

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4031055号
(P4031055)

(45) 発行日 平成20年1月9日(2008.1.9)

(24) 登録日 平成19年10月26日(2007.10.26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 1 D 3/386 (2006.01)

C 1 1 D 3/386

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/54 (2006.01)

C 1 2 N 9/54

請求項の数 11 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願平11-501947	(73) 特許権者	590005058
(86) (22) 出願日	平成10年6月2日(1998.6.2)		ザ プロクター アンド ギャンブル カ
(65) 公表番号	特表2002-502256 (P2002-502256A)		ンパニー
(43) 公表日	平成14年1月22日(2002.1.22)		アメリカ合衆国オハイオ州、シンシナティ
(86) 国際出願番号	PCT/IB1998/000853		ー、ワン プロクター アンド ギャンブ
(87) 国際公開番号	W01998/055634		ル プラザ (番地なし)
(87) 国際公開日	平成10年12月10日(1998.12.10)	(73) 特許権者	507206985
審査請求日	平成14年10月18日(2002.10.18)		ジェネンカー・インターナショナル・イン
(31) 優先権主張番号	60/048,550		コーポレイテッド
(32) 優先日	平成9年6月4日(1997.6.4)		アメリカ合衆国カリフォルニア州、パロ、
(33) 優先権主張国	米国(US)		アルト、ページ、ミル、ロード 925
		(74) 代理人	100110423
			弁理士 曾我 道治
		(74) 代理人	100084010
			弁理士 古川 秀利

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 強力な洗浄および／またはスポットおよびフィルム低減のためのプロテアーゼ酵素およびそれを混合した組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 有効量の、Seq. ID No.2で表されるアミノ酸配列を有する *Bacillus amyloliquefaciens* サブチリシンの等価な位置で、アミノ酸 2 1 0 I / 7 6 D / 1 0 3 A / 1 0 4 I / 1 5 6 E / 1 6 6 D を有するサブチリシン変種であるプロテアーゼ酵素、

(b) 前記プロテアーゼ酵素と適合する、1つまたは複数のクリーニング添加剤、を含んでなるクリーニング組成物。

【請求項 2】

前記クリーニング組成物が食器洗い用洗剤組成物であって、前記食器洗い用洗剤組成物が、

- (a) 組成物の重量で 5 % から 9 0 % のビルダー、
- (b) 組成物の重量で 0 . 1 % から 1 5 % の洗浄界面活性剤
- (c) 組成物の重量で 0 . 1 % から 1 0 % の前後プロテアーゼ酵素
- (d) 任意に、組成物の重量で 0 . 1 % から 4 0 % の漂白剤、ならびに、
- (e) クリーニング添加剤

を含んでなる、請求項 1 に記載のクリーニング組成物。

【請求項 3】

前記クリーニング添加剤が、界面活性剤、溶媒、緩衝剤、酵素、汚れ放出剤、土汚れ除去剤、分散剤、増白剤、起泡抑制剤、柔軟剤、起泡促進剤、酵素安定剤、ビルダー、漂白剤、染料、香料およびそれらの混合物から成る群から選択される、請求項 1 または 2 に記載

の組成物。

【請求項 4】

ゼオライト、ポリカルボキシレート、層状シリケート、ホスフェートおよびそれらの混合物から成る群から選択されたビルダーをさらに 5 % から 50 % 含んでなる、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記クリーニング添加剤が少なくとも 1 種の漂白剤を含んでなる、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記漂白剤が、過炭酸塩、過ホウ酸塩およびそれらの混合物から成る群から選択され、さらに任意に少なくとも 1 種の漂白活性剤を含んでなる、請求項 5 に記載の組成物。

10

【請求項 7】

前記組成物が、セルラーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、ホスホオリパーゼ、プロテアーゼ、ペルオキシダーゼおよびそれらの混合物から成る群から選択される少なくとも 1 種の洗浄酵素をさらに含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

繊維をクリーニングする方法であって、クリーニングの必要のある繊維を請求項 1 および 3 から 7 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることを含んでなる方法。

【請求項 9】

食器をクリーニングする方法であって、クリーニングの必要のある食器を請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の組成物に接触させることを含んでなる方法。

20

【請求項 10】

パーソナルクレンジングの方法であって、クリーニングの必要のあるヒトまたは下等動物の体の部分を請求項 1 および 3 から 7 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることを含んでなる方法。

【請求項 11】

自動食器洗いにおいて改善されたスポッティングおよびフィルミング利益を提供する方法であって、クリーニングの必要のある食器を請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の組成物に接触させることを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

30

発明の分野

本発明は、さまざまな組成物における強力洗浄および / またはスポットおよびフィルム低減のためのプロテアーゼ酵素およびその使用方法、より具体的にはカルボニルヒドロラーゼ変種であるプロテアーゼ酵素に関する。

発明の背景

繊維 (fabric) からある種のしみを除去するのを助けるため、さまざまな種類の酵素が洗濯用洗剤に長い間用いられてきた。各種類の酵素 (アミラーゼ、プロテアーゼなど) は、一般的に異なる化学反応を触媒する。例えば、プロテアーゼ酵素は、他のタンパク質を加水分解 (化合物を 2 つ以上のより単純な化合物に分解すること) する能力により知られている。その能力は、天然由来 (naturally occurring) または工学処理プロテアーゼ酵素を洗濯用洗浄組成物に混和することを介して利用されてきた。

40

近年、自動食器洗い機用組成物での使用においても、酵素の使用が研究されてきた。残念なことに、酵素の多く、特にプロテアーゼ酵素は、洗浄環境にうまく移されていない。具体的には、満足できる性能を保証するため、熱安定性、pH 安定性、酸化安定性および基質特異性を最適化する必要がある。

プロテアーゼ酵素の特性を最適化するため、アミノ酸配列の変更がしばしば利用される。アミノ酸配列の変更は、アミノ酸配列の変化の位置、性質および / または大きさにより、酵素の性質をさまざまな程度に変化させる。洗浄環境下のようなクリーニング用途でプロテアーゼの効力を増加させることを目標として、プロテアーゼ酵素の性質を変えるために、そのアミノ酸配列を変える試みがいくつかなされた。

50

さらに、強力な食品のクリーニングをもたらす自動食器洗い機用組成物に対する消費者の興味は増加している。焼いた乳製品や卵は、自動食器洗い機では長い間除去が困難であった。それに加え、ガラス食器のスポッティング (spotting) およびフィルミング (被膜形成 (filming)) は、自動食器洗いに共通した問題である。さらに、消費者は、現在、食器の手洗いや予備洗浄を減らし、自動食器洗い機によりもたらされるクリーニング能力が増すことを望んでいる。したがって、スポット/フィルム形成なしに強力なクリーニングおよび/またはスポットおよび/またはフィルム低減クリーニングができる組成物の必要性が未だ存在する。より具体的には、そのような利点をもたらすよう設計されたプロテアーゼ酵素により、強力な食品クリーニングおよび低減されたスポット/フィルム形成をもたらす自動食器洗い機用組成物が要請されている。

10

背景技術

以下の文書は、本発明に関連する、または関連しない情報を含んでいる。Genencor International, Inc. に付与された W0 95/10615; Novo Nordisk A/S に付与された W0 89/06270; Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4th. Ed., Vol. 9, Wiley 1994, pages 567 - 620, titled "Enzyme Applications - Industrial", Nielsen 他およびその中の参考文献。The Procter & Gamble Company に付与された W0 95/10591 および W0 95/10592。

発明の概要

20

強力な食品クリーニングおよび低減されたスポッティング/フィルミングが可能なプロテアーゼ酵素を有する組成物を提供する本発明により、前記必要性は満足される。好ましいプロテアーゼ酵素は、天然に見られないアミノ酸配列を持つカルボニルヒドロラーゼ変種である。前記プロテアーゼにトリプシン様特異性を与えることにより、強力なクリーニングおよび/またはスポットおよびフィルム低減および低減されたスポッティング/フィルミングをもたらすように前記プロテアーゼは工学処理されている。したがって、前記プロテアーゼは、牛乳やチーズなどの乳製品の汚れおよび卵黄の汚れに非常に有効であり、自動食器洗い工程でそれらの汚れが起こす可能性のあるスポッティングおよびフィルミングを著しく低減する。前記プロテアーゼは、前駆カルボニルヒドロラーゼの複数のアミノ酸残基を異なるアミノ酸で置換することにより誘導される。さらに、前記の好ましいプロテアーゼは、高いレベルの漂白安定性を持つよう工学処理されている。それに加え、本発明の酵素は、洗濯用途において改善された汚れの除去を提供できる。

30

本発明の第 1 の実施態様に従い、クリーニング組成物が提供される。前記クリーニング組成物は、

(a) 有効量の、天然にはみられないアミノ酸配列を有するカルボニルヒドロラーゼ変種であるプロテアーゼ酵素であって、前駆カルボニルヒドロラーゼの複数のアミノ酸残基を異なるアミノ酸で置換することにより誘導され、ここで前駆酵素中で置換された前記複数のアミノ酸残基は、+ 210 位と、+ 33, + 62, + 67, + 76, + 100, + 101, + 103, + 104, + 107, + 128, + 129, + 130, + 132, + 135, + 156, + 158, + 164, + 166, + 167, + 170, + 209, + 215, + 217, + 218 および + 222 位の残基の 1 つまたは複数との組み合わせに対応しており、ここで番号をつけた位置は、*Bacillus amyloliquefaciens* からの天然由来サブチリシンまたは他のカルボニルヒドロラーゼまたはサブチリシン (例えば、*Bacillus lentus* サブチリシン) 中の等価なアミノ酸残基に対応している当該プロテアーゼ酵素と、

40

(b) 前記プロテアーゼ酵素と適合する、1 つまたは複数のクリーニング添加剤とを含んでなる。

前記プロテアーゼは、前駆カルボニルヒドロラーゼの複数のアミノ酸残基を異なるアミノ酸で置換することにより誘導されるのが最も好ましく、ここで前駆酵素中で置換された前記複数のアミノ酸残基は、+ 210 位と、+ 76, + 103, + 104, + 156, + 166, 217 ならびに + 222 の残基の 1 つまたは複数との組み合わせに対応しており、

50

最も好ましくは、前記プロテアーゼは + 2 1 0 , + 7 6 , + 1 0 3 , + 1 0 4 , + 1 5 6 および + 1 6 6 の位置のアミノ酸残基を置換することにより誘導される。

本発明は、本明細書に記載されるカルボニルヒドロラーゼ変種であるプロテアーゼ酵素と物品を接触させることにより、クリーニングする必要のある物品をクリーニングする方法にも関する。したがって、本発明は、繊維を、好ましくは攪拌しながら、前記プロテアーゼ酵素含有水性液体に接触させることを含んでなる繊維の洗浄方法も包含する。本方法は、約 6 0 未満の温度で行うことができるが、もちろん沸騰までの洗濯温度で極めて有効である。本発明は、クリーニングの必要のある食器を本発明に記載されたプロテアーゼ酵素を接触させることによる食器のクリーニング方法にも関する。本発明は、クレンジングの必要のあるヒトまたは下等動物の身体の一部を本明細書に記載されたプロテアーゼ酵素を接触させることを含むパーソナルクレンジング方法をも含む。

したがって、本発明の目的は、強力なクリーニングおよび/またはスポットおよびフィルム低減が可能なプロテアーゼ酵素を有するクリーニング組成物、特に強力な汚れまたは食品クリーニングを有する自動食器洗い機用組成物を提供することである。さらに、本発明の目的は、本発明のプロテアーゼ酵素の使用による、繊維、食器およびパーソナルクレンジングの方法である。これらおよび他の目的、特徴および長所は、以下の詳細な記載、添付した図面および付随する請求項から明らかであろう。

特に断りのない限り、パーセンテージ、比率および割合は重量に基づいている。本明細書に引用された全文書はこれにより参照のため組み込む。

【図面の簡単な説明】

図 1 A および 1 B は、*Bacillus lentus* から得たサブチリシンの D N A およびアミノ酸配列を示す (Seq.ID No.6 および 7)。成熟サブチリシンタンパク質は、A 1 a に相当するコドン G C G (3 3 4 - 3 3 6) で始まるコドンによりコードされている。

図 2 A および 2 B は、4 種のサブチリシンのアミノ酸配列を示している。一番上の列は、*Bacillus amyloliquefaciens* から得たサブチリシン (サブチリシン B P N ' と呼ばれることもある) のアミノ酸配列を表す (Seq.ID No.2)。2 番目の列は、*Bacillus subtilis* から得たサブチリシンのアミノ酸配列を示す (Seq.ID No.3)。第 3 の列は、*B. licheniformis* から得たサブチリシンのアミノ酸配列を示す (Seq.ID No.4)。第 4 の列は、*Bacillus lentus* から得たサブチリシン (PCT WO 89/06276 においてサブチリシン 3 0 9 と呼ばれている) のアミノ酸配列を示す (Seq.ID No.5)。* の記号は、サブチリシン B P N ' に比較して特定のアミノ酸残基の不在を表す。

図 3 A ~ C は、*Bacillus amyloliquefaciens* サブチリシンの D N A およびアミノ酸配列およびこの遺伝子の部分制限地図を示す (Seq.ID No.1)。

図 4 は、*Bacillus amyloliquefaciens* (B P N ') および *Bacillus lentus* (野生型) のサブチリシンの中に保存されたアミノ酸残基を示す。

図 5 A および 5 B は、本発明の好ましい態様の D N A およびアミノ酸残基を示す (P210I/S156E/S166D/N76D/S103A/V104I) (Seq.ID No.8 および 9)。この図の D N A は、7 6 位および 1 6 6 位でアスパルテート、1 5 6 位でグルタメート、1 0 3 位でアラニンおよび 2 1 0 位および 1 0 4 位でイソロイシンをコードするように記載された方法で修飾されている。成熟サブチリシン変種タンパク質は、A 1 a に対応するコドン G C G (3 3 4 - 3 3 6) で始まるコドンによりコードされている。

好ましい実施態様の詳細な説明

プロテアーゼ酵素

本発明は、変種のアミノ酸配列が誘導された元である前駆カルボニルヒドロラーゼに比較して、異なるタンパク質分解活性、安定性、基質特異性、p H プロファイルおよび/または性能特性を有する天然由来でないカルボニルヒドロラーゼ変種であるプロテアーゼ酵素を含む。既に述べたとおり、前記プロテアーゼ酵素は、トリプシン様特異性を持つように設計されており、好ましくは漂白安定性でもある。前記前駆カルボニルヒドロラーゼは、天然由来カルボニルヒドロラーゼでもよいし、組換えヒドロラーゼでもよい。具体的には、そのようなカルボニルヒドロラーゼ変種は、天然にみられず、前記カルボニルヒドロ

10

20

30

40

50

ーゼの複数のアミノ酸残基を異なるアミノ酸で置換することにより誘導されたアミノ酸配列を有する。前駆酵素の複数のアミノ酸残基は、+ 2 1 0 位と、+ 3 3 , + 6 2 , + 6 7 , + 7 6 , + 1 0 0 , + 1 0 1 , + 1 0 3 , + 1 0 4 , + 1 0 7 , + 1 2 8 , + 1 2 9 , + 1 3 0 , + 1 3 2 , + 1 3 5 , + 1 5 6 , + 1 5 8 , + 1 6 4 , + 1 6 6 , + 1 6 7 , + 1 7 0 , + 2 0 9 , + 2 1 5 , + 2 1 7 , + 2 1 8 および + 2 2 2 の1つまたは複数との組み合わせに対応しており、番号をつけた位置は、*Bacillus amyloliquefaciens*からの天然由来サブチリシンまたは他のカルボニルヒドロラーゼまたはサブチリシン、例えば *Bacillus lentus* サブチリシンなどの中の等価なアミノ酸残基に対応している。

本発明の組成物に有用なプロテアーゼ酵素であるカルボニルヒドロラーゼ変種は、1つまたは複数の追加の修飾と組合わせて + 2 1 0 のアミノ酸残基の置換を含んでなる。以上
10
列記したアミノ酸置換のいかなる組合せも用いることができるが、本発明に有用な好ましい変種プロテアーゼ酵素は、下記組合せ：2 1 0 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 ; 2 1 0 / 1 0 3 ; 2 1 0 / 1 0 4 ; 2 1 0 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 4 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 4 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 4 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 / 2 1 7 および / または 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 / 2 2 2 ; 2 1 0 / 6 7 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 / 2 2 2 ; 2 1 0 / 6 7 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 / 2 1 8 / 2 2 2 で、アミノ酸残基の置換、欠損および挿入を含んでなる。最も好ましくは、本発明に有用な変種酵素は、*B. lentus* の以下の残基組合せ：2 1 0 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 5 6 / 1 6 6 および 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 1 6 6 でアミノ酸残基の置換、欠損および挿入を含んでなり、2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 1 6 6 が最も好ましい。
20
30

このようなカルボニルヒドロラーゼまたはサブチリシン変種をコードする変種DNA配列は、天然由来または組換え前駆酵素をコードする前駆DNA配列より誘導される。変種DNA配列は、*Bacillus lentus* において + 2 1 0 , + 3 3 , + 6 2 , + 6 7 , + 7 6 , + 1 0 0 , + 1 0 1 , + 1 0 3 , + 1 0 4 , + 1 0 7 , + 1 2 8 , + 1 2 9 , + 1 3 0 , + 1 3 2 , + 1 3 5 , + 1 5 6 , + 1 5 8 , + 1 6 4 , + 1 6 6 , + 1 6 7 , + 1 7 0 , + 2 0 9 , + 2 1 5 , + 2 1 7 , + 2 1 8 および + 2 2 2 の位置またはその如何なる組合せにも相当する前駆DNA配列によりコードされた1つまたは複数の特定アミノ酸残基の置換をコードするように前駆DNA配列を修飾することにより誘導される。本明細書において修飾について特定されたアミノ酸残基は *B. amyloliquefaciens* に適用できる番号付け（すべてのサブチリシンにおける残基位置を特定する常法になっている）に従い特定され
40
ているが、本発明に有用な好ましい前駆DNA配列は図1に示すような *Bacillus lentus* のDNA配列である。

これらの変種DNA配列は、1つまたは複数の追加の修飾と組合わせて + 2 1 0 位のアミノ酸残基の挿入または置換をコードしている。好ましくは、変種DNA配列は、下記組合せ：2 1 0 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 ; 2 1 0 / 1 0 3 ; 2 1 0 / 1 0 4 ; 2 1 0 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 4 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 4 / 1 6 6 ; 2 1
50

0 / 7 6 / 1 0 4 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 / 2 1 7 および / または 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 / 2 2 2 ; 2 1 0 / 6 7 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 6 6 / 2 1 8 / 2 2 2 で、アミノ酸残基の置換または挿入をコードする。最も好ましくは、変種 DNA 配列は、以下の残基組合せ：2 1 0 / 1 5 6 ; 2 1 0 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 1 5 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 1 6 6 / 2 1 7 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 5 6 / 1 6 6 ; 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 5 6 / 1 6 6 および 2 1 0 / 7 6 / 1 0 3 / 1 0 4 / 1 5 6 / 1 6 6 の修飾のためコードしている。これらの組み替え DNA 配列は、新規なアミノ酸配列および一般的に前駆カルボニルヒドロラーゼ DNA 配列にコードされた酵素の性質とは非常に異なる性質を少なくとも 1 つ有するカルボニルヒドロラーゼ変種をコードしている。そのような性質には、タンパク質分解活性、基質特異性、安定性、変化した pH プロファイルおよび / または向上した性質特徴が含まれる。

本明細書において有用なプロテアーゼ酵素は、指定されたアミノ酸残基位置における 19 の天然由来 L - アミノ酸のいずれかの置換も包含する。そのような置換は、どのような前駆サブチリシン（原核生物、真核生物、哺乳動物など）においても行うことができる。本出願書全体を通して、さまざまなアミノ酸を共通な 1 文字および 3 文字コードで表している。このようなコードは、D a l e , M . W . (1 9 8 9) , M o l e c u l a r G e n e t i c s o f B a c t e r i a , J o h n W i l e y & S o n s , L t d . , A p p e n d i x B に確認される。

好ましくは、特定アミノ酸残基位置の各行で行われる置換には、+ 2 1 0 位における I、V、L および A を含む置換、+ 3 3 , + 6 2 , + 7 6 , + 1 0 0 , + 1 0 1 , + 1 0 3 , + 1 0 4 , + 1 0 7 , + 1 2 8 , + 1 2 9 , + 1 3 0 , + 1 3 2 , + 1 3 5 , + 1 5 6 , + 1 5 8 , + 1 6 4 , + 1 6 6 , + 1 6 7 , + 1 7 0 , + 2 0 9 , + 2 1 5 , + 2 1 7 および + 2 1 8 位における D または E の置換、7 6 位における D、H、E、G、F、K、P および N を含む置換；1 0 3 位における Q、T、D、E、Y、K、G、R および S を含む置換；ならびに 1 0 4 位における S、Y、I、L、M、A、W、D、T、G および V を含む置換；ならびに 2 2 2 位における S、C、A を含む置換を含むが、これらに限定されない。そのような各位置において置換される特に好ましいアミノ酸を、以下の表 I に示す。特定アミノ酸が表 I に示されているが、いかなるアミノ酸も特定残基で置換されてもよいことが理解されるべきである。

表 I

アミノ酸残基

+210

+33, +62, +100, +101, +107, +128, +129, +130, +135, +156, +158, +164, +166, +167, +170, +209, +215, +217 および +218

+76

+103

+104

+222

置換／挿入される好ましいアミノ酸

I, V, L, A

D, E

D, H

A, Q, T, D, E, Y, K, G, R

I, Y, S, L, A, T, G

S, C, A

カルボニルヒドロラーゼは、

O

||

C - X

結合を含む化合物を加水分解するプロテアーゼ酵素であり、ここで式中 X は酸素または窒素である。それらには天然由来に産出するカルボニルヒドロラーゼおよび組換えカルボニ

10

20

30

40

50

ルヒドロラーゼがある。天然由来カルボニルヒドロラーゼには主としてヒドロラーゼ、例えばサブチリシンまたはメタロプロテアーゼのようなペプチドヒドロラーゼがある。ペプチドヒドロラーゼとしては、 α -アミノアシルペプチドヒドロラーゼ、ペプチジルアミノ酸ヒドロラーゼ、アシルアミノヒドロラーゼ、セリンカルボキシペプチダーゼ、メタロカルボキシペプチダーゼ、チオールプロテイナーゼ、カルボキシリプロテイナーゼおよびメタロプロテイナーゼがある。セリン、メタロ、チオールおよび酸プロテアーゼが、エンドおよびエキソプロテアーゼと共に含まれる。

「組換えカルボニルヒドロラーゼ」とは、天然由来カルボニルヒドロラーゼをコードするDNA配列が、カルボニルヒドロラーゼアミノ酸配列において1つまたは複数のアミノ酸の置換、挿入または欠失をコードする変異DNA配列を生じるように修飾されているカルボニルヒドロラーゼのことである。適した修飾法は本明細書および米国特許第4,760,025号、米国特許第5,204,015号および米国特許第5,185,258号に開示されており、それらの開示を参照により本明細書の一部とする。

サブチリシンは、一般的にタンパク質またはペプチドのペプチド結合を開裂するように作用する細菌または真菌カルボニルヒドロラーゼである。本明細書で用いられる「サブチリシン」とは、天然由来サブチリシンまたは組換えサブチリシンを意味する。天然由来一連のサブチリシンは、さまざまな微生物種により生成され、しばしば分泌されることが知られている。この系統のメンバーのアミノ酸配列は完全に相同的ではない。しかしながら、この系統のサブチリシンは同一または類似したタイプのタンパク質分解活性を示す。この種のセリンプロテアーゼは、それらとキモトリプシン関連クラスのセリンプロテアーゼとを区別する触媒性三残基(catalytic triad)を規定する共通なアミノ酸配列を有する。サブチリシンおよびキモトリプシン関連セリンプロテアーゼは両方ともアスパルテート、ヒスチジンおよびセリンからなる触媒性三残基を有する。サブチリシン関連プロテアーゼにおいて、これらアミノ酸の相対順序は、アミノ末端からカルボキシ末端へ読取ると、アスパルテート-ヒスチジン-セリンの順である。しかしながら、キモトリプシン関連プロテアーゼでは、相対順序がヒスチジン-アスパルテート-セリンである。したがって、本明細書でのサブチリシンは、サブチリシン関連プロテアーゼの触媒性三残基を有するセリンプロテアーゼを意味する。例としては、本明細書において図2に特定されるサブチリシンを含むが、それに限定されない。

「組換えサブチリシン」とは、サブチリシンをコードするDNA配列が、天然由来サブチリシンアミノ酸配列中の1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入をコードする変種(または変異)DNA配列を生じるように修飾されたサブチリシンを意味する。このような修飾を生じる方法であって本明細書に開示されたものと組み合わせてもよい適切な方法には、米国特許第4,760,025号、米国特許第5,204,015号および米国特許第5,185,258号に開示されたものがある。

「非ヒトカルボニルヒドロラーゼ」およびそれらをコードするDNAは、多くの原核および真核生物から得られる。原核生物の適切な例には、E.coliまたはPseudomonasのようなグラム陰性生物と、MicrococcusまたはBacillusのようなグラム陽性細菌がある。カルボニルヒドロラーゼおよびそれらの遺伝子が得られ得る真核生物の例には、Saccharomyces cerevisiaeのような酵母、Aspergillus sp.のような真菌および非ヒト哺乳動物源、例えばカルボニルヒドロラーゼキモシンをコードする遺伝子が得られるbovine sp.がある。サブチリシンの場合のように、一連のカルボニルヒドロラーゼシリーズは、その系列のメンバー間で完全に相同的ではないアミノ酸配列を有するがそれでもなお同一または類似する種類の生物活性を示す様々な関連種から得られる。したがって、本明細書で用いられる非ヒトカルボニルヒドロラーゼは、原核および真核源と直接または間接的に関連したカルボニルヒドロラーゼに関係する機能的規定を有する。

「カルボニルヒドロラーゼ変種」は、「前駆カルボニルヒドロラーゼ」のアミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列を有する。前駆カルボニルヒドロラーゼには、天然由来カルボニルヒドロラーゼおよび組換えカルボニルヒドロラーゼがある。カルボニルヒドロラーゼ変種のアミノ酸配列は、前駆アミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失また

10

20

30

40

50

は挿入により、前駆ヒドロラーゼアミノ酸配列から「誘導」される。このような修飾は、前駆カルボニルヒドロラーゼ酵素自体の操作よりもむしろ、前駆カルボニルヒドロラーゼのアミノ酸配列をコードする「前駆DNA配列」に関するものである。前駆DNA配列のこのような操作に適した方法には、本明細書および米国特許第4,760,025号に開示された方法がある。

*Bacillus lentus*サブチリシンの+210位と、下記の位置：+33, +62, +67, +76, +100, +101, +103, +104, +107, +128, +129, +130, +132, +135, +156, +158, +164, +166, +167, +170, +209, +215, +217, +218および+222のうち1つまたは複数との組み合わせに相当する特定残基は、本明細書において変異のため特定される。好ましくは、修飾される残基は、下記の組合せ：210/156; 210/166; 210/76; 210/103; 210/104; 210/217; 210/156/166; 210/156/217; 210/166/217; 210/76/156; 210/76/166; 210/76/217; 210/76/156/166; 210/76/156/217; 210/76/166/217; 210/76/103/156; 210/76/103/166; 210/76/103/217; 210/76/104/156; 210/76/104/166; 210/76/104/217; 210/76/103/104/156/166; 210/76/103/104/217; 210/76/103/104/156/217; 210/76/103/104/166/217および/または210/76/103/104/156/166/217から選択され、好ましい組合せは：210/156; 210/166; 210/217; 210/156/166; 210/156/217; 210/166/217; 210/76/156/166; 210/76/103/156/166および210/76/103/104/156/166である。これらのアミノ酸の位置番号は、図3に示した成熟*Bacillus amyloliquefaciens*サブチリシン配列に割り当てられた番号を指す。しかし、本発明において有用なプロテアーゼ酵素は、この特定のサブチリシンの変異に限定されず、*Bacillus amyloliquefaciens*サブチリシンの特定された残基に「等価」な位置にあるアミノ酸残基を含む前駆カルボニルヒドロラーゼまで及ぶ。好ましくは、前駆サブチリシンは*Bacillus lentus*サブチリシンであり、置換、欠失または挿入は上記のものに相当する*B. lentus*の等価なアミノ酸残基で行われる。

前駆カルボニルヒドロラーゼの残基（アミノ酸）は、それが*Bacillus amyloliquefaciens*サブチリシンにおける特定残基またはその残基の一部に相同（ホモログ）的である（即ち、一次または三次構造の位置に対応している）か、または類似（アナログ）的である（即ち、同一または類似した、化学的に化合、反応または相互作用する機能的能力を有する）ならば、*Bacillus amyloliquefaciens*サブチリシンの残基に等価である。

一次構造との相同性を確立するために、前駆カルボニルヒドロラーゼのアミノ酸配列は*Bacillus amyloliquefaciens*サブチリシン一次配列、特に配列が公知であるサブチリシンにおいて非変種であることが知られた一連の残基と直接比較される。本明細書の図4は*amyloliquefaciens*サブチリシンと*B. lentus*サブチリシンとの間における保存残基を示している。保存残基を整列させ、整列状態（アライメント）を維持する（即ち、任意の欠失および挿入により保存残基の除去を避ける）ために必要な挿入および欠失を行った後、*Bacillus amyloliquefaciens*サブチリシンの一次配列中の特定アミノ酸に等価である残基が明確にされる。保存残基のアライメントは、このような残基の100%を保存しているのが望ましい。しかしながら、保存残基の75%以上または50%ほどの少ないアライメントでも、等価な残基を明らかにする上で十分である。触媒性三残基Asp32/His64/Ser221の保存は維持しなくてはならない。

例えば、図2において、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) および*Bacillus lentus*が生産するサブチリシンのアミノ酸配列が、アミノ酸配列間で最大量の相同性を与えるように並べられている。これらの配

10

20

30

40

50

列を比較すると、各配列に保存残基がいくつか含まれていることが示されている。これらの保存残基（B P N' およびB. lentus間）は図4で特定されている。

したがって、これらの保存残基は、Bacillus lentus由来サブチリシン（1989年7月13日付で発行されたPCT公開W0089/06279）および本明細書において好ましいサブチリシン前駆酵素のような他のカルボニルヒドロラーゼにおけるBacillus amyloliquefaciensサブチリシンの対応等価アミノ酸残基を明確にするために用いることができる。これらの特定のアミノ酸配列が、保存残基の最大相同性を生じるよう、Bacillus amyloliquefaciensサブチリシンの配列と共に図2Aおよび2Bで並べられている。見て分かるように、Bacillus amyloliquefaciensサブチリシンと比較してBacillus lentusの配列にはいくつかの欠失がある。したがって、例えば、他のサブチリシンにおいてBacillus amyloliquefaciensサブチリシンのVal165に等価なアミノ酸は、B. lentusおよびB. licheniformisの場合にはイソロイシンである。

したがって、例えば、+210位のアミノ酸はB. amyloliquefaciensおよびB. lentusサブチリシン両方でプロリン（P）である。しかしながら、本発明で有用な好ましいサブチリシン変種において、Bacillus amyloliquefaciensサブチリシンで+210に等価なアミノ酸はイソロイシン（I）で置換されている。本明細書において置換について特定されたすべてのアミノ酸残基对各位置で好ましい置換の比較が、表IIに示されている。

表II

	<u>+210</u>	<u>+156</u>	<u>+166</u>	<u>+217</u>	<u>+76</u>	<u>+103</u>	<u>+104</u>
B. amyloliquefaciens (野生型)	P	E	G	Y	N	Q	Y
B. lentus (野生型)	P	S	S	L	N	S	V
最も好ましい置換	I	E/D	E/D	E/D	D	A	I/Y

等価な残基は、その三次構造がX線結晶学で決定された前駆カルボニルヒドロラーゼの三次構造レベルでホモロジーを決定することにより明らかにすることもできる。等価な残基は、前駆カルボニルヒドロラーゼおよびBacillus amyloliquefaciensサブチリシンの特定アミノ酸残基の2以上の主鎖原子（NとN、CAとCA、CとC、およびOとO）の原子座標が、アライメントの後に0.13nm、好ましくは0.1nm以内であるものとして定義される。最良のモデルを配向および配置し、Bacillus amyloliquefaciensサブチリシンに対する、問題とするカルボニルヒドロラーゼの非水素タンパク質原子の原子座標の最大の重なりが得られて初めて並びが実現される。最良のモデルは、利用可能な最高分解能において実験回折データに関して最低のR因子を与える結晶学モデルである。

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

Bacillus amyloliquefaciensサブチリシンの特定残基と機能的に類似している（アナログな）等価残基とは、Bacillus amyloliquefaciensサブチリシンの特定残基に限られかつ属する方法で、タンパク質構造、基質結合性または触媒作用を変更、修飾または寄与するようなコンホメーションをとることのできる前駆カルボニルヒドロラーゼのアミノ酸として規定される。さらに、それらは、所定残基の主鎖原子が相同的な位置を占めることに基づく等価性の基準を満たさないかもしれないが、残基の少なくとも2つの側鎖原子の原子座標がBacillus amyloliquefaciensサブチリシンの対応する側鎖原子の0.13nm内に存在する程度までアナログな位置を占める（三次構造がX線結晶学で得られた）前駆カルボニルヒドロラーゼの残基である。Bacillus amyloliquefaciensサブチリシンの三次元構造の座標はEP0公開No.0251446（米国特許出願第SN 07/898,382号に相当し、その開示を参照により本明細書の一部とする）に示されており、三次構造のレベルで等価残基を決めるために上記のように使用できる。

置換、挿入または欠失について特定された残基の一部は保存残基であるが、そうではない

10

20

30

40

50

ものもある。保存されていない残基の場合、1つまたは複数のアミノ酸の置換は、天然でみられるものに相当しないアミノ酸配列を有する変種を生じる置換に限定される。保存残基の場合、このような置換は天然由来配列を生み出さないはずである。本発明で有用なカルボニルヒドロラーゼ変種には、カルボニルヒドロラーゼ変種の成熟形ならびにこのようなヒドロラーゼ変種のプロおよびブレプロ形がある。ブレプロ形は、カルボニルヒドロラーゼ変種の発現、分泌および成熟を促進するので、好ましい構造である。

本発明により酵素をつくる方法および手順は公知であり、PCT公開W0 95/10615に開示されているが、その開示を参照により本明細書の一部とする。

本発明の酵素はトリプシン様の特異性を有する。すなわち、本発明の酵素は、電荷を帯びたアミノ酸残基、より具体的にはアルギニンおよびリジンなどの残基のペプチド結合の方
10
を、疎水性のアミノ酸残基、より具体的にはフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンのペプチド結合を優先的に開裂するよりも優先的に開裂することによりタンパク質を加水分解する。後者のプロファイルを持つ酵素はキモトリプシン様特異性を有する。以上で議論したような基質特異性は2つの合成基質に対する酵素の働きにより説明される。トリプシン様特異性を持つプロテアーゼは、合成基質 b V G R - p N A を合成基質 s u c A A P F - p N A よりも優先的に加水分解する。それとは対照的に、キモトリプシン様プロテアーゼ酵素は、前者より後者をはるかに速く加水分解する。本発明の目的には、以下の手順に従い、本発明のプロテアーゼ酵素のトリプシン様特異性を明確にした。

p H が 1 0、温度が 2 5 の固定量のグリシン緩衝液を、標準的な 1 0 m L 試験管に加える。0 . 5 p p m の試験すべき活性酵素を前記試験管に加える。緩衝溶液 1 m L あたり約
20
1 . 2 5 m g の合成基質を試験管に加える。混合物を 1 5 分間 2 5 でインキュベートする。インキュベーション時間の終了の際に、酵素阻害剤、P M S F を緩衝溶液 1 m L あたり約 0 . 5 m g の濃度で混合物に加える。混合物の吸光度または O D 値を波長 4 1 0 n m で読む。前記吸光度は、合成基質に対する酵素の活性を示している。吸光度が大きいほど、その基質に対する活性のレベルは高い。

次に、各酵素の特異性を決定するため、2つの合成基質タンパク質に関する吸光度を特異性比に変換する。本発明の目的には、前記の比は、特異性の式：

[s A A P F - p N A における活性] / [b V G R - p N A における活性]

により決定される。約 1 0 未満、より好ましくは約 5 未満、最も好ましくは約 2 . 5 未満の比を有する酵素が、トリプシン様活性を示すと考えてよい。
30

クリーニング添加剤

本発明のクリーニング組成物は、上述のようなプロテアーゼ酵素の他に、前記プロテアーゼ酵素と適合する1つまたは複数のクリーニング添加剤を含んでなる。本明細書で用いる「クリーニング添加剤」という用語は、所望のクリーニング組成物の種類および製品の形態（例、液体、粒状、スプレー組成物）のために選択された、いかなる液体、固体または気体の物質をも意味し、その物質は組成物に用いられるプロテアーゼ酵素と適合している。クリーニング添加剤の具体的な選択は、クリーニングされる表面、物品または繊維および使用中のクリーニング状態に対して望まれる組成物の形態（例、洗浄洗剤使用）を考慮することにより容易に行える。本明細書で用いる「適合」という用語は、クリーニング組成物物質が、プロテアーゼが通常の使用状況中に望まれるほど有効でなくなる程度に、
40
プロテアーゼ酵素の蛋白質分解活性を低下させないことを意味する。具体的なクリーニング組成物物質は、以下で詳細に例示される。

有効量の1つまたは複数の上記プロテアーゼ酵素が、タンパク質性汚れ除去の必要があるさまざまな表面をクリーニングするのに有用な組成物に含まれる。そのようなクリーニング組成物には、形態が制限されない（例、液体および粒状）硬い表面をクリーニングするための洗剤組成物；形態が制限されない（例、粒状、液体および棒処方）繊維をクリーニングするための洗剤組成物；食器洗浄組成物（形態が制限されず、粒状および液体の自動食器洗いの両方を含む）；形状が制限されない口内クリーニング組成物（例、歯磨き粉、練り歯磨きおよび洗口液処方）；形態が制限されない（例、液体、錠剤）義歯クリーニング組成物がある。本明細書で用いる「有効量のプロテアーゼ酵素」とは、特定のクリーニ
50

ング組成物で必要とされる酵素活性を達成するために必要な、上述のプロテアーゼ酵素の量のことである。そのような有効量は、当業者には容易に確かめることができ、用いられる特定の酵素変種、クリーニング用途、クリーニング組成物の具体的な組成および液体または乾燥した組成物（例、粒状、棒状）のどちらが求められているかなどの多くの要因に基づいている。

好ましくは、本発明のクリーニング組成物は、約 0.0001% から約 10% の、より好ましくは約 0.001% から約 1% の、さらにより好ましくは約 0.001% から約 0.1% の 1 つまたは複数のプロテアーゼ酵素を含んでなる。また、好ましくは、本明細書で酵素対漂白剤比（E/B 比）と呼ばれる組成物 100 グラムあたりの活性酵素の mg 数と、洗浄溶液中のいずれかのペルオキシ酸から得られた理論有効 O_2 （「Av O_2 」）ppm との比が約 1:1 から約 20:1 になるような量でプロテアーゼ酵素は組成物中に存在する。プロテアーゼ酵素が用いられ得るさまざまなクリーニング組成物を数例、以下でさらに詳細に議論する。さらに、本発明の組成物は、組成物の重量で約 1% から約 99.9% の添加剤組成物を含んでもよい。

10

任意の洗浄酵素

本明細書の洗剤組成物は、任意に 1 種または複数の洗浄酵素も含んでもよい。このような酵素には、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼおよびリパーゼがある。そのような物質は当業界に公知であり、などの商標で市販されている。それらは、懸濁液の形態、「マルム（marumes）」または「プリル（prills）」で本明細書の非水性液体洗剤組成物に混和することができる。他の適した種類の酵素は、非イオン性界面活性剤中の酵素のスラリーの形態のものを含んでなり、例えば、Novo Nordisk から「SL」の商標で市販されている酵素や、Novo Nordisk から「LDP」の商標で販売されているマイクロカプセル封入酵素がある。適した酵素および使用濃度は、米国特許第 5,576,282 号、第 5,705,464 号および第 5,710,115 号に開示されている。

20

従来の酵素プリルの形態で本明細書の組成物に添加される酵素は、本明細書での使用に特に好ましい。そのようなプリルは、その大きさが約 100 から 1,000 ミクロン、より好ましくは約 200 から約 800 ミクロンであり、組成物の非水液体相全体に懸濁される。本発明の組成物中のプリルは、他の酵素形態と比較して、時間に対する酵素活性の保持の点で特に望ましい酵素安定性を示すことが分かっている。したがって、酵素プリルを使用する組成物は、酵素が水性液体洗剤に混合される場合にしばしば使用しなければならない酵素安定を含有する必要はない。

30

本明細書で用いる「洗浄酵素（detergent enzyme）」は、洗濯、硬質表面クリーニングまたはパーソナルケア洗剤組成物において、クリーニング、汚れ除去または他の有益な効果を有する全ての酵素を意味する。好ましい洗浄酵素は、プロテアーゼ、アミラーゼおよびリパーゼなどのヒドロラーゼである。洗濯目的での好ましい酵素には、プロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼおよびペルオキシターゼがあるが、これらに限定されない。アミラーゼおよび/またはプロテアーゼが自動食器洗いに特に好ましく、それらには現在市販されている種類および相次いで改良されるがますます漂白適合性であるが、漂白失活感受性を残している改良された種類の両方が含まれる。

適切な酵素の例としては、ヘミセルラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、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、ケラタナーゼ、レダクターゼ、オキシターゼ、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、ブルナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ、マラーゼ（malanases）、 β -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、ラッカーゼおよび公知のアミラーゼまたはそれらの混合物がある。

40

そのような好適の酵素の例は、米国特許第 5,705,464 号、第 5,710,115 号、第 5,576,282 号、第 5,728,671 号および第 5,707,950 号に開示されている。

特に有用なプロテアーゼは、The Procter & Gamble Company による 1995 年 11 月 9 日発行の PCT 公開 W0 95/30010；The Procter & Gamble Company による 1995 年 11 月 9 日発行の PCT 公開 W0 95/30011；および The Procter & Gamble Company による 1995 年 11

50

月 9 日発行の PCT 公開 W0 95/29979 に記載されている。好適なプロテアーゼは、デンマークの Novo Nordisk A/S から ESPERASE^{▲ R ▼}、ALCALASE^{▲ R ▼}、DURAZYME^{▲ R ▼} および SAVINASE^{▲ R ▼} として市販されており、オランダの Gist-Brocades から MAXATASE^{▲ R ▼}、MAXACAL^{▲ R ▼}、PROPERASE^{▲ R ▼} および MAXAPEM^{▲ R ▼} として市販されている。

米国特許第 5,705,464 号、第 5,710,115 号、第 5,576,282 号、第 5,728,671 号および第 5,707,950 号に開示されたペルオキシダーゼ酵素に加え、他の適切なペルオキシダーゼ酵素が、1996 年 2 月 20 日に出願された欧州特許出願 EP No. 96870013.8 に開示されている。ラッカーゼ酵素も適切である。

好ましいエンハンサーは、置換されたフェンチアジン、フェノキサジン 10 - フェノチアジンプロピオン酸 (PPT)、10 - エチルフェノチアジン - 4 - カルボン酸 (EPC)、10 - フェノキサジンプロピオン酸 (POP) および 10 - メチルフェノキサジン (W0 94/12621 に記載されている) ならびに置換されたシリリングート (C₃ - C₅ 置換アルキルシリリングート) ならびにフェノールである。過炭酸ナトリウムまたは過ホウ酸ナトリウムは過酸化水素の好ましい発生源である。

前記のペルオキシダーゼは、通常、洗剤組成物の重量に対して活性酵素 0.0001% から 2% のレベルで、洗剤組成物に混和される。

本発明の洗剤組成物に含むことができる他の好ましい酵素にはリパーゼがある。洗剤用途に適したリパーゼ酵素には、英国特許第 1,372,034 号に開示されているように *Pseudomonas stutzeri* ATCC 19.154 などの *Pseudomonas* 群の微生物が生成するものがある。適したリパーゼには、*Pseudomonas fluorescent* IAM1057 により生成されるリパーゼの抗体と陽性の免疫学的交叉反応を示すものがある。このリパーゼは、日本、名古屋の Amano Pharmaceutical Co. Ltd., からリパーゼ P「Amano」の商標で市販されており、以下で「Amano-P」と呼ぶ。他の好適な市販リパーゼには、Amano-CES、リパーゼ ex *Chromobacter viscosum*、例えば日本、田方の Toyo Jozo Co., から市販される *Chromobacter viscosum* var. *lipolyticum* NRRLB 3673; 米国の U.S. Biochemical Corp. およびオランダの Disoynt Co. から市販の *Chromobacter viscosum* リパーゼ; リパーゼ ex *Pseudomonas gladioli* がある。特に好ましいリパーゼは、本発明の組成物とともに用いると非常に有効であると分かっている、M1 LIPASE^{▲ R ▼} および LIPOMAX^{▲ R ▼} (Gist-Brocades) ならびに LIPOLEASE^{▲ R ▼} および LIPOLEASE ULTRA^{▲ R ▼} (Novo) などのリパーゼである。

特別な種類のリパーゼ、すなわち界面活性を必要としないリパーゼと考えられ得るクチナーゼ [EC 3.1.1.50] も適切である。洗剤組成物へのクチナーゼの添加は、例えば W0 88/09367 (Genencor) に記載された。

以上で言及したリパーゼに加え、本発明の洗剤組成物にホスホリパーゼが混和されてもよい。適したホスホリパーゼの非制限的な例としては、EC 3.1.1.32 Phospholipase A1; EC 3.1.1.4 Phospholipase A2; EC 3.1.1.5 Lysopholipase; EC 3.1.4.3 Phospholipase C; EC 3.1.4.4 Phospholipase D がある。市販のホスホリパーゼには、デンマークの Novo Nordisk A/S から市販の LECITASE^{▲ R ▼} および Sigma から市販の Phospholipase A2 がある。本発明の組成物にホスホリパーゼが含まれる場合、アミラーゼも含まれることが好ましい。理論に縛られることを望まずに、ホスホリパーゼとアミラーゼの組合わさった作用が強固な汚れ除去、特に脂性/油性、デンプン質の非常に色の付いたしみや汚れの除去を提供すると考えられている。好ましくは、ホスホリパーゼおよびアミラーゼが存在する場合、純粋な酵素重量比で 4500:1 と 1:5 の間、より好ましくは 50:1 と 1:1 の間で本発明の組成物に混和される。

炭水化物をベースにした染みの除去のため、公知のアミラーゼ (α および / または β) を含むことができる。1994 年 2 月 3 日に発行された Novo Nordisk A/S の W0 94/02597 は、変異アミラーゼを混和したクリーニング組成物を記載している。1994 年 8 月 18 日に発行された Genencor の W0 94/18314 および 1995 年 4 月 20 日に発行された Novo Nordisk A/S の W0 95/10603 も参照のこと。洗剤組成

10

20

30

40

50

物への使用が知られている他のアミラーゼには、 α および β - アミラーゼの両方がある。
 α - アミラーゼは当業界に公知であり、米国特許第5,003,257号；欧州特許第252,666号；
W0 91/00353；フランス特許第2,676,454号；欧州特許第285,126号；欧州特許第525,610号
；欧州特許第368,341号；および英国特許明細書第1,296,839号（Novo）に開示されて
いるものがある。他の適したアミラーゼは、1994年8月18日に発行されたW0 94/18
314および1996年2月22日に発行されたGenencorのW0 96/05295に記載のP
URAFAC T O X A M[▲] R[▼] および95年4月に発行のW0 95/10603に開示された
Novo Nordisk A/Sからのアミラーゼ変種を含む安定性増加アミラーゼが
ある。

商業的な α - アミラーゼ製品の例としては、TERMAMYL[▲] R[▼]、BAN[▲] R[▼]、F 10
UNGAMYL[▲] R[▼] およびDURAMYL[▲] R[▼] があり、すべてデンマークのNovo
Nordisk A/Sから販売されている。W0 95/26397は、他の適切なアミラーゼ
を記載している。それは、25 から55 の温度範囲および8から10の範囲のpH値
で、Phadebas[▲] R[▼] α - アミラーゼ活性アッセイにより測定されたTERMAM
YL[▲] R[▼] の特定活性よりも少なくとも25%高い特定活性を有することで特徴づけられ
ている α - アミラーゼである。活性レベルに関して改善された性質と熱安定性および一層
高い活性レベルの組合せとを有する他のデンプン分解酵素は、W0 95/35382に記載されて
いる。

上記の酵素は、植物、動物、細菌、真菌および酵母などいかなる起源でもよい。精製済み
または未精製の形態のこれらの酵素を用いることができる。定義上、天然の酵素の変種も 20
含まれる。例えば、天然酵素のタンパクおよび/または遺伝子工学、化学的および/または
物理的修飾により、変種が得られる。酵素の生産を行う遺伝物質がクローニングされる
宿主生物による酵素の発現もよく行われる。

前記酵素は、通常、洗剤組成物の重量で活性酵素の0.0001%から2%の濃度で洗剤
組成物に混和される。酵素は、別々な単一の成分（1種の酵素を含有するブリル、粒体、
安定化された液体など）または2種以上の酵素の混合物（例、共粒体）として添加するこ
とができる。

添加できる他の適切な洗剤成分は、酵素酸化スカベンジャーである。そのような酵素酸化
スカベンジャーの例は、エトキシ化テトラエチレンポリアミンである。

ある範囲の酵素物質およびその合成洗剤組成物への混合手段は、Genencor In 30
ternationalに付与されたW0 9307263およびW09307260、Novoに付与され
たW08908694、McCarty他に1971年1月5日に付与された米国特許第3,553,139
号に開示されている。酵素は、1978年7月18日のPlace他の米国特許第4,101,
457号および1985年3月26日のHughesの米国特許第4,507,219号にさらに開示
されている。液体洗剤配合物に有用な酵素物質およびそのような配合物への混合は、19
81年4月14日のHora他の米国特許第4,261,868号に開示されている。

酵素安定剤

洗剤に用いる酵素は、さまざまな技術で安定化することができる。酵素安定化技術は19
71年8月17日のGedgely他の米国特許第3,600,319号および1986年10月29
日のVenegasの欧州特許第199,405号および欧州特許第200,586号に開示および例示 40
されている。酵素安定化系はまた、例えば、米国特許第3,519,570号にも記載されてい
る。プロテアーゼ、キシラナーゼおよびセルラーゼを生産する有用なBacillus, sp. AC13は、
Novoに付与されたW09401532に記載されている。本明細書で使用される酵素は、カル
シウムおよびまたはマグネシウムイオンの水溶性発生源の存在下で、そのようなイオンを
酵素に提供する完成組成物内で安定化することができる。適切な酵素安定剤および使用の
レベルは、米国特許第5,705,464号、第5,710,115号および第5,576,282号に記載されてい
る。

キレート剤

本明細書での洗剤組成物は、本明細書の非水性洗剤組成物中の金属イオン、例えば鉄およ
び/またはマンガンを経キレート化するように作用するキレート剤を任意に含んでもよい。 50

したがってそのようなキレート剤は、キレート剤がなければ過酸素漂白剤などの組成物成分を失活させる傾向のある組成物内の金属不純物と、錯体を形成するように作用する。有用なキレート剤としては、アミノカルボキシレート、ホスホネート、アミノホスホネート、多官能化置換芳香族キレート剤およびそれらの混合物がある。適切なキレート剤のさらなる例および使用のレベルは、米国特許第5,705,464号、第5,710,115号および第5,576,282号に記載されている。

有機ビルダー

本明細書の組成物は、任意に、しかし好ましくは、重量で約50%まで、より好ましくは約1%から約40%まで、さらにより好ましくは約5%から約30%までの洗剤ビルダー物質を含む。しかし、これよりも低濃度および高濃度のビルダーを除外するものではない。洗剤ビルダーは、鉱物硬度を制御するのに助けるため本明細書の組成物に含んでもよい。無機および有機のビルダーを用いることができる。ビルダーは、典型的には、粒子状の汚れを除去するのに助けるため、繊維洗濯組成物に用いられる。適切なビルダーは、米国特許第5,705,464号、第5,710,115号、第5,576,282号、第4,321,165号および第4,284,532号に記載されている。本明細書の液体洗剤に使用するための好ましいビルダーは、米国特許第5,705,464号、第5,710,115号、第5,576,282号および第4,284,532号に記載されている。

10

無機ビルダー

本明細書の洗剤組成物は、以上に列記したもの以外に、アルカリ性源として機能する1種または複数の無機洗剤ビルダーを任意に含んでもよい。そのような任意の無機ビルダーには、例えば、ゼオライトなどのアルミノシリケートがある。アルミノシリケートゼオライトおよび洗剤ビルダーとしてのその使用は、1986年8月12日に発行のCorkill他の米国特許第4,605,509号により詳しく議論されており、その開示を参照により本明細書の1部とする。この'509号米国特許で議論されているものなどの結晶層状シリケートも本明細書の洗剤組成物に使用するのに適切である。用いる場合、任意の無機洗剤ビルダーは、重量で、本明細書の組成物の約2%から15%含むことができる。無機ビルダーの追加の例は、米国特許第5,705,464号および第5,710,115号に記載されている。

20

界面活性剤

本発明により与えられる完全処方された洗剤組成物に含まれる洗浄界面活性剤は、使用される界面活性剤および望まれる効果により、洗剤組成物の重量の少なくとも0.01%、好ましくは約0.5%から約50%含まれる。非常に好ましい態様において、洗浄界面活性剤は、組成物の重量の約0.5%から約20%含まれる。

30

洗浄界面活性剤は、非イオン性、アニオン性、両性、双性イオン性またはカチオン性でよく、その非制限的な例が米国特許第5,707,950号および第5,576,282号に開示されている。これらの界面活性剤の混合物を用いることもできる。好ましい洗剤組成物は、アニオン洗浄界面活性剤またはアニオン界面活性剤と他の界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤との混合物を含む。

本明細書において有用な非制限的な例としては、従来の $C_{11} - C_{18}$ アルキルベンゼンスルホネートおよび第1、第2およびランダムアルキルスルフェート、 $C_{10} - C_{18}$ アルキルアルコキシルスルフェート、 $C_{10} - C_{18}$ アルキルポリグリコシドおよびそれらの対応するスルフェート化ポリグリコシド、 $C_{12} - C_{18}$ α-スルホネート化脂肪酸エステル、 $C_{12} - C_{18}$ アルキルおよびアルキルフェノールアルコキシレート（特にエトキシレートおよび混合エトキシ/プロポキシ）、 $C_{12} - C_{18}$ ベタインおよびスルホベタイン（「スルタイン」）、 $C_{10} - C_{18}$ アミノオキシドなどがある。他の従来型の有用な界面活性剤は、標準的なテキストに列記されている。

40

本発明の好ましい自動食器洗い組成物（ADD）において特に好ましい界面活性剤は、米国特許第5,705,464号および第5,710,115号に記載されている低発泡性非イオン性界面活性剤（LFNI）である。LFNIは、重量で0.01%から約10%、好ましくは約0.1%から約10%、最も好ましくは約0.25%から約4%の量で存在し得る。LFNIは、それらがADD製品に与える、改善されたウォーターシーティング作用（water-shee

50

ting action) (特にガラスから) のため A D D に最も典型的に用いられる。それらは、自動食器洗い中に遭遇する食品汚れを脱泡すると知られている、以下でさらに説明される非シリコン、非ホスフェートポリマー物質をも包含する。

好ましい L F N I には、非イオン性アルコキシ化界面活性剤、特に 1 級アルコールから誘導されたエトキシ化物およびそれらと米国特許第 5,705,464 号および第 5,710,115 号に記載されているようなポリオキシプロピレン / ポリオキシエチレン / ポリオキシプロピレン (P O / E O / P O) 逆ブロックポリマーなどのより複雑な界面活性剤とのブレンドがある。

L F N I が存在する本明細書の非常に好ましい A D D は、エトキシ化モノヒドロキシアルコールまたはアルキルフェノールを利用しており、さらに米国特許第 5,705,464 号および第 5,710,115 号に記載されているようにポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレンブロックポリマー化合物を含む。

使用することのできる L F N I としては、O l i n C o r p . からの P O L Y - T E R G E N T ^{▲ R ▼} S L F - 1 8 非イオン性界面活性剤および以上で議論したような融点特性を有する如何なる生分解性 L F N I も含まれる。

これらおよび他の非イオン性界面活性剤は当業界に公知であり、参照により本明細書の一部になっている K i r k - O t h m e r ' s E n c y c l o p e d i a o f C h e m i c a l T e c h n o l o g y 3 r d E d . , V o l . 2 2 , p p . 3 6 0 - 3 7 9 、 “ S u r f a c t a n t s a n d D e t e r s i v e S y s t e m ” により詳細に記載されている。

以下の開示により決定される泡立ち (如何なるシリコン起泡制御剤もない) が 2 インチ未満、好ましくは 1 インチ未満である混合界面活性剤を含んでなる A D D 組成物が好ましい。

この測定に有用な装置は、透明なブレキシングラasdアを備えた W h i r l p o o l D i s h w a s h e r (m o d e l 9 0 0) 、 L a b v i e w および E x c e l S o f t w a r e のついた I B M コンピュータデータ収集、S C X I インターフェースを用いた近接センサー (N e w a r k C o r p . - m o d e l 9 5 F 5 2 0 3) およびプラスチック定規である。

データは以下のとおり集められる。近接センサーが、金属ブラケットの下部食器洗いラックに固定される。センサーは下向きに機械底部の回転食器洗いアームの方を向いている (回転アームから約 2 c m の距離) 。回転アームのそれぞれの通過が近接センサーにより測定され、記録される。コンピューターにより記録されたパルスは、3 0 秒間隔でパルスを計測することにより、ボトムアームの 1 分あたりの回転数 (R P M) に変換される。アーム回転速度は、機械内および食器洗いポンプ内の泡の量に正比例する (すなわち、より多く泡がたつほど、アーム回転はゆっくりである) 。

プラスチック定規が食器洗い機のボトムラックに固定され、機械の床の方にのびている。洗浄サイクルの最後に、プラスチック定規を用いて (透明なドアから見ながら) 泡の高さが測定され、泡の高さとして記録される。

以下の手順で、A D D を泡の生成に関して、また非イオン性界面活性剤をその効用に関して評価する (非イオン性界面活性剤の別な評価のため、カスケードパウダーなどの A D D ベース処方を、ガラスバイアル瓶に別に入れて食器洗い機に加えられた非イオン性界面活性剤とともに用いる) 。

最初に、機械に水を満たし (水を適当な温度および硬度に調整する) すすぎサイクルまで進む。添加される如何なる A D D 製品 (または界面活性剤) も加えずに、R P M をサイクルの間 (約 2 分間) モニターする (機械が正常に機能することを確認する品質コントロールチェック) 。機械が洗浄サイクルのために一杯になり始めたら、水の温度および硬度を再び調整し、A D D 製品を機械の底部に加える (別に評価する界面活性剤の場合、A D D ベース処方が最初に機械底部に加えられ、次いで界面活性剤を含むガラスバイアルを機械のトップラックに逆さに置くことにより、界面活性剤が加えられる) 。R P M を洗浄サイクルの間モニターする。洗浄サイクルの最後で、泡の高さを、プラスチック定規を用い

10

20

30

40

50

て測定する。機械に再び水を満たし（適切な温度および硬度に水を調整）、もう一度すすぎサイクルを行う。RPMをこのサイクルの間モニターする。

平均RPMを、第1のすすぎ、メインの洗浄、最後のすすぎから計算する。％RPM効率が、対照系（非イオン性界面活性剤を含まないベースのADD処方）の平均RPMを試験界面活性剤の平均RPMで割ることにより計算される。RPM効率および泡の高さの測定を用いて、界面活性剤の全体的な泡プロファイルの大きさを決める。

漂白剤

過酸化水素源は、本明細書に取り入れられたKirk-Othmer's Encyclopedia of Chemical Technology 4th Ed. (1992, John Wiley & Sons), Vol. 4, pp. 271-300, "Bleaching agents (Survey)" に詳細に記載されており、さまざまなコートされた形態や修飾された形態を含む過ホウ酸ナトリウムおよび過炭酸ナトリウムの種々の形態が含まれる。「有効量」の過酸化水素源とは、汚れた食器がアルカリの存在下で、家庭用食器洗い機で消費者により洗浄される場合、過酸化水素源なしの組成物に比較して、汚れた食器からの汚れの除去（特に茶しぶ）を測定可能なほど改善することのできるいずれの量でもある。

より一般的には、本明細書の過酸化水素源は、消費者の使用条件下で有効量の過酸化水素を提供する便利な化合物または混合物のいずれでもある。レベルは広範囲に変えられるが、通常、本明細書のADD組成物の重量で約0.1%から約70%、より典型的には約0.5%から約30%の範囲である。

本明細書で用いられる好適な過酸化水素源は、便利な発生源のいずれでもあることができ、過酸化水素自体も含まれる。例えば、過ホウ酸塩、例えば過ホウ酸ナトリウム（いかなる水和物でもよいが、好ましくは1水和物または4水和物）、炭酸ナトリウム過酸化水素化物または等価な過炭酸塩、ピロリン酸ナトリウム過酸化水素化物、尿素過酸化水素化物または過酸化ナトリウムを本明細書で用いることができる。過硫酸塩漂白剤（例、Dupon t 製造のOXONE）などの利用可能な酸素の供給源も有用である。過ホウ酸ナトリウム1水和塩および過炭酸ナトリウムが特に好ましい。いかなる便利な過酸化水素源の混合物も使用できる。

好ましい過炭酸塩漂白剤は、約500マイクロメートルから約1,000マイクロメートルの範囲の平均粒度を有する乾燥粒子を含んでなり、前記粒子の10重量%以下が約200マイクロメートルより小さく、前記粒子の約10重量%以下が約1,250マイクロメートルより大きい。任意に、前記過炭酸塩は、シリケート、ボレートまたは水溶性界面活性剤でコーティングされることができる。過炭酸塩は、FMC、Solvay および Tokai Denka などのさまざまな発売元から入手可能である。

洗浄酵素を含む本発明のADD組成物には好ましくないが、本発明の組成物は塩素型の漂白物質を漂白剤として含んでもよい。そのような薬剤は当業界に公知であり、例えば、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム（NaDCC）がある。

本明細書の有効なADD組成物は、非イオン性界面活性剤およびビルダーのみを含み得るが、完全処方のADD組成物は、性能を改善または修飾するため、他の自動食器洗い洗剤添加剤も普通含み得る。これらの物質は、自動食器洗い組成物に求められる性質に関して適宜選択される。例えば、低スポッティングおよびフィルミングが望まれる場合、この好ましい組成物は、The American Society of Testing and Materials（「ASTM」）D3556-85（1989に再承認）「Standard Test Method for Deposition on Glassware During Mechanical Dishwashing」の標準試験により測定して、3以下、好ましくは2未満、最も好ましくは1未満のスポッティングおよびフィルミンググレードを有する。

(a) 漂白活性剤

好ましくは、組成物中の過酸素漂白成分は、活性剤（過酸前駆体）とともに処方されている。前記活性剤は、重量で組成物の約0.01%から約15%、好ましくは約0.5%か

10

20

30

40

50

ら約10%、より好ましくは約1%から約8%の濃度で存在している。好ましい活性剤は、テトラアセチルエチレンジアミン(TAED)、ベンゾイルカプロラクタム(BzCL)、4-ニトロベンゾイルカプロラクタム、3-クロロベンゾイルカプロラクタム、ベンゾイルオキシベンゼンスルホネート(OBS)、ノナノイルオキシベンゼンスルホネート(NOBS)、フェニルベンゾエート(PhBz)、デカノイルオキシベンゼンスルホネート(C₁₀-OBS)、ベンゾイルバレロラクタム(BZVL)、オクタノイルオキシベンゼンスルホネート(C₈-OBS)、過加水分解性エステルおよびそれらの混合物から成る群から選択され、最も好ましくはベンゾイルカプロラクタムおよびベンゾイルバレロラクタムである。約8から約9.5のpH範囲で特に好ましい漂白活性剤は、OBSまたはVL脱離基を有するものから選択されたものである。

10

好ましい漂白活性剤は、米国特許第5,698,504号、第5,695,679号、第5,686,014号、第5,130,045号および第4,412,934号および同時係属出願米国第08/064,624号、第08/064,623号、第08/064,621号、第08/064,562号、第08/064,564号、第08/082,270号およびM. Burns, A. D. Willey, R. T. Hartshorn, C. K. Ghoshに付与された「Bleach Compounds Comprising Peroxyacid Activators Used With Enzymes」という名称で、米国第08/133,691号(P & Gケース4890R)の同時係属出願に記載されているものであり、前記の明細書は全て参照により本明細書の一部になっている。

本発明において過酸素漂白化合物(AvOとして)と漂白活性剤のモル比は、一般的に少なくとも1:1、好ましくは約20:1から約1:1、より好ましくは約10:1から約3:1の範囲である。

20

4級置換漂白活性剤を含んでもよい。本洗剤組成物は、好ましくは、4級置換漂白活性剤(QSBA)または4級置換過酸(QSP)を含んでなる。より好ましいのは前者である。好ましいQSBA構造は、参照により本明細書の1部となった、それぞれ現在の米国特許第5,686,015号、第5,460,747号、第5,584,888号および第5,578,136号である1994年8月31日出願された同時係属米国第08/298,903号、第08/298,650号、第08/298,906号および第08/298,904号にさらに記載されている。

本明細書で有用な非常に好ましい漂白活性剤は、米国特許第5,698,504号、第5,695,679号および第5,686,014号に記載されているようにアミド置換されている。そのような漂白活性剤の好ましい例としては、(6-オクタンアミドカプロイル)オキシベンゼンスルホネート、(6-ノナンアミドカプロイル)オキシベンゼンスルホネート、(6-デカンアミドカプロイル)オキシベンゼンスルホネートおよびそれらの混合物がある。

30

米国特許第5,698,504号、第5,695,679号、第5,686,014号および第4,966,723号に開示されている他の有用な活性剤としては、1,2位に-C(O)OC(R¹)=N-部分が融合されているC₆H₄環などのベンズオキサジン型活性剤がある。

活性剤および正確な用途により、約6から約13、好ましくは約9.0から約10.5の使用pHを有する漂白系から良好な漂白結果を得ることができる。典型的には、例えば、電子吸引性部分を有する活性剤が、中性付近または準中性のpH範囲で用いられる。アルカリおよび緩衝剤を用いて、そのようなpHを確実にすることができる。

米国特許第5,698,504号、第5,695,679号および第5,686,014号に記載されているとおり、アシルラクタム活性剤、特にアシルカプロラクタム(例えば、WO 94-28102Aを参照)およびアシルバレロラクタム(米国特許第5,503,639号参照)は本明細書で非常に有用である。

40

(b) 有機過酸化物、特にジアシルペルオキシド

これらは、Kirk Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 17, John Wiley and Sons, 1982, pages 27-90、特にpages 63-72に詳細に説明されており、それらを全て参照により本明細書の一部とする。ジアシルペルオキシドが用いられる場合、スポットティング/フィルミングに及ぼす有害な影響が最低なものが好ましい。

(c) 金属含有漂白触媒

50

本発明の組成物および方法は、A D D組成物に用いるのに有効である金属含有漂白触媒を利用している。マンガンおよびコバルト含有漂白触媒が好ましい。

金属含有漂白触媒の1つの種類は、銅、鉄、チタン、ルテニウム、タングステン、モリブデン、またはマンガンカチオンなどの定義された触媒活性を持つ遷移金属カチオン、亜鉛、またはアルミニウムカチオンなどの触媒活性がほとんどまたは全くない添加剤金属カチオンならびに、触媒および添加剤金属カチオンに対し定義された安定定数を持つ隔離剤、特にエチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミンテトラ（メチレンホスホン酸）およびそれらの水溶性塩を含んでなる触媒系である。そのような触媒は、米国特許第4,430,243号に開示されている。

要すれば、本明細書の組成物は、マンガン化合物により触媒してもよい。そのような化合物および使用レベルは当業界に公知であり、例えば、米国特許第5,576,282号、第5,246,621号、第5,244,594号；第5,194,416号；第5,114,606号および欧州特許出願公開番号549,271A1、549,272A1、544,440A2および544,490A1に開示されているマンガン主体の触媒がある。これらの触媒の好ましい例としては、 $Mn^{IV}_2(u-O)_3(1,4,7-トリメチル-1,4,7-トリアザシクロノナン)_2(PF_6)_2$ 、 $Mn^{III}_2(u-O)_1(u-OAc)_2(1,4,7-トリメチル-1,4,7-トリアザシクロノナン)_2(ClO_4)_2$ 、 $Mn^{IV}_4(u-O)_6(1,4,7-トリアザシクロノナン)_4(ClO_4)_4$ 、 $Mn^{III}Mn^{IV}_4(u-O)_1(u-OAc)_2(1,4,7-トリメチル-1,4,7-トリアザシクロノナン)_2(ClO_4)_3$ 、 $Mn^{IV}(1,4,7-トリメチル-1,4,7-トリアザシクロノナン)-(OCH_3)_3(PF_6)$ およびそれらの混合物がある。他の金属主体の漂白触媒としては、米国特許第4,430,243号および第5,114,611号に開示されたものがある。漂白性を高めるためさまざまな錯体リガンドとともにマンガンを使用することも、米国特許第4,728,455号、第5,284,944号、第5,246,612号、第5,256,779号、第5,280,117号、第5,274,147号、第5,153,161号および第5,227,084号に報告されている。

本明細書に有用なコバルト漂白触媒は公知であり、例えば、米国特許第5,597,936号、第5,595,967号および第5,703,030号およびM. L. Tobe, "Base Hydrolysis of Transition-Metal Complexes", Adv. Inorg. Bioinorg. Mech., (1983), 2, pages 1-94に記載されている。本明細書で有用な最も好ましいコバルト触媒は、 $[Co(NH_3)_5OAc]Ty$ の式を有するコバルトペンタアミンアセテート塩であり、ここで式中「OAc」は、アセテート部分を表し「Ty」はアニオンであり、特にコバルトペンタアミンアセテートクロライド $[Co(NH_3)_5OAc]Cl_2$ ならびに $[Co(NH_3)_5OAc](OAc)_2$ 、 $[Co(NH_3)_5OAc](PF_6)_2$ 、 $[Co(NH_3)_5OAc](SO_4)$ 、 $[Co(NH_3)_5OAc](BF_4)_2$ および $[Co(NH_3)_5OAc](NO_3)_2$ （本明細書では「PAC」）である。

これらのコバルト触媒は、例えば、米国特許第5,597,936号、第5,595,967号および第5,703,030号、前記Tobeの記事およびそこで引用されている文献、1989年3月7日にDiakun他に付与された米国特許第4,810,410号、J. Chem. Ed (1989) 66(12)、1043-45; The Synthesis and Characterization of Inorganic Compounds, W. L. Jolly (Prentice-Hall; 1970), pp. 461-3; Inorg. Chem., 18, 1497-1502 (1979); Inorg. Chem., 21, 2881-2885 (1982); Inorg. Chem., 18, 2023-2025 (1979); Inorg. Synthesis, 173-176 (1960); Journal of Physical Chemistry, 56, 22-25 (1952)に教示されている公知の手順で容易に調製される。

自動食器洗い用組成物および濃縮粉末洗剤組成物に有用な漂白触媒を、本発明のために適宜選択してもよい。好適な漂白触媒の例については、米国特許第4,246,612号および第5,227,084号を参照のこと。

限定のためでないが実際問題として、本明細書の組成物およびクリーニング方法は、水性

10

20

30

40

50

洗浄媒体中に少なくとも1億分の1部のオーダーの活性漂白触媒種を提供するように調整することができ、好ましくは約0.01ppmから約25ppm、より好ましくは約0.05ppmから約10ppm、最も好ましくは約0.1ppmから約5ppmの漂白触媒種を洗浄液体中に提供し得る。自動洗浄工程の洗浄液体でそのようなレベルを得るために、本明細書での典型的な組成物は、クリーニング組成物の重量に対し約0.0005%から約0.2%、より好ましくは約0.004%から約0.08%の漂白触媒、特にマンガンまたはコバルト触媒を含んでなる。

pHおよび緩衝変動

本明細書の洗剤組成物の多くは緩衝されており、すなわちそれらは酸性の汚れ存在下でのpH低下に対して比較的抵抗性がある。しかし、本明細書の他の組成物は、並はずれて低い緩衝能力を有したり、実質的に緩衝されていないであろう。推奨される使用濃度でより穏やかにpHを制御または変化させる技術としては、緩衝剤の使用だけでなく、追加のアルカリ、酸、pHジャンプシステム、2区画容器などの使用があり、当業者に公知である。

10

本明細書での好ましいADD組成物は、米国特許第5,705,464号および第5,710,115号に記載されているように、水溶性アルカリ性無機塩および水溶性有機または無機ビルダーから選択されるpH調整成分を含んでなる。

水溶性シリケート

本自動食器洗い洗剤組成物は、米国特許第5,705,464号および第5,710,115号に記載されているように、さらに水溶性シリケートを含んでもよい。

20

マテリアルケア剤

好ましいADD組成物は、米国特許第5,705,464号、第5,710,115号および第5,646,101号に記載されているとおり、腐食防止剤および/または曇り防止剤として有効な1種または複数のマテリアルケア剤を含んでもよい。存在する場合、そのような保護物質は、好ましくは、例えばADD組成物の約0.01%から約5%の低濃度で混和される。

他の物質

本組成物に任意に含まれる洗剤成分および添加剤は、クリーニング性能の補助または向上、クリーニングされる基材の処理のための、または組成物の美観を改善するように設計された1または複数の物質を含むことができる。従来の業界確立使用濃度（通常添加剤は全体で、組成物重量の約30%から約99.9%、好ましくは約70%から約95%を占める）で含有させることができる本発明の組成物に用いられてもよい添加剤には、米国特許第5,705,464号、第5,710,115号、第5,698,504号、第5,695,679号、第5,686,014号および第5,646,101号に記載されているとおり、ノンホスフェートビルダー、キレート剤、酵素、起泡抑制剤、分散剤ポリマー（例えば、BASF Corp.またはRoehm & Haasから市販）、カラスベックル、シルバーケア、曇り防止および/または腐食防止剤、染料、充填剤、殺菌剤、アルカリ性源、ヒドロトロブ剤、酸化防止剤、酵素安定剤、香料、可溶化剤、担体、加工添加剤、顔料、pH制御剤などの他の活性成分がある。

30

以下の非制限的な実施例は、本発明のADD組成物をさらに説明する。

実施例 1

成分重量%

	<u>A</u>	<u>B</u>
トリポリリン酸ナトリウム (STPP)	24.0	45
炭酸ナトリウム	20.0	13.5
水和2.0rシリケート	15	13.5
非イオン性界面活性剤	2.0	2.0
ポリマー ¹	4.0	-
プロテアーゼ ² (4%活性)	0.83	0.83
アミラーゼ (0.8%活性)	0.5	0.5
過ホウ酸塩1水和物 (15.5%活性A v O) ³	14.5	14.5
コバルト触媒 ⁴	0.008	-
ジベンゾイルパーオキサイド (18%活性)	4.4	4.4
水、硫酸ナトリウムおよびさまざまな成分	残量	残量

10

1 60%アクリル酸/20%マレイン酸/20%エチルアクリレートまたは70%アクリル酸/10%マレイン酸/20%エチルアクリレートから選択されたターポリマー。

2 210I/76D/103A/104I/156E/166Dのアミノ酸置換を有するB. amyloliquefaciensサブチリシンのカルボニルヒドロラーゼ変種。

3 DeGussa Corp. から入手。上記処方のA v O濃度は2.2%。

20

4 上述のとおり調製されたペンタアミンアセテートコバルト(III)ニトレート; MnTACNに替えてもよい。

上記の食器洗い洗剤組成物例のADDを用いて、牛乳で汚れたグラス、デンプン、チーズ、卵、ベビーフードで汚れた銀食器類を家庭用自動食器洗い機にいれ、コールドフィル、60ピークまたは均一45-50洗淨サイクルのいずれかを用い、約1,000から約8,000ppmの典型的な組成物の製品濃度で洗淨することにより、それらの食器を洗うと、優れた結果が得られる。

実施例2

軽質液体食器洗い洗剤配合物を以下のとおり調製する。

成分組成物

30

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
	<u>重量%</u>		
界面活性剤	32.00	29.50	30.75
エタノール	4.00	4.00	4.00
クエン酸アンモニウム	0.06	0.06	0.06
塩化マグネシウム	3.32	3.32	3.32
硫酸アンモニウム	0.08	0.08	0.08
過酸化水素	200ppm	200ppm	200ppm
香料	0.18	0.18	0.18
プロテアーゼ1	0.50	0.50	0.50
水および微量成分	-----	残量-----	-----

40

1 210I/76D/103A/104I/156E/166Dのアミノ酸置換を有するB. amyloliquefaciensサブチリシンのカルボニルヒドロラーゼ変種。

本発明を好ましい実施態様および実施例に関連して詳細に記載したので、本発明の範囲を逸脱せずにさまざまな変化および修飾を行うことができることは当業者には明らかであるが、本発明は本明細書に記載したものに限定されたいと考えられるべきではない。

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Rai, Saroj
Correa, Paul E.
Zhu, Yong
Graycar, Thomas P.
Bott, Richard R.

(ii) TITLE OF INVENTION: Protease Enzymes for Tough Cleaning and/or
Spot and Film Reduction and
Compositions Incorporating Same

10

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 9

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

- (A) ADDRESSEE: The Procter & Gamble Company
(B) STREET: 11810 East Miami River Road
(C) CITY: Ross
(D) STATE: OH
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 45061

(v) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

20

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE: June 4, 1997
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

- (A) NAME: Bolam, Brian M.
(B) REGISTRATION NUMBER: 37,513
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 6689P

30

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

- (A) TELEPHONE: 513/627-2457
(B) TELEFAX: 513/627-0318

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1497 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

40

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 275 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

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

10

20

30

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 275 amino acids

(B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

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

Ala Ala Gln
275

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 274 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

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

20

30

40

His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
 225 230 235 240

Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
 245 250 255

Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
 260 265 270

Ala Gln

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

10

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 269 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

20

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
 115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
 130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser
 145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175

30

40

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 180 185 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
 195 200 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
 225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
 245 250 255

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

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1140 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

20

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..1140

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

ATG AAG AAA CCG TTG GGG AAA ATT CTC GCA AGC AGC GCA CTA CTC ATT 48
 Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
 1 5 10 15

TCT GTT GCT TTT AGT TCA TCG ATC GCA TCG GCT GCT GAA GAA GCA AAA 96
 Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys
 20 25 30

GAA AAA TAT TTA ATT GGC TTT AAT GAG CAG GAA GCT GTC AGT GAG TTT 144
 Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe
 35 40 45

GTA GAA CAA GTA GAG GCA AAT GAC GAG GTC GCC ATT CTC TCT GAG GAA 192
 Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu
 50 55 60

GAG GAA GTC GAA ATT GAA TTG CTT CAT GAA TTT GAA ACG ATT CCT GTT 240
 Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val
 65 70 75 80

TTA TCC GTT GAG TTA AGC CCA GAA GAT GTG GAC GCG CTT GAA CTC GAT 288
 Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp
 85 90 95

30

40

CCA GCG ATT TCT TAT ATT GAA GAG GAT GCA GAA GTA ACG ACA ATG GCG Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala 100 105 110	336	
CAA TCA GTG CCA TGG GGA ATT AGC CGT GTG CAA GCC CCA GCT GCC CAT Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His 115 120 125	384	
AAC CGT GGA TTG ACA GGT TCT GGT GTA AAA GTT GCT GTC CTC GAT ACA Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr 130 135 140	432	
GGT ATT TCC ACT CAT CCA GAC TTA AAT ATT CGT GGT GGC GCT AGC TTT Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe 145 150 155 160	480	10
GTA CCA GGG GAA CCA TCC ACT CAA GAT GGG AAT GGG CAT GGC ACG CAT Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Glr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His 165 170 175	528	
GTG GCC GGG ACG ATT GCT GCT TTA AAC AAT TCG ATT GGC GTT CTT GGC Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly 180 185 190	576	
GTA GCG CCG AGC GCG GAA CTA TAC GCT GTT AAA GTA TTA GGG GCG AGC Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser 195 200 205	624	20
GGT TCA GGT TCG GTC AGC TCG ATT GCC CAA GGA TTG GAA TGG GCA GGG Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly 210 215 220	672	
AAC AAT GGC ATG CAC GTT GCT AAT TTG AGT TTA GGA AGC CCT TCG CCA Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro 225 230 235 240	720	
AGT GCC ACA CTT GAG CAA GCT GTT AAT AGC GCG ACT TCT AGA GGC GTT Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val 245 250 255	768	
CTT GTT GTA GCG GCA TCT GGG AAT TCA GGT GCA GGC TCA ATC AGC TAT Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser Tyr 260 265 270	816	30
CCG GCC CGT TAT GCG AAC GCA ATG TCA GTC GGA GCT ACT GAC CAA AAC Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn 275 280 285	864	
AAC AAC CGC GCC AGC TTT TCA CAG TAT GGC GCA GGG CTT GAC ATT GTC Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val 290 295 300	912	
GCA CCA GGT GTA AAC GTG CAG AGC ACA TAC CCA GGT TCA ACG TAT GCC Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr Ala 305 310 315 320	960	40
AGC TTA AAC GGT ACA TCG ATG GCT ACT CCT CAT GTT GCA GGT GCA GCA Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala 325 330 335	1008	

1056

10

(A) LENGTH: 380 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

20

30

40

Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser
 195 200 205

Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly
 210 215 220

Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro
 225 230 235 240

Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val
 245 250 255

Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser Tyr
 260 265 270

Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn
 275 280 285

Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val
 290 295 300

Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr Ala
 305 310 315 320

Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala
 325 330 335

Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg
 340 345 350

Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr
 355 360 365

Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 370 375 380

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1140 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..1140

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mat_peptide
- (B) LOCATION: 334..1140

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

ATG AAG AAA CCG TTG GGG AAA ATT GTC GCA AGC ACC GCA CTA CTC ATT
 Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
 -111-110 -105 -100

48

TCT GTT GCT TTT AGT TCA TCG ATC GCA TCG GCT GCT GAA GAA GCA AAA Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys -95 -90 -85 -80	96	
GAA AAA TAT TTA ATT GGC TTT AAT GAG CAG GAA GCT GTC AGT GAG TTT Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe -75 -70 -65	144	
GTA GAA CAA GTA GAG GCA AAT GAC GAG GTC GCC ATT CTC TCT GAG GAA Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu -60 -55 -50	192	
GAG GAA GTC GAA ATT GAA TTG CTT CAT GAA TTT GAA ACG ATT CCT GTT Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val -45 -40 -35	240	10
TTA TCC GTT GAG TTA AGC CCA GAA GAT GTG GAC GCG CTT GAA CTC GAT Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp -30 -25 -20	288	
CCA GCG ATT TCT TAT ATT GAA GAG GAT GCA GAA GTA ACG ACA ATG GCG Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala -15 -10 -5 1	336	
CAA TCA GTG CCA TGG GGA ATT AGC CGT GTG CAA GCC CCA GCT GCC CAT Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His 5 10 15	384	20
AAC CGT GGA TTG ACA GGT TCT GGT GTA AAA GTT GCT GTC CTC GAT ACA Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr 20 25 30	432	
GGT ATT TCC ACT CAT CCA GAC TTA AAT ATT CGT GGT GGC GCT AGC TTT Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe 35 40 45	480	
GTA CCA GGG GAA CCA TCC ACT CAA GAT GGG AAT GGG CAT GGC ACG CAT Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His 50 55 60 65	528	
GTG GCC GGG ACG ATT GCT GCT TTA GAC AAC TCG ATT GGC GTT CTT GGC Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly 70 75 80	576	30
GTA GCG CCG AGC GCG GAA CTA TAC GCT GTT AAA GTA TTA GGG GCG AGC Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser 85 90 95	624	
GGT TCA GGC GCC ATC AGC TCG ATT GCC CAA GGA TTG GAA TGG GCA GGG Gly Ser Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly 100 105 110	672	
AAC AAT GGC ATG CAC GTT GCT AAT TTG AGT TTA GGA AGC CCT TCG CCA Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro 115 120 125	720	40
AGT GCC ACA CTT GAG CAA GCT GTT AAT AGC GCG ACT TCT AGA GGC GTT Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val 130 135 140 145	768	

CTT GTT GTA GCG GCA TCT GGG AAT GAA GGT GCA GGC TCA ATC GAC TAT Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Glu Gly Ala Gly Ser Ile Asp Tyr 150 155 160	816	
CCG GCC CGT TAT GCG AAC GCA ATG GCA GTC GGA GCT ACT GAC CAA AAC Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn 165 170 175	864	
AAC AAC CGC GCC AGC TTT TCA CAG TAT GGC GCA GGG CTT GAC ATT GTC Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val 180 185 190	912	
GCA CCA GGT GTA AAC GTG CAG AGC ACA TAC CCA ATT TCA ACG TAT GCC Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Ile Ser Thr Tyr Ala 195 200 205	960	10
AGC TTA AAC GGT ACA TCG ATG GCT ACT CCT CAT GTT GCA GGT GCA GCA Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala 210 215 220 225	1008	
GCC CTT GTT AAA CAA AAG AAC CCA TCT TGG TCC AAT GTA CAA ATC CGC Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg 230 235 240	1056	
AAT CAT CTA AAG AAT ACG GCA ACG AGC TTA GGA AGC ACG AAC TTG TAT Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr 245 250 255	1104	20
GGA AGC GGA CTT GTC AAT GCA GAA GCG GCA ACA CGC Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg 260 265	1140	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 380 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile -111 -110 -105 -100	
Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys -95 -90 -85 -80	
Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe -75 -70 -65	
Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu -60 -55 -50	40
Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val -45 -40 -35	
Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp -30 -25 -20	

40

【 図 1 A 】

10 30 50
 ATGAAGAAACGCTGGGGGAAAATGTCGGAACGACGGCACTACTGATTCTGCTGCTTT
 MetLysLeuProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaIlePhe
 70 90 110
 AGTTTCATCGCTCGCATCGGCTGCTGAAGAGACGAAAGAAAAATATTAAATGGCTTTAA
 SerThrGleAlaAlaAlaGluAlaCysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn
 130 150 170
 GAGCAGGAAGCTGTCACTGACTTTGTAGAACATGACGGCAATGACGAGGTGGCCATT
 GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle
 190 210 230
 CTCTCGAGGAGAGGAAGTCGAAATTCGATTGCTTCATGAATTTGAAACGATCTGCTT
 LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal
 250 270 290
 TTATCCGTTGAGTCTAAAGCCGACGAAGATGTGGACGGCCTTCAACTCGATCGACGGATTCT
 LeuSerValGluLeuSerProGluAaspValAlaAlaLeuGluLeuAaspProAlaIleSer
 310 330 350
 TATATTGAGAGAGGTGCAGAAATGACACATGCGGCCAATCAGTGCATCGGGGAATTAGC
 TyrIleGluGluAaspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTyrIleSer
 370 390 410
 CGTGTGACGCCCCAGCTGCCCATTAACCGTGATTGACAGCTTCTGTGTCTAAAAAGTTGCT
 ArgValGlnIleProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValIysValAlaIle
 430 450 470
 GTCTCGATACAGGATTTCGACTCATCGAGCTTAAATATTGGTGCGGGCTAGCTTT
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAaspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe
 490 510 530
 GTACCGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCACTGGCAGCCGATGTGGCCGGGAG
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisValThrHisValAlaGlyThr
 550 570 590
 ATTGCTGCTTTAAACAAATTCGATTGGGCTTTCTGGCGTAGCCGGCGGCGGAATATAC
 IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaIleLeuTyr
 610 630 650
 CGCTTTAAAGTATTAGGGCGAGCGGTTTCAGTTTCGGTCAGCTCGATTGGCCAAAGGATTG
 AlaValIysValLeuGlyAlaGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu
 670 690 710
 GAATGGCGGGGAACAAATGGCATCCGCTTCTCAATTTCAGTTTAGGAAGACCTTCGCCA
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuLeuGlySerProSerPro
 730 750 770
 ACTGCCACACTTGAGCAAGCTCTTAATAGCGGCACCTTCTAGAGCGGCTTCTTGTTGATGG
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValIleValValAla
 790 810 830
 GCATCTGGGAATCTCAGGTGACGGTCAATCAGCTATCCGGCCGCTTATCGGCAAGCCAA
 AlaSerGlyAsnSerGlyGlyGlySerThrSerIleGlySerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
 850 870 890
 CGACTGGCGCTACTGACCAAAACACACACCGCCGAGCTTTCCAGCATGTGGCCGAGGG
 AlaValGlyAlaThrAaspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

FIG. 1A

【 図 2 A 】

910 930 950
 CTTCACATTGTCGCACAGGTTGAAGCTGCAGACACATCCAGGCTCAACCGTATGCC
 LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrrProGlySerThrTyrrAla
 970 990 1010
 AGCTTAAAGCTGACATCGATCGCTACTCTTCATGTGCAGGTGCAGCCGCTTTTAA
 SerAsnGlyThrSerMetAlaThrThrProHisValAlaGlyAlaAlaLeuValLys
 1030 1050 1070
 CAAAGAACCCCATTTGGTCCAATTGACAAATCCGCAATCATCTAAAGATACCGGCAAG
 GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr
 1090 1110 1130
 AGCTTAGGACGACCAAGCTTTGTATGGAGCCGCACTTGTCATGCAAGCGCCGCAACGG
 SerLeuSerThrAsnLeuTyrrGlySerGlySerAsnAlaGlyAlaThrAlaThrArg

FIG. 2A

以下のものからのサブチリシン配列の比較

3. *amyloliquefaciens*
4. *subtilis*
5. *licheniformis*
6. *lentus*

[illegible]

FIG. 2A

【 図 2 B 】

161	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
170	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
180	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
190	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
201	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
210	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
220	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
230	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
241	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
250	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
260	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
270	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
280	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
290	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
300	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
310	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
320	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L	D	V	H	A
330	S	T	V	G	Y	P	A	K	Y	P	S	I	A	V	G	A	V	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	V	G	C	E	L				

FIG. 2B

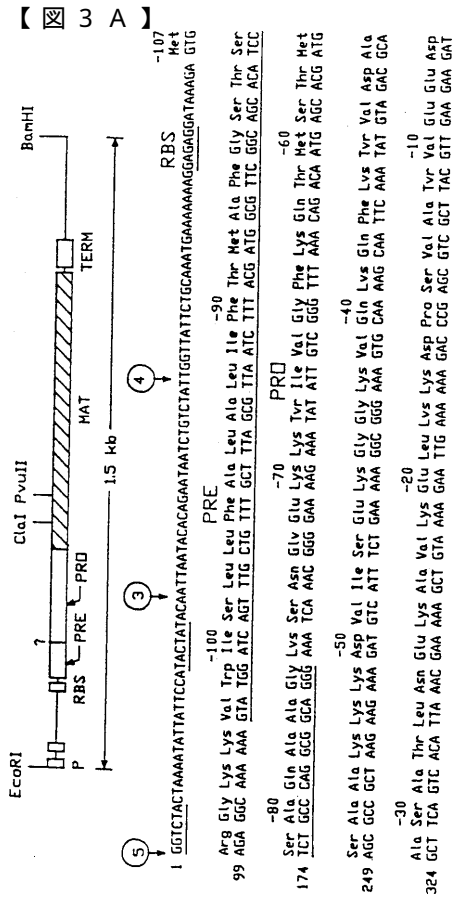


FIG. 3A

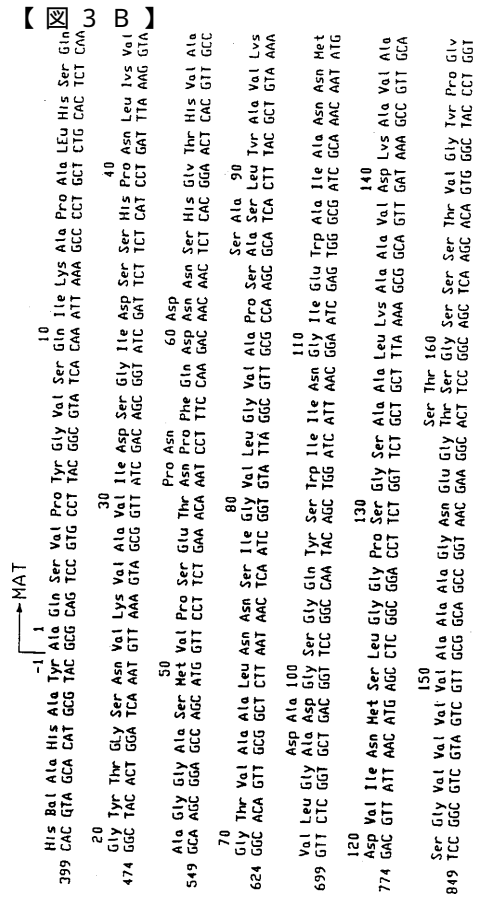


FIG. 3B

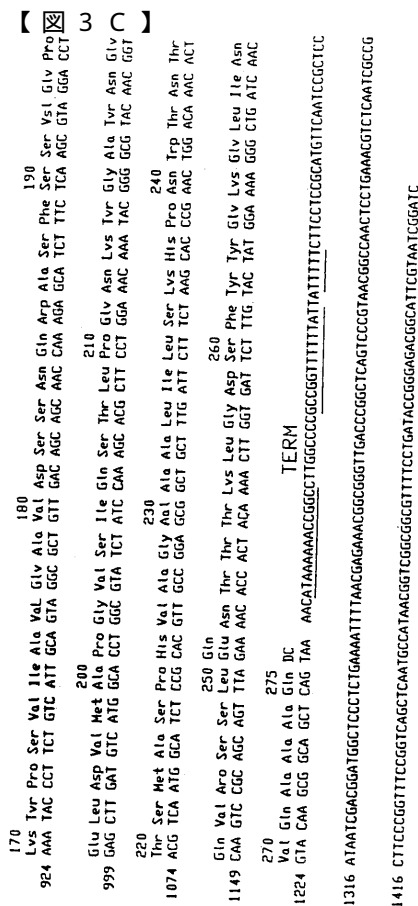


FIG. 3C

【図 4】
*BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*からの
 サブチリンにおける保存残基

1	A Q S V P . G	10	. . . A P A . H . .	20	G
21	T G S . V K V A V . D . G	30		40	H P
41	D L . . . G G A S . V P	50		60	Q D
61	. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G	70		80	
81	V L G V A P S A . L Y A V K V L G A .	90		100	G
101	S G . . S . L	110	G . E W A . N	120	
121	V . N . S L G . P S . S	130		140	A . .
141	 G V . V V A A . G N . G . .	150		160	
161	 Y P	170		180	A V G A .
181	D . . N . . A S F S	190		200	A
201	P G V . . Q S T . P G . . . Y . . .	210		220	N G T
221	S M A . P H V A G A A A L	230		240	K . .
241	W . . . Q . R . . . L . N T	250		260	L G . .
261	. . . Y G . G L . N	270			

FIG. 4

【 5 A 】

ATG AAG AAA CCG TTG GGG AAA ATT GTC GCA AGC ACC GCA CTA CTC ATT 43
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
-111-110 -105 -100

TCT GTT GCT TTT AGT TCA TCG ATC GCA TCG GCT GCT GAA GAA GCA AAA 96
Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys
-95 -90 -85 -80

GAA AAA TAT TTA ATT GGC TTT AAT GAG CAG GAA GCT GTC AGT GAG TTT 144
Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe
-75 -70 -65

GTA GAA CAA GTA GAG GCA AAT GAC GAG GTC GCC ATT CTC TCT GAG GAA 192
Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu
-60 -55 -50

GAG GAA GTC GAA ATT GGA TTG CTT CAT GAA TTT GAA ACG ATT CCT GTT 240
Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val
-45 -40 -35

TTA TCC GTT GAG TTA AGC CCA GAA GAT GTG GAC GCG CTT GAA CTC GAT 288
Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp
-30 -25 -20

CCA GCG ATT TCT TAT ATT GAA GAG GAT GCA GAA GTA ACG ACA ATG GCG 336
Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala
-15 -10 -5 1

CAA TCA GTG CCA TCG GGA ATT AGC CGT GTG CAA GCC CCA GCT GCC CAT 384
Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His
5 10 15

AAC CGT GGA TTG ACA GGT TCT GGT GTA AAA GTT GCT GTC CTC GAT ACA 432
Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr
20 25 30

GGT ATT TCC ACT CAT CCA GAC TTA AAT ATT CGT GGT GGC GCT AGC TTT 480
Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe
35 40 45

GTA CCA GGG GAA CCA TCC ACT CAA GAT GGG AAT GGG CAT GGC ACG CAT 528
Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His
50 55 60 65

GTG GCC GGG ACG ATT GCT GCT TTA GAC AAC TCG ATT GGC GTT CTT GGC 576
Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly
70 75 80

GTA GCG CCG AGC GCG GAA CTA TAC GCT GTT AAA GTA TTA GGG GCG AGC 624
Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser
85 90 95

GGT TCA GGC GCC ATC AGC TCG ATT GCC CAA GGA TTG GAA TGG GCA GGG 672
Gly Ser Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly
100 105 110

FIG. 5A

【 5 B 】

AAC AAT GGC ATG CAC GTT GCT AAT TTG AGT TTA GGA AGC CCT TCG CCA 720
Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro
115 120 125

AGT GCC ACA CTT GAG CAA GCT GTT AAT AGC GCG ACT TCT AGA GGC GTT 768
Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val
130 135 140 145

CTT GTT GTA CCG GCA TCT GGG AAT GAA GGT GCA GGC TCA ATC GAC TAT 816
Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Glu Gly Ala Gly Ser Ile Asp Tyr
150 155 160

CCG GCC CGT TAT GCG AAC GCA ATG GCA GTC GGA GCT ACT GAC CAA AAC 864
Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn
165 170 175

AAC AAC CCG GCC AGC TTT TCA CAG TAT GGC GCA GGG CTT GAC ATT GTC 912
Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val
180 185 190

GCA CCA GGT GTA AAC GTG CAG AGC ACA TAC CCA ATT TCA ACG TAT GCC 960
Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Ile Ser Thr Tyr Ala
195 200 205

AGC TTA AAC GGT ACA TCG ATG GCT ACT CCT CAT GTT GCA GGT GCA CCA 1008
Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala
210 215 220 225

GCC CTT GTT AAA CAA AAG AAC CCA TCT TGG TCC AAT GTA CAA ATC CGC 1056
Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg
230 235 240

AAT CAT CTA AAG AAT ACG GCA ACG AGC TTA GGA AGC ACG AAC TTG TAT 1104
Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr
245 250 255

GGA AGC GGA CTT GTC AAT GCA GAA GCG GCA ACA CGC 1140
Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

FIG. 5B

フロントページの続き

- (74)代理人 100094695
弁理士 鈴木 憲七
- (74)代理人 100111648
弁理士 梶並 順
- (74)代理人 100122437
弁理士 大宅 一宏
- (72)発明者 ライ, サロジ
アメリカ合衆国オハイオ州、ウエスト、チェスター、フォックス、クノール、ドライブ 8 2 8 7
- (72)発明者 コーリー, ポール エリオット
アメリカ合衆国オハイオ州、シンシナチ、マイアミ、トレイルズ、レーン 4 2 4 5
- (72)発明者 ズー, ヨン
アメリカ合衆国オハイオ州、シンシナチ、ブロムヤード、アベニュー 4 3 4 8
- (72)発明者 グレイカー, トーマス ポール
アメリカ合衆国カリフォルニア州、パシフィーカ、マンザニータ 1 1 6 6
- (72)発明者 ボット, リチャード レイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州、バーリンゲーム、ヒルサイド、ドライブ 3 0 3 2

審査官 坂井 哲也

- (56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 1 0 5 9 1 (WO, A 1)
国際公開第 9 6 / 0 1 6 1 5 4 (WO, A 1)
特表平 0 9 - 5 0 3 8 1 8 (JP, A)
特表平 0 9 - 5 0 4 1 7 0 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C11D 1/00 ~ 19/00