの配列を、以下の配列番号 1 で表す。

30

【0407】

配列番号 1 は、発現プラスミド pHPLT - プロテイナーゼ T 由来のサーモリシン遺伝子のヌクレオチド配列を示している (ネイティブシグナル配列は小文字で、ネイティブプロペプチドは下線を付した小文字で、そして成熟配列は大文字でそれぞれ表す)。

atgaaatgaaatgaaatgacatcggttggtctgcagcaggactagcgcccaagtattttaccttacaatgcgctggcttcaacggaacacgttacat
ggaaccaacaatttcaaacccctcaattcatctccgggatctgctgaaagtgaatggcacatccccagaagaactcgtctaatatgtgaaaaaac
gaaaacaagttaatttcatgaaaacgctaaggatactctacaattgaagaaaaagaaaaatgataacctgggtttacgtttatgcacttccaacaacgt
ataaagggaltcctgtgtttggagcagtagtaactggcacgtgaaagatggcacgctgacggcgctatcaggggacactgaltccgaatttggacacga
aaggatccttaaaaaagcgggaagaattgagtgagaacaagcgcgtgacattgctgaaaaagatttagtgcaaatgtaacaaaggaagtaccggaa
tatgaacagggaaaagacaccgagtttctgtttatgtcaatggggacgaggcttctttagcgtacgttgcatttaacttttaactcctgaaccagggaaa
ctggctgtatcatltagccgtagacggaaaaattttaataaatttaaccaactgacggcgcaaaaccagggtgacgtcaagtgcATAACAGG
AACATCAACTGTCGGAGTGGAAGAGGAGTACTTGGTGATCAAAAAATATTAATACAACC
TACTCTACGTACTACTATTTACAAGATAAATACCGTGGAATGGGATTTTCACGTATGATGC
GAAATACCGTACGACATTGCCGGGAAGCTTATGGGCAGATGCAGATAACCAATTTTTTTCG
AGCTATGATGCTCCAGCGGTTGATGCTCATTATTACGCTGGTGTGACATATGACTACTATAA
AAATGTTTCATAACCGTCTCAGTTACGACGGAAATAATGCAGCTATTAGATCATCCGTTTCATT
ATAGCCAAGGCTATAATAACGCATTTTGAACGGTTCGCAAATGGTGTATGGCGATGGTGA
TGGTCAAACATTTATTCCACTTTCTGGTGGTATTGATGTGGTCGCACATGAGTTAACGCATG
CGGTAACCGATTACACAGCCGGACTCATTTATCAAAACGAATCTGGTGCAATTAATGAGGC
AATATCTGATATTTTTGGAACGTTAGTCGAATTTACGCTAACAAAAATCCAGATTGGGAAA
TTGGAGAGGATGTGTATACACCTGGTATTTACAGGGGATTTCGCTCCGTTTCGATGTCCGATCCG
GCAAAGTATGGTGTATCCAGATCACTATTCAAAGCGCTATACAGGCACGCAAGATAATGGCG
GGGTTTCATATCAATAGCGGAATTATCAACAAAGCCGCTTATTTGATTAGCCAAGGCGGTACG
CATTACGGTGTGAGTGTGTCGGAATCGGACGCGATAAATTGGGGAAAATTTTCTATCGTGC
ATTAACGCAATATTTAACACCAACGTCCAACTTTAGCCAACTTTCGTGCTGCCGCTGTTCAAT
CAGCCACTGACTTGTACGGTTCGACAAGCCAGGAAGTCGCTTCTGTGAAGCAGGCCTTTGAT
CGGGTAGGGGTGAAA

10

20

【 0 4 0 8 】

30

配列番号 2 は、発現プラスミド p H P L T - プロテイナーゼ T 由来のサーモリシン遺伝子のアミノ酸配列を示している（ネイティブシグナル配列は小文字で、ネイティブプロペプチドは下線を付した小文字で、そして成熟配列は大文字でそれぞれ表す）。

mkmkmlasfglaaglaaqvflpynalastehvtwnqqfqtppqfisdllkvngtspeelvyyqyveknknkfkfhenakdtlqlkkeknndnlgt
fmhfqqtykqipvfgaavvtahvkdgtltalsgtlipnldtkgslkskklsekqardiaekdlvanvtkevpeyegkdtefvvyvngdeaslayvv
nlfnltppegnwlyiidavdgkilnkfnqldaakpgdvksITGTSTVGVGRGVLGDQKNINTTYSTYYYLQDNTRGN
GIFTYDAKYRTTLPGLSWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNA
AIRSSVHYSQGYNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVAHELTHAVTDYTAGLIYQNES
GAINEAISDIIFGTLVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRSMSDPAKYGDPDHYSKRYTGTQD
NGGVHINSGIINKAAYLISQGGTHYGVSVVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPSNSFQLRAAAVQS
ATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK

40

【 0 4 0 9 】

配列番号 3 は、P H P L T - プロテイナーゼ T プラスミドによって産生されたサーモリシン成熟タンパク質アミノ酸配列を示している（残基数 3 1 6 ）。

ITGTSTVGVRGVLGDQKNINTTYSTYYYLQDNTRGNGIFTYDAKYRTTL
 PGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNAI
 RSSVHYSQGYNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVAHELTHAVTD
 YTAGLIYQNESGAINEAISDIFGTILVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGD
 SLRMSMDPAKYGDPDHYSKRYTGTQDNGGVHINS~~GI~~INKAAYLISQGGTH
 YGVS~~V~~VVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQSATDLYGSTS
 QEVASVKQAFDAVGK

【 0 4 1 0 】

10

配列番号 4 は、バチルス・サーモプロテオリティカス *UniProtKB/Swiss-Prot* (受託番号 P00800) 由来のサーモリシンの完全長アミノ酸配列を示している。

mkmkmlasfllaaglaaqlpynalastehvtwnqqfqtppqfsgdillkvngtspeelvyqyveknenkfkfhenakdtlqlkekknndnlgtf
fmrffqqttykgipvfagavvtshvkdgtltalsgtlipnldtkgslksgkksekqardiaekdlvanvtkevpeyegkdtefvvyvngdeaslayyv
nlntfpepgnwlyiidavdgkilnkfnqldaakpgdvksITGTSTVGVRGVLGDQKNINTTYSTYYYLQDNTRGN
 GIFTYDAKYRTTLPGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNA
 AIRSSVHYSQGYNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVAHELTHAVTDYTAGLIYQNES
 GAINEAISDIFGTILVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRSMDPAKYGDPDHYSKRYTGTQD
 NGGVHINS~~GI~~INKAAYLISQGGTHYGVSVVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQS
 ATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGK

20

【 0 4 1 1 】

配列番号 5 は、ゲオバチルス・カルドプロテオリティカス由来のサーモリシンの完全長アミノ酸配列を示している (Chen et al., (2004 年)、*Extremophiles* 8: 489~498 頁、及び PCT 国際特許出願公開第 WO2009/058303 号に記載されている)。

mkmkmlasfllaaglaaqlpynalastehvtwnqqfqtppqfsgdillkvngtspeelvyqyveknenkfkfhenakdtlqlkekknndnlgtf
fmrffqqttykgipvfagavvtahvkdgtltalsgtlipnldtkgslksgkksekqardiaekdlvanvtkevpeyegkdtefvvyvngdeaslayyv
nlntfpepgnwlyiidavdgkilnkfnqldaakpgdvksITGTSTVGVRGVLGDQKNINTTYSTYYYLQDNTRGN
 GIFTYDAKYRTTLPGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNA
 AIRSSVHYSQGYNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVAHELTHAVTDYTAGLIYQNES
 GAINEAISDIFGTILVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRSMDPAKYGDPDHYSKRYTGTQD
 NGGVHINS~~GI~~INKAAYLISQGGTHYGVSVVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQS
 ATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGK

30

【 0 4 1 2 】

サーモリシン変異体の産生

40

316 個の残基それぞれのポジショナルライブラリは、BaseClear BV (Leiden、The Netherlands) によって作製された。このライブラリは、成熟タンパク質の 316 個の位置でサーモリシン変異体配列コードする発現プラスミドを含む形質転換枯草菌細胞から構成された。各変異体を、DNA シークエンシング分析によって確認した後、タンパク質活性を評価した。個々のクローンを、以下の説明通りに培養して、機能的特徴付けのために異なるサーモリシン変異体を得た。

【 0 4 1 3 】

タンパク質の発現

サーモリシン変異体を含む枯草菌形質転換体を 96 穴プレートにおいてネオマイシン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む MTP トリブチックソイブロス (TSB) 中で 16 時間培養し、この

50

予備培養物 10 μ l を、ネオマイシン 10 μ g/ml を含む培養培地（以下に説明するもの）190 μ l を満たした Corning 3599 MTP に添加した。このプレートを 37℃、湿度 80% で、300 rpm の定速回転で混合させながら 22 ~ 26 時間インキュベートした。2500 rpm で 10 分間遠心分離することによって細胞を回収し、それを、Millipore 減圧システムを利用して Millipore Multiscreen フィルタープレートで濾過した。回収後、培養上清にプロピレングリコールを最終濃度が 10% となるように加えて、これらの試料をアッセイに用いた。培養培地は、リン酸緩衝液ベースで、主要炭素源としてグルコース及びマルトデキストリンを含む、半合成強化培地であり、ロバストな細胞成長のために 0.2% ソイトン及び 0.14% 酵母エキスを追加した。

10

【0414】

（実施例 3）

組み合わせ可能な変異の同定

生産的位置は、改善された特徴を示すコンビナトリアル変異体を製造するのに最も有用な分子内位置として記載され、この位置では、少なくとも 1 種の組み合わせ可能な変異が生じ得る。組み合わせ可能な変異は、コンビナトリアルな変異体を作製するのに使用することのできる、これらの分子内の置換として記載され得る。組み合わせ可能な変異は、コンビナトリアル変異体を作製することのできる分子内の置換として記載され得る。

【0415】

20

組み合わせ可能な変異は、この分子の所望の特性のうち少なくとも 1 種を改善するが、発現、活性、又は安定性のいずれかを有意に低下させないものである。サーモリシンにおける組み合わせ可能な変異は、実施例 1 で説明したアッセイ（Abz-AGLA-Nba プロテアーゼアッセイ（活性）、PAS-38 微小布見本アッセイ（活性）、洗剤安定性及び熱安定性アッセイ、並びにタンパク質定量（発現））で得られた性能指数（PI）値を用いて決定した。

【0416】

組み合わせ可能な変異の他に、サーモリシンにおける第二の群の変異は、組み合わせ可能な活性を有する変異である。組み合わせ可能な活性を有する変異は、この分子の活性特性のうち少なくとも 1 種を改善し、性能指数が 1.5 以上であるが、発現又は安定性の P I 値を 0.5 より下に低下させないものである。

30

【0417】

組み合わせ可能な変異は、次の基準に従って分類されている（表 3.1 に要約する）。

親酵素サーモリシンと比較して、pH 6 又は pH 8 での PAS-38 微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nba に対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数（PI）が 0.9 以上であり、更にこれらの試験のうちいずれか一つの PI が 1.0 以上である変異体（グループ A）

【0418】

親酵素サーモリシンと比較して、pH 6 又は pH 8 での PAS-38 微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nba に対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数（PI）が 0.8 以上であり、更にこれらの試験のうちいずれか一つの PI が 1.2 以上である変異体（グループ B）

40

【0419】

親酵素サーモリシンと比較して、pH 6 又は pH 8 での PAS-38 微小布見本の洗浄、Abz-AGLA-Nba に対する活性、洗剤安定性及び熱安定性に関する最小性能指数（PI）が 0.5 以上であり、更にこれらの試験のうちいずれか一つの PI が 1.5 以上である変異体（グループ C）

【0420】

【表 8 3】

表 3. 1 サーモリシン変異体の組み合わせ可能な変異を分類するのに用いられる基準の要約

グループ	発現 PI	洗浄 (pH 6又はpH 8のとき) PI	合成基質活性 PI	安定性 (洗剤又は熱) PI	1種以上の 試験におけるPI (少なくともX)
A	≥ 0.9	≥ 0.9	≥ 0.9	≥ 0.9	$X \geq 1.0$
B	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 0.8	$X \geq 1.2$
C	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	$X \geq 1.5$

10

【0 4 2 1】

グループ A、B 及び C には、更に、複数の置換に関する寛容度が異なるアミノ酸位置が含まれている。生産的位置を同定するために、各位置で許容される置換の程度を測定して、各位置に生産性スコアを割り当てた。生産性スコアは、以下に示す基準の組を用いて、グループ A、B、又は C に該当するそれぞれの位置での置換の百分率（試験した全変異体に基づいて算出）に照らして割り当てた。

【0 4 2 2】

生産的位置は、複数の置換に対してある程度の寛容度を示し、なおかつ以降に示す通りの組み合わせ可能性に関する基準の組を満たす位置と定義される。

20

【0 4 2 3】

生産的位置の生産性スコアを決定するための基準は次の通りである。

- ・所定の位置での置換の 15 % 未満がグループ A、B 又は C に当てはまる位置に、生産性スコア「1」を与える。
- ・所定の位置での置換の 15 % 以上 40 % 未満が A、B 又は C に当てはまる位置に、生産性スコア「2」を与える。
- ・所定の位置での置換の 40 % 以上 75 % 未満が A、B 又は C に当てはまる位置に、生産性スコア「3」を与える。
- ・所定の位置での置換の 75 % 以上が A、B 又は C に当てはまる位置に、生産性スコア「4」を与える。

30

【0 4 2 4】

これらアミノ酸置換は、更に、置換が出現するグループ（グループ A、B、C）に基づいて適性スコアが割り当てられるが、適性スコアは大きいほど、コンビナトリアル変異体の作製に使用するのにより適した置換を表す。適性スコアを表 3. 2 に規定する。

【0 4 2 5】

【表 8 4】

表 3. 2 は、組み合わせ可能な変異及び生産的位置のグループに関連する各適性スコアを規定する。

グループで生じる置換:	適性スコア
グループ A、B 及び C	+++++
グループ A 及び B	++++
グループ A 又は (グループ B 及び C)	+++
グループ B	++
グループ C	+

40

【0 4 2 6】

表 3. 3 に、前述の生産性スコア「4」に該当するサーモリシンにおける生産的位置と、その位置において組み合わせ可能な置換とを示す。位置のナンバリングは、配列番号 3 に記載された成熟サーモリシンタンパク質に基づくものである。

【0 4 2 7】

50

【表 8 5】

表 3. 3

位置 (POS)	置換、WT 1ST	生産性スコア
2	T, F, L, P, S, V, W, Y, Q, A, C, I, K, M	4
26	T, K, L, R, V, Y, W, F, G, H, I, M, C, D	4
47	R, A, C, H, K, N, D, E, G, L, M, Q, T	4
49	T, A, D, F, H, I, S, W, L, N, Q, V, E, M, Y	4
53	S, F, H, I, M, Q, T, W, K, R, A, N, V, C, L	4
65	S, I, M, Q, V, L, T, W, A, D, E, P, Y	4
87	V, D, E, G, I, S, P, R, T, C, K, L, M, N, Q, W, Y	4
91	L, D, E, F, K, M, P, Q, S, A, N, R, W, Y	4
96	N, C, D, I, V, F, T, G, H, Q, R, S, W, K, L, Y	4
108	Q, C, E, F, H, A, D, I, K, N, L, M	4
118	S, C, G, E, A, D, M, Q, R, T, V	4
128	Q, C, D, E, R, S, V, I, K, A, L, Y	4
154	G, L, Q, S, T, D, I, W, C, N, A, H, K, M, Y	4
179	Y, A, D, H, M, N, Q, S, T, W, F	4
196	G, D, E, T, K, R, V, H, L, Y, A, W	4
197	I, D, K, L, T, V, W, Y, A, H, N, E, Q, R, F, C	4
198	S, C, E, F, G, H, I, P, Q, T, V, M, N, R, W, A, K	4
199	G, C, E, F, H, Q, S, T, W, L, A, Y	4
209	A, D, E, L, S, T, V, G, I, K, P, R, Y, C, M	4
211	Y, A, C, D, F, G, H, I, L, N, Q, S, T, E, R	4
217	Y, Q, S, T, V, W, G, A, F, M, N, C, L	4
219	K, D, F, G, H, I, M, N, Q, T, A, E, R, S	4
225	Q, D, G, H, I, P, V, W, A, M, R, C, E, K, L, S	4
232	I, C, E, F, K, M, N, Q, W, G, L, R, S, T, V, Y	4
256	V, L, T, K, A, D, F, G, H, R, S, N	4
257	G, C, D, E, L, N, P, Q, S, T, Y, K, R	4
259	G, A, C, E, F, H, L, M, W, K, R, N, S, T	4
261	D, A, N, P, V, W, G, H, I, S	4
265	K, A, C, D, M, P, Q, S, G, I, L, R, N	4
267	F, E, G, N, S, V, W, A, C, H, I, K, L, M, T, Y	4
272	T, E, L, V, W, P, Y, C, F, N, Q, A, K	4
276	T, C, F, I, P, Q, W, H, A, L, V, Y	4
277	P, Q, S, T, E, F, G, H, N, R, V, W, A, D, Y	4
286	A, D, E, F, G, H, I, S, P, C, Q, R, T, K, L, M, N, Y	4
289	V, C, E, F, G, I, N, S, W, R, T, L, M, Y, A	4
290	Q, C, D, F, G, L, W, Y, R, T, V, A, H, N	4
293	T, C, E, F, G, H, Q, S, N, V, W, A, I, K, L, M, Y	4
295	L, C, I, N, T, V, F, G, A, K, M, W	4
298	S, C, T, W, Y, E, N, P, A, G, K, M, R	4
299	T, C, F, L, M, R, W, P, D, Q, N, A, K	4
300	S, C, K, M, R, Y, I, L, H, P, V, W, A, G, T, D, N	4
301	Q, E, H, P, R, L, C, F, G, W, M, S, T, V, K	4
303	V, C, H, G, K, L, R, W, A, P, Y	4
305	S, G, I, L, N, W, Y, Q, H, T, V, A, K, M	4
308	Q, C, D, F, G, I, M, R, V, W, Y, A, L	4
311	D, C, E, F, G, I, Q, S, T, A, K, L, M, V, W, Y	4
316	K, D, E, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, V, W, Y, A, M	4

【0 4 2 8】

表 3. 4 に、前述の生産性スコア「3」に該当するサーモリシンにおける生産的位置と

10

20

30

40

50

、その位置において組み合わせ可能な置換とを示す。位置のナンバリングは、配列番号 3 に記載された成熟サーモリシンタンパク質に基づくものである。

【 0 4 2 9 】

【表 8 6】

表 3. 4

位置 (POS)	置換、WT 1ST	生産性スコア
1	I, K, M, V, A, H, W, Y, C, L	3
4	T, E, A, N, R, V, K, L, M, Y	3
17	Q, I, W, Y, C, R, V, T, L	3
25	S, D, F, A, C, K, M, R	3
40	F, E, G, M, Q, S, Y, W, A, K, L	3
45	K, E, L, S, F, H, Q, Y, A, G, M	3
56	A, K, Q, V, W, H, I, Y, E, M	3
58	A, N, Y, C, V, E, L	3
61	Q, M, R, W, F, V, C, I, L	3
74	H, E, L, V, C, F, M, N, Q, W	3
86	N, L, S, Y, A, C, E, F, G, K, D	3
97	N, K, C, R, S, Y, E, M	3
101	R, T, C, L, S, H	3
109	G, A, L, S, E, M, R, W	3
149	T, M, V, A, L, D, S, N	3
150	D, A, F, K, N, Q, T, V, S	3
158	Q, A, K, M, N, L, R, Y, S	3
159	N, R, W, A, C, G, M, T, S, Y	3
172	F, G, L, M, Q, S, V, W, Y, D, H	3
181	N, L, A, G, K, M, T, S	3
214	P, C, G, K, S, N, A, R	3
216	H, C, E, S, T, R, A	3
218	S, K, L, Y, F, G, T, V	3
221	Y, K, N, Q, R, S, T, V, A, F, G, M	3
222	T, C, D, L, Y, I, V, A, M, K	3
224	T, K, M, F, L, P, Q, V, Y, E, H	3
250	H, A, C, K, M, N, P, Q, R, V, Y	3
253	V, N, T, I, R, Y, M, Q	3
254	S, A, M, R, Y, K, L, N, V, W	3
258	I, E, L, M, N, R, S, A, C, K, Q, V	3
263	L, C, I, Q, T, H, K, N, V, A, M	3
264	G, C, R, A, N, P, Q, S, T	3
266	I, A, F, L, S, C, M, T, V	3
268	Y, M, Q, V, A, S, K	3
271	L, A, D, F, I, N, Y, H	3
273	Q, A, H, Y, C, S, W, E, G, N	3
275	L, I, M, V, C, Q, S, T	3
278	T, G, K, R, Y, C, H, M, N, Q, S	3
279	S, A, D, I, L, M, N, Q, T, G	3
280	N, A, C, D, E, G, Q, H, T	3
282	S, K, N, R, A, H, L, M, T	3
283	Q, K, L, P, R, W, Y, S	3
287	A, I, L, N, V, Y, K, R, T, D, C	3
288	A, C, I, S, T, V, Y, N, L, M	3
291	S, E, I, L, M, N, V, A, T	3
297	G, A, M, R, Y, C, F, K, T, D, N	3
302	E, K, L, G, T, V, D, Q, A	3
304	A, C, D, L, N, R, S, T, W, E, K, Y	3
307	K, A, C, G, I, M, N, Q, R, W, Y, H	3
312	A, G, M, V, L, N, R, T, C	3

表 3 . 5 に、前述の生産性スコア「2」に該当するサーモリシンにおける生産的位置と、その位置において組み合わせ可能な置換とを示す。位置のナンバリングは、配列番号 3 に記載された成熟サーモリシンタンパク質に基づくものである。

【 0 4 3 1 】

【表 8 7 - 1 】

表 3 . 5

位置 (POS)	置換、WT 1ST	生産性スコア
5	S, D, N, P, H, L	2
9	V, L, T, I	2
11	R, I, Y, K	2
19	N, L, Y, K, S	2
27	Y, W, A, M, V, C, L	2
31	Q, A, K, V, I, C, Y	2
33	N, S, T, K, A, C, L, M	2
37	N, D, Q, R, L, K	2
46	Y, L, H, N, C	2
64	A, H, Q, T, D, E	2
73	A, I, F, L, M, W	2
76	Y, H, L, M, Q, T	2
79	V, L, Q, T, A, N, S	2
80	T, I, D, A, L, N	2
85	K, E, A, L, N, R, S	2
89	N, L, M, H	2
95	G, A, D, H, M, N, S	2
98	A, C, E, H, R, Y, K, V	2
99	A, E, K, P, R, S	2
107	S, D, K, Y, A, G	2
127	G, C, D, E	2
129	T, I, R, E, Y, L, M	2
131	I, Y, W, L	2
137	I, P, A, E, T, V, L	2
141	A, S, C, G	2
145	T, A, C, E, G, M, N, Q	2
148	V, L, N, Y, M, A, Q	2
151	Y, K, G, H, S, W	2
152	T, S, L, M, G	2
155	L, C, I, M	2
156	I, M, T, L, Q	2
160	E, L, Y, Q	2
161	S, A, N, P, T	2
164	I, L, N, S, T, V, C, A	2
168	I, A, M, T, L	2
171	I, C, E, F, L, S, G	2

【 0 4 3 2 】

10

20

30

40

【表 8 7 - 2】

(表 3 . 5 の続き)

位置 (POS)	置換、WT 1ST	生産性スコア
176	V, L, N, C	2
180	A, E, G, K, T, S	2
182	K, L, A, W	2
187	E, L, D	2
188	I, L, V	2
205	M, L, A, V, Q	2
206	S, A, C, K, L, M, R	2
207	D, A, H, N	2
210	K, I, L, V	2
212	G, Y, A, D, Q	2
213	D, N, S, L, A, G, W	2
220	R, K, V, A	2
227	N, D, L, Y, A	2
234	S, D, N, A, C	2
235	G, M, C, Q, S, A	2
236	I, M, A, C	2
237	I, N, F, M	2
242	Y, C, F, N, V	2
244	I, T, V, F, A, M, L	2
246	Q, E, N, T, L, C, D	2
248	G, A, E, S	2
249	T, K, M, N, L, Y, P	2
252	G, K, Y, A, S, T, W	2
255	V, L, P, A, Y, M, N	2
270	A, C, F, I, L, S, G	2
274	Y, F, H, A, C, Q, T, M	2
284	L, V, W, A, M, Y	2
294	D, A, V, Q, N	2
296	Y, N, L, R, H, W, M	2
306	V, A, S, F, I, L, T	2
309	A, G, S, T, V, C	2
310	F, A, C, W, M	2
313	V, T, A, G, L, I, C	2
314	G, A, E, H, M, S, W, Q	2
315	V, A, C, I, M, L, T	2

10

20

30

【 0 4 3 3 】

表 3 . 6 に、前述の生産性スコア「1」に該当するサーモリシンにおける生産的位置と、その位置において組み合わせ可能な置換とを示す。位置のナンバリングは、配列番号 3 に記載された成熟サーモリシンタンパク質に基づくものである。

40

【 0 4 3 4 】

【表 8 8】

表 3. 6

位置 (POS)	置換、WT 1ST	生産性スコア
3	G, Y	1
6	T, C, V	1
7	V, L, I	1
20	I, L, V	1
23	T, F, W	1
24	Y, W	1
44	A, C	1
48	T, E, D	1
50	L, P	1
57	D, K	1
63	F, Y, C	1
72	D, F, W	1
75	Y, A	1
81	Y, F	1
92	S, L	1
93	Y, T, C	1
94	D, T	1
100	I, L, V	1
102	S, G, N	1
103	S, T	1
104	V, A	1
110	Y, L	1
117	G, H	1
120	M, L	1
134	S, A, P	1
135	G, A	1
136	G, A, S	1
140	V, D	1
144	L, T	1
153	A, T	1
173	G, A, C	1
174	T, C, A	1
175	L, H, S	1
178	F, H, Y	1
183	N, S	1
185	D, E	1
189	G, A	1
193	Y, F	1
201	S, C, A	1
223	G, D, K	1
230	V, A	1
238	N, L, M	1
239	K, A	1
241	A, L, S	1
247	G, A, S	1
251	Y, M	1
260	R, A, N	1
262	K, A	1
269	R, V, K	1
285	R, K, Y	1

【 0 4 3 5 】

10

20

30

40

50

(実施例4)

組み合わせ可能な変異及び適性スコア

実施例3に示した通り、サーモリシンにおける組み合わせ可能な変異を、実施例1で説明したアッセイで得た性能指数(PI)を用いて決定した。

【0436】

組み合わせ可能な変異を、実施例3に記載の基準に照らしてグループA、B又はCに割り当てた。これらの置換に、更に、置換が出現するグループ(グループA、B、C)に基づいて適性スコアを割り当てるが、適性スコアは大きいほど、コンビナトリアル変異体を製造する際の使用に一層適した置換を表す。適性スコアを表4.1に規定する。前記基準を満たすサーモリシンの個々の置換に関する適性スコアを以下に報告する。

10

【0437】

【表89】

表4.1は、組み合わせ可能な変異及び生産的位置のグループに関連する各適性スコアを示す。

グループで生じる置換:	適性スコア
グループA、B及びC	+++++
グループA及びB	++++
グループA又は(グループB及びC)	+++
グループB	++
グループC	+

20

【0438】

適性スコア+++++の変異体:

I001L, T002A, T002C, T002I, T002K, T002M, T004K, T004L, T004M, T004Y, Q017L, N037K, F040K, F040L, K045A, K045G, K045M, T049E, T049M, T049Y, L050P, S053C, S053L, A056M, A058E, A058L, Q061L, F063C, A064D, A064E, S065A, S065D, S065E, S065P, S065Y, V087C, V087K, V087L, V087M, V087N, V087Q, V087W, V087Y, N096K, N096L, N096Y, R101H, Q108L, Q108M, G109E, G109M, G109R, G109W, S118A, S118D, S118M, S118Q, S118R, S118T, S118V, Q128A, Q128L, Q128Y, I131L, I137L, T149N, G154A, G154H, G154K, G154M, G154Y, L155M, I164A, N181S, G196A, G196W, I197C, S198A, S198K, G199A, G199Y, A209C, A209M, H216A, Y217C, Y217L, T222K, N227A, I244L, Q246D, V256N, L263A, L263M, T272K, Q273N, Y274M, P277A, P277D, P277Y, L284A, L284M, L284Y, A286K, A286L, A286M, A286N, A286Y, A287C, A288L, A288M, V289A, S291A, S291T, T293A, T293I, T293K, T293L, T293M, T293Y, L295A, L295K, L295M, L295W, Y296M, G297N, S298A, S298G, S298K, S298M, S298R, T299A, T299K, S300D, S300N, Q301K, E302A, V303A, V303P, V303Y, A304E, A304K, A304Y, S305A, S305K, S305M, V306L, V306T, A309C, F310M, D311A, D311K, D311L, D311M, D311V, D311W, D311Y, およびA312C

30

40

【0439】

適性スコア++++の変異体:

50

T 0 0 2 Q , T 0 0 4 V , V 0 0 7 I , V 0 0 9 I , R 0 1 1 K , I 0 2 0 L , I 0 2
 0 V , S 0 2 5 A , S 0 2 5 C , S 0 2 5 K , S 0 2 5 M , S 0 2 5 R , T 0 2 6 C , T
 0 2 6 D , Y 0 2 7 C , Y 0 2 7 L , N 0 3 7 L , F 0 4 0 A , A 0 4 4 C , K 0 4 5 F
 , K 0 4 5 H , K 0 4 5 Q , K 0 4 5 Y , Y 0 4 6 C , R 0 4 7 D , R 0 4 7 E , R 0 4
 7 G , R 0 4 7 L , R 0 4 7 M , R 0 4 7 Q , R 0 4 7 T , T 0 4 9 L , T 0 4 9 N , T
 0 4 9 Q , T 0 4 9 V , S 0 5 3 A , S 0 5 3 N , S 0 5 3 V , A 0 5 6 E , Q 0 6 1 C
 , Q 0 6 1 I , A 0 6 4 T , S 0 6 5 L , S 0 6 5 T , S 0 6 5 W , A 0 7 3 F , A 0 7
 3 L , A 0 7 3 M , A 0 7 3 W , H 0 7 4 C , H 0 7 4 F , H 0 7 4 M , H 0 7 4 N , H
 0 7 4 Q , H 0 7 4 W , T 0 8 0 L , T 0 8 0 N , K 0 8 5 S , N 0 8 6 D , V 0 8 7 R
 , V 0 8 7 T , L 0 9 1 A , L 0 9 1 N , L 0 9 1 R , L 0 9 1 W , L 0 9 1 Y , S 0 9
 2 L , Y 0 9 3 C , N 0 9 6 G , N 0 9 6 H , N 0 9 6 Q , N 0 9 6 R , N 0 9 6 S , N
 0 9 6 W , N 0 9 7 E , N 0 9 7 M , A 0 9 9 R , A 0 9 9 S , R 1 0 1 C , R 1 0 1 L
 , R 1 0 1 S , S 1 0 2 N , S 1 0 7 G , Q 1 0 8 I , Q 1 0 8 K , Q 1 0 8 N , G 1 0
 9 S , S 1 1 8 E , M 1 2 0 L , Q 1 2 8 I , Q 1 2 8 K , T 1 2 9 L , T 1 2 9 M , I
 1 3 1 W , S 1 3 4 P , G 1 3 6 S , I 1 3 7 E , I 1 3 7 T , I 1 3 7 V , V 1 4 0 D
 , V 1 4 8 A , V 1 4 8 Q , T 1 4 9 D , T 1 4 9 S , T 1 5 2 G , G 1 5 4 C , G 1 5
 4 N , L 1 5 5 I , N 1 5 9 S , N 1 5 9 Y , I 1 6 4 C , I 1 6 8 L , I 1 7 1 G , Y
 1 7 9 F , A 1 8 0 S , G 1 8 9 A , Y 1 9 3 F , G 1 9 6 H , G 1 9 6 L , G 1 9 6 Y
 , I 1 9 7 F , S 1 9 8 M , S 1 9 8 N , S 1 9 8 R , S 1 9 8 W , S 2 0 1 A , A 2 0
 9 G , A 2 0 9 I , A 2 0 9 K , A 2 0 9 P , A 2 0 9 R , A 2 0 9 Y , Y 2 1 1 E , Y
 2 1 1 R , P 2 1 4 A , P 2 1 4 R , Y 2 1 7 A , Y 2 1 7 F , Y 2 1 7 M , Y 2 1 7 N
 , K 2 1 9 A , K 2 1 9 E , K 2 1 9 R , K 2 1 9 S , R 2 2 0 A , Y 2 2 1 A , Y 2 2
 1 F , Y 2 2 1 G , Y 2 2 1 M , T 2 2 2 A , T 2 2 2 M , Q 2 2 5 C , Q 2 2 5 E , Q
 2 2 5 K , Q 2 2 5 L , Q 2 2 5 S , I 2 3 2 L , I 2 3 2 R , I 2 3 2 S , I 2 3 2 T
 , I 2 3 2 V , I 2 3 2 Y , S 2 3 4 A , S 2 3 4 C , G 2 3 5 A , I 2 3 6 C , I 2 4
 4 A , I 2 4 4 M , Q 2 4 6 C , V 2 5 6 S , G 2 5 7 K , G 2 5 7 R , I 2 5 8 A , I
 2 5 8 C , I 2 5 8 K , I 2 5 8 Q , I 2 5 8 V , G 2 5 9 N , G 2 5 9 S , G 2 5 9 T
 , L 2 6 3 H , L 2 6 3 K , L 2 6 3 N , L 2 6 3 V , G 2 6 4 A , G 2 6 4 N , G 2 6
 4 P , G 2 6 4 Q , G 2 6 4 S , G 2 6 4 T , K 2 6 5 N , I 2 6 6 C , I 2 6 6 M , I
 2 6 6 T , I 2 6 6 V , F 2 6 7 A , F 2 6 7 C , F 2 6 7 H , F 2 6 7 I , F 2 6 7 K
 , F 2 6 7 L , F 2 6 7 M , F 2 6 7 T , F 2 6 7 Y , R 2 6 9 K , A 2 7 0 G , L 2 7
 1 H , T 2 7 2 A , Q 2 7 3 E , Q 2 7 3 G , L 2 7 5 C , L 2 7 5 Q , L 2 7 5 S , L
 2 7 5 T , T 2 7 6 A , T 2 7 6 L , T 2 7 6 V , T 2 7 6 Y , P 2 7 7 E , P 2 7 7 F
 , P 2 7 7 G , P 2 7 7 H , P 2 7 7 N , P 2 7 7 R , P 2 7 7 V , P 2 7 7 W , S 2 7
 9 G , R 2 8 5 Y , A 2 8 6 C , A 2 8 6 Q , A 2 8 6 R , A 2 8 6 T , A 2 8 8 N , V
 2 8 9 L , V 2 8 9 M , V 2 8 9 Y , Q 2 9 0 A , Q 2 9 0 H , Q 2 9 0 N , S 2 9 1 V
 , T 2 9 3 N , T 2 9 3 V , T 2 9 3 W , D 2 9 4 N , L 2 9 5 F , L 2 9 5 G , Y 2 9
 6 W , G 2 9 7 D , S 2 9 8 E , S 2 9 8 N , S 2 9 8 P , T 2 9 9 N , S 3 0 0 A , S
 3 0 0 G , S 3 0 0 T , Q 3 0 1 M , Q 3 0 1 S , Q 3 0 1 T , Q 3 0 1 V , E 3 0 2 D
 , E 3 0 2 Q , V 3 0 3 G , V 3 0 3 K , V 3 0 3 L , V 3 0 3 R , V 3 0 3 W , A 3 0
 4 R , A 3 0 4 S , A 3 0 4 T , A 3 0 4 W , S 3 0 5 H , S 3 0 5 T , S 3 0 5 V , V
 3 0 6 I , Q 3 0 8 A , Q 3 0 8 L , F 3 1 0 C , F 3 1 0 W , D 3 1 1 F , D 3 1 1 G
 , D 3 1 1 I , D 3 1 1 Q , D 3 1 1 S , D 3 1 1 T , V 3 1 3 C , G 3 1 4 Q , V 3 1
 5 L , V 3 1 5 T , K 3 1 6 A , および K 3 1 6 M

【 0 4 4 0 】

適性スコア + + + の変異体 :

I 0 0 1 K , I 0 0 1 M , I 0 0 1 V , T 0 0 2 F , T 0 0 2 L , T 0 0 2 P , T 0 0
 2 S , T 0 0 2 V , T 0 0 2 W , T 0 0 2 Y , T 0 0 4 E , S 0 0 5 D , S 0 0 5 N , S
 0 0 5 P , T 0 0 6 C , R 0 1 1 I , Q 0 1 7 I , Q 0 1 7 W , Q 0 1 7 Y , S 0 2 5 D
 , S 0 2 5 F , T 0 2 6 K , T 0 2 6 L , T 0 2 6 R , T 0 2 6 V , T 0 2 6 Y , Y 0 2

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

, K 2 6 5 Q , K 2 6 5 S , I 2 6 6 A , I 2 6 6 F , I 2 6 6 L , I 2 6 6 S , F 2 6 7 E , F 2 6 7 G , F 2 6 7 N , F 2 6 7 S , F 2 6 7 V , F 2 6 7 W , Y 2 6 8 M , Y 2 6 8 Q , Y 2 6 8 V , A 2 7 0 C , A 2 7 0 F , A 2 7 0 I , A 2 7 0 L , A 2 7 0 S , L 2 7 1 A , L 2 7 1 D , L 2 7 1 F , L 2 7 1 I , T 2 7 2 E , T 2 7 2 L , T 2 7 2 V , T 2 7 2 W , Q 2 7 3 A , Q 2 7 3 H , Q 2 7 3 Y , Y 2 7 4 F , Y 2 7 4 H , L 2 7 5 I , L 2 7 5 M , L 2 7 5 V , T 2 7 6 C , T 2 7 6 F , T 2 7 6 I , T 2 7 6 P , T 2 7 6 Q , T 2 7 6 W , P 2 7 7 Q , P 2 7 7 S , P 2 7 7 T , T 2 7 8 G , S 2 7 9 A , S 2 7 9 D , S 2 7 9 I , S 2 7 9 L , S 2 7 9 M , S 2 7 9 N , S 2 7 9 Q , S 2 7 9 T , N 2 8 0 A , N 2 8 0 C , N 2 8 0 D , N 2 8 0 E , S 2 8 2 K , S 2 8 2 N , L 2 8 4 V , L 2 8 4 W , R 2 8 5 K , A 2 8 6 D , A 2 8 6 E , A 2 8 6 F , A 2 8 6 G , A 2 8 6 H , A 2 8 6 I , A 2 8 6 S , A 2 8 7 I , A 2 8 7 L , A 2 8 7 N , A 2 8 7 V , A 2 8 7 Y , A 2 8 8 C , A 2 8 8 I , A 2 8 8 S , A 2 8 8 T , A 2 8 8 V , V 2 8 9 C , V 2 8 9 E , V 2 8 9 F , V 2 8 9 G , V 2 8 9 I , V 2 8 9 N , V 2 8 9 S , V 2 8 9 W , Q 2 9 0 C , Q 2 9 0 D , Q 2 9 0 F , Q 2 9 0 G , Q 2 9 0 L , Q 2 9 0 W , S 2 9 1 E , T 2 9 3 C , T 2 9 3 E , T 2 9 3 F , T 2 9 3 G , T 2 9 3 H , T 2 9 3 Q , T 2 9 3 S , L 2 9 5 C , L 2 9 5 I , L 2 9 5 N , Y 2 9 6 N , G 2 9 7 A , G 2 9 7 M , G 2 9 7 R , G 2 9 7 Y , S 2 9 8 C , S 2 9 8 T , S 2 9 8 W , S 2 9 8 Y , T 2 9 9 C , T 2 9 9 F , T 2 9 9 L , T 2 9 9 M , T 2 9 9 R , T 2 9 9 W , S 3 0 0 C , S 3 0 0 K , S 3 0 0 M , S 3 0 0 R , S 3 0 0 Y , Q 3 0 1 E , Q 3 0 1 H , Q 3 0 1 P , Q 3 0 1 R , V 3 0 3 C , V 3 0 3 H , A 3 0 4 C , A 3 0 4 D , A 3 0 4 L , A 3 0 4 N , S 3 0 5 G , S 3 0 5 I , S 3 0 5 L , S 3 0 5 N , S 3 0 5 W , S 3 0 5 Y , V 3 0 6 A , V 3 0 6 S , K 3 0 7 A , K 3 0 7 C , K 3 0 7 G , K 3 0 7 I , K 3 0 7 M , K 3 0 7 N , K 3 0 7 Q , K 3 0 7 R , K 3 0 7 W , K 3 0 7 Y , Q 3 0 8 C , Q 3 0 8 D , Q 3 0 8 F , Q 3 0 8 G , Q 3 0 8 I , Q 3 0 8 M , A 3 0 9 G , A 3 0 9 S , D 3 1 1 C , D 3 1 1 E , A 3 1 2 G , A 3 1 2 M , A 3 1 2 V , V 3 1 3 T , G 3 1 4 A , G 3 1 4 E , G 3 1 4 H , G 3 1 4 M , G 3 1 4 S , G 3 1 4 W , V 3 1 5 A , V 3 1 5 C , V 3 1 5 I , V 3 1 5 M , K 3 1 6 D , K 3 1 6 E , K 3 1 6 F , K 3 1 6 G , K 3 1 6 H , K 3 1 6 L , K 3 1 6 N , K 3 1 6 P , K 3 1 6 Q , K 3 1 6 R , K 3 1 6 S , K 3 1 6 V , K 3 1 6 W , および K 3 1 6 Y

【 0 4 4 1 】

適性スコア++の変異体：

I 0 0 1 C , T 0 0 4 R , T 0 0 6 V , Q 0 1 7 T , N 0 1 9 K , N 0 1 9 S , T 0 2 3 F , T 0 2 3 W , Y 0 2 4 W , T 0 2 6 F , T 0 2 6 G , T 0 2 6 H , T 0 2 6 I , T 0 2 6 M , Y 0 2 7 M , Y 0 2 7 V , Q 0 3 1 C , Q 0 3 1 Y , N 0 3 3 A , N 0 3 3 C , N 0 3 3 L , N 0 3 3 M , Y 0 4 6 H , Y 0 4 6 N , T 0 4 8 D , T 0 4 9 W , A 0 5 8 C , A 0 5 8 V , Q 0 6 1 F , Q 0 6 1 V , A 0 6 4 H , A 0 6 4 Q , D 0 7 2 W , A 0 7 3 I , H 0 7 4 V , Y 0 7 6 T , V 0 7 9 S , T 0 8 0 A , K 0 8 5 A , K 0 8 5 L , K 0 8 5 N , K 0 8 5 R , N 0 8 6 A , N 0 8 6 C , N 0 8 6 E , N 0 8 6 F , N 0 8 6 G , N 0 8 6 K , N 0 8 9 H , N 0 9 6 F , N 0 9 6 T , N 0 9 7 C , N 0 9 7 R , N 0 9 7 S , N 0 9 7 Y , A 0 9 8 K , A 0 9 8 V , I 1 0 0 L , I 1 0 0 V , R 1 0 1 T , S 1 0 2 G , S 1 0 3 T , S 1 0 7 A , Q 1 0 8 D , G 1 1 7 H , S 1 1 8 G , Q 1 2 8 V , T 1 2 9 Y , G 1 3 6 A , A 1 4 1 G , L 1 4 4 T , V 1 4 8 M , D 1 5 0 S , Y 1 5 1 G , Y 1 5 1 H , Y 1 5 1 S , Y 1 5 1 W , G 1 5 4 D , G 1 5 4 I , G 1 5 4 W , I 1 5 6 L , I 1 5 6 Q , Q 1 5 8 S , N 1 5 9 A , N 1 5 9 C , N 1 5 9 G , N 1 5 9 M , N 1 5 9 T , E 1 6 0 Q , I 1 6 8 A , I 1 6 8 M , I 1 6 8 T , F 1 7 2 D , F 1 7 2 H , L 1 7 5 S , V 1 7 6 C , F 1 7 8 H , F 1 7 8 Y , Y 1 7 9 A , Y 1 7 9 D , Y 1 7 9 H , Y 1 7 9 M , Y 1 7 9 N , Y 1 7 9 Q , Y 1 7 9 S , Y 1 7 9 T , Y 1 7 9 W , A 1 8 0 E , A 1 8 0 G , A 1 8 0 K , A 1 8 0 T , N 1 8 1 G , N 1 8 1 K , N 1 8 1 M , N 1 8 1 T , K 1 8 2 A , K 1 8 2 W , N 1 8 3 S , D 1 8 5 E , E 1 8 7 D , I 1 8 8 V , G 1 9 6 K , G 1 9 6 R , G 1 9 6 V , I 1 9 7 E , I 1 9 7 Q , I 1 9

7 R , G 1 9 9 L , S 2 0 1 C , M 2 0 5 Q , S 2 0 6 M , S 2 0 6 R , D 2 0 7 H , D
 2 0 7 N , K 2 1 0 I , K 2 1 0 L , K 2 1 0 V , G 2 1 2 A , G 2 1 2 D , G 2 1 2 Q
 , D 2 1 3 A , D 2 1 3 G , D 2 1 3 W , P 2 1 4 N , Y 2 1 7 G , S 2 1 8 G , S 2 1
 8 T , S 2 1 8 V , T 2 2 2 I , T 2 2 2 V , G 2 2 3 D , G 2 2 3 K , T 2 2 4 E , T
 2 2 4 H , Q 2 2 5 A , Q 2 2 5 M , Q 2 2 5 R , V 2 3 0 A , I 2 3 2 G , S 2 3 4 N
 , G 2 3 5 C , G 2 3 5 Q , G 2 3 5 S , I 2 3 7 F , I 2 3 7 M , I 2 4 4 F , G 2 4
 8 A , G 2 4 8 E , G 2 4 8 S , T 2 4 9 P , Y 2 5 1 M , G 2 5 2 A , G 2 5 2 S , G
 2 5 2 T , G 2 5 2 W , V 2 5 3 M , V 2 5 3 Q , S 2 5 4 N , S 2 5 4 V , S 2 5 4 W
 , V 2 5 5 M , V 2 5 5 N , V 2 5 6 A , V 2 5 6 D , V 2 5 6 F , V 2 5 6 G , V 2 5
 6 H , V 2 5 6 R , I 2 5 8 R , I 2 5 8 S , G 2 5 9 K , G 2 5 9 R , R 2 6 0 A , R
 2 6 0 N , D 2 6 1 G , D 2 6 1 H , D 2 6 1 I , D 2 6 1 S , G 2 6 4 C , G 2 6 4 R
 , K 2 6 5 G , K 2 6 5 I , K 2 6 5 L , K 2 6 5 R , Y 2 6 8 K , L 2 7 1 N , L 2 7
 1 Y , T 2 7 2 C , T 2 7 2 F , T 2 7 2 N , T 2 7 2 Q , Y 2 7 4 C , Y 2 7 4 Q , Y
 2 7 4 T , T 2 7 6 H , T 2 7 8 C , T 2 7 8 H , T 2 7 8 M , T 2 7 8 N , T 2 7 8 Q
 , T 2 7 8 S , N 2 8 0 H , N 2 8 0 T , S 2 8 2 A , S 2 8 2 H , S 2 8 2 L , S 2 8
 2 M , S 2 8 2 T , Q 2 8 3 S , A 2 8 6 P , A 2 8 7 D , A 2 8 8 Y , V 2 8 9 R , V
 2 8 9 T , Q 2 9 0 R , Q 2 9 0 T , Q 2 9 0 V , D 2 9 4 Q , L 2 9 5 T , L 2 9 5 V
 , Y 2 9 6 H , G 2 9 7 C , G 2 9 7 F , G 2 9 7 K , G 2 9 7 T , T 2 9 9 D , T 2 9
 9 Q , S 3 0 0 H , S 3 0 0 P , S 3 0 0 V , S 3 0 0 W , Q 3 0 1 C , Q 3 0 1 F , Q
 3 0 1 G , Q 3 0 1 W , E 3 0 2 G , E 3 0 2 T , E 3 0 2 V , S 3 0 5 Q , V 3 0 6 F
 , K 3 0 7 H , Q 3 0 8 R , Q 3 0 8 V , Q 3 0 8 W , Q 3 0 8 Y , A 3 0 9 T , A 3 0
 9 V , A 3 1 2 T , および V 3 1 3 I

10

20

【 0 4 4 2 】

適性スコア + の変異体：

I 0 0 1 A , I 0 0 1 H , I 0 0 1 W , I 0 0 1 Y , G 0 0 3 Y , T 0 0 4 A , T 0 0
 4 N , S 0 0 5 H , S 0 0 5 L , V 0 0 7 L , V 0 0 9 L , V 0 0 9 T , R 0 1 1 Y , Q
 0 1 7 C , Q 0 1 7 R , Q 0 1 7 V , N 0 1 9 L , N 0 1 9 Y , T 0 2 6 W , Y 0 2 7 A
 , Q 0 3 1 I , N 0 3 3 K , F 0 4 0 W , S 0 5 3 K , S 0 5 3 R , A 0 5 6 H , A 0 5
 6 I , A 0 5 6 Y , D 0 5 7 K , A 0 5 8 N , A 0 5 8 Y , Q 0 6 1 R , Q 0 6 1 W , F
 0 6 3 Y , Y 0 7 5 A , V 0 7 9 A , V 0 7 9 N , T 0 8 0 D , N 0 8 6 Y , V 0 8 7 P
 , N 0 8 9 L , N 0 8 9 M , D 0 9 4 T , A 0 9 8 Y , V 1 0 4 A , S 1 0 7 K , S 1 0
 7 Y , Q 1 0 8 A , G 1 0 9 A , G 1 0 9 L , Y 1 1 0 L , S 1 1 8 C , T 1 2 9 E , I
 1 3 1 Y , G 1 3 5 A , I 1 3 7 A , A 1 4 1 C , T 1 4 9 A , T 1 4 9 L , D 1 5 0 A
 , D 1 5 0 F , D 1 5 0 K , D 1 5 0 N , D 1 5 0 Q , D 1 5 0 T , D 1 5 0 V , T 1 5
 2 L , T 1 5 2 M , I 1 5 6 M , I 1 5 6 T , Q 1 5 8 L , Q 1 5 8 R , Q 1 5 8 Y , E
 1 6 0 L , E 1 6 0 Y , T 1 7 4 A , L 1 7 5 H , N 1 8 1 A , K 1 8 2 L , E 1 8 7 L
 , I 1 8 8 L , I 1 9 7 A , I 1 9 7 H , I 1 9 7 N , M 2 0 5 A , M 2 0 5 V , S 2 0
 6 A , S 2 0 6 C , S 2 0 6 K , S 2 0 6 L , D 2 0 7 A , G 2 1 2 Y , D 2 1 3 L , H
 2 1 6 R , S 2 1 8 F , T 2 2 4 F , T 2 2 4 L , T 2 2 4 P , T 2 2 4 Q , T 2 2 4 V
 , T 2 2 4 Y , N 2 2 7 D , N 2 2 7 L , N 2 2 7 Y , I 2 3 6 A , I 2 3 7 N , N 2 3
 8 L , N 2 3 8 M , K 2 3 9 A , A 2 4 1 L , A 2 4 1 S , Q 2 4 6 L , T 2 4 9 L , T
 2 4 9 Y , H 2 5 0 K , H 2 5 0 M , H 2 5 0 N , H 2 5 0 P , H 2 5 0 Q , H 2 5 0 R
 , H 2 5 0 V , H 2 5 0 Y , V 2 5 3 I , V 2 5 3 R , V 2 5 3 Y , S 2 5 4 K , S 2 5
 4 L , V 2 5 5 A , V 2 5 5 Y , V 2 5 6 K , D 2 6 1 P , D 2 6 1 V , D 2 6 1 W , K
 2 6 2 A , Y 2 6 8 A , Y 2 6 8 S , R 2 6 9 V , T 2 7 2 P , T 2 7 2 Y , Q 2 7 3 C
 , Q 2 7 3 S , Q 2 7 3 W , Y 2 7 4 A , T 2 7 8 K , T 2 7 8 R , T 2 7 8 Y , N 2 8
 0 G , N 2 8 0 Q , S 2 8 2 R , Q 2 8 3 K , Q 2 8 3 L , Q 2 8 3 P , Q 2 8 3 R , Q
 2 8 3 W , Q 2 8 3 Y , A 2 8 7 K , A 2 8 7 R , A 2 8 7 T , Q 2 9 0 Y , S 2 9 1 I
 , S 2 9 1 L , S 2 9 1 M , S 2 9 1 N , D 2 9 4 A , D 2 9 4 V , Y 2 9 6 L , Y 2 9
 6 R , T 2 9 9 P , S 3 0 0 I , S 3 0 0 L , Q 3 0 1 L , E 3 0 2 K , E 3 0 2 L , F

30

40

50

3 1 0 A , A 3 1 2 L , A 3 1 2 N , A 3 1 2 R , V 3 1 3 A , V 3 1 3 G , および V 3
1 3 L

【 0 4 4 3 】

【表 90 - 1】

表 4. 2 は、サーモリシンにおける組み合わせ可能な活性を有する変異体を示している。位置のナンバリングは、配列番号 3 に記載された成熟サーモリシンタンパク質に基づくものである。

位置 (POS)	変異体
17	E, F, P
19	A, D, H, I, R, T, V
24	F, H
25	H
31	L
33	Q
40	C
48	A, R
73	Y
79	C
80	C, R
81	H
85	C, M, Y
86	V
89	K, R, T, V
94	E
109	D
117	A, K, R, T
140	S
141	T
150	E, M, W
151	A, C, E, I
152	D
153	V
156	H, R
158	F, G, I, V
159	F, I, K
160	S
161	Y
168	N
171	D
174	S, V
175	C, E, F, G, I
176	E, Q
178	C, M
180	L, W
181	Y
182	F, R
183	H, I, L, M, Q, R, T
189	C
205	C, F
206	F, H, I, T, V, Y
207	T
210	A, E, F, G, H, T
212	F, H, K, M, N, R, S, T
213	I, K, R, V, Y
214	Q
218	R

【 0 4 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 90 - 2】

(表 4. 2 の続き)

位置 (POS)	変異体
223	Y
224	I, R
227	C, E, G, K, Q, R, S, T, V
235	D, L, T
236	P
237	A, Q
238	A, C, D, E, R, S
239	C, G, H, L, Q, R, S, V, Y
241	E, F, G, I, T, V
244	Q
246	K, R
248	C, H
249	G, V
250	F, S
251	H
252	F, I, L
253	A, D, E, P
254	C, F, G, H, I, P
255	F, Q
258	F
259	I
260	C, D, I
261	K, R, T
262	C, F, H, L, P, R
266	W
268	F, R
269	P, T, W, Y
270	M, N, P, V
271	V
272	R
273	R
274	D, E
276	G, S
278	V
279	E
280	P, R, V
282	P
283	A, C, E, G, H, T, V
294	T
295	R
296	E, I
297	I, V
300	Q
302	W
306	Y
310	I, N
312	Q

10

20

30

40

【0445】

選択された生産的位置でのサーモリシン変異体を更に挙げる。位置のナンバリングは、

50

配列番号3に記載された成熟サーモリシタンパク質に基づくものである。T002I, T002M, T048E, A058L, F063C, V087L, N096H, Q128Y, Y151R, A180E, S198A, I244T, Q273N, P277R, T278R, Q283E, T293L, T293N, L295F, S298A, Q301I, N019D, S025A, T026R, T049K, T049Q, F063L, S065A, S065T, L091M, N096Q, N096R, N096Y, N097K, R101M, G109A, S118A, I131L, V140D, Q158A, N159E, N159K, L175V, A180R, G196H, G196T, G196Y, K219S, Q225E, I232R, I244L, Q246D, D261N, P277G, T293Y, S300G, Q301F, Q301M, V303R, S305A, D311A。

10

【0446】

(実施例5)

サーモリシン同族体の同定

A. プロテアーゼのMEROPSデータベースにおける関連分子の同定

バチルス・サーモプロテオリティカスのサーモリシンは、MEROPSプロテアーゼデータベースではM4ファミリー(Mはメタロプロテアーゼを表す)に分類されている(<http://merops.sanger.ac.uk>)。サーモリシンは、M4ファミリー(サーモリシンファミリー)メタロプロテアーゼのプロトタイプであって、クランMAの典型例である。サーモリシンは更に、第三の亜鉛配位子がグルタミン酸塩であることから、Glu-Zincinとしても知られるサブクランMA(E)にも分類される。バチルス・サーモプロテオリティカスのサーモリシンには、Meropsの受託番号MER001026が割り当てられた。

20

【0447】

MEROPSデータベースは、ペプチダーゼ(プロテアーゼ)の階層的な構造による分類を利用している。この場合、各ペプチダーゼは、アミノ酸配列における統計的に有意な類似性に基づいてファミリーに割り当てられ、相同であると考えられるファミリーは同じクランに分類される。分子構造及び相同性によるペプチドの分類法は、アミノ酸配列及び三次元構造に関するデータが大量に入手できるかどうかにかかっていたが、それが1990年代に実現できたことで開発に至った。1993年には、Rawlings及びBarrettにより、個々のペプチダーゼをファミリーに割り当てて、そのファミリーを更にクランに分類するシステムが示された(Rawlings, N.D. & Barrett, A.J., (1993年) *Evolutionary families of peptidases*. *Biochem J* 290, 205~218頁)。

30

【0448】

M4ファミリーに属するペプチダーゼはいずれも、一つの触媒亜鉛イオンと結合している。多くの他のメタロペプチダーゼファミリーにはHEXXHモチーフが存在しており、この場合、ヒスチジンは亜鉛の配位子であり、グルタミン酸塩は活性部位残基である。このファミリーのファミリーメンバーの大部分は、中性pHにおいてエンドペプチダーゼ活性を有し、ほぼ例外なく細菌由来であり、しかもカルシウムイオンの結合によって熱安定性が生じる。タンパク質及びペプチドは、選択的にXaa+Yaaの開裂によって分解する。ここで、Xaaは疎水性残基であり、そしてYaaはロイシン(Leu)、フェニルアラニン(Phe)、イソロイシン(Ile)又はバリン(Val)である。サーモリシンは、ドメイン間に活性部位を有する2つのドメイン構造を有する。N末端ドメインは、2本のヘリックスを有する明白な6本鎖のシートを含み、そのうち1本のヘリックスがHEXXH亜鉛結合モチーフを有する。C末端ドメインは、このファミリー固有のものであり、主にらせん状で、第三の亜鉛配位子を有する。

40

【0449】

MEROPSデータベース(バージョン9.5)上での成熟サーモリシタンパク質(配列番号3)の相同体に関するBLAST検索により、以下に示される結果を得た(表5.1)。各酵素を、MEROPSデータベースの固有の受託番号及び遺伝子の起源によ

50

て一覧表にし、プログラムで算出された同一性（％）を示す。

【 0 4 5 0 】

【表 9 1 - 1】

表 5. 1. メタロプロテアーゼ M4 ファミリーのメンバー（サーモリシンを含む）に関する MEROPS データベース出力

MEROPS ID 番号	起源	同一性 (%)	
MER001026	－サーモリシン（バチルス・サーモプロテオリティカス）	100.00%	
MER001027	－サーモリシン（ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス）	100.00%	
MER212338	－サーモリシン（ゲオバチルス種）C56-T3）	87.13%	
MER168133	－サーモリシン（ゲオバチルス種）Y412MC61）	87.13%	10
MER001353	－サーモリシン（アリシクロバチルス・アシドカルダリウス）	86.13	
MER001927	－サーモリシン（バチルス種）	87.13	
MER234417	－サーモリシン（ゲオバチルス種）Y412MC52）	87.13%	
MER001034	－サーモリシン（バチルス・カルドリティカス）	86.80	
MER001025	－ステアロリシン（ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス）	86.14	
MER040474	－サーモリシン（ゲオバチルス・カウストフィルス）	87.76%	
MER109364	－ステアロリシン（バチルス種 SG-1）	74.75%	
MER187808	－サーモリシン（バチルス・セレウス）	73.42%	
MER176709	－サーモリシン（バチルス・シュードマイコイデス）	73.75%	20
MER003181	－サーモリシン（バチルス・チューリンゲンシス）	73.75%	
MER061817	－サーモリシン（バチルス・セレウス）	73.42%	
MER001031	－サーモリシン（バチルス・メガテリウム）	73.18%	
MER001030	－サーモリシン（バチルス・セレウス）	73.75%	
MER001354	－サーモリシン（乳酸桿菌種）	72.76%	
MER187798	－サーモリシン（バチルス・マイコイデス）	73.75%	
MER187790	－サーモリシン（バチルス・シュードマイコイデス）	72.76%	
MER021824	－サーモリシン（バチルス・アントラシス）	72.76%	
MER109427	－サーモリシン（バチルス種 SG-1）	72.88%	
MER109389	－サーモリシン（バチルス・ウェイヘンステファネンシス）	73.42%	30
MER187794	－サーモリシン（バチルス・マイコイデス）	72.43%	
MER091675	－サーモリシン（エクシグオバクテリウム・シビリウム）	70.61%	
MER124526	－サーモリシン（エクシグオバクテリウム種 AT1b）	68.90%	
MER001028	－サーモリシン（ブレピバチルス・ブレビス）	67.55%	
MER169677	－サーモリシン（ブレピバチルス・ブレビス）	63.04%	
MER187793	－サーモリシン（バチルス・シュードマイコイデス）	61.24%	
MER187797	－サーモリシン（バチルス・マイコイデス）	60.91%	
MER187765	－M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ （パエニバチルス・ラルバエ）	59.67%	40
MER001033	－M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ （パエニバチルス・ポリミキサ）	56.62%	
MER001029	－中性ペプチダーゼ B（枯草菌）	54.05%	
MER187796	－中性ペプチダーゼ B（バチルス・マイコイデス）	55.26%	
MER187792	－中性ペプチダーゼ B（バチルス・シュードマイコイデス）	55.26%	
MER038281	－M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ （バチルス・ベトナムシス）	57.89%	
MER091650	－M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ （ヘルペトシフォン・アウランチアクス）	56.90%	

【表 9 1 - 2】

(表 5. 1 の続き)

MEROPS ID 番号	起源	同一性(%)	
MER084165	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(バチルス・セレウス)	55. 59%	
MER187771	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (バチルス・コアウイレンシス)	57. 05%	
MER151875	→中性ペプチダーゼB(バチルス・セレウス)	54. 93%	
MER187800	→中性ペプチダーゼB(バチルス・マイコイデス)	53. 95%	
MER028887	→中性ペプチダーゼB(バチルス・セレウス)	54. 05%	10
MER084215	→中性ペプチダーゼB(バチルス・ウェイヘンステファネンシス)	53. 62%	
MER187810	→中性ペプチダーゼB(バチルス・セレウス)	53. 95%	
MER039810	→中性ペプチダーゼB(バチルス・チューリンゲンシス)	54. 28%	
MER062589	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (バチルス種NRRL B-14911)	56. 62%	
MER021804	→中性ペプチダーゼB(バチルス・アントラシス)	54. 61%	
MER109478	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(バチルス種SG-1)	55. 45%	
MER187779	→中性ペプチダーゼB(バチルス・チューリンゲンシス)	52. 98%	
MER187806	→中性ペプチダーゼB(バチルス・セレウス)	52. 63%	20
MER168882	→サーモリシン(パエニバチルス・ラルパエ)	53. 33%	
MER062591	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(バチルス・セレウス)	52. 72%	
MER187770	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(バチルス・セレウス)	52. 40%	
MER080987	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (バチルス・チューリンゲンシス)	52. 40%	
MER187805	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(バチルス・セレウス)	52. 55%	
MER050323	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(バチルス・セレウス)	53. 21%	
MER187780	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (バチルス・チューリンゲンシス)	53. 21%	
MER022038	→中性ペプチダーゼB(オセアノバチルス・イヘイエンシス)	49. 50%	30
MER187809	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(バチルス・セレウス)	49. 05%	
MER117663	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (シェワネラ・ヘリファキセンシス(Shewanella halifaxensis))	51. 03%	
MER014937	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (クロストリジウム・アセトブチリウム)	48. 04%	
MER002103	→λ 毒素(クロストリジウム・パーフリンジェンシス)	46. 86%	
MER048471	→バシロリシン(プレビバチルス・ラテロスポラス)	49. 51	
MER001035	→バシロリシン(バチルス・アミロリケファシエンシス)	49. 51%	
MER001038	→バシロリシン(バチルス種)	49. 51%	
MER054676	→バシロリシン(バチルス種B16)	49. 18%	40
MER057051	→オーレオリシン(スタフィロコッカス・サブプロフィチカス)	47. 02%	
MER080743	→バシロリシン(バチルス種RH219)	49. 66%	
MER187789	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (バチルス・チューリンゲンシス)	48. 72%	
MER003790	→M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(ヒストリチウム菌)	47. 71%	
MER080014	→バシロリシン(枯草菌)	49. 32%	

【 0 4 5 2 】

【表 9 1 - 3】

(表 5. 1 の続き)

MEROPS ID 番号	起源	同一性(%)	
MER001032	ーバシロリシン(枯草菌)	47. 37%	
MER091634	ーバシロリシン(バチルス・ブミルス)	47. 37%	
MER014941	ーλ毒素(クロストリジウム・アセトブチリウム)	45. 48%	
MER091620	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(カラムナリス菌)	45. 40%	
MER155135	ーオーレオリシン(マクロコッカス・カセオリティカス)	48. 65%	10
MER203088	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(シュワネラ・ピオラセア)	49. 82%	
MER086404	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (スチグマテラ・オーランチアカ)	45. 11%	
MER068045	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (ミクソコッカス・ザンサス)	45. 39%	
MER187787	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (バチルス・チューリンゲンシス)	58. 88%	
MER251173	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (ミクソコッカス・フルプス)	45. 39%	
MER091640	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (スチグマテラ・オーランチアカ)	48. 43%	20
MER086488	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (スチグマテラ・オーランチアカ)	44. 44%	
MER025442	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (ビブリオ・バルニフィカス)	46. 49%	
MER001869	ーオーレオリシン(表皮ブドウ球菌)	46. 13%	
MER178903	ーオーレオリシン(スタフィロコッカス・キャピティス)	47. 47%	
MER017697	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (メタノサルシナ・アセチボランス)	44. 14%	
MER062832	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (フラボバクテリウム・ジョンソニアエ)	45. 71%	
MER187814	ーオーレオリシン(スタフィロコッカス・ワーネリ)	45. 21%	30
MER004711	ーオーレオリシン(黄色ブドウ球菌)	46. 28%	
MER229315	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(ビブリオ・ミミカス)	44. 15%	
MER011075	ーオーレオリシン(スタフィロコッカス・クロモゲネス)	43. 00%	
MER179736	ーオーレオリシン(スタフィロコッカス・シュドインターメディウス)	45. 83%	
MER187776	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (クリセオバクテリウム・グレウム)]	42. 81%	
MER068475	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (ミクソコッカス・ザンサス)	43. 84%	
MER063156	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (シュドアルテロモナス・チュニカータ)	46. 56%	40
MER252532	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (ミクソコッカス・フルプス)	46. 32%	
MER091643	ーM4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (スチグマテラ・オーランチアカ)]	45. 64%	

【 0 4 5 3】

系統樹の作製など、MEROPSデータベースにおける多様なファミリーのファミリーメンバーの更なる解析も実行可能である。424のファミリーメンバーからなるM4ファミリーの系統樹(http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famwrap/famcards/trees/m4_tree.htm)の構成を以下に示す(図2A~2C)。

【 0 4 5 4 】

上記図 2 に示す M 4 ファミリーの系統樹における重要なアミノ酸配列及び構成。

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C

1 スチグマテラ・オーランチアカ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 8 6 4 0 4)

【 0 4 5 5 】

P __ プロタンパク質 ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C

2 (スチグマテラ・オーランチアカ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 8 6 4 8 8)

3 (ミクソコッカス・ザンサス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 8 0 4 5) 10

【 0 4 5 6 】

ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C ~ P P C ~ P P C

4 (シュードアルテロモナス・チュニカータ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 3 1 5 6)

【 0 4 5 7 】

ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C

5 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・エバミティリス) グリセリシン (M E R 0 2 8 5 6 1)

6 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・スピセウス) グリセリシン (M E R 1 4 4 0 0 0) 20

7 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・ビロクロモ) ゲネスグリセリシン (M E R 2 2 9 6 6 8)

8 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・セリカラー) グリセリシン (M E R 0 1 2 2 7 5)

9 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・スカビエー) グリセリシン (M E R 2 0 0 7 7 6)

1 0 M 0 4 . 0 1 7 (クリベラ・フラビダ) グリセリシン (M E R 0 7 6 5 7 7)

1 1 M 0 4 . 0 1 7 (ジャニバクター種 H T C C 2 6 4 9) グリセリシン (M E R 1 1 9 3 7 0) 30

1 2 M 0 4 . 0 1 7 (ノカルジオイデス種 J S 6 1 4) グリセリシン (M E R 0 7 5 5 7 5)

【 0 4 5 8 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C

1 3 M 0 4 . 0 1 7 (スチグマテラ・オーランチアカ) グリセリシン (M E R 0 8 6 4 9 7)

1 4 M 0 4 . 0 1 7 (ザントモナス・カンペストリス) グリセリシン (M E R 0 7 0 1 9 3)

1 5 M 0 4 . 0 1 7 (かいよう病菌) グリセリシン (X A C 0 4 6 5 タンパク質) (M E R 0 1 9 5 6 0) 40

1 6 M 0 4 . 0 1 7 (イネ白葉枯病菌) グリセリシン (M E R 1 1 3 8 7 0)

1 7 M 0 4 . 0 1 7 (ミクロモノスポラ種 L 5) グリセリシン (M E R 2 3 0 6 3 5)

1 8 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・エバミティリス) グリセリシン (S A V 1 0 3 7 タンパク質) (M E R 0 2 8 5 6 3)

1 9 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・スピセウス) グリセリシン (M E R 1 8 7 8 2 7)

【 0 4 5 9 】

ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C

2 0 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・プリスチナエスピラリス) グリセリシン 50

(MER137080)

21 M04.017 (ストレプトマイセス種SPB74) グリセリシン (MER163965)

22 M04.017 (ストレプトマイセス・アルプス) グリセリシン (MER187823)

23 M04.017 (ストレプトマイセス・エバミティリス) グリセリシン (SAV2795タンパク質) (MER028566)

24 M04.017 (ストレプトマイセス・スピセウス) グリセリシン (MER137175)

25 M04.017 (ストレプトマイセス・ガーナエンシス) グリセリシン (MER187817)

10

26 M04.017 (ストレプトマイセス・セリカラー) グリセリシン (MER019351)

【0460】

Pe pSY ~ ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C

27 M04.017 (ストレプトマイセス・スカビエー) グリセリシン (MER200969)

【0461】

ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ P__プロタンパク質

28 M04.017 (ストレプトマイセス種SPB74) グリセリシン (MER137964)

20

29 M04.017 (ストレプトマイセス・スピセウス) グリセリシン (MER187826)

【0462】

ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ He__PIG

30 M04.017 (ストレプトマイセス・エバミティリス) グリセリシン (MER028567)

【0463】

ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C

31 M04.017 (ストレプトマイセス・セプタタス) グリセリシン (MER108931)

30

32 M04.017 (ストレプトマイセス・スカビエー) グリセリシン (MER200878)

33 M04.017 (ストレプトマイセス種Mg1) グリセリシン (MER180683)

34 M04.017 (ストレプトマイセス・スピセウス) グリセリシン (MER187825)

【0464】

ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ P__プロタンパク質

35 M04.017 (ストレプトマイセス・セリカラー) グリセリシン (MER011085)

40

36 M04.017 (ストレプトマイセス・スカビエー) グリセリシン (MER200968)

37 M04.017 (ストレプトマイセス・ガーナエンシス) グリセリシン (MER187816)

38 M04.017 (ストレプトマイセス・グリセウス) グリセリシン (MER004744)

39 M04.017 (ストレプトマイセス・フィラメントサス) グリセリシン (MER187821)

40 M04.017 (ストレプトマイセス・エバミティリス) グリセリシン (MER

50

0 2 8 5 6 5)

4 1 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス種 M g 1) グリセリシン (M E R 1 6 3 4 1 6)

【 0 4 6 5 】

ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

4 2 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・グリセウス) グリセリシン (M E R 1 2 1 3 9 3)

4 3 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・フィラメントサス) グリセリシン (M E R 1 8 7 8 2 0)

4 4 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス種 T H - 3) グリセリシン (M E R 1 6 9 9 6 4)

10

【 0 4 6 6 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

4 5 M 0 4 . 0 1 7 (ジャニバクター種 H T C C 2 6 4 9) グリセリシン (M E R 1 0 9 4 4 3)

4 6 M 0 4 . 0 1 7 (ジャニバクター種 H T C C 2 6 4 9) グリセリシン (M E R 1 0 9 4 1 7)

4 7 M 0 4 . 0 1 7 (クリベラ・フラビダ) グリセリシン (M E R 0 9 6 4 9 7)

4 8 M 0 4 . 0 1 7 (ストレプトマイセス・エバミティリス) グリセリシン (M E R 0 2 8 5 6 4)

20

4 9 M 0 4 . 0 2 2 (類鼻疽菌) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 0 2 9 9 6 1)

5 0 M 0 4 . 0 2 2 (鼻疽菌) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 0 4 0 1 4 2)

5 1 M 0 4 . 0 2 2 (パークホルデリア・タイランデンシス) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 0 5 8 4 7 7)

5 2 M 0 4 . 0 2 2 (パークホルデリア・オクラホメンシス) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 6 6)

5 3 M 0 4 . 0 2 2 (パークホルデリア・セノセパシア) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 0 5 0 8 0 4)

5 4 M 0 4 . 0 2 2 (セパシア菌) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 0 2 8 6 2 2)

5 5 M 0 4 . 0 2 2 (パークホルデリア・アンピファリア) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 0 5 5 6 9 7)

30

5 6 M 0 4 . 0 2 2 (パークホルデリア種 3 8 3) Z m p A ペプチダーゼ (M E R 0 5 6 8 1 6)

5 7 M 0 4 . 0 2 2 (パークホルデリア・ウボネンシス) Z m p A ペプチダーゼ . (M E R 1 6 6 2 6 6)

5 8 (デハロコッコイデス種 V S) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 0 9 8 8 3)

5 9 (未同定真正細菌 S C B 4 9) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 7 2 2 9)

6 0 (クロセイバクター・アトランチカス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 1 8 3 4 0)

40

【 0 4 6 7 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C ~ f n 3

6 1 (フラボバクテリウム・ジョンソニアエ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 2 8 3 2)

6 2 (フラボバクテリウムカラムナーレ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 2 0)

【 0 4 6 8 】

ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

6 3 (クロセイバクター・アトランチカス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ

50

- (M E R 1 0 9 8 4 7)
 6 4 (クリセオバクテリウム・グレウム) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 7 6)
- 6 5 (コルディア・アルジシダ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 6 6 4 0 3)
- 【 0 4 6 9 】
 P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C ~ M A M
 6 6 (ミクロシラ・マリナ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 2 4)
- 6 7 (クロセイバクター・アトランチカス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ 10
 (M E R 1 1 7 3 8 8)
 6 8 (クロセイバクター・アトランチカス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ
 (M E R 1 3 8 8 0 2)
 6 9 (バエニバチルス・ラルバエ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 6 5)
- 7 0 M 0 4 . 0 0 1 (バエニバチルス・ラルバエ) サーモリシン (M E R 1 6 8 8 8 2)
- 【 0 4 7 0 】
 ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C
 7 1 (バエニバチルス・ポリミキサ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E 20
 R 0 0 1 0 3 3)
- 【 0 4 7 1 】
 P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C
 7 2 M 0 4 . 0 0 1 (ブレビバチルス・ブレビス) サーモリシン (M E R 0 0 1 0 2 8)
- 7 3 M 0 4 . 0 0 1 (ブレビバチルス・ブレビス) サーモリシン (n p r タンパク質) (M E R 1 6 9 6 7 7)
- 7 4 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・シュードマイコイデス) サーモリシン (M E R 1 8 7 7 9 0)
- 7 5 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・マイコイデス) サーモリシン (M E R 1 8 7 7 9 4 30
)
- 7 6 M 0 4 . 0 0 1 (セレウス菌) サーモリシン (M E R 0 6 1 8 1 7)
 7 7 M 0 4 . 0 0 1 (セレウス菌) サーモリシン (M E R 1 8 7 8 0 8)
 7 8 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・ウェイヘンステファネンシス) サーモリシン (M E 40
 R 1 0 9 3 8 9)
- 7 9 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・マイコイデス) サーモリシン (M E R 1 8 7 7 9 8)
)
- 8 0 M 0 4 . 0 0 1 (セレウス菌) サーモリシン (M E R 0 0 1 0 3 0)
 8 1 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・チューリングエンシス) サーモリシン (M E R 0 0 3 1 8 1) 40
- 8 2 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・シュードマイコイデス) サーモリシン (M E R 1 7 6 7 0 9)
- 8 3 M 0 4 . 0 0 1 (乳酸桿菌種) サーモリシン (M E R 0 0 1 3 5 4)
 8 4 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・アントラシス) サーモリシン (M E R 0 2 1 8 2 4)
)
- 8 5 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・メガテリウム) サーモリシン (M E R 0 0 1 0 3 1)
)
- 8 6 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス種 S G - 1) サーモリシン (M E R 1 0 9 4 2 7)
 8 7 M 0 4 . 0 0 1 (バチルス・カルドリティカス) サーモリシン (M E R 0 0 1 0 3 4) 50

8 8	<u>M 0 4 . 0 1 8</u>	(<u>ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス</u>)	ステアロリシン (<u>M E R 0 0 1 0 2 5</u>)	
8 9	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>ゲオバチルス種 Y 4 1 2 M C 5 2</u>)	サーモリシン (<u>M E R 2 3 4 4 1 7</u>)	
9 0	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>アリシクロバチルス・アシドカルダリウス</u>)	サーモリシン (<u>M E R 0 0 1 3 5 3</u>)	
9 1	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>バチルス種</u>)	サーモリシン (<u>M E R 0 0 1 9 2 7</u>)	
9 2	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>ゲオバチルス種 Y 4 1 2 M C 6 1</u>)	サーモリシン (<u>M E R 1 6 8 1 3 3</u>)	
9 3	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>ゲオバチルス種 C 5 6 - T 3</u>)	サーモリシン (<u>M E R 2 1 2 3 3 8</u>)	10
9 4	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>ゲオバチルス・カウストフィルス</u>)	サーモリシン (<u>M E R 0 4 0 4 7 4</u>)	
9 5	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>バチルス・サーモプロテオリティカス</u>)	サーモリシン (<u>M E R 0 0 1 0 2 6</u>)	
9 6	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス</u>)	サーモリシン (<u>M E R 0 0 1 0 2 7</u>)	
9 7	<u>M 0 4 . 0 1 8</u>	(<u>バチルス種 S G - 1</u>)	ステアロリシン (<u>M E R 1 0 9 3 6 4</u>)	
9 8	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>エクシグオバクテリウム・シビリクム</u>)	サーモリシン (<u>M E R 0 9 1 6 7 5</u>)	20
9 9	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>エクシグオバクテリウム種 A T 1 b</u>)	サーモリシン (<u>M E R 1 2 4 5 2 6</u>)	
1 0 0	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>バチルス・マイコイデス</u>)	サーモリシン (<u>M E R 1 8 7 7 9 7</u>)	
1 0 1	<u>M 0 4 . 0 0 1</u>	(<u>バチルス・シュードマイコイデス</u>)	サーモリシン (<u>M E R 1 8 7 7 9 3</u>)	
1 0 2		(<u>バチルス・チューリンゲンシス</u>)	M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>M E R 1 8 7 7 8 7</u>)	
1 0 3	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>バチルス・チューリンゲンシス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 0 3 9 8 1 0</u>)	30
1 0 4	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>セレウス菌</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 0 2 8 8 8 7</u>)	
1 0 5	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>バチルス・ウェイヘンステファネンシス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 0 8 4 2 1 5</u>)	
1 0 6	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>バチルス・マイコイデス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 1 8 7 8 0 0</u>)	
1 0 7	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>セレウス菌</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 1 5 1 8 7 5</u>)	
1 0 8	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>バチルス・アントラシス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 0 2 1 8 0 4</u>)	
1 0 9	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>バチルス・シュードマイコイデス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 1 8 7 7 9 2</u>)	40
1 1 0	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>バチルス・マイコイデス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 1 8 7 7 9 6</u>)	
1 1 1		(<u>セレウス菌</u>)	M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>M E R 0 8 4 1 6 5</u>)	
1 1 2	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>セレウス菌</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 1 8 7 8 1 0</u>)	
1 1 3	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>セレウス菌</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 1 8 7 8 0 6</u>)	
1 1 4	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>バチルス・チューリンゲンシス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 1 8 7 7 7 9</u>)	
1 1 5	<u>M 0 4 . 0 1 2</u>	(<u>オセアノバチルス・イヘイエンシス</u>)	中性ペプチダーゼ B (<u>M E R 0 2 2 0 3 8</u>)	50

- 1 1 6 M 0 4 . 0 1 2 (枯草菌) 中性ペプチダーゼ B (M E R 0 0 1 0 2 9)
- 【 0 4 7 2 】
- ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 1 7 (ヘルペトシフォン・アウランチアクス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 5 0)
- 1 1 8 (セレウス菌) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 8 0 9)
- 【 0 4 7 3 】
- P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 1 9 M 0 4 . 0 0 9 (表皮ブドウ球菌) オーレオリシン (M E R 0 0 1 8 6 9) 10
- 1 2 0 M 0 4 . 0 0 9 (スタフィロコッカス・キャピティス) オーレオリシン (M E R 1 7 8 9 0 3)
- 1 2 1 M 0 4 . 0 0 9 (黄色ブドウ球菌) オーレオリシン (M E R 0 0 4 7 1 1)
- 1 2 2 M 0 4 . 0 0 9 (マクロコッカス・カセオリティカス) オーレオリシン (M E R 1 5 5 1 3 5)
- 1 2 3 M 0 4 . 0 0 9 (スタフィロコッカス・シュードインターメディウス) オーレオリシン (M E R 1 7 9 7 3 6)
- 1 2 4 M 0 4 . 0 0 9 (スタフィロコッカス・ワーネリ) オーレオリシン (M E R 1 8 7 8 1 4)
- 1 2 5 M 0 4 . 0 0 9 (スタフィロコッカス・クロモゲネス) オーレオリシン (M E R 0 1 1 0 7 5) 20
- 1 2 6 M 0 4 . 0 0 9 (スタフィロコッカス・サブロフィチカス) オーレオリシン (M E R 0 5 7 0 5 1)
- 1 2 7 (セレウス菌) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 5 0 3 2 3)
- 1 2 8 (バチルス・チューリングエンシス M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 8 0)
- 1 2 9 (セレウス菌) に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 2 5 9 1)
- 1 3 0 (セレウス菌) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 7 0) 30
- 1 3 1 (バチルス・チューリングエンシス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 8 0 9 8 7)
- 1 3 2 (セレウス菌 M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 8 0 5)
- 1 3 3 (バチルス・チューリングエンシス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 8 9)
- 1 3 4 (バチルス・ベトナムエンシス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 3 8 2 8 1)
- 1 3 5 (バチルス種 NRRL B - 1 4 9 1 1) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 2 5 8 9)
- 1 3 6 (バチルス種 SG - 1) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 0 9 4 7 8) 40
- 1 3 7 (バチルス・コアウイレンシス) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 7 1)
- 【 0 4 7 4 】
- P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C ~ P P C
- 1 3 8 M 0 4 . 0 2 1 (サーモアクチノミセス属 2 7 a) 中性ペプチダーゼ (M E R 0 2 9 7 1 9)
- 【 0 4 7 5 】
- P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 3 9 M 0 4 . 0 1 4 (枯草菌) バシロリシン (M E R 0 8 0 0 1 4) 50

- 1 4 0 M 0 4 . 0 1 4 (バチルス種 R H 2 1 9) バシロリシン (M E R 0 8 0 7 4 3)
- 1 4 1 M 0 4 . 0 1 4 (バチルス種 B 1 6) バシロリシン (M E R 0 5 4 6 7 6)
- 【 0 4 7 6 】
- ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 4 2 M 0 4 . 0 1 4 (ブレビバチルス・ラテロスポラス) バシロリシン (M E R 0 4 8 4 7 1)
- 【 0 4 7 7 】
- P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 4 3 M 0 4 . 0 1 4 (バチルス・アミロリケファシエンス) バシロリシン (M E R 0 0 1 0 3 5)
- 1 4 4 M 0 4 . 0 1 4 (バチルス種) バシロリシン (M E R 0 0 1 0 3 8)
- 【 0 4 7 8 】
- ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 4 5 M 0 4 . 0 1 4 (バチルス・プミルス) バシロリシン (M E R 0 9 1 6 3 4)
- 【 0 4 7 9 】
- P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 4 6 M 0 4 . 0 1 4 (枯草菌) バシロリシン (M E R 0 0 1 0 3 2)
- 1 4 7 (クロストリジウム・アセトブチリクム) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 1 4 9 3 7)
- 1 4 8 M 0 4 . 0 1 1 (クロストリジウム・パーフリンジェンス) 毒素 (M E R 0 0 2 1 0 3)
- 1 4 9 M 0 4 . 0 1 1 (クロストリジウム・アセトブチリクム) 毒素 (M E R 0 1 4 9 4 1)
- 1 5 0 (クロストリジウム・ヒストリチクム) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 0 3 7 9 0)
- 【 0 4 8 0 】
- ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C ~ P P C
- 1 5 1 (クロロフレクス・アウランティアカス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 0 1 4 5 3)
- 1 5 2 (クロロフレクサス属 Y - 4 0 0 - f 1) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 5 5 4 9 7)
- 1 5 3 M 0 4 . 0 0 8 (リステリア・イノキュア) M p 1 ペプチダーゼ (リステリア属) (M E R 2 2 9 9 2 5)
- 【 0 4 8 1 】
- P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C
- 1 5 4 M 0 4 . 0 0 8 (リステリア菌) M p 1 ペプチダーゼ (M E R 0 0 1 0 4 7)
- 1 5 5 M 0 4 . 0 0 8 (リステリア・イバノビイ) M p 1 ペプチダーゼ (M E R 0 4 5 7 3 9)
- 1 5 6 M 0 4 . 0 0 8 (リステリア・ゼーリゲリ) M p 1 ペプチダーゼ (M E R 0 4 5 7 4 0)
- 1 5 7 (プレシオシスチス・パシフィカ (Plesiocystis pacifica)) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 6 0 6 0 3)
- 【 0 4 8 2 】
- ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C ~ P P C ~ P P C
- 1 5 8 (スチグマテラ・オーランチアカ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 4 3)
- 1 5 9 (スチグマテラ・オーランチアカ) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 4 0)
- 【 0 4 8 3 】

10

20

30

40

50

<p> ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C 160 (<u>ミクソコッカス・ザンサス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER068475</u>) 【0484】 ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C～PPC～PPC 161 (<u>ミクソコッカス・ザンサス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER017624</u>) 【0485】 ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C 162 (<u>シェワネラ・ヘリファキセンシス (Shewanella halifaxensis)</u>) M4 に割り 当てられていないペプチダーゼ (<u>MER117663</u>) 163 (<u>シュワネラ・ピオラセア</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER203088</u>) 164 (<u>ハリスコメノバクター・ヒドロシス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダー ゼ (<u>MER248570</u>) 165 (<u>サイトファガ・ハッチンソニイ</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER023927</u>) 166 (<u>ビブリオ・ミミカス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER229315</u>) 【0486】 ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C 167 (<u>ビブリオ・バルニフィカス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER025442</u>) 168 (<u>セレウス菌</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER187802</u>)) 169 (<u>セレウス菌</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER091678</u>)) 170 (<u>バチルス・アントラシス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER019065</u>) 171 (<u>セレウス菌</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER054507</u>)) 172 (<u>バチルス・チューリンゲンシス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER039813</u>) 173 (<u>セレウス菌</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER187804</u>)) 174 (<u>バチルス・チューリンゲンシス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER091674</u>) 【0487】 Pe p S Y ～ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C～B i g__3～G r a m__ p o s__a n c h o r 175 (<u>セレウス菌</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER028889</u>)) 176 (<u>バチルス・チューリンゲンシス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER039811</u>) 177 (<u>セレウス菌</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER028890</u>)) 178 (<u>バチルス・アントラシス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER020840</u>) 179 (<u>バチルス・マイコイデス</u>) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (<u>MER187799</u>) </p>		10
		20
		30
		40
		50

180 (バチルス・ウェイヘンステファネンシス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 0 9 6 8 4)

181 (バチルス・シュードマイコイデス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 9 1)

182 (バチルス・マイコイデス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 9 5)

183 (バチルス・マイコイデス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 8 0 1)

184 (バチルス・チューリングエンシス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 3 9 8 1 4)

10

【0488】

ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C

185 (セレウス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 2 8 8 8 8)

186 (バチルス・アントラシス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 2 0 8 3 5)

187 (ハヘラ・チェジュエンシス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 5 8 6 6 7)

【0489】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C

20

188 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (n p r タンパク質) (M E R 0 8 8 2 9 9)

【0490】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C

189 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (n p r - 1 タンパク質) (M E R 0 7 9 3 4 2)

190 (スポロゲネス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 7 5 4 2)

191 (ボツリヌス菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (n p r タンパク質) (M E R 1 8 7 7 6 7)

30

192 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (n p r __ 1 タンパク質) (M E R 1 8 7 7 5 4)

193 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 5 3)

194 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 7 9 3 3 8)

195 (スポロゲネス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 4 4 8 8 4)

196 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (n p r タンパク質) (M E R 0 7 9 3 4 1)

40

197 (スポロゲネス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 6 9)

198 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (n p r __ 2 タンパク質) (M E R 1 8 7 7 5 5)

199 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 7 9 3 4 0)

200 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (n p r - 4 タンパク質) (M E R 0 9 5 3 1 7)

201 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (n p r - 4 タンパク質) (M E R 0 9 4 8 0 2)

50

202 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (npr タンパク質)
(MER094801)

203 (スポロゲネス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (MER136684)

204 (ボツリヌス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (npr タンパク質)
(MER079339)

205 (スポロゲネス菌) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ (MER178275)

【0491】

ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4 __C ~ P__プロタンパク質 ~ P__プロタンパ
ク質

10

206 (メタノサルシナ・アセチボランス) M4 に割り当てられていないペプチダーゼ
(MER017697)

207 (ストレプトマイセス・ガーナエンシス) M4 に割り当てられていないペプチダ
ーゼ (MER187818)

【0492】

ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4 __C

208 (ストレプトマイセス・セリカラー) M4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ (MER011082)

209 (ストレプトマイセス・スカビエイ) M4 ファミリーに割り当てられていない
ペプチダーゼ (MER200705)

20

210 (ストレプトマイセス・エバミティリス) M4 ファミリーに割り当てられていな
いペプチダーゼ (MER028562)

211 (ストレプトマイセス・スピセウス) M4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ (MER137373)

212 (ストレプトマイセス種 Mg1) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチ
ダーゼ (MER137463)

213 (ストレプトマイセス・グリセウス) M4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ (MER121447)

214 (ストレプトマイセス・フィラメントサス) M4 ファミリーに割り当てられてい
ないペプチダーゼ (MER187819)

30

215 (ストレプトマイセス・プリスチナエスピラリス) M4 ファミリーに割り当てら
れていないペプチダーゼ (MER140364)

216 (ストレプトマイセス・アルプス) M4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ (MER187822)

217 (ストレプトマイセス種 SPB74) M4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ (MER163861)

218 <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/pepsum?id=M04.UPW> (ストレプトマイセス・クラブリゲルス) M4 ファミ
リーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER187824)

40

219 (アルスロバクター・クロロフェノリカス) M4 ファミリーに割り当てられてい
ないペプチダーゼ (MER126758)

220 (アルスロバクター・フェナントレニボランス (Arthrobacter phenanthrenivor
ans)) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER240183)

221 (アルスロバクター種 FB24) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチ
ダーゼ (MER050759)

222 (アルスロバクター・アウレッセンス) M4 ファミリーに割り当てられていない
ペプチダーゼ (MER075195)

223 (海洋性放線菌 PHSC20C1) M4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ

50

- 224 (ブラキバクテリウム・ファエシウム (Brachybacterium faecium)) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 2 7 5 5 2)
- 225 (クラビバクター・ミシガンエンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 2 1 2 1 6)
- 226 (クラビバクター・ミシガンエンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 1 5 2 9 9)
- 227 (マイクロバクテリウム・テストセウム) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 4 7 3 9 9)
- 228 (イントラスポランギウム・カルバム (Intrasporangium calvum)) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 3 1 7 3 8) 10
- 229 (ジャニバクター種 H T C C 2 6 4 9) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 1 5 3 0 1)
- 230 (フランキア・アルニ (Frankia alni)) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 5 1)
- 231 (フランキア種 C c I 3) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 5 1 5 1 0)
- 232 (フランキア種 E A N 1 p e c) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 5 1 7 4 7)
- 233 (メイオテルムス・シルヴェナス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 3 8 2 6 9) 20
- 234 (蛍光菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 5 6)
- 235 (ミクソコッカス・ザンサス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 8 0 9 5)
- 236 (バークホルデルリア種 C C G E 1 0 0 2) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 0 3 8 7 8)
- 237 (トウゴマ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 6 2 8 2 1)
- 238 (カテヌリスポラ・アシジフィラ (Catenulispora acidiphila)) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 2 7 9 5) 30
- 239 (プレビバクテリウム・リネンス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 1 5 3 0 0)
- 240 (アナベナ・バリアビリス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 5 4 9 7 6)
- 241 (ノストック種 P C C 7 1 2 0) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 1 6 7 1 9)
- 242 (ノストック・パンクチフォルメ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 2 4 2 5 9)
- 243 (かいよう病菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 1 9 5 6 1) 40
- 244 (ザントモナス・カンペストリス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 7 0 1 7 5)
- 245 (イネ白葉枯病菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 2 7 4 9 6)
- 246 (ザントモナス・カンペストリス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 1 9 4 1 6)
- 247 (サーモモノスポラ・クルパータ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 2 9 2 2 9)
- 248 (ハロモナス・エロンガータ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 2 3 5 4 8) 50

249 (クロモハロバクター・サレキシゲンス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 5 0 8 9 7)

250 (パラ百日咳菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 3 0 7 0 6)

251 (気管支敗血症菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 3 0 7 8 1)

252 (ボルデテラ・ベツリイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 1 4 6 9 0)

253 (バリオボラックス・パラドクス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 5 7)

254 (バリオボラックス・パラドクス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 3 5 2 8 1)

255 (シュードモナス・ブラッシカセアルム) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 4 4 7 7 0)

256 (シュードモナス・フルバ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 4 9 2 1 5)

257 (シュードモナス・スツツツェリ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 4 6 9 9)

258 (ディケヤー・ダダンティイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 2 3 8 4 3)

259 (ディケヤー・ダダンティイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 9 3 4 1 5)

260 (ディケヤー・ジアエ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 5 8)

261 (軟腐病菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 0 1 0 4 5)

262 (ペクトバクテリウム・ワサビアエ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 8 3 0)

263 (ディケヤー・ダダンティイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 2 7 0 7)

264 M 0 4 . 0 2 3 (シトロバクター・ローデンチウム) z p x ペプチダーゼ (M E R 1 9 6 1 8 4)

265 M 0 4 . 0 2 3 (エンテロバクター・カンセロゲナス) z p x ペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 7 2)

266 M 0 4 . 0 2 3 (サルモネラ菌) z p x ペプチダーゼ (M E R 1 0 8 7 1 2)

267 M 0 4 . 0 2 3 (エンテロバクター・サカザキ) z p x ペプチダーゼ (z p x タンパク質) (M E R 0 9 1 6 0 1)

268 M 0 4 . 0 2 3 (火傷病菌) z p x ペプチダーゼ (p r t 1 タンパク質) (M E R 2 0 2 0 7 4)

269 M 0 4 . 0 2 5 (エルウィニア・ピリンギアエ) プロテアリシン (m p r タンパク質) (M E R 2 2 0 9 0 2)

270 M 0 4 . 0 2 5 (パントエア種 A t - 9 b) プロテアリシン (M E R 2 3 2 0 2 2)

271 M 0 4 . 0 2 5 (イネ内穎褐変病菌) プロテアリシン (M E R 2 0 2 8 1 7)

272 M 0 4 . 0 2 5 (ラーネラ種 Y 9 6 0 2) プロテアリシン (M E R 2 3 7 1 3 9)

273 M 0 4 . 0 2 5 (セラチア・グリメシイ) プロテアリシン (M E R 1 1 5 2 9 8)

274 M 0 4 . 0 2 5 (セラチア種 A 2) プロテアリシン (M E R 1 1 9 6 6 4)

275 M 0 4 . 0 2 5 (セラチア・プロテアマキュランス) プロテアリシン (M E R

10

20

30

40

50

- 0 5 9 4 3 9)
- 2 7 6 M 0 4 . 0 2 5 (セラチア種 A S 9) プロテアリシン (M E R 2 4 9 8 2 5)
- 2 7 7 M 0 4 . 0 2 5 (セラチア種 A S 1 2) プロテアリシン (M E R 2 4 9 8 0 7)
-)
- 2 7 8 (ゲオデルマトフィルス・オブスクルス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 2 5 8 9)
- 2 7 9 (ゲンマタ・オブスキュリグロブス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 6 8)
- 2 8 0 (ノカルジオイデス種 J S 6 1 4) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 4 9 5 2 3)
- 2 8 1 M 0 4 . 0 2 4 (ゼノラブダス・ボビエニイ) P r t S ペプチダーゼ (フォトラブダス・ルミネッセンス) (M E R 2 0 0 6 1 6)
- 2 8 2 M 0 4 . 0 2 4 (ゼノラブダス・ネマトフィラ) P r t S ペプチダーゼ (M E R 2 1 9 8 1 6)
- 2 8 3 M 0 4 . 0 2 4 (ゼノラブダス・ネマトフィラ) P r t S ペプチダーゼ (M E R 2 1 9 8 1 5)
- 2 8 4 M 0 4 . 0 2 4 (フォトラブダス・アシンピオティカ) P r t S ペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 5 9)
- 2 8 5 M 0 4 . 0 2 4 (フォトラブダス・ルミネッセンス) P r t S ペプチダーゼ (M E R 0 3 3 4 8 1)
- 2 8 6 M 0 4 . 0 2 4 (フォトラブダス種 A z 2 9) P r t S ペプチダーゼ (M E R 1 1 5 2 9 7)
- 2 8 7 (アスペルギルス・テレウス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 4 4)
- 2 8 8 (ネオサルトリア・フィシェリ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 1 5)
- 2 8 9 (ピレノフォラ・トリチシ・リペンティス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 8 9 0 3)
- 2 9 0 (サッカロボリスボラ・エリスラエア) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 8 8 6 8 8)
- 2 9 1 (ネクトリア・ハエマトコカ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 4 3 7 7 1)
- 2 9 2 (ジベレラ・ゼアエ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 4 8 3 8)
- 2 9 3 (メタリジウム・アニソピラエ (メタリジウム菌)) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 4 3 7 7 0)
- 2 9 4 (メタリジウム・アクリダム) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 4 3 7 6 9)
- 2 9 5 (ワドリア・コンドロフィラ (Waddlia chondrophila)) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 1 1 8 4 4)
- 2 9 6 (シュードモナス・サバスタノイ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 2 3 2 8 2 2)
- 2 9 7 (シリング菌) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 5 2 6 7 2)
- 2 9 8 (シュードモナス・コロナファシエン) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 8 1 3)
- 2 9 9 (シアノセイス種 A T C C 5 1 1 4 2) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 0 3 3 6 2)
- 3 0 0 (バチルス・チューリングゲンシス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 8 3)

10

20

30

40

50

301 (セレウス菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 7 8 9 7 8)

302 (セレウス菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 8 1 1)

303 (バチルス・チューリングゲンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 7 7 8)

304 (セレウス菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 8 0 7)

305 (メタノサルシナ・アセチボランス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 0 1 7 6 9 8)

10

306 (バチルス・チューリングゲンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 7 8 4)

307 (バチルス・チューリングゲンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 7 8 8)

308 (セルロファーガ・アルジコラ (Cellulophaga algicola)) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 2 3 5 5 6 2)

309 (クロコウジカビ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 0 9 1 6 3 1)

310 (プロピデンシア・ラスティジアニイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 7 7 3)

20

311 (プロピデンシア・アルカリファシエンス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 7 7 4)

312 (プロピデンシア・レットグリ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 7 7 5)

313 (プロピデンシア・スチュアルティ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 2 2 8 3 9)

314 (マイコバクテリウム・アブセサス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 1 7 3 6 4)

315 (マイコバクテリウム・アブセサス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 1 7 3 6 3)

30

316 (ブラディリゾビウム・ジャポニクム) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 0 2 6 9 8 8)

317 (アグロバクテリウム・ピチス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 6 2 4 5 4)

318 (ムシラジニバクター・パルジス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 2 2 9 3 1 6)

【0493】

ペプチダーゼ__M4__C

319 (霊菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 0 0 1 0 4 6)

40

320 (ストレプトマイセス・ガーナエンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 8 7 8 1 5)

【0494】

ペプチダーゼ__M4__ペプチダーゼ__M4__C

321 (粘液細菌) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 1 1 4 2 9 2)

【0495】

ペプチダーゼ__M4__ペプチダーゼ__M4__C

322 (ストレプトマイセス・フィラメントサス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (MER 0 9 1 6 7 9)

50

【 0 4 9 6 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

3 2 3 (ストレプトマイセス・エバミティリス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 2 8 5 1 9)3 2 4 (ストレプトスポランギウム・ロセウム) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 8 1 2)

【 0 4 9 7 】

ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

3 2 5 M 0 4 . 0 0 7 (フェシウム菌) ココリシン (M E R 1 8 7 7 4 9)3 2 6 M 0 4 . 0 0 7 (フェカリス菌) ココリシン (M E R 0 0 2 8 1 0)3 2 7 (レニバクテリウム・サルモニナルム) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 0 2 0 8 3)3 2 8 (クリベラ・フラビダ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 7 9 3 6 6)3 2 9 (ヘルペトシフォン・アウランチアクス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 8 5 8 5 1)

【 0 4 9 8 】

ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

3 3 0 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・ジャンダエイ) P A ペプチダーゼ (アエロモナス型) (M E R 0 7 9 8 1 5)3 3 1 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・オイクレノフィラ) P A ペプチダーゼ (アエロモナス型) (M E R 0 7 9 8 0 3)

【 0 4 9 9 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C ~ P P C

3 3 2 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・パンクタータ) P A ペプチダーゼ (アエロモナス型) (M E R 0 2 9 9 4 3)

【 0 5 0 0 】

ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

3 3 3 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・エンシェレイア) P A ペプチダーゼ (M E R 0 7 9 8 1 7)3 3 4 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・ベスチアルム) P A ペプチダーゼ (M E R 0 7 9 8 1 6)3 3 5 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・メディア) P A ペプチダーゼ (M E R 0 7 9 8 0 2)3 3 6 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・サルモニシダ) P A ペプチダーゼ (M E R 0 7 9 8 1 9)

【 0 5 0 1 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C ~ P P C

3 3 7 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・パンクタータ) P A ペプチダーゼ (M E R 0 3 0 0 7 3)

【 0 5 0 2 】

ペプチダーゼ__M 4 ~ ペプチダーゼ__M 4 __C

3 3 8 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・エンシェレイア) P A ペプチダーゼ (M E R 0 7 9 8 0 4)3 3 9 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・ボボフィイ) P A ペプチダーゼ (M E R 0 7 9 8 0 5)3 4 0 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・ハイドロフィラ) P A ペプチダーゼ (M E R 0 1 1 8 5 3)3 4 1 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス種 C D C 2 4 7 8 - 8 5) P A ペプチダーゼ (M E R 0 7 9 8 1 8)

3 4 2 M 0 4 . 0 1 6 (アエロモナス・シュベルティイ (Aeromonas schubertii))
P A ペプチダーゼ (アエロモナス型) (M E R 0 7 9 8 0 6)
【 0 5 0 3 】
P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C ~ P P C
3 4 3 (アエロモナス・ベロニイ (Aeromonas veronii)) M 4 に割り当てられていない
ペプチダーゼ (M E R 0 5 5 1 5 4)
【 0 5 0 4 】
ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C
3 4 4 (アエロモナス・ソブリア) M 4 に割り当てられていないペプチダーゼ (M E R
0 7 9 8 2 0)
【 0 5 0 5 】
F T P ~ P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C ~ P P C ~ P P C
3 4 5 (レイネケア種 M E D 2 9 7) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダ
ーゼ (M E R 0 8 3 7 2 7)
3 4 6 (シュワネラ・デニトリフィカンス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ (M E R 0 5 0 2 3 1)
【 0 5 0 6 】
P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C ~ P P C ~ P K D
3 4 7 (シュワネラ・バルティカ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダー
ゼ (M E R 0 4 8 8 9 5)
3 4 8 (シュワネラ・アマゾネンシス) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチ
ダーゼ (M E R 0 4 8 8 1 1)
3 4 9 (シュワネラ・ウーディイ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダー
ゼ (M E R 0 8 7 2 6 5)
【 0 5 0 7 】
P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C
3 5 0 (クロモバクテリアム・ピオラセウム) M 4 ファミリーに割り当てられていない
ペプチダーゼ (M E R 0 2 7 3 5 0)
【 0 5 0 8 】
P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C ~ P P C ~ P P C
3 5 1 (シュードアルテロモナス種 S B - B 1) M 4 ファミリーに割り当てられていな
いペプチダーゼ (M E R 1 4 0 5 9 2)
3 5 2 (シュードアルテロモナス種 S M 9 9 1 3) M 4 ファミリーに割り当てられてい
ないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 1 7)
3 5 3 (シュードアルテロモナス種 A 2 8) M 4 ファミリーに割り当てられていないペ
プチダーゼ (M E R 0 1 9 0 9 8)
3 5 4 (南極細菌株 (Antarctic bacterium str.) 6 4 3) M 4 ファミリーに割り当て
られていないペプチダーゼ (M E R 0 1 2 2 5 5)
3 5 5 (シュードアルテロモナス種 S M 4 9 5) M 4 ファミリーに割り当てられていな
いペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 4 8)
3 5 6 (シュードアルテロモナス・ピスキキダ) M 4 ファミリーに割り当てられていな
いペプチダーゼ (M E R 0 1 9 0 9 9)
3 5 7 (シュードアルテロモナス・ルテニカ (Pseudoalteromonas rutenica)) M 4
ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 5 1)
3 5 8 (シュードアルテロモナス・チュニカータ) M 4 ファミリーに割り当てられてい
ないペプチダーゼ (M E R 1 0 8 8 5 5)
3 5 9 (モリテラ・ビスコサ) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 9 4 4 2)
3 6 0 (ハリアンギウム・オクラセウム) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプ
チダーゼ (M E R 1 1 4 7 6 1)

10

20

30

40

50

361 (ハリアンギウム・オクラセウム) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 2 4 4 5 0)

362 (カンギエラ・コレエンシス (Kangiella koreensis)) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 6 5 6 1 3)

【0509】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ P P C

363 M 0 4 . 0 0 3 (マリノモナス種 M E D 1 2 1) ビブリオリシン (M E R 1 3 9 8 2 6)

364 (ビブリオ・スプレンドィダス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 2 2 4 8 6)

10

【0510】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ P P C ~ P K D

365 (ビブリオナレス目の細菌 S W A T - 3) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 9 2 5 4)

【0511】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ P K D

366 (ビブリオ・トゥビアッシ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 8 7 7 5 0)

367 (ビブリオ・ハーベイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 9 1 6 8 8)

20

368 (ビブリオ・キャンブベリイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 9 5 6 8)

【0512】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C

369 (シュワネラ種 M R - 7) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 7 2 7 6 8)

370 (シュワネラ種 M R - 4) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 7 3 0 3 0)

371 (シュワネラ種 A N A - 3) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 7 3 3 8 1)

30

372 (シュワネラ・アマゾネンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 4 9 9 2 8)

373 (シュワネラ・ウーディイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 8 7 2 0 9)

374 (腸炎ビブリオ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 2 7 9 3 6)

【0513】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ P P C

375 (ビブリオ種 E x 2 5) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 3 9 7 4 9)

40

376 (ビブリオ・ハーベイ) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 0 9 2 7 1)

377 (ハヘラ・チェジュエンシス) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 0 8 0 0 0 2)

378 M 0 4 . 0 0 3 (モリテラ種 P E 3 6) ビブリオリシン (M E R 1 1 3 7 6 8)

【0514】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__M4 ~ ペプチダーゼ__M4__C ~ P P C ~ P P C ~ P__プロタンパク質

379 (難培養性細菌 p T W 3) M4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ

50

(M E R 1 6 4 9 6 1)

3 8 0 (難培養性細菌 p T W 2) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ

(M E R 1 6 4 9 5 1)

【 0 5 1 5 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C

3 8 1 M 0 4 . 0 0 5 (緑膿菌) シュードリシン (M E R 0 0 1 0 2 4)

【 0 5 1 6 】

P e p S Y ~ ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C ~ P P C

3 8 2 M 0 4 . 0 0 3 (ビブリオ・トゥピアッシ) ビブリオリシン (M E R 1 3 9 0 4 4)

3 8 3 M 0 4 . 0 0 3 (ビブリオ・プロテオリチカス) ビブリオリシン (M E R 0 0 1 0 4 3)

3 8 4 M 0 4 . 0 0 3 (リストネラ・アンギラルム) ビブリオリシン (M E R 1 2 0 5 8 3)

3 8 5 M 0 4 . 0 0 3 (ビブリオ・アンギラルム) ビブリオリシン (M E R 0 0 1 0 4 4)

3 8 6 M 0 4 . 0 0 3 (リストネラ・アンギラルム) ビブリオリシン (M E R 1 2 0 6 7 1)

3 8 7 M 0 4 . 0 0 3 (ビブリオ・エスチュアリアナス) ビブリオリシン (M E R 1 1 3 8 0 9)

3 8 8 M 0 4 . 0 0 3 (ビブリオ・バルニフィカス) ビブリオリシン (M E R 0 0 3 3 5 3)

3 8 9 M 0 4 . 0 1 0 (ビブリオ・スプレディダス) ビメリシン (M E R 0 9 1 6 3 6)

3 9 0 M 0 4 . 0 1 0 (ビブリオ種 M E D 2 2 2) ビメリシン (M E R 1 1 3 7 1 1)

3 9 1 M 0 4 . 0 1 0 (ビブリオ種 T - 1 8 0 0) ビメリシン (M E R 0 2 9 7 9 6)

3 9 2 M 0 4 . 0 1 0 (ビブリオナレス目の細菌 S W A T - 3) ビメリシン (M E R 1 0 9 2 3 7)

3 9 3 M 0 4 . 0 0 3 (コレラ菌) ビブリオリシン (M E R 0 0 1 0 4 1)

3 9 4 M 0 4 . 0 0 3 (ビブリオ・ミミカス) ビブリオリシン (M E R 1 2 2 2 9 9)

3 9 5 M 0 4 . 0 0 3 (ビブリオ・フラビアリス) ビブリオリシン (M E R 0 1 9 0 9 7)

3 9 6 M 0 4 . 0 0 3 (サリニビブリオ種 A F - 2 0 0 4) ビブリオリシン (M E R 0 9 1 6 3 9)

3 9 7 M 0 4 . 0 1 0 (フォトバクテリウム種 S K A 3 4) ビメリシン (M E R 1 1 0 0 3 4)

3 9 8 M 0 4 . 0 1 0 (ビブリオ・アンガスタム) ビメリシン (M E R 1 0 9 0 5 6)

3 9 9 M 0 4 . 0 1 0 (フォトバクテリウム・アンガスタム) ビメリシン (M E R 1 8 7 7 6 3)

4 0 0 M 0 4 . 0 1 0 (ビブリオ・アンガスタム) ビメリシン (M E R 1 0 9 3 0 2)

【 0 5 1 7 】

ペプチダーゼ__ M 4 ~ ペプチダーゼ__ M 4 __ C

4 0 1 (モリテラ種 P E 3 6) M 4 ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ (M E R 1 0 9 1 8 0)

【 0 5 1 8 】

10

20

30

40

50

- ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C
 402 (アルテロモナダ属の細菌TW-7) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER091610)
- 403 (シュワネラ・ピオラセア) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER203253)
- 404 (ビブリオ・キャンブベリイ) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER168125)
- 【0519】
- Pe pSY～ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C
 405 (レジオネラ・ロングビーチエ) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER198565) 10
- 406 M04.020 (ビブリオ種AND4) p a p 6 ペプチダーゼ(MER187764)
- 【0520】
- Pe pSY～ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C
 407 M04.020 (ビブリオ・キャンブベリイ) p a p 6 ペプチダーゼ(MER118605)
- 408 M04.020 (ビブリオ・ハーベイ) p a p 6 ペプチダーゼ(MER020240)
- 【0521】 20
- Pe pSY～ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C
 409 (ビブリオ・スプレディダス) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER139945)
- 【0522】
- ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C
 410 M04.006 (レジオネラ・ニューモフィラ) M s p ペプチダーゼ(レジオネラ種)(MER001039)
- 411 M04.006 (レジオネラ・ドランコーティイ) M s p ペプチダーゼ(レジオネラ種)(MER187828)
- 【0523】 30
- Pe pSY～ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C
 412 M04.006 (レジオネラ・ロングビーチエ) M s p ペプチダーゼ(レジオネラ種)(MER002394)
- 413 (レジオネラ・ニューモフィラ) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER040780)
- 414 (レジオネラ・ドランコーティイ) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER187829)
- 415 (レジオネラ・ロングビーチエ) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER198471)
- 416 (レジオネラ・ニューモフィラ) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER040782) 40
- 417 (レジオネラ・ニューモフィラ) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダーゼ(MER040781)
- 【0524】
- ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C～PKD～PKD～PKD
 418 M04.019 (シュードアルテロモナス・ピスキキダ) M p r I I I (MER024591)
- 419 (テレディニバクター・ツルネラエ) M4に割り当てられていないペプチダーゼ(MER187760)
- 【0525】 50

ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C～PKD～PKD～PKD～PKD
 420 (レイネケア種MED297) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダ
 ーゼ (MER083722)

421 (レイネケア・ブランデンシス (Reinekea blandensis)) M4ファミリーに割
 り当てられていないペプチダーゼ (MER187762)

【0526】

ペプチダーゼ__M4～ペプチダーゼ__M4__C
 422 (レイネケア種MED297) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダ
 ーゼ (MER117392)

423 (アルテロモナス種SN2) M4ファミリーに割り当てられていないペプチダー
 ーゼ (MER247991)

10

【0527】

PepsY～ペプチダーゼ__M4__C
 424 (ヒドロゲニビルガ種128-5-R1-1) M4ファミリーに割り当てられて
 いないペプチダーゼ (MER142070)

【0528】

B. Genome Quest 検索アルゴリズムを用いた関連分子の同定
 タンパク質BLAST解析 (Altschul SF, Madden TL, Scha
 ffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman
 DJ. (1997年) Nucleic Acids Res. 25:3389~402)
 を、Genome Quest (www.genomequest.com) において、
 特許及びパブリックドメインのデータベースに対して、問い合わせ配列としてサーモリシ
 ン (配列番号3) のアミノ酸配列を用いて実行することで、以下に示す結果を得た (表5
 .2)。BLASTは、Genome QuestによるNCBI BLAST2アルゴリ
 ズムの実行であって、生物学的類似性の観点から最も関連するアミノ酸配列を見つけだす
 。この配列検索は、タンパク質を検索するために次のデフォルトBLASTパラメータを
 有している：ワードサイズ：3、E値カットオフ：10、スコア行列：BLOSUM62
 、ギャップ開始：11、ギャップ伸長：2

20

【0529】

【表 9 2 - 1】

表 5. 2. B L A S T 解析で同定されたサーモリシンタンパク質配列番号 3) の同族体。使用した用語: I D (%) = 配列同一性、識別子 = 特許番号 - 配列番号又はパブリックドメインの受託番号。

ID (%)	識別子	生物起源	タンパク質名	参考文献
100	US20090263882-0183	バチルス・ステアロサーモフィルス		
100	8TLN	バチルス・サーモプロテオリティカス	サーモリシン	Holland DR, Tronrud DE, Pley HW, Flaherty KM, Stark W, Jansonius JN, McKay DB, Matthews BW Biochemistry 31, 11310~11316頁 (1992年)
100	AAA22625	ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス	中性プロテアーゼ (nprS) 前駆体	Nishiyama, Y. and Imanaka, T. J. Bacteriol. 172(9), 4861~4869(1990)
99. 68	US20090263882-0182	バチルス・サーモプロテオリティカス		
99. 37	JP1994014788-0002	未同定		
99. 37	CAA54291	バチルス・サーモプロテオリティカス	サーモリシン	O'Donohue, M. J. , Biochem. J. 300 (PT 2), 599~603頁 (1994年)
99. 05	1LNA	バチルス・サーモプロテオリティカス	E鎖、	Titani, K. , Nature New Biol. 238 (80), 35~37頁 (1972年)
87. 66	AAB18652	バチルス・カルドリティカス	中性プロテイナーゼ	Saul, D. J. , Biochim. Biophys. Acta 1308(1), 74~80頁 (1996年)
87. 66	WO2004011619-0003	無指定		
87. 34	US20090263882-0184	バチルス種		
87. 34	AAA22623	バチルス・カルドリティカス	中性プロテアーゼ	van den Burg, B. , J. Bacteriol. 173 (13), 4107~4115頁 (1991年)
86. 39	EP0867512-0001	未同定		
86. 39	AAA22621	ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス	熱安定性 中性プロテアーゼ (nprT)	Takagi, M. , J. Bacteriol. 163(3), 824~831頁 (1985年)
79. 43	BAD77123	ゲオバチルス・カウストフィルス HTA426	仮説上のタンパク質	Takami, H. , Nucleic Acids Res. 32(21), 6292~6303頁 (2004年)

【 0 5 3 0 】

【表 9 2 - 2】

(表 5. 2 の続き)

ID (%)	識別子	生物起源	タンパク質名	参考文献
73. 42	1NPC	セレウス菌、 Dsm 3101株	中性プロテアーゼ (E. C. 3. 4. 24. 27)	Sidler, W. , Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367 (7), 643~657 (1986)
73. 42	US20090263882- 0195	セレウス菌		
73. 42	AAB62279	バチルス・ チューリングゲンシス血清型 クルスタキ (kurstaki)	中性プロテアーゼA	Donovan, W. P. , Appl. Environ. Microbiol. 63(6), 2311~2317頁 (1997年)
73. 42	US5759538-0004	バチルス・ チューリングゲンシス		
73. 1	AAK69076	バチルス・ チューリングゲンシス	中性プロテアーゼ	Choi, S. -K. , Submitted(13- JUN-2000)Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon, Korea
73. 1	US20090263882- 0178	バチルス・ チューリングゲンシス		
72. 78	AAU19730	セレウス菌E33L	バシロリシン (サーモリシン様 メタロプロテアーゼ、 ペプチダーゼM4)	Brettin, T. S. , Submitted(14- JUL-2004)Joint Genome Institute, Department of Energy, CA 94598, USA
72. 47	BAA06144	乳酸桿菌種	加水分解酵素	Maeda, T. , J. Ferment. Bioeng. (1994)
72. 47	JP1995184649- 0001	乳酸桿菌種		
68. 99	ACB62386	エクシグオバクテリウム ・シビリウム255-15	サーモリシン	Rodrigues Extremophiles 10 (4), 285~294頁 (2006年)
67. 72	ACQ69059	エクシグオバクテリウム種 AT1b	ペプチダーゼM4 サーモリシン	Vishnivetskaya, T. A. , J. Bacteriol. 193 (11), 2880~2881頁 (2011年)
67. 41	US7642079-0142	未知		
66. 14	CAA43589	プレバチルス・プレビス	微生物 メタロプロテイナーゼ	Avakov, A. S Dokl. Biochem. 24, 1363~1372頁 (1990年)

10

20

30

40

【 0 5 3 1 】

【表 9 2 - 3】

(表 5. 2 の続き)

ID (%)	識別子	生物起源	タンパク質名	参考文献	
65. 82	AEI46285	パエニバチルス・ ムシラギノサスKNP414	Npr	Wang, J. , Submitted(08－ JUN－2011) Zhejiang Sci－Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China	10
62. 34	BAH42306	ブレバチルス・ブレビス NBRC 100599	バシロリシン前駆体	Hosoyama, A. , Submitted(31－ MAR－2005) Contact: Director－ NITE Genome Analysis Center (NGAC), Tokyo 151－0066, Japan	
57. 91	AEI80144	バチルス・ チューリンゲンシス	メタロプロテアーゼ	Chudasama, C. J. , Submitted(18－ APR－2011)V P Science College, Sardar Patel University, Gujarat 388120, India	20
57. 59	BAD13318	バチルス・ベトナムシス	プロテアーゼ	Kim, M Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(7), 1533～1540頁 (2004年)	
56. 65	ADM71641	パエニバチルス・ ポリミキサE681	バシロリシン前駆体 (中性プロテアーゼ)	Kim, J. F. , J. Bacteriol. 192(22), 6103～6104頁 (2010年)	30
56. 33	ADR72651	バチルス種 NprB_遺伝子MB	中性プロテアーゼB	Mustapha, S. , Submitted(14－ JUL－2010) University Malaysia Sabah, Biotechnology Research Institute, Kota Kinabalu, Sabah 88999, Malaysia	
56. 01	ADO58270	パエニバチルス・ ポリミキサSC2	バシロリシン	Ma, M. , J. Bacteriol. 193(1), 311～312頁 (2011年)	
56. 01	AAP35685	サーモアクチノミセス属 27a	中性プロテアーゼ 前駆体	Zabolotskaya, M. V. , Protein J. 23 (7), 483～492頁 (2004年)	40
55. 7	US20090263882－ 0187	バチルス・ポリミキサ		熱安定性中性 メタロプロテアーゼ	

【 0 5 3 2 】

【表 9 2 - 4】

(表 5. 2 の続き)

ID (%)	識別子	生物起源	タンパク質名	参考文献	
55. 7	BAA00734	パエニバチルス・ ポリミキサ	細胞外 中性プロテアーゼ	Takekawa, S. , J. Bacteriol. 173(21), 6820~6825頁 (1991年)	
55. 06	ABK00710	セレウス菌	推定メタロペプチダーゼ	Rasko, D. A. , J. Bacteriol. 189(1), 52~64頁(2007年)	
54. 75	AAU15507	セレウス菌E33L	中性プロテアーゼB	Brettin, T. S. , Submitted(14- JUL-2004)Joint Genome Institute, Department of Energy, CA 94598, USA	10
54. 43	ABY46015	バチルス・ ウェイヘンステファネンシス KBAB4	ペプチダーゼM4 サーモリシン	Lapidus, A. Chem. Biol. Interact. 171 (2), 236~249頁 (2008年)	
54. 43	US20090263882- 0180	枯草菌		熱安定性中性 メタロプロテアーゼ	
54. 11	ABS21909	バチルス・サイトトキシカス (Bacillus cytotoxicus) NVH 391-98	ペプチダーゼM4サー モリシン	Lapidus, A. Chem. Biol. Interact. 171 (2), 236~249頁 (2008年)	20
53. 8	ADM71642	[パエニバチルス・ ポリミキサE681]	バシロリシン前駆体 (中性プロテアーゼ)	Kim, J. F. , J. Bacteriol. 192(22), 6103~6104頁 (2010年)	
53. 48	ACO28045	セレウス菌03BB102]	中性プロテアーゼ	Dodson, R. J. , Submitted(03- FEB-2009)Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA	
52. 85	ACQ49186	バチルス・ アントラシス細菌株A0248	中性プロテアーゼB	Dodson, R. J. , Submitted(09- APR-2009)Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA	30
49. 68	ABU53636	枯草菌	中性プロテアーゼ 前駆体	Zhao, C. Submitted (11-JUL-2007) College of Biotechnology, Tianjin Univ. of Science and Technology, 13 Street, Tianjing, Tianjin 300457, China	40
49. 05	WO2009058661- 0019	合成構築物		クエン酸塩で 安定化させた中性 メタロプロテアーゼの 使用及び産生(Use And Production Of Citrate- Stable Neutral Metalloproteases)	

【 0 5 3 3 】

【表 9 2 - 5】

(表 5. 2 の続き)

ID (%)	識別子	生物起源	タンパク質名	参考文献	
48. 73	ABS73818	バチルス・ アミロリケファシエンス FZB42	NprE	Chen, X. H. Nat. Biotechnol. 25(9), 1007~1014頁 (2007年)	
48. 42	AAW59490	プレビバチルス・ ラテロスポラス	細胞外 中性プロテアーゼ 前駆体	Tian, B. Y. , Submitted(28- DEC-2004)Key Laboratory of Conservation and Utilization for Bioresources, Yunnan Univ, No. 2 North Road of Cuihu, Kunming, Yunnan 650091, China	10
48. 1	ADZ21343	クロストリジウム・ アセトブチリウム EA 2018]	中性の細胞外 メタロプロテアーゼ、 NPPE、ChW- リピートに結合したもの	Hu, S. BMC Genomics 12, 93 (2011)	
47. 78	BAJ41480	枯草菌	中性プロテアーゼ	Takenaka, S. , Biosci. Biotechnol. Biochem. 75(1), 148~151頁 (2011年)	20
47. 47	AEJ66824	表皮ブドウ球菌	米国特許第 7968297号を 引用する、 配列番号359	Meinke, A. , Patent: US 7968297-B2 359 28-JUN- 2011;	
47. 15	BAH18382	マクロコッカス・ カセオリティカス JCSC5402	亜鉛MMP オーレオリシン同族体	Baba, T. J. , Bacteriol. 191(4), 1180~1190頁 (2009年)	
46. 84	AAA22670	バチルス・ アミロリケファシエンス	中性プロテアーゼ	Shimada, H. , J. Biotechnol. 2, 75~ 85頁(1985年)	30
46. 52	ADX06849	枯草菌	NprE	Liu, C. , Wang, Z. and Yang, W. Submitted(29- DEC-2010)Anhui Agricultural University, College of Life Science, Changjiang West Road, Hefei, Anhui 230036, China	
46. 2	ADP31979	バチルス・アトロファエウス 1942	細胞外 中性メタロプロテアーゼ	Gibbons, H. S. Submitted(13- SEP-2010) Genomics Integrated Product Team, US Army Edgewood Chemical Biological Center, 5183 Blackhawk Rd, Aberdeen Proving Ground, MD 21010-5424, USA	40

【表 9 2 - 6】

(表 5. 2 の続き)

ID (%)	識別子	生物起源	タンパク質名	参考文献
45. 57	ABN71638	黄色ブドウ球菌	オーレオリシン	Sabat, A. J. , BMC Microbiol. 8, 129 (2008) PUBMED 664262
45. 25	1BQB	黄色ブドウ球菌	オーレオリシン (メタロプロテイナーゼ)	Medrano, F. J. , Submitted (12-AUG-1998)
44. 94	ABN71626	黄色ブドウ球菌	オーレオリシン	Sabat, A. J. , BMC Microbiol. 8, 129頁 (2008年)
44. 62	ABN71636	黄色ブドウ球菌	オーレオリシン	Sabat, A. J. , , BMC Microbiol. 8, 129頁 (2008年)
44. 2	WO2007044993-0013	バチルス・アミロリケファシエンス		貯蔵安定性の中性メタロプロテアーゼの使用及び産生 (Use And Production Of Storage-Stable Neutral Metalloprotease)
44. 2	AAB05346	バチルス・アミロリケファシエンス	プレプロ中性プロテアーゼ (開始コドンgtg)	Vasanth, N. , J. Bacteriol. 159(3), 811~819頁 (1984年)
44. 2	AEB24126	バチルス・アミロリケファシエンス TA208	細胞外 中性メタロプロテアーゼ	Zhang, G. , J. Bacteriol. 193(12), 3142~3143頁 (2011年)
44. 2	CBI42672	バチルス・アミロリケファシエンス DSM7	細胞外 中性メタロプロテアーゼ	Borriess, R. , Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61 (PT 8), 1786~1801頁 (2011年)
44. 2	US20090263882-0003 WO2007044993-0003	バチルス・アミロリケファシエンス		熱安定性の中性メタロプロテアーゼ／貯蔵安定性中性メタロプロテアーゼの使用及び産生 (Thermostable Neutral Metalloproteases/Use And Production Of Storage-Stable Neutral Metalloprotease)
44. 2	WO2007044993-0018	バチルス・アミロリケファシエンス	(成熟NprE配列)	貯蔵安定性の中性メタロプロテアーゼの使用及び産生 (Use And Production Of Storage-Stable Neutral Metalloprotease)

10

20

30

【 0 5 3 5】

(実施例 6)

安定性が強化されたサーモリシン変異体を同定するための温度因子の利用

結晶学上の温度因子は、高分子を構成する各原子の相対運動の尺度である。これらの温度因子は、結晶 X 線回折の個々のピーク強度として与えられる回折パターン計算値が実測パターンと最もよくマッチするようにモデルを精密化した結果として生じる。温度因子は、式： $\exp(-B \sin^2 \theta / \lambda^2)$ (式中、B は温度因子である) を用いて、運動性の高い原子が、散乱角 () の関数として高分子凝集体の回折全体の縮小効果を有することを反映するように減衰因子として精密化される (Blundell, T. L. 及び Johnson L. N.、Protein Crystallography, Academic Press, 1976 年、121 頁)。

40

50

【 0 5 3 6 】

全体的に運動性が高い領域は、折り畳まれた高分子がより不安定である領域を表し、温度上昇又は変性剤によって分子がストレスを受けたときにアンフォールディングが始まる点である可能性が高い。さらに、全体的な運動性が高い領域は、平均温度因子が最も高い領域であると見込まれる。

【 0 5 3 7 】

バチルス・サーモプロテオリティカスのサーモリシンタンパク質の結晶構造は、多数の独立した研究機関によって決定されている。タンパク質構造データバンク (P r o t e i n D a t a B a n k) により、8 T L N、2 T L X 及び 3 D O 1 の識別子を入力することで独立した3つのタンパク質モデルが選択された。主鎖の温度因子が最も高い結晶構造内の領域であって、具体的には主鎖平均温度因子が平均値より観測された分散の少なくとも1.5倍超の領域をスクリーニングすることにより、全体的に運動性を有する領域を調べた。表6 a ~ 6 c に、主鎖平均温度因子が、所定の結晶学的モデルの分子全体に関する主鎖平均温度因子に関して観測された分散と比較して1.5倍超の z スコアを有する残基を挙げる。これら3つの構造では、同じ領域が、サーモリシン中の全残基に関する主鎖平均温度因子より上に観測された分散の1.5倍超の温度因子を示すことが見出される。これら領域は、コンセンサス柔軟性領域を表し、次の残基を含む。

10

【 0 5 3 8 】

1 ~ 2 位 (N 末端残基)、1 2 7 ~ 1 2 8 位、1 8 0 ~ 1 8 1 位、1 9 5 ~ 1 9 9 位、2 1 1 位、2 2 3 ~ 2 2 4 位、2 9 8 ~ 3 0 0 位、及び 3 1 6 位 (C 末端残基)。

20

【 0 5 3 9 】

【表 9 3】

表 6 a : PDB : 8 TLN			
野生型アミノ酸 (WT AA)	位置 (POS)	分子全体の主鎖平均B因子の平均値 (17.79) 及び分散 (5.43)	
		平均値	z スコア
G	196	49.31	5.81
I	1	42.17	4.49
K	182	38.18	3.76
S	198	37.91	3.71
K	316	37.53	3.64
T	2	36.91	3.52
I	197	35.04	3.18
Y	211	33.64	2.92
P	195	33.4	2.88
G	199	30.8	2.4
S	298	30.3	2.3
Q	128	29.22	2.11
T	299	29.11	2.09
T	224	28.82	2.03
G	127	28.5	1.97
G	223	27.98	1.88
T	293	27.57	1.8
D	124	8.3	1.75
G	252	27.28	1.75
G	109	27.16	1.73
Q	301	27.03	1.7
K	210	26.6	1.62
A	73	9.38	1.55
D	126	26.19	1.55

【 0 5 4 0 】

【表 9 4】

表 6 b : PDB : 3DO1			
野生型アミノ酸 (WT AA)	位置 (POS)	分子全体の主鎖平均B因子の平均値 (19.92) 及び分散 (3.72)	
		平均値	z スコア
S	298	33.38	3.62
T	299	32.9	3.49
G	297	31.99	3.24
S	300	31.01	2.98
Y	296	30.95	2.97
L	295	29.54	2.59
Q	301	29.34	2.53
N	181	29.14	2.48
S	198	29.13	2.48
D	294	29.05	2.46
K	182	29.02	2.45
G	196	28.81	2.39
I	197	28.75	2.37
T	293	28.17	2.22
G	199	27.73	2.1
E	302	26.75	1.84
A	292	26.39	1.74
Q	128	26.13	1.67
A	180	25.86	1.6
V	303	25.81	1.58
Y	211	25.77	1.57
K	316	25.75	1.57
P	195	25.69	1.55
G	248	25.62	1.53
H	74	14.33	1.51

【 0 5 4 1 】

【表 9 5】

表 6 c : PDB : 2TLX

野生型アミノ酸 (WT AA)	位置 (POS)	分子全体の主鎖平均B因子の平均値 (15.07) 及び分散 (4.68)	
		平均値	z スコア
G	196	34.46	4.15
S	198	32.73	3.78
T	299	31.52	3.52
I	197	31.25	3.46
I	1	30.27	3.25
K	316	29.83	3.16
T	2	29.61	3.11
S	298	29.53	3.09
T	224	28.08	2.78
P	195	27.95	2.76
G	223	27.95	2.76
T	222	27.77	2.72
G	199	27.62	2.68
K	182	27.34	2.63
Y	211	26.34	2.41
N	181	26.29	2.4
G	127	25.6	2.25
G	297	25.48	2.23
Q	128	25.42	2.21
S	300	23.98	1.91
Q	225	22.79	1.65
G	212	22.72	1.64
G	3	22.45	1.58
Q	301	22.28	1.54
D	294	22.2	1.52

【0542】

サーモリシン内の全ての部位を、分子内の可能な限り多数の1アミノ酸置換を作製することによってスクリーニングした。様々な洗濯洗剤配合物中での熱安定性又は高温での改善された洗浄性能のどちらかを付与するいくつかの変異体が、これらのコンセンサス柔軟性領域のうちの一つに該当する部位で生じることが分かった。Sun All-in-1 Turbo Gel 若しくはAt処方洗剤 (pH 8) 中での改善された洗浄性能又は改善された熱安定性を付与する、コンセンサス柔軟性領域における代表的な置換を表6.2に挙げる。作業仮説は、これらの柔軟性領域がタンパク質のアンフォールディング開始部位であることである。この仮説に基づいて、様々なコンセンサスな柔軟性領域での変異体を組み合わせることで、より一層の安定化が図られると予想される。表2に示すものから選択されるいくつかの柔軟性領域を同時に安定化させれば、実質的により安定な分子が得られるであろう。

【0543】

10

20

30

40

【表 9 6】

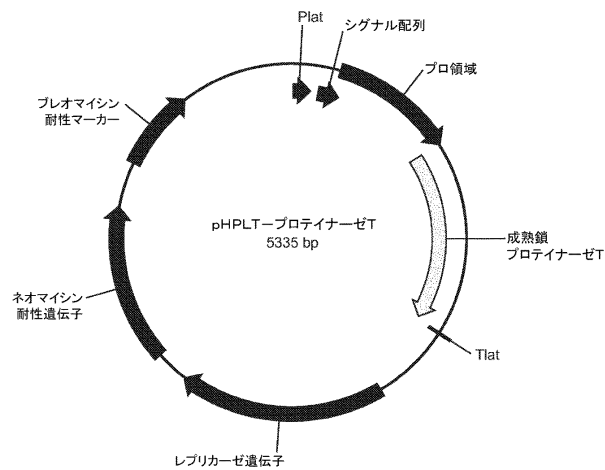
表 6. 2 : コンセンサス柔軟性領域での安定性変異体

コンセンサス 柔軟性領域	位置	安定性変異体 (野生型の第1アミノ酸 (WT AA 1 st))
1 ~ 2	1	I, V
	2	T, C, I, M, P, Q, V
127 ~ 128	127	G, C
	128	Q, C, E, F, I, L, V, Y
180 ~ 181	180	A, E, N
	181	N, A, G, Q, S
195 ~ 199	196	G, L, Y
	197	I, F
	198	S, A, C, D, E, H, I, M, P, Q, T, V, Y
211	211	Y, A, C, E, F, H, I, Q, S, T, V, W
223 ~ 224	224	T, D, H, Y
298 ~ 300	298	S, A, C, E, F, G, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y
	299	T, A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W
316	316	K, A, D, E, H, M, N, P, Q, S, T, V, Y

10

20

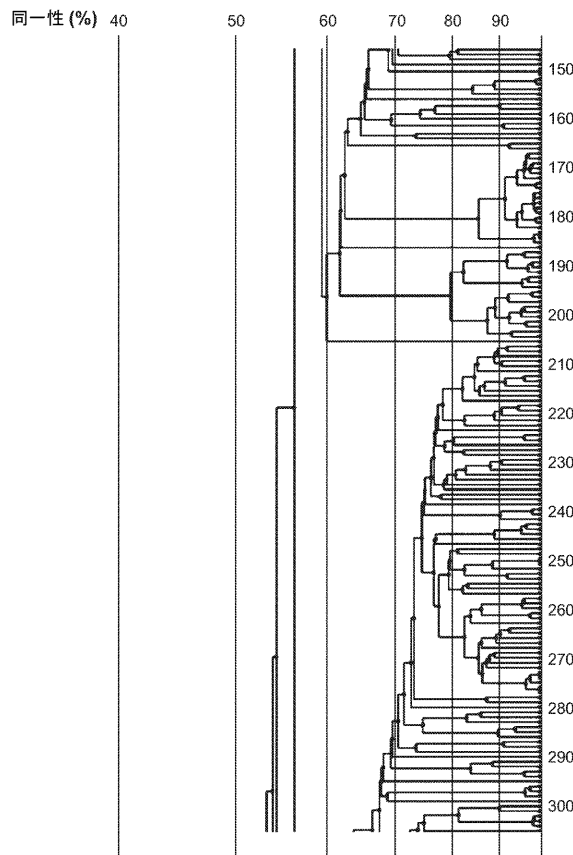
【図 1】



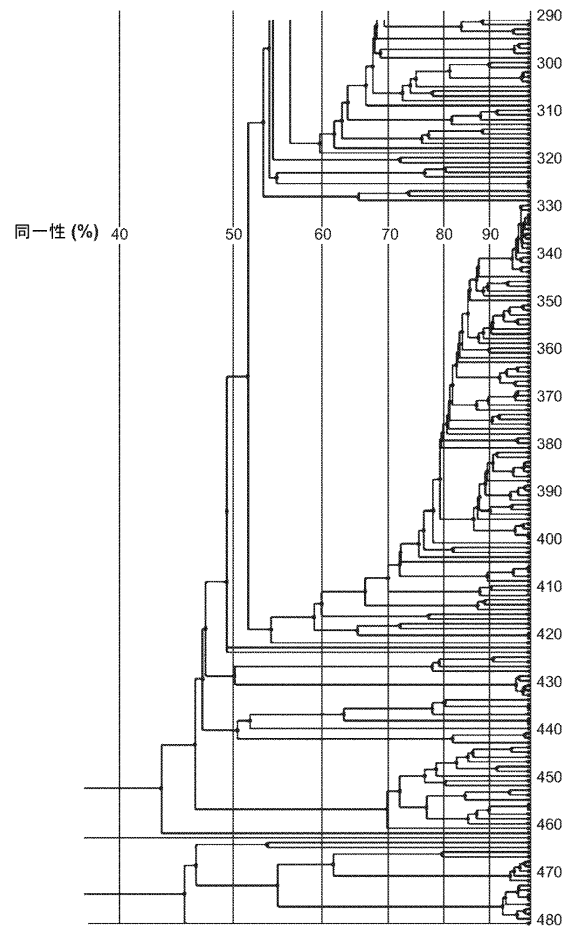
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 2 C】



【配列表】

0006858487000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 アレクセイエフ、ビクター・ユーリエビッチ
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 バービー、リリア・マリア
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 エステル、デービッド・エー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ゴードゲブール、フリッツ
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ムルダー、ハーム
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 トーレス・バズミノ、ダニエル・エステバン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ヤオ、ジアン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ボット、リチャード・アール
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
、ダニスコ・ユーエス・インク

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 山本 晋也

審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第2009/058303(WO, A1)
特開平07-250679(JP, A)
特表2011-502506(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/