

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-525102

(P2005-525102A)

(43) 公表日 平成17年8月25日(2005.8.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00	A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	
A 2 3 C 19/032	A 2 3 C 19/032	
A 2 3 C 19/06	A 2 3 C 19/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-564209 (P2003-564209)	(71) 出願人	503089489 ダイヴァーサ コーポレーション アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 1 2 1 サン ディエゴ ディレクターズ プレイス 4 9 5 5
(86) (22) 出願日	平成15年1月28日 (2003. 1. 28)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月28日 (2004. 9. 28)	(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/002694	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 国際公開番号	W02003/064613	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(87) 国際公開日	平成15年8月7日 (2003. 8. 7)	(74) 代理人	100114007 弁理士 平山 孝二
(31) 優先権主張番号	60/352, 895		
(32) 優先日	平成14年1月28日 (2002. 1. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミダーゼ、それをコードする核酸、および、それを作製および使用する方法

(57) 【要約】

本発明は、アミダーゼ、前記アミダーゼをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを製造および使用する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、第二アミダーゼ活性を有する酵素、例えばアミドの加水分解における活性を有する酵素（ペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素を含む）を提供する。また別の特徴では、本発明の酵素を用いて、食品の風味を増強し（例えば酵素熟成チーズ）、殺菌および殺真菌を促進し、ファインケミカル中間体を改変および脱保護し、ペプチド結合を合成し、キラル分離を実施し、セファロスポリンCを加水分解することができる。本発明の酵素を用いて、7-アミノセファロスポラン酸（7-ACA）および半合成セファロスポリン抗生物質（セファロシン、セファロリジンおよびセフロキシムを含む）を生成することができる。本発明の酵素を殺菌剤として、例えば細胞壁加水分解剤として用いることができる。本発明はまた、7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを含む蛍光アミダーゼ基質を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、または配列番号:111と少なくとも50%の配列同一性、

配列番号:35、配列番号:73、配列番号:89、または配列番号:113と少なくとも55%の配列同一性、

配列番号:27、配列番号:29、または配列番号:57と少なくとも60%の配列同一性、

配列番号:99と少なくとも65%の配列同一性、

配列番号:55と少なくとも90%の配列同一性、または、

配列番号:37と少なくとも99%の配列同一性を、

少なくとも約100残基の領域にわたって有する核酸配列を含む単離または組換え核酸であって、アミダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに前記配列同一性が配列比較アルゴリズムによる分析または視覚による精査によって決定される前記単離または組換え核酸。

【請求項2】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも55%の配列同一性を少なくとも約100残基の領域にわたって有する核酸配列を含む、請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項3】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも60%の配列同一性を少なくとも約100残基の領域にわたって有する配列を含む、請求項2記載の単離または組換え核酸。

【請求項4】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65

配列番号:111、または配列番号:113記載の配列を含む請求項10記載の単離または組換え核酸。

【請求項13】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114記載の配列を含むポリペプチドをコードする単離または組換え核酸。

10

【請求項14】

配列比較アルゴリズムが、BLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであって、フィルター設定がblastall -p blastp -d "nr pataa" -FFに設定され、他の全てのオプションがデフォルトに設定される請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項15】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約200、300、400、500、550、600または650残基の領域にわたって有する配列を含む請求項1記載の単離または組換え核酸。

20

30

【請求項16】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約700残基の領域にわたって有する配列を含む請求項15記載の単離または組換え核酸。

40

【請求項17】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、

50

配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約800残基の領域にわたって有する配列を含む請求項16記載の単離または組換え核酸。

【請求項18】

配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:31、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約900残基の領域にわたって有する配列を含む請求項17記載の単離または組換え核酸。

【請求項19】

配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:31、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約900残基の領域にわたって有する配列を含む請求項18記載の単離または組換え核酸。

【請求項20】

配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:31、配列番号:35、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約1000残基の領域にわたって有する配列を含む請求項19記載の単離または組換え核酸。

【請求項21】

配列番号:31、配列番号:35、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:105、配列番号:107、または配列番号:111と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約1200残基の領域にわたって有する配列を含む請求項20記載の単離または組換え核酸。

【請求項22】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113記載の配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする単離または組換え核酸。

【請求項23】

長さが少なくとも約50、100、150、200、300、400または500残基である請求項22記載の単離または組換え核酸。

【請求項24】

10

20

30

40

50

長さが少なくとも約600、700、800、900、1000、1100もしくは1200残基、または完全長の遺伝子もしくは転写物である請求項23の単離または組換え核酸。

【請求項25】

ストリンジェントな条件が、約65 の温度で約15分、0.2×SSCでの洗浄を含む洗浄工程を含む請求項22記載の単離または組換え核酸。

【請求項26】

アミダーゼ活性がアミド結合を加水分解することを含む請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項27】

アミダーゼ活性が第二アミダーゼ活性を含む請求項1記載の単離または組換え核酸。

10

【請求項28】

アミダーゼ活性が内部アミダーゼ活性を含む請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項29】

アミダーゼ活性がC-末端アミダーゼ活性を含む請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項30】

アミダーゼ活性がN-末端アミダーゼ活性を含む請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項31】

アミダーゼ活性がタンパク質のアミド結合を加水分解することを含む請求項26記載の単離または組換え核酸。

【請求項32】

アミダーゼ活性がセファロsporin中のアミド結合を加水分解することを含む請求項1記載の単離または組換え核酸。

20

【請求項33】

セファロsporinがセファロsporinCを含む請求項32記載の単離または組換え核酸。

【請求項34】

アミダーゼ活性が、セファロsporinC中のアミド結合を加水分解して7-アミノセファロsporin酸(7-ACA)を生成することを含む請求項33記載の単離または組換え核酸。

【請求項35】

アミダーゼ活性が鏡像選択性を有する請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項36】

アミダーゼが、ラセミ混合物から鏡像体として純粋なL-アミノ酸を生成する請求項35記載の単離または組換え核酸。

30

【請求項37】

アミダーゼが、アミノ酸アルキルエステルまたはN-保護ペプチドアルキルエステルの酵素変換によってペプチドを生成する請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項38】

アミダーゼが約37 から約95 の範囲の温度を含む条件下で活性を保持する請求項1の単離または組換え核酸。

【請求項39】

アミダーゼが約55 から約85 の範囲の温度を含む条件下で活性を保持する請求項38記載の単離または組換え核酸。

40

【請求項40】

アミダーゼ活性が耐熱性である請求項1記載の単離または組換え核酸。

【請求項41】

ポリペプチドが37 を越える温度から約95 の範囲の温度に暴露された後アミダーゼ活性を保持する請求項40記載の単離または組換え核酸。

【請求項42】

アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブであって、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23

50

、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113を含む配列の少なくとも10、20、30、40または50の連続する塩基を含み、結合またはハイブリダイゼーションによって前記核酸を同定する前記核酸プローブ。

10

【請求項43】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113を含む配列の少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、または約60から100、または約70から150の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項42記載の核酸プローブ。

20

【請求項44】

アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブであって、請求項1記載の配列の少なくとも10、20、30、40または50の連続する塩基を含む前記核酸プローブ。

【請求項45】

アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー配列対であって、請求項1記載の核酸を増幅させることができる前記増幅プライマー対。

30

【請求項46】

増幅プライマー配列対の各メンバーが、前記配列の少なくとも約10からの50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項45記載の増幅プライマー対。

【請求項47】

請求項45記載の増幅プライマー配列対で鋳型核酸を増幅することを含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法。

【請求項48】

請求項1または請求項22記載の核酸を含む発現カセット。

【請求項49】

請求項1または請求項22記載の核酸を含むベクター。

40

【請求項50】

請求項49記載のベクターまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸を含むクローニングベヒクルであって、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含む前記クローニングベヒクル。

【請求項51】

ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ随ウイルスベクターを含む請求項50のクローニングベヒクル。

【請求項52】

50

バクテリア人工染色体 (BAC)、プラスミド、バクテリオファージ P1-由来ベクター (PAC)、酵母人工染色体 (YAC)、または哺乳類人工染色体 (MAC) を含む請求項 50 のクローニングビヒクル。

【請求項 53】

請求項 49 記載のベクターまたは請求項 1 もしくは請求項 22 記載の核酸を含む形質転換細胞。

【請求項 54】

請求項 49 記載のベクターまたは請求項 1 もしくは請求項 22 記載の核酸を含む形質転換細胞。

【請求項 55】

細胞が、バクテリア細胞、哺乳類細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または植物細胞である請求項 54 の形質転換細胞。

【請求項 56】

請求項 49 記載のベクターまたは請求項 1 もしくは請求項 22 記載の核酸を含む非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 57】

動物がマウスである、請求項 56 記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 58】

請求項 49 記載のベクターまたは請求項 1 もしくは請求項 22 記載の核酸を含むトランスジェニック植物。

【請求項 59】

植物が、トウモロコシ、モロコシ、ジャガイモ、トマト、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、イネ、オオムギ、牧草またはタバコである請求項 58 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 60】

請求項 49 記載のベクターまたは請求項 1 もしくは請求項 22 記載の核酸を含むトランスジェニック種子。

【請求項 61】

トウモロコシ、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、ヤシ、ヒマワリ、ゴマ、イネ、オオムギ、ピーナツまたはタバコの種子である請求項 60 記載のトランスジェニック種子。

【請求項 62】

請求項 49 記載のベクターまたは請求項 1 もしくは請求項 22 記載の核酸と相補的である核酸配列、または、前記ベクター若しくは前記核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列、を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 63】

長さが約 10 から 50、約 20 から 60、約 30 から 70、約 40 から 80、または約 60 から 100 塩基である請求項 62 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 64】

請求項 49 記載のベクターまたは請求項 1 もしくは請求項 22 記載の核酸と相補的な核酸配列、または前記ベクター若しくは前記核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列、を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に投与するか、または細胞で発現させることを含む、細胞内でアミダーゼメッセンジャーの翻訳を抑制する方法。

【請求項 65】

(a) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:85、配列番号:87、配列番号

10

20

30

40

50

:88、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、または配列番号:112と少なくとも50%の配列同一性、配列番号:36、配列番号:74、配列番号:90、または配列番号:114と少なくとも55%の配列同一性、配列番号:28、配列番号:30、または配列番号:58と少なくとも60%の配列同一性、配列番号:100と少なくとも65%の配列同一性、配列番号:56と少なくとも90%の配列同一性、または、配列番号:38と少なくとも99%の配列同一性を、少なくとも約100残基の領域にわたって含むポリペプチド、または

(b) 請求項1または請求項22記載の核酸を含む核酸によってコードされるポリペプチドを含む単離または組換えポリペプチド。

【請求項66】

アミダーゼ活性を有する請求項65記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項67】

少なくとも約150、200、250、300、350、400、450または500残基の領域にわたって少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む請求項65記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項68】

少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%同一性を有するアミノ酸配列を含む請求項65記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項69】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114記載のアミノ酸配列を含む請求項68記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項70】

アミダーゼ活性がアミド結合を加水分解することを含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項71】

アミダーゼ活性がアミド結合を加水分解することを含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項72】

アミダーゼ活性が第二アミダーゼ活性を含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項73】

アミダーゼ活性が内部アミダーゼ活性を含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項74】

アミダーゼ活性がC-末端アミダーゼ活性を含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項75】

アミダーゼ活性がN-末端アミダーゼ活性を含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項76】

10

20

30

40

50

アミダーゼ活性がタンパク質中のアミド結合を加水分解することを含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項77】

アミダーゼ活性がセファロスポリン中のアミド結合を加水分解することを含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項78】

セファロスポリンがセファロスポリンCを含む請求項77記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項79】

アミダーゼ活性が、セファロスポリンC中のアミド結合を加水分解して7-アミノセファロスポラニン酸(7-ACA)を生成することを含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

10

【請求項80】

アミダーゼ活性が鏡像選択性を有する請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項81】

アミダーゼが、ラセミ混合物から鏡像体として純粋なL-アミノ酸を生成する請求項80記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項82】

アミダーゼが、アミノ酸アルキルエステルまたはN-保護ペプチドアルキルエステルの酵素変換によってペプチドを生成する請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

20

【請求項83】

アミダーゼが、約37 から約95 の範囲の温度を含む条件下で活性を保持する請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項84】

アミダーゼが、約55 から約85 の範囲の温度を含む条件下で活性を保持する請求項83記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項85】

アミダーゼ活性が耐熱性である請求項66の単離または組換えポリペプチド。

【請求項86】

37 を越える温度から約95 の範囲の温度に暴露した後にアミダーゼ活性を保持する請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

30

【請求項87】

請求項65記載のポリペプチドを含み、さらにシグナル配列を欠く単離または組換えポリペプチド。

【請求項88】

アミダーゼ活性が約37 でタンパク質1ミリグラムにつき約100から約1000単位の範囲の比活性を含む請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項89】

アミダーゼ活性が、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約750単位の比活性を含む請求項88記載の単離または組換えポリペプチド。

40

【請求項90】

少なくとも1つのグリコシル化部位を含む請求項65記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項91】

グリコシル化がN-結合グリコシル化である請求項90記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項92】

アミダーゼが、P. パストリス(P. pastoris)またはS. ポンベ(S. pombe)で発現させた後グリコシル化される請求項90記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項93】

50

pH約5またはpH約4.5を含む条件下でアミダーゼ活性を保持する請求項66記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項94】

pH約8.0、pH約8.5、pH約9、pH約9.5、pH約10またはpH約10.5を含む条件下でアミダーゼ活性を保持する請求項71記載の単離または組換えポリペプチド。

【請求項95】

液体、固体またはゲルを構成するポリペプチドを含むタンパク質調製物。

【請求項96】

請求項65記載のポリペプチドおよび第二のドメインを含むヘテロダイマー。

【請求項97】

第二のドメインがポリペプチドであり、ヘテロダイマーが融合タンパク質である請求項96記載のヘテロダイマー。

【請求項98】

第二のドメインがエピトープである請求項97記載のヘテロダイマー。

【請求項99】

第二のドメインがタグである請求項97記載のヘテロダイマー。

【請求項100】

請求項65記載のポリペプチドを含むホモダイマー。

【請求項101】

請求項65または請求項96記載の配列を含む、アミダーゼ活性を有する固定化ポリペプチド。

【請求項102】

細胞、鉱物、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、石墨粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレーまたは毛細管に固定される請求項101記載の固定化ポリペプチド。

【請求項103】

請求項65または請求項96記載のポリペプチドが固定化されたアレー。

【請求項104】

請求項1または請求項22記載の核酸が固定化されたアレー。

【請求項105】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドと特異的に結合する単離また組換え抗体。

【請求項106】

モノクローナルまたはポリクローナル抗体である請求項105記載の単離また組換え抗体。

【請求項107】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項32記載の核酸によってコードされるポリペプチドと特異的に結合する抗体を含むハイブリドーマ。

【請求項108】

以下の工程を含むアミダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する方法：

(a) 請求項105記載の抗体を提供する工程；

(b) ポリペプチドを含むサンプルを提供する工程；および、

(c) 工程(b)のサンプルを工程(a)の抗体と前記抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合することができる条件下で接触させ、それによってアミダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する工程。

【請求項109】

非ヒト動物に請求項1もしくは請求項32記載の核酸、請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを、液性免疫反応を生じるために十分な量で投与し、それによって抗アミダーゼ抗体を生成させることを含む、抗アミダーゼ抗体を作製する方法。

【請求項110】

10

20

30

40

50

以下の工程を含む組換えポリペプチドを製造する方法：

(a) プロモーターに機能的に連結された核酸を提供する工程であって、前記核酸は請求項1または請求項22記載の配列を含む核酸である、前記工程；および、

(b) ポリペプチドの発現を許容する条件下で工程(a)の核酸を発現させ、それによって組換えポリペプチドを製造する工程。

【請求項111】

宿主細胞を工程(a)の核酸で形質転換し、続いて工程(a)の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組換えポリペプチドを製造することをさらに含む請求項110記載の方法。

【請求項112】

以下の工程を含むアミダーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) アミダーゼ基質を提供する工程；および、

(c) 前記ポリペプチドを工程(b)の基質と接触させ、基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出し、基質の量の減少または反応生成物の量の増加によってアミダーゼ活性を有するポリペプチドを検出する工程。

【請求項113】

基質がタンパク質である請求項112記載の方法。

【請求項114】

基質がセファロsporin Cである請求項113記載の方法。

【請求項115】

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) テスト基質を提供する工程；および、

(c) 工程(b)のテスト基質と工程(a)のポリペプチドを接触させ、基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出する工程を含み、基質の量の減少または反応生成物の量の増加によってテスト基質がアミダーゼ基質であると決定することを含む、アミダーゼ基質を同定する方法。

【請求項116】

以下の工程を含む、テスト化合物がポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する方法：

(a) 請求項1もしくは請求項22記載の配列を有する核酸または前記核酸を含むベクターを前記核酸のポリペプチドへの翻訳を許容する条件下で発現させるか、または請求項65記載のポリペプチドを提供する工程；

(b) テスト化合物を提供する工程；

(c) 前記ポリペプチドを前記テスト化合物と接触させる工程；および、

(d) 工程(b)のテスト化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程。

【請求項117】

(a) 請求項66記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程；

(b) テスト化合物を提供する工程；

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)のテスト化合物と接触させてアミダーゼ活性を測定する工程を含み、

テスト化合物の非存在下でのアミダーゼ活性と比較してテスト化合物の存在下で測定されたアミダーゼ活性が変化すれば、テスト化合物がアミダーゼ活性を調節するという決定を行うことを含む、アミダーゼ活性の調節物質を同定する方法。

【請求項118】

アミダーゼ基質を提供し、基質量の減少もしくは反応生成物量の増加、または基質量の

10

20

30

40

50

増加もしくは反応生成物量の減少を検出することによって前記アミダーゼ活性を測定する請求項116記載の方法。

【請求項119】

テスト化合物の非存在下での基質量または反応生成物量と比較したときの基質量の減少またはテスト化合物との反応生成物量の増加によって、テスト化合物をアミダーゼ活性のアクチベーターと特定する請求項117記載の方法。

【請求項120】

テスト化合物の非存在下での基質量または反応生成物量と比較したときの基質量の増加またはテスト化合物との反応生成物量の減少によって、テスト化合物をアミダーゼ活性のインヒビターと特定する請求項117記載の方法。

10

【請求項121】

プロセッサおよびデータ保存装置を含むコンピュータシステムであって、前記データ保存装置にはポリペプチド配列または核酸配列が保存されており、前記ポリペプチド配列が請求項65記載の配列または請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む前記コンピュータシステム。

【請求項122】

さらに配列比較アルゴリズムおよび少なくとも1つのリファレンス配列が保存されているデータ保存装置を含む請求項120記載のコンピュータシステム。

【請求項123】

配列比較アルゴリズムが多型性を表示するコンピュータプログラムを含む請求項121記載のコンピュータシステム。

20

【請求項124】

さらに配列の1つまたは2つ以上の特徴を識別するアイデンティファイヤーを含む請求項120記載のコンピュータシステム。

【請求項125】

ポリペプチド配列または核酸配列が保存されているコンピュータ読み出し可能媒体であって、前記ポリペプチド配列が、請求項65記載のポリペプチド、または、請求項1または請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含む前記コンピュータ読み出し可能媒体。

【請求項126】

以下の工程を含む配列内の特徴を識別する方法：

30

(a) 配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別するコンピュータプログラムを用いて配列を読み取る工程であって、前記配列がポリペプチド配列または核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は、請求項65記載のポリペプチド、または、請求項1若しくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチド、を含む配列である、前記工程；および、

(b) 前記コンピュータプログラムにより前記配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別する工程。

【請求項127】

以下の工程を含む第一の配列と第二の配列を比較する方法：

(a) 配列を比較するコンピュータプログラムを用いて第一の配列および第二の配列を読み取る工程であって、前記第一の配列はポリペプチド配列または核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む配列である、前記工程；および、

40

(b) 前記コンピュータプログラムにより前記第一の配列および第二の配列間の相違を決定する工程。

【請求項128】

第一の配列および第二の配列間の相違を決定する工程がさらに多型性を識別する工程を含む請求項126記載の方法。

【請求項129】

さらに配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別するアイデンティファイヤーを含む請求

50

項126記載の方法。

【請求項130】

コンピュータプログラムを用いて第一の配列を読み取り、さらに配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別することを含む請求項126記載の方法。

【請求項131】

以下の工程を含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法：

(a) 請求項44記載の増幅プライマー配列対を提供する工程；

(b) 前記サンプル中の核酸が前記増幅プライマー対にハイブリダイゼーションのためにアクセスできるように、前記環境サンプルから核酸を単離するか、または前記環境サンプルを処理する工程；および、

(c) 工程(b)の核酸を工程(a)の前記増幅プライマー対と一緒にして前記環境サンプル由来の核酸を増幅し、それによってアミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する工程。

10

【請求項132】

増幅プライマー配列対の各メンバーが少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項130記載の方法。

【請求項133】

以下の工程を含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法：

20

(a) 請求項1または請求項22記載の配列を含むポリヌクレオチドプローブを提供する工程；

(b) 前記サンプル中の核酸がハイブリダイゼーションのために工程(a)のポリヌクレオチドプローブにアクセスできるように、前記環境サンプルから核酸を単離するか、または前記環境サンプルを処理する工程；

(c) 工程(b)の前記単離した核酸または処理した環境サンプルを工程(a)のポリヌクレオチドプローブと一緒にする工程；および、

(d) 工程(a)のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離し、それによってアミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する工程。

30

【請求項134】

環境サンプルが、水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプルまたは生物学的サンプルを含む請求項130または請求項132の方法。

【請求項135】

生物学的サンプルが、バクテリア細胞、原虫細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞または哺乳類細胞に由来する請求項133記載の方法。

【請求項136】

以下の工程を含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の変種を作製する方法：

(a) 請求項1または請求項22記載の配列を含む鋳型核酸を提供する工程；および、

(b) 前記鋳型配列において1つまたは2つ以上のヌクレオチドを改変、欠失もしくは付加し、またはその組み合わせを実施して前記鋳型核酸の変種を作製する工程。

40

【請求項137】

変種核酸を発現させて変種アミダーゼポリペプチドを作製することをさらに含む請求項135記載の方法。

【請求項138】

改変、付加または欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブリーPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、再帰的アンサンブル突然変異誘発、エキスポネンシャルアンサンブル突然変異誘発、位置特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブリー、遺伝子部位飽和

50

突然変異誘発 (GSSM)、合成連結再アッセンブリー (SLR) およびその組み合わせによって導入される請求項135記載の方法。

【請求項139】

改变、付加または欠失が、組換え、反復配列組換え、ホスホチオエート改变DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型による突然変異誘発、ギャップ保有デュープレックスによる突然変異誘発、ポイントミスマッチ修復による突然変異誘発、修復欠損宿主株による突然変異誘発、化学物質による突然変異誘発、放射線による突然変異誘発、欠失突然変異誘発、限定-選別突然変異誘発、限定-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンプル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成、およびそれらの組み合わせによって導入される請求項135記載の方法。

10

【請求項140】

改变、付加または欠失が変異性PCRによって導入される請求項135記載の方法。

【請求項141】

改变、付加または欠失がシャッフリングによって導入される請求項135記載の方法。

【請求項142】

改变、付加または欠失がオリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発によって導入される請求項135記載の方法。

【請求項143】

改变、付加または欠失がアッセンブリーPCRによって導入される請求項135記載の方法。

【請求項144】

改变、付加または欠失がセクシュアルPCR突然変異誘発によって導入される請求項135記載の方法。

20

【請求項145】

改变、付加または欠失が *in vivo* 突然変異誘発によって導入される請求項135記載の方法。

【請求項146】

改变、付加または欠失がカセット突然変異誘発によって導入される請求項135記載の方法。

【請求項147】

改变、付加または欠失が再帰的アンサンプル突然変異誘発によって導入される請求項135記載の方法。

30

【請求項148】

改变、付加または欠失がエキスポネンシャルアンサンプル突然変異誘発によって導入される請求項135記載の方法。

【請求項149】

改变、付加または欠失が位置特異的突然変異誘発によって導入される請求項135記載の方法。

【請求項150】

改变、付加または欠失が遺伝子再アッセンブリーによって導入される請求項135記載の方法。

40

【請求項151】

改变、付加または欠失が合成連結再アッセンブリー (SLR) によって導入される請求項135記載の方法。

【請求項152】

改变、付加または欠失が遺伝子部位飽和突然変異誘発 (GSSM) によって導入される請求項135記載の方法。

【請求項153】

鋳型核酸によってコードされるポリペプチドの活性または安定性から変化したまたは異なるアミダーゼが生成されるまで反復して繰り返される請求項135記載の方法。

【請求項154】

50

変種アミダーゼポリペプチドが耐熱性であり、高温に暴露した後何らかの活性を保持する請求項152記載の方法。

【請求項155】

変種アミダーゼポリペプチドが、鋳型核酸によってコードされたアミダーゼと比較してグリコシル化が増加している請求項152記載の方法。

【請求項156】

変種アミダーゼポリペプチドが、鋳型核酸によってコードされたアミダーゼが活性をもたない高温下でアミダーゼ活性を有する請求項152記載の方法。

【請求項157】

方法が、鋳型核酸のコドン使用頻度と異なるコドン使用頻度を有するアミダーゼコード配列が生成されるまで反復して繰り返される、請求項135記載の方法。 10

【請求項158】

方法が、鋳型核酸のメッセンジャー発現または安定性よりも高いまたは低いレベルのメッセンジャー発現または安定性を示すアミダーゼ遺伝子が得られるまで反復して繰り返される、請求項135記載の方法。

【請求項159】

以下の工程を含む、宿主細胞における発現を高めるために、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変する方法：

(a) 請求項1または請求項22記載の配列を含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；さらに 20

(b) 工程(a)の核酸の好ましくないまたは好ましが劣るコドンを同定し、これを前記コドンと同じアミノ酸をコードする好ましいまたは天然に用いられるコドンで置換し(ここで、好ましいコドンは、宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて多く表現されるコドンであり、好ましくないまたは好ましが劣るコドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて少なく表現されるコドンである)、それによって前記核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を高める工程。

【請求項160】

以下の工程を含むアミダーゼポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変する方法：

(a) 請求項1または請求項22記載の配列を含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；および、 30

(b) 工程(a)の核酸のコドンを同定し、これを前記コドンと同じアミノ酸をコードする異なるコドンで置換し、それによってアミダーゼをコードする核酸のコドンを改変する工程。

【請求項161】

以下の工程を含む、宿主細胞における発現を高めるために、アミダーゼポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変する方法：

(a) 請求項1または請求項22記載の配列を含む、アミダーゼポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；および、

(b) 工程(a)の核酸の好ましくないまたは好ましが劣るコドンを同定し、これを前記コドンと同じアミノ酸をコードする好ましいまたは天然に用いられるコドンで置換し(ここで、好ましいコドンは、宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて多く表現されるコドンであり、好ましくないまたは好ましが劣るコドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて少なく表現されるコドンである)、それによって前記核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を高める工程。 40

【請求項162】

以下の工程を含む、宿主細胞における発現を低下させるために、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変する方法：

(a) 請求項1または請求項22記載の配列を含む、アミダーゼポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；および、

(b) 工程(a)の核酸において少なくとも1つの好ましいコドンを同定し、これを前 50

記コドンと同じアミノ酸をコードする好ましくないまたは好ましが劣るコドンで置換し（ここで、好ましいコドンは、宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて多く現れるコドンであり、好ましくないまたは好ましが劣るコドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて少なく表れるコドンである）、それによって前記核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を低下させる工程。

【請求項163】

宿主細胞が、バクテリア細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞または哺乳類細胞である請求項160または請求項161記載の方法。

【請求項164】

以下の工程を含む、複数の改変アミダーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸ライブラリーを作製する方法であって、前記改変活性部位または基質結合部位が、第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする配列を含む第一の核酸に由来する、前記方法： 10

(a) 第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする第一の核酸を提供する工程であって、前記第一の核酸配列は請求項1若しくは請求項22記載の配列またはそのサブ配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、アミダーゼ活性部位またはアミダーゼ基質結合部位をコードする配列である、前記工程；

(b) 前記第一の核酸内の複数の標的コドンにおいて天然に存在するアミノ酸変種をコードする一組の変異誘発性オリゴヌクレオチドを提供する工程；および、

(c) 前記一組の変異誘発性オリゴヌクレオチドを用いて、突然変異を誘発された各アミノ酸コドンにおいて一連のアミノ酸変種をコードする、活性部位または結合部位をコードする一組の変種核酸を作製し、それによって複数の改変アミダーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸ライブラリーを作製する工程。 20

【請求項165】

最適化した誘導進化系を含む方法によって工程(a)の第一の核酸を突然変異させることをさらに含む請求項163記載の方法。

【請求項166】

遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)を含む方法によって工程(a)の第一の核酸を突然変異させることをさらに含む請求項163記載の方法。

【請求項167】 30

合成連結再アッセンブリー(SLR)を含む方法によって工程(a)の第一の核酸を突然変異させることをさらに含む請求項163記載の方法。

【請求項168】

変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブリーPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、再帰的アンサンブル突然変異誘発、エキスポネンシャルアンサンブル突然変異誘発、位置特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブリー、遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)、合成連結再アッセンブリー(SLR)およびその組み合わせを含む方法によって工程(a)の第一の核酸または変種を突然変異させることをさらに含む請求項163記載の方法。

【請求項169】 40

組換え、反復配列組換え、ホスホチオエート改変DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型による突然変異誘発、ギャップ保有デュプレックスによる突然変異誘発、ポイントミスマッチ修復による突然変異誘発、修復欠損宿主株による突然変異誘発、化学物質による突然変異誘発、放射線による突然変異誘発、欠失突然変異誘発、限定-選別突然変異誘発、限定-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成およびその組み合わせを含む方法によって、工程(a)の第一の核酸または変種を突然変異させることをさらに含む請求項163記載の方法。

【請求項170】

以下の工程を含む小分子の製造方法：

(a) 小分子を合成または改変することができる複数の生合成酵素を提供する工程で 50

あって、前記酵素の1つは請求項1または請求項22記載の配列を含む核酸によってコードされるアミダーゼ酵素を含む、前記工程；

(b) 工程(a)の酵素の少なくとも1つのための基質を提供する工程；および、

(c) 工程(b)の基質を複数の生体触媒反応を促進する条件下で前記酵素と反応させ、一連の生体触媒反応によって小分子を生成する工程。

【請求項171】

以下の工程を含む小分子の改変方法：

(a) アミダーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素は、請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、前記工程；

(b) 小分子を提供する工程；および、

(c) 前記アミダーゼ酵素によって触媒される酵素反応を促進する条件下で、工程(a)の酵素を工程(b)の小分子と反応させ、それによって小分子をアミダーゼ酵素反応により改変する工程。

【請求項172】

工程(a)の酵素に対する複数の小分子基質を含み、それによって、アミダーゼ酵素により触媒される少なくとも1つの酵素反応によって製造される改変小分子ライブラリーを作製する請求項170記載の方法。

【請求項173】

さらに、酵素による複数の生体触媒反応を促進する条件下で複数のさらに追加される酵素を含み、複数の酵素反応によって製造される改変小分子のライブラリーを作製する請求項170記載の方法。

【請求項174】

所望の活性を示す個々の改変小分子が前記ライブラリー内に存在するか否かを決定するためにライブラリーを検査する工程をさらに含む請求項170記載の方法。

【請求項175】

ライブラリー検査工程がさらに、所望の活性を有する特定の改変小分子の有無について改変小分子の部分を検査すること、および、所望の活性を有する特定の改変小分子を生成する少なくとも1つの特異的な生体触媒反応を同定することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の部分を製造するために使用された生体触媒反応の1つを除いて全てを系統的に除外することを含む請求項173記載の方法。

【請求項176】

以下の工程を含むアミダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法：

(a) アミダーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素が請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、前記工程；および、

(b) 工程(a)の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、アミダーゼ活性について残余の配列を検査し、それによってアミダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程。

【請求項177】

アミダーゼ基質を提供すること、および、前記基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出することによってアミダーゼ活性が測定される請求項175記載の方法。

【請求項178】

以下の工程を含む、代謝フラックスの即時分析を用いることによって新規または改変表現型を有する全細胞を操作する方法：

(a) 細胞の遺伝的組成を改変することによって改変細胞を作製する工程であって、前記遺伝的組成が請求項1または請求項22記載の配列を含む核酸を前記細胞に添加することによって改変される前記工程；

(b) 前記改変細胞を培養して複数の改変細胞を生成する工程；

(c) 工程(b)の細胞培養をリアルタイムでモニターすることによって前記細胞の少

10

20

30

40

50

なくとも1つの代謝パラメーターを測定する工程；および、

(d) 工程(c)のデータを分析して、前記測定パラメーターが同様な条件下での未改変細胞の対応する測定値と異なるか否かを決定し、それによって前記細胞の操作された表現型を代謝フラックスの即時分析を用いて同定する工程。

【請求項179】

細胞の遺伝的組成が、細胞内の配列の欠失もしくは配列の改変、または遺伝子発現のノックアウトを含む方法によって改変される請求項177記載の方法。

【請求項180】

新たに操作された表現型を含む細胞を選抜することをさらに含む請求項177記載の方法

10

【請求項181】

選抜細胞を培養し、それによって新たに操作された表現型を含む新規な細胞株を創出することを含む請求項179記載の方法。

【請求項182】

以下の工程を含む、アミド結合を加水分解する方法：

(a) アミダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドが請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、前記工程；

(b) アミド結合を含む組成物を提供する工程；および、

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記アミド結合を加水分解する条件下で接触させる工程。

20

【請求項183】

組成物が内部アミド結合を含む請求項181記載の方法。

【請求項184】

組成物がC-末端アミド結合を含む請求項181記載の方法。

【請求項185】

組成物がN-末端アミド結合を含む請求項181記載の方法。

【請求項186】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドの少なくとも30の連続するアミノ酸を含むアミダーゼポリペプチドをグリコシル化し、それによって前記アミダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高めることを含む、アミダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高める方法。

30

【請求項187】

アミダーゼの比活性が、約37 を越える温度から約95 の範囲の温度で熱安定性または耐熱性を示す請求項185記載の方法。

【請求項188】

請求項1または請求項22記載の核酸を含むベクターを発現させることを含む、細胞で置換えアミダーゼポリペプチドを過剰発現させる方法であって、過剰発現が、高活性のプロモーター、ニシストロン性ベクターの使用によってまたは前記ベクターの遺伝子増幅によって実現される、前記方法。

40

【請求項189】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む洗剤組成物であって、前記ポリペプチドがアミダーゼ活性を含む前記組成物。

【請求項190】

以下の工程を含む、光学的に活性な化合物のラセミ混合物を分離する方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含み、光学的に活性な化合物の1つの鏡像体に対して選択性を有するポリペプチドを提供する工程；

(b) 光学的に活性な化合物のラセミ混合物を提供する工程；および、

50

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の混合物と、前記ポリペプチドが光学的に活性な化合物の一方の鏡像体のみを選択的に変換することができる条件下で接触させ、それによってラセミ混合物の分離を生じさせる工程。

【請求項191】

ポリペプチドがL鏡像体に対して選択性である請求項189記載の方法。

【請求項192】

ポリペプチドがR鏡像体に対して選択性である請求項189記載の方法。

【請求項193】

ポリペプチドが立体特異的である請求項189記載の方法。

【請求項194】

以下の工程を含む、アミド結合を含む化合物を合成する方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程であって、前記ポリペプチドがアミダーゼ活性を含む、前記工程；

(b) 前駆体を提供する工程；および、

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の前駆体と、前記ポリペプチドがアミド結合の合成を触媒することができる条件下で接触させる工程。

【請求項195】

ポリペプチドが立体選択性または立体特異性であり、アミド結合を含む化合物がキラルである請求項193記載の方法。

【請求項196】

前駆体が水に難溶である請求項193記載の方法。

【請求項197】

前記前駆体为非キラルであり、さらにアミド結合を含む前記化合物がキラルである請求項193記載の方法。

【請求項198】

アミド結合を含む化合物がアミノ酸またはアミノアミドである請求項193記載の方法。

【請求項199】

化合物がメチルドーパである請求項193記載の方法。

【請求項200】

以下の工程を含む、ペニシリンを加水分解する方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；

(b) ペニシリンを含む組成物を提供する工程；

(c) 工程(a)のポリペプチドと工程(b)の組成物とを、前記ポリペプチドが前記ペニシリンを加水分解することができる条件下で一緒にする工程。

【請求項201】

以下の工程を含むセファロスポリンを加水分解する方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；

(b) セファロスポリンを含む組成物を提供する工程；

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記セファロスポリンを加水分解することができる条件下で一緒にする工程。

【請求項202】

前記セファロスポリンがセファロスポリンCである請求項201記載の方法。

【請求項203】

以下の工程を含む7-アミノセファロスポラニン酸(7-CAC)を合成する方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；

(b) セファロスポリンCを含む組成物を提供する工程；

10

20

30

40

50

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドがセファロsporin Cを7-アミノセファロsporin酸(7-ACA)に変換することができる条件下で一緒にする工程。

【請求項204】

以下の工程を含む、細胞壁を加水分解する方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；

(b) 細胞壁を含む組成物を提供する工程；

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記細胞壁を加水分解することができる条件下で接触させる工程。

10

【請求項205】

以下の工程を含む、食品の加工において発酵に影響を与える方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；

(b) 食品の加工に用いられるバクテリアを含む組成物を提供する工程；

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記バクテリアの発酵特性を変化させることができる条件下で接触させる工程。

【請求項206】

バクテリアの発酵特性が増殖速度、酸の生成または生存を含む請求項204記載の方法。

【請求項207】

以下の工程を含む、チーズの熟成および風味の発生のための方法：

(a) 請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；

(b) チーズを含む組成物を提供する工程；

(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドがミルクカゼインを加水分解する条件下で接触させ、それによってチーズの熟成およびチーズの風味の発生を促進させる工程。

20

【請求項208】

殺菌または殺真菌を促進する方法であって、請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供し、工程(a)のポリペプチドを組成物と接触させ、それによって殺菌または殺真菌を促進する前記方法。

30

【請求項209】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む抗菌組成物。

【請求項210】

抗菌組成物が殺菌剤または殺真菌剤である請求項208記載の抗菌組成物。

【請求項211】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む食品。

40

【請求項212】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含むチーズ。

【請求項213】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む乳製品。

【請求項214】

請求項65記載のポリペプチドまたは請求項1もしくは請求項22記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項215】

50

7-(β -D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを含む蛍光性第二アミダーゼ基質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に分子および細胞生物学並びに生化学に関する。本発明はアミダーゼ、前記アミダーゼをコードするポリヌクレオチド、前記のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、並びに1つの特徴では第二アミダーゼ活性を有する、例えばアミドの加水分解における活性を有する酵素（ペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素を含む）を提供する。また別の特徴では、本発明の酵素は、食品の加工、例えば食品の風味を増すために（例えば酵素熟成チーズ）、殺菌および殺真菌の促進のために、ファインケミカル中間体の改変および脱保護のために、ペプチド結合の合成のために、キラル分離の実施のために、セファロsporin Cの加水分解のために用いることができる。本発明の酵素は、7-アミノセファロsporin酸（7-ACA）および半合成セファロsporin抗生物質（セファロシン、セファロリジンおよびセフトキシムを含む）の生成に用いることができる。本発明の酵素は、抗菌物質として、例えば細胞壁加水分解物質として用いることができる。

10

【背景技術】

【0002】

第二アミダーゼは種々の有用な酵素を含む。この酵素にはペプチダーゼ、プロテアーゼおよびヒダントイナーゼが含まれる。このクラスの酵素は一連の工業的利用で用いることができる。例えば第二アミダーゼは以下のために用いることができる：1) 食品、特にチーズの風味の増強（酵素熟成チーズとして知られている）；2) 殺菌および殺真菌の促進；3) ファインケミカル中間体の改変および脱保護；4) ペプチド結合の合成；および5) キラル分離の実施。特に当技術分野ではセファロsporin Cを加水分解できる酵素が要求されている。

20

セファロsporin Cはセファロsporin生合成経路の発酵生成物であり、それ自体抗生物質としてグラム陰性細菌に対して何らかの活性を示しているが、セファロsporin Cの主要な工業的用途は他のセファロsporin様抗生物質のための構築ブロックとしてである。例えば、D-アルファ-アミノアジポイル側鎖を除去して7-アミノセファロsporin酸（7-ACA）を生成することができる。7-ACAは広範囲の半合成セファロsporin抗生物質（セファロシン、セファロリジンおよびセフトキシムを含む）の前駆体である。

30

【0003】

半合成セファロsporinはもっとも広く用いられている抗生物質である。これらの抗生物質は、セファロsporin C (CephC) の脱アシル化により得られる化合物である7-アミノセファロsporin酸（7-ACA）から合成される。伝統的には、この脱アシル化は化学的方法を用いて実施されてきた。しかしながら、この化学的方法は、費用のかかる化学廃棄物流を生成する多数の有毒な化合物の使用を必要とする。この理由のために、CephCから7-ACAを生成する酵素ルートが非常に魅力的である。現在のところ、CephCから7-ACAの酵素による生成は二酵素プロセスを用いて実施される（図7）。第一の酵素、D-アミノ酸オキシダーゼを用い、CephCを酸化してケト酸中間体を得て、続いてこれを過酸化水素によって脱カルボキシル化してグルタリル-7-ACAを得る。続いて、第二の酵素グルタリル-7-ACAアシラーゼの作用によりグルタリル-7-ACAを脱アシル化して7-ACAを得る。いくらかのグルタリル-7-ACAアシラーゼはCephCを7-ACAに直接変換することができるが、それらがこの反応を行う効率は非常に低い。それにもかかわらず、CephCに対して測定可能な活性を有するグルタリル-7-ACAアシラーゼはセファロsporin Cアシラーゼとして分類される。

40

【0004】

高処理スクリーニングに適した基質/アッセイの組み合わせが存在しないために第二アミダーゼの探索には限界があった。これまでは前記アミダーゼを見つけるために、処理量の低い、感度および/または特異性を欠く基質またはアッセイを用いてきた。

50

本明細書で考察される刊行物は、単に本出願の出願日以前の前記刊行物の開示のために提供される。それらのいずれも、先行発明のために本発明が前記の開示に先行する資格をもたないことを容認するものと解釈されるべきではない。

【発明の開示】

【0005】

発明の要旨

本発明は、第二アミダーゼ活性（例えばアミドの加水分解の触媒）を含むアミダーゼ活性を有するポリペプチド、例えばペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素を提供する。また別の特徴では、本発明の酵素は、食品の加工[例えば食品の風味の増強（例えば酵素熟成チーズ）]、殺菌および殺真菌の促進、ファイ
ンケミカル中間体の改変および脱保護、ペプチド結合の合成、キラル分離の実施、セファ
ロスポリンCの加水分解に用いることができる。本発明の酵素は、7-アミノセファロスポ
ラニン酸（7-ACA）および半合成セファロスポリン抗生物質（セファロシン、セファロリ
ジンおよびセフロキシム）の生成に用いることができる。本発明の酵素は抗菌物質、例え
ば細胞壁加水分解物質として用いることができる。

10

【0006】

本発明は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:59、
配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、または配列番号:111と少なくとも50%の配列同一性、配列番号:35、配列番号:73、配列番号:89、または配列番号:113と少なくとも55%の配列同一性、配列番号:27、配列番号:29、または配列番号:57と少なくとも60%の配列同一性、配列番号:99と少なくとも65%の配列同一性、配列番号:55と少なくとも90%の配列同一性、または、配列番号:37と少なくとも99%の配列同一性を、少なくとも約100残基の領域にわたって有する核酸配列を含む単離または組換え核酸であって、前記核酸がアミダーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードし、さらに
前記配列同一性が配列比較アルゴリズムによる分析または視覚による精査によって決定される前記単離または組換え核酸を提供する。

20

30

【0007】

ある特徴では、前記単離または組換え核酸は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、
配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも55%の配列同一性を少なくとも約100残基の領域にわたって有する核酸配列を含む。

40

【0008】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61

50

列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも99%の配列同一性を少なくとも約100残基の領域にわたって有する配列を含む。

【0017】

ある特徴では、前記核酸配列は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113記載の配列を含む。

10

【0018】

本発明は、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114記載の配列を含むポリペプチドをコードする単離または組換え核酸を提供する。

20

【0019】

ある特徴では、前記配列比較アルゴリズムはBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムであり、この場合フィルター設定はblastall -p blastp -d "nr pataa" -FFに設定され、他の全てのオプションはデフォルトに設定される。

【0020】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約200、300、400、500、550、600または650残基の領域にわたって有する配列を含む。

30

40

【0021】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配

50

列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約700残基の領域にわたって有する配列を含む。

【0022】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約800残基の領域にわたって有する配列を含む。

10

【0023】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:31、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約900残基の領域にわたって有する配列を含む。

20

【0024】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:9、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:31、配列番号:35、配列番号:39、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約900残基の領域にわたって有する配列を含む。

30

【0025】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:31、配列番号:35、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:111、または配列番号:113と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約1000残基の領域にわたって有する配列を含む。

【0026】

ある特徴では、前記核酸は、配列番号:31、配列番号:35、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:81、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:105、配列番号:107、または配列番号:111と少なくとも50%の配列同一性を、少なくとも約1200残基の領域にわたって有する配列を含む。

40

【0027】

本発明は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配

50

列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113記載の配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、アミダーゼ活性を有するペプチドをコードする単離または組換え核酸を提供する。

【0028】

ある特徴では、前記核酸は、長さが少なくとも約50、100、150、200、300、400または500残基である。ある特徴では、前記核酸は、長さが少なくとも約600、700、800、900、1000、1100もしくは1200残基、または完全長の前記遺伝子もしくは転写物である。

ある特徴では、前記ストリンジェントな条件は、約65の温度で約15分、0.2×SSCで洗浄することを含む洗浄工程を含む。

【0029】

ある特徴では、アミダーゼ活性はアミド結合の加水分解を含む。前記アミダーゼ活性は第二アミダーゼ活性を含む。ある特徴では、前記アミダーゼ活性は内部アミダーゼ活性を含む。ある特徴では、前記アミダーゼ活性はC-末端アミダーゼ活性を含む。前記アミダーゼ活性はN-末端アミダーゼ活性を含むことができる。前記アミダーゼ活性はタンパク質のアミド結合の加水分解を含むことができる。前記アミダーゼ活性は、薬剤または医薬組成物、例えばセファロsporin（例えばセファロsporin C）のアミド結合の加水分解を含むことができる。ある特徴では、前記アミダーゼ活性は、セファロsporin Cのアミド結合を加水分解して7-アミノセファロsporin酸（7-ACA）を生成することを含む。

【0030】

ある特徴では、前記アミダーゼ活性は鏡像体選択性を有する。前記アミダーゼは、ラセミ混合物から鏡像体として純粋なL-アミノ酸を生成することができる。前記アミダーゼは、アミノ酸アルキルエステルまたはN-保護ペプチドアルキルエステルの酵素による変換によってペプチドを生成することができる。

ある特徴では、前記アミダーゼは約37から約95の範囲の温度を含む条件下で活性を保持する。前記アミダーゼは、約55から約85の範囲の温度を含む条件下で活性を保持することができる。

ある特徴では、前記アミダーゼ活性は耐熱性である。前記アミダーゼ活性は、37を越える温度から約95の範囲の温度に暴露した後に耐熱性を示すことができる。

【0031】

本発明は、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブを提供し、前記プローブは、本発明の核酸配列の連続する少なくとも10塩基を含む。本発明は、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブを提供し、前記プローブは、本発明の核酸配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を有する核酸配列を含む核酸を含み、前記配列同一性は配列比較アルゴリズムによる分析または視覚による精査によって決定される。ある特徴では、前記プローブは、核酸配列の少なくとも約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、または約60から100、または約70から150の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【0032】

本発明は、本発明のポリペプチド、例えばアミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー配列対を提供し、前記プライマー対は本発明の核酸配列を増幅させることができる。増幅プライマー配列対の1つまたは各メンバーは、前記配列の少なくとも約10からの50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。本発明は、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法を提供し、前記方法は、本発明の核酸配列を増幅することができる増幅プライマー配列対による鋳型核酸の増幅を含む。

10

20

30

40

50

【0033】

本発明は、本発明の核酸を含む発現カセットを提供する。ある特徴では、前記核酸は動物または植物プロモーターに機能的に連結させることができる。ある特徴では、前記発現カセットは更に植物発現ベクターを含むことができる。前記植物発現ベクターは植物ウイルスを含むことができる。ある特徴では、前記植物プロモーターは、ジャガイモ、コメ、トウモロコシ、コムギまたはオオムギのプロモーターを含むことができる。ある特徴では、前記プロモーターは、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) のT-DNAに由来するプロモーターを含むことができる。ある特徴では、前記プロモーターは構成的プロモーターでもよい。前記構成的プロモーターはCaMV35Sでもよい。別の特徴では、前記プロモーターは誘導性プロモーターでもよい。ある特徴では、前記プロモーターは組織特異的プロモーターでもよい。前記組織特異的プロモーターは、種子特異的、根特異的、茎特異的プロモーターまたは器官脱離誘導プロモーターでもよい。

10

【0034】

本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。本発明は、本発明のベクターまたは本発明の核酸を含むクローニングベヒクルを提供する。ある特徴では、前記クローニングベヒクルは、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含むことができる。ある特徴では、前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ附随ウイルスベクターを含むことができる。別の特徴では、前記クローニングベヒクルはバクテリア人工染色体 (BAC)、プラスミド、バクテリオファージP1-由来ベクター (PAC)、酵母人工染色体 (YAC)、または哺乳類人工染色体 (MAC) を含むことができる。

20

【0035】

本発明は、本発明のベクター、本発明の核酸または本発明のクローニングベヒクルを含む形質転換細胞を提供する。ある特徴では、前記細胞は、バクテリア細胞でも哺乳類細胞でも真菌細胞でも酵母細胞でも昆虫細胞でも植物細胞でもよい。ある特徴では、前記植物細胞はジャガイモ、コメ、トウモロコシ、コムギ、タバコまたはオオムギ細胞でもよい。

本発明は、本発明のベクター、本発明の核酸または本発明のクローニングベヒクルを含む非ヒトトランスジェニック動物を提供する。ある特徴では前記動物はマウスである。

本発明は、本発明のベクター、本発明の核酸または本発明のクローニングベヒクルを含むトランスジェニック植物を提供する。ある特徴では前記植物は、トウモロコシ、モロコシ、ジャガイモ、トマト、コムギ、オオムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、イネ、オオムギ、牧草またはタバコであろう。

30

【0036】

本発明は、本発明の核酸を含むトランスジェニックな種子を提供する。ある特徴では、前記種子はトウモロコシ、コムギ、ナタネ、アブラナ、ダイズ、ヤシ、ヒマワリ、ゴマ、イネ、オオムギ、ピーナツまたはタバコの種子であろう。

本発明は、本発明の核酸またはそのサブ配列の核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。ある特徴では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが約10から50、約20から60、約30から70、約40から80、または約60から100塩基であろう。

本発明は細胞内でアミダーゼメッセンジャーの翻訳を抑制する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸と相補的であるか、または本発明の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に投与するか、または細胞で発現させることを含む。

40

【0037】

本発明は、(a) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:85、配列番号:8

50

7、配列番号:88、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、または配列番号:112と少なくとも50%の配列同一性、配列番号:36、配列番号:74、配列番号:90、または配列番号:114と少なくとも55%の配列同一性、配列番号:28、配列番号:30、または配列番号:58と少なくとも60%の配列同一性、配列番号:100と少なくとも65%の配列同一性、配列番号:56と少なくとも90%の配列同一性、または、配列番号:38と少なくとも99%の配列同一性を、少なくとも約100残基の領域にわたって含む配列、または(b)本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む単離または組換えポリペプチドを提供する。

【0038】

ある特徴では前記ポリペプチドはアミダーゼ活性を有することができる。

10

ある特徴では、前記ポリペプチドは、少なくとも約150、200、250、300、350、400、450または500残基の領域にわたって少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特徴では、前記ポリペプチドは少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0039】

ある特徴では、前記単離または組換えポリペプチドは、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114記載のアミノ酸配列を含むことができる。

20

【0040】

ある特徴では、前記アミダーゼ活性はアミド結合の加水分解を含む。前記アミダーゼ活性は第二アミダーゼ活性を含むことができる。ある特徴では、前記アミダーゼ活性は内部アミダーゼ活性を含む。ある特徴では、前記アミダーゼ活性はC-末端アミダーゼ活性を含む。前記アミダーゼ活性はN-末端アミダーゼ活性を含むことができる。前記アミダーゼ活性はタンパク質のアミド結合の加水分解を含むことができる。前記アミダーゼ活性は、薬剤または医薬組成物、例えばセファロsporin(例えばセファロsporin C)のアミド結合の加水分解を含むことができる。ある特徴では、前記アミダーゼ活性は、セファロsporin Cのアミド結合を加水分解して7-アミノセファロsporin酸(7-ACA)を生成することを含む。

30

【0041】

ある特徴では、前記アミダーゼ活性は鏡像選択性を有する。前記アミダーゼは、ラセミ混合物から鏡像体として純粋なL-アミノ酸を生成することができる。前記アミダーゼは、アミノ酸アルキルエステルまたはN-保護ペプチドアルキルエステルの酵素による変換によってペプチドを生成することができる。

40

ある特徴では、本発明は、前記アミダーゼ活性が熱に安定な単離または組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、前記ポリペプチドは、約37 から約95 の範囲の温度を含む条件下でアミダーゼ活性を保持することができる。別の特徴では、前記ポリペプチドは、約55 から約85 の範囲の温度、約70 から約95 の範囲の温度、または約90 から約95 の範囲の温度を含む条件下でアミダーゼ活性を保持することができる。

別の特徴では、本発明は、前記アミダーゼ活性が耐熱性である単離または組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、前記ポリペプチドは、37 を越える温度から約95 の範囲の温度、55 を越える温度から約85 の範囲の温度、または90 を越える温度から約

50

95 の範囲の温度に暴露した後アミダーゼ活性を保持することができる。

【0042】

本発明は、本発明のポリペプチドを含みシグナル配列を欠く単離または組換えポリペプチドを提供する。

ある特徴では、本発明は、前記アミダーゼ活性が約37 でタンパク質1ミリグラムにつき約100から約1000単位の範囲の比活性を含む本発明の単離または組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、前記アミダーゼ活性は、37 でタンパク質1ミリグラムにつき約500から約750単位、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200単位の範囲、またはタンパク質1ミリグラムにつき約750から約1000単位の範囲の比活性を含むことができる。ある特徴では、前記耐熱性は、高温に加熱した後、前記アミダーゼの比活性が37 で少なくとも半分維持されることを含む。別の特徴では、前記耐熱性は、高温に加熱した後、タンパク質1ミリグラムにつき約500から約1200単位の範囲の比活性が維持されることを含むことができる。

10

【0043】

ある特徴では、本発明の単離または組換えポリペプチドは少なくとも1つのグリコシル化部位を含むことができる。ある特徴では、グリコシル化はN-結合グリコシル化でもよい。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、P. パストリス (*P. pastoris*) またはS. ポンベ (*S. pombe*)、で発現させた後グリコシル化することができる。

本発明は本発明のポリペプチドを含むタンパク質調製物を提供する。前記調製物は液体、固体またはゲルを構成することができる。

20

ある特徴では、本発明は本発明のポリペプチドおよび第二のドメインを含むヘテロダイマーを提供する。ある特徴では、前記第二のドメインはポリペプチドで、前記ヘテロダイマーは融合タンパク質である。別の特徴では、前記第二のドメインはエピトープまたはタグである。本発明は、本発明のポリペプチドを含むホモダイマーを提供する。

【0044】

本発明はアミダーゼ活性を有する固定化ポリペプチドを提供する。このポリペプチドは本発明のポリペプチドを含むか、または本発明のポリペプチドを含むヘテロダイマーを含む。ある特徴では、前記ポリペプチドは、細胞、鉱物、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、石墨粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレーまたは毛細管に固定することができる。本発明は、本発明のポリペプチドを固定したアレーを提供する。ある特徴では、アレーは固定化された本発明の核酸を含むことができる。

30

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドと特異的に結合する単離また組換え抗体を提供する。ある特徴では、前記抗体はモノクローナルまたはポリクローナル抗体であろう。本発明は、本発明の抗体を含むハイブリドーマを提供する。

本発明は、本発明のポリペプチドを含む動物用飼料添加物を提供する。本発明は、本発明のポリペプチドを含む食用酵素デリバリーマトリックスを提供する。

【0045】

本発明は以下の工程を含むアミダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する方法を提供する：(a)本発明の抗体を提供する工程；(b)ポリペプチドを含むサンプルを提供する工程；および、(c)工程(b)のサンプルを工程(a)の抗体と前記抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合することができる条件下で接触させ、それによってアミダーゼ活性を有するポリペプチドを単離または同定する工程。

40

本発明は抗アミダーゼ抗体を作製する方法を提供する。前記方法は、ヒト以外の動物に本発明の核酸、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを、液性免疫反応を生じるために十分な量で投与し、それによって抗アミダーゼ抗体を作製する。

本発明は以下の工程を含む組換えポリペプチドを製造する方法を提供する：(a)プロモーターに機能的に連結した核酸を提供する工程(ここで前記核酸は本発明の核酸を含む)；および(b)前記ポリペプチドの発現を許容する条件下で工程(a)の核酸を発現さ

50

せ、それによって組換えポリペプチドを産生させる工程。ある特徴では、前記方法はさらに、宿主細胞を工程 (a) の核酸で形質転換し、続いて工程 (a) の核酸を発現させ、それによって形質転換細胞で組換えポリペプチドを製造する。

【 0 0 4 6 】

本発明は以下の工程を含むアミダーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法を提供する： (a) 本発明のポリペプチドを提供する工程； (b) アミダーゼ基質を提供する工程；および (c) 工程 (b) の基質と前記ポリペプチドを接触させ、さらに基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出し、基質の量の減少または反応生成物の量の増加によってアミダーゼ活性を有するポリペプチドを検出する工程。ある特徴では、前記基質はタンパク質またはアミドであろう。別の特徴では、前記基質はセファロスポリンCである。

10

本発明は以下の工程を含むアミダーゼ基質を同定する方法を提供する： (a) 本発明のポリペプチドを提供する工程； (b) テスト基質を提供する工程；および (c) 工程 (b) のテスト基質と工程 (a) のポリペプチドを接触させ、さらに基質の量の減少または反応生成物の量の増加を検出し、基質の量の減少または反応生成物の量の増加によってテスト基質がアミダーゼ基質であると同定する工程。

【 0 0 4 7 】

本発明は、テスト化合物がポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む： (a) 核酸 (本発明の核酸を含む) または前記核酸を含むベクターを前記核酸のポリペプチドへの翻訳を許容する条件下で発現させるか、または本発明のポリペプチドを提供する工程； (b) テスト化合物を提供する工程； (c) 前記ポリペプチドを前記テスト化合物と接触させる工程；および (d) 工程 (b) のテスト化合物が前記ポリペプチドと特異的に結合するか否かを決定する工程。

20

【 0 0 4 8 】

本発明は、以下の工程を含む、アミダーゼ活性の調節物質を同定する方法を提供する： (a) 本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する工程； (b) テスト化合物を提供する工程； (c) 工程 (a) のポリペプチドを工程 (b) のテスト化合物と接触させてアミダーゼ活性を測定し、テスト化合物の非存在下でのアミダーゼ活性と比較してテスト化合物存在下で測定されたアミダーゼ活性が変化すれば、テスト化合物がアミダーゼ活性を調節すると決定される工程。ある特徴では、アミダーゼ基質を提供して基質量の減少もしくは反応生成物量の増加、または基質量の増加もしくは反応性生物量の減少を検出することによって前記アミダーゼ活性を測定することができる。ある特徴では、基質量の減少またはテスト化合物との反応生成物量の増加を、テスト化合物の非存在下での基質または反応生成物の量と比較して、テスト化合物をアミダーゼ活性のアクチベーターと同定する。別の特徴では、基質量の増加またはテスト化合物との反応生成物量の減少を、テスト化合物の非存在下での基質または反応生成物の量と比較して、テスト化合物をアミダーゼ活性のインヒビターと同定する。

30

【 0 0 4 9 】

本発明は、プロセッサおよびデータ保存装置を含むコンピュータシステムを提供する。前記データ保存装置には、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドが保存されている。ある特徴では、前記コンピュータシステムはさらに、配列比較アルゴリズムおよび少なくとも1つのリファレンス配列が保存されてあるデータ保存装置を含む。前記配列比較アルゴリズムは、多型性を表示するコンピュータプログラムを含むことができる。別の特徴では、さらに前記コンピュータシステムは前記配列において1つまたは2つ以上の特徴を識別するアイデンティファイヤーを含むことができる。

40

本発明は、ポリペプチド配列または核酸配列が保存されているコンピュータ読み出し可能媒体を提供し、前記ポリペプチド配列は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む。

【 0 0 5 0 】

本発明は配列内の特徴を識別する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む： (a

50

) 配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別するコンピュータプログラムを用いて配列を読み取り、ここで前記配列はポリペプチド配列または核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；さらに(b)前記コンピュータプログラムにより前記配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別する。

本発明は、以下の工程を含む、第一の配列と第二の配列を比較する方法を提供する：(a)配列を比較するコンピュータプログラムを用いて第一の配列および第二の配列を読み取り、ここで前記第一の配列はポリペプチド配列または核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；さらに(b)前記コンピュータプログラムにより前記第一の配列および第二の配列間の相違を決定する。ある特徴では、前記第一の配列および第二の配列間の相違を決定する工程は、さらに多型性を識別する工程を含む。ある特徴では、前記方法はさらに、配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別するアイデンティファイヤーを含むことができる。別の特徴では、前記方法は、コンピュータプログラムを用いて第一の配列を読み取り、さらに配列内の1つまたは2つ以上の特徴を識別することを含む。

【0051】

本発明は、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a)アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するために増幅プライマー配列対を提供する工程であって、ここで前記プライマー対は本発明の核酸またはそのサブ配列を増幅することができ；(b)前記環境サンプルから核酸を単離するか、または前記サンプル中の核酸が前記増幅プライマー対にハイブリダイゼーションのためにアクセスできるように前記環境サンプルを処理する工程；および、(c)工程(b)の核酸を工程(a)の前記増幅プライマー対と一緒にして前記環境サンプル由来の核酸を増幅し、それによってアミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する工程。ある特徴では、前記増幅プライマー配列対の1つまたは各メンバーは、本発明の配列またはそのサブ配列の少なくとも約10から50の連続する塩基を含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【0052】

本発明は、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a)本発明の核酸を含むポリヌクレオチドプローブを提供する工程；(b)前記環境サンプルから核酸を単離するか、または前記サンプル中の核酸が工程(a)のポリヌクレオチドプローブにハイブリダイゼーションのためにアクセスできるように前記環境サンプルを処理する工程；(c)前記単離核酸または工程(b)の処理環境サンプルを工程(a)のポリヌクレオチドプローブと一緒にする工程；および、(d)工程(a)のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離し、それによってアミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を環境サンプルから単離または回収する工程。ある特徴では、前記環境サンプルは、水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプルまたは生物学的サンプルを含むことができる。ある特徴では、前記生物学的サンプルは、バクテリア細胞、原虫細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞または哺乳類細胞に由来することができる。

【0053】

本発明は、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の変種を作製する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a)本発明の核酸を含む鋳型核酸を提供する工程；さらに(b)前記鋳型配列で1つまたは2つ以上のヌクレオチドを改変、欠失もしくは付加し、またはその組み合わせを実施して前記鋳型核酸の変種を作製する工程。ある特徴では、前記方法はさらに、変種核酸を発現させて変種アミダーゼポリペプチドを作製することを含むことができる。ある特徴では、前記改変、付加または欠失は、変異性PCR(error-prone PCR)、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセ

10

20

30

40

50

ンブリーPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、再帰的アンサンブル突然変異誘発、エキスポネンシャルアンサンブル突然変異誘発、位置特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブリー、遺伝子部位飽和突然変異誘発（GS SM）、合成連結再アッセンブリー（SLR）およびその組み合わせによって導入することができる。別の特徴では、前記改変、付加または欠失は、組換え、反復配列組換え、ホスホチオエート改変DNA突然変異誘発、ウラシル含有鑄型による突然変異誘発、ギャップ保有デュープレックスによる突然変異誘発、ポイントミスマッチ修復による突然変異誘発、修復欠損宿主株による突然変異誘発、化学物質による突然変異誘発、放射線による突然変異誘発、欠失突然変異誘発、限定-選別突然変異誘発、限定-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成、およびその組み合わせによって導入することができる。

10

【0054】

ある特徴では、前記方法は、改変もしくは異なる活性を有するアミダーゼまたは鑄型核酸によりコードされるポリペプチドの安定性とは改変もしくは異なる安定性を有するアミダーゼが得られるまで反復して繰り返すことができる。ある特徴では、前記変種アミダーゼポリペプチドは耐熱性であることができ、さらに高温に暴露した後何らかの活性を保持する。別の特徴では、前記変種アミダーゼポリペプチドは、鑄型核酸によってコードされたアミダーゼと比較してグリコシル化が増加していてもよい。ある特徴では、前記変種アミダーゼポリペプチドは高温下でアミダーゼ活性を有することができ、この場合、鑄型核酸によってコードされたアミダーゼは前記高温下では活性をもたない。ある特徴では、前記方法は、鑄型核酸のコードの使用頻度と異なるコドン使用頻度を示すアミダーゼコード配列が得られるまで反復して繰り返すことができる。別の特徴では、前記方法は、鑄型核酸のメッセンジャー発現または安定性よりも高いまたは低いレベルのメッセンジャー発現または安定性を示すアミダーゼ遺伝子が得られるまで反復して繰り返すことができる。

20

【0055】

本発明は、宿主細胞でのその発現を高めるために、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）本発明の核酸を含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；および、（b）工程（a）の核酸の好ましくないまたは好ましさが劣るコドンを同定し、これを前記コドンと同じアミノ酸をコードする好ましいまたは天然に用いられるコドンで置換し（ここで、好ましいコドンは、宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて多く表現されるコドンであり、好ましくないまたは好ましさが劣るコドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて少なく表現されるコドンである）、それによって前記核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を高める工程。

30

本発明はアミダーゼポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）本発明の核酸を含む、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；および、（b）工程（a）の核酸のコドンを同定し、これを前記コドンと同じアミノ酸をコードする異なるコドンで置換し、それによってアミダーゼをコードする核酸のコドンを改変する工程。

【0056】

本発明は、宿主細胞でのその発現を高めるために、アミダーゼポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）アミダーゼポリペプチドをコードし、さらに本発明の核酸を含む核酸を提供する工程；および、（b）工程（a）の核酸の好ましくないまたは好ましさが劣るコドンを同定し、これを前記コドンと同じアミノ酸をコードする好ましいまたは天然に用いられるコドンで置換し（ここで、好ましいコドンは、宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて多く表現されるコドンであり、好ましくないまたは好ましさが劣るコドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて少なく表現されるコドンである）、それによって前記核酸を改変して宿主細胞におけるその発現を高める工程。

40

本発明は、宿主細胞でのその発現を低下させるために、アミダーゼ活性を有するポリペ

50

プチドをコードする核酸のコドンを変更する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a)本発明の核酸を提供する工程；および、(b)工程(a)の核酸において少なくとも1つの好ましいコドンを同定し、これを前記コドンと同じアミノ酸をコードする好ましくないまたは好ましが劣るコドンで置換し(ここで、好ましいコドンは、宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて多く表現されるコドンであり、好ましくないまたは好ましが劣るコドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて少なく表現されるコドンである)、それによって前記核酸を変更して宿主細胞におけるその発現を低下させる工程。ある特徴では、前記宿主細胞は、バクテリア細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞または哺乳類細胞であろう。

【0057】

本発明は、複数の変更アミダーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸ライブラリーを作製する方法を提供する。ここで前記変更活性部位または基質結合部位は、第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする配列を含む第一の核酸に由来する。前記方法は以下の工程を含む：(a)第一の活性部位または第一の基質結合部位をコードする第一の核酸を提供する工程であって、ここで前記第一の核酸配列は本発明の配列またはそのサブ配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含み、さらに前記核酸はアミダーゼ活性部位またはアミダーゼ基質結合部位をコードし；(b)前記第一の核酸内の複数の標的コドンで天然に存在するアミノ酸変種をコードする一組の変異誘発性オリゴヌクレオチドを提供する工程；および、(c)前記一組の変異誘発性オリゴヌクレオチドを用いて、突然変異を誘発された各アミノ酸コドンで一連のアミノ酸変種をコードする、活性部位または基質結合部位をコードする一組の変種核酸を作製し、それによって複数の変更アミダーゼ部位または基質結合部位をコードする核酸ライブラリーを作製する工程。ある特徴では、前記方法は、以下を含む方法によって工程(a)の第一の核酸の突然変異を誘発することをさらに含むことができる：最適化した誘導進化系、エラー誘導PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンプリーPCR、セクシユアルPCR突然変異誘発、*in vivo*突然変異誘発、カセット突然変異誘発、再帰的アンサンプル突然変異誘発、エキスポネンシャルアンサンプル突然変異誘発、位置特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンプリー、遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)、合成連結再アッセンプリー(SLR)およびその組み合わせ。別の特徴では、前記方法は以下の方法によって工程(a)の第一の核酸または変種の突然変異を誘発することをさらに含むことができる：組換え、反復配列組換え、ホスホチオエート改変DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型による突然変異誘発、ギャップ保有デュプレックスによる突然変異誘発、ポイントミスマッチ修復による突然変異誘発、修復欠損宿主株による突然変異誘発、化学物質による突然変異誘発、放射線による突然変異誘発、欠失突然変異誘発、限定-選別突然変異誘発、限定-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンプル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成およびその組み合わせ。

【0058】

本発明は以下の工程を含む小分子の製造方法を提供する：(a)小分子を合成または改変することができる複数の生合成酵素を提供する工程であって、ここで前記酵素の1つは本発明の核酸を含む核酸によってコードされるアミダーゼ酵素を含み；(b)工程(a)の酵素の少なくとも1つのための基質を提供する工程；および、(c)複数の生体触媒反応を促進する条件下で、工程(b)の基質を酵素と反応させ、一連の生体触媒反応によって小分子を生成する工程。

【0059】

本発明は以下の工程を含む小分子を変更する方法を提供する：(a)アミダーゼ酵素を提供する工程であって、ここで前記酵素は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；(b)小分子を提供する工程；および、(c)前記アミダーゼ酵素によって触媒される酵素反応を促進する条件下で、工程(a)の酵素を工程(b)の小分子と反応させ、それによって小分子をアミダーゼ酵素反応により改変する工程。ある特徴では、前記方法は、工程(a)の酵素のために複数の小分子基質を含み

10

20

30

40

50

、それによって前記アミダーゼ酵素によって触媒される少なくとも1つの酵素反応により生成される改変小分子のライブラリーを作製することができる。別の特徴では、前記方法は、複数の酵素による複数の生物触媒反応を促進する条件下で複数の追加酵素を含み、複数の酵素反応によって製造される改変小分子のライブラリーを作製することができる。また別には、前記方法はさらに、所望の活性を示す同定の改変小分子が前記ライブラリー内に存在するか否かを決定するためにライブラリーを検査する工程を含むことができる。前記ライブラリー検査工程はさらに、使用される生体触媒反応の1つを除いて全てを系統的に除外し、所望の活性を有する同定の改変小分子の有無について改変小分子の部分を検査し、さらに所望の活性を有する同定の改変小分子を生成する少なくとも1つの特異的な生体触媒反応を同定することによって複数の改変小分子の一部を製造する工程を含むことができる。

10

【0060】

本発明は、以下の工程を含む、アミダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法を提供する：(a)アミダーゼ酵素を提供する工程(前記酵素は本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む)；および(b)工程(a)の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、アミダーゼ活性について残余の配列を検査し、それによってアミダーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程。ある特徴では、前記アミダーゼ活性は、アミダーゼ基質を提供し、さらに基質量の減少または反応性生物の増加を検出することによって測定することができる。

【0061】

本発明は、代謝フラックスの即時分析を用いることにより細胞全体のための新規または改変表現型の作製方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a)細胞の遺伝的組成を改変することによって改変細胞を作製する工程であって、ここで前記遺伝的組成は、本発明の核酸を含む核酸を前記細胞に添加することによって改変され；(b)前記改変細胞を培養して複数の改変細胞を作製する工程；(c)工程(b)の細胞培養をリアルタイムでモニターすることによって前記細胞の少なくとも1つの代謝パラメーターを測定する工程；および(d)工程(c)のデータを分析して、前記測定パラメーターが同様な条件下での未改変細胞の対応する測定と異なるか否かを決定し、それによって前記細胞の操作された表現型を代謝フラックスの即時分析を用いて同定する工程。ある特徴では、前記細胞の遺伝的組成は、細胞内の配列の欠失もしくは配列の改変、または遺伝子発現のノックアウトを含む方法によって改変することができる。ある特徴では、前記方法はさらに、新たに操作された表現型を含む細胞を選抜することを含むことができる。別の特徴では、前記方法はさらに、前記選抜細胞を培養し、それによって新たに操作された表現型を含む新規な細胞株を作製することを含むことができる。

20

30

【0062】

本発明は、以下の工程を含む、アミド結合を加水分解する方法を提供する：(a)アミダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、ここで前記ポリペプチドは本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；(b)アミド結合を含む組成物を提供する工程；および、(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記アミド結合を加水分解する条件下で接触させる工程。ある特徴では、前記組成物は内部アミド結合を含むことができる。別の特徴では、前記組成物はC-末端アミド結合またはN-末端アミド結合を含むことができる。

40

【0063】

本発明は、組成物からアミド結合を含む化合物を液化または除去する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：(a)アミダーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程であって、ここで前記ポリペプチドは本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；(b)アミド結合を含有する化合物を含む組成物を提供する工程；および、(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドがアミド結合を含有する化合物を液化または除去する条件下で接触させる工程。

50

本発明は、アミダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高める方法を提供する。前記方法は、アミダーゼポリペプチド（前記ポリペプチドは、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドの少なくとも30の連続するアミノ酸を含む）をグリコシル化し、それによって前記アミダーゼポリペプチドの耐熱性または熱安定性を高めることを含む。ある特徴では、前記アミダーゼの比活性は、約37を越える温度から約95の範囲の温度で熱安定性または耐熱性を示すことができる。

【0064】

本発明は、本発明の核酸を含むベクターを過剰発現させることを含む、細胞中で組換えアミダーゼポリペプチドを過剰発現させる方法を提供する。ここで、過剰発現は、高活性のプロモーター、ニシストロン性ベクターの使用によってまたはベクターの遺伝子増幅によって実施される。

10

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む洗剤組成物を提供する。前記ポリペプチドはアミダーゼ活性を含む。ある特徴では、前記アミダーゼは非界面活性アミダーゼであろう。別の特徴では、前記アミダーゼは界面活性アミダーゼであろう。

本発明は、以下の工程を含む対象物を洗浄する方法を提供する：（a）アミダーゼ活性を有するポリペプチド（前記ポリペプチドは、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む）を含む組成物を提供する工程；（b）対象物を提供する工程；さらに（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の対象物と、前記組成物が前記対象物を洗浄することができる条件下で接触させる工程。

20

【0065】

本発明は、動物によって消費されるに先立って飼料または食品中のタンパク質またはアミドを加水分解する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）タンパク質を含む飼料物質を入手する工程であって、ここで前記タンパク質はアミダーゼ活性を有するポリペプチドによって加水分解することができ、前記ポリペプチドは本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；および（b）工程（a）のポリペプチドを前記飼料または食品物質に、前記タンパク質の加水分解および食品または飼料の処理をもたらすために十分な時間、十分な量で添加し、それによって動物が消費する前に前記食品または飼料中のタンパク質を加水分解する工程。ある特徴では、前記食品または飼料はコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、マメまたはジャガイモを含む。

30

【0066】

本発明は光学的に活性な化合物のラセミ混合物を分離する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程であって、ここで前記ポリペプチドは光学的に活性な化合物の一方の鏡像体に対して選択性を有し；（b）光学的に活性な化合物のラセミ混合物を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の混合物と、前記ポリペプチドが光学的に活性な化合物の一方の鏡像体のみを選択的に変換することができる条件下で接触させ、それによってラセミ混合物の分離を生じさせる工程。ある特徴では、前記ポリペプチドはL鏡像体に対して選択性であることができる。別の特徴では、前記ポリペプチドはR鏡像体に対して選択性であることができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは立体特異的である。

40

本発明はアミド結合を含む化合物を合成する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：（a）本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程であって、ここで前記ポリペプチドはアミダーゼ活性を含み；（b）前駆体を提供する工程；および（c）工程（a）のポリペプチドを工程（b）の前駆体と、前記ポリペプチドが前記アミド結合の合成を触媒することができる条件下で接触させる工程。ある特徴では、前記ポリペプチドは立体選択的または立体特異的であり、さらにアミド結合を含む化合物はキラルであろう。別の特徴では、前記前駆体は非キラルであり、アミド結合を含む前記化合物はキラルである。ある特徴では、アミド結

50

合を含む化合物はアミノ酸またはアミノアミドであろう。ある特徴では、前記化合物はメチルドーパであろう。

【0067】

本発明は、以下の工程を含むペニシリンを加水分解する方法を提供する：(a)本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；(b)ペニシリンを含む組成物を提供する工程；(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記ペニシリンを加水分解することができる条件下で一緒にする工程。

本発明は、以下の工程を含むセファロsporinを加水分解する方法を提供する：(a)本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する；(b)セファロsporinを含む組成物を提供し；(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記セファロsporinを加水分解することができる条件下で一緒にする。ある特徴では、前記セファロsporinはセファロsporinCであろう。

本発明は、以下の工程を含む7-アミノセファロsporin酸(7-CAC)を合成する方法を提供する工程：(a)本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；(b)セファロsporinCを含む組成物を提供する工程；(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記セファロsporinCを7-アミノセファロsporin酸(7-ACA)に変換することができる条件下で一緒にする工程。

【0068】

本発明は、以下の工程を含む細胞壁を加水分解する方法を提供する：(a)本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；(b)細胞壁を含む組成物を提供する工程；(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記細胞壁を加水分解することができる条件下で接触させる工程。

本発明は、以下の工程を含む、食品の加工において発酵に影響を与える方法を提供する：(a)本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；(b)食品の加工に用いられるバクテリアを含む組成物を提供する工程；(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドが前記バクテリアの発酵特性を変化させることができる条件下で接触させる工程。ある特徴では、前記バクテリアの発酵特性は増殖速度、酸の生成または生存を含むことができる。

本発明は、以下の工程を含む、チーズの熟成および風味の発生のための方法を提供する：(a)本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する工程；(b)チーズを含む組成物を提供する工程；(c)工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と、前記ポリペプチドがミルクのカゼインを加水分解しそれによってチーズの熟成およびチーズの風味の発生を促進する条件下で接触させる工程。

【0069】

本発明は、以下の工程を含むトランスジェニック植物の製造方法を提供する：(a)異種の核酸配列(前記異種核酸配列は本発明の核酸を含む)を細胞に導入し、それによって形質転換した植物細胞を生成する工程；(b)前記形質転換細胞からトランスジェニック植物を産出する工程。ある特徴では、工程(a)はさらに、異種核酸配列を植物細胞のプロトプラストにエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションによって導入することを含むことができる。別の特徴では、工程(a)はさらに、異種核酸配列をDNA粒子ボンバーによって植物組織に直接導入することを含むことができる。また別には、工程(a)はさらに、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)宿主を用いて異種核酸配列を植物細胞DNAに導入することを含むことができる。

本発明は、以下の工程を含む、細胞(例えば動物または植物細胞)で異種核酸配列を発

10

20

30

40

50

現させる方法を提供する：(a)プロモーターに機能的に連結された異種核酸配列で前記細胞を形質転換する工程であって、ここで前記異種核酸配列は本発明の核酸を含み；(b)前記異種核酸配列が前記細胞内で発現される条件下で前記細胞を増殖させる工程。

【0070】

本発明は、以下の工程を含む殺菌または殺真菌を促進する方法を提供する：本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを提供し、さらに工程(a)のポリペプチドを組成物と接触させ、それによって殺菌または殺真菌を促進する。本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む抗菌組成物を提供する。前記抗菌組成物は殺菌剤または殺真菌剤であろう。

10

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む食品を提供する。本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含むチーズを提供する。本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む乳製品を提供する。

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。

本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを含む市販製品および食品を提供する。前記には食用品、化粧品、織物、硬質表面および人間の肌などのための洗浄用品、パンおよびパンの改良物質、バター、マーガリン、バターの低カロリー代替物、チーズ、ドレッシング、マヨネーズ様製品、肉製品、ペプチドを含む食品原料、シャンプー、クリームまたはローション(例えば人肌の治療用)、石鹼および石鹼代替製品、洗浄粉末または洗浄液、および/または食品製造機械および台所器具のための洗浄用品が含まれる。

20

【0071】

本発明は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113に示す配列を有する単離核酸、および本発明の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し、さらにアミダーゼ活性[第二アミダーゼ活性(例えばアミドの加水分解を触媒する)を含む]を有するポリペプチド(ペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素含む)をコードするその変種を提供する。

30

【0072】

本発明のある特徴は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113に示す配列を有する単離核酸、前記と実質的に同一の配列、および前記と相補的な配列である。

40

50

【0073】

本発明の別の特徴は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113に示す配列の連続する少なくとも10塩基を含む単離核酸、前記と実質的に同一の配列、および前記と相補的な配列である。

【0074】

さらに別の特徴では、本発明は、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114に示す配列を有するポリペプチドをコードする単離核酸、およびアミダーゼ活性(第二アミダーゼ活性を含む)を有し、さらに前記配列と少なくとも50%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするその変種を提供する。ある特徴では、前記アミダーゼ活性はアミドの加水分解を含み、例えばペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素である。

【0075】

本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸および前記と実質的に同一の配列である。

本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸および前記と実質的に同一の配列である。

さらに別の特徴では、本発明は、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114に示す配列、および前記と実質的に同一の配列を有する精製ポリペプチドを提供する。ある特徴では、前記ポリペプチドは、アミダーゼ活性[第二アミダーゼ活性(例えばアミドの加水分解を含む)を含む]を有する(ペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素を含む)。

【0076】

本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列に特異的に結合する単離または精製抗体である。

本発明のまた別の特徴は、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列に特異的に結合する、単離もしくは精製抗体または前記の結合フラグメントである。

本発明のさらに別の特徴は、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列の少なくとも10アミノ酸を有するポリペプチドの製造方法である。前記方法は、前記ポリペプチドをコードする核酸（前記核酸はプロモーターに機能的に連結される）を宿主細胞に導入し、前記宿主細胞を前記核酸の発現を許容する条件下で培養し、それによってポリペプチドを製造することを含む。

【0077】

本発明のまた別の特徴は以下の工程を含む変種の創出方法である：本発明の核酸、例えば配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、または配列番号：113に示す配列を有するポリヌクレオチド、前記と実質的に同一の配列、本発明の配列と相補的な配列、前述の配列の連続する少なくとも30ヌクレオチドを含むフラグメントを入手し、さらに前記配列中の1つまたは2つ以上のヌクレオチドを別のヌクレオチドに変更し、前記配列中の1つまたは2つ以上のヌクレオチドを欠失させ、または前記配列に1つまたは2つ以上のヌクレオチドを付加する。

【0078】

本発明のまた別の特徴はコンピュータ読み出し可能媒体であり、前記には本発明の核酸および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列が保存されてある。本発明のまた別の特徴は、プロセッサおよびデータ保存装置を含むコンピュータシステムである。前記データ保存装置には本発明の核酸および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列が保存されてある。本発明のさらに別の特徴は第一の配列とリファレンス配列を比較する方法である。ここで前記第一の配列は、本発明の核酸および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列である。前記方法は、配列を比較するコンピュータプログラムを使用して第一の配列およびリファレンス配列を読み取り、さらに前記コンピュータプログラムにより第一の配列とリファレンス配列間の相違を決定することを含む。本発明の別の特徴は、本発明の核酸および前記と実質的に同一の配列または本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列における特徴を同定する方法である。前記方法は、配列内の特徴を同定するコンピュータプログラムを使用して前記配列を読み取り、さらに前記コンピュータプログラムにより配列内の特徴を同定することを含む。

【0079】

本発明の別の特徴は、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列のフラグメントまたは変種を同定するアッセイである（前記フラグメントまたは変種は、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列の酵素機能を保持する）。前記アッセイは、本発明のポリペプチドおよび前記と実質的に同一の配列またはポリペプチドフラグメントまたは変種を、前記ポリペプチドフラグメントまたは変種が機能することができる条件下で基質分子と接触させ、基質レベルの低下または前記ポリペプチドと基質間反応の特異的生成物レベルの増加を決定し、それによってそのような配列を有するフラグメントまたは変種を同定することを含む。

表1は本発明の配列を示す表である。

【0080】

本発明は、蛍光性アミダーゼ（例えば第二アミダーゼ）、基質、7-(-D-2アミノアジ

ポイルアミド)-4-メチルクマリンを提供する。本発明は、7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを含む組成物を提供する。ある特徴では、本発明の7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンは高処理 (HT) 活性系細胞全体スクリーニングであり、例えばアミダーゼ活性の発見のために用いられる。ある特徴では、本発明の7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンは、環境ライブラリーのHTスクリーニングのために用いられる。ある特徴では、7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンは、セファロスポリンCの発見のための基質として用いられる。本発明は、7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを用いてセファロスポリンCアミダーゼを発見する方法を提供する。

【0081】

本発明の1つまたは2つ以上の実施態様の詳細は添付の図面および下記の詳細な説明で示される。本発明の他の特徴、目的および利点は本記述および図面から、さらに請求の範囲から明らかとなる。

本明細書に引用した全ての刊行物、特許、特許出願、GenBank配列およびATCC寄託は、参照により本明細書にその全ての目的のために含まれる。

【0082】

発明の詳細な説明

本発明は、アミダーゼ酵素、前記酵素をコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドおよびポリペプチドを製造する方法並びに使用する方法を提供する。本発明は、アミダーゼ活性を有する新規なポリペプチド、それらをコードする核酸およびそれらと結合する抗体を目的とする。本発明のポリペプチドは多様な診断的、治療的および工業的背景で用いられる。本発明のアミダーゼは、第二アミダーゼ活性 (例えばアミドの加水分解における活性) を有し、例えばペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素を含む。別の特徴では、本発明の酵素は、食品の加工、例えば食品の風味の増強 (例えば酵素熟成チーズ)、殺菌および殺真菌の促進、ファインケミカルの改変および脱保護、ペプチド結合の合成、キラル分離の実施、抗生物質 (例えばセファロスポリンC) の加水分解のために用いることができる。

【0083】

本発明のアミダーゼは高温および/または低温で、または広い範囲の温度で活性を有することができる。例えば、それらは、20 から90、30 から80 または40 から70 の範囲の温度で活性を有することができる。本発明はまた、アルカリ性pHまたは酸性pH、例えば低水中酸性度で活性を有するアミダーゼを提供する。また別の特徴では、本発明のアミダーゼは、pH5.0、pH4.5、pH4.0およびpH3.5の低い酸性pHで活性を有することができる。また別の特徴では、本発明のアミダーゼは、pH9.5、pH10、pH10.5およびpH11の高いアルカリ性pHで活性を有することができる。ある特徴では、本発明のアミダーゼは、低い水活量 (低水分含有量) 下で約40 から約70 の範囲の温度で活性を有する。

本発明はまた、本発明の典型的なアミダーゼをさらに改変して所望の特性を有するタンパク質を作製する方法を提供する。例えば、本発明の方法によって作製されるアミダーゼは、改変された酵素活性、耐熱性、pH/活性プロファイル、pH/安定性プロファイル [例えば低pH値 (例えばpH<6またはpH<5) または高pH値 (例えばpH>9) での安定性の増強]、酸化に対する安定性、Ca²⁺依存性、比活性などを有することができる。本発明は任意の対象における特性の改変を提供する。例えば、前記改変によって、親の酵素と比較して酵素活性、またはpHもしくは温度活性プロファイルが改変された変種が得られるであろう。

【0084】

定義

“アミダーゼ” という用語にはアミダーゼ活性 (例えばアミドの加水分解を触媒する) を有する全てのポリペプチド、例えば酵素が含まれる。例えば、アミダーゼという用語には第二アミダーゼ活性を有するポリペプチド、例えばアミドの加水分解における活性を有するポリペプチドが含まれる。前記用語にはペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有する酵素が含まれる。前記用語には、食品 (例えば酵素熟成チ

10

20

30

40

50

ーズ)で風味を増強するために、殺菌および殺真菌を促進するために、ファインケミカル中間体を改変および脱保護するために、ペプチド結合を合成するために、キラル分離を実施するために用いることができる酵素が含まれる。前記用語には、アミド系抗生物質(例えばセファロsporin C)を加水分解することができる酵素が含まれる。“アミダーゼの変種”は、“前駆体アミダーゼ”のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含む。前記前駆体アミダーゼは天然に存在するアミダーゼおよび組換えアミダーゼを含むことができる。前記アミダーゼ変種のアミノ酸配列は、前記前駆体アミダーゼのアミノ酸配列から前記配列の1つまたは2つ以上のアミノ酸を置換、欠失または挿入することによって“誘導”することができる。そのような改変は、前駆体アミダーゼ酵素自体を操作するのではなく、前記前駆体アミダーゼのアミノ酸配列をコードする“前駆体DNA配列”から得ることができる。前駆体DNA配列の前記のような操作に適した方法には本明細書で開示する方法と同時に当技術分野で公知の方法が含まれる。本発明のアミダーゼはまた米国特許第6,500,659号;第6,465,204号;第6,429,004号に記載された活性を有することができる。ポリペプチドがアミダーゼ活性を有するか否かについてのまた別の日常的検査については、本明細書に記載したスクリーニング方法の他に米国特許第6,333,176号を参照されたい。

10

【0085】

“抗体”という用語には、免疫グロブリン遺伝子に由来するか、その後形成されるか、または実質的に免疫グロブリン遺伝子によってコードされたペプチドもしくはポリペプチドまたはそのフラグメントであって、抗原またはエピトープと結合することができるものが含まれる。例えば以下を参照されたい: *Fundamental Immunology, Third Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97.* 抗体という用語には抗原結合部分、すなわち抗原と結合する能力を保持する“抗原結合部位”[例えばフラグメント、配列、相補性決定領域(CDR)]が含まれる。前記部位には以下が含まれる: (i) Fabフラグメント、VL、VH、CLおよびCH1ドメインから成る一価フラグメント; (ii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント; (iii) VHおよびCH1ドメインから成るFdフラグメント; (iv) 抗体の一本のアームのVLおよびVHドメインから成るFvフラグメント; (v) dAbフラグメント(Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546)、これはVHドメインから成る; および (vi) 単離された相補性決定領域(CDR)。単鎖抗体もまた“抗体”という用語に含まれる。

20

30

【0086】

本明細書で用いられる“フラグメント”という用語には、ポリペプチド(例えば天然に存在するタンパク質)の部分が含まれ、これは少なくとも2つの異なる構造で存在することができる。フラグメントはポリペプチド(例えば天然に存在するタンパク質)と同じまたは実質的に同じアミノ酸配列を有することができる。“実質的に同じ”とは、アミノ酸配列がほとんど(ただし完全にではない)同じであるが、前記が関連を有する配列の少なくとも1つの機能的活性を保持する。ある特徴では、アミノ酸配列は、それらが少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%またはそれより多く同一である場合は“実質的に同じ”または“実質的に相同”である。天然に存在するタンパク質とは異なる三次元構造を有するフラグメントもまた含まれる。前記の例は“前駆形”分子であり、例えば切断によって改変され顕著に高い活性を有する成熟酵素を生成できる低活性の前タンパク質である。

40

本明細書で用いられる“アレー”または“マイクロアレー”または“バイオチップ”または“チップ”という用語は、複数の標的エレメントであり、各標的エレメントは、基質表面の一定面積上に固定された一定量の1つまたは2つ以上のポリペプチド(抗体を含む)または核酸を含む(下記でさらに詳細に考察される)。

本明細書で用いられる、“コンピュータ”、“コンピュータプログラム”および“プロセッサ”は、そのもっとも広い一般的な意味で用いられ、下記に詳細に記載するようにそのような全ての装置を含む。個々のポリペプチドまたはタンパク質“のコード配列”また

50

は前記“を配列がコードする”ということは、適切な調節配列の制御下に配置されたとき、転写されポリペプチドまたはタンパク質に翻訳される核酸配列を指す。

【0087】

本明細書で用いられる“発現カセット”という用語は、構造遺伝子（すなわちタンパク質コード配列、例えば本発明のアミダーゼ）の発現に対してそのような配列に適合する宿主で影響を与えることができるヌクレオチド配列を指す。発現カセットは、少なくとも前記ポリペプチドコード配列および場合によって他の配列（例えば転写終了シグナル）に機能的に連結されたプロモーターを含む。発現の実施に必要なまたは役立つさらに別の因子、例えばエンハンサーもまた用いることができる。したがって、発現カセットにはまたプラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、“裸のDNA”組換えベクターなどが含まれる。

10

本明細書で用いられる“機能的に連結される”とは、2つまたは3つ以上の核酸（例えばDNA）セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、この用語は転写調節配列と転写される配列の機能的関係を指す。例えば、プロモーターが適切な宿主細胞または他の発現系でコード配列の転写を刺激または調節する場合は、前記プロモーターはコード配列に機能的に連結されてある。一般的に、転写される配列に機能的に連結されるプロモーター転写調節配列は転写される配列と物理的に連続している。すなわちそれらはcis-作動性である。しかしながら、いくつかの転写調節配列（例えばエンハンサー）は、前記が転写を強化するコード配列に対して必ずしも物理的に連続または接近して配置される必要はない。

【0088】

“ベクター”は、細胞に感染、トランスフェクト、一過性または永久的に形質導入することができる核酸を含む。ベクターは裸出核酸でもタンパク質もしくは脂質との複合核酸でもよいことは理解されよう。ベクターは場合によってウイルスまたはバクテリアの核酸および/またはタンパク質および/またはメンブレン（例えば細胞膜、ウイルス脂質エンベロープなど）を含む。ベクターにはレプリコン（例えばRNAレプリコン、バクテリオファージ）が含まれ（ただしこれに限定されない）、前記レプリコンにDNAフラグメントが結合され、複製できるようになるであろう。したがってベクターにはRNA、自律的自己複製環状もしくは直鎖状DNAまたはRNA（例えばプラスミド、ウイルスなど、例えば米国特許第5,217,879号を参照されたい）が含まれ（ただしこれらに限定されない）、さらに発現および非発現プラスミドの両者が含まれる。組換え微生物または細胞培養が“発現ベクター”の宿主として記載される場合は、前記には染色体外環状および直鎖状DNAおよび宿主染色体に組み込まれたDNAの両方が含まれる。ベクターが宿主細胞によって維持される場合、前記ベクターは、自律性構造物として分裂時に細胞によって安定的に複製されるか、または宿主のゲノム内に取り込まれるであろう。

20

30

【0089】

本明細書で用いられる“プロモーター”という用語には、細胞（例えば植物細胞）内でコード配列の転写を駆動することができる全ての配列が含まれる。したがって、本発明の構築物で用いられるプロモーターにはcis-作動性転写制御エレメントおよび調節配列（遺伝子転写のタイミングおよび/または速度の調節または調整に必要である）が含まれる。例えば、あるプロモーターは、エンハンサー、プロモーター、転写終了因子、複製起点、染色体組み込み配列、5'および3'非翻訳領域またはイントロン配列を含むcis-作動性転写制御エレメントであろう（これは転写の調節に必要である）。これらのcis-作動性配列は典型的にはタンパク質または他の生体分子と相互作用して転写を実行（オン/オフ切り換え、調節、調整など）する。“構成的”プロモーターは、ほとんどの環境条件および発生もしくは細胞分化の状態下で持続的に発現を駆動するプロモーターである。“誘導性”または“調節可能”プロモーターは、環境条件または発生条件の影響下で本発明の核酸の発現を指令する。誘導性プロモーターによって転写に影響を与えることができる環境条件の例には、嫌気性条件、高温、乾燥または光の存在が含まれる。

40

【0090】

“組織特異的”プロモーターは、例えば植物または動物の同定の細胞または組織または

50

器官でのみ活性を有する転写制御エレメントである。組織特異的調節は、ある組織に特異的なタンパク質をコードする遺伝子の発現を担保するある種の固有因子によって達成される。そのような因子は、固有の組織の発生を可能にするために哺乳類および植物に存在することが知られている。

“植物”という用語には植物全体、植物の部分（例えば葉、茎、花、根など）、植物のプロトプラスト、種子および植物細胞および前記の子孫が含まれる。本発明の方法で用いることができる植物の種類は一般的に、形質転換技術を応用しやすい高等植物の種類と同様に広く、被子植物（単子葉植物および双子葉植物）の他に裸子植物が含まれる。前記には種々のレベルの倍数性を有する植物が含まれ、異数体、二倍体、半数体、ヘミ接合体状態を含む。本明細書で用いられるように、“トランスジェニック植物”という用語には、異種の核酸配列 [例えば本発明の核酸および種々の組換え構築物（例えば発現カセット）] が挿入された植物または植物細胞が含まれる。

10

【0091】

“プラスミド”は、市販ルートで入手可能であるか、基本的に制限なく公的に入手可能であるか、または公表された方法にしたがって入手可能なプラスミドから構築することができる。本明細書に記載したプラスミドと同等なプラスミドが当技術分野で公知であり、当業者には明白であろう。

“遺伝子”という用語には、転写生成物（例えばメッセンジャー）の生成に必要なDNAセグメントを含む核酸配列が含まれる。これは順次翻訳されてポリペプチド鎖を生成するか、または遺伝子の転写、再生産もしくは安定性を調節する。遺伝子は、コード領域に先行する領域および後続の領域を含むことができる。これには例えば、リーダー、トレイラー、プロモーターおよびエンハンサーの他に、適用可能な場合には個々のコードセグメント（エクソン）の間の介在配列（イントロン）が含まれる。

20

【0092】

“核酸”または“核酸配列”という語句には以下が含まれる：オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはそれらの任意のフラグメント、ゲノム起源もしくは合成起源のDNAまたはRNA（例えばmRNA、rRNA、tRNA）（これらは一本鎖でも二本鎖でもよく、さらにセンス鎖でもアンチセンス鎖でもよい）、ペプチド核酸（PNA）、または任意のDNA様もしくはRNA様物質（天然または合成起源） [例えばiRNA、リボヌクレオタンパク質（例えばiRNP）を含む]。この用語は、天然のヌクレオチドの既知類似体を含む核酸、すなわちオリゴヌクレオチドを包含する。この用語はまた、合成骨格をもつ核酸様構造物を包含する（例えば以下を参照されたい：Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156）。

30

“アミノ酸”または“アミノ酸配列”はオリゴヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質配列、またはこれらのいずれかのフラグメント、部分もしくはサブユニットおよび天然に存在する分子または合成分子を含む。“ポリペプチド”および“タンパク質”という用語は、ペプチド結合または改変ペプチド結合（すなわち同配体）によって互いに結合したアミノ酸を含み、さらに20個の遺伝子コードアミノ酸以外の改変アミノ酸を含有することができる。“ポリペプチド”という用語はまたペプチドおよびポリペプチドフラグメント、モチーフなども含む。この用語はまたグリコシル化ポリペプチドも含む。本発明のペプチドおよびポリペプチドはまた、下記でさらに詳細に述べるように全ての“模倣体”および“ペプチド模倣体”を含む。

40

【0093】

“単離された”という用語は、その本来の環境（例えば前記物質が天然に存在する場合は天然の環境）から移動させた物質を含む。例えば、生きている動物に存在する天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、前記天然の系に同時に存在するいくつかまたは全ての物質から分離されてある前記同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であることができ、および/またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成

50

物の一部分であることができるが、それでもなお、そのようなベクターまたは組成物がその物質の天然の環境の一部ではないという点で単離されたものである。本明細書で用いられるように、単離物質または組成物はまた“精製”組成物であることができる。すなわち、前記用語は絶対的な純粋を要求せず、むしろ相対的な定義として意図される。ライブラリーから得られる個々の核酸は慣習的に精製され電気泳動的均質性が得られる。別の特徴では、本発明は、少なくとも1、2、3、4、5またはそれ以上の指数規模でゲノムDNAから精製された核酸、またはライブラリーもしくは他の環境に存在する他の配列から精製された核酸を提供する。

【0094】

本明細書で用いられる“組換え”という用語は、天然の環境では隣接していない“骨格”核酸に隣接する核酸を含むことができる。ある特徴では、核酸は、核酸“骨格分子”集団中で5%またはそれ以上の数の核酸挿入物を表す。本発明の“骨格分子”には核酸、例えば発現ベクター、自己複製核酸、ウイルス、組み込み核酸および関心のある核酸挿入物の維持または操作に利用される他のベクターまたは核酸が含まれる。ある特徴では、前記濃縮された核酸は、組換え骨格分子集団内で10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%またはそれ以上の数の核酸挿入物を表す。“組換え”ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術によって生成される、例えば所望のポリペプチドまたはタンパク質をコードする外因性DNA構築物によって形質転換された細胞から生成されるポリペプチドまたはタンパク質を指す。“合成”ポリペプチドまたはタンパク質は、下記でさらに詳細に記載するように化学合成によって製造されるものである。

【0095】

プロモーター配列は、下記でさらに考察するように、前記プロモーターで転写を開始するRNAポリメラーゼがあるコード配列をmRNAに転写するときには前記コード配列に“機能的に連結されている”であろう。

“オリゴヌクレオチド”は、化学的に合成することができる一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは二本鎖相補性ポリデオキシヌクレオチドのいずれも含む。そのような合成オリゴヌクレオチドは5'ホスフェートをもたず、したがってキナーゼの存在下でATPを用いてホスフェートを添加しなければ別のオリゴヌクレオチドと連結されないであろう。合成オリゴヌクレオチドは、脱リン酸されていないフラグメントに連結することができる。

【0096】

2つの核酸またはポリペプチドの関係で“実質的に同一”という語句は、下記で詳細に考察するように公知のいずれかの配列比較アルゴリズムを用いるかまたは視覚による精査によって測定した場合、最大一致について比較およびアラインメントを実施したとき、例えば少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%もしくは99%またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基(配列)同一性を有する2つまたは3つ以上の配列を指すことができる。また別の特徴では、本発明は、本発明の典型的な配列、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113; および、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配

列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114と、それぞれ少なくとも約10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000またはそれ以上の残基の領域にわたって、または約50残基から完全長の核酸もしくはポリペプチドの範囲の領域にわたって実質的に同一性を有する核酸およびポリペプチド配列を提供する。本発明の核酸配列は、ポリペプチドコード領域の全長にわたって実質的に同一であることができる。

10

【0097】

“実質的に同一な”アミノ酸配列はまた1つまたは2つ以上の保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または挿入によってリファレンス配列と異なる配列を含むことができるが、特に前記置換が前記分子の活性を有する部位ではない部位で発生し、さらに前記ポリペプチドがその機能的特性を本質的に保持することを条件とする。保存的アミノ酸置換は、例えば1つのアミノ酸を同じ種類の別のアミノ酸で置換することである（例えば、1つの疎水性アミノ酸、例えばイソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンによるまた別の疎水性アミノ酸の置換、または1つの極性アミノ酸によるまた別の極性アミノ酸の置換、例えばアルギニンによるリジンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換またはグルタミンによるアスパラギンの置換）。1つまたは2つ以上のアミノ酸を例えばアミダーゼから欠失させ、その生物学的活性を顕著に変化させることなく前記ポリペプチドの構造を改変させることができる。例えば、アミダーゼ活性に要求されないアミノまたはカルボキシ末端のアミノ酸を除去することができる。

20

【0098】

“ハイブリダイゼーション”は核酸鎖が塩基対形成により相補鎖と結合する過程を含む。ハイブリダイゼーション反応は鋭敏で選択性であるので、関心のある特定の配列を前記配列が低濃度で存在するサンプルでも識別することができる。ストリンジェントな条件は、例えば、前ハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液中の塩濃度またはホルムアミド濃度によって、またはハイブリダイゼーション温度によって定義することができる、それらは当技術分野で周知である。例えば、ストリンジェンシーは、下記で述べるように塩濃度の減少、ホルムアミドの濃度の増加、またはハイブリダイゼーション温度の上昇、ハイブリダイゼーション時間の変更によって高めることができる。また別の特徴では、本発明の核酸は、本明細書で説明するように種々の（例えば高、中程度および低）ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるその能力によって限定される。

30

【0099】

“変種”には、（それぞれ）1つまたは2つ以上の塩基対、コドン、イントロン、エクソンまたはアミノ酸残基で改変された本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドであって、本発明のアミダーゼの生物学的活性をなお保持するものが含まれる。変種は例えば以下の方法を含む任意の数の手段によって作製することができる：変異性PCR（error-prone PCR）、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブリーPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、再帰的アンサンブル突然変異誘発、エキスポネンシャルアンサンブル突然変異誘発、位置特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブリー、GSSM、およびそれらの任意の組み合わせ。野生型アミダーゼと異なる例えばpHまたは温度で活性を有する変種アミダーゼを作製する技術は本明細書に含まれている。

40

“飽和突然変異”または“GSSM”という用語は、下記で詳細に説明するように、縮退オリゴヌクレオチドプライマーを用いて点変異をポリヌクレオチドに導入する方法を含む。

“最適化誘導進化システム”または“最適化誘導進化”という用語は、関連核酸配列（例えば関連遺伝子）の再アッセンブリーのための方法を含み、下記で詳細に説明する。

50

“合成連結再アッセンブリー”または“SLR”という用語は、非確率論的態様でオリゴヌクレオチドフラグメントを連結する方法を含み、下記で詳細に説明する。

【0100】

核酸の作製および操作

本発明は、本発明のアミダーゼポリペプチドをコードする核酸〔発現カセット（例えば発現ベクター）を含む〕を提供する。本発明はまた、本発明の核酸を用いて新規なアミダーゼ配列を発見する方法も含む。本発明はまた、アミダーゼ遺伝子の発現、転写物およびポリペプチドを本発明の核酸を用いて阻害する方法も含む。さらにまた提供されるものは、例えば合成連結再アッセンブリー、最適化誘導進化システムおよび/または飽和突然変異誘発によって本発明の核酸を改変する方法である。本発明の核酸は、例えばcDNAライブラリーのクローニングおよび発現、メッセンジャーまたはゲノムDNAのPCRによる増幅などによって作製、単離および/またはマニピュレーションを実施することができる。本発明の方法の実施に際しては、相同な遺伝子を本明細書で開示するように鋳型核酸の細工によって改変することができる。本発明は、当技術分野で公知の任意の方法またはプロトコルまたは装置（これらは学術文献および特許文献によく説明されている）を組み合わせる実施することができる。

10

【0101】

一般的技術：本発明の実施のために用いられる核酸は、RNA、iRNA、アンチセンス核酸、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルスまたはそのハイブリッドのいずれであれ、種々の供給源から単離し、遺伝学的に細工し、増幅し、および/または組換え体として発現/作製することができる。これらの核酸から作製された組換えポリペプチドは個々に単離またはクローニングして、所望の活性についてテストすることができる。いずれの組換え発現系（バクテリア、哺乳類、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含む）も使用することができる。

20

また別には、これらの核酸は周知の化学的合成技術によってin vitroで合成することができる。これらは例えば以下に記載されている：Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra Lett. 22:1859; 米国特許4,458,066。

30

【0102】

核酸のマニピュレーション技術、例えばサブクローニング、プローブの標識（例えばクレーノポリメラーゼ、ニックトランスレーション、増幅によるランダムなプライマーの標識）、配列決定、ハイブリダイゼーションなどは学術文献および特許文献によく記載されている。例えば以下を参照されたい：Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)。

40

【0103】

本発明の方法の実施に用いられる核酸を入手しこれを操作するまた別の有用な手段はゲノムサンプルからのクローニングであり、所望する場合には、例えばゲノムクローンまたはcDNAクローンから単離し増幅させた挿入物のスクリーニングおよび再クローニングである。本発明の方法で用いられる核酸の供給源にはゲノムまたはcDNAライブラリーが含まれ、例えば哺乳類人工染色体（MAC）（例えば米国特許第5,721,118号；第6,025,155号を参照されたい）、ヒト人工染色体（例えばRosenfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335を参照されたい）、酵母人工染色体（YAC）、バクテリア人工染色体（BAC）、P1人工染色体（例えば以下を参照されたい：Woon (1998) Genomics 50:306-316）、P1-由来ベクター（PAC）（例えば以下を参照されたい：Kern (1997) Biotechniques 23:120-124）、コス

50

ミド、組換えウイルス、ファージまたはプラスミドに含有される。

ある特徴では、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、翻訳されたポリペプチドまたはそのフラグメントの分泌を指令することができるリーダー配列とともに適切な相でアッセンブリされる。

【0104】

本発明は融合タンパク質および前記をコードする核酸を提供する。本発明のポリペプチドは異種ペプチドまたはポリペプチド、例えばN-末端識別ペプチド〔所望の特徴（例えば安定性の強化または精製の簡易化）を付与する〕と融合させることができる。本発明のペプチドまたはポリペプチドはまた、例えば免疫原性のより高いペプチドの作製、組換えにより合成されたペプチドのより容易な単離、抗体および抗体発現B細胞の同定および単離などのために、1つまたは2つ以上のさらに追加のドメインが結合された融合タンパク質として合成および発現させることもできる。検出および精製を容易にするドメインには、例えば金属キレートペプチド、例えばポリペプチドヒスチジントラクトおよびヒスチジン-トリプトファンモジュール（固定金属上での精製を可能にする）、プロテインAドメイン（固定化免疫グロブリン上での精製を可能にする）、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製システム（Immunex Corp, Seattle WA）で利用されるドメインが含まれる。切断可能なリンカー配列〔例えばXa因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego, CA）〕を精製ドメインとモチーフ含有ペプチドまたはポリペプチドとの間に挿入することによって精製が促進される。例えば、発現ベクターは、6ヒスチジン残基と結合させたエピートープコード核酸配列を含むことができ、前記配列の後にチオレドキシニンおよびエンテロキナーゼ切断部位が続く（例えば以下を参照されたい：Williams (1995) Biochemistry 34: 1787-1797; Dobeli (1998) Protein Expr. Purif. 12:404-414）。前記ヒスチジン残基は検出および精製を容易にし、一方エンテロキナーゼ切断部位は、前記融合タンパク質の残余から前記エピートープを精製する手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクターおよび融合タンパク質の利用に関する技術は学術文献および特許文献に詳細に説明されており、例えば以下の文献を参照されたい：Kroll (1993) DNA Cell. Biol. 12:441-53。

【0105】

転写および翻訳制御配列：本発明は、RNAの合成/発現を指令または調節するために発現（例えば転写または翻訳）制御配列（例えばプロモーター、エンハンサー）に機能的に連結された本発明の核酸（例えばDNA）配列を提供する。前記発現制御配列は発現ベクター中に存在することができる。典型的なバクテリアプロモーターには、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPR、PLおよびtrpが含まれる。典型的な真核細胞プロモーターにはCMV極初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルスのLTRおよびマウスメタロチオネインIが含まれる。

バクテリアでポリペプチドを発現するために適切なプロモーターには大腸菌のlacまたはtrpプロモーター、lacIプロモーター、lacZプロモーター、T3プロモーター、T7プロモーター、gptプロモーター、ラムダPRプロモーター、ラムダPLプロモーター、糖分解酵素をコードするオペロン〔例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ（PGK）〕のプロモーターおよび酸性ホスファターゼプロモーターが含まれる。真核細胞プロモーターには、CMV極初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、熱ショックプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、レトロウイルスのLTRおよびマウスメタロチオネインIのプロモーターが含まれる。原核細胞もしくは真核細胞またはそれらのウイルスで遺伝子発現を制御することが知られている他のプロモーターも用いることができる。

【0106】

組織特異的植物プロモーター：本発明は、組織特異的態様で発現させることができる、例えば組織特異的態様で本発明のアミダーゼを発現させることができる発現カセットを提供する。本発明はまた、組織特異的態様で本発明のアミダーゼを発現することができる植物または種子を提供する。前記組織特異性は種子特異性、茎特異性、葉特異性、根特異性、果実特異性などであろう。

ある特徴では、構成的プロモーター（例えばCaMV35Sプロモーター）を植物の特定部分

または種子または植物全体での発現に用いることができる。例えば、過剰発現のために、植物のいくつかの組織または全組織（例えば再生植物）で核酸の発現を指令する植物プロモーターフラグメントを用いることができる。そのようなプロモーターは本明細書では“構成的”プロモーターと称され、ほとんどの環境条件下および発生または細胞分化状態で活性を有する。構成的プロモーターの例には、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35S転写開始領域、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのT-DNA由来1'-または2'-プロモーター、および当業者に公知の種々の植物遺伝子由来の他の転写開始領域が含まれる。そのような遺伝子には例えば以下が含まれる：シロイヌナズナ（*Arabidopsis*）のACT11（Huang (1996) *Plant Mol. Biol.* 33:125-139）；シロイヌナズナのCat3（1GenBank No. U43147, Zhong (1996) *Mol. Gen. Genet.* 251:196-203）；アブラナ（*Brassica napus*）由来のステアロイル-アシルキャリアータンパク質デサチュラーゼをコードする遺伝子（GenBank No.X74782, Solocombe (1994) *Plant Physiol.* 104:1167-1176）；モロコシのGpc1（GenBank No.X15596; Martinez (1989) *J. Mol. Biol.* 208:551-565）；モロコシのGpc2（GenBank No.U45855, Manjunath (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:97-112）；米国特許第4,962,028号および第5,633,440号に記載された植物プロモーター。

10

【0107】

本発明は、ウイルス由来の組織特異的または構成的プロモーターを用いる。前記には例えば以下が含まれるであろう：トバモウイルスサブゲノムプロモーター（Kumagai (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1679-1683）；イネツングロ杆状ウイルス（RTBV）、前記ウイルスは、強力な篩部特異的レポーター遺伝子の発現を駆動させる前記プロモーターにより感染したイネの篩部細胞でのみ複製する；キャッサバ葉脈モザイクウイルス（CVMV）プロモーター（維管束成分、葉の葉肉細胞および根端で極めて高い活性を有する）（Verdaguer (1996) *Plant Mol. Biol.* 31:1129-1139）。

20

また別には、植物プロモーターは、特定の組織、器官または細胞タイプでアミダーゼ発現核酸の発現を指令することができるか（すなわち組織特異的プロモーター）、そうでなければより厳密な環境的もしくは発生的制御下にあるか、または誘導性プロモーターの制御下にあるであろう。転写に影響を与えることができる環境的條件の例には嫌気性条件、高温、光の存在または化学物質/ホルモンの噴霧が含まれる。例えば、本発明は、モロコシの乾燥誘導性プロモーター（Busk (1997) 上掲書）；ジャガイモの低温、乾燥および高塩誘導性プロモーター（Kirch (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:897-909）を包含する。

30

【0108】

組織特異的プロモーターは、その組織内での発生段階の一定期間枠内でのみ転写を促進することができる。例えば以下の文献を参照されたい：Blazquez (1998) *Plant Cell* 10:791-800（シロイヌナズナのLEAFY遺伝子プロモーターの性状を調べている）；Cardon (1997) *Plant J.* 12:367-77（*A. thaliana*）の花の分裂組織のアイデンティティ-遺伝子AP1のプロモーター領域内の保存配列モチーフを認識する転写因子SPL3について記載している）；およびMandel (1995) *Plant Molecular Biology*, Vol. 29, pp995-1004（分裂組織プロモーター-eIF4について記載している）。特定の組織のライフサイクルを通して活性を有する組織特異的プロモーターを用いてもよい。ある特徴では、本発明の核酸は、綿の繊維細胞でのみ主として活性を有するプロモーターに機能的に連結される。ある特徴では、本発明の核酸は、上掲書（Rinehart, 1996）に記載されているように綿の繊維細胞の伸長段階時に主として活性を有するプロモーターに機能的に連結される。前記核酸は、Fb12A遺伝子プロモーターに機能的に連結して綿繊維細胞で優先的に発現させることができる（上掲書）。さらにまた綿繊維特異的プロモーターおよびトランスジェニックな綿花植物体の構築方法を開示している以下の文献も参照されたい：John (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5769-5773；John et al., 米国特許第5,608,148号および第5,602,321号。根特異的プロモーターもまた本発明の核酸の発現に用いることができる。根特異的プロモーターの例には、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子由来のプロモーターが含まれる（DeLisle (1990) *Int. Rev. Cytol.* 123:39-60）。本発明の核酸の発現に用いることができる他のプロモーターには、例えば以下が含まれる：胚珠特異的、胚特異的、内乳

40

50

特異的、珠皮特異的、種皮特異的プロモーター、またはそのいくつかの組み合わせ；葉特異的プロモーター（例えば以下を参照：Busk (1997) *Plant J.* 11:1285-1295、モロコシの葉特異的プロモーターについて記載）；アグロバクテリウム・リゾゲネス (*A. rhizogenes*) のORF13プロモーター（これは根で高い活性を示す、上掲書 (Hansen, 1997) を参照されたい）；モロコシの花粉特異的プロモーター（例えば以下を参照されたい：Guerrero (1990) *Mol. Gen. Genet.* 224:161-168）；果実成熟時、葉の老化および離脱時に活性を有するトマトのプロモーター（前記より程度は低いですが花のプロモーターも用いられる）（例えば、blume (1997) *Plant J.* 12:731-746；ジャガイモSK2遺伝子のめしべ特異的プロモーター（例えば、Ficker (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:425-431）；エンドウマメのBle c4遺伝子（これはトランスジェニックなアルファルファの栄養茎頂および生殖茎頂の上皮で活性を有し、活発に生長しているシュートまたは繊維の上皮層を標的として外来遺伝子を発現させるために有用なツールである）；胚珠特異的BEL1遺伝子（例えば以下を参照されたい：Reiser (1995) *Cell* 83:735-742, GenBank No.U39944）；および/または米国特許第5,589,583号に記載されたプロモーター（前記特許は分裂組織および/または迅速に分裂している細胞で高レベルの転写を付与することができる植物プロモーター領域について記載している）。

10

【0109】

また別には、植物ホルモン（例えばオーキシン）への暴露に際して誘導することができる植物プロモーターを用いて本発明の核酸を発現することができる。例えば、本発明は以下のオーキシン反応エレメントを用いることができる：ダイズ (*Glycine max* L.) のオーキシン反応エレメントE1プロモーターフラグメント (AuxRE) (Liu (1997) *Plant Physiology* 115:397-407)；オーキシン反応性シロイヌナズナGST6プロモーター（サリチル酸および過酸化水素にも反応性である）(Chen (1966) *Plant J.* 10:955-966)；タバコのオーキシン誘発性parCプロモーター (Sakai (1996) 37:906-913)；植物ビオチン反応エレメント (Streit (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:933-937)；およびストレスホルモン、アブシジン酸に反応するプロモーター (Sheen (1996) *Science* 274:1900-1902)。

20

【0110】

本発明の核酸はまた、植物に用いることができる化学薬品、例えば農薬または抗生物質への暴露に際して誘導することができる植物プロモーターに機能的に連結することができる。例えば、モロコシのIn2-2プロモーター（ベンゼンスルホンアミド系農薬毒性緩和剤によって活性化される）を用いることができる (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiology* 38:568-577)。異なる農薬毒性緩和剤の適用によって、別個の遺伝子発現パターン（根、排水組織および茎頂分裂組織における発現を含む）が誘導される。コード配列は、[例えばアヴェナ・サティバL. (エンバク) のアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むトランスジェニックタバコに関して開示されたように [Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473]]、例えばテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下にあるか、またはサリチル酸反応性エレメント (Stange (1997) *Plant J.* 11:1315-1324) の制御下にあるであろう。化学的に（例えばホルモンまたは殺虫剤により）誘導されるプロモーター（すなわち野外でトランスジェニック植物に適用できる化学物質に反応性のプロモーター）を用いて、本発明のポリペプチドの発現を前記植物の特定の発育ステージで誘導することができる。したがって、本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする誘導性遺伝子（その宿主レンジが標的植物種、例えばトウモロコシ、イネ、オオムギ、コムギ、ジャガイモまたは他の穀物に限定され、前記穀物の任意の発育ステージで誘導可能である）を含むトランスジェニック植物を提供する。

30

40

組織特異的植物プロモーターは機能的に連結された配列の発現を標的以外の他の組織で駆動することができることは当業者には理解されよう。したがって、組織特異的プロモーターは、標的組織または細胞タイプで優先的に発現を駆動するが、他の組織でも同様にある程度の発現を誘導することができるプロモーターである。

【0111】

50

本発明の核酸はまた、化学薬品への暴露に際して誘導することができる植物プロモーターに機能的に連結することができる。これらの試薬には、例えばトランスジェニック植物に例えば噴霧によって適用できる農薬、合成オーキシンまたは抗生物質が含まれる。本発明のアミダーゼ生成核酸の誘導性発現によって、所望のアミダーゼ合成または活性をもつ植物の選抜が可能になる。植物の部分の発育はしたがって制御することができる。このようにして本発明は、植物および植物の部分の収穫を容易にする手段を提供する。例えば、種々の実施態様では、モロコシのIn2-2プロモーター（ベンゼンスルホンアミド系農薬毒性緩和剤によって活性化される）を用いることができる（De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577）。異なる農薬毒性緩和剤の適用によって、別個の遺伝子発現パターン（根、排水組織および茎頂分裂組織における発現を含む）が誘導される。本発明のコード配列はまた、[例えばアヴェナ・サティバL. (*Avena sativa* L., エンバク)のアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むトランスジェニックタバコに関して開示されたように（Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473)]テトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下にあるか、またはサリチル酸反応性エレメント（Stange (1997) *Plant J.* 11:1315-1324）の制御下にあるであろう。

適切なポリペプチド発現が所望される場合には、コード領域の3'末端のポリアデニル化領域を包含させるべきである。前記ポリアデニル化領域は天然の遺伝子、種々の他の植物遺伝子またはアグロバクテリアのT-DNAの遺伝子から得ることができる。

【0112】

発現ベクターおよびクローニングビヒクル：本発明は、本発明の核酸（例えば本発明のアミダーゼおよび抗体をコードする配列）を含む発現ベクターおよびクローニングビヒクルを提供する。本発明の発現ベクターおよびクローニングビヒクルは、ウイルス粒子、バキュロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリア人工染色体、ウイルスDNA（例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびSV40誘導體）、P1系人工染色体、酵母プラスミド、酵母人工染色体、および関心のある特定の宿主（例えばパチルス、アスペルギルスおよび酵母）に特異的な他の任意のベクターを含むことができる。本発明のベクターは染色体、非染色体および合成DNA配列を含むことができる。多数の適切なベクターが当業者に知られており、さらに市販されている。典型的なベクターには以下が含まれる：バクテリアベクター：pQEベクター（Qiagen）、pBluescriptプラスミド、pNHベクター [ラムダ-ZAPベクター（Stratagene）]、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T（Pharmacia）；真核細胞ベクター：pXT1、pSG5（Stratagene）、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40（Pharmacia）。しかしながら、任意の他のプラスミドまたは他のベクターもまた、それらが宿主中で複製可能であり生存を維持できる限り用いることができる。低コピー数または高コピー数ベクターも本発明で用いることができる。

【0113】

発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写終了因子を含むことができる。ベクターはまた発現の増幅のために適切な配列を含むことができる。哺乳類の発現ベクターは、複製起点、必要な任意のリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシングドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列および5'フランキング非転写配列を含むことができる。いくつかの特徴では、SV40スプライスに由来するDNA配列およびポリアデニル化部位を用いて、必要な非転写遺伝子エレメントを提供することができる。ある特徴では、発現ベクターは1つまたは2つ以上の選抜可能なマーカー遺伝子を含み、ベクターを含有する宿主細胞の選抜を可能にする。そのような選抜可能マーカーには、ジヒドロフォレートレダクターゼをコードする遺伝子、または真核細胞培養にネオマイシン耐性を付与する遺伝子、大腸菌でテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性を付与する遺伝子、およびビール酵母菌（*S. cerevisiae*）TRP1遺伝子が含まれる。プロモーター領域は、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ（CAT）ベクターまたは選抜可能マーカーを有する他のベクターを用いて任意の所望遺伝子から選択することができる。

10

20

30

40

50

【0114】

真核細胞でポリペプチドまたはそのフラグメントを発現するベクターはまたエンハンサーを含み、発現レベルを高めることができる。エンハンサーはDNAのcis-作動性エレメントで、通常は長さが約10から300bpで、DNAの転写を高めるためにプロモーター上で作用する。その例には、SV40複製起点の後期側bp100から270上のエンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマ複製起点の後期側のエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。核酸配列は多様な方法によってベクターに挿入することができる。一般的には、前記配列は、挿入物およびベクターを適切な制限エンドヌクレオアーゼで消化した後ベクター内の所望の位置に連結される。また別には、挿入物およびベクターの両者の平滑端を連結してもよい。例えば文献 (Ausubel & Sambrook) に記載されているような多様なクローニング技術が当技術分野では公知である。そのような方法および他の方法は従来技術の範囲内であろう。 10

ベクターの形態は、プラスミド、ウイルス粒子またはファージであろう。他のベクターには染色体、非染色体および合成DNA配列、SV40の誘導體；バクテリアプラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ウイルスDNA (例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルスおよび仮性狂犬病ウイルス) が含まれる。原核細胞および真核細胞宿主で用いられる多様なクローニングおよび発現ベクターが例えばSambrookによって記載されている。

使用することができる具体的なバクテリアベクターには、周知のクローニングベクター pBR322 (ATCC37017)、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Uppsala, Sweden)、GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA)、pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pD10、psiX174、pBluescript I IKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、DR540、pRIT5 (Pharmacia)、pKK232-8およびpCM7の遺伝的エレメントを含む市販のプラスミドが含まれる。特別な真核細胞ベクターには、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (Pharmacia) が含まれる。しかしながら任意の他のベクターも宿主細胞で複製可能であり生存できる限り用いることができる。 20

【0115】

本発明の核酸は発現カセット、ベクターまたはウイルスで発現させることができ、さらに植物細胞および種子で一過性または安定的に発現させることができる。ある典型的な一過性発現系はエピソーム発現系を用いる。これは例えば、スーパーコイルを形成したDNAを含むエピソームミニ染色体の転写によって核内に生成されたカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) のウイルスRNAである (例えば以下を参照されたい: Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1633-1637)。また別には、コード配列 (すなわち本発明の配列の全部またはサブ配列) を宿主植物細胞ゲノムに挿入し、宿主染色体DNAの不可欠の部分とすることができる。この態様ではセンスまたはアンチセンス転写物を発現させることができる。本発明の核酸に由来する配列 (例えばプロモーターまたはコード領域) を含むベクターは、植物細胞または種子に選抜可能な表現型を付与するマーカーを含むことができる。例えば、前記マーカーは、殺菌剤耐性、特に抗生物質耐性 (例えばカナマイシン、G418、ブレオマイシン、ヒグロマイシン)、または農薬耐性 [例えばクロロスルフロンまたはバスタ (Basta)] をコードすることができる。 30 40

【0116】

植物で核酸およびタンパク質を発現することができる発現ベクターは当技術分野で周知であり、例えば以下が含まれる: アグロバクテリウム (Agrobacterium spp.) 由来ベクター、ジャガイモウイルスX (Angell (1997) ENBO J. 16:3675-3684)、タバコモザイクウイルス (Casper (1996) Gene 173:69-73)、トマトブッシュイスタントウイルス (Hillman (1989) Virology 169:42-50)、タバコエッチウイルス (Dolja (1997) Virology 234:243-252)、エンドウマメゴールデンモザイクウイルス (Morinaga (1993) Microbiol. Immunol. 37:471-476)、カリフラワーモザイクウイルス (Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:1094-1101)、モロコシAc/Ds転移因子 (Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 50

17:6924-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194) およびモロコシサプレッサー-ミューテーター (Spm) 転移因子 (Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725) 並びに前記の誘導體。

【0117】

ある特徴では、発現ベクターは、2つの生物で維持させるために2つの複製系を有することができる(例えば発現のために哺乳類または昆虫細胞で、クローニングおよび増幅のために原核細胞で)。さらに発現ベクターの組み込みのために、発現ベクターは宿主細胞ゲノムと相同な少なくとも1つの配列を含むことができる。ベクターは発現構築物にフランキングする2つの相同な配列を含むことができる。前記組み込みベクターは、ベクター内に包含されるための適切な相同配列を選択することにより宿主細胞内の特異的遺伝子座に誘導される。ベクターを組み込むための構築物は当技術分野では周知である。

本発明の発現ベクターはまた選抜可能マーカー遺伝子を含み、形質転換されたバクテリア株の選抜を可能にすることができる。前記マーカーは、例えば薬剤(例えばアンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、ネオマイシンおよびテトラサイクリン)に対しバクテリアを耐性にする遺伝子である。選抜マーカーはまた生合成遺伝子、例えばヒスチジン、トリプトファンおよびロイシン生合成経路の遺伝子でもよい。

【0118】

宿主細胞および形質転換細胞：本発明はまた、本発明の核酸配列(例えば本発明のアダージェまたは抗体をコードする配列)またはベクターを含む形質転換細胞を提供する。前記宿主細胞は、原核細胞、真核細胞(例えばバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞または植物細胞)を含む当業者によく知られたいずれの宿主細胞でもよい。典型的なバクテリア細胞には、大腸菌(*E. coli*)、ストレプトミセス(*Streptomyces*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、並びにシュードモナス、ストレプトミセスおよびブドウ球菌属の種々の菌種が含まれる。典型的な昆虫細胞にはショウジョウバエS2およびスポドプテラSf9が含まれる。典型的な動物細胞にはCHO、COSまたはボウズ(Bowes)メラノーマまたは任意のマウスまたはヒトの細胞株が含まれる。適切な宿主の選択は当業者の技術範囲内である。多様な高等植物種の形質転換技術は周知で、学術文献に記載されている(例えば以下を参照されたい：Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477; 米国特許第5,750,870号)。

ベクターは、形質転換、トランスフェクション、形質導入、ウイルス感染、遺伝子銃またはTi-仲介遺伝子移転を含む種々の技術によって宿主細胞に導入することができる。具体的な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションが含まれる(L. Davis, M. Dibner, I. Battey, Basic Methods in Molecular Biology, (1986))。

【0119】

ある特徴では、本発明の核酸またはベクターはスクリーニング用細胞に導入され、したがって前記核酸のその後の発現に適した態様で細胞に入る。導入方法は主に標的細胞タイプによって決定される。典型的な方法にはリン酸カルシウム沈澱、リポソーム融合、リポフェクション(例えばLIPOFECTIN(登録商標))、エレクトロポレーション、ウイルス感染などが含まれる。候補核酸は宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれるか(例えばレトロウイルス導入により)、または一過性もしくは安定的に細胞質に存在することができる(すなわち標準的調節配列、選抜マーカーなどを利用する慣習的なプラスミドの使用により)。多くの医薬的に重要なスクリーニングは標的のヒト細胞または哺乳類モデル細胞を必要とするので、そのような標的にトランスフェクトすることができるレトロウイルスベクターが好ましい。

適切な場合には、プロモーターの活性化、形質転換体の選抜または本発明の遺伝子の増幅に適切にように改変された通常の栄養培地で作製した宿主細胞を培養することができる。適切な宿主株を形質転換し、さらにこの宿主株を適切な細胞密度に増殖させた後、選択したプロモーターを適切な手段(例えば温度シフトまたは化学物質による誘発)によって

誘発し、所望のポリペプチドまたはそのフラグメントを産生させるために前記細胞を更なる期間培養することができる。

【0120】

細胞を遠心により採集し、物理的または化学的手段で破壊し、得られた粗抽出物を更なる精製のために維持する。タンパク質の発現に用いられるバクテリア細胞は、凍結融解の繰返し、超音波処理、機械的破碎または細胞溶解剤の使用を含む任意の便利な方法で破壊することができる。発現されたポリペプチドまたはそのフラグメントは、以下を含む方法によって組換え細胞培養から回収し精製することができる：硫酸またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオンクロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水反応クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー。前記ポリペプチドの立体配置の完成に際して必要に応じタンパク質の再折り畳み工程を用いることができる。所望の場合には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を最終工程に用いることができる。

10

種々の哺乳類細胞培養系も使用して組換えタンパク質を発現させることができる。哺乳類発現系の例には、サル腎線維芽細胞のCOS-7株および適合ベクターからタンパク質を発現することができる他の細胞株（例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株）が含まれる。

【0121】

宿主細胞内の構築物を通常の態様で用い、組換え配列によってコードされる遺伝子生成物を製造することができる。組換え製造工程で用いた宿主に応じて、ベクターを含有する宿主細胞により生成されるポリペプチドはグリコシル化されたり、またはグリコシル化されなかったりするであろう。本発明のポリペプチドはその最初のメチオニンアミノ酸残基を含む場合も含まない場合もある。

20

細胞非含有翻訳系もまた本発明のポリペプチドの製造に用いることができる。細胞非含有系では、前記ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸に機能的に連結したプロモーターを含むDNA構築物から転写されたmRNAを用いることができる。いくつかの特徴では、前記DNA構築物はin vitro転写反応を実施する前に直線化してもよい。続いてこの転写mRNAを適切な細胞非含有翻訳抽出物（例えばウサギ網状赤血球抽出物）とインキュベートして所望のポリペプチドまたはそのフラグメントを生成することができる。

発現ベクターは1つまたは2つ以上の選抜可能マーカー遺伝子を含み、形質転換宿主細胞選抜のための表現型の特徴を提供することができる。これは例えば、真核細胞培養のためにはジヒドロホレートラクターゼまたはネオマイシン耐性、または大腸菌では例えばテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性である。

30

【0122】

核酸の増幅：本発明の実施に際して、本発明の核酸および本発明のポリペプチドをコードする核酸、または本発明の改変核酸を増幅により再生することができる。増幅はまた本発明の核酸のクローニングまたは改変にも用いることができる。したがって、本発明は本発明の核酸を増幅するための増幅プライマー配列対を提供する。また別の特徴では、前記プライマー対は本発明の核酸配列またはそのサブ配列を増幅することができる。当業者は前記配列の任意の部分またはその完全長のための増幅プライマー配列対をデザインすることができる。

40

【0123】

例えば典型的な配列番号:1は以下のとおりである：

```
atgaactcaaccttagcctacttcacggaacaggaccatgtctgacccggaacctatcgcttcgcttttgaagatct
tcccacatccatcccagatctggtgaagcttgtgcaggagtcaccctacatatcttttgacggagcgatattggactca
aagttcccccgcaacgaatggaggaactgcagctccgttcgatggagaaacggctggcgcgcacgctcgaattagatccg
cgtccacttgttgagccgcgtccgctagagaacaagttgctcggcaattgtcgggatcatctctattgcttaccgcgct
gctgctcatcagggagttccggctcgcgcccgcgtgtgggtttgggtgcctacttctgccagaccattttgaggaccact
gggtcgttgagtactggaatcaggagcaatcccgcgtgggtacttgtggacgcacagttggatgcctcacagcgcgagggtg
ttgaagatcgactttgacactttggatgtcccccgatcaattcatcgtcggcggcaaagcctggcaaatgtgccgttc
```

50

tggcgagcaagaccctggcaaatcggcattttcgatatgaatggattgggcttcgtgcggggggatcttgtacgtgatg
 tcgctcgctcaataaaatggaatgctgacctgggatgctggggtgttatctcgttgagaaactcgatgacctggct
 gaccttccgtgcttgatcgagtcgcttcgctcaccgagagatgtccccgatttgaagtgctgcgcgctgttatga
 gctgatccgagactgctgtgaacgactcattgctgagctacgtcaacgggaacatggtggaagtccagatcgcttaa
 【 0 1 2 4 】

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:1の残基1から21および配列番号:
 1の最後の21残基の相補鎖である。

【 0 1 2 5 】

典型的な配列番号:3は以下のとおりである:

gtgccgagcctcgacgagtacgagaccacagcgcttcaccgacccccggcggcaccgggacctgctcggcgagaccgg 10
 gacgtcgcccagcaccctgaccgtgcggcgacaggcgtcgtcctgcactaccgcgccagcgcgaccggctcacggacg
 agcagctgcccagctcgacctgcgctgggtctcggcccagctcgaggtcgttcggcaccgcgcgggcgtcccgtcggc
 gcgaccggagcggacgcgagcaccctcgcggggtgctgcccgcaccacacgctgctcgccgtcgccgtcctgcgcgagca
 cggcatccccgcgcgagccgctcggcttcgcccactacttcgagcccgacttcaccacgaccacgtcgtcgtcgagc
 ggtgggacggcgcgcggtgggtgcgcttcgactcggcgctggaccggcgaccacctgttcgacgtggacgacatgccg
 gcggggagggcatgccgttcgagacggcccgaggctggctcgccgcgggcgggccgctcgacccccggcggtta
 cggcgtggacaaggcgaatgccgcacctgatcggcatccccgttcctgctcggcgaggtcttcctcgagctcgcgacccggc
 agcgcgacgagatcctgctgtgggacgtgtggggcgtcggcatccccgcttcgcgcgccggacggcctggcaccctg
 accatgtcggacgacgagatggcggagctcggcagcaggtggcgcggtcgtcgtcgcgcgggacgacggcgacgacgc 20
 ggctgacgcggcgtcgacgcccgtacgcccgaatccccgctcggccgacggccaaccgctcgtggcgctctcgc
 cgctcgaacgcatcggggacgtcgacctgacggcgcgacgacgacctggcggtga

【 0 1 2 6 】

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:3の残基1から21および配列番号:
 3の最後の21残基の相補鎖である。

【 0 1 2 7 】

典型的な配列番号:5は以下のとおりである:

atgaccaatcagccggagcgcagcaccgcacggtcatactacgccccccggcggcagtgaccgacttgagcgcgcatcg 30
 cgcgcgcttgcgcgacctgcccagcagatctggccgggcttcgccgctcatcagggactgctgggtgcatccctttctcg
 cgcacctctacggcctgccgtcgagcgcgctgcgccctcggcgagttggagttgcgcccgcgctcggcgaatgctcgatcac
 gcgttgacctcgacgcgccccgctcgtcgaggcgcgcccggagcagcctggtgggcaactgccgccacttttc
 ggtgctgttctgccccttactgcgccccagggcgttcggcgcgccccgctcgggatcggcgccctacttcaatccgg
 cgcgcttcgaggatcactgggtcggcgaagtctgggactcgacgcgcccggcctggcgccctcgtcgacgcacagctcgat
 gccgagcagcggcagcgtgcgcatctcgttcgatccgctcgacgtgccgcgagcaggttcgtggtagccggcgaggc
 gtggcgacggtgccggagcggcgggccgctcccgaactgttcggcatcctcgatctgcgcggtctctggttcgtgcgcg
 gcaacgtggtgcgcgacctcggcggttcagcaagcgcgaactgctgccgtgggacggctggggtctgatggcgacgcgc
 gaggacagcagctcctgccgagctggcgctactcgaccacgtcgccgagctgactctggccggcgagcagcggccacgacga
 gcgcttgcattcgcaggatgccgaaccggcctgcgctgcctcgcgctcgttctcagcttcaacctgaacggcgccgagg
 tcgatctcggccccggcgttcggaactga

【 0 1 2 8 】

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:5の残基1から21および配列番号:
 5の最後の21残基の相補鎖である。 40

【 0 1 2 9 】

典型的な配列番号:7は以下のとおりである:

atgcgagcagcactcgcatctatcaaacacaggggatcatcaccgatccccgccaacatcacgacctgctgaccggcct
 gccgggagacctgcccggcctgggtcaaagtcgtccagggcctgggtgggtgcacgtctctggctggagcgttacggcttga
 agctgaaggagacgcgcaaggccgaggtgcagttgcgctgggctgaaaagcagctcgagcgcacccgcgcgctcgacccg
 cggccgctggccgaagcccggccccctggagaagcgcctgggtgggcaactgccgggatctcaccgtcctgctgggtatgcct
 gctgcgccccggggcatccccggcccgcgcgctgcggttctcgccaagtacttcgaggcggggcggcacatggatcact
 ggggtggccgaggtttggaacccgagctgcaacgctggactttggctcgacgcacaactcgacgacctgcagcgcaaggcg
 ctcgcgataccgttcaaccgctggacgtgccgcgctgcagttcctgaccggcggcgaagcctggctgcgctgccgcaa 50

ggggcaggccgacccccgagaccttcggcatcttcgacctgaaggggttggtggttcgtgcgcggggacttcgtgcgcgacg
 tggccgcgtcaacaaggttgagctgctgcccgggatgcatggggcatcgccgatgtgcaggaaaaggataatctccggg
 gaagacctgggtttcctggacgaggtggccgagctctcacatggcgacgtggagcgcttcgagcaggtgaaggggctgta
 tgaaccgacccccggctgcacgtgccggaggtgatcaacagttacacacaggcaggggtgctgcgcgctcgatctccaag
 cacattcgtag

【0130】

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:7の残基1から21および配列番号:
 7の最後の21残基の相補鎖である。

【0131】

典型的な配列番号:9は以下のとおりである:

atgaccgatcgtgcgccgtacgcccagagttccatctccgatccgggcatatgtccaggtggcttactggcttgcc
 agcagatttcgcgccctgccccgctggccaggccgctggtcgcacactaccgggcccgatgacctggcggcgttcggca
 tccccgaggagcgctggaggagatcgacacgcggttcgaggagcggatgctggcgcggtgcacgagatggagagcgg
 ccgctcacgcccggagcgcacgcccgaaccgcttcgtgggtgctgcccggacttcacctgctctacctgacctgct
 gcgccacgcccggcatcccggcacggtcacgctgggcttcgcccgtacttcgcccgtggctggttcacgaccacgtgg
 tggctgaggttcgggacgaggccaacgggctggcgccctggtcgatcccagttggcggatgtgcgcaactgacccaac
 gacggcttccccatcgatagcctcgatatacccgcgcgaccggttcctgggtgcccgggcatggcgtggcaggcttgcgggag
 tgaggaactgcagccagagcagttcggtggtgaccagatctcgatatacccgggtgacgcccggctggctgcaactgcggc
 acaacctggtgcaggacctcgccgcaactgacgaagcgggagatgatcctctgggatacgtggggcatcctgggtgacgag
 ccggtggcggaggatagcctgcccctgctggacagcatcgccgctgtcaccgcccgatcccgatgtcacgtacgcccgacgc
 cctcaatctctacgagcgggagccccgggtgcagggtcccggcagaggtgatgagcttcaacatgctggcgaacgagccaa
 ggatggtggcgtcgggggtgtag

10

20

【0132】

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:9の残基1から21および配列番号:
 9の最後の21残基の相補鎖である。

【0133】

典型的な配列番号:11は以下のとおりである:

atgcttgacgccccgggtaccaggacgacttgtaggccttcaccggatgttgaactcgatctcgagcgtgaaacgctcgg
 gcagctgcagcaggcacttcttcaggctcgccctgcagtgccctgcctgacgcccctcgccgatctgcccgcaggcggccttg
 ggcgcgaggctgacggtcgacggcccgatgcccctcgctgaccgagcggcggatggttgggggtgggtctccttgatgtc
 ggtgcagagctgccagtcgcccggagacgaacaccaccgggacgcccaccatggcggcggcataggcgtgcagcaggaatt
 ccgaagtgcaccgcccgttgatgcgcatgcgcatgacctcaccgctcagcgtgtgcgccaagggatgggtctcgtcgccg
 gccttcgagtgatagccgatgaacatcgccggcatcgaagctcttgtccagctcctgcaccaatgctcatcggatggccgct
 ccagcccggatcaggcgcacatctccggcaggctggccctgcaggatgtgcccgggtcgcggtgtgcttcttgatca
 ggatctccttggccccgcccgttggcgccgtcgacgcccggcagcacttcgcccgtcatctgctcgcgatgctcgggg
 tagtcggcgtgcccgttgcgcccctcgctcccagttgggtgatgcccggcgggtgcccctcgatgtcggcgtgatgaagatctt
 catgcccactcctcttgcacaacgcccactctag

30

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:11の残基1から21および配列番号:
 11の最後の21残基の相補鎖である。

40

【0134】

典型的な配列番号:13は以下のとおりである:

tggccgaaggcgtgtgcccgttcactgctcggtatcggcaacgaaaggaacagttacctcatgacgatacaccaca
 gatctcgcacttctatacgcgccctgcccggatgacgtcccgggccaattcgccccttatcgcagcgcgtgcccgagcg
 acgtgggccaactcgtccgcatcatccaggccctgggggtgatgacctgtggcgtccggcttctacggcttcacgatc
 ccggacgagcgcagggcgagatccacctcccggccttagagaaaatgctgggcccctcctcgcccctgcagcaccggcc
 gctccgtgtgcccggccggctgcacaggcgtctggctggccgctgcccgtcacttcgtgctgctactcgtcgccatgttgc
 gggccaaggggtgttccggcgcggggcgcgtgcccgttcggctcctactttagacgcccgttctttagaggaccactgggtg
 tgcgagttactggaacgcccgaagcccgtgggtgctgttcgatccacagttcgacgaggttggcgggagacactaca
 gatagatcacgacatcttgatgtgcccgcgcgaccgttctcctggtagcgggagcgcctgggcccgaatgcccgcgggtg

50

cggccgaccggcggaagtctgaaatcggttttcgccgacctgagcggactgtgggttcacgcccgggaacctgggtgcgcgac
gtggcggcgctcaacaagacggagatgctgccgtgggacgtctggggcgcccagccccgcccgcacgaagcgctcgacga
cgaccaactgacctctctcgacaaactcgccgcgctcacgcgcgagccctgacgcgtcgcttcgcggaactgcgaccctct
acgaaggagatgatcgccctgctgtgccggcgaccgtcttcaacgcgatgcgcaacgcgcccgaacgatcgcgggctga

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:13の残基1から21および配列番号
:13の最後の21残基の相補鎖である。

【0135】

典型的な配列番号:15は以下のとおりである:

gtggacaaaccggagcaaatgacgcactgggtggggcatggccggcgcccgctccgcccgtcgccgagaccgacctgc
gcgtcgccggccgcttcaaggtgcagtcttgggatcccaagaacgagcatcacagcgtcagcggcatctacaaggaggctc
gtgccaaccggaagctcgccctctcggtggcctggcagagcacgcccagcgcgaatcgctggtgacgatcgagctcaa
cccgtcaccgagggcaccaatgctgacgctgaccacgagcagttcttcgacgagaaggcgcgcgacgaccacggccg
gctggaacgtcgccctcgaccgctggagagcttctcacaatgacccccggccaggccgtggaccgggcttcgcccggct
tggccggcgatcccgcgtcgctggccggcgctgctgcagggccttttgatgacagagcatatcgcgccggcctacggcctc
accctgagcagggcccagcacgcggaggcgacacccggccggtcgaggagatcgctgcccagatcgctggcgcacgatcc
tcgtccgctcgccgagccgcgcgcccggcgaacgccaggctcggaattgccggcacttcaccctgctgcacgtcacga
tctgctgcccgcgcccggcgtgcccggcgcgcccgcctgcccgttcggcggctacttcgagccgggcaagtctctcgaccac
tgggtcaccgaatactggaacgagcggcgccaggcgtgggttctggtcgatgccagctcgatgcccgccagcgcgagct
cttcaagatcgccctcgacccccctcgacgtgccgcgcgacaagtctctggtcgcgggcgacgcctggcagcgtgcccgcg
ccggcaccgcccgatccgaacgcgttcggcatcctcgacatgcacgggctgtgggttcgtcgcccggcaatttgatccgcgac
gtcgccgctcaacgaccacgtgatgctgccgtgggacgtgtggggcgcgatgaccagaacgacgcggagctcgacca
accgttcttcgacaagctggccgcgctgaccgtcgagcccgaccgccaatttcggcgagctgcccgcgcttaccaggatc
cgcgctgaaagtgcggcgaccgtgttcaacgccaatccgcaaccgcccgaacaccttga

したがって典型的な増幅プライマー配列対は配列番号:15の残基1から21および配列番号
:15の最後の21残基の相補鎖である。

【0136】

増幅反応はまた、サンプル中の核酸量(例えば細胞サンプル中のメッセンジャー量)の
定量、核酸の標識(例えば前記核酸をアレーまたはプロットに適用するために)、核酸の
検出、またはサンプル中の特定の核酸の定量にも用いることができる。本発明のある特徴
では、細胞またはcDNAライブラリーから単離されたメッセンジャーが増幅される。

当業者は適切なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択およびデザインすることができ
よう。増幅方法はまた当技術分野で周知であり、それらには例えば以下が含まれる:ポ
リメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば以下を参照されたい:PCR Protocols, A Guide to M
ethods and Applications, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990); PCR Strategies
(1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y.)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(Wu (19
98) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:
117)、転写増幅(Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173)、セルフサステ
イン配列複製(Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874)、Q-ベータレブ
リカーゼ増幅(Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491)、自動Q-ベータレブ
リカーゼ増幅アッセイ(Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271)および他のRNAポ
リメラーゼ仲介技術(例えば以下を参照されたい:NASBA, Cangene, Mississauga, Onta
rio)。さらにまた以下の文献を参照されたい:Berger (1987) Methods Enzymol. 152:30
7-316; Sambrook; Ausbel; 米国特許第4,683,195号および第4,683,202号; Sooknanan (19
95) Biotechnology 13:563-564。

【0137】

配列同一性の程度の決定

本発明は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号
:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:2
3、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35

、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、または配列番号:113; および、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸およびポリペプチドを提供する。ある特徴では、本発明は、本発明の配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、65%、60%、55%または50%の配列同一性を有する核酸およびポリペプチドを提供する。ある特徴では、本発明は、本発明の配列で示した配列を有する核酸およびポリペプチドを提供する。また別の特徴では、前記配列同一性は、前記核酸またはポリペプチドの少なくとも約5、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000もしくはそれより長い連続する残基の領域、または完全長に及ぶ。配列同一性(相同性)の程度は任意のコンピュータプログラムおよび附随のパラメータを用いて決定できる。前記には本明細書に記載したもの、例えばBLAST2.2.2またはFASTAバージョン3.0t78(そのデフォルトパラメータと併せて)が含まれる。

【0138】

相同な配列にはまたRNA配列も含まれ、前記RNA配列ではウリジンが前記核酸配列のチミンと置き換えられている。前記相同な配列は本明細書に記載する方法のいずれかを用いて得ることができるが、またはシーケンシングエラーの修正から得ることもできる。本明細書記載の核酸配列は、慣用的な一文字形式(例えば以下を参照されたい: Lubert Strayer, *Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York)、または配列中のヌクレオチドそのものを示す他の任意の形式で表示できることは理解されよう。

本明細書で同定される種々の配列比較プログラムはこの特徴で用いられる。タンパク質および/または核酸配列の同一性(相同性)は、当技術分野で公知の多様な配列比較アルゴリズムおよびプログラムを用いて評価することができる。そのようなアルゴリズムおよびプログラムには以下が含まれる(ただしこれらに限定されない): TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALW (Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., *Nucleic Acids Res.* 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., *Methods Enzymol.* 266:383-402, 1996; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410; Altschul et al., *Nature Genetics* 3:266-272, 1993)。

【0139】

相同性または同一性は配列分析ソフトを用いて測定できる(例えばSequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI53705)。そのようなソフトウェアは、相同性を種々の欠失、置換および他の改変に帰属させることによって適合する類似の配列を見つける。2つまたは3つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関して“相同性”および“同一性”という用語は、任意の数の配列比較アルゴリズムまたは手動アラインメ

ントと目視によって、比較ウィンドウまたは指定領域で最大一致のためにアラインメントを施し比較した場合に、同一または特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つまたは3つ以上の配列またはサブ配列を指す。配列比較の場合、1つの配列はリファレンス配列（本発明の配列）として機能し、前記リファレンス配列に対してテスト配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いるときは、テスト配列およびリファレンス配列をコンピューターに入力し、必要な場合にはサブ配列同等物を指定し、さらに配列アルゴリズムプログラムのパラメーターを指定する。デフォルトプログラムパラメーターを用いるか、また別のパラメーターを指定することができる。続いて配列比較アルゴリズムは、リファレンス配列に対してテスト配列のパーセント配列同一性を前記プログラムパラメーターにしたがって算出する。

10

【0140】

本明細書で用いられる“比較ウィンドウ”は、任意の数の連続する残基セグメントのリファレンスを含む。例えば本発明のまた別の特徴では、本発明の典型的なポリペプチドまたは核酸配列の20から完全長までのいずれかの範囲の連続残基が同じ数の連続部位のリファレンス配列と、前記2つの配列の最適なアラインメント実施後に比較される。リファレンス配列が本発明の典型的なポリペプチドまたは核酸配列と必要な配列同一性を有する場合、例えば本発明の配列に対して50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、98%、99%またはそれより高い配列同一性を有するならば、前記配列は本発明の範囲内に含まれる。また別の実施態様では、約20から600、約50から200、および約100から150の範囲のサブ配列が、同じ数の連続部位のリファレンス配列と、前記2つの配列の最適なアラインメント実施後に比較される。比較のための配列アラインメントの方法は当技術分野では周知である。比較のための最適な配列アラインメントは、例えばSmith & Watermanの局所相同性アルゴリズム (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981) によって、Needleman & Wunschの相同性アラインメントアルゴリズム (J. Mol. Biol. 48:443, 1970) によって、Person & Lipmanの類似性検索方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988) によって、これらアルゴリズムのコンピューターによる実施によって [GAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)]、または手動アラインメントと目視による精査によって実施することができる。相同性または同一性を決定するための他のアルゴリズムには、例えばBLASTプログラム (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biological Information) の他に、ALIGN、AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences)、AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment)、ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool)、BANDS、BESTSCOR、BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node)、BLIMPS (Blocks IMProved Searcher)、FASTA、Intervals & Points、BMB、CLUSTALV、CLUSTALW、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Watermanアルゴリズム、DARWIN、ラスベガスアルゴリズム、FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool)、フレームアライン、フレームサーチ、DYNAMIC、FILTER、FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package)、GAP (Global Alignment Program)、GENAL、GIBBS、GenQuest、ISSC (Sensitive Sequence Comparison)、LALIGN (Local Sequence Alignment)、LCP (Local Content Program)、MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench)、MAP (Multiple Alignment Program)、MBLKP、MBLKN、PIMA (Patter-Induced Multiple Sequence Alignment)、SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) およびWHAT-IFが含まれる。このようなアラインメントプログラムはまた、ゲノムデータベースのスクリーニングに用いて、実質的に同一の配列を有するポリヌクレオチド配列を同定することができる。多数のゲノムデータベースが利用可能である。例えばヒトゲノムの相当な部分がヒトゲノム配列決定プロジェクト (Gibbs, 1995) の一部分として利用可能である。いくつかのゲノム配列 [例えば、M. ジェニタリウム (genitalium) (Fraster et al., 1995)、M. ヤナシー (jannaschii) (Bult et al., 1996)、H. インフルエンザ (influenzae) (Fleischmann et al., 1995)、大腸菌 (Blattner et al., 1997)、酵母 (S. cerevisiae) (Mewes et al., 1997)、およびショウジョウバエ (D. melanogaster) (Adams

20

30

40

50

et al., 2000)] が決定された。顕著な進展がモデル生物 [例えばマウス (*C. elegans*) 、シロイヌナズナ (*Arabidopsis* sp.)] のゲノム配列決定で達成された。いくつかの機能的情報の注釈が付されたゲノム情報を含むデータベースが種々の機関に保有され、インターネットによりアクセスできる。

【 0 1 4 1 】

本発明の実施にはまたBLAST、BLAST2.0およびBLAST2.2.2アルゴリズムも用いることができる。このアルゴリズムは以下の文献に記載されている：Altschul (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; Altschul (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410。BLAST分析を実施するソフトは、National Center for Biotechnology Informationから公開されている。このアルゴリズムは、先ず初めに問い合わせ配列中で、データベース配列の中の同じ長さを有する語とアラインメントを実施したとき何らかの正の値をもつ閾値スコアTと一致するか満足させる、長さWの短いワードを特定することによって高スコアをもつ配列対 (HSP) を同定することを含む。Tは隣接ワードのスコア閾値と称される (Altschul (1990) 上掲書) 。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための検索開始の種として機能する。このワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加する限り各配列に沿って両方向の伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列についてはパラメーターMを用いて計算される (Mはマッチする残基対のための褒章スコアで、常に0より大きい) 。アミノ酸配列の場合、スコア付与マトリックスが累積スコア算出に用いられる。各方向でのワードヒットの伸長は以下の場合に停止する：累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ減少したとき；1つまたは2つ以上の負のスコアをもつ残基アラインメントのために累積スコアが0またはそれ以下になったとき；またはいずれかの配列の最後に到達したとき。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXはアラインメントの感度と速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) はデフォルトとして以下を用いる：ワードの長さ (W) は11、エクスペクテーション (E) は10、M=5、N=-4および両方の鎖の比較。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムはデフォルトとして以下を用いる：ワードの長さは3、エクスペクテーション (E) は10、およびBLOSUM62スコア付与マトリックス (Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) アラインメント (B) は50、エクスペクテーション (E) は10、M=5、N=-4および両方の鎖の比較。BLASTM=5、N=-4および両方の鎖の比較。

【 0 1 4 2 】

BLASTアルゴリズムはまた2つの配列間の類似性の統計分析を実施する (例えば以下を参照：Karlín & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873) 。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の測定の1つは最少合計確率 (P(N)) である。これは2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のマッチが偶然生じる確率の指標を提供する。例えば、リファレンス核酸に対するテスト核酸の比較で最少合計確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、もっとも好ましくは約0.001未満ならば、その核酸はリファレンス配列と類似と考えられる。ある特徴では、タンパク質と核酸配列の相同性はベーシック・ローカル・アラインメント・サーチツール (“ BLAST ”) を用いて評価される。例えば、以下の5つの特別なBLASTプログラムが下記の作業の実施に用いることができる：(1) BLASTPおよびBLAST3はアミノ酸問い合わせ配列をタンパク質配列データベースに対して比較する；(2) BLASTNはヌクレオチド問い合わせ配列をヌクレオチド配列データベースに対して比較する；(3) BLASTXは調査ヌクレオチド配列 (両方の鎖) の6フレームの理論的翻訳生成物をタンパク質配列データベースに対して比較する；(4) TBLASTNは、タンパク質問い合わせ配列を (両方の鎖の) 全6読み枠で翻訳されたヌクレオチド配列データベースに対して比較する；および(5) TBLASTXはヌクレオチドデータベースの6フレーム翻訳に対してヌクレオチド問い合わせ配列の6フレーム翻訳を比較する。BLASTプログラムは、問い合わせアミノ酸または核酸配列とテスト配列 (これは好ましくはタンパク質または核酸配列データベースから入手される) との間で類似のセグメント (これはここでは “ 高スコア付与セグメント対 ” と称される) を同定することによって相同な配列を同定する。高スコア付与セグメント対は、好ましくはスコア付与マトリックス (これらの多くは当技術

分野で知られている)の手段によって好ましくは同定される(すなわちアラインメントされる)。好ましくは、用いられるスコア付与マトリックスはBLOSUM62マトリックス(Gonn et et al., Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993)である。PAMまたはPAM250マトリックスも用いることができるが前記の方が好ましい(例えば以下を参照されたい: Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation)。

【0143】

本発明のある特徴では、ある核酸が本発明の範囲内に包含されるために必要な配列同一性を有しているか否かを決定するために、NCBIのBLAST2.2.2プログラム(デフォルトオプションはblastp)が用いられる。BLAST2.2.2には約38の設定オプションが存在する。本発明のこの典型的な特徴では、デフォルトフィルタリング設定を除いて全てのデフォルト値が用いられ[すなわち、全てのパラメータはフィルタリング除外デフォルトに設定される(フィルタリングはOFFに設定される)]、その場合、フィルタリングをしない“-FF”設定が用いられる。デフォルトフィルタリングの使用によって、Karlin-Altschulバイオリレーションが長さが短い配列のためにしばしば発生する。

本発明のこの典型的な特徴で用いられるデフォルト値には以下が含まれる:

“低コンプレキシティー用フィルター: ON
 ワードサイズ: 3
 マトリックス: Blosum62
 ギャップコスト: 存在: 11
 伸長: 1”

他のデフォルト設定は以下でもよい: 低コンプレキシティー用フィルターOFF、タンパク質についてはワードサイズ3、BLOSUM62マトリックス、ギャップ存在ペナルティーは-1、およびギャップ伸長ペナルティーは-1。典型的なNCBIのBLAST2.2.2プログラム設定では“-W”オプションデフォルトが0である。このことは、設定しない場合はワードサイズデフォルトはタンパク質で3およびヌクレオチドで11であることを意味する。

【0144】

コンピュータシステムおよびコンピュータプログラムプロダクト

配列同一性、構造相同性、モチーフなどをイン・シリコで測定し同定するために、コンピュータが読み出しアクセスすることができる任意の媒体に本発明の配列を保存し、記録し、さらに操作することができる。したがって、本発明は、コンピュータ、コンピュータシステム、コンピュータ読出し可能媒体、本発明の核酸およびポリペプチド配列を記録または保存したコンピュータプログラムプロダクトなどを提供する。本明細書で用いるように、“記録”または“保存”という語は情報をコンピュータ媒体に保存するプロセスを指す。当業者は、コンピュータ読出し可能媒体に情報を記録する任意の公知の方法を容易に選択し、1つまたは2つ以上の本発明の核酸および/またはポリペプチド配列を含む製品を製造することができる。

本発明の別の特徴は、本発明の少なくとも1つの核酸および/またはポリペプチド配列がそれに記録されてあるコンピュータ読出し可能媒体である。コンピュータ読出し可能媒体には、磁気により読出しが可能な媒体、光学的に読出しが可能な媒体、電子的に読出しが可能な媒体および磁気/光学媒体が含まれる。例えば、前記コンピュータ読出し可能媒体は、ハードディスク、フレキシブルディスク、磁気テープ、CD-ROM、大容量デジタルディスク(Digital Versatile Disk, DVD)、ランダムアクセスメモリー(RAM)または読出し専用メモリー(ROM)の他に当業者に知られている他のタイプの媒体であろう。

【0145】

本発明の特徴は、システム(例えばインターネット依拠システム)、特にコンピュータシステム(本明細書に記載した配列および配列情報を保存し高度な細工を施す)を含む。コンピュータシステム100の一例は図1の組み立て分解図に示されている。本明細書で用いるように、“コンピュータシステム”とは、ハード成分、ソフト成分、および本発明の

10

20

30

40

50

ヌクレオチドまたはポリペプチド配列の分析に用いられるデータ保存成分を指す。コンピュータシステム100は、配列データの処理、アクセスおよびマニピュレーションのためのプロセッサを含むことができる。プロセッサ105は周知のいずれのタイプの中央演算ユニットでもよいが、例えばインテル社 (Intel Corporation) のペンティアムIII、またはサン (Sun)、モトローラ (Motorola)、コンパック (Compaq)、AMDもしくはIBM (International Business Machines) の同様なプロセッサである。コンピュータシステム100は、プロセッサ105およびデータ保存のための1つまたは2つ以上の内部データ保存成分110、並びに前記データ保存成分に保存されたデータを検索する1つまたは2つ以上の検索装置を含む汎用システムである。現在利用可能なコンピュータシステムはいずれも適切であることは当業者には容易に理解されよう。

10

【0146】

ある特徴では、コンピュータシステム100はバスに連結されたプロセッサ105を含み、メインメモリ115 (好ましくはRAMとして供給される) および1つまたは2つ以上の内部データ保存装置110 (例えばハードドライブおよび/またはそれにデータが記録されてある他のコンピュータ読み出し可能媒体) と連結されている。前記コンピュータシステム100はさらに、内部データ記憶装置110に保存されたデータを読み出す1つまたは2つ以上のデータ検索装置118を含むことができる。前記データ検索装置118は、例えばフレキシブルディスクドライブ、コンパクトディスクドライブ、磁気テープドライブまたは遠隔データ保存システムに (例えばインターネットを介して) 連結することができるモデムなどであってもよい。いくつかの実施態様では、前記内部データ保存装置110は、取り外し可能なコンピュータ読み出し可能媒体 (例えばフレキシブルディスク、コンパクトディスク、磁気テープなど) (それに保存されたコントロールロジックおよび/またはデータを含む) である。前記コンピュータシステム100は有利には、データ検索装置にいったん挿入されたら、コントロールロジックおよび/またはデータを前記データ保存成分から読み出すための適切なソフトを含むかまたはこれによってプログラムされるであろう。前記コンピュータシステム100はディスプレイ120を含み、出力データをコンピュータのユーザーに表示するために用いられる。前記コンピュータシステム100は、他のコンピュータシステム125a-cとネットワークまたは広域ネットワークと連結され、中央集中方式によるコンピュータシステム100へのアクセスを提供することができることもまた特記されるべきである。本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列にアクセスし、これを加工処理するためのソフトは、実行中のメインメモリ115に存在することができる。いくつかの特徴では、前記コンピュータシステム100はさらに、本発明の核酸配列の比較のための配列比較アルゴリズムを含むことができる。前記アルゴリズムおよび配列はコンピュータ読み出し可能媒体に保存することができる。“配列比較アルゴリズム”は、コンピュータシステム100に (限定位置または遠隔位置に) 備えられた、あるヌクレオチド配列をデータ保存手段内に保存された他のヌクレオチド配列および/または化合物と比較するための1つまたは2つ以上のプログラムを指す。例えば、前記配列比較アルゴリズムは、コンピュータ読み出し可能媒体に保存された本発明のヌクレオチド配列をコンピュータ読み出し可能媒体に保存されたリファレンス配列と比較して、相同性または構造モチーフを同定することができる。

20

30

【0147】

上記アルゴリズムに関して用いられるパラメータは、調べようとする配列の長さおよび相同性の度合いにしたがって調整することができる。いくつかの特徴では、前記パラメータは、ユーザーの指示がない場合に前記アルゴリズムによって用いられるデフォルトパラメータであろう。図2は、新規なヌクレオチドまたはタンパク質配列をデータベース配列と比較して前記新規な配列とデータベースの配列との間の相同性レベルを決定するプロセス200の1つの特徴を示す工程図である。前記配列データベースはコンピュータシステム100内に保存された私的なデータベースでも、インターネットを通じて利用可能な公的データベース (例えばGENBANK) でもよい。プロセス200は、開始相201で始まり、続いて相202に移動し、前記相202で比較されるべき新規な配列はコンピュータシステム100のメモリーに保存される。上記で考察したように、前記メモリーは、RAMまたは内部保存

40

50

装置を含むいずれのタイプのメモリーでもよい。続いてプロセス200は相204に移行し、前記相で配列データベースは分析および比較のために開かれる。その後、プロセス200は相206に移動し、前記相で前記データベースに保存された第一の配列はコンピュータのメモリーに読み込まれる。続いて、相210で比較が実施され、第一の配列が第二の配列と同じであるか否かが決定される。この工程は、新規な配列とデータベース内の第一の配列との正確な比較の実施に限定されないということの特記することは重要である。2つのヌクレオチドまたはタンパク質配列（たとえそれらが同一ではなくても）を比較する周知の方法が当業者には知られている。例えば、ギャップを1つの配列に導入し、2つの被検配列間の相同性レベルを上昇させることができる。比較中にギャップまたは他の特色を配列に導入するか否かを管理するパラメーターは、通常はユーザーがコンピュータシステムに入力する。いったん2つの配列の比較が相210で実施されたら、前記2つの配列が同じであるか否かの決定は決定相210で実施される。もちろんのこと、“同じ”という用語は完全に同一である配列に限られない。

10

【0148】

ユーザーによって入力された相同性パラメーターの範囲内にある配列は、プロセス200で“同じ”として印を付されるであろう。2つの配列が同じであると決定された場合、プロセス200は相214に移行し、そこでデータベースの配列名がユーザーに表示される。この相によって、表示された名称をもつ配列は入力された相同性の制約を満たすことがユーザーに通知される。いったん保存配列の名称がユーザーに表示されたら、プロセス200は決定相218に移行し、そこでさらに別の配列がデータベースに存在するか否かが決定される。もはやそれ以上の配列がデータベースに存在しない場合は、プロセス200は終了相20で終了する。しかしながら、さらに別の配列がデータベースに存在する場合は、プロセス200は相224に移行し、そこでポインターは、データベースの次ぎの配列に移動し、前記配列を前記新規な配列と比較することができる。このようにして、新規な配列はデータベースの各配列とアラインメントを実施され比較される。配列が相同でないとして決定された場合、プロセス200は直ちに決定相218に移行し、他の別の配列がデータベースに比較のために利用可能であるか否かが決定されるであろう。

20

【0149】

したがって、本発明のある特徴は、プロセッサ、データ保存装置（本発明の核酸配列が保存されてある）、および前記比較を実施する配列比較装置を含むコンピュータシステムである。前記配列比較装置は、比較される配列間の相同性レベルを表示するか、または構造モチーフを同定することができるか、または、これら核酸コードおよびポリペプチドコードと比較される配列中の構造モチーフを同定することができる。図3は、2つの配列が相同であるか否かを決定するコンピュータ内のプロセス250の一態様である。プロセス250は開始相252で始まり、続いて相254に移行し、そこで比較されるべき第一の配列がメモリーに記憶される。続いて比較されるべき第二の配列が相256でメモリーに記憶される。続いてプロセス250は相260に移行し（そこで第一の配列の第一の文字が読み出される）、続いて相262に移行し、そこで第二の配列の第一の文字が読み出される。配列がヌクレオチド配列ならば、この文字は通常はA、T、C、GまたはUであることは理解されよう。配列がタンパク質配列であるならば、この文字は単一文字のアミノ酸コードであり、その結果第一および第二の配列は容易に比較することができる。続いて、2つの文字が同じであるか否かの決定が決定相264で行われる。それらが同じ場合には、プロセス250は相268に移行し、そこで第一および第二の配列の次ぎの文字が読み出される。続いて次ぎの文字が同じであるか否かの決定が行われる。それらが同じであれば、2つの文字が同じでなくなるまでプロセス250は前述の過程を繰り返す。次ぎの2つの文字が同じでないという決定が行われたならば、プロセス250は決定相274に移行し、いずれかの配列にまだ読み出すべき文字があるか否かを決定する。読み出すべき文字が全くなければ、プロセス250は相276に移行し、そこで第一と第二の配列間の相同性レベルがユーザーに表示される。相同性レベルは、第一の配列中の総文字数のうち配列間で同じであった文字の割合を計算することによって決定される。したがって、100ヌクレオチドの第一の配列の各文字が第二の配列の各文

30

40

50

字とアラインメントされたならば、相同性レベルは100%であろう。

【0150】

また別には、本コンピュータプログラムはリファレンス配列を本発明の配列と比較し、前記配列が1つまたは2つ以上の位置で異なるか否かを決定することができる。このプログラムは、リファレンス配列または本発明の配列どちらかの配列に対して挿入、欠失または置換されたヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の長さおよび同一性を記録することができる。このコンピュータプログラムは、本発明の配列に対して単一ヌクレオチド多型性(SNP)を含むか否か、または本発明の配列が既知配列のSNPを含むか否かを決定するプログラムであってもよい。したがって、いくつかの特徴では、このコンピュータプログラムはSNPを同定するプログラムである。この方法は上記に記載したコンピュータシステムによって実施することができる。この方法は図3に示されている。この方法は、本発明の配列およびリファレンス配列を前記コンピュータプログラムの使用によって読み取り、さらに相違を同定することによって実施することができる。

10

【0151】

他の特徴では、前記コンピュータ依拠システムは本発明の核酸またはポリペプチド内の特徴を同定するためのアイデンティファイヤーを含む。“アイデンティファイヤー”とは核酸配列内の一定の特徴を同定する1つまたは2つ以上のプログラムを指す。例えば、アイデンティファイヤーは核酸配列内の開放読み枠(ORF)を同定するプログラムを含むことができる。図4は、配列内の特徴の存在を検出するアイデンティファイヤープロセス300の1つの特徴を示す工程系統図である。プロセス300は開始相302で始まり、続いて相304に移行し、そこで特徴をチェックされるべき第一の配列がコンピュータシステム100のメモリ115に保存される。続いてプロセス300は相306に移行し、そこで配列の特徴のデータベースが開かれる。そのようなデータベースは特徴の名称とともに各特徴のアトリビュートのリストを含むであろう。例えば、ある特徴の名称は“開始コドン”でそのアトリビュートは“ATG”であろう。別の例は、特徴の名称は“TAATAAボックス”で特徴のアトリビュートは“TAATAA”であろう。そのようなデータベース例は、University of Wisconsin Genetics Computer Groupによって作製される。また別には、この特徴は、構造的ポリペプチドモチーフ(例えばアルファヘリックス、ベータシート)または機能的ポリペプチドモチーフ(例えば酵素活性部位)、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフまたは当業者に公知の他のモチーフであろう。いったん特徴のデータベースが相306で開かれたら、プロセス300は相308に移行し、そこで第一の特徴がデータベースから読み出される。第一の特徴のアトリビュートと第一の配列との比較が続いて相310で実施される。続いて決定相316で、前記特徴のアトリビュートが第一の配列に見出されるか否かの決定が行われる。前記アトリビュートが見出されたら、続いてプロセス300は相318に移行し、前記相で見出された特徴の名称がユーザーに表示される。続いてプロセス300は決定相320に移行し、そこでさらにそれ以上の特徴がデータベースに存在するか否かの決定が行われる。それ以上の特徴が存在しない場合は、プロセス300は終了相324で終了する。しかしながら、それ以上の特徴がデータベースに存在する場合は、続いてプロセス300は次ぎの配列特徴を相326で読み取り、相310に戻り、そこで次ぎの特徴のアトリビュートを第一の配列と比較する。決定相316で配列の特徴が第一の配列に見出されない場合は、プロセス300は決定相320に直接移行し、データベースにさらに別の特徴が存在するか否かを決定する。したがって、ある特徴では、本発明は開放読み枠(ORF)を同定するコンピュータプログラムを提供する。

20

30

40

【0152】

本発明のポリペプチドまたは核酸配列は、多様なデータプロセッサプログラムにおいて多様な形式で保存および細工することができる。例えば、配列はワードプロセッシングファイル(例えばマイクロソフトウェア、またはワードパーフェクト)のテキストとして、または当業者によく知られている多様なデータベースでアスキーファイルとして(例えばDB2、SYBASE、またはORACLE)保存することができる。さらに、多くのコンピュータプログラムおよびデータベースを、配列比較アルゴリズム、アイデンティファイヤー、または

50

本発明の核酸配列と比較されるべきリファレンスヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の供給源として用いることができる。本発明の実施に用いられるプログラムおよびデータベースには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：マックパターン（MacPattern; EMBL）、ディスカバリーベース（DiscoveryBase; Molecular Applications Group）、ジーンマイン（GeneMine; Molecular Applications Group）、ルック（Look; Molecular Applications Group）、マックルック（MacLook; Molecular Applications Group）、BLASTおよびBLAST2（NCBI）、BLASTNおよびBLASTX（Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990）、FASTA（Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444, 1988）、FASTDB（Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990）、カタリスト（Catalyst; Molecular Simulations Inc.）、カタリスト/SHAPE（Molecular Simulations Inc.）、セリウス2.DBアクセス（Cerius2.DBAccess; Molecular Simulations Inc.）、HypoGen（Molecular Simulations Inc.）、インサイトII（Molecular Simulations Inc.）、ディスカバー（Molecular Simulations Inc.）、CHARMm（Molecular Simulations Inc.）、フェリックス（Felix; Molecular Simulations Inc.）、デルファイ（DelPhi; Molecular Simulations Inc.）、クオンテMM（QuanteMM; Molecular Simulations Inc.）、ホモロジー（Molecular Simulations Inc.）、モデラー（Modeler; Molecular Simulations Inc.）、ISIS（Molecular Simulations Inc.）、クオンタ/プロテインデザイン（Quanta/Protein Design; Molecular Simulations Inc.）、ウェブラブ（WebLab; Molecular Simulations Inc.）、ウェブラブダイバーシティエクスプローラー（WebLab Diversity Explorer; Molecular Simulations Inc.）、ジーンエクスプローラー（Molecular Simulations Inc.）、セックフォールド（SeqFold; Molecular Simulations Inc.）、MDLアベイラブルケミカルディレクトリーデータベース、MDLドラッグデータレポートデータベース、コンプリヘンシブメディシナルデータベース、ダーウエントの（Derwent's）ワールドドラッグインデックスデータベースバイオバイトマスターファイル（BioByteMasterFile）データベース、Genbankデータベース、およびGenseqnデータベース。本発明の開示により、当業者には他の多くのプログラムおよびデータベースが明白となる。

上記のプログラムを用いて検出することができるモチーフには、ロイシンジッパー、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ、グリコシル化部位、ユビキチン化部位、アルファヘリックス、およびベータシートをコードする配列、シグナルペプチド（コードされたタンパク質の分泌を指令する）をコードするシグナル配列、転写調節に関連する配列（例えばホメオボックス、酸性ストレッチ、酵素活性部位、基質結合部位、および酵素切断部位）。

【0153】

核酸のハイブリダイゼーション

本発明は、ストリンジェントな条件下で本発明の典型的な核酸または本発明のポリペプチドをコードする核酸とハイブリダイズする単離核酸または組換え核酸を提供する。前記ストリンジェントな条件は、高度にストリンジェントな条件、中等度にストリンジェントな条件、低度にストリンジェントな条件で、本明細書に開示する高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシー条件を含むことができる。ある特徴では、下記で考察するように、ある核酸が本発明の範囲内のものであるか否かを決定する条件を示すのは洗浄条件のストリンジェンシーである。

また別の実施態様では、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるそれらの能力によって明示される本発明の核酸は、本発明の核酸の約5残基から完全長であろう。例えばそれらは、長さが少なくとも、5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、またはそれより大きい残基であろう。完全長よりも短い核酸もまた含まれる。これらの核酸は、例えばハイブリダイゼーションプローブ、標識プローブ、PCRオリゴヌクレオチドプローブ、iRNA、アンチセンスまたは、抗体結合ペプチド（エピトープ）、モチーフ、活性部位などをコードする配列として有用であろう。

【0154】

ある特徴では、本発明の核酸は、約37 から42 で約50%のホルムアミドの条件を含む高ストリンジェンシー下でハイブリダイズすることができるそれらの能力によって規定される。ある特徴では、本発明の核酸は、約30 から35 で約35%から25%のホルムアミドの条件を含む低ストリンジェンシー下でハイブリダイズするそれらの能力によって規定される。

また別には、本発明の核酸は、50%のホルムアミド、5XのSSPE、0.3%のSDSおよび反復配列ブロッキング核酸、例えばcot-1またはサケ精子DNA（例えば200n/mLのせん断変性サケ精子DNA）中で42 の条件を含む高ストリンジェンシー下でハイブリダイズすることができるそれら能力によって規定される。ある特徴では、本発明の核酸は、約35 の低温で35%のホルムアミドを含む低ストリンジェンシー下でハイブリダイズすることができるそれらの能力によって規定される。

10

ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターは6XのSSC、0.5%のSDSで50 で洗浄することができる。この条件は25%を超えるホルムアミドで“中等度”の条件、25%より低いホルムアミドで“低い”条件であると考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが30%ホルムアミドで実施される場合である。“低い”ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の具体的な例は上記のハイブリダイゼーションが10%ホルムアミドで行われる場合である。

【0155】

ストリンジェンシーの個々のレベルに対応する温度範囲は、関心のある核酸のプリン対ピリミジン比を算出し、さらに前記に応じて温度を調節することによってさらに限定することができる。本発明の核酸はまた、Ausubel & Sambrookの著書で説明されているように、高、中等度および低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるそれらの能力によって明示される。上記の範囲および条件における変動例は当技術分野で周知である。ハイブリダイゼーション条件は下記でさらに考察される。

20

上記の手順は、プローブ配列との相同性レベルが低い核酸を同定するために改変することができる。例えば、検出可能プローブに対し相同性が低い核酸を得るために、ストリンジェンシーの低い条件を用いることができる。例えば、ハイブリダイゼーションの温度は、5 ずつ68 から42 まで下げることができる。ハイブリダイゼーション緩衝液のNa⁺濃度は約1Mである。ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターは、ハイブリダイゼーションの温度で2XのSSC、0.5%のSDSで洗浄することができる。これらの条件は、50 を超えるときは“中等度”のハイブリダイゼーション条件、50 未満では“低い”条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが55 で実施される場合である。“低ストリンジェンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが45 で実施される場合である。

30

【0156】

また別には、ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを含む緩衝液（例えば6XのSSC）で42 の温度で実施することができる。この事例では、ハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミドの濃度は、5%ずつ50%から0%まで減少させ、プローブに対して相同性レベルの低いクローンを同定することができる。ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターは、50 で6XのSSC、0.5%のSDSで洗浄することができる。これらの条件は、25%のホルムアミドを超える場合は“中等度”の条件、25%未満のホルムアミドでは“低い”条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施される場合である。“低ストリンジェンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが10%のホルムアミド実施される場合である。

40

しかしながら、ハイブリダイゼーション様式の選択は重大ではなく、核酸が本発明の範囲内であるか否かを決定する条件の説明は洗浄条件のストリンジェンシーである。本発明の範囲内の核酸の同定に用いられる洗浄条件には例えば以下が含まれる：約0.02モル（pH

50

7) の塩濃度および少なくとも約50 または約55 から約60 の温度 ; または約0.15Mの塩濃度のNaClで72 で約15分 ; または塩濃度約0.2XのSSCで少なくとも約50 または約55 から約60 の温度で約15から約20分 ; またはハイブリダイゼーション複合体は、0.1%のSDSを含む約2XのSSCの塩濃度を有する溶液で室温にて5分間、2回洗浄し、続いて0.1%のSDSを含む0.1XのSSCで68 で15分間、2回洗浄される ; またはこれらと同等な条件。SSC緩衝液および同等な条件については、Sambrook, Tijssen and Ausubelの著書を参照されたい。

前記の方法は本発明の核酸の単離に用いることができる。

【0157】

オリゴヌクレオチドプローブおよびこれを使用する方法

本発明はまた、例えばアミダーゼ活性をもつポリペプチドをコードする核酸またはそのフラグメントを同定するため、またはアミダーゼ遺伝子を同定するために用いることができる核酸プローブを提供する。ある特徴では、プローブは本発明の核酸の少なくとも10の連続する塩基を含む。また別には本発明のプローブは、本発明の核酸で示す配列の少なくとも約5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、または約10から50、約20から60、約30から70の連続する塩基であろう。前記プローブは結合および/またはハイブリダイゼーションによって核酸を同定する。前記プローブは、本発明のアレー（例えば毛细管アレーを含む）で用いることができる（下記の考察を参照されたい）。本発明のプローブはまた他の核酸またはポリペプチドの単離に用いることができる。

【0158】

本発明のプローブを用いて、生物学的サンプル（例えば土壌サンプル）が、本発明の核酸配列を有する生物または本発明の核酸が得られた生物を含むか否かを決定することができる。そのような方法では、本発明の核酸が単離された生物を潜在的に含む生物学的サンプルを入手し、サンプルから核酸を入手する。プローブがサンプル中に存在する一切の相補性配列と特異的にハイブリダイズすることができる条件下で、前記核酸を前記プローブと接触させる。必要な場合には、プローブが相補性配列と特異的にハイブリダイズすることができる条件は、相補性配列を含むことが判明しているサンプルから得られた相補性配列と（相補性配列を含まないコントロール配列も同様に）プローブを接触させることによって決定することができる。ハイブリダイゼーションの条件、例えばハイブリダイゼーション緩衝液の塩濃度、ハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミド濃度またはハイブリダイゼーションの温度を変更して、プローブが相補性核酸と特異的にハイブリダイズすることを可能にする条件を同定することができる（具体的なハイブリダイゼーション条件についての考察を参照されたい）。

サンプルが核酸が単離された生物を含む場合、プローブの特異的なハイブリダイゼーションが検出される。ハイブリダイゼーションは、検出可能な物質（例えば放射性同位元素、蛍光染料または検出可能な生成物の形成を触媒することができる酵素）でプローブを標識することにより検出することができる。標識プローブを用いてサンプル中の相補性核酸の存在を検出する多くの方法が当業者にはよく知られている。

【0159】

また別には、2つ以上のプローブ（そのうちの少なくとも1つは核酸サンプルに存在する一切の相補性配列と特異的にハイブリダイズすることができる）を増幅反応で用いて、サンプルが本発明の核酸配列を含む生物（例えば前記核酸が単離された生物）を含むか否かを決定することができる。ある特徴では、プローブはオリゴヌクレオチドを含む。ある特徴では、増幅反応はPCR反応を含むことができる。PCRプロトコルはAusubel and Sambrookの著書に記載されている（増幅反応については考察を参照されたい）。そのような方法では、サンプル中の核酸をプローブと接触させ、増幅反応を実施し、得られた増幅生成物の一切が検出される。増幅生成物は、反応生成物のゲル電気泳動を実施し、ゲルをインターカラーター（例えば臭化エチジウム）で染色することによって検出することができる。また別には、1つまたは2つ以上のプローブを放射性同位元素で標識し、放射性増幅生成物

10

20

30

40

50

をゲル電気泳動の後でオートラジオグラフィーによって検出してもよい。

【0160】

本発明の核酸配列の3'または5'末端近くの配列に由来するプローブを染色体ウォーキング法で用いて、さらに別の例えばゲノム配列を含むクローンを同定することもできる。そのような方法によって、関心をもつさらに別のタンパク質をコードする遺伝子を宿主生物から単離することが可能になる。

ある特徴では、本発明の核酸配列をプローブとして用いて関連する核酸を同定および単離する。いくつかの特徴では、そのようにして同定した関連核酸は、本発明の核酸を最初に単離した生物以外の生物に由来するcDNAまたはゲノムDNAであろう。そのような方法では、前記プローブが関連配列と特異的にハイブリダイズすることができる条件下で核酸サンプルを前記プローブと接触させる。続いて前記プローブと関連する生物由来の核酸とのハイブリダイゼーションを上記に記載した方法のいずれかを用いて検出する。

【0161】

核酸のハイブリダイゼーション反応では、特定レベルのストリンジェンシーを達成するために用いられる条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質にしたがって変動させることができる。例えば、核酸がハイブリダイズする領域の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えばGC対AT含量）および核酸のタイプ（例えばRNA対DNA）は、ハイブリダイゼーション条件で考慮されるであろう。さらにその他に考慮されることは、核酸の1つが例えばフィルターに固定されるか否かである。ハイブリダイゼーションは低ストリンジェンシー、中等度ストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシーの条件下で実施することができる。核酸のハイブリダイゼーションの例として、固定された変性核酸を含むポリマーメンブレンを、先ず初めに以下から成る溶液中で45℃で30分予備ハイブリダイズする：0.9MのNaCl、50mMのNa₂HPO₄（pH7.0）、5.0mMのNa₂EDTA、0.5% SDS、10Xデンハルト溶液および0.5mg/mLのポリリボアデニル酸。続いて約2×10⁷ cpm（比活性4-9×10⁸ cpm/μg）の³²P末端標識オリゴヌクレオチドプローブを前記溶液に添加することができる。12-16時間インキュベートした後で、前記メンブレンを、0.5%のSDSを含む1XのSET（150mMのNaCl、20mMのトリス塩酸（pH7.8）、1mMのNa₂EDTA）中で室温（RT）で30分洗浄し、続いて新しい1XのSETで30分、前記オリゴヌクレオチドに対するT_m-10℃で洗浄する。その後、ハイブリダイゼーションシグナル検出のために前記メンブレンをオートラジオグラフィー用フィルムに暴露する。

【0162】

検出可能プローブとハイブリダイズする核酸（例えばcDNAまたはゲノムDNA）を同定するために用いられるハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変更することによって、プローブに対し種々のレベルの相同性を有する核酸を同定し単離することができる。ストリンジェンシーは、前記プローブの溶融温度より低い種々の温度でハイブリダイゼーションを実施することによって変更することができる。溶融温度（T_m）は、（限定されたイオン強度およびpHで）50%の標的配列が完全に相補的なプローブとハイブリダイズする温度である。非常にストリンジェントな条件は、個々のプローブのT_mと等しいかまたは前記より約5℃低くなるように選択される。プローブの溶融温度は以下の典型的な公式を用いて計算できる。長さが14から70ヌクレオチドのプローブでは、溶融温度（T_m）は以下の式を用いて計算される：

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41(G + C \text{の割合}) - (600 / N)$$

式中、Nはプローブの長さである。

ハイブリダイゼーションがホルムアミドを含む溶液中で実施される場合、溶融温度は以下の等式を用いて計算することができる：

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41(G + C \text{の割合}) - (0.63\% \text{ホルムアミド}) - (600 / N)$$

式中、Nはプローブの長さである。プレハイブリダイゼーションは6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5%のSDS、100μgの変性断片化サケ精子DNA、または6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5%のSDS、100μgの変性断片化サケ精子DNA、50%のホルムアミド中で実施できる。SSCおよびデンハルトの溶液および他の溶液の成分は例えばSambrookの著書に記載さ

れている。

【0163】

ハイブリダイゼーションは上記に挙げたプレハイブリダイゼーション溶液に検出可能なプローブを添加することによって実施される。プローブが二本鎖DNAを含む場合、これをハイブリダイゼーション溶液に添加する前に変性させる。フィルターをハイブリダイゼーション溶液に十分な時間接触させ、前記プローブをそれに対して相補的な配列またはそれに対して相同的な配列を含むcDNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズさせる。長さが200ヌクレオチドを越えるプローブの場合、ハイブリダイゼーションは T_m よりも15 - 25 低い温度で実施できる。より短いプローブ（例えばオリゴヌクレオチドプローブ）の場合、ハイブリダイゼーションは T_m より5 - 10 低い温度で実施できる。ある特徴では、6XのSSCでのハイブリダイゼーションが約68 で実施される。ある特徴では、50%のホルムアミドを含む溶液中で約42 でハイブリダイゼーションが実施される。前述のハイブリダイゼーションはいずれも高ストリンジェンシー条件下にあると考えられる。

10

【0164】

ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを洗浄して非特異的に結合した検出可能プローブを全て除去する。フィルターの洗浄に用いられるストリンジェンシーもまた、ハイブリダイズされる核酸の性質、ハイブリダイズされる核酸の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えばGC対AT含量）および核酸のタイプ（例えばRNA対DNA）にしたがって変動させることができる。漸進的に高くなるストリンジェンシー条件をもつ洗浄は以下のとおりである：2XのSSC、0.1%のSDS、室温で15分（低ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5%のSDS、室温で30分から1時間（中等度ストリンジェンシー）；0.1XのSSC、0.5%のSDS、ハイブリダイゼーション温度から68 の間で室温で15分から30分（高ストリンジェンシー）；および0.15MのNaCl、72 で15分（非常に高いストリンジェンシー）。最後の低ストリンジェンシー洗浄は0.1XのSSCで室温で実施することができる。上記の例は、フィルターの洗浄に用いることができる単なる例示的条件セットである。多様なストリンジェンシーの洗浄レシピが存在することは当業者は理解していよう。

20

【0165】

プローブとハイブリダイズした核酸はオートラジオグラフィまたは他の通常の技術によって同定することができる。上記の方法を改変して、プローブ配列に対して低い相同性レベルを有する核酸を同定することができる。例えば、前記検出可能プローブに対して相同性レベルが低い核酸を得るために、ストリンジェンシーが低い条件を用いることができる。例えば、 Na^+ 濃度が約1Mのハイブリダイゼーション緩衝液で、ハイブリダイゼーション温度を68 から42 まで5 ずつ低下させることができる。ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを2XのSSC、0.5%のSDSでハイブリダイゼーションの温度で洗浄することができる。これらの条件は、50 より上では“中等度”の条件で、50 未満では“低い”条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件は、上記ハイブリダイゼーションが55 で実施されるときである。“低ストリンジェンシー”のハイブリダイゼーション条件の例は、上記のハイブリダイゼーションが45 で実施されるときである。

30

また別には、ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを含む緩衝液（例えば6XのSSC）で42 の温度で実施してもよい。この場合には、ハイブリダイゼーション緩衝液中のホルムアミドの濃度を50%から0%まで5%ずつ減少させて、プローブに対して低い相同性を有するクローンを同定することができる。ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを6XのSSC、0.5%のSDSで50 で洗浄することができる。これらの条件は、25%よりも高いホルムアミドで“中等度”の条件、25%未満のホルムアミドで“低い”条件と考えられる。“中等度”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが30%のホルムアミドで実施されるときである。“低ストリンジェンシー”のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、上記のハイブリダイゼーションが10%のホルムアミドで実施されるときである。

40

【0166】

本発明のこれらのプローブおよび方法を用いて、本発明の核酸配列と少なくとも約99%

50

、98%、97%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%または少なくとも50%の相同性を有する配列および前記と相補的な配列を有する核酸を単離することができる。前記核酸は、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、またはそれより長い連続する本発明の核酸配列の塩基を含む。相同性は本明細書で考察したアラインメントアルゴリズムを用いて測定することができる。例えば、相同なポリヌクレオチドは、本明細書に記載したコード配列の1つの天然に存在する対立遺伝子の変種であるコード配列を有することができる。そのような対立遺伝子の変種は、本発明の核酸と比較したとき1つまたは2つ以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有するであろう。 10

さらにまた、本発明のプローブまたは方法を用いて、本発明のポリペプチドと少なくとも約99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%または少なくとも50%の配列同一性（相同性）を有し、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、または150の連続するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を単離することができる。これは配列アラインメントアルゴリズムを用いて決定される（例えば、デフォルトパラメータを有するFASTAバージョン3.0t78アルゴリズム、または本明細書で説明した典型的な設定を有するBLAST2.2.2プログラム）。 20

【0167】

本発明のアミダーゼの発現の抑制

本発明は、本発明の核酸配列に相補的な核酸（例えばアンチセンス配列）を提供する。アンチセンス配列は、アミダーゼコード遺伝子の輸送、スプライシングまたは転写を阻害することができる。前記阻害はゲノムDNAまたはメッセンジャーRNAの標的捕捉（ターゲッティング）により実行することができる。標的として捕捉された核酸の転写または機能は、例えばハイブリダイゼーションおよび/または切断によって阻害することができる。本発明によって提供される特に有用な阻害物質セットの1つは、アミダーゼ遺伝子またはメッセンジャーに結合することができるオリゴヌクレオチドを含む。前記のいずれの場合でもアミダーゼの生成または機能が妨げられるかまたは阻害される。その結合は配列特異的ハイブリダイゼーションを介するものでもよい。また別の有用な阻害剤クラスは、アミダーゼメッセンジャーの不活化または切断を惹起するオリゴヌクレオチドを含む。前記オリゴヌクレオチドは、そのような切断を惹起する酵素活性（例えばリボザイム）を有することができる。前記オリゴヌクレオチドは化学的に改変するか、または相補的な核酸を切断できる酵素または組成物に結合させることができる。前記のような多数の種々のオリゴヌクレオチドを含むプールを所望の活性を有するオリゴヌクレオチドについてスクリーニングすることができる。 30

【0168】

アンチセンスオリゴヌクレオチド：本発明は、mRNAのターゲッティングによってタンパク分解活性を阻害することができる、アミダーゼメッセンジャーと結合する能力を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。アンチセンスオリゴヌクレオチドをデザインする手法は、学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬を用いてそのようなアミダーゼオリゴヌクレオチドをデザインすることができる。例えば、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングする遺伝子ウォーキング/RNAマッピングプロトコルは当技術分野で周知で、例えば以下を参照されたい：Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183 (RNAマッピングアッセイが記載されている)。前記アッセイは標準的な分子技術をベースにし、強力なアンチセンス配列の選抜のために容易で信頼できる方法を提供する。Smithの報告 (*Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198(2000)) もまた参照されたい。 40

天然に存在する核酸はアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いられる。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは任意であり、また別の特徴では、例えば アンチセン 50

スオリゴヌクレオチドは約5から100、約10から80、約15から60、約18から40である。最適な長さは日常的なスクリーニングにより決定できる。アンリセンスオリゴヌクレオチドは任意の濃度で存在できる。最適濃度は日常的なスクリーニングにより決定できる。天然に存在しない多様な合成ヌクレオチドおよび核酸類似体が知られているが、それらはこの潜在的な問題を強調しているであろう。例えば、非イオン性骨格（例えばN-(2-アミノエチル)グリシンユニット）を含むペプチド核酸（PNA）を用いることができる。ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた用いることができる（これらは以下に記載されている：W097/03211；W096/39154；Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197(1997)；Antisense Therapeutics, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996)。合成DNA骨格類似体を有する、本発明によって提供されるアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、上記のようにホスホロ-ジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-チオアセタール、メチレン（メチルイミノ）、3'-N-カルバメート、およびモルホリノカルバメート核酸を含むことができる。

化学的方法を総合的に組み合わせ膨大な数のオリゴヌクレオチドを作製し、任意の標的（例えば本発明のセンスおよびアンチセンスアミダーゼ配列）に対して適切な結合親和性および特異性を有する特異的オリゴヌクレオチドを目指して前記オリゴヌクレオチドを容易にスクリーニングすることができる（例えば以下を参照されたい：Gold (1995) J. Biol. Chem. 270:13581-13584）。

【0169】

阻害性リボザイム：本発明はアミダーゼメッセンジャーと結合することができるリボザイムを提供する。これらのリボザイムは、例えばmRNAのターゲッティングによってアミダーゼ活性を阻害することができる。リボザイムをデザインし、さらにターゲッティングのためのアミダーゼ特異的アンチセンス配列を選抜する手法は、学術文献および特許文献に詳しく記載されており、当業者は本発明の新規な試薬を用いてそのようなリボザイムをデザインすることができる。リボザイムは、その標的RNA結合部分を介して標的RNAと結合することによって機能する（前記標的RNA結合部分は標的RNAを切断する前記RNAの酵素部分の近傍に保持されている）。したがって、リボザイムは相補的な塩基の対合を介して標的RNAを認識しこれと結合し、いったん正確な部位に結合したら、作用を発揮して前記標的RNAを酵素的に切断および不活化する。そのような態様で標的RNAを切断することによって、コード配列における切断が発生しなかったならばコードタンパク質の合成を指令するその能力を破壊する。リボザイムがそのRNA標的に結合し、これを切断した後、前記リボザイムは前記RNAから遊離し、繰返し新しい標的に結合しこれを切断する。

【0170】

いくつかの状況では、リボザイムの酵素としての性質は他の技術（例えばアンチセンス技術、この場合、核酸分子は単に核酸標的と結合してその転写、翻訳または別の分子との結合を阻害する）に対して有利であろう。なぜならば、治療を達成するために必要なリボザイムの有効濃度はアンチセンスオリゴヌクレオチドのそれよりも減少させることができるからである。この潜在的利点は酵素として機能するリボザイムの能力を示している。したがって、ただ1つのリボザイム分子が多く数の標的RNA分子を切断することができる。さらに、リボザイムは典型的には高度に特異的な阻害物質であり、阻害特異性は、塩基対形成による結合メカニズムによるだけでなく、リボザイムが結合するRNAの発現を前記リボザイムが阻害するメカニズムにも依存する。すなわち、前記阻害はRNA標的の切断によって惹起され、したがって特異性は標的として捕捉されないRNAの切断速度に対する標的として捕捉されたRNAの切断速度の比と定義される。この切断メカニズムは、塩基対形成に必要とされる因子の他にさらに別の因子にも左右される。したがって、リボザイムの作用の特異性は、同じRNA部位と結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの特異性よりも強いであろう。

【0171】

本発明のリボザイム、例えば酵素リボザイムRNA分子は、ハンマーヘッドモチーフ、ヘ

アピンモチーフ、肝炎デルタウイルスモチーフ、グループIイントロンモチーフおよび/またはRNAガイド配列と結合したリボヌクレアーゼP様RNAとして作製することができる。ハンマーヘッドモチーフの例はRossi (Aids Research and Human Retroviruses 8:183(1992))により、ヘアピンモチーフはHampel (Biochemistry 28:4929 (1989); Hampel Nuc. Acids Res. 18:299(1990))により、肝炎デルタウイルスモチーフはPerrotta (Biochemistry 31:16(1992))により、リボヌクレアーゼPモチーフはGuerrier-Takada (Cell 35:849 (1983))により、グループIイントロンはCech (米国特許第4,987,071号)により記載されている。これらの特異的モチーフの列挙はこれらに限定することを意図していない。本発明のリボザイム、例えば本発明の酵素RNA分子は1つまたは2つ以上の標的遺伝子RNA領域に相補的な特異的基質結合部位を有することができる。本発明のリボザイムは、基質結合部位内またはその周辺に、この分子にRNA切断活性を付与するヌクレオチド配列を有することができる。

10

【0172】

核酸の改変

本発明は、本発明の核酸、例えば本発明のアミダーゼまたは本発明の抗体をコードする核酸の変種を作製する方法を提供する。これらの方法を反復するかまたは種々の組み合わせで用いて、鋳型核酸によってコードされるアミダーゼとは改変された、または異なる活性もしくは安定性を有するアミダーゼを作製することができる。これらの方法を反復または種々の組み合わせで用いて、例えば遺伝子/メッセンジャーの発現、メッセンジャーの翻訳、またはメッセンジャーの安定性の変形型を作製することができる。また別の特徴では、例えば相同な遺伝子を *ex vivo* での改変によって変更し、続いて細胞内へ再度挿入することによって、細胞の遺伝的組成が変更される。

20

本発明の核酸は任意の手段によって改変することができる。それらは、例えばランダムもしくは確率論的方法、または非確率論的、または“誘導進化的(*directed evolution*)”方法である(例えば米国特許第6,361,974号を参照されたい)。遺伝子のランダム変異の方法は当技術分野では周知である(例えば米国特許第5,830,696号を参照されたい)。例えば、変異原を用いて遺伝子をランダムに変異させる。変異原には、例えば紫外線もしくはガンマ線の照射、または化学的変異原、例えばマイトマイシン、亜硝酸、光活性化ソラレン(単独または併用して使用し、組換えによる修復を受けやすいDNAの断裂を誘発する)が含まれる。他の化学的変異原には、例えば重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはギ酸が含まれる。他の変異原はヌクレオチド前駆体の類似体、例えばニトロソグアニジン、5-プロモウラシル、2-アミノプリンまたはアクリジンである。これらの物質は、ヌクレオチド前駆体の代わりにPCR反応に添加され、それによって前記配列を変異させることができる。インターカレート剤(例えばプロフラビン、アクリフラビン、キナクリンなど)もまた用いることができる。

30

【0173】

分子生物学の任意の技術、例えばランダムPCR突然変異誘発(Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471)、またはコンビナトリアルマルチカセット突然変異誘発(Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196)を用いることができる。また別には、核酸(例えば遺伝子)をランダムまたは“確率論的”フラグメント化した後で再アッセンブリーを実施することができる(米国特許第6,291,242号; 6,287,862号; 6,287,861号; 5,955,358号; 5,830,721号; 5,824,514号; 5,811,238号; 5,605,793号)。また別の特徴では、改変、付加または欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブリーPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、*in vivo*突然変異誘発、カセット突然変異誘発、再帰的アンサンブル突然変異誘発、エキスポネンシャルアンサンブル突然変異誘発、位置特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブリー、遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)、合成連結再アッセンブリー(SLR)、組換え、反復配列再組換え、ホスホチオエート改変DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型による突然変異誘発、ギャップ惹起デュープレックスによる突然変異誘発、ポイントミスマッチの修復による突然変異誘発、修復欠損宿主株の突然変異誘発、化学物質による突然変異誘発、放射線発生源に

40

50

よる突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限酵素選抜による突然変異誘発 (restriction-selection mutagenesis)、制限酵素精製による突然変異誘発 (restriction-purification mutagenesis)、人工遺伝子合成、キメラ核酸マルチマー作製、および/またはその組み合わせによって導入される。

【 0 1 7 4 】

以下の刊行物には、本発明の方法に取り入れることができる多様な反復再組換え工程および/または方法が記載されている：Stemmer (1999) “Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties” *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang (1999) “Evolution of a cytokine using DNA family shuffling” *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull (1999) “Protein evolution by molecular breeding” *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians (1999) “Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling” *Nature Biotechnology* 17:259-264; Cramer (1998) “DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution” *Nature* 391:288-291; Cramer (1997) “Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling” *Nature Biotechnology* 15:436-438; Zhang (1997) “Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten et al. (1997) “Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines” *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Cramer et al., (1996) “Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling” *Nature Medicine* 2:100-103; Gates et al. (1996) “Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor headpiece dimer” *J. Mol. Biol.* 255:373-386; Stemmer (1996) “Sexual PCR and Assembly PCR” In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publications, New York. Pp.447-457; Cramer and Stemmer (1995) “Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes” *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al. (1995) “Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides” *Gene* 164:49-53; Stemmer (1995) “The Evolution of Molecular Computation” *Science* 270:1510; Stemmer (1995) “Searching Sequence Space” *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) “Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling” *Nature* 370:389-391; および Stemmer (1994) “DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

【 0 1 7 5 】

多様性を作製する変異誘発方法には、例えば位置特異的突然変異誘発 (Ling et al. (1997) “Approaches to DNA mutagenesis: an overview” *Anal. Biochem.* 254(2):157-178; Dale et al. (1996) “Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method” *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) “In vitro mutagenesis” *Ame. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) “Strategies and applications of in vitro mutagenesis” *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) “Site-directed mutagenesis” *Biochem. J.* 237:1-7; および Kunkel (1987) “The Efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis” in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin)、ウラシル含有鋳型を用いる突然変異誘発 (Kunkel (1985) “Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotype selection” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488; Kunkel et al. (1987) “Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotype selection” *Methods in Enzymol.* 154:367-382; および Bass et al. (1988) “Mutant Trp repressor with new DNA-binding specificities” *Science* 242:240-245)、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発 (*Methods in Enzymol.* 100:468-500(1983); Me

thods in Enzymol. 154:329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; および Zoller & Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350)、ホスホロチオエート改変DNAによる突然変異誘発 (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13:8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nuc. Acids Res.* 13:8765-8787; Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14:9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; および Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16:803-814)、ギャップを有するデュプレックスDNAを用いる突然変異誘発 (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12:9441-9456; Kramer & Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16:7207; および Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" *Nucl. Acids Res.* 16:6987-6999) が含まれる。

【 0 1 7 6 】

本発明の実施に用いることができるさらに別のプロトコルには、ポイントミスマッチ修復 (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" *Cell* 38:879-887)、修復欠損宿主株を用いる突然変異誘発 (Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" *Nucl. Acids Res.* 13:4431-4443; および Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 154:382-403)、欠失突然変異誘発 (eghtedarzadeh (1986) "Use of Oligonucleotides to generate large deletions" *Nucl. Acids Res.* 14:5115)、制限酵素選抜および制限酵素精製による突然変異誘発 (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* A317:415-423)、全遺伝子合成による突然変異誘発 (Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" *Science* 223:1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) "Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" *Nucl. Acids Res.* 14:6361-6372; Wells et al. (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" *Gene* 34:315-323; および Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale shot-gun' gene synthesis" *Nucl. Acids Res.* 13:3305-3316)、二本鎖断裂修復 (Mandecki (1993) "Protein engineering for usual environments" *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455; "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-

7181) が含まれる。上記の方法の多くに関する更なる詳細は *Methods in Enzymology* (Vol. 154) で見出すことができる。これには種々の突然変異誘発方法に関する問題を解決する有用なコントロールについてもまた記載されている。

【0177】

本発明の実施に用いることができるプロトコルは例えば以下に記載されている：米国特許第5,605,793号 (Stemmer, Feb. 25, 1997, "Methods for In Vitro Recombination")、米国特許第5,811,238号 (Stemmer et al., Sep. 22, 1998, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination")、米国特許第5,830,721号 (Stemmer et al., Nov. 3, 1998, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly")、米国特許第5,834,252号 (Stemmer et al., Nov. 10, 1998, "End-Complementary Polymerase Reaction")、米国特許第5,837,458号 (Minshull et al., Nov. 17, 1998, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering")、W095/22625 (Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly")、W096/33207 (Stemmer and Lipschutz, "Endo Complementary Polymerase Chain Reaction")、W097/20078 (Stemmer and Cramer, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination")、W097/35966 (Minshull and Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering")、W099/41402 (Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors")、W099/41383 (Punnonen et al. "Antigen Library Immunization")、W099/41369 (Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering")、W099/41368 (Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines")、EP752008 (Stemmer and Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly")、EP0932670 (Stemmer, "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination")、W099/23107 (Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling")、W099/21979 (Apt et al. "Human Papillomavirus Vectors")、W098/31837 (del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination")、W098/27230 (Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering")、W098/27230 (Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection")、W000/00632 ("Methods for Generating Highly Diverse Libraries")、W000/09679 ("Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences")、W098/42832 (Arnold et al. "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers")、W099/29902 (Arnold et al. "Methods for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences")、W098/41653 (Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library")、W098/41622 (Borchert et al. "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling") および W098/42727 (Pati and Zarl, "Sequence Alterations Using Homologous Recombination")。

【0178】

本発明の実施に用いることができるプロトコルは例えば以下に記載されている (種々の多様性を作製する方法に関する詳細を提供する)：米国特許出願第 (USSN) 09/407,800号 (Patten et al., Sep. 28, 1999; "Shuffling of Codon Altered Genes)、米国特許第6,379,964号 (del Cardayre et al., "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination")；米国特許出願第6,319,714号 (Cramer et al., "Oligonucleotide Mediated Nucleic Acid Recombination")、同6,368,861号、6,376,246号、6,423,542号、6,426,224号およびPCT/US00/01203号；米国特許第6,436,675号 (Welch et al., "Use of Codon-Varied oligonucleotide Synthesis for Synthetic Shuffling")、PCT/US00/01202 (Selifonov et al., Jan.18, 2000, "Methods for Making Character Strings, Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics")、

および例えば米国特許出願09/618,579号 (Selifonov et al., Jul. 18, 2000, "Methods for Making Character Strings, Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics")、PCT/US00/01138 (Selifonov and Stemmer, Jan. 18, 2000, "Methods of Populating Data Structures for Use in Evolutionary Simulations") ; および米国特許出願09/656,549号 (Afholter, Sep. 6, 2000, "Single-Stranded Nucleic Acid Template-Mediated Recombination and Nucleic Acid Fragment Isolation")、および米国特許第6,177,263号、同6,153,410号。

【0179】

非確率論的 (または "誘導進化的") 方法には、例えば飽和突然変異誘発 (GSSM)、合成連結再アッセンブリー (SLR)、またはその組合せが含まれ、これらを本発明の核酸の改変に用いて、新規な特性または変更された特性を有するアミダーゼが作製される (例えば強酸性または強アルカリ性条件下、高温などで活性を有する)。改変核酸によってコードされるポリペプチドは、タンパク分解活性または他の活性を調べる前に活性をスクリーニングすることができる。いずれの検査様式またはプロトコルも用いることができるが、例えば毛細管アレープラットフォームを使用できる。例えば米国特許第6,361,974号、6,280,926号、5,939,250号を参照されたい。

【0180】

飽和突然変異誘発 (Saturation mutagenesis) (またはGSSM) : ある特徴では、縮退N,N,G/T配列を含むコドンプライマーを用いて点変異がポリヌクレオチド (例えば本発明のアミダーゼまたは抗体) に導入され、それによって各アミノ酸位置 (例えば改変の標的となっている酵素活性部位またはリガンド結合部位のアミノ酸残基) において完全な一続きの単一アミノ酸置換が提示されている子孫ポリペプチド一式が作製される。これらのオリゴヌクレオチドは連続する第一の相同な配列、縮退N,N,G/T配列および場合によって第二の相同な配列を含む。そのようなオリゴヌクレオチドを使用して得られる下流子孫の翻訳生成物は、ポリペプチドの各アミノ酸の位置で全ての可能なアミノ酸変化を含む。なぜならばN,N,G/T配列の縮退性は20アミノ酸の全てのコドンを含むからである。ある特徴では、そのような縮退オリゴヌクレオチドの1つ (例えば1つの縮退N,N,G/Tカセットで構成される) を用いて、親のポリヌクレオチド鑄型中の本来のコドンの各々が一続きの完全なコドン置換に付される。別の特徴では、少なくとも2つの縮退カセットを (同じオリゴヌクレオチド中で、または別のオリゴヌクレオチド中で) 用いて、親のポリヌクレオチド鑄型中の少なくとも2つの本来のコドンが一続きの完全なコドン置換に付される。例えば、2つ以上のN,N,G/T配列を1つのオリゴヌクレオチド内に包含させて、2つ以上の部位にアミノ酸変異を導入することができる。この複数のN,N,G/T配列は直接連続しているか、または1つまたは2つ以上のさらに別のヌクレオチド配列によって分離されていてもよい。別の特徴では、付加および欠失の導入に有用なオリゴヌクレオチドを単独で、またはN,N,G/T配列を含むコドンと併せて用い、アミノ酸付加、欠失および/または置換の任意の組合せまたは並べ替えを導入することができる。

【0181】

ある特徴では、2つまたは3つ以上の連続する位置のアミノ酸の同時変異は、連続するN,N,G/Tトリプレットを含むオリゴヌクレオチド (すなわち縮退(N,N,G/T)_n配列) を用いて実施される。別の特徴では、N,N,G/T配列よりも低い縮退性を有する縮退カセットが用いられる。例えば、いくつかの例ではただ1つのNを含む縮退トリプレット配列を (例えばオリゴヌクレオチドで) 用いるのが望ましいであろう (Nは前記トリプレットの第一、第二または第三の位置に存在できる)。他のいずれの塩基 (任意の組合せおよびその並べ替えを含む) も前記トリプレットの残りの2つの位置で用いることができる。また別には、いくつかの事例では縮退N,N,Nトリプレット配列を (例えばオリゴヌクレオチドで) 用いることが望ましいであろう。

ある特徴では、縮退トリプレット (例えばN,N,G/Tトリプレット) の使用によって、(20のアミノ酸の全てに対して) ポリペプチドの各々および全ての位置のアミノ酸について完全な一続きの可能な天然のアミノ酸を系統的に容易に作製することができる (また別の

10

20

30

40

50

特徴では、前記方法はまた各アミノ酸、または各コドン、各位置につき全てには満たない可能な置換の作製も含む)。例えば、100アミノ酸のポリペプチドの場合、2000の別個の種(すなわち各位置につき20の可能なアミノ酸×100のアミノ酸位置)が作製される。縮退N,N,G/Tトリプレットを含む1つのオリゴヌクレオチドまたは1組のオリゴヌクレオチドを用いることによって、個々の配列は存在し得る20個全ての天然アミノ酸をコードすることができる。したがって、少なくとも1つの前記のようなオリゴヌクレオチドを用いて親のポリヌクレオチド配列が飽和突然変異誘発に付される反応容器では、20の別個のポリペプチドをコードする32の別個の子孫ポリヌクレオチドが作製される。対照的に、位置特異的突然変異誘発で非縮退オリゴヌクレオチドを使用する場合、各反応容器につきただ1つの子孫ポリペプチド生成物がもたらされるだけである。非縮退オリゴヌクレオチドは、開示の縮退プライマーと組み合わせて場合によって用いることができる。例えば、非縮退オリゴヌクレオチドは対象のポリヌクレオチドで特異的な点変異を作製するために用いることができる。前記によって、特異的なサイレント点変異、対応するアミノ酸変化をもたらす点変異、および終止コドンの作製とポリペプチドフラグメントの対応する発現をもたらす点変異を作製する手段が提供される。

10

【0182】

ある特徴では、飽和突然変異誘発のための各反応容器は、少なくとも20の子孫ポリペプチド(例えばアミダーゼ)分子をコードするポリヌクレオチドを含み、それによって20個の天然アミノ酸の全てが、親のポリヌクレオチドで突然変異が誘発されたコドンの位置に対応する個々のアミノ酸位置に出現する(他の特徴では20個全てには満たない天然アミノ酸の組合せが用いられる)。飽和突然変異誘発のための各反応容器から作製された32倍の縮退子孫ポリペプチドをクローン増幅に付し(例えば適切な宿主(例えば大腸菌宿主)で例えば発現ベクターを用いてクローニングする)、発現スクリーニングに付すことができる。個々の子孫ポリペプチドを好ましい特性の変化(親のポリペプチドと比較したとき、例えばアルカリ性または酸性条件下でタンパク分解活性が増加する)を表示するかについてスクリーニングすることによって同定したならば、前記ポリペプチドの配列を決定してそれに含まれる対応する好ましいアミノ酸置換を同定することができる。

20

【0183】

ある特徴では、本明細書に開示する飽和突然変異誘発を用いて親のポリペプチドの各アミノ酸位置全てで突然変異を誘発するとき、好ましいアミノ酸変化を2つ以上のアミノ酸位置で同定することができる。これら好ましいアミノ酸置換の全てまたはいくつかの組合せを含む1つまたは2つ以上の新規な子孫分子を作製することができる。例えば、あるポリペプチドで3つのアミノ酸位置の各々で2つの好ましい固有のアミノ酸変化が同定されたら、並べ替えは各位置(1つは最初のアミノ酸から変化していないものおよび2つの好ましい変化の各々をもつもの)および3つの位置について3通りを含む。したがって、合計 $3 \times 3 \times 3$ または27通りの可能性が存在し、前記には、以前に調べられた7-6つの単一点変異(すなわち3つの位置の各々で2つ)およびいずれの位置にも変化がないものが含まれる。

30

別の特徴では、部位飽和突然変異誘発は、配列を変化させる別の確率論的または非確率論的手段(例えば合成連結再アッセンブリー(下記参照)、シャッフリング、キメラ形性、リコンビネーションおよび他の突然変異誘発方法および突然変異誘発物質)とともに用いることができる。本発明は、反復態様で使用される任意の突然変異誘発方法(飽和突然変異誘発を含む)を提供する。

40

【0184】

合成連結再アッセンブリー(Synthetic Ligation Reassembly)(SLR): 本発明は、新規または改変された特性を有する本発明のポリペプチド(例えばアミダーゼまたは抗体)を作製する“合成連結再アッセンブリー”または簡単に“SLR”、“誘導進化プロセス”と称する非確率論的遺伝子改変系を提供する。本方法は、核酸構築ブロックが任意にシャッフリング、連結またはキメラ化されるのではなく、むしろ非確率論的にアッセンブリングされるという点で、確率論的オリゴヌクレオチドシャッフリングとは異なる。例えば以下を参照されたい: 米国特許出願(USSN) 09/332,835 (“Synthetic Ligation Reassembly in

50

Directed Evolution” , June 14, 199出願)。ある特徴では、SLRは以下の工程を含む：
(a) 鋳型ポリヌクレオチドを提供する工程、ここで前記鋳型ポリヌクレオチドは相同な遺伝子をコードする配列を含み；(b) 複数の構築ブロックポリヌクレオチドを提供する工程、ここで前記構築ブロックポリヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドと予め定めた配列で交差再アッセムリングを生じるようにデザインされ、さらに構築ブロックポリヌクレオチドは前記相同な遺伝子の変種である配列および前記変種配列にランキングする鋳型ポリヌクレオチドと相同な配列を含み；(c) 構築ブロックポリヌクレオチドを鋳型ポリヌクレオチドと一緒にし、それにより前記構築ブロックポリヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドと交差再アッセムリングして、相同遺伝子配列の変種を含むポリヌクレオチドが作製される工程。

10

【 0 1 8 5 】

SLRは、再編成されるポリヌクレオチド間で高レベルの相同性が存在するか否かに左右されない。したがって本方法を用いて、10100を超える異なるキメラを含む子孫分子ライブラリーまたは分子セットを非確率論的に作製することができる。SLRを用いて101000を超える子孫キメラを含むライブラリーを作製することができる。したがって、本発明の特徴は、意図的に選択した全体的なアッセムリー秩序に極めて近い仕上がりを有するキメラ核酸分子セットの非確率論的製造方法を含む。本方法は、有用な互いに適合する連結可能末端を有する、複数の固有の核酸構築ブロックを意図的に作製し、これら核酸構築ブロックをアッセムリングし、それによって設計された全体的なアッセムリー秩序が達成される工程を含む。

20

アッセムリングされるべき核酸構築ブロックの互いに適合する連結可能末端は、それらが前記構築ブロックを予め定めた順序で結合させることができるときに、このタイプの順序を有するアッセムリーのために“有用である”と考えられる。したがって、核酸構築ブロックが結合する全体的なアッセムリー順序は、連結可能末端のデザインによって特徴付けられる。2つ以上のアッセムリー工程が用いられる場合は、核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセムリー順序はまた、アッセムリー工程の一連の順序によって特徴付けられる。ある特徴では、アニーリングさせた構築片を酵素、例えばリガーゼ(例えばT4DNAリガーゼ)で処理して、構築片の共有結合を達成する。

【 0 1 8 6 】

ある特徴では、前記オリゴヌクレオチド構築ブロックのデザインは、最終的なキメラポリヌクレオチドの子孫セットを製造する土台として機能する原型の核酸配列鋳型セットを分析することによって得られる。これら親オリゴヌクレオチド鋳型はしたがって、突然変異を誘発される(例えばキメラを形成されるかまたはシャッフリングされる)核酸構築ブロックの設計に役立つ配列情報源として機能する。本方法のある特徴では、複数の親の核酸鋳型の配列でアラインメントを実施し、1つまたは2つ以上の境界設定点が選択される。前記境界設定点は相同性領域に存在し、1つまたは2つ以上のヌクレオチドを含むことができる。これらの境界設定点は、少なくとも2つの原型鋳型によって好ましくは共有される。したがって前記境界設定点を用いて作製されるべきオリゴヌクレオチド構築ブロックの境界を正確に示し、親のポリヌクレオチドを再編成することができる。原型分子内で特定し選択した境界設定点は、最終的なキメラ子孫分子のアッセムリーで潜在的なキメラ形成点として機能する。境界設定点は、少なくとも2つの親ポリヌクレオチド配列によって共有される相同性領域(少なくとも1つの相同なヌクレオチド対を含む)であろう。また別には、境界設定点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも半分によって共有される相同性領域であろう。または境界設定点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも2/3によって共有される相同性領域であろう。さらに好ましくは、有用な境界設定点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも3/4によって共有される相同性領域である。またはこれは、親ポリヌクレオチド配列のほぼ全てによって共有される相同性領域である。ある特徴では、境界設定点は、親ポリヌクレオチド配列の全てによって共有される相同性領域である。

30

40

ある特徴では、連結再アッセムリープロセスは網羅的に実施され、子孫キメラポリヌクレオチドの網羅的ライブラリーが作製される。換言すれば、全ての可能な順序付けされ

50

た核酸構築ブロックの組合せが最終的なキメラ核酸分子セットで表される。同時に、別の特徴では、各組み合わせにおけるアッセンブリーの順序（すなわち最終的なキメラ核酸の各々の5'から3'の配列における各構築ブロックのアッセンブリーの順序）は、上記に記載したように意図的である。本発明の非確率論的な性質のために、望ましくない副生成物の可能性は大きく減少する。

【0187】

別の特徴では、前記連結再アッセンブリーの方法は系統的に実施される。例えば、前記方法は、系統的に区分された子孫分子ライブラリーを作製するために実施され、前記区分されたものは系統的に（例えば1つずつ）スクリーニングされる。換言すれば、本発明は、特定の核酸構築ブロックの選択的で慎重な使用と連続工程のアッセンブリー反応の選択的および慎重な使用との併用によって、いくつかの反応容器の各々で固有の子孫生成物セットが作製されるデザインを達成することができる。これによって、系統的な調査およびスクリーニング方法の実施が可能になる。したがって、これらの方法は、非常に多数の子孫分子をより小さなグループで系統的に調べることを可能にする。極めて融通性を有するが、同様に網羅的で系統的な態様でキメラ形成を実施することができるその能力のゆえに（特に原型分子間で相同性レベルが低い場合）、これらの方法は、多数の子孫分子を含むライブラリー（またはセット）の作製を提供する。本発明の連結再アッセンブリーの非確率論的な性質のために、作製される子孫分子は、設計によって選択した全体的なアッセンブリーの順序をもつ最終的なキメラ核酸分子ライブラリーを含む。飽和突然変異誘発および最適化誘導進化方法もまた種々の子孫分子種の作製に用いることができる。本発明は、核酸構築ブロックの境界設定点、サイズおよびデザイン並びに結合のデザインの選択に関する選択並びに制御の自由を提供することは理解されよう。さらにまた、分子間相同性の必要性は、本方法の稼働性のために極めて緩やかであることも理解されるところである。実際、境界設定点は、分子間相同性がほとんど存在しないかまたは全く存在しない領域においてさえ選択することができる。例えば、コドンのゆらぎ（すなわちコドンの縮退性）のために、対応する原型鋳型で本来コードされるアミノ酸を変更することなくヌクレオチド置換を核酸構築ブロックに導入することができる。また別には、コドンを変化させ、それによって本来のアミノ酸のためのコードを変化させてもよい。本発明によって提供されることは、そのような置換を核酸構築ブロックに導入し、分子間で相同な境界設定点の発生を高め、したがって結合ブロック間で達成されるべき結合数を増加させ、それによってより多くの子孫キメラ分子を作製させることである。

【0188】

別の特徴では、構築ブロックを作製する工程の合成的性質によって、*in vitro*プロセスで（例えば突然変異誘発によって）または*in vivo*プロセスで（例えば宿主生物の遺伝子スプライシング能を利用することによって）、場合によって後で除去することができるヌクレオチド（例えば1つまたは2つ以上のヌクレオチドで、例えばコドンまたはイントロンまたは調節配列である）のデザインおよび導入が可能になる。多くの事例で、有用な境界設定点作製の潜在的利点の他に多くの他の理由からこれらヌクレオチドの導入がまた所望されることは理解されよう。

ある特徴では、核酸構築ブロックを用いてイントロンが導入される。したがって、本明細書に記載した方法にしたがって作製した人工遺伝子に機能的イントロンが導入される。人工的に導入したイントロンは、天然に存在するイントロンが遺伝子スプライシングで機能的に作用するような態様で遺伝子スプライシングのために宿主細胞で機能することができる。

【0189】

最適化誘導進化システム (Optimized Directed Evolution System): 本発明は、新規なまたは改変された特性を有する本発明のポリペプチド（例えばアミダーゼまたは抗体）を生成する“最適化誘導進化システム”と称する非確率論的遺伝子改変システムを提供する。最適化誘導進化は、組換えにより核酸分子の誘導的分子進化を可能にする還元再組合せ（*reductive reassortment*）、組換えおよび選択の反復サイクルの使用が中心である。最

適化誘導進化は大集団のキメラ配列の生成を可能にする。生成される集団には予め定められた数の交差事象を有する配列が極めて豊富に存在する。

交差事象は、一方の親変種から別の親変種への配列内シフトが生じる、キメラ配列の点であり。そのような点は通常は、2つの親に由来するオリゴヌクレオチドと一緒に連結されてただ1つの配列を形成する結合部分に存在する。本方法は、オリゴヌクレオチドの正確な濃度の算出を可能にし、それによって最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象のために濃縮される。これによって、予め定められた数の交差事象を有するキメラ変種を選択に対してより強いコントロールが提供される。

【0190】

さらにまた、本方法は、他の系と比較して極めて大量のタンパク質変種スペースの開発手段を提供する。以前は、例えば1つの反応中に 10^{13} のキメラ分子を作製した場合、そのような多数のキメラ変種を特定の活性についてテストすることは極めて困難であった。さらにまた、顕著な割合の子孫集団が極めて多数の交差事象を有し、その結果、特定の活性レベルの増強の可能性が低いタンパク質が生じるであろう。前記の方法を用いることによって、キメラ分子集団は特定の数の交差事象を有する変種の濃度を高めることができる。したがって、 10^{13} のキメラ分子が1つの反応中になお作製されるけれども、更なる分析のために選択される分子の各々は、おそらく例えばわずかに3つの交差事象を有するだけであろう。生成子孫集団は予め定められた数の交差事象をもつように偏向させることができるので、キメラ分子間の機能的多様性に対する制限は減少する。これによって、本来の親ポリヌクレオチドに由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の特徴に必要であるかを計算するときに、より操作が容易な変数の数が提供される。

【0191】

キメラ子孫ポリヌクレオチド配列を作製する1つの方法は、各親配列のフラグメントまたはその一部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することである。各オリゴヌクレオチドは、好ましくは固有のオーバーラップ領域を含み、その結果、前記オリゴヌクレオチドと一緒に混合することによって新規な変種が生じ、前記変種は各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順序でアッセムブリングされている。更なる情報はまた例えばUSSN09/332,835、米国特許第6,361,974号で見出すことができる。各親の変種に対して作製されたオリゴヌクレオチドの数は、最終的に作製されるキメラ分子中の交差総数と関連を有する。例えば、3つの親ヌクレオチド配列変種が連結反応を受けるために提供され、例えば高温でより強い活性を有するキメラ変種を見出すことができるかもしれない。1つの例として、50ヌクレオチド配列の1セットが各親変種の各部分に対応して作製される。したがって、連結再アッセムブリー過程の間に、キメラ配列の各々で50までの交差事象が存在するであろう。作製されたキメラポリヌクレオチドの各々が、各親変種由来のオリゴヌクレオチドを互い違いの順序で含む確立は非常に低い。各オリゴヌクレオチドフラグメントが同じモル濃度の量で連結反応に存在するならば、いくつかの場所で同じ親のポリヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチドが互いに隣り合って連結され、したがって交差事象が生じないとうことはありそうなことである。各親に由来する各オリゴヌクレオチドの濃度がこの例の全ての連結工程の間一定に保たれるならば、同じ親の変種に由来するオリゴヌクレオチドがキメラ配列内で連結され、交差を生じない公算は1/3である(3つの親と仮定する)。

【0192】

したがって、親変種のセット数、各変種に対応するオリゴヌクレオチドの数および連結反応の各工程中の各変種の濃度が与えられるならば、確率密度関数(probability density function)を決定して、連結反応工程中におそらく生じる交差事象集団を予測することができる。PDF決定の根拠となる統計学および数学は下記に記載されている。これらの方法を利用することによって、前記のような確立濃度関数を算出し、したがって、特定の連結反応から生じる、予め定められた数の交差事象のためのキメラ子孫集団の濃度を高めることができる。さらにまた、交差事象の標的数を予め定め、続いて系をプログラムして、予め定められた交差事象数に集中する確率密度関数をもたらす、連結反応の各工程での親オリゴヌ

クレオチドの各々の出発量を計算することができる。これらの方法は、組換えによりポリペプチドをコードする核酸の誘導分子進化を可能にする還元再組合せ、組換えおよび選択の反復サイクルの使用が中心である。この系は大集団のキメラ配列の生成を可能にする。前記作製される集団には予め定めた数の交差事象を有する配列が極めて豊富である。交差事象は、一方の親変種から別の親変種への配列内シフトが生じる、キメラ配列中の点である。そのような点は通常は、2つの親に由来するオリゴヌクレオチドと一緒に連結されてただ1つの配列を形成する結合部分に存在する。本方法は、オリゴヌクレオチドの正確な濃度の算出を可能にし、それによって最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象について濃縮される。これは予め定めた数の交差事象を有するキメラ変種の選択に対してより強いコントロールを提供する。

10

【0193】

さらにまた、これらの方法は、他の系と比較して極めて大量の可能なタンパク質変種スペースの開発手段を提供する。本明細書に記載した方法を用いることによって、キメラ分子集団は特定の数の交差事象を有する変種の濃度を高めることができる。したがって、 10^{13} のキメラ分子が1つの反応中になお作製されるけれども、更なる分析のために選択される分子の各々は、おそらく例えばわずかに3つの交差事象を有するのみであろう。生成子孫集団は予め定めた数の交差事象をもつように偏向させることができるので、キメラ分子間の機能的多様性に対する制限は減少する。これによって、本来の親ポリヌクレオチドに由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の特徴に必要であるかを計算するとき、より操作が容易な変数の数が提供される。

20

ある特徴では、前記方法は、各親配列のフラグメントまたはその一部分に対応するオリゴヌクレオチドを作製することによってキメラ子孫ポリヌクレオチド配列を作製する。各オリゴヌクレオチドは、好ましくは固有のオーバーラップ領域を含み、その結果、前記オリゴヌクレオチドと一緒に混合することによって新規な変種が生じ、前記変種は各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順序でアッセンブルされている。例えばUSSN09/332,835を参照されたい。

【0194】

各親の変種に対して作製されたオリゴヌクレオチドの数は、最終的に作製されるキメラ分子中の交差総数と関連する。例えば、3つの親ヌクレオチド配列変種が連結反応を受けるために提供され、例えば高温でより強い活性を有するキメラ変種を見出すことができるかもしれない。1つの例として、50ヌクレオチド配列の1セットが各親変種の各部分に対応して作製される。したがって、連結再アッセンブリープロセスの間に、キメラ配列の各々で50までの交差事象が存在するであろう。作製されたキメラポリヌクレオチドの各々が各親変種由来のオリゴヌクレオチドを交互の順序で含む確立は非常に低い。各オリゴヌクレオチドフラグメントが同じモル濃度の量で連結反応に存在するならば、いくつかの場所で同じ親のポリヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチドが互いに隣り合って連結され、したがって交差事象を生じないということはあることである。各親に由来する各オリゴヌクレオチドの濃度がこの例の全ての連結工程の間一定に保たれるならば、同じ親の変種に由来するオリゴヌクレオチドがキメラ配列内で連結され、交差を生じない公算は $1/3$ である(3つの親と仮定する)。

30

40

したがって、親変種のセット数、各変種に対応するオリゴヌクレオチドの数および連結反応の各工程中の各変種の濃度が与えられるならば、確率密度関数を決定して、連結反応工程中におそらく生じる交差事象集団を予測することができる。PDF決定の根拠となる統計学および数学は下記に記載されている。このような確立濃度関数を算出し、したがって、特定の連結反応から得られる予め定めた数の交差事象をもつキメラ子孫集団の濃度を高めることができる。さらにまた、交差事象の標的数を予め定め、続いて系をプログラムして、予め定めた交差事象数に集中する確率密度関数が得られる連結反応の各工程での親オリゴヌクレオチドの各々の出発量を算出することができる。

【0195】

交差事象の決定：本発明の特徴は、所望の交差確率密度関数(PDF)、再アッセンブリ

50

ングされる親遺伝子の数、および再アッセンブリーのフラグメント数を入力として受けとるシステムおよびソフトを含む。このプログラムの出力は“PDFフラグメント”であり、前記を用いて、再アッセンブリングされた遺伝子および前記遺伝子の交差PDFの概算を得るための手段を決定できる。個々に記載した処理は、好ましくはMATLABa (The Mathworks, Natick, Massachusetts) (プログラム言語) および学術的コンピュータ計算の開発環境で実施される。

【0196】

反復プロセス：本発明の実施で、前記工程は反復して繰り返すことができる。例えば、変更または新規なアミダーゼ表現型に必要な核酸を同定し、活性について再単離、再変更、再検査する。前記の処理は、所望の表現型が生じるまで反復して繰り返すことができる。例えば、完全な生化学的同化および異化経路を細胞で作製することができる。前記には例えばアミド加水分解活性、7-アミノセファロスポラニン酸(7-ACA)の生成、半合成セファロスポリン抗生物質(例えばセファロシン、セファロリジンおよびセフロキシム)の合成が含まれる。

同様に、特定のオリゴヌクレオチドが所望の特性(例えば新規なアミダーゼ表現型)に対して全く影響を与えないことが判明したならば、除去されるべき配列を含むより大きな親オリゴヌクレオチドを合成することにより前記配列を可変因子として除去することができる。より大きな配列内に前記配列を取り込むことによって、いずれの交差事象も防止されるので、子孫ポリヌクレオチドにおいてこの配列の変型はもはや全く存在しない。どのオリゴヌクレオチドが所望の特性と極めて関係が深いか、または無関係であるかを判定するこの反復操作によって、特定の特性または活性を提供する可能性がある可能なタンパク質変種の全てをより効率的に探索することが可能になる。

【0197】

in vivoシャッフリング：in vivoシャッフリングは、本発明のポリペプチド(例えば抗体、アミダーゼなど)の変種を提供する本発明の方法で用いられる。In vivoシャッフリングはマルチマーを組換える細胞の天性の特性を利用することにより実施できる。in vivo組換えは分子の多様性のための主要な天然の経路を提供してきたが、遺伝子組換えは以下を必要とする比較的複雑なプロセスである：1) 相同性の認識；2) 鎖の切断、鎖への侵入および組換え体キアズマの生成をもたらす代謝工程；および3) キアズマの個々の組換え分子への分解。キアズマの形成には相同性配列の認識が必要である。

ある特徴では、本発明は、少なくとも第一のポリヌクレオチド(例えば本発明のアミダーゼ)および第二のポリヌクレオチド(例えば酵素、例えば本発明のアミダーゼまたは任意の他のアミダーゼまたはタグまたはエピトープ)からハイブリッドポリヌクレオチドを生成する方法を提供する。本発明を用い、少なくとも第一のポリヌクレオチドおよび第二のポリヌクレオチド(少なくとも1つの部分的な配列相同性領域を共有する)を適切な宿主細胞に導入することによってハイブリッドポリヌクレオチドを製造することができる。部分的な配列相同性領域は、ハイブリッドポリヌクレオチドを生成する配列の再構成を生じさせる過程を促進する。“ハイブリッドポリヌクレオチド”という用語は、本明細書で用いられるように、本発明の方法から得られる任意の配列であって少なくとも2つの本来のポリヌクレオチド配列に由来する配列を含む配列である。そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、DNA分子間の配列組み込みを促進する分子間の組換え事象から生じるであろう。さらにまた、そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、DNA分子内のヌクレオチド配列を変化させるために繰り返し配列を利用する、分子内還元再組合せプロセスから生じるであろう。

【0198】

in vivo再組合せ：本発明は、本発明の核酸を使用するin vivo再組合せ(reassortment)を提供する。この方法は、バクテリアでは一般的に“RecA-依存”現象と見なされる“組換え”と総称される“分子間”過程を含む。本発明の方法は、配列を組換えおよび再組合せする宿主細胞の組換え過程を利用するか、または細胞内の擬似反復配列の複雑度を欠失によって減少させる還元過程を仲介する細胞の能力を利用することができる。“還元再

組合せ”過程は、“分子内”Rec-A非依存過程によって生じるであろう。

本発明の別の特徴では、新規なポリヌクレオチドを還元再組合せ過程によって作製することができる。本方法は、連続配列（最初のコード配列）を含む構築物の作製、それら構築物の適切なベクターへの挿入、およびそれに続く前記の適切な宿主細胞への導入を必要とする。個々の分子実体の再組合せは、相同性領域を有する前記構築物中の連続配列間で、または擬似反復ユニット間でコンビナトリアル過程によって生じる。前記再組合せプロセスによって、反復配列が組換えられ、および/または反復配列の複雑度および程度が減少し、新規な分子種の作製がもたらされる。種々の処置を適用して、再組合せの速度を速めることができる。前記処置には、紫外線またはDNA損傷化学物質による処置、および/または“遺伝的不安定性”レベルの強化を示す宿主細胞株の使用が含まれるであろう。したがって、前記再組合せプロセスは、擬似反復配列自体の進化を誘導する、相同組換えまたは擬似反復配列の天然の特性を伴うであろう。

10

【0199】

反復または“擬似反復”配列は遺伝的不安定性において役割を果す。本発明では、“擬似反復配列”はそれらの元々のニット構造に限定されない反復配列である。擬似反復ユニットは構築物中で配列アレー（類似の配列の連続ユニット）として提示することができる。いったん連結されたら、連続配列間の結合部は本質的に見分けがつかず、生成された構築物の擬似反復性の性状は今や分子レベルで連続性である。細胞が生成構築物の複雑度を減少させるために行う欠失プロセスは、擬似反復配列間で機能する。擬似反復ユニットは、スリップ現象の発生時に実際に無限の鋳型レパートリーを提供する。したがって、擬似反復配列を含む構築物は、欠失（および場合によって挿入）事象が擬似反復ユニット内の実質的に任意の場所で発生するために十分な分子の順応性を提供する。

20

擬似反復配列が同じ向き（例えば頭部と尾部またはその逆）で全て連結されたとき、細胞は個々のユニットを識別できない。結果として還元過程が配列全体で生じ得る。対照的に、例えばユニットが頭部と尾部結合ではなく頭部と頭部結合で提示されたとき、逆転によって隣接ユニットの終末点の輪郭が明瞭に示され、その結果欠失形成は分離ユニットの脱落に有利に働くであろう。したがって、配列が同じ向きにあることが本発明では好ましい。擬似反復配列のランダムな方向性は再組合せの効率の低下をもたらすが、前記配列の一定の方向性は最高の効率を提供するであろう。しかしながら、同じ向きにある連続配列の減少は効率を低下させるが、それでもなお、新規な分子の効果的回収に十分な順応性を提供する。構築物は同じ方向性の擬似反復配列で作製することができ、より高い効率を可能にすることができる。

30

【0200】

配列は、以下を含む任意の多様な方法を用いて頭部から尾部の向きでアッセンブリングされる：

- a) 一本鎖で作製された場合に方向性を提供するポリAヘッドおよびポリTテールを含むプライマーを利用することができる。これはプライマーの最初の数塩基をRNAで作製することによって（したがって容易にリボヌクレアーゼHで除去できる）実施される；
- b) 固有の制限切断部位を含むプライマーを利用することができる。マルチサイト、固有配列セット、および合成および連結の反復工程が要求されるであろう；
- c) プライマーの内部の数塩基をチオール化し、さらにエキソヌクレアーゼを用いて適切なテールを有する分子を生成することができる。

40

再組合せされた配列の回収は、反復インデックス（RI）が減少したクローニングベクターの特定に依存する。続いて再組合せされたコード配列を増幅によって回収することができる。前記生成物を再クローニングし、発現させる。RIが減少したクローニングベクターの回収は以下によって影響を受けるであろう：

- 1) 構築物の複雑度が減少したときにのみ安定に維持されるベクターの使用；
- 2) 短くなったベクターの物理的方法による物理的回収。この場合、クローニングベクターは、標準的なプラスミド単離方法および標準的な方法を利用する低分子量をカットオフするアガロースゲルもしくはカラムによるサイズ分画を用いて回収される；

50

3) 挿入物のサイズが減少したときに選抜されるインターラプト遺伝子を含むベクターの回収；

4) 発現ベクターおよび適切な選抜による直接選抜技術の使用。

【0201】

関連生物に由来するコード配列（例えば遺伝子）は高度な相同性を示すことがあり、極めて多様なタンパク質生成物をコードすることがある。このような配列タイプは擬似反復配列として本発明で有用である。しかしながら、下記に示す例は元々ほぼ同一のコード配列（擬似反復配列）の再組合せを示すが、本プロセスはそのような同一に近い反復配列に限定されない。

以下の例は本発明の典型的方法を示す。

3つの固有種に由来するコード核酸配列（擬似リピート）について述べる。各配列は、明瞭な一組の特性を有するタンパク質をコードする。配列の各々は、配列内の固有の位置で1塩基対または数塩基対が異なっている。擬似反復配列は別々にまたは一緒に増幅され、さらに全ての可能な並べ替えおよび組換えが連結分子集団で入手できるようにランダムアッセンブリーで連結される。擬似リピートユニットの数はアッセンブリー条件によって制御することができる。構築物中の擬似反復ユニットの平均数は反復インデックス（RI）として示される。

【0202】

いったん形成されたら、前記構築物を公表されたプロトコルにしたがってアガロースゲル上でサイズ分画し（またはサイズ分画しないで）、クローニングベクターに挿入し、適切な宿主細胞にトランスフェクトする。続いて細胞を増殖させ、“還元再組合せ”を実行させる。還元再組合せプロセスの速度は、所望の場合はDNA損傷を誘発することによって促進することができる。RIの減少が、“分子内”メカニズムによって反復配列間での欠失形成によって仲介されるか、または“分子間”メカニズムによる組換え様事象によって仲介されるかは重要ではない。最終結果は全ての可能な組合せが得られる分子の再組合せである。

場合によって、前記方法は、シャッフルされたプールのライブラリーメンバーをスクリーニングする工程をさらに含む。前記工程で、予め定めたマクロ分子（例えばタンパク質レセプター、オリゴ糖、ビリオン）または他の予め定めた化合物もしくは構造物と結合するか、さもなくば相互作用するか、または特定の反応を触媒する能力（例えば酵素の触媒ドメイン）を有するシャッフルされたライブラリーの個々のメンバーを特定する。

そのようなライブラリーから特定したポリペプチドを治療、診断、研究および関連する目的（例えば触媒、水溶液の浸透圧増加のために溶質）のために用いることができる。および/または、前記を1つまたは2つ以上の更なるシャッフリングおよび/または選抜サイクルに付してもよい。

【0203】

別の特徴では、組換えまたは再組合せの前またはその間に、本発明の方法で作製されたポリヌクレオチドを、最初のポリヌクレオチドへの変異の導入を促進する物質またはプロセスに付すことができる。そのような変異を導入することによって、生成されるポリヌクレオチドおよび前記ポリヌクレオチドからコードされるポリペプチドの多様性が高められるであろう。突然変異誘発を促進する物質またはプロセスには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：(+)-CC-1065または合成類似体、例えば(+)-CC-1065-(N3-アデニン)（Sun & Hurley (1992)）；DNA合成を抑制することができるN-アセチルル化または脱アセチル化4'-フルオロ-4-アミノピフェニルアダクト（例えば以下を参照：van de Poll et al. (1992)）；またはDNA合成を抑制することができるN-アセチルル化または脱アセチル化4-アミノピフェニルアダクト（また以下を参照されたい：van de Poll et al. (1992), pp.751-758）；三価クロム、三価クロム塩、DNA複製を抑制することができる多環式芳香族炭化水素（PAH）DNAアダクト、例えば7-プロモメチル-ベンゾ[a]アントラセン（“BM A”）、トリス(2,3-ジプロモプロピル)ホスフェート（“トリス-BP”）、1,2-ジプロモ-3-クロロプロパン（“DBCP”）、2-プロモアクロレイン（2BA）、ベンゾ[a]-7,8-ジヒドロ

10

20

30

40

50

ジオール-9-10-エポキシド (“BPDE”)、白金(II)ハロゲン塩、N-ヒドロキシ-2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]-キノリン (“N-ヒドロキシ-IQ”)およびN-ヒドロキシ-2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-f]-ピリジン (“N-ヒドロキシ-PhIP”)。PCR増幅を遅らせるかまたは停止させる特に好ましい手段は、UV光(+)-CC-1065および(+)-CC-1065-(N3-アデニン)から成る。特に包含される手段は、DNA付加物または前記ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプールに由来するDNA付加物を含むポリヌクレオチド(これらは更なる処理の前に前記ポリヌクレオチドを含む溶液を加熱することを含む工程によって遊離または除去することができる)である。

【0204】

配列変種の作製：本発明はまた、本発明の核酸(例えばアミダーゼ)配列の配列変種のまた別の製造方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸およびポリペプチドを用いるアミダーゼを単離するまた別の方法を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明のアミダーゼコード配列(例えば遺伝子、cDNAまたはメッセンジャー)の変種を提供する。前記変種は、任意の手段(上記に記載したようなランダムもしくは確率論的方法、または非確率論的もしくは“誘導進化”方法を含む)によって変化させることができる。

単離される変種は天然に生じることもある。変種はまたin vitroで作製することができる。変種は、遺伝子工学技術、例えば位置特異的突然変異誘発、化学物質によるランダムな突然変異誘発、エキソヌクレアーゼIIIにより欠失させる方法および標準的なクローニング技術を用いて作製できる。また別には、そのような変種、フラグメント、類似体または誘導体は、化学的合成または改変方法を用いて作製することができる。他の変種作製方法もまた当業者にはよく知られている。前記方法には、天然の単離株から得られた核酸配列を改変して、それらの工業的または研究的利用における価値を高める特徴を有するポリペプチドをコードする核酸を作製する方法が含まれる。そのような方法では、天然の単離株から得られる配列に対して1つまたは2つ以上のヌクレオチドの相違を有する多数の変種配列が作製され、性状が決定される。これらのヌクレオチドの相違は、天然の単離株に由来する核酸によってコードされるポリペプチドに対してアミノ酸の変化をもたらすことができる。

【0205】

例えば、変種は変異性PCRを用いて作製することができる。変異性PCRでは、PCRは、DNAポリメラーゼの複写忠実度が低い条件下で実施され、その結果、高率の点変異がPCR生成物の全長にわたって得られる。変異性PCRは例えば以下に記載されている：D.W. Leung et al. *Technique*, 1:11-15 (1989)およびR.C. Caldwell & G.F. Joyce, *PCR Methods Applied*, 2:28-33 (1992)。簡単に記せば、前記の方法では、突然変異を誘発されるべき核酸は、PCRプライマー、反応緩衝液、MgCl₂、MnCl₂、TaqポリメラーゼおよびPCR生成物の全長にわたって高率の点変異を達成するために適切な濃度のdNTPと混合される。例えば、反応は、20fmoleの突然変異を誘発されるべき核酸、30pmoleの各PCRプライマー、反応緩衝液(以下を含む：50mMのKCl、10mMのトリス塩酸(pH8.3)および0.01%ゼラチン)、7mMのMgCl₂、0.5mMのMnCl₂、5単位のTaqポリメラーゼ、0.2mMのdGTP、0.2mMのdATP、1mMのdCTPおよび1mMのdTTPを用いて実施できる。PCRは、94 で1分、45 で1分、72 で1分の30サイクルを実施することができる。しかしながら、これらのパラメーターは適切に变化させることができることは理解されよう。突然変異誘発核酸は適切なベクターにクローニングし、前記突然変異誘発核酸によってコードされるポリペプチドの活性が検定される。

【0206】

変種はまた、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発を用い、興味をもたれる任意のクローン化DNAで位置特異的変異を作製することができる。オリゴヌクレオチド突然変異誘発は、例えばReidhaar-Olson (*Science* 241:53-57 (1988))の報告によって記載されている。簡単に記せば、そのような方法では、クローン化DNAに導入されるべき1つまたは2つ以上の変異を有する二本鎖の複数のオリゴヌクレオチドを合成し、さらに突然変異を誘発するべきクローン化DNAに挿入する。前記突然変異誘発DNAを含むクローンを回収し、それら

がコードするポリペプチドの活性を調べる。

変種を作製するまた別の方法はアッセンブリーPCRである。アッセンブリーPCRは、小さなDNAフラグメントの混合物から得られるPCR生成物のアッセンブリーを必要とする。多数の種々のPCR反応が同じバイアルで平行して生じ、1つの反応の生成物が別の反応の生成物をプライミングする。アッセンブリーPCRは例えば米国特許第5,965,408号に記載されている。

変種を作製するさらに別の方法はセクシュアルPCR突然変異誘発である。セクシュアルPCR突然変異誘発では、強制的相同組換えが、異なるが高度に関連を有するDNA配列をもつDNA分子間で *in vitro* で生じる。前記組換えは、配列相同性によるDNA分子のランダムなフラグメント化、続いてPCR反応におけるプライマーの伸長による交差の固定の結果として生じる。セクシュアルPCR突然変異誘発は例えばStemmerの報告 (Proc.Natl.Acad. Sci. USA 91:10747-10751(1994)) に記載されている。簡単に記せば、そのような方法では、組換えられるべき複数の核酸がデオキシリボヌクレアーゼで消化され、平均サイズが50から200ヌクレオチドのフラグメントが生成される。所望の平均サイズのフラグメントを精製し、PCR混合物中に再懸濁させる。前記核酸フラグメント間での組換えを促進する条件下でPCRを実施する。例えば、PCRは精製フラグメントを10から30ng/ μ Lの濃度で溶液 (0.2 mMの各 dNTP、2.2mMのMgCl₂、50mMのKCl、10mMのトリス塩酸 (pH9.0) および0.1%のトリトンX-100) に再懸濁することによって実施することができる。100 μ Lの反応混合物につき2.5単位のTaqポリメラーゼを添加し、以下の処方を用いてPCRを実施する：94 で60秒、94 で30秒、50 - 55 で30秒、72 で30秒 (30 - 45回) および72 で5分。しかしながら、これらのパラメーターは適切に変動させることができることは理解されよう。いくつかの特徴では、DNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントを最初のPCR反応で用い、Taqポリメラーゼをその後のPCR反応セットで用いてもよい。組換え配列を単離し、それらがコードするポリペプチドの活性を調べる。

【0207】

変種はまた *in vivo* 突然変異誘発で作製される。いくつかの特徴では、関心のある配列におけるランダム突然変異誘発は、DNA修復経路の1つまたは2つ以上に変異を有するバクテリア株 (例えば大腸菌株) で関心のある配列を増殖させることによって発生させる。そのような“ミューテーター”株は、野生型の親のランダム変異率より高い変異率を有する。これらの株の1つでDNAを増殖させることによって、最終的にDNA内にランダム変異を生じるであろう。 *in vivo* 突然変異誘発で使用される適切なミューテーター株は例えばPCT公開No.W091/16427に記載されている。

変種はまたカセット突然変異誘発を用いて作製することができる。カセット突然変異誘発では、二本鎖DNA分子の小さな領域が、天然の配列とは異なる合成オリゴヌクレオチドの“カセット”で置き換えられる。前記オリゴヌクレオチドはしばしば完全におよび/または部分的任意抽出された天然配列を含む。

再帰的アンサンプル突然変異誘発もまた変種の作製に用いることができる。再帰的アンサンプル突然変異誘発は、表現型が関連を有する変異体で構成される多様な集団 (メンバーのアミノ酸配列が異なっている) を作製するために開発されたタンパク質工学 (タンパク質の突然変異誘発) のためのアルゴリズムである。本方法は、コンビナトリアルカセット突然変異誘発の連続する繰返し工程を制御するためにフィードバックメカニズムを用いる。再帰的アンサンプル突然変異誘発は例えば以下に記載されている：Arkin (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815。

【0208】

いくつかの特徴では、変種はエキスポネンシャルアンサンプル突然変異誘発を用いて作製される。エキスポネンシャルアンサンプル突然変異誘発は、固有で機能を有する変異体を高いパーセンテージで含むコンビナトリアルライブラリーを作製するプロセスである。この場合、機能的なタンパク質をもたらすアミノ酸を同定するために、変化した各位置で小グループの残基が平行して任意抽出される。エキスポネンシャルアンサンプル突然変異誘発は例えば以下に記載されている：Delegrave (1993) Biotechnology Res. 11:1548-15

52. ランダム突然変異誘発および位置特異的突然変異誘発は例えば以下に記載されている：Arnold (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455。

いくつかの特徴では、変種はシャッフリングによる方法で作製される。前記方法では、別個のポリヌクレオチドをコードする複数の核酸部分を一緒に融合させ、キメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列が作製される。これらは、例えば米国特許第5,965,408号、5,939,250号に記載されている（上記の考察もまた参照されたい）。

【0209】

本発明はまた本発明のポリペプチド（例えばアミダーゼ）の変種を提供する。前記変種は、その配列において1つまたは2つ以上のアミノ酸残基（例えば以下のような典型的ポリペプチドのアミノ酸残基：配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：113、または配列番号：114）が保存または非保存アミノ酸残基（例えば保存アミノ酸残基）で置換されており、さらにそのような置換アミノ酸残基が遺伝暗号によってコードされたアミノ酸残基であるか、またはコードされたものではない配列を含む。保存的置換は、ポリペプチド内のあるアミノ酸を同様な特徴を有するまた別のアミノ酸によって置換するものである。したがって、本発明のポリペプチドには本発明の配列の保存的置換を有するものが含まれる。前記保存的置換には以下の置換が含まれる（ただしこれらに限定されない）：鎖式アミノ酸、例えばアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンの別の鎖式アミノ酸による置換；セリンのスレオニンによる置換、またはその逆の置換；酸性残基、例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸の別の酸性残基による置換；アミド基を有する残基、例えばアスパラギンおよびグルタミンのアミド基を有する別の残基による置換；塩基性残基、例えばリジンおよびアルギニンの別の塩基性残基による交換；および芳香族残基、例えばフェニルアラニン、チロシンのまた別の芳香族残基による置換。他の変種は、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基の1つまたは2つ以上が置換基を含むものである。

【0210】

本発明に包含される他の変種は、そのポリペプチドが別の化合物と結合した変種である。前記化合物は例えば前記ポリペプチドの半減期を延長するもの、例えばポリエチレングリコールである。

本発明に包含されるさらに別の変種は、さらに別のアミノ酸が前記ポリペプチドに融合されてある変種である。前記別のアミノ酸は、例えばリーダー配列、分泌配列、前タンパク質配列、または前記ポリペプチドの精製、濃縮もしくは安定化を促進する配列である。

いくつかの特徴では、本発明のポリペプチドの変種、フラグメント、誘導体および類似体は、本明細書に開示した典型的なポリペプチドと同じ生物学的機能または活性（例えばアミダーゼ活性）を保持する。他の特徴では、前記変種、フラグメント、誘導体または類似体には前タンパク質が含まれ、前記の前タンパク質部分を切断して活性なポリペプチドを生成することによって前記変種、フラグメント、誘導体または類似体が活性化できるものである。

【0211】

コドンの最適化による宿主細胞での高レベルのタンパク質発現の達成：本発明は、アミダーゼをコードする核酸を改変してコドン使用頻度を改変する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、アミダーゼをコードする核酸のコドンを改変して宿主細胞でのその発現を増化または低下させる方法を提供する。本発明はまた、宿主細胞でのその発現が増化す

10

20

30

40

50

るように改変されたアミダーゼをコードする核酸、前記のように改変されたアミダーゼ、および改変アミダーゼの製造方法を提供する。前記方法は、アミダーゼをコードする核酸で“好ましくない”または“好ましが劣る”コドンと同定し、前記好ましくないまたは好ましが劣るコドンの1つまたは2つ以上を同じアミノ酸をコードする“好ましいコドン”で置き換えることを含む。好ましいコドンは、宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて多く表現されるコドンで、好ましくないまたは好ましが劣るコドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列で極めて少なく表現されるコドンである。

本発明の核酸、発現カセットおよびベクターを発現する宿主細胞にはバクテリア、酵母、真菌、植物細胞および哺乳類細胞が含まれる。したがって、本発明は、これら細胞の全てでコドンの使用頻度を最適化させる方法、コドン改変核酸およびコドン改変核酸によって生成されるポリペプチドを提供する。典型的な宿主細胞には、グラム陰性細菌（例えば大腸菌およびシュードモナス・フルオレセンス）；グラム陽性細菌（例えばストレプトミセス・ディベルサ（*Streptomyces diversa*）、ラクトバチルス・ガッセリ（*Lactobacillus gasserii*）、ラクトコッカス・ラクチス（*Lactococcus lactis*）、ラクトコッカス・クレモリス（*Lactococcus cremoris*）、枯草菌）が含まれる。典型的な宿主細胞にはまた、真核生物、例えば種々の酵母菌、例えばサッカロミセス種（サッカロミセス・セレピシエを含む）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、およびクリベロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces lactis*）、ハンセヌラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）、アスペルギルス・ニゲル（*Aspergillus niger*）、並びに哺乳類細胞および細胞株、並びに昆虫細胞および細胞株が含まれる。したがって、本発明はまたこれら生物および種での発現に最適な核酸およびポリペプチドを含む。

10

20

30

【0212】

例えば、バクテリア細胞から単離したアミダーゼをコードする核酸のコドンを改変し、それによって前記アミダーゼが由来したバクテリアとは異なるバクテリア細胞、酵母、真菌、植物細胞、昆虫細胞または哺乳類細胞で前記核酸が最適に発現される。コドンを最適化する方法は当技術分野で周知である。例えば以下を参照されたい：米国特許第5,795,737号；Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118；Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188；Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253。さらにまた以下を参照されたい：Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253（マウスの系でのコドンの最適化を述べている）；Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24（酵母でのコドンの最適化を述べている）；Fenh (2000) *Biochemistry* 39:15399-15409（大腸菌でのコドンの最適化を述べている）；Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264（大腸菌での分泌に影響を与えるコドンの使用頻度の最適化を述べている）。

【0213】

非ヒトトランスジェニック動物：本発明はヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。前記動物は、本発明の核酸、ポリペプチド（本発明のアミダーゼまたは抗体）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトしたもしくは形質転換させた細胞を含む。本発明はまた、非ヒトトランスジェニック動物を製造する方法または使用方法も提供する。

40

非ヒトトランスジェニック動物は、本発明の核酸を含む、例えばヤギ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ラットおよびネズミであろう。これらの動物は、例えばアミダーゼ活性の研究のための *in vivo* モデルとして、または *in vivo* でアミダーゼ活性を変化させる物質をスクリーニングするモデルとして用いることができる。非ヒトトランスジェニック動物で発現されるべきポリペプチドのコード配列は、構成的であるか、または組織特異的、発生特異的転写調節因子もしくは誘導性の転写調節因子の制御下にあるように設計することができる。非ヒトトランスジェニック動物は、当技術分野で公知の任意の方法を用いてデザインおよび作製することができる。例えば以下を参照されたい：米国特許第6,211,428号、6,187,992号、6,156,952号、6,118,044号、6,111,166号、6,107,541号、5,959,171号、5,922,854号、5,892,070号、5,880,327号、5,891,698号、5,639,940号、5,573,933号、5,

50

387,742号、5,087,571号（形質転換細胞および卵、並びにトランスジェニックマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタおよびウシの作製並びに使用について記載している）。さらにまた例えば以下も参照されたい：Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157（トランスジェニック酪農動物の乳汁中の組換えタンパク質の生成について述べている）；Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461（トランスジェニックヤギの作製を示す）。米国特許第6,211,428号は、それらの脳でDNA配列を含む核酸構築物を発現する、ヒト以外のトランスジェニック哺乳類の作製および使用について述べている。米国特許第5,387,742号は、クローン化した組換え体または合成DNA配列をマウスの受精卵に注入し、注入された卵を偽妊娠の雌に移植し、分娩までトランスジェニックマウスを飼育することについて記載している。前記マウスの細胞はアルツハイマー病関連タンパク質を発現する。米国特許第6,187,992号は、そのゲノムがアミロイド前駆体タンパク質（APP）をコードする遺伝子の破壊を含むトランスジェニックマウスの作製および使用について記載している。

10

“ノックアウト”動物もまた本発明の方法の実施に用いることができる。例えば、ある特徴では、本発明のトランスジェニックまたは改変動物は、“ノックアウト動物”（例えば“ノックアウトマウス”）を含む。ノックアウト動物では、内因性遺伝子が発現しないように操作され、前記内因性遺伝子は本発明のアミダーゼまたは本発明のアミダーゼを含む融合タンパク質を発現する遺伝子で置換される。

【0214】

トランスジェニック植物および種子：本発明はトランスジェニック植物および種子を提供する。前記植物および種子は、本発明の核酸、ポリペプチド（本発明のアミダーゼまたは抗体）、発現カセットもしくはベクター、またはトランスフェクトしたもしくは形質転換させた細胞を含む。前記トランスジェニック植物は双子葉植物でも単子葉植物でもよい。本発明はまた、これらのトランスジェニック植物および種子の作製方法および使用方法も提供する。本発明のポリペプチドを発現するトランスジェニック植物または植物細胞は当技術分野で公知の任意の方法にしたがって構築することができる。例えば米国特許第6,309,872号を参照されたい。

20

本発明の核酸および発現構築物は任意の手段により植物細胞に導入することができる。例えば、核酸または発現構築物は所望の植物宿主のゲノムに導入してもよいが、また前記核酸または発現構築物はエピソームであってもよい。所望の植物のゲノムへの導入は、宿主の -アミダーゼの産生が内因性転写または翻訳制御エレメントによって調節されるものである。本発明はまた、例えば相同性組換えによる遺伝子の挿入によって内因性遺伝子の発現が破壊された“ノックアウト植物”を提供する。“ノックアウト”植物を作出する手段は当技術分野では周知である。例えば以下を参照されたい：Strepp (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4368-4373；Miao (1995) *Plant J.* 7:359-365。下記のトランスジェニック植物に関する考察も参照されたい。

30

【0215】

本発明の核酸を用いて、本質的にいずれの植物にも、例えば澱粉生成植物、例えばジャガイモ、コムギ、イネ、オオムギなどに所望の特質を付与することができる。本発明の核酸を用いて植物の代謝経路をマニピュレートし、宿主のアミダーゼの発現を最適化または変更することができる。本発明のアミダーゼをトランスジェニック植物の作出に用いて、前記植物によって天然には産生されない化合物を製造することができる。それによって生産コストを下げることができ、また新規な生成物を作出することができる。

40

ある特徴では、トランスジェニック植物を作出する第一の工程は、植物細胞での発現のための発現構築物の作製を含む。前記の技術は当技術分野でよく知られている。それらにはプロモーター（リボソームのmRNAへの効率的結合を促進するためのコード配列）の選抜およびクローニング、並びに適切な遺伝子ターミネーター配列の選抜が含まれる。ある典型的な構成的プロモーターはCaMV35S（カリフラワーモザイクウイルスに由来する）であり、一般的には植物で高い発現度をもたらす。他のプロモーターはより特異的であり、植物の内部または外部環境の刺激に反応する。典型的な光誘発プロモーターはcab遺伝子

50

のプロモーターである (cab遺伝子は主要なクロロフィルa/b結合タンパク質をコードする)。

【0216】

ある特徴では、核酸は植物細胞でより高い発現を達成するために改変される。例えば、本発明の配列はおそらく、植物で観察されるA-Tヌクレオチド対と比較してより高いA-Tヌクレオチド対を有する (いくつかの植物はG-Cヌクレオチド対を好む)。したがって、コード配列中のA-Tヌクレオチドは、アミノ酸配列を顕著に変化させることなくG-Cヌクレオチドで置換し、植物細胞での遺伝子生成物の産生を高めることができる。

選抜可能マーカー遺伝子を遺伝子構築物に付加して、導入遺伝子を組み込むことができた植物細胞または組織を特定することができる。植物細胞の遺伝子の取り込みおよび発現は極めて稀な事象であり、標的とされる組織または細胞のほんの数パーセントにしか生じないので前記の操作は必要であろう。選抜可能マーカー遺伝子は、通常は植物に対して毒性を有する物質 (例えば抗生物質または農薬) に対する耐性を提供するタンパク質をコードする。適切な抗生物質または農薬を含有する培地で増殖させたとき、選抜マーカー遺伝子を組み込まれた植物細胞のみが生存するであろう。他の挿入遺伝子に関していえば、マーカー遺伝子もまた適切な機能のためにプロモーターおよびターミネーター配列を必要とする。

【0217】

ある特徴では、トランスジェニック植物または種子の作製は、プロモーターおよびターミネーター配列を適切に配置するとともに、本発明の配列および場合によってマーカー遺伝子を標的発現構築物 (例えばプラスミド) に取り込みことを含む。これは、適切な方法を介して改変遺伝子を植物に移すことを必要とする。例えば、構築物は、植物細胞プロトプラストへの電気穿孔またはマイクロインジェクションのような技術を用いて植物細胞のゲノムDNAに直接導入するか、または構築物は弾道法 (例えばDNA粒子ボンバー) を用いて植物組織に直接導入してもよい。例えば以下の文献を参照されたい: Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69 (コムギへの導入遺伝子の導入に粒子ボンバーを使用することに関する考察; Adam (1997) 上掲書 (植物細胞にYACを導入するために粒子ボンバーを使用することに関する)。例えば、Rinehart (上掲書、1997) は、綿のトランスジェニック植物の作出に粒子ボンバーを用いた。粒子の加速装置は米国特許第5,015,580号に記載されている。さらにBioRad (BioListics) PDS-2000粒子加速装置は市販されている (以下をまた参照されたい: 米国特許第5,608,148号 (John); 米国特許第5,681,730号 (Ellis) (粒子仲介裸子植物の形質転換に関して述べている)。

【0218】

ある特徴では、プロトプラストを固定化し、核酸 (例えば発現構築物) を注入することができる。プロトプラストから植物を再生させることは穀類に関しては容易ではないが、マメ科では、プロトプラスト由来のカルスから体細胞性胚形成を用いる場合には可能である。組織化が進んだ組織では遺伝子銃技術を用いて裸のDNAにより形質転換することができる。この場合DNAは、細胞のサイズの1/100のタングステン微小プロジェクタイトルに被覆され、前記プロジェクタイトルは細胞および細胞内小器官の深部にDNAを運ぶ。続いて形質転換組織を誘導して再生させる (通常は体細胞性胚形成による)。この技術はいくつかの穀類の種 (モロコシおよびイネを含む) で成功している。

核酸 (例えば発現構築物) はまた、組換えウイルスにより植物細胞に導入することができる。植物細胞は、ウイルスベクター [例えばタバコモザイクウイルス由来ベクター (Rowland (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:989-999)] を用いて形質転換することができる (以下の文献を参照されたい: Porta (1996) "Use of viral replicons for the expression of genes in plants", *Mol. Biotechnol.* 5:209-221)。

【0219】

また別には、核酸 (例えば発現構築物) は適切なT-DNAフランキング領域と結合させ、

通常のアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 宿主ベクターに導入することができる。アグロバクテリウム・ツメファシエンス宿主の病原性機能は、細胞が前記バクテリアに感染したとき前記構築物および隣接するマーカーの植物細胞DNAへの挿入を誘導するであろう。アグロバクテリウム・ツメファシエンス仲介形質転換技術 (攻撃解除および二重ベクターの使用を含む) は学術文献に詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい: Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803; *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995)。A. ツメファシエンス細胞内のDNAは、バクテリアの染色体、およびTi (腫瘍誘発; tumor-inducing) プラスミドとして知られている別の構造物に含まれる。Tiプラスミドは、T-DNAと称される一続きのDNA (長さが約20kb) (これは感染プロセスで植物細胞に移行する) および一連のvir ("virulence"; 病原性) 遺伝子 (感染プロセスを誘導する) を含む。A. ツメファシエンスは傷口を介してのみ植物に感染できる。すなわち、植物の根または茎が傷を受けたとき、植物はある種の化学的シグナルを発生し、前記シグナルに反応してA. ツメファシエンスのvir遺伝子は活性化され、TiプラスミドのT-DNAを植物染色体に移行させるために必要な一連の事象を誘導する。続いてT-DNAは傷口から植物細胞に侵入する。1つの推測は、T-DNAは植物DNAが複製されるまで、または転写されるまで待機し、続いて露出した植物DNAに自身を挿入するということである。A. ツメファシエンスを遺伝子導入ベクターとして使用するためには、T-DNAの腫瘍誘発断片を除去し、一方T-DNA境界領域およびvir遺伝子を保持しなければならない。続いて導入遺伝子をT-DNA境界領域の間に挿入する。これにより、導入遺伝子は植物細胞に移されて植物の染色体に組み込まれる。

【0220】

本発明は、本発明の核酸を用いて単子葉植物 (重要な穀類を含む) の形質転換を提供する (例えば以下を参照されたい: Hiei (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:205-218)。さらに例えば以下も参照されたい: Horsch (1984) *Science* 233:496; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803; Thykjaer (1997) 上掲書; Park (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1135-1148 (T-DNAのゲノムDNAへの組み込みについて考察する)。また以下を参照されたい: D'Halluin, 米国特許第5,712,135号 (穀類 (または他の単子葉植物) の細胞で機能を有する遺伝子を含むDNAの安定な組み込みのためのプロセスについて考察する)。

ある特徴では、第三の工程は選抜および取り込んだ標的遺伝子を次世代に伝達することができる全植物体の再生を含むことができる。そのような再生技術は、組織培養培地である種の植物ホルモンの操作を必要とし、典型的には所望のヌクレオチド配列とともに導入された殺菌剤および/または農薬マーカーが必要である。培養プロトプラストから植物を再生させることについては以下の文献に記載されている: Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; およびBinding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985。再生はまた植物のカルス、エキスプラント、器官またはその部分からも達成することができる。そのような再生技術は一般的に以下に記載されている: Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486。トランスジェニックな組織 (例えば未熟胚) から全植物体を得るために、これらを栄養物およびホルモンを含む一連の培地中で制御環境条件下で増殖させることができる (組織培養として知られているプロセス)。いったん完全な植物が作出され種子が得られたら、子孫の評価が開始される。

【0221】

発現カセットがトランスジェニック植物に安定的に取り込まれた後、これを有性交配により他の植物に導入することができる。交配されるべき種に応じていずれの交配技術も用いることができる。本発明の核酸のトランスジェニックな発現は表現型の変化をもたらすので、本発明の組換え核酸を含む植物は第二の植物と有性的に交配して最終的生成物を得ることができる。したがって、本発明の種子は、本発明の2つのトランスジェニック植物間での交配、または本発明の植物と別の植物との間の交配によって派生させることができ

る。両親が本発明のポリペプチドを発現する場合に、所望の効果（例えば本発明のポリペプチドを発現させて開花の態様に変化した植物を作出する）は、強化することができる。所望の効果は、標準的な繁殖手段によってさらにその後の世代に伝達することができる。

【0222】

本発明の核酸およびポリペプチドは任意の植物または種子で発現させるか、または前記に挿入することができる。本発明のトランスジェニック植物は双子葉植物または単子葉植物であろう。本発明の単子葉トランスジェニック植物の例は、牧草、例えばナガハグサ（blue grass, Poa）、飼い葉、例えばフェスツカ（festuca）、ロリウム（lorium）、テンペレートグラス、例えばアグロスチス（Agrostis）、および穀類、例えばコムギ、エンバク、ライムギ、オオムギ、コメ、モロコシおよびトウモロコシである。本発明の双子葉トランスジェニック植物の例は、タバコ、豆類、例えばルピナス（lupin）、ジャガイモ、サトウダイコン、エンドウマメ、インゲンマメおよびダイズ、および十字花植物（アブラナ科）、例えばカリフラワー、ナタネおよび近縁モデル植物シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）である。したがって、本発明のトランスジェニック植物および種子には以下の属に由来する種を含む広範囲の植物が含まれる（ただしこれらに限定されない）：アナカルジウム（*Anacardium*）、アラキス（*Arachis*）、アスパラガス（*Asparagus*）、アトロパ（*Atropa*）、アヴェーナ（*Avena*）、ブラシカ（*Brassica*）、シトラス（*Citrus*）、キトルルス（*Citrullus*）、カプシカム（*Capsicum*）、カルサムス（*Carthamus*）、ココス（*Cocos*）、コッフエア（*Coffea*）、ククミス（*Cucumis*）、ククルビタ（*Cucurbita*）、ダウクス（*Daucus*）、エレイス（*Elaeis*）、フラガリア（*Fragaria*）、グリシン（*Glycine*）、ゴッシピウム（*Gossypium*）、ヘリアンサス（*Helianthus*）、ヘテロカリス（*Heterocallis*）、ホルデウム（*Hordeum*）、ヒオシナムス（*Hyocyanus*）、ラクツカ（*Lactuca*）、リナム（*Linum*）、ロリウム（*Lolium*）、ルピナス（*Lupinus*）、リコペリシコン（*Lycopersicon*）、マルス（*Malus*）、マニオト（*Manihot*）、マジヨラナ（*Majorana*）、メディカゴ（*Medicago*）、ニコチアナ（*Nicotiana*）、オレア（*Olea*）、オリザ（*Oryza*）、パニユーム（*Panieum*）、パンニセツム（*Pannisetum*）、ペルセア（*Persea*）、ファセオルス（*Phaseolus*）、ピスタキア（*Pistachia*）、ピスム（*Pisum*）、ピルス（*Pyrus*）、プルナス（*Prunus*）、ラファヌス（*Raphanus*）、リシナス（*Ricinus*）、セカレ（*Secale*）、セネシオ（*Senecio*）、シナピス（*Sinapis*）、ソラナム（*Solanum*）、ソルガム（*Sorghum*）、テオブロムス（*Theobromus*）、トリゴネラ（*Trigonella*）、トリチカム（*Triticum*）、ヴィキア（*Vicia*）、ヴィチス（*Vitis*）、ヴィグナ（*Vigna*）、およびゼア（*Zea*）。

【0223】

また別の態様では、本発明の核酸は、繊維細胞を含む植物（例えばワタ、モメン（カボック、シーバペンタンドラ（*Ceiba pentandra*））、デザートウイロウ（desert willow）、クレオソートブッシュ（creosote bush）、ウィンターファット（winterfat）、バルサ、カラムシ、ケナフ、アサ、ローセル（roselle）、ジュート、サイザルアサ（sisal abaca）およびアマを含む）で発現される。また別の態様では、本発明のトランスジェニック植物はワタ属のメンバーであろう。これには任意のワタ種のメンバー、例えばG. アルボレウム（*arboreum*）、G. ハーバセウム（*herbaceum*）、G. バルバデンス（*barbadense*）およびG. ハースツム（*hirsutum*）が含まれる。

本発明はまた、大量の本発明のポリペプチドを製造するために用いられるトランスジェニック植物を提供する。例えば、以下の文献を参照されたい：Palmgren (1997) *Trends Genet.* 13:348; Chong (1997) *Transgenic Res.* 6:289-296（アグロバクテリウム・ツメファシエンス仲介リーフディスク形質転換法でオーキシン誘発性の二方向性マンノパインシンターゼ（*mas1',2'*）プロモーターを用いて母乳タンパク質ベータ-カゼインをトランスジェニックなジャガイモで製造する）。

公知の方法を用いて、当業者は、トランスジェニック植物で導入遺伝子のmRNAまたはタンパク質の増化または減少を検出することによって本発明の植物をスクリーニングすることができる。mRNAまたはタンパク質の検出もしくはは定量のための手段は当技術分野では周知である。

【0224】

ポリペプチドおよびペプチド

本発明は、本発明の典型的な配列、例えば配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114と同一の配列を有する単離または組換えポリペプチドを提供する。上記で考察したように、前記同一性は前記ポリペプチドの完全長に及ぶか、または前記同一性は少なくとも約50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000または1100またはそれ以上の残基領域に及ぶことができる。本発明のポリペプチドはまた、典型的なポリペプチドの完全長よりも短くてもよい。また別の特徴では、本発明は、ポリペプチド（例えば酵素、例えばアミダーゼ）の約5から完全長の間のサイズのポリペプチド（ペプチド、フラグメント）を提供する。典型的なサイズは、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700またはそれ以上の残基、例えば本発明の典型的なアミダーゼの連続する残基である。本発明のペプチドは、例えば標識プローブ、抗原、トレラゲン、モチーフ、アミダーゼ活性部位として有用であろう。

【0225】

本発明のポリペプチドおよびペプチドはまた、天然の供給源から単離されたポリペプチドでも、合成または組換えによって作製されたポリペプチドでもよい。ペプチドおよびタンパク質は *in vitro* または *in vivo* で組換えによって発現させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドは当技術分野で公知の任意の方法によって作製および単離することができる。本発明のポリペプチドおよびペプチドはまた、当技術分野で周知の化学的方法を用いて全体をまたは部分的に合成することができる。例えば以下を参照されたい：Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223; Horn (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232; A.K. Banga, *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. 例えば、ペプチド合成は、種々の固相技術を用いて実施することができる（例えば以下を参照されたい：Roberge (1995) *Science* 269:202; Merrifield (1997) *Methods Enzymol.* 289-13）、さらに例えばABI 431Aペプチドシンセサイザー（Perkin Elmer）を製造元の提供する指示にしたがって用いながら自動合成も実施することができる。

【0226】

本発明のペプチドおよびポリペプチドはグリコシル化することもできる。グリコシル化は翻訳後に化学的または細胞の生合成メカニズムによって付加することができる。後者の細胞による生合成では、公知のグリコシル化モチーフが使用されるが、前記モチーフはその配列にとって天然であってもまたはペプチドとして付加されてもよく、また核酸のコード配列に付加されてもよい。グリコシル化はO-連結でも、またはN-連結でもよい。

本発明のペプチドおよびポリペプチドには、互いにペプチド結合または改変ペプチド結合（すなわちペプチド同配体）によって結合したアミノ酸を含む全てのポリマーが含まれ、さらに20遺伝子のコードするアミノ酸以外の改変アミノ酸も含むことができる。前記ポリペプチドは、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）によって、または当技術分野で周知の化学的改変技術によって改変することができる。改変はポリペプチドのいずれの位置（ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端）で生じても

よい。同じタイプの改変が、あるペプチドのいくつかの位置で同じ程度でまたは種々の程度で存在しえることは理解されよう。さらにまた、1つのペプチドが多数のタイプの改変をもつことも可能である。改変にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋環状化、ジスルフィド結合形成、ジメチル化、共有架橋の形成、システインの生成、ピログルタメートの生成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、PEG化、タンパク分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、およびタンパク質へのアミノ酸のトランスファー-RNA仲介添加（例えばアルギニル化）が含まれる。以下を参照されたい：T.E. Creighton, *Proteins - Structure and Molecular Proteins*, 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp.1-12 (1983)。

10

【0227】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、上記で定義したように全ての“模倣物”型および“擬似ペプチド”型を含む。“模倣物”および“擬似ペプチド”という用語は、本発明のポリペプチドと実質的に同じ構造のおよび/または機能的特徴を有する合成化合物を指す。前記模倣物は、完全に合成非天然アミノ酸類似体で構成されているか、または部分的に天然のペプチドアミノ酸と部分的に非天然のアミノ酸類似体とのキメラ分子であってもよい。前記模倣物はまた任意量の天然のアミノ酸の保存的置換を、そのような置換がまた前記模倣物の構造および/または活性を変化させないかぎり取り込んでいてもよい。保存的変種である本発明のポリペプチドに関しては、模倣物が本発明の範囲内に包含されるか否か（すなわちその構造および/または機能が実質的に変化されていないか否か）は、日常的な実験によって決定されるであろう。したがって、ある特徴では、擬似組成物がアミダーゼ活性を有するならば、前記組成物は本発明に包含される。

20

【0228】

本発明のポリペプチド擬似組成物は非天然の構造的成分の任意の組合せを含むことができる。また別の特徴では、本発明の擬似組成物は以下の3つの構造群の1つを含む：a) 天然のアミド結合（“ペプチド結合”）以外の残基連結基；b) 天然に存在するアミノ酸残基に代わる非天然の残基；c) 擬似二次構造を誘発する、すなわち二次構造（例えばターン、ターン、シート、ヘリックス構造など）を誘導または安定化させる残基。例えば、本発明のポリペプチドは、その残基の全てまたはいくつかが天然のペプチド結合以外の化学的手段によって結合されるとき模倣物として特徴付けることができる。個々の擬似ペプチド残基は、ペプチド結合、他の化学結合またはカップリング手段、例えばグルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、二官能性マレイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）またはN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）によって結合させることができる。通常のアミド結合（“ペプチド結合”）の代用となることができる連結基には、例えばケトンメチレン（例えば-C(=O)-NH-の代わりに-C(=O)-CH₂-）、アミノメチレン（CH₂-NH）、エチレン、オレフィン（CH=CH）、エーテル（CH₂-O）、チオエーテル（CH₂-S）、テトラゾール（CN₄-）、チアゾール、レトロアミド、チオアミド、またはエステルが含まれる。例えば以下を参照されたい：Spatola (1983) *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 7, pp267-357, “Peptide Backbone Modifications,” Marcell Dekker, NY。

30

40

【0229】

本発明のポリペプチドはまた、天然に存在するアミノ酸残基の代わりに全てのまたはいくつかの非天然残基を含むことによって模倣物として特徴付けることができる。非天然残基は学術文献および特許文献に詳しく記載されている。天然のアミノ酸残基の模倣物として有用ないくつかの典型的な非天然組成物およびその目安は下記に記載する。芳香族アミノ酸の模倣物は、以下で置換することによって生成することができる：D-またはL-ナフィ

50

ルアラニン；D-またはL-フェニルグリシン；D-またはL-2チエネイルアラニン；D-またはL-1、-2、3-または4-ピレネイルアラニン；D-またはL-3チエネイルアラニン；D-またはL-(2-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(3-ピリジニル)-アラニン；D-またはL-(2-ピラジニル)-アラニン；D-またはL-(4-イソプロピル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルアラニン；D-p-フルオロ-フェニルアラニン；D-またはL-p-ピフェニルフェニルアラニン；D-またはL-p-メトキシ-ピフェニルフェニルアラニン；D-またはL-2-インドール(アルキル)アラニン；およびD-またはL-アルキルアラニン(ここでアルキルは、置換または非置換メチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、イソブチル、sec-イソチル、イソ-ペンチルまたは非酸性アミノ酸であろう)。非天然アミノ酸の芳香環には、チアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、ベンゾイミダゾリル、ナフチル、フラニル、ピロリル、およびピリジル芳香環が含まれる。

10

【0230】

酸性アミノ酸の模倣物は、例えば非カルボキシレートアミノ酸で置換しながら陰性荷電を維持することによって；(ホスホノ)アラニンで置換することによって；硫酸化スレオニンで置換することによって生成することができる。カルボキシル側鎖基(例えばアスパルチルまたはグルタミル)はまた、選択的にカルボジイミド($R'-N-C-N-R'$)、例えば1-シクロヘキシル-3(2-ホルホルニル-(4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドとの反応によって改変することができる。アスパルチルまたはグルタミルはまた、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミル残基に変換することができる。塩基性アミノ酸の模倣物は、例えば(リジンおよびアルギニンの他に)アミノ酸のオルニチン、シトルリンまたは(グアニジノ)-酢酸、または(グアニジノ)アルキル-酢酸で置換して生成できる(ここでアルキルは上記で定義した通りである)。ニトリル誘導体(例えばCOOHの代わりにCN-成分を含む)でアスパラギンまたはグルタミンを置換することができる。アスパラギニルおよびグルタミル残基は脱アミノ反応によって対応するアスパルチルまたはグルタミル残基を得ることができる。アルギニン残基の模倣物は、アルギニルを例えば1つまたは2つ以上の通常の試薬(例えばフェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオンまたはニンヒドリンを含む)と好ましくはアルカリ性条件下で反応させて生成することができる。チロシン残基模倣物は、例えば芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとチロシルを反応させて生成することができる。N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いてO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ生成することができる。システイン残基模倣物は、システニル残基を例えば-ハロアセテート(例えば2-クロロ酢酸またはクロロ酢酸)および対応するアミンと反応させてカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得ることによって生成することができる。システイン残基模倣物はまた、例えばブromo-トリフルオロアセトン、-ブromo-(5-イミダゾリル)プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド；p-クロロメルクリベンゾエート、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-オキサ-1,3-ジアゾールとシステニル残基を反応させて生成できる。リジン模倣物は、リシニルを例えば無水コハク酸または他のカルボン酸と反応させ(さらにアミノ末端残基を変更して)生成することができる。リジンおよび他の-アミノ含有残基の模倣物はまた、イミドエステル、例えばメチルピコリンイミデート、ピリドキサールホスフェート、ピリドキサール、クロロボロハイドライド、トリニトロ-ベンゼンスルホン酸、O-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオンとの反応、およびグリオキシレートとのトランスアミダーゼ触媒反応によって生成することができる。メチオニンの模倣物は、例えばメチオニンシルホキシドとの反応によって生成することができる。プロリンの模倣物には、例えばピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、3-もしくは4-ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、3-もしくは4-メチルプロリン、または3,3-ジメチルプロリンが含まれる。ヒスチジン残基模倣物は、ヒスチジルを例えばジエチルプロカルボネートまたはパラ-ブromoフェナ

20

30

40

50

シルプロミドと反応させて生成することができる。他の模倣物には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化；セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化；リジン、アルギニンおよびヒスチジンの α -アミノ基のメチル化；N-末端アミンのアセチル化；主鎖のアミド残基のメチル化またはN-メチルアミノ酸による置換；またはC-末端カルボキシル基のアミド化によって生成されるものが含まれる。

【0231】

本発明のポリペプチドの残基、例えばアミノ酸はまた反対のキラリティーをもつアミノ酸（またはペプチド擬似残基）によって置換することができる。したがって、L-構造（化学物質の構造に応じてRまたはSとも称することができる）に天然に存在するいずれのアミノ酸も、同じ化学的構造型またはペプチド模倣物であるが反対のキラリティーをもつアミノ酸（D-アミノ酸と称されるが、またR-またはS-型とも称することができる）で置換することができる。

10

【0232】

本発明はまた、天然のプロセス [例えば翻訳後プロセッシング（例えばリン酸化、アシル化など）] によって、または化学的改変技術によって本発明のポリペプチドを改変し、改変ポリペプチドを生成する方法を提供する。改変は、ポリペプチドのいずれの場所（ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端を含む）でも生じることができる。ある1つのポリペプチドのいくつかの場所で同じタイプの改変が同じ程度でまたは種々の程度で存在することができることは理解されよう。さらにまた、ある1つのポリペプチドが多くタイプの改変をもつこともできる。改変にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋環状化、ジスルフィド結合形成、ジメチル化、共有架橋の形成、システインの生成、ピログルタメートの生成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、PEG化、タンパク分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、およびタンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA仲介添加（例えばアルギニル化）が含まれる。例えば以下を参照されたい：T.E. Creighton, *Proteins - Structure and Molecular Proteins*, 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp.1-12 (1983)。

20

30

【0233】

ペプチドの固相化学合成法もまた用いて本発明のポリペプチドまたはフラグメントを合成することができる。そのような方法は1960年代の初めから当技術分野では公知で（R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154(1963)）（また以下を参照されたい：J. M. Stewart and J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. pp.11-12））、最近では市販の実験室用ペプチドデザイン合成キットとして利用されている（Cambridge Research Biochemicals）。前記の実験室用市販キットは一般的にはH.M. Geysten et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998(1984)) の開示を利用し、一枚のプレートに結合させた多数の“ロッド”または“ピン”の先端に合成ペプチドを提供する。前記のようなシステムを利用するときは、ロッドまたはピンを含むプレートを逆さにして対応するウェルまたは液溜め（適切なアミノ酸をピンまたはロッドの先端に結合もしくは付着させるための溶液を含む）を含む第二のプレートに挿入する。前記のような操作工程（すなわち逆さにしロッドおよびピンの先端を適切な溶液に挿入する）を繰り返すことによって、アミノ酸は所望のペプチドに構築される。さらに、多数のFmocペプチド合成系が入手できる。例えば、ポリペプチドまたはフラグメントのアッセンプリーは、アプライドバイオシステム社（Applied Biosystems, Inc.）のモデル431A（登録商標）自動ペプチド合成装置を用いて固相で実施できる。前記のような装置は、直接合成または他の公知の技術によって結合させることができる一連のフラグメントの合成により本発明のペプチドへのアクセスを容易にする。

40

50

【0234】

本発明は、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114に示すアミノ酸配列を有する典型的な酵素を含む新規なアミダーゼ、それらをコードする核酸、それらに結合する抗体、並びにそれらを製造および使用方法を提供する。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載したようにアミダーゼ活性（例えばアミドを加水分解する能力）を有し、第二アミダーゼ活性（ペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を含む）を有する酵素を含む。

10

【0235】

また別の特徴では、本発明のアミダーゼは、本明細書に記載した典型的なアミダーゼの活性から改変された活性を有する。本発明は、シグナル配列をもつアミダーゼおよびシグナル配列をもたないアミダーゼ並びにシグナル配列それ自体を含む。本発明は固定アミダーゼ、抗アミダーゼ抗体およびそのフラグメントを含む。本発明は、例えばドミナントネガティブ変異体または本発明の抗アミダーゼ抗体を用いて、アミダーゼ活性を抑制する方法を提供する。本発明は、本発明のアミダーゼを含むヘテロ複合体、例えば融合タンパク質、ヘテロダイマーなどを含む。

20

本発明のアミダーゼを研究室および工業的環境で用いて、多様な目的のためにアミド化合物を加水分解することができる。これらのアミダーゼは単独で用いて特異的な加水分解を提供するか、または他のアミダーゼと併用して広スペクトルの活性をもつ“カクテル”を提供することができる。本発明のアミダーゼの典型的な使用には、食品での風味の増強（例えば酵素熟成チーズ）、殺菌および殺真菌の促進、ファインケミカルの中間体の改変および脱保護、ペプチド結合の合成、キラル分離の実施、アミド含有抗生物質または他の薬剤（例えばセファロスポリン）の加水分解におけるそれらの使用が含まれる。

30

【0236】

本発明のアミダーゼは、種々の条件（例えば極端なpHおよび/または温度、酸化剤など）下でアミダーゼ活性を有することができる。本発明は、種々の触媒効率および安定性（例えば温度、酸化剤および洗浄条件の変化に対する安定性）を有するまた別のアミダーゼ調製物を生じる方法を提供する。ある特徴では、アミダーゼ変種は、位置特異的突然変異誘発および/またはランダム突然変異誘発の技術を用いて作製することができる。ある特徴では、誘導進化を用いて、また別の特異性および安定性をもつ極めて多様なアミダーゼ変種を作製することができる。

本発明のタンパク質はまた、アミダーゼ調節物質（例えばアミダーゼ活性のアクチベーターまたはインヒビター）を特定するための研究用試薬としても有用である。簡単に記せば、テストサンプル（化合物、プロス、抽出物など）をアミダーゼアッセイに添加し、加水分解を阻害するそれらの能力を決定する。このようにして同定したインヒビターを工業および研究に用いて、望ましくない加水分解（例えばタンパク質分解）を減少または防止することができる。アミダーゼに関しては、インヒビターを組み合わせ、その活性スペクトルを広げることができる。

40

【0237】

本発明はまた、本発明の核酸、ポリペプチドおよび抗体を用いて新規なアミダーゼを発見する方法を提供する。ある特徴では、アミダーゼの発現を基準にしてその発現についてラムダファージライブラリーをスクリーニングする。ある特徴では、本発明は、毒性クロー

50

ンの検出、基質へのアクセスの改善、ライブラリーの大量切り出しから生じる一切の偏向の潜在的可能性を迂回させることによる宿主のエンジニアリングの必要性の減少、および低クローン密度でのより迅速な増殖を可能にするためにラムダファージライブラリーをスクリーニングに使用する。ラムダファージライブラリーのスクリーニングは液相または固相で実施できる。ある特徴では、本発明は液相でのスクリーニングを提供する。前記によって、アッセイ条件におけるより大きな融通性、基質の融通性の更なる付加、弱いクローンに対する感度の上昇、および固相スクリーニングよりも容易な自動化が提供される。

本発明は、何千もの生体触媒反応の実施および高レベルの正確さと再現性を担保しながら短時間（例えば1日）でできるスクリーニングアッセイを可能にするために、本発明のタンパク質および核酸並びにロボットによる自動化を用いるスクリーニング方法を提供する（下記のアレーについての考察を参照されたい）。結果として、誘導化合物ライブラリーが数週間で作製できる。分子（小分子を含む）の改変に関する更なる教示についてはPC T/US94/09174を参照されたい。

本発明は天然に存在しないアミダーゼ変種であるアミダーゼ酵素を含み、このアミダーゼ酵素は、前記変種のアミノ酸配列が由来した前駆体アミダーゼと比較したとき、異なるタンパク分解活性、安定性、基質特異性、pHプロファイルおよび/または性能特性を有する。特に、そのようなアミダーゼ変種は天然には見出されないアミノ酸配列を有し、このアミダーゼ変種は前駆体アミダーゼの複数のアミノ酸残基の異なるアミノ酸による置換によって誘導される。前記前駆体アミダーゼは天然に存在するアミダーゼまたは組換えアミダーゼであろう。有用なアミダーゼ変種は、指定のアミノ酸残基の位置に天然に存在するL-アミノ酸のいずれかによる置換を含む。

【0238】

典型的な配列番号:2は以下の配列を有する：

Met Asn Ser Thr Leu Ala Tyr Phe Thr Glu Gln Gly Pro Met Ser Asp Pro Gly Thr Tyr
Arg Ser Leu Phe Glu Asp Leu Pro Thr Ser Ile Pro Asp Leu Val Lys Leu Val Gln Gly
Val Thr Leu His Ile Phe Trp Thr Glu Arg Tyr Gly Leu Lys Val Pro Pro Gln Arg Met
Glu Glu Leu Gln Leu Arg Ser Met Glu Lys Arg Leu Ala Arg Thr Leu Glu Leu Asp Pro
Arg Pro Leu Val Glu Pro Arg Pro Leu Glu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Cys Arg Asp His
Ser Leu Leu Leu Thr Ala Leu Leu Arg His Gln Gly Val Pro Ala Arg Ala Arg Cys Gly
Phe Gly Ala Tyr Phe Leu Pro Asp His Phe Glu Asp His Trp Val Val Glu Tyr Trp Asn
Gln Glu Gln Ser Arg Trp Val Leu Val Asp Ala Gln Leu Asp Ala Ser Gln Arg Glu Val
Leu Lys Ile Asp Phe Asp Thr Leu Asp Val Pro Arg Asp Gln Phe Ile Val Gly Gly Lys
Ala Trp Gln Met Cys Arg Ser Gly Glu Gln Asp Pro Gly Lys Phe Gly Ile Phe Asp Met
Asn Gly Leu Gly Phe Val Arg Gly Asp Leu Val Arg Asp Val Ala Ser Leu Asn Lys Met
Glu Leu Leu Pro Trp Asp Cys Trp Gly Val Ile Leu Val Glu Lys Leu Asp Asp Pro Ala
Asp Leu Ser Val Leu Asp Arg Val Ala Ser Leu Thr Ala Arg Asp Val Pro Asp Phe Glu
Val Leu Arg Ala Cys Tyr Glu Ser Asp Pro Arg Leu Arg Val Asn Asp Ser Leu Leu Ser
Tyr Val Asn Gly Asn Met Val Glu Val Gln Ile Ala

【0239】

典型的な配列番号:4は以下の配列を有する：

Val Pro Ser Leu Asp Glu Tyr Ala Thr His Ser Ala Phe Thr Asp Pro Gly Arg His Arg
Asp Leu Leu Gly Ala Thr Gly Thr Ser Pro Asp Asp Leu His Arg Ala Ala Thr Gly Val
Val Leu His Tyr Arg Gly Gln Arg Asp Arg Leu Thr Asp Glu Gln Leu Pro Asp Val Asp
Leu Arg Trp Phe Ser Ala Gln Leu Glu Val Val Arg His Arg Ala Ala Leu Pro Leu Gly
Ala His Arg Thr Asp Ala Gln His Leu Ala Gly Cys Cys Arg Asp His Thr Leu Leu Ala
Val Ala Val Leu Arg Glu His Gly Ile Pro Ala Arg Ser Arg Val Gly Phe Ala Asp Tyr
Phe Glu Pro Asp Phe His His Asp His Val Val Val Glu Arg Trp Asp Gly Ala Arg Trp
Val Arg Phe Asp Ser Ala Leu Asp Pro Ala Asp His Leu Phe Asp Val Asp Asp Met Pro
Ala Gly Glu Gly Met Pro Phe Glu Thr Ala Ala Glu Val Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly
Arg Val Asp Pro Arg Arg Tyr Gly Val Asp Lys Ala Met Pro His Leu Ile Gly Ile Pro

Phe Leu Leu Gly Glu Val Phe Leu Glu Leu Ala His Arg Gln Arg Asp Glu Ile Leu Leu
 Trp Asp Val Trp Gly Val Gly Ile Pro Pro Phe Ala Arg Pro Asp Gly Leu Ala Pro Val
 Thr Met Ser Asp Asp Glu Met Ala Glu Leu Ala Asp Glu Val Ala Arg Leu Val Val Ala
 Ala Asp Asp Gly Asp Asp Ala Ala Asp Ala Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Ala Asp Pro
 Arg Leu Arg Pro Thr Ala Asn Pro Leu Val Ala Leu Ser Pro Leu Glu Arg Ile Gly Asp
 Val Asp Leu Thr Ala Arg Thr Thr Thr Trp Arg

【 0 2 4 0 】

典型的な配列番号:6は以下の配列を有する:

Met Thr Asn Gln Pro Glu Arg Ser Thr Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Ala Pro Ala Ala Met
 Thr Asp Leu Ser Ala His Arg Ala Arg Leu Arg Asp Leu Pro Thr Asp Leu Ala Gly Leu 10
 Cys Arg Val Ile Gln Gly Leu Leu Val His Pro Phe Leu Ala His Leu Tyr Gly Leu Pro
 Ser Ser Ala Leu Arg Leu Gly Glu Leu Glu Leu Arg Arg Ala Ser Ala Met Leu Asp His
 Ala Leu Thr Leu Asp Ala Arg Pro Leu Val Glu Ala Arg Pro Pro Glu Arg Arg Leu Val
 Gly Asn Cys Arg His Phe Ser Val Leu Phe Cys Ala Leu Leu Arg Ala Gln Gly Val Pro
 Ala Arg Ala Arg Cys Gly Phe Gly Ala Tyr Phe Asn Pro Ala Arg Phe Glu Asp His Trp
 Val Gly Glu Val Trp Asp Ser Thr Arg Gly Ala Trp Arg Leu Val Asp Ala Gln Leu Asp
 Ala Glu Gln Arg Gln Ala Leu Arg Ile Ser Phe Asp Pro Leu Asp Val Pro Arg Ser Glu
 Phe Val Val Ala Gly Glu Ala Trp Arg Arg Cys Arg Ser Gly Ala Ala Ala Pro Glu Leu
 Phe Gly Ile Leu Asp Leu Arg Gly Leu Trp Phe Val Arg Gly Asn Val Val Arg Asp Leu
 Ala Ala Phe Ser Lys Arg Glu Leu Leu Pro Trp Asp Gly Trp Gly Leu Met Ala Thr Arg 20
 Glu Asp Ser Ser Pro Ala Glu Leu Ala Leu Leu Asp His Val Ala Glu Leu Thr Leu Ala
 Gly Asp Glu Arg His Asp Glu Arg Leu His Leu Gln Asp Ala Glu Pro Gly Leu Arg Val
 Pro Arg Val Val Leu Ser Phe Asn Leu Asn Gly Ala Glu Val Asp Leu Gly Pro Gly Val
 Ala Asn

【 0 2 4 1 】

典型的な配列番号:8は以下の配列を有する:

Met Arg Ser Asp Leu Ala Phe Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Ile Thr Asp Pro Gly Gln His
 His Asp Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Leu Val Lys Val Val Gln Gly
 Leu Val Val His Val Phe Trp Leu Glu Arg Tyr Gly Leu Lys Leu Lys Glu Thr Arg Lys
 Ala Glu Val Gln Leu Arg Trp Ala Glu Lys Gln Leu Glu Arg Ile Arg Ala Leu Asp Pro 30
 Arg Pro Leu Ala Glu Ala Arg Pro Leu Glu Lys Arg Leu Val Gly Asn Cys Arg Asp Phe
 Thr Val Leu Leu Val Cys Leu Leu Arg Ala Arg Gly Ile Pro Ala Arg Ala Arg Cys Gly
 Phe Ala Lys Tyr Phe Glu Ala Gly Arg His Met Asp His Trp Val Ala Glu Val Trp Asn
 Ala Glu Leu Gln Arg Trp Thr Leu Val Asp Ala Gln Leu Asp Asp Leu Gln Arg Lys Ala
 Leu Ala Ile Pro Phe Asn Pro Leu Asp Val Pro Arg Val Gln Phe Leu Thr Gly Gly Glu
 Ala Trp Leu Arg Cys Arg Lys Gly Gln Ala Asp Pro Glu Thr Phe Gly Ile Phe Asp Leu
 Lys Gly Leu Trp Phe Val Arg Gly Asp Phe Val Arg Asp Val Ala Ala Leu Asn Lys Val
 Glu Leu Leu Pro Trp Asp Ala Trp Gly Ile Ala Asp Val Gln Glu Lys Asp Ile Ser Gly
 Glu Asp Leu Val Phe Leu Asp Glu Val Ala Glu Leu Ser His Gly Asp Val Glu Arg Phe
 Glu Gln Val Lys Gly Leu Tyr Glu Thr Asp Pro Arg Leu His Val Pro Glu Val Ile Asn 40
 Ser Tyr Thr Gln Ala Gly Val Leu Arg Val Asp Leu Gln Ala His Ser

【 0 2 4 2 】

典型的な配列番号:10は以下の配列を有する:

Met Thr Asp Arg Ala Pro Tyr Ala Ala Gln Ser Pro Ile Ser Asp Pro Gly Asp Met Ser
 Arg Trp Leu Thr Gly Leu Pro Ala Asp Phe Ala Ala Leu Arg Ala Leu Ala Arg Pro Leu
 Val Ala His Tyr Arg Ala Asp Asp Leu Ala Ala Phe Gly Ile Pro Glu Glu Arg Val Glu
 Glu Ile Asp Thr Arg Phe Ala Glu Arg Met Leu Ala Arg Leu His Glu Met Glu Ser Gly
 Pro Leu Thr Pro Glu Arg Thr Pro Ala Asn Arg Leu Val Gly Cys Cys Arg Asp Phe Thr
 Leu Leu Tyr Leu Thr Met Leu Arg His Ala Gly Ile Pro Ala Arg Ser Arg Val Gly Phe
 Ala Gly Tyr Phe Ala Ala Gly Trp Phe Ile Asp His Val Val Ala Glu Val Trp Asp Glu 50

Ala Asn Gly Arg Trp Arg Leu Val Asp Pro Gln Leu Ala Asp Val Arg Thr Asp Pro Asn
 Asp Gly Phe Pro Ile Asp Thr Leu Asp Ile Pro Arg Asp Arg Phe Leu Val Ala Gly Met
 Ala Trp Gln Ala Cys Arg Ser Glu Glu Leu Gln Pro Glu Gln Phe Val Val Asp Pro Asp
 Leu Asp Ile Pro Val Thr Arg Gly Trp Leu Gln Leu Arg His Asn Leu Val Gln Asp Leu
 Ala Ala Leu Thr Lys Arg Glu Met Ile Leu Trp Asp Thr Trp Gly Ile Leu Gly Asp Glu
 Pro Val Ala Glu Asp Thr Leu Pro Leu Leu Asp Ser Ile Ala Ala Val Thr Ala Asp Pro
 Asp Val Thr Tyr Ala Asp Ala Leu Asn Leu Tyr Glu Arg Glu Pro Gly Val Gln Val Pro
 Pro Glu Val Met Ser Phe Asn Met Leu Ala Asn Glu Pro Arg Met Val Ala Ser Gly Val

【 0 2 4 3 】

典型的な配列番号 :12は以下の配列を有する :

10

Met Leu Ala Ala Gly Val Pro Gly Arg Leu Val Gly Leu His Arg Ile Val Glu Leu Asp
 Leu Glu Arg Glu Thr Leu Gly Gln Leu Gln Gln Ala Leu Leu Gln Val Ala Leu Gln Cys
 Leu Pro Asp Ala Leu Ala Asp Leu Arg Ala Gly Gly Leu Gly Arg Glu Ala Asp Gly Arg
 Arg Pro Asp Ala Leu Ala Asp Arg Asp Gly Gly Asp Val Gly Val Gly Leu Leu Asp Val
 Gly Ala Glu Leu Pro Val Ala Gly Asp Glu His His Arg Asp Ala Asp His Gly Gly Gly
 Ile Gly Val Gln Gln Glu Phe Arg Ser Arg His Ala Val Asp Ala His Ala His Asp Leu
 Thr Arg Gln Arg Val Arg Gln Gly Ile Gly Leu Val Ala Gly Leu Arg Val Ile Ala Asp
 Glu His Arg Gly Ile Glu Ala Leu Val Gln Leu Leu His His Ala His Arg Met Ala Ala
 Pro Ala Ala Asp Gln Ala His Ile Leu Arg Gln Val Gly Leu Gln Asp Val Ala Pro Gly
 Arg Val Cys Val Leu Asp Gln Asp Leu Leu Gly Pro Arg Arg Val Gly Ala Val Ala Arg
 Arg Gln His Phe Ala Arg His Leu Leu Ala Met Leu Gly Ile Val Gly Val Arg Leu Ala
 Arg Leu Val Pro Val Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Asp Val Gly Ala Asp Glu Asp Leu
 His Ala Thr Pro Leu Cys Lys Arg Ala Pro Leu

20

【 0 2 4 4 】

典型的な配列番号 :14は以下の配列を有する :

Met Pro Gln Gly Val Cys Ala Ala Ser Leu Arg Arg Tyr Arg Gln Arg Lys Glu Gln Tyr
 Leu Met Thr Ile His Gln Gln Ile Leu Asp Phe Tyr Thr Arg Pro Ala Gly Met Thr Ser
 Ala Gly Gln Phe Ala Pro Leu Phe Asp Ala Leu Pro Ser Asp Val Gly Glu Leu Val Arg
 Ile Ile Gln Gly Leu Gly Val Tyr Asp Leu Val Ala Ser Gly Phe Tyr Gly Phe Thr Ile
 Pro Asp Glu Arg Gln Gly Glu Ile His Leu Arg Pro Val Glu Lys Met Leu Gly Arg Leu
 Leu Ala Leu Asp Asp Arg Pro Leu Arg Val Ala Arg Pro Val Asp Arg Arg Leu Val Gly
 Arg Cys Arg His Phe Val Leu Leu Leu Val Ala Met Leu Arg Ala Lys Gly Val Pro Ala
 Arg Ala Arg Cys Gly Phe Gly Ser Tyr Phe Arg Arg Gly Phe Phe Glu Asp His Trp Val
 Cys Glu Tyr Trp Asn Ala Ala Glu Ala Arg Trp Val Leu Val Asp Pro Gln Phe Asp Glu
 Val Trp Arg Glu Thr Leu Gln Ile Asp His Asp Ile Leu Asp Val Pro Arg Asp Arg Phe
 Leu Val Ala Gly Asp Ala Trp Ala Gln Cys Arg Ala Gly Ala Ala Asp Pro Ala Lys Phe
 Glu Ile Val Phe Ala Asp Leu Ser Gly Leu Trp Phe Ile Ala Gly Asn Leu Val Arg Asp
 Val Ala Ala Leu Asn Lys Thr Glu Met Leu Pro Trp Asp Val Trp Gly Ala Gln Pro Arg
 Pro His Glu Ala Leu Asp Asp Asp Gln Leu Thr Phe Phe Asp Lys Leu Ala Ala Leu Thr
 Arg Glu Pro Asp Ala Ser Phe Ala Glu Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Gly Asp Asp Arg Leu
 Arg Val Pro Ala Thr Val Phe Asn Ala Met Arg Asn Ala Pro Glu Thr Ile Ala Gly

30

40

【 0 2 4 5 】

典型的な配列番号 :16は以下の配列を有する :

Val Asp Gln Thr Gly Ala Asn Asp Ala Leu Val Gly His Gly Arg Arg Pro Ala Ser Ala
 Gly Arg Arg Asp Arg Pro Ala Arg Arg Arg Pro Leu Gln Gly Ala Val Leu Gly Ser Gln
 Glu Arg Ala Ser Gln Arg Gln Arg His Leu Gln Gly Gly Arg Ala Gln Pro Glu Ala Arg
 Leu Leu Val Gly Leu Ala Glu His Ala Arg Ala Arg Ile Ala Gly Asp Asp Arg Ala Gln
 Pro Gly His Arg Gly His His Ala Asp Ala Asp Pro Arg Ala Val Leu Arg Arg Glu Gly
 Ala Arg Arg Pro Arg Pro Arg Leu Glu Arg Arg Pro Arg Pro Pro Gly Glu Leu Pro His
 Met Thr Pro Gly Gln Ala Val Asp Arg Ala Phe Ala Gly Leu Pro Gly Asp Pro Ala Ser

50

Leu Ala Gly Val Val Gln Gly Leu Leu Met His Glu His Ile Ala Pro Ala Tyr Gly Leu
 Thr Leu Ser Glu Ala Gln His Ala Glu Ala His Thr Arg Pro Val Glu Glu Ile Val Arg
 Gln Ile Val Ala His Asp Pro Arg Pro Leu Ala Glu Pro Arg Ala Pro Gly Glu Arg Gln
 Val Gly Asn Cys Arg His Phe Thr Leu Leu His Val Thr Met Leu Arg Arg Ala Gly Val
 Arg Ala Arg Ala Arg Cys Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Glu Pro Gly Lys Phe Leu Asp His
 Trp Val Thr Glu Tyr Trp Asn Glu Arg Arg Gln Ala Trp Val Leu Val Asp Ala Gln Leu
 Asp Ala Arg Gln Arg Glu Leu Phe Lys Ile Ala Phe Asp Pro Leu Asp Val Pro Arg Asp
 Lys Phe Leu Val Ala Gly Asp Ala Trp Gln Arg Cys Arg Ala Gly Thr Ala Asp Pro Asn
 Ala Phe Gly Ile Leu Asp Met His Gly Leu Trp Phe Val Ala Gly Asn Leu Ile Arg Asp
 Val Ala Ala Leu Asn Asp His Val Met Leu Pro Trp Asp Val Trp Gly Ala Met Thr Gln
 Asn Asp Ala Glu Leu Asp Gln Pro Phe Leu Asp Lys Leu Ala Ala Leu Thr Val Glu Pro
 Asp Arg His Phe Gly Glu Leu Arg Ala Val Tyr Gln Asp Pro Arg Val Lys Val Pro Ala
 Thr Val Phe Asn Ala Ile Arg Asn Arg Pro Glu Thr Leu

10

【0246】

アミダーゼシグナル配列：本発明はまた、シグナル配列を含むアミダーゼコード核酸を提供する。ある特徴では、本発明のシグナル配列は、新規なアミダーゼポリペプチドの検証に続いて同定される。

タンパク質が分類され細胞内のそれらの適切な分布場所に輸送される経路は、しばしばタンパク質ターゲティング経路と称される。これらターゲティング系の全てで最も重要な成分は、新規に合成されたポリペプチドのアミノ末端の短いアミノ酸配列で、シグナル配列と称される。このシグナル配列は、タンパク質を細胞内のその適切な分布場所に誘導し、輸送中に、または前記タンパク質がその最終目的地に到達したときに除去される。ほとんどのリソソームタンパク質、膜タンパク質または分泌タンパク質は、小胞体の管腔内への移動のためにそれらを特徴付けるアミノ末端シグナル配列を有する。この群のタンパク質のために100を越えるシグナル配列が決定された。シグナル配列は長さが13から36アミノ酸残基まで変動する。種々のシグナル配列認識方法が当業者に知られている。例えば、ある特徴では、新規なアミダーゼシグナルペプチドは、シグナルP (SignalP) と称される方法によって同定される。シグナルPは、シグナルペプチドとそれらの切断部位の両方を認識する一体化ニューラルネットワーク (Nielsen et al., "Identification of Prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites" . Protein Engineering, vol.10, no.1, p.1-6) を用いる。

20

30

いくつかの特徴では、本発明のアミダーゼはシグナル配列をもたないことは理解されよう。異なるアミダーゼの核酸配列に機能的に連結させたあるアミダーゼに由来するシグナル配列をコードする核酸配列を含むことを所望することができるが、また場合によっては非アミダーゼタンパク質に由来するシグナル配列を用いることもできる。

【0247】

選択的触媒としてのアミダーゼ：本発明は、立体選択的、鏡像選択的、位置選択的、および化学的選択性活性を有するアミダーゼを提供する。酵素は高度に選択的な触媒である。それらの特徴は、通常合成化学では類を見ない完璧な立体、位置および化学的選択性を有する反応を触媒する能力である。さらにまた、酵素は極めて融通性を有する。ある特徴では、本発明の酵素は、有機溶媒中で機能するように、極端なpH (例えば高pHおよび低pH)、極端な温度 (例えば高温および低温)、極端な塩分濃度 (例えば高塩分および低塩分) で作用するように、さらにそれらの天然の生理学的な基質とは構造的に無関係の化合物との反応を触媒するように仕立てられる。

40

ある特徴では、本発明の酵素は広範囲の天然または非天然の基質と反応し、したがって実質的に任意のリード有機化合物の改変を可能にする。さらにまた、伝統的触媒と異なり、これらの酵素は高度に鏡像選択的および位置選択的である。酵素によって提示される高度の官能基特異性は、新規な活性化合物をもたらす一連の合成反応で各反応の進路を追跡することを可能にする。これらの酵素はまた、自然界でのそれらの生理学的機能とは無関係の多様な多くの反応を触媒することができる。例えば、ペルオキシダーゼは過酸化

50

水素によるフェノールの酸化を触媒する。ペルオキシダーゼはまた、前記酵素の天然の機能とは無関係のヒドロキシル化反応を触媒することができる。他の例はポリペプチドの破壊を触媒するプロテアーゼである。有機溶液中では、いくつかのプロテアーゼはまた糖をアシル化することができる。アシル化は前記酵素の天然の機能とは無関係の機能である。

【0248】

本発明は、酵素の固有の触媒特性を探索する。化学的変換における生体触媒の使用（すなわち精製または粗酵素、死細胞または生細胞）は特定の出発化合物と反応する個々の生体触媒の同定を必要とするが、本発明は、多くの出発化合物に存在する官能基に特異的な選択された生体触媒および反応条件を用いる。ある特徴では、各生体触媒は1つの官能基またはいくつかの関連する官能基に特異的であり、この官能基を含む多くの出発化合物と反応することができる。

10

本発明の生体触媒反応はただ1つの出発化合物から誘導体集団を作製することができる。これらの誘導体をさらにもう1回の生体触媒反応に付して、第二の誘導体化合物集団を作製することができる。生体触媒による誘導反応を繰返す度に最初の化合物から何千もの変種を作製することができる。

【0249】

本発明の酵素は、分子の残りには影響を与えることなく出発化合物の特定の部位で反応することができる。これは伝統的な化学的方法では達成が困難なプロセスである。生体触媒のこの高度な特異性は、ライブラリー内のただ1つの活性を有する化合物を同定する手段を提供する。ライブラリーはそれを作製するために用いられた一連の生体触媒反応、いわゆる“生合成履歴”によって特徴付けられる。生物学的活性についてのライブラリーのスクリーニングおよび生合成履歴の追跡によって、活性な化合物を作製する一連の特異的な反応が同定される。前記の一連の反応を繰返し、合成された化合物の構造を決定する。この同定の仕方は、他の合成およびスクリーニング方法と異なり固定化技術を必要とせず、実質的に任意のタイプのスクリーニングアッセイにより溶液中で自由に化合物を合成および検査することができる。ある特徴では、官能基に対する酵素反応の高度な特異性によって、生体触媒反応作製ライブラリーを完成させる特異的な酵素反応の“追跡”が可能になる。

20

また別の特徴では、前記製造工程の多くがロボットによる自動化を用いて実施される。自動化によって、1日当たり何千もの生体触媒反応およびスクリーニングアッセイの実施が可能になる。これはまた、高レベルの精度および再現性を担保することができる。結果として、本発明の方法を用いて誘導化合物ライブラリーを数週間で作製することができる。分子（小分子を含む）の改変に関する更なる教示については例えばPCT/US94/09174を参照されたい。

30

【0250】

未培養生物（“環境サンプル”）：種々の特徴で、本発明は、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、または配列番号：113と少なくとも50%の配列同一性を有する単離核酸、および配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番

40

50

号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:113、または配列番号:114に示す配列と少なくとも50%の配列同一性を有するポリペプチドを提供する。ポリヌクレオチドの供給源は個々の生物(“単離株”)から、所定の培養液(“富裕培養液”)で増殖させた生物集合物から、または未培養生物(“環境サンプル”)から単離することができる。環境サンプルから新規な生物活性をコードするポリヌクレオチドを誘導する培養非依存アプローチがもっとも好ましい。なぜならば、これは生物多様性の未開拓資源へのアクセスを可能にするからである。

10

【0251】

ある特徴では、本発明は、環境サンプルから作製することができる、天然に存在する生物の集合的ゲノムを表すことができる“環境ライブラリー”からアミダーゼを単離する。これらの“環境ライブラリー”は、適切な原核細胞宿主で増殖させることができるクローニングベクターに保管することができる。ある特徴では、クローン化DNAは先ず初めに環境サンプルから直接抽出されるので、前記ライブラリーは、純粋培養で増殖させることができる原核細胞の限られた一部に限定されない。ある特徴では、これらサンプルに存在する環境DNAの標準化によって、最初のサンプルに存在する種の全てに由来するDNAをより均等に表わすことができる。このことは、サンプルのマイナーな構成成分に由来する関心のある遺伝子(優勢な種と較べて数桁過少表現される可能性がある)の発見効率を劇的に高めることができる。

20

ある特徴では、1つまたは2つ以上の未培養微生物から作製される遺伝子ライブラリーが関心のある活性についてスクリーニングされる。関心のある生物活性を有する分子をコードする潜在的経路は、先ず初めに遺伝子発現ライブラリーの形で原核細胞内に捕捉される。関心のある活性をコードするポリヌクレオチドを前記のライブラリーから単離し、宿主細胞に導入する。前記宿主細胞を、新規な活性または強化活性をもつ潜在的に活性な生体分子を作製する組換えおよび/または還元再組合せを促進する条件下で増殖させる。宿主細胞での発現は、関心のあるポリヌクレオチドを進化させるかまたは改変することによって(例えば収量を)改良することができる。

30

【0252】

前記ポリヌクレオチドを調製することができる微生物には原核微生物(例えば真正細菌および古細菌)および下等な真核微生物(例えば真菌、いくつかの藻類および原虫)が含まれる。ポリヌクレオチドは環境サンプルから単離することができる。前記の場合には、核酸は生物を培養することなく回収されるか、または1回または2回以上培養した生物から回収される。ある特徴では、前記の微生物は、極限環境細菌(extremophile)、例えば好熱細菌、好低温細菌、好冷細菌(psychrotroph)、好塩細菌、好アルカリ細菌、および好酸細菌であろう。極限環境微生物から単離された酵素をコードするポリヌクレオチドが特に好ましい。そのような酵素は、陸地の温泉および深海の熱水排出口で100を越える温度で、北極海の0より低い温度で、死海の飽和塩の環境で、石炭堆積物および硫黄の豊富な地熱温泉の0付近のpH値で、または下水ヘド口の11を越えるpH値で機能することができる。例えば、極限環境生物からクローニングし発現させたいいくつかのエステラーゼおよびリパーゼは、広範囲の温度およびpHにわたって高い活性を示す。

40

本発明のある特徴では、複雑な環境ライブラリーを高処理スクリーニング法を用いてスクリーニングし、第二アミダーゼ活性を有する新規な酵素が同定される。

【0253】

蛍光性アミダーゼ基質:

本発明の他の特徴において、商業的に入手可能な蛍光基質(例えば、CBZ-L-ALA-AMC, CBZ-L-ARG-AMC, CBZ-L-ASP-AMC, CBZ-L-LEU-AMC, CBZ-L-PHE-AMC)を第2アミダーゼの新規な基質を発見するために使用する。本発明の別の特徴において、7-(γ -D-2アミノアジ

50

ポイルアミド)-4-メチルクマリンを用いて第2アミダーゼ活性についてライブラリーをスクリーニングする。

本発明において、新規な蛍光第2アミダーゼ基質、7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンが設計され、合成され、提示される。この基質は抗生物質セファロスポリンCを7-アミノセファロスポラニン酸(7-ACA)に直接変換することの出来る第2アミダーゼ活性の発見のための、高スループット(HT)活性ベースの全細胞スクリーニングに使用するために特に設計されたものである。この基質は、蛍光レポーター、7-アミノ-4-メチルクマリンにアミド結合を介して結合された、セファロスポリンC中に見出されるD-2-アミノアジポイル側鎖を利用する。従って、この基質を切断することの出来る酵素はD-2-アミノアジポイル側鎖を認識し、セファロスポリンC中の所望の切断部位と等価な位置でこの蛍光基質を切断する可能性が高い。この基質は環境ライブラリーのHTスクリーニングに使用され、セファロスポリンCを7-ACAに変換することの出来る新規な第2アミダーゼを同定した。しかしながら、7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンはセファロスポリンCアミダーゼの発見のための基質として使用することに限定されず、この基質は第2アミダーゼ活性を有する多数の新規なヒドロラーゼを同定した。加えて、この基質はこれらの酵素のKmおよび比活性を決定するために設計されたアッセイにおいて、粗酵素または精製酵素のキネティック特性決定に有用であることが分かった。

基質、7-(-D-2アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンは、高スループットスクリーニングに適しており、通常1536穴スクリーニングおよび100,000穴GAGAMATRIX^T形式(Diversaコーポレーション、San Diego, CA)のいずれにおいても第2アミダーゼを同定するために使用された。加えて、この基質は、蛍光レポーター、7-アミノ-4-メチルクマリンを使用するので非常に感度が高い。最後に、この基質はセファロスポリンC中に見られるD-2-アミノアジポイル側鎖に特異的である。

【0254】

本発明の第2アミダーゼは本明細書に記載した方法及び基質を用いてスクリーニングすることが出来る。例えば、アミダーゼ活性はセファロスポリンCまたはヒダントインをアミダーゼ特異的基質として用いて同定することが出来る。

本明細書に記載したように選抜および単離したポリヌクレオチドは適切な宿主細胞へ導入することが出来る。適切な宿主細胞は組換えおよび/または還元的再組合せを促進することの出来る任意の細胞である。選抜したポリヌクレオチドは既に適切な制御配列を含むベクター中であってもよい。宿主細胞は哺乳動物細胞のような高等真核細胞であっても、バクテリア細胞のような原核細胞であってもよい。構築物の宿主細胞中への導入はリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって行うことが出来る(Davisら、1986)。

適切な例示的宿主には、大腸菌、ストレプトミセス、サルモネラ・ティフィムリウム(*Salmonella typhimurium*)、真菌細胞、酵母、ドロソフィラ(*Drosophila*) S2およびスポドプテラ(*Spodoptera*) Sf9のような昆虫細胞、CHO、COSまたはボーズメラノーマのような動物細胞、アデノウイルス、および植物が含まれる。適切な宿主の選択は本明細書の教示から、当業者の能力範囲内であると考えられる。

【0255】

組換えタンパク質を発現するために使用することの出来る種々の哺乳動物細胞培養系に特に言及すると、哺乳動物発現系の例には、「SV40-形質転換去る細胞は初期SV40変異株の複製を支持する」(“SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants”)(Gluzman、1981)に記載されたサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、適合ベクターを発現させることのできる他の細胞株、例えば、C127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株が含まれる。哺乳動物発現ベクターは複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、および、必要な任意のリボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシングドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、および5'フランキング非転写配列を含むであろう。SV40スプライシング部位およびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を使用して必要な非転写遺伝的要素を提供することが出来る。

関心のあるポリヌクレオチドを含む宿主細胞はプロモーターの活性化、形質転換体の選抜または遺伝子増幅のために適切な改変を加えた通常の栄養培地で培養することができる。温度、pH等の培養条件も発現について選択した宿主細胞で前に使用したものと同一であり、当業者には明らかであろう。同定した酵素活性を有するとして同定されたクローンは、次に配列決定して増強された活性を有する酵素をコードするポリヌクレオチド配列を同定することができる。

【0256】

生化学的経路の生成

別の特徴において、本発明の方法は、1以上のオペロンまたは遺伝子クラスターまたはそれらの部分から生化学的経路をコードする新規なポリヌクレオチドを生成するために使用することができる。例えば、バクテリアや多くの原核生物は関連する過程に關与する産物の遺伝子を制御するために協同した機構を有している。これらの遺伝子は「遺伝子クラスター」と称される構造として、単一の染色体上にクラスター化しており、クラスター全体の転写を開始させる単一のプロモーターを含む単一の制御配列の制御下に一緒に転写される。従って、遺伝子クラスターは（通常その機能について）同一または関連する隣接遺伝子の一群である。遺伝子クラスターによってコードされる生化学経路の例はポリケチドである。

【0257】

遺伝子クラスターDNAは、種々の生物から単離し、ベクター（特に連結した遺伝子クラスターからの検出可能なタンパク質またはタンパク質関連配列活性の生成を制御および管理できる発現制御配列を含むベクター）へ連結することができる。外来性DNA導入に対して非常に許容性の高いベクターの使用はそのような遺伝子クラスターと共に使用するために特に適切であり、ここで例示的に記載すれば、それらには大腸菌のf-因子（すなわち、稔性因子）が含まれる。この大腸菌f-因子は接合の際に自身の高頻度移行に影響するプラスミドであり、混合微生物サンプルからの遺伝子クラスターのような大きなDNA断片を達成し、その増殖を安定化させるために理想的である。特に好ましい実施態様は、「フォスミド」と呼ばれるクローニングベクターまたは、バクテリア人工染色体(BAC)ベクターを使用するものである。これらは大腸菌f-因子に由来し、ゲノムDNAの大きな断片を安定に組み込むことができる。混合未培養環境サンプルからのDNAを組み込んだ場合、このことにより大きなゲノム断片を安定な「環境DNAライブラリー」の形で達成することができる。本発明に使用する他のタイプのベクターは、コスミドベクターである。コスミドベクターは、元々はゲノムDNAの大きなベクターをクローニングし増殖させるために設計された。コスミドベクターへのクローニングはSambrookらに詳細に記載されている。Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。一旦適切なベクターに連結されたならば、異なるポリケチド合成遺伝子クラスターを含む2以上のベクターを適切な宿主細胞へ導入することができる。遺伝子クラスターによって共有される部分配列相同性の領域は配列再構成を引き起こす過程を促進し、ハイブリッド遺伝子クラスターを生じさせるであろう。次に、新規なハイブリッド遺伝子クラスターを、元の遺伝子クラスターには見られない増強された活性についてスクリーニングすることができる。

【0258】

ある特徴において、本発明は生物学的に活性なハイブリッドアミダーゼポリペプチドを作製する方法、および増強された活性についてそのようなポリペプチドをスクリーニングする方法を提供する。これらは以下によって行うことができる。

- 1) 機能的に連結された少なくとも第1のポリヌクレオチド、および、機能的に連結された少なくとも第2のポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入すること。ここで、前記少なくとも第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの部分配列相同領域を共有する。;
- 2) 適切に連結されたハイブリッドポリヌクレオチドを生じさせる配列再構成を促進する条件下で前記宿主細胞を培養すること;

10

20

30

40

50

- 3) 前記ハイブリッドポリヌクレオチドによってコードされるハイブリッドポリペプチドを発現させること；
- 4) 前記ハイブリッドポリペプチドを、増強された生物学的活性の同定を促進する条件下でスクリーニングすること；および、
- 5) 前記ハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離すること。

【0259】

種々の酵素活性をスクリーニングする方法は当業者には知られたものであり本明細書全体にわたって述べられている。そのような方法は本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドを単離するときを使用することが出来る。

【0260】**ハイブリッドアミダーゼ、抗体及びペプチドライブラリー**

一つの特徴において、本発明は、ハイブリッドアミダーゼ、抗体および本発明の配列を含むペプチドライブラリーを含む融合タンパク質を提供する。本発明のペプチドライブラリーは、アミダーゼ基質、レセプター、酵素のような、標的の調節因子（例えば、活性化因子または阻害因子）を単離するために使用することが出来る。本発明のペプチドライブラリーは、リガンド、例えばサイトカイン、ホルモンその他のような、標的の正式な結合パートナーを同定するために使用することが出来る。

一つの特徴において、本発明の融合タンパク質（例えばペプチド部分）は（直線状ペプチドに比べて）立体配置的に安定化され、標的に対してより高い結合アフィニティーが可能となる。本発明は、本発明のアミダーゼおよび抗体および既知のおよびランダムペプチドを含む他のペプチドとの融合タンパク質を提供する。これらは、アミダーゼの構造が有意に攪乱されず、ペプチドが代謝的または構造的立体配座的に安定化されるような様式で融合することができる。このことにより、細胞内の存在および量の両方について容易に監視できるペプチドライブラリーの生成が可能となる。

【0261】

本発明のアミノ酸配列変種は、変動の所定の性質によって特徴付けることができる。その性質とは、それらの変種を天然に存在する形態とは違うものとする特徴、例えばアミダーゼ配列のアレル変異または種間変異である。ある特徴において、本発明の変種は天然に存在する類似物と同じ定性的生物学的活性を示す。あるいは、変種は改変された特徴を有することについて選抜することが出来る。ある側面において、アミノ酸配列変異を導入する部位または領域が予め決定されていても、変異自体は予め決定される必要はない。たとえば、ある部位における変異の操作を最適化するために、ランダム変異導入を標的コドンまたは領域に起こさせて、発現された変種を所望の活性の最適な組合せについてスクリーニングしてもよい。既知の配列を有するDNAの所定の部位において置換変異を起こすための技術はよく知られたものであり、本明細書に記載したように例えばM13プライマー変異導入およびPCR変異導入がある。変異体のスクリーニングはタンパク質分解活性のアッセイを用いて行うことが出来る。別の側面において、アミノ酸置換は単一残基であってよく、挿入は約1~20アミノ酸のオーダーであってよいが、かなり大きな挿入を行ってもよい。欠失は約1~約30、40、50、60、70残基またはそれ以上であってよい。最適な特性を有する最終誘導体を得るために、置換、欠失、挿入またはこれらのいずれかの組合せを利用することが出来る。一般に、これらの変化は分子の改変を最小にするためにいくつかのアミノ酸上で行われる。しかしながら、ある状況では大きな変更も寛容されることがある。

【0262】

本発明は、ポリペプチド骨格、二次または三次構造、例えば α -ヘリックスまたは β -シート構造が改変されたアミダーゼまたは抗体を提供する。ある特徴において、電荷または疎水性が改変される。ある特徴においては、側鎖の嵩が改変される。保存性の低い置換を選択することにより機能または免疫学的実体の本質的な変化が引き起こされる。例えば、以下に対してより有意に影響する置換を起こすことが出来る：改変領域におけるポリペプチド骨格の構造（例えば α -ヘリックス構造、 β -シート構造）、分子の電荷または疎水性部位（活性部位であってよい）、または側鎖。本発明は、本発明のポリペプチドにおけ

10

20

30

40

50

る置換を提供する。その置換においては、(a)親水性残基、例えばセリルまたはスレオニルが疎水性残基、例えばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルで置換され、またはその逆(b)システインまたはプロリンが他の残基に置換され、またはその逆、(c)陽電荷側鎖を有する残基、例えばリジル、アルギニル、またはヒスチジルが陰電荷残基、例えばグルタミルまたはアスパルチルに置換され、またはその逆、または(d)嵩の多い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンが側鎖を持たない残基、例えばグリシンに置換され、またはその逆の置換がなされる。変種は、同じ定性的生物学的活性(すなわちアミダーゼ活性)を示すことも出来るが、変種は必要に応じてアミダーゼの特性を改変するために選抜することができる。

【0263】

一つの特徴において、本発明のアミダーゼおよび抗体はエピトープまたは精製タグ、シグナル配列または他の融合配列等を含む。一つの特徴において、本発明のアミダーゼおよび抗体はランダムペプチドと融合させて融合ポリペプチドを形成させることができる。本明細書において「融合した」または「機能的に連結した」とはランダムペプチド及びアミダーゼが、アミダーゼ構造の安定性の破壊を最小とするような様式で(例えば、それがアミダーゼ活性を保持する)一緒に結合されていることを意味する。融合ポリペプチド(または融合ポリペプチドをコードする融合ポリヌクレオチド)は更にマルチループにおけるマルチペプチドを含む他の構成要素を含むことが出来る。

一つの特徴において、本ペプチドおよびそれらをコードする核酸は、例えばヌクレオチド/残基頻度において一般にまたは位置毎に、完全にランダム化されるかそのランダム化に偏向があるかを問わず、ランダム化される。“ランダム化”とは、各核酸およびペプチドがそれぞれ本質的にランダムなヌクレオチドおよびアミノ酸からなることを意味する。ある特徴において、ペプチドを生じさせる核酸は化学的に合成することができ、従っていかなるヌクレオチドも任意の位置に取り込むことが出来る。従って、核酸が発現されてペプチドが形成される場合、どのようなアミノ酸も任意の位置に取り込むことが出来る。合成過程はランダム化された核酸を生成するように設計することができ、それによりその核酸の長さ全体にわたって全てのまたは大部分の可能な組合せを形成することができ、従ってランダム化核酸のライブラリーを形成することが出来る。このライブラリーはランダム化発現産物の十分に構造的に多様な集団を提供することができ、所望の応答を示す1以上の細胞を提供するために十分な細胞応答の範囲に影響を与える蓋然性が高い。従って、本発明は十分に大きな相互作用ライブラリーを提供し、少なくともそのメンバーの一つはある分子、タンパク質または他の因子に対してアフィニティーを与える構造を有するであろう。

【0264】

スクリーニング方法論および「オンライン」モニター装置

本発明の方法の実施において、種々の装置及び方法論を本発明のポリペプチド及び核酸と組み合わせて、例えばアミダーゼまたは抗体活性についてポリペプチドをスクリーニングするため、アミダーゼ活性の潜在的な調節因子(例えば活性化因子または阻害因子)として化合物をスクリーニングするため、本発明のポリペプチドに結合する抗体をスクリーニングするため、本発明の核酸にハイブリダイズする核酸をスクリーニングするため、本発明のポリペプチドを発現する細胞をスクリーニングするために等に使用することが出来る。

【0265】

キャピラリーアレイ

GIGAMATRIXTM (Diversa Corporation, San Diego, CA)のようなキャピラリーアレイを本発明の方法に使用することが出来る。本発明の核酸またはポリペプチドはキャピラリーアレイを含むアレイに固定化または塗布することができる。アレイは組成物(例えば、小分子、抗体、核酸その他)のライブラリーを本発明の核酸またはポリペプチドに結合するまたは調節する能力についてスクリーニングまたはモニタリングするために使用することが出来る。キャピラリーアレイはサンプルを支持およびスクリーニングするための別の系

10

20

30

40

50

を提供する。例えば、サンプルスクリーニング装置は隣接キャピラリーのアレイとして形成された複数のキャピラリーを含むことができ、各キャピラリーはサンプルを保持するための少なくとも一つの管腔を規定する。この装置はさらにアレイ中の隣接キャピラリー間に置かれた間質材料、および、その間質材料内に形成された一以上のリファレンス指標を含むことができる。サンプルをスクリーニングするためのキャピラリーは、キャピラリーのアレイとして結合させるために適合されており、サンプルを保持するための管腔を規定する第1の壁および、サンプルを励起するために管腔に供給される励起エネルギーを透過させるためのフィルター材料で形成された第2の壁を有することができる。ポリペプチドまたは核酸、例えば、リガンドはキャピラリーアレイのキャピラリーの少なくとも一部へ第1の成分へ導入することができる。キャピラリーアレイの各キャピラリーは第1の成分を保持するための管腔を規定する少なくとも一つの壁を有する。キャピラリー中の第1の成分の後ろに気泡を導入することができる。このキャピラリーに第2の成分を導入することができ、この第2の成分は気泡によって第1の成分と分離される。

10

【0266】

関心のあるサンプルは検出可能な粒子で標識した第1の液体としてキャピラリーまたはキャピラリーアレイに導入することができ、キャピラリーアレイの各キャピラリーは第1の液体および検出可能粒子を保持するための管腔を規定する少なくとも第1の壁を含み、前記少なくとも第1の壁は前記検出可能粒子を前記少なくとも一つの壁へ結合させるための結合材料で被覆されている。本方法は、前記第1の液体をキャピラリー管から除去すること、ここで結合した検出可能粒子はキャピラリー内に維持され、および、前記キャピラリー管に第2の液体を導入することを更に含むことができる。キャピラリーアレイは、管腔を規定する少なくとも一つの外壁を含む複数の個々のキャピラリーを含むことができる。キャピラリーの外壁は互いに融合した一つ以上の壁であってもよい。同様に、壁は円筒状、四角形、六角形または、壁が液体又はサンプルを保持するための管腔を形成する限り他のどのような幾何学的形状の管腔を規定することもできる。キャピラリーアレイのキャピラリーは密接に保持されて平面構造を形成することも出来る。キャピラリーは融合（キャピラリーがガラス製の場合）、糊付け、結合、または並べて留めることにより一緒に結合させることができる。キャピラリーアレイはどのような数の（例えば100~4,000,000の範囲）個々のキャピラリーからも形成することができる。キャピラリーアレイは互いに結合された約100,000以上の個々のキャピラリーを有するマイクロタイタープレートを形成することが出来る。

20

30

【0267】

アレイ、または“バイオチップ”

本発明の核酸またはポリペプチドはアレイに固定化または塗布することが出来る。アレイは組成物（例えば、小分子、抗体、核酸その他）のライブラリーを本発明の核酸またはポリペプチドに結合するまたは調節する能力についてスクリーニングまたはモニタリングするために使用することができる。例えば、本発明の一側面において、モニターされるパラメータはアミダーゼ遺伝子の転写発現である。細胞の一以上、または、全ての転写物を、細胞の転写物、または細胞の転写物若しくはその相補物を表す核酸を含むサンプルのアレイまたは“バイオチップ”上の固定化核酸へハイブリダイゼーションすることによって測定することができる。マイクロチップ上の核酸の“アレイ”を用いることにより、細胞の幾つかの若しくは全ての転写物を同時に定量することができる。あるいは、ゲノム核酸を含むアレイは本発明の方法によって作製された新たに操作された株のゲノム型を決定するためにも使用することが出来る。“ポリペプチドアレイ”も複数のタンパク質を同時に定量するために使用することが出来る。本発明はどのような既知の“アレイ”（“マイクロアレイ”または“核酸アレイ”または“ポリペプチドアレイ”または“抗体アレイ”または“バイオチップ”とも呼ばれる）またはそれらの変形物によっても実施することができる。アレイは一般には複数の“スポット”または“標的要素”であり、各標的要素はサンプル分子、例えばmRNA転写物、への特異的結合のために基材表面の規定された領域上に固定化された所定量の生物学的分子、例えばオリゴヌクレオチドを含む。

40

50

【0268】

本発明の実施において、どのような既知のアレイおよび/またはアレイを作製し使用する方法も全体として、または部分的に、あるいはその変形として取り込むことが出来、それらは例えば、米国特許第6,277,628号；第6,277,489号；第6,261,776号；第6,258,606号；第6,054,270号；第6,048,695号；第6,045,996号；第6,022,963号；第6,013,440号；第5,965,452号；第5,959,098号；第5,856,174号；第5,830,645号；第5,770,456号；第5,632,957号；第5,556,752号；第5,143,854号；第5,807,522号；第5,800,992号；第5,744,305号；第5,700,637号；第5,556,752号；第5,434,049号に記載されている。また、WO 99/51773；WO 99/09217；WO 97/46313；WO 96/17958も参照されたし；また例えば、Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-R174；Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092；Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124；Solinas-Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407；Bowtell (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:25-32も参照されたし。また、公開された米国特許出願、第20010018642号；第20010019827号；第20010016322号；第2001014449号；第20010014448号；第20010012537号；第20010008765号も参照されたし。

10

【0269】

抗体および抗体ベースのスクリーニング方法

本発明は本発明のアミダーゼに特異的に結合する単離抗体または組換え抗体を提供する。これらの抗体は、本発明のアミダーゼまたは関連ペプチドを単離、同定、または定量するために使用することが出来る。これらの抗体は本発明の範囲内にある他のポリペプチドまたは他の関連アミダーゼを単離するために使用することが出来る。これらの抗体はアミダーゼの活性部位に結合するように設計することが出来る。従って、本発明は本発明の抗体を用いてアミダーゼを阻害する方法を提供する。

20

本抗体は免疫沈降、染色、免疫アフィニティークラム、その他に使用することが出来る。所望であれば、特定の抗原をコードする核酸配列を、免疫感作および続くポリペプチドまたは核酸の単離、増幅またはクローニング、および本発明のアレイ上へのポリペプチドの固定化によって生成することが出来る。あるいは、本発明の方法は改変すべき細胞によって生成される抗体の構造を改変するために使用することが出来る。例えば、抗体のアフィニティを増加または減少させることが出来る。さらに、抗体を産生または改変する能力は本発明の方法によって操作される表現型であり得る。

【0270】

免疫感作、抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）の作製及び単離方法は当業者には知られたものであり、科学文献および特許文献に記載されている。例えば、以下を参照されたし：Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY (1991)；Stites (eds.) *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA (“Stites”)；Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (2d ed.) Academic Press, New York, NY (1986)；Kohler (1975) *Nature* 256:495；Harlow (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publications, New York。抗体はまた、動物を用いた伝統的な *in vivo* 方法に加えて、*in vitro* で、例えば組換え抗体結合部位発現ファージディスプレイライブラリーを用いて作製することが出来る。例えば、Hoogenboom (1997) *Trends Biotechnol.* 15:62-70；Katz (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45を参照されたし。

30

40

ポリペプチドまたはペプチドを用いて本発明のポリペプチド、例えばアミダーゼに特異的に結合する抗体を作製することが出来る。得られた抗体は免疫アフィニティークロマトグラフィー法に使用してポリペプチド単離又は生成する、または、そのポリペプチドが生物学的サンプル中に存在するかどうかを決定することができる。そのような方法において、抽出物のようなタンパク質調製物または生物学的サンプルが、本発明のポリペプチドの一つに特異的に結合することのできる抗体と接触される。

【0271】

免疫アフィニティークラムにおいて、抗体はビーズまたは他のカラムマトリックスのような固体支持体に接着される。タンパク質調製物は、抗体が本発明のポリペプチドの一つに特

50

異的に結合することのできる条件下で抗体と接触される。非特異的に結合したタンパク質を除去するための洗浄後、特異的に結合したポリペプチドが溶出される。

生物学的サンプル中のタンパク質が抗体に結合する能力は当業者にはよく知られた任意の種々の手順をもちいて決定することができる。例えば、結合は抗体を蛍光剤、酵素標識または放射性同位体のような検出可能標識で標識することによって測定することが出来る。あるいは、サンプルへの抗体の結合はそのような標識を有する二次抗体を用いて検出することが出来る。具体的なアッセイには、ELISA、サンドイッチアッセイ、ラジオイムノアッセイおよびウェスタンブロットが含まれる。

本発明のポリペプチドに対して生成されるポリクローナル抗体は、このポリペプチドを直接動物に注射するか、このポリペプチドを非ヒト動物に投与することによって得ることが出来る。そのようにして得られた抗体は、次にそのポリペプチド自体に結合するであろう。このようにして、ポリペプチドの断片のみをコードする配列さえも未変性のポリペプチド全体に結合するであろう抗体を作製するために使用することが出来る。そのような抗体は、次にこのポリペプチドを発現する細胞からそのポリペプチドを単離するために使用することが出来る。

10

【0272】

モノクローナル抗体の調製のためには、連続細胞株培養によって生成される抗体を提供するどのような方法を使用することも出来る。その例には、ハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞技術および、EBV-ハイブリドーマ技術 (Cole (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照されたし) が

20

含まれる。
一本鎖抗体を作製するために記載された技術 (例えば、米国特許第4,946,778号を参照されたし) は本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を作製するために適合させることが出来る。あるいは、トランスジェニックマウスを用いてこれらのポリペプチドまたはその断片に対するヒト化抗体を発現させることが出来る。

本発明のポリペプチドに対して生成される抗体は他の生物およびサンプルからの類似のポリペプチド (例えばアミダーゼ) のスクリーニングに使用することが出来る。そのような技術においては、その生物からのポリペプチドを抗体と接触させ、その抗体に特異的に結合するポリペプチドが検出される。上述の方法のいずれも抗体結合を検出するために使用することが出来る。

30

【0273】

キット

本発明は、本発明の核酸、発現カセット、ベクター、細胞、トランスジェニック種子または植物または植物部分、ポリペプチド (例えばアミダーゼ) および/または抗体のような構成物を含むキットを提供する。本キットはまた、本明細書に記載したような、方法論および本発明の工業的使用を教示する説明資料を含むことが出来る。例えば、本キットは、本発明の酵素を用いた、食品 (例えば、酵素熟成チーズ) の風味を増加させる、殺菌および殺真菌の促進、ファインケミカル中間体の脱保護、ペプチド結合の合成、キラル分離の実施、セファロsporin Cの加水分解用であってよい。

【0274】

代謝パラメータの測定

本発明の方法は、細胞の遺伝的構成を改変することによる、新規な表現型、例えば、新規な若しくは改変されたアミダーゼ活性、を有する新規な細胞株を発生させるための、細胞の全細胞進化または全細胞操作を提供する。遺伝的構成は本発明の核酸を細胞に追加することによって改変することが出来る。新規な表現型を検出するために、改変細胞の少なくとも一つの代謝パラメータを細胞において“即時的”または“オンライン”時間枠でモニターする。ある特徴において、複数の代謝パラメータが“即時的”または“オンライン”でモニターされる。代謝パラメータは本発明のアミダーゼを用いてモニターすることが出来る。

40

代謝フラックス分析 (MFA) は既知の生化学的枠組みに基づいている。線形独立な代謝行

50

列が細胞内代謝物に関する質量保存則および擬似定常状態仮説(PSSH)に基づいて構築される。本発明の方法の実施において、以下を含む代謝ネットワークが確立される：

- ・全ての経路の基質、生成物および中間代謝物の実体
- ・経路代謝物を相互転換する全ての化学反応の実体、その経路反応の化学量論
- ・反応を触媒する全ての酵素の実体、酵素反応キネティクス
- ・経路構成物間の制御的相互作用、例えば、アロステリック相互作用、酵素 - 酵素相互作用等
- ・酵素の細胞内画分化または酵素の他の一切の超分子的構成
- ・代謝物、酵素またはエフェクター分子の一切の濃度勾配、またはそれらの移行に対する核酸障壁の存在

10

【0275】

任意の株について代謝ネットワークが構築されると、オンライン代謝データが入手できるならば、行列による数学的提示を用いて細胞内代謝フラックスを評価することができる。代謝表現型は細胞内の代謝ネットワーク全体の変化に依存する。代謝表現型は環境条件、遺伝的制御、発生段階およびゲノム型等応じた経路利用の変化に依存する。本発明の一つの特徴において、オンラインMFA計算後、細胞の動的挙動、細胞の表現型および他の特性を、経路利用を調べることによって解析することが出来る。例えば、酵母発酵の際にグルコース供給が増加し、酸素が減少したならば、呼吸経路の利用は低下および/または停止し、醗酵経路の利用が支配的になるであろう。経路解析の後では細胞培養物の生理学的状態の制御が可能となるであろう。本発明の方法は、基質供給、温度、誘導物質の使用その他をどのように変化させて細胞の生理状態を所望の方向へ制御するかを決定することによって、醗酵をどのように操作するかを決定する助けとなり得る。本発明の実施において、MFAの結果はトランスクリプトソームおよびプロテオームデータと比較することができ、それにより代謝操作または遺伝子シャッフリング等のための実験およびプロトコルを設計することができる。

20

本発明の実施において、細胞において、新規な若しくは改良された特性を含む、どのような改変されたまたは新規は表現型も付与し検出することが出来る。

【0276】

mRNA転写物の発現のモニタリング

本発明の一つの特徴において、操作された表現型は細胞におけるmRNA転写物（例えば、アミダーゼメッセンジャー）の発現の増加または減少、または新たな（例えばアミダーゼ）転写物の生成を含む。この増加または低下した発現は本発明のアミダーゼの存在をテストすることにより、またはアミダーゼ活性アッセイにより追跡することが出来る。mRNA転写物、すなわちメッセンジャー、はまた、ノーザンブロット、定量的増幅反応、アレイへのハイブリダイゼーション等の、この分野で知られたいかなる方法によっても検出および定量することが出来る。定量的増幅反応には、例えば、定量的PCR、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、すなわちRT-PCR；定量的リアルタイムRT-PCR、または“リアルタイムキネティックRT-PCR”が含まれる（例えば、Kreuzer (2001) Br. J. Haematol. 114:313-318; Xia (2001) Transplantation 72:907-914を参照されたし）。本発明の一つの側面において、操作された表現型は同種遺伝子の発現をロックアウトすることによって生成することが出来る。遺伝子のコード配列または一以上の転写制御要素、例えばプロモーターまたはエンハンサー、をロックアウトすることができる。このように転写物の発現は完全に除去または単に低下させることが出来る。

30

40

本発明の一つの特徴において、操作された表現型は同種遺伝子の発現の増加を含む。これはcis-またはtrans-に作用する転写制御要素を含む負の制御要素をロックアウトする、または正の制御要素を変異させることによって行うことができる。細胞の1以上の、または全ての転写物を、細胞の転写物、または細胞の転写物またはその相補物を表す核酸を含むサンプルのアレイ上の固定化核酸へのハイブリダイゼーションによって、測定することができる。

【0277】

50

ポリペプチド、ペプチドおよびアミノ酸の発現のモニタリング

本発明の一つの特徴において、操作された表現型は、細胞におけるポリペプチド（例えばアミダーゼ）の発現の増加または減少、または新規なポリペプチドの生成を含む。この増加または減少した発現は、存在するアミダーゼの量を決定するまたはアミダーゼ活性アッセイにより追跡することが出来る。ポリペプチド、ペプチドおよびアミノ酸はまた、各磁気共鳴(NMR)、分光測光法、ラジオグラフィ（タンパク質放射標識）、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、超拡散クロマトグラフィー、種々の免疫学的方法、例えば、免疫沈降、免疫拡散、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫固相アッセイ(ELISA)、免疫蛍光アッセイ、ゲル電気泳動（例えばSDS-PAGE）、抗体による染色、蛍光活性化セルソーター(FACS)、ピロリシス質量分光計、フーリエ変換赤外分光法、ラマン分光法、GC-MSおよびLC-エレクトロスプレーおよびキャップ-LC-タンデム-エレクトロスプレー質量分光法その他を含む、この分野で既知のどのような方法によっても検出および定量することが出来る。新規な生物活性はまた、米国特許第6,057,103号に記載された方法またはその変法によってもスクリーニングすることが出来る。さらに、上述したように、細胞の1以上のポリペプチド、または細胞の全てのポリペプチドをタンパク質アレイを用いて測定することが出来る。

10

【0278】

工業的食品加工および製薬的応用

本発明の酵素は種々の工業用途、食品加工および製薬用途、例えば、食品（例えば、酵素熟成チーズ）の風味を増加させるため、殺菌および殺真菌を促進するため、ファインケミカル中間体を改変および/または脱保護するため、ペプチド結合を合成するため、キラル分離を行うため、および/または、アミド含有薬剤、例えば、セファロsporin Cのような抗生物質を加水分解するために使用することができる。本発明の酵素は、第2アミダーゼ活性を有することができ、例えば、それはアミドの加水分解を触媒することができる。本発明のポリペプチドはペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を有するタンパク質を含む。一つの特徴において、本発明のアミダーゼはペプチドアミドのC-末端上の遊離アミノ基の選択的加水分解除去を触媒することが出来るが、ペプチド結合を切断しない。一つの特徴において、本発明のアミダーゼはペプチドアミドのC-末端位置の遊離アミノ基の選択的加水分解除去を触媒することができる。

20

30

【0279】

鏡像体 - 選択的処理

本発明の組成物および方法は光学的に活性な化合物のラセミ混合物の分離のために使用することができ、キラルアミドの立体化学的精製を含む。一つの特徴において、本発明の酵素は、アミノ酸誘導体のL体に対して選択的、すなわち“天然の”鏡像異性体に対して選択的である。一つの特徴において、それらは光学的に活性な化合物の製造のために有用である。それらの反応は、化学的により反応性のエステル基の存在下で行うことが出来る。

本発明の組成物および方法は、水に溶けにくいまたは生成物 - 阻害反応によって生成される化合物の酵素的分離及びキラル合成に使用することが出来る。本発明によって処理できるラセミ混合物には、キラルアミドの異性体および他の化合物の混合物が含まれる。キラル前駆体はアミノニトリル化合物を含む有用なキラル生成物に生物変換することができ、それらは立体選択的にアミノ酸（例えばD-アミノ酸およびメチルドーパ）およびアミノアミドのような有用な産物へ変換することが出来る。

40

一つの特徴において、本発明のアミダーゼは鏡像異性的に純粋なL-アミノ酸をN-保護アミノ酸アミドのラセミ混合物から生成するために使用される。一つの特徴において、N-保護アミノ酸アミドのラセミ混合物はペプチドアミダーゼと共にインキュベーションされる。N-保護L-アミノ酸アミドの完全な転換まで反応させる。一つの特徴において、N-保護L-アミノ酸は電荷の相違に基づいてN-保護D-アミノ酸アミドから分離される。

【0280】

50

一つの特徴において、本発明のアミダーゼは例えば、N-アセチル-ネオペンチルグリシンアミド、N-アセチル-ナフチルアラニンアミド、N-アセチルフェニルグリシンアミドまたは類似の誘導体のようなN-保護ラセミアミノ酸アミドを用いて、非タンパク質性D-アミノ酸を得るために使用される。一つの特徴において、N-アセチル-L-アミノ酸アミドは酵素的に加水分解され、N-アセチル-D-アミノ酸アミドはクロマトグラフィーによって反応混合物から分離され、酸加水分解によって遊離のD-アミノ酸へ変換される。

一つの特徴において、本発明のアミダーゼは、アミノ酸アミドを有するアミノ酸アルキルエステル（場合によりN-保護アミノ酸アルキルエステル）またはペプチドアルキルエステル（場合によりN-保護ペプチドアルキルエステル）を、水性相または水性-有機環境において酵素的に変換することによってペプチドを製造するために使用される。一つの特徴において、この酵素はペプチド性結合およびアミド保護基の酵素的開裂を触媒する。合成は連続様式で生じさせることが出来る。ペプチドアミドはペプチドアミダーゼにより酵素的にペプチドへ加水分解することが出来る。一つの特徴において、ペプチドはその電荷により反応混合物から分離することが出来る。本発明のアミダーゼは、例えば、米国特許第4,800,162号に記載されたような、どのような鏡像異性選択的処理法と共に用いることが出来る。

10

【0281】

製薬用途

本発明のアミダーゼは製薬用途に使用することができ、たとえば、セファロsporin Cを7-アミノセファロsporin酸またはその対応する誘導体に加水分解するなどの、薬剤を処理するために使用することができる。本発明の酵素は7-アミノセファロsporin酸（7-ACA）およびセファロチン、セファロリジンおよびセフロキシムを含む半合成セファロsporin抗生物質を生成するために使用することができる。本発明は、本発明のポリペプチドを含む薬剤および医薬品を提供する。

20

一つの側面において、本発明は、セファロsporin Cまたはその誘導体を7-アミノセファロsporin酸またはその対応する誘導体へ段階変換するための（本発明のポリペプチドを用いた）酵素処理を提供する。この方法はいかなる製薬的方法、たとえば米国特許第6,297,032号に記載されたような方法、をも含むことができる。

【0282】

食品加工

ペプチダーゼ、プロテアーゼおよび/またはヒダントイナーゼ活性を含む本発明のポリペプチドは食品加工のいかなる局面においても使用することができる。たとえば、本発明の酵素は、バクテリアの増殖速度、酸産生および生存のような、バクテリアの発酵特性に影響を与えることができる。このように、本発明の酵素は乳製品の風味、機能および構造に影響を与えることができ、また増殖速度、酸産生および生存のようなバクテリアの発酵特性に影響を与えることもできる。本発明の酵素は細胞壁ヒドロラーゼとして使用することもできる。

30

本発明のポリペプチドはチーズの熟成処理に使用することができる。本発明のポリペプチドはミルクカゼインの加水分解に使用することができる。ペプチダーゼはチーズ熟成およびチーズの風味発達の過程に重要な酵素である。チーズ中のミルクカゼインの加水分解は構造の変化とチーズの風味の発生を生じさせる。タンパク質加水分解酵素は開始培養物に添加することもでき、チーズ熟成過程のどの段階で添加することもできる。一つの特徴において、チーズ熟成に使用される本発明のポリペプチドはN-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ活性を有する。本発明のアミダーゼは、N-アセチルムラミダーゼ、ムラミダーゼ、およびN-アセチルグルコサミニダーゼを含む、ムラミダーゼ、リゾチームと併せて使用することができる。本発明のアミダーゼは、米国特許第6,476,209号に記載されたように、どのような食品加工法とともに使用することもできる。

40

【0283】

殺菌および殺真菌

本発明のアミダーゼは殺菌および殺真菌を促進するために使用することができる。本発

50

明の酵素は細胞壁ヒドラーゼとして使用することができる。本発明のアミダーゼは、微生物コンタミネーションを抑制および防止する手段として、標品の酵素的汚染除去のための方法に使用することができる。本発明の方法は本発明の1以上のアミダーゼ、または他の溶解酵素を使用して汚染微生物（たとえばグラム陰性微生物）の生存性または構造的堅牢さを損傷する。本発明のアミダーゼおよび方法は殺菌および殺真菌を促進するため、たとえば、殺菌剤、殺真菌剤としてサンプル、固体の表面または液体に使用することができる。本発明の組成物および方法は単独で使用することも、抗生物質を含む微生物汚染除去を容易にするための他の薬剤とともに使用することもできる。本発明のアミダーゼは、たとえば米国特許第5,985,593号、第5,369,016号；第5,955,258号に記載されるような、いかなる抗微生物方法、製品または装置（たとえば、殺菌剤、殺真菌剤）とともに使用することもできる。

10

【0284】

本発明のアミダーゼはまた消費製品または食品の保存期間を改良するために使用することができる。本発明の酵素は、有害なバクテリアまたは病原性バクテリアの増殖が阻害されるまたはそれらの生存性を強く低下させる量で食品または消費製品に取り込まれる。従って、本発明は、本発明のアミダーゼを含む消費製品および食品を提供する。本発明の消費製品および食品には、食べられる製品、化粧品、布、堅い表面、ヒトの皮膚用の洗浄用製品等が含まれる。本発明の食品および消費製品にはパンおよびパン添加物、バター、マーガリン、バターの低カロリー代用品、チーズ、ドレッシング、マヨネーズ様製品、肉製品、ペプチド含有食品成分、シャンプー、クリームまたはローション、たとえば、人の皮膚処理用のもの、セッケンおよびセッケン代用品、洗浄粉末または液体、および/または食品製造機器および台所用品の洗浄用製品が含まれる。

20

【0285】

小分子の改変

本発明は、本発明のアミダーゼを用いた、小分子の改変方法を提供する。一つの特徴において、本発明は本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド（酵素的に活性なその断片を含む）を小分子と接触させて改変小分子を生成することを含む。小分子のライブラリーをテストして、所望の活性を示す改変小分子がライブラリー中に存在するかどうかを決定する。ライブラリーの部分を作成するために使用した個々の生物触媒反応を系統的に排除し、ライブラリーの部分に生成された小分子を所望の活性を有する改変小分子が存在するかまたは存在しないかについてテストすることによって、所望の活性の改変小分子を生成する特定の生物触媒反応を同定する。所望の活性を有する改変小分子を生成する特定の生物触媒反応は場合によって繰り返される。生物触媒反応は、小分子の構造中に見られる個別の構造的部分と反応する一群の生物触媒を用いて行われ、各生物触媒は構造的部分または関連する構造的部分の基の一つに特異的なものである。また、各生物触媒はこの個別の構造的部分を含む多くの異なる小分子と反応する。

30

【0286】

実施例

本発明は以下の実施例を参照して更に説明されるが、本発明はそれらの実施例に限定されずと解してはならない。

40

【0287】

実施例1：新規な蛍光基質の合成

蛍光アミダーゼ基質、7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリン（図7、構造“1”）を二段階合成反応で調製した（図5）。7-アミノ-4-メチルクマリン（350mg、2.0mmol）、N-Boc-D-2-アミノアジピン酸（523mg、2.0mmol）およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾール（270mg、2.0mmol）を2.5mLのジメチルホルムアミドに溶解した。ジイソプロピルカルボジイミド（313 μ L、2.0mmol）を添加し、混合物を室温で24時間攪拌した。続いてこれをろ過してジイソプロピルウレア副生成物を除去し、減圧下で濃縮した。残留物を15mLの酢酸エチルに再溶解し4で1時間静置した。形成された沈殿物（ただ1種の位置異性体から成る）をろ過し、酢酸エチルで洗浄し、減圧下で乾燥させて440mg（53

50

%) のオフホワイトの固体を得た。生成物を0.1%のトリエチルシランを含有する6mLのジクロロメタン：トリフルオロ酢酸(1:1)に溶解し、減圧下で濃縮する前に30分静置した。残留物を2mLの水に溶解し、さらに注意深く飽和重炭酸ナトリウム水溶液を添加してpH7.5から8.0に中和した。形成された沈殿物をろ過し、5mLの水で2回洗浄し、続いて10mLの酢酸エチルで4回洗浄し、減圧下で乾燥させた。オフホワイトの粉末(308mg、92%)を得た。プロトン、¹³CNMRおよびエレクトロスプレー質量分析により、生成物の構造を構造1に割り当てた。前記のレジオケミストリーはHMBC分析によって確認した。

【0288】

実施例2：環境ライブラリースクリーニングの実施

基質、7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンおよび市販の蛍光基質を高スループット均質アッセイで用いて、環境ライブラリーコレクション(Diversa Corporation, San Diego, CA)をスクリーニングした。前記基質を用いて全細胞または溶解細胞を含むプラスミドまたはファージライブラリーをスクリーニングすることができる。アミド結合の切断時に蛍光が生成され、蛍光シグナルの発生または強化に二次試薬が要求されないため、キネティックアッセイに前記基質を用いることができる。さらにまた、この基質は粗溶解物または精製調製物に存在する酵素の定量的キネティック特性を決定するために用いることができる。

10

7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリン基質を利用する典型的な液相スクリーニングは以下のように実施されるであろう：

スクリーニングされるべき組換えライブラリーを適切な発現宿主細胞(例えば大腸菌)に導入する。ライブラリークローンを含む細胞を、7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを含む増殖培養液で希釈し(10-100 μ M)、384ウェルまたは1536ウェルまたは100,000ウェルのスクリーニング様式で各ウェル当たり1-10クロンのクローン密度を作製する。前記スクリーニングプレート(25-37)に置いてタンパク質の発現および基質のターンオーバーを可能にする。これらのクローンによってコードされる組換えタンパク質の発現は構成的で、したがってタンパク質の発現に第二の添加または増殖条件の変化を必要としない。タンパク質発現時の基質の存在はキネティック測定の実施を可能にする。これは、時間の経過にしたがって基質から生じる遊離蛍光を蛍光プレート読取装置で読み取ることによって達成される(360nmで励起、465nmで放射)。この基質は全細胞アッセイに用いることができるので、細胞内酵素に基質をアクセスさせるために溶解工程の提供は要求されない。陽性クローンは、スクリーニングプレートのウェルから直接回収しさらに処理することができる。

20

30

結果：上記に概略した液体スクリーニングプロトコルを用いて、7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンに対する活性を有する8つの新規な第二アミダーゼを発見した。これら第二アミダーゼおよびそれらの対応する核酸配列は表1に示されている。これらクローンの推定されるアミノ酸配列の分析によって、それらは一次配列レベルで相関性を有することが示された(図6参照)。

【0289】

実施例3：改変/変更

液相アッセイで7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを使用する他に、この基質をザイモグラムにもまた用いた。この用途では、第二アミダーゼ活性を含有する粗溶解物を非変性ポリアクリルアミドゲルで分画する。続いてこのゲルを7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを含む緩衝液に浸す。ゲル中の第二アミダーゼ活性の分布は、酵素が基質を切断したときに出現する蛍光バンドとして同定される(蛍光シグナルは活性酵素の極めて近くのゲルに保持される)。

40

【0290】

実施例4：単離酵素の酵素活性

アッセイ方法：反応は384ウェルの黒色プラスチックマイクロタイターディッシュ(ScreenMates, Matrix Technologies, Hudson, NH)で実施する。反応物は以下を一緒にして調製した：

50

50mM トリス-塩酸、pH7.5

25 μ M 7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリ

5mMのDTTまたはL-システイン(またはコントロールのための緩衝液)

1 μ gの精製配列番号:9および10

最終体積:100 μ L

7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンの切断は、蛍光プレート読み取り装置(Molecular Devices SPECTRAMAX GEMINI XS(登録商標))で37°Cで360nmの励起および465nmの放射で測定した蛍光の増加として記録した。アッセイ方法は以下の文献から適合させた:R. Arnon: Papain, in "Methods in Enzymology", XIX, G. Perlmann & L. Lorand, eds., Academic Press, NY, 226 (1970)。

10

図8に示すように、第二アミダーゼ配列番号:9および10の酵素活性は、ジチオスレイトール(DTT)またはL-システインと前記酵素をインキュベートすることによって活性化される。"5mMDTT"は、5mMのDTTの存在下での7-(β -D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリ

【0291】

実施例5:セファロsporinCから7-ACAへの1酵素変換

cephCアシラーゼ活性についての活性に基づく酵素スクリーニング(図11参照):

20

活性に基づくスクリーニングは以下が含まれる:

- cephCアシラーゼ活性についての活性ベースの酵素スクリーニング。酵素のクラスには以下が含まれる: i. 第一、第二アミダーゼ; ii. シャッフリングされたアミダーゼ; iii. エステラーゼ; iv. アミノ酸アシラーゼ
- 活性ベースのライブラリースクリーニング
- 配列ベースのライブラリースクリーニング
- ライブラリーの可能な選抜スクリーニング
- 発見されたクローンの特徴決定。

液体系の活性に基づくスクリーニング

ある特徴では、活性に基づくスクリーニングは均質なアッセイとして1536ウェル様式で実施される。これは均質なアッセイであるので、別の特徴では、GIGAMATRIX(登録商標)スクリーニングが用いられる。初期スクリーニングの試みでは、cephCに極めて類似する市販の蛍光基質が用いられるであろう。さらにまた、よりcephCに類似する蛍光基質が合成されている(図9参照)

30

7-ACA感受性インジケーター株による寒天系活性スクリーニング

ある特徴では、本発明は、7-ACAに感受性でcephCに対しては耐性を有する"特徴未決定"土壌単離株(例えば以下に記載されている: Matsuda et al., 1987 J. Bacteriol. 169:5815-5820)を利用する選別スクリーニングを提供する。この株は、cephCを7-ACAに変換することができるクローンを同定するために透明ゾーンアッセイでインジケーター株として用いられる。ライブラリークローンを発現する細胞をインジケーター細胞層の上に重層する。

40

陽性クローンはcephCを7-ACAに変換し、それによって近傍のインジケーター細胞を殺して透明ゾーンを生じる。このタイプのアプローチを利用するために、7-ACA感受性/cephC耐性株を使用する必要があるであろう。

配列に基づくスクリーニング

ある特徴では、本発明は配列に基づくスクリーニングを提供する。前記は、生物学的選別(biopanning)およびcephC(グルタリル-7-ACA)アシラーゼ配列をプローブとして利用するハイブリダイゼーションアプローチを必要とする。3つの新規なクローンを同定した。これらを酵素の特徴決定および配列に基づくスクリーニングの両方でサブクローニングした(図10参照)。ある特徴では、これらの配列および公表されたcephCアシラーゼ配

50

列を比較し、保存領域を同定し、他のライブラリーのPCRスクリーニングで使用するために縮退オリゴヌクレオチドプライマーをデザインする。

【0292】

実施例6：例示的な選別スクリーニング

アミノアジピン酸選別：本発明はアミノアジピン酸の選別方法を提供する。ある特徴では、本方法は以下の株を作製/同定する：1) cephC耐性である；2) 唯一の炭素源および/または窒素源としてcephCを利用できない；しかし、3) 唯一の炭素源および/または窒素源としてD-2-アミノアジピン酸を利用できる。ある特徴では、cephC含有最少培地での選別を用いてライブラリーをスクリーニングし、細胞増殖を調べる。ある特徴では、発現活性によって細胞は増殖のためにアミノアジピン酸を代謝できるので、増殖はcephCからアミノアジピン酸（および7-ACA）が遊離されたことを示す。

10

“ケージ化(caged)”増殖源選別

ある特徴では、炭素増殖源は“ケージ化”増殖源として例示的な選別プロトコルとして用いられる。炭素増殖源はD-2-アミノアジピン酸(AAA)に結合され、この基質を、この“ケージ化”炭素源について栄養要求性である株の唯一の炭素源および/または窒素源として供給する。ある特徴では、切り出したファージミドリブラリーをロイシン要求株を用いてスクリーニングする。ロイシンをD-2-アミノアジピン酸に結合し、ケージ化増殖源を生じることができる。ライブラリーを前記ケージ化ロイシンを含有する最少培地でのロイシン要求株の増殖でスクリーニングすることができる。D-2-アミノアジピン酸-ロイシンからロイシンを放出する活性を発現するクローンは増殖することができる。これはD-2-アミノアジピン酸-ロイシンを切断できる酵素はまたD-2-アミノアジピン酸-7ACA(セファロスポリンC)を切断することもできることを前提としている。

20

アミダーゼを発現するクローンの性状決定

ある特徴では、上記のようにして発見されたアミダーゼをコードするクローンの第二の性状決定は、cephCを基質として用いるクローンの活性の評価、およびcephCから7-ACAへの変換をモニターするHPLCを必要とする。

【0293】

実施例7：アミダーゼの進化/最適化

本発明は、本明細書で述べるように本発明の核酸の改変を含む、改変活性を有するアミダーゼの作製方法を提供する。グルタリル-7-ACAアシラーゼはcephCを7-ACAに直接変換することができるので(低効率ではあるが)、ある特徴では、これらの酵素をGSSMおよび再アッセムブリー(上記参照)で用いて、変化した活性を有するアミダーゼが作製される。

30

シュドモナス株N176由来のグルタリル-7-ACAアシラーゼの位置特異的突然変異誘発によりCephC利用効率の改善(1.5から2.5倍)を示す報告が少なくとも1つある(例えば以下を参照されたい：Ishii et al., (1995) Eur. J. Biochem., 230:773-778)。

液体系の活性に基づくスクリーニング

ある特徴では、本方法はアミダーゼコード核酸の活性ベースのスクリーニング、例えば液系活性に基づくスクリーニングを提供する。ある特徴では、蛍光性基質がcephCのための適切な摸倣物であることを示す。基質認識の重要な決定基はcephCの側鎖D-2-アミノアジポイル基であろうから、7-ACA基を蛍光インジケータで置換することができる。

40

基質認識の主要決定基はペニシリンアシラーゼのための側鎖であることは既に示されている。CephCアシラーゼの最近の結晶構造分析によって、 β -ラクタム核は活性部位残基との固有の反応に直接関与しないことが示唆されている。さらにまた、市販のペニシリンアシラーゼを用いるアッセイの開発によって、この酵素はこれまで活性ベースのスクリーニングで用いられている市販の蛍光基質に対して良好な活性を有することが示された。

寒天系活性スクリーニングおよびアミノアジピン酸選別スクリーニング

ある特徴では、本発明は、アミダーゼの寒天系活性スクリーニングおよびアミノアジピン酸選別スクリーニングを提供する。ある特徴では、目標は増殖培地の成分に対し耐性または感受性を示す株をスクリーニングおよび同定することである。これらのスクリーニングは液体系活性スクリーニングに関する第二のアプローチであり、配列を基準にする試み

50

が第一のアプローチとして考えられる。

“ケージ化 (caged)” 増殖源選別

例示的な“ケージ化”増殖選別法では、D-2-アミノアジピン酸-ロイシンが合成される。しかしながら、最終生成物は2つの異性体を含んでいる。これらの異性体はクロマトグラフィーで分離するのは困難であることが判明した。ある特徴では、スクリーニングは混合異性体を用いて実施される。増殖するクローンはいずれも純粋なD-2-アミノアジピン酸-ロイシン含有培地で再クローニングされるであろう。D-2-アジピン酸-ロイシンを切断することができる酵素はまたセファロスポリンCを切断して7-ACAを生じることができるといふことを前提としている。

【0294】

実施例8：セファロスポリンCから7-アミノセファロスポラニン酸への直接変換

本実施例は、セファロスポリンCから7-アミノセファロスポラニン酸への直接変換を目的とする本発明の第二アミダーゼの使用を示す。

複雑な環境ライブラリーを高スループットスクリーニング法を用いてスクリーニングし、第二アミダーゼ活性を有する本発明の新規な酵素を同定した。発見には市販の蛍光基質に加えて、第二アミダーゼの発見のために7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを含む新規な基質を合成した。

新規な蛍光性第二アミダーゼ基質、7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンの有効性が示された。7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンは、抗生物質セファロスポリンCを7-アミノセファロスポラニン酸(7-ACA)に直接変換することができる第二アミダーゼ活性を発見することを目的に、高スループット活性ベースの全細胞スクリーニングで使用するために特に設計された。7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンは、アミド結合を介して蛍光性レポーター7-アミノ-4-メチルクマリンに結合した、セファロスポリンC上に見出されるD-2-アミノアジポイル側鎖を利用する。したがって、この基質を切断できる酵素はD-2-アミノアジポイル側鎖を認識し、前記蛍光基質をセファロスポリンCの所望の切断部位と等価の位置で切断することができる。7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを環境ライブラリーのHTスクリーニングで用い、セファロスポリンCを7-ACAに変換することができる新規な第二アミダーゼを同定した。7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンに対し活性を有する16個の配列を発見した。これらの酵素の1つ、配列番号:70の特性をセファロスポリンCに対するその活性について調べた。配列番号:70はセファロスポリンCを7-ACAに直接変換することができる。ある特徴では、この酵素および関連酵素は、一酵素プロセスを用いるセファロスポリンCから7-ACAへの大規模製造に有用である。

【0295】

高スループットスクリーニング法を用いて、新規な基質7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンに対して第二アミダーゼ活性を有する新規な酵素を同定した。環境ライブラリーのスクリーニングによって、7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンに対して活性を有する16個の固有の第二アミダーゼ(枯草菌(B. subtilis)のDppAD-アミノペプチダーゼと関連性を有する)が同定された。これら酵素の1つ(配列番号:70)の特性解析によって、配列番号:70はセファロスポリンCを7-ACAに直接変換できることが示された。DppAファミリーメンバーのセファロスポリンCから7-ACAへの直接酵素変換能力は新規な活性である。

本明細書で用いられる基質7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンは高スループットスクリーニングに適切であり、通常1536ウェルおよび100,000ウェルのGIG AMATRIX(登録商標)様式(Diversa, San Diego, CA)の両方で第二アミダーゼの同定に用いた。さらにまた、この基質は、蛍光レポーター7-アミノ-4-メチルクマリンを利用するので非常に鋭敏である。最後に、この基質は特異的で、セファロスポリンCで見出されるD-2-アミノアジポイル側鎖を含む。

上に概説した液系スクリーニングプロトコルを用いて、16個の新規なDppA関連二次アミダーゼ活性を発見した。これらの酵素は7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルク

10

20

30

40

50

マリニンに対し活性を有する。

推定されるアミノ酸配列の分析によって、それらは一次配列のレベルで関連性を有することが示された。

【0296】

本発明のアミダーゼによるセファロsporin Cの7-ACAへの直接変換：配列番号：70を過剰発現するように操作した大腸菌株を用いて、本発明の活性な組換え配列番号：70の酵素を作出した。基質としてセファロsporin Cを用いてこの精製酵素の性状を調べた。

図12は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した反応サンプルを示す。精製組換え配列番号：70をセファロsporin Cから7-ACAに直接変換するその能力についてアッセイした。反応は、7mg/mLの精製した配列番号：70の酵素および50mMのMOPS緩衝液（pH7.0）中の20mMのセファロsporin Cを用いて37℃で実施した。反応サンプルを0時間、2時間および4時間で採取した。図12に示すように、反応サンプルをHPLCを用いて分画し、基質（cephC）および反応生成物（7-ACA）に分離した。結果は、配列番号：70の酵素はセファロsporin Cを7-ACAに直接変換することを示している。

【0297】

酵素活性アッセイ：アミダーゼ活性をテストするまた別の日常のアッセイは、13.5mg/mLのクロキサシリン（cloxacillin）およびセファロsporin C（10mg/mL）を含む50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）の基質緩衝液の使用を含む。細胞懸濁物または半精製酵素サンプルを基質緩衝液中で24時間まで37℃でインキュベートすることができる。続いて適切な時間で100μLのフルラム（fluram）試薬を添加し、混合し、さらにサンプルを1時間室温でインキュベートした。フルラム試薬は、乾燥アセトン中の1mg/mLのフルロエスカミン（fluroescamine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）から成る。反応混合物中の7-ACAの存在は、励起波長378nmで蛍光分光法を用い、担体液として10%アセトン水によるフローインジェクション系で498nmの放射検出によって、遊離の第一アミン基の誘導後に検出することができる。7-ACA生成はまたHPLC系でも示すことができる。酵素反応混合物は、上記のように20μLのサンプルを15cmのハイパーシルODS5μmカラムの移動相（HPLC級の水に35%のアセトニトリル、0.1%のトリフルオロ酢酸から成る）に流速1.5mL/分で32℃で適用して誘導することができる。蛍光分光法による検出は上記の通りであった。この系では標準の7-ACA標品の保持時間は6.7分である。例えば米国特許第6,297,032号を参照されたい。他の日常のアッセイについては例えばEP0283218; EP0322032; EP0405846; EP0474652を参照されたい。

【0298】

改変 / 変化

本発明は、本発明の核酸およびポリペプチドを改変および / または変化させる方法を提供する。ある特徴では、本発明の酵素は、例えば誘導進化によって、GSSMおよび遺伝子再アセンブリー技術を用いて改変される。これらの進化戦略を用いて、cephCから7-ACAへの直接変換のために用いられる一酵素生体触媒プロセスでの使用を目的とする生化学的特性を改善された酵素を作出することができる。

【0299】

これまで本発明の多数の実施態様を述べてきたが、それにもかかわらず本発明の範囲を外れることなく種々の改変を実施することができることは理解されよう。したがって、その他の実施態様は以下の請求の範囲に包含されよう。

【0300】

以下の図面は本発明の実施態様の説明であり、請求の範囲に包含される本発明の範囲を限定しようとするものではない。種々の図面中の同じ参照記号は同じ成分を示す。

【図面の簡単な説明】

【0301】

【図1】コンピュータシステムの組み立て分解図である。

【図2】新規ヌクレオチドまたはタンパク質配列をデータベース配列と比較して新規配列とデータベース配列との間の相同性レベルを決定する処理の一態様を示す工程図である。

【図3】2つの配列が相同であるか否かを決定するコンピュータ処理の一態様を示す工程図である。

【図4】配列内の特色の存在を検出するアイデンティファイヤー300の一態様を示す工程図である。

【図5】実施例3で説明した、蛍光アミダーゼ基質7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを合成する本発明の例示的な二段階合成方法を示す。

【図6】蛍光基質7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを切断するその能力により、実施例3で発見された第二アミダーゼのアミノ酸配列の関連性を示すグラフである。

【図7】セファロスポリンCの二酵素脱アシル反応を示す。

【図8】DTTおよびL-システインを加えた配列番号:9および10の活性を示すグラフである。

【図9】実施例5で用いた種々の蛍光基質(合成7-(-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリンを含む)の構造を示す。

【図10】酵素の特徴解析および配列に基づくスクリーニングでの使用の両目的のために同定およびサブクローニングした3つの新規なクローンを示す。

【図11】実施例5の例示的アプローチを示す。

【図12】実施例8で述べた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した反応サンプルを示す。

【図1】

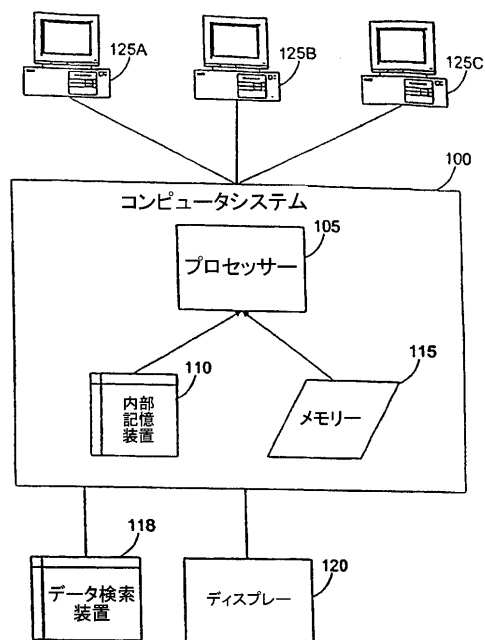


FIGURE 1

【図2】

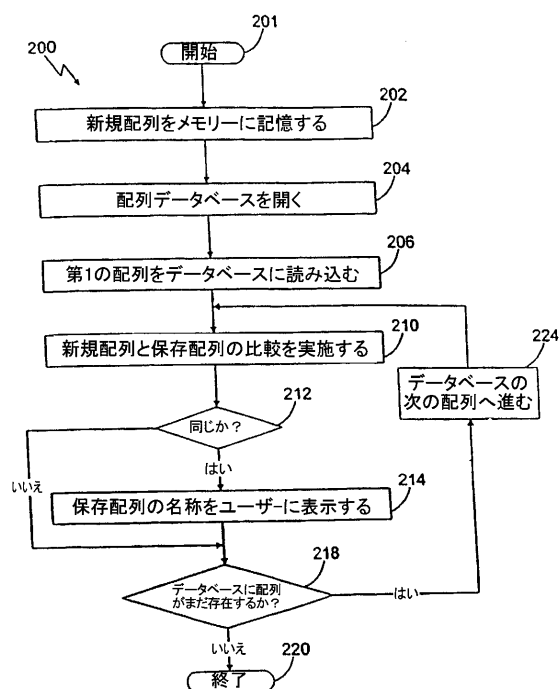


FIGURE 2

【 図 3 】

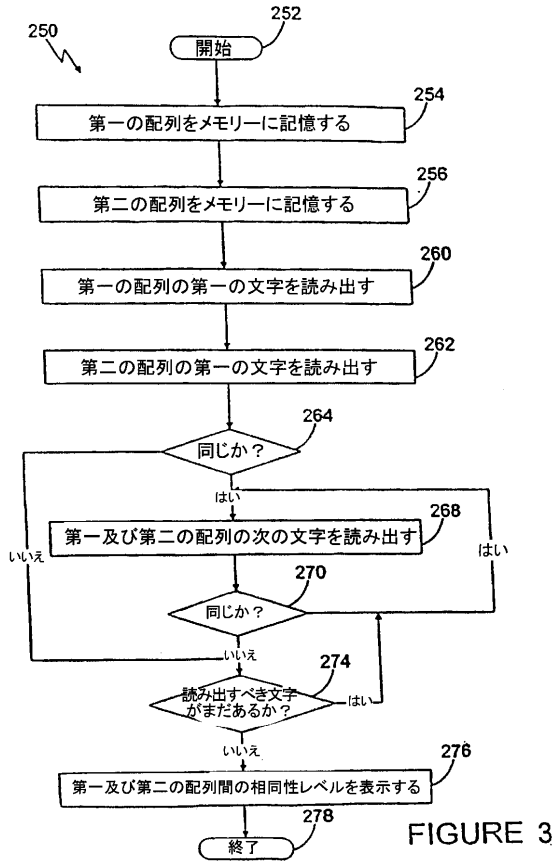


FIGURE 3

【 図 4 】

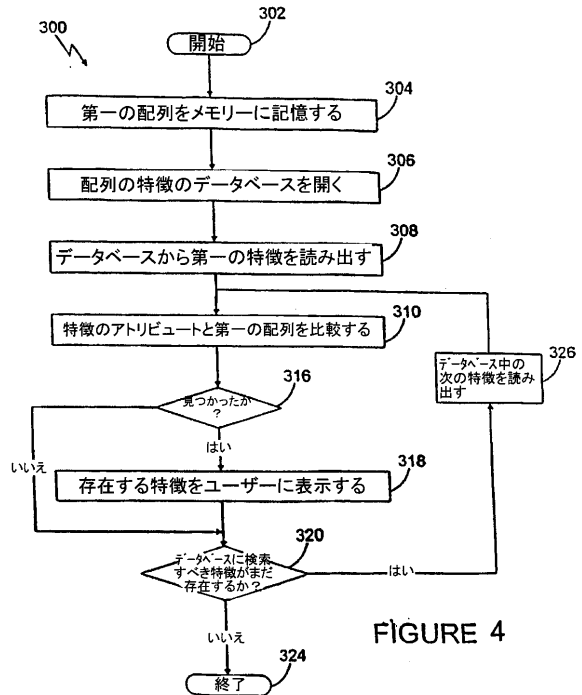
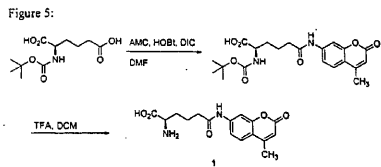


FIGURE 4

【 図 5 】



【 図 6 】

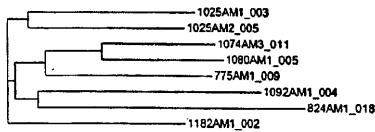


Figure 6: 蛍光性基質 7-(ε-D-2-アミノアジポリアミド)-4-メチルクマリンを切断する能力のために発見された第二アミダーゼのアミノ酸配列の関連性

【 図 7 】

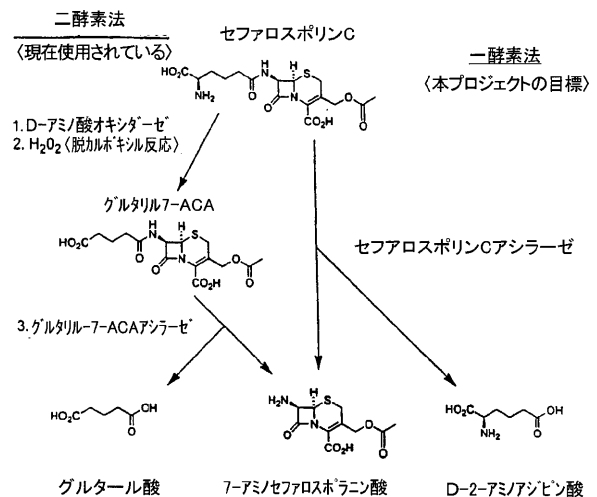
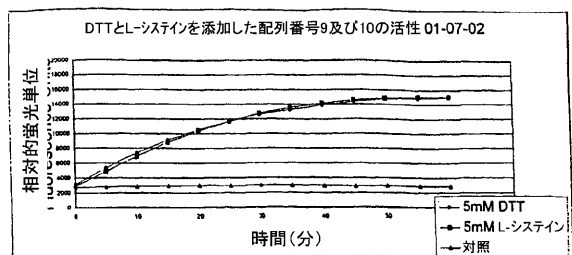


Figure 7: セファロsporin C の二酵素脱アシル反応

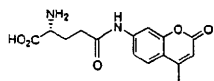
【 図 8 】

Figure 8:

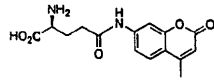


【 図 9 】

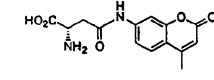
Figure 9: 種々の蛍光基質



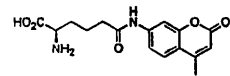
D-グルタミン酸γ-AMC
(市販されている)



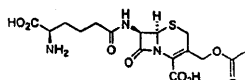
L-グルタミン酸γ-AMC
(市販されている)



L-アスパラギン酸β-AMC
(市販されている)



7-(ε-D-2-アミノアジポイルアミド)-4-メチルクマリン



セファロスポリンC

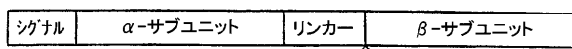
【 図 10 】

Figure 10

配列に基づくスクリーニング法で使用されるペニシリン/グルタリル7-ACAアシラーゼ配列

%同一性(アミノ酸)	pyrobac_2951	282es154_024	SDIV_WT_042_271
pyrobac_2951	100	14.4	23.1
282es154_024	14.4	100	16.0
SDIV_WT_042_271	23.1	16.0	100

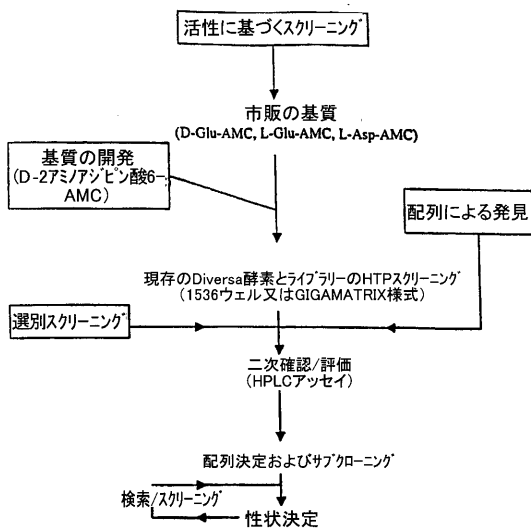
ペニシリン/グルタリル7-ACAアシラーゼの構造
(約80kDa)



282ES154_024: G SNAWAMS
 Pyrobac: G SNNWIIS
 SDIV_WT_042_271: G SNSWVVS
 G SN.W..S

分子内切断は、リンカーの最後の残基(G)とβ-サブユニットの最初の残基(S)との間(矢印)で生じる。この切断は、β-サブユニットの1位の触媒性セリン残基の活性化をもたらす。

【 図 11 】



【 図 12 】

反応時間 反応生成物のHPLCによる分離

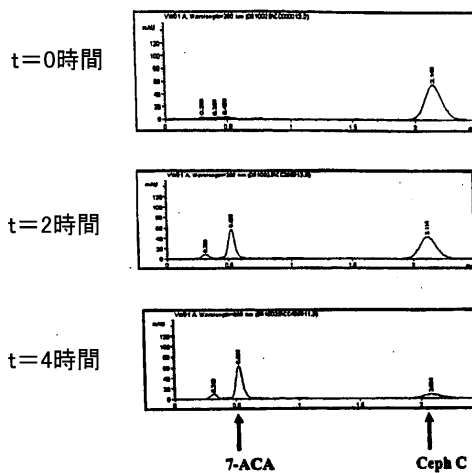


Figure 12

【配列表】

2005525102000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 31/04	4 B 0 6 4
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/10	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/10	C 0 7 K 14/00	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/00	C 0 7 K 16/40	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/80	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/86	
C 1 2 N 9/80	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 9/86	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M, X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 バートン ネルソン アール
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 1 サン ディエゴ サンセット リッジ ドライ
 ヴ 1 0 9 2 8
- (72) 発明者 ウェイナー デイヴィッド ポール
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 0 4 デル マー ストラットフォード コート 4
 2 5 アpartment 1 8
- (72) 発明者 グリーンバーグ ウィリアム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サン ディエゴ ルエッテ デ ヴィル 3 7
 0 9
- (72) 発明者 ルー サマンサ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サン ディエゴ パルミラ ドライヴ 7 6 6
 5 # 5 2 0 9
- (72) 発明者 チャン クリスティン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サン ディエゴ リボン ドライヴ 3 5 2 5
 Apartment 1 1 7
- (72) 発明者 ウォーターズ エリザベス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サン ディエゴ # 4 0 ポート デ パルマ
 4 0 2 0

F ターム(参考) 2B030 AA02 AD08 CA14
 4B001 AC25 EC99
 4B024 AA01 AA03 AA05 BA07 BA14 CA02 DA02 GA01 GA11

专利名称(译)	酰胺酶，编码它的核酸，以及制备和使用它们的方法		
公开(公告)号	JP2005525102A	公开(公告)日	2005-08-25
申请号	JP2003564209	申请日	2003-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	戴弗萨公司		
申请(专利权)人(译)	Daivasa公司		
[标]发明人	パートンネルソンアール ウェイナーデイヴィッドポール グリーンバーグウィリアム ルーサマンサ チャンクリスティン ウォーターズエリザベス		
发明人	パートン ネルソン アール ウェイナー デイヴィッド ポール グリーンバーグ ウィリアム ルー サマンサ チャン クリスティン ウォーターズ エリザベス		
IPC分类号	A01H5/00 A01K67/027 A23C19/032 A23C19/06 A61K38/00 A61P31/04 A61P31/10 C07K14/00 C07K16/40 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/78 C12N9/80 C12N9/86 C12N15/09 C12P21/08 C12P35/00 C12P35/02 C12Q1/34 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C07D501/00 A01K2217/05 A61K38/00 C12N9/78 C12P35/00 C12P35/02 C12P41/007 C12Q1/34		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01H5/00.A A01K67/027 A23C19/032 A23C19/06 A61P31/04 A61P31/10 C07K14/00 C07K16/40 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/80 C12N9/86 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N5/00.A C12N15/00.F C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2B030/AA02 2B030/AD08 2B030/CA14 4B001/AC25 4B001/EC99 4B024/AA01 4B024/AA03 4B024/AA05 4B024/BA07 4B024/BA14 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B029/AA23 4B029/BB16 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA01 4B029/FA12 4B050/CC03 4B050/EE10 4B050/LL01 4B050/LL02 4B050/LL03 4B050/LL05 4B050/LL10 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA27 4B065/CA33 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZB351 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA01 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA60 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/352895 2002-01-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供酰胺酶，编码所述酰胺酶的多核苷酸，制备和使用所述多核苷酸和多肽的方法。一方面，本发明提供了具有仲酰胺酶活性的酶，例如在酰胺水解中具有活性的酶，包括肽酶，蛋白酶和/或具有乙内酰胺酶活性的酶。另一方面，本发明的酶用于增强食物风味（例如，酶成熟的干酪），促进杀菌和杀真菌，修饰和去保护精细化学中间体，并合成肽键。可以进行手性分离以水解头孢菌素C。本发明的酶可用于产生7-氨基头孢菌素酸（7-ACA）和半合成头孢菌素抗生素（包括头孢氨苄，头孢氨苄和头孢呋辛）。本发明的酶可用作杀微生物剂，例如细胞壁水解剂。本发明还提供了包含7-（ε-D-2-氨基己二酰胺）-4-甲基香豆素的荧光酰胺酶底物。

【 図 2 】

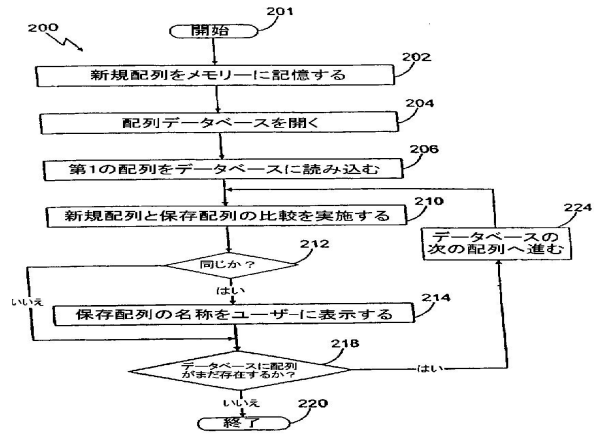


FIGURE 2