

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3554322号

(P3554322)

(45) 発行日 平成16年8月18日(2004.8.18)

(24) 登録日 平成16年5月14日(2004.5.14)

(51) Int. Cl.⁷

F I

D O 6 P 5/00

D O 6 P 5/00 1 2 1

C 1 1 D 3/386

C 1 1 D 3/386

C 1 2 N 9/42

C 1 2 N 9/42

D O 6 P 5/08

D O 6 P 5/08 D B B A

請求項の数 8 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願平6-509093

(86) (22) 出願日 平成5年9月15日(1993.9.15)

(65) 公表番号 特表平8-502101

(43) 公表日 平成8年3月5日(1996.3.5)

(86) 国際出願番号 PCT/US1993/008735

(87) 国際公開番号 W01994/007983

(87) 国際公開日 平成6年4月14日(1994.4.14)

審査請求日 平成12年7月31日(2000.7.31)

(31) 優先権主張番号 07/954, 113

(32) 優先日 平成4年9月30日(1992.9.30)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ジェネンコア インターナショナル, イン
コーポレイティドアメリカ合衆国, カリフォルニア 940
80, サウス サンフランシスコ, キンボ
ール ウェイ 180

(74) 代理人

弁理士 柳田 征史

(74) 代理人

弁理士 佐久間 剛

(72) 発明者

クラークソン, カスリーン エー,
アメリカ合衆国, カリフォルニア 941
10, サンフランシスコ, トゥエンティ
エイ ストリート 53

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドグルカナーゼを利用する布帛をストーンウォッシュするための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

着色布帛のストーンウォッシュの際の着色料の再付着を減らす方法であって、前記布帛と、有効な量の菌類セルラーゼ組成物とを接触させる工程を含み、前記菌類セルラーゼ組成物が、実質的にCBH型セルラーゼ成分を含まず、かつセルラーゼタンパク質の総重量に基づいて少なくとも約40重量%の、約5.0～7.0の最適pH、約7.2～8.0の等電点、および約23～28キロダルトンの分子量を有するトリコデルマ種由来のエンドグルカナーゼIIIを含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

デニムを軽石と接触させることをさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

前記セルラーゼ組成物が、セルラーゼタンパク質の総重量に基づいて、少なくとも約80重量%のトリコデルマ種由来のエンドグルカナーゼIIIを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記セルラーゼ組成物が、界面活性剤をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記セルラーゼ組成物が、バッファーをさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

20

【請求項 6】

前記セルラーゼ組成物が、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムおよびトリコデルマ ピリデよりなる群から選択されるトリコデルマ種の微生物によって発現されたセルラーゼ組成物を含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記セルラーゼ組成物が、ドライ顆粒製品を含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記セルラーゼ組成物が、水性溶液を含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

10

発明の分野

本発明は布帛においてストーンウォッシュ外観を達しめ、同時に布帛上への着色料の逆染色 (backstaining) を低める又は防ぐための組成物及び方法、並びにこれらの方法より製造した布帛及び衣料に関する。特に、本発明の改良方法は、布帛を、CBH型成分を実質的に含まないエンドグルカナーゼ型成分を含んで成る菌類セルラーゼ組成物を含む水性溶液と接触させることに向けられる。布帛にかかる溶液で処理すると、布帛のストーンウォッシュの最中でのその布帛への着色料の逆染色の程度は低まる。

従来技術

セルロース系布帛、例えば綿デニムより成る衣料は衣料品の製造、取扱い及び仕立てのし易さのために用いるサイジング組成物の存在に基づきテキスチャーにおいて剛性であり、そして一般に新品の濃い染色外観を有する。インジゴ染めしたデニム衣料の一の所望される特徴は白色の繊維を伴う染色繊維の変化であり、これはデニムに青色の白色外観上を供する。

20

長期間の着用及び洗濯を経て、衣料品、特にデニムは、衣服パネル上又は縫目の中で、色調の深さ又は密度が薄くなっている状態におけるバリエーションの局所領域を有するようになりうる。更に、衣料の一般的なぼけ、縫目における多少のしわ及び布帛パネルにおける多少のしわが往々にして見られうる。更に、洗濯後、サイジングは布帛から実質的に抜けてしまい、柔軟な肌触りをもたらす。近年、かかるくたびれた又は「ストーンウォッシュ」ルックが特にデニム衣料において、公衆の大部分にとって非常に所望されるに至っている。

30

くたびれたルックを生み出すための従来方法は、約 1 ~ 10 インチの粒子サイズを有する軽石及びそのプロセスの摩滅的性質により生じるより小さい軽石粒子を有する大型のタブの中での衣料品のストーンウォッシュを包括する。一般には、衣料品を、その軽石が布帛を摩滅して布帛パネルにおいて色の薄くなった局所的摩滅領域及び縫目における似たような薄くなった領域ができるのに十分な時間にわたって、濡れている間に軽石と一緒に反転させる。更に、軽石は布帛を柔軟にし、そして布帛の長期着用及び洗濯により生ずるのと似たようなぼやけた表面を生み出す。この方法は上記した青色のコントラスト上の所望の白色を生み出す。

軽石の使用は、機械モーターへの過剰損傷、輸送機構及び洗浄ドラムへの機械的損傷、生ずる粗粒子に由来する環境廃棄物の問題及び衣服のポケットから石を人手で取り出さなければならぬことに関する高い労働力を含むいくつかの欠点を有する。

40

ストーンウォッシュにおける軽石に係る問題の観点において、デニムに「ストーンウォッシュ」外観を授けるため、攪拌及びカスケード条件下で、即ち、ロータリードラム洗浄装置の中で、軽石の代用品として完全セルロース溶液を使用する (米国特許第 4,832,864 号)。

トリコデルマ (Trichoderma) 種の微生物及びその他の菌類源由来の完全セルラーゼ組成物の利用にかかる問題は、ストーンウォッシュ工程中での衣料に染料の一部が再付着又は逆染色してしまうことにより生ずる着色料の不完全な除去にある。デニム布帛の場合、これは白及び青色の糸と摩滅箇所との間での弱いコントラスト (即ち、好適な青上の白ではなく青上の青の外観) をもたらす。American Dyestuff Reporter、1990 年 9 月、頁 24 - 28

50

を参照のこと。この再付着は一部の着用者より拒絶される。

トリコデルマセルラーゼは、たとえそれらが逆染色をもたらすにしても、デニム材質に対するその他高い活性の理由により好適である。更に、高純度のセルラーゼが本発明において有利である。高い比活性又は高いレベルの純度は著しく短い処理時間において高度の摩滅をもたらしめ、そしてそれ故デニム加工者に好適である。

染料の再付着の度合いを低める試みには、追加の化学品又は酵素、例えば界面活性剤、プロテアーゼ又はその他の試薬を、ゆるい染料を分散するのに役立つためにセルラーゼ洗浄液の中に添加することを含む。更に、処理者は活性の低い完全セルラーゼを、追加の洗濯に伴って使用している。しかしながら、このことは追加の化学品の経費及びより長めの処理時間をもたらしめる。別の方法には、その処理における緩かな漂白剤又は染料除去剤の利用を含む。この方法は衣料の最終的な色相に影響し、そして処理時間を長くする。最後に、酵素及び石と一緒に使用することは、石を単独で利用することによって生じる全ての問題をその処理者に残してしまう。

従って、セルラーゼによる衣服のストーンウォッシュの際に着色剤の再付着を防ぐ方法を見い出すことが所望されるであろう。

発明の概要

本発明は、ストーンウォッシュ処理中での布帛上への着色料の再付着が、CBH型成分を実質的に含まない菌類セルラーゼ組成物を採用することによって低めることができる発見に向けられている。EG型成分によるストーンウォッシュは布帛上への着色料の再付着を低め、その結果より顕著な摩滅点をもたらすことが見い出された。例えば、インジゴ染めしたデニムでは、白糸と青糸との間での向上したコントラストが獲得でき、優れたストーンウォッシュルックが得られた。

上記の点におけるその方法の一観点において、本発明は着色布帛のストーンウォッシュ中での着色料の再付着を低めるための改良方法に向けられ、この方法は布帛を、再付着性完全菌類セルラーゼに由来する有効量の菌類セルラーゼ溶液と、その布帛にストーンウォッシュ外観を授けるのに十分なる条件のもとで、接触させることを含んで成り、ここで前記セルラーゼ溶液はCBH型成分を実質的に含まない。好適な態様において、ここで採用する菌類セルラーゼ組成物は実質的に純粋なEG I、EG II及び/又は実質的に純粋なEG III成分を含んで成る。更なる別の好適な態様において、この菌類組成物は少なくとも約40重量%、そして好ましくは少なくとも約70重量%のEG型成分を、そのセルラーゼ組成物中のタンパク質の総重量に基づいて含んで成る。

本発明の方法により処理した綿含有布帛又は衣服は驚くべきことに、完全セルラーゼで処理した布帛に比べ、ストーンウォッシュ外観の向上及び低められた着色料の再付着の両方を保有する。

この組成物の観点において、本発明は上記した本発明の方法で処理した綿含有布帛又は衣服に向けられる。

【図面の簡単な説明】

図1は、p Δ CBH I pry4の構築の概略である。

図2は、T.ロンジブラチアトゥム (T. longibrachiatum) の一本の染色体の上のcbh1座での、p Δ CBH I pry4由来の大きめのEco R Iフラグメントの組込みによるT.ロンジブラチアトゥム遺伝子の欠損を示す。

図3は、プローブとして³²Pラベル化p Δ CBH I pry4を用いる、サザンブロット分析後の、Eco R I消化p Δ CBH I pry4で形質転換したT.ロンジブラチアトゥム株GC69由来のDNAのオートラジオグラフである。分子量マーカーのサイズは図の左側にキロベースペアで示している。

図4は、プローブとして³²Pラベル化pIntCBH Iを用いる、Eco R I消化p Δ CBH I pry4で形質転換したT.ロンジブラチアトゥム株GC69由来のDNAのオートラジオグラフである。

図5は、T.ロンジブラチアトゥムの野生型及び形質転換株により分泌されたタンパク質を表示する等電点電気泳動ゲルである。詳しくは、図5において、等電点電気泳動ゲルのレーンAはT.ロンジブラチアトゥム由来の部分精製CBH Iを採用する；レーンBは野生型T.

10

20

30

40

50

ロンジブラチアトゥムを採用する；レーンCはcbh1遺伝子の欠落したT.ロンジブラチアトゥム由来のタンパク質を採用する；そしてレーンDはcbh1及びcbh2遺伝子の欠落したT.ロンジブラチアトゥム株由来のタンパク質を採用する。図5において、図の右側は1又は複数の分泌タンパク質において見い出せる個々のタンパク質の位置を表示するように印を付している。詳しくは、BGは β -グルコシダーゼを意味し、E1はエンドグルカナーゼIを意味し、E2はエンドグルカナーゼIIを意味し、E3はエンドグルカナーゼIIIを意味し、C1はエキソセロビオヒドロラーゼIを意味し、そしてC2はエキソセロビオヒドロラーゼIIを意味する。

図6Aは、ゲノムDNA上の4.1kbのEcoRIフラグメントとしてクローンした、T.ロンジブラチアトゥム cbh2座を示し、そして図6Bは、cbh2遺伝子欠損ベクターp Δ CBH IIを示す。図7は、プローブとして³²Pラベル化p Δ CBH IIを用いる、サザンブロット分析後のEcoRI消化p Δ CBH IIで形質転換したT.ロンジブラチアトゥム株P37P Δ CBH I Pyr⁻26由来のDNAのオートラジオグラフである。分子量マーカーのサイズは図の左側にキロベースパーで示す。

図8はプラスミドpEG I pyr4のダイアグラムである。

図9はプラスミドpTEX-EG Iの構築の概略である。

図10は、40で一定のpH域にわたるトリコデルマ ロンジブラチアトゥム由来の酸性の、EGに富んだ菌類セルラーゼ組成物（CBH I及びII欠落）のRBB-CMC活性プロフィール、及び40で一定のpH域にわたるトリコデルマ ロンジブラチアトゥム由来のEG IIIに富むセルラーゼ組成物の活性プロフィールを示す。

図11は、ストーンウォッシュ処理中の着色料の再付着に及ぼす種々のセルラーゼ組成物の作用を示す。

好適な態様の詳細な説明

前述の通り、本発明の方法は、布帛上への着色料の逆染色の程度を低めながら菌類セルラーゼで布帛をストーンウォッシュする方法に向けられる。この方法は、CBH型成分を実質的に含まない特定の菌類セルラーゼ溶液を用いることを含んで成り、これは布帛に対する着色料の逆染色を低める。ところで、本発明を詳細に説明する前に、下記の用語をまず定義する。

1) 定義：

「布帛」なる用語は、純粋な綿又は綿ブレンド等より成る、縫われた、又は縫われていない、例えばメリヤス及び織物を意味する。綿ブレンドを採用するとき、布帛中の綿の量は、少なくとも約40重量%の綿であるべきあり；好ましくは約60重量%より大の綿；そして最も好ましくは約75重量%より大の綿とする。ブレンドとして採用するとき、その布帛において採用する相手方の材料には1又は複数種の非綿ファイバー、例えば合成ファイバー、例えばポリアミドファイバー（例えばナイロン6及びナイロン66）、アクリルファイバー（例えばポリアクリロニトリルファイバー）、及びポリエステルファイバー（例えばポリエチレンテレフタレート）、ポリビニルアルコールファイバー（例えばビニロン）、ポリビニルクロリドファイバー、ポリビニリデンクロリドファイバー、ポリウレタンファイバー、ポリウレアファイバー及びアラミドファイバーが含まれる。この布帛は一般に染料又は顔料、例えば染料インジゴで着色されている。着色布帛の一の所望の特徴は白糸を伴う着色糸の変化であり、例えばデニムのケースにおいては、これは青色上の白色のコントラスト外観をデニムに与える。

「ストーンウォッシュ」なる用語は、菌類セルラーゼ溶液による染色デニム布帛の、攪拌及びカスケード条件下での、即ち、ロータリードラム洗浄装置の中での処理を意味し、これはデニムに「ストーンウォッシュ」外観を与える。デニムにストーンウォッシュ外観を与えるための方法はその全体を引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,832,864号に記載してある。

「菌類セルラーゼ」なる用語は、菌類起源又は菌類起源より得られるセルラーゼ遺伝子の全部又は一部を組込んで発現するように遺伝子的に改良した微生物に由来する酵素組成物を意味する。セルラーゼはセルロース及びその誘導体に作用してセルロースを加水分解し

10

20

30

40

50

、そして一次産物、グルコース及びセロビオースを提供する。本明細書記載のセルラーゼ組成物を調整するうえで有用なセルラーゼを産生できる菌類は、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる英国特許第2,094,826Aに開示されている。

本明細書で用いている「再付着性セルラーゼ」とは、デニムの酵素的ストーンウォッシュにおいて、布帛を逆染色しがちなセルラーゼを意味している。布帛のかかる逆染色は不完全な逆染色を招いてしまい、なぜなら所望する白色上の青色のコントラストの代わりに、再付着は青色上の青色をもたらしてしまうからである。再付着性セルラーゼには微生物、例えば菌類微生物トリコデルマ種等が含まれる。

ほとんどの菌類セルラーゼは一般にその最適活性を酸性又は中性pH域において有するが、一部の菌類セルラーゼは中性及び若干アルカリ性の条件下で顕著な活性を保有することで知られ、即ち、例えばヒュミコラ インソレンス (*Humicola insolens*) 由来のセルラーゼは中性から若干アルカリ性の条件において活性を有することで知られる。

菌類セルラーゼは種々の基質特異性、酵素作用パターン等を有するいくつかの酵素分類より成ることで知られる。更に、各分類における酵素成分は様々な分子量、様々なグリコシル化度、様々な等電点、様々な基質特異性等を発揮できうる。例えば、菌類セルラーゼは、エンドグルカナーゼ (EG)、エキソ - セロビオヒドロラーゼ (CBH)、 β - グルコシダーゼ (BG) 等を含むセルラーゼ分類を含みうる。他方、細菌セルラーゼは論文の中でCBH成分をわずかに又はほとんど含まないことが報告されているが、細菌セルラーゼ由来のCBH様成分がエキソ - セロビオヒドロラーゼ活性を保有しているのを報告しているのは数ケースしかない。

天然起源より産生され、且つ1又は複数種のCBH及びEG成分を含んで成る菌類セルラーゼ組成物 (ここで、これらの成分それぞれはその起源により産生される率で見い出せる) は本明細書では「完全菌類セルラーゼ系」又は「完全菌類セルラーゼ組成物」とも時折り呼んでおり、それらを、その分類及びそれより単離したセルラーゼの成分から、細菌及びいくつかの菌類により産生された不完全セルラーゼ組成物から、又は1もしくは複数種のCBH型及び/もしくはEG型セルラーゼ成分を過剰生産する、低生産するもしくは生産しないように遺伝的に改良した微生物から得たセルラーゼ組成物から区別している。

セルラーゼの製造のために菌類を培養するための発酵手順は当業界において本質的に公知である。例えば、セルラーゼ系は固相又は浸漬培養、例えばバッチ式、供給バッチ式及び連続フロー工程のいずれかで製造できうる。発酵液からのセルラーゼ系の回収及び精製も当業界に公知の手順によって行われうる。

「エンドグルカナーゼ (「EG」) 型成分」とは、トリコデルマ ロンジブラチアトゥム (従来はトリコデルマ リーセイ (*Trichoderma reesei*) と分類されていた) のエンドグルカナーゼ成分に似た繊維物活性特性を示す菌類セルラーゼ成分又は組合せ成分の全てを意味する。これに関連して、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムのエンドグルカナーゼ成分 (詳しくは、EG I、EG II、EG III等であって、単独又は組合せのもの) は、これらの成分を繊維物処理媒体の中に入れ、そして布帛をこの媒体で処理したときに、デニム布帛に向上した感触、向上した外観、柔軟性、着色改善及び/又はストーンウォッシュ外観を (処理前の布帛に比べて) 与える。

従って、エンドグルカナーゼ型成分は、これらの成分を布帛を処理するのに用いる媒体の中に入れたときにデニム布帛に向上した感触、向上した外観、柔軟性、着色向上、及び/又はストーンウォッシュ外観を (処理前の布帛に比べて) 与えるようなセルラーゼ成分である。一定のEG成分は、CBH I成分を更に含む類似のセルラーゼ組成物による処理より生ずる強度損失に比して、デニム布帛に低い強度損失を与えうる。

かかるエンドグルカナーゼ型成分は、(a) カルボキシメチルセルロース (CMC) の如きの可溶性セルロース誘導体を加水分解し、これによりCMC含有溶液の粘度を下げる能力、(b) リン酸膨潤セルロース (例えばWalsethセルロース) の如きのセルロースの水和形態を容易に加水分解し、且つより結晶度の高いセルロース (例えば、Avicel, Solkafloc等) をあまり容易に加水分解しない能力、の如きの活性試験を利用してエンドグルカナーゼとして伝統的に分類された成分を含まないことがある。他方、かかる活性試験により定義

10

20

30

40

50

されたエンドグルカナーゼ成分の全てが、デニム布帛に1又は複数種の改善及び低い強度損失を与えるものではないものと信じられている。従って、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムのエンドグルカナーゼ成分により保有されているものと類似の織物活性特性を保有する菌類セルラーゼの成分としてエンドグルカナーゼ型成分を定義することが本目的にとってはより正確である。

菌類セルラーゼは1より多くEG型成分を含みうる。この種々の成分は一般に異なる等電点、異なる分子量、異なるグリコシル化度、異なる基質特異性、異なる酵素作用パターン等を有する。これらの成分のこの異なる等電点は、イオン交換クロマトグラフィー等を介するその分離を可能にする。事実、異なる起源からの成分の単離は当業界において公知である。例えば、Bjorkらの米国特許第5,120,463号;Schuleinらの国際出願WO 89/09259号;WoodらのBiochemistry and Genetics of Cellulose Degradation頁31 - 52 (1988);WoodらのCarbohydrate Research第190巻、頁279 - 297 (1989);SchuleinのMethods in Enzymology第160巻、頁234 - 242 (1988)等を参照のこと。これらの文献の全開示内容は引用することで本明細書に組入れる。

好ましくは、本発明の菌類セルラーゼ組成物は実質的に純粋なEG I又はEG IIIセルラーゼ成分を含む。本発明の菌類セルラーゼ組成物は実質的に純粋なEG IIセルラーゼ成分を含みうる。しかしながら、EG型成分の組合せは、デニムのストーンウォッシュ中でのデニムに対する染料の逆染色の程度を下げるうえで相乗的な応答を与えうることが考えられる。他方、単独のEG型成分はより安定であるか、又はpH域にわたってより広い活性スペクトルを有しうる。更に、これらの抗再付着特性は1又は複数種の特定のEG型成分に関して高まることがある。従って、本発明において採用するEG型成分は単独EG型成分、又は2種以上のEG型成分の組合せのいずれかでありうる。成分の組合せを採用するとき、EG型成分は同一又は異なる起源に由来しうる。

完全セルラーゼ組成物の中に存在しているCBH型セルラーゼ成分以外のタンパク質は、ストーンウォッシュ工程中で布帛に対する着色料の再付着を及ぼしうる可能性がある。従って、実質的に純粋なEG I,EG II又はEG III成分の利用は、完全セルラーゼ組成物の中に存在しているこれらのタンパク質の一部又は全てを排除し得、そして再付着の更なる低下をもたらしうる。

「実質的に純粋なEGセルラーゼ」なる用語は、セルラーゼタンパク質の総重量を基礎に、少なくとも40重量%、好ましくは少なくとも70重量%、そして最も好ましくは少なくとも90重量%の記載の特定のEG型成分を含むセルラーゼタンパク質の組成物を意味する。

「EG Iセルラーゼ」なる用語は、約4.0~6.0の指摘pH、及び約4.5~4.7の等電点、並びに約47~49キロダルトンの分子量を特徴とするトリコデルマ種に由来するエンドグルカナーゼ成分を意味する。好ましくは、EG Iセルラーゼはトリコデルマ ロンジブラチアトゥム又はトリコデルマ ピリデ (*Trichoderma viride*) のいずれかに由来する。トリコデルマ ロンジブラチアトゥム由来のEG Iセルラーゼは約5.0の指摘pH、約4.7の等電点 (pI) 及び約47~49キロダルトンの分子量を有する。トリコデルマ ピリデ由来のEG Iセルラーゼは約5.0の指摘pH、約5.3の等電点 (pI) 及び約50キロダルトンの分子量を有する。

EG IIは従来一部の著者によっては「EG III」の名称で呼ばれていたが、しかし現在の命名法はEG IIを用いる。どのような状況においても、EG IIタンパク質はEG IIIタンパク質とはその分子量、pI及び指摘pHにおいて実質的に異なる。「EG IIセルラーゼ」なる語はトリコデルマ種由来のエンドグルカナーゼ成分を意味し、約4.0~6.0の指摘pH、及び約5.5の等電点、並びに約35キロダルトンの分子量を特徴とする。好ましくは、EG IIセルラーゼはトリコデルマ ロンジブラチアトゥム又はトリコデルマ ピリデのいずれかに由来する。

「EG IIIセルラーゼ」なる語は、トリコデルマ種由来のエンドグルカナーゼ成分を意味し、約5.0~7.0の指摘pH、及び約7.2~8.0の等電点 (pI)、並びに約23~28キロダルトンの分子量を特徴とする。好ましくは、EG IIIセルラーゼはトリコデルマ ロンジブラチアトゥム又はトリコデルマ ピリデのいずれかに由来する。トリコデルマ ロンジブラチアトゥム由来のEG IIIセルラーゼは約5.5~6.0の指摘pH、約7.4の等電点及び約25~28キロダ

10

20

30

40

50

ルトンの分子量を有する。トリコデルマ ビリデ由来のEG IIIセルラーゼは約5.5の指摘pH、約7.7の等電点(pI)及び約23.5キロダルトンの分子量を有する。

EG型成分は細菌誘導セルラーゼに由来しうることが考慮される。

「エキソ・セルロピオヒドロラーゼ型(「CBH型」)成分」は、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムのCBH I及び/又はCBH IIセルラーゼ成分に似た繊維物活性特性を発揮する菌類セルラーゼ成分を意味する。これに関連して、(上記の)EG型セルラーゼ成分抜きで用いたとき、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムのCBH I及びCBH II成分は単独では、このようにして処理したデニム布帛に対して、感触、外観における任意の有意義な向上、着色向上及び/又はストーンウォッシュ外観を与えない。更に、一部のEG型成分と組合せて用いたとき、CBH I、対、EG成分の約2.5:1の比において、トリコデルマ ロンジブラチア 10
トゥムのCBH I成分はデニム布帛に対して高められた強度損失を与える。

従って、CBH I型成分及びCBH II型成分とは、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムのCBH I及びCBH II成分それぞれに類似する繊維物活性特性を発揮する菌類セルラーゼ成分を意味する。前述の通り、CBH I型成分に関しては、このことは一定のEG型成分の存在下で用いたときにデニム布帛の強度損失を高める性質を含んでいる。

かかるエキソ・セルロピオヒドロラーゼ型成分は、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムからCBH I及びCBH IIを特定するのに利用した如くの活性試験を用いてエキソ・セルロピオヒドロラーゼとして伝統的に分類されている成分を含まないであろう。例えば、かかる成分は、(a)セルロースにより競合的に阻害される(K_i は約1mM); (b)カルボキシメチルセルロース等の如きの置換化セルロースを有意義な程度に加水分解できない、及び(c)リン酸膨潤セルロースを加水分解し、そして結晶度の高いセルロースを弱い程度で加水分解する。他方、かかる活性試験によってCBH成分と特定されている一部のセルラーゼ成分は、セルラーゼ組成物の中で単独で用いたとき、綿含有布帛に向上した感触、外観、柔軟性、着色向上、及び/又はストーンウォッシュ外観を与えるであろうことが信じられている。従って、かかるエキソ・セルロピオヒドロラーゼをEG型成分として定義することが本目的にとってより正確であると信じられ、なぜならこれらの成分はトリコデルマ ロンジブラチアトゥムのエンドグルカナーゼ成分により保有されるのと類似の繊維物における機能的性質を保有するからである。

本明細書で用いる「CBH型セルラーゼ成分を実質的に含まない菌類セルラーゼ組成物」なる語は、タンパク質の重量に基づいて、20重量%未満のCBH型成分、より好ましくは10重量%未満のCBH型セルラーゼ成分を含むであろうセルラーゼ組成物を意味する。驚くべきことに、CBH型成分の存在はストーンウォッシュ外観を達しめるのに必要でないことが見い出された。しかしながら、少量(即ち、20%未満)はストーンウォッシュの若干の向上を供することが考慮される。また、セルラーゼからのCBH型成分の除去は着色料の再付着を低めることが見い出された。何らの理論に拘束されるわけでもないが、CBH型成分は、それらがタンパク質であること及びセルラーゼに対するその親和力を理由に着色料を可逆的に封鎖してしまうことがあり、そしてその他のタンパク質も似たような効果を有しうることが考えられる。

CBH型成分を実質的に含まないセルラーゼ組成物は精製技術によって獲得できうる。詳しくは、完全セルラーゼ系は論文で詳しく公開されている公知の分離技術、例えば適当なpHでのイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除等によって実質的に純粋な成分へと精製できうる。例えば、イオン交換クロマトグラフィーにおいては(通常はアニオン交換クロマトグラフィー)、セルラーゼ成分はpH勾配もしくは塩勾配、又はpH及び塩の両者の勾配で溶離させることによって分離することが可能である。精製後、必須の量の所望の成分を再び組合せてよい。

CBH型成分を実質的に含まないセルラーゼ組成物の混合物は、成分の単離及び再組合せ以外の手段によって調整できうることも考慮される。これに関して、組換え技術が、CBH型成分を実質的に含まないセルラーゼ組成物を作り出すように、生物により産生されるEG型成分、対CBH型成分の相対比を変えることができる。

以上に関して、本明細書に記載のセルラーゼ組成物の調製のための好適な方法は、微生物 50

を遺伝子的に改良して1又は複数種のEG型成分を過剰生産できるようにすることである。同様に、微生物を遺伝子的に改良して、1又は複数種のCBH型成分を生産できなくすることも可能であり、この方法は不均質タンパク質を全く産生しない。

以上に関して、共に全体を引用することで本明細書に組入れる、1990年10月5日出願の米国第07/593,919号の一部係属出願である、1991年10月4日出願の米国第07/770,049号は、トリコデルマ ロンジブラチアトゥムを遺伝子操作して、1もしくは複数種のCBH成分が生産できず、及び/又は1もしくは複数種のEG成分が生産できるようにする方法を開示している。更に、これらの出願の方法は不均質タンパク質を全く産生しないトリコデルマ ロンジブラチアトゥム株を作り出す。同様に、Millerら「Direct and Indirect Gene Replacement in *Aspergillus nidulans*」Molecular and Cellular Biology頁1714 - 1721 (1985)は、相同性のDNAの線形フラグメントを用いるDNA媒介型形質転換によるアスペルギルス ニドゥランスにおける遺伝子の欠損のための方法を開示している。

上記の観点において、CBH I型及び/又はCBH II型セルラーゼ成分を生産する原因となる遺伝子の欠損は、セルラーゼ組成物の中に存在するEG成分の量を富化する効果を有するであろう。

「 β -グルコシダーゼ(BG)成分」はBG活性を発揮するセルラーゼ成分を意味する。即ち、かかる成分はセロピオース及びその他の可溶性セロオリゴ糖(「セロピオース」)の非還元末端から作用し、そして単独産物としてグルコースを供すると言える。BG成分はセルロースポリマーに吸着しない、又は反応しない。更に、かかるBG成分はグルコースによって競合的に阻害される(K_i は約1mM)。厳密に言うとBG成分はセルロースを分解しないことから解釈上セルラーゼではないがかかるBG成分はセルラーゼ系の定義の中に含まれ、なぜならこれらの酵素は、CBH型成分とEG型成分との組合せ作用によって生ずる阻害性セルロース分解産物(特にセロピオース)を更に分解することによってセルロースの全体的な分解を促進するからである。

セルラーゼ組成物中のBG成分の量を高める又は低める方法は、共に全体を引用することで本明細書に組入れる、1990年12月10日出願の米国第07/625,140号の一部係属出願である1991年12月10日出願の米国第07/807,028号(代理人事件番号010055-056)、題名「SACCHARIFICATION OF CELLULOSE BY CLONING AND AMPLIFICATION OF THE β -GLUCOSIDASE GENE OF *TRICHODERMA REESEI*」に開示されている。

本発明において用いるセルラーゼ組成物を調製するのに利用するための好適な菌類セルラーゼは、トリコデルマ ロンジブラチアトゥム、トリコデルマ ビリデ、トリコデルマ コニングイ(*Trichoderma koningii*)、ペンシリウム(*pencillium*)種、ヒュミコラインソレンス(*Humicola insolens*)、アスパラギルス(*Aspergillus*)種等から得られるものである。一定の菌類セルラーゼ、即ちCELLUCAST(Novo industry, Copenhagen, Denmarkより入手可能)、RAPIDASE(Gist Brocades, N.V., Delft, Hollandより入手可能)、CYTOLASE 123(Genencor International, South San Francisco, Californiaより入手可能)等が市販されている。他の菌類セルラーゼは当業界公知の発酵及び単離手順によって容易に単離できうる。

「バッファー」なる語は、当業界公知の酸/塩基試薬を意味し、これはデニム布帛のセルラーゼ処理中での所望されないpHシフトに対してセルラーゼ溶液を安定化する。これに関して、セルラーゼ活性はpH依存性であることが当業界で公知である。即ち、特定のセルラーゼ組成物は一定のpH域においてセルロース分解活性を発揮し、最適セルロース分解活性は一般にこの一定の域の狭い領域において見い出せるといえる。セルロース分解活性にとっての特定のpH域はセルラーゼ組成物毎に変わるであろう。前述した通り、ほとんどのセルラーゼは酸性から中性に至るpHプロファイル内でセルロース分解活性を発揮するであろうが、アルカリ性pHプロファイルにおいてセルロース分解活性を発揮するいくつかのセルラーゼ組成物がある。

デニム布帛のセルラーゼストーンウォッシュ処理の際、初期セルラーゼ溶液のpHはセルラーゼ活性にとって必要な域外であることが可能である。デニム布帛の処理の際、例えば、溶液のpHを変える反応生成物の発生によってpHを変えることが更に可能である。どの状況

10

20

30

40

50

においても、緩衝化していないセルラーゼ溶液のpHは、セルラーゼ活性にとって必要な域外となりうる。このことが起きたとき、セルラーゼ溶液中での所望されない副産物又はセルロース分解活性の断続が生ずる。例えば、酸性活性プロフィールを有するセルラーゼを中性未緩衝水性溶液において採用したなら、この溶液のpHは低めのセルロース分解活性及びおそらくはセルロース分解活性の断続をもたらしめるであろう。他方、中性又はアルカリ性pHプロフィールを有するセルラーゼの未緩衝水性溶液の中での利用は最初に有意義なセルロース分解活性を供するであろう。

上記の観点において、セルラーゼ溶液のpHはセルロース分解活性にとって必要とされる域内に維持すべきである。これを達成するための一の手段は単にこの系のpHをモニターし、そして酸又は塩基のいずれかの添加によってpHを必要なだけ調整することである。しかしながら、好適な態様においては、この系のpHは好ましくはセルラーゼ溶液の中でのバッファの利用により所望のpH域内で維持する。一般に、採用するセルラーゼが活性を発揮する域内にこの溶液のpHを維持するのに十分な量のバッファを使用する。異なるセルラーゼ組成物はセルラーゼ活性を発揮するための異なるpH域を有しており、採用する特定のバッファは採用する特定のセルラーゼ組成物に関連付けて選定する。採用するセルラーゼ組成物と共に使用するために選定するバッファは、採用するセルラーゼ組成物にとってのpH域及び指摘pH、並びにセルラーゼ溶液のpHを考慮して当業者によって容易に決定できる。好ましくは、採用するバッファは、セルラーゼ組成物と相溶性であり、且つセルラーゼ溶液のpHを最適活性にとって必要とされるpH域内に維持するものである。適切なバッファにはクエン酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム及び任意のその他の当業界公知のバッファが含まれる。

2. 方法論

前述の通り、本発明はデニム布帛をストーンウォッシュするための従来技術の方法より優れた改善であり、なぜなら本発明は着色料の再付着を最少限にする特定のセルラーゼ組成物を採用するからである。

本発明の方法は、布帛に追加の向上、例えば布帛の感觸及び/又は外観の改善を、処理布帛の強度損失を低めながら、供するであろう。

上記のセルラーゼ組成物は好ましくは、セルラーゼ、及びその他の任意的な成分、例えばバッファ、界面活性剤、精練剤等を含む最終水性処理溶液中で採用する。

この最終溶液中に採用するセルラーゼ組成物の濃度は一般に意図する目的にとって十分な濃度にする。即ち、デニム布帛の効果的なストーンウォッシュを供する量のセルラーゼ組成物を採用する。従って、「効果的な量」のセルラーゼ組成物とはストーンウォッシュを供する量である。採用するセルラーゼ組成物の量は採用する装置、採用する工程パラメーター（セルラーゼ処理溶液の温度、セルラーゼ溶液に対する暴露時間、等）、セルラーゼ活性（例えば、セルラーゼ溶液は、活性の低いセルラーゼ組成物に比して、より低濃度の活性の高いセルラーゼ組成物を必要とするであろう）、等にも依存する。セルラーゼ組成物の正確な濃度は上記の要因及び所望の効果を基礎として当業者によって容易に決定できる。好ましくは、ここで採用している最終セルラーゼ溶液中のセルラーゼ組成物の濃度は約5mg/lのセルラーゼ溶液～約2000mg/lのセルラーゼ溶液；そしてより好ましくは、約10mg/lのセルラーゼ溶液～約200mg/lのセルラーゼ溶液である。（上記のセルラーゼ濃度は全タンパク質重量を基礎として述べている）。

セルラーゼ処理溶液の中にバッファを採用するとき、水性セルラーゼ処理溶液中のバッファの濃度は、採用するセルラーゼが活性を発揮する域内にその溶液のpHを維持するのに十分なものとし、言うなればそれは採用するセルラーゼの種類に依存する。採用するバッファの正確な濃度は、当業者が容易に考慮に入れることのできるいくつかの要因に依存しうる。例えば、好適な態様においては、バッファ及びバッファ濃度は、最終セルラーゼ溶液のpHを最適セルラーゼ活性にとって必要なpH域内に維持するように選定する。一般に、セルラーゼ溶液中のバッファ濃度は約0.005Nより大とする。好ましくは、セルラーゼ溶液中のバッファの濃度は約0.01～約0.2Nとする。

セルラーゼ及びバッファに加えて、セルラーゼ処理溶液は任意的に界面活性剤を、即ち

10

20

30

40

50

約10,000ppm未満で、そして好ましくは約10ppm～約1,000ppmで含みうる。適当な界面活性剤には、セルラーゼ及び布帛に適合する任意の界面活性剤、例えばアニオン、非イオン及び両親媒性界面活性剤が含まれる。

ここで用いるのに適当なアニオン界面活性剤には、線形又は枝分れアルキルベンゼンスルホネート；線形又は枝分れアルキル基又はアルケニル基を有するアルキル又はアルケニルエーテルスルフェート；アルキル又はアルケニルスルフェート；オレフィンスルホネート；アルカンスルホネート等が含まれる。アニオン界面活性剤にとっての適当な対イオンにはアルカリ金属イオン、例えばナトリウム及びカリウム；アルカリ土類金属イオン、例えばカルシウム及びマグネシウム；アンモニウムイオン；並びに炭素数2又は3の1～3個のアルカノール基を有するアルカノールアミンが含まれる。

10

両親媒性界面活性剤には四級アンモニウム塩スルホネート、ベータイン型両親媒性界面活性剤等が含まれる。かかる両親媒性界面活性剤は同一分子の中に正及び負に帯電した基の両者を有する。

非イオン界面活性剤は一般にポリオキシアルキレンエーテル、及び高級脂肪酸アルカノールアミド又はそのアルキレンオキシド付加物、脂肪酸グリセリンモノエステル、等を含んで成る。

界面活性剤の混合物も採用できうる。

好適な態様において、本明細書に記載の方法において利用するための濃縮物を調製できうる。かかる濃縮物は好ましくは水性溶液の中に、濃縮された量の上記のセルラーゼ組成物、バッファー及び界面活性剤を含むであろう。そのように配合したとき、その濃縮物はこれらの添加物の必須の濃度を有するセルラーゼ溶液を迅速、且つ正確に調製できるように水で容易に希釈することができる。好ましくは、かかる濃縮物は約0.5～約50重量%の上記の菌類セルラーゼ組成物（タンパク質）；約1～約80重量%のバッファー；約0～約50重量%の界面活性剤；及び残りとしての水を含んで成るであろう。水性濃縮物を配合するとき、それらの濃度はセルラーゼ溶液中の成分の必須濃度が上記の通りになるように希釈してよい。明らかな通り、かかる濃縮物はセルラーゼ溶液の簡単な配合を可能とし、そしてそれを使用する場所へのその濃縮物の容易な輸送を可能とするであろう。この濃縮物は液体、エマルジョン、ゲル、ペースト等の形態であってよい。かかる形態は当業者によく知られている。

20

固形のセルラーゼ濃縮物を採用するとき、このセルラーゼ組成物は一般に顆粒、粉末、凝集物等である。顆粒を採用するとき、その顆粒は好ましくはセルラーゼ保護剤を含むように配合する。例えば1991年1月17日出願の米国第07/642,669号（代理人事件番号010055-073）、題名「GRANULES CONTAINING BOTH AN ENZYME AND AN ENZYME PROTECTING AGENT AND DETERGENT COMPOSITIONS CONTAINING SUCH GRANULES」を参照のこと。その内容全体は引用することで本明細書に組入れる。同様に、この顆粒は、水性媒体への顆粒の溶解速度を低めるような材料を含むように配合してよい。かかる材料及び顆粒は1991年1月17日出願の米国第07/642,596号（代理人事件番号GCS-171-US1）、題名「GRANULAR COMPOSITIONS」に開示されている。その内容全体は引用することで本明細書に組入れる。

30

その他の材料、例えば石、充填材、溶媒、酵素活性化剤、他の抗再付着剤等も、所望するならばセルラーゼ組成物と一緒に又はその中に入れて使用できる。

40

液比、即ち、ここで採用する、セルラーゼ処理溶液の重量、対、布帛の重量の比は一般に、デニム布帛において所望のストーンウォッシュ効果が達せられるのに十分な値とし、そして使用する工程に依存する。好ましくは、液比は一般に約1:1より大、そしてより好ましくは約2:1より大である。約20:1より大の液比は経済観点から通常好ましくない。

セルラーゼ処理にとっての反応温度は2つの競合する要因に支配される。第一に、高めの温度は一般に高めの反応速度、即ち、速めの反応に対応し、これは低めの温度において必要とされる反応時間に比して短い反応時間を可能にする。従って、反応温度は一般に約30

以上とする。第二に、セルラーゼは一定の反応温度を超えると活性を失うタンパク質であり、その温度は使用するセルラーゼの種類に依存する。従って、もしその反応温度が高すぎるようになることを許してしまうと、セルラーゼ活性はセルラーゼの変性の結果とし

50

て失われる。その結果、ここで採用する最大反応温度は一般に約65 である。上記の観点において、反応温度は一般に約30 ～約65 ；好ましくは約35 ～約60 ；そしてより好ましくは約35 ～約55 である。

反応時間は一般に約10分～約3時間、そして好ましくは約20分～約1時間である。

かかるセルラーゼ組成物を用いて上記の方法でストーンウォッシュしたデニム布帛は、競合のセルラーゼ組成物で同一の方法でストーンウォッシュした同一のデニム布帛に比べて低めの染料再付着を示した。

下記の実施例は本発明を例証するために提供し、その範囲を限定するものと考えべきではない。

実施例

10

実施例1～14は、1もしくは複数種のセルラーゼ成分を生産することのできないように、又は特定セルラーゼ成分を過剰生産するように遺伝子操作したトリコデルマ ロンジブラチアトゥムの調製を実証する。

実施例1

トリコデルマ ロンジブラチアトゥムのpyr4⁺誘導体の選別

pyr4遺伝子は、ウリジンの生合成にとって必要な酵素、オルチジン - 5' - モトホスフェートデカルボキシラーゼをエンコードする。毒性インヒビター5 - フルオロオロチン酸 (FOA) が野生型細胞によってウリジンの中に組込まれており、それ故細胞を毒してしまう。ところで、pyr4遺伝子を欠く細胞はこのインヒビターに対して耐性であるが、しかし増殖のためにウリジンを必要とする。従って、FOAを用いてpyr4誘導株を選別することが可能である。実際には、T.ロンジブラチアトゥム (従来はT.リーセイと分類されていた) の株RL - P37 (Sheir - Neiss, G. and Montenecourt, B. S., Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, p46 - 53 (1984)) の胞子を、2mg/mlのウリジン及び1.2mg/mlのFOAを含む固形培地の表面の上にまいた。自発性FOA耐性コロニーが3～4日以内に出現し、そしてそれは増殖のためにウリジンを必要とするFOA耐性誘導体をその後同定することを可能にする。特に、欠陥pyr4遺伝子を有する誘導体を同定するために、プロトプラストを作り、そして野生型pyr4遺伝子を含むプラスミドで形質転換した (実施例3及び4を参照のこと)。形質転換後、プロトプラストを、ウリジンを欠く培地の上でプレート培養した。形質転換コロニーのその後の増殖はプラスミド担持pyr4遺伝子による欠損pyr4遺伝子の補完を実証した。これにより、株GC69は株RL - P37のpyr4⁺誘導体と特定された。

20

30

実施例2

CBH I欠損ベクターの調製

CBH Iタンパク質をエンコードするcbh1遺伝子を、T.ロンジブラチアトゥム株RL - P37のゲノムDNAより、公知のプロープ合成法 (Shoemakerら、1983b) を用いてのこの遺伝子についての公開の配列を基礎にデザインしたオリゴヌクレオチドプロープとのハイブリダイゼーションによりクローンした。cbh1遺伝子は6.5kbのPst Iフラグメント上にあり、そして当業界に公知の技術を利用して、Pst I切断pUC4K (Pharmacia inc., Piscataway, New Jerseyより購入) の中に、このベクターのKan^r遺伝子を書き換えるように挿入した。この技術はSambrookら (1989) MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Pressに記載されており、これは引用することで本明細書に組入れる。得られるプラスミド、pUC4K::cbh1を次にHind IIIで切り、そして約6kbの大きめのフラグメントを単離し、そして再リゲートしてpUC4K::cbh1ΔH/Hを得た (図1参照)。この手順は全cbh1コード配列、並びに約1.2kb上流及び約1.5kb下流のフランク配列を除去する。オリジナルのPst Iフラグメントの両端からの約1kbのフランクDNAが残っている。

40

T.ロンジブラチアトゥム pyr4遺伝子を、Sambrookら前掲の方法に従い、pUC18中のゲノムDNAの6.5kbのHind IIIフラグメントとしてクローンして、pTpyr2を形成した (Smithら、1991)。プラスミドpUC4K::cbh1ΔH/HをHind IIIで切り、そしてその末端を仔牛小腸アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。この末端脱リン酸化DNAを、T.ロンジブラチアトゥム pyr4遺伝子を含む6.5kbのHind IIIフラグメントとリゲートし、pΔCBH I pyr4を得た。図1はこのプラスミドの構造を示す。

50

Eco R Iによる p ΔCBH I pyr4の消化は大きめのフラグメントを放出し、これは両端においてのcbh1座のフランク領域と、中央のcbh1コード配列に置き代わるpyr4遺伝子とより成る。

このフラグメント上のT.ロンジブラチアトゥムに由来しない唯一DNAはpUC4Kの多重クローニング部位に由来する21bpのフラグメントである。

実施例 3

プロトプラストの単離

菌糸体は、500mlのフラスコの中の100mlのYEG (0.5%の酵母抽出物、2%のグルコース) に約 5×10^7 のT.ロンジブラチアトゥム GC69胞子 (pyr4⁻誘導株) を接種することにより得た。次いでこのフラスコを振盪しながら37℃で約16時間インキュベートした。その菌糸体を2,750×gで遠心することにより回収した。回収した菌糸体を更に1.2Mのソルビール溶液の中で洗い、そして5mg/mlのNovozym (商標) 234溶液 (これはNovo Biolabs, Danbury, CT由来の、1,3-アルファ-グルカナーゼ、1,3-ベーター-グルカナーゼ、ラミナリナーゼ、キシラナーゼ、キチナーゼ及びプロテアーゼを含む多成分酵素系についての商標名である)、5mg/mlのMgSO₄・7H₂O; 0.5mg/mlの牛血清アルブミン; 1.2Mのソルビトールを含む溶液40mlの中に再懸濁した。このプロトプラストをMiracloth (Calbiochem Corp, La Jolla, California) を介す濾過によって細胞魂から除去し、そして2,000×gでの遠心により集めた。このプロトプラストを1.2Mのソルビトールの中で3回、そして1.2Mのソルビトール、50mMのCaCl₂の中で1回洗い、遠心し、そして1.2Mのソルビトール、50mMのCaCl₂ 1ml当り約 2×10^8 のプロトプラストの密度で再懸濁した。

実施例 4

p ΔCBH I pyr4による菌類プロトプラストの形質転換

実施例 3において調製した200μlのプロトプラスト懸濁物を、TEバッファー (10mMのトリリス、pH7.4; 1mMのEDTA) 中のEco R I消化 p ΔCBH I pyr4 (実施例 2で調製) 20μl並びに25%のPEG 4000、0.6MのKCl及び50mMのCaCl₂を含むポリエチレングリコール (PEG) 溶液50μlに加えた。この混合物を氷の上で20分インキュベートした。このインキュベーション期間の後、2.0μlの上記のPEG溶液をこれに加え、その溶液を更に混合し、そして室温で5分インキュベートした。この第二インキュベーションの後、1.2Mのソルビトール及び50mMのCaCl₂を含む4.0mlの溶液をそれに加え、そしてこの溶液を更に混合した。次にこのプロトプラスト溶液を直ちに、1%のグルコース、1.2Mのソルビトール及び1%のアガロースを含むVogel培地N (3gのクエン酸ナトリウム、5gのKH₂PO₄、2gのNH₄NO₃、0.2gのMgSO₄・7H₂O、0.1gのCaCl₂・2H₂O、5μgのα-ピオチン、5mgのクエン酸、5mgのZnSO₄・7H₂O、1mgのFe (NH₄)₂・6H₂O、0.25mgのCuSO₄・5H₂O、50μgのMnSO₄・4H₂O/l) の溶解アリコートに加えた。このプロトプラスト/培地混合物を次に上記と同一のVogel培地を含む固形培地の上に注いだ。この培地の中にはウリジンは存在しておらず、従ってp ΔCBH I pyr4の中の野生型pyr4遺伝子インサートによる株GC69のpyr4突然変異の補完の結果として形質転換コロニーは増殖可能であった。これらのコロニーをその後、添加剤として1%のグルコースを含む固形Vogel培地の上に転写して精製し、そして安定な形質転換体を更なる分析のために選定した。

この段階で、安定な形質転換体は不安定な形質転換体から、ウリジンを欠く固形培養培地上でのそのより速い増殖速度及びぎざぎざではなく円滑な輪郭の円形コロニーの形成によって区別される。あるケースにおいては、安定性の更なる試験を、その形質転換体を固形の非選択培地の上で増殖させ (即ち、ウリジン含有)、この培地から胞子を回収し、そしてその後ウリジンを欠く選択培地の上で発芽させて増殖させるその胞子の%を決定することによって行う。

実施例 5

形質転換体の分析

実施例 4において得られた形質転換体から、それらを1%のグルコースを含む液状Vogel培地Nの中で増殖させた後に、DNAを単離した。これらの形質転換体のDNAサンプルを更にPst I制限酵素で切り、そしてアガロースゲル電気泳動にかけた。このゲルを次にNytran

10

20

30

40

50

膜フィルターの上にブロットし、そして³²Pラベル化 p Δ CBH I pyr4プローブとハイブリダイズさせた。このプローブは6.5kbのPst Iフラグメントとしての天然cbh1遺伝子、天然pyr4遺伝子及び形質転換用DNAフラグメントに由来する任意のDNA配列を同定するために選定した。

ハイブリダイゼーション由来の放射活性バンドをオートラジオグラフィーにより識別化した。このオートラジオグラフィーを図3に示す。5つのサンプル、即ち、サンプルA,B,C,D及びEを上記の通りに泳動させた。レーンEは未形質転換株GC69であり、そして本分析におけるコントロールとして利用した。レーンA～Dは上記の方法によって得た形質転換体を示す。オートラジオグラフの横側の数字は分子量マーカーのサイズを表わす。このオートラジオグラムからわかる通り、レーンDは6.5kbのCBH Iバンドを含んでおらず、この遺伝子はcbh1遺伝子でのDNAフラグメントの組込みによって形質転換体の中で完全に欠落しているを示唆する。cbh1欠失株をP37P Δ CBH Iと呼ぶ。図2は、T.ロンジブラチアトゥム染色体の一つの上のcbh1座での、p Δ CBH I pyr4由来の大きめのEco R Iフラグメントの二重クロソオーバー現象を介しての組込みによるT.ロンジブラチアトゥム cbh1遺伝子の欠損を概略する。分析したその他の形質転換体は未形質転換コントロール株と同一であることが認められた。

10

実施例 6

pIntCBH Iを有する形質転換体の分析

実施例5と同一の手順を本実施例において利用したが、ただし使用したプローブを³²Pラベル化pIntCBH Iプローブに変えた。このプローブはpUC4K::cbh1 Δ H/Hにおいて欠失した領域内でcbh1座由来の2kbのBgl IIフラグメントを含むpUC型プラスミドである。2つのサンプルを本実施例において泳動し、コントロール、未形質転換株GC69であるサンプルA及び形質転換体P37P Δ CBH IのサンプルBが含まれる。図4からわかる通り、サンプルAは6.5kbのバンドで表示されている通りcbh1遺伝子を含み、しかしながら形質転換体のサンプルBはこの6.5kbのバンドを含んでおらず、それ故cbh1遺伝子を含まず、そしてpUCプラスミドに由来する任意の配列を含まない。

20

実施例 7

株P37P Δ CBH Iによるタンパク質分泌

製造したP37P Δ CBH I株由来の胞子を、1%のグルコース、0.14%の(NH₄)₂SO₄、0.2%のKH₂PO₄、0.03%のMgSO₄、0.03%の尿素、0.75%のバクトトリプトン、0.05%のTween 80、0.000016%のCuSO₄・5H₂O、0.001%のFeSO₄・7H₂O、0.000128%のZnSO₄・7H₂O、0.0000054%のNa₂MoO₄・2H₂O、0.0000007%のMnCl₂・4H₂Oを含むトリコデルマ基礎培地50mlの中に接種せしめた。この培地を250mlのフラスコの中で振盪しながら37℃で約48時間インキュベートした。得られる菌糸体をMiracloth (Calbiochem Corp.)を介する濾過により集め、そして17mMのリン酸カリウムで2又は3回洗った。その菌糸体を最後に1mMのソホロース(sophorose)を有する17mMのリン酸カリウムの中に懸濁し、そして更に振盪しながら30℃で24時間インキュベートした。次にこれらの培養物から上清液を集め、そして菌糸体を捨てた。培養上清液のサンプルをPharmacia Phastgelシステム及びpH3～9の予備成形ゲルを用い、その製造者の仕様書に従って分析した。このゲルを銀染色により染色してタンパク質バンドを識別化した。cbh1タンパク質に対応するバンドは、図5に示している通り株P37P Δ CBH I由来のサンプルにはなかった。その等電点電気泳動ゲルはT.ロンジブラチアトゥムの様々な上清液中の様々なタンパク質を示している。レーンAは部分精製CBH Iである；レーンBは未形質転換T.ロンジブラチアトゥム培養物由来の上清液である；レーンCは本発明の方法に従って作った株P37P Δ CBH I由来の上清液である。様々なセルロース成分の位置は、ラベル化CBH I, CBH II, EG I, EG II及びEG IIIである。CBH Iは全細胞外タンパク質の50%を構成しているため、それが主要分泌タンパク質であり、それ故ゲル上で最も濃いバンドである。この等電点電気泳動はP37P Δ CBH I株中のCBH Iタンパク質の枯渇を明示している。

30

40

実施例 8

pP Δ CBH IIの調製

50

CBH IIタンパク質をエンコードするT.ロンジブラチアトゥムのcbh2遺伝子をゲノムDNAの4.1kbのEco RIフラグメントとしてクローンし、これは図6Aにおいて模式的に示す(Chenら、1987,Biotechnology 5:274 - 278)。この4.1kbのフラグメントをpUC4XLのEco RI部位の間に挿入した。この後者のプラスミドはpUC誘導体であり(R.M.Borka,Genencor International,Inc.により構築)、これは下記の順で並んだ制限エンドヌクレアーゼ部位の対称パターンを有する多重クローニング部位を含む:

Eco RI, Bam HI, Sac I, Sma I, Hind III, Xho I, Bgl II, Cla I, Bgl II, Xho I, Hind III, Sma I, Sac I, Bam HI, Eco RI。当業界に公知の方法を利用して、プラスミド、pPΔCBH II(図6B)を構築した。それにおいては、Hind III部位(CBH II翻訳開始部位の3'の74bp)とCla I部位(CBH IIの最後のコドンの3'の265bp)との間にあるこの遺伝子の1.7kbの中央領域が除去されており、そしてT.ロンジブラチアトゥム pyr4遺伝子を含む1.6kbのHind III - Cla I DNAフラグメントに置き換えられている。

T.ロンジブラチアトゥム pyr4遺伝子を、1.6kbのNhe I - Sph Iフラグメント上のpTpyr2(実施例2参照)から切り出し、そしてpUC219のSph IとXba I部位との間に挿入してp219Mを作った(Smithら、1991,Curr.Genet 19頁27 - 33)。ベクターpuc219はpUC119(Wilsonら(1984) Gene 77:69 - 78)から、多重クローニング部位を増幅してBgl II, Cla II及びXho Iにとっての制限部位を含むようにすることによって誘導されたものである。pyr4遺伝子を、p219Mから、pUC219多重クローニング部位に由来する7bpのDNAを一端に、そして6bpのDNAを他端に有するHind III - Cla Iフラグメントとして除去し、そしてcbh2遺伝子のHind IIIとCla I部位との間に挿入し、プラスミドpPΔCBH IIを形成した(図6B参照)。

Eco RIによるこのプラスミドの消化は、一端にcbh2座由来の0.7kbのフランクDNA、他端にcbh2座由来の1.7kbのフランクDNA及び中央にT.ロンジブラチアトゥム pyr4遺伝子を有するフラグメントを遊離させるであろう。

実施例 9

P37PΔCBH Iのpyr4⁻誘導体の作製

cbh1遺伝子について欠失した形質転換体(P37PΔCBH I)の胞子をFOA含有培地の上にまいた。この形質転換体のpyr4⁻誘導体を次に実施例1の方法を利用して得た。このpyr4⁻株をP37PΔCBH I Pyr⁻26と命名した。サザン分析は、株P37PΔCBH I Pyr⁻26を選別しているときに自発欠損が起きたことを示している。この欠損は、はじめにクローンしたゲノムDNAの6.5kbのPst Iフラグメントの幅を超えてcbh1座に組込まれたpyr4遺伝子を完全に除去した。

実施例10

cbh1について予め欠失している株におけるcbh2遺伝子の欠失。株P37PΔCBH I Pyr⁻26のプロトプラストを作り、そして実施例3及び4に概略した方法に従ってEco RI消化pPΔCBH IIで形質転換した。

精製した安定形質転換体を実施例7の通りにシェーカーフラスコの中で培養し、そしてその培養上清液中のタンパク質を等電点電気泳動により検査した。CBH II(ないしCBH I)タンパク質を生産しない一形質転換体(P37PΔΔCBH67と命名)を同定した。図5のレーンDは本発明の方法に従って作ったcbh1及びcbh2遺伝子の両方について欠失している形質転換体由来の上清液を示す。

DNAを、Eco RI及びAsp718で消化した株P37PΔΔCBH67から抽出し、そしてアガロースゲル電気泳動にかけた。このゲル由来のDNAを膜フィルターにブロットし、そして³²Pラベル化pPΔCBH IIとハイブリダイズさせた(図7)。図7のレーンAは未形質転換T.ロンジブラチアトゥム株由来のDNAについて観察されたハイブリダイゼーションパターンを示す。野生型cbh2遺伝子を含む4.1kbのEco RIフラグメントが観察された。レーンBは株P37PΔΔCBH67について観察されたハイブリダイゼーションパターンを示す。一本の4.1kbのバンドがなくなり、そして約0.9及び3.1kbの二本のバンドに置き換えられていた。これは、pPΔCBH II由来のEco RIフラグメントの一コピーがcbh2座に正確に組込まれている場合に予測されるパターンである。

10

20

30

40

50

同一のDNAサンプルをEco R Iによって消化し、そして上記の通りにサザンブロット分析を行った。本例においては、プローブは³²Pラベル化pIntCBH IIとした。このプラスミドは、プラスミドpPΔCBH II欠失しているcbh2遺伝子のセグメント内に由来するcbh2遺伝子コード配列の一部を含む。株P37PΔΔCBH67由来のDNAとのハイブリダイゼーションは認められず、cbh2遺伝子は欠失しており、そしてpUCプラスミド由来の配列はこの株の中になことを示している。

実施例11

株P37PΔΔCBH67のpyr4 nu11突然変異体の選別。cbh1及びcbh2遺伝子の両者について欠いている形質転換体（P37PΔΔCBH67）の胞子をFOA含有培地の上にまいた。次にこの形質転換体のpyr4欠陥誘導体を実施例1記載の方法を利用して得た。このpyr4欠陥株をP37PΔΔCBH67Pyr⁻1と命名した。サザン分析は、株P37PΔΔCBH67Pyr⁻1を選別するときに自発欠損が生じたことを示す。この欠損はもともとクローンしてあるゲノムDNAの4.1kbのEco R Iフラグメントの幅を超えてcbh2座に組込まれたpyr4遺伝子を完全に除去した。pyr4遺伝子の両末端に存在するpUC219多重クローニング部位に由来するDNAの短い（6bp及び7bp）フラグメントもこの欠損によってゲノムから除去されるであろう。

実施例12

pEG I pyr4の構築

EG IをエンコードするT.ロンジブラチアトゥム egl1遺伝子を、株RL - P37由来のゲノムDNAの4.2kbのHind IIIフラグメントとして、公開の配列に従って合成したオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによってクローンした（Penttiläら、1986, Gene 45:253 - 263; Van Arsdelら、1987, Bio/Technology 5:60 - 64）。3.6kbのHind III - Bam HIフラグメントをこのクローンから取り出し、そしてpTpyr2（実施例2参照）により得たT.ロンジブラチアトゥム pyr4遺伝子及びHind IIIで切ったpUC218（実施例8のpUC219と同じであるが、ただし多重クローニング部位が反対方向となっている）を含む1.6kbのHind III - Bam HIフラグメントと、Sambrookら（1989）前掲に概略した標準分子技術によってリゲートして、プラスミドpEG I pyr4を供した（図8）。Hind IIIによるpEG I pyr4の消化は、2本の遺伝子（egl1及びpyr4遺伝子）間の24bpの配列決定した合成DNA及び一端にある6bpの配列決定した合成DNAを除き、T.ロンジブラチアトゥムゲノムDNA（egl1及びpyr4遺伝子）のみを含むDNAのフラグメントを遊離するであろう（図8参照）。これら合成DNA片の両者はpUC - 型ベクターの多重クローニング部位より得られた。

実施例13

EG I発現ベクターpTEX - EG1の構築

プラスミドpTEX - EG IをSambrookら（1989）前掲の方法に従って構築し、そして図9に示す。このプラスミドは糸状菌類トリコデルマリイセイにおける使用のための多目的発現ベクターとしてデザインされている。その発現力セットはこの機能にとってそれを有用なものにするいくつかの固有の特徴を有する。転写はT.リーセイにとって強力なCBH I遺伝子プロモーター及びターミネーター配列を使用して制御している。CBH Iプロモーターとターミネーターとの間には、発現させるべき遺伝子を挿入するのに用いる固有のPme I及びSst I制限部位がある。T.リーセイ pyr4選択マーカー遺伝子がCBH Iターミネーターの中に挿入されており、そして完全発現力セット（CBH Iプロモーター - 挿入部位 - CBH Iターミネーター - pyr4遺伝子 - CBH Iターミネーター）は固有のNot I制限部位又は固有のNot I及びNhe I制限部位を用いて切り出すことができる。

このベクターは細菌ベクターpSL1180（Pharmacia Inc., Piscataway, New Jersey）を基礎とし、これは長い多重クローニング部位を有するpUC型ベクターである。pTEXをSst II及びPme Iで消化し、次いでcbh1プロモーターをegl1コード配列に、並びにegl1コード配列及びターミネーター領域のほとんどを含むT.ロンジブラチアトゥムDNAの約2kb Sfi I - Sca Iフラグメントに連結するのにデザインされた合成DNAリンカーにリゲートさせる。このリゲーションはベクターpTEX - EG Iをもたらし、このベクターをNot I及びNhe Iで消化して、下記の成分を含んで成る発現力セットを遊離させた：

a) pSL1180の多重クローニング部位に由来する11bpのリンカーDNA。

10

20

30

40

50

b) cbh1遺伝子のプロモーター領域に由来する約2.2kbのPst I - Sst IIフラグメント。このSst II部位は翻訳開始コドン(ATG)の5'の位置15bpにある。

c) cbh1プロモーターをegl1コード配列に連結するために用いる合成DNAリンカーであって、Sst II及びSfi I消化DNAと適合性の一本鎖突き出し(overhanging)末端を有し、且つ下記の配列を有するもの：

5' GGAAGTGGCATCATGGCGCCCTCAGTTACACTGCCGTTGACCACGGCCATCC 3'

3' CGCCTGACCGTAGTACCGCGGGAGTCAATGTGACGGCAACTGGTGCCGGT 5'

(SEQ ID NO:4)。星印はegl1遺伝子コード領域の翻訳開始コドン(ATG)である。5'からATGコドンに至るDNA配列はcbh1遺伝子のこの領域において見い出せるものと全く同一である。ATGコドンの3'のDNA配列はegl1遺伝子のこの領域と全く同一である。

d) T.ロンジブラチアトゥムDNAの約2kbのSfi I - Sca Iフラグメントであって、第一ATGコドンの30bp後方のSfi I部位で開始するegl1コード配列、並びに転写終止及びポリアダニル化シグナルを含む約300bpの3'フランクDNAを含むもの。

e) T.ロンジブラチアトゥムDNAの約1kbのSma I - Bgl IIフラグメントであって、cbh1遺伝子の3'フランク領域に由来し、図9に示す合成リンカーDNA(SEQ ID NO:1)を用いてSma I部位の隣りに付加されたPme I制限部位を有するもの。

f) 1.6kbのBgl IIプラスミド上のT.ロンジブラチアトゥムpyr4遺伝子であって、一端上に13bp、そして他端上に17bpの合成リンカー配列を有するもの。両リンカーともpUC219ベクターの多重クローニング部位に由来する。この後者の合成リンカーは図9に示すリンカー(SEQ ID NO:3)を用いるHind III部位でのBgl II部位の挿入によって追加的に改良されている。オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発(Sambrookら(1989) Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press)を、pyr4コード領域内の一つのヌクレオチドを改変するのに用いた(図9のSEQ ID NO:2)。タンパク質のアミノ酸位置251にあるアルギニンについてコードするコドンの3番目のヌクレオチドをCヌクレオチドからAヌクレオチドへとこの方法によって変えた。この変更は作成されたオロチジン5'モノホスフェートデカルボキシラーゼのアミノ酸配列を変更しないが、しかしDNA配列中のSst II部位を破壊し、それ故プラスミドの構築を助長する。

g) cbh1遺伝子の3'フランク領域由来のT.ロンジブラチアトゥムDNAの約0.5kbのBgl II - Nhe Iフラグメント。

pTEX - EG Iに類似するが、gel1遺伝子に代わる任意のその他のT.ロンジブラチアトゥム遺伝子を有するプラスミドを構築することが可能であろう。これにより、その他の遺伝子の過剰発現及びcbh1遺伝子の同時欠損が達せられうる。

実施例14

EG I過剰発現株の構築

Hind IIIによる消化によりpEG I pyr4から遊離したgel1及びpyr4遺伝子を含むDNAの線形フラグメントをアガロースゲルから精製した。同様に、egl1, pyr4遺伝子及びcbh1遺伝子のフランク領域を含むDNAの線形フラグメントをNot I及びNhe Iによる消化後にpTEX - EG Iから精製した。DNAのこれらのフラグメントを、実施例3及び4の方法によってT.ロンジブラチアトゥム株P37PΔΔCBH67 Pyr⁻1を形質転換せしめる個別の実験において用いた。いくつかの形質転換体が各DNAフラグメントより得られ、これらの形質転換体はその親株に比して高いレベルのEG Iを産生した。全DNAをこれらの形質転換体から単離し、Pst Iで消化し、アガロースゲル電気泳動にかけ、そして膜フィルターにブロットした。放射性ラベルpUCEG I(ゲノムDNAの4.2kbのHind IIIフラグメント上にegl1遺伝子を含むpUCプラスミド)を用いるサザンブロット分析は、各形質転換体が、決定することのできなかったゲノム内の部位に組込まれたegl1遺伝子の複数のコピーを含んでいることを示した。

同様のサザン分析をプローブとしてpUCベクターを用いて実施した。この分析は、pEG I pyr4又はpTEX - EG1のいずれかのpUCプラスミドフラグメントがどちらの株によっても組込まれていないことを示した。

上記の通りにしてpEG I pyr4又はpTEX - EG Iのいずれかにより得られた株P37PΔΔCBH67Pyr⁺1の形質転換体を50mlのシェークフラスコ培養物の中に接種し、生成された分泌エンドグルカナーゼの量を決定した。これらの実験のために用いた液体培地は下記の組成を有する：

アルファー - ラクトース30g/l; (NH₄)₂SO₄6.5g/l;KH₂PO₄2.0g/l;MgSO₄・7H₂O0.3g/l;CaCl₂0.2g/l;1000×の微量塩溶液1.0ml/l;10%Tween 80 2.0ml/l;Proflo 22.5g/l;CaCO₃0.72g/l。

Tween 80及びProfloのための起源。1000×の微量塩溶液は下記の組成を有していた：FeSO₄・7H₂O5.0g/l;MnSO₄・H₂O1.681;ZnSO₄1.4g/l。これらのシェークフラスコ培養物を30で7日間、振盪しながらインキュベートした。上清液のサンプルをこれらの培養物から採取し、そしてエンドグルカナーゼ活性を測定するためにデザインしたアッセイは下記の通りに実施した。

エンドグルカナーゼアッセイはレマゾール ブリリアント ブルーカルボキシメチルセルロース (RBB - CMC;Megazyme,North Rocks,NSW,Australiaより入手)由来の可溶性染色オリゴ糖の放出に基づく。この基質は、2gのドライRBB - CMCを80mlの単に沸騰した脱イオン水に強く攪拌しながら加えることによって調製した。室温にまで冷やしたら、5mlの2Mの酢酸ナトリウムバッファー (pH4.8)を加え、そしてそのpHを4.5に調整した。その容量を最終的に脱イオン水で100mlに調整し、そしてアジ化ナトリウムを0.02%の最終濃度となるように加えた。T.ロンジブラチアトゥムコントロール培養物、pEG I pyr4もしくはpTEX - EG I形質転換体培養上清液、又はブランクとしての0.1Mの酢酸ナトリウムのアリコート (10~20μl)をチューブの中に入れ、250μlの基質を加え、そしてそのチューブを37で30分インキュベートした。これらのチューブを氷の上に10分間載せ、次いで1mlの低温沈殿剤 (3.3%の酢酸ナトリウム、0.4%の酢酸亜鉛、HClでpH5、76%のエタノール)を加えた。これらのチューブをボルテックスに付し、そして5分間放置し、次いで約13,000×gで3分間遠心した。光学密度を590~600nmの波長で吸光度的に測定した。

pEG I pyr4 DNAにより得た5種の形質転換体の三重培養物及び親株P37PΔΔCBH67の培養物に基づいて実施したエンドグルカナーゼアッセイの結果を下記の表1に示す。形質転換体は明らかに、上記の親株に比してより多くの分泌エンドグルカナーゼ活性を供し、それは表1に示す。

表 1

T. ロンジブラチアトゥム形質転換体の
分泌エンドグルカナーゼ活性

形質転換体	フラスコ 1	RBB-CMC 単位/ML フラスコ 2	フラスコ 3	フラスコ 4	平均
P37 EP1	5.7	14.3	14.1		11.4
P37 EP8	11.0	3.8	6.1		7.0
P37 EP9	3.4	11.5	14.9		9.9
P37 EP10	7.0	9.1	5.0		7.0
P37 EP11	5.0	5.5	10.0		6.9
親 P37PΔΔCBH67	3.0	2.8	5.5	1.1	3.1

上記の結果はEG I成分の過剰生産を実証するための目的で示しており、過剰生産の程度を実証する目的のために示しているのではない。これに関して、過剰生産の程度は各実験で

異なると予測される。

類似のシェークフラスコ培養及びエンドグルカナーゼアッセイをpTEX - EG Iで得られた形質転換体で実施し、そしてエンドグルカナーゼ活性を過剰生産した形質転換体を同定した。

本実施例の方法は任意のその他のEG成分を過剰生産するであろうT.ロンジブラチアトゥム株を産生するのに用いることができる。

CBH I及びCBH IIに加えてその他の遺伝子、例えばEG IIについて予め欠失させておいたT.ロンジブラチアトゥムのpyr4誘導株をpEG I pyr4又はpTEX - EG Iで形質転換させて、例えばエキソセロピオヒドロラーゼ又はEG IIを生産せず、且つEG Iを過剰発現するであろう形質転換体を構築することも可能であろう。

10

実施例15

Cytolase 123セルラーゼのセルラーゼ成分に至る精製CYTOLASE 123セルラーゼを下記の方法で分画した。このセルラーゼ系の中のセルラーゼ成分の通常の分布は下記の通りである：

CBH I	45 - 55重量%
CBH II	13 - 15重量%
EG I	11 - 13重量%
EG II	8 - 10重量%
EG III	1 - 4重量%
BG	0.5 - 1重量%。

20

分画は下記の樹脂を含むカラムを用いて行った：

Sigma Chemical Company (St.Louis,Mo) 由来のSephadex G - 25ゲル濾過樹脂、IBF Biotechnics (Savage,Maryland) 由来のQA Trisacryl Mアニオン交換樹脂及びSP Trisacryl Mカチオン交換樹脂。CYTOLASE 123セルラーゼ0.5gをSephadex G - 25ゲル濾過樹脂の3リットルのカラムを用い、10mMのリン酸ナトリウムバッファーpH6.8で脱塩した。この脱塩溶液を次に20mlのQA Trisacryl Mアニオン交換樹脂の20mlのカラムの上に載せた。このカラムに結合した画分はCBH I及びEG Iを含んでいた。これらの成分を0～約500mMの塩化ナトリウムを含む水性勾配を利用する勾配溶出によって分離させた。このカラムに結合しなかった画分はCBH II及びEG IIを含む。これらの画分を10mMのクエン酸ナトリウム、pH3.3で平衡にしたSephadex G - 25ゲル濾過樹脂のカラムを用いて脱塩した。この溶液200mlを次に20mlのSP Trisacryl Mカチオン交換樹脂のカラムの上に載せた。CBH II及びEG IIを0～約200mMの塩化ナトリウムを含む水性勾配を用いて個別に溶出させた。

30

上記の実施例13のそれに似た手順に従い、その成分へと分けることのできるその他のセルラーゼ系にはCELLUCAST (Novo Industry,Copenhagen,Denmarkより入手可能)、RAPIDASE (Gist Brocades,N.V.,Delft,Holland) 及びトリコデルマ コニンギイ、ペニシルム種に由来するセルラーゼ系等が含まれる。

実施例16

Cytolase 123セルラーゼからのEG IIIの精製

上記の実施例22はCytolase 123セルラーゼからのいくつかの成分の単離を実証している。しかしながら、EG IIIはCytolase 123セルラーゼの中で非常に少量で存在しているため、この成分を単離するのに下記の手順を採用する。また、全体を引用することで本明細書に組入れる1992年4月3日出願の米国第07/862,846号、題名「METHODS FOR PRODUCING SUBSTANTIALLY PURE EG III CELLULASE USING POLYETHYLENE GLYCOL」を参照のこと。

40

A. EG IIIセルラーゼ酵素の大量抽出

100リットルの無細胞セルラーゼ濾液を約30 に熱した。この熱した材料は約4% (wt/vol) PEG 8000 (ポリエチレングリコール、MW約8000) 及び約10% (wt/vol) の無水硫酸ナトリウムより成る。この混合物は二相の液体混合物を構成している。それらの相をSA - 1ディスクスタック遠心を利用して分離させた。それらの相を銀染色等電点電気泳動ゲルを用いて分析した。分離はEG III及びキシラナーゼに関して得られた。回収した組成物は約20～50重量%のEG IIIを含む。

50

上記の手順に関し、約8000未満の分子量を有するポリエチレングリコールの利用は不適切な分離を供した；一方、約8000より大の分子量を有するポリエチレングリコールの利用は回収した組成物における所望の酵素の排除をもたらした。硫酸ナトリウムの量に関しては、約10%wt/volより大の硫酸ナトリウムのレベルは沈殿の問題を起こした；一方、約10%wt/vol未満の硫酸ナトリウムのレベルは劣った分離を供すか、又はその溶液は単相のままであり続けた。

他に、EG IIIセルラーゼは、全体を引用することで本明細書に組入れる1992年4月3日出願の米国第07/862,641号、題名「METHODS FOR PRODUCING SUBSTANTIALLY PURE EG III CELLULASE USING ALCOHOL」に記載の方法によって抽出できる。

B. 分画を介するEG IIIの精製

EG IIIの精製は、野生型トリコデルマ ロンジブラチアトゥムにより産生された完全菌類セルラーゼ組成物（CYTOLASE 123セルラーゼ；Genencor International, South San Francisco, Californiaより市販）からの分画によって行われる。詳しくは、分画は下記の樹脂を含むカラムを用いて行う：

Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo) 由来のSephadex G - 25ゲル濾過樹脂、IBF Biotechnics (Savage, Maryland) 由来のQA Trisacryl Mアニオン交換樹脂及びSP Trisacryl Mカチオン交換樹脂。CYTOLASE 123セルラーゼ0.5gをSephadex G - 25ゲル濾過樹脂の3リットルのカラムを用い、10mMのリン酸ナトリウムバッファーpH6.8で脱塩する。この脱塩溶液を次に20mlのQA Trisacryl Mアニオン交換樹脂の20mlのカラムの上に載せる。このカラムに結合する画分はCBH I及びEG Iを含む。このカラムに結合しない画分はCBH II, EG II及びEG IIIを含む。これらの画分を10mMのクエン酸ナトリウム、pH4.5で平衡にしたSephadex Q - 25ゲル濾過樹脂のカラムを用いて脱塩する。この溶液200mlを次に20mlのSP Trisacryl Mカチオン交換樹脂のカラムの上に載せる。EG IIを200mMの塩化ナトリウムの水性溶液100mlを用いて溶出させる。

EG IIIの単離の効率を高めるため、1又は複数種のEG I, EG II, CBH I及び/又はCBH IIを生産することができなくなるようにトリコデルマ ロンジブラチアトゥムを遺伝子的に改良することを採用することが所望されうる。1又は複数種のかかる成分がないことはEG I IIのより効率的な単離を必然的にもたらずであろう。

同様に、実質的に純粋なEG III組成物、即ち、約80重量%より大のタンパク質においてEG IIIを含む組成物を供するために上記のEG III組成物を更に精製することが所望されうる。例えば、かかる実質的に純粋なEG IIIタンパク質は手順Aにおいて得られた材料を手順Bにおいて利用することにより、又はその逆により得られうる。EG IIIを更に精製するための一の特定の方法は本実施例14のパートb)において得られたEG IIIサンプルの更なる分画を有する。更なる分画は、Mono - S - HR 5/5カラム（Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJより入手可能）を用いてFPLCシステムで行った。このFPLCシステムは液体クロマトグラフィーコントローラー、2台のポンプ、デュアルパスモニター、フラクションコレクター及びチャートレコーダーより成る（全てPharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJより入手可能）。分画は、本実施例14のパートb)において調製したEG IIIサンプル5mlを、10mMのクエン酸ナトリウム、pH4で予め平衡にしておいた20mlのSephadex G - 25カラムで脱塩することにより行った。次いでこのカラムを0 ~ 200mMのNaClの水性勾配で0.5ml/分の流速で溶出させ、そのサンプルを1mlの画分で集めた。EG IIIは分画10及び11で回収され、そしてSDSゲル電気泳動により90%より大の純度であることが決定された。この純度のEG IIIは公知の技術によってN末端アミノ酸配列を決定するのに適当である。

上記の実施例16において精製した実質的に純粋なEG III並びにEG I及びEG II成分は本発明において単独で、又は混合物として利用できる。これらのEG成分は下記の特徴を有する：

	MW	pI	指摘 ¹ pH
EG I	~ 47 - 49kD	4.7	~ 5
EG II	~ 35kD	5.5	~ 5

10

20

30

40

50

EG III ~ 25 - 28kD 7.4 ~ 5.5 - 6.0

1. 指摘pHは下記の実施例17に従いRBB - CMC活性により決定した。

実施例17

一定pH域にわたるセルラーゼ組成物の活性

以下の手順を2種類のセルラーゼ組成物のpHプロファイルを決定するために採用した。第1セルラーゼ組成物は、CBH I及びII成分が生産できないように上記と似たような方法で遺伝子的に改良したトリコデルマ ロンジブラチアトゥムより調製したCBH I及びCBH II欠失セルラーゼ組成物である。このセルラーゼ組成物は、トリコデルマ ロンジブラチアトゥム由来のセルラーゼ組成物を約58~78%一般的に含んで成るCBH I及びCBH IIを含まないため、このセルラーゼ組成物は必然的にCBH I型及びCBH II型セルラーゼ成分を実質的に含まず、従ってEG成分、即ちEG I,EG II,EG III等に富んでいる。

10

第二セルラーゼ組成物は実施例16のパートb)に似た精製方法を介するトリコデルマ ロンジブラチアトゥム由来のセルラーゼ組成物から単離したEG IIIの約20~40%の純度の画分である。

これらのセルラーゼ組成物の活性を40℃で決定し、そしてその決定は下記の手順を利用して行った。

5~20μlの適当な酵素溶液を、最終溶液において必須の酵素を供するように十分な濃度で加える。pH4,5,5.5,6,6.5,7,7.5及び8の0.05Mのクエン酸/リン酸バッファー中の250μlの2重量%のRBB - CMC(レマゾール ブリリアント ブルー R - カルボキシメチルセルロース;MagaZyme,6 Altona Place,North Rocks,N.S.W.2151,Australiaより市販)を加える。

20

ボルテックスし、そして40℃で30分インキュベートする。氷浴の中で5~10分冷やす。0.3Mの酢酸ナトリウム及び0.02Mの酢酸亜鉛を含む1000μlのメチルセロソルブ(methyl cellosolve)を加える。ボルテックスし、そして5~10分放置する。遠心し、そして上清液をキュベットに入れる。各キュベットの中の光学密度(OD)を590nmで測定する。高めのレベルの光学密度は高めのレベルの酵素活性に相当する。

この分析の結果を図10に示し、これはEG IIIセルラーゼ組成物と対比させたCBH I及びII欠失セルラーゼ組成物の相対活性を示している。この図より、CBH I及びCBH IIを欠くセルラーゼ組成物はRBB - CMCに対する最適セルロース分解活性をpH5.5付近で有し、そして若干の活性をアルカリpHで、即ち、7より高く8に至るpHにおいて有している。他方、EG IIIに富むセルラーゼ組成物はpH5.5~6において最適セルロース分解活性を有し、そしてアルカリのpHで有意な活性を有する。

30

上記の実施例から、当業者は、セルラーゼ組成物が活性であり、且つ好ましくは最適活性を有しているように水性繊維組成物のpHを単に調整及び維持すればよい。上記の通り、かかる調整及び維持は適当なバッファーの利用を包括しうる。

実施例18

ストーンウォッシュ外観

本実施例は、CBH型成分の存在がデニム布帛にストーンウォッシュ外観を授けるのに本質的でないことを実証する。詳しくは、本実施例は、CBH型成分を生産できない(即ち、CBH I及びII成分を生産できない)ように上記の方法で遺伝子操作されたトリコデルマ ロンジブラチアトゥムに由来するセルラーゼ組成物及びトリコデルマ ロンジブラチアトゥムに由来し、そしてGenencor International,South San Francisco,CaliforniaからCytolase 123セルロースとして入手できる完全セルラーゼ組成物を採用する。

40

これらのセルラーゼ組成物を染色したデニムパンツにストーンウォッシュ外観を授けるその能力について試験した。詳しくは、サンプルを工業用洗濯機及び下記の条件を利用して用意した:

10mMのクエン酸/リン酸バッファーpH5

40Lの全容量

110°F

4本のデニムパンツ

50

1 時間の工程時間

50ppmのCBH I及びII欠失セルラーゼ又は100ppmの完全セルラーゼ（即ち、ほぼ等しいEG濃度において）

サンプルを、8人のパネリストにより、染料の再付着のレベルでなく、そのストーンウォッシュ外観について評価した。8人のパネリスト全員が、非酵素処理パンツに比べて100ppm完全セルラーゼ処理パンツをより良いストーンウォッシュルックを有するものとして選んだ。8人のパネリストのうち4人が完全セルラーゼに比べてCBH I及びII欠失セルラーゼ処理パンツを、より良いストーンウォッシュルックを有するものとして選んだ；一方、他の4人のパネリストは完全セルラーゼ処理パンツをより良いストーンウォッシュルックを有するものとして選んだ。これらの結果は、CBH I及びII欠失セルラーゼ処理パンツが、完全セルラーゼ処理パンツと区別できず、従ってCBH I及びII又はCBH IIはデニム布帛にストーンウォッシュ外観を供するのに本質的でないことを示唆する。

10

実施例19

染料の低められた再付着

本実施例は、CBH型成分を実質的に含まないEG型成分の利用がストーンウォッシュ中での布帛に対する染料の低められた再付着をもたらすことを実証する。

詳しくは、本実施例は下記のセルラーゼ組成物を採用する：

- a) トリコデルマ ロンジブラチアトゥムに由来し、且つGenencor International, South San Francisco, CaliforniaからCytolase 123セルラーゼとして入手できる完全セルラーゼ組成物。
- b) CBH型成分を生産できないように（即ち、CBH I及びII成分を生産できないように）上記のように遺伝子操作したトリコデルマロンジブラチアトゥム由来のセルラーゼ組成物；
- c) 実施例15の方法により精製したCBH I；
- d) 実施例15の方法により精製したEG II；
- e) 実施例15の方法により精製したEG III；及び
- f) 実施例16の方法により精製したEG III。

20

これらのセルラーゼ組成物を、染色したデニムパンツに対してストーンウォッシュ外観を供するその能力及び布帛に対する染料の再付着を防ぐその能力について試験した。

詳しくは、これらのサンプルは工業用洗濯機及びドライヤーを用いて下記の条件下で用意した：

30

20mMのクエン酸 / リン酸バッファー pH4.9

40Lの全容量

55

3.8kgの脱糊化インジゴ染めデニムパンツ

36rpmで 1 時間の工程時間

35ppmのCBH I及びII欠失セルラーゼ、又は

70ppmの完全セルラーゼ、又は

15～30ppmの精製EG I, EG IIもしくはEG IIIセルラーゼ

衣料を清浄な液体での3連続サイクルにおいて標準化プロトコールに従ってすすいだ。すすぎ # 1 ... 24ガロンの熱湯、約50℃、100gの標準洗剤WOR (American Association of Textile Chemists and Colorists [AATCC], WOB - 漂白剤抜き)。攪拌は36rpmで12分とした。液を抜いた。すすぎ # 2 ... 24ガロンの温水、～40℃、添加洗剤なし、5分の攪拌。液を抜いた。すすぎ # 3 ... 24ガロンの冷水、～30℃、添加洗剤なし、5分の攪拌。液を抜いた。衣料をしぼた、そして標準の電気洋服ドライマーの中で乾燥した。

40

図11は種々のセルラーゼ組成物より得た結果を示す。

この結果は、EG IIIが布帛上の染料の最低の再付着を供することを示唆する。しかしながら、精製EG I, EG II及びCBH I/II欠失セルラーゼも、完全セルラーゼで得られたものと対比させたとき、低い付着を有する満足たるストーンウォッシュ外観を供した。CBH I単独は再付着を供しないが、それはストーンウォッシュ効果ももたらさない。

セルラーゼ組成物中の大量のCBH型成分の存在は布帛に対する染料の再付着の上昇をもた

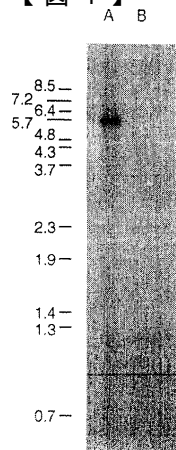
50

らすようである。

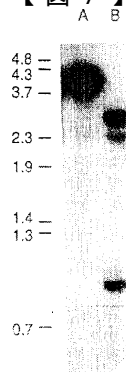
CBH型成分を実質的に含まない、トリコデルマ ロンジブラチアトゥム以外の再付着性完全セルラーゼ組成物を提供する微生物に由来するセルラーゼ組成物が、本実施例に記載のセルラーゼ組成物の代わりに使用できうる。特に、EG型成分を含むセルラーゼ組成物の起源は本発明にとって重要でなく、そして1又は複数種のEG型成分を含み、且つ実質的に全てのCBH - 型成分を含まない任意のセルラーゼ組成物をここでは使用できる。例えば、本発明において使用する菌類セルラーゼ組成物を調製するうえで使用するための菌類セルラーゼは、トリコデルマ ビリデ、トリコデルマ コニンギイ、ペンシリウム種等から獲得できるか、又は市販のセルラーゼ、即ち、CELLUCAST (Novo Industry, Copenhagen, Denmarkより入手可能)、RAPIDASE (Gist Brocades, N.V., Delft, Hollandより入手可能)等を利用

10

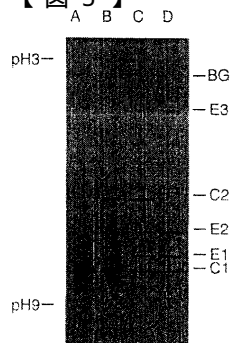
【図4】



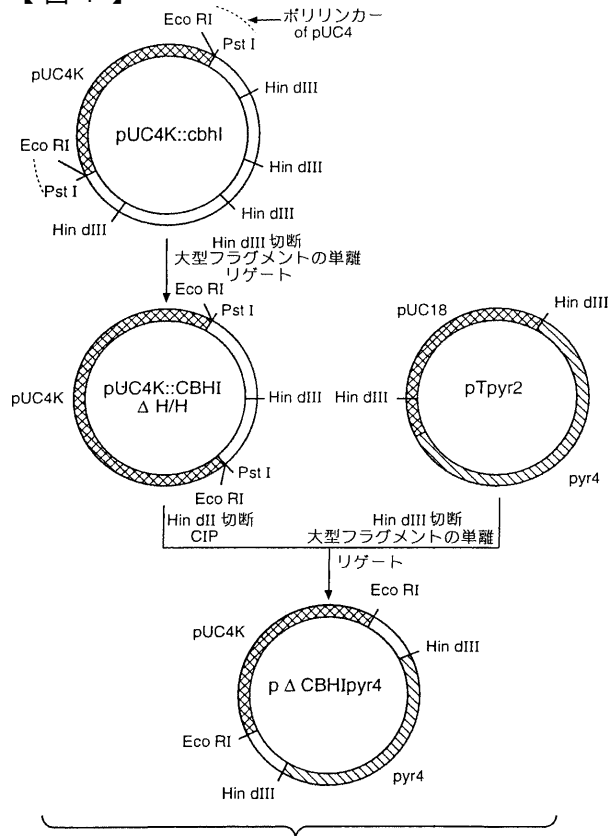
【図7】



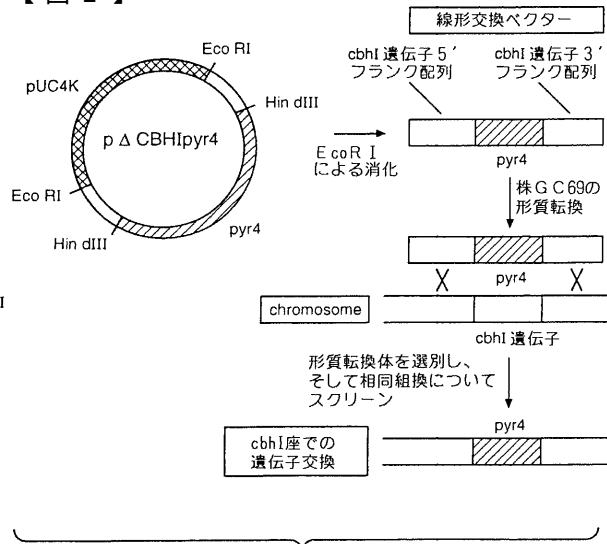
【図5】



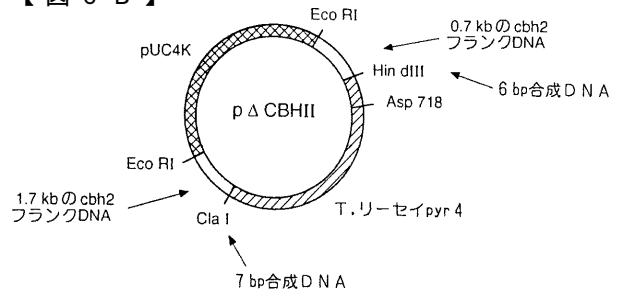
【図 1】



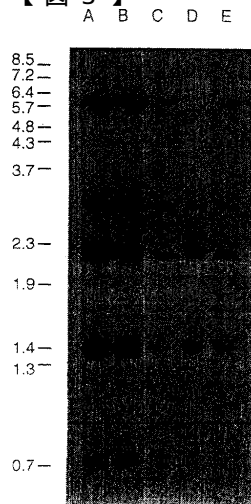
【図 2】



【図 6 B】



【図 3】

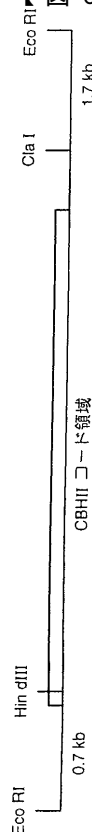


【図 9】

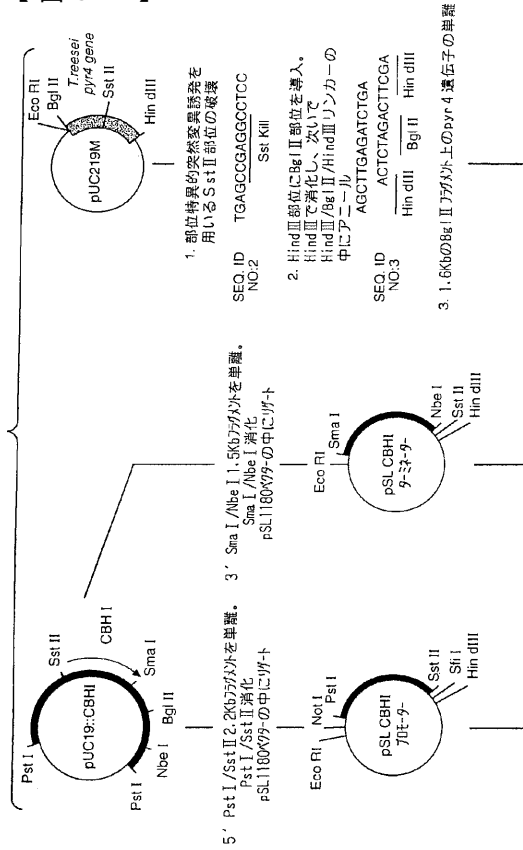
FIG. 9A

FIG. 9B

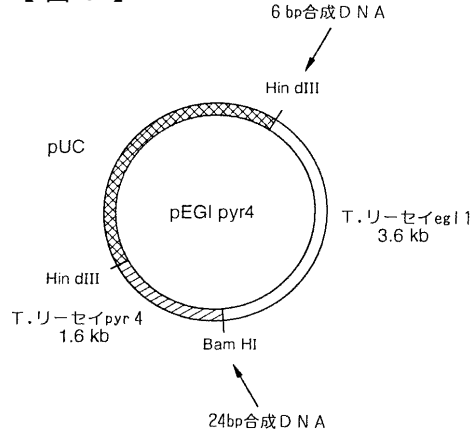
【図 6 A】



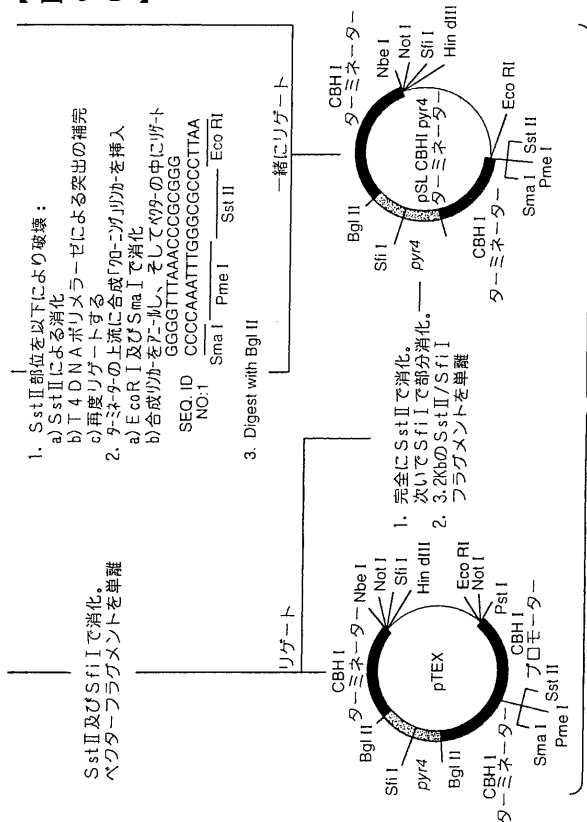
【図 9 A】



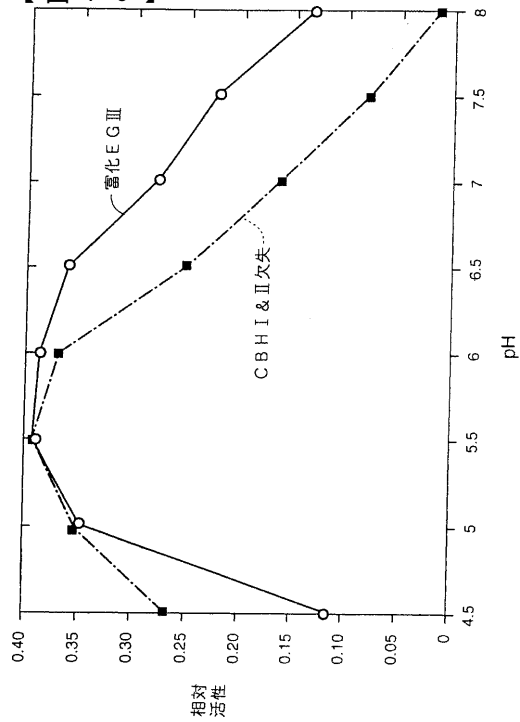
【図 8】



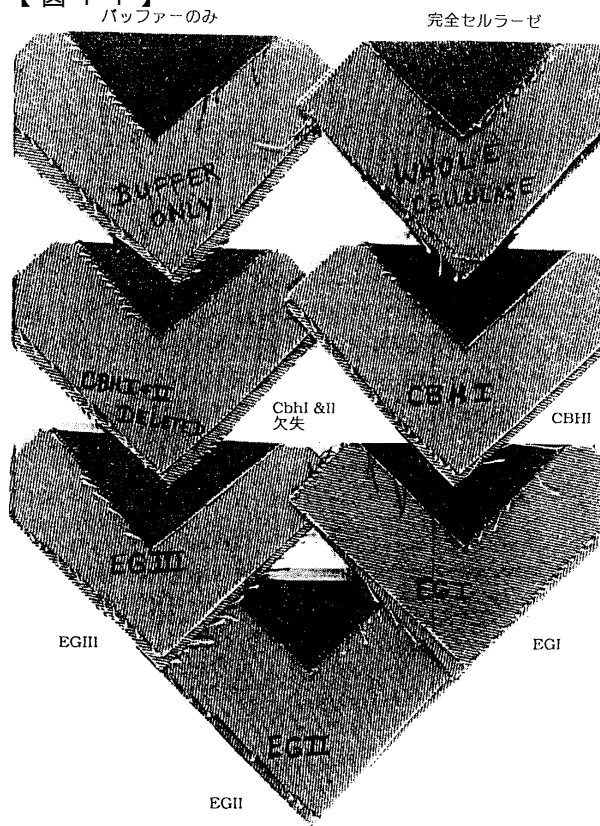
【図 9 B】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

- (72)発明者 ラレナス, エドムンド
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 0 3 8 , モスピーチ, ネバダ 3 0 1
- (72)発明者 ウェイス, ジョフリー
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 1 1 7 , サンフランシスコ, ブエナ ビスタ 4 5 7
- (72)発明者 ボウアー, ベンジャミン エス.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 0 4 4 , パシフィカ, エスプラネイド ドライブ # 3 9
3 2 0

審査官 審査長

- (56)参考文献 国際公開第 9 2 / 0 0 6 2 2 1 (WO, A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

D06P 5/00 121

D06P 5/08 DBB