

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5944908号
(P5944908)

(45) 発行日 平成28年7月5日 (2016.7.5)

(24) 登録日 平成28年6月3日 (2016.6.3)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/76 (2006.01)

C 1 2 N 9/76 Z N A

C 1 2 P 21/06 (2006.01)

C 1 2 P 21/06

C 1 2 N 9/52 (2006.01)

C 1 2 N 9/52

A 2 3 J 3/08 (2006.01)

A 2 3 J 3/08

請求項の数 7 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-530759 (P2013-530759)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月30日 (2011.9.30)
 (65) 公表番号 特表2013-544499 (P2013-544499A)
 (43) 公表日 平成25年12月19日 (2013.12.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/067167
 (87) 国際公開番号 W02012/042037
 (87) 国際公開日 平成24年4月5日 (2012.4.5)
 審査請求日 平成26年9月4日 (2014.9.4)
 (31) 優先権主張番号 10185793.6
 (32) 優先日 平成22年10月1日 (2010.10.1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

微生物の受託番号 DSMZ DSM 23706

(73) 特許権者 500586299
 ノボザイムス アクティーゼルスカブ
 デンマーク国, デーコー 2880 バグ
 スバエルト, クロシェイバイ 36
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エンドペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドであって、

(a) 配列番号 2 の成熟ポリペプチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するポリペプチド；及び(b) 配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドから成る群から選択される、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記配列番号 2 の成熟ポリペプチドに対して、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は 100 % の配列同一性を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドの製造方法であって、

(a) ポリペプチドの製造を指示する 1 又は 2 以上の調節配列に対して作動可能に結合される、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞を、ポリペプチドの製造のための条件下で培養し；そして

(b) 前記ポリペプチドを回収することを含んで成る、方法。

【請求項 4】

10

20

タンパク質加水分解物の製造のための、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 5】

タンパク質加水分解物の製造方法であって、

(a) 加水分解されるべきタンパク質を含む溶液を供給し；

(b) 請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを、前記溶液に添加し；そして

(c) タンパク質加水分解物を得ること

を含んで成る、方法。

【請求項 6】

前記加水分解されるべきタンパク質が食用タンパク質である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記タンパク質が乳タンパク質である、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、エンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチド、及び前記ポリペプチドの製造及び使用方法に関する。本発明はまた、タンパク質加水分解物、例えば食用タンパク質加水分解物の製造方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

配列列挙の参照

本出願は、参照により本明細書に組込まれる、コンピューター読み取り可能フォームでの配列列挙を含む。

【0003】

生物材料の寄託物の参照

本出願は、参照により本明細書に組込まれる、生物材料の寄託物への参照を含む。

【0004】

関連技術の記載

トリプシン (EC 3.4.21.4) は、それがタンパク質を加水分解する、多くの脊椎動物の消化系に見出されるセリンプロテアーゼである。トリプシンは、アミノ酸リシン及びアルギニンのカルボキシル側で主にペプチド鎖を分解する。トリプシンは、膵臓で高い量で入手でき、そしてかなり容易に精製され得る。従って、それは種々の生物工学工程により広く使用されて来た。トリプシンは、ベビーフードをプレ - 消化するためにそのフードに使用される。それは、乳児の胃は大きなタンパク質分子を消化するために十分に発育されていないので、タンパク質分子を分解し、乳児によるその分子の消化を助けることができる。トリプシンは乳タンパク質を分解し、乳児用調製粉乳のための部分乳タンパク質加水分解物を供給することができる。例えば、国際公開第 93 / 04593 号及びアメリカ特許第 5,039,532 号は、低アレルギー性ホエータンパク質加水分解物の製造のためへの膵臓トリプシン調製物の使用を開示している。

【0005】

いくつかの理由のために、食品製造及び特に、ベビーフード又は乳児用調製粉乳の製造においては、微生物、例えばバクテリアに由来するタンパク質分解酵素の使用が有益である。例えば、細菌酵素の製造は、効率良く且つ容易に調節できるよう容易に最適化され得る。従って、そのような酵素は、多量に及び高純度で製造され得る。また、微生物酵素の使用は、動物源からの酵素の抽出に関する、上昇する品質保証関連の困難性の克服を助けるであろう。

【0006】

本発明の 1 つの目的は、例えば食品産業において、部分使用のための新規微生物プロテアーゼを供給することであった。

【発明の概要】

【 0 0 0 7 】

発明の概要

本発明者は驚くべきことには、多くの細菌エンドペプチダーゼが膵臓トリプシンの切断特異性に非常に類似する切断特異性を有することを見出した。さらに、そのような細菌エンドペプチダーゼは、膵臓トリプシンにより得られる食用タンパク質加水分解物と類似する性質、例えば類似する程度の加水分解性及び/又は類似するペプチドスペクトルを有する食用タンパク質加水分解物を製造するために使用され得る。

【 0 0 0 8 】

本発明者はさらに、トリプリン様活性を有する新規細菌エンドペプチダーゼを同定した。

10

【 0 0 0 9 】

従って、本発明は、

(a) 配列番号 2 の成熟ポリペプチドに対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するポリペプチド；

(b) (i) 配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列、(ii) 前記配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列を含むゲノム DNA 配列、又は (iii) (i) 又は (ii) の完全長相補鎖と低緊縮条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド；

(c) 配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド；

20

(d) 配列番号 2 の成熟ポリペプチドの 1 又は 2 以上 (数個) のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入を含んで成る変異体；及び

(e) エンドペプチダーゼ活性を有する、(a) , (b) , (c) 又は (d) のポリペプチドの断片から成る群から選択された、エンドペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドに関する。

【 0 0 1 0 】

本発明はまた、ポリペプチドの製造方法にも関する。

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、タンパク質加水分解物を製造するためへのポリペプチドの使用方法にも関する。

30

【 0 0 1 2 】

別の観点によれば、本発明は、

(a) 加水分解されるべき食用タンパク質を含む溶液を供給し；

(b) 細菌由来のトリプシン様エンドペプチダーゼを前記溶液に添加し；そして

(c) 前記食用タンパク質加水分解物を得ることを含んで成る、食用タンパク質加水分解物の製造方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】図 1 は、クツネリア・アルビダ (kutzneria, albida) からのトリプシン様エンドペプチダーゼをコードする遺伝子を有する ExpVec8 のプラスミド地図を示す。

40

【図 2】図 2 は、クツネリア・アルビダ (上部トレース) 又はブタトリプシン (下部トレース) からのトリプシン様エンドペプチダーゼにより加水分解されたウシアルファラクトアルブミンの UV クロマトグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

定義

エンドペプチダーゼ活性：用語「エンドペプチダーゼ活性 (Endopeptidase activity) 」とは、ペプチドにおけるいずれかのペプチド結合を加水分解できるタンパク質分解活性を意味する。しかしながら、エンドペプチダーゼはしばしば、数個のアミノ酸への結合を包含する、及びしばしば切断部位の両側上に触媒部位を有するので、ペプチドのいずれか

50

の端からのペプチド結合を加水分解するエキソペプチダーゼに比較して、エンドペプチダーゼは一般的に、非末端ペプチド結合を好む。エンドペプチダーゼは、EC 3.4.21-25として通常分類される。本発明のためには、エンドペプチダーゼ活性は、実施例2に記載されるように、Protazyme AKアッセイを用いることにより決定される。

【0015】

本発明のポリペプチドは、配列番号2の成熟ポリペプチドの少なくとも20%、例えば少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも100%のエンドペプチダーゼ活性を有することができる。

【0016】

トリプシン様エンドペプチダーゼ：用語「トリプシン様エンドペプチダーゼ (Trypsin-like endopeptidase)」又は「トリプシン様活性を有するエンドペプチダーゼ」とは、アルギニン及び/又はリシンのL-異性体のC末端でペプチド又はタンパク質を選択的に切断するエンドペプチダーゼとして、本明細書においては定義される。好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、アルギニン又はリシンのC末端でペプチド又はタンパク質を選択的に切断する。これは、エンドペプチダーゼがいずれか他のアミノ酸の後の切断に関して有する特異性よりも、アルギニン及びリシンの両端の後の切断に関して、より高い特異性を有することを意味する。別の好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、アルギニン又はリシンのC末端側でペプチド又はタンパク質を選択的に切断する。これは、エンドペプチダーゼがいずれか他のアミノ酸の後の切断に関して有する特異性よりも、アルギニン又はリシンのいずれかの後の切断に関して、より高い特異性を有することを意味する。別の好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、アルギニンのC末端側でペプチド又はタンパク質を選択的に切断する。これは、エンドペプチダーゼがいずれか他のアミノ酸の後の切断に関して有する特異性よりも、アルギニンの後の切断に関して、より高い特異性を有することを意味する。別の好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、リシンのC末端側でペプチド又はタンパク質を選択的に切断する。これは、エンドペプチダーゼがいずれか他のアミノ酸の後の切断に関して有する特異性よりも、リシンの後の切断に関して、より高い特異性を有することを意味する。

【0017】

トリプシン比率：「トリプシン比率 (Trypsin ratio)」は、Ala、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Phe又はVal(どれが大きくとも)のいずれか1つの後の切断の場合の酵素の活性により割算された、Arg又はLys(どれが大きくとも)の後の切断の場合の酵素の活性として決定される。好ましい態様によれば、本発明のトリプシン様エンドペプチダーゼは100以上のトリプシン比率を有し、すなわち好ましい態様によれば、本発明のトリプシン様エンドペプチダーゼは、Ala、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Phe又はVal(どれが大きくとも)のいずれか1つの後の切断に対するその特異性よりも少なくとも100倍高い、Arg又はLys(どれが大きくとも)の後の切断に対する特異性を有する。トリプシン比率を決定するためのそのような活性測定は、エンドペプチダーゼの活性がそのpH最適性でエンドペプチダーゼの活性の少なくとも半分であるpH値で実施されるべきである。トリプシン比率は、本出願の実施例2に記載のようにして決定され得る。

【0018】

単離ペプチド：用語「単離ポリペプチド (isolated polypeptide)」とは、天然において見出されるようなポリペプチドに比較して人工的に修飾されるポリペプチドを意味する。1つの態様によれば、ポリペプチドは、SDS-PAGEにより決定される場合、少なくとも1%の純度、例えば少なくとも5%の純度、少なくとも10%の純度、少なくとも20%の純度、少なくとも40%の純度、少なくとも60%の純度、少なくとも80%の純度、又は少なくとも90%の純度を有する。

【0019】

実質的に純粋なポリペプチド：用語「実質的に純粋な変異体 (substantially pure variant)」とは、天然又は組換えにより混在する他のポリペプチド材料の含有率が、重量基準で最大10%、最大8%、最大6%、最大5%、最大4%、最大3%、最大2%、最大1%、または好ましくは最大0.5%である調製物を意味する。好ましくは、ポリペプチドは、調製物中の総ポリペプチド材料に対して、重量基準で少なくとも92%の純度、例えば少なくとも94%の純度、少なくとも95%の純度、少なくとも96%の純度、少なくとも97%の純度、少なくとも98%の純度、少なくとも99%、少なくとも99.5%の純度、またはもっとも好ましくは100%の純度を有する。本発明のポリペプチドは、実質的に純粋な形であることが好ましい。これは例えば、周知の組換え法や従来の精製法を用いてポリペプチドを調製することにより達成される。

10

【0020】

成熟ポリペプチド：用語「成熟ポリペプチド (mature polypeptide)」とは、翻訳及び任意の翻訳後修飾 (例えばN末端プロセッシング、C末端切断、グリコシル化、リン酸化等) を経た最終形にある、ポリペプチドを意味する。1つの態様によれば、成熟ポリペプチドは、実施例2に記載されるように、N-末端配列決定及び分子量決定に基づいて、配列番号2のアミノ酸1-225である。

【0021】

成熟ポリペプチドコーディング配列：用語「成熟ポリペプチドコーディング配列 (mature polypeptide coding sequence)」とは、エンドペプチダーゼ活性を有する成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。1つの態様によれば、成熟ポリペプチドコーディング配列は、成熟ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、配列番号1のヌクレオチド1-675であり得る。別の態様によれば、成熟ポリペプチドコーディング配列は、配列番号3のヌクレオチド82-756であり得る。

20

【0022】

配列同一性：2つのアミノ酸配列間又は2つのヌクレオチド配列間の関連性を、「配列同一性 (sequence identity)」というパラメーターで表す。

【0023】

本発明の目的においては、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度は、Needleman-Wunsch アルゴリズム (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453) を、EMBOSSパッケージ (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16:276-277) のNeedleプログラム (好ましくはバージョン2.8.0以降) で実行することにより決定される。使用される任意パラメーターは、ギャップ・オープン・ペナルティー (gap open penalty) が10、ギャップ・エクステンション・ペナルティー (gap extension penalty) が0.5であり、また、EBL62 (BLOSUM62のEMBOSSバージョン) 置換マトリックスを使用する。「最長同一性」 (longest identity) と表示されたNeedleの出力値 (-nobriefオプションを用いて得られるもの) を%同一性として使用する。これは以下の式に従い算出される：

30

$$(\text{同一残基数} \times 100) / (\text{アラインメント長} - \text{アラインメント中のギャップ総数})$$

【0024】

40

本発明の目的においては、2つのデオキシリボヌクレオチド配列間の配列同一性の程度は、Needleman-Wunsch アルゴリズム (Needleman and Wunsch, 1970, 同上) を、EMBOSSパッケージ (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, 同上) のNeedleプログラム (好ましくはバージョン3.0.0以降) で実行することにより決定される。任意パラメーターは、ギャップ・オープン・ペナルティー (gap open penalty) が10、ギャップ・エクステンション・ペナルティー (gap extension penalty) が0.5であり、また、EDNAFULL (NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン) 置換マトリックスを使用する。「最長同一性」 (longest identity) と表示されたNeedleの出力値 (-nobriefオプションを用いて得られるもの) を%同一性として使用する。これは以下の式に従い算出される：

50

(同一デオキシリボヌクレオチド数 × 1 0 0) / (アラインメント長 - アラインメント中のギャップ総数)

【 0 0 2 5 】

断片：用語「断片 (fragment) 」とは、成熟ポリペプチドのアミノ及びノ又はカルボキシル末端から 1 又は 2 以上 (数個) のアミノ酸が欠失してなるポリペプチドを意味し；ここで断片はエンドペプチダーゼ活性を有する。1つの態様によれば、断片は少なくとも 1 0 0 個のアミノ酸残基、少なくとも 1 5 0 個のアミノ酸残基、又は少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸残基を含む。

【 0 0 2 6 】

下位配列：用語「下位配列 (subsequence) 」とは、成熟ポリペプチドコーディング配列の 5 ' 及びノ又は 3 ' 末端から 1 又は 2 以上 (数個) のヌクレオチドが欠失してなるポリヌクレオチドを意味し；ここで下位配列はエンドペプチダーゼ活性を有する断片をコードする。1つの態様によれば、下位配列は少なくとも 3 0 0 個のヌクレオチド、例えば少なくとも 4 0 0 個のヌクレオチド、少なくとも 5 0 0 個のヌクレオチド又は少なくとも 6 0 0 個のヌクレオチドを含む。

【 0 0 2 7 】

対立遺伝子変異体：用語「対立遺伝子変異体 (allelic variant) 」とは、同一の染色体座を占める一遺伝子の複数形態のいずれかを意味する。対立遺伝子変異は自然界において突然変異により生じ、そして個体集団内に多型をもたらすことができる。遺伝子の突然変異はサイレントであり (コードされるポリペプチドは変化しない) 、そして変更されたアミノ酸を有するポリペプチドをコードすることができる。ポリペプチドの対立遺伝子変異体とは、遺伝子の対立遺伝子変異体によりコードされるポリペプチドである。

【 0 0 2 8 】

単離ポリヌクレオチド：用語「単離ポリヌクレオチド (isolated polynucleotide) 」とは、天然において見出されるようなポリヌクレオチドに比較して人工的に修飾されるポリヌクレオチドを意味する。1つの態様によれば、前記単離ポリヌクレオチドは、アガロース電気泳動により決定される純度において、少なくとも 1 % の純度、例えば少なくとも 5 % の純度、好ましくは少なくとも 1 0 % の純度、少なくとも 2 0 % の純度、少なくとも 4 0 % の純度、少なくとも 6 0 % の純度、少なくとも 8 0 % の純度、少なくとも 9 0 % の純度、またはより好ましくは少なくとも 9 5 % の純度を有する。ポリヌクレオチドは、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、合成の何れに由来するものでもよく、これらの任意の組み合わせでもよい。

【 0 0 2 9 】

実質的に純粋なポリヌクレオチド：用語「実質的に純粋なポリヌクレオチド (substantially pure polynucleotide) 」とは、他の外因性又は不所望のヌクレオチドを含まず、遺伝子組換えポリペプチド生産系における使用に適した形にあるポリヌクレオチド調製物を意味する。従って、実質的に純粋なポリヌクレオチドは、天然又は組換えにより混在する他のポリペプチド材料の含量が、重量基準で最大 1 0 % 、最大 8 % 、最大 6 % 、最大 5 % 、最大 4 % 、最大 3 % 、最大 2 % 、最大 1 % 、又は最大 0 . 5 % である。しかしながら、実質的に純粋なポリヌクレオチドは、天然の 5 ' 及び 3 ' 非翻訳領域、例えばプロモーター及びターミネーターを含んでいてもよい。好ましくは、ポリヌクレオチドは、重量基準で少なくとも 9 0 % の純度、たとえば少なくとも 9 2 % の純度、少なくとも 9 4 % の純度、少なくとも 9 5 % の純度、少なくとも 9 6 % の純度、少なくとも 9 7 % の純度、少なくとも 9 8 % の純度、少なくとも 9 9 % の純度、又は少なくとも 9 9 . 5 % の純度を有する。本発明のポリヌクレオチドは、実質的に純粋な形であることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

コーディング配列：用語「コーディング配列 (coding sequence) 」とは、そのポリペプチドのアミノ酸配列を直接規定するポリヌクレオチドを意味する。コーディング配列の境界は通常、オープン・リーディング・フレーム (open reading frame) により画定される。オープン・リーディング・フレームは通常、A T G 開始コドン、又は G T G や T T G

10

20

30

40

50

等の代替開始コドンから開始し、TAA、TAG、TGA等の停止コドンで停止する。コーディング配列は、DNA、cDNA、合成、組換えポリヌクレオチドの何れでもよい。

【0031】

cDNA：用語「cDNA」とは、真核細胞から得られるスプライス後の成熟mRNA分子から逆転写により調製されるDNA分子を意味する。cDNAは、対応するゲノムDNA中に通常存在するイントロン配列を有さない。初期一次RNA転写物がmRNAの前駆体となり、これが一連の処理工程を経て、最終的にスプライス後の成熟mRNAを生じる。

【0032】

核酸コンストラクト：用語「核酸コンストラクト(nucleic acid construct)」とは、天然遺伝子から単離され、又は天然では存在しない核酸のセグメントを含むように修飾され、又は合成された、一本鎖又は二本鎖の核酸分子を意味する。核酸コンストラクトが本発明のコーディング配列の発現に必要な調節配列を含む場合、用語核酸コンストラクトは「発現カセット(expression cassette)」と同義となる。

【0033】

調節配列：用語「調節配列(control sequence)」とは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現に必要な全ての構成要素を意味する。各調節配列は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して同種でも外来でもよく、互いに同種でも外来でもよい。そのような調節配列としては、これらに限定されるものではないが、リーダー、ポリアダニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列、及び転写ターミネーターが挙げられる。少なくとも、調節配列はプロモーターと、転写及び翻訳停止シグナルとを含む。特定の制限部位を導入する目的で、調節配列にリンカーを付加してもよい。これにより前記調節配列と、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコーディング領域との連結が容易になる。

【0034】

作動可能に連結された：用語「作動可能に連結された(operably linked)」とは、ポリペプチドのコーディング配列が調節配列により発現されるように、調節配列がポリヌクレオチド配列のコーディング配列に対して適切な位置に配置された構成を意味する。

【0035】

発現：「発現」(expression)とは、ポリペプチドの産生に関与する任意の段階を意味し、ここで段階としては、これらに制限されるものではないが、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌が挙げられる。

【0036】

発現ベクター：用語「発現ベクター(expression vector)」とは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むとともに、その発現を可能とする更なるヌクレオチドと操作可能的に連結された、線状又は環状DNA分子を意味する。

【0037】

宿主細胞：用語「宿主細胞(host cell)」とは、本発明のポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクト又は発現ベクターにより形質転換、トランスフェクション、形質導入等が可能な任意の細胞型を意味する。用語「宿主細胞」とは、親細胞の任意の子孫であって、複製時に生じた突然変異により親細胞とは同一ではなくなったものも含まれる。

【0038】

変異体：用語「変異体(variant)」とは、1つの変異、すなわち1又は2以上(数個)の位置での1又は2以上(数個)のアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失を含んで成る、エンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチドを意味する。置換とは、1つの位置を占めるアミノ酸の異なったアミノ酸による置換を意味し；欠失とは、1つの位置を占めるアミノ酸の除去を意味し；そして挿入とは、1つの位置を占めるアミノ酸に隣接する1~3個のアミノ酸の付加を意味する。

【0039】

エンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチド：

10

20

30

40

50

ポリペプチド：

本発明は、

(a) 配列番号 2 の成熟ポリペプチドに対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するポリペプチド；

(b) (i) 配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列、(ii) 前記配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列を含むゲノム DNA 配列、又は (iii) (i) 又は (ii) の完全長相補鎖と低緊縮条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド；

(c) 配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列に対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド；

(d) 配列番号 2 の成熟ポリペプチドの 1 又は 2 以上 (数個) のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入を含んで成る変異体；及び

(e) エンドペプチダーゼ活性を有する、(a)、(b)、(c) 又は (d) のポリペプチドの断片から成る群から選択された、エンドペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドに関する。

【0040】

本発明は、配列番号 2 の成熟ポリペプチドに対して、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は 100 % の配列同一性を有する単離ポリペプチド (エンドペプチダーゼ活性を有する) に関する。

1 つの態様によれば、ポリペプチドは、配列番号 2 の成熟ポリペプチドとは、10 個以下のアミノ酸、例えば 5 個のアミノ酸、4 個のアミノ酸、3 個のアミノ酸、2 個のアミノ酸又は 1 個のアミノ酸、異なる。

【0041】

本発明のポリペプチドは、好ましくは配列番号 2 のアミノ酸配列又はその対立遺伝子変異体を含むか又は成り；又はエンドペプチダーゼ活性を有するその断片である。別の態様によれば、ポリペプチドは配列番号 2 の成熟ポリペプチドを含むか又は成る。別の好ましい態様によれば、ポリペプチドは配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 225 を含むか又は成る。

【0042】

本発明はまた、(i) 配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列、(ii) 前記配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列を含むゲノム DNA 配列、又は (iii) (i) 又は (ii) の完全長相補鎖と、非常に低い緊縮条件、低緊縮条件、中位の緊縮条件、中位 ~ 高い緊縮条件、高緊縮条件又は非常に高い緊縮条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、エンドペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドにも関する (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York)。

【0043】

配列番号 1 のポリヌクレオチド又はその下位配列、及び配列番号 2 のアミノ酸配列又はその断片は、当業界において良く知られている方法に従って、異なった属又は種の株からのエンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA を同定し、そしてクローン化するための核酸プローブを企画するために使用され得る。特に、そのようなプローブは、そこにおける対応する遺伝子を同定し、そして単離するために、標準のサザンブロット方法に従って、興味ある属又は種のゲノム又は cDNA とのハイブリダイゼーションのために使用され得る。そのようなプローブは、完全な配列よりも相当に短い、しかし少なくとも 14 個、例えば少なくとも 25 個、少なくとも 35 個、又は少なくとも 70 個の長さのヌクレオチドであるべきである。好ましくは、核酸プローブは少なくとも 100 個の長さのヌクレオチド、例えば、少なくとも 200 個の長さのヌクレオチド、少なくとも 300 個の長さのヌクレオチド、少なくとも 400 個の長さのヌクレオチド、少なくとも 500 個の長さのヌクレオチド又は少なくとも 600 個の長さのヌクレオチドである。DNA 及び RNA の両プローブが使用され得る。プローブは典型的には、対応する遺伝子

を検出するためにラベルされる（例えば、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、ビオチン、又はアビジンにより）。そのようなプローブは、本発明により包含される。

【0044】

そのような他の株から調製されたゲノムDNA又はcDNAライブラリーは、上記に記載されるプローブとハイブリダイズし、そしてエンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAについてスクリーンされ得る。そのような他の株からのゲノム又は他のDNAは、アガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動、又は他の分離技法により分離され得る。ライブラリーからのDNA又は分離されたDNAが、ニトロセルロース又は他の適切な担体材料に移行され、そしてその上に固定され得る。配列番号1と相同であるクローン又はDNA、又はその下位配列を同定するためには、担体材料がサザンブロットに使用

10

【0045】

本発明のためには、ハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチドが、非常に低い～非常に高い緊縮条件下で、配列番号1の成熟ポリペプチドコーディング配列；配列番号1の成熟ポリペプチドコーディング配列を含むゲノムDNA配列；その完全長相補的鎖；又はその下位配列に対応するラベルにされた核酸プローブにハイブリダイズすることを示す。核酸プローブがそれらの条件下でハイブリダイズする分子は、X-線フィルムを用いて検出される。

【0046】

1つの態様によれば、核酸プローブは、配列番号1の成熟ポリペプチドコーディング配列である。別の態様によれば、核酸プローブは、配列番号1のヌクレオチド1-200、ヌクレオチド201-400、ヌクレオチド401-600、又はヌクレオチド401-625である。別の態様によれば、核酸プローブは、配列番号2のポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドである。別の態様によれば、核酸プローブは、E.コリDSM23706に含まれるプラスミドExpVec8に含まれるポリヌクレオチドであり、ここで前記ポリヌクレオチドはエンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。別の態様によれば、核酸プローブは、E.コリDSM23706に含まれるプラスミドExpVec8に含まれる成熟ポリペプチドコーディング領域である。

20

【0047】

少なくとも100個の長さのヌクレオチドの長さの長いプローブに関して、非常に低い～非常に高い緊縮条件は、最適には12～24時間の標準のサザンブロット方法に従っての、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $0.3\%\text{SDS}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の剪断され、そして変性されたサケ精子DNA、及び25%ホルムアミド（非常に低い及び低い緊縮に関して）、35%ホルムアミド（中位及び中-高緊縮に関して）、又は50%ホルムアミド（高い及び非常に高い緊縮に関して）における42℃でのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションとして定義される。担体材料は最終的に、 $2\times\text{SSC}$ 、 $0.2\%\text{SDS}$ 溶液を用いて、45℃（非常に低い緊縮）、50℃（低い緊縮）、55℃（中位の高い緊縮）、60℃（中くらいに高い緊縮）、65℃（高い緊縮）及び70℃（非常に高い緊縮）で、それぞれ15分間、3度洗浄される。

30

【0048】

約15個～約70個の長さのヌクレオチドである短いプローブに関しては、緊縮条件は、 0.9M のNaCl、 0.09M のトリス-HCl、 $\text{pH}7.6$ 、 6mM のEDTA、 0.5 のNP-40、 $1\times\text{Denhardt}$ 's溶液、 1mM のピロリン酸ナトリウム、 1mM の一塩基性リン酸ナトリウム、 0.1mM のATP及び 0.2mg の酵母RNA（ ml 当たり）における、Bolton and McCarthy（1962、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48: 1390）に従って計算された T_m よりも約5℃～約10℃低い温度での、最適には12～24時間の標準のサザンブロット方法に従ってのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションとして定義される。担体材料は、 $6\times\text{SSC}$ 及び $0.1\%\text{SDS}$ により15分間、1度、及び $6\times\text{SSC}$ を用いて、計算された T_m よりも約5℃～約10℃低い温度でそれぞれ15分間、2度、洗浄される。

40

【0049】

50

本発明はまた、配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列に対して、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされる、エンドペプチダーゼ活性を有する単離ポリペプチドにも関する。

【0050】

本発明はまた、配列番号 2 の成熟ポリペプチド又はその相同配列の 1 又は 2 以上（数個）のアミノ酸の置換、欠失及び／又は挿入を含む変異体にも関する。好ましくは、アミノ酸変更は、タンパク質の折りたたみ及び／又は活性に実質的に影響を及ぼさない保存的アミノ酸置換又は挿入；典型的には 1 ～ 約 30 個のアミノ酸の小さな欠失；小さなアミノ - 又はカルボキシル - 末端延長、例えばアミノ末端メチオニン残基の延長；約 20 ～ 25 個までの残基の小さなリンカーペプチドの延長；又は実効電荷又は他の機能、例えばポリヒスチジン系、抗原性エピトープ又は結合ドメインを変えることにより精製を促進する小さな延長であるマイナーな性質のものである。

【0051】

保存的置換の例は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リシン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン及びメチオニン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、及び小さなアミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、及びトレオニン）のグループ内である。一般的に、非活性を変更しないアミノ酸置換は当業界において知られており、そしてたとえば、H. Neurath and R.L. Hill, 1979, *The Proteins*, Academic Press, New York により記載されている。最も通常生じる交換は次のものである：Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 及び Asp/Gly 並びにそれらの逆。

【0052】

他方では、アミノ酸変化は、ポリペプチドの生理化学的性質が変更されるような性質のものである。例えば、アミノ酸変化は、ポリペプチドの熱安定性を改良し、基質変異性を変更し、pH 最適性を変え、そして同様のことをする。

【0053】

親ポリペプチドにおける必須アミノ酸は、当業界において知られている方法、例えば特定部位の突然変異誘発、又はアラニン - 走査突然変異誘発に従って同定され得る（Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085, 1989）。後者の技法においては、単一のアラニンの突然変異が分子におけるあらゆる残基に導入され、そして得られる変異体分子が、分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、エンドペプチダーゼ活性、好ましくは、トリプシン様エンドペプチダーゼについて試験される。また、Hilton など., *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708, 1996 を参照のこと。酵素の活性部位又は他の生物学的相互作用はまた、推定上の接触部位アミノ酸の突然変異に関して、核磁気共鳴、結晶学、電子回折、又は光親和性ラベリングのような技法により決定されるように、構造の物理的分析によっても決定され得る。例えば、de Vos など., *Science* 255: 306-312, 1992; Smith など., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904, 1992; Wlodaver など., *FEBS Lett.* 309: 59-64, 1992 を参照のこと。必須アミノ酸の本体はまた、本発明のポリペプチドに関連するポリペプチドとの同一性の分析からも推定され得る。

【0054】

単一又は多重のアミノ酸置換、欠失、及び／又は挿入を形成・検証するには、公知の突然変異誘発法、組換え、及び／又はシャッフリングを用いた後、適切なスクリーニング法、例えば Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241:53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156; 国際公開第 95 / 17413 号; 又は国際公開第 95 / 22625 号等の開示の手法を用いればよい。他の使用可能な方法として

は、error-prone PCR、ファージ・ディスプレイ (phage display) (例えば Lowman et al., 1991, Biochem. 30:10832-10837; 米国特許第 5, 223, 409 号; 国際公開第 92/06204 号等) 及び領域特異的突然変異誘発法 (Derbyshire et al., 1986, Gene 46:145; Ner et al., 1988, DNA 7:127) 等が挙げられる。

【0055】

突然変異誘発法/シャッフリング法をハイスループット自動スクリーニング法と組み合わせることにより、宿主細胞により発現されるクローン化突然変異ポリペプチドの活性を検出することが可能となる (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896)。当業界の標準法により、活性ポリペプチドをコードする突然変異 DNA 分子を宿主細胞から回収し、即時に配列決定することができる。これらの手法により、ポリペプチドにおける個々のアミノ酸残基の重要性を、迅速に決定することが可能となる。

10

【0056】

配列番号 2 の成熟ポリペプチドのアミノ酸置換、欠失及び/又は挿入の合計数は、10 以下、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8 又は 9 である。

【0057】

ポリペプチドは、1つのポリペプチドの一部が別のポリペプチドの一部の N - 末端又は C - 末端で融合されているハイブリッドポリペプチドであり得る。

【0058】

ポリペプチドは、別のポリペプチドが発明のポリペプチドの N - 末端又は C - 末端で融合されている、融合されたポリペプチド又は切断できる融合ポリペプチドであり得る。融合されたポリペプチドは、本発明のポリヌクレオチドにもう 1つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを融合することにより生成される。融合ポリペプチドを生成するための技法は、当業界において知られており、そしてポリペプチドをコードするコード配列を、それらが整合して存在し、そして融合されたポリペプチドの発現が同じプロモーター及びターミネーターの制御下にあるよう連結することを包含する。融合タンパク質はまた、融合が後翻訳的に創造されるインテイン技法を用いて構成され得る (Cooper など., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson など., 1994, Science 266: 776-779)。

20

【0059】

さらに融合ポリペプチドは、2種のポリペプチド間に切断部位を含むことができる。融合タンパク質の分泌に基づいて、前記部位が切断され、2種のポリペプチドが開放される。切断部位の例は、Martin など., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3 : 568-576; Svetina など., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson など., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63 : 3488-3493; Ward など., 1995, Biotechnology 13 : 498-503; Contreras など., 1991, Biotechnology 9 : 378-381; Eaton など., 1986, Biochemistry 25 : 505-512; Collins-Racie など., 1995, Biotechnology 13 : 982-987; Carter など., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; 及び Stevens, 2003, Drug Discovery World 4 : 35-48に開示される部位を包含するが、但しそれらだけに限定されない。

30

【0060】

好ましくは、本発明のポリペプチドはトリプシン様エンドペプチダーゼである。

40

【0061】

エンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチド源：

本発明のエンドペプチダーゼ活性を有するポリペプチドは、いずれかの属の微生物から得られる。本発明のためには、用語「～から得られる (obtained from)」とは、所定の源に関して本明細書において使用される場合、ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが前記源により、又はその源からのヌクレオチド配列が挿入されている細胞により生成されることを意味する。1つの態様によれば、所定の源から得られるポリペプチドは細胞外に分泌される。

【0062】

ポリペプチドは、細菌ポリペプチドである。例えば、ポリペプチドは、グラム陽性細菌

50

ポリペプチド、例えばエンドペプチダーゼ活性を有する、アクチノシンネマ (*Actinocynnema*)、バチルス (*Bacillus*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、エンテロコカス (*Enterococcus*)、ゲオバチルス (*Geobacillus*)、クリベラ (*Kribbella*)、クツネリア (*Kutzneria*)、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)、ラクトコカス (*Lactococcus*)、オセアノバチルス (*Oceanobacillus*)、スタフィロコカス (*Staphylococcus*)、ストレプトコカス (*Streptococcus*)、又はストレプトミセス (*Streptomyces*) ポリペプチド、又はグラム陰性細胞ポリペプチド、例えばカンピロバクター (*Campylobacter*)、E. コリ (*E. coli*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*)、フソバクテリウム (*Fusobacterium*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*)、イリオバクター (*Ilyobacter*)、ネイセリア (*Neisseria*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、サルモネラ (*Salmonella*) 又はウレアプラズマ (*Ureaplasma*) ポリペプチドであり得る。

10

【 0 0 6 3 】

1つの態様によれば、ポリペプチドは、バチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・クラウジ (*Bacillus clausii*)、バチルス・コアギュランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・ラウタス (*Bacillus lautus*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウス (*Bacillus megaterium*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 又はバチルス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) ポリペプチドである。

20

【 0 0 6 4 】

別の態様によれば、ポリペプチドは、ストレプトコカス・エクイシミリス (*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコカス・ウベリス (*Streptococcus uberis*)、又はストレプトコカス・エクイ subsp. ゼオエピデミカス (*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*) ポリペプチドである。

【 0 0 6 5 】

別の態様によれば、ポリペプチドは、ストレプトミセス・アクロモゲネス (*Streptomyces achromogenes*)、ストレプトミセス・アベルミチリス (*Streptomyces avermitilis*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) 又はストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) ポリペプチドである。

30

【 0 0 6 6 】

ポリペプチドはまた、菌類ポリペプチドでもあり得る。例えば、ポリペプチドは、酵母ポリペプチド、例えばカンジダ (*Candida*)、クルイペロミセス (*Kluyveromyces*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*)、又はヤロウイア (*Yarrowia*) ポリペプチド、又はアクレモニウム (*Acremonium*)、アガリカス (*Agaricus*)、アルターナリア (*Alternaria*)、アスペルギラス (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*)、ボツリオススパエリア (*Botryosphaeria*)、セリポリオプシス (*Ceriporiopsis*)、カエトミジウム (*Chaetomidium*)、クリソスポリウム (*Chrysosporium*)、クラビセプス (*Claviceps*)、コクリオボラス (*Cochliobolus*)、コプリノプシス (*Coprinospora*)、コプトテルメス (*Coptotermes*)、コリナスカス (*Corynascus*)、クリホネクトリア (*Cryphonectria*)、クリプトコカス (*Cryptococcus*)、ジプロジア (*Diplodia*)、エクシジア (*Exidia*)、フィリバシジウム (*Filibasidium*)、フサリウム (*Fusarium*)、ギベレラ (*Gibberella*)、ホロマスチゴトイデス (*Holomastigotoides*)、ヒューミコラ (*Humicola*)、イルペクス (*Irpex*)、レンチヌラ (*Lentinula*)、レプトスパエリア (*Leptosphaeria*)、マグナポリス (*Magnaporthe*)、メラノカルパス (*Melanocarpus*)、メリピラス (*Meripilus*)、ムコル (*Mucor*)、ミセリオプソ

40

50

ラ (*Myceliophthora*)、ネオカノマスチックス (*Neocallimastix*)、ネウロスボラ (*Neurospora*)、パエシロミセス (*Paecilomyces*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、ファネロカエテ (*Phanerochaete*)、ピロミセス (*Piromyces*)、ポイトラシア (*Poitrasia*)、シュードプレクタニア (*Pseudoplectania*)、シュードトリコニンファ (*Pseudotrichonympha*)、リゾムコル (*Rhizomucor*)、シゾフィラム (*Schizophyllum*)、シタリジウム (*Scytalidium*)、タラロミセス (*Talaromyces*)、サーモアスカス (*Thermoascus*)、チエラビア (*Thielavia*)、トリポクラジウム (*Tolypocladium*)、トリコダーマ (*Trichoderma*)、トリコファエア (*Trichophaea*)、ベルチシリウム (*Verticillium*)、ボルバリエラ (*Volvariella*) 又はキシラリア (*Xylaria*) ポリペプチドである。

【 0 0 6 7 】

10

別の態様によれば、ポリペプチドは、サッカロミセス・カルスベルゲンシス (*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ジアスタチカス (*Saccharomyces diastaticus*)、サッカロミセス・ドウグラシ (*Saccharomyces douglasii*)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロミセス・ノルベンシス (*Saccharomyces norbensis*) 又はサッカロミセス・オビホルミス (*Saccharomyces oviformis*) ポリペプチドである。

【 0 0 6 8 】

別の態様によれば、ポリペプチドは、アクレモニウム・セルロリチカス (*Acremonium cellulolyticus*)、アスペルギラス・アキュレアタス (*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギラス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギラス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギラス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギラス・ホエチダス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギラス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギラス・ニジュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギラス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、クリソスポリウム・イノプス (*Chrysosporium inops*)、クリソスポリウム・カラチノフィラム (*Chrysosporium keratinophilum*)、クリソスポリウム・ルクノウエンセ (*Chrysosporium lucknowense*)、クリソスポリウム・メルダリウム (*Chrysosporium merdarium*)、クリソスポリウム・パンニコラ (*Chrysosporium pannicola*)、クリソスポリウム・クイーンズランジカム (*Chrysosporium queenslandicum*)、クリソスポリウム・イノプス (*Chrysosporium tropicum*)、クリソスポリウム・ゾナタム (*Chrysosporium zonatum*)、フサリウム・バクトリジオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フサリウム・セラリス (*Fusarium cerealis*)、フサリウム・クロックウェレンズ (*Fusarium crookwellense*)、フサリウム・クルモラム (*Fusarium culmorum*)、フサリウム・グラミネアラム (*Fusarium graminearum*)、フサリウム・グラミン (*Fusarium graminum*)、フサリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*)、フサリウム・ネグンジ (*Fusarium negundi*)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フサリウム・レチキュラタム (*Fusarium reticulatum*)、フサリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)、フサリウム・サムブシウム (*Fusarium sambucinum*)、フサリウム・サルコクロウム (*Fusarium sarcochromum*)、フサリウム・スポロトリキオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、フサリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フサリウム・トルロサム (*Fusarium torulosa*)、フサリウム・トリコセシオイデス (*Fusarium trichothecioides*)、フサリウム・ベネナタム (*Fusarium venenatum*)、ヒュミコラ・グリセア (*Humicola grisea*)、ヒュミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、ヒュミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*)、イレペクス・ラクテウス (*Irpelex lacteus*)、ムコル・ミエヘイ (*Mucor miehei*)、ミセリオブラソ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、ネウロスボラ・クラサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・フニコロサム (*Penicillium funiculosum*)、ペニシリウム・プルプロゲナム (*Penicillium purpurogenum*)、ファネロカエテ・キソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*)、チエラビア・アクロマチカ (*Thielavia achromatica*)、チエラビア・アルボミセス (*Thielavia albomyces*)、チエラビア・アルボピロラ (*Thielavia albopilosa*)、チエラビア・オウストラレインシス (*Thielavia*

20

30

40

50

australeinsis)、チエラビア・フィメチ (*Thielavia fimeti*)、チエラビア・ミクロスポラ (*Thielavia microspora*)、チエラビア・オビスポラ (*Thielavia ovispora*)、チエラビア・ペルビアナ (*Thielavia peruviana*)、チエラビア・セトサ (*Thielavia setosa*)、チエラビア・スペデドニウム (*Thielavia spededonium*)、チエラビア・サブサーモフィラ (*Thielavia subthermophila*)、チエラビア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、トリコダーマ・ハルジアナル (*Trichoderma harzianum*)、トリコダーマ・コニング (*Trichoderma koningii*)、トリコダーマ・ロンジブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコダーマ・レセイ (*Trichoderma reesei*)、又はトリコダーマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) ポリペプチドである。

【0069】

10

好ましい態様によれば、ポリペプチドは、クツネリアポリペプチド、例えばクツネリア・アルビダから得られるポリペプチド、例えばクルネリア・アルビダ ATCC 25243 (ATCC 培養物寄託所から入手できる) から得られるポリペプチドである。

【0070】

前述の種に関しては、本発明は完全及び不完全状態の両者、及び他の分類学的同等物、例えばアナモルフを、それらが知られている種の名称にかかわらず、包含することが理解されるであろう。当業者は適切な同等物の正体を容易に理解するであろう。

【0071】

それらの種の株は、次の多くの培養物寄託所から容易に入手できる：American Type Culture Collection (ATCC)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM)、Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) 及び Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL)。

20

【0072】

ポリペプチドは、他の源、例えば天然源 (例えば、土壌、堆肥、水、等) から単離された微生物から、上記プローブを用いて、同定され、そして得られる。天然の生息地から微生物を単離する技法は当業界において良く知られている。次に、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、別の微生物のゲノム又はcDNAライブラリー又は混合されたDNAサンプルを同様にスクリーニングすることによって得られる。ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがプローブにより検出されると、そのポリヌクレオチドは当業者に知られている技法を用いることによって単離され、又はクローン化され得る (例えば、Sambrook, et al, 1989, 上記を参照のこと)。

30

【0073】

核酸コンストラクト：

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、これと操作可能的に連結された1又は2以上の調節配列とを含む核酸コンストラクトであって、適切な宿主細胞中において、調節配列に適合する条件下、前記調節配列により前記コーディング配列が発現されるような核酸コンストラクトにも関する。

【0074】

ポリペプチドの発現を可能とするべく、当該ポリヌクレオチドを、種々の手法により操作してもよい。発現ベクターによっては、ベクターへの挿入前にポリヌクレオチドを操作することが好適又は必要な場合がある。組換えDNA法を用いてポリヌクレオチドを修飾する手法は、当業者には周知である。

40

【0075】

調節配列としては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現のために宿主細胞に認識される、プロモーター配列が挙げられる。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を媒介する転写調節配列を含む。プロモーターは、選択された宿主細胞内で転写活性を示すものであれば、如何なるポリヌクレオチドであってもよく、突然変異型、切断型、ハイブリッド型等のプロモーターであってもよく、そして宿主細胞に対して同種又は異種の細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から取得されたものでも良い。

50

【 0 0 7 6 】

細菌宿主細胞において本発明の核酸コンストラクトの転写を引き起こすのに適したプロモーターの例としては、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) - アミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、バシラス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) - アミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、バシラス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、バチルス・ステアロテルモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) マルトース生成アミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) レバンスクラールゼ遺伝子 (*sacB*)、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) *xylA* 及び *xylB* 遺伝子、大腸菌 (*E. coli*) 乳糖オペロン (*lac operon*)、ストレプトミセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) アガラーゼ遺伝子 (*dagA*)、及び原核 - ラクタマーゼ遺伝子 (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:3727-3731) 由来のプロモーター、並びに *tac* プロモーター (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25) が挙げられる。更なるプロモーターは "Useful proteins from recombinant bacteria", Scientific American, 1980, 242:74-94; 及び Sambrook et al., 1989 (同上) に記載されている。

【 0 0 7 7 】

糸状菌宿主細胞において本発明の核酸コンストラクトの転写を引き起こすのに適したプロモーターの例としては、アスペルギルス・ニズランス (*Aspergillus nidulans*) アセトアミダーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 中性 - アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 酸安定 - アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 又はアスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) グルコアミラーゼ (*glaA*)、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKA アミラーゼ、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) トリオースリン酸イソメラーゼ、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) トリブシン様プロテアーゼ (国際公開第 9 6 / 0 0 7 8 7 号)、フザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*) アミログルコシダーゼ (国際公開第 0 0 / 5 6 9 0 0 号)、フザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*) Daria (国際公開第 0 0 / 5 6 9 0 0 号)、フザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*) Quinn (国際公開第 0 0 / 5 6 9 0 0 号)、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) - グルコシダーゼ、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) セロピオヒドロラーゼ I、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) セロピオヒドロラーゼ II、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) エンドグルカナーゼ I、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) エンドグルカナーゼ II、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) エンドグルカナーゼ III、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) エンドグルカナーゼ IV、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) エンドグルカナーゼ V、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) キシラナーゼ I、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) キシラナーゼ II、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) - キシロシダーゼ由来のプロモーター、並びに NA2-tpi プロモーター (アスペルギラスにおける中性 - アミラーゼをコードする遺伝子を含む修飾されたプロモーター、前記アスペルギラスにおいては、未翻訳リーダーがアスペルギラスにおけるトリオ - スリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子からの未翻訳リーダーにより置換されており; 非制限的例としては、アスペルギラス・ニガーにおける中性 - アミラーゼをコードする遺伝子を含む修飾されたプロモーターを挙げることができ、前記アスペルギラス・ニガーにおいては、未翻訳リーダーがアスペルギラス・ニジュランス又はアスペルギラス・オリザエにおけるトリオースリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子からの未翻訳リーダーにより置換されている); 並びにこれらの突然変異型、切断型、ハイブリッド型プロモーターが挙げられる。

【 0 0 7 8 】

酵母宿主の場合、有用なプロモーターとしては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) エノラーゼ (ENO-1)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) ガラクトキナーゼ (GAL1)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) アルコール デヒドロゲナーゼ / グリセロアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH1、ADH2 / GAP)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) メタロチオネイン (CUP1)、及びサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ由来のプロモーターが挙げられる。酵母宿主細胞に有用な他のプロモーターは、Romanos et al., 1992, *Yeast* 8:423-488 に記載されている。

10

【0079】

調節配列としては、転写を停止するために宿主細胞に認識される、適切な転写ターミネーター配列も挙げられる。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの3'末端に作動可能に連結される。本発明では、選択された宿主細胞において機能し得る任意のターミネーターを使用することができる。

【0080】

糸状菌宿主細胞の場合、ターミネーターとしては、アスペルギルス・ニズランス (*Aspergillus nidulans*) アントラニル酸シンターゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) - グルコシダーゼ、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKA アミラーゼ、及びフザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) トリプシン様プロテアーゼ由来のターミネーターが好ましい。

20

【0081】

酵母宿主細胞の場合、ターミネーターとしては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) エノラーゼ、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) シトクロームC (CYC1)、及びサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) グリセロアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ由来のターミネーターが好ましい。酵母宿主細胞に有用な他のターミネーターは、Romanos et al., 1992 (同上) に記載されている。

【0082】

調節配列としては、適切なリーダー配列も挙げられる。リーダー配列は、転写される場合、宿主細胞による翻訳に重要であるmRNAの非翻訳領域である。リーダー配列は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'末端に作動可能に連結される。選択された宿主細胞において機能し得る任意のリーダー配列を使用することができる。

30

【0083】

糸状菌宿主細胞の場合、リーダー配列としては、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKA アミラーゼ、及びアスペルギルス・ニズランス (*Aspergillus nidulans*) トリオースリン酸イソメラーゼ由来のリーダー配列が好ましい。

【0084】

酵母宿主細胞に適したリーダー配列としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) エノラーゼ (ENO-1)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) - 因子、及びサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) アルコールデヒドロゲナーゼ / グリセロアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH2/GAP) 由来のリーダー配列が挙げられる。

40

【0085】

調節配列としては、ポリアデニル化配列、ポリヌクレオチドの3'末端に作動可能に連結される配列、転写時に宿主細胞によって、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するシグナルとして認識される。本発明では、選択された宿主細胞において機能し得る任意のポリアデニル化配列を使用することができる。

50

【 0 0 8 6 】

調節配列としては、ポリアデニル化配列も挙げられる。ポリアデニル化配列は、ポポリヌクレオチドの3'末端に操作可能に連結され、転写時に宿主細胞によって、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するシグナルとして認識される。選択された宿主細胞において機能し得る任意のポリアデニル化配列を使用することができる。

【 0 0 8 7 】

糸状菌宿主細胞の場合、ポリアデニル化配列としては、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKA アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニズランス (*Aspergillus nidulans*) アントラニル酸シンターゼ、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) トリプシン様プロテアーゼ、及びアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) - グルコシダーゼ由来のポリアデニル化配列が好ましい。

10

【 0 0 8 8 】

酵母宿主細胞において有用なポリアデニル化配列は、Guo and Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15:5983-5990 に記載されている。

【 0 0 8 9 】

調節配列はまた、ポリペプチドのN-末端に連結されるシグナルペプチドをコードし、そして前記ポリペプチドを細胞の分泌経路に誘導するシグナルペプチドコーディング領域でもあり得る。ポリヌクレオチドのコーディング配列の5'末端は、翻訳リーディングフレーム内において、前記ポリペプチドをコードするコーディング配列のセグメントと当初から連結された、固有のシグナルペプチドコーディング配列を有していてもよい。他方では、コーディング配列の5'末端は、コーディング配列に対して外来のシグナルペプチドコーディング配列を有していてもよい。外来のシグナルペプチドコーディング配列が必要となるのは、例えば、コーディング配列が生来のシグナルペプチドコーディング配列を有さない場合である。他方では、ポリペプチドの分泌を促進するために、外来のシグナルペプチドコーディング配列により、生来のシグナルペプチドコーディング配列をそのまま置換してもよい。しかしながら、発現されたポリペプチドを選択された宿主細胞の分泌経路に誘導し得るものであれば、任意のシグナルペプチドコーディング配列を使用できる。

20

【 0 0 9 0 】

細菌宿主細胞において有効なシグナルペプチドコーディング配列としては、バチルスNCIB 11837マルトース生成アミラーゼ、バチルス・リケニホルミスサブチリシン、バチルス・リケニホルミス - ラクタマーゼ、バチルス・ステアロサーモフィラス - アミラーゼ、バチルス・ステアロサーモフィラス中性プロテアーゼ (nprT、nprS、NprM) 及びバチルス・サブチリスprS A由来の配列が挙げられる。

30

【 0 0 9 1 】

糸状菌宿主細胞において有効なシグナルペプチドコーディング配列としては、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 中性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼ、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKA アミラーゼ、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) セルラーゼ、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) エンドグルカナーゼV、フミコラ・ランギノサ (*Humicola lanuginosa*) リパーゼ及びリゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ由来の配列が挙げられる。

40

【 0 0 9 2 】

酵母宿主細胞において有用なシグナルペプチドとしては、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) - 因子及びサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) インベルターゼが挙げられる。他の有用なシグナルペプチドコーディング配列は、Romanos et al., 1992 (同上) に記載されている。

【 0 0 9 3 】

調節配列としては、ポリペプチドのN-末端に位置するプロペプチドをコードするプロペプチドコーディング配列も挙げられる。得られるポリペプチドは酵素前駆体 (proenzym

50

e) 又はプロポリペプチド (propolypeptide) (又は場合によりチモーゲン (zymogen)) と呼ばれる。プロポリペプチドは通常不活性であるが、触媒又は自己触媒によりプロペプチドがプロポリペプチドから切断されると、活性ポリペプチドに変換される。プロペプチドコーディング配列としては、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) アルカリプロテアーゼ (aprE)、バチルス・サブチリス中性プロテアーゼ (nprT)、ミセリオフィソラ・テルモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) ラッカーゼ (国際公開第 95/33836 号)、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ、及びサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) - 因子由来の配列が挙げられる。

【0094】

10

ポリペプチドの N - 末端にシグナルペプチド及びプロペプチド配列の双方が存在する場合、プロペプチド配列は、ポリペプチドの N - 末端の隣に位置し、シグナルペプチド配列は、プロペプチド配列の N - 末端の隣に位置する。

【0095】

また、宿主細胞の生育との関連において、ポリペプチドの発現調節を可能にする調節配列を付与することも望ましい。調節系の例としては、調節化合物の存在等の化学又は物理刺激に応答して遺伝子の発現を開始又は停止させる系が挙げられる。原核細胞系における調節系としては、lac、tac、及び trp オペレータ系が挙げられる。酵母においては、例えば ADH2 系又は GAL1 系が使用できる。糸状菌においては、例えば

アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼプロモーター、
アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKA - アミラーゼプロモーター、
及びアスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) グルコアミラーゼプロモーターを
調節配列として使用できる。他の調節配列の例としては、遺伝子の増幅を可能にする系が
挙げられる。真核細胞系におけるそれらの調節配列としては、メトトレキサートの存在下
で増幅されるジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子や、重金属により増幅されるメタロチオネ
イン遺伝子が挙げられる。これらの場合、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは
、調節配列に作動可能に連結される。

20

【0096】

発現ベクター：

本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、プロモーターと、
転写及び翻訳停止シグナルとを含む組換え発現ベクターにも関する。上述の種々のヌクレ
オチド及び調節配列を組み合わせ、1 又は 2 以上 (数個) の便利な制限部位を含む組換え
発現ベクターを構築すれば、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをそのよう
な部位に挿入又は置換することができる。他方では、前記ポリヌクレオチド又はその配列
を含む核酸コンストラクトを、発現に適したベクターに挿入することにより、ポリヌクレ
オチドを発現させてもよい。発現ベクターを作製する際には、発現に適した調節配列とコー
ディング配列とが作動可能に連結されるように、コーディング配列をベクター内に配置
する。

30

【0097】

組換え発現ベクターは、組換え DNA 法に好適に利用でき、且つポリヌクレオチドの発
現を生じ得るものであれば、任意のベクター (例えばプラスミド又はウイルス) が使用で
きる。ベクターの選択は、通常はベクターを導入する宿主細胞と、ベクターとの適合性に
依存する。ベクターは線状でも閉環状プラスミドでもよい。

40

【0098】

ベクターは自己複製ベクター、即ち、染色体外成分として存在し、染色体複製とは独立
に複製するベクターであってもよい。例としては、プラスミド、染色体外要素、ミニ染色
体、又は人工染色体等が挙げられる。前記ベクターは、自己複製を促進する任意の手段を
含んでいてもよい。他方では、ベクターは、宿主細胞内に導入されるとゲノム内に組み込
まれ、統合された染色体と一緒に複製されるものであってもよい。さらに、宿主細胞のゲ
ノムに導入される全 DNA は、単一のベクター又はプラスミドが含まれてもよく、又は

50

2以上のベクター又はプラスミドが共同で含んでいてもよい。

【0099】

本発明のベクターは、形質転換、トランスフェクション、形質導入等を生じた細胞の選択を容易にする、1又は2以上(数個)の選択マーカーを含むことが好ましい。選択マーカーは、殺生物剤、ウイルス耐性、重金属耐性、原栄養又は栄養要求性等を付与する物質を産生する遺伝子である。

【0100】

細菌選択マーカーの例は、バチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)又はバチルス・リケニホルミス(*Bacillus licheniformis*)からの*dal*遺伝子、又は抗生物質の耐性、例えばアンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン又はテトラサイクリン耐性を付与するマーカーである。酵母宿主細胞に適したマーカーとしては、ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1、及びURA3が挙げられる。糸状菌宿主細胞に使用される選択マーカーとしては、これらに限定されるものではないが、*amdS*(アセトアミダーゼ)、*argB*(オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、*bar*(ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)、*hph*(ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、*niaD*(硝酸レダクターゼ)、*pyrG*(オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ)、*sC*(硫酸アデニルトランスフェラーゼ)、及び*trpC*(アントラニル酸シンターゼ)、並びにこれらの同等物が挙げられる。アスペルギルス(*Aspergillus*)細胞での使用には、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)又はアスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)の*amdS*及び*pyrG*遺伝子、並びにストレプトミセス・ヒグロスコピカス(*Streptomyces hygroscopicus*)の*bar*遺伝子が好適である。

【0101】

ベクターは、ベクターの宿主細胞ゲノムへの組み込み、又は、細胞内におけるゲノムとは独立したベクターの自律的な複製を可能にする(1又は2以上の)要素を含むことが好ましい。

【0102】

宿主細胞ゲノムへの組み込みの場合、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、又はベクターのその他の要素に基づく相同又は非相同組換えにより、ゲノムへの組み込みを生じさせてもよい。他方では、宿主細胞ゲノムの(1又は2以上の)染色体内の(1又は2以上の)正確な位置に対して、相同組換えによるベクターの組み込みを生じさせるようなさらなるヌクレオチド配列を、ベクターが含んでいてもよい。正確な位置に組み込まれる確率を高めるべく、組み込み要素は、相同組換えの可能性を高めるよう、対応する標的配列と高い同一性を有する十分な数の核酸(例えば100~10,000塩基対、好ましくは400~10,000塩基対、最も好ましくは800~10,000塩基対)を有することが好ましい。前記組み込み要素は、宿主細胞のゲノムの標的配列に相同な配列であれば、任意の配列でよい。さらに、前記組み込み要素は、非コーディング配列でもコーディング配列ヌクレオチド配列でもよい。一方、ベクターは非相同組換えにより宿主細胞ゲノムに組み込まれてもよい。

【0103】

自律的な複製の場合、ベクターはさらに、問題の宿主細胞内でのベクターの自律的な複製を可能にする複製起点を含んでいてもよい。複製起点としては、自律的複製を生じさせるプラスミド複製子であって、細胞内で機能し得る任意の配列が挙げられる。本明細書において「複製起点(origin of replication)」又は「プラスミド複製子(plasmid replicator)」とは、プラスミド又はベクターのインピボでの複製を可能にするヌクレオチド配列として定義される。

【0104】

複製の細菌起点の例としては、E.コリにおいて複製を可能にするプラスミドpBR322、pUC19、pAYC177及びpACY184、及びバチルスにおいて複製を可能にするpUB110、pE194、pTA1060及びpAM1の複製の起点を挙げることができる。

【 0 1 0 5 】

酵母宿主細胞に使用される複製起点の例としては、2ミクロン複製起点、ARS1、ARS4、ARS1とCEN3との組み合わせ、及び、ARS4とCEN6との組み合わせが挙げられる。

【 0 1 0 6 】

糸状菌細胞において有用な複製起点の例としては、AMA1 及び ANS1 が挙げられる (Gem s et al., 1991, Gene 98:61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15:9163-9175; 国際公開第 0 0 / 2 4 8 8 3 号)。AMA1 遺伝子の単離、及び、当該遺伝子を含むプラスミド又はベクターの構築は、国際公開第 0 0 / 2 4 8 8 3 号に開示の手法により達成することができる。

10

【 0 1 0 7 】

本発明のポリヌクレオチドを2コピー以上、宿主細胞に挿入することにより、ポリペプチドの産生を増進してもよい。ポリヌクレオチドのコピー数の増大は、前記配列の少なくとも1つのさらなるコピーを宿主細胞ゲノム内に組み込むことにより、又は、増幅可能な選択マーカー遺伝子をポリヌクレオチド内に含め、適切な選択物質の存在下で細胞を培養した場合に、選択マーカー遺伝子の増幅されたコピー、さらには前記ポリヌクレオチドのさらなるコピーを含む細胞が選択できるようにすることにより達成される。

【 0 1 0 8 】

本発明の組換え発現ベクターを構築するために上記要素を連結するために使用される手法は、当業者には周知である (例えば Sambrook et al., 1989 (同上) 参照)。

20

【 0 1 0 9 】

宿主細胞：

本発明はまた、本発明のポリペプチドの生成を誘導する1又は2以上(数個)の調節配列に作動可能に連結される本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞にも関する。ポリヌクレオチドを含むコンストラクトは、そのベクターが染色体組み込み体として、又は前記のような自己複製染色体外ベクターとして維持されるように、宿主細胞中に導入される。用語「宿主細胞」とは、複製の間に生じる突然変異のために、親細胞と同一ではない親細胞のいずれかの子孫を包含する。宿主細胞の選択は、ポリペプチドをコードする遺伝子及びその源に、かなりの程度依存するであろう。

【 0 1 1 0 】

宿主細胞は、本発明のポリペプチドの組換え生成において有用ないずれかの細胞、例えば原核又は真核細胞であり得る。

30

【 0 1 1 1 】

原核宿主細胞は、いずれかのグラム - 陽性又はグラム - 陰性細菌であり得る。グラム - 陽性細胞は下記のを包含するが、但しそれらだけには限定されない：バチルス (Bacillus)、クロストリジウム (Clostridium)、エンテロコッカス (Enterococcus)、ゲオバチルス (Geobacillus)、ラクトバチルス (Lactobacillus)、ラクトコッカス (Lactococcus)、オセノバチルス (Oceanobacillus)、スタフィロコッカス (Staphylococcus)、ストレプトコッカス (Streptococcus) 及びストレプトミセス (Streptomyces)。グラム - 陰性細菌は下記のを包含するが、但しそれらだけには限定されない：カンピロバクター (Campylobacter)、E. コリ (E. coli)、フラボバクテリウム (Flavobacterium)、フソバクテリウム (Fusobacterium)、ヘリコバクター (Helicobacter)、イリオバクター (Ilyobacter)、ネイセリア (Neisseria)、シュドモナス (Pseudomonas)、サルモレラ (Salmonella) 及びウレアプラズマ (Ureaplasma)。

40

【 0 1 1 2 】

細菌宿主細胞は、いずれかのバチルス細胞、例えば次のものを包含するが、但しそれらだけには制限されない：バチルス・アルカロフィラス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリケファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・クラウジ (Bacillus clausii)、バチルス・コアグラルス (Bacillus coagulans)、バチ

50

ルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・ラクタス (*Bacillus lautus*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 及びバチルス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 細胞。

【 0 1 1 3 】

細菌宿主細胞はまた、いずれかのストレプトコカス細胞、例えば次のものであり得るが、しかしそれらだけには制限されない：ストレプトコカス・エクイシミリス (*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコカス・ウベリス (*Streptococcus uberis*) 及びストレプトコカス・エクイ亜種ズーエピデミカス (*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*) 細胞。

【 0 1 1 4 】

細菌宿主細胞はまた、いずれかのストレプトミセス細胞、例えば次のものであり得るが、但しそれらだけには限定されない：ストレプトミセス・アクロモゲネス (*Streptomyces achromogenes*)、ストレプトミセス・アベルミチリス (*Streptomyces avermitilis*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) 及びストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 細胞。

【 0 1 1 5 】

バチルス細胞中への DNA の導入は例えば、プロトプラスト形質転換 (例えば、Chang and Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115を参照のこと) により、コンピテント細胞の使用 (例えば、Young and Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, 又はDubnau and Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221を参照のこと) により、エレクトロポレーション (例えば、Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751を参照のこと) により、又はコンジュゲーション (例えば、Koehler and Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278を参照のこと) によりもたらされ得る。E. コリ細胞中への DNA の導入は例えば、プロトプラスト形質転換 (例えば、Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580を参照のこと) 又はエレクトロポレーション (例えば、Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145を参照のこと) によりもたらされ得る。ストレプトミセス細胞への DNA の導入は例えば、プロトプラスト形質転換及びエレクトロポレーション (例えば、Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405を参照のこと) により、コンジュゲーション (例えば、Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585を参照のこと) により、又はトランスダクション (例えば、Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294を参照のこと) によりもたらされ得る。シュードモナス細胞中への DNA の導入は例えば、エレクトロポレーション (例えば、Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397を参照のこと) により、又はコンジュゲーション (例えば、Pinedo and Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57を参照のこと) によりもたらされ得る。ストレプトコカス細胞中への DNA の導入は例えば、天然の能力 (natural competence) (例えば、Perry and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297を参照のこと) により、プロトプラスと形質転換 (例えば、Catt and Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207を参照のこと) により、エレクトロポレーション (例えば、Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804を参照のこと) により、又はコンジュゲーション (例えば、Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436を参照のこと) によりもたらされ得る。しかしながら、当業界において知られているいずれの方法でも、宿主細胞中への DNA の導入のためには使用され得る。

【 0 1 1 6 】

宿主細胞はまた、真核生物、例えば哺乳類、昆虫、植物又は菌類細胞でもあり得る。

【 0 1 1 7 】

宿主細胞は真菌細胞である。本明細書において「真菌 (fungi)」とは、子囊菌 (Ascomycota) 門、担子菌 (Basidiomycota) 門、ツボカビ (Chytridiomycota) 門、及び接合菌 (Zygomycota) 門を含む (Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK の定義による) とともに、卵菌類 (Oomycota) (Hawksworth et al., 1995 (同上) 171 頁に言及あり) 及び全ての分生子形成菌 (Hawksworth et al., 1995 (同上)) をも含む。

【0118】

真菌宿主細胞は酵母細胞である。本明細書において「酵母 (yeast)」とは、有子囊孢子酵母 (Endomycetales)、担子孢子形成酵母、及び不完全菌に属する酵母 (Blastomycetes) を含む。酵母の分類は今後変更される可能性があるが、本発明の目的においては、酵母は Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980) に記載の定義に従うものとする。

【0119】

酵母宿主細胞は、カンジダ (*Candida*)、ハンゼヌラ (*Hansenula*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*)、又はヤロウイア (*Yarrowia*) 細胞、例えばクルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、サッカロミセス・カールスベルゲンシス (*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロミセス・セルビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ジアスタチカス (*Saccharomyces diastaticus*)、サッカロミセス・ドウグラシ (*Saccharomyces douglasii*)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロミセス・ノルベンシス (*Saccharomyces norbensis*)、サッカロミセス・オビフォルミス (*Saccharomyces oviformis*) 又はヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 細胞である。

【0120】

真菌宿主細胞は、糸状菌細胞である。「糸状菌」は (Hawksworth et al., 1995 (同上) に定義のとおり) 全ての真菌亜門 (Eumycota) 及び卵菌亜門 (Oomycota) の線状体を含む。糸状菌は通常、キチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン、及び他の複合多糖類からなる菌糸壁を特徴とする。栄養増殖は菌糸伸長により、炭素代謝は偏性好気性である。対照的に、酵母、例えばサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) による栄養増殖は、単細胞性葉状体の出芽により、炭素代謝は醗酵でも可能である。

【0121】

糸状菌宿主細胞は、アクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*)、ブイェルカンデラ (*Bjerkandera*)、セリポリオプシス (*Ceriporiopsis*)、クリソスポリウム (*Chrysosporium*)、コプリナス (*Coprinus*)、コリオラス (*Coriolus*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、フィリバシジウム (*Filibasidium*)、フサリウム (*Fusarium*)、フミコラ (*Humicola*)、マナポルテ (*Magnaporthe*)、ムコール (*Mucor*)、ミセリオフトラ (*Myceliophthora*)、ネオカリマスティクス (*Neocallimastix*)、ニューロスポラ (*Neurospora*)、パエシロミセス (*Paecilomyces*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、ファネロカエテ (*Phanerochaete*)、フレビア (*Phlebia*)、ピロミセス (*Piromyces*)、プレウロタス (*Pleurotus*)、スキゾフィラム (*Schizophyllum*)、タラロミセス (*Talaromyces*)、テルモアスカス (*Thermoascus*)、ティエラビア (*Thielavia*)、トリボクラジウム (*Tolypocladium*)、トラメテス (*Trametes*)、又はトリコデルマ (*Trichoderma*) 細胞である。

【0122】

例えば、糸状菌宿主細胞は、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フォエティダス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニドゥランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー (

10

20

30

40

50

Aspergillus niger)、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、ブイエルカンデラ・アジュスタ (*Bjerkandera adusta*)、セリポリオプシス・アネイリナ (*Ceriporiopsis aneirina*)、セリポリオプシス・カレジエナ (*Ceriporiopsis caregiea*)、セリポリオプシス・ジルベセンス (*Ceriporiopsis gilvescens*)、セリポリオプシス・パンノシント (*Ceriporiopsis pannocinta*)、セリポリオプシス・リプロザ (*Ceriporiopsis rivulosa*)、セリポリオプシス・スブルファ (*Ceriporiopsis subrufa*)、セリポリオプシス・スベルミスボラ (*Ceriporiopsis subvermispora*)、クリソスポリウム・イノプス (*Chrysosporium inops*)、クリソスポリウム・ケラチノフィラム (*Chrysosporium keratophilum*)、クリソスポリウム・ルクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、クリソスポリウム・メルダリウム (*Chrysosporium merdarium*)、クリソスポリウム・パニコラ (*Chrysosporium pannicola*)、クリソスポリウム・クィーンズランディカム (*Chrysosporium queenslandicum*)、クリソスポリウム・トロピカム (*Chrysosporium tropicum*)、クリソスポリウム・ゾナタム (*Chrysosporium zonatum*)、コプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*)、コリオラス・ヒルスタス (*Coriolus hirsutus*)、フザリウム・バクトリディオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フザリウム・セラリス (*Fusarium cerealis*)、フザリウム・クロークウェレンス (*Fusarium crookwellense*)、フザリウム・カルモラム (*Fusarium culmorum*)、フザリウム・グラミネアラム (*Fusarium graminearum*)、フザリウム・グラミナム (*Fusarium gramineum*)、フザリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*)、フザリウム・ネガンジ (*Fusarium negundi*)、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・レチクララム (*Fusarium reticulatum*)、フザリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)、フザリウム・サンブキナム (*Fusarium sambucinum*)、フザリウム・サルコキロウム (*Fusarium sarcochroum*)、フザリウム・スポロトリキオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、フザリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フザリウム・トルロサム (*Fusarium torulosum*)、フザリウム・トリコテシオイデス (*Fusarium trichothecioides*)、フザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*)、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、フミコラ・ラヌジノサ (*Humicola lanuginosa*)、ムコール・ミエヘイ (*Mucor miehei*)、ミセリオフトラ・テルモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・ブルプロゲナム (*Penicillium purpurogenum*)、ファネロカエテ・クリソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*)、フレビア・ラジアタ (*Phlebia radiata*)、プレウロタス・エリンギ (*Pleurotus eryngii*)、チエラピア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、トラメテス・ビロサ (*Trametes villosa*)、トラメテス・ベルシコロール (*Trametes versicolor*)、トリコデルマ・ハルジアナム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・コニンギイ (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 又はトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) 細胞である。

【 0 1 2 3 】

真菌細胞は、周知の手法により、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換、及び細胞壁の再生を含むプロセスにより形質転換してもよい。アスペルギウス (*Aspergillus*) 及びトリコデルマ (*Trichoderma*) 宿主細胞の形質転換に適した手法は、欧州特許第 2 3 8 0 2 3 号及び Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474 に記載されている。フザリウム (*Fusarium*) 属の形質転換に適した手法は、Malardier et al., 1989, Gene 78:147-156、及び国際公開第 9 6 / 0 0 7 8 7 号に記載されている。酵母は、例えば Becker and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153:163; 及び Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920 に記載の手法により形質転換される。

【 0 1 2 4 】

生成方法：

本発明はまた、(a)その野生型において、ポリペプチドの生成の助けと成る条件下でポリペプチドを生成することができる細胞を培養し；そして(b)前記ポリペプチドを回収することを含んで成る、本発明のポリペプチドの生成方法にも関する。好ましい態様によれば、細胞は属[クツネリア(Kutzneria)]のものである。より好ましい態様によれば、細胞はクツネリア・アルビダ(Kutzneria albida)である。最も好ましい態様によれば、細胞はクツネリア・アルビダATCC 25243である。

【0125】

本発明はまた、(a)ポリペプチドの生成を助ける条件下で本発明の組換え宿主細胞を培養し；そして(b)ポリペプチドを回収することを含んで成る、本発明のポリペプチドを生成するための方法にも関する。

10

【0126】

宿主細胞は、当業界において知られている方法を用いて、ポリペプチドの生成のために適切な栄養培地において培養される。例えば、細胞は、ポリペプチドの発現及び/又は単離を可能にする、適切な培地において、及び条件下で行われる実験室用又は産業用発酵器において、振盪フラスコ培養、小規模又は大規模発酵(連続、バッチ、供給バッチ、又は固体状態発酵を包含する)により培養され得る。培養は、炭素及び窒素源及び無機塩を含んで成る適切な栄養培地において、当業界において知られている方法を用いて行われる。適切な培地は、市販されているか、又は公開されている組成(例えば、American Type Culture Collectionのカatalogにおける)に従って調製され得る。ポリペプチドが栄養培地に分泌される場合、ポリペプチドは培地から直接的に回収され得る。ポリペプチドが分泌されない場合、それは細胞溶解物から回収され得る。

20

【0127】

ポリペプチドは、そのポリペプチドに対して特異的である、当業界において知られている方法を用いて検出され得る。それらの検出方法は、特定の抗体、ポリペプチド生成物の形成、又は酵素基質の消出の使用を包含する。例えば、酵素アッセイは、ポリペプチドの活性を決定するために使用され得る。

【0128】

ポリペプチドは、当業界において知られている方法により回収され得る。例えば、ポリペプチドは、従来の方法、例えば遠心分離、濾過、抽出、噴霧-乾燥、蒸発又は沈殿(但し、それらだけには限定されない)により、栄養培地から回収され得る。

30

【0129】

ポリペプチドは、当業界において知られている種々の方法、例えばクロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性、疎水性、クロマトフォーカシング及びサイズ排除)、電気泳動方法(例えば、分離用等電点電気泳動)、示差溶解性(例えば、硫酸アンモニウム沈殿)、SDS-PAGE又は抽出(但し、それらだけには限定されない)により精製され得(例えば、Protein Purification, J.C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989を参照のこと)、実質的に純粋なポリペプチドが得られる。

【0130】

他の態様によれば、ポリペプチドは回収されず、むしろポリペプチドを発現する本発明の宿主細胞がポリペプチド源として使用される。

40

【0131】

植物：

本発明はまた、ポリペプチドを、回収できる量で発現し、そして生成するために、本発明の単離ポリヌクレオチドを含んで成るトランスジェニック植物、その植物部分又は植物細胞にも関する。ポリペプチドは、植物又は植物部分から回収され得る。他方では、ポリペプチドを含む植物又は植物部分は、食物又は飼料の品質を改良し、例えば栄養価値、嗜好性及び流動性質を改良するために、又は抗栄養因子を破壊するために使用され得る。

【0132】

トランスジェニック植物は、双子葉植物又は単子葉植物であり得る。単子葉植物の例は、草、例えば湿潤地の草本(ブルーグラス、イチゴツナギ属)、飼草、例えばウシノケ

50

サ、ドクムギ、温帯性草本、例えばヌカボ、及び穀類、例えば小麦、オート麦、ライ麦、イネ、モロコシ、及びトウモロコシ（サトウモロコシ）である。

【 0 1 3 3 】

双子葉植物の例は、タバコ、マメ科植物、例えばルピナス、ジャガイモ、砂糖大根、エンドウ、インゲン豆及び大豆、及びアブラナ科植物（ブラシカセアエ科（Brassicaceae））、例えばカリフラワー、ナタネ種子及び密接に関連するモデル生物アラビドプシス・タリアナ（*Arabidopsis thaliana*）である。

【 0 1 3 4 】

植物部分の例は、茎、カルス、葉、根、果物、種子及び塊茎、並びにそれらの部分を含んで成る個々の組織、例えば表皮、葉肉、柔組織、維管束組織、分裂組織である。また特定の植物細胞区画、例えばクロロプラスト、アポプラスト、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシゾーム及び細胞質が、植物部分であると思われる。さらに、組織起源が何であろうと、いずれの植物細胞でも、植物部分であると思われる。同様に、植物部分、例えば本発明の利用を促進するために単離された特定の組織及び細胞はまた、植物部分、例えば胚、内生精子、アリューロン及び被膜であると思われる。

【 0 1 3 5 】

そのような植物、植物部分及び植物細胞の子孫はまた、本発明の範囲内に包含される。

【 0 1 3 6 】

ポリペプチドを発現するトランスジェニック植物又は植物細胞は、当業界において知られている方法に従って構成され得る。手短には、植物又は植物細胞は、ポリペプチドをコードする、1又は2以上（数個）の発現コンストラクトを、植物宿主ゲノム又はクロロプラストゲノム中に導入し、そして得られる修飾された植物又は植物細胞をトランスジェニック植物又は植物細胞中に成長せしめることによって構成される。

【 0 1 3 7 】

発現コンストラクトは、選択の植物又は植物におけるポリヌクレオチドの発現のために必要とされる適切な調節配列により作動可能に連結されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んで成る核酸コンストラクトである。さらに、発現コンストラクトは、発現コンストラクトが組み込まれている宿主細胞を同定するために有用な選択マーカー、及び問題の植物中へのコンストラクトの導入のために必要なDNA配列を含んで成る（後者は、使用されるDNA導入方法に依存する）。

【 0 1 3 8 】

調節配列、例えばプロモーター及びターミネーター配列、及び任意には、シグナル又はランジット配列の選択は、例えばポリペプチドがいつ、どこで及びいかにして発現されることを所望するかに基づいて決定される。例えば、ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、構成的又は誘発的であり、又は進行的、段階又は組織特異的であり、そして遺伝子生成物は、特定組織又は植物部分、例えば種子又は葉に標的化され得る。調節配列は、Taquetなど、1988, Plant Physiology 86: 506により記載される。

【 0 1 3 9 】

構成的発現のためには、次のプロモーターが使用され得る：35S-CaMVプロモーター、トウモロコシユビキチン1及びイネアクチン1プロモーターが使用され得る（Frank et al., 1980, Cell 21: 285-294; Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689; Zhang et al., 1991, Plant Cell 3: 1155-1165）。器官特異的プロモーターは例えば、貯蔵吸込み組織、例えば種子、ジャガイモ塊茎及び果物（Edwards & Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303）、又は代謝吸込み組織、例えば分裂組織（Ito など、1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878）からのプロモーター、種子特異的プロモーター、例えばイネからのグルテリン、プロラミン、グロブリン又はアルブミンプロモーター（Wu など、1998, Plant and Cell Physiology 39: 885-889）、レグニンB4からのVicifabaプロモーター及び未知の種子タンパク質遺伝子からのVicifabaプロモーター（Conrad など、1998, Journal of Plant Physiology 152: 708-711）、種子油体タンパク質からのプロモーター（Chen など、1998, Plant and Cell Phy

10

20

30

40

50

siology 39: 935-941)、ブラシカ・ナパス (*Brassica napus*) からの貯蔵タンパク質nap Aプロモーター又は当業界において知られている、例えば国際公開第 9 1 / 1 4 7 7 2 号に記載されるようないずれか他の種子特異的プロモーターであり得る。さらに、プロモーターは、葉特異的プロモーター、例えばイネ又はトマトからの *r b c s* プロモーター (Kyo-
uka など., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000)、クロレラウィルスアデニンメチ
ルトランスフェラーゼ遺伝子プロモーター (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular*
Biology 26: 85-93)、イネからの *a l d P* 遺伝子プロモーター (Kagaya など., 1995,
Molecular and General Genetics 248: 668-674)、又は創傷誘発性プロモーター、例
えばジャガイモ *p i n 2* プロモーター (Xu など., 1993, *Plant Molecular Biology* 22 : 5
73-588) であり得る。同様に、プロモーターは、非生物学的処理、例えば温度、渇水又は
塩分の変更により誘発できるか、又はプロモーターを活性化する外部的に適用される物質、
例えばエタノール、エストロゲン、植物ホルモン様エチレン、アブシジン酸、ジベレリ
ン酸及び/又は重金属により誘発できる。

10

【 0 1 4 0 】

プロモーターエンハンサー要素がまた、植物におけるポリペプチドのより高い発現を達
成するために使用され得る。例えば、プロモーターエンハンサー要素は、プロモーターと
、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に位置するイントロンであり得る。
例えば、Xu など., 1993 (前記) は、発現を増強するためへのイネアクチン 1 遺伝子の最
初のイントロンの使用を開示する。

【 0 1 4 1 】

20

発現コンストラクトの選択マーカー遺伝子及びいずれか他の部分は、当業界において入
手できるそれらから選択され得る。

【 0 1 4 2 】

核酸コンストラクトは、当業界において知られている従来の技法、例えばアグロバクテ
リウム介在性形質転換、ウィルス介在性形質転換、マイクロインジェクション (*microinj*
ection)、粒子衝撃 (*particle bombardment*)、バイオリステック形質転換 (*biolistic*
transformation) 及びエレクトロポレーションに従って、植物ゲノム中に組込まれる (Ga
sser など., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *BiolTechnology* 8 : 535; Shim
amoto など., 1989, *Nature* 338: 274)。

【 0 1 4 3 】

30

現在、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 介在性遺
伝子トランスファーは、トランスジェニック双子葉類を生成するための選択方法であり (再
考のためには、Hooykas and Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-3
8を参照のこと)、そして、それはまた、単子葉類を形質転換するためにも使用され得る
が、しかし他の形質転換方法が一般的にそれらの植物のために好ましい。現在、アグロバ
クテリウムアプローチを補足する、トランスジェニック単子葉類を生成するための選択方
法は、胚細胞又は成長胚の粒子衝撃である (形質転換DNAにより被覆された微小金又はタ
ングステン粒子) (Christou, 1992, *Plant Journal* 2 : 275-281; Shimamoto, 1994, *Cu*
rrent Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil など., 1992, *BiolTechnology* 10: 66
7-674)。単子葉類の形質転換のための他の方法は、Omirulלה など., 1993, *Plant Molec*
ular Biology 21: 415-428により記載されるようにプロトプラスト形質転換に基づく。40
。本開示に従っての使用のための追加の形質転換方法は、アメリカ特許第 6 , 3 9 5 , 9
6 6 号 及び第 7 , 1 5 1 , 2 0 4 号 (引用により本明細書に組込まれる) に記載される
それらの方法を包含する。

【 0 1 4 4 】

形質転換に続いて、発現コンストラクトを組込んでいる形質転換体が選択され、そして
当業界において良く知られていた方法に従って、完全な植物に再生される。しばしば、形
質転換方法が、2種の別々の T - DNA コンストラクトによる同時形質転換を用いること
により、再生の間又は次の生成において、選択遺伝子の選択的排除、又は特異的組換え酵
素による選択遺伝子の部位特異的排除のために企画される。

50

【 0 1 4 5 】

本発明に従って調製されたコンストラクトによる特定の植物遺伝子型の直接的形質転換の他に、トランスジェニック植物は、前記コンストラクトを欠いている第2植物に前記コンストラクトを有する植物を交雑することにより製造され得る。例えば、ポリペプチドをコードするコンストラクトは、その所定の品種の植物を直接形質転換する必要なしに、交雑により特定植物品種中に導入され得る。従って、本発明は、本発明に従って形質転換された細胞から直接再生された植物のみならず、またそのような植物の子孫も包含する。本明細書において使用され得る場合、子孫とは本発明に従って調製される親植物のいずれかの世代の子孫を言及することができる。そのような子孫は、本発明に従って調製されたDNAコンストラクト、又は本発明に従って調製されたDNAコンストラクトの一部を包含することができる。交雑は、ドナー植物系により出発植物系を交雑受粉することによりトランスジェニックの植物系中への導入をもたらす。そのような段階の非制限的例は、アメリカ特許第7,151,204号に示されている。

10

【 0 1 4 6 】

植物は戻し交雑転換の工程を通して生成され得る。例えば、植物は、戻し交雑転換された遺伝子型、系統、同系繁殖体(inbred)、又はハイブリッドとして言及される植物を包含する。

【 0 1 4 7 】

遺伝子マーカーが、1つの遺伝子バックグラウンドからの本発明の1又は2以上のトランスジェニックの別のトランスジェニックへの遺伝子移入を助けるために使用され得る。マーカー助力選択は、それが表現型変異により引起される誤差を回避するために使用され得ることで、従来の育種に対して利点を提供する。さらに、遺伝子マーカーは、特定の交雑の個々の子孫において相対的程度のすぐれた胚形質に関するデータを提供することができる。例えば、農業的に所望されない遺伝子バックグラウンドを有する所望する形質を有する植物が優れた親に交雑される場合、遺伝子マーカーは、興味ある形質を有するのみならず、また比較的大集団の所望する胚形質を有する子孫を選択するために使用され得る。この手段によれば、特定の遺伝子バックグラウンド中に1又は2以上の形質を遺伝子移入するために必要とされる世代の数が減じられる。

20

【 0 1 4 8 】

本発明はまた、(a)ポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成るトランスジェニック植物又は植物細胞を、前記ポリペプチドの生成の助けとなる条件下で栽培し、そして(b)前記ポリペプチドを回収することを含んで成る、本発明のポリペプチドを生成するための方法にも関する。

30

【 0 1 4 9 】

組成物：

本発明はまた、本発明のポリペプチドを含む組成物にも関する。好ましくは、組成物は、そのようなポリペプチドを富化されている。用語「富化された(enriched)」とは、組成物のエンドペプチダーゼ活性、好ましくはトリプシン様エンドペプチダーゼ活性が少なくとも1.1の富化係数、高められたことを示す。

【 0 1 5 0 】

組成物は、主要酵素成分、例えば単独成分組成として本発明のポリペプチドを含むことができる。他方では、組成物は、複数の酵素活性、例えばアミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリン、グリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、インバーターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペプチドグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ又はキシナーゼを含むことができる。追加の酵素は、属アスペルギラス、例えばアスペルギラス・アキュレアタス

40

50

(*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギラス・アウモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギラス・ホエチダス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギラス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギラス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギラス・ニジュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger*)、又はアスペルギラス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)；フサリウム、例えばフサリウム・バクトリジオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フサリウム・セラリス (*Fusarium cerealis*)、フサリウム・クロックウェレンズ (*Fusarium crookwellense*)、フサリウム・クルモラム (*Fusarium culmorum*)、フサリウム・グラミネアラム (*Fusarium graminearum*)、フサリウム・グラミン (*Fusarium graminum*)、フサリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*)、フサリウム・ネグンジ (*Fusarium negundi*)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フサリウム・レチキュラタム (*Fusarium reticulatum*)、フサリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)、フサリウム・サムブシウム (*Fusarium sambucinum*)、フサリウム・サルコクロウム (*Fusarium sarcocroium*)、フサリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フサリウム・トルロサム (*Fusarium torulosum*)、フサリウム・トリコセシオイデス (*Fusarium trichothecoides*)、又はフサリウム・ベネナタム (*Fusarium venenatum*)；ヒュミコラ、例えばヒュミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、又はヒュミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*)；又はトリコダーマ、例えばトリコダーマ・ハルジアナル (*Trichoderma harzianum*)、トリコダーマ・コニンギ (*Trichoderma koningii*)、トリコダーマ・ロンジブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコダーマ・レセイ (*Trichoderma reesei*)、又はトリコダーマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) に属する微生物により生成され得る。

【0151】

組成物は、周知方法に従って調製され得、そして液体又は乾燥組成物の形で存在することができる。例えば、組成物は、顆粒又は微粒子の形で存在することができる。ポリペプチドは、周知方法に従って安定化され得る。

【0152】

用途：

本発明はまた、本発明のポリペプチド又はその組成物の使用方法にも関する。

好ましくは、本発明は、タンパク質加水分解物、好ましくは食用タンパク質加水分解物、より好ましくは乳タンパク質加水分解物、例えばホエータンパク質加水分解物又はカゼイン加水分解物の製造への本発明のポリペプチド又はその組成物の使用に関する。

【0153】

本発明はまた、

(a) 加水分解されるべくタンパク質を含む溶液を供給し；

(b) 本発明のポリペプチド又はその組成物を、前記溶液に添加し；そして

(c) タンパク質加水分解物を得ることを含んで成る、タンパク質加水分解物の製造方法にも関する。

【0154】

好ましくは態様によれば、加水分解されるタンパク質は食用タンパク質であり、そして従って、得られるタンパク質加水分解物は、食用タンパク質加水分解物である。

【0155】

食用タンパク質は、いずれの食用タンパク質であってもよい。食用タンパク質を含む溶液は、植物、例えば大麦、カノーラ、ルピナス、トウモロコシ、オート麦、エンドウ、ジャガイモ、米、大豆、小麦、又はそれらのいずれかの組合せからのタンパク質材料を含む溶液であり得る。食用タンパク質を含む溶液は、動物、例えば卵タンパク質材料、肉タンパク質材料又は乳タンパク質材料からのタンパク質を含む溶液であり得る。それはまた、植物由来のタンパク質材料及び動物由来のタンパク質材料の組合せでもあり得る。

【0156】

好ましい態様においては、食用タンパク質は乳タンパク質であり、すなわち出発材料は

乳タンパク質を含む溶液である。そのような溶液は、いずれかの比率でのホエータンパク質及びカゼインを含むことができるか、又はそれは純粋なホエータンパク質又は純粋なカゼインの溶液であり得る。それは、例えば乳、例えば原乳、又は乳由来の乳タンパク質を含むいずれかの溶液であり得る。

【0157】

1つの態様によれば、そのような溶液は、チーズ製造から得られるホエー、特にスイートホエー、例えばレネットによるカゼインの凝固に起因するそのホエーを源とする、ホエータンパク質の溶液である。ホエータンパク質はまた、ホエータンパク質濃縮物又はホエータンパク質単離物からでもあり得る。好ましい態様によれば、乳タンパク質はホエータンパク質濃縮物(WPC)である。

10

【0158】

別の態様によれば、そのような溶液はカゼインの溶液である。カゼイン源は酸性カゼイン又は脱脂乳固形物であり得る。

【0159】

食用タンパク質を含む溶液、例えば乳タンパク質を含む溶液は好ましくは、約2 - 35重量%のタンパク質、より好ましくは約5 - 30重量%のタンパク質を含む。

【0160】

1つの態様によれば、乳タンパク質を含む溶液、好ましくはホエータンパク質を含む溶液はまた、ラクトースを含む。

【0161】

ご承知のように、溶液は、技術的には、むしろ懸濁液として特徴付けられる形態でよい。

20

【0162】

本発明はまた、湿式加工の間、すなわちソーキング、脱毛及び/又はベイティング(bating)の間、革の処理への本発明のポリペプチドの使用にも関する。

【0163】

本発明の特定の態様によれば、本発明のポリペプチドによる革の酵素処理は、ソーキングの間に行われる。本発明のソーキング工程は、従来のソーキング条件、すなわちpH 6 - 10の範囲のpH、20 - 30の範囲、好ましくは24 - 28の範囲の温度、及び2 - 24時間、好ましくは4 - 16時間の範囲の反応時間、並びに必要ななら、既知の界面活性剤及び保存剤を伴って実施され得る。

30

【0164】

本発明のより特定の態様によれば、本発明のポリペプチドによる革の酵素処理は、脱毛の間に行われる。本発明の脱毛工程は、従来の条件、すなわちpH 5.5 - 12.5の範囲、好ましくは6 - 12の範囲、より好ましくは7 - 10の範囲のpH、5 - 32の範囲、好ましくは15 - 30の範囲の温度及び1 - 5時間、好ましくは1.5 - 4時間の反応時間、実施され得る。

【0165】

別の特定の態様によれば、革の酵素処理は、ベイティングの間に行われる。最も好ましい態様によれば、酵素処理は、脱灰期の後、ベイティングの間に行われる。本発明のベイティング工程は、従来の条件、すなわちpH 6 - 9、好ましくはpH 6.5 - 8.5の範囲のpH、20 - 30、好ましくは25 - 28の範囲の温度、及び20 - 90分、好ましくは40 - 80分の範囲の反応時間、実施され得る。

40

【0166】

食用タンパク質加水分解物の製造方法：
方法：

別の観点によれば、本発明は、

(a) 加水分解されるべく食用タンパク質を含む溶液を供給し；

(b) 細菌由来のトリプシン様エンドペプチダーゼを前記溶液に添加し；そして

(c) 前記食用タンパク質加水分解物を得ることを含んで成る、食用タンパク質加水分

50

解物の製造方法に関する。

【 0 1 6 7 】

食用タンパク質基質：

食用タンパク質は、いずれの食用タンパク質であってもよい。食用タンパク質を含む溶液は、植物、例えば大麦、カノーラ、ルピナス、トウモロコシ、オート麦、エンドウ、ジャガイモ、米、大豆、小麦、又はそれらのいずれかの組合せからのタンパク質材料を含む溶液であり得る。食用タンパク質を含む溶液は、動物、例えば卵タンパク質材料、肉タンパク質材料又は乳タンパク質材料からのタンパク質を含む溶液であり得る。それはまた、植物由来のタンパク質材料及び動物由来のタンパク質材料の組合せでもあり得る。

【 0 1 6 8 】

好ましい態様においては、食用タンパク質は乳タンパク質、好ましくはホエータンパク質であり、すなわち出発材料は乳タンパク質を含む溶液である。そのような溶液は、いずれかの比率でのホエータンパク質及びカゼインを含むことができるか、又はそれは純粋なホエータンパク質又は純粋なカゼインの溶液であり得る。それは、例えば原乳、又は乳由来の乳タンパク質を含むいずれかの溶液であり得る。

【 0 1 6 9 】

1つの態様によれば、そのような溶液は、チーズ製造から得られるホエー、特にスイートホエー、例えばレネットによるカゼインの凝固に起因するそのホエーを源とする、ホエータンパク質の溶液である。ホエータンパク質はまた、ホエータンパク質濃縮物又はホエータンパク質単離物からでもあり得る。好ましい態様によれば、乳タンパク質はホエータンパク質濃縮物（WPC）である。

【 0 1 7 0 】

別の態様によれば、そのような溶液はカゼインの溶液である。カゼイン源は酸性カゼイン又は脱脂乳固形物であり得る。

【 0 1 7 1 】

食用タンパク質を含む溶液、例えば乳タンパク質を含む溶液は好ましくは、約 2 - 3 5 重量%のタンパク質、より好ましくは約 5 - 3 0 重量%のタンパク質、さらにより好ましくは約 5 - 2 0 重量%のタンパク質を含む。

【 0 1 7 2 】

1つの態様によれば、乳タンパク質を含む溶液、好ましくはホエータンパク質を含む溶液はまた、ラクトースを含む。

【 0 1 7 3 】

溶液は、技術的には、むしろ分散体として特徴づけられ得る形で存在できることが理解されるべきである。

【 0 1 7 4 】

トリプシン様エンドペプチダーゼ：

食用タンパク質を含む溶液、例えば乳タンパク質を含む溶液は、細菌由来のトリプシン様エンドペプチダーゼにより処理される。

【 0 1 7 5 】

本発明のためには、所定の源（すなわち、生物体（biological organism））に由来するポリペプチドに関して、用語「～から由来（derived from）」とは、本明細書において使用される場合、ポリペプチドが別の源、例えばエンドプロテアーゼをコードする源からのポリヌクレオチドが挿入されている菌株により生成することに関係なく、ポリペプチドがその源のゲノムにより天然においてコードされるポリペプチドと又はそのポリペプチドの変異体と同一であることを意味する。

【 0 1 7 6 】

トリプシン様エンドペプチダーゼは、グラム陽性細菌株、例えばアクチノシンネマ（*Actinosynnema*）、バチルス（*Bacillus*）、クロストリジウム（*Clostridium*）、エンテロコッカス（*Enterococcus*）、ゲオバチルス（*Geobacillus*）、クリベラ（*Kribbella*）、クズネリア（*Kutzneria*）、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）、ラクトコッカス（*Lactococcus*）

10

20

30

40

50

s)、オセノバチルス (*Oceanobacillus*)、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 又はストレプトミセス (*Streptomyces*) の株、又はグラム陽性細菌株、例えばカンピロバクター (*Campylobacter*)、E. コリ (*E. coli*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*)、フソバクテリウム (*Fusobacterium*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*)、イリオバクター (*Ilyobacter*)、ネイセリア (*Neisseria*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、サルモレラ (*Salmonella*) 又はウレアプラズマ (*Ureaplasma*) の株に由来する。

【0177】

1つの態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、バチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・クラウジ (*Bacillus clausii*)、バチルス・コアグランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・ラクタス (*Bacillus loutus*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 又はバチルス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 株に由来する。

【0178】

別の態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、ストレプトコカス・エクイシミリス (*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコカス・ウベリス (*Streptococcus uberis*) 又はストレプトコカス・エクイ亜種ズーエピデミカス (*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*) 株に由来する。

【0179】

別の態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、ストレプトミセス・アクロモゲネス (*Streptomyces achromogenes*)、ストレプトミセス・アベルミチリス (*Streptomyces avermitilis*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) 又はストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 株に由来する。

【0180】

そのような細菌トリプシン様エンドペプチダーゼは、約 5.0 - 約 11.0、好ましくは約 6 - 約 10 の pH、及び約 40 - 約 75、好ましくは約 50 - 約 70 の温度で最適タンパク質分解活性を有することができる。

【0181】

好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 2、5 又は 6 のいずれかの成熟ポリペプチドに対して、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する。別の好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 2、5 又は 6 のいずれかの成熟ポリペプチドとは、10 個以下のアミノ酸、例えば 5 個のアミノ酸、4 個のアミノ酸、3 個のアミノ酸、2 個のアミノ酸、1 個のアミノ酸、異なる。

【0182】

配列番号 2 の成熟ポリペプチドは、アミノ酸 1 - 225 であり得る。配列番号 5 の成熟ポリペプチドは、アミノ酸 38 - 261 であり得る。配列番号 6 の成熟ポリペプチドは、アミノ酸 40 - 226 であり得る。

【0183】

好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、アクチノバクテリアに由

10

20

30

40

50

来する。

【 0 1 8 4 】

より好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、クツネリア (*kutzneria*) の株、例えば、クツネリア・アルビダ (*kutzneria albida*) に由来する。

【 0 1 8 5 】

別のより好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 2 の成熟ポリペプチドに対して、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する。別の好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 2 の成熟ポリペプチドとは、10 個以下のアミノ酸、例えば 5 個のアミノ酸、4 個のアミノ酸、3 個のアミノ酸、2 個のアミノ酸、1 個のアミノ酸、異なる。そのような細菌トリプシン様エンドペプチダーゼは、約 5.0 - 約 11.0、好ましくは約 6 - 約 10 の pH、及び約 40 - 約 75、好ましくは約 50 - 約 70 の温度で最適タンパク質分解活性を有することができる。それはアポプロチニンにより阻害され得る。

10

【 0 1 8 6 】

別のより好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、アクチノシンネマ (*Actinosynnema*) の株、例えばアクチノシンネマ・ミルム (*Actinosynnema mirum*) に由来する。それは例えば、本出願の配列番号 5 の成熟ポリペプチドのアミノ酸配列 (UNIPROT: C6WDM8) を有することができる。

20

【 0 1 8 7 】

別のより好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 5 の成熟ポリペプチドに対して、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する。別の好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 5 の成熟ポリペプチドとは、10 個以下のアミノ酸、例えば 5 個のアミノ酸、4 個のアミノ酸、3 個のアミノ酸、2 個のアミノ酸、1 個のアミノ酸、異なる。そのような細菌トリプシン様エンドペプチダーゼは、約 5.0 - 約 11.0、好ましくは約 8 - 約 10 の pH、及び約 40 - 約 75、好ましくは約 50 - 約 70 の温度で最適タンパク質分解活性を有することができる。それは PMSF により阻害され得る。

30

【 0 1 8 8 】

別のより好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、クリベラ (*Kribbella*) の株、例えばクリベラ・フラビダ (*Kribbella flavida*) に由来する。それは例えば、本出願の配列番号 6 の成熟ポリペプチドのアミノ酸配列 (UNIPROT: D2PZJ1) を有することができる。

【 0 1 8 9 】

別のより好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 6 の成熟ポリペプチドに対して、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する。別の好ましい態様によれば、トリプシン様エンドペプチダーゼは、配列番号 6 の成熟ポリペプチドとは、10 個以下のアミノ酸、例えば 5 個のアミノ酸、4 個のアミノ酸、3 個のアミノ酸、2 個のアミノ酸、1 個のアミノ酸、異なる。そのような細菌トリプシン様エンドペプチダーゼは、約 5.0 - 約 11.0、好ましくは約 8 - 約 11 の pH、及び約 40 - 約 75、好ましくは約 40 - 約 60 の温度で最適タンパク質分解活性を有することができる。それは EDTA により阻害され得る。

40

【 0 1 9 0 】

トリプシン様エンドペプチダーゼは、それが由来する株により生成され得る。それは、その生成を誘発する 1 又は 2 以上 (数個) の調節配列に作動可能に連結されるエンドペプ

50

チダーゼをコードするポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞から生成され得る。ポリヌクレオチドを含むコンストラクト又はベクターが宿主細胞中に導入され、その結果、前記コンストラクト又はベクターは、染色体組込み体として又は自己複製染色体外ベクターとして維持される。

【 0 1 9 1 】

宿主細胞は、本発明のポリペプチドの組換え生成において有用ないずれかの細胞、例えば原核又は真核細胞であり得る。

【 0 1 9 2 】

原核宿主細胞は、いずれかのグラム - 陽性又はグラム - 陰性細菌であり得る。グラム - 陽性細胞は下記のことを包含するが、但しそれらだけには限定されない：バチルス (*Bacillus*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、エンテロコッカス (*Enterococcus*)、ゲオバチルス (*Geobacillus*)、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)、ラクトコッカス (*Lactococcus*)、オセノバチルス (*Oceanobacillus*)、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 及びストレプトミセス (*Streptomyces*)。グラム - 陰性細菌は下記のことを包含するが、但しそれらだけには限定されない：カンピロバクター (*Campylobacter*)、E. コリ (*E. coli*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*)、フソバクテリウム (*Fusobacterium*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*)、イリオバクター (*Ilyobacter*)、ネイセリア (*Neisseria*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、サルモレラ (*Salmonella*) 及びウレアプラズマ (*Ureaplasma*)。

【 0 1 9 3 】

細菌宿主細胞は、いずれかのバチルス細胞、例えば次のものを包含するが、但しそれらだけには制限されない：バチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・クラウジ (*Bacillus clausii*)、バチルス・コアグランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・ラクタス (*Bacillus lautus*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 及びバチルス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 細胞。

【 0 1 9 4 】

細菌宿主細胞はまた、いずれかのストレプトコカス細胞、例えば次のものであり得るが、しかしそれらだけには制限されない：ストレプトコカス・エクイシミリ (*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコカス・ウベリス (*Streptococcus uberis*) 及びストレプトコカス・エクイ垂種ズーエピデミカス (*Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*) 細胞。

【 0 1 9 5 】

細菌宿主細胞はまた、いずれかのストレプトミセス細胞、例えば次のものであり得るが、但しそれらだけには限定されない：ストレプトミセス・アクロモゲネス (*Streptomyces achromogenes*)、ストレプトミセス・アベルミチリス (*Streptomyces avermitilis*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) 及びストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 細胞。

【 0 1 9 6 】

宿主細胞はまた、真核生物、例えば哺乳類、昆虫、植物又は菌類細胞でもあり得る。

【 0 1 9 7 】

トリプシン様エンドペプチダーゼは、単離トリプシン様エンドペプチダーゼである。トリプシン様エンドペプチダーゼの濃度は、食用タンパク質 1 g 当たり、100 - 500,000 USP トリプシン単位 (USP Trypsin Units)、例えば 250 - 250,000

10

20

30

40

50

又は500 - 100,000 USPトリプシン単位であり得る。

【0198】

1 USPトリプシン単位は、基質としてN - ベンゾイル - L - アルギニンエチルエステル塩酸塩 (BAEE) を用いて、pH 7.6 及び25 で、253nmでの吸光度の0.003の変化を引起す活性である。

【0199】

比活性は、異なったトリプシン様エンドペプチダーゼ間で有意に変化するが、しかし当業者は、トリプシン様エンドペプチダーゼが使用される量を、加水分解の程度に基づいて容易に決定できる。

【0200】

食用タンパク質に対するトリプシン様エンドペプチダーゼの比率は、好ましくは0.01 - 5 % w / w、より好ましくは0.01 - 2 %、より好ましくは0.05 - 0.8 %、さらにより好ましくは0.1 - 0.6 % 及び最も好ましくは約0.2 % である。

【0201】

低特異性である別のエンドペプチダーゼの任意の包含：

好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼが、段階 (b) の前、間又は後、容易に添加される。

【0202】

好ましくは、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、単離エンドペプチダーゼである。

【0203】

好ましくは、少なくとも1つのエンドペプチダーゼは、セリンエンドペプチダーゼである。

【0204】

好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼが、トリプシン様エンドペプチダーゼよりも低い特異性である活性を有する。

【0205】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、哺乳類キモトリプシン、例えばブタ膵臓組織から抽出されたキモトリプシンの活性に類似する活性を有する。

【0206】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、いずれか他の天然のアミノ酸のカルボキシ - 末端側上での切断についての特異性よりも、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、メチオニン又はヒスチジンのいずれかのカルボキシ - 末端側上での切断についての高い特異性を有する。

【0207】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、イソロイシン、リシン、プロリン、セリン、トレオニン及びバリンのいずれか1つのカルボキシ - 末端側での切断についてのその特異性よりも、少なくとも3倍高い、好ましくは少なくとも5倍高い、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、メチオニン又はヒスチジンの少なくとも1つのカルボキシ - 末端側での切断についての特異性を有する。

【0208】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、アルギニンのカルボキシ - 末端側上での切断についての特異性よりも、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、メチオニン及びヒスチジンから成る群からの少なくとも3個のアミノ酸の個々のカルボキシ - 末端側での切断について高い特異性を有する。

【0209】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、リシンのカ

10

20

30

40

50

ルボキシ - 末端側上での切断についての特異性よりも、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、メチオニン及びヒスチジンから成る群からの少なくとも3個のアミノ酸の個々のカルボキシ - 末端側での切断について高い特異性を有する。

【0210】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、アルギニン及びリシンの両者のカルボキシ - 末端側上での切断についての特異性よりも、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、メチオニン及びヒスチジンの個々のカルボキシ - 末端側での切断について高い特異性を有する。

【0211】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、少なくとも3、好ましくは少なくとも5のキモトリプシン比 (Chymotrypsin ratio) を有する。少なくとも5のキモトリプシン比とは、Phe、Leu又はMet (どれが大きくとも) の1つの後の切断の場合の酵素活性がAla、Arg、Asp、Glu、Ile、Lys又はVal (どれが大きくとも) のいずれか1つの後の切断の場合の活性よりも少なくとも5倍高いことを意味する。すなわち、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼが、Ala、Arg、Asp、Glu、Ile、Lys又はVal (どれが大きくとも) のいずれか1つの後の切断についてのその特異性よりも、少なくとも3倍高く、好ましくは少なくとも5倍高い、Phe、Leu又はMet (どれが大きくとも) の後の切断についての特異性を有する。キモトリプシン比を決定するためのそのような活性測定は、エンドペプチダーゼの活性がそのpH最適でのエンドペプチダーゼの活性の少なくとも半分であるpH値で実施されるべきである。キモトリプシン比は、国際公開第2010/112546号の実施例1に記載のようにして決定され得る。

【0212】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは細菌エンドペプチダーゼである。

【0213】

より好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、ノカルジオプシス (Nocardiosis) の株、好ましくはノカルジオプシスsp NRRL 18262 (例えば、国際公開第88/03947号に記載される) に由来する。例えば、それは、本出願の配列番号7の成熟ポリペプチドのアミノ酸配列を有することができる。ノカルジオプシスsp. NRRL 18262由来のプロテアーゼのDNA及びアミノ酸配列は、例えばデンマーク特許出願番号第199600013号にすでに公開されている。

【0214】

別のさらに好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、例えば本出願の配列番号8の成熟ポリペプチドのアミノ酸配列 (TREMBL: Q9Y843) を有する、メタルヒジウム (Metarhizium)、好ましくはメタルヒジウム・アニソプリアエ (Metarhizium anisopliae) に由来する。別のさらに好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、例えば本出願の配列番号9の成熟ポリペプチドのアミノ酸配列 (CGMCC 0865) を有する、ブラキスポリエラ (Brachysporiella)、好ましくはブラキスポリエラ・ガヤナ (Brachysporiella gayana) に由来する。メタルヒジウム・アニソプリアエ (Metarhizium anisopliae) 及びブラキスポリエラ・ガヤナ (Brachysporiella gayana) 由来のプロテアーゼのDNA及びアミノ酸配列は、例えば国際公開題04072279号にすでに公開されている。

【0215】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、配列番号7、8又は9のいずれかの成熟ポリペプチドに対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、配列番号7、8又は9のいずれかの成熟ポリペプチドとは、10個以下のアミ

ノ酸、例えば5個のアミノ酸、4個のアミノ酸、3個のアミノ酸、2個のアミノ酸、1個のアミノ酸、異なる。

【0216】

配列番号7の成熟ポリペプチドは、アミノ酸1-188であり得る。配列番号8の成熟ポリペプチドは、アミノ酸187-374であり得る。配列番号9の成熟ポリペプチドは、アミノ酸190-375であり得る。

【0217】

別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、配列番号7の成熟ポリペプチドに対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、配列番号7の成熟ポリペプチドとは、10個以下のアミノ酸、例えば5個のアミノ酸、4個のアミノ酸、3個のアミノ酸、2個のアミノ酸、1個のアミノ酸、異なる。

10

【0218】

少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼの濃度は、食用タンパク質1g当たり、好ましくは100-500,000USPトリプシン単位、より好ましくは500-50,000及び最も好ましくは1,000-20,000USPトリプシン単位であり得る。

【0219】

1USPトリプシン単位は、基質としてN-アセチル-L-チロシンエチルエステル(ATEE)を用いて、pH7.0及び25で、237nmでの吸光度の0.0075の変化を引起す活性である。

20

【0220】

比活性は、異なったトリプシン様エンドペプチダーゼ間で有意に変化するが、しかし当業者は、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼが使用される量を、加水分解の程度に基づいて容易に決定できる。

【0221】

食用タンパク質に対する少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼの比率は、好ましくは0.001-1%w/w、より好ましくは0.001-0.5%、より好ましくは0.005-0.25%、及び最も好ましくは0.01-0.05%である。

30

【0222】

好ましくは、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、エンドペプチダーゼの重量に基づいて添加されるトリプシン様エンドペプチダーゼの濃度の1%-50%である濃度で添加される。1つの好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、トリプシン様エンドペプチダーゼの濃度の2%-20%(w/w)、好ましくは3%-5%である濃度で添加される。別の好ましい態様によれば、少なくとも1つの他のエンドペプチダーゼは、トリプシン様エンドペプチダーゼの濃度の5%-15%、好ましい約10%である濃度で添加される。

【0223】

食用タンパク質加水分解物：

40

加水分解の前の任意の予備段階は、食用タンパク質を含む溶液の予備加熱である。好ましい態様によれば、約75-95で約5-30分の食用タンパク質の加熱を包含する予備処理段階が実施される。別の好ましい態様によれば、135以上で約1-5秒の食用タンパク質の加熱を包含する予備処理段階が実施される。別の好ましい態様によれば、約135で約30-60秒の食用タンパク質の加熱を包含する予備処理段階が実施される。

【0224】

当業者は、好ましくは、加水分解反応のために適用できる条件を知るであろう。その反応は例えば、約40-60の温度で、1-6時間、6.5-8.5のpH、好ましくは6.5-8のpHで実施され得る。

50

【 0 2 2 5 】

好ましい態様によれば、エンドペプチダーゼによる最初の処理に続いて、タンパク質性材料はさらに、第2のタンパク質分解性加水分解、続くエンドペプチダーゼ不活性化にゆだねられる。より好ましい態様によれば、タンパク質性材料は、参照により本明細書に組込まれるアメリカ特許第5,039,532号に開示されるように、第1及び第2タンパク質分解性加水分解の間で熱処理にゆだねられる。

【 0 2 2 6 】

加水分解の条件に関係なく、加水分解物は好ましくは、エンドペプチダーゼの不活性化の追加の段階にゆだねられる。好ましい態様によれば、ペプチダーゼ不活性化は、約70 - 110、好ましくは75 - 95の温度で約0.1 - 30分の熱処理を包含する。他

10

【 0 2 2 7 】

得られる食用タンパク質加水分解物はさらに処理され得る。それは透明化され得る。それは液体状態で貯蔵され得る。加水分解物はまた、限外濾過され得、それは、例えば蒸発により濃縮され得、そしてそれは、例えば噴霧乾燥又は凍結乾燥により乾燥され得る。

【 0 2 2 8 】

好ましい態様によれば、得られる食用タンパク質加水分解物は、中程度の加水分解を有する。別の好ましい態様によれば、得られる食用タンパク質加水分解物は、部分加水分解物である。別の好ましい態様によれば、得られる食用タンパク質加水分解物は、5 - 30

20

【 0 2 2 9 】

加水分解度(DH)は、本発明の方法により得られるタンパク質加水分解の程度を表す。本発明によれば、加水分解度(DH)は、次の通りに定義される：

$$DH = (\text{切断されるペプチド結合の数} / \text{ペプチド結合の合計数}) \times 100\%$$

【 0 2 3 0 】

得られるタンパク質加水分解物の加水分解度(DH)は、Church, F. C. et al. (1983) Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins, J. Dairy Sci. 66: 1219-1227の方法に従っ

30

【 0 2 3 1 】

得られる食用タンパク質加水分解物におけるペプチドの分子量分布は、例えばサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により決定され得る。好ましい態様によれば、本発明の加水分解物は、ペプチドから成り、ここで重量に基づいての1%以下が20,000 kDa以上の分子量を有する。

【 0 2 3 2 】

本発明の方法により得られる食用タンパク質加水分解物は好ましくは、検出できる損なわれていない食用タンパク質を欠いている。加水分解物における損なわれていない食用タンパク質の不在は、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS - PAGE)により示され得る。加水分解物と加水分解されていないタンパク質出発材料との間の直接的比較が同じゲルにおいて行われ得る。好ましい態様によれば、本発明の加水分解物はペプチドから成り、ここで重量に基づく1%以下が損なわれていない食用タンパク質である。

40

【 0 2 3 3 】

本発明の方法により得られる加水分解物の残留抗原性は、酵素結合されたイムノソルベントアッセイ(ELISA)を用いて決定され得る。加水分解されていない食用タンパク質は、アッセイにおいて確立された線状用量応答範囲内にある濃度で固相上に固定される。加水分解調製物も同様に固定される。続いて、ウサギ抗体及びウサギIgGと反応性の酵素接合体との連続的インキュベーションは、抗原的に認識できるタンパク質及びペプチ

50

ドの存在を示す。加水分解物により得られる結果は、加水分解されていないタンパク質出発材料により得られるそれらの結果に、質量に基づいて比較される。次に、加水分解物の%抗原性低下が計算される。

【0234】

好ましい態様によれば、本発明の方法により得られる食用タンパク質加水分解物は、ELISAにより測定される場合、その対応する加水分解されていない食用タンパク質に対して、少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも90%又は少なくとも約95%、最も好ましくは少なくとも約98%及びさらに最も好ましくは少なくとも約99%の抗原性の低下を有する。

【0235】

本発明は、次の実施例によりさらに説明されるが、それらは本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0236】

実施例1：クツネリア・アルビダ (*Kutzneria albida*) からのトリプシン様エンドペプチダーゼのクローニング及び発現：

遺伝子：

クツネリア・アルビダトリプシン様エンドペプチダーゼを、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) において、合成遺伝子から発現した。合成遺伝子配列を、配列番号2 (クツネリア・アルビダ成熟トリプシン様エンドペプチダーゼ) 及びバチルス・サブチリスにおける発現のために最適化されたコドンに基づいて企画した。発現されたDNA配列は配列番号3であった。クツネリア・アルビダトリプシン様エンドペプチダーゼを、生来の分泌シグナルを置換するSavinase (登録商標) 分泌シグナル (次のアミノ酸配列を有する：MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA (配列番号4)) により発現した。配列番号3のヌクレオチド1-81は、Savinase分泌シグナルのDNA配列であり、そしてヌクレオチド82-756は成熟ポリペプチドをコードする。

【0237】

発現ベクター：

ExpVec8を発現ベクターとして使用し、そしてプラスミド地図は図1に示される。そのベクターは、バチルス・サブチリス染色体上の遺伝子コンストラクトのバチルス・サブチリス宿主のペクチン酸リアーゼ遺伝子座中への相同組換えによる組込みを可能にする。前記遺伝子を、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) - アミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) - アミラーゼ遺伝子 (*amyQ*) 及びバチルス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) *cr yIIIA* プロモーター (安定化配列を含む) からのプロモーターから成る三元プロモーター系から発現した (国際公開第99/43835号に記載されるようにして)。ExpVec8は、サビナーゼシグナルペプチド、サビナーゼターミネーター、バチルス・サブチリスにおけるインテグランドの選択を可能にするためのクロラムフェニコール耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子 (*bla*)、カナマイシン耐性遺伝子 (*neo*) 及び複製のE. コリ起点を含む。

【0238】

発現クローニング：

合成遺伝子を含む標準クローニングベクターを用いて、E. コリ (DNAにおけるアデニン及びシトシン残基のメチル化を欠いている、New England BioLabsからのdam-/dcm-) を形質転換した。プラスミドを精製し、そしてClaI及びMluIにより消化し、合成遺伝子を有する挿入体を開放した。ExpVec8を発現ベクターとして使用し、そして同じ制限酵素 (ClaI及びMluI) により消化した。ベクター及び精製されたフラグメントを連結し、そしてE. コリ (Top10、Invitrogen) を形質転換した。前記挿入体を含む発現プラスミドを、前記形質転換体の1つから精製し、そしてバチルス・サブチリスを再び形質転換した。組込まれた発現コンストラクトを含む組換えバチルス・サブチリスクローンを、流体培養下で増

10

20

30

40

50

殖した。上清液を含む酵素を収穫し、そして酵素を実施例 2 に記載のようにして精製した。

【0239】

実施例 2：クツネリア・アルビダからの AC3トリプシン様エンドペプチダーゼの精製及び特徴化：

精製活性アッセイ：

pNA 基質：Boc - VLGR - pNA (Bachem L-1205)

温度：室温(25)

アッセイ緩衝液：100mMの琥珀酸、100mMのHEPES、100mMのCHES、100mMのCABS、1mMのCaCl₂、150mMのKCl、0.01% Triton X-100、pH6.0。 10

【0240】

20μlのプロテアーゼ(0.01% Triton X-100に希釈された)を、マイクロタイタープレートのウェルに分配する。アッセイを、200μlのpNA基質(1.0mlのDMSOに溶解され、そしてさらに、アッセイ緩衝液により90倍に希釈された、50mgのBoc - VLGR - pNA)を添加することにより、開始する。OD₄₀₅の初期上昇を、プロテアーゼ活性の基準としてモニターする。

【0241】

特徴化活性アッセイ：

1) pNAアッセイ：

pNA 基質：Boc - VLGR - pNA (Bachem L-1205)

Suc - AAPF - pNA (Bachem L-1400)

Suc - AAPA - pNA (Bachem L-1775)

Suc - AAPR - pNA (Bachem L-1720)

Suc - AAPD - pNA (Bachem L-1835)

Suc - AAPE - pNA (Bachem L-1710)

Suc - AAPI - pNA (Bachem L-1790)

Suc - AAPL - pNA (Bachem L-1390)

Suc - AAPK - pNA (Bachem L-1725)

Suc - AAPM - pNA (Bachem L-1395) 30

Suc - AAPV - pNA (Bachem L-1770)

温度：室温(25)

アッセイ緩衝液：100mMの琥珀酸、100mMのHEPES、100mMのCHES、100mMのCABS、1mMのCaCl₂、150mMのKCl、HCl又はNaOHによりpH-値 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0及び12.0に調節された0.01% Triton X-100。

【0242】

20μlのプロテアーゼ(0.01% Triton X-100に希釈された)を、100μlのアッセイ緩衝液と共に混合する。アッセイを、100μlのpNA基質(1.0mlのDMSOに溶解され、そしてさらに、0.01% Triton X-100により45倍に希釈された、50mgの基質)を添加することにより、開始する。OD₄₀₅の初期上昇を、プロテアーゼ活性の基準としてモニターする。 40

【0243】

2) Protazyme AKアッセイ：

基質：Protazyme AK 錠剤(架橋され、及び染色されたカゼイン；Megazymeからの)

温度：調節された(アッセイ温度)

アッセイ緩衝液：100mMの琥珀酸、100mMのHEPES、100mMのCHES、100mMのCABS、1mMのCaCl₂、150mMのKCl、HCl又はNaOHによりpH-値 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7 50

. 0、8 . 0、9 . 0、1 0 . 0、1 1 . 0 及び 1 2 . 0 に調節された 0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0。

【 0 2 4 4 】

Protozyme AK錠剤を、軽く撈拌しながら、2 . 0 m l の 0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 に懸濁する。5 0 0 μ l のこの懸濁液及び 5 0 0 μ l のアッセイ緩衝液を、エッペンチューブにおいて混合し、そして氷上に置く。2 0 μ l のプロテアーゼサンプル (0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 に希釈された) を添加する。アッセイを、アッセイ温度に設定されているエッペンサーモミキサーに前記エッペンチューブを移すことにより開始する。チューブを、最高の振盪速度 (1 4 0 0 r p m) でエッペンサーモミキサー上で 1 5 分間インキュベートする。インキュベーションを、そのチューブを氷浴に移すことにより、停止する。次に、チューブを、氷冷却された遠心分離機において数分間、遠心分離し、そして 2 0 0 μ l の上清液をマイクロタイタープレートに移した。O D _{6 5 0} をプロテアーゼ活性の基準として読取る。緩衝液ブランクがアッセイに含まれる (酵素の代わりに) 。

【 0 2 4 5 】

クツネリア・アルピダからの A C 3 トリプシン様プロテアーゼの精製：

実施例 1 からの培養物ブイオンを遠心分離し (2 0 0 0 0 \times g、2 0 分)、そして上清液を注意して、沈殿物からデカントした。組合された上清液を、パチルス宿主細胞の残りを除くために、Nalgene 0 . 2 μ m 濾過ユニットを通して濾過した。0 . 2 μ l の濾液を、固形硫酸アンモニウムを添加し、3 . 4 M の最終 (N H ₄) ₂ S O ₄ 濃度にするにより、その硫酸アンモニウムにより沈殿した。形成された沈殿物を、遠心分離 (2 0 0 0 0 \times g、2 0 分) により集め、そして沈殿物を、最少体積の脱イオン水に溶解した。その溶液を、5 0 m M の H ₃ B O ₃、5 m M の M E S、1 m M の C a C l ₂、p H 6 を含む G 2 5 Sephadex (登録商標) カラムに移し、そして同じ緩衝液下で平衡化された S - Sepharose H P (登録商標) カラムに適用した。平衡化緩衝液によりカラムを広範囲にわたって洗浄した後、プロテアーゼを同じ緩衝液において溶離し、線状 N a C l グラジエント (0 . 5 M) を有した。カラムからの画分を、プロテアーゼ活性について分析した (精製活性アッセイ)。固形硫酸アンモニウムを、S - Sepharose H P カラムからの B O C - V L G R - p N A 活性ピークに添加し、酵素溶液中、1 . 6 M の最終 (N H ₄) ₂ S O ₄ 濃度を得た。酵素溶液を、(N H ₄) ₂ S O ₂ 添加の際、磁気撈拌機により軽く混合し、そして撈拌を、前記添加の後、3 0 分間続け、システムを平衡化した。次に、酵素溶液を、5 0 m M の H ₃ B O ₃、1 0 m M の M E S、2 m M の C a C l ₂、1 . 6 M の (N H ₄) ₂ S O ₄、p H 6 により平衡化されたフェニル - Sepharose F F (high sub) カラムに適用した。平衡化緩衝液によりカラムを広範囲にわたって洗浄した後、A C 3 トリプシンプロテアーゼを同じ緩衝液において溶離し、線状 (N H ₄) S O ₄ グラジエント (1 . 6 0 M) を得た。カラムからの画分を、プロテアーゼ活性について分析し (精製活性アッセイ)、そして活性画分をさらに、S D S - P A G E により分析した。クーマシー染色された S D S - P A G E ゲル上に見出される唯一 1 つのバンドである画分をプールし、そして 1 0 0 m M の H ₃ B O ₃、1 0 m M の M E S、2 m M の C a C l ₂、p H 6 を含む G 2 5 Sephadex カラム上に精製された調製物として移し、そしてさらなる特徴化のために使用した。

【 0 2 4 6 】

特徴化：p H - 活性、p H - 安定性及び温度 - 活性：

p N A アッセイを、B o c - V L G R - p N A 及び S u c - A A R R - p N A 上での p H - 活性プロフィール及び p H - 安定性プロフィールを得るために使用した。p H - 安定性プロフィールに関しては、プロテアーゼを、アッセイ緩衝液により 1 0 倍に希釈し、そして 3 7 ° で 2 時間インキュベートした。インキュベーションの後、プロテアーゼサンプルを、残留活性についてのアッセイの前、p H 9 のアッセイ緩衝液による希釈により p H 9 にした。Protozyme AKアッセイを、3 7 ° での p H - 活性プロフィール及び p H 7 での温度 - 活性プロフィールを得るために使用した。それらの結果は下記表 1 - 3 に示される。表 1 については、活性は、個々の基質のための酵素についての最適 p H に関してである

。表 2 については、活性は、安定条件（5℃、pH 9）で維持されるサンプルに関してである。表 3 については、活性は、酵素についての pH 7 での最適温度に関してである。

【0247】

【表 1】

表 1：pH-活性プロフィール：

pH	Boc-VLGR-pNA に対する AC3 トリプシン	Suc-AARR-pNA に対する AC3 トリプシン	Protazyme AK に対する AC3 トリプシン
2	0.00	0.00	0.00
3	0.01	0.01	0.00
4	0.06	0.04	0.00
5	0.30	0.14	0.01
6	0.79	0.41	0.67
7	1.00	0.66	1.00
8	0.87	0.96	0.71
9	0.77	1.00	0.50
10	0.61	0.97	0.28
11	0.48	0.86	0.16
12	0.00	—	—

【0248】

【表 2】

表 2：pH-安定性プロフィール：

pH	AC3 トリプシン
2.0	0.00
2.5	0.00
3.0	0.78
3.5	1.01
4.0	1.01
5.0	1.00
6.0	1.00
7.0	0.99
8.0	0.98
9.0	0.99
10.0	1.03
11.0	0.61
12.0	0.01
9.0 及び 5℃での 2 時間後	1.00

【0249】

【表 3】

表 3 : pH 7. 0 での温度活性プロフィール :

温度 (°C)	Protazyme AK に対する AC 3 トリブシン
15	0. 05
25	0. 07
37	0. 20
50	0. 45
60	1. 00
70	0. 74
80	0. 19

10

【 0 2 5 0 】

特徴化 : Suc - AAPX - pNA 基質に対する P 1 - 特異性及びトリブシン比率の計算

:

pNA アッセイを、2 種の異なった pH 値 : pH 7. 0 及び pH 9. 0 での 10 種の Suc - AAPX - pNA 基質を用いて、AC 3 トリブシンプロテアーゼについての P 1 - 特異性を得るために使用した。活性をまた、国際公開第 2010 / 112546 号に定義されるように、トリブシン比率を計算するために使用した。それらの結果は下記表 4 に示される。表 4 については、個々の Suc - AAPX - pNA 基質についての活性は、最良の Suc - AAPX - pNA 基質 (Suc - AAPR - pNA) についての活性に関してである。

20

【 0 2 5 1 】

【表 4】

表 4 : Suc - AAPX - pNA に対する特異性及びトリブシン比率 :

Suc - AAPX - pNA	AC 3 トリブシン pH 7	AC 3 トリブシン pH 9
Suc - AAPA - pNA	0. 00001	0. 00000
Suc - AAPR - pNA	1. 00000	1. 00000
Suc - AAPD - pNA	0. 00000	0. 00000
Suc - AAP I - pNA	0. 00000	0. 00000
Suc - AAPM - pNA	0. 00002 (0. 0000151)	0. 00001 (0. 0000113)
Suc - AAPV - pNA	0. 00000	0. 00000
Suc - AAPL - pNA	0. 00001	0. 00000
Suc - AAPE - pNA	0. 00001	0. 00000
Suc - AAPK - pNA	0. 67242	0. 49569
Suc - AAPF - pNA	0. 00001	0. 00001 (0. 0000086)
Suc - AAP (R/K) - pNA の最大		1. 00000
Suc - AAPnon (R/K) - pNA の最大		0. 00001 (0. 0000113)
トリブシン比率	66000	88000

30

40

【 0 2 5 2 】

50

他の特徴：

AC3トリプシンプロテアーゼを、アプロチニンにより阻害する。SDS-PAGEにより測定される場合の相対的分子量は、 $M_r = 26\text{ kDa}$ であった。そのN-末端配列を、IVGGTKASTSTYとして測定した。完全な(intact)分子量は、 $M_w = 23087.6\text{ Da}$ であることが測定された。それらのデータは、成熟AC3トリプシンプロテアーゼが次の配列(配列番号2のアミノ酸1-225)を有する：

IVGGTKASTSTY PFWFLTDSTGFQFCGGTLVKPNKVVTAA
HCTVGE SAANIRWAGRDDKQSTAGTVSKVSKIWIHPSTYQD
ATKGS DVS VLTSLTQFTPLPLAATTDTALYKEGTAAT
ILGWGDTTEGGSA SRYLLKATVPLTSDATCKKAYGEYSST
AMVCAGYPQGGTDTCQGDSGGPLVAGNKLIGITSWGQGCA
EAGYPGVYTRVATYSSSLITQQLG。

10

【0253】

実施例3：クツネリア・アルピダからのAC3トリプリン様エンドペプチダーゼの切断特異性分析：

序論：

微生物トリプシン様エンドペプチダーゼAC3のタンパク質分解切断特異性を、ブタトリプシンと比較した。切断特異性分析を、Daiscp Food Internationalからの生来のモデル基質ウシBioPURE - ラクトアルブミンと共に、前記エンドペプチダーゼのインキュベーションにより実施した。得られるタンパク質分解ペプチドのペプチドプロファイルを、RP-HPLC分離及び214nmでのUVシグナル検出により決定した。

20

【0254】サンプル：

プロテアーゼ：ブタトリプシン (UniProt受託：P00761)

AC3(クツネリア・アルピダからのトリプシン様エンドプロテアーゼ)

基質：Daviscoからの ラクトアルブミン、BE-2009-00036、Davisco Foods internationalからの97%タンパク質

【0255】タンパク質分解：

1gの ラクトアルブミンを、17.6mlの5mMの CaCl_2 に溶解した。そのサンプルを55 に加熱し、そしてpHを0.25MのNaOHにより7.5に調節した。酵素を、1gの ラクトアルブミン当たり2gの酵素の比率で添加した。pH滴定を、Titralab 856上で120分間、実施した。200 μl のサンプルを、120分後に取り、そして2.2 μl のトリフルオロ酢酸(TFA)の添加により停止した。サンプルを、RP-HPLC分析の前、-20 で貯蔵した。

30

【0256】RP-HPLC分析：

タンパク質分解サンプルを、Waters C18カラム (ACQUITY UPLC (登録商標) BEH C18、1.7 μm 、2.1 \times 100mm)

及びThermo ScientificからのAccele液体クロマトグラフィーシステムから成るRP-HPLCシステム上で分析した。すべてのサンプルを、0.1%TFAにより5倍に希釈した(10 μl のサンプル+40 μl の0.1%TFA)。5 μl の体積をカラム上に注入した。

40

【0257】

ペプチドを次のグラジエントにより分離した：

すべてのサンプルを5倍に希釈した。注入体積：5 μl 。溶媒A：UHQ水中、0.1%TFA(CAS番号76-05-1)及び溶媒B：アセトニトリル中、0.08%TFA(CAS番号75-05-8)。

【0258】

【表 5】

時間 (分)	% B 溶媒
0	5
2	5
4 9	5 0
5 1	9 0
5 3	9 0
5 5	5
6 0	5

10

【 0 2 5 9 】

溶出するペプチドを、214 nm で UV - 検出器によりオンラインでモニターした。

結果：

比較のために、AC3 アッセイ（上部トレース）の UV - クロマトグラムを、ブタトリプシンアッセイ（底部トレース）と共に、図 2 に示す。

【 0 2 6 0 】

結論：

AC3 により加水分解された ラクトアルブミンの RP - HPLC ペプチドプロファイルは、ブタトリプシンにより生成されるペプチドプロファイルに類似し；従って AC3 はトリプシン様特異性を有する。

20

【 0 2 6 1 】

実施例 4：ブタ由来のトリプシンに比較しての AC3 トリプシン様プロテアーゼによるホエータンパク質濃縮物及び ラクトアルブミンの加水分解：

材料：

ホエータンパク質濃縮物 (WPC)、80% 乾燥物タンパク質、Lacprodan 80、Aria Foods Ingredients、DK

ラクトアルブミン (ALA)、97% 乾燥物タンパク質、Davisco Foods International、MN、US

30

CaCl₂ 無水物、Merck art 2387

NaOH、Prolabo 31627.368

【 0 2 6 2 】

加水分解アッセイ：

17.6 ml の 5 mM の CaCl₂ に溶解された 1 g の - ラクトアルブミン、又は 17.4 ml の 5 mM の CaCl₂ 中、1.2 g の Lacprodan80 を生成し、5% の最終タンパク質濃度を得た。

【 0 2 6 3 】

サンプルを 55 に加熱し、そして pH を 7.5 に調節した。pH 調節のために消費される NaOH 体積を記録した。酵素を添加し、そして pP 滴定を Titralab856 (Radiometer) 上で 120 分間、実施した。NaOH 消費をモニターし、そして %DH に転換した。

40

【 0 2 6 4 】

加水分解度：

懸濁液の加水分解度を、Adler-Nissen, J. 1986, Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins, Chapter 6 に記載のようにして、pH スタットにより測定した。

【 0 2 6 5 】

切断されるペプチド結合の % として定義される加水分解度 (DH) を、次の pH - スタット技法によりモニターすることができる： $DH = h / h_{t.o.t} \times 100$

式中、h：反応の間、消費される塩基の量に比例しての、切断されるペプチド結合の数。

50

h_{tot} : アミノ酸消費から計算されるタンパク質におけるペプチド結合の数。
 ALAについての $h_{tot} = 8.16$ 、及びWPCについての $h_{tot} = 8.8$
 $h = B \times Nb \times 1 / \quad \times 1 / Mp$
 B = 塩基消費 (ml)
 Nb = 塩基の規定度 (0.25 N)
 $1 / \quad = \quad -NH_2$ 基の平均解離度
 Mp = タンパク質質量 (g)、(N × Kjeldahl 因子)

【0266】

【表6】

10

使用されるエンドペプチダーゼ:

酵素	トリプシン濃度 (mg/ml)
クツネラ・アルピダからのAC3トリプシン様プロテアーゼ	1.3 mg/ml
ブタトリプシンからクロマトグラフィーにより精製されたトリプシン (PTN6.0S)	9.5 mg/ml

【0267】

データ:

【表7】

20

ALA:

	用量	DH (120分)
クツネラ・アルピダからのAC3トリプシン様プロテアーゼ	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	6.9
ブタトリプシンからクロマトグラフィーにより精製されたトリプシン (PTN6.0S)	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	9.0

30

【0268】

【表8】

WPC:

	用量	DH (120分)
クツネラ・アルピダからのAC3トリプシン様プロテアーゼ	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	6.0
ブタトリプシンからクロマトグラフィーにより精製されたトリプシン (PTN6.0S)	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	7.6

40

【0269】

結論:

ホエータンパク質画分 ラクトアルブミン及びホエータンパク質濃縮物の両者においては、PTN6.0Sからクロマトグラフィー精製されたブタトリプシンを用いる場合と、微生物由来のAC3トリプシン様プロテアーゼを用いる場合と同じ範囲で加水分解度(DH)を得ることが可能であると思われる。

【0270】

50

実施例 5 : アクチノシンネマ・ミルム (Actinosynnema mirum) からのトリプシン様エンドペプチダーゼの精製及び特徴化 :

精製活性アッセイ :

pNA 基質 : Suc - AAPR - pNA (Bachem L-1720)

温度 : 室温 (25 °C)

アッセイ緩衝液 : 100 mM の琥珀酸、100 mM の HEPES、100 mM の CHES、100 mM の CABS、1 mM の CaCl_2 、150 mM の KCl、0.01 % Triton X-100、pH 9.0。

【0271】

20 μl のプロテアーゼ (0.01 % Triton X-100 に希釈された) を、
マイクロタイタープレートのウェルに分配する。アッセイを、200 μl の pNA 基質 (1.0 ml の DMSO に溶解され、そしてさらに、アッセイ緩衝液により 90 倍に希釈された、50 mg の Suc - AAPR - pNA) を添加することにより、開始する。OD₄₀₅ の初期上昇を、プロテアーゼ活性の基準としてモニターする。

10

【0272】

特徴化活性アッセイ :

1) pNA アッセイ :

pNA 基質 : Suc - AAPR - pNA (Bachem L-1720)

Suc - AAPF - pNA (Bachem L-1400)

Suc - AAPA - pNA (Bachem L-1775)

Suc - AAPD - pNA (Bachem L-1835)

Suc - AAPE - pNA (Bachem L-1710)

Suc - AAPI - pNA (Bachem L-1790)

Suc - AAPL - pNA (Bachem L-1390)

Suc - AAPK - pNA (Bachem L-1725)

Suc - AAPM - pNA (Bachem L-1395)

Suc - AAPV - pNA (Bachem L-1770)

20

温度 : 室温 (25 °C)

アッセイ緩衝液 : 100 mM の琥珀酸、100 mM の HEPES、100 mM の CHES、100 mM の CABS、1 mM の CaCl_2 、150 mM の KCl、HCl 又は NaOH により pH-値 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、及び 11.0 に調節された 0.01 % Triton X-100

30

【0273】

20 μl のプロテアーゼ (0.01 % Triton X-100 に希釈された) を、
100 μl のアッセイ緩衝液と共に混合する。アッセイを、100 μl の pNA 基質 (1.0 ml の DMSO に溶解され、そしてさらに、0.01 % Triton X-100 により 45 倍に希釈された、50 mg の基質) を添加することにより、開始する。OD₄₀₅ の初期上昇を、プロテアーゼ活性の基準としてモニターする。

【0274】

2) Protazyme AK アッセイ :

基質 : Protazyme AK 錠剤 (架橋され、及び染色されたカゼイン; Megazyme からの)

温度 : 調節された (アッセイ温度)

アッセイ緩衝液 : 100 mM の琥珀酸、100 mM の HEPES、100 mM の CHES、100 mM の CABS、1 mM の CaCl_2 、150 mM の KCl、HCl 又は NaOH により pH-値 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、及び 11.0 に調節された 0.01 % Triton X-100

40

【0275】

Protozyme AK 錠剤を、軽く攪拌しながら、2.0 ml の 0.01 % Triton X-100 に懸濁する。500 μl のこの懸濁液及び 500 μl のアッセイ緩衝液を、エッペンチュ

50

ープにおいて混合し、そして氷上に置く。20 μ lのプロテアーゼサンプル(0.01% Triton X-100に希釈された)を添加する。アッセイを、アッセイ温度に設定されているエッペンサーモミキサーに前記エッペンチューブを移すことにより開始する。チューブを、最高の振盪速度(1400 rpm)でエッペンサーモミキサー上で15分間インキュベートする。インキュベーションを、そのチューブを氷浴に移すことにより、停止する。次に、チューブを、氷冷却された遠心分離機において数分間、遠心分離し、そして200 μ lの上清液をマイクロタイタープレートに移した。OD₆₅₀をプロテアーゼ活性の基準として読取る。緩衝液ブランクがアッセイに含まれる(酵素の代わりに)。

【0276】

株RBPO0013からのトリプシン様プロテアーゼの精製:

10

RBPO0013は、アクチノシンネマ・ミルム(Actinosynnema mirum)からの成熟トリプシン様プロテアーゼを、培養培地に発現するよう構築されたバチルス・サブチリス株であり、このアミノ酸配列は、本出願の配列番号5として示される。

【0277】

RBPO0013培養ブイオンを遠心分離し(20000 \times g、20分)、そして上清液を沈殿物から注意してデカントした。組合された上清液を、Nalgeneの0.2 μ mのフィルターを通して濾過し、バチルス宿主細胞の残りを除いた。固形硫酸アンモニウムを、0.2 μ mの濾液に添加し、1.8 Mの最終(NH)₄SO₄濃度にした。濾液を、(NH)₄SO₄添加の間、磁気攪拌機により軽く混合し、そして添加の後、攪拌を30分間続け、システムを平衡化した。次に、その溶液を、100 mMのH₃BO₃、10 mMのMES、2 mMのCaCl₂、1.8 Mの(NH)₄SO₄、pH 6により平衡化されたPhenyl Toyopearl 650Sカラム(TosoHaas)に適用した。カラムを平衡化緩衝液により広範囲にわたって洗浄した後、トリプシン様プロテアーゼを溶離し、同じ緩衝液中、線状(NH)₄SO₄グラジエント(1.6 OM)を得た。カラムの画分を、トリプシン様プロテアーゼ活性について分析し(精製活性アッセイ)、そして主要活性ピークを形成する画分をプールした。Phenyl Toyopearlカラムからのプールを、50 mMのH₃BO₃、5 mMのMES、1 mMのCaCl₂、pH 6を含むG25 Sephadexカラム(GE Healthcare)上に移し、そして同じ緩衝液下で平衡化されたS-Sepharose FFカラム(GE Healthcare)に適用した。カラムを平衡化緩衝液により広範囲にわたって洗浄した後、プロテアーゼを溶離し、同じ緩衝液中、線状NaClグラジエント(0.0.5 M)を得た。カラムからの画分を、トリプシン様プロテアーゼ活性について分析し(精製活性アッセイ)、そして活性画分をさらに、SDS-PAGEにより分析した。クーマシー染色されたSDS-PAGEゲル上で少なくとも90%の純度であると見られる画分をプールし、そしてさらなる特徴化のために使用した。

20

30

【0278】

特徴化: pH - 活性、pH - 安定性及び温度 - 活性:

pNAアッセイを、Suc-AAPR-pNA上でのpH - 活性プロファイル及びpH - 安定性プロファイルを得るために使用した。pH - 安定性プロファイルに関しては、プロテアーゼを、アッセイ緩衝液により10倍に希釈し、そして37で2時間インキュベートした。インキュベーションの後、プロテアーゼサンプルを、残留活性についてのアッセイの前、pH 9のアッセイ緩衝液による希釈によりpH 9にした。Protazyme AKアッセイを、pH 7での温度 - 活性プロファイルを得るために使用した。それらの結果は下記表5 - 7に示される。表5については、活性は、個々の基質のための酵素についての最適pHに関してである。表6については、活性は、安定条件(5、pH 9)で維持されるサンプルに関してである。表7については、活性は、酵素についてのpH 7での最適温度に関してである。

40

【0279】

【表 9】

表 5 : pH-活性プロフィール :

pH	アクチノシンネマ・ミルムトリ プシン
2	0. 0 0
3	0. 0 0
4	0. 0 2
5	0. 1 2
6	0. 2 8
7	0. 4 8
8	0. 8 6
9	1. 0 0
1 0	0. 9 8
1 1	0. 7 7

10

【 0 2 8 0 】

【表 1 0】

20

表 6 : pH-安定性プロフィール (3.7℃での2時間後の残留活性) :

pH	アクチノシンネマ・ミルムトリ プシン
2. 0	0. 0 0
3. 0	0. 2 8
4. 0	1. 0 0
5. 0	1. 0 3
6. 0	1. 0 5
7. 0	1. 0 3
8. 0	1. 0 2
9. 0	1. 0 1
1 0. 0	0. 9 5
1 1. 0	0. 2 5
9. 0 及び 5℃での2時間後	1. 0 0

30

【 0 2 8 1 】

【表 1 1】

表 7 : pH 7. 0 での温度活性プロフィール :

温度 (°C)	アクチノシンネマ・ミルムトリブシン
15	0. 01
25	0. 01
37	0. 05
50	0. 33
60	1. 00
70	0. 52
80	0. 07

10

【 0 2 8 2 】

特徴化 : Suc - AAPX - pNA 基質に対する P 1 - 特異性及びトリブシン比率の計算

:

pNA アッセイを、pH 9. 0 での 10 種の Suc - AAPX - pNA 基質を用いて、アクチノシンネマ・ミルムからのトリブシンプロテアーゼについての P 1 - 特異性を得るために使用した。活性をまた、国際公開第 2 0 1 0 / 1 1 2 5 4 6 号に定義されるように、トリブシン比率を計算するために使用した。それらの結果は下記表 8 に示される。表 8 については、個々の Suc - AAPX - pNA 基質についての活性は、最良の Suc - AAPX - pNA 基質 (Suc - AAPR - pNA) についての活性に関してである。

20

【 0 2 8 3 】

【表 1 2】

表 8 : Suc - AAPX - pNA に対する特異性及びトリブシン比率 :

Suc - AAPX - pNA	アクチノシンネマ・ミルムトリブシン
Suc - AAPA - pNA	0. 00000
Suc - AAPR - pNA	1. 00000
Suc - AAPD - pNA	0. 00000
Suc - AAP I - pNA	0. 00000
Suc - AAPM - pNA	0. 00005
Suc - AAPV - pNA	0. 00000
Suc - AAPL - pNA	0. 00003
Suc - AAPE - pNA	0. 00000
Suc - AAPK - pNA	0. 40723
Suc - AAPF - pNA	0. 00013
Suc - AAPF - pNA	0. 00013 (0. 0001315)
Suc - AAP (R/K) - pNA の最大	1. 00000
Suc - AAPnon (R/K) - pNA の最大	0. 00013 (0. 0001315)
トリブシン比率	7600

30

40

50

【 0 2 8 4 】

他の特徴：

アクチノシンネマ・ミルムからのトリプシン様プロテアーゼを、P M S Fにより阻害する。S D S - P A G Eにより測定される場合の相対的分子量は、 $M_r = 26 \text{ kDa}$ であった。そのN - 末端配列を、I V G G T R Aとして測定した。完全な分子量は、 $M_w = 22460.9 \text{ Da}$ であることが測定された。それらのデータは、アクチノシンネマ・ミルムからの成熟トリプシン様プロテアーゼが次の配列（配列番号5のアミノ酸38 - 261）を有する：

I V G G T R A S I S E A P W T V Y L A S S S G S Q F C G G T L V K A N K W T A A
H C V A G R S A S S T R V V I G R E D K Q S T A G T V A T V S G I W S H P S Y R
T A T S G Y D V A V L T L G T S V S G T Y L P L A T P S D T A L Y A A G T N A V
A Y G W G A T C S G C S T S R Y L L K V T V P V T S D A T C K T A Y S Q Y S N T
S M V C A G V P A G G K D T C Q G D S G G P L V A G G K L I G A T S W G N G C A
L P N Y P G V Y A R V A A Y Y S V L S A Q I G。

10

【 0 2 8 5 】

実施例6：クリベラ・フラビダ (*Kribbella flavida*) からのトリプシン様エンドペプチダーゼの精製及び特徴化：

精製活性アッセイ：

p N A 基質：S u c - A A P R - p N A (Bachem L-1720)

温度：室温 (25)

20

アッセイ緩衝液：100 mMの琥珀酸、100 mMの H E P E S、100 mMの C H E S、100 mMの C A B S、1 mM の C a C l₂、150 mMの K C l、0.01 % T r i t o n X - 100、pH 9.0。

【 0 2 8 6 】

20 μ lのプロテアーゼ (0.01 % T r i t o n X - 100に希釈された) を、マイクロタイタープレートのウェルに分配する。アッセイを、200 μ lのp N A 基質 (1.0 mlのDMSOに溶解され、そしてさらに、アッセイ緩衝液により90倍に希釈された、50 mgのS u c - A A P R - p N A) を添加することにより、開始する。OD₄₀₅の初期上昇を、プロテアーゼ活性の基準としてモニターする。

30

【 0 2 8 7 】

特徴化活性アッセイ：

1) p N A アッセイ：

p N A 基質：S u c - A A P R - p N A (B a c h e m L - 1720)

S u c - A A P F - p N A (B a c h e m L - 1400)

S u c - A A P A - p N A (B a c h e m L - 1775)

S u c - A A P D - p N A (B a c h e m L - 1835)

S u c - A A P E - p N A (B a c h e m L - 1710)

S u c - A A P I - p N A (B a c h e m L - 1790)

S u c - A A P L - p N A (B a c h e m L - 1390)

S u c - A A P K - p N A (B a c h e m L - 1725)

S u c - A A P M - p N A (B a c h e m L - 1395)

S u c - A A P V - p N A (B a c h e m L - 1770)

40

温度：室温 (25)

アッセイ緩衝液：100 mMの琥珀酸、100 mMの H E P E S、100 mMの C H E S、100 mMの C A B S、1 mM の C a C l₂、150 mMの K C l、H C l又はNaOHによりpH-値 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、及び11.0に調節された0.01 % T r i t o n X - 100

【 0 2 8 8 】

20 μ lのプロテアーゼ (0.01 % T r i t o n X - 100に希釈された) を、100 μ lのアッセイ緩衝液と共に混合する。アッセイを、100 μ lのp N A 基質 (1

50

． 0 m l の D M S O に溶解され、そしてさらに、 0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 により 4 5 倍に希釈された、 5 0 m g の基質) を添加することにより、開始する。 O D _{4 0 5} の初期上昇を、プロテアーゼ活性の基準としてモニターする。

【 0 2 8 9 】

2) Protazyme AK アッセイ :

基質 : Protazyme AK 錠剤 (架橋され、及び染色されたカゼイン ; Megazyme からの)

温度 : 調節された (アッセイ温度)

アッセイ緩衝液 : 1 0 0 m M の琥珀酸、 1 0 0 m M の H E P E S 、 1 0 0 m M の C H E S 、 1 0 0 m M の C A B S 、 1 m M の C a C l ₂ 、 1 5 0 m M の K C l 、 H C l 又は N a O H により p H - 値 2 . 0 、 2 . 5 、 3 . 0 、 3 . 5 、 4 . 0 、 5 . 0 、 6 . 0 、 7 . 0 、 8 . 0 、 9 . 0 、 1 0 . 0 、 及び 1 1 . 0 に調節された 0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0

【 0 2 9 0 】

Protozyme AK 錠剤を、軽く攪拌しながら、 2 . 0 m l の 0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 に懸濁する。 5 0 0 μ l のこの懸濁液及び 5 0 0 μ l のアッセイ緩衝液を、エッペンチューブにおいて混合し、そして氷上に置く。 2 0 μ l のプロテアーゼサンプル (0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 に希釈された) を添加する。アッセイを、アッセイ温度に設定されているエッペンサーモミキサーに前記エッペンチューブを移すことにより開始する。チューブを、最高の振盪速度 (1 4 0 0 r p m) でエッペンサーモミキサー上で 1 5 分間インキュベートする。インキュベーションを、そのチューブを氷浴に移すことにより、停止する。次に、チューブを、氷冷却された遠心分離機において数分間、遠心分離し、そして 2 0 0 μ l の上清液をマイクロタイタープレートに移した。 O D _{6 5 0} をプロテアーゼ活性の基準として読取る。緩衝液ブランクがアッセイに含まれる (酵素の代わりに)。

【 0 2 9 1 】

株 T H F F 0 0 3 7 からのトリプシン様プロテアーゼの精製 :

T H F F 0 0 3 7 は、クリベラ・フラビダ (*Kribbella flavida*) からの成熟トリプシン様プロテアーゼを、培養培地に発現するよう構築されたパチルス・サブチリス株であり、このアミノ酸配列は、本出願の配列番号 6 として示される。

【 0 2 9 2 】

T H F F 0 0 3 7 培養ブイオンを遠心分離し (2 0 0 0 0 \times g 、 2 0 分) 、そして上清液を沈殿物から注意してデカントした。組合された上清液を、Nalgene の 0 . 2 μ m のフィルターを通して濾過し、パチルス宿主細胞の残りを除いた。固形硫酸アンモニウムを、 0 . 2 μ m の濾液に添加し、 1 . 5 M の最終 (N H) ₂ S O ₄ 濃度にした。濾液を、 (N H ₄) ₂ S O ₄ 添加の間、磁気攪拌機により軽く混合し、そして添加の後、攪拌を 3 0 分間続け、システムを平衡化した。次に、その溶液を、 1 0 0 m M の H ₃ B O ₃ 、 1 0 m M の M E S 、 2 m M の C a C l ₂ 、 1 . 5 M の (N H ₄) ₂ S O ₄ 、 p H 6 により平衡化された Phenyl Toyopearl 650S カラム (TosoHaas) に適用した。カラムを平衡化緩衝液により広範囲にわたって洗浄した後、トリプシン様プロテアーゼを溶離し、同じ緩衝液中、線状 (N H ₄) ₂ S O ₄ グラジエント (1 . 5 0 M) を得た。カラムの画分を、トリプシン様プロテアーゼ活性について分析し (精製活性アッセイ) 、そして主要活性ピークを形成する画分をプールした。 Phenyl Toyopearl カラムからのプールを、 5 0 m M の H ₃ B O ₃ 、 5 m M の M E S 、 1 m M の C a C l ₂ 、 p H 6 を含む G 2 5 Sephadex カラム (G E Healthcare) 上に移し、そして p H を、 2 0 % C H ₃ C O O H により p H 4 . 5 に調節した。 p H 調節された溶液を、 1 0 m M の C H ₃ C O O H / N a O H 、 1 m M の C a C l ₂ 、 p H 4 . 5 により平衡化された S O U R C E S カラム (G E Healthcare) に適用した。カラムを平衡化緩衝液により広範囲にわたって洗浄した後、プロテアーゼを溶離し、同じ緩衝液中、線状 (N H ₄) ₂ S O ₄ グラジエント (0 . 5 M) を得た。カラムからの画分を、トリプシン様プロテアーゼ活性について分析し (精製活性アッセイ) 、そして活性ピークを形成する画分をプールした。 S O U R C E S カラムからのプールを、 1 0 0 m M の H ₃ B O ₃ 、 1 0 m M の M E S 、 2 m M の C a C l ₂ 、 1 0 0 m M の N a

C1、pH 6により平衡化されたSuperdex 75カラム（GE Healthcare）に適用した。カラムを同じ緩衝液により溶離し、カラムからの画分をトリプシン様プロテアーゼ活性について分析し（精製活性アッセイ）、そして活性画分をさらに、SDS-PEGEにより分析した。クーマシー染色されたSDS-PAGEゲル上で少なくとも90%の純度であることが見出された画分をプールし、そしてさらなる特徴化のために使用した。

【0293】

特徴化：pH - 活性、pH - 安定性及び温度 - 活性：

pNAアッセイを、Suc-AAPR-pNA上でのpH - 活性プロフィール及びpH - 安定性プロフィールを得るために使用した。pH - 安定性プロフィールに関しては、プロテアーゼを、アッセイ緩衝液により10倍に希釈し、そして37℃で2時間インキュベートした。インキュベーションの後、プロテアーゼサンプルを、残留活性についてのアッセイの前、pH9のアッセイ緩衝液による希釈によりpH9にした。Protazyme AKアッセイを、pH7での温度 - 活性プロフィールを得るために使用した。それらの結果は下記表9 - 11に示される。表9については、活性は、個々の基質のための酵素についての最適pHに関してである。表10については、活性は、安定条件（5℃、pH9）で維持されるサンプルに関してである。表11については、活性は、酵素についてのpH7での最適温度に関してである。

【0294】

【表13】

表9：pH-活性プロフィール：

pH	クリベラ・フラビダトリプシン
2	0.00
3	0.00
4	0.01
5	0.07
6	0.29
7	0.60
8	0.83
9	0.93
10	1.00
11	0.90

【0295】

【表 1 4】

表 1 0 : p H - 安定性プロフィール (3 7 ° C での 2 時間後の残留活性) :

p H	クリベラ・フラビダトリプシン
2 . 0	0 . 1 9
3 . 0	0 . 3 7
4 . 0	0 . 6 6
5 . 0	0 . 9 1
6 . 0	0 . 9 6
7 . 0	0 . 9 5
8 . 0	0 . 9 5
9 . 0	0 . 8 6
1 0 . 0	0 . 4 8
1 1 . 0	0 . 0 1
9 . 0 及び 5 ° C での 2 時間後	1 . 0 0

10

【 0 2 9 6 】

【表 1 5】

20

表 1 1 : p H 7 . 0 での温度活性プロフィール :

温度 (°C)	クリベラ・フラビダトリプシン
1 5	0 . 0 4
2 5	0 . 1 0
3 7	0 . 3 0
5 0	1 . 0 0
6 0	0 . 2 7
7 0	0 . 1 2

30

【 0 2 9 7 】

特徴化 : S u c - A A P X - p N A 基質に対する P 1 - 特異性及びトリプシン比率の計算 :

p N A アッセイを、p H 9 . 0 での 1 0 種の S u c - A A P X - p N A 基質を用いて、アクチノシンネマ・ミルムからのトリプシンプロテアーゼについての P 1 - 特異性を得るために使用した。活性をまた、国際公開第 2 0 1 0 / 1 1 2 5 4 6 号に定義されるように、トリプシン比率を計算するために使用した。それらの結果は下記表 1 2 に示される。表 1 2 については、個々の S u c - A A P X - p N A 基質についての活性は、最良の S u c - A A P X - p N A 基質 (S u c - A A P R - p N A) についての活性に関してである。

40

【 0 2 9 8 】

【表 16】

表12：pH9でのSuc-AAPX-pNAに対する特異性及びトリプシン比率：

Suc-AAPX-pNA	クリベラ・フラビダトリプシン
Suc-AAPA-pNA	0.00001
Suc-AAPR-pNA	1.00000
Suc-AAPD-pNA	0.00000
Suc-AAPL-pNA	0.00002
Suc-AAPM-pNA	0.00004
Suc-AAPV-pNA	0.00000
Suc-AAPL-pNA	0.00002
Suc-AAPE-pNA	0.00001
Suc-AAPK-pNA	0.56906
Suc-AAPF-pNA	0.00005 (0.0000477)
Suc-AAP (R/K) - pNAの最大	1.00000
Suc-AAPnon (R/K) - pNAの最大	0.00005 (0.0000477)
トリプシン比率	2100

10

20

【0299】

他の特徴：

クリベラ・フラビダからのトリプシン様プロテアーゼを、EDTAにより阻害する。SDS-PAGEにより測定される場合の相対的分子量は、 $M_r = 26 \text{ kDa}$ であった。そのN-末端配列を、IVGGSLとして測定した。完全な分子量は、 $M_w = 23169.0 \text{ Da}$ であることが測定された。それらのデータは、クリベラ・フラビダからの成熟トリプシン様プロテアーゼが次の配列（配列番号6のアミノ酸40-266）を有する：

IVGGSLASTAQAPWAIALNNSQSPSPSGQWCGATLVKANK
IVTAAHCVTKARSTYTAIQGRDSLSSSTTGRTSKIASIWK
DPQYGRAPGHDVAVLTLPFTGVPTLPLETSLAADAVGA
QPTVYGWGNTTEGTGPADRFQKVLVPVLGDAYCGQVYANY
DYVANGEICAGYKEGGKDSCQGDSGGPLVLNGRLFGVVS
WGI GCADAGNPGVYAEVATYAAALTAQINS。

30

【0300】

実施例7：アクチノシンネマ・ミルム及びクリベラ・フラビダからのトリプシン様プロテアーゼによるホエータンパク質濃縮物及びラクトアルブミンの加水分解：

材料：

ホエータンパク質濃縮物 (WPC)、80%乾燥物タンパク質、Lacprodan 80、Aria Foods Ingredients、DK

40

ラクトアルブミン (ALA)、97%乾燥物タンパク質、Davisco Foods International、MN、US

CaCl_2 無水物、Merck art 2387

NaOH 、Prolabo 31627.368

【0301】

加水分解アッセイ：

17.6 mlの5 mMの CaCl_2 に溶解された1 gの - ラクトアルブミン、又は17.4 mlの5 mMの CaCl_2 中、1.2 gのLacprodan80を生成し、5%の最終タンパク質濃度を得た。

50

【 0 3 0 2 】

サンプルを 5 5 又は 5 0 に加熱し、そして pH を 7 . 5 に調節した。pH 調節のために消費される NaOH 体積を記録した。酵素を添加し、そして pH 滴定を Titralab856 (Radiometer) 上で 1 2 0 分間、実施した。NaOH 消費をモニターし、そして % DH に転換した。

【 0 3 0 3 】

加水分解度 (DH) :

懸濁液の加水分解度を、Adler-Nissen, J. 1986, Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins, Chapter 6 に記載のようにして、pH スタットにより測定した。

【 0 3 0 4 】

切断されるペプチド結合の % として定義される加水分解度 (DH) を、次の pH - スタット技法によりモニターすることができる : $DH = h / h_{tot} \times 100$

式中、h : 反応の間、消費される塩基の量に比例しての、切断されるペプチド結合の数

。

h_{tot} : アミノ酸消費から計算されるタンパク質におけるペプチド結合の数。

ALA についての $h_{tot} = 8.16$ 、及び WPC についての $h_{tot} = 8.8$

$h = B \times Nb \times 1 / \quad \times 1 / Mp$

B = 塩基消費 (ml)

Nb = 塩基の規定度 (0 . 2 5 N)

$1 / \quad = \quad - NH_2$ 基の平均解離度

Mp = タンパク質質量 (g)、(N x Kjeldahl 因子)

【 0 3 0 5 】

【表 1 7 】

使用されるエンドペプチダーゼ :

酵素	トリプシン濃度 (mg/ml)
アクチノシンネマ・ミルムからのトリプシン様プロテアーゼ	0. 6 9 mg/ml
クリベラ・フラビダからのトリプシン様プロテアーゼ	0. 3 8 mg/ml
フサリウム・オキシスポラムからのトリプシン様プロテアーゼ	8. 0 mg/ml
ブタトリプシンからクロマトグラフィーにより精製されたトリプシン (PTN6. 0 S)	9. 5 mg/ml
ノカルジオプシス sp NRRL 18262 からのキモトリプシン様プロテアーゼ	8. 8 mg/ml
ブタ脾臓トリプシン Novo6. 0S, PTN	2 0 0 mg/g

【 0 3 0 6 】

フサリウム・オキシスポラムからのトリプシン様プロテアーゼ及びノカルジオプシス sp . (Nocardiosis sp .) NRRL 1 8 6 2 からのキモトリプシン様プロテアーゼのアミノ酸配列については、国際公開第 2 0 1 0 / 1 1 2 5 4 6 号を参照のこと。

【 0 3 0 7 】

データ :

10

20

30

40

【表 18】

トリプシン様酵素により加水分解されたALA:

	用量	DH (120分)
アクチノシンネマ・ミルムからのトリプシン様プロテアーゼ	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	6.5
クリベラ・フラビダからのトリプシン様プロテアーゼ	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	7.9
フサリウム・オキシスポラムからのトリプシン様プロテアーゼ	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	4.8
ブタトリプシンからクロマトグラフィーにより精製されたトリプシン (PTN6.0S)	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	9.0

10

【0308】

【表 19】

トリプシン様酵素+キモトリプシン様酵素により加水分解されたALA:

	用量	DH (120分)
アクチノシンネマ・ミルムからのトリプシン様プロテアーゼ+ノカルジオプシスからのキモトリプシン様プロテアーゼ	1.8+0.2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	11.9
クリベラ・フラビダからのトリプシン様プロテアーゼ+ノカルジオプシスからのキモトリプシン様プロテアーゼ	1.8+0.2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	8.9
フサリウム・オキシスポラムからのトリプシン様プロテアーゼ+ノカルジオプシスからのキモトリプシン様プロテアーゼ	1.8+0.2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	8.4
ブタトリプシン (PTN6.0S)	2 mgの酵素タンパク質/gタンパク質	13.3

20

30

【0309】

【表 2 0】

トリプシン様酵素+キモトリプシン様酵素により加水分解されたALA:

	用量	DH (120分)
アクチノシンネマ・ミルムからのトリプシン様プロテアーゼ+ノカルジオブシスからのキモトリプシン様プロテアーゼ	1.8+0.2mgの酵素タンパク質/gタンパク質	10.9
フサリウム・オキシスポラムからのトリプシン様プロテアーゼ+ノカルジオブシスからのキモトリプシン様プロテアーゼ	1.8+0.2mgの酵素タンパク質/gタンパク質	9.9
ブタトリプシン (PTN6.0S)	2mgの酵素タンパク質/gタンパク質	10.1

10

【0310】

生物材料の寄託:

次の生物材料を、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、ブタペスト条件に基づいて寄託し、そして次の受託番号を付与された:

20

寄託物: Escherichia coli NN 059278

受託番号: DSM 23706

寄託日: 2010 年6月18日

【0311】

前記株は、培養物の入手が、外国特許法により決定される本特許出願の係属の間、利用できることを保証する条件下で寄託された。寄託物は、寄託された株の実質的に純粋な培養物を示す。寄託物は、本出願の対応物又はその子孫が出願される国々における外国特許法により要求される場合、利用できる。しかしながら、寄託物の入手可能性は、政府の指令により許される特許権の低下で本発明を実施する許可を構成しないことが理解されるべきである。

30

【0312】

本明細書に記載される発明は、本明細書に開示される特許の態様により範囲を限定されるものではない。何故ならば、それらの態様は本発明のいくつかの観点为例示するものである。いずれかの同等の態様は本発明の範囲内で意図される。実際、本明細書に示され、そして記載されるそれらの修飾の他に、本発明の種々の修飾は、前述の記載から当業者に明らかになるであろう。そのような修飾はまた本発明の範囲内にある。抵触の場合、定義を包含する本発明の開示が調節するであろう。

【配列表】

0005944908000001.app

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 2 3 C 9/152 (2006.01) A 2 3 C 9/152

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ピーター エル・エステルガールド

デンマーク国, デーコー - 2 8 3 0 ビールム, クベーデバイ 1 1 1

(72)発明者 カルステン ペー・センクセン

デンマーク国, デーコー - 3 5 2 0 ファールム, ソルヘイパルケン 1 3

(72)発明者 ティネ ホフ

デンマーク国, デーコー - 2 8 4 0 ホルテ, セレズガールズバイ 3 8

(72)発明者 ギッテ ペー・リングレブ

デンマーク国, デーコー - 2 0 0 0 フレデリクスベルウ, エゲルンバイ 3 9

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 米国特許第 0 5 0 3 9 5 3 2 (U S , A)

特表 2 0 1 0 - 5 2 4 4 7 1 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 1 1 4 6 (W O , A 1)

JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 日本, JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY, 1 9 9 5 年 1 月 1 日, V

118 N2, P338-346, ENCODING A TRYPSIN-LIKE PROTEASE FROM STREPTOMYCES ERYTHRAEUS

EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, ドイツ, SPRINGER, 2 0 0 6 年 2 月 1 日, V222

N3-4, P286-290, OBTAINED BY COMBINED ENZYMATIC PROTEOLYSIS AND HIGH PRESSURE

FOOD CHEMISTRY, NL, ELSEVIER LTD, 2 0 0 9 年 5 月 1 5 日, V114 N2, P440-446

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

G o o g l e S c h o l a r

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

B l a s t 2

P u b M e d

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q