

(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2007-531516

(P2007-531516A)

(43) 公表日 平成19年11月8日(2007.11.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B 0 3 0
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 179 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-502990 (P2007-502990)
 (86) (22) 出願日 平成17年3月8日(2005.3.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年11月8日(2006.11.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/007908
 (87) 国際公開番号 W02005/086900
 (87) 国際公開日 平成17年9月22日(2005.9.22)
 (31) 優先権主張番号 10/796, 907
 (32) 優先日 平成16年3月8日(2004.3.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

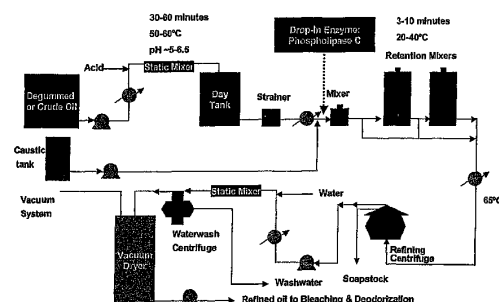
(71) 出願人 503089489
 ダイヴァーサ コーポレイション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 121 サン ディエゴ ディレクターズ
 プレイス 4955
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治
 (74) 代理人 100114007
 弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホリパーゼ、それらをコードする核酸並びにそれらの製造方法及び使用方法

(57) 【要約】

本発明は、ホスホリパーゼ活性（例えばホスホリパーゼA、B、C及びD活性、パタチン活性、ホスファチジン酸ホスファターゼ（PAP）及び/又は脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）活性を含む）を有する新規なポリペプチド、前記ポリペプチドをコードする核酸、前記ポリペプチドと結合する抗体を提供する。これらホスホリパーゼの使用を含む工業的方法（例えば油の脱ガム）及び製品もまた提供される。



【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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173と、少なくとも約100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核酸配列を含む単離又は組換え核酸であって、

10

前記核酸がホスホリパ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、前記配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる分析によって又は目視検査によって決定される、前記単離又は組換え核酸。

20

【請求項 2】

配列同一性が少なくとも約51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%又は64%である、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 3】

配列同一性が、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に対して少なくとも約65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高いか、又は100%の配列同一性である、請求項1の単離又は組換え核酸。

30

40

【請求項 4】

配列同一性が、少なくとも約10、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150残基若しくはそれより長い残基、又は遺伝子もしくは転写物の完全長の領域にわたる、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 5】

核酸配列が、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

50

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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に示される配列を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

10

【請求項6】

核酸配列が、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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172又は配列番号174に示される配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1の単離又は組換え核酸。

20

【請求項7】

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、フィルタリング設定がblastall -p blastp d "nr pataa" F Fに設定されており、且つ他の全てのオプションはデフォルトに設定されている、請求項1の単離又は組換え核酸。

30

【請求項8】

ホスホリパーゼ活性が、グリセロホスフェートエステル結合の加水分解を触媒することを含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項9】

ホスホリパーゼ活性が、植物油のリン脂質のエステル結合の加水分解を触媒することを含む、請求項8の単離又は組換え核酸。

【請求項10】

植物油のリン脂質が脂肪種子のリン脂質を含む、請求項8の単離又は組換え核酸。

40

【請求項11】

ホスホリパーゼ活性がホスホリパーゼC (PLC) 活性を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項12】

ホスホリパーゼ活性がホスホリパーゼA (PLA) 活性を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項13】

ホスホリパーゼ活性がホスホリパーゼB (PLB) 活性を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

50

【請求項 1 4】

ホスホリパーゼ活性がホスホリパーゼD (PLD) 活性を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 1 5】

ホスホリパーゼD活性がホスホリパーゼD1活性又はホスホリパーゼD2活性を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 1 6】

ホスホリパーゼ活性が糖タンパク質の加水分解を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 1 7】

糖タンパク質がジャガイモ塊茎を含む、請求項16の単離又は組換え核酸。

【請求項 1 8】

ホスホリパーゼ活性がパタチン酵素活性を含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 1 9】

ホスホリパーゼ活性が脂質アシルヒドロラーゼ (LAH) 活性を含む、請求項18の単離又は組換え核酸。

【請求項 2 0】

ホスホリパーゼ活性が熱安定性である、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 2 1】

ポリペプチドが、約37 ~ 約95、又は約55 ~ 約85、又は約70 ~ 約75、又は約70 ~ 約95、又は約90 ~ 約95 の間の温度範囲を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持する、請求項20の単離又は組換え核酸。

【請求項 2 2】

ホスホリパーゼ活性が耐熱性である、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 2 3】

ポリペプチドが、37 を超える温度から約95、又は約55 を超える温度から約85、又は約70 から約75、又は90 を超える温度から約95 の範囲の温度に暴露された後もホスホリパーゼ活性を保持する、請求項22の単離又は組換え核酸。

【請求項 2 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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173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、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、単離又は組換え核酸。

【請求項 2 5】

核酸の長さが、少なくとも約20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100、125、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000残基若しくはそれより長い残基、又は遺伝子若しくは転写物の完全長である、請求項24の単離又は組換え核酸。

【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

ストリンジェントな条件が、0.2X SSC中、約65 の温度で約15分間の洗滌を含む洗滌工程を含む、請求項24の単離又は組換え核酸。

【請求項27】

ホスホリパ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、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173を含む配列の少なくとも10の連続する塩基を含み、結合又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

20

【請求項28】

少なくとも約10～50、約20～60、約30～70、約40～80、約60～100、又は約50～150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27の核酸プローブ。

【請求項29】

ホスホリパ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、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173の少なくとも約10の連続する残基を含む核酸を含み、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる分析によって又は目視検査によって決定される、前記核酸プローブ。

30

40

【請求項30】

少なくとも約10～50、約20～60、約30～70、約40～80、約60～100、又は約50～150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29の核酸プローブ。

【請求項31】

ホスホリパ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若しくは請求項24に記載の配列又はその部分配列を含む核酸を増幅することが

50

できる、前記増幅プライマー配列対。

【請求項 3 2】

増幅プライマー配列対のメンバーが、前記配列の少なくとも約10～50の連続する塩基、又は約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24若しくは25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29の増幅プライマー対。

【請求項 3 3】

増幅プライマー対であって、

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、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173の最初の(5'の)約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30残基、又はそれより多い残基によって示される配列をもつ第一のメンバーと、前記第一のメンバーの相補鎖の最初の(5'の)約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30残基、又はそれより多い残基によって示される配列をもつ第二のメンバーとを含む、前記増幅プライマー対。

10

20

【請求項 3 4】

請求項33に記載の増幅プライマー対を用いるポリヌクレオチドの増幅によって生成される、ホスホリパーゼをコードする核酸。

【請求項 3 5】

増幅がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるものである、請求項34のホスホリパーゼをコードする核酸。

30

【請求項 3 6】

遺伝子ライブラリーの増幅によって生成される、請求項34のホスホリパーゼをコードする核酸。

【請求項 3 7】

遺伝子ライブラリーが環境ライブラリーである、請求項34のホスホリパーゼをコードする核酸。

【請求項 3 8】

請求項34に記載のホスホリパーゼをコードする核酸によってコードされる、単離又は組換えホスホリパーゼ。

40

【請求項 3 9】

ホスホリパ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であって、請求項1又は請求項24に記載の核酸配列又はその部分配列を増幅することができる増幅プライマー配列対を用いて鋳型核酸を増幅することを含む、前記方法。

【請求項 4 0】

請求項33に記載の増幅プライマー対を用いて核酸を増幅すること、及び増幅された核酸を発現させることを含む、ホスホリパーゼの生成方法。

【請求項 4 1】

請求項1又は請求項24に記載の配列を含む核酸を含む、発現カセット。

50

【請求項 4 2】

請求項1又は請求項24に記載の配列を含む核酸を含む、ベクター。

【請求項 4 3】

請求項1又は請求項24に記載の配列を含む核酸を含むクローニングビヒクルであって、クローニングビヒクルがウイルスベクター、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又は人工染色体を含む、前記クローニングビヒクル。

【請求項 4 4】

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又はアデノ関連ウイルスベクターを含む、請求項43のクローニングビヒクル。

10

【請求項 4 5】

細菌人工染色体 (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)、又は哺乳動物人工染色体 (MAC) を含む、請求項43のクローニングビヒクル。

【請求項 4 6】

請求項1又は請求項24に記載の配列を含む核酸を含む、形質転換細胞。

【請求項 4 7】

請求項41に記載の発現カセットを含む、形質転換細胞。

【請求項 4 8】

細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は植物細胞である、請求項47の形質転換細胞。

20

【請求項 4 9】

請求項1又は請求項24に記載の配列を含む、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 0】

動物がマウスである、請求項49の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 1】

請求項1又は請求項24に記載の配列を含む、トランスジェニック植物。

【請求項 5 2】

植物が、トウモロコシの草木、ソルガムの草木、ジャガイモの草木、タバコの草木、トマトの草木、コムギの草木、脂肪種子の草木、アブラナの草木、ダイズの草木、イネの草木、オオムギの草木、牧草、綿実、ヤシ、ゴマの草木、落花生の草木、ヒマワリの草木又はタバコの草木である、請求項51のトランスジェニック植物。

30

【請求項 5 3】

請求項1又は請求項24に記載の配列を含む、トランスジェニック種子。

【請求項 5 4】

種子が、トウモロコシの種子、コムギの穀粒、脂肪種子、ナタネ、大豆の種子、ヤシの実、ヒマワリの種子、ゴマの種子、コメ、オオムギ、落花生、綿実、ヤシ、落花生、ゴマの種子、ヒマワリの種子又はタバコの草木の種子である、請求項53のトランスジェニック種子。

【請求項 5 5】

請求項1若しくは請求項24に記載の配列若しくはその部分配列に対して相補的である核酸配列を含むか、又は請求項1若しくは請求項24に記載の配列若しくはその部分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。

40

【請求項 5 6】

長さが約10～50塩基、約20～60塩基、約30～70塩基、約40～80塩基、又は約60～100塩基である、請求項55のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 5 7】

ホスホリパーゼメッセージの翻訳を細胞内で阻害する方法であって、

請求項1若しくは請求項24に記載の配列に対して相補的である核酸配列又は請求項1若し

50

くは請求項24に記載の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、細胞に投与するか又は細胞内で発現させることを含む、前記方法。

【請求項58】

請求項1又は請求項24に記載の配列の部分配列を含む、二本鎖阻害性RNA (RNAi) 分子。

【請求項59】

RNAiが、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25又はそれより長い二重鎖ヌクレオチドである、請求項58の二本鎖阻害性RNA (RNAi) 分子。

【請求項60】

ホスホリパーゼの発現を細胞内で阻害する方法であって、

10

二本鎖阻害性RNA (RNAi) を細胞に投与するか又は細胞内で発現させることを含み、ここで前記RNAが請求項1又は請求項24に記載の配列の部分配列を含む、前記方法。

【請求項61】

以下の(i)～(iii)のいずれかの単離又は組換えポリペプチド：

(i) 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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172又は配列番号174と少なくとも約100残基の領域にわたって、少なくとも約50%の配列同一性を有し、前記配列同一性が、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される、単離又は組換えポリペプチド；

20

30

(ii) 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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に示される配列と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも約50%の配列同一性を有する核酸によってコードされ、さらに前記配列同一性が、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される、単離又は組換えポリペプチド；又は

40

(iii) 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、

50

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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に示される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ことができる核酸によってコードされる、単離又は組換えポリペプチド。

10

【請求項62】

配列同一性が、少なくとも約51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高いか、又は100%の配列同一性である、請求項61の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項63】

20

配列同一性が、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、又はそれより多い残基、又は酵素の完全長の領域に及ぶ、請求項61の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項64】

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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172又は配列番号174に示される配列を有する、請求項61の単離又は組換えポリペプチド。

30

40

【請求項65】

ポリペプチドがホスホリパーゼ活性を有する、請求項61の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項66】

ホスホリパーゼ活性がグリセロホスフェートエステル結合の加水分解を触媒することを含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項67】

ホスホリパーゼ活性が、植物油のリン脂質のエステル結合の加水分解を触媒することを含む、請求項66の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項68】

50

植物油のリン脂質が脂肪種子のリン脂質を含む、請求項67の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項69】

植物油のリン脂質が、植物油、高リン油、大豆油、キャノーラ油、パーム油、綿実油、トウモロコシ油、ヤシの実由来のリン脂質、米ぬか油、ココナッツ油、ゴマ油、魚油、藻類のリン脂質、ヒマワリ油、精油、果実種子油、ブドウ種子リン脂質、アプリコットリン脂質又はルリチシャのリン脂質から得られる、請求項67の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項70】

ホスホリパーゼ活性がホスホリパーゼC (PLC) 活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

10

【請求項71】

ホスホリパーゼ活性がホスホリパーゼA (PLA) 活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項72】

ホスホリパーゼA活性がホスホリパーゼA1活性又はホスホリパーゼA2活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項73】

ホスホリパーゼ活性がホスホリパーゼD (PLD) 活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項74】

20

ホスホリパーゼD活性がホスホリパーゼD1活性又はホスホリパーゼD2活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項75】

ホスホリパーゼ活性が糖タンパク質の加水分解を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項76】

糖タンパク質がジャガイモの塊茎を含む、請求項68の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項77】

ホスホリパーゼ活性がパタチン酵素活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

30

【請求項78】

ホスホリパーゼ活性が脂質アシルヒドロラーゼ (LAH) 活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項79】

ホスホリパーゼ活性が熱安定性である、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項80】

ポリペプチドが、約20 から約30 、約25 から約40 、約37 から約95 、約55 から約85 、約70 から約95 、約70 から約75 、又は約90 から約95 の間の温度範囲を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持する、請求項79の単離又は組換えポリペプチド。

40

【請求項81】

ホスホリパーゼ活性が耐熱性である、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項82】

ポリペプチドが、37 を超える温度から約95 、約55 を超える温度から約85 、約70 から約75 、又は90 を超える温度から約95 の範囲の温度に暴露された後でホスホリパーゼ活性を保持する、請求項81の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項83】

請求項61記載のポリペプチドを含み、且つシグナル配列を欠いている、単離又は組換えポリペプチド。

【請求項84】

50

請求項61記載のポリペプチドを含み、且つ異種シグナル配列を有する、単離又は組換えポリペプチド。

【請求項 8 5】

ホスホリパーゼ活性が、約37 で約10から約100ユニット/mgタンパク質、約100から約1000ユニット/mgタンパク質、約500から約750ユニット/mgタンパク質、約500から約1200ユニット/mgタンパク質、又は約750から約1000ユニット/mgタンパク質の範囲の比活性を含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項 8 6】

耐熱性が、高温に加熱した後で、37 でのホスホリパーゼの比活性の少なくとも半分を保持することを含む、請求項81の単離又は組換えポリペプチド。

10

【請求項 8 7】

耐熱性が、高温に加熱した後で、37 での比活性の約500から約1200ユニット/mgタンパク質の範囲を保持することを含む、請求項81の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項 8 8】

ポリペプチドが少なくとも1つのグリコシル化部位を含む、請求項61の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項 8 9】

グリコシル化がN-結合グリコシル化である、請求項88の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項 9 0】

ポリペプチドが、P.パストリス又はS.ポンペで発現された後でグリコシル化される、請求項89の単離又は組換えポリペプチド。

20

【請求項 9 1】

ポリペプチドが、約pH6.5、pH6.0、pH5.5、pH5.0、pH4.5又はpH4.0を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持する、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項 9 2】

ポリペプチドが、約pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9.0、pH9.5又はpH10.0、又はpH10.5を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持する、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項 9 3】

請求項61記載のポリペプチドを含むタンパク質調製物であって、液体、固体又はゲルを含む前記タンパク質調製物。

30

【請求項 9 4】

請求項61記載のポリペプチドと第二のドメインとを含む、ヘテロダイマー。

【請求項 9 5】

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94のヘテロダイマー。

【請求項 9 6】

第二のドメインがエピトープ又はタグである、請求項94のヘテロダイマー。

【請求項 9 7】

請求項61記載のポリペプチドを含むホモダイマー。

【請求項 9 8】

ポリペプチドが請求項61記載の配列又はその部分配列を含む、固定されたポリペプチド。

40

【請求項 9 9】

ポリペプチドが、細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、マイクロ電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレイ又はキャピラリー管上に固定されている、請求項98の固定されたポリペプチド。

【請求項 1 0 0】

請求項61記載の固定されたポリペプチドを含むアレイ。

【請求項 1 0 1】

請求項1又は請求項24記載の固定された核酸を含むアレイ。

50

【請求項 102】

請求項61記載のポリペプチドと特異的に結合する単離又は組換え抗体。

【請求項 103】

抗体がモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である、請求項102の単離又は組換え抗体。

【請求項 104】

請求項61記載の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 105】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを単離又は同定する方法であって、

- (a) 請求項102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；及び
 - (c) 前記抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合する条件下で、工程(b)のサンプルを工程(a)の抗体と接触させ、それによってホスホリパーゼを単離又は同定する工程；
- を含む前記方法。

10

【請求項 106】

抗ホスホリパーゼ抗体を生成する方法であって、

請求項1又は請求項24に記載の核酸又はその部分配列を、液性免疫応答を生じさせるのに十分な量で非ヒト動物に投与し、それによって抗ホスホリパーゼ抗体を生成することを含む、前記方法。

【請求項 107】

抗ホスホリパーゼ抗体を生成する方法であって、

請求項61に記載のポリペプチド又はその部分配列を、液性免疫応答を生じさせるのに十分な量で非ヒト動物に投与し、それによって抗ホスホリパーゼ抗体を生成することを含む、前記方法。

20

【請求項 108】

組換えポリペプチドを生成する方法であって、

- (a) プロモーターに機能可能に連結された核酸を提供する工程、ここで前記核酸は請求項1又は請求項24に記載の配列を含み；及び
 - (b) 前記ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程(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生成する工程；
- を含む前記方法。

30

【請求項 109】

工程(a)の核酸で宿主細胞を形質転換し、続いて工程(a)の核酸を発現させ、それによって組換えポリペプチドを形質転換細胞で生成する工程をさらに含む、請求項108の方法。

【請求項 110】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを同定する方法であって、

- (a) 請求項65に記載のポリペプチドを提供する工程；
 - (b) ホスホリパーゼの基質を提供する工程；及び
 - (c) 前記ポリペプチドを工程(b)の基質と接触させて、基質の量の減少又は反応生成物の量の増加を検出する工程、ここで基質の量の減少又は反応生成物の量の増加によってホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが検出される；
- を含む前記方法。

40

【請求項 111】

ホスホリパーゼ基質を同定する方法であって、

- (a) 請求項65に記載のポリペプチドを提供する工程；
- (b) 被検基質を提供する工程；及び
- (c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の被検基質と接触させて、基質の量の減少又は反応生成物の量の増加を検出する工程、ここで、基質の量の減少又は反応生成物の量の増加が、前記被検基質をホスホリパーゼ基質として同定する；

50

を含む前記方法。

【請求項 1 1 2】

被検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であって、

(a) 核酸又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工程、ここで前記核酸は請求項1又は請求項24に記載の配列を有し；

(b) 被検化合物を提供する工程；

(c) 前記ポリペプチドを前記被検化合物と接触させる工程；及び

(d) 工程(b)の被検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；

を含む前記方法。

10

【請求項 1 1 3】

被検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であって、

(a) 請求項61に記載のポリペプチドを提供する工程；

(b) 被検化合物を提供する工程；

(c) 前記ポリペプチドを被検化合物と接触させる工程；及び

(d) 工程(b)の被検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；

を含む前記方法。

【請求項 1 1 4】

ホスホリパーゼ活性のモジュレーターを同定する方法であって、

(a) 請求項65に記載のポリペプチドを提供する工程；

(b) 被検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)の被検化合物と接触させて、ホスホリパーゼの活性を測定する工程、ここで、被検化合物の非存在下で測定したホスホリパーゼ活性と比較して、被検化合物の存在下で測定したホスホリパーゼ活性における変化は、被検化合物がホスホリパーゼ活性を調節するという決定を提供する；

を含む前記方法。

20

【請求項 1 1 5】

ホスホリパーゼ活性が、ホスホリパーゼ基質を提供すること、及び基質量の減少若しくは反応生成物量の増加又は基質量の増加若しくは反応生成物量の減少を検出することによって測定される、請求項114の方法。

30

【請求項 1 1 6】

被検化合物が存在しないときの基質量又は反応生成物量と比較して、前記被検化合物が存在するときの基質量の減少又は反応生成物量の増加により、前記被検化合物はホスホリパーゼ活性のアクチベーターと同定される、請求項115の方法。

【請求項 1 1 7】

被検化合物が存在しないときの基質量又は反応生成物量と比較して、前記被検化合物が存在するときの基質量の増加又は反応生成物量の減少によって、前記被検化合物はホスホリパーゼ活性の阻害物質と同定される、請求項115の方法。

【請求項 1 1 8】

40

プロセッサ及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はポリペプチド配列又は核酸配列を保存しており、ここで前記ポリペプチド配列は請求項61に記載の配列を含み、前記ポリペプチドは請求項1又は請求項24に記載の核酸によってコードされている、前記コンピュータシステム。

【請求項 1 1 9】

配列比較アルゴリズムと、少なくとも1つの参照配列が保存されているデータ保存装置とをさらに含む、請求項118のコンピュータシステム。

【請求項 1 2 0】

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119のコンピュータシステム。

50

【請求項 1 2 1】

配列の1以上の特徴を同定するアイデンティファイヤーをさらに含む、請求項119のコンピュータシステム。

【請求項 1 2 2】

ポリペプチド配列又は核酸配列が保存されてあるコンピュータ読み取り可能な媒体であって、

前記ポリペプチド配列が請求項61に記載のポリペプチド；請求項1又は請求項24に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取り可能な媒体。

【請求項 1 2 3】

以下の工程を含む、配列中の特徴を同定する方法：

(a) 配列中の1以上の特徴を同定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、ここで前記配列はポリペプチド配列又は核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は請求項61に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；及び

(b) 前記コンピュータプログラムにより前記配列中の1以上の特徴を同定する工程。

【請求項 1 2 4】

以下の工程を含む、第一の配列を第二の配列と比較する方法：

(a) 配列を比較するコンピュータプログラムの使用により第一の配列及び第二の配列を読み取る工程、ここで第一の配列はポリペプチド配列又は核酸配列を含み、前記ポリペプチド配列は請求項61に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含み；及び

(b) 前記コンピュータプログラムにより第一の配列と第二の配列との間の相違を決定する工程。

【請求項 1 2 5】

第一の配列と第二の配列との間の相違を決定する工程が、多型性を同定する工程をさらに含む、請求項124の方法。

【請求項 1 2 6】

さらに、配列中の1以上の特徴を同定するアイデンティファイヤーを含む、請求項124の方法。

【請求項 1 2 7】

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、配列中の1以上の特徴を同定する工程を含む、請求項126の方法。

【請求項 1 2 8】

以下の工程を含む、ホスホリパ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又は回収する方法：

(a) 請求項33に記載の増幅プライマー配列対を提供する工程；

(b) 環境サンプルから核酸を単離する工程、又は前記環境サンプル中の核酸を前記増幅プライマー対とのハイブリダイゼーションに利用できるように、前記環境サンプルを処理する工程；及び

(c) 工程(b)の核酸を工程(a)の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、それによってホスホリパ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又は回収する工程。

【請求項 1 2 9】

増幅プライマー配列対の各メンバーが、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

10

20

30

40

50

、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171若しくは配列番号173に示される配列又はその部分配列のうち少なくとも約10～50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128の方法。

【請求項130】

10

以下の工程を含む、ホスホリパ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又は回収する方法：

(a) 請求項1又は請求項24に記載の配列又はその部分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) 環境サンプルから核酸を単離する工程、又は前記サンプル中の核酸を工程(a)のポリヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションに利用できるように、前記環境サンプルを処理する工程；

(c) 工程(b)の単離された核酸又は処理された環境サンプルを、工程(a)のポリヌクレオチドプローブと一緒にする工程；及び

(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、それによってホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を前記環境サンプルから単離又は回収する工程。

20

【請求項131】

環境サンプルが、水サンプル、液体サンプル、土壌サンプル、大気サンプル又は生物学的サンプルを含む、請求項128又は請求項130の方法。

【請求項132】

生物学的サンプルが、細菌細胞、原虫細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞又は哺乳動物細胞に由来する、請求項131の方法。

【請求項133】

以下の工程を含む、ホスホリパ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：

30

(a) 請求項1又は請求項24に記載の配列を含む鋳型核酸を提供する工程；及び

(b) 前記鋳型配列中の1以上のヌクレオチドの改変、欠失若しくは付加、又はそれらの組合せを実施して、前記鋳型核酸の変種を作製する工程。

【請求項134】

さらに、変種核酸を発現させて変種ホスホリパーゼポリペプチドを生成する工程を含む、請求項133の方法。

【請求項135】

改変、付加又は欠失が、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシャルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入(商標)(GSSM(商標))、合成連結再アッセンブリ(SLR)及びそれらの組合せを含む方法によって導入される、請求項133の方法。

40

【請求項136】

改変、付加または欠失が、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ保有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成、及びそれらの組合せを含む方法によって導入される、請求項133の方法。

50

【請求項 137】

方法が、鋳型核酸によってコードされるポリペプチドのものとは変化した若しくは異なる活性又は変化した若しくは異なる安定性を有するホスホリパーゼが生成されるまで反復的に繰り返される、請求項133の方法。

【請求項 138】

変種ホスホリパーゼポリペプチドが耐熱性であり、高温に暴露された後で幾らか活性を保持している、請求項137の方法。

【請求項 139】

鋳型核酸によってコードされたホスホリパーゼと比較して、変種ホスホリパーゼポリペプチドのグリコシル化が増加している、請求項137の方法。

10

【請求項 140】

変種ホスホリパーゼポリペプチドが高温下でホスホリパーゼ活性を有し、鋳型核酸によってコードされたホスホリパーゼは高温下で活性を持たない、請求項137の方法。

【請求項 141】

方法が、鋳型核酸のコドン使用頻度とは変化したコドン使用頻度を示すホスホリパーゼコード配列が生成されるまで反復的に繰り返される、請求項133の方法。

【請求項 142】

方法が、鋳型核酸のメッセージ発現レベル又は安定性レベルより高いまたは低いレベルを有するホスホリパーゼ遺伝子が生成されるまで反復的に繰り返される、請求項133の方法。

20

【請求項 143】

以下の工程を含む、ホスホリパ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して宿主細胞でのその発現を高める方法：

(a) 請求項1又は請求項24に記載の配列を含む、ホスホリパ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；及び

(b) 工程(a)の核酸の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、そのコドンを同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中性的に使用されるコドンで置換し、よって前記核酸を改変して宿主細胞内での発現を増加させる工程であって、前記優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先コドンまたは前記低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである前記工程。

30

【請求項 144】

以下の工程を含む、ホスホリパ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又は請求項24に記載の配列を含む、ホスホリパ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；及び

(b) 工程(a)の核酸のコドンを同定し、そのコドンを同じアミノ酸をコードする別のコドンで置換し、それによってホスホリパーゼをコードする核酸のコドンを改変する工程。

【請求項 145】

以下の工程を含む、ホスホリパーゼポリペプチドをコードする核酸のコドンを改変して宿主細胞での発現を高める方法：

40

(a) 請求項1又は請求項24に記載の配列を含む、ホスホリパーゼポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；及び

(b) 工程(a)の核酸の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、そのコドンを同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中性的に使用されるコドンで置換し、ここで前記優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンであり、よって前記核酸を改変して宿主細胞での発現を高める工程。

【請求項 146】

以下の工程を含む、ホスホリパ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

50

ンを改変して宿主細胞での発現を低下させる方法：

(a) 請求項1又は請求項24に記載の配列を含む、ホスホリパーゼポリペプチドをコードする核酸を提供する工程；及び

(b) 工程(a)の核酸の少なくとも1つの好ましいコドン进行を同定し、そのコドン进行を同じアミノ酸をコードする非優先コドンまたは低優先コドンで置換し、ここで前記優先コドン进行は宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、前記非優先または前記低優先コドン进行は宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンであり、よって前記核酸を改変して宿主細胞での発現を低下させる工程。

【請求項147】

宿主細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、又は哺乳動物細胞である、請求項146の方法。

【請求項148】

以下の工程を含む、複数の改変されたホスホリパーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する方法であって、前記改変される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：(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、ここで前記第一の核酸配列は、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に示される配列、又はその部分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、さらに前記核酸はホスホリパーゼ活性部位又はホスホリパーゼ基質結合部位をコードし；(b) 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原性オリゴヌクレオチドを提供する工程；及び(c) 前記一組の変異原性オリゴヌクレオチドを用いて、変異を導入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一組の活性部位コード変種または基質結合部位コード変種核酸を生成し、それによって複数の改変ホスホリパーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する工程。

【請求項149】

最適化定方向進化システム、遺伝子部位飽和変異導入(商標)(GSSM(商標))及び合成連結再アッセンブリ(SLR)を含む方法によって、工程(a)の第一の核酸に変異を導入する工程を含む、請求項148の方法。

【請求項150】

変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシャルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入(商標)(GSSM(商標))、合成連結再アッセンブリ(SLR)及びそれらの組合せを含む方法によって、工程(a)の第一の核酸に変異を導入する工程を含む、請求項148の方法。

【請求項151】

10

20

30

40

50

組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ保有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成及びそれらの組合せを含む方法によって、工程(a)の第一の核酸又は変種に変異を導入する工程を含む、請求項148の方法。

【請求項152】

以下の工程を含む小分子を生成する方法：(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あって、前記酵素の1つは請求項1又は請求項24に記載の配列を含む核酸によってコードされるホスホリパ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；及び(c)複数の生体触媒反応を促進する条件下で工程(b)の基質を前記酵素と反応させて一連の生体触媒反応により小分子を生成する工程。

10

【請求項153】

以下の工程を含む小分子を改変する方法：(a)ホスホリパーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素は、請求項65に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸配列を含む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；及び(c)前記ホスホリパーゼ酵素によって触媒される酵素反応が促進される条件下で工程(a)の酵素を工程(b)の小分子と反応させ、それによってホスホリパーゼ酵素反応により小分子を改変する工程。

20

【請求項154】

工程(a)の酵素の小分子基質を複数含み、よってホスホリパ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生成される改変小分子のライブラリーを作製する、請求項153の方法。

【請求項155】

複数の酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを形成するために、前記酵素による複数の生体触媒反応が促進される条件下で複数の追加酵素をさらに含む、請求項153の方法。

【請求項156】

さらに、所望の活性を示す特定の改変小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために前記ライブラリーを試験する工程を含む、請求項155の方法。

30

【請求項157】

ライブラリーを試験する工程が、さらに、所望の活性をもつ特定の改変小分子の有無について改変小分子の一部を試験することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の一部を生成するために使用された生体触媒反応の1つ以外の全てを系統的に排除し、所望の活性をもつ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工程を含む、請求項156の方法。

【請求項158】

以下の工程を含む、ホスホリパーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する方法：(a)ホスホリパーゼ酵素を提供する工程であって、前記酵素は請求項65に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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；及び(b)工程(a)の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、さらにホスホリパーゼ活性について残りの部分配列を試験し、それによってホスホリパーゼ酵素の機能的フラグメントを決定する工程。

40

【請求項159】

ホスホリパーゼ活性が、ホスホリパーゼ基質を提供して、基質量の減少又は反応生成物の増加を検出することによって測定される、請求項158の方法。

【請求項160】

以下の工程を含む、リアルタイム代謝フラックス分析を使用することによる新規又は改変表現型のホールセル操作方法：(a)細胞の遺伝的組成を改変することによって改変細

50

胞を作製する工程であって、前記遺伝的組成は、請求項1又は請求項24に記載の配列を含む核酸の細胞への添加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；及び(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における非改変細胞の対応する測定値と異なっているか否かを決定し、それによって、リアルタイム代謝フラックス分析を用いて細胞の操作された表現型を同定する工程。

【請求項161】

細胞の遺伝的組成が、細胞内の配列の欠失若しくは改変、又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160の方法。

10

【請求項162】

新規に操作された表現型を含む細胞を選別する工程をさらに含む、請求項160の方法。

【請求項163】

選別された細胞を培養し、それによって新規に操作された表現型を含む新規な細胞株を生成する工程をさらに含む、請求項162の方法。

【請求項164】

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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173の残基1から16、1から17、1から18、1から19、1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、1から33に示される配列から成る単離又は組換えシグナル配列。

20

30

【請求項165】

請求項164に記載の配列を有するシグナルペプチド(SP)を含む少なくとも第一のドメイン及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含むキメラポリペプチドであって、前記異種ポリペプチド又はペプチドが天然には前記シグナルペプチド(SP)とは結合していない、前記キメラポリペプチド。

【請求項166】

異種ポリペプチド又はペプチドがホスホリパーゼではない、請求項165のキメラポリペプチド。

40

【請求項167】

異種ポリペプチドが、シグナルペプチド(SP)又は触媒ドメイン(CD)のアミノ末端、カルボキシ末端又はその両端に存在する、請求項165のキメラポリペプチド。

【請求項168】

キメラポリペプチドをコードする単離又は組換え核酸であって、前記キメラポリペプチドが、請求項164に記載の配列を有するシグナルペプチド(SP)を含む少なくとも第一のドメイン及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含み、前記異種ポリペプチド又はペプチドが天然には前記シグナルペプチド(SP)とは結合していない、前記単離又は組換え核酸。

50

【請求項169】

ホスホリパーゼをグリコシル化することを含む、ホスホリパーゼポリペプチドの耐熱性又は熱安定性を高める方法であって、前記ポリペプチドが、請求項61に記載のポリペプチド又は請求項1若しくは請求項24に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み、それによって前記ホスホリパーゼの耐熱性又は熱安定性が高められる、前記方法。

【請求項170】

細胞で組換えホスホリパーゼを過剰発現させる方法であって、前記方法が請求項1又は請求項24に記載の核酸配列を含むベクターを発現させることを含み、ここで過剰発現が高活性プロモーターの使用、ジシストロン性ベクターの使用又はベクターの遺伝子増幅によって実施される、前記方法。

10

【請求項171】

以下の工程を含むトランスジェニック植物を作製する方法：(a)異種核酸配列を前記細胞に導入し(ここで前記異種核酸配列は請求項1又は請求項24に記載の配列を含む)、それによって形質転換細胞を作製する工程；(b)前記形質転換細胞からトランスジェニック植物を生産する工程。

【請求項172】

工程(a)がさらに、植物細胞プロトプラストのエレクトロポレーション又はマイクロインジェクションによって前記異種核酸配列を導入することを含む、請求項171の方法。

【請求項173】

工程(a)が、DNA粒子衝撃によって、又はアグロバクテリウムツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)宿主を使用することによって、植物組織に直接前記異種核酸配列を導入することを含む、請求項171の方法。

20

【請求項174】

以下の工程を含む、植物細胞で異種核酸配列を発現させる方法：(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植物細胞を形質転換する工程、ここで前記異種核酸配列は請求項1又は請求項24に記載の配列を含み；(b)前記異種核酸配列が前記植物細胞で発現される条件下で、前記植物を生長させる工程。

【請求項175】

以下の工程を含む、リン脂質含有組成物を加水分解し、分解し又は破壊する方法：(a)請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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)リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び(c)前記ホスホリパーゼが前記リン脂質含有組成物を加水分解し、分解し又は破壊する条件下で、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。

30

【請求項176】

組成物がリン脂質含有脂質二重層又は膜を含む、請求項175の方法。

【請求項177】

組成物が、植物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は動物細胞を含む、請求項175の方法。

40

【請求項178】

以下の工程を含む、リン脂質含有組成物を液化又は除去する方法：(a)請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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)リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び(c)前記ホスホリパーゼが前記リン脂質含有組成物を除去又は液化する条件下で、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。

【請求項179】

請求項65に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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ホスホリパーゼ活性を有する、前記洗剤組成物。

50

【請求項 180】

ホスホリパーゼが非表面活性ホスホリパーゼ又は表面活性ホスホリパーゼである、請求項179の洗剤組成物。

【請求項 181】

ホスホリパーゼが、非水性液状組成物、鑄造固体、凍結乾燥粉末、顆粒形、粒状形、圧縮錠剤、ペレット、ゲル形、エロゾル又はスラリー形である請求項179の洗剤組成物。

【請求項 182】

以下の工程を含む、対象物を洗浄する方法：(a)請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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)対象物を提供する工程；及び(c)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、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の対象物と接触させる工程。 10

【請求項 183】

以下の工程を含む油を脱ガムする方法を提供する：(a)請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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)リン脂質含有脂肪又は油を含む組成物を提供する工程；及び(c)前記ポリペプチドが前記組成物中のリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で、工程(a)のポリペプチドと工程(b)の組成物とを接触させる工程。

【請求項 184】

油含有組成物が植物、動物、藻類又は魚類の油若しくは脂肪を含む、請求項183の方法。 20

【請求項 185】

植物油が、米ぬか油、大豆油、菜種油、トウモロコシ油、ヤシの実の油、キャノーラ油、ヒマワリ油、ゴマ油、又は落花生油を含む、請求項183の方法。

【請求項 186】

ポリペプチドが、油含有組成物中の水和性及び/又は非水和性リン脂質のホスファチドを加水分解する、請求項183の方法。

【請求項 187】

ポリペプチドが、ホスファチドをグリセリルホスホエステル結合で加水分解して、ジグリセリドと水溶性ホスフェート化合物を生成する、請求項183の方法。 30

【請求項 188】

ポリペプチドがホスホリパーゼC活性を有する、請求項183の方法。

【請求項 189】

ポリペプチドがホスホリパーゼD活性を有し、さらにホスファターゼ酵素がまた添加される、請求項183の方法。

【請求項 190】

接触工程が、油中の水和リン脂質の加水分解を含む、請求項183の方法。

【請求項 191】

工程(c)の加水分解条件が、アルカリ性pHで約20 から40 の温度を含む、請求項183の方法。 40

【請求項 192】

アルカリ性条件が、約pH8からpH10のpHを含む、請求項190の方法。

【請求項 193】

工程(c)の加水分解条件が、約3～10分の反応時間を含む、請求項183の方法。

【請求項 194】

工程(c)の加水分解の条件が、約50 から60 の温度で、約pH5からpH6.5のpHで、約pH6からpH7.5のpHで、又は約pH5からpH8.0のpHで、約30から60分の反応時間を用いて、油中の水和性及び非水和性リン脂質を加水分解することを含む、請求項183の方法。

【請求項 195】

ポリペプチドがフィルターに結合され、前記リン脂質含有脂肪又は油が前記フィルターに通される、請求項183の方法。

【請求項196】

ポリペプチドがリン脂質含有脂肪又は油を含む溶液に添加され、続いて前記溶液がフィルターに通される、請求項183の方法。

【請求項197】

以下の工程を含む、非水和性リン脂質を水和可能な形に変換する方法：(a) 請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物を提供する工程；(b) 非水和性リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び(c) 前記ポリペプチドが非水和性リン脂質を水和可能な形に変換する条件下で、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。

10

【請求項198】

ポリペプチドがホスホリパーゼC活性を有する、請求項197の方法。

【請求項199】

ポリペプチドがホスホリパーゼD活性を有し、ホスファターゼ酵素も添加される、請求項197の方法。

【請求項200】

以下の工程を含む、リン脂質含有組成物を苛性アルカリ精製する方法：(a) ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを含む組成物を提供する工程；(b) リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び(c) 苛性アルカリ精製の前、最中又は後で、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。

20

【請求項201】

ポリペプチドがホスホリパーゼC活性を有する、請求項200の方法。

【請求項202】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが、酸又は苛性アルカリの添加前に加えられる、請求項200の方法。

【請求項203】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが苛性アルカリ精製中に添加され、さらにリンのレベル及び遊離脂肪酸のレベルに応じて種々のレベルの酸及び苛性アルカリが添加される、請求項200の方法。

30

【請求項204】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが、苛性アルカリ精製後に、すなわち分離前に強力攪拌機又は維持攪拌機中に；加熱工程に続いて；遠心機に；石鹼ストックに；洗浄水に；又は漂白若しくは脱臭工程時に添加される、請求項200の方法。

【請求項205】

以下の工程を含む、植物ステリン又はトリテルペンを精製する方法：(a) 請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物を提供する工程；(b) 植物ステリン又はトリテルペンを含む組成物を提供する工程；及び(c) 前記ポリペプチドが前記組成物中のリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。

40

【請求項206】

ポリペプチドがホスホリパーゼC活性を有する、請求項205の方法。

【請求項207】

植物ステリン又はトリテルペンが植物ステロールを含む、請求項205の方法。

【請求項208】

植物ステロールが植物油に由来する、請求項207の方法。

【請求項209】

植物油が、ココナッツ油、キャノーラ油、カカオ脂油、トウモロコシ油、綿実油、亜麻

50

仁油、オリーブ油、パーム油、落花生油、米ぬか由来油、紅花油、ゴマ油、大豆油、又はヒマワリ油を含む、請求項208の方法。

【請求項210】

遊離植物ステリン及びフィトステリル脂肪酸エステルを定量的に抽出するための非極性溶媒の使用をさらに含む、請求項205の方法。

【請求項211】

植物ステリン又はトリテルペンが、 α -シトステロール、キャンペステロール、スチグマステロール、スチグマスタノール、 β -シトスタノール、シトスタノール、デスモステロール、カリナステロール、ポリフェラステロール、クリオナステロール又はブラシッカステロールを含む、請求項205の方法。

10

【請求項212】

以下の工程を含む粗油を精製する方法：(a)請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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)リン脂質を含有する油を含む組成物を提供する工程；及び(c)前記ポリペプチドが前記組成物中のリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。

【請求項213】

ポリペプチドがホスホリパーゼC活性を有する、請求項212の方法。

【請求項214】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが、組成物に添加される水溶液に存在する、請求項212の方法。

20

【請求項215】

水のレベルが約0.5から5%の間である、請求項214の方法。

【請求項216】

工程時間が約2時間未満である、請求項214の方法。

【請求項217】

工程時間が約60分未満である、請求項216の方法。

【請求項218】

工程時間が約30分未満、約15分未満又は約5分未満である、請求項217の方法。

【請求項219】

加水分解条件が約25 から70 の間の温度を含む、請求項212の方法。

30

【請求項220】

加水分解条件が苛性アルカリの使用を含む、請求項212の方法。

【請求項221】

加水分解条件が約pH3からpH10の間のpHを含む、請求項212の方法。

【請求項222】

加水分解条件が、乳化剤の添加及び/又は工程(c)の接触後の混合を含む、請求項212の方法。

【請求項223】

水相の分離を促進するために、エマルジョン破壊剤の添加及び/又は加熱若しくは冷却を含む、請求項212の方法。

40

【請求項224】

遠心によってレシチンを採集するために接触工程の前に脱ガムを施し、続いてPLC、PLC及び/又はPLAを添加して非水和性リン脂質を除去する工程を含む、請求項212の方法。

【請求項225】

食用油のために粗油を水で脱ガムしてリンを10ppm未満にし、続いてバイオディーゼル油のために物理的に精製してリンを約50ppm未満のリンにする工程を含む、請求項212の方法。

【請求項226】

酸を添加して非水和性リン脂質の水和を促進する工程を含む、請求項212の方法。

50

【請求項 2 2 7】

以下の工程を含む、油又は脂肪を脱ガムする方法：(a)請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチド(ここで前記ホスホリパーゼ活性はホスホリパーゼD活性を含む)及びホスファターゼ酵素を含む組成物を提供する工程；(b)リン脂質含有脂肪又は油を含む組成物を提供する工程；及び(c)前記ポリペプチドが組成物中のリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で工程(a)のポリペプチドと工程(b)の組成物とを接触させる工程。

【請求項 2 2 8】

請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチド(ここで前記ホスホリパーゼ活性はホスホリパーゼD活性を含む)及びホスファターゼ酵素を含む組成物を提供することを、ホスホリパーゼC活性の等価物を有する組成物。

10

【請求項 2 2 9】

リポ多糖類(LPS)媒介毒性を軽減又は予防する方法であって、請求項65に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に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を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 3 0】

請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドと内毒素を接触させることを含む、内毒素を無毒化する方法。

20

【請求項 2 3 1】

請求項65に記載のポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドと脂質Aを接触させることを含む、脂質Aの2'又は3'脂肪酸鎖を脱アシル化する方法。

【請求項 2 3 2】

ポリペプチドがパタチン活性を有する、請求項231の方法。

【請求項 2 3 3】

パタチンが、配列番号12(配列番号11によってコードされる)、配列番号14(配列番号13によってコードされる)、配列番号18(配列番号17によってコードされる)、配列番号26(配列番号25によってコードされる)、配列番号28(配列番号27によってコードされる)、配列番号34(配列番号33によってコードされる)、配列番号36(配列番号35によってコードされる)、配列番号44(配列番号43によってコードされる)、配列番号46(配列番号45によってコードされる)、配列番号56(配列番号55によってコードされる)、配列番号60(配列番号59によってコードされる)、配列番号66(配列番号65によってコードされる)、配列番号72(配列番号71によってコードされる)、配列番号78(配列番号77によってコードされる)、配列番号87(配列番号86によってコードされる)、配列番号88(配列番号87によってコードされる)、配列番号92(配列番号91によってコードされる)、配列番号96(配列番号95によってコードされる)、配列番号100(配列番号99によってコードされる)、配列番号104(配列番号103によってコードされる)、配列番号126(配列番号125によってコードされる)、配列番号128(配列番号127によってコードされる)、配列番号132(配列番号131によってコードされる)、配列番号134(配列番号133によってコードされる)、配列番号136(配列番号135によってコードされる)、又は配列番号138(配列番号137によってコードされる)に示される配列を有する、請求項232の方法。

30

40

【請求項 2 3 4】

ホスホリパーゼ活性が1以上のホスホリパーゼ活性の組合せを含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

【請求項 2 3 5】

ホスホリパーゼ活性が、PLC及びPLA活性；PLB及びPLA活性；PLC及びPLD活性；PLC及びPLB活性；PLB及びパタチン活性；PLC及びパタチン活性；PLD及びPLA；PLD、PLA、PLB及びP

50

LC活性；又はPLD、PLA、PLB、PLC及びパタチン活性を含む、請求項234の単離又は組換え核酸。

【請求項236】

ホスホリパーゼ活性が、リゾホスホリパーゼ（LPL）活性又はリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性又はリゾホスホリパーゼ（LPL）活性及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性を含む、請求項234の単離又は組換え核酸。

【請求項237】

ホスホリパーゼ活性が、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジリノシトール（PI）及び/又はホスファチジン酸、又はそれらの組合せにおけるグリセロホスフェートエステル結合の加水分解を触媒することを含む、請求項1の単離又は組換え核酸。

10

【請求項238】

ホスホリパーゼ活性が1以上のホスホリパーゼ活性の組合せを含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項239】

ホスホリパーゼ活性が、PLC及びPLA活性；PLB及びPLA活性；PLC及びPLD活性；PLC及びPLB活性；PLB及びパタチン活性；PLC及びパタチン活性；PLD及びPLA；PLD、PLA、PLB及びPLC活性；又はPLD、PLA、PLB、PLC及びパタチン活性を含む、請求項238の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項240】

20

ホスホリパーゼ活性が、リゾホスホリパーゼ（LPL）活性又はリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性又はリゾホスホリパーゼ（LPL）活性及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性を含む、請求項238の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項241】

ホスホリパーゼ活性が、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジリノシトール（PI）及び/又はホスファチジン酸、又はそれらの組合せにおけるグリセロホスフェートエステル結合の加水分解を触媒することを含む、請求項65の単離又は組換えポリペプチド。

【請求項242】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドがPLC活性を有し、中性油を増加させる、請求項183の方法。

30

【請求項243】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドがPLC活性を有し、ジアシルグリセロール（DAG）を増加させて油相に寄与する、請求項183の方法。

【請求項244】

さらに、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、また別のホスホリパーゼ、カーボヒドラーゼ、セルラーゼ、ベクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクトナーゼ、キシナーゼ、オキシダーゼ、例えばラクターゼ及び/又はペルオキシダーゼ、又は等価の活性を有するポリペプチド、又はそれらの組合せを有する1以上のポリペプチドを添加してガム塊をいっそう分解し、油の収量を高めることを含む、請求項183の方法。

40

【請求項245】

加水分解条件がアルカリ性pHを含む、請求項183の方法。

【請求項246】

アルカリ性条件が、PLCによって生成される1,2-DAGの1,3-DAGへの異性化を生じるのに充分である、請求項183の方法。

【請求項247】

さらに、脱ガムの方法によって生成されたガムを硬化剤の添加によって物理的に除去する工程を含む、請求項183の方法。

【請求項248】

50

硬化剤がタルクを含む、請求項247の方法。

【請求項249】

脱ガム油の最終製品が1,3-DAGに富む、請求項183の方法。

【請求項250】

脱ガム油の最終製品が1.0%未満の1,3-DAGを含む、請求項249の方法。

【請求項251】

以下の工程を含む、油の囲い込みを低下させることによりガムの量を減少させて、中性油（トリグリセリド）収量を増加させる方法：（a）請求項65に記載のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物を提供する工程；（b）リン脂質含有脂肪又は油を含む組成物を提供する工程；及び（c）ガムの量を減少させるのに十分な時間、前記ポリペプチドが組成物中のリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で工程（a）のポリペプチド及び工程（b）の組成物を接触させる工程。

10

【請求項252】

タンパク質調製物が、非水性液状組成物、鑄造固体、粉末、凍結乾燥粉末、顆粒形、粒状形、圧縮錠剤、ペレット、ピル、ゲル形、ヒドロゲル、ペースト、エーロゾル、スプレー、ローション、スラリー製剤、水性/油性エマルジョン、クリーム、カプセル、小胞、又はミセル状懸濁物を含む製剤を含む、請求項93のタンパク質調製物。

【請求項253】

組成物とホスホリパーゼ活性を有する本発明の少なくとも1つのポリペプチドとの高せん断混合、それに続く無せん断混合又は低せん断混合を使用して、リン脂質基質とホスホリパーゼとの適切な接触を可能にする工程を含む、請求項175の方法。

20

【請求項254】

苛性アルカリ精製条件が苛性アルカリの濃縮溶液の添加によって生じる、請求項200の方法。

【請求項255】

苛性アルカリの濃縮溶液が11%の工業的標準液よりも濃縮されている、請求項254の方法。

【請求項256】

苛性アルカリの濃縮溶液が約12%から50%濃縮されている、請求項255の方法。

30

【請求項257】

ホスホリパーゼ活性を有する前記ポリペプチドが請求項65に記載の配列を有するか、又は請求項1若しくは請求項24に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、請求項200の方法。

【請求項258】

リン脂質を含む組成物が植物を含む、請求項200の方法。

【請求項259】

ポリペプチドが植物で形質転換的に発現される、請求項200の方法。

【請求項260】

ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが、種子又は他の植物部分を粉砕している間に添加されるか、又は、前記ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが、粉砕した後に又は精製前に添加される、請求項200の方法。

40

【請求項261】

図13に示されるプロセスを含む、請求項200の方法。

【請求項262】

充分な酸が、カルシウム及びマグネシウム金属含有量の低下を促進するために添加される、請求項226の方法。

【請求項263】

宿主細胞での発現が高められたホスホリパーゼコード配列変種を作製する方法であって、1つ、いくつか又は全てのN-結合グリコシル化部位コード配列モチーフが非グリコシル

50

化モチーフに改変されるように、請求項1又は請求項22記載の配列を改変することを含む、前記変種作製方法。

【請求項264】

請求項263の方法によって作製された配列によってコードされる、単離、合成又は組換えホスホリパーゼ。

【請求項265】

プロテアーゼに対する耐性が増したホスホリパーゼをコードするホスホリパーゼコード配列変種を作製する方法であって、配列番号2の131位に相当するアミノ酸を以下の残基、リシン(K)；セリン(S)；グリシン(G)；アルギニン(R)；グルタミン(Q)；アラニン(A)；イソロイシン(I)；ヒスチジン(H)；フェニルアラニン(F)；スレオニン(T)；メチオニン(M)；ロイシン(L)の1つ、いくつか又は全てに改変することを含む、前記変種作製方法。

10

【請求項266】

請求項265の方法によって作製された配列によってコードされる単離、合成又は組換えホスホリパーゼ。

【請求項267】

プロテアーゼに対する耐性が低下したホスホリパーゼをコードするホスホリパーゼコード配列変種を作製する方法であって、配列番号2の131位に相当するアミノ酸を以下の残基、トリプトファン(W)；グルタメート(E)；チロシン(Y)の1つ、いくつか又は全てに改変することを含む、前記変種作製方法。

20

【請求項268】

請求項267の方法によって作製された配列によってコードされる単離、合成又は組換えホスホリパーゼ。

【請求項269】

以下の工程を含む、その活性がグリコシル化によって一過性に不活化される、生物学的活性を有するタンパク質を作製しさらに発現させる方法：(a)生物学的活性を有するタンパク質をコードする核酸を提供する工程(ここで前記タンパク質は天然にはグリコシル化されない)；(b)少なくとも1つのグリコシル化モチーフコード配列を前記タンパク質コード核酸に挿入する工程(ここで前記タンパク質のグリコシル化形は活性をもたない)；(c)前記タンパク質が宿主細胞の分泌経路に誘導されるように、ターゲティング配列を前記タンパク質に挿入する工程(ここで前記宿主細胞は前記グリコシル化モチーフを認識し、前記タンパク質をグリコシル化することができる)；及び(d)前記改変核酸を前記宿主細胞で発現させる工程。

30

【請求項270】

発現されたタンパク質を脱グリコシル化し、よって前記タンパク質の活性を再度活性化する工程をさらに含む、請求項269の方法。

【請求項271】

宿主細胞が真核細胞である、請求項270の方法。

【請求項272】

以下の工程を含むホスホリパーゼCの発現方法：(a) Mut⁺表現型をもつピキア(Pichia)株を提供する工程；(b)異種ホスホリパーゼCコード核酸をピキア株に挿入する工程；及び(c)前記ピキア株をホスホリパーゼCが発現される条件下で培養する工程。

40

【請求項273】

さらに、培養条件に亜鉛を補充することを含む、請求項272の方法。

【請求項274】

ピキア細胞株で機能することができるプロモーターに機能可能に連結された異種ホスホリパーゼCコード核酸を含む Mut⁺表現型を含む、ホスホリパーゼCを発現する細胞系。

【請求項275】

ゼオシン耐性ピキア株細胞を含む、異種タンパク質を発現する細胞系。

【請求項276】

50

以下の工程を含む、異種タンパク質を発現するゼオシン耐性酵母細胞系：(a) 異種タンパク質を発現することができる異種核酸を含むピキア種細胞を提供する工程；(b) 最初の濃度のゼオシンを含む条件下で前記細胞を培養する工程；(c) 最初のゼオシン濃度に耐性を有する細胞を選別し、さらにより高い濃度のゼオシンを含む条件下で再培養する工程；及び(d) より高いゼオシン濃度に対して耐性を有する、工程(c)で培養された細胞を選別する工程。

【請求項277】

異種タンパク質が酵素、又は場合によってホスホリパーゼ、又は場合によってホスホリパーゼC (PLC) である、請求項276のゼオシン耐性酵母細胞系。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般にホスホリパーゼ酵素、前記酵素をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドを製造及び使用する方法に関する。具体的には、本発明は、ホスホリパーゼ活性を有する新規なポリペプチド、前記をコードする核酸及び前記と結合する抗体を提供する。前記ホスホリパーゼの使用を含む工業的方法及び製品もまた提供される。

【背景技術】

【0002】

ホスホリパーゼはリン脂質のエステル結合を加水分解する酵素である。リン脂質の代謝におけるそれらの重要性に対応して、これらの酵素は原核細胞及び真核細胞間に広く存在する。ホスホリパーゼは、生物膜の代謝、構築及び再構成に影響を及ぼし、シグナルカスケードに必要である。リン脂質分子の攻撃される結合の位置にしたがってそれらの特異性が異なる、いくつかのホスホリパーゼタイプが知られている。ホスホリパーゼA1 (PLA1) は、1-位脂肪酸を除去して、遊離脂肪酸及び1-リゾ-2-アシルホスホリピドを生成する。ホスホリパーゼA2 (PLA2) は2-位脂肪酸を除去して、遊離脂肪酸及び1-アシル-2-リゾホスホリピドを生成する。PLA1及びPLA2酵素は、細胞内若しくは細胞外性、膜結合性、又は可溶性でありえる。細胞内PLA2はほとんど全ての哺乳動物細胞で見出される。ホスホリパーゼC (PLC) はホスフェート成分を除去して、1,2ジアシルグリセロール及びリン酸エステルを生成する。ホスホリパーゼD (PLD) は1,2ジアシルグリセロホスフェート及び主成分基を生成する。PLC及びPLDは細胞の機能及びシグナリングにおいて重要である。PLDは生体触媒作用で支配的なホスホリパーゼであった (例えば以下を参照されたい：T. Godfrey and S. West 1996, Industrial enzymology, 200-300, Stockton Press, New York) 。パタチンはまた別のタイプのホスホリパーゼであり、PLAとして作用すると考えられる (例えば以下を参照されたい：HJ firschberg et al. 2002, Eur. J. Biochem. 268(19): 5037-44) 。

20

30

【0003】

一般的な脂肪種子、例えばダイズ、ナタネ、ヒマワリの種子、米ぬか油、ゴマ及び落花生は油の供給源及びフィードストックとして用いられる。油の抽出過程では、前記種子は機械的に及び温度により処理される。溶媒によって油を分離し、ひき割りと分ける。続いて蒸留によって溶媒を油から分離して溶媒を回収する。前記ひき割り中の溶媒内容物を“デソルベンタイザートスター”で熱処理することによって蒸発させ、続いてひき割りを乾燥させ冷却することができる。溶媒を蒸留によって分離した後、得られた生油を特殊な脱ガム工程及び物理的精製によって食用油に加工する。生油はまた脂肪酸及びメチルエステルの製造のためのフィードストックとして利用することもできる。ひき割りは動物の飼料に用いることができる。

40

脱ガムは植物油の精製における最初の工程であり、前記は夾雑ホスファチドを除去するために設計される (ホスファチドは油とともに抽出されるが、以降の油の加工を妨げる) 。これらのホスファチドは無水形においてのみ植物油に可溶性であり、それらは完全に水和されると沈殿し除去することができる。水和は、通常少しの割合の水を実質的に乾燥し

50

た油と持続的に混合することによって達成される。典型的には、水の量はホスファチド含有量（典型的には1から1.5%である）の75%である。温度は非常に重要というわけではないが、ただし水和ガムの分離は、50 から 80 で油の粘度が低下したときに良好である。

【0004】

現在のところ、油の脱ガムのために多くの方法が用いられている。油の脱ガムの過程はホスホリパーゼ酵素を用いることによって酵素的に促進することができる。ホスホリパーゼA1及びA2は、種々の産業的プロセス（例えば“ENZYMAL(商標)脱ガム”（Lurgi Life Science Technologies GmbH, Germany））で油の脱ガムに用いられてきた。ホスホリパーゼC（PLC）もまた、リン脂質に対するその作用によって生成したホスフェート部分が非常に水溶性で除去が容易であり、さらにジグリセリドは油とともに保持され損失が減少するので油の脱ガムのために関心を払われてきた（例えば以下を参照されたい：T. Godfrey and S. West 1996, Industrial enzymology, 299-300, Stockton Press, New York; Dahlke 1998, “An enzymatic process for the physical refining of seed oils”, Chem. Eng. Technol. 21:278-181; Clausen 2001, “Enzymatic oil degumming by a novel microbial phospholipase”, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 103:333-340）。

高ホスファチド油（例えばダイズ、キャノーラ及びヒマワリ）は他の油（例えばヤシ）とは異なる態様で加工される。低ホスファチド油のために蒸気又は“物理的精製”プロセスとは異なり、これらリンの多い油は、リン含有リン脂質の除去のために特殊な化学的及び機械的処理を必要とする。これらの油は、典型的には、遊離脂肪酸を中和して石鹼及び不溶性ガム分画を生成することを必要とするプロセスで化学的に精製される。中和プロセスは遊離脂肪酸及びリン脂質の除去には高度に有効であるが、顕著な収量低下もまたもたらし、さらに品質を犠牲にする。いくつかの事例では、高ホスファチドの不純油は、苛性アルカリ中和の前の工程で脱ガムされる。レシチンのために利用される大豆油の場合がこれで、この場合、油は先ず初めに水又は酸により脱ガムされる。

【0005】

植物ステリン（植物ステロール）は天然の生成物の“トリテルペン”類のメンバーである。前記には100を超える異なる植物ステリンが含まれ、さらに4000を超える他のタイプのトリテルペンが含まれる。一般的に、植物ステリンは、ステロール/リン脂質比を高めて膜の剛性化（rigidification）をもたらし植物の膜を安定化させると考えられる。化学的には、植物ステリンは、コレステロールとその構造において極めて類似し、植物膜における膜流動性を動物膜におけるコレステロールのように調節すると考えられる。主要な植物ステリンは、 β -シトステロール、キャンペステロール及びスチグマステロールである。その他のものには、スチグマスタノール（ β -シトスタノール）、シトスタノール、デスモステロール、ジヒドロブラッシカステロール、カリナステロール、ポリフェラステロール、クリオナステロール及びブラッシカステロールが含まれる。

植物ステロールは、健康及び栄養産業のための重要な農産物である。それらは化粧品製造業者にとって有用な乳化剤であり、さらにホルモン医薬の製造のために大半のステロイド中間体及び前駆体を供給する。植物ステリンの飽和類似体及びそれらのエステルは、心臓の健康に関して利点がある効果的なコレステロール低下剤として提唱されてきた。植物ステロールは、小腸管腔内のコレステロール吸収を抑制することによって血清コレステロールレベルを低下させ、さらに極めて低濃度で免疫調節特性（Tリンパ球の細胞性応答及び癌細胞株に対するナチュラルキラー細胞の細胞障害性能力の強化を含む）を有する。さらにまた、それらの治療効果は、肺結核、慢性関節リウマチの治療の臨床試験、HIV侵襲患者の管理及びマラソン走者の免疫ストレスの抑制で示された。

【0006】

植物ステロールエステル（植物ステリンエステルとも称される）は、米国食品医薬局（FDA）によりGRAS（全般的に安全と認識される（Generally Recognized As Safe））として1999年にマーガリン及びスプレッドでの使用が承認された。2000年9月に、FDAはまた、植物ステリンエステルを含む食品の健康を標榜する標識を容認する暫定規則を発令した。したがって、植物ステリンエステルによる食品の強化は消費者の支持のために強く所望さ

10

20

30

40

50

れる。

大豆油は広く用いられ、重要な食品であり、種子及び果実から生産される油の約30%を占める。ダイズは20%しか油を含有せず、抽出は通常、産業規模では溶媒（例えばヘキサン）を用いて実施される。大豆油の品質の評価及びひき割りタンパク質の栄養価によってダイズは第一位の脂肪種子とされる。油の効率的な溶媒抽出には油細胞の各々が破壊され物質移動が改善されることが必要であるので、抽出前にダイズを洗浄し、破碎し、薄片化しなければならない。細胞壁はほとんどセルロースで構成され、ヘミセルロース、ペクチン性物質及びリグニンが結合しており、抽出収量及び抽出率の顕著な改善を達成するためには酵素の手段によってもまた破壊することが可能であろう。

ジアシルグリセロール（DAG）油は、天然の脂肪酸よりも80%以上のDAG量を含む食用油である。食後のカイロミクロンのトリグリセリドの上昇は、類似の脂肪酸組成を有するTAG油と比較してDAG油のエマルジョンの摂取後には顕著に低いことがヒトで示された。日本人男性及びアメリカ人の男女を用いた実験で、長期のDAG油の消費は体重減少及び体脂肪減少を促進した。ある実験では、通常の料理油をDAG油で代用することによって、肥満及び他の危険因子の発生率が低下する。

【発明の開示】

【0007】

発明の要旨

本発明は、本発明の例示的核酸、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173と、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、2000、2050、2100、2200、2250、2300、2350、2400、2450、2500、又はそれより大きい残基の領域にわたって、少なくとも約50%、51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な（100%）配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供し、さらにある特徴では、前記核酸は、ホスホリパーゼ（PL）活性、例えばホスホリパーゼA、C若しくはD活性、又はホスホリパーゼ活性（例えばPLA、PLC及び/又はPLD活性）の任意の組合せを多機能活性として有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする。ある特徴では、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。

【0008】

本発明は、配列番号1と、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850より多い連続する残基の領域にわたって、少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、

10

20

30

40

50

87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供し、さらにある特徴では、前記核酸は、ホスホリパーゼ(PL)活性、例えばホスホリパーゼA、C若しくはD活性、又はホスホリパーゼ活性(例えばPLA、PLC及び/又はPLD活性)の任意の組合せを多機能活性として有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする。ある特徴では、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。

本発明は、配列番号3と、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850又はそれより多い残基の領域にわたって、少なくとも78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供し、さらにある特徴では、前記核酸は、ホスホリパーゼ(PL)活性、例えばホスホリパーゼA、C若しくはD活性、又はホスホリパーゼ活性(例えばPLA、PLC及び/又はPLD活性)の任意の組合せを多機能活性として有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする。ある特徴では、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。

10

【0009】

本発明は、配列番号5と、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850又はそれより多い残基の領域にわたって、少なくとも78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供し、さらにある特徴では、前記核酸は、ホスホリパーゼ(PL)活性、例えばホスホリパーゼA、C若しくはD活性、又はホスホリパーゼ活性(例えばPLA、PLC及び/又はPLD活性)の任意の組合せを多機能活性として有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする。ある特徴では、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。

20

本発明は、配列番号7と、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850又はそれより多い残基の領域にわたって、少なくとも50%、51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む単離又は組換え核酸を提供し、さらにある特徴では、前記核酸は、ホスホリパーゼ(PL)活性、例えばホスホリパーゼA、C若しくはD活性、又はホスホリパーゼ活性(例えばPLA、PLC及び/又はPLD活性)の任意の組合せを多機能活性として有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする。ある特徴では、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。

30

40

【0010】

また別の特徴では、前記単離又は組換え核酸は、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11

50

2、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、又は配列番号174に示される配列を含むポリペプチドをコードする。ある特徴では、これらのポリペプチドは、ホスホリパーゼ活性、例えばホスホリパーゼA、B、C若しくはD活性、又はホスホリパーゼ活性（例えばPLA、PLC及び/又はPLD活性）の任意の組合せを多機能活性として有する。

ある特徴では、前記配列比較アルゴリズムはBLASTアルゴリズム、例えばBLASTバージョン2.2.2アルゴリズムである。ある特徴では、フィルタリング設定はblastall -p blastp d "nr pataa" F F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。

10

【0011】

ある特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は、グリセロホスフェートエステル結合の加水分解（すなわち、グリセロホスフェートエステル結合の切断）の触媒を含む。前記ホスホリパーゼ活性は、植物油中のリン脂質のエステル結合の加水分解の触媒を含むことができる。前記植物油のリン脂質は、脂肪種子のリン脂質を含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性は、ホスホリパーゼC（PLC）活性；ホスホリパーゼA（PLA）活性、例えばホスホリパーゼA1又はホスホリパーゼA2活性；ホスホリパーゼD（PLD）活性、例えばホスホリパーゼD1又はホスホリパーゼD2活性；ホスホリパーゼB（PLB）活性、例えばホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性；又はパタチン活性、又は前記の組合せを含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性は、糖タンパク質（例えばジャガイモの塊茎で見出される糖タンパク質）の加水分解を含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性はパタチン酵素活性を含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性は脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）活性を含むことができる。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは、多機能活性、例えば本明細書に記載の酵素活性の1以上の組合せを有することができる。例えば、本発明のホスホリパーゼは、PLC及びPLA活性；PLB及びPLA活性；PLC及びPLD活性；PLC及びPLB活性；PLB及びパタチン活性；PLC及びパタチン活性；PLDおよびPLA活性；PLD、PLA、PLB及びPLC活性；又はPLD、PLA、PLB、PLC及びパタチン活性；又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性、又は前記の任意の組合せを有することができる。

20

30

【0012】

例えば、ある特徴では、本発明のポリペプチドは酵素的に活性であるが、リパーゼ活性を欠く。例えば前記は中性油（トリグリセリド）分画に影響を与えるいずれかの酵素活性を欠く。そのようなポリペプチドを具体的なプロセス、例えば脱ガムプロセスで用いることを所望することができる（前記プロセスでは、中性油分画は損なわれない（減少しない、例えば加水分解されない）ことが重要である）。したがって、ある特徴では、本発明は、ホスホリパーゼ活性を有するがリパーゼ活性は有しない本発明のポリペプチドの使用を含む脱ガムの方法を提供する。

40

ある特徴では、前記単離又は組換え核酸は、熱安定性のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記ポリペプチドは、約20 から約30 、約25 から約40 、約37 から約95 、約55 から約85 、約70 から約95 、又は約90 から約95 の間の温度範囲を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持することができる。別の特徴では、前記単離及び組換え核酸は、耐熱性のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記ポリペプチドは、37 を超える温度から約95 の範囲の温度、又は約55 を超える温度から約85 の範囲のいずれかの温度に暴露された後ホスホリパーゼ活性を保持することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、90 を超える温度から約95 の範囲

50

のいずれかの温度にpH4.5で暴露された後ホスホリパーゼ活性を保持する。

前記ポリペプチドは、約pH8、pH7.5、pH7、pH6.5、pH6.0、pH5.5、pH5、又はpH4.5を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持することができる。前記ポリペプチドは、約40 から約70 の間の温度範囲を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持することができる。

【0013】

ある特徴では、前記単離又は組換え核酸は、ストリンジントな条件下で、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に示す配列とハイブリダイズする配列を含み、ここで前記核酸はホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。前記核酸は、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850残基の長さ又は本明細書に記載の遺伝子若しくは転写物の完全長であることができ、シグナル配列を含むか又は含まない。前記ストリンジントな条件は、本明細書に記載の高ストリンジント条件でも、中等度のストリンジント条件でも、又は低ストリンジント条件でもよい。前記ストリンジントな条件は、洗浄工程、例えば0.2×SSC中で約65 の温度で15分間の洗浄を含む洗浄工程を含むことができる。

10

20

【0014】

本発明は、ホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼ）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する。ここで前記プローブは、本発明の配列、例えば配列番号1、配列番号3、配列番号5又は配列番号7の配列の少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850又はそれより大きい連続する塩基を含み、さらに前記プローブは結合又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。前記プローブは、配列番号1、配列番号3、配列番号5及び/又は配列番号7に示す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、又は約60から100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。

30

本発明は、ホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼ）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する。ここで前記プローブは、本発明の核酸、例えば配列番号1、配列番号3、配列番号5及び/又は配列番号7、又はその部分配列と、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850又はそれより大きい連続する塩基にわたって、少なくとも50%、51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な（100%）配列同一性を有する核酸を含み、さらにある特徴では、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムによる分析によって、又は目視検査によって決定される。

40

50

【0015】

本発明は、ホスホリパ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、ここで前記プライマー対は、本発明の配列、又はそのフラグメント若しくは部分配列を含む核酸を増幅させることができる。前記増幅プライマー配列対の各々又はその各メンバーは、前記配列の少なくとも約10から50の連続する塩基、又は前記配列の10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25、又はそれより大きい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。

本発明は増幅プライマー対を提供し、ここで前記プライマー対は、本発明の核酸の最初の（5'の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25、又はそれより大きい残基によって示される配列をもつ第一のメンバー、及び前記第一のメンバーの相補鎖の最初の（5'の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25、又はそれより大きい残基によって示される配列をもつ第二のメンバーを含む。 10

本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いる増幅、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生成されたホスホリパーゼを提供する。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いる増幅、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってホスホリパーゼを生成する方法を提供する。ある特徴では、前記増幅プライマー対は、ライブラリー、例えば遺伝子ライブラリー（例えば環境ライブラリー）から核酸を増幅する。

本発明は、ホスホリパ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する。前記方法は、本発明の核酸配列又はそのフラグメント若しくは部分配列を増幅することができる増幅プライマー配列対を用いて鋳型核酸を増幅する工程を含む。前記増幅プライマー対は本発明の増幅プライマー対でありうる。 20

【0016】

本発明は、本発明の核酸又はその部分配列を含む発現カセットを提供する。ある特徴では、前記発現カセットは、プロモーターに機能的に連結された前記核酸を含むことができる。前記プロモーターは、ウイルスプロモーター、細菌プロモーター、哺乳動物プロモーター、又は植物プロモーターでありうる。ある特徴では、前記植物プロモーターは、ジャガイモ、イネ、トウモロコシ、コムギ、タバコ又はオオムギのプロモーターでありうる。前記プロモーターは構成的プロモーターでありうる。前記構成的プロモーターはCaMV35Sを含むことができる。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ありうる。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、又は環境調節若しくは 30
は発育調節プロモーターでありうる。したがって、前記プロモーターは、例えば種子特異的、葉特異的、根特異的、茎特異的、又は器官脱離誘導プロモーターでありうる。ある特徴では、前記発現カセットはさらに植物発現ベクター又は植物ウイルス発現ベクターを含むことができる。

本発明は、本発明の発現カセット（例えばベクター）又は本発明の核酸を含むクローニングビヒクルを提供する。前記クローニングビヒクルは、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又は人工染色体でありうる。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又はアデノ関連ウイルスベクターを含むことができる。前記クローニングビヒクルは、細菌人工染色体（BAC）、プラスミド、バクテリオファージP1-誘導ベクター（PAC）、酵 40
母人工染色体（YAC）、又は哺乳動物人工染色体（MAC）を含むことができる。

【0017】

本発明は、本発明の核酸、又は本発明の発現カセット（例えばベクター）、又は本発明のクローニングビヒクルを含む形質転換細胞を提供する。ある特徴では、前記形質転換細胞は細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は植物細胞でありうる。ある特徴では、前記植物細胞はジャガイモ、コムギ、イネ、トウモロコシ、タバコ又はオオムギ細胞でありうる。

本発明は、本発明の核酸又は本発明の発現カセット（例えばベクター）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、ラット、ウシ、ヒツジ又は別の哺乳動物である。 50

本発明は、本発明の核酸又は本発明の発現カセット（例えばベクター）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、前記トランスジェニック植物は、トウモロコシの草木、ジャガイモの草木、タバコの草木、トマトの草木、コムギの草木、脂肪種子の草木、アブラナ、ダイズの草木、オオムギの草木又はタバコの草木でありうる。本発明は、本発明の核酸又は本発明の発現カセット（例えばベクター）を含むトランスジェニック種子を提供する。前記トランスジェニック種子は、トウモロコシの種子、コムギの穀粒、ジャガイモの草木、タバコの草木、トマトの草木、脂肪種子の草木、ナタネ（キャノーラの草木）、ダイズの種子、ヤシの実、ヒマワリの種子、ゴマの種子、落花生、コメ、又はタバコの種子でありうる。

【0018】

10

本発明は、本発明の核酸に対して相補的であるか、又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提供する。本発明は、ホスホリパーゼメッセージの翻訳を細胞内で阻害する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸に対して相補的であるか、又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、又は細胞で発現させることを含む。

本発明は、本発明の核酸に対して相補的であるか、又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提供する。本発明は、ホスホリパーゼメッセージの翻訳を細胞内で阻害する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸に対して相補的であるか、又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、又は細胞で発現させることを含む。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、約60から100、約70から110、又は約80から120塩基でありえる。

20

本発明は、ホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼ）のメッセージの翻訳を細胞内で阻害する方法を提供する。前記方法は、本発明の核酸に対して相補的であるか、又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、又は細胞で発現させることを含む。本発明は、本発明の配列の部分配列を含む二本鎖阻害性RNA（RNAi）分子を提供する。ある特徴では、前記RNAiは、長さが約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25又はそれより大きい二重鎖ヌクレオチドである。本発明は、ホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼ）の発現を細胞内で阻害する方法を提供する。前記方法は、二本鎖阻害性RNA（RNAi）を細胞に投与するか、又は細胞で発現させることを含む、ここで前記RNAは本発明の配列の部分配列を含む。

30

【0019】

本発明は、本発明の例示的なポリペプチド又はペプチド（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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、又は配列番号174）と、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、80

40

50

、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、400、450、500、550、600、又はそれより大きい残基、又は前記ポリペプチドの完全長にわたって、少なくとも約50%、51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又は組換えポリペプチドを提供し、さらにある特徴では、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。

【0020】

ある特徴では、本発明は、配列番号2と少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又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、配列番号4と少なくとも約78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又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、配列番号6と少なくとも約78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又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、配列番号8と少なくとも約50%、51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いか、又は完全な(100%)配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又は組換えポリペプチドを提供する。

【0021】

本発明は、本発明の核酸によってコードされる単離又は組換えポリペプチドを提供する。また別の特徴では、前記ポリペプチドは、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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、又は配列番号174に示す配列を有することができる。前記ポリペプチドは、ホスホリパーゼ活性、例えばホスホリパーゼA、B、C若しくはD活性、又はホスホリパーゼ活性(例えばPLA、PLC及び/又はPLD活性)の任意の組合せを多機能活性として有することができる。例えば、ある特徴では、本発明のポリペプチドは酵素的に活性であるが、リパーゼ活性を欠き、例えば中性油(トリグリセリド)分画に影響を与えるいずれかの酵素活性を欠く。ある特徴では、本発明は、ホスホリパーゼ活性は有するが、リパーゼ活性はもたない本発明のポリペプチドの使用を含む脱ガムプロセスを提供し、それによって前記脱ガムプロセスでは、いずれ

10

20

30

40

50

の中性油分画も損なわれない（減少せず、変化せず、分解しない、例えば加水分解されない）。

【0022】

本発明は、シグナル配列を欠く本発明のポリペプチドを含む単離又は組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、前記シグナル配列を欠くポリペプチドは、配列番号2の残基30から287と少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い配列同一性を有するか、配列番号4の残基25から283と少なくとも78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い配列同一性を有するアミノ酸配列であるか、配列番号6の残基26から280と少なくとも約78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い配列同一性を有するアミノ酸配列であるか、又は、配列番号8の残基40から330と少なくとも約50%、51%、52%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い配列同一性を有するアミノ酸配列である。

10

本発明のまた別の特徴は、本発明のポリペプチド若しくはペプチド配列の少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は100、又はそれより大きい連続する塩基、前記と実質的に同一の配列及び前記と相補的な配列を含む単離又は組換えポリペプチド若しくはペプチドを提供する。前記ペプチドは、例えば免疫原性フラグメント、モチーフ（例えば結合部位）又は活性部位であるうる。

20

【0023】

ある特徴では、本発明の単離又は組換えポリペプチド（シグナル配列を含むもの、含まないもの）はホスホリパーゼ活性を有する。ある特徴では、前記ホスホリパーゼ活性はグリセロホスフェートエステル結合の加水分解（すなわちグリセロホスフェートエステル結合の切断）の触媒を含む。前記ホスホリパーゼ活性は、植物油中のリン脂質におけるエステル結合の加水分解の触媒を含むことができる。前記植物油のリン脂質は脂肪種子のリン脂質を含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性は、ホスホリパーゼC（PLC）活性；ホスホリパーゼA（PLA）活性、例えばホスホリパーゼA1又はホスホリパーゼA2活性；ホスホリパーゼD（PLD）活性、例えばホスホリパーゼD1又はホスホリパーゼD2活性；ホスホリパーゼB（PLB）活性、例えばホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性；又はパタチン活性、又は前記の組合せを含むことができる。例えば、ある特徴では、ホスホリパーゼは、本明細書に記載の酵素活性の1以上の組合せを含む。例えば、ホスホリパーゼは、PLC及びPLA活性；PLB及びPLA活性；PLC及びPLD活性；PLC及びPLB活性；PLB及びパタチン活性；PLC及びパタチン活性；PLDおよびPLA活性；PLD、PLA、PLB及びPLC活性；又はPLD、PLA、PLB、PLC及びパタチン活性；又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性又はホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼ（LPL）活性及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性、又は前記の任意の組合せを有することができる。

30

40

【0024】

前記ホスホリパーゼ活性は、糖タンパク質、例えばジャガイモの塊茎で見出される糖タンパク質の加水分解を含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性はパタチン酵素活性を含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性は脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）活性を含むことができる。

ある特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は熱安定性である。前記ポリペプチドは、約20

50

から約30、約25から約40、約37から約95、約55から約85、約70から約95、又は約90から約95の間の温度範囲を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持することができる。別の特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は耐熱性でありえる。前記ポリペプチドは、37を超える温度から約95の範囲の温度、又は約55を超える温度から約85の範囲のいずれかの温度に暴露された後ホスホリパーゼ活性を保持することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、90を超える温度から約95の範囲の温度にpH4.5で暴露された後ホスホリパーゼ活性を保持する。

ある特徴では、前記ポリペプチドは、約pH6.5、pH6、pH5.5、pH5、pH4.5又はpH4又はそれより低いpH(より酸性)を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、約pH7、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9、pH9.5、pH10、pH10.5又はpH11、又はそれより高いpH(より塩基性)を含む条件下でホスホリパーゼ活性を保持することができる。

10

ある特徴では、前記単離又は組換えポリペプチドは、シグナル配列を欠く本発明のポリペプチドを含むことができる。ある特徴では、前記単離又は組換えポリペプチドは、異種のシグナル配列、例えば異種のホスホリパーゼ又は非ホスホリパーゼシグナル配列を含む本発明のポリペプチドを含むことができる。

【0025】

本発明は、配列番号2の残基1から29と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高い配列同一性、配列番号4の残基1から24と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高い配列同一性、配列番号6の残基1から25と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高い配列同一性、又は配列番号8の残基1から39と、及び配列表に示す他のシグナル配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高い配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離又は組換えペプチドを提供し、ここで、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。これらのペプチドは、その内因性ホスホリパーゼに対して、別のホスホリパーゼに対し、又は異種タンパク質に対し(非ホスホリパーゼ酵素又は他のタンパク質)シグナル配列として作用することができる。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列を含む第一のドメイン及び少なくとも第二のドメインを含むキメラタンパク質を提供する。前記タンパク質は融合タンパク質でありうる。前記第二のドメインは酵素を含むことができる。前記酵素はホスホリパーゼでありうる。

30

本発明は、本発明のシグナルペプチド(SP)又は本発明のホスホリパーゼの触媒ドメイン(CD)若しくは活性部位を含む少なくとも第一のドメイン、及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含むキメラポリペプチドを提供し、ここで前記異種ポリペプチド又はペプチドは天然の状態では前記シグナルペプチド(SP)又は触媒ドメイン(CD)と結合していない。ある特徴では、前記異種ポリペプチド又はペプチドはホスホリパーゼではない。前記異種ポリペプチド又はペプチドは、前記シグナルペプチド(SP)又は触媒ドメイン(CD)のアミノ末端であっても、カルボキシ末端であっても又は両方の末端にあってもよい。

【0026】

本発明は、キメラポリペプチドをコードする単離又は組換え核酸を提供し、ここで前記キメラポリペプチドは、シグナルペプチド(SP)又は本発明のポリペプチドの触媒ドメイン(CD)若しくは活性部位を含む少なくとも第一のドメイン、及び異種ポリペプチド又はペプチドを含む少なくとも第二のドメインを含み、ここで前記異種ポリペプチド又はペプチドは天然の状態では前記シグナルペプチド(SP)又は触媒ドメイン(CD)と結合していない。

40

ある特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は、約37で約10ユニット/mgタンパク質から約100ユニット/mgタンパク質の範囲の比活性を含む。別の特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は、約100ユニット/mgタンパク質から約1000ユニット/mgタンパク質、約500ユニット/mgタンパク質から約750ユニット/mgタンパク質の比活性を含む。また別には、前記ホスホリパーゼ活性は、37で約100から約500ユニット/mgタンパク質の範囲の比活性を含む

50

。ある特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は、37 で約500から約1200ユニット/mgタンパク質の範囲の比活性を含む。また別の特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は、37 で約750から約1000ユニット/mgタンパク質の範囲の比活性を含む。また別の特徴では、前記耐熱性は、高温に加熱した後、37 でのホスホリパーゼの比活性の少なくとも半分の保持を含む。また別には、前記耐熱性は、高温に加熱した後、約500から約1200ユニット/mgタンパク質の範囲の37 での比活性の保持を含むことができる。

【0027】

本発明は、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む、本発明の単離又は組換えポリペプチドを提供する。ある特徴では、グリコシル化はN-結合グリコシル化でありうる。ある特徴では、前記ポリペプチドは、*P. pastris* (pastris) 又は*S. pombe* (pombe) での発現後にグリコシル化することができる。 10

本発明は、ホスホリパーゼ酵素及び前記をコードする核酸を提供する。前記は、上記に記載されるように、1つ若しくは2つ以上又は全てが変異したグリコシル化部位をもつ本発明の例示的ホスホリパーゼのいずれかの配列を有する。したがって、本発明は、宿主細胞で発現が増加した変種ホスホリパーゼコード配列を製造する方法を提供し、ここで前記方法は、モチーフをコードする1つ、いくつか又は全てのN-結合グリコシル化部位を非グリコシル化モチーフに改変できるように、本発明のホスホリパーゼコード配列を改変することを含む。本発明はまた、前記方法で製造したホスホリパーゼコード配列及び前記がコードする酵素を提供する。

本発明は、プロテアーゼに対する耐性が増したホスホリパーゼをコードするホスホリパーゼコード配列を製造する方法を提供する。前記方法は、配列番号2の131位に相当するアミノ酸を以下の残基の1つ、いくつか又は全てに改変することを含む：リシン(K)；セリン(S)；グリシン(G)；アルギニン(R)；グルタミン(Q)；アラニン(A)；イソロイシン(I)；ヒスチジン(H)；フェニルアラニン(F)；スレオニン(T)；メチオニン(M)；ロイシン(L)。前記変種ホスホリパーゼは、これら例示的改変を有する配列番号2の変種(及び前記をコードする核酸)を含む。本発明はまた、この方法によって製造した配列によりコードされる単離、合成又は組換えホスホリパーゼを提供する。 20

【0028】

本発明は、プロテアーゼに対する耐性が低下したホスホリパーゼをコードする、変種ホスホリパーゼコード配列を製造する方法を提供する。前記方法は、配列番号2の131位に相当するアミノ酸を以下の残基の1つ、いくつか又は全てに改変することを含む：トリプトファン(W)；グルタメート(E)；チロシン(Y)。これら例示的改変を有する配列番号2の変種(及び前記をコードする核酸)を含む。本発明はまた、この方法によって製造した配列によりコードされる単離、合成又は組換えホスホリパーゼを提供する。 30

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し、ここで前記タンパク質調製物は、液体、固体又はゲルを含む。

本発明は、本発明のポリペプチド及び第二のタンパク質又はドメインを含むヘテロダイマーを提供する。前記ヘテロダイマーの第二のメンバーは異なるホスホリパーゼ、異なる酵素又は別のタンパク質でありうる。ある特徴では、前記第二のドメインはポリペプチドであり、前記ヘテロダイマーは融合タンパク質でありうる。ある特徴では、前記第二のドメインはエピトープ又はタグでありうる。ある特徴では、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。 40

本発明は、ホスホリパーゼ活性をもつ固定されたポリペプチドを提供し、ここで、前記ポリペプチドは、本発明のポリペプチド、本発明の核酸によってコードされたポリペプチド、又は本発明のポリペプチド及び第二のドメインを含むポリペプチド(例えば融合タンパク質)を含む。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、細胞、小胞、リポソーム、フィルム、メンブレン、金属、樹脂、ポリマー、ガラス、マイクロ電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、クリスタル、錠剤、ピル、カプセル、散剤、集塊、表面、多孔性構造物、アレイ又はキャピラリー管上に固定される。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、穀粒、さや、樹皮、皮膚、毛髪、エナメル、骨、殻、及び前記から誘導した物 50

質、又は動物の飼料物質又は前記の組合せに固定される。

【0029】

本発明のポリペプチド（例えばホスホリパーゼ）はまた、単独でも又はホスホリパーゼの混合物若しくはホスホリパーゼと他の加水分解酵素（例えばセルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ又はレドックス酵素、例えばラッカーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、オキシダーゼ又はレダクターゼ）との混合物として提供することができる。それらは、固体形（例えば散剤、凍結乾燥調製物、顆粒、バー、クリスタル、カプセル、ピル、ペレット）、又は液状形（例えば水溶液、エーロゾル、ゲル、ペースト、スラリー、水性/油性エマルジョン、クリーム、カプセル、小胞状又はミセル状懸濁物）として製剤化することができる。ある特徴では、本発明のこれら製剤は、任意の以下の成分又はそれらの組合せを含むことができる：ポリオール、例えばポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、グリセロール；糖、例えばシュクロース、ソルビトール、トレハロース、グルコース、フラクトース、マルトース；ゲル化剤、例えばグアガム、カラゲナン、アルギネート、デキストラン、セルロース誘導体、ペクチン；塩、例えば塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、脂肪酸の塩及びそれらの誘導体；金属キレーター、例えばEDTA、EGTA、クエン酸ナトリウム；抗菌剤、例えば脂肪酸、その誘導体、パラベン、ソルベート、ベンゾエート；プロテアーゼの影響を阻止する更なる化合物、例えばバルクタンパク質（例えばBSA、コムギの水解物、ハウ酸化合物）；乳化剤、例えば非イオン性及びイオン性界面活性剤（前記は単独でも組合わせても使用できる）；植物ステリン；ビタミン；アミノ酸；還元剤、例えばシステイン；又は抗酸化剤、例えばアスコルビン酸も分散剤と同様に用いることができる。

10

20

【0030】

ある特徴では、架橋及びタンパク質改変（例えばペジル化、脂肪酸改変及びグリコシル化）を用いて、本発明のポリペプチドの安定性（例えば酵素の安定性）が改善される。ある特徴では、ポリオール及び/又は糖は、製剤の約5%から約60%若しくはそれ以上、製剤の約10%から約50%、製剤の約20%から約40%、又は製剤の約5%から約20%を構成する。別の特徴では、ゲル化剤は、製剤の約0.5%から約10%、製剤の約1%から約8%、製剤の約2%から約5%、又は製剤の約0.5%から約3%を構成する。また別の特徴では、塩（例えば塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム及び/又は塩化マグネシウムは、製剤の約1%から約30%、製剤の約2%から約20%、製剤の約5%から約15%、又は製剤の約1%から約10%を構成する。また別の特徴では、塩化亜鉛は、約0.1mMから約20mM、約0.5mMから約10mM、約1mMから約5mM、又は約0.1mMから約5mMを構成する濃度で製剤中に存在する。さらに別の特徴では、硫酸亜鉛は、約0.1mMから約20mM、約0.5mMから約10mM、約1mMから約5mM、又は約0.1mMから約5mMを構成する濃度で製剤中に存在する。また別の特徴では、脂肪酸の塩及び/又はそれらの誘導体は、製剤の約5%から約40%、製剤の約10%から約30%、製剤の約15%から約25%、又は製剤の約5%から約20%を構成する。また別の特徴では、金属キレーター（例えばEDTA、EGTA及び/又はクエン酸ナトリウム）は、約0.1mMから約10mM、約0.5mMから約8mM、約1mMから約5mM、又は約0.1mMから約1mMを構成する濃度で製剤中に存在する。また別の特徴では、抗菌剤（例えばパラベン、ソルベート及び/又はベンゾエート）は、製剤の約0.01%から約10%、製剤の約0.05%から約5%、製剤の約0.1%から約1%、又は製剤の約0.05%から約0.5%を構成する。さらに別の特徴では、バルクタンパク質（例えばBSA及び/又はコムギ水解物）は、製剤の約1%から約20%、製剤の約5%から約15%、製剤の約2.5%から約7.5%、又は製剤の約1%から約5%を構成する。また別の特徴では、乳化剤（例えば非イオン性及び/又はイオン性界面活性剤）は、約1Xの臨界ミセル濃度（CMC）から約10XのCMC、約2.5XのCMCから約7.5XのCMC、約1XのCMCから約5XのCMC、又は約3XのCMCから約6XのCMCを構成する濃度で製剤中に存在する。また別の特徴では、ビタミン、アミノ酸、還元剤及び/又は抗酸化化合物は、製剤の約0.1%から約5%、製剤の約0.5%から約4%、製剤の約1%から約2.5%、又は製剤の約0.1%から約1%を構成する。

30

40

【0031】

50

本発明は、固定されたポリペプチドを含むアレイを提供し、ここで前記ポリペプチドは本発明のホスホリパーゼ又は本発明の核酸によってコードされるポリペプチドである。本発明は、本発明の固定核酸を含むアレイを提供する。本発明は、本発明の固定抗体を含むアレイを提供する。

本発明はまた、本発明のポリペプチド又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又は組換え抗体を提供する。前記抗体は、モノクローナル抗体でも又はポリクローナル抗体でもよい。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、以下の工程を含む、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを単離又は特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；及び(c) 前記抗体が前記ポリペプチドと特異的に結合する条件下で工程(b)のサンプルを工程(a)の抗体と接触させ、それによってホスホリパーゼを単離又は同定する工程。本発明は抗ホスホリパーゼ抗体を製造する方法を提供する。前記方法は、非ヒト動物に本発明の核酸又は本発明のポリペプチドを、液性免疫応答を生じさせるために十分な量で投与し、それによって抗ホスホリパーゼ抗体を生成する工程を含む。

10

【0032】

本発明は、以下の工程を含む組換えポリペプチドを生成する方法を提供する：(a) プロモーターに機能的に連結された本発明の核酸を提供する工程；及び(b) 前記ポリペプチドの発現を可能にする条件下で工程(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生成する工程。前記核酸は、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも85%の配列同一性を有するか、配列番号3と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、配列番号5と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、配列番号7と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含むことができ、ここで、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。前記核酸は、配列番号1に示す核酸又はその部分配列；配列番号3に示す配列又はその部分配列；配列番号5に示す配列又はその部分配列；配列番号7に示す配列又はその部分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核酸を含むことができる。前記方法は、さらに、工程(a)の核酸で宿主細胞を形質転換し、続いて工程(a)の核酸を発現させ、それによって組換えポリペプチドを形質転換細胞で生成する工程を含むことができる。前記方法はさらに、非ヒト宿主動物に工程(a)の核酸を挿入し、続いて工程(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非ヒト宿主動物で生成する工程を含むことができる。

20

30

【0033】

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパ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、又は本発明の核酸によってコードされるポリペプチド、又はそのフラグメント若しくは変種を提供する工程；(b) ホスホリパーゼ基質を提供する工程；及び(c) 工程(a)のポリペプチド又はそのフラグメント若しくは変種を工程(b)の基質と接触させて、基質の量の増加又は反応生成物の量の減少を検出する工程、ここで基質の量の減少又は反応生成物の量の増加によってホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドが検出される。また別の特徴では、前記核酸は、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも85%の配列同一性を有するか、配列番号3と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、配列番号5と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、配列番号7と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含み、ここで、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。また別の特徴では、前記核酸は、配列番号1に示す配列又はその部分配列；配列番号3に示す配列又はその部分配列；配列番号5に示す配列又はその部分配列；配列番号7に示す配列又はその部分配列とストリンジェントな条件下でハイブ

40

50

リダイズする。

【0034】

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパ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又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) 被検基質を提供する工程；(c) 工程(a)のポリペプチドを工程(b)の被検基質と接触させて、基質の量の増加又は反応生成物の量の減少を検出する工程、ここで基質の量の減少又は反応生成物の量の増加によって前記被検基質はホスホリパーゼ基質として同定される。また別の特徴では、前記核酸は、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも85%の配列同一性を有するか、配列番号3と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、配列番号5と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、又は配列番号7と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも70%の配列同一性を有することができ、ここで、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。また別の特徴では、前記核酸は、配列番号1に示す配列又はその部分配列；配列番号3に示す配列又はその部分配列；配列番号5に示す配列又はその部分配列；配列番号7に示す配列又はその部分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。

10

【0035】

本発明は、以下の工程を含む、ある化合物がホスホリパーゼと特異的に結合するか否かを決定する方法を提供する：(a) 核酸又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工程（ここで前記核酸及びベクターは本発明の核酸又はベクターを含む）又は本発明のポリペプチドを提供する工程；(b) 前記ポリペプチドを被検化合物と接触させる工程；及び(c) 前記被検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し、それによって前記化合物がホスホリパーゼと特異的に結合すると決定する工程。また別の特徴では、前記核酸配列は、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも85%の配列同一性を有するか、配列番号3と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、配列番号5と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、又は配列番号7と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも70%の配列同一性を有し、ここで、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。また別の特徴では、前記核酸は、配列番号1に示す配列又はその部分配列；配列番号3に示す配列又はその部分配列；配列番号5に示す配列又はその部分配列；配列番号7に示す配列又はその部分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。

20

30

【0036】

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパーゼ活性のモジュレーターを同定する方法を提供する：(a) 本発明のポリペプチド又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) 被検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)の被検化合物と接触させて、ホスホリパーゼの活性を測定する工程、ここで被検化合物の非存在下でのホスホリパーゼ活性と比較して被検化合物の存在下で測定された前記活性の変化によって、被検化合物がホスホリパーゼ活性を調節するという決定が提供される。また別の特徴では、前記核酸配列は、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも85%の配列同一性を有するか、配列番号3と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、配列番号5と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも80%の配列同一性を有するか、又は配列番号7と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも70%の配列同一性を有することができ、ここで、前記配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる分析によって、又は目視検査によって決定される。また別の特徴では、前記核酸は、配列番号1に示す配列又はその部分配列；配列番号3に示す配列又はその部分配列；配列番号5に示す配列又はその部分配列；配列番号7に示す配列又はその部分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ことができる。

40

50

ある特徴では、前記ホスホリパーゼ活性は、ホスホリパーゼ基質を提供し、基質量の増加又は反応生成物量の減少を検出することによって測定される。被検化合物が存在しないときの基質又は反応生成物の量と比較して、被検化合物が存在するときの基質量の減少又は反応生成物量の増加によって、前記被検化合物はホスホリパーゼ活性のアクチベーターと同定される。被検化合物が存在しないときの基質又は反応生成物の量と比較して、被検化合物が存在するときの基質量の増加又は反応生成物量の減少によって、前記被検化合物はホスホリパーゼ活性の阻害物質と同定される。

【0037】

本発明は、プロセッサ及びデータ保存装置を含むコンピュータシステムを提供し、ここで前記データ保存装置には本発明のポリペプチド又は本発明の核酸配列が保存されてある 10

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及び少なくとも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ことができる。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。前記コンピュータシステムはさらに前記配列の1以上の特徴を同定するアイデンティファイヤー(identifier)を含むことができる。

本発明は、本発明のポリペプチド配列又は本発明の核酸配列を含む配列が保存されてあるコンピュータ読み取り可能な媒体を提供する。

本発明は、以下の工程を含む、配列中の特徴を同定する方法を提供する：(a) 配列中の1以上の特徴を同定するコンピュータプログラムを用いて配列を読みとる工程（ここで前記配列は本発明のポリペプチド配列又は本発明の核酸配列を含む）；及び(b) 前記コンピュータプログラムにより前記配列中の1以上の特徴を同定する工程。 20

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の使用により第一の配列及び第二の配列を読みとる工程（ここで第一の配列は本発明のポリペプチド配列又は本発明の核酸配列を含む）；及び(b) 前記コンピュータプログラムにより第一の配列と第二の配列間の相違を決定する工程。ある特徴では、前記第一の配列と第二の配列間の相違を決定する工程はさらに、多型性を同定する工程を含む。ある特徴では、前記方法はさらに、配列中の1以上の特徴を同定するアイデンティファイヤー（及び前記アイデンティファイヤーの使用）を含む。ある特徴では、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、配列中の1以上の特徴を同定する工程を含む。 30

【0038】

本発明は、以下の工程を含む、環境サンプルからホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離又は回収する方法を提供する：(a) ホスホリパ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（ここで前記プライマー対は本発明の核酸（例えば配列番号1又はその部分配列；配列番号3又はその部分配列；配列番号5又はその部分配列；配列番号7又はその部分配列など）を増幅することができる）；(b) 環境サンプルから核酸を単離する工程、又は前記環境サンプル中の核酸がハイブリダイゼーションのために前記増幅プライマー対に接近することができるように前記環境サンプルを処理する工程；及び(c) 工程(b)の核酸を工程(a)の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、それによってホスホリパ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又は回収する工程。ある特徴では、前記増幅プライマー配列対の各々のメンバーは、本発明の核酸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。ある特徴では、前記増幅プライマー配列対は本発明の増幅対である。 40

本発明は、以下の工程を含む、環境サンプルからホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を単離又は回収する方法を提供する：(a) 本発明の核酸配列又はその部分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) 環境サンプルから核酸を単離する工程、又は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接近することができるように前記環境サンプルを処 50

理する工程；(c)工程(b)の単離核酸又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；及び(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、それによってホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を前記環境サンプルから単離又は回収する工程。また別の特徴では、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、大気サンプル又は生物学的サンプルを含む。また別の特徴では、前記生物学的サンプルは、細菌細胞、原虫細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞、藻類細胞、地衣類細胞又は哺乳動物細胞に由来する。

【0039】

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパーゼをコードする核酸の変種を作製する方法を提供する：(a)本発明の核酸を含む鋳型核酸を提供する工程；(b)前記鋳型配列中の1以上のヌクレオチドの改変、欠失若しくは付加、又はその組合せを実施して、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ホスホリパーゼポリペプチドを作製する工程を含む。また別の特徴では、前記改変、付加又は欠失は、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシャルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入(商標)(Gene Site Saturation Mutagenesis(商標)、GSSM(商標))、合成連結再アッセンブリ(SLR)及び/又はそれらの組合せによって導入することができる。また別の特徴では、前記改変、付加または欠失は、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ保有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成、及び/又はそれらの組合せによって導入される。

【0040】

ある特徴では、前記方法は、鋳型核酸によってコードされるホスホリパーゼのものとは変化した若しくは異なる安定性又は変化した若しくは異なる活性を有するホスホリパーゼが生成されるまで反復的に繰り返される。ある特徴では、前記変異又は異なる活性は酸性条件下でのホスホリパーゼ活性であり、この場合、前記鋳型核酸によってコードされるホスホリパーゼは酸性条件下で活性がない。ある特徴では、前記変異又は異なる活性は高温下でのホスホリパーゼ活性であり、この場合、前記鋳型核酸によってコードされるホスホリパーゼは高温下で活性がない。ある特徴では、前記方法は、鋳型核酸のコドン使用頻度とは変化したコドン使用頻度を示すホスホリパーゼコード配列が生成されるまで反復的に繰り返される。前記方法は、鋳型核酸のメッセージ発現レベルまたは安定性レベルより高いまたは低いレベルを有するホスホリパーゼ遺伝子が得られるまで前記方法を反復することができる。

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパ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発現を高める方法を提供する：(a)ホスホリパーゼをコードする本発明の核酸を提供する工程；及び(b)工程(a)の核酸の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、そのコドンを同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中性的に(neutrally)使用されるコドンで置換し(前記優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先コドンまたは低優先コドンとは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである)、それによって核酸を改変して宿主細胞内での発現を増加させる工程。

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパーゼをコードする核酸内のコドンを改変する方法を提供する：(a)ホスホリパーゼをコードする本発明の核酸を提供する工程；及び(b)工程(a)の核酸内のコドンを同定し、前記コドンを置換される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、それによってホスホリパーゼをコードする核酸内のコドンを改変する工程。

10

20

30

40

50

【0041】

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパーゼをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞で発現を高める方法を提供する：(a) ホスホリパーゼをコードする本発明の核酸を提供する工程；及び(b) 工程(a)の核酸内の非優先コドンまたは低優先コドンを同定し、そのコドンを同じアミノ酸をコードする優先コドンまたは中性的に使用されるコドンで置換し(優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先または低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示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での発現を高める工程。

本発明は、以下の工程を含む、ホスホリパーゼをコードする核酸内のコドンを変更して宿主細胞で発現を低下させる方法を提供する：(a) ホスホリパーゼをコードする本発明の核酸を提供する工程；及び(b) 工程(a)の核酸内の少なくとも1つの好ましいコドンを同定し、そのコドンを同じアミノ酸をコードする非優先コドンまたは低優先コドンで置換し(優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度で提示されるコドンであり、非優先または低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示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での発現を低下させる工程。また別の特徴では、前記宿主細胞は細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、藻類細胞、地衣類細胞又は哺乳動物細胞である。

【0042】

本発明は、複数の変更されたホスホリパーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する方法を提供する(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(前記第一の核酸配列は本発明の核酸を含む)；(b) 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原性(mutagenic)オリゴヌクレオチドを提供する工程；及び(c) 前記一組の変異原性オリゴヌクレオチドを用いて、変異を導入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一組の活性部位コード変種または基質結合部位コード変種核酸を生成し、それによって複数の変更ホスホリパーゼ活性部位または基質結合部位をコードする核酸のライブラリーを作製する工程。また別の特徴では、前記方法は、最適化定方向進化システム、遺伝子部位飽和変異導入(商標)(GSSM(商標))及び合成連結再アセンブリ(SLR)を含む方法によって工程(a)の第一の核酸に変異を導入する工程を含む。前記方法はさらに、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アセンブリPCR、セクシャルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アセンブリ、遺伝子部位飽和変異導入(商標)(GSSM(商標))、合成連結再アセンブリ(SLR)及びそれらの組合せを含む方法によって、工程(a)の第一の核酸に変異を導入する工程を含む。前記方法はさらに、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA変異導入、ウラシル含有鋳型変異導入、ギャップ保有二重鎖変異導入、点ミスマッチ修復変異導入、修復欠損宿主株変異導入、化学変異導入、放射性変異導入、欠失変異導入、制限-選択変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマー生成およびそれらの組合せを含む方法によって、工程(a)の第一の核酸又は変種に変異を導入する工程を含む。

【0043】

本発明は、以下の工程を含む小分子の生成方法を提供する：(a) 小分子を合成または変更することができる複数の生合成酵素を提供する工程(前記酵素の1つは本発明の核酸によってコードされるホスホリパーゼ酵素を含む)；(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；及び(c) 複数の生体触媒反応を促進する条件下で工程(b)の基質を前記酵素と反応させて一連の生体触媒反応により小分子を生成する工程。

10

20

30

40

50

本発明は、以下の工程を含む小分子の改変方法を提供する：(a) 本発明の核酸によってコードされるホスホリパーゼ酵素を提供する工程；(b) 小分子を提供する工程；及び(c) 前記ホスホリパーゼ酵素によって触媒される酵素反応が促進される条件下で工程(a)の酵素を工程(b)の小分子と反応させ、それによってホスホリパーゼ酵素反応により小分子を改変する工程。ある特徴では、前記方法は、工程(a)の酵素のための複数の小分子基質を提供し、それによってホスホリパ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生成される改変小分子のライブラリーを作製する工程を含む。ある特徴では、前記方法はさらに、前記酵素による複数の生体触媒反応が促進される条件下で複数の酵素を追加して、複数の酵素反応によって生成される改変小分子のライブラリーを形成する工程を含む。ある特徴では、前記方法はさらに、所望の活性を示す特定の改変小分子がライブラリー内に存在するか否かを決定するために前記ライブラリーを試験する工程を含む。前記ライブラリーの試験工程はさらに、所望の活性をもつ特定の改変小分子の有無について改変小分子の一部を試験することによって、ライブラリー内の複数の改変小分子の一部を生成するために用いられた生体触媒反応の1つ以外の全てを系統的に排除し、所望の活性をもつ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工程を含むことができる。

10

本発明は、以下の工程を含むホスホリパ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) 本発明のアミノ酸配列を含むホスホリパーゼ酵素を提供する工程；及び(b) 工程(a)の配列から複数のアミノ酸残基を欠失させ、さらにホスホリパーゼ活性について残りの部分配列を試験し、それによってホスホリパ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、前記ホスホリパーゼ活性は、ホスホリパーゼ基質を提供して、基質量の増加又は反応生成物の減少を検出することによって測定される。ある特徴では、被検化合物が存在しないときの基質又は反応生成物の量と比較して、被検化合物が存在するときの酵素基質の量の減少又は反応生成物の量の増加によって、前記被検化合物はホスホリパーゼ活性のアクチベーターと同定される。

20

【0044】

本発明は、以下の工程を含むグリセロホスフェートエステル結合を切断する方法を提供する：(a) ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程（ここで前記ポリペプチドは本発明のアミノ酸配列を含むか、又は前記ポリペプチドは本発明の核酸によってコードされる）；(b) グリセロホスフェートエステル結合を含む組成物を提供する工程；及び(c) 前記ポリペプチドがグリセロホスフェートエステル結合を切断する条件下で工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。ある特徴では、前記条件は、約pH5から約8.5の間、約pH4.5（又はさらに酸性、すなわちpH<4.5）から約9.0（又はさらにアルカリ性、すなわちpH>9）の間を含む。ある特徴では、前記条件は、約40 から約70 の間の温度を含む。ある特徴では、前記組成物は植物油を含む。ある特徴では、前記組成物は脂肪種子のリン脂質を含む。ある特徴では、前記切断反応は、水で抽出できるリン酸化塩基及びジグリセリドを生成することができる。

30

本発明は、以下の工程を含む、リン脂質含有組成物を加水分解し、分解し又は破壊する方法を提供する：ホスホリパーゼ活性を有する本発明の少なくとも1つのポリペプチド、又は本発明の少なくとも1つの核酸によってコードされるホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程；リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び前記ホスホリパーゼが前記リン脂質含有組成物を加水分解し、分解し又は破壊する条件下で、前記ポリペプチドを前記組成物と接触させる工程。ある特徴では、前記方法は、ホスホリパーゼ活性を有する本発明の少なくとも1つのポリペプチドと組成物の高せん断混合の使用、それに続く無せん断又は低せん断混合を含み、前記ホスホリパーゼによる前記リン脂質基質の適切な“接触”を可能にする工程を含む。ホスホリパーゼ活性を有する前記少なくとも1つのポリペプチドはまた、高せん断混合工程に存在することができる。前記方法は、任意の規模、例えば約1グラム(g)から約500、1000、2000、2500、5000g若しくはそれ以上、又は前記範囲内の任意の量で実施することができる。

40

【0045】

50

本発明は、以下の工程を含む油を脱ガムする方法を提供する：(a) ホスホリパーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドを提供する工程（ここで前記ポリペプチドは本発明のアミノ酸配列を含むか、又は前記ポリペプチドは本発明の核酸によってコードされる）；(b) 植物油を含む組成物を提供する工程；及び(c) 前記ポリペプチドが前記植物油中のエステル結合を切断することができる条件下で、工程(a)のポリペプチドと工程(b)の植物油を接触させ、それによって前記油を脱ガムする工程。ある特徴では、前記植物油は脂肪種子を含む。前記植物油は、米ぬか油、パーム油、菜種油、トウモロコシ油、大豆油、キャノーラ油、ゴマ油、落花生油、又はヒマワリの油を含むことができる。ある特徴では、前記方法はさらに、本発明のホスホリパーゼ、また別のホスホリパーゼ又はそれらの組合せの添加を含む。ある特徴では、ホスホリパーゼ活性を有する2つ以上のポリペプチドが前記プロセスに添加され、この場合、少なくとも1つのポリペプチドが本発明の酵素である。ある特徴では、前記酵素は特別な順序で添加される。例えば、異なる特異性を有するPLCが特別な順序で添加される。例えばPC及びPF活性を有する酵素が最初に添加され（又は2つの酵素（1つはPC活性をもち、他方はPE活性をもつ）が一緒に添加される）、続いてPI PLC活性をもつ酵素が添加されるか、又は前記の任意の組合せが実施される。

10

油の脱ガム方法のある特徴では、油を含有する組成物は、植物、動物、藻類又は魚類又は脂肪を含む。植物油は、米ぬか油、大豆油、菜種油、トウモロコシ油、ヤシの実に由来する油、キャノーラ油、ヒマワリの油、ゴマ油、又は落花生油を含むことができる。前記ポリペプチドは、油含有組成物中の水和性及び/又は非水和性リン脂質由来のホスファチドを加水分解することができる。ある特徴では、前記ポリペプチドはホスファチドをグリセリルホスホエステル結合で加水分解して、ジグリセリドと水溶性ホスフェート化合物を生成する。ある特徴では、前記ポリペプチドはホスホリパーゼC活性を有する。ある特徴では、前記ポリペプチドはホスホリパーゼDであり、ホスファターゼ酵素がまた添加される。

20

【0046】

油の脱ガム方法のある特徴では、前記接触工程は、油中の水和リン脂質の加水分解を含む。前記の加水分解条件はアルカリ性条件を含むことができる。例えば、前記条件は、アルカリ性pHで約20 から40 の温度を含む。前記アルカリ性条件は約pH8からpH10又はそれ以上のpHを含むことができる。前記加水分解の条件は、前記プロセスの任意の時点でアルカリ性にしてもよい。例えば、ある特徴では、ホスホリパーゼ（例えばPLC）はアルカリ性条件にされる前に添加される（例えば酸含有油（例えばホスファチジン酸）の“苛性アルカリ中和”）。

30

油の脱ガム方法のある特徴では、前記塩基は、PLCによって生成される1,2-DAGの1,3-DAGへの異性化をもたらし、1,3-DAGは1,2-DAGよりも栄養的な利益を提供する。例えば1,3-DAGは1,2-DAGのように脂肪として蓄積されずにエネルギーとして燃焼する。したがって、本発明は苛性アルカリによる油の精製方法を提供し、ここで、ホスホリパーゼ（例えば本発明の酵素、PLCを含む）は、“最先端（front end）”で（すなわち一切の酸及び苛性アルカリの添加前に）、例えば図13の例示的方法に示すように添加される。本発明の苛性アルカリ精製方法（更なる考察については下記を参照されたい）において最先端でPLCを添加し、続いて酸及び苛性アルカリを添加することの結果の1つは、1,3-DAG（1,2-DAGではなく）の生成レベルの上昇である。これは、酸又は塩基触媒のアシルマイグレーションの結果かもしれない。栄養的には、1,3-DAGは1,2-DAGよりも優れている。したがって、本発明は、本発明のPLCを用いる油の脱ガム方法を含み、この方法によって、最終的な脱ガム生成物は、約0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%又は5.0%を下回らない1,3-DAGを含む。

40

【0047】

油の脱ガム方法のある特徴では、加水分解の条件は約3から10分又はそれ以上の反応時間を含むことができる。前記加水分解の条件は、約50 から60 の間の温度で、約pH5からpH6.5の間、又は約pH5からpH7.5の間、又はpH5からpH8.0の間のpHで、約30から60分の反応時間を用いて、油中の水和性及び非水和性リン脂質を加水分解することを含む。

50

油の脱ガム方法のある特徴では、前記ポリペプチドはフィルターに結合され、リン脂質含有脂肪又は油は前記フィルターを通過する。前記ポリペプチドをリン脂質含有脂肪又は油を含む溶液に添加し、続いて前記溶液をフィルターに通してもよい。

ある特徴では、油の脱ガム方法はさらに、脱ガムによって生成したガムの硬化剤（例えばタルク又は等価物）の添加による物理的除去を含む。ある特徴では、これによって油の収量が増加する。

本発明はまた、以下の工程を含む、非水和性リン脂質を水和可能な形に変換する方法を提供する：（a）ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを提供する工程（ここで前記ポリペプチドは本発明のアミノ酸配列を含むか、又は前記ポリペプチドは本発明の核酸によってコードされる）；（b）非水和性リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び（c）前記ポリペプチドが非水和性リン脂質中のエステル結合を切断することができる条件下で、工程（a）のポリペプチドを工程（b）の非水和性リン脂質と接触させ、それによって非水和性リン脂質を水和可能な形に変換する工程。

10

【0048】

本発明は、以下の工程を含む油を脱ガムする方法を提供する：（a）ホスホリパーゼ活性を有する本発明のポリペプチド又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組成物を提供する工程；（b）リン脂質を含有する脂肪又は油を含む組成物を提供する工程；及び（c）前記ポリペプチドが前記リン脂質含有組成物を脱ガムすることができる条件下で（本発明のポリペプチドがリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で）、工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程。ある特徴では、前記油含有組成物は、植物、動物、藻類又は魚類の油を含む。前記植物油は、米ぬか油、大豆油、菜種油、トウモロコシ油、ヤシの実に由来する油、キャノーラ油、ヒマワリの油、ゴマ油、又は落花生油を含むことができる。前記ポリペプチドは、油含有組成物中の水和性及び/又は非水和性リン脂質由来のホスファチドを加水分解することができる。前記ポリペプチドは、ホスファチドをグリセリルホスホエステル結合で加水分解して、ジグリセリドと水溶性ホスフェート化合物を生成する。前記ポリペプチドはホスホリパーゼC、B、A又はD活性を有することができる。ある特徴では、ホスホリパーゼD活性及びホスファターゼ酵素が添加される。前記接触工程は、油中の水和リン脂質の加水分解を含むことができる。前記加水分解の条件はアルカリ性pHでの約20 から40 の温度を含むことができる。前記アルカリ性条件は、約pH8からpH10のpHを含むことができる。前記加水分解の条件は約3から10分の反応時間を含むことができる。前記加水分解の条件は、約50 から60 の間の温度で約pH5からpH6.5のpHで、約30から60分の反応時間を用いて、油中の水和性及び非水和性リン脂質を加水分解することを含む。前記ポリペプチドはフィルターに結合させることができ、リン脂質含有脂肪又は油は前記フィルターを通過する。前記ポリペプチドをリン脂質含有脂肪又は油を含む溶液に添加し、続いて前記溶液をフィルターに通してもよい。

20

30

【0049】

本発明は、以下の工程を含む、非水和性リン脂質を水和可能な形に変換する方法を提供する：（a）本発明のホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、又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組成物を提供する工程；（b）非水和性リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び（c）前記ポリペプチドが非水和性リン脂質を水和可能な形に変換する条件下で、工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程。前記ポリペプチドはホスホリパーゼC活性を有することができる。前記ポリペプチドはホスホリパーゼD活性を有することができ、ホスファターゼ酵素もまた添加される。

40

本発明は、以下の工程を含む、リン脂質含有組成物の苛性アルカリ精製方法を提供する：（a）ホスホリパーゼを含む組成物を提供する工程（前記はホスホリパーゼ活性を有する本発明のポリペプチドでも、又は本発明の核酸によってコードされるポリペプチドでもよい）；（b）リン脂質を含む組成物を提供する工程；及び（c）苛性アルカリ精製の前、最中又は後で、工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程。前記ポリペプチドはホスホリパーゼ活性、例えばPLC、PLB、PLD及び/又はPLAを有することがで

50

きる。前記ポリペプチドは、図13に示すように、苛性アルカリ精製の前、すなわち前記プロセスの“最先端”で、酸又は苛性アルカリの添加前に加えることができる。

前記ポリペプチド（前記は本発明の酵素、例えばPLCでありえる）は苛性アルカリ精製中に添加することができ、リンのレベル及び遊離脂肪酸のレベルに応じて種々のレベルの酸及び苛性アルカリを添加することができる。前記ポリペプチド（前記は本発明の酵素でありえる）は、苛性アルカリ精製前に又は苛性アルカリ精製後に、すなわち分離前に強力攪拌機又は維持攪拌機中に；加熱工程に続いて；石鹼ストックに；洗浄水に；及び/又は漂白又は脱臭工程で添加することができる。前記方法は、ガムのかさを減らすために、苛性アルカリの濃縮溶液、例えば11%の工業的標準液よりも濃縮されたもの使用を含む。また別の特徴では、苛性アルカリの前記濃縮溶液は約12%から50%濃縮、例えば約20%、30%、40%、50%、又はそれよりも濃縮されてある。

10

【0050】

前記リン脂質を含む組成物は植物を含むことができる。前記ポリペプチドは植物でトランスジェニック技術により発現させることができる。ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドは、種子又は他の植物部分を粉砕しながら添加することができる。または、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドは、粉砕した後で又は精製前に添加される。

さらにまた提供されるものは、ジアシルグリセロール（DAG）及び水溶性ホスフェートエステルを生成するために、本発明のポリペプチドを用いて油（例えば植物油）中のリン脂質を加水分解する苛性アルカリ精製方法である。ある特徴では、本発明の酵素は苛性アルカリ精製プロセスで操作されねばならず、前記は場合によって少量の水及び/又は約55

20

から70の温度範囲を含む。この温度範囲での少量の水による苛性アルカリ精製プロセスの使用は、DAGを増加させ飛沫同伴油を減少させることによって収量を最大にするであろう。ある特徴では、本発明のこの苛性アルカリ精製プロセスで用いられる酵素は、ホスファチジルコリン（PC）及びホスファチジルエタノールアミン（PE）の両者に対して非常に良好な活性を有し、約pH6からpH9の間のpHで活性を有し、75まで活性を有し、油中の少量の水（例えば約2%から5%の水）で活性を有し、例えば前記酵素は、配列番号1によってコードされ、配列番号2の配列によってコードされる。

油中のリン脂質を加水分解する本発明の苛性アルカリ精製プロセスのまた別の特徴では、以下の2つの酵素が用いられる：PI特異的PLC（PIを加水分解する）及びPC、PE及びPAを加水分解するPC-PLC。この実施態様は化学的又は物理的精製に適した油を生じ、DAGを増加させ飛沫同伴油を減少させて収量を最大にする。

30

【0051】

本発明は、以下の工程を含む、植物ステリン又はトリテルペンを精製する方法を提供する：（a）ホスホリパーゼ活性を有する本発明のポリペプチド又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組成物を提供する工程；（b）植物ステリン又はトリテルペンを含む組成物を提供する工程；及び（c）前記ポリペプチドが前記組成物中のリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で、工程（a）のポリペプチドを工程（b）の組成物と接触させる工程。前記ポリペプチドはホスホリパーゼC活性を有することができる。前記植物ステリン又はトリテルペンは植物ステロールを含むことができる。前記植物ステロールは植物油に由来することができる。前記植物油は、米ぬか油、ココナッツ油、キャノーラ油、カカオ脂油、トウモロコシ油、綿実油、オリーブ油、パーム油、落花生油、米ぬか誘導油、紅花油、ゴマ油、大豆油、又はヒマワリの油を含むことができる。前記方法は、遊離植物ステリン及びフィトステリル脂肪酸エステルを定量的に抽出するために、非極性溶媒の使用を含むことができる。前記植物ステリン又はトリテルペンは、シトステロール、キャンベステロール、スチグマステロール、スチグマスタノール、シトスタノール、シトスタノール、デスモステロール、カリナステロール、ポリフェラステロール、クリオナステロール又はブラシカステロールを含むことができる。

40

【0052】

本発明は、以下の工程を含む粗油を精製する方法を提供する：（a）ホスホリパーゼ活性を有する本発明のポリペプチド又は本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを

50

含む組成物を提供する工程；(b)リン脂質を含有する油を含む組成物を提供する工程；及び(c)前記ポリペプチドが前記組成物中のリン脂質の加水分解を触媒することができる条件下で、工程(a)のポリペプチドを工程(b)の組成物と接触させる工程。前記ポリペプチドはホスホリパーゼC活性を有することができる。ホスホリパーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、前記組成物に添加される水溶液中に存在することができる。前記水のレベルは約0.5から5%の間でありうる。前記工程時間は約2時間未満、約60分未満、約30分未満、15分未満又は5分未満でありうる。前記加水分解の条件は約25 から70 の間の温度を含むことができる。前記加水分解の条件は苛性アルカリの使用を含むことができる。ガムの量を減少させるために、苛性アルカリの濃縮溶液、例えば11%の工業的標準液よりも濃縮された溶液を使用することができる。また別の特徴では、苛性アルカリの前記濃縮溶液は約12%から50%濃縮、例えば約20%、30%、40%、50%、又はそれよりも濃縮されてある。

10

前記加水分解の条件は、約pH3からpH10の間、約pH4からpH9の間、又は約pH5からpH8の間のpHを含むことができる。前記加水分解の条件は、乳化剤の添加及び/又は工程(c)の接触後の混合を含むことができる。前記方法は、エマルジョン破壊剤の添加及び/又は加熱若しくは冷却(例えば約4 から約-20 の間又はそれより低温)を含み、水相の分離を促進することができる。前記方法は、遠心によってレシチンを採集するために接触工程の前に脱ガムを施し、続いてPLC、PLC及び/又はPLAを添加して非水和性リン脂質を除去する工程を含むことができる。前記方法は、食用油のために粗油を水で脱ガムしてリンを10ppm未満にし、その後バイオディーゼル油のために約50ppm未満のリンに物理的に精製する工程を含むことができる。前記方法は、酸を添加して非水和性リン脂質の水和を促進する工程を含むことができる。ある特徴では、酸の添加はカルシウム及びマグネシウム金属含有量の低下を促進する。

20

【0053】

本発明は、本発明のポリペプチドを含む医薬組成物を患者に投与することを含む、リポ多糖類-媒介毒性を軽減又は予防する方法を提供する。本発明は、内毒素を本発明のポリペプチドと接触させることを含む、内毒素を無毒化する方法を提供する。本発明は、脂質Aを本発明のポリペプチドと接触させることを含む、脂質Aの2'又は3'脂肪酸鎖を脱アシル化する方法を提供する。

本発明は、以下の工程を含む潤滑油を精製する方法を提供する：(a)本発明の酵素を含む組成物を提供する工程；(b)潤滑油を提供する工程；及び(c)酵素が潤滑油中の油を選択的に加水分解することができる条件下で前記潤滑油を前記酵素で処理し、それによって前記潤滑油を精製する工程。前記潤滑油は作動油でありうる。

30

本発明は、以下の工程を含む、織物を処理する方法を提供する：(a)本発明の酵素を含む組成物を提供する工程；(b)織物を提供する工程；及び(c)前記織物を前記酵素で処理する工程。前記織物の処理は、最終的織物の風合及びドレープの改善、染色、防炎性の獲得、撥水性の獲得、光学的明るさの獲得、又は樹脂仕上りの獲得を含むことができる。前記織物は、綿布、ビスコースレーヨン、レーヨン、ライオセル、リンネル、亜麻織物、カラムシ布、及び前記の全ての混合物、又は前記とポリエステル、ウール、ポリアミド、アクリリックス若しくはポリアクリリックスとの混合物を含むことができる。本発明は、本発明の酵素を含む織物、糸、又は線維を提供する。前記酵素は、前記織物、糸又は線維の表面に吸着、吸収又は固定される。

40

【0054】

本発明は、以下の工程を含むホスホリパーゼCを発現する方法を提供する：Mut⁺表現型をもつピキア(Pichia)株を提供する工程；異種ホスホリパーゼCコード核酸をピキア株に挿入する工程；及び前記ピキア株をホスホリパーゼCが発現される条件下で培養する工程。前記方法はさらに、培養条件に亜鉛を補充することを含むことができる。本発明はまた、ホスホリパーゼCを発現する細胞系、単離細胞及び細胞株を提供する。前記は、ピキア細胞株で機能することができるプロモーターと機能的に連結された異種のホスホリパーゼCコード核酸を含むMut⁺表現型を含む。

50

本発明は、異種タンパク質を発現するゼオシン耐性酵母細胞系（例えば酵母細胞、細胞株、個々の細胞）を提供する。前記は以下の工程を含む：異種タンパク質を発現することができる異種核酸を含むピキア種（例えばP.パストリス（*pastoris*））の細胞を提供する工程；最初の濃度のゼオシンを含む条件下で前記細胞を培養する工程；最初の濃度のゼオシンに耐性を示す細胞を選別し、より高い濃度のゼオシンを含む条件下で再び培養する工程；及びより高い濃度に対して耐性を示す、工程（c）で培養された細胞を選別する工程。ある特徴では前記異種タンパク質は酵素、又は場合によってホスホリパーゼ、又は場合によってホスホリパーゼC（PLC）、例えば本発明の任意の酵素である。

本発明の1以上の実施態様の詳細が、添付の図面及び以下の記載で説明される。本発明の他の特徴、目的及び利点はこの説明及び図面、並びに特許請求の範囲から明白となろう。

10

本明細書に引用した全ての刊行物、特許出願、GenBank配列及びATCC寄託物が参照により本明細書に含まれる。

【0055】

発明の詳細な説明

本発明は、ホスホリパーゼ、例えばホスホリパーゼA、B、C、D、パタチン、ホスファチジン酸ホスファターゼ（PAP）及び/又は脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）又は等価の活性を有するポリペプチド、前記をコードするポリヌクレオチド、並びに前記を製造及び使用する方法を提供する。本発明は、油（例えば植物油、例えば脂肪種子のリン脂質）中のグリセロホスフェートエステル結合を効率的に切断して、水で抽出できるホスホリル化された主成分及びジグリセリドを生じる。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）活性を有する。また別の特徴では、本発明のホスホリパーゼは、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルイノシトール（PI）、ホスファチジン酸、及び/又はスフィンゴミエリン又はそれらの組合せ中のグリセロホスフェートエステル結合切断することができる。例えば、ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは、1以上の固有の基質に対して特異的である。例えば、本発明の酵素は、PE及びPC；PE及びPI；PE及びPS；PS及びPE；PS及びPI；PI及びPE；PS、PI及びPC；PE、PI及びPC；又はPE、PS、PI及びPCに対して特異的な作用を有することができる。

20

【0056】

本発明のホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼA、B、C、D、パタチン、ホスファチジン酸ホスファターゼ（PAP）及び/又は脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）又は等価の活性を有するポリペプチド）は、植物油の酵素的な脱ガムに用いることができる。なぜならば、前記のホスフェート成分は水溶性で除去が容易なためである。そのジグリセリド成分は油中に残留し、したがって損失は少ないであろう。本発明のPLCは、工業的脱ガム（例えばENZYMAL(商標)プロセス、ここではリン脂質はPLA1及びPLA2によって加水分解される）でPLA1及びPLA2に加えて、又はそれらに代わって用いることができる。

30

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは、高温及び/又は低温で又は広範囲の温度にわたって活性を有する。例えば、それらは、20 から90 、30 から80 、又は40 から70 の間の温度範囲で活性を有することができる。本発明のホスホリパーゼはまた、アルカリ性pH又は酸性pH、例えば低い水酸性度（low water acidity）で活性を有することができる。また別の特徴では、本発明のホスホリパーゼは、pH6.5、pH6.0、pH5.5、pH5.0、pH4.5、pH4.0及びpH3.5又は前記より低い酸性pH（すなわち<pH3.5）で活性を有することができる。また別の特徴では、本発明のホスホリパーゼは、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9.0、pH9.5、pH10又は前記よりアルカリ性（すなわち>pH10）で活性を有することができる。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは、約40 から約70 、75 、若しくは80 又はそれより高い温度の温度範囲で、低い水活動度（低水分含有量）の条件下で活性を有する。

40

【0057】

本発明はまた、本発明の例示的ホスホリパーゼを更に改変して所望の特性を有する酵素

50

を生成する方法を提供する。例えば、本発明の方法によって生成されたホスホリパーゼは、変異した基質特異性、基質結合特異性、基質切断パターン、熱安定性、pH/活性プロファイル、pH/安定性プロファイル（例えば低いpH値（例えば $\text{pH} < 6$ 又は $\text{pH} < 5$ ）又は高いpH値（例えば $\text{pH} > 9$ ）での高い安定性）、酸化に対する安定性、 Ca^{2+} 依存性、比活性などを有することができる。本発明は、対象の任意の特性の変更を提供する。例えば、前記の変更は、親のホスホリパーゼと比較したとき、変異したpH及び温度活性プロファイルを有する変種をもたらすことができる。

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは、種々の植物油加工工程、例えば植物油の抽出、特に本明細書に記載するように“油の脱ガム”と称されるプロセスにおける“リン脂質ガム”の除去で用いられる。本発明は、組成物（例えば本発明の酵素を含む）及び、種々の供給源（例えば米ぬか、ダイズ、ナタネ、落花生、ゴマ、ヒマワリ及びトウモロコシ由来の油）から植物油を製造する方法を提供する。本発明のホスホリパーゼ酵素は、PLA（例えばホスホリパーゼA2）の代わりに任意の植物油加工工程で用いることができる。

10

【0058】

定義

“ホスホリパーゼ”という用語は、任意のホスホリパーゼ活性、例えば油（例えば植物油）のグリセロホスフェートエステル結合の切断（グリセロホスフェートエステル結合の加水分解の触媒）、を有する酵素を包含する。本発明のホスホリパーゼ活性は、水抽出可能なホスホリル化された主成分及びジグリセリドを生じることができる。本発明のホスホリパーゼ活性はまた、高温、低温、アルカリ性pH及び酸性pHでのグリセロホスフェートエステル結合の加水分解を含む。“ホスホリパーゼ活性”という用語はまた、グリセロホスフェートエステルを切断して、水抽出可能なホスホリル化主成分及びジグリセリドを生じることを含む。“ホスホリパーゼ活性”という用語はまた、リン脂質中のグリセリン及びリン酸のエステル結合を切断することを含む。“ホスホリパーゼ活性”という用語はまた、他の活性、例えば基質（例えば油、例えば植物油）と結合しこれを加水分解する能力を含む。基質にはまた、植物及び動物のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン及びスフィンゴミエリンが含まれる。前記ホスホリパーゼ活性は、ホスホリパーゼC（PLC）活性；ホスホリパーゼA（PLA）活性、例えばホスホリパーゼA1又はホスホリパーゼA2活性；ホスホリパーゼB（PLB）活性、例えばホスホリパーゼB1又はホスホリパーゼB2活性（リゾホスホリパーゼ（LPL）活性及び/又はリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性を含む）；ホスホリパーゼD（PLD）活性、例えばホスホリパーゼD1又はホスホリパーゼD2活性；及び/又はパタチン活性、又は前記の任意の組合せを含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性は、糖タンパク質〔例えばジャガイモの塊茎、又はソラナム（*Solanum*）属の任意の草木（例えばソラナム・ツベロスム（*Solanum tuberosum*））で見出される糖タンパク質〕の加水分解を含む。前記ホスホリパーゼ活性は、パタチン酵素活性、例えばパタチンエステラーゼ活性を含むことができる（例えば以下を参照されたい：Jimenez (2002) Biotechnol. Prog. 18:635:640）。前記ホスホリパーゼ活性は脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）活性を含むことができる。前記ホスホリパーゼ活性は、1以上の固有の基質に対して特異的であることを含むことができる。例えば、本発明の酵素は、PE及びPC；PE及びPI；PE及びPS；PS及びPE；PS及びPI；PI及びPE；PS、PI及びPC；PE、PI及びPC；又はPE、PS、PI及びPC、又は前記の任意の組合せに対して特異的な作用を有することができる。

20

30

40

【0059】

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは、多機能活性、例えば本明細書に記載した酵素活性の1以上の組合せを有することができる。例えば、ある特徴では、本発明のポリペプチドは酵素的に活性であるが、リパーゼ活性を欠くか、又は中性油（トリグリセリド）分画に影響を及ぼすいずれの酵素活性も欠いている。そのようなポリペプチドを特定のプロセス、例えば脱ガムプロセス〔このプロセスでは中性油分画は損なわれない（減少しない、分解（例えば加水分解）されない）ことが重要である〕で用いることが所望されうる。したがって、ある特徴では、本発明は、ホスホリパーゼ活性を有するがリパーゼ活性を

50

欠く本発明のポリペプチドの使用を含む脱ガムプロセスを提供する。

ある特徴では、本発明のPLCホスホリパーゼは、種々のリン脂質基質（ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジイルノシトール（PI）及び/又はホスファチジン酸又はそれらの組合せを含む）を利用する（例えば前記の加水分解を触媒する）。さらにまた、これら酵素はこれらリン脂質のリゾリン脂質形に対して種々の程度の活性を有することができる。様々な特徴で、本発明のPLC酵素は基質としてホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンに対して優先性を示すことができる。

【0060】

ある特徴では、本発明のホスファチジイルノシトールPLCホスホリパーゼは、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール及びホスファチジン酸又はそれらの組合せを含む、多様なリン脂質を利用する。さらにまた、これらの酵素は、これらリン脂質のリゾリン脂質形に対して様々な程度の活性を有することができる。多様な特徴で、本発明のホスファチジイルノシトールPLC酵素は基質としてホスファチジイルノシトールに対して優先性を示すことができる。

ある特徴では、本発明のパタチン酵素は、多様なリン脂質基質（ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール及びホスファチジン酸又はそれらの組合せを含む）を利用する。さらにまた、これらの酵素は、これらリン脂質のリゾリン脂質形に対して様々な程度の活性を有することができる。多様な特徴において、本発明のパタチンはアミノ酸配列類似性の保存を抛りどころとしている。多様な特徴において、これらの酵素は、様々な生化学的特性の組合せを示し、PLA1、PLA2、PLC又はPLD酵素クラスに特徴的な反応を生じることができる。

ある特徴では、本発明のPLDホスホリパーゼは、多様なリン脂質（ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール及びホスファチジン酸又はそれらの組合せを含む）を利用する。さらにまた、これらの酵素は、これらリン脂質のリゾリン脂質形に対して様々な程度の活性を有することができる。ある特徴では、これらの酵素は、トランスエステル化反応を実施して体系化されたリン脂質を生成するために有用である。

【0061】

“抗体”という用語には、1つの免疫グロブリン遺伝子もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントから誘導されたか、前記にならって作製されたか、または前記によって実質的にコードされたペプチドまたはポリペプチドであって、抗原またはエピトープに特異的に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）。抗体という用語は、抗原に結合する能力を保持する抗原結合部分、すなわち“抗原結合部位”（例えばフラグメント、部分配列、相補性決定領域（CDR））を含み、（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のフラグメント）；（ii）F(ab')₂フラグメント（ヒンジ領域でジスルフィド結合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）抗体のただ1つのアームの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）（前記は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）が含まれる。単鎖抗体もまた表示により“抗体”という用語に含まれる。

本明細書で用いられる“アレイ”又は“マイクロアレイ”又は“バイオチップ”又は“チップ”という用語は複数の標的成分であって、各標的成分は、基質表面の規定面積上に固定された、規定量の1つ若しくは2つ以上のポリペプチド（抗体を含む）又は核酸を含む（更なる詳細は下記で考察される）。

【0062】

本明細書で用いられるように、“コンピュータ”、“コンピュータプログラム”及び“

プロセッサ”はそれらのもっとも広い一般的な意味で用いられ、下記で詳細に述べるような装置の全てが含まれる。

具体的なポリペプチド又はタンパク質の“コード配列”又は前記を“コードする配列”は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、転写されてポリペプチド又はタンパク質に翻訳される核酸配列である。

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、例えば本発明のホスホリパーゼ）の発現に、前記のような配列と適合する宿主内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、前記ポリペプチドコード配列、及び場合によって他の配列（例えば転写終了シグナル）と機能的に連結された少なくとも1つのプロモーターを含む。発現の実施に必要なまたは有用なさらに別の因子（例えばエンハンサー）もまた用いることができる。本明細書で用いられる“機能的に連結される”とは、プロモーターがDNA配列の転写を仲介することができるように、DNA配列から上流に前記プロモーターが連結されることを指す。したがって、発現カセットはまた、プラスミド、発現ベクター、組み換えウイルス、組換えられた任意の形態の“裸のDNA”ベクターなどを含む。“ベクター”は、細胞に感染するか、一過性にトランスフェクトされるか、又は永久的に形質導入することができる核酸を含む。ベクターは裸の核酸であっても、タンパク質若しくは脂質と複合体を形成した核酸であってもよい。ベクターは場合によってウイルスまたは細菌の核酸及び/又はタンパク質、及び/又は膜（例えば細胞膜、ウイルスの脂質エンベロープなど）を含む。ベクターには、DNAフラグメントが結合し複製できるようになったレプリコン（例えばRNAレプリコン、バクテリオファージ）が含まれるが、ただし前記に限定されない。したがって、ベクターには、RNA、自律的自己複製型環状若しくは直鎖状DNA又はRNA（例えばプラスミド、ウイルスなど、例えば米国特許出願第5,217,879号参照）が含まれ（ただし前記に限定されない）、さらに発現および非発現プラスミドが含まれる。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ている場合は、染色体外環状および直鎖状DNA並びに宿主染色体に取り込まれたDNAの両方が含まれる。ベクターが宿主細胞により維持される場合は、前記ベクターは自律性構造物として有糸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ことが可能である。

10

20

30

40

50

【0063】

“プラスミド”は、先行する小文字“p”及び/又は前記に続く大文字及び/又は数字によって示される。本明細書で用いられる出発のプラスミドは、市販若しくは公的に制約なく入手可能であるか、又は公表された方法で入手可能なプラスミドから構築することができる。さらにまた、本明細書に記載されているプラスミドと等価のプラスミドは当技術分野で公知であり、さらに当業者には明白であろう。

“遺伝子”はポリペプチド鎖の生成に必要なDNAのセグメントを意味し、とりわけコード領域に先行または後続する領域、例えばリーダーおよびトレイラー、プロモーターおよびエンハンサー並びに（適用されうる場合には）個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）が含まれる。

本明細書で用いられる“核酸”または“核酸配列”という語句は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド又は前記のいずれかのフラグメント、ゲノム由来若しくは合成起源のDNAまたはRNA（例えばmRNA、rRNA、tRNA、iRNA）（前記は一本鎖でも二本鎖でもよく、センス又はアンチセンス鎖を表すことができる）、ペプチド核酸（PNA）又は任意のDNA様若しくはRNA様物質（天然若しくは合成起源）[例えばiRNA、リボヌクレオプロテイン（例えば二本鎖iRNA、例えばiRNP）を含む]を指す。前記用語は、天然のヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸（すなわちオリゴヌクレオチド）を包含する。前記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）。

本明細書で用いられる“アミノ酸”または“アミノ酸配列”は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質配列、又は前記のいずれかのフラグメント、部分若しくは

はサブユニット、並びに天然に存在する分子及び合成分子を指す。

本明細書で用いられる“ポリペプチド”及び“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（すなわちペプチドイソステアー）によって互いに結合したアミノ酸を指し、20個の遺伝子によってコードされるアミノ酸以外の改変アミノ酸を含むことができる。“ポリペプチド”という用語にはまたペプチド及びポリペプチドフラグメント、モチーフなども含まれる。前記用語はまたグリコシル化ポリペプチドを含む。本発明のペプチド及びポリペプチドにはまた、下記でさらに詳細に記載されるように全ての“模倣体”及び“ペプチド模倣体”が含まれる。

【0064】

本明細書で用いられる“単離”という用語は、物質がその本来の環境（例えば、前記が天然に存在する場合はその天然の環境）から取り出されたことを意味する含む。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、前記天然の系と一緒に存在する物質のいくつかまたは全てから分離された前記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部分であってもよいし、及び/又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物の一部であってもよく、それでもなおそのようなベクターまたは組成物は前記の天然の環境の一部ではないということで、それらは単離されている。本明細書で用いられるように、単離された物質または組成物はまた“精製”された組成物でありうる。すなわち、前記は絶対的な純度を要求せず、むしろ相対的な規定として前記は意図される。ライブラリーから得られる個々の核酸は電気泳動による均質度まで通常的に精製することができる。また別の特徴では、本発明は、ゲノムDNA又はライブラリー若しくは他の環境中の他の配列から少なくとも一桁、二桁、三桁、四桁、五桁またはそれより大きい桁まで精製された核酸を提供する。

本明細書で用いられるように、“組換え体”という用語は、前記核酸がその天然の環境では隣接していない“骨格”核酸に隣接することを意味する。ある特徴では、核酸は、核酸“骨格分子”集団において、核酸挿入物の5%又は5%を超える数を占める。本発明の“骨格分子”には、問題の核酸挿入物を維持または操作するために用いられる核酸、例えば発現ベクター、自己複製核酸、ウイルス、組み込みを実施する核酸、及び他のベクター又は核酸が含まれる。ある特徴では、組換え体の骨格分子集団において濃縮された核酸は、核酸挿入物の10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれを超える数を占める。“組換え体”ポリペプチド又はタンパク質は、組換えDNA技術によって生成されたポリペプチド又はタンパク質、例えば所望のポリペプチド又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産生されたポリペプチド又はタンパク質を指す。“合成”ポリペプチド又はタンパク質は、下記でさらに詳細に記載されるように化学的合成によって調製されたものである。

【0065】

プロモーター配列は、下記でさらに考察されるように、前記プロモーターで転写を開始するRNAポリメラーゼがコード配列のmRNAへの転写を開始するときには、前記コード配列に“機能的に連結”されている。

“オリゴヌクレオチド”は、一本鎖ポリデオキシヌクレオチド又は2本の相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖を指し、前記は化学的に合成することができる。そのような合成オリゴヌクレオチドは5'リン酸基をもたず、したがってキナーゼの存在下でATPを用いてリン酸基を付加されなければ別のオリゴヌクレオチドに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化されていないフラグメントに連結されるであろう。

2つの核酸又はポリペプチドの関係で“実質的に同一”という語句は、公知のいずれかの配列比較アルゴリズム（下記で詳細に考察される）を用いるかまたは目視検査により最大一致のために比較およびアラインメントを実施したとき、少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%のヌクレオチド若しくはアミノ酸残基（配列）同一性を有する2つまたは3つ以上の配列を指す。また別の特徴では、本発明は、本発明の例示的な配列、例えば配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配

列番号6、配列番号7、配列番号8などと、少なくとも約100残基、150残基、200残基、300残基、400残基、又は前記核酸若しくはポリペプチドの約50残基から完全長の範囲の領域にわたって実質的な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りうる。

【0066】

さらにまた、“実質的に同一”なアミノ酸配列は、1つまたは2つ以上の保存的若しくは非保存的アミノ酸置換、欠失または挿入（特にそのような置換が分子の活性をもたない部位で生じ、前記ポリペプチドがその機能的特性を本質的に維持していることを条件として）によって参照配列と異なる配列である。保存的アミノ酸置換は、例えばあるアミノ酸を同じクラスの別のアミノ酸で置換する、例えば疎水性アミノ酸（例えばイソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニン）で別の疎水性アミノ酸を置換、又は極性アミノ酸で別のアミノ酸を置換、例えばアルギニンでリジンを置換、グルタミン酸でアスパラギン酸を置換、又はグルタミンでアスパラギンを置換。1つまたは2つ以上のアミノ酸を例えばホスホリパーゼポリペプチドから欠失させて、その生物学的活性を顕著に変更することなく、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、ホスホリパーゼの生物学的活性に要求されないアミノ末端またはカルボキシル末端アミノ酸を除去することができる。本発明の改変ポリペプチド配列は、多数の方法によってホスホリパーゼの生物学的活性についてアッセイすることができる。前記方法は、下記でさらに考察されるように以下の工程を含む：前記改変ポリペプチド配列をホスホリパーゼ基質と接触させ、前記改変ポリペプチドがアッセイ中の特定の基質の量を減少させるか、又は機能的ホスホリパーゼと基質との酵素反応のバイオ生成物を増加させるか否かを決定する。

【0067】

“ハイブリダイゼーション”は、塩基対形成を介して核酸の鎖が相補的な鎖と結合するプロセスを指す。ハイブリダイゼーション反応は鋭敏で選択性があり、前記が低い濃度でしか存在しないサンプルにおいてさえ対象の固有配列を同定することができる。適切にストリンジェントな条件は、例えばプレ-ハイブリダイゼーション溶液及びハイブリダイゼーション溶液中の塩又はホルムアミドの濃度によって、又はハイブリダイゼーション温度によって規定することができる。当業界で周知である。例えば、ストリンジェンシーは、下記で詳細に記載されるように、塩濃度の減少、ホルムアミド濃度の増加、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、本明細書に示すように種々の（例えば高い、中等度及び低い）ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするその能力によって定義される。

“変種”という用語は、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、しかもなお（それぞれ）本発明のホスホリパーゼの生物学的活性を維持する本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。変種は多数の手段によって作製することができる。前記は例えば以下を含む：エラー誘発PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセンブリPCR、セクシャルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセンブリ、GSSM(商標)及び前記の任意の組合せ。例えば、野生型ホスホリパーゼとは異なるpHまたは温度で活性を有する変種ホスホリパーゼを作製する技術は本明細書に含まれている。

“飽和変異導入”、遺伝子部位飽和変異導入（Gene Site Saturation Mutagenesis）(商標)又は“GSSM(商標)”という用語は、下記に詳細に記載されるように、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。

“最適化定方向進化システム”または“最適化定方向進化”という用語は、関連する核酸配列（例えば関連する遺伝子）のフラグメントを再アッセンブリングする方法を含み、下記で詳細に説明される。

“合成連結再アッセンブリ”または“SLR”という用語は、非確率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、下記で詳細に説明される。

【0068】

核酸の作製及び操作

本発明は、単離及び組換え核酸（例えば例示的な配列番号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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173）を提供し、前記には、本発明のポリペプチドおよびホスホリパーゼをコードする発現カセット（例えば発現ベクター）が含まれる。本発明はまた、本発明の核酸を用いて新規なホスホリパーゼ配列を発見する方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸を用いて新規なホスホリパーゼ配列をみつける方法を含む。さらにまた提供されるものは、例えば合成連結再アッセムブリ、最適化定方向進化系及び/又は飽和変異導入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及び発現、PCRなどによるメッセージ又はゲノムDNAの増幅によって作製、単離及び/又は操作することができる。本明細書に開示されるように、本発明の方法の実施では、相同遺伝子を鋳型核酸の操作によって改変することができる。本発明は、当業界で公知の任意の方法若しくはプロトコル又は装置（前記は学術文献及び特許文献に詳しく記載されている）と組合わせて実施することができる。

【0069】

一般的技術：本発明の実施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、ウイルス又は前記のハイブリッドのいずれであっても、種々の供給源から単離、遺伝的に操作、増幅、及び/又は組換えにより発現/生成することができる。これらの核酸から生成された組換えポリペプチドは個々に単離又はクローニングし、所望の活性について試験することができる。いずれの組換え発現系（細菌、哺乳動物、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含む）も用いることができる。

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。前記技術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) Tetrahedron Lett. 22:1859; US Patent No. 4,458,066。

核酸操作のための技術、例えばサブクローニング、プローブの標識（例えばクレノーポリメラーゼ、ニックトランスレーション、増幅を用いるランダムプライマー標識）、配列決定、ハイブリダイゼーションなどは学術文献及び特許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：Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol1-3, 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 Acids Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)。

本発明の方法の実施に用いられる核酸を入手および操作するために有用なまた別の手段は、ゲノムサンプルからのクローニング、および所望の場合には、例えばゲノムクローン又はcDNAクローンから単離又は増幅し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、哺乳動物人工染色体（MAC）（例えば米国特許5,721,118号、同6,025,155号を参照されたい）、ヒト人工染色体（Rosenfeld (1997) *Nat. Genet.* 15:333-335）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、P1人工染色体（Woon (1998) *Genomics* 50:306-316）、P1誘導ベクター（PAC）（Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124）、コスミド、組換えウイルス、ファージまたはプラスミドに含まれるゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーが含まれる。

【0070】

10

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又はそのフラグメントの分泌を誘導することができるリーダー配列とともに適切な局面でアッセンブリされる。

本発明は融合タンパク質およびそれら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、例えば所望の性状（例えば安定性増強または精製の簡便化）を付与するN-末端識別ペプチドと融合させることができる。本発明のペプチド及びポリペプチドはまた、より強い免疫原性をもつペプチドを製造するために、組換えにより合成されたペプチドをより容易に単離するために、抗体および抗体発現B細胞を同定および単離するためなどのために、前記に結合した1つまたは2つ以上の追加のドメインを有する融合タンパク質として合成及び発現させることができる。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（例えばポリヒスチジン鎖およびヒスチジン-トリプトファンモジュール（前記は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（前記は固定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系（Immune Corp, Seattle WA）で利用されるドメインが含まれる。精製ドメインおよびモチーフ構成ペプチドまたはポリペプチド間の切断可能リンカー配列（例えばXa因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego CA））の挿入は精製を容易にする。例えば、発現ベクターは、6つのヒスチジン残基とそれに続くチオレドキシン及びエンテロキナーゼ切断部位に連結されたエピトープコード核酸配列を含むことができる（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融合タンパク質の残りの部分からエピトープを精製するための手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクター及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しく記載されている（例えば以下を参照されたい：Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53）。

20

30

【0071】

転写および翻訳制御配列：本発明は、RNA合成/発現を誘導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またはエンハンサー）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内に存在しうる。例示的な細菌プロモーターにはlacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPR、PLおよびtrpが含まれる。例示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およびマウスのメタロチオネインIが含まれる。

40

細菌でのポリペプチド発現に適したプロモーターには、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（例えば3-ホスホグセレートキナーゼ（PGK））をコードするオペロン由来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およびマウスのメタロチオネインIプロモーターが含まれる。原核細胞若しくは真核細胞又はそれらのウイルスで遺伝子の発現を制御する

50

ことが知られている他のプロモーターもまた用いることができる。

【0072】

発現ベクターおよびクローニングベヒクル：本発明は、本発明の核酸、例えば本発明のホスホリパーゼ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ベヒクルを提供する。本発明の発現ベクターおよびクローニングベヒクルは、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、細菌人工染色体、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の誘導體）、P1系人工染色体、酵母プラスミド、酵母人工染色体、および対象の特定宿主（例えばバチルス、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が含まれる。本発明のベクターには染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列が含まれうる。多くの適切なベクターが当業者に知られており、市場で入手できる。例示的なベクターには以下が含まれる：細菌系：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）；真核細胞系：pXT1、pSG5（Stratagene）、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL SV40（Pharmacia）。しかしながら、他の任意のプラスミドまたは他のベクターもまた、それらが宿主内で複製可能でさらに生存可能であ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を本発明に関して用いることができる。

10

前記発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位及び転写終了因子を含むことができる。発現を増幅させるために、ベクターはまた適切な配列を含むことができる。哺乳類発現ベクターは、複製起点、必要な任意のリボソーム結合部位、ポリアダニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列および5'フランキング非翻訳配列を含むことができる。いくつかの特徴では、SV40スプライシングおよびポリアダニル化部位に由来するDNA配列を用いて、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。

20

ある特徴では、発現ベクターは1つまたは2つ以上の選別可能なマーカー遺伝子を含み、前記ベクターを含む宿主細胞の選別を可能にする。そのような選別可能マーカーには、真核細胞培養に対してはジヒドロホレートレダクターゼをコードする遺伝子またはネオマイシン耐性を付与する遺伝子、大腸菌では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、及び*S. cerevisiae*の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）ベクターまたは選別可能なマーカーを有する他のベクターを用いて、所望される任意の遺伝子から選択できる。

30

【0073】

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させるためのベクターはまた発現レベルを高めるためにエンハンサーを含むことができる。エンハンサーはDNAのcis-作動性エレメントであり、通常は長さが約10から約300bpであってプロモーター上で作用してその転写を高める。例には、複製起点の後期側100bpから270bpにあるSV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマ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。

DNA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、DNA配列は、適切な制限エンドヌクレアーゼによる挿入物及びベクターの消化に続いてベクター内の所望の位置に連結される。また別には、挿入物とベクターの両方の平滑端を連結することもできる。多様なクローニング技術が当業界で公知であり、例えばAusubel and Sambrookに記載されている。前記のような技術及びその他の技術は当業者の技術範囲内と考えられる。

40

ベクターはプラスミド、ウイルス粒子またはファージの形態を有することができる。他のベクターには染色体配列、非染色体配列及び合成DNA配列、SV40の誘導體、細菌プラスミド、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の組合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使用できる多様なクローニングベクターおよび発現ベクターは例えばSambrookによって記載され

50

ている。

使用できる具体的な細菌ベクターには、以下の周知のクローニングベクターの遺伝子エレメントを含む市販のプラスミドが含まれる：pBR322 (ATCC37017)、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA)、pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pD10、psiX174Bluescript I IKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)、pKK232-8およびpCM7。具体的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。しかしながら他のベクターのいずれも前記が宿主細胞内で複製可能で生存可能である限り使用することができる。

10

【0074】

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、例えば本発明のホスホリパーゼをコードする配列、または本発明のベクターを含む形質転換細胞を提供する。前記宿主細胞は当業者に周知のいずれの宿主細胞でもよく、原核細胞、真核細胞、例えば細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞が含まれる。本発明の酵素は、任意の宿主細胞、例えば任意の細菌細胞、任意の酵母細胞、例えばピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) で発現させることができる。例示的な細菌細胞には、大腸菌 (*E. coli*)、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 又はバチルス属、ストレプトミセス属及びスタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*) 内の任意の種が含まれる。例示的な昆虫細胞にはドロソフィラ (*Drosophila*) S2及びスポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9が含まれる。例示的な動物細胞にはCHO、COSまたはボウズ=メラノーマ又は任意のマウスおよび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。

20

ベクターは、多様な任意の技術を用いて前記宿主細胞に導入することができる。前記技術には、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仲介遺伝子伝達が含まれる。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、又はエレクトロポレーションが含まれる (L. Davis, M. Digner, I. Battey, Basic Methods in Molecular Biology, (1986))。

30

【0075】

適切な場合には、操作した宿主細胞を、プロモーターの活性化に適切に改変した通常の栄養培地で培養し、形質転換体を選別するか又は本発明の遺伝子を増幅することができる。適切な宿主株を形質転換し、さらに適切な細胞密度に前記宿主株を増殖させた後、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的誘導) によって誘導し、さらに細胞を追加の期間培養して所望のポリペプチド又はそのフラグメントを産生させることができる。

細胞を遠心分離によって採集し、物理的または化学的手段により破壊し、得られた粗抽出物は更なる精製のために維持される。タンパク質の発現に用いた微生物細胞は任意の一般的な方法によって破壊することができる。前記方法には、凍結融解の繰り返し、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用が含まれる。前記のような方法は当業者には周知である。発現されたポリペプチドまたはそのフラグメントは、組換え細胞培養から以下を含む方法によって回収および精製することができる：硫酸またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換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、疎水性反応による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。タンパク質の再折りたたみ工程は、ポリペプチドの構造の完成に際して必要に応じて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) を最終精製工程で用いるこ

40

50

とができる。

【0076】

種々の哺乳動物細胞培養系もまた組換えタンパク質の発現に用いることができる。哺乳動物発現系の例には、サル腎線維芽細胞のCOS-7株及び、コンパチブルベクターからタンパク質を発現させ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。

宿主細胞内の構築物を通常の態様で用い、前記組換え配列によってコードされる遺伝子生成物を産生させることができる。組換え体生成方法で用いられる宿主細胞に応じて、前記ベクターを含む宿主細胞により産生されるポリペプチドをグリコシル化してもよいし、またグリコシル化しなくてもよい。本発明のポリペプチドはまた最初のメチオニン残基を含んでいても含んでなくてもよい。

10

無細胞翻訳系もまた本発明のポリペプチドの生成に利用することができる。無細胞翻訳系は、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され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*転写反応実施前に直鎖化することができる。続いて適切な無細胞翻訳抽出物（例えばウサギ網状赤血球抽出物）とともに前記転写mRNAをインキュベートし、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。

発現ベクターは1つまたは2つ以上の選別可能な遺伝子を含み、形質転換された宿主細胞の選別用表現型特質（真核細胞の場合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、大腸菌では例えばテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性）を提供する

20

例示的ホスホリパーゼC酵素（配列番号2に示される配列を有する）は、種々の宿主細胞系において活性な形態で過剰発現された。前記細胞系は例えば、グラム陰性細菌（例えば大腸菌）、グラム陽性細菌（例えばいずれかのバチルス種（例えば枯草菌、バチルス・セレウス）、酵母宿主細胞（例えばピキア・パストリス、サッカロミセス種（例えばS.セレピシアエ及びS.ボンベを含む））及びラクトコッカス・ラクチス又は哺乳動物、真菌、植物若しくは昆虫細胞である。前記活性酵素は、各宿主系で多様な構築物から発現される。これらの核酸発現構築物は、完全長のオープンリーディングフレーム（シグナル配列、プロ-配列及び成熟タンパク質コード配列を含む）をコードするヌクレオチドを含むか、又はそれらはこれら遺伝的エレメントのサブセットを単独又は異種の遺伝的エレメント（前記はシグナル配列及び/又は成熟オープンリーディングフレームのためのプロ-配列として機能する）と一緒に含むことができる。これらの系はそれぞれ、先に記載した酵素的な油の脱ガムプロセスで使用するためにPLCの発現を目的とする工業的生産宿主として機能することができる。

30

【0077】

核酸の増幅：本発明の実施では、本発明のポリペプチドをコードする核酸又は改変核酸は例えば増幅によって複製することができる。本発明は、ホスホリパ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する。ある特徴では、前記プライマー対は本発明の核酸配列を増幅することができる（前記核酸配列対は、例えば例示的配列番号1又はその部分配列；配列番号3に示される配列又はその部分配列；配列番号5に示される配列又はその部分配列；及び配列番号7に示される配列又はその部分配列などを含む）。当業者は、これら配列の任意の部分又は完全長のための増幅プライマー配列対を設計することができよう。

40

本発明は、ホスホリパ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ことができる増幅プライマー配列対を提供する。ここで、前記プライマー対は、本発明の配列又はそのフラグメント若しくは部分配列を含む核酸を増幅することができる。前記増幅プライマー配列の1つ又は各メンバーは、前記配列の少なくとも約10から50の連続する塩基、又は前記配列の約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24若しくは25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。

本発明は増幅プライマー対を提供し、ここで、前記プライマー対は、本発明の核酸の最

50

初の（5'の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25残基によって示される配列を有する第一のメンバー、及び前記第一のメンバーの相補鎖の最初の（5'の）約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25残基によって示される配列を有する残基によって示される配列を有する第二のメンバーを含む。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて増幅（例えばポリメラーゼ連鎖反応、PCR）により生成されるホスホリパーゼを提供する。本発明は、本発明の増幅プライマー対を用いて増幅（例えばポリメラーゼ連鎖反応、PCR）により生成されるホスホリパーゼを生成する方法を提供する。ある特徴では、前記増幅プライマー対は、核酸ライブラリー、例えば遺伝子ライブラリー（例えば環境ライブラリー）から核酸を増幅する。

【0078】

増幅反応はまたサンプル中の核酸の量（例えば細胞サンプル中のメッセージの量）の定量、核酸の標識（例えば前記核酸をアレイまたはプロットに適用する）、前記核酸の検出、又はサンプル中の特定の核酸量の定量に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したメッセージが増幅される。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及びデザインすることができる。増幅方法はまた当業界で周知であり、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 Methods and Applications, ed. Innis, Academic Press, NY (1990); PCR Strategies (1995) ed. Innis, Academic Press, Inc., NY）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば以下を参照されたい：Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117）、転写増幅（例えば以下を参照されたい：Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173）、及びセルフサステイン配列複製（例えば以下を参照されたい：Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874）、Qベータレプリカーゼ増幅アッセイ（例えば以下を参照されたい：Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271）、自動Q-ベータレプリカーゼ増幅アッセイ（例えば以下を参照されたい：Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271）及び他のRNAポリメラーゼ仲介技術（例えば以下を参照されたい：NASBA, Cingene, Mississauga, Ontario）。さらにまた以下を参照されたい：Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; US Patent Nos. 4,683,195及び4,683,202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564。

【0079】

配列同一性の程度の決定

本発明は、本発明の例示的な核酸（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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173、及び配列番号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

10

20

30

40

50

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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、又は配列番号174をコードする核酸)と少なくとも約50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550またはそれより大きい残基領域にわたって、少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれ以上の、又は完全な(100%)配列同一性を有する配列を含む単離及び組換え核酸を提供する。本発明は、本発明の例示的なポリペプチドと少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれ以上の、又は完全な(100%)配列同一性を有する配列を含むポリペプチドを提供する。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及び関連するパラメーター(本明細書に記載されたもの、例えばBLAST2.2.2又はFASTAバージョン3.0t78を含む)をデフォルトパラメーターとともに用いて決定することができる。

【0080】

図11は、本発明の例示的核酸及びポリペプチドの選択した特徴を記載した図表である(公開データベースと本例示的配列の配列同一性比較を含む)。図11に記載した全ての配列が、2セットのデータベースに対するBLAST検索の対象であった。第一のデータベースセットはNCBI(National Center for Biotechnology Information)を通して利用できる。これらデータベースに対する検索から得られた全ての結果は、“NR Description”、“NR Accession Code”、“NR Evaluate”又は“NR Organism”と表記した欄に示されている。“NR”は、NCBIによって維持されている非重複ヌクレオチドデータベースを指す。このデータベースは、GenBank、GenBank updates、及びEMBL updatesの混成である。“NR Description”欄の記載は、与えられた任意のNCBI記録中の定義情報を示し、前記情報は、配列に関する説明(例えば由来生物、遺伝子の名称/タンパク質の名称、又は配列の機能に関するいくつかの記載)を含む。“NR Accession Code”欄の記載は、配列記録に与えられた固有の識別票を示す。“NR Evaluate”欄の記載は予想(Expect)値(E値)を示し、前記はクエリー配列(本発明の配列)とデータベースの配列との間で見出されるアラインメントスコアと同様に良好なアラインメントスコアが、このBLAST検索で実施された数と同じ数のランダム配列間の比較で見出される確率を表す。“NR Organism”欄の記載は、もっとも近縁のBLASTヒットとして同定された配列の由来生物を示す。第二のデータベースセットはひとまとめにしてGeneseq(商標)データベースとして知られている。前記はトムソン・ダーウェント(Thomson Derwent; Philadelphia, PA)を通して利用できる。このデータベースに対する検索から得られた全ての結果は、“GeneseqProtein Description”、“Geneseq Protein Accession Code”、“Geneseq Protein Evaluate”、“Geneseq DNA Description”、“Geneseq DNA Accession Code”、“Geneseq DNA Evaluate”と表記した欄に示される。これらの欄で見出される情報は、上記のNR欄で見出される情報に相当するが、ただし前記は、NCBIデータベースの代わりにGeneseq(商標)データベースに対するBLAST検索から得られた。さらにまた、この表は“Predicted EC No”欄を含む。EC番号(EC No)は

、国際生化学分子生物学連合 (International Union of Biochemistry and Molecular Biology; IUBMB) の命名委員会の酵素委員会によって開発された酵素命名標準のスキームにしたがって酵素のタイプに割り振られた番号である。“Predicted EC No” 欄の結果はケッグ (Kegg; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データベースに対するBLAST検索によって決定される。もし最高のBLASTマッチが e^{-6} 以下のE値を有するならば、前記最高マッチに割り振られたEC番号が表に記入される。最高ヒットのEC番号は、本発明の配列のEC番号が何であるかの手引きとして用いられる。“Query DNA Length” 及び “Query Protein Length” は、NCBI又はGeneseqデータベースに対して検索又は照会された本発明の配列のそれぞれヌクレオチド又はアミノ酸の数を示す。“Geneseq or NR DNA Length” 及び “Geneseq or NR Protein Length” は、BLASTから得られた最高マッチの配列におけるそれぞれヌクレオチド又はアミノ酸の数を示す。これらの欄で提供される結果は、NCBIデータベース又はGeneseqデータベースのどちらからより低いE値を報告した検索から得られた結果である。“Geneseq or NR % ID Protein” 欄及び “Geneseq or NR % ID DNA” 欄は、本発明の配列と最高BLASTマッチの配列との間のパーセント配列同一性を示す。これらの欄で提供される結果は、NCBIデータベース又はGeneseqデータベースのどちらからより低いE値を報告した検索から得られた結果である。

10

20

30

40

【0081】

相同な配列にはまたRNA配列が含まれる (RNA配列では前記核酸配列のチミンはウリジンに置換されている)。相同な配列は本明細書に記載されている方法のいずれかを用いて入手するか、又はシーケンシングエラーの修正から得ることができる。本明細書に示される核酸配列は、伝統的な一文字様式 (例えば以下を参照されたい: Lubert Stryer, Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York) 又は配列内のヌクレオチドの実体を記録する他の任意の様式で表現することができることは理解されよう。

本明細書で特定した種々の配列比較アルゴリズムが本発明のこの特徴で用いられる。タンパク質及び/または核酸配列同一性 (相同性) は、当業界で公知の多様な配列比較アルゴリズム及びプログラムのいずれか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、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALWが含まれるが、ただしこれらに限定されない (Pearson and 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, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993)。

相同性または同一性は配列分析ソフト (例えばジネティクスコンピュータグループ (University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705) の配列分析ソフトウェアパッケージ) を用いて測定できる。そのようなソフトは、種々の欠失、置換および他の改変に対して相同性の程度を決めることによって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、比較ウィンドウまたは指定の領域上で、任意の数の配列比較アルゴリズムを使用するかまたは手動アラインメントおよび目視検査による測定にしたがって最大一致を求めて比較およびアラインメントを実施したとき、同じであるか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が同じである2つまたは3つ以上の配列を指す。配列比較の場合、一方の配列は参照配列 (例示的配列の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8など) として機能し、前記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、テスト配列および参照配列はコンピュータに入力され、部分配列同等物が必要な場合に指定され、さらに配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。デフォルトのプログラムパラメーターを用いることができるが、また別のパラメーターを指定することもできる。続いて配列比較アルゴリズムは、前記のプログラムパラメーターを基に参照配列に対するテスト配列のパーセント配列同一性を計算する。

【0082】

50

本明細書で用いられる“比較ウィンドウ”は、任意数の連続残基セグメントに対する参照を含む。例えば本発明の別の特徴では、本発明の例示的な配列（例えば配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8など）の20から完全長の間のいずれかの範囲の連続残基が、同じ数の連続した箇所の参照配列と前記2つの配列を最適にアラインメントした後で比較される。参照配列が本発明の例示的な配列と必要な配列同一性を有するならば、例えば50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を本発明の配列（例えば配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8など）に対して有するならば、前記配列は本発明の範囲内にある。また別の実施態様では、約20から600、約50から200、及び約100から150の範囲の部分配列が、同じ数の連続した箇所の参照配列と前記2つの配列を最適にアラインメントした後で比較される。配列比較のアラインメントを実施する方法は当業界では周知である。比較のための配列の最適アラインメントは、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、Pearson & Lipmanの類似性検索方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)）によって、前記アルゴリズムのコンピュータ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検査によって実施できる。相同性または同一性決定のための他のアルゴリズムには、BLASTプログラム（Basic Local Alignment Search Tool at the 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（Pattern-Induced Multi-Sequence Alignment）、SAGA（Sequence Alignment by Genetic Algorithm）およびWHAT-IFが含まれる。前記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られ、実質的に同一の配列をもつ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、例えばヒトゲノムの実質的部分がヒトゲノム配列決定プロジェクト（Gibbs, 1995）の一部として利用可能である。いくつかのゲノムの配列、例えばM. ジェニタリウム（genitalium）（Fraser et al., 1995）、M. ジャナスキイー（jannaschii）（Bult et al., 1996）、H. インフルエンザエ（Fleischmann et al. 1995）、大腸菌（Blattner et al. 1997）、酵母（S. cerevisiae）（Mewes et al. 1997）およびD. メラノガスター（melanogaster）（Adams et al., 2000）の配列が決定された。顕著な進展がモデル生物（例えばマウス、C. エレガンスおよびアラビドプシス種（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に関する注釈をもつゲノム情報を含むデータベースが種々の機関で維持されており、インターネットでアクセスすることができる。

【0083】

BLAST、BLAST2.0およびBLAST2.2.2アルゴリズムもまた本発明の実施に用いられる。前記アルゴリズムは例えば以下に記載されている：Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3

389-3402; 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を通して公開されている。このアルゴリズムは、クエリー配列内の長さが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) をまず初めに同定することを必要とする。前記は、データベース配列中の同じ長さを持つワードとアラインメントを実施したとき、一致するかまたは何らかの正の値をもつ閾値スコアTの条件を満たす。Tは近傍ワードスコア閾値と称される (Altschul (1990) 上掲書)。これらの最初の近傍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シードとして機能する。前記ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加する限り各配列の両方向に沿って伸長される。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 (一致残基対のための褒賞スコア、常に > 0) を用いて計算される。アミノ酸配列の場合、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアが計算される。各方向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だけ下降したとき；累積スコアが、1つまたは2つ以上の負のスコアを与える残基アラインメントの累積のために0またはそれ以下になったとき；またはどちらかの配列の末端に達したとき。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは前記アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、デフォルトとして11のワード長、10の期待値 (E)、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、3のワード長および10の期待値 (E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。BLASTアルゴリズムはまた2つの配列間の類似性の統計的分析を実施する (例えば以下を参照されたい：Karlin & 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測定の1つは最小合計確率 ($P(N)$) であり、前記は2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然によって生じる確率を示す。例えば、テスト核酸と参照核酸の比較で最小合計確率が約0.2未満、好ましくは約0.01未満、もっとも好ましくは約0.001未満であるならば、前記核酸は参照配列と類似であると考えられる。ある特徴では、タンパク質および核酸配列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 (Basic Local Alignment Search Tool, “BLAST”) を用いて評価される。例えば、5つの特別なBLASTプログラムを用いて以下のタスクを実施することができる：(1) BLASTPおよびBLAST3はアミノ酸のクエリー配列をタンパク質配列データベースと比較する；(2) BLASTNはヌクレオチドのクエリー配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；(3) BLASTXはクエリーヌクレオチド配列 (その両方の鎖) の概念的6フレーム翻訳生成物をタンパク質配列データベースと比較する；(4) TBLASTNはクエリータンパク質配列 (両方の鎖) を全ての6つの読み枠で翻訳されるヌクレオチド配列データベースと比較する；さらに(5) TBLASTXはヌクレオチドクエリー配列の6枠翻訳をヌクレオチド配列データベースの6枠翻訳と比較する。BLASTプログラムは類似のセグメントを特定することによって相同な配列を同定する。前記セグメントは本明細書ではクエリーアミノ酸または核酸配列とテスト配列間の“高スコアセグメントペア”と称され、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得られる。高スコアセグメントペアは好ましくは、スコアリングマトリックス (その多くは当業界で公知である) によって特定される (すなわちアラインメントが実施される)。好ましくは、使用されるスコアリングマトリックスはBLOSUM62マトリックスである (Gonnet et al., Science 256:1443-1445 (1992); Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61 (1993))。好ましさは劣るが、PAMまたはPAM250もまた用いることができる (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)。

【0084】

本発明のある特徴では、核酸が本発明の範囲内のものであるために必要な配列同一性を有するか否かを決定するためにNCBI BLAST 2.2.2プログラムが用いられる。デフォルトオ

10

20

30

40

50

ブションはblastpである。BLAST 2.2.2プログラムには約38の設定オプションがある。本発明のこの例示的な特徴では、デフォルトのフィルタリング設定を除く全てのデフォルト値が用いられる（すなわち全てのパラメーターは、OFFに設定されるフィルタリングを除きデフォルトに設定される）。フィルタリングはデフォルトの代わりに“-FF”設定が用いられ、前記はフィルタリングを無効にする。デフォルトのフィルタリングの使用は、配列の長さが短いためにKarlin-Altschulバイオレーションを生じる場合が多い。

本発明のこの例示的な特徴において、及び上記で考察した図11の値を決定するために用いられるデフォルトには以下が含まれる：

- “ 低複雑度用フィルター：ON
- > ワードサイズ：3
- > マトリックス：Blosom62
- > ギャップコスト：エグジスタンス：11
- > エクステンション：1”

10

他のデフォルト設定は以下のとおりである：低複雑度用フィルターはOFF、タンパク質のためのワードサイズは3、BLOSUM62マトリックス、ギャップ存在のペナルティーは-11、およびギャップ伸長のペナルティーは-1。

典型的なNCBI BLAST2.2.2プログラム設定は下記の実施例1に示されている。“-W”オプションのデフォルト値は0であることに留意されたい。これは、設定されなければワードサイズはタンパク質についてデフォルトで3を選択し、ヌクレオチドについてデフォルトで11を選択することを意味する。

20

【0085】

コンピュータシステムおよびコンピュータプログラム製品

配列同一性、構造的相同性、モチーフなどをコンピュータシステムで決定および同定するために、コンピュータによって読み取りさらにアクセスすることができる任意の媒体上に本発明の配列を保存、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、本発明の核酸およびポリペプチド配列、例えば本発明の例示的配列（例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8など）を記録または保存させたコンピュータ、コンピュータシステム、コンピュータ読み取り可能な媒体、コンピュータプログラム製品などを提供する。本明細書で用いられる“記録”および“保存”という用語はコンピュータ媒体に情報を保存するプロセスを指す。当業者は、コンピュータ読み取り可能な媒体に情報を記録するための任意の公知の方法を容易に利用して、本発明の1つまたは2つ以上の核酸及び/又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。

30

本発明のまた別の特徴は、本発明の少なくとも1つの核酸及び/又はポリペプチド配列が記録されているコンピュータ読み取り可能な媒体である。コンピュータ読み取り可能な媒体には、磁気により読み取り可能な媒体、光学的に読み取り可能な媒体、電子的に読み取り可能な媒体及び磁気/光学媒体、フラッシュメモリーが含まれる。例えば前記コンピュータ読み取り可能な媒体はハードディスク、フロッピーディスク、磁気テープ、フラッシュメモリー、CD-ROM、多用途デジタルディスク（DVD）、ランダムアクセスメモリー（RAM）、又は読み出し専用メモリー（ROM）の他、当業者に公知の任意のタイプの媒体である。

40

本発明の特徴には、システム（例えばインターネット使用システム）、特にコンピュータシステムが含まれ、前記は本明細書に記載されている配列および配列情報を保存し、これを操作する。コンピュータシステム（100）の一例が図1の組立図に示されている。本明細書で用いられるように、“コンピュータシステム”は、本発明の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ハードウェア成分、ソフトウェア成分およびデータ保存成分を指す。コンピュータシステム（100）は、配列データを処理し、これにアクセスし、さらに前記を操作するプロセッサを含むことができる。プロセッサ（105）は周知のタイプの中央演算ユニットのいずれか、例えばインテル社（Intel Corporation）のペンチウムIIIまたはサン（Sun）、モトローラ（Motorola）、コンパック（Compaq）、AMD又

50

はインターナショナル=ビジネス=マシーン（IBM）の類似のプロセッサでありうる。前記コンピュータシステム（100）は汎用システムであり、前記はプロセッサ（105）および1つまたは2つ以上のデータ保存のための内部データ保存成分（110）、および前記データ保存成分に保存されたデータを検索するための1つまたは2つ以上のデータ検索装置を含む。従来の利用可能なコンピュータシステムのいずれも適切であることは当業者には理解されよう。

【0086】

ある特徴では、コンピュータシステム（100）は、バス（メインメモリー（115）（好ましくはRAMとして提供されている）に連結されている）に連結されたプロセッサ（105）、及び1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る他のコンピュータ読み取り可能な媒体）を含む。コンピュータシステム（100）はさらに、内部データ保存装置（110）のデータを読み取るための1つまたは2つ以上のデータ検索装置（118）を含む。

10

データ検索装置（118）は、例えばフロッピーディスクドライブ、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連結することができる（例えばインターネットを介して）モデムでもよい。いくつかの実施態様では、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取り可能な媒体、例えばフロッピーディスク、コンパクトディスク、磁気テープなどで、制御ロジック及び/又はそれに記録されたデータを含んでいる。コンピュータシステム（100）は便利には、データ検索装置にいったん挿入されたデータ保存成分から前記制御ロジック及び/又はデータを読み出すための適切なソフトを含むか、または前記ソフトによってプログラムされる。

20

コンピュータシステム（100）は、コンピュータのユーザーに出力結果を表示するために用いられるディスプレイ（120）を含む。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で連結され、コンピュータシステム（100）への中央アクセスを提供することができることは留意されるべきであろう。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前記を処理するためのソフトは実行時にはメインメモリー（115）に存在することができる。

いくつかの特徴では、コンピュータシステム（100）はさらに本発明の核酸配列を比較する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取り可能な媒体に保存することができる。“配列比較アルゴリズム”は、データ保存手段内に保存されている他のヌクレオチド配列及び/又は化合物とヌクレオチド配列を比較するためにコンピュータシステム（100）に（端末または遠隔端末から）提供される1つまたは2つ以上のプログラムを指す。例えば、配列比較アルゴリズムは、コンピュータ読み取り可能な媒体に保存されている例示的配列のヌクレオチド配列（例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8など）をコンピュータ読み取り可能な媒体に保存されている参照配列と比較し、相同性または構造モチーフを決定することができる。

30

【0087】

上記のアルゴリズムとともに用いられるパラメーターは、配列の長さおよび調べられる相同性の程度に応じて適用することができる。いくつかの特徴では、前記パラメーターは、ユーザーの指示がない場合、前記アルゴリズムによって用いられるデフォルト値パラメーターでもよい。図2は、新規なヌクレオチドまたはタンパク質配列を配列データベースと比較して、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ためのプロセス（200）の1つの特徴を示す工程図である。前記データベースの配列は、コンピュータシステム（100）内に保存された個人的データベースでも、公的データベース（例えばインターネットを介して利用可能なGENBANK）でもよい。プロセス（200）は開始状態（201）で始まり、続いて、比較されるべき新規な配列がコンピュータシステム（100）内のメモリーに保存される状態（202）に移行する。上記で考察したように、前記メモリーは任意のタイプのメモリー（RAMまたは内部保存装置を含む）であろう。

40

続いてプロセス（200）は状態（204）に移行し、ここで配列データベースが分析および

50

比較のために開かれる。続いてプロセス(200)は、データベースに保存されている第一の配列がコンピュータのメモリーに読み出される状態(206)に移行する。続いて比較が状態(210)で実施され、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の第一の配列との間の正確な比較の実施に限定されないことに留意することが重要である。2つのヌクレオチド配列またはタンパク質配列を(たとえそれらが同一ではなくても)比較する周知の方法を当業者は心得ている。例えばギャップを1つの配列に導入してこれら2つのテスト配列間の相同性レベルを高めることができる。比較時にギャップまたは他の特徴を配列に導入するか否かを制御するパラメータは通常はコンピュータシステムのユーザーによって入力される。

いったん2つの配列の比較が状態(210)で実施されたら、決定の状態(210)で前記2つの配列が同じか否かの決定が下される。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定されない。ユーザーによって入力された相同性パラメータ内にある配列は、プロセス(200)で“同じ”と示され、プロセス(200)は状態(214)に移行する(前記状態でデータベース由来の配列の名称がユーザーに表示される)。前記状態は表示された名称の配列が入力した相同性の特徴を満たすことをユーザーに知らせる。保存配列の名称がいったんユーザーに表示されたら、プロセス(200)は、それ以上の配列がデータベースに存在するか否かの決定が下される決定状態(218)に移行する。それ以上データベースに配列が存在しない場合には、プロセス(200)は終了状態(220)で終了する。しかしながらデータベースにさらに配列が存在する場合は、プロセス(200)は状態(224)に移行し、前記状態でポインターは、データベースの次の配列に移動し前記新たな配列と比較することができる。このようにして、新たな配列はアラインメントを実施されデータベースの各配列と比較される。

配列が相同でないという決定が決定状態(212)で下された場合、プロセス(200)は直ちに決定状態(218)に移行し、データベース内に比較されるべき他の配列が存在するか否かが決定されることは留意されよう。したがって、本発明のある特徴は、プロセッサ、本発明の核酸配列および比較を実施するための配列コンペアラが保存されているデータ保存装置を含むコンピュータシステムである。前記配列コンペアラは、比較される配列間の相同性レベルを示すかまたは構造モチーフを同定することができる。前記はまたこれらの核酸コードまたはポリペプチドコードと比較される配列内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システムのプロセス(250)のある実施態様を示す工程図である。プロセス(250)は開始状態(252)で開始し、続いて比較されるべき第一の配列がメモリーに保存される状態(254)に移行する。続いて比較されるべき第二の配列が状態(256)でメモリーに保存される。続いてプロセス(250)は状態(260)に移行し、前記状態(260)で第一の配列中の第一の記号が読み取られ、続いて状態(262)に移行し、前記状態(262)で第二の配列の第一の記号が読み取られる。前記配列がヌクレオチド配列の場合、前記記号は通常はA、T、C、GまたはUのいずれかであることは理解されよう。前記配列がタンパク質配列の場合は、前記記号は一文字のアミノ酸コードであり、それによって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つの記号が同じものであるか否かの決定が決定状態(264)で下される。それらが同じものである場合、プロセス(250)は状態(268)に移行し、前記状態(268)で第一および第二の配列の次の記号が読み取られる。続いて、前記次の記号が同じものであるか否かの決定が下される。それらが同じものである場合には、プロセス(250)は2つの記号が同じでなくなるまでこのループを繰り返す。次の2つの記号が同じでないという決定が下された場合、プロセス(250)は決定状態(274)に移行して、いずれかの配列に読み取られるべき記号がそれ以上存在するか否かが決定される。読み取られるべき記号がそれ以上存在しない場合は、プロセス(250)は状態(276)に移行し、第一および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、第一の配列内の記号の総数のうち同じであった配列間の記号の割合を計算することによって決定される。したがって、第二の配列の各記号と最初の100ヌクレオチド配列内の各記号のアラインメントが達

10

20

30

40

50

成された場合、前記相溶性レベルは100%であろう。

【0088】

また別には、前記コンピュータプログラムは本発明の配列と参照配列とを比較して、前記配列が1つまたは2つ以上のポジションで異なるか否かを決定することができる。前記プログラムは、リファレンス配列または本発明の配列にいずれかの配列に対して、挿入、欠失または置換されたヌクレオチドまたはアミノ酸残基の長さまたはそれらが何であるかを記録することができる。前記コンピュータプログラムは、本発明の配列に対して参照配列が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公知の配列のSNPを含むか否かを決定するプログラムであろう。したがって、いくつかの特徴では、前記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。前記方法は上記に述べたコンピュータシステムによって実施することができ、前記方法は図3に示されている。前記方法は、前記コンピュータプログラムを使用することにより本発明の配列およびリファレンス配列を読み取り、前記コンピュータプログラムにより相違を同定することによって実施することができる。

10

他の特徴では、前記コンピュータ使用システムは、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”は、核酸配列内のある種の特徴を同定する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オープンリーディングフレーム (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1つの特徴の存在を検出するためのアイデンティファイヤープロセス (300) のある特徴を示す流れ作業図である。プロセス (300) は開始状態 (302) で開始し、続いて状態 (304) に移行し、前記状態 (304) で特徴について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) のメモリー (115) に保存される。プロセス (300) は続いて状態 (306) に移行し、前記状態 (306) 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各特徴の属性リストを前記特徴の名称とともに含むであろう。例えば、特徴の名称は“開始コドン”であり、その属性は“ATG”であろう。別の例では、特徴の名称は“TAATAAボックス”であり、特徴の属性は“TAATAA”であろう。そのようなデータベースの例は、ウィスコンシン大学のGenetics Computer Groupによって作製されている。また別には、前記特徴は構造的な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。特徴のデータベースが状態 (306) で開かれると直ちにプロセス (300) は状態 (308) に移行し、前記状態 (308) で第一の特徴がデータベースから読み取られる。続いて第一の特徴の属性と第一の配列との比較が状態 (310) で実施される。続いて、前記特徴の属性が第一の配列内で見出されるか否かの決定が決定状態 (316) で下される。前記属性が見出された場合、プロセス (300) は状態 (318) に移行し、前記状態 (318) 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) は決定状態 (320) に移行し、前記状態 (320) で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下される。特徴がそれ以上存在しない場合は、プロセス (300) は終了状態 (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、プロセス (300) は状態 (326) で次の配列特徴を読み取り、状態 (310) に戻り、前記状態で次の特徴の属性が第一の配列に対して比較される。第一の配列で前記特徴の属性が決定状態 (316) で見出されない場合、プロセス (300) は直接決定状態 (320) に移行し、特徴がそれ以上データベースに存在するか否かを決定する。したがって、ある特徴では、本発明はオープンリーディングフレーム (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

【0089】

本発明のポリペプチドまたは核酸配列を、種々のデータプロセッサプログラムで多様な様式で保存し操作することができる。例えば配列は、当業者に周知の多様なデータベースプログラム (例えばDB2、SYBASEまたはORACLE) で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アスキーファイルとして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

50

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及びBLAST2（NCBI）、BLASTN及びBLASTX（Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403, 1990）、FASTA（Pearson and 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（Catalyst/SHAPE）（Molecular Simulations Inc.）、セリウス2DBアクセス（Cerius2.DBAccess）（Molecular Simulations Inc.）、ハイボゲン（HypoGen）（Molecular Simulations Inc.）、インサイトII（Insight II）（Molecular Simulations Inc.）、ディスカバー（Discover）（Molecular Simulations Inc.）、CHARMM（Molecular Simulations Inc.）、フェリックス（Felix）（Molecular Simulations Inc.）、デルフィー（DelPhi）（Molecular Simulations Inc.）、クオンテMN（QuanteMN）（Molecular Simulations Inc.）、ホモロジー（Homology）（Molecular Simulations Inc.）、モデラー（Modeler）（Molecular Simulations Inc.）、ISIS（Molecular Simulations Inc.）、クオンタ/タンパク質デザイン（Quanta/Protein Design）（Molecular Simulations Inc.）、ウェブラブ（WebLab）（Molecular Simulations Inc.）、ウェブラブ・ダイバーシティー・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（Gene Explorer）（Molecular Simulations Inc.）、シークフォールド（SeqFold）（Molecular Simulations Inc.）、MDLアベイラブル・ケミカルズ・ディレクトリー（MDL Available Chemicals Directory）データベース、MDLドラッグデータレポート（MDL Drug Data Report）データベース、コンプリヘンシブメディカルケミストリー（Comprehensive Medical Chemistry）データベース、デルウェントのワールドドラッグインデックス（Derwent's World Drug Index）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、ジンバンク（Genbank）データベース。本発明の開示により他の多くのプログラムおよびデータベースが当業者には明白となる。

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、ロイシンジッパーコード配列、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、普遍化部位、アルファヘリックス、ベータシート、コードされたタンパク質の分泌を誘導するシグナルペプチドをコードするシグナル配列、転写調節に関与する配列（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が含まれる。

【0090】

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例示的な配列（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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、

配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に示される配列)とハイブリダイズするか、又は配列番号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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、又は配列番号174に示される配列を含むポリペプチドをコードする単離若しく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あり、本明細書に記載されている高ストリンジェンシー条件および低ストリンジェンシー条件を含む。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の能力によって定義される本発明の核酸は、前記分子(例えば本発明の例示的な核酸)の約5残基から完全長でありうる。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、又はそれより大きい残基でありうる。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、標識用プローブ、PCRオリゴヌクレオチドプローブ、iRNA(一本鎖又は二本鎖)、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、結合ドメイン、調節ドメインなどをコードする配列として有用である。

10

20

【0091】

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定義される。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定義される。また別には、本発明の核酸は、42 で約50%のホルムアミド、5XのSSPE、0.3% SDSおよび反復配列封鎖核酸(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))の条件を含む高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定義される。ある特徴では、本発明の核酸は、35の低温で約35%のホルムアミドを含む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定義される。ある特徴では、本発明の核酸は、35の低い温度で35%のホルムアミドを含む低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするそれらの能力によって定義される。

30

40

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% SDSにより50 で洗浄することができる。前記の条件は、25%を超えるホルムアミドで“中等度”の条件、25%以下のホルムアミドで“低度”の条件と考えられる。“中等度にストリンジェントな”ハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、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ときである。“低度にストリンジェントな”ハイブリダイゼーション条件の具体的な条件は、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。

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対象の核酸のプリン対ピリミジンの比を計算し、したがって温度を調節することによってさらに狭めることができる。

50

本発明の核酸はまた文献（AusubelおよびSambrook）に示される高度、中等度および低度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするその能力によっても定義される。上記の範囲および条件の多様な変型例を本発明の実施に用いることができ、それらは当業界で周知である。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。

【0092】

オリゴヌクレオチドプローブおよびその使用方法

本発明はまた、ホスホリパーゼ活性をもつポリペプチドをコードする核酸を同定する核酸プローブを提供する。ある特徴では、前記プローブは、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、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171又は配列番号173に示される配列の少なくとも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、本発明の配列に示される配列の少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、90、100若しくは150又はそれより大きいか、又は約10から50、約20から60、約30から70の連続する塩基でありうる。前記プローブは、結合及び/又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、例えばキャピラリーアレイを含む本発明のアレイ（下記の考察を参照されたい）で用いることができる。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。

10

20

30

【0093】

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、本発明の核酸を有する生物又は前記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、前記核酸が単離された生物を潜在的に保有する生物学的サンプルを入手し、前記サンプルから核酸を得る。前記プローブがサンプル中に存在する相補的配列のいずれか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、相補性配列を含まないコントロール配列とともに相補性配列を含むことが判明しているサンプルの相補性配列と前記プローブを接触させることによって、前記プローブが特異的にハイブリダイズすることができる条件を決定することができる。ハイブリダイゼーション条件（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）を変化させて、前記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ができる条件を同定することができる（個々のハイブリダイゼーション条件に関しては考察を参照されたい）。

40

前記核酸が単離された生物をサンプルが含む場合、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、プローブを検出可能な薬剤（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）で標識することによって検出できる。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。前記方法にはサザンブロット、ノザンブロット、コロニーハイブリダイゼーション法およびドットブロットが含まれる。前記方法の各々のプロトコルは文献（AusubelおよびSambrook）に提供されている。

50

【0094】

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いずれか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、前記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、前記プローブはオリゴヌクレオチドを含む。ある特徴では、前記増幅反応はPCR反応を含むことができる。PCRプロトコルは文献（AusubelおよびSambrook）に記載されている（増幅反応に関し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、さらに生成された増幅生成物のいずれかを検出する。増幅生成物は、反応生成物のゲル電気泳動を実施し、前記ゲルをインターカレーション試薬（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、ゲル電気泳動の後で放射性増幅生成物の存在を検出してよい。

10

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もまた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ができる。そのような方法は、さらに別の問題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を可能にする。

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が同定および単離される。いくつかの特徴では、そのようにして同定された関連核酸は、本発明の核酸が最初に単離され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、核酸サンプルは、プローブが特異的に関連配列とハイブリダイズすることができる条件下で前記プローブと接触させられる。続いて、関連生物に由来する核酸とプローブのハイブリダイゼーションが上記に記載した方法のいずれかをを用いて検出される。

20

核酸ハイブリダイゼーション反応では、具体的なストリンジェンシーレベル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するであろう。例えば、核酸のハイブリダイズ領域の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えばGC対AT含有量）及び核酸タイプ（例えばRNA対DNA）は、ハイブリダイゼーション条件の選択に考慮することができる。さら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ているか否かである。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又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最初に45℃で30分、以下から成る溶液（0.9MのNaCl、50mMのNaH₂PO₄（pH7.0）、5.0mMのNa₂EDTA、0.5% SDS、10Xのデンハルト溶液及び0.5mg/mLのポリリボアデニル酸）中でプレハイブリダイズさせる。約2X10⁷ cpm（比活性4 - 9X10⁸ cpm/μg）の³²P末端標識オリゴヌクレオチドプローブを続いて溶液に添加する。12 - 16時間インキュベーションした後で、前記メンブレンを0.5%のSDSを含む1XのSET（150mMのNaCl、20mM トリス塩酸塩（pH7.8）、1mMのNa₂EDTA）中で30分室温（RT）で洗浄し、続いて新しい1XのSET中で30分、オリゴヌクレオチドプローブのためのT_m-10℃で洗浄する。続いて、ハイブリダイゼーションシグナルを検出するためにメンブレンでオートラジオグラフィフィルムを感光させる。

30

【0095】

核酸、例えばcDNAまたはゲノムDNA（前記は検出プローブとハイブリダイズする）の同定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動させることによって、プローブと相同性レベルが異なる核酸を同定し、これを単離することができる。ストリンジェンシーは、プローブの融解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動させることができる。融解温度（T_m）は、（限定されたイオン強度およびpHの下で）標的配列の50%が完全に相補性の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に等しいかまたはそれより約5℃低くなるように選択される。プローブの融解温度は以下の等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の場合、融解温度（T_m）は下記式を用いて計算される：T_m = 81.5 + 16.6（log[Na⁺]） + 0.41（G+Cの割合） - （600/N）、式中Nは

40

50

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含有溶液中で実施される場合、融解温度は以下の等式を用いて計算できる： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log[Na^+]) + 0.41 (G+C \text{の割合}) - (0.63\% \text{ホルムアミド}) - (600/N)$ 、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% SDS、100 μ gの変性フラグメント化サケ精子DNA、または6XのSSC、5Xのデンハルト試薬、0.5% SDS、100 μ gの変性フラグメント化サケ精子DNA、50%ホルムアミド中で実施することができる。SSCおよびデンハルト試薬ならびに他の溶液のための組成は例えば上掲書 (Sambrook) に挙げられている。

【0096】

ハイブリダイゼーションは、検出プローブを上記に挙げたプレハイブリダイゼーション溶液に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、ハイブリダイゼーション溶液に添加する前に前記を変性させる。前記プローブが、それと相補的または相同な配列を含むcDNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズできるように十分な時間前記ハイブリダイゼーション溶液とフィルターを接触させる。長さが200ヌクレオチドを超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15 - 25 °C下で実施できる。より短いプローブの場合 (例えばオリゴヌクレオチドプローブ)、ハイブリダイゼーションは T_m より5 - 10 °C下で実施できる。ある特徴では、6XのSSC中でのハイブリダイゼーションが約68 °Cで実施される。ある特徴では、50%ホルムアミド含有溶液中でハイブリダイゼーションが約42 °Cで実施される。前述のハイブリダイゼーションの全ては高ストリンジェンシー条件下であると考えられよう。

ハイブリダイゼーションの後で、フィルターを洗浄して非特異的に結合した一切の検出プローブを除去する。フィルターの洗浄に用いられるストリンジェンシーは、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であるかDNAであるか) にしたがって変動するであろう。だんだんと高くなるストリンジェンシー洗浄条件の例は以下のとおりである：2XのSSC、0.1% SDS、室温で15分 (低ストリンジェンシー)；0.1XのSSC、0.5% SDS、室温で30分 (中等度ストリンジェンシー)；0.1XのSSC、0.5% SDS、ハイブリダイゼーションの温度から68 °Cの間で15から30分 (高ストリンジェンシー)；0.15 MのNaCl、72 °C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、フィルター洗浄に用い

【0097】

プローブにハイブリダイズした核酸はオートラジオグラフィーまたは他の一般的な技術によって同定できる。上記の方法は、プローブ配列と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、検出プローブと相同性が低い核酸を得るためには、より低いストリンジェンシー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温度は、 Na^+ 濃度が約1Mのハイブリダイゼーション緩衝液で68 °Cから42 °Cまで5 °Cずつ下げることができる。ハイブリダイゼーションの後で、フィルターはハイブリダイゼーション温度で2XのSSC、0.5% SDSで洗浄することができる。これらの条件は、50 °Cより上で“中等度”の条件、50 °Cより下で“低ストリンジェンシー”条件と考えられる。“中等度”ハイブリダイゼーション条件の例は、上記ハイブリダイゼーションが55 °Cで実施されるときである。“低ストリンジェンシー”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 °Cで実施されるときである。

また別には、ハイブリダイゼーションは、緩衝液 (例えばホルムアミド含有6XのSSC) 中で42 °Cの温度で実施できる。この事例では、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は、プローブと相同性レベルの低いクローンを同定するために50%から0%まで5%ずつ減少させることができる。ハイブリダイゼーションの後で、フィルターを6XのSSC、0.5%のSDSで50 °Cで洗浄することができる。これらの条件は、25%より高いホル

ムアミドで“中等度”の条件、25%より低いホルムアミドホルムアミドで“低”ストリンジェンシー条件と考えられる。“中等度”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”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%のホルムアミドで実施されるときである。

【0098】

本発明のこれらプローブおよび方法を用いて、本発明の核酸配列の少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400又は500の連続する塩基を含む配列と少なくとも約99%、少なくとも98%、少なくとも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%、又は少なくとも50%の相同性を有する配列、及び前記と相補的な配列をもつ核酸を単離することができる。相同性は、本明細書で考察したようなアラインメントアルゴリズムを用いて測定できる。例えば、相同なポリヌクレオチドは、本明細書に記載されたコード配列の1つの天然に存在する対立遺伝子座変種の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座変種は、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、本発明のプローブおよび方法を用いて、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100または150の連続するそのアミノ酸を含む本発明のポリペプチドと、配列アラインメントアルゴリズムを用いて決定したとき、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%、又は少なくとも50%の配列同一性（相同性）を有する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（前記配列アラインメントアルゴリズムは、例えば、規定値を用いるFASTAバージョン3.0t78アルゴリズム又は、本明細書に示される例示的な設定を用いるBLAST2.2.2プログラムである）。

20

【0099】

ホスホリパーゼの発現阻害

本発明は、本発明の核酸、例えばホスホリパーゼをコードする核酸と相補的な核酸（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、ホスホリパ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を標的とすることにより達成することができる。標的と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及び/又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には、ホスホリパーゼ遺伝子またはメッセンジャーに結合する（いずれの事例でもホスホリパーゼの生成もしくは機能を防止または抑制する）ことができるオリゴヌクレオチドが含まれる。前記の結合は配列特異的ハイブリダイゼーションによるものでありうる。別の有用な阻害物質の種類にはホスホリパーゼメッセージの不活化または切断をもたらすオリゴヌクレオチドが含まれる。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を有することができる（例えばリボザイム）。前記オリゴヌクレオチドは化学的に改変するか、または相補性核酸を切断することができる酵素もしくは組成物と結合させることができる。前記のような種々のオリゴヌクレオチドの多数を含むプールを所望の活性を有するものについてスクリーニングすることができる。

30

40

ホスホリパーゼ発現阻害は多様な工業的用途を有しうる。例えば、ホスホリパーゼ発現の阻害は腐敗を抑制又は防止することができる。腐敗は、脂質又はポリペプチド（例えば構造的脂質又はポリペプチド）が酵素によって分解されるときに発生する。これは果実又は野菜の変質又は腐敗をもたらす。ある特徴では、ホスホリパーゼの発現及び/又は活性を阻害する本発明の組成物（例えば抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム及びRNAi）を使用して腐敗を遅らせ又は妨げる。したがって、ある特徴では、本発明は、腐敗の遅延又は防止のために、植物又は植物製品（例えば果実、種子、根、葉など）に本

50

発明の抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム及びRNAiを適用することを含む方法及び組成物を提供する。これらの組成物はまた、植物（例えばトランスジェニック植物）又は別の生物（例えば本発明のホスホリパーゼ遺伝子で形質転換された細菌又は他の微生物）によって発現させることもできる。

ホスホリパーゼの発現を阻害する本発明の組成物（例えばアンチセンス、iRNA、リボザイム及び抗体）は、医薬組成物として用いることができる。

【0100】

アンチセンスオリゴヌクレオチド：本発明は、mRNAを標的とすることによってホスホリパーゼ活性を阻害することができる、ホスホリパーゼメッセージと結合することができ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設計する方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ホスホリパーゼオリゴヌクレオチドを設計することができる。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ためのジーンウォーキング/RNAマッピングプロトコルは当業界で周知である。例えば以下を参照されたい：Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183。この文献はRNAマッピングアッセイを記載し、前記アッセイは標準的な分子技術を基にし、強力なアンチセンス配列選別のための簡単で信頼できる方法を提供する。さらにまた以下を参照されたい：Smith (2000) *Eur. J. Phar. Sci.* 11:191-198。

天然に存在する核酸が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は任意の長さでありうる。例えば、また別の特徴では、前記アンチセン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って決定できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の濃度で存在しうる。最適濃度は日常的なスクリーニングによって決定できる。この潜在的課題に用いることができる広範囲の合成された天然に存在しないヌクレオチドおよび核酸類似体が知られている。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（それらは以下に記載されている：W097/03211；W096/39154；Mata (1997) *Toxicol. App. Pharmacol.* 144:189-197；*Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996)）。本発明によって提供される合成DNA骨格類似体をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドにはまた、上記で述べたようにホスホロ-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(メチリミノ)、3'-N-カルバメート及びモルホリノカルバメート核酸が含まれうる。

順列組合せ的な化学的方法を用いて膨大な数のオリゴヌクレオチドを生成することができる。前記オリゴヌクレオチドは、任意の標的（例えば本発明のセンスおよびアンチセンスホスホリパーゼ配列）に対し適切な結合親和性および特異性を有する特定のオリゴヌクレオチドについて迅速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）。

【0101】

阻害性リボザイム：本発明は、mRNAを標的とすることによってホスホリパーゼ酵素活性を阻害することができる、ホスホリパーゼメッセージと結合することができるリボザイムを提供する。リボザイムを設計し、ターゲッティングのためにホスホリパーゼ特異的アンチセンス配列を選別する方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設計することができる。リボザイムは、標的RNAを切断するRNAの酵素部分の極めて近くに保持されるリボザイムの標的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。したがって、リボザイムは、相補性塩基対形成により標的RNAを認識し、これと結合する。いったん正確な部位に結合したら、リボザイムは酵素として機能し標的RNAを切断し、これを不活化する。切断がコード配列内で発生すれば、そのような態様での標的RNAの切断は、もしその切断がコー

ド配列で生じるならば、コードされるタンパク質の合成を指令するその能力を破壊するであろう。リボザイムがそのRNA標的と結合し、これを切断した後、リボザイムは典型的には前記RNAから遊離し、新たな標的と前記のように結合し、繰り返しこれを切断することができる。

いくつかの環境下では、前記リボザイムの酵素的性質は他の技術、例えばアンチセンス技術（アンチセンス技術では、核酸分子は核酸標的に単に結合してその転写、翻訳または別の分子との結合を阻止するだけである）に比べて有利であろう。なぜならば、治療達成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低いからである。この潜在的な利点はリボザイムの酵素として機能する能力の結果である。したがって、ただ1つのリボザイム分子が多くの標的RNA分子を切断することができる。さらにまた、リボザイムは典型的には特異性が高い阻害剤であり、阻害の特異性は塩基対形成による結合メカニズムだけでなく、リボザイムが結合するRNAの発現を前記リボザイム分子が阻害するメカニズムにも依存している。すなわち、阻害はRNA標的の切断によって生じ、したがって特異性は非標的RNAの切断速度に対する標的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關与する要因に加えて更に種々の要因に依存する。したがって、リボザイム作用の特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド結合の特異性よりも高いであろう。

【0102】

本酵素リボザイムRNA分子はハンマーヘッドモチーフとして形成することができるが、又ヘアピンモチーフ、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又はRNaseP様RNAモチーフ（RNAガイド配列と結合）としても形成することができる。そのようなハンマーヘッドモチーフの例は、Rossi (Aids Research and Human Retroviruses 8:183 (1992)) によって、ヘアピンモチーフの例はHampel (Biochemistry 28:4929 (1989) 及びNuc. Acids Res. 18:299 (1992)) によって、肝炎デルタウイルスモチーフの例はPerrotta (Biochemistry 31:16 (1992)) によって、RNasePモチーフの例はGuerrier-Takada (Cell 35:849 (1983)) によって、さらにグループIイントロンの例はCech (US Pat. No. 4,987,071) によって記載されている。前記の具体的なモチーフの記載はそれらに限定することを意図したものではない。当業者は、本発明の酵素RNA分子は、標的遺伝子のRNA領域の1つまたは2つ以上と相補的な固有の基質結合部位を有し、さらに、基質結合部位内またはその周辺に前記リボザイム分子にRNA切断活性を付与するヌクレオチド配列を有することを理解していよう。

【0103】

RNA干渉 (RNAi) : ある特徴では本発明は、本発明のホスホリパーゼ配列を含むRNA阻害分子、いわゆる“RNAi”分子を提供する。RNAi分子は二本鎖RNA (dsRNA) 分子を含む。RNAiはホスホリパーゼ遺伝子の発現を阻害することができる。ある特徴では、RNAiは、長さが約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25又はそれより大きい二重鎖ヌクレオチドである。本発明はいずれの特定の作用メカニズムにも限定されないが、RNAiは細胞内に入り、類似または同一の配列を有する一本鎖RNA (ssRNA) (内因性mRNAを含む) の分解を引き起こす。細胞が二本鎖RNA (dsRNA) に暴露されるとき、相同な遺伝子に由来するmRNAは、RNA干渉 (RNAi) と称される過程によって選択的に分解される。RNAiの背後にある可能な基本的メカニズムは、特定の遺伝子配列と一致する二本鎖RNA (dsRNA) の短い破片 (短小干渉性RNAと称される) への分解である。前記短小干渉性RNAは、その配列と一致するmRNAの分解の引き金となる。ある特徴では、本発明のRNAiは遺伝子サイレンシング療法で用いられる (例えば以下を参照されたい: Shuey (2002) Drug Discov. Today 7:1040-1046)。ある特徴では、本発明は、本発明のRNAiを用いて選択的にRNAを分解する方法を提供する。前記方法はin vitro、ex vivoまたはin vivoで実施することができる。ある特徴では、本発明のRNAi分子を用いて細胞、器官または動物の機能低下変異を作出することができる。選択的にRNAを分解するためにRNAi分子を製造および使用する方法は当業界では周知であり、例えば以下を参照されたい: 米国特許第6,506,559号、第6,511,824号、第6,515,109号および第6,489,127号。

10

20

30

40

50

【0104】

核酸の改変

本発明は、本発明の核酸（例えばホスホリパーゼをコードする核酸）の変種を生成する方法を提供する。また別の実施態様では、本発明は、例えばpH/温度安定性に影響を与えるために、酵素のpH活性範囲若しくは最適活性範囲、温度の活性範囲若しくは最適活性範囲、特異性、活性（カイネティクス）；酵素のグリコシル化、リン酸化または金属（例えばCa、Mg、Zn、Fe、Na）の使用を改変するために、例えばランダム若しくは確率論的方法、又は非確率論的若しくは“定方向進化”、例えば遺伝子部位飽和変異導入（商標）（GSSM（商標））による本発明の酵素のコード配列の変異によって本発明の酵素を改変する方法を提供する。本発明は、例えばそのコード配列に（例えばGSSM（商標）によって）変異を導入してそのプロテアーゼ活性に対する耐性を高めることによって、本発明の酵素を改変する方法を提供する。本発明は、例えばそのコード配列に（例えばGSSM（商標）によって）変異を導入して、Znをキレートしない、Ca、Mg、Naに特異的な金属キレート物質の酵素による使用を改変することによって、本発明の酵素を改変する方法を提供する。本発明は、例えばそのコード配列に、例えばGSSM（商標）によって、所望の活性の組合せ（例えばPI、PA及びPC/PE特異的PLC）を示す変異を導入することによって、本発明の酵素を改変する方法を提供する。

10

これらの方法は反復するか、又は種々の組合せで用いて、鋳型核酸によってコードされるホスホリパーゼのものとは変異した若しくは異なる活性を有するか、又は変異した若しくは異なる安定性を有するホスホリパーゼ酵素を作製することができる。これらの方法はまた反復するか、又は種々の組合せで用いて、例えば遺伝子/メッセージ発現、メッセージの翻訳又はメッセージの安定性における変種を作製することができる。又別の特徴では、細胞の遺伝的組成が、例えば相同遺伝子をex vivoで改変し、前記改変遺伝子をその後細胞に再挿入することによって改変される。

20

【0105】

本発明の核酸は任意の手段、例えばランダム若しくは確率論的方法、又は非確率論的方法若しくは“定方向進化”方法によって改変できる（例えば米国特許6,361,974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ことができる。変異原には、例えば紫外線またはガンマ線照射、又は化学的変異原、例えばマイトマイシン、亜硝酸、光活性化ソラレンが含まれ、単独または併用して組換えによって修復されやすいDNA開裂を誘導する。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。その他の変異原は、ヌクレオチド前駆体の類似物質、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。これらの薬剤はPCR反応にヌクレオチド前駆体の代わりに添加され、それによって前記配列を変異させることができる。インターカレーション薬剤（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

【0106】

分子生物学の任意の技術、例えばランダムPCR変異導入（例えば以下を参照されたい：Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471）又は順列組合せマルチカセット変異導入（combinatorial multiple cassette mutagenesis）（例えば以下を参照されたい：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）をランダムにまたは“確率論的に”フラグメント化した後で再アッセムブリングすることもできる（例えば以下を参照されたい：米国特許第6,291,242号；同6,287,862号；同6,287,861号；同5,955,358号；同5,830,721号；同5,824,514号；同5,811,238号；同5,605,793号）。また別の特徴では、改変、付加または欠失は、変異性PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド特異的変異導入、アッセムブリPCR、セクシャルPCR変異導入、in vivo変異導入、カセット変異導入、再帰的アンサンブル変異導入、エクスポネンシャルアンサンブル変異導入、部位特異的変異導入、遺伝子再アッセムブリ、遺伝子部位飽和変異導入（GSSM）、合成連結再アッセムブリ（SLR）、組換え、再帰的配列組換え、ホスホチオエート-修飾DNAによる変異導入、ウラシル含有鋳型による変異導入、ギ

40

50

ャップ含有二重鎖による変異導入、ポイントミスマッチ修復による変異導入、修復欠損宿主株による変異導入、化学的変異導入、放射源による変異導入、欠失による変異導入、制限-選別変異導入、制限-精製変異導入、人工遺伝子合成、アンサンブル変異導入、キメラ核酸マルチマーの生成及び/又はこれらの組合せ並びに他の方法によって導入される。

【 0 1 0 7 】

以下の文献は、本発明の方法に取り入れることができる多様な反復組換え手順及び/又は方法を記載している：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 an antibody-phage libraries by DNA shuffling", Nature Medicine 2:100-103; Cramer et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling", Nature Biotechnology 14:315-319; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" Journal of Molecular Biology 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: The Encyclopedia of Molecular Biology. VCH Publishers, 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 0 8 】

多様性を生成する変異導入方法には例えば以下が含まれる：部位特異的変異導入 (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" Ann. 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; 及び 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変異導入 (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" Methods in Enzymol. 154, 367-382; および Bass et al. (1988) "Mutant

Trp repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); オリゴヌクレオチド誘導変異導入 (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods 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変異導入 (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucleic Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucleic Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease *Nci* I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucleic Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucleic 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" *Nucleic Acids Res.* 16: 803-814); ギャップをもつ二重鎖DNAを用いる変異導入 (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucleic 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" *Nucleic 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" *Nucleic Acids Res.* 16: 6987-6999)。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 9 】

本発明を実施するために用いることができるさらに別の方法には以下が含まれる：点ミスマッチ修復 (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" *Cell* 38:879-887)、修復欠損宿主株を用いる変異導入 (Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4443; and Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 154: 382-403)、欠失変異導入 (Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" *Nucleic Acids Res.* 14: 5115), restriction-selection and restriction-selection and restriction-purification (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423)、全遺伝子合成による変異導入 (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)" *Nucleic 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" *Nucleic Acids Res.* 13: 3305-3316)、二本鎖開裂修復 (Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual 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)。上記の方法の多くに関する更なる詳細は "Enzymology" (Volume 154) で見出すことができる。この文献にはまた種々の変異導入方法に関する問題を解決するための有用な管理に関する記述がある。

【 0 1 1 0 】

さらにまた以下を参照されたい：U.S. Pat. No. 5,605,793 (Stemmer, Feb. 25, 1997, "Methods for In Vitro Recombination") ; U.S. Pat. No. 5,811,238 (Stemmer et al., Sep. 22, 1998, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination") ; U.S. Pat. No. 5,830,721 (Stemmer et al., Nov. 3, 1998, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; U.S. Pat. No. 5,834,252 (Stemmer, et al., Nov. 10, 1998, "End-Complementary Polymerase Reaction") ; U.S. Pat. No. 5,837,458 (Minshull, et al., Nov. 17, 1998, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering") ; WO 95/22625 (Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; WO 96/33207 (Stemmer and Lipschutz, "End Complementary Polymerase Chain Reaction") ; WO 97/20078 (Stemmer and Cramer, "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination") ; WO 97/35966 (Minshull and Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering") ; WO 99/41402 (Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors") ; WO 99/41383 (Punnonen et al. "Antigen Library Immunization") ; WO 99/41369 (Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering") ; WO 99/41368 (Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines") ; EP 752008 (Stemmer and Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly") ; EP 0932670 (Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination") ; WO 99/23107 (Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling") ; WO 99/21979 (Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors") ; WO 98/31837 (del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination") ; WO 98/27230 (Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering") ; WO 98/27230 (Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection") ; WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries" ; WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences" ; WO 98/42832 (Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers") ; WO 99/29902 (Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences") ; WO 98/41653 (Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library") ; WO 98/41622 (Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling") ; 及び WO 98/42727 (Pati and Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination")

【 0 1 1 1 】

ある種の米国特許出願は、種々の多様性を生成する方法に関するさらに追加の詳細を提供し、前記には以下が含まれる："SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" (Patten et al., 1999年9月28日出願、U.S. Ser. No. 09/407,800) ; "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" (del Cardayre et al., 1998年7月15日出願、U.S. Ser. No.09/354,922) ; "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" (Cramer et al., 1999年9月28日出願、U.S. Ser. No.09/408,392及び"OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" (Cramer et al.,2000年1月18日出願、PCT/US00/01203) ; "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" (Welch et al., 1999年9月28日出願、U.S. Ser. No. 09/408,393) ; "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTER

ERISTICS" (Selifonov et al., 2000年1月18日出願、PCT/US00/01202) 及び、例えば "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" (Selifonov et al., 2000年7月18日出願、U.S. Ser. No. 09/618,579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" (Selifonov and Stemmer, 2000年1月18日出願PCT/US00/01138); 及び "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" (Affholter, 2000年9月6日出願、U.S. Ser. No. 09/656,549)。

非確率論的又は“定方向進化”方法(例えば“飽和変異導入”(GSSM)、合成連結再アッセンブリ(SLR)または前記の組合せを含む)を用いて本発明の核酸を改変し、新規なまたは変異した特性(例えば強酸または強アルカリ条件、高温条件下などでの活性)を有するホスホリパーゼが生成される。改変された核酸によってコードされるポリペプチドは、ホスホリパーゼ活性または他の活性について試験する前に活性についてスクリーニングすることができる。任意の試験様式又はプロトコルを、例えばキャピラリーアレイ盤を利用して用いることができる。例えば米国特許第6,280,926号、同5,939,250号を参照されたい。

10

【0112】

飽和変異導入(またはGSSM(商標)): 本発明のある特徴では、非確率論的遺伝子改変、“定方向進化プロセス”を用いて、新規で変異した特性を有するホスホリパーゼが生成される。この方法の変型は“遺伝子部位変異導入”、“部位飽和変異導入”、“遺伝子部位飽和変異導入(商標)”又は簡単に“GSSM(商標)”と称されてきた。前記は他の変異導入プロセスと組み合わせて用いることができる(例えば米国特許6,171,820号; 6,238,884号を参照されたい)。ある特徴では、GSSM(商標)は、鋳型ポリペプチド及び複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程[ここで各オリゴヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドと相同な配列(それによって鋳型ポリヌクレオチドの特定の配列を標的とする)及び前記相同な遺伝子の変種である配列を含む]; 前記鋳型ポリヌクレオチドを前記オリゴヌクレオチドで置き換えることによって、非確率論的な配列変動を含む子孫ポリヌクレオチドを生成し、それによって相同な遺伝子の配列変動を含むポリヌクレオチドを生成する工程を含む。

20

ある特徴では、ポリヌクレオチドに点変異を導入し、子孫ポリペプチドセットを生成するために縮退N,N,G/T配列を含むコドンプライマーが使用される。前記子孫ポリペプチドセットでは、全範囲の単一アミノ酸置換が各アミノ酸の位置で、例えば改変の標的となる酵素活性部位またはリガンド結合部位内の各アミノ酸の位置で出現する。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配列及び場合によって第二の相同な配列を含むことができる。そのようなオリゴヌクレオチドを使用することによって得られる下流の子孫翻訳生成物には、前記N,N,G/T配列の縮退は20の全てのアミノ酸のためのコドンを含むので前記ポリペプチドに沿って各アミノ酸の位置で可能な全てのアミノ酸変化が含まれる。ある特徴では、1つのそのような縮退オリゴヌクレオチド(例えば1つに縮退N,N,G/Tカセットを含む)が、親のポリヌクレオチド鋳型中の本来のコドンの各々を全範囲のコドン置換に付すために用いられる。また別の特徴では、親のポリヌクレオチド鋳型中の少なくとも2つの本来のコドンを全範囲のコドン置換に付すために少なくとも2つの縮退カセットが(同じヌクレオチドまたは別個のヌクレオチドで)用いられる。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含ませ、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配列は連続していてもよいし、又は1つ若しくは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あってもよい。別の特徴では、付加および欠失の導入に役立つオリゴヌクレオチドを単独又はN,N,G/T配列を含むコドンとともに用いて、アミノ酸付加、欠失及び/又は置換の任意の組合せまたは並べ換えが導入される。

30

40

【0113】

ある特徴では、2つまたは3つ以上の連続するアミノ酸の位置での同時変異導入は、連続するN,N,G/Tトリプレット(すなわち縮退(N,N,G/T)_n配列)を含むオリゴヌクレオチドを

50

用いて実施される。別の特徴では、N,N,G/T配列よりも縮退度の小さい縮退力セットが用いられる。例えば、いくつかの事例では、ただ1つのN（このNは前記トリプレットの第一、第二または第三番目の位置に存在しうる）を含む縮退トリプレット配列を（オリゴヌクレオチドで）用いることが所望されよう。任意の組合せ及び並べ換えを含む他のいずれの塩基もトリプレットの残りの2つの位置において用いることができる。また別には、いくつかの事例で縮退N,N,Nトリプレット配列を（例えばオリゴで）用いることができよう。

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、ポリペプチドのそれぞれの及び全てのアミノ酸の位置について天然アミノ酸の全範囲の（合計20アミノ酸）系統的で容易な生成が可能になる（別の特徴では、前記方法はまた、各アミノ酸残基、コドン、位置の可能な全ての置換よりも少ない置換の生成も含む）。例えば、100アミノ酸のポリペプチドについては、2000個の別個の種（すなわち各位置につき20個の可能なアミノ酸×100個のアミノ酸位置）が生成される。縮退N,N,G/Tトリプレットを含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドセットを使用することによって、32個の個々の配列が20個の可能な天然のアミノ酸を全てコードすることができる。したがって、親のポリヌクレオチド配列が少なくとも1つの前記のようなオリゴヌクレオチドを用いて飽和変異導入に付される反応容器では、20個の別個のポリペプチドをコードする32個のそれぞれ別個の子孫ポリヌクレオチドが生成される。対照的に、部位特異的変異導入では非縮退オリゴヌクレオチドを使用したとき、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生じるだけである。場合によって非縮退オリゴヌクレオチドを開示された縮退プライマーとともに用いることができる。例えば、非縮退オリゴヌクレオチドを用いて作業中のポリヌクレオチドで特定の点変異を生成することができる。これは、特定のサイレント点変異、対応するアミノ酸変化をもたらす点変異、並びに終止コドン及びポリペプチドフラグメントの対応する発現を生じさせる点変異を生成する1つの手段を提供する。

【0114】

ある特徴では、各飽和変異導入反応容器は、親のポリヌクレオチドで変異を導入されるコドンの位置に一致する特定の1つのアミノ酸位置において20個全ての天然アミノ酸が提示されるように、少なくとも20の子孫ポリペプチド（例えばホスホリパーゼ）分子をコードするポリヌクレオチドを含む（他の特徴では20個全てより少ない天然の組合せが用いられる）。各飽和変異導入反応容器から生成される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）に例えば発現ベクターを用いてクローニングする）、さらに発現スクリーニングに付すことができる。スクリーニングによって好ましい特性変化を表示する個々の子孫ポリペプチドが同定されたとき（例えば親のポリペプチドと比較したときアルカリ性または酸性条件下でホスホリパーゼ活性が増加する）、前記子孫ポリペプチドを配列決定し、その中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。

ある特徴では、本明細書に開示したように、親のポリペプチドの各々及び全てのアミノ酸位置に飽和変異導入を用いて変異を導入するとき、好ましいアミノ酸変化が2つ以上のアミノ酸位置において同定されうる。これら好ましいアミノ酸置換の全てまたは一部分の組合せを含む1つまたは2つ以上の新規な子孫分子を生成することができる。例えば、2つの具体的な好ましいアミノ酸変化が、ポリペプチドの3つのアミノ酸位置の各々で同定されるならば、前記置換は各位置および3つの位置で3つの可能性を含む（最初のアミノ酸から変化のないもの及び好ましい変化をもつ2つの各々）。したがって、 $3 \times 3 \times 3$ 、または合計27の可能性が存在し、これらは以前に調べられた7つ - 6つの単一点変異（すなわち3つの位置の各々で2つ）及びいずれの位置においても変化のないものを含む。

別の特徴では、位置飽和変異導入をまた別の確率論的または非確率論的手段と一緒に用いて配列を変化させることができる。前記別的手段は、例えば合成連結再アッセンブリ（下記参照）、シャッフリング、キメラ化、組換えおよび他の変異導入方法および変異導入剤である。本発明は任意の突然変異導入方法（飽和変異導入を含む）の反復態様での使用を提供する。

【0115】

合成連結再アッセンブリ (SLR) : 本発明は、“合成連結再アッセンブリ” (又は簡単に“SLR”)、“定方向進化プロセス”と称される、新規なまたは変異した特性を有するホスホリパーゼを生成する非確率論的遺伝子改変系を提供する。SLRは、オリゴヌクレオチドフラグメントを非確率論的に一緒に連結する方法である。この方法は、核酸構築ブロックがランダムにシャッフル、連結、またはキメラ化されるのではなく、非確率論的にアッセンブリングされるという点で確率的オリゴヌクレオチドシャッフルングとは異なる。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 Directed Evolution”) (1999年6月14日出願 “USSN09/332,835”)。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（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む）；(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（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あらかじめ定められた配列で交差再アッセンブリングを生じるように設計され、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とフランキングする前記鋳型ポリヌクレオチドと相同な配列を含む）；(c) 前記構築ブロックポリヌクレオチドが前記鋳型ポリヌクレオチドと交差再アッセンブリングして相同な遺伝子配列変種を含むポリヌクレオチドを生成できるように、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する工程。

10

SLRは、再配列を実施されるポリヌクレオチド間に高レベルの相同性が存在することを必要としない。したがって、本方法は、 10^{100} を超える種々のキメラを含む子孫分子のライブラリー (又はセット) を非確率論的に作製するために用いることができる。SLRを用いて 10^{100} を超える種々の子孫キメラを含むライブラリーの作製に用いることができる。したがって、本発明の特徴は、設計に従って選択された全体的なアッセンブリの順番にしたがって完成されたキメラ核酸分子セットを製造する非確率論的方法を含む。前記方法は以下の工程を含む：互いに適合する連結可能な有用な末端を有する複数の固有の核酸構築ブロックを設計に従って作製する工程、及び、設計した全体的なアッセンブリの順番が達成されるように前記核酸構築ブロックをアッセンブリングする工程。

20

【0116】

アッセンブリングされる互いに適合する核酸構築ブロックの末端は、これらが前記構築ブロックをあらかじめ定めた順序で結合させることができるならば、このタイプの指定されたアッセンブリに対して“有用”であると考えられる。したがって、前記核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセンブリの順番は、連結させることができる末端の設計によって特定される。2つ以上のアッセンブリ工程が用いられる場合、核酸構築ブロックが結合される全体的なアッセンブリの順番は、前記アッセンブリ工程の一連の順番によって特定される。ある特徴では、アニールされた構築片が酵素 (例えばリガーゼ (例えばT4DNAリガーゼ)) で処理され、前記構築片の共有結合が達成される。

30

ある特徴では、オリゴヌクレオチド構築ブロックの設計は、祖先核酸配列鋳型セットを分析することによって得られる (祖先核酸配列は完成したキメラポリヌクレオチドの子孫セットを製造する基礎として機能する)。したがって、これら親のオリゴヌクレオチド鋳型は、変異 (例えばシャッフルングまたはキメラ化) を導入しようとす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。

40

この方法のある特徴では、1つまたは2つ以上の境界点を選択するために、複数の親核酸鋳型の配列でアラインメントが実施される。前記境界点は相同領域に位置することができる、1つまたは2つ以上のヌクレオチドが含まれる。これらの境界点は好ましくは少なくとも2つの祖先鋳型によって共有される。それによって前記境界点は、親ポリヌクレオチドの再編成のために作製されるオリゴヌクレオチド構築ブロックの境界線を引くために用いることができる。祖先分子中で特定され選別される境界点は、完成キメラ子孫分子のアッセンブリにおける潜在的キメラ形成点として機能する。境界点は、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領域 (少なくとも1つの相同なヌクレオチド塩基を含む) でありうる。また別には、境界点は、親ポリヌクレオチド配列の少なくとも半

50

分によって共有される相同領域であるか、また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領域でありうる。さらに好ましくは、有用な境界点は、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領域であるか、または境界点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うる。ある特徴では、境界点は、親ポリヌクレオチド配列の全部によって共有される相同領域である。

ある特徴では、連結再アッセンブリプロセスは、子孫キメラポリヌクレオチドの網羅的ライブラリーを作製するために網羅的に実施される。換言すれば、全ての可能な順番で組み合わされた核酸構築ブロックが、完成キメラ核酸分子セットに提示される。同時に、別の実施態様では、各組合せにおけるアッセンブリの順番（すなわち完成したキメラ核酸の各々の配列の5'から3'方向における各構築ブロックのアッセンブリの順番）は上記に記載したように意図的（又は非確率論的）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極めて低くなる。

【0117】

別の特徴では、前記連結再アッセンブリ法は系統的に実施される。例えば、前記方法は、系統的に区画化された子孫分子のライブラリーを作製するために実施され、前記区画化ライブラリーは、系統的に（例えば1つずつ）スクリーニングすることができる区画を有する。換言すれば、本発明は、連続工程によるアッセンブリング反応の選択的および慎重な使用と併せて特定の核酸構築ブロックを選択的および慎重に使用することによって、特定の子孫生成物セットがいくつかの反応容器の各々で生成される仕組みの達成を提供する。前記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、潜在的に膨大な数の子孫分子をより小さなグループで系統的に調査することを可能にする。特に祖先分子間で低レベルの相同性しか存在しないときに、高度に柔軟性を有し、しかも網羅的で系統的な態様でのキメラ化の実施を可能にするその能力のために、これらの方法は膨大な数の子孫分子を含むライブラリー（又はセット）の生成を提供する。本発明の連結再アッセンブリの非確率論的な性質のために、生成される子孫分子は好ましくは、設計に従って選択された全体的なアッセンブリの順番を有する完成されたキメラ核酸分子のライブラリーを含む。飽和変異導入および最適化された定方向進化法もまた種々の子孫分子種の生成に用いることができる。本発明は、境界点、核酸構築ブロックのサイズおよび数並びに結合の設計の選択に関して選択と制御の自由を提供することは理解されよう。さらにまた、分子間相同性の要求は、本発明の操作性のために大きく緩和されることもまた理解されよう。実際、境界点はほとんど又は全く分子間相同性がない領域でも選択できる。例えば、コドンの揺らぎのために（すなわちコドンの縮退のために）、対応する祖先鋳型で本来コードされるアミノ酸を変更することなく核酸中にヌクレオチド置換を導入することができる。また別に、コドンを変更して本来のアミノ酸のコードを変更してもよい。本発明は、分子間相同性を有する境界点の出現傾向を高めるために、したがって構築ブロック間で達成される結合数を高めるために（生成される子孫キメラ分子数の増加を可能にする）、前記のような置換の核酸構築ブロックへの導入を提供する。

また別の特徴では、構築ブロックが作製される工程の合成的な性質によって、*in vitro* プロセス（例えば変異導入により）または*in vivo* プロセス（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り）で場合によって後で除去することが可能なヌクレオチド（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ろう）を設計または導入することが可能になる。利用可能な境界点を創出できるという潜在的な利点に加えて、多くの事例で、他の多くの理由からこれらヌクレオチドの導入がまた所望されう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を導入することができる。したがって、機能的なイントロンが本明細書に記載された方法にしたがって製造された人工遺伝子に導入される。前記人工的に導入されたイントロンは、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を発揮する態様とほぼ同じように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。

【0118】

10

20

30

40

50

最適化定方向進化系：本発明は、新規な又は変異した特性をもつホスホリパーゼを生成するために、“最適化定方向進化系”と称される非確率論的遺伝子改変系を提供する。最適化定方向進化は、組換えによる核酸の定方向分子進化を可能にする、還元的再組合せ（reductive reassortment）、組換え及び選別の反復サイクルを用いることを意図する。最適化定方向進化は進化したキメラ配列の大集団の作出を可能にし、前記作出集団には予め定められた数の交差事象を含む配列がきわめて豊富に存在する。

交差事象は、一方の親の変種から別の親の変種へ配列のシフトが生じるキメラ配列内の点である。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単一の配列を形成する結合部に存在する。この方法は、最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象を豊富に含むことができるようにオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にする。これによって、予め定められた数の交差事象を含むキメラ変種の選択に対してより大きな制御が提供される。

さらにまた、本方法は、他の系と比較して膨大な量の可能なタンパク質変種スペースの探索のための簡便な手段を提供する。以前には、反応中に例えば 10^{13} 個のキメラ分子が生成された場合、そのような膨大な数の変種の特定の活性についてテストすることは極めて困難であろう。さらにまた、子孫集団の顕著な部分が、特定の活性のレベルが増加している可能性が少ないタンパク質を生じる非常に大きな数の交差事象を含むであろう。こ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含む変種を豊富に含むことができる。したがって、反応中になお 10^{13} 個のキメラ分子が生成されても、更なる分析のために選別される分子の各々は、例えば3つの交差事象だけを含む可能性が高くなる。生成された子孫集団が予め定めた数の交差事象を持つように偏らせることができるので、キメラ分子間の機能的変種に対する境界線が減少する。これによって、最初の親の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属性に影響を及ぼすために必要かを計算するときにより操作しやすい数の変数が提供される。

【0119】

キメラ子孫ポリヌクレオチドを作製する1つの方法は、それぞれの親の配列のフラグメントまたは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重複領域を含み、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、各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順番でアッセンブリングされた新規な変種が生成される。更なる情報は、例えばUSSN09/332,835で見出すことができる。各親変種について生成される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で生じる交差の総数と関係がある。例えば、3つの親のヌクレオチド配列変種が提供され、連結反応を経て高温でより高い活性をもつキメラ変種を見つけることができるであろう。1つの例として、50個のオリゴヌクレオチド配列を含むセットを各親変種のそれぞれの部分に対応して作製することができる。したがって、連結アッセンブリプロセスの間に、キメラ配列の各々の中に50個までの交差事象が存在することができよう。生成されたキメラポリヌクレオチドの各々が交互に各親変種由来のオリゴヌクレオチドを含む確率は非常に低い。各オリゴヌクレオチドフラグメントが連結反応で同じモル濃度で存在するならば、いくつかの位置で同じ親に由来するオリゴヌクレオチドが互いに並んで連結され、したがって交差事象を生じない可能性がある。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いずれの連結工程でも一定に保たれるならば、同じ親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、交差を生じないチャンスは $1/3$ （3つの親と仮定した）である。

【0120】

したがって、親変種セットの数、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における各変種の濃度を与えられたならば、確率濃度関数（probability density function (PDF)）を決定して連結反応の各工程で生じる可能性がある交差事象をもつ集団を予測することができる。PDFの決定の根拠となる統計学および数学は以下に記載される。これらの方法を用いることによって、前記の確率濃度関数を決定することができ、したがって個々の連結反応から生じる予め定めた数の交差事象のためにキメラ子孫集

団の濃度を高めることができる。さらにまた、交差事象の標的数は予め定めることができ、続いて、予め定めた交差事象数に集中する確率濃度関数をもたらし連結反応の各工程における各親オリゴヌクレオチドの出発量を算出するために前記系をプログラミングすることができる。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定方向分子進化を可能にする還元的再組合せ、組換えおよび選別の反復サイクルを用いることを意図する。前記の系は進化したキメラ配列の大集団の作製を可能にし、前記作製された集団は、予め定めた数の交差事象を含む配列が顕著に濃縮されている。交差事象は、一方の親変種からもう一方の親変種へ配列の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単一の配列を形成する結合部に存在する。前記方法は、最終的なキメラ配列集団が選択した数の交差事象に富むことができるようにオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にする。これによって、予め定めた数の交差事象を含むキメラ変種の選択に対してより大きな制御が提供される。

10

【0121】

さらにまた、これらの方法は、他の系と比較して膨大な量の可能なタンパク質変種空間の探索のための簡便な手段を提供する。ここに記載した方法を用いることによって、具体的な数の交差事象を含む変種についてキメラ分子集団を濃縮することができる。したがって、反応中になお 10^{13} 個のキメラ分子が生成されても、更なる分析のために選別される分子の各々は、例えば3つの交差事象だけを含む可能性が高くなる。生成された子孫集団が予め定めた数の交差事象を持つように偏らせることができるので、キメラ分子間の機能的変種に対する境界線が減少する。これによって、最初の親の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属性に影響を及ぼすために必要かを計算するときにより操作しやすい数の変数が提供される。

20

ある特徴では、前記方法は、それぞれの親の配列のフラグメントまたは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生成する。各オリゴヌクレオチドと一緒に混合することによって各オリゴヌクレオチドフラグメントが正しい順番でアッセムブリングされた新規な変種が生じるように、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む。USSN09/332,835をまた参照されたい。

【0122】

30

各親変種について生成されるオリゴヌクレオチドの数は、最終的に作出されるキメラ分子中に生じる交差事象の総数と関係がある。例えば高温に対してより強い活性を有するキメラ変種を見つけるために、例えば3つの親ヌクレオチド配列変種が提供され連結反応に付されたとしよう。一例として、50個のオリゴヌクレオチド配列のセットが各親変種の各部分に対応して作出できる。したがって、連結再アッセムブリプロセス中に、前記キメラ配列の各々の中で50までの交差事象が存在することが可能であろう。生成されたキメラポリヌクレオチドの各々が各親変種に由来するオリゴヌクレオチドを交互の順序で含む確率は非常に低い。各オリゴヌクレオチドフラグメントが同じモル数で連結反応中に存在するならば、同じ親ポリヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチドがいくつかの位置において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ことはありうることである。この例で、各親由来の各オリゴヌクレオチドの濃度が一切の連結工程の間一定に保たれるならば、キメラ配列内で同じ親変種に由来するオリゴヌクレオチドが連結され交差を生じない機会は $1/3$ である(3つの親が存在すると仮定して)。

40

したがって、親変種セットの数、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における各変種の濃度が与えられたならば、確率濃度関数(PDF)を決定して連結反応の各工程で生じる可能性がある交差事象をもつ集団を予測することができる。PDFの決定の根拠となる統計学および数学は以下に記載される。そのような確率濃度関数を算出することが可能であり、したがって、具体的な連結反応から生じる、予め定めた数の交差事象に対してキメラ子孫集団を濃縮することができる。さらにまた、交差事象の標的数を予め定め、続いて連結反応の各工程時の各親オリゴヌクレオチドの出発量を計算

50

して、予め定めた数の交差事象に集中する確率濃度関数が得られるように、前記系をプログラムすることができる。

【0123】

交差事象の決定：本発明の実施態様は、所望の交差事象の確率濃度関数（PDF）、再アッセンブリされる親遺伝子の数及び再アッセンブリでのフラグメント数を入力としての受け取るシステム及びソフトを含む。このプログラムの出力は、再アッセンブリされた遺伝子を作製するためのレシピを決定するために用いることができる“フラグメントPDF”及びこれら遺伝子の交差PDFの概算である。ここに記載されるプロセッシングは好ましくは、MATLAB（商標）（The Mathworks, Natick, Massachusetts）、プログラミング言語およびテクニカルコンピューティングのための発展環境で実施される。

10

【0124】

反復工程：本発明の実施に際して、これらのプロセスは何度も繰り返すことができる。例えば、変異ホスホリパーゼ表現型をもたらすある核酸（または所定の核酸）は特定、再単離、再改変され、さらに活性について再試験される。このプロセスは、所望の表現型が操作されるまで何度も繰り返すことができる。例えば、完全な生化学的同化作用または異化作用経路（ホスホリパーゼ活性を含む）を細胞内で操作することができる。

同様に、特定のオリゴヌクレオチドが所望の属性（例えば新規なホスホリパーゼ表現型）について全く影響を与えないと決定されたならば、除去される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って前記オリゴヌクレオチドは変異性のものとして除去することができる。配列をより大きな配列内に取り込むことによって一切の交差事象が防止されるので、子孫ポリヌクレオチド中にはこの配列の変型はもはや全く存在しないであろう。どのオリゴヌクレオチドが所望の属性と最も関係があり、どのオリゴヌクレオチドが無関係であるかを決定するこの反復実施は、特定の属性または活性を提供する可能性があるタンパク質の全てについてより効率的な探索を可能にする。

20

【0125】

in vivoシャッフリング：分子の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、ホスホリパーゼ酵素など）の変種を提供する本発明の方法で使用される。in vivoシャッフリングは、マルチマーを組み換える細胞の天然の特性を利用して実施することができる。in vivo組換えは分子の多様性をもたらす主要な天然の経路を提供してきたが、一方、遺伝子組み換えは以下を含む比較的複雑な過程を保有する：1）相同性の認識；2）鎖の切断、鎖の侵襲、および組換え交差の生成をもたらす代謝工程；および最後に3）別個の組み換えられた分子へのキアズマの分離。キアズマの形成は相同配列の認識を必要とする。

30

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及び第二のポリヌクレオチドからハイブリッドポリヌクレオチドを製造する方法を提供する。本発明を用いて、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（前記は、部分的な配列相同性をもつ少なくとも1つの領域を共有する）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生成することができる。部分的な配列相同領域は、ハイブリッドポリヌクレオチドを生成する配列認識を生じる過程を促進する。本明細書で用いられる“ハイブリッドポリヌクレオチド”という用語は、本発明の方法によりもたらされ、少なくとも2つの原型ポリヌクレオチド配列由来の配列を含む任意のヌクレオチド配列である。そのようなハイブリッドポリヌクレオチドは、DNA分子間で配列組み込みを促進する分子間組換え事象により生じる。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改変させるために反復配列を利用する分子内復元的再編成プロセスから生じうる。

40

【0126】

配列変種の作製：本発明はまた、本発明の核酸およびポリペプチドを用いて、本発明の核酸及びホスホリパーゼ配列の変種を作製する方法、又はホスホリパーゼ酵素（例えばホスホリパーゼ）の配列変種を単離する方法を提供する。ある特徴では、本発明は本発明のホスホリパーゼ遺伝子の変種を提供する。前記は、任意の手段（例えばランダム若しくは

50

確率論的方法、又は非確率論的若しくは上記に記載した“定方向進化”方法を含む)によって変異させることができる。

前記単離変種は天然に存在しうる。変種はまた *in vitro* で生成することもできる。変種は遺伝子工学技術、例えば部位特異的変異導入、化学的ランダム変異導入、エキソヌクレアーゼIII欠失方法及び標準的クローニング技術を用いて生成することができる。あるいは、そのような変種、フラグメント、類似体又は誘導体は化学的合成または改変方法を用いて生成することができる。変種を作製する他の方法もまた当業者にはよく知られている。前記には、天然の単離物から得られた核酸配列を改変して、それらの工業的価値または実験室利用を高める特徴をもつポリペプチドをコードする核酸を生成する方法が含まれる。そのような方法では、天然の単離物から得られた配列に対して1つまたは2つ以上のヌクレオチドの相違を有する多くの変種配列が生成され、性状が決定される。これらのヌクレオチド相違は、天然の単離物の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変化をもたらすことができる。

10

【0127】

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信頼性が低く、高率の点変異がPCR全長にわたって得られるような条件下で実施される。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); R.C. Caldwell & G.F. Joyce, *PCR Methods Applic.* 2:28-33 (1992)。簡単に記せば、前記の方法では、変異を導入される核酸は、PCRプライマー、反応緩衝液、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、Taqポリメラーゼおよび適切な濃度のdNTPと混合され、PCR生成物の全長にわたって高率の点変異が達成される。例えば、前記反応は、20fmoleの突然変異を導入されるべき核酸、30pmoleの各PCRプライマー、反応緩衝液(50mMのKCL、10mMのトリス(pH8.3)および0.01%のゼラチンを含む)、7mMの $MgCl_2$ 、0.5mMの $MnCl_2$ 、5ユニットのTaqポリメラーゼ、0.2mMのdGTP、0.2mMのdATP、1mMのdCTPおよび1mMのdTTPを用いて実施される。PCRでは、94 1分、45 1分および72 1分の30サイクルが実施される。しかしながら、これらのパラメーターは適宜変動させることができることは理解されよう。変異核酸は適切なベクターでクローニングされ、前記変異核酸によってコードされたポリペプチドの活性が評価される。

20

変種はまた、関心のある任意のクローン化DNAで位置特異的変異を得るためにオリゴヌクレオチド特異的変異導入を用いて生成することができる。オリゴヌクレオチド変異導入は例えば以下に記載されている：Reidhaar-Olson (1988) *Science* 241:53-57。簡単に記せば、前記の方法では、クローン化DNAに導入されるべき1つまたは2つ以上の変異をもつ複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが合成され、変異を導入される前記クローン化DNAに挿入される。変異を導入された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評価する。

30

【0128】

変種を生成するまた別の方法はアッセンブリPCRである。アッセンブリPCRでは、小さなDNAフラグメント混合物からPCR生成物をアッセンブリングすることが必要である。多数の様々なPCR反応が同じバイアル中で生じ、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PCRは例えば米国特許第5,965,408号に記載されている。

40

変種を生成するまた別の方法はセクシャルPCR変異導入である。セクシャルPCR変異導入では、配列相同性によるDNA分子のランダムなフラグメント化とそれに続く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、強制された相同組換えが、別個であるが相関性を有するDNA配列をもつDNA分子間で *in vitro* で生じる。セクシャルPCR変異導入は例えば以下に記載されている：Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751。簡単に記せば、前記の方法では、組換えられるべき複数の核酸をDNaseで消化して平均サイズが50 - 200ヌクレオチドのフラグメントを生成する。所望の平均サイズをもつフラグメントを精製し、PCR混合物に再懸濁する。PCRは、前記核酸フラグメント間の組換えが促進される条件下で実施される。PCRは、例えば以下によって実施できる：前記精製フラグメントを10 - 30ng/ μ Lの濃度で溶液(0.2Mの各dNTP、2.2mMの $MgCl_2$ 、50mMのKCL

50

、10mMのトリス塩酸（pH9.0）および0.1%トリトンX-100）に再懸濁する。100 μ Lの反応混合物につき2.5ユニットのTaqポリメラーゼを添加し、PCRを以下の方式を用いて実施する：94 60秒、94 30秒、50 - 55 30秒、72 30秒（30 - 45回）および72 で5分。しかしながら前記パラメーターは適宜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、オリゴヌクレオチドをPCR反応に含ませることができる。他の特徴では、DNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントをPCR反応の最初のセットで用い、Taqポリメラーゼをその後のPCR反応セットで用いることができる。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評価する。

【0129】

変種はまた *in vivo* 変異導入によって生成することができる。いくつかの特徴では、細菌株（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、関心のある配列中でランダム変異が生成される。前記大腸菌株はDNA修復経路の1つまたは2つ以上に変異を含む。そのような“ミューテーター”株は野生型の親よりも高いランダム変異率を有する。これらの株の1つでDNAを増殖させることによって、最終的にはDNA内部にランダム変異が生成されるであろう。*in vivo* 変異導入に使用するために適したミューテーター株は例えばPCT公開広報W091/16427に記載されている。

変種はまたカセット変異導入を用いて生成することができる。カセット変異導入では、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“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及び/又は部分的に任意抽出された天然の配列を含む。

再帰的アンサンブル変異導入もまた変種の生成に用いることができる。再帰的アンサンブル変異導入は、表現型が関連性をもつ変異体の多様化集団（そのメンバーはアミノ酸配列が異なる）を生成するために開発されたタンパク質工学（タンパク質変異導入）のためのアルゴリズムである。前記方法はフィードバックメカニズムを用いて、順列組合せカセット変異導入（combinatorial cassette mutagenesis）の連続ラウンドを制御する。再帰的アンサンブル変異導入は例えば以下に記載されている：Arkin (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815。

【0130】

いくつかの実施態様では、変種はエクスポネンシャルアンサンブル変異導入を用いて生成される。エクスポネンシャルアンサンブル変異導入は、高い割合の固有で機能的な変異体を含む順列組合せライブラリーを生成する方法である。前記変異導入では、小さな残基群が並行して任意抽出され、機能的タンパク質を生じるアミノ酸がそれぞれ変更された位置で特定される。エクスポネンシャルアンサンブル変異導入は例えば以下に記載されている：Delagrave (1993) Biotechnology Res. 11:1548-1552。ランダムな変異導入および部位特異的変異導入は例えば以下に記載されている：Arnold (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455。

いくつかの実施態様では、変種はシャッフリング方法によって生成される。前記では、別個のポリペプチドをコードする複数の核酸の部分が融合され、例えば米国特許第5,965,408号、同第5,939,250号に記載されたようなキメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列が生成される。

本発明はまた本発明のポリペプチドの変種を提供する。前記変種は、（例えば本発明の例示的なポリペプチドの）1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存又は非保存アミノ酸残基（例えば保存アミノ酸残基）で置換されている配列を含み、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされるものでも、そうでないものでもよい。保存的置換は、ポリペプチド内のあるアミノ酸が同様な特徴を持つ別のアミノ酸によって置換されるものである。したがって、本発明のポリペプチドは本発明の配列の保存的置換を有するポリペプチドを含む。前記置換は以下の置換を含む（ただしこれらに限定されない）：脂肪族アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）の別の脂肪族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；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；アミド基をもつ残基（例え

ばアスパラギンおよびグルタミン)の別のアミド基をもつ残基による置換;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1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が置換基を含む変種である。

【0131】

本発明に包含される他の変種は、前記ポリペプチドが別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させる化合物(例えばポリエチレングリコール)と結合しているものである。

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本発明のポリペプチドに融合されているものである。前記別のアミノ酸は例えばリーダー配列、分泌配列、プロ

10

ロテイン配列または前記ポリペプチドの精製、濃縮また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、本明細書に記載されたような例示的なポリペプチドと同じ生物学的機能または活性(例えばホスホリパーゼ活性)を保持している。他の特徴では、変種、フラグメント、誘導体または類似体は前タンパク質を含み、その結果、前記前タンパク質部分の切断によって前記変種、フラグメント、誘導体または類似体は活性化されて活性なポリペプチドを生成することができる。

【0132】

宿主細胞における高レベルのタンパク質発現を達成するためのコドンの最適化

本発明は、コドン使用頻度を改変するためにホスホリパーゼをコードする核酸を改変する方法を提供する。ある特徴では、本発明は、ホスホリパーゼをコードする核酸内のコドンを改変して宿主におけるその発現を増加または減少させる方法を提供する。本発明はまた、宿主細胞におけるその発現を高めるために改変されたホスホリパーゼをコードする核酸、そのように改変されたホスホリパーゼ、及び前記改変ホスホリパーゼ酵素を製造する方法を提供する。前記方法は、“非優先”または“低優先”コドンをホスホリパーゼをコードする核酸において特定し、さらにこれら非優先もしくは低優先コドンの1つまたは2つ以上を、前記コドンと同じアミノ酸をコードする“優先コドン”で置き換えることを含み、核酸内の少なくとも1つの非優先または低優先コドンが同じアミノ酸をコードする好ましいコドンによって置き換えられてある。優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において高頻度に提示されるコドンであり、非優先または低優先コドンは宿主細胞の遺伝子のコード配列において低頻度で提示されるコドンである。

20

30

本発明の核酸、発現カセットおよびベクターの発現のための宿主細胞には細菌、酵母、真菌、植物細胞および哺乳動物細胞が含まれる。したがって、本発明はこれら全ての細胞でコドン使用頻度を最適化する方法、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。例示的な宿主細胞には、グラム陰性細菌(例えば大腸菌);グラム陽性細菌(例えば任意のバチルス(例えば*B. cereus*)又はストレプトミセス、ラクトバチルス・ガッセリ(*Lactobacillus gasseri*)、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*)、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)が含まれる。例示的な宿主細胞はまた真核生物、例えば種々の酵母、例えばサッカロミセス種(サッカロミセス・セレビシアエを含む)、シ

40

ゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)及びクルイベロミセス・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、並びに哺乳動物細胞および細胞株、並びに昆虫細胞および細胞株を含む。したがって、本発明はまた前記生物および種での発現のために最適化された核酸およびポリペプチドを含む。

例えば、細菌細胞から単離されたホスホリパーゼをコードする核酸のコドンは、前記ホスホリパーゼが由来した細菌とは異なる細菌細胞、酵母、真菌、植物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞で前記核酸が最適に発現できるように改変される。コドンを最適化する方法は当業界において周知で、例えば以下を参照されたい: US Pat. No. 5,795,737; Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-18

50

8; 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 (マウス系におけるコドンの最適化を記載); Outchkourov (2002) Protein Expr. Purif. 24:18-24 (酵母におけるコドンの最適化を記載); Feng (2000) Biochemistry 39:15339-15409 (大腸菌におけるコドンの最適化を記載); Humphreys (2000) Protein Expr. Purif. 20:252-264 (大腸菌における分泌に影響するコドン使用頻度の最適化を記載)。

【0133】

非ヒトトランスジェニック動物

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド、発現カセット若しくはベクター、又はトランスフェクトされた若しくは形質転換された細胞を含むヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。前記トランスジェニック非ヒト動物は、例えば本発明の核酸を含むヤギ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、乳牛、ラットおよびマウスでありうる。これらの動物は、例えばホスホリパーゼ活性を調べる *in vivo* モデルとして、又はホスホリパーゼ活性の *in vivo* のモジュレーター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、構成的であるように、又は組織特異的、生育特異的若しくは誘導性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業界で公知の任意の方法を用いて設計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: US Patent No. 6,211,428; 6,187,992; 6,156,952; 6,118,044; 6,111,166; 6,107,541; 5,959,171; 5,922,854; 5,892,070; 5,880,327; 5,891,698; 5,639,940; 5,573,933; 5,387,742; 5,087,571 (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及び使用について記載されている)。さらにまた例えば以下を参照されたい: Pollock (1999) J. Immunol. Methods 231:147-157 (トランスジェニック乳牛のミルク中の組換えタンパク質の製造について記載); 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、DNA配列を含む核酸構築物をその脳で発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物の作製及び使用について記載している。米国特許第5,387,742号は、クローン化組換えまたは合成DNA配列の受精マウス卵への注入、前記注入卵の偽妊娠雌への移植および、アルツハイマー病関連タンパク質をその細胞が発現するトランスジェニックマウスの妊娠期間満了までの発生について記載している。米国特許第6,187,992号は、そのゲノムがアミロイド前駆体 (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及び使用を記載している。

“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”)を含み、前記はホスホリパーゼを発現しないように、または発現することができないように操作されている。

【0134】

トランスジェニック植物および種子

本発明は、本発明の核酸、ポリペプチド(例えばホスホリパーゼ)、発現カセット若しくはベクター、又はトランスフェクト若しくは形質転換された細胞を含むトランスジェニック植物および種子を提供する。本発明はまた、本発明の核酸及び/又はポリペプチド(例えばホスホリパーゼ)を含む植物生成物、例えば種子、葉、抽出物などを提供する。前記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りうる。本発明はまた前記トランスジェニック植物及び種子の製造方法並びに使用方法を提供する。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業界で公知の任意の方法にしたがって構築できる。例えば米国特許第6,309,872号を参照されたい。

本発明の核酸及び発現構築物は任意の手段によって植物細胞に導入できる。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することができるが、また、前記核酸又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、宿主のホスホリパーゼの産生が内因性の転写または翻訳制御エレメントによって調節できるようなものでありうる。本発明はまた、例えば相同組換えによる遺伝子配列の挿入によって内

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”植物を作製する手段は当業界で周知であり、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ついての考察を参照されたい。

【0135】

本発明の核酸を用いて、本質的にいずれの植物にも（例えば脂肪種子含有植物、例えばコメ、ダイズ、ナタネ、ヒマワリの種子、ゴマ及び落花生）、所望の属性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操作し、宿主のホスホリパーゼ発現を最適化または変異させることができる。本発明の核酸は植物中でのホスホリパーゼ活性を変化させることができる。また別に、本発明のホスホリパーゼをトランスジェニック植物の作製に用いて、天然に産生することができない化合物を前記植物によって製造することができる。これによって製造コストを下げるか、または新規な生成物を生成することができる。

10

ある特徴では、トランスジェニック植物作製の第一の工程は、植物細胞での発現のための発現構築物を作製することを必要とする。これらの技術は当業界では公知である。これらにはプロモーターの選別およびクローニング、リボソームのmRNAへの効率的な結合を促進するためのコード配列および適切な遺伝子ターミネーター配列の選別が含まれる。例示的な構成的プロモーターの1つはカリフラワーモザイクウイルスに由来するCaMV35Sであり、これは植物で一般的に高度な発現をもたらす。他のプロモーターはより特異的であり、植物の内部環境または外部環境の合図に反応する。例示的な光誘導性プロモーターは、主要な葉緑素a/b結合タンパク質をコードするcab遺伝子に由来するプロモーターである。

20

ある特徴では、核酸は改変されて植物細胞でのより強い発現が達成される。例えば、本発明の配列は、植物で認められるA-Tヌクレオチド対の割合と比較して高いA-Tヌクレオチド対をもつ可能性が高い（植物のいくつかはG-Cヌクレオチド対を好む）。従って、コード配列内のA-Tヌクレオチドを、アミノ酸配列を顕著に変化させることなくG-Cヌクレオチドに置換して、植物細胞における遺伝子生成物の産生を高めることができる。

選別可能なマーカー遺伝子を遺伝子構築物に付加し、トランスジーンを組み込むことに成功した植物細胞または組織を特定することができる。これは、植物細胞での遺伝子の取り込みおよび発現の達成が稀な事象であり、標的組織または細胞のわずかな割合で生じるだけであるので必要であろう。選別可能なマーカー遺伝子は、通常は植物にとって有毒である物質（例えば抗生物質または除草剤）に対して耐性を提供するタンパク質をコードする。前記適切な抗生物質または除草剤を含む培地で増殖させたとき、選別可能なマーカー遺伝子を組み込んだ植物細胞だけが生存するであろう。他の挿入遺伝子の場合のように、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。

30

【0136】

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、本発明の配列および場合によってマーカー遺伝子の標的発現構築物（例えばプラスミド）への取り込みをプロモーターおよびターミネーター配列の適切な配置とともに含む。前記は、適切な方法により改変遺伝子を前記植物に移すことを必要とするであろう。例えば、構築物は植物細胞のゲノムDNAに、例えば植物細胞のプロトプラストの電穿孔およびマイクロインジェクションのような技術を用いて直接導入することができる。または、構築物は弾道的方法（例えばDNA粒子衝撃）を用いて植物組織に直接導入することもできる。例えば以下を参照されたい：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（トランスジーンのコムギへの導入のための粒子衝撃の使用を考察する）；およびAdam (1997)（上掲書）（YACの植物細胞への導入のための粒子衝撃の使用について記載）。例えばRinehart (1997)（上掲書）は粒子衝撃を用いてトランスジェニックな綿植物を生成した。粒子を加速する装置は米国特許第5,015,580号に記載されており、バイオラド（BioRad; Biolistics）PDS-2000粒子加速装置が市販されている。さらに以

40

50

下もまた参照されたい：米国特許第5,608,148号（John）；および米国特許第5,681,730号（Ellis）（裸子植物の粒子仲介形質転換を記載している）。

ある特徴では、プロトプラストを固定し、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では容易ではないが、マメ類では体細胞の胚形成を用いてプロトプラスト由来カルスから植物の再生が可能である。遺伝子銃技術を用いて、組織化された組織を裸のDNAで形質転換することができる。この場合、DNAはタングステンの微小発射体上に被覆され、細胞のサイズの1/100で発射される。前記発射体はDNAを細胞および細胞内小器官の奥深くに運ぶ。続いて形質転換組織を再生のために誘導する（通常は体細胞胚形成による）。この技術はいくつかの穀類種（トウモロコシおよびイネを含む）で成功した。

10

核酸、例えば発現構築物は組換えウイルスを用いて植物細胞に導入することもできる。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を用いて形質転換することができる（Rouwendal (1997) Plant Mol. Biol. 33:989-999）。以下を参照されたい：”Use of viral replicons for the expression of genes in plants”, Mol. Biotechnol. 5:209-221。

【0137】

また別には、核酸（例えば発現構築物）を適切なT-DNAフランキング領域と結合させて、一般的な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ビルレンス機能は、細胞が前記細菌に感染したとき植物細胞DNAに前記構築物および隣接するマーカー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（バイナリーベクターの無毒化および使用を含む）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)。アグロバクテリウム・ツメファシエンス細胞中のDNAは細菌の染色体に、Ti（腫瘍誘導；tumor-inducing）プラスミドとして知られている別の構造物中と同様に含まれている。Tiプラスミドは、T-DNA（約20kbの長さ）と称される一続きのDNA（感染過程で植物細胞に移される）及び一連のvir（virulence、ビルレンス）遺伝子（感染プロセスを誘導する）を含む。アグロバクテリウム・ツメファシエンスは創傷からのみ植物に感染する。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し、それに応答してアグロバクテリウム・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の植物染色体への移転に必要な一連の事象を誘導する。続いてT-DNAは創傷から植物細胞に進入する。1つの推測は、T-DNAは、植物DNAが複製または転写されるまで待機し、続いて自身を裸の植物DNAに挿入するということである。アグロバクテリウム・ツメファシエンスをトランスジーンベクターとして使用するために、T-DNAの腫瘍誘導部分を除去し、一方T-DNAボーダー領域及びvir遺伝子は維持する必要がある。続いてトランスジーンをT-DNAボーダー領域間に挿入する（前記領域でトランスジーンは植物細胞に移され、植物染色体に組み込まれる）。

20

30

本発明は、本発明の核酸を用いる単子葉植物（重要な穀類を含む）の形質転換を提供する（Hiei (1997) Plant Mol. Biol. 35:205-218）。さらにまた、例えば以下を参照されたい：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（ゲノムDNAへのT-DNAの組み込みについて考察する）。さらにまた以下を参照されたい：米国特許第5,712,135号（D'Halluin）（穀類または他の単子葉植物の細胞内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方法を開示する）。

40

【0138】

ある特徴では、第三の工程は、取り込まれた標的遺伝子を次の世代に伝達することができる植物体の選別および再生を含むことができる。そのような再生技術は、組織培養の増殖培地での一定の表現型の操作を必要とし、典型的には所望のヌクレオチド配列と一緒に導入された有毒物質及び/又は除草剤マーカーを必要とする。培養プロトプラストから植

50

物を再生することについては以下に記載されている：Evans et al., Protoplast Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp.124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. 再生はまた植物カルス、外植片、器官またはその部分からも得ることができる。そのような再生技術は一般的には以下に記載されている：Klee (1987) Ann. Rev. of Phys. 38:467-486. トランスジェニック組織（例えば未熟胚）から植物体を得るために、前記胚を栄養およびホルモンを含む一連の培養液中で環境制御条件下（組織培養として公知の方法）で増殖させることができる。いったん植物体が生成され種子が生じたら、子孫の評価を開始する。

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、前記カセットは有性交配によって他の植物に導入することができる。交配される種に応じて、多くの標準的育種技術のいずれも用いることができる。本発明の核酸のトランスジーン発現は表現型の変化を生じるので、本発明の組換え核酸を含む植物を第二の植物と有性交配して最終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の交配、または本発明の植物と他の植物間の交配から誘導することができる。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が変わった植物を作製する）は、両方の親植物が本発明のポリペプチド（例えばホスホリパーゼ）を発現するときに強化される。所望の効果は将来の植物世代に標準的な繁殖手段によって伝えることができる。

10

【0139】

20

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れ、又は前記に挿入される。本発明の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。本発明のトランスジェニック単子葉植物の例は、牧草、例えばメドーグラス（meadow grass（ブルーグラス、*Poa*））、飼料用草類、例えばフェスチュカ（*festuca*）、ロリウム（*loli*um）、テンプレートグラス、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、ソルガムおよびトウモロコシ（コーン）である。本発明のトランスジェニック双子葉植物の例は、タバコ、豆類（例えばルピナス）、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、並びに十字架植物（*Brassicaceae*科）、例えばカリフラワー、ナタネ、および近縁のモデル植物のシロイヌナズナ（*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、アトロパ（*Atropa*）、アベナ（*Avena*）、ブラシッカ（*Brassica*）、シトラス、シトラルス（*Citrullus*）、カプシカム（*Capsicum*）、カルサムス（*Carthamus*）、ココス（*Cocos*）、コフエア（*Coffea*）、ククミス（*Cucumis*）、ククルピタ（*Cucurbita*）、ダウクス（*Daucus*）、エレイス（*Elaris*）、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（*Hyoscyamus*）、ラクツカ（*Lactuca*）、リヌム（*Linum*）、ロリウム（*Lolium*）、ルピナス、リコペルシコン（*Lycopersicon*）、マルス（*Malus*）、マニホット（*Manihot*）、マジョラナ（*Majorana*）、メディカゴ（*Medicago*）、ニコチアナ、オレア（*Olea*）、オリザ（*Oryza*）、パニエウム（*Paniceum*）、パニセツム（*Panisetum*）、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*）、プルヌス（*Prunus*）、ラファヌス（*Raphanus*）、リシヌス（*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*）、トリチウム（*Triticum*）、ビシア（*Vicia*）、ビチス（*Vitis*）、ビグナ（*Vigna*）、及びゼア（*Zea*）。

30

40

【0140】

また別の実施態様では、本発明の核酸は、植物（例えばトランスジェニック植物、例えば脂肪種子含有植物、例えばコメ、ダイズ、ナタネ、ヒマワリの種子、ゴマ及び落花生）

50

で発現される。本発明の核酸は、繊維細胞を含む植物（綿、シルクコットンツリー（Kao k、Ceiba pentandra）、ヤナギ（desert willow）、クレオソートブッシュ、ウィンターファット、バルサ、カラムシ、ケナフ、アサ、ロゼレ（roselle）、ジュート、サイザル（sisal abaca）及びアマを含む）で発現される。また別の実施態様では、本発明のトランスジェニック植物はゴシピウム（Gossypium）属のメンバー（一切のゴシピウム種のメンバー、例えばG.アルボレウム（arboreum）；G. ヘルバセウム（herbaceum）；G. バルバデンス（barbadense）；G. ヒルスタム（hirsutum）を含む）でありうる。

本発明はまた、大量の本発明のポリペプチド（例えばホスホリパーゼ又は抗体）を製造するために用いることができるトランスジェニック植物を提供する。例えば以下を参照されたい：Palmgren (1997) Trends Genet. 13:348; Chong (1997) Transgenic Res. 6:289-296（オーキシン誘導性二方向性マンノピンシンターゼ（mas1',2'）プロモーターを用い、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により母乳タンパク質のベータカゼインのトランスジェニックなジャガイモによる生産を記載）。

公知の方法を用いて、当業者は、形質導入植物でトランスジーンのみRNAまたはタンパク質の増減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の検出および定量手段は当業界で周知である。

【0141】

ポリペプチド及びペプチド

本発明は、本発明の例示的な配列、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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、又は配列番号174と配列同一性（例えば少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくはそれより高いか、又は完全な（100%）配列同一性）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、前記同一性はポリペプチドの完全長に及ぶことができ、また、前記同一性はその部分配列にわたって、例えば少なくとも約50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700又はそれより多い残基の領域にわたることができる。本発明のポリペプチドはまた例示的なポリペプチド（例えば配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8など）の完全長よりも短くてもよい。また別の実施態様では、本発明は、約5から完全長の範囲のサイズのポリペプチド（例えば酵素、例えばホスホリパーゼ、例えばホスホリパーゼ）を提供する。例示的なサイズは、例えば約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又はそれより大きい残基、例えば配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8などの例示的ホスホリパーゼの連続する残基である。本発明のペプチドは、例えば標識用プローブ、抗原、トレラゲン、モチーフ、ホスホリパーゼ活性部位、結合ドメイン、調節ドメインなどとして有用でありうる。

【 0 1 4 2 】

ある特徴では、前記ポリペプチドは、ホスホリパーゼ活性（例えばグリセロホスフェートエステル結合の切断）、ホスフェートエステル結合を加水分解する能力（パタチン、脂質アシリヒドロラーゼ（LAH）、ホスホリパーゼA、B、C及び/又はホスホリパーゼD活性又は前記の任意の組合せを含む）を有する。

また別の特徴では、本発明の例示的ポリペプチドは、下記の表1に示すようにホスホリパーゼ活性、シグナル配列配置、及び最初の供給源を有する。この表の理解を容易にするために記せば、最初の列で、配列番号143、144は、配列番号144に示される配列を有し、例えば配列番号143によってコードされ、PLA特異的PLA活性を有し、不明の供給源から最初に単離されたポリペプチドを意味し、配列番号167、168の列の別の例では、配列番号167、168は、配列番号168に示される配列を有し、例えば配列番号167によってコードされ、ホスファチジン酸ホスファターゼ活性、残基1 - 30にシグナル配列（“AA1 - 30”はアミノ酸残基1から30を意味する）、すなわちMARSWKWRPLLSSFLLVSLAPFSTSVPCFKを有し、さらに不明の供給源から最初に単離されたポリペプチドを意味する。本発明はまた、シグナル配列、及びキメラポリペプチドを含むペプチドを提供し、ここで前記ペプチド又はキメラは、下記表に示され、さらに以下で考察されるようにシグナル配列を含む。

【 0 1 4 3 】

【表 1】

		シグナル 配列位置 (AA= アミノ酸)	シグナル(AA)	供給源	
配列番号	酵素タイプ				
143, 144	PA特異的PLA			未知	
25, 26	パタチン			未知	
77, 78	パタチン			未知	
35, 36	パタチン			未知	
125, 126	パタチン			未知	10
135, 136	パタチン			未知	
99, 100	パタチン			未知	
65, 66	パタチン			未知	
87, 88	パタチン			未知	
86, 87	パタチン			未知	
45, 46	パタチン			未知	
59, 60	パタチン			未知	
13, 14	パタチン			未知	
71, 72	パタチン			未知	
55, 56	パタチン			未知	20
33, 34	パタチン			未知	
91, 92	パタチン			未知	
103, 104	パタチン			未知	
11, 12	パタチン			未知	
17, 18	パタチン			未知	
95, 96	パタチン			未知	
43, 44	パタチン			未知	30
27, 28	パタチン			未知	
131, 132	パタチン			未知	
127, 128	パタチン			未知	

133, 134	パタチン			未知	
137, 138	パタチン			未知	
165, 166	パタチン			未知	
167, 168	ホスファチジン酸 ホスファターゼ	AA1-30	MARSWKWRPLLSSFLLVSLAPFSTSVPCF K	未知	10
169, 170	ホスファチジン酸 ホスファターゼ			未知	
171, 172	ホスファチジン酸 ホスファターゼ			未知	
173, 174	ホスファチジン酸 ホスファターゼ			未知	
111, 112	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-16	MGAGAILLTGAPTASA	細菌	20
107, 108	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-23	MSNKKFILKLFICSTILSTFVFA	未知	
109, 110	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-23	MSNKKFILKLFICSTILSTFVFA	未知	
113, 114	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-23	MSNKKFILKLFICSTILSTFVFA	未知	
117, 118	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-23	MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFA	未知	30
119, 120	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-23	MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFA	未知	
115, 116	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-23	MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFA	未知	
121, 122	ホスファチジル イノシトールPLC	AA1-23	MRNKKFILKLLICSTVLSTFVFA	未知	
141, 142	ホスホリパーゼ			未知	
155, 156	ホスホリパーゼ	AA1-36	MRTTTTNWRQIVKSLKFLMGLCLFISAS FASSAYA	未知	40
159, 160	ホスホリパーゼ			未知	
145, 146	PLA			未知	
147, 148	PLA			未知	
149, 150	PLA			未知	

151, 152	PLA				未知	
153, 154	PLA				未知	
157, 158	PLA				未知	
163, 164	PLA				未知	
101, 102	PLC	AA1-39	LSLVASLRRAPGAALALALAAATLAVTAQ GATAAPAAAAA	細菌		10
1, 2	PLC	AA1-24	MKKKVLALAAMVALAAPVQSVVFAQ	未知		
3, 4	PLC	AA1-24	MKRKILAIASVIALTAPIQSVAFAH	未知		
5, 6	PLC	AA1-24	MKRKILAIASVIALTAPIQSVAFAH	未知		
97, 98	PLC	AA1-25	MKRKLCTWALVTAIASSTAVIPTAAE MITLIKKCLLVLTMTLLGVFVPLQPSHA	未知		
7, 8	PLC	AA1-29	T	未知		20
31, 32	PLC	AA1-20	MKKKLCTWALVTAISSGVVAI	未知		
81, 82	PLC	AA1-25	MKKKLCTMALVTAISSGVVTIPTEAQ	未知		
93, 94	PLC	AA1-29	MITLIKKCLLVLTMTLLSGVFVPLQPSYA T	未知		
89, 90	PLC	AA1-25	MKKKLCTLAFVTAISSIAITIPTEAQ	未知		
123, 124	PLC	AA1-24	MKKKVLALAAMVALAAPVQSVVFA	未知		
129, 130	PLC	AA1-27	MKKKICTLALVSAITSGVVTIPTVASA	未知		30
139, 140	PLC	AA1-20	MKIKPLTFSFGLAVTSSVQA	未知		
105, 106	PLC	AA1-30	MNRCRNSLNLQLRAVTVAALVVVASSAAL AW	未知		
9, 10	PLC	AA1-20	MKLLRVFVCVFALLSAHSKAD	未知		
47, 48	PLD			未知		
15, 16	PLD			未知		
41, 42	PLD			未知		
23, 24	PLD			未知		40
51, 52	PLD			未知		
53, 54	PLD			未知		
19, 20	PLD	AA1-19	MKKTTLVLALLMPFGAASQA	未知		
75, 76	PLD			未知		
57, 58	PLD			未知		

63, 64	PLD	AA1-18	MKNTLILAGCILAAPAVAD	未知
79, 80	PLD	AA1-23	MRNFSKGLTSILLSIATSTSAMAF	未知
37, 38	PLD	AA1-23	MRNFSKGLTSILLSIATSTSAMAF	未知
61, 62	PLD	AA1-21	MTLKLSLLIASLSAVSPAVLAN	未知
67, 68	PLD		No	未知
83, 84	PLD	AA1-21	MKKIVIYSFVAGVMTSGGVFAA	未知
49, 50	PLD	AA1-23	MNFWSFLLSITLPMGVGVAHAQPD	未知
39, 40	PLD			未知
73, 74	PLD			未知
29, 30	PLD			未知
21, 22	PLD	AA1-28	MQQHKLNRNFKGLTGVVLSVLTSTSAMAF	未知
71, 72	PLD			未知
161, 162	PLD	AA1-24	MNRKLLSLCLGATSCIALSLPVHA	未知

10

20

【 0 1 4 4 】

ある特徴では、本発明は、配列番号107、配列番号109、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171及び/又は配列番号173に示される配列、及びその部分配列、例えばホスホリパーゼ活性（例えばホスホリパーゼC（PLC）活性）を有するそれらの活性部位を有する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ホスホリパーゼ活性を有するが、中性油（トリグリセリド）の加水分解活性を欠く。例えば、ある特徴では、前記ポリペプチドはホスホリパーゼ活性を有するが、中性油（トリグリセリド）分画に影響を及ぼすいずれの活性も欠く。ある特徴では、本発明は、ホスホリパーゼ活性を有するがリパーゼ活性を欠く本発明のポリペプチドを使用することを含む、脱ガムプロセスを提供する。

30

本発明のポリペプチド及びペプチドは、天然の供給源から単離すること、合成または組換えによって生成することもできる。ペプチド及びタンパク質は組換えによって *in vivo* または *in vitro* で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、当業界で公知の任意の方法を用いて製造及び単離できる。本発明のポリペプチド及びペプチドはまた、当業界で周知の化学的方法を全体的又は部分的に用いて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してもよい（例えば以下を参照されたい：Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289:3-13）。さらにこれらは、例えばABI431Aペプチド合成装置（Perkin Elmer）を用い製造元の提供する指示にしたがって自動合成することもできる。

40

【 0 1 4 5 】

本発明のペプチド及びポリペプチドはまたグリコシル化することができる。グリコシル

50

化は翻訳後に化学的に又は細胞の生合成メカニズムによって実施できる。後者は、公知のグリコシル化モチーフの使用を含む（このモチーフは配列にとって天然のものでもよく、またペプチドとして付加するか配列をコードする核酸に付加することもできる）。グリコシル化はO-結合またはN-結合でありうる。

本発明のペプチド及びポリペプチドは（上記で定義されたように）、全ての“模倣体”及び“ペプチド模倣体”形を含む。“模倣体”及び“ペプチド模倣体”という用語は、実質的に本発明のポリペプチドと同じ構造及び/又は機能的特徴を有する合成化学物質を指す。前記模倣体は完全に合成された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及び部分的に非天然のアミノ酸類似体のキメラ分子である。前記模倣体はまた任意の量の天然アミノ酸の保存的置換を、そのような置換が前記模倣体の構造及び/又は活性を実質的に変化させない限り含むことができる。保存的変種である本発明のポリペプチドに関しては、日常的な実験によって模倣体が発明の範囲内に包含されるものであるか否か、すなわちその構造及び/又は機能が実質的に改変されていないかが決定されるであろう。したがって、ある特徴では、模倣体組成物がホスホリパーゼ活性をもつならばそれらは本発明の範囲内に包含される。

10

20

30

【0146】

本発明のポリペプチド模倣体組成物は任意の組合せの非天然成分を含むことができる。また別の特徴では、本発明の模倣体組成物は以下の3つの構造基の1つまたは全てを含む：a) 天然のアミド結合（“ペプチド結合”）以外の残基結合基；b) 天然に存在するアミノ酸残基の代わりに非天然残基；c) 二次構造模倣を誘導する（すなわち二次構造、例えばベータターン、ガンマターン、ベータシート、アルファヘリックス構造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は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体と特徴付けることができる。個々のペプチド模倣体残基は、ペプチド結合、他の化学的結合、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、二官能基性マレイミド、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）によって結合される。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結合基には例えば以下が含まれる：ケトメチレン（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（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）。

【0147】

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またはいくつかの非天然の残基が含まれることによって模倣体と特徴付けられる。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体として有用な例示的な非天然組成物のいくつかおよび基準は以下で述べる。芳香族アミノ酸の模倣体は、例えば以下によって置き換えることによって生成することができる：D-またはL-ナフチルアラニン；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-ビフェニルフェニルアラニン；D-またはL-p-メトキシ-ビ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（アルキルはメチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、iso-ブチル、sec-イソチル、iso-ペンチルまたは非酸性アミノ酸で置換できるがまた置換されてなくてもよい）。非天然アミノ酸の芳香環には、例えばチアゾリル、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

40

50

およびピリジル芳香環が含まれる。

酸性アミノ酸の模倣体は、例えば陰性荷電を維持している非カルボキシレートアミノ酸、（ホスホノ）アラニン、硫酸スレオニンによって置換することにより生成できる。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、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-モルホリニル-(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-ジメソールペンチル)カルボジイミドとの反応によって選択的に改変することができる。アスパルチルまたはグルタミルもまた、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ニル残基に変換することができる。塩基性アミノ酸の模倣体は、（リジンおよびアルギニンの他に）アミノ酸オルニチン、シトルリン又は（グアニジノ）-酢酸または（グアニジノ）アルキル-酢酸（アルキルは上記で定義されたとおり）による置換によって生成することができる。ニトリル誘導体（例えばCOOHの代わりにCN-部分を含む）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ニル残基は、対応するアスパルチルまたはグルタミル残基に脱アミノ化することができる。アルギニン残基模倣体は、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ることによって生成することができる。チロシン残基模倣体はチロシルを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反応させることによっ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形成することができる。システイン残基模倣体は、システニル残基を例えばアルファ-ハロアセテート（例えば2-クロロ酢酸またはクロロアセトアミド）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生成することによって達成できる。システイン残基模倣体はまた、システイン残基を例えばプロモ-トリフルオロアセトン、アルファ-プロモ-ベータ-(5-イミドゾイル)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-クロロ水銀ベンゾエート；2-クロロ水銀-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-ジアゾールと反応させることによって生成することができる。リジン模倣体は、リジニルをコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させることによって（さらにアミノ末端残基を変化させることによって）生成することができる。リジンおよび他のアルファ-アミノ含有残基模倣体はまた、イミドエステル、例えばメチルピコリンイミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロポロハイドライド、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、およびグキ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。メチオニンの模倣体は、例えばメチオニンスルホキシドとの反応によって生成することができる。プロリンの模倣体には、例えばピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、3-または4-ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、3-または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体は、ヒスチジルを例えばジエチルプロカーボネートまたはパラ-プロモフェナシルプロミドと反応させることによって生成することができる。他の模倣体には、例えば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アルファ-アミノ基のメチル化；N-末端アミンのアセチル化；主鎖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することができるものが含まれる。

【0148】

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（またはペプチド模倣体残基）によって置換することができる。したがって、L型構造で天然に存在するいずれのアミノ酸（前記化学物質の構造に応じてRまたはSとも呼ぶことができる）も、同じ化学構造型であるが反対のキラリティーのアミノ酸またはペプチド模倣体（D-アミノ酸と称されるが、またR-またはS-型とも称される）で置換することができる

。

本発明はまた本発明のポリペプチドを、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、アセチル化など)、又は化学的改変技術のどちらかによって改変する方法、及び生成された改変ポリペプチドを提供する。改変は、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ル末端を含むポリペプチド内のいずれの場所でも生じうる。あるポリペプチドにおいて同じタイプの改変が同じ程度または種々の程度でいくつかの部位で存在することができることは理解されよう。さらにまた与えられたポリペプチドが多くタイプの改変を含むこともできる。改変には以下が含まれる：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による付加、ヘム成分の共有結合による付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合による付加、脂質または脂質誘導体の共有結合による付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合による付加、架橋環形成、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、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、ミリストリエーション、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トランスファーRNA仲介アミノ酸付加、例えばアルギニル化。例えば以下を参照されたい：T.E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties* 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

20

【0149】

固相ペプチド化学合成法もまた本発明のポリペプチドまたはフラグメントの合成に用いることができる。前記の方法は1960年代初頭より当業界で公知であり(R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963; さらに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)、さらに最近では市販の実験室ペプチド設計および合成キット(Canbridge Research Biochemicals)として用いられている。そのような市販の実験室キットは一般的にはH.M. Geysenら(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998 (1984))の教示を利用し、多数の“ロッド”または“ピン”(これらは全て一枚のプレートにつながっている)の先端でペプチドを合成させる。前記のような系を利用するときは、ロッドまたはピンを含むプレートはさかさまにされ、対応するウェルまたはレザーバーの第二のプレートに挿入される。前記ウェルまたはレザーバーは適切なアミノ酸をピンまたはロッドの先端に結合または固着させるために溶液を含んでいる。そのような工程(すなわちロッドまたはピンの先端をさかさまにして適切な溶液に挿入する工程)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。さらにまた、多数のFMOCペプチド合成系が利用可能である。例えば、ポリペプチドまたはフラグメントのアッセmbリはアプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems, Inc.)のモデル431A(商標)自動ペプチド合成装置を用いて固相上で実施できる。前記のような装置は、直接合成または一連のフラグメント(前記フラグメントは他の公知の技術を用いて結合させることができる)の合成によって本発明のペプチドの容易な入手を提供する。

30

40

【0150】

ホスホリパーゼ酵素：本発明は、新規なホスホリパーゼ、前記をコードする核酸、前記と結合する抗体、前記酵素の抗原部位(エピトープ)及び活性部位を表すペプチド、調節及び結合ドメイン、前記を製造及び使用する方法を提供する。ある特徴では、本発明のポリペプチドは、ホスホリパーゼ活性又は本明細書に記載したようにホスホリパーゼ活性の任意の組合せ(例えばグリセロホスフェートエステル結合の切断、リパーゼ活性の欠如など)を有する。また別の特徴では、本発明のホスホリパーゼは、本明細書に記載した例示的ホスホリパーゼの活性とは改変された活性を有する。

本発明は、シグナル配列含有及びシグナル配列非含有ホスホリパーゼ、並びにシグナル配列そのものを含む。本発明は、本発明の酵素のフラグメント又は部分配列を含み、前記

50

は、例えば触媒ドメイン（“活性部位”）、結合部位、調節ドメイン、エピトープ、シグナル配列、プレプロドメインなどを含むか、又は前記から成るペプチド若しくはポリペプチドである。本発明はまた、固定されたホスホリパーゼ、抗ホスホリパーゼ抗体及び前記のフラグメントを含む。本発明は、本発明のホスホリパ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。ペプチドが前記酵素の抗原部位（エピトープ）、活性部位、結合部位、シグナル配列などを表しているか否かの決定は、日常的なスクリーニングプロトコルによって実施することができる。

【0151】

本発明のこれらの酵素及び方法を用いて、高リン油、特にコメ、ダイズ、トウモロコシ、キャノーラ及びヒマワリ油のより完全な脱ガムを達成することができる。例えば、ある特徴では、PI-PLCによる切断に際して、ホスファチジルイノシトールはジアシルグリセロール及びホスホイノシトールに変換される。ジアシルグリセロールは水相へ分配され（油の収量を改善する）、ホスホイノシトールは水相へ分配される（前記は遠心時に重い相の成分として除去される）。本発明の酵素、例えば本発明のPI-PLCは化学的又は物理的な精製プロセスに取り入れることができる。

また別の特徴では、本発明の酵素は、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC（PI-PLC）活性、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼC活性、ホスファチジン酸ホスファターゼ活性、ホスホリパーゼA活性及び/又はパタチン関連ホスホリパーゼ活性を有する。これらの酵素は単独で用いるか、又は互いに組み合わせるか、又は本発明の別の酵素、若しくは本発明の酵素以外の酵素と組み合わせる用いることができる。ある特徴では、本発明は、これらの酵素（本発明のホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC（PIPLC）、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼC、及び/又はホスホリパーゼD（ホスファターゼと結合している）、ホスファチジン酸ホスファターゼ、ホスホリパーゼA、パタチン関連ホスホリパーゼを含む）を単独又は組み合わせ、油（例えば植物油、例えば高リン油、例えばダイズ、トウモロコシ、キャノーラ、米ぬか及びヒマワリ油）の脱ガムに用いる方法を提供する。PI-PLCによる切断に際して、ホスファチジルイノシトールはジアシルグリセロール及びホスホイノシトールに変換される。ジアシルグリセロールは水相へ分配され（油の収量を改善する）、ホスホイノシトールは水相へ分配される（前記は遠心時に重い相の成分として除去される）。本発明の酵素、例えば本発明のPI-PLCは化学的又は物理的な精製プロセスに取り入れることができる。

【0152】

ある特徴では、本発明は、非水和性物質を水和するために中性pHでクエン酸ナトリウムを含む組成物（例えば溶液）を提供する。例えば、本発明は、約4から9、又は5から8、又は6から7の間のpH範囲にあるクエン酸ナトリウム溶液を提供し、前記は、高リン油中の非水和性リン脂質（本発明の酵素を含む）を水和するために用いることができる。ある特徴では、前記非水和性リン脂質の水和は、リン脂質と結合したカルシウム及びマグネシウムをキレートし、それによって、強固に不溶性のリン脂質塩をより容易に水相に分配させることによる。ある特徴では、いったんリン脂質が水/油の境界面又は水相中に移動したら、本発明のホスホリパーゼ（例えば本発明のホスホリパーゼ特異的ホスホヒドロラーゼ）又は別のホスホリパーゼがリン脂質をジアシルグリセロール及びホスフェートエステルに変換するであろう。ある特徴では、カルシウム及びマグネシウム金属含有量は、酸及び苛性アルカリの添加に際して低下する（苛性アルカリプロセスに関する考察を参照されたい）。

本発明の酵素は高度に選択的な触媒である。他の酵素の場合のように、本発明の酵素は、通常の合成化学においては比類のない、完璧に立体選択性、領域選択性及び化学選択性を有する反応を触媒する。さらにまた、本発明の酵素は極めて融通性が高い。それらは、有機溶媒中で機能するように、極端なpH（例えば高pH及び低pH）、極端な温度（例えば高温及び低温）、極端な塩レベル（例えば高塩濃度及び低塩濃度）で働くように調整することができ、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。本発明の酵素は、広範囲の天然及び非天然基質と反応性を有するように設計す

ることができ、したがって実質的に任意のリード化合物の改変を可能にする。本発明の酵素はまた高度に鏡像選択的及び領域選択的であるように設計することができる。これらの酵素によって示される高度な官能基特異性によって、新規な活性化合物をもたらす合成工程の各反応を正確に追跡することが可能になる。本発明の酵素はまた、自然界におけるこれらの天然の生理学的な機能とは無関係な多くの多様な反応を触媒するように設計することができる。

【0153】

本発明は、酵素の固有の触媒特性を利用する。一方、化学的変換における生体触媒の使用（すなわち精製又は粗酵素、死細胞又は生細胞）は、特定の出発化合物と反応する生体触媒の特定が通常要求される。本発明は、選択された生体触媒（すなわち本発明の酵素）及び多くの出発化合物中に存在する官能基に特異的な反応条件を用いる。各生体触媒は1つの官能基又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。前記生体触媒反応は、ただ1つの出発化合物に由来する誘導体集団を生じる。これらの誘導体はまた別の生体触媒反応ラウンドに付され、第二の誘導体化合物集団を生じる。生体触媒による誘導体生成が繰り返される毎に、最初の化合物から数千の変種が生成されうる。

酵素は、分子の残りの部分に影響を与えることなく出発化合物の特定の部位で反応し、前記プロセスは慣習的な化学的方法を用いて達成することは非常に困難である。生体触媒のこの高度な特異性は、ライブラリー内でただ1つの活性な酵素を特定する手段を提供する。ライブラリーは、前記を生成するために用いられる一連の生体触媒反応（いわゆる“生合成歴”）によって特徴付けられる。生物学的活性についてライブラリーをスクリーニングし、生合成歴を追跡することによって、活性化合物を生成する固有の反応工程が特定される。前記反応工程を繰り返して、合成された化合物の構造を決定する。前記の特定ののための態様は、合成及びスクリーニングのための他の態様と異なり、固定化技術を必要とせず、化合物は、溶液中に遊離した状態で合成でき、さらに実質的に任意のタイプのスクリーニングアッセイを用いて試験することができる。官能基に対する酵素反応の高度な特異性は、生体触媒反応により生成されるライブラリーを構成する固有の酵素反応を“追跡”することを可能にする。

【0154】

本発明はまた、本発明の核酸、ポリペプチド及び抗体を用いて新規なホスホリパーゼを発見する方法を提供する。ある特徴では、ホスホリパーゼの発現依存発見に対してラムダファージライブラリーがスクリーニングされる。スクリーニングにおけるラムダファージライブラリーの使用は、有害クローンの検出、基質への接近の改善、ライブラリーの大量削除から生じる一切の偏向の可能性を回避して宿主を操作することの必要性を減少させること、及び低いコロニー密度でのより迅速な増殖を可能にする。ラムダファージライブラリーのスクリーニングは、液相においても固相においても実施することができる。液相でのスクリーニングは、固相スクリーニングと比較してアッセイ条件におけるより大きな融通性、基質追加の融通性、脆弱クローンに対するより高い感度、及び自動化の容易さを提供する。

本方法の工程の多くが自動装置による自動化を用いて実施され、1日当たり何千もの生体触媒反応及びスクリーニングアッセイの実施を可能にするとともに、高レベルの正確性及び再現性を担保する（下記のアレイの項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を数週間程度で作製することができる。分子（小分子を含む）の改変についての更なる教示については、PCT/US94/09174を参照されたい。

【0155】

ホスホリパーゼシグナル配列：本発明は、ホスホリパーゼシグナル配列（例えばシグナルペプチド（SP））、例えばシグナル配列を含むペプチド及び/又はキメラポリペプチドを提供する（ここで前記ペプチド又はキメラは表1に示すシグナル配列、又は下記に示すシグナル配列を有する）。本発明は、これらシグナル配列（SP、例えば本発明のポリペプチドのアミノ酸残基を含む/アミノ酸残基から成る配列を有するペプチド）をコードする

核酸を提供する。ある特徴では、本発明は、本発明のポリペプチド、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112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、又は配列番号174の残基1から20、1から21、1から22、1から23、1から24、1から25、1から26、1から27、1から28、1から29、1から30、1から31、1から32、1から33に示される配列を含む/配列から成るペプチドを含むシグナル配列を提供する。これらペプチドのいずれもキメラタンパク質、例えば組換えタンパク質の部分でありうる。シグナル配列ペプチドは、下記でさらに考察するように、本発明の別の酵素（例えば前記を誘導したホスホリパーゼ以外の本発明のホスホリパーゼ）、又は別のホスホリパーゼ、または任意のポリペプチドと組み合わせることができる。

例示的なシグナル配列は表1及び配列リストに示され、例えば配列番号2、配列番号4、配列番号6の残基1から24；配列番号8の残基1から29；配列番号10の残基1から20；配列番号20の残基1から19；配列番号22の残基1から28；配列番号32の残基1から20；配列番号38の残基1から23である。本発明の他の例示的シグナル配列については表1及び配列リストを参照されたい。

いくつかの特徴では、本発明のホスホリパーゼはシグナル配列をもたない。ある特徴では、本発明は、シグナル配列の全部又は一部分を欠く本発明のホスホリパーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるホスホリパーゼ由来のシグナル配列をコードする核酸配列であって、異なるホスホリパーゼの核酸配列と連結されたものを提供する。または場合によって、非ホスホリパーゼタンパク質由来のシグナル配列を所望することができる。

【0156】

ホスホリパーゼプレプロドメイン、結合ドメイン及び触媒ドメイン：上記で考察したようなシグナル配列（例えばシグナルペプチド（SP））の他に、本発明は、プレプロドメイン、結合ドメイン（例えば基質結合ドメイン）及び触媒ドメイン（CD）を提供する。本発明のSPドメイン、プレプロドメイン及び/又はCDは単離又は組換えペプチドであっても、又は例えばキメラタンパク質の異種ドメインのような融合タンパク質の一部であっても、又は融合タンパク質の部分（例えばキメラタンパク質の異種ドメインの場合）であってもよい。本発明は、これら触媒ドメイン（CD）（例えば“活性部位”）、プレプロドメイン、結合ドメイン及びシグナル配列（SP、例えば本発明のポリペプチドのアミノ末端残基を含む/アミノ末端残基からなる配列を有するペプチド）をコードする核酸を提供する。

本発明のホスホリパーゼシグナル配列（SP）、結合ドメイン、触媒ドメイン（CD）及び/又はプレプロ配列は単離ペプチドであっても、又は別のホスホリパーゼ若しくは非ホスホリパーゼポリペプチドと（例えば融合（キメラ）タンパク質として）結合した配列であってもよい。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼシグナル配列SP及び/またはプレプロ配列を含むポリペプチドは、本発明のホスホリパーゼに対して異種の配列を含む（例えば、本発明のSP及び/又はプレプロ配列並びに別のホスホリパーゼ又は非ホスホリパーゼタンパク質由来の配列を含む融合タンパク質）。ある特徴では、本発明は、異種CD、SP及び/又はプレプロ配列を有する本発明のホスホリパーゼを提供する（例えば酵母のシグナル配列を有する配列）。本発明のホスホリパーゼは、異種CD、SP及び/又はプレプロ配列

をベクター（例えばpPICシリーズベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA））中に含むことができる。

【0157】

ある特徴では、本発明のSP、CD及び/又はプレプロ配列は、新規なホスホリパーゼポリペプチドの特定に続いて特定される。タンパク質を分類し、それらの適切な細胞内の指定場所へ輸送する経路は、しばしばタンパク質ターゲッティング経路と称される。これら全てのターゲッティング系でもっとも重要な要素の1つは、新規に合成されるペプチドのアミノ末端の、シグナル配列と称される短いアミノ酸配列である。このシグナル配列はタンパク質をその適切な細胞内の指定場所へ誘導し、さらに、輸送時又は前記タンパク質がその最終的な目的地に到達したときに除去される。ほとんどのリソゾームタンパク質、膜タンパク質又は分泌タンパク質はアミノ末端のシグナル配列を有し、前記配列は、小胞体の管腔内への輸送のためにそれらタンパク質に目印を与える。シグナル配列の長さは13から45又はそれより大きいアミノ酸残基でありうる。当業者には種々のシグナル配列認識方法が知られている。例えば、ある特徴では、新規なヒドロラーゼシグナルペプチドが、シグナルPと称される方法によって特定される。シグナルPは合体神経ネットワークを用い、前記はシグナルペプチド及びそれらの切断部位の両方を認識する（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 (1997)）。

10

いくつかの特徴では、本発明のホスホリパーゼは、SP及び/又はプレプロ配列及び/又は触媒ドメイン（CD）をもたなくてもよい。ある特徴では、本発明は、SP、CD及び/又はプレプロドメインの全てまたは一部分を欠くホスホリパーゼを提供する。ある特徴では、本発明は、あるホスホリパーゼに由来するシグナル配列（SP）、CD及び/又はプレプロ配列をコードする核酸が別のホスホリパーゼの核酸配列に機能的に連結された核酸を提供し、また場合によっては、非ホスホリパーゼタンパク質のシグナル配列（SP）、CD及び/又はプレプロドメインを所望することができる。

20

【0158】

本発明はまた、本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメイン及び/または触媒ドメイン（CD）並びに異種配列を含む単離または組換えポリペプチドを提供する。前記異種配列は、SP、プレプロドメイン及び/又はCDと（例えばホスホリパーゼと）天然には結合していない配列である。SP、プレプロドメイン及び/又はCDが天然には結合していない配列は、SP、プレプロドメイン及び/又はCDのアミノ末端、カルボキシ末端、及び/又はSP及び/又はCDの両方の末端に存在しうる。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメイン及び/又は触媒ドメイン（CD）を含むポリペプチドを含む（または前記から成る）単離又は組換えポリペプチドを提供するが、ただし前記ポリペプチドはそれが天然に結合しているいずれの配列（例えばホスホリパーゼ配列）とも結合していないことを条件とする。同様にある特徴では、本発明は、これらの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。したがって、ある特徴では、本発明の単離または組換え核酸は、本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメイン及び/又は触媒ドメイン（CD）並びに異種配列（すなわち本発明のシグナル配列（SP）、プレプロドメイン及び/又は触媒ドメイン（CD）と天然には結合していない配列）のコード配列を含む。前記異種配列は、SP、プレプロドメイン及び/又はCDのコード配列の3'末端、5'末端及び/又はその両末端に存在することができる。

30

40

【0159】

本発明のポリペプチドは活性型又は不活性型のホスホリパーゼを含む。例えば、本発明のポリペプチドは、“成熟”前又はプレプロ配列のプロセッシング前（例えばプロタンパク質変換酵素のようなプロタンパク質プロセッシング酵素によって“活性な”成熟タンパク質が生成される前）のプロタンパク質を含む。本発明のポリペプチドは他の原因、例えば翻訳後プロセッシング事象（例えばエンド-又はエキソ-ペプチダーゼ又はプロテイナーゼ作用）、リン酸化事象、アミド化、グリコシル化、脱グリコシル化、硫酸化、ダイマー化事象などにより活性化される前の、不活性であるホスホリパーゼを含む。“プレプロ”

50

ドメイン配列、CD、結合ドメイン及びシグナル配列を特定する方法は当分野ではよく知られている。例えば以下を参照されたい：Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136；タンパク質-タンパク質相互作用の特定のための酵母2ハイブリッドスクリーニングは、例えば以下によって記載されている：Miller (2004) Methods Mol. Biol. 261:247-62；Heyninck (2004) Methods Mol. Biol. 282:223-41；USPN 6,617,122；USPN 6,190,874。例えば、プレプロ配列を特定するために、前記タンパク質を細胞外間隙から精製し、さらにN-末端タンパク質配列を決定しプロセッシングを受けていない形態と比較する。

本発明のポリペプチドは、タンパク質調製物として任意の液体、固体、半固体又はゲル形に製剤化することができる。例えば、本発明のタンパク質調製物は、非水性液体組成物、10 鑄造固体、散剤、凍結乾燥粉末、顆粒形、粒状形、圧縮錠剤、ペレット、ゲル形、ヒドロゲル、ペースト、エアロゾル、スプレー、ローション又はスラリー製剤を含む製剤を含むことができる。

【0160】

本発明のポリペプチドは全ての活性な形態を含み、これらには本発明の酵素の活性な部分配列、例えば触媒ドメイン（CD）又は活性部位が含まれる。ある特徴では、本発明は下記に示される触媒ドメイン又は活性部位を提供する。ある特徴では、本発明は、例えばPfamのようなデータベース又は等価物を使用することにより予測される活性部位を含む、又は前記活性部位から成るペプチド又はポリペプチドを提供する（Pfamは、多数の一般的なタンパク質ファミリーをカバーする、マルチ配列アラインメント及び隠蔽マルコフモデルの大きな蒐集物である；Pfamタンパク質ファミリーデータベース、A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Ewinger, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, & E.L.L. Sonnhammer, Nucleic Acids Research, 30(1):276-280, 2002）20

。本発明は、本発明の酵素のN-末端又はC-末端部分配列（例えばシグナル配列、プレプロ配列）と他のポリペプチド、活性を有するタンパク質又はタンパク質フラグメントとの融合物を提供する。本発明の酵素（例えばホスホリパーゼC酵素）の製造はまた、前記酵素を不活性な融合タンパク質として発現させ、前記融合タンパク質を後でタンパク質分解切断事象（内因性又は外因性プロテアーゼ活性（例えばトリプシン）を用いる）によって活性化させ、これによって融合タンパク質パートナーと成熟酵素（例えばホスホリパーゼC酵素）を分離することによって達成されうる。ある特徴では、本発明の融合タンパク質は、30 以下の要素を含有する単一のオープンリーディングフレームをコードするハイブリッドヌクレオチド構築物から発現される：前記融合タンパク質のためのヌクレオチド配列、リンカー配列（2つの可撓性の低いタンパク質ドメインを結合させる可撓性アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と定義される）、プロテアーゼ切断認識部位及び成熟酵素（例えば本発明の任意の酵素、例えばホスホリパーゼ）配列。また別の特徴では、前記融合タンパク質は、ペクテトリアーゼ配列、キシラナーゼ配列、ホスファチジン酸ホスファターゼ配列又は別の配列、例えば対象の宿主系で過剰発現することが以前に示された配列を含むことができる。

【0161】

任意の宿主系、例えば任意の細菌、例えばグラム陽性細菌（例えばバチルス）又はグラム陰性細菌（例えば大腸菌）又は任意の酵母（例えばピキア・パストリス）を用いることができる（上記の考察を参照されたい）。キメラヌクレオチド構築物におけるヌクレオチド配列の並べ方は、各構築物により達成されるタンパク質の発現レベルを基準にして決定することができる。ある特徴では、ヌクレオチド構築物の5'末端から始まって前記構築物の3'プライム末端まで、前記ヌクレオチド配列は以下のようにアッセムブリングされる：シグナル配列／融合タンパク質／リンカー配列／プロテアーゼ切断認識部位／成熟酵素（例えば本発明の酵素、例えばホスホリパーゼ）、又はシグナル配列／プロ配列／成熟酵素／リンカー配列／融合タンパク質。不活性な融合タンパク質としての酵素（例えば本発明の酵素、例えばホスホリパーゼ）を発現させることによって、前記酵素配列の全体的な発現が改善される可能性があり、活性酵素の過剰生成に付随する潜在的な毒性を減少させる 40 50

可能性があり、及び/又は使用前の酵素の保存期間を延長させる可能性がある（なぜならば、酵素は、融合タンパク質（例えばベクテートリアーゼ）が前記酵素（例えばホスホリパーゼ）から分離されるまで不活性であろうから）。

【0162】

様々な特徴において、本発明は、融合タンパク質として発現される本発明のホスホリパーゼの活性化のための特別な製剤を提供する。ある特徴では、最初に不活性な融合タンパク質として発現されるホスホリパーゼ活性の活性化は、タンパク分解活性を用いて、又はアミノ末端若しくはカルボキシ末端ペプチダーゼと組み合わせられた潜在的なタンパク分解活性を用いて達成される。この活性化事象は、多様な方法で、及び油の脱ガムでの適用前の製造/貯蔵プロセスにおける多様な時点で実施することができる。本発明の例示的なプ

10

ロセスには以下が含まれる：発酵培地への融合構築物の分泌時に製造宿主によって発現される内因性活性による切断；細胞崩壊時に細胞内で発現された融合構築物により活性化されるか、又は前記と接触する内因性プロテアーゼ活性による切断；酵素を製剤化する前に切断及び酵素（本発明のホスホリパーゼ、例えばホスホリパーゼC）の活性化を達成するために、固定したプロテアーゼ活性のカラムに粗又は精製融合タンパク質を通過させる；可溶性のタンパク分解活性供給源を用いる粗又は精製融合構築物の処理；油の精製プロセスで使用する直前に、可溶性又は不溶性のいずれかのタンパク分解活性供給源を用いる油の精製プロセスでのホスホリパーゼ（例えば本発明のホスホリパーゼ、例えばホスホリパーゼC）の活性化；及び/又は固定プロテアーゼ活性カラムに低温（例えば約4 から20

20

の間の任意の温度）で融合構築物製剤を持続的に循環させることによるホスホリパーゼ（例えば本発明のホスホリパーゼ、例えばホスホリパーゼC）活性の活性化。この活性化事象は使用場所にデリバリーする直前に実施するか、又は油精製のその場所で行うことができる。

【0163】

グリコシル化：本発明のペプチド及びポリペプチド（例えばヒドロラーゼ、抗体）はまたグリコシル化することができ、例えばある特徴では、少なくとも1つのグリコシル化部位（例えばN-結合又はO-結合グリコシル化）を含む。ある特徴では、前記ポリペプチドは、P.バストリス又はP.ポンベで発現された後でグリコシル化することができる。前記グリコシル化は、化学的に又は細胞の生合成メカニズムによって翻訳後に付加することができる。この場合、後者のメカニズムは公知のグリコシル化モチーフの使用を取り入れる。前

30

記モチーフは前記配列にとって天然のものでよいが、またペプチドとして付加しても、配列をコードする核酸に付加してもよい。

ある特徴では、本発明は、例えば下記の表に記載されているように、N-結合グリコシル化された配列番号2を含むポリペプチドを提供する：

部位番号	グリコシル化部位	長さ	グリコシル化部位のアミノ酸の位置	
1	組合せ：NNS	長さ：3	開始：27	終了：29
2	組合せ：NTT	長さ：3	開始：65	終了：67
3	組合せ：NET	長さ：3	開始：72	終了：74
4	組合せ：NST	長さ：3	開始：100	終了：102
5	組合せ：NFT	長さ：3	開始：168	終了：170
6	組合せ：NLS	長さ：3	開始：171	終了：173
7	組合せ：NDT	長さ：3	開始：229	終了：231

40

【0164】

完全長に配列番号2（前記はある特徴では配列番号1によってコードされる）のオープンリーディングフレームは、7つの潜在的なアスパラギン結合（N-結合）グリコシル化部位をコードする。グリコシル化宿主（例えばピキア・バストリス、サッカロミセス・セレピシアエ、シゾサッカロミセス・ポンベ又は哺乳動物細胞）での野生型配列番号2のオープンリーディングフレームの発現は、グリコシル化された配列番号2のホスホリパーゼ酵素の生成をもたらし、前記酵素はN-結合グリコシル化の存在のために本質的に不活性である

50

。グリコシル化された野生型の配列番号2をPNGアーゼF又はエンドグリコシダーゼHを用いた酵素による脱グリコシル化は、配列番号2活性の活性化をもたらす。さらにまた、1以上のN-結合グリコシル化部位の変異誘導による改変（前記部位がN-結合グリコシル化部位としてもはや認識されず、前記部位でグリコシル化がもはや生じないような改変）によって、種々の程度に活性が増強した配列番号2が生成される。

配列番号2のグリコシル化部位4、5及び/又は6のアスパラギンをコードするヌクレオチドの変異導入（例えば前記アスパラギンをアスパラギン酸に変換する）は、同じ宿主で発現させた野生型のオープンリーディングフレームと比較して、増強したPLC活性を有する酵素の生成をもたらす（ピキア・パストリスで発現された三重変異体は、大腸菌のような非グリコシル化宿主で発現された野生型配列の比活性及び機能活性と本質的に同一の活性を保有する）。N-結合グリコシル化コンセンサス配列（NXS/T）中のセリン又はスレオニン残基を変異させることによって（例えば前記のヌクレオチドコドンを変異させて、セリン又はスレオニンの代わりにこれらの位置にバリン又はイソロイシンを生成することによって）、N-結合グリコシル化部位を廃止することもまた可能である。この方法を使用してN-結合グリコシル化部位を除去することによってもまた、グリコシル化宿主の発現系で活性な配列番号2のホスホリパーゼが生成される。

10

【0165】

ホスホリパーゼ活性のアッセイ

本発明は、ホスホリパーゼ活性又は任意の組合せのホスホリパーゼ活性を有する単離、合成又は組み換えポリペプチド（例えば酵素、抗体）及び前記をコードする核酸を提供する。当分野で公知の多くのホスホリパーゼ活性のいずれのアッセイも、ポリペプチドがホスホリパーゼ活性を有し、本発明の範囲内に包含されるか否かの決定に用いることができる。ホスホリパーゼA、B、D及びC、パタチン並びに脂質アシルヒドロラーゼ活性、またはリパーゼ活性を測定するための日常的プロトコルは当分野で周知である。

20

例示的な活性アッセイには、濁度アッセイ、メチルウンベリフェリルホスホコリン（蛍光）アッセイ、アンプレックス（Amplex）レッド（蛍光）ホスホリパーゼアッセイ、薄層クロマトグラフィー（TLC）、細胞溶解アッセイ及びp-ニトロフェニルホスホリルコリンアッセイが含まれる。これらのアッセイを用いて、ポリペプチド、ペプチド又は抗体は、ホスホリパーゼ活性について迅速にスクリーニングすることができる。

前記ホスホリパーゼ活性は、酸アシルヒドロラーゼ（LAH）活性を含むことができる。例えば以下を参照されたい：Jimenez (2001) *Lipids* 36:1169-1174（前記は、パタチンの脂質アシルヒドロラーゼ活性を決定するためのオクタエチレングリコールモノドデシルエーテル系混合ミセルについて記載している）；Pinsirodom (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48:155-160（前記は例示的脂質アシルヒドロラーゼ（LAH）パタチン活性について記載している）。

30

【0166】

ホスホリパーゼ活性を測定するための濁度アッセイは例えば以下に記載されている：Kauffmann (2001) “Conversion of *Bacillus thermocatenuatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design,” *Protein Engineering* 14:919-928；Ibrahim (1995) “Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*,” *Infect. Immun.* 63:1993-1998。

40

ホスホリパーゼ活性を測定するためのメチルウンベリフェリル（蛍光）ホスホコリンアッセイは例えば以下に記載されている：Goode (1997) “Evidence for cell surface and internal phospholipase activity in ascidian eggs,” *Develop. Growth Differ.* 39:655-660；Diaz (1999) “Direct fluorescence-based lipase activity assay,” *BioTechniques* 27:696-700。

ホスホリパーゼ活性を測定するためのアンプレックスレッド（蛍光）ホスホリパーゼアッセイはキットとして入手できる。例えばモリキュラープローブ社（Molecular Probes Inc., Eugene, OR）のアンプレックスレッド・ホスファチジルコリン特異的ホスホリパー

50

ゼアッセイキットを製造元の指示にしたがって用いてホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ活性が検出される。蛍光は、蛍光マイクロプレート読取装置で $560 \pm 10\text{nm}$ での励起及び $590 \pm 10\text{nm}$ での蛍光検出を用いて測定される。前記アッセイは非常に低い酵素濃度で感度を有する。

【0167】

ホスホリパーゼ活性を測定するための薄層クロマトグラフィーアッセイ (TLC) は例えば以下に記載されている: Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13; Taguchi (1975) "Phospholipase from *Clostridium novyi* type A.I," *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85. 薄層クロマトグラフィー (TLC) はホスホリパーゼ活性の検出に広く用いられている技術である。水性アッセイ混合物からリン脂質を抽出するために、本方法の種々の改変が実施されている。いくつかのPLCアッセイでは、加水分解は、クロロホルム/メタノール (2:1) を反応混合物に添加することによって停止される。未反応出発物質及びジアシルグリセロールは有機相中に抽出されてTLCによって分画され、一方、ヘッドグループ生成物は水相に残留する。リン脂質消化のさらに正確な測定のために、放射能標識基質を用いることができる (例えば以下を参照されたい: Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13)。生成物と反応物質との比を用いて、単位時間あたりに加水分解された基質の実際の分子数を計算することができる。全ての成分が等しく抽出されるならば、抽出物中の一切の損失は全ての成分に等しく影響するであろう。リン脂質消化成分の分離は、溶媒系としてクロロホルム/メタノール/水 (65:25:4) を用いてシリカゲルのTLCによって実施できる (例えば以下を参照されたい: Taguchi (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85)。

ホスホリパーゼ活性を測定するためのp-ニトロフェニルホスホリルコリンアッセイは以下に記載されている: Korbsrisate (1999) *J. Clin. Microbiol.* 37:3742-3745; Berka (1981) *Infect. Immun.* 34:1071-1074. このアッセイは、基質類似体のp-ニトロフェニルホスホリルコリンの酵素的加水分解による黄色の発色原化合物p-ニトロフェノールの遊離 (405nmで検出できる) を根拠にしている。この基質は高処理スクリーニングに便利である。

細胞溶解アッセイは、赤血球の溶解により細胞溶解活性をもつホスホリパーゼを検出することができる。毒性ホスホリパーゼは真核細胞膜と相互作用し、ホスファチジルコリン及びスフィンゴミエリンを加水分解し、細胞を溶解させる。例えば以下を参照されたい: Titball (1993) *Microbiol. Rev.* 57:347-366。

【0168】

ハイブリッド (キメラ) ホスホリパーゼ及びペプチドライブラリー

ある特徴では、本発明は、本発明の配列を含むハイブリッドホスホリパーゼおよび融合タンパク質 (ペプチドライブラリーを含む) を提供する。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的 (例えばホスホリパーゼ基質、レセプター、酵素) のペプチドモジュレーター (例えば活性化物質または阻害物質) を単離することができる。本発明のペプチドライブラリーを用いて、標的の正式な結合パートナー、例えばリガンド (例えばサイトカイン、ホルモンなど) を特定することができる。ある特徴では、本発明は、本発明のシグナル配列 (SP) 及び/又は触媒ドメイン (CD) 並びに異種配列 (上記参照) を含むキメラタンパク質を提供する。

本発明はまた、本発明の核酸及びポリペプチドを用いて "改善された" ハイブリッドホスホリパーゼを作出する方法を提供する。例えば、本発明は、極端なアルカリ性pH及び/又は酸性pH、高温及び低温、浸透圧条件などで活性、例えばホスホリパーゼ活性 (例えばホスホリパーゼA、B、CまたはD活性、パタチンエステラーゼ活性、グリセロホスファターゼエステル結合の切断、植物油のリン脂質中のエステル結合の切断) を有する酵素を作出する方法を提供する。本発明は、ハイブリッド酵素 (例えばハイブリッドホスホリパーゼ) を作出する方法を提供する。

【0169】

ある特徴では、本発明の方法は、得られたハイブリッドポリヌクレオチドが第一の生物

10

20

30

40

50

学的に活性なポリペプチドに由来する活性を示すことができるように第一のポリヌクレオチドの配列を組み込む細胞のプロセスを利用することによって、新規なハイブリッドペプチドを作出する。例えば、第一のポリヌクレオチドは、本発明の例示的ホスホリパーゼ（例えば配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8など）をコードする例示的核酸配列（例えば配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7など）でありうる。前記第一の核酸は、特定の環境条件下（例えば高塩濃度）で効率的に機能する1つの生物由来の酵素をコードすることができる。前記核酸は、異なる条件下（例えば極端な高温）で効率的に機能する別個の生物に由来する第二のポリヌクレオチドによってコードされる酵素とともに“組み込む”ことができる。例えば、2つの核酸が、例えば組換え及び/又は還元的再組合せ（reductive reassortment）によってハイブリッド分子を生成するとき、第一及び第二の最初のポリヌクレオチド由来の配列を含むハイブリッドポリヌクレオチドは、本来のポリヌクレオチドによってコードされる両方の酵素の特徴を示す酵素をコードすることができる。したがって、ハイブリッドポリヌクレオチドによってコードされる酵素は、第一及び第二のポリヌクレオチドによってコードされる酵素の各々によって共有される環境条件下（例えば高塩濃度および極端な温度）で効率的に機能することができる。

10

また別には、本発明の方法から得られるハイブリッドポリペプチドは、本来の酵素では示されない特殊な酵素活性を示すことができる。例えば、ホスホリパーゼ活性をコードするポリヌクレオチドの組換え及び/又は還元的再組合せに続いて、得られた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は、本来の酵素の各々から得られる特殊な活性（すなわち前記ホスホリパーゼが作用する結合のタイプ及び前記ホスホリパーゼが機能する温度）についてスクリーニングすることができる。したがって、例えば前記ホスホリパーゼは、ハイブリッドホスホリパーゼを本来のホスホリパーゼから区別する化学的官能性（例えば（a）アミド（ペプチド結合）、すなわちホスホリパーゼ；（b）エステル結合、すなわちホスホリパーゼ及びリパーゼ；（c）アセタール、すなわちグリコシダーゼ）及びハイブリッドポリペプチドが機能する温度、pH又は塩濃度を確認するためにスクリーニングすることができる。

20

【0170】

本発明の核酸とともに“組み込まれる”べきポリヌクレオチド供給源は、個々の生物（“単離体”）、規定培地で増殖させた生物の集合体（“濃縮培養”）、又は未培養生物（“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ために培養によらないアプローチを用いることは、それによって生物多様性をもつ未利用資源に近づくことが可能になるので極めて好ましい。“環境ライブラリー”は環境サンプルから作製され、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された天然に存在する生物の包括的ゲノムを表す。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、ライブラリーは純粋培養として増殖させることができる原核細胞の小部分に限定されない。さらにまた、これらサンプル中に存在する環境DNAの標準化は、最初のサンプル中に存在していた全ての種に由来するDNAのより均等な提示を可能にするであろう。これによって、サンプルのより少ない構成物（優勢な種と比較して数桁少なく提示されるかもしれない）に由来する興味深い遺伝子の発見効率を劇的に増加させることができる。

30

40

例えば、未培養の1以上の微生物から作製された遺伝子ライブラリーが問題の活性についてスクリーニングされる。問題の生物活性分子をコードする潜在的な経路が、遺伝子発現ライブラリーの形で原核細胞で先ず初めに捕捉される。問題の活性をコードするポリヌクレオチドがそのようなライブラリーから単離され、宿主細胞に導入される。新規な又は強化された活性をもつ潜在的に活性な生物分子を作出する組換え及び/又は還元的再組合せを促進する条件下で、前記宿主細胞を増殖させる。

【0171】

ハイブリッドポリヌクレオチドを調製することができる微生物には、原核細胞微生物（例えば真性細菌及び古細菌）及び下等な真核細胞微生物（例えば真菌、いくつかの藻類及び原虫）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。核酸

50

は、生物から培養することなく回収してもよいし、または1以上の培養生物から回収してもよい。ある特徴では、そのような微生物は、好極限菌(extremophile)、例えば好熱菌、低温菌、psychrotroph)、好塩菌、好圧性細菌及び好酸性菌でありうる。ある特徴では、好極限性微生物から単離されたホスホリパーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを用いてハイブリッド酵素が生成される。そのような酵素は、例えば地上の温泉及び深海の熱水噴出孔の100 を越える温度で、例えば北極海の0 より低い温度で、例えば死海の飽和塩環境で、例えば石炭堆積物及び硫黄に富む地熱温泉中のほぼ0のpH値で、又は例えば下水中の11を超えるpH値で機能することができる。例えば、好極限生物からクローニングされ、発現されたホスホリパーゼは、広範囲の温度及びpHで高い活性を示すことができる。

10

本明細書に記載したように選別及び単離したポリヌクレオチド(本発明の少なくとも1つの核酸を含む)を適切な宿主細胞に導入する。適切な宿主細胞は、組換え及び/又は還元的再組合せを促進することができる任意の細胞である。前記選別ポリヌクレオチドは、適切な制御配列を含むベクター中に存在しうる。前記宿主細胞は、高等真核細胞(例えば哺乳動物細胞)でも下等真核細胞(例えば酵母細胞)でもよいが、好ましくは宿主細胞は原核細胞(例えば細菌細胞)である。構築物の宿主細胞への導入はリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション又はエレクトロポレーションによって実施することができる(Davis et al. 1986)。

【0172】

適切な例示的宿主には、細菌細胞(例えば大腸菌、ストレプトミセス、ネズミチフス菌)、真菌細胞(例えば酵母)、昆虫細胞(例えばドロソフィラS2及びスポドプテラSf9)、動物細胞(例えばCHO、COS又はボウズメラノーマ)、アデノウイルス及び植物細胞(上記の考察もまた参照されたい)が含まれる。組換え及び/又は還元的再組合せのため、又は単に組換えタンパク質の発現のための適切な宿主の選択は、本明細書の教示から当業者の範囲内であると考えられる。組換え及び/又は還元的再組合せのため、又は単に組換えタンパク質の発現のために用いることができる哺乳動物細胞培養系には、例えばサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株(前記は以下に記載された: Gluzman, 1981, "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants")、C127、3T3、CHO、HeLa及び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及びエンハンサー、並びに必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位、転写終了配列、及び5'-フランキング非転写配列を含むことができる。SV40スプライス由来のDNA配列、及びポリアデニル化部位を用いて、必要な非転写遺伝エレメントを提供することができる。

20

30

問題のポリヌクレオチドを含む宿主細胞(組換え及び/又は還元的再組合せのため、又は単に組換えタンパク質の発現のためのもの)は、プロモーターの活性化、形質転換体の選別又は遺伝子増幅に適切にように改変した通常の栄養培養液で培養することができる。培養条件(例えば温度、pHなど)は、発現の選別のために宿主細胞に以前に用いられたものであり、当業者には明白であろう。固有の酵素活性を有すると特定したクローンを続いて配列決定し、強化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特定することができる。

40

【0173】

別の特徴では、本発明の核酸及び方法を用いて、生化学的経路(例えば1以上のオペロン又は遺伝子クラスターに由来する経路又はその部分)のための新規なポリヌクレオチドを作出することができる。例えば、細菌及び多くの真核細胞は遺伝子の調節のために協調的メカニズムを有し、前記遺伝子の生成物は関連するプロセスに必要である。前記遺伝子は、単一染色体上にクラスターを形成し("遺伝子クラスター"と称される構造を有する)、単一調節配列(前記クラスター全体の転写を開始するただ1つのプロモーターを含む)の制御下に一緒に転写される。

遺伝子クラスターDNAは種々の生物から単離することができ、ベクター(特に、検出可能タンパク質又は連結した遺伝子クラスターのタンパク質関連アレイ活性の産生を制御又

50

は調節することができる発現調節配列を含むベクター)に連結することができる。外因性DNAの導入に対して例外的に大きな収容力を有するベクターを使用することは、そのような遺伝子クラスターとともに使用する場合に特に適切であり、大腸菌のf因子(又は稔性因子)を含む例示として本明細書に記載されている。この大腸菌のf因子は、接合時におけるその因子自体の高頻度の移転に影響を与え、大きなDNAフラグメント(例えば混合細菌サンプル由来の遺伝子クラスター)を獲得し、安定的に増殖させるために理想的なプラスミドである。“フォスミド”、コスミド又は細菌人工染色体(BAC)ベクターをクローニングベクターとして用いることができる。これらは、ゲノムDNAの大きなセグメントを安定的に組み込むことができる大腸菌f因子に由来する。混合未培養環境サンプル由来のDNAとともに組み込まれたとき、前記は安定した“環境DNAライブラリー”の形で大きなゲノムフラグメントを獲得することを可能にする。コスミドベクターは、本来は大きなゲノムDNAセグメントをクローニングし増殖させるために設計された。コスミドベクターでのクローニングは以下の文献に詳細に記載されている: Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。いったん適切なベクターに連結したら、種々のポリケチドシンターゼ遺伝子クラスターを含む2つ又は3つ以上のベクターを適切な宿主細胞に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的な配列相同性を有する領域は、ハイブリッド遺伝子クラスターをもたらず配列再編成を生じるプロセスを促進するであろう。続いて新規なハイブリッド遺伝子クラスターを、最初の遺伝子クラスターでは見いだされなかった強化された活性についてスクリーニングすることができる。

10

20

【0174】

したがって、ある特徴では、本発明は、本発明の核酸を用いて生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドを生成し、前記ポリペプチドを活性(例えば強化された活性)についてスクリーニングする方法に関する。前記方法は以下によって実施される:

(1) 操作可能な連結状態にある少なくとも第一のポリヌクレオチド(例えば本発明の核酸)及び操作可能な連結状態にある第二のポリヌクレオチドを適切な宿主に導入し、ここで前記少なくとも第一のポリヌクレオチド及び第二のポリヌクレオチドは部分的な配列相同性をもつ少なくとも1つの領域を共有し;

(2) 操作可能な連結状態にあるハイブリッドポリヌクレオチドを生じる配列再編成を促進する条件下で前記宿主細胞を増殖させ;

30

(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;

(4) 所望の生物学的活性(例えば強化されたホスホリパーゼ活性)の特定を促進する条件下でハイブリッドポリペプチドをスクリーニングし; さらに

(5) 前記ハイブリッドペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離する。

多様な酵素活性をスクリーニングする方法は当業者には公知であり、本明細書を通して考察される。本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを単離するときは、そのような方法を用いることができる。

in vivo再組合せは、包括的に“組換え”と称される“分子間”プロセスに焦点を合わせることができる。細菌では、前記は一般的には“RecA依存”現象とみなされる。本発明は、配列を組み換えさらに配列を再組み合わせる宿主細胞の組換えプロセスに依存するか、又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的プロセスを仲介する細胞の能力に依存することができる。“還元的再組合せ”のこのプロセスは、“分子内”、RecA非依存プロセスによって生じる。したがって、本発明のある特徴では、本発明の核酸を用いて、新規なポリヌクレオチドが還元的再組合せのプロセスによって作出される。前記方法は、連続配列(本来のコード配列)を含む構築物の作製、適切なベクターへの前記の挿入、及びそれに続く適切な宿主への前記の導入を必要とする。個々の分子の実体の再組合せは、順列組み合わせ的(combinatorial)プロセスによって、相同性領域を有する構築物中の連続配列間で又は擬似反復ユニット間で生じる。前記再組合せプロセスは組換えを生じ、及び/又は反復配列の複雑度及び程度を減少させる。

40

50

【0175】

再組合せ率を高めるために多様な処置を適用することができる。これらには、紫外線照射、DNA障害性化学物質による処置、及び/又は“遺伝的不安定性”のレベル強化が示されている宿主細胞株の使用が含まれる。したがって、再組合せプロセスは、相同な組換え又は擬似反復配列自体の進化を誘導するそれら配列の天然の特性を必要とする。

反復配列又は“擬似反復”配列は、遺伝的不安定性における役割を有する。“擬似リピート”は、それらの本来のユニット構造に拘束されない。擬似反復ユニットは構築物中で配列アレイ（すなわち類似配列の連続ユニット）として存在することができる。いったん連結されると、連続配列間の結合部は本質的に見えなくなり、生じた構築物の擬似反復性の性質は分子レベルでは連続性である。得られた構築物の複雑度を減少させるために細胞が実施する欠失プロセスは擬似反復配列間で実施される。前記擬似反復ユニットは、実際に無限の鋳型レパートリーを提供し、前記ですべり現象が発生する。したがって、擬似リピートを含む構築物は、欠失（及び潜在的に挿入）事象が前記擬似反復ユニット内の実質的にいずれの場所においても発生しうる十分な分子の融通性を効果的に提供する。擬似反復配列が全て同じ向きで連結されるとき（例えばヘッドトゥテール又はその逆）、細胞は個々のユニットを識別することができない。結果として、前記還元的プロセスは配列全体で生じうる。対照的に、例えばユニットがヘッドトゥテールではなくヘッドトゥヘッドで提示されるとき、前記倒置は隣接ユニットも末端部の境界を明確にし、その結果欠失形成は不連続ユニットの減少を促進するであろう。したがって、本発明のある特徴では、再組合せが実施されるべき配列は同じ向きで存在する。擬似反復配列のランダムな向きでの配置は再組合せ効率の低下をもたらし、一方、配列を一定の向きで配置することによって最高の効率が提供されるであろう。しかしながら、同じ向きにある連続配列が少ないことによって前記効率は低下するが、前記はなお新規な分子の効率的な回収に対して十分な融通性を提供する。構築物は、同じ向きにある擬似反復配列を用いて作製され、より高い効率を可能にする。

【0176】

配列は、以下を含む多様な方法のいずれかを用いてヘッドトゥテールの向きでアッセンブリングすることができる：a) ポリAヘッド及びポリTテールを含み、一本鎖にしたとき方向性を提供するプライマーを利用することができる。前記は、プライマーの最初の数塩基をRNAから生成し、したがってRNase Hで容易に除去することによって達成される；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、固有配列バッテリー並びに反復合成及び連結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、エキソヌクレアーゼを用いて適切にテールを有する分子を生成することができる。

再組み合わ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を根拠にする。続いて、前記再組み合わせされたコード配列を増幅により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実施することができる：1) 構築物の複雑度が低下したときにのみ安定的に維持されるベクターを使用する；2) 物理的方法による短縮ベクターの物理的回収、この事例では、クローニングベクターは、標準的なプラスミド単離方法及びアガロースゲル上で又は標準的方法を利用する低分子量カットオフカラムでサイズ分画される；3) 挿入物サイズが減少したときに選別されうる、分断遺伝子を含むベクターを回収する；4) 発現ベクター及び適切な選別を利用する直接選別技術を使用する。

関連生物に由来するコード配列（例えば遺伝子）は高度の相同性を示し、極めて多様なタンパク生成物をコードする。これらの配列型は、擬似リピートとして本発明で特に有用である。しかしながら、このプロセスはそのようにほぼ同一のリピートに限定されない。

【0177】

以下は本発明の例示的方法である。核酸コード配列（擬似リピート）は、本発明の核酸を含む3つの種に由来する。各配列は、別個の1組の特性を有するタンパク質（本発明の酵素を含む）をコードする。各配列は、配列の固有の位置で1塩基対又は数塩基対の違いを

10

20

30

40

50

有する。擬似反復配列は別々に又は一緒に増幅され、全ての可能な入れ替え及び組合せが連結分子集団で入手できるようにランダムに連結してアッセムブリングされる。擬似リピートユニットの数はアッセムブリ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)と定義される。いったん形成されたら、構築物は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てもよいし、又はしなくてもよい。前記をクローニングベクターに挿入し、さらに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、“還元的再組合せ”を実施する。還元的再組合せプロセスの速度は、所望の場合はDNAの導入によって促進することができる。RIの減少が、“分子内”メカニズムによる反復配列間の欠失形成によって仲介されているか、又は“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ているかは重要ではない。最終結果は分子の再組合せによる全ての可能な組合せである。ある特徴では、前記方法は、シャッフルしたプールのライブラリーメンバーをスクリーニングして、予め定めた巨大分子(例えばタンパク質性レセプター、オリゴ糖、ビリオン又は他の予め定めた化合物若しくは構造)と結合する能力、又は前記と相互反応するか若しくは触媒作用を示す能力を有する個々のシャッフルライブラリーメンバーを特定する追加の工程を含む。そのようなライブラリーから特定したポリペプチド、例えばホスホリパーゼは多様な目的、例えば本明細書に記載する工業的プロセスに用いるか、及び/又は1以上の更なるシャッフリング及び/又は選別サイクルに付すことができる。

10

【0178】

また別の特徴では、組換え又は再組合せ前又は前記の最中に、本発明の方法によって生成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薬剤又はプロセスに付すことができる。そのような変異の導入は、生成されるハイブリッドポリヌクレオチド及びそれらからコードされるポリペプチドの多様性を増加させるであろう。変異導入を促進する薬剤又はプロセスには以下が含まれうる(ただしこれらに限定されない: (+)-CC-1065、又は合成類似体、例えば(+)-CC-1065-(N3-アデニン)(Sun & Hurley, (1992)参照); DNA合成を阻害することができる、N-アセチル化又は脱アセチル化4'-フルオロ4-アミノピフェニルアダクト(例えば以下を参照されたい: van de Poll et al. (1992)); 又はDNA合成を阻害することができる、N-アセチル化又は脱アセチル化4-アミノピフェニルアダクト(さらに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複製を阻害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(“BMA”)、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]ピレン-7,8-ジヒドロジオール-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”)、及び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増幅を遅くするか又は停止させるための特に好ましい手段は、UV光(+)-CC-1065及び(+)-CC-1065-(N3-アデニン)から成る。特に包含される手段は、DNAアダクト、又は、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドプールから得られるDNAアダクトを含むポリヌクレオチドである(前記は、ポリヌクレオチドを含む溶液を更なるプロセッシングの前に加熱することを含む工程によって遊離又は除去することができる)。

20

30

40

【0179】

スクリーニングの方法論および“オンライン”モニター装置

本発明の方法の実施では、多様な装置および方法論を本発明のポリペプチドおよび核酸と併せて用いて、例えばホスホリパーゼ活性についてポリペプチドをスクリーニングし、活性の潜在的モジュレーター(例えば酵素活性の活性化又は阻害)としての化合物をスクリーニングし、本発明のポリペプチドと結合する抗体について、本発明の核酸とハイブリダイズする核酸についてスクリーニングに用いるなどすることができる。

【0180】

固定酵素の固形支持体: ホスホリパーゼ酵素、そのフラグメント、及び前記酵素及びフ

50

ラグメントをコードする核酸を固形支持体に固定することができる。前記は、工業的工程でホスホリパーゼを使用するときしばしば経済的であり、効率的である。例えば、ホスホリパーゼ酵素(又はそのフラグメント)の混合物又はカクテル(前記は特殊な化学反応で用いられる)を固相に結合させて反応容器に入れ、酵素反応を起こさせることができる。続いて、繰り返し使用するために、前記固相をそれに固定した酵素とともに前記容器から取り出すことができる。本発明のある実施態様では、本発明の単離核酸が固相に固定される。本発明のまた別の実施態様では、前記固相は、ゲル、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極及び前記の任意の組合せの群から選択される。

例えば、本発明で有用な固相にはゲルが含まれる。ゲルのいくつかの例には、セファロース、ゼラチン、グルタルアルデヒド、キトサン処理グルタルアルデヒド、キトサン-キサンタン、トーヨーパールゲル(ポリマーゲル)、アルギネート、アルギネート-ポリリシン、カラゲナン、アガロース、グリオキシルアガロース、磁性アガロース、デキストラン-アガロース、ポリ(カルバモイルスルホネート)ヒドロゲル、BSA-PEGヒドロゲル、リン酸化ポリビニルアルコール(PVA)、モノアミノエチル-N-アミノエチル(MANA)、アミノ又は前記の任意の組合せが含まれる。

本発明で有用なまた別の固相は樹脂又はポリマーである。樹脂又はポリマーのいくつかの例には、セルロース、アクリルアミド、ナイロン、レーヨン、ポリエステル、陰イオン交換樹脂、AMBERLITE(商標)XAD-7、AMBERLITE(商標)XAD-8、AMBERLITE(商標)IRA-94、AMBERLITE(商標)IRC-50、ポリビニル、ポリアクリリック、ポリメタクリレート、又は前記の任意の組合せが含まれる。

本発明で有用な固相のまた別のタイプはセラミックである。いくつかの例には、無孔性セラミック、多孔性セラミック、 SiO_2 、 Al_2O_3 が含まれる。本発明で有用なまた別のタイプの固相はガラスである。いくつかの例には、無孔性ガラス、多孔性ガラス、アミノプロピルガラス又は前記の任意の組合せが含まれる。用いることができるまた別のタイプの固相は微小電極である。一例はポリエチレンイミン被覆マグネタイトである。石墨粒子を固相として用いてもよい。

本発明の実施に用いられる他の例示的固相は、珪藻土生成物及びケイ酸塩を含む。いくつかの例には、CELITE(商標)、KENTITE(商標)、DIATIV(商標)、PRIMISIL(商標)、DIAFIL(商標)珪藻土岩及びMICRO-CEL(商標)、CALFLO(商標)、SILASORB(商標)、並びにCELKATE(商標)合成カルシウム及びマグネシウムケイ酸塩を含む。固相のまた別の例は細胞、例えば赤血球細胞である。

【0181】

固定化の方法：酵素若しくはそのフラグメント又は核酸を固相に固定する、当業者に公知の方法が多数存在する。そのような方法のいくつかの例には、例えば静電気性液滴の生成、電気化学的手段、共有結合によるもの、化学的反応又はプロセスによるもの、アルギン酸カルシウムによるもの、又はポリ(2-ヒドロキシエチルマタクリレート)によるものが含まれる。同様な方法が以下に記載されている：Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C, 1987, Academic Press. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. Vol. 136.; 及びImmobilization of Enzymes and Cells, 1997, Humana Press. Edited by G.F. Bickerstaff. Series: Methods in Biotechnology, Edited by J.M. Walker.

【0182】

キャピラリーアレイ：キャピラリーアレイ、例えばGIGAMATRIX(商標)(Diversa Corporation, San Diego, CA)を本発明の方法で用いることができる。本発明の核酸又はポリペプチドは、アレイ(キャピラリーアレイを含む)に固定又は塗布することができる。アレイを用いて、組成物(例えば小分子、抗体、核酸など)のライブラリーを本発明の核酸又はポリペプチドとの結合能力又は前記の活性の調節能力についてスクリーニング又はモニターすることができる。キャピラリーアレイは、サンプル保持およびスクリーニングのためのまた別のシステムを提供する。例えば、サンプルスクリーニング装置は、隣接するキャピラリーのアレイを形成する複数のキャピラリーを含み、ここで各キャピラリーはサン

ブル保持のために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を構成する。前記装置はさらに、アレイ内の隣接するキャピラリーの間に配置された間隙物質及び前記間隙物質内に形成された1以上の参照用インディシアを含む。サンプルスクリーニング用キャピラリー（キャピラリーアレイ中に束ねることができるように調製されている）は、サンプルを保持するために管腔を仕切る第一の壁、及びサンプル励起のために提供される励起エネルギーのフィルタリングのためのフィルター物質で形成された第二の壁を含むことができる。

【0183】

ポリペプチド又は核酸（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分の第一の成分に導入される。キャピラリーアレイの各キャピラリーは、前記第一の成分を保持するために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を含むことができる。気泡をキャピラリーの第一の成分の後ろに導入することができる。第二の成分をキャピラリーに導入することができ、この場合第二の成分は前記気泡によって第一の成分と分離される。対象サンプルは検出可能な粒子で標識された第一の液体としてキャピラリーアレイのキャピラリーに導入することができる。ここでキャピラリーアレイの各キャピラリーは、第一の液体及び検出可能な粒子を保持するために管腔を仕切る少なくとも1つの壁を含み、さらに前記少なくとも1つの壁は、前記少なくとも1つの壁に前記検出可能な粒子を結合させるために結合物質で被覆される。前記方法はさらに、キャピラリー管から第一の液体を除去する工程（ここで前記結合した検出可能粒子はキャピラリー内に保持される）、及び第二の液体をキャピラリー管に導入する工程を含む。

キャピラリーアレイは、管腔を仕切る少なくとも1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。前記キャピラリーの外壁は1以上の一緒に融合させた壁であり得る。同様に、前記の壁は、円筒形、四角形、六角形または、前記壁が液体又はサンプルの保持のための管腔を形成することができるかぎり他の任意の幾何学形である管腔を仕切ることができる。前記キャピラリーアレイのキャピラリーは接近して一緒に保持され平面構造を形成することができる。キャピラリーは、溶融（その場合にはキャピラリーは例えばガラスで製造される）、接着剤による接着、縛るかまたは隣同士を留め金で固定することによって一緒に束ねることができる。キャピラリーアレイは、任意の数の個々のキャピラリー、例えば100から4,000,000本の範囲のキャピラリーで形成できる。キャピラリーアレイは、約100,000本またはそれ以上の個々のキャピラリーを一緒に結合させたマイクロタイタープレートを形成することができる。

【0184】

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できる。アレイを用いて、（例えば小分子、抗体、核酸などの）組成物ライブラリーを、本発明の核酸またはポリペプチドと結合するその能力または前記の活性を調節するその能力についてスクリーニングまたはモニターすることができる。例えば本発明のある特徴では、モニターされるパラメーターはホスホリパーゼ遺伝子転写物の発現である。細胞の1つ若しくは2つ以上または全ての転写物は、細胞の転写物を含むサンプル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、又細胞の代表的な核酸若しくは細胞の転写物と相補的な核酸はアレイ若しくは“バイオチップ”上に固定化された核酸と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。マイクロチップ上の核酸“アレイ”を用いることによって、細胞の転写物のいくつかまたは全てを同時に定量することができる。また別には、ゲノム核酸を含むアレイはまた、本発明の方法によって新規に操作された株の遺伝子型の決定に用いることができる。“ポリペプチドアレイ”はまた、複数のタンパク質の同時定量に用いることができる。

本発明は公知の任意の“アレイ”（“マイクロアレイ”または“核酸アレイ”又は“ポリペプチドアレイ”又は“抗体アレイ”又は“バイオチップ”又はその変型とも称される）を用いて実施することができる。アレイは一般的には複数の“スポット”または“標的エレメント”である。各標的エレメントは規定量の1つまたは2つ以上の生物学的分子、例えばオリゴヌクレオチドを含み、それらはサンプル分子（例えばmRNA転写物）と特異的に結合させるため基質表面の規定領域に固定されている。

【0185】

本発明の方法の実施では、任意の公知のアレイおよび/またはアレイの製造および使用方法の全体もしくは部分またはその変型を、例えば以下に記載されているように取り入れることができる：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。さらにまた例えば以下を参照されたい：W099/5173；W099/09217；W097/46313；W096/17958。さらにまた例えば以下を参照されたい：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 Genetis Supp.* 21:25-32。さらにまた以下を参照されたい：米国特許出願公開広報第20010018642号；同第20010019827号；同第20010016322号；同第20010014449号；同第20010014448号；同第20010012537号；同第20010008765号。

【0186】

抗体および抗体使用スクリーニング方法

本発明は、本発明のホスホリパーゼと特異的に結合する単離または組換え抗体を提供する。これらの抗体を用いて、本発明のホスホリパーゼまたは関連するポリペプチドを単離、特定または定量することができる。これらの抗体を用いて本発明の酵素活性を阻害することができる。これらの抗体を用いて、本発明の酵素と関連するポリペプチド（例えば関連するホスホリパーゼ酵素）を単離することができる。

前記抗体は、免疫沈澱、染色（例えばFACS）、イムノアフィニティーカラムなどで用いることができる。所望の場合は、特異的な抗原をコードする核酸配列を、免疫とそれに続くポリペプチド又は核酸の単離、増幅又はクローニング及びポリペプチドの本発明のアレイ上への固定によって作製することができる。

また別には、本発明の方法を用いて、細胞により産生された抗体の構造を改変することができる。例えば抗体の親和性を強化または低下させることができる。さらにまた、抗体を製造又は改変する能力は本発明の方法により細胞を操作して付与した表現型でありうる。

免疫方法、抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）の製造および単離方法は当業者には公知で、学術文献及び特許文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：Coligan, *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY (1991)；Stites (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (7th ed.) Lang Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites")；Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd 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、動物を用いる従来の *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できる。例えば以下を参照されたい：Hoogenboom (1997) *Trends Biotechnol.* 15:62-70；Katz (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45。

【0187】

前記ポリペプチドを用いて、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を作製することができる。得られた抗体は、前記ポリペプチドを単離または精製するためにイムノアフィニティークロマトグラフィー方法で用いることも、前記ポリペプチドが生物学的サンプルに存在するか否かを決定するために用いることもできる。そのような方法では、タンパク質調製物（例えば抽出物）又は生物学的サンプルを、本発明のポリペプチドの1つと特異的に結合することができる抗体と接触させる。

イムノアフィニティーの工程では、前記抗体を固相（例えばビーズ又は他のカラムマトリックス）に結合させる。抗体が本発明のポリペプチドの1つと特異的に結合する条件下

で、前記タンパク質調製物を前記抗体と接触させる。洗浄して非特異的に結合したタンパク質を除去した後、特異的に結合したポリペプチドを溶出させる。

生物学的サンプル中のタンパク質が前記抗体と結合する能力は、当業者に周知の多様な方法を用いて決定できる。例えば、結合は抗体を検出可能な標識（例えば蛍光物質、酵素標識又は放射性同位元素）で標識することによって決定できる。また別には、抗体とサンプルとの結合は、前記のような検出可能な標識を保持する二次抗体を用いて検出してもよい。具体的なアッセイにはELISAアッセイ、サンドイッチアッセイ、放射能免疫アッセイおよびウェスタンブロットが含まれる。

【0188】

本発明のポリペプチドに対して生じるポリクローナル抗体は、動物に前記ポリペプチドを直接注射することによって、または非ヒト動物に前記ポリペプチドを投与することによって得ることができる。そのようにして得られた抗体は前記ポリペプチドそのものと結合するであろう。このようにして、ポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえも完全な天然のポリペプチドと結合することができる抗体の作製に用いることができる。続いて前記のような抗体を用いて、前記ポリペプチドを発現している細胞から前記ポリペプチドを単離することができる。

モノクローナル抗体の調製の場合、継続的な細胞株培養によって生成される抗体を提供するいずれの技術も用いることができる。その例にはハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術およびEBV-ハイブリドーマ技術が含まれる（例えば以下を参照されたい：Cole (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）。

単鎖抗体の生成のために記載された技術（例えば米国特許第4,946,778号を参照されたい）を利用して、本発明のポリペプチドに対する単鎖抗体を生成することができる。また別には、遺伝子導入マウスを用いて、これらポリペプチド又はそのフラグメントに対するヒト化抗体を発現させることができる。

本発明のポリペプチドに対して作製された抗体を他の生物およびサンプルに由来する類似のポリペプチドのスクリーニングに用いることができる。そのような技術では、前記生物由来のポリペプチドを抗体と接触させ、さらに前記抗体と特異的に結合するポリペプチドが検出される。上記に記載したいずれの方法も抗体結合の検出に用いることができる。

【0189】

キット

本発明は、前記組成物（例えば核酸、発現カセット、ベクター、細胞、ポリペプチド（例えば本発明の少なくとも1つのホスホリパーゼを含むキット）及び/又は抗体（例えば本発明の少なくとも1つの抗体を含むキット））を含むキットを提供する。前記キットはまた、本明細書に記載したような本発明の方法論および工業的使用を教示する指示資料を含むことができる。

【0190】

本発明の酵素の工業的及び医学的用途

本発明は、本発明のポリペプチド（例えば本発明のホスホリパーゼ及び他の酵素、例えばホスホリパーゼA、B、C及びD、パタチン）を用いる、多くの工業的使用及び医学的利用を提供する。ほんの少しの用途を挙げれば、前記使用には、非水和性リン脂質の水和性形態への変換、油の脱ガム、植物、魚類、藻類などに由来する油の加工が含まれる。これらの工業的使用及び医学的利用のいずれの選択肢においても、酵素は固有の順序で添加することができる。例えば、種々の特異性を有するホスホリパーゼは、固有の順序で、例えば、PC-及びPE-加水分解活性を有する1つの酵素が最初に添加され（又は2つの酵素が添加され、1つはPC-加水分解活性を有し、他方はPE-加水分解活性を有する）、続いてPI-加水分解活性（例えばPLC活性）を有する酵素が添加されるか、又は前記の組合せのいずれかである。

本発明の方法のいずれか又は全てを、“プロセススケール”で、例えば1日あたり約15,000、25,000、50,000、75,000又は100,000 lbsの精製油から1日あたり約1、2、3、4、5又

10

20

30

40

50

は6百万lbs又はそれを超える精製油の規模での油の加工又は精製で用いることができる。

工業的用途でホスホリパーゼ酵素を使用する方法は当分野では周知である。例えば、本発明のホスホリパーゼ及び方法は、例えば日本国特許出願公開公報H6-306386（前記は、油及び脂肪に存在するリン脂質をリン酸基を含む水溶性物質に変換することについて記載している）に記載されているように、脂肪及び油の加工のために使用することができる。

【0191】

本発明のホスホリパーゼを用いて、植物油及びリン脂質（例えば米ぬか、ダイズ、キャノーラ、ヤシ、綿実、トウモロコシ、ヤシの種子、ココナッツ、落花生、ゴマ、ヒマワリに由来するか又は前記から単離されたもの）を加工することができる。本発明のホスホリパーゼを用いて、精油（例えば果実の種子油、例えばぶどう種子、アプリコット、ルリチシャ（borage）などに由来するもの）を加工することができる。本発明のホスホリパーゼを用いて、種々の形態（例えば未精製形、脱ガム形、ガム、洗浄水、粘土、シリカ、ソープストックなど）中の油及びリン脂質を加工することができる。本発明のホスホリパーゼを用いて、高リン油、魚油、動物の油、植物油、藻類の油などを加工することができる。本発明のいずれの特徴においても、いつでもホスホリパーゼCを用いることができる。又別の選択肢は、本発明のホスホリパーゼD及びホスファターゼの使用を含む（例えば高リン油（例えば大豆油）における収量の改善のためにPLD/ホスファターゼの組合せが使用される）。

10

本発明のホスホリパーゼを用いて、食用油、バイオディーゼル油、医薬及び化粧品のリポソーム、構造化（structured）リン脂質及び構造化脂質を加工並びに製造することができる。本発明のホスホリパーゼを油の抽出物で用いることができる。本発明のホスホリパーゼを用いて種々の石鹸を加工及び製造することができる。

20

【0192】

食用油の加工：1,3-ジアシルグリセロール（1,3DAG）の生成：本発明は、本発明の酵素を用いて1,3-ジアシルグリセロール（1,3DAG）を製造する方法を提供する。ある特徴では、ホスホリパーゼC又はホスホリパーゼD+ホスファターゼによって1,2-ジアシルグリセロールが生成される。これは、食用油の精製時の油の収量を改善する。苛性アルカリ中和工程を含む方法で用いられるとき、例えば苛性アルカリ精製の補助剤として、70%もの1,2-ジアシルグリセリド（2-DAG）がアシルマイグレーションを経て、1,3-DAGに変換される。1,3-DAGは高い健康上の利点を有し、したがって苛性アルカリ精製補助としてPLCを使用することによって栄養価の高い油が製造される。

30

本発明は、本発明の酵素を用いて、1,3-DAG量の増加した食用油の製造を含む、食用油を製造及び加工する方法を提供する。ジアシルグリセロールは、多くの食用油に見出される天然に存在する化合物である。本発明の方法（例えば油の脱ガムプロセス）のある特徴では、塩基（苛性アルカリ）は、PLCによって生成される1,2-DAGの1,3-DAGへの異性化を引き起こし、1,3-DAGは1,2-DAGよりも優れた栄養上の利点を提供する。例えば1,3-DAGは、1,2-DAGのように脂肪として貯蔵される代わりにエネルギーとして燃焼する。苛性アルカリ精製プロセスの最先端でPLCを添加する（さらにその後で酸及び苛性アルカリを添加することによって、本発明の方法は1,3-DAGレベルの上昇（1,2-DAGの減少）をもたらす。栄養的には、1,3-DAGは1,2-DAGよりも優れている。又別の特徴では、本発明は、本発明のPLCを用いて油を脱ガムするプロセスを含み、前記プロセスによって脱ガム油最終製品は、0.5%、1.0%、2.0%を下回らない又は前記を越える1,3-DAGを含む。

40

【0193】

したがって、本発明は、（エステル交換により）精製油（例えばジアシルグリセロール油）（前記には高レベルの1,3-ジアシルグリセロール（1,3-DAG）を含む食用油が含まれる）を実施例13に示すように製造する方法を提供する。前記方法では、ホスホリパーゼ（例えば本発明の酵素）が“フロントロード”されるか、又は酸若しくは苛性アルカリの添加前に添加される。DAGの酵素的加水分解によって、1,2-DAGからエステル交換により1,3-DAGが生成される。1,3-DAG含有食用油は、通常の食用油と比較して異なる代謝作用を示す。1,3-DAGと1,2-DAG又はトリグリセリドとの間の代謝経路における相違は、1,3ジアシル

50

グリセリド由来の脂肪酸のより大きな部分は、脂肪として貯蔵されるのではなくエネルギーとして燃焼される。臨床実験によって、良好な規定食の一部としてDAG油を規則的に消費することは、個体がその体重および体脂肪を管理することに役立つことが示された。さらにまた、1,3-DAGの代謝は、食後のトリグリセリドの血流中の循環を減少させる。肥満及び血中脂質の上昇は、心脈管系疾患及びII型糖尿病を含む慢性疾患の危険因子と密接に関連しているため、これらの生活習慣に関連する健康状態はDAG油の規則的な消費により有益な影響を受けることができる。

DAG含有油の消費は多様な手段によりもたらされうる。したがって、ある特徴では、本発明は、本発明の酵素を用いて、1,3-DAGジアシルグリセロールレベルが増加した食品（例えば焼成製品）及びジアシルグリセロール油を含む焼成製品を製造する方法を提供する。ある特徴では、前記焼成製品はクッキー、ケーキ及び同様な焼成製品である。

また別の実施態様では、本発明の方法（食用油の加工を含む）で用いることができる酵素の組合せには以下が含まれる（この場合、前記組合せ中の酵素の1つ、いくつかまたは全てが本発明の酵素である）：

- PLC + PI-PLC + PLA（PLAはPLC反応の完了後に添加される）；
- PLD + ホスファターゼ + PI-PLC、続いてPLA；又は
- PLC又は（PLC + PI-PLC） + ホスファチジン酸に特異的なPLA（全ての酵素と一緒に添加されるか又は連続して添加される）。

【0194】

油の脱ガム及び植物油の加工：本発明の酵素（例えばリパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ及び/又はグリコシダーゼ又は等価の活性をもつ本発明のポリペプチド）を多様な植物油の加工工程、例えば植物油の抽出で、特に“油の脱ガム”と称されるプロセスでの“リン脂質ガム”の除去で用いることができる。

本発明のこれらのプロセスは“プロセススケール”で、例えば1日あたり約15,000、25,000、50,000、75,000又は100,000 lbsの精製油から1日あたり約1、2、3、4、5又は6百万lbs又はそれを超える精製油までの規模で用いることができる。

ある特徴では、本発明は、本発明のホスホリパーゼ（例えば本発明のPLC）の使用を含む油の脱ガム方法を提供する。ある特徴では、前記方法はさらに、また別のホスホリパーゼ（前記はまた本発明のホスホリパーゼでありうる）、例えば本発明のPLC、PLA、PLB、PLB若しくはパタチン、又はリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）活性又はリゾホスホリパーゼ（LPL）活性及びリゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ（LPTA）、又は前記の組合せ、及び/又はパタチン様ホスホリパーゼ（前記もまた本発明の酵素でありうる）活性を有する酵素（前記もまた本発明の酵素でありうる）の添加をさらに含む。ある特徴では、全ての酵素と一緒に添加されるか、あるいは、前記酵素は固有の順序で添加される。例えば、PLC添加に続いてPLA及び/又はパタチンが添加されるか、又はPC及びPE活性を有する本発明の1つの酵素又は複数の酵素が先ず初めに添加され、続いてPI-PLCが二番目に添加される。

【0195】

ある特徴では、この方法は、ホスホリパーゼ（例えば本発明のPLC）処理の結果として収量の改善を提供する。ある特徴では、この方法は、ホスホリパーゼ（例えば本発明のPLA）処理の結果としてリンの含有量の更なる低下を提供する。

ある特徴では、本発明は、本発明のホスホリパーゼ（例えば本発明のPLC）を使用してガムのかさを減少させ、さらに油の囲い込みを減少させることにより中性油（トリグリセリド）獲得を増加させることを含む方法を提供する。ある特徴では、本発明は、油相に寄与する中性油及びジアシルグリセリド生成を増加させるために、本発明のホスホリパーゼ（例えば本発明のPLC）を使用することを含む方法を提供する。また別の特徴では、本発明の方法（例えば脱ガムの方法）は、1以上の他の酵素、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、別のホスホリパーゼ（例えば本発明の酵素を含む）、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクターゼ、キシナーゼ、オキシダーゼ、例えばラクターゼ及び/又はペルオキシダーゼ、又は等

10

20

30

40

50

価の活性をもつポリペプチド、又は前記の組合せを含むことができる。

本発明のホスホリパーゼは、上記に記載したように、多様な植物油の加工工程、例えば植物油の抽出で、特に“油の脱ガム”と称されるプロセスでの“リン脂質ガム”の除去で用いることができる。本発明は、種々の供給源、例えば米ぬか、ダイズ、ナタネ、落花生及び他のナッツ、ゴマ、ヒマワリ、ヤシ及びトウモロコシに由来する植物油を加工する方法を提供する。前記方法は、ヘキサンによる抽出、それに続く粗抽出物の食用油への精製を用いるプロセス（本発明の方法及び本発明の酵素の使用を含む）と併用して用いることができる。精製の連続工程の最初の工程はいわゆる“脱ガム”プロセスであり、前記は水の添加によってホスファチドを分離させる。脱ガムによって沈殿した物質を分離し、さらに処理してレシチンの混合物が得られる。産業レシチン（例えばダイズレシチン及びヒマワリレシチン）は、半固形又は非常に粘稠な物質である。前記は、極性脂質（主としてリン脂質）及び油（主としてトリグリセリド）の混合物から成る。

10

【0196】

本発明のホスホリパーゼは、任意の“脱ガム”方法（水による脱ガム、ALCON油脱ガム（例えばダイズ用）、サフィンコ（safinco）脱ガム、“スーパー脱ガム”、UF脱ガム、TOP脱ガム、ユニ脱ガム、乾燥脱ガム及びENZYMAL（商標）脱ガムを含む）で用いることができる（例えば以下を参照されたい：米国特許6,355,693号、6,162,623号、6,103,505号、6,001,640号、5,558,781号、5,264,367号）。本発明の方法に取り込まれた種々の“脱ガム”方法は以下に記載されている：M. Bockisch (1998) Fats and Oils Handbook, The Extraction of Vegetable Oils (Chapter 5), 345-445, AOCS Press, Champaign, Illinois。本発明のホスホリパーゼは、例えばEP513,709に記載されているように、トリグリセリド油の酵素的脱ガムの工業的利用で用いることができる。

20

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼを用いて、植物油（例えば粗油、例えば米ぬか、ダイズ、キャノーラ、ヒマワリなど）が処理される。ある特徴では、前記処理によって、脱ガムプロセスの効率が改善される。ある特徴では、本発明は、低水分条件下（例えば約0.1%から20%の範囲の水分、又は0.5%から10%の範囲の水分）での酵素的脱ガム方法を提供する。ある特徴では、この処理は、遠心中の油から重い相の分離を改善する。これらの相の分離の改善は、油（水和性及び非水和性油の両方を含む）からより効率的なリン脂質の除去をもたらす。ある特徴では、この処理は、中性油（トリグリセリド）の取り込みがより少ないガム分画を生じ、それによって脱ガムプロセス時の全体的な油の収量を改善することができる。

30

【0197】

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼ、例えばPLC活性を有するポリペプチドを用いて、油、例えば植物油（粗油、例えば米ぬか、ダイズ、キャノーラ、ヒマワリなどを含む）を処理して（例えば脱ガムプロセスで）、ガムのかさを減少させ、さらに油の囲い込みを減少させることにより中性油の獲得を増加させる。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼ、例えばPLC活性を有するポリペプチドは、ジアシルグリセロール（DAG）の製造及び油相への提供のために用いられる。

本発明のホスホリパーゼは、例えばCA1102795（前記は、少なくとも50重量%の水を添加することによって穀類の脂質から極性脂質を単離する方法を記載している）に記載されているように酵素的脱ガムの工業的利用で用いることができる。前記方法は粗油混合物に水を添加する原理を用いるという意味で改変脱ガムである。

40

ある特徴では、本発明は、本発明のホスホリパーゼ（例えばPLC）の使用を含む酵素的な方法を提供し、前記方法は、油中の水和リン脂質を約20 から40 の温度で、アルカリ性pH（例えば約pH8からpH10）で約3から10分の反応時間を用いて加水分解することを含む。前記によって、10ppm未満の最終的な油中リンレベルを得ることができる。本発明はまた、本発明のホスホリパーゼ（例えばPLC）の使用を含む酵素的な方法を提供し、前記方法は、油中の水和性及び非水和性リン脂質を約50 から60 の温度で、中性よりわずかに低いpH（例えば約pH5からpH6.5）で約30から60分の反応時間を用いて加水分解することを含む。前記によって、10ppm未満の最終的な油中リンレベルを得ることができる。

50

【0198】

ある特徴では、本発明は、ホスホリパーゼC酵素を用いてグリセリルホスホエステル結合を加水分解し、それによってリン脂質のジアシルグリセリドを油（例えば植物油、魚油又は藻類の油）中に戻し（“ホスホリパーゼC（PLC）苛性アルカリ精製補助”）；さらに物理的に精製される高リン油としては十分に低レベルに、脱ガム工程におけるリン脂質含有量を減少させる（“ホスホリパーゼC（PLC）脱ガム補助”）ことができる酵素的方法を提供する。前記2つのアプローチは別個の価値をもたらし、さらに別個の標的に適用される。

本発明の種々の例示的方法では、それぞれ異なる多数の工程が、コア漂白に先行する脱ガムプロセス及び脱臭精製プロセスを含む。これらの工程は、加熱、混合、保持、分離及び乾燥を含む。加熱工程に続いて、水及びしばしば酸が添加及び混合され、不溶性リン脂質“ガム”がかためられて、分離可能な粒子になる。脱ガムに際して水はホスファチドの多くを分離させるが、一方、リン脂質の一部分は、カルシウム又はマグネシウム塩として存在する非水和性ホスファチド（NHP）である。脱ガムプロセスは、酸の添加によってこれらNHPに向けらる。リン脂質の水和に続いて、油を混合し保持しさらに遠心によって分離する。最後に、例えば図6に示されるように、油を乾燥させ保存し、輸送又は精製する。得られたガムはレシチン生成物としてさらに加工されるか、又はひきわりに戻される。

10

【0199】

本発明の種々の例示的方法では、リンのレベルは物理的精製にしては十分なレベルまで減少する。分離プロセスは、苛性アルカリ精製よりも潜在的に高い収量低下をもたらす。さらにまた、脱ガムプロセスは、商業的レシチンとして販売することができない廃棄生成物を生じる可能性がある（物理的精製油の例示的脱ガムプロセスのために、例えば図7を参照されたい）。したがって、これらのプロセスは市場で顕著なシェアを達成しておらず、苛性アルカリ精製は、米ぬか、ダイズ、キャノーラ及びヒマワリについては工業的に優位を保ち続けている。しかしながら、特殊な脱ガムプロセスで用いられるホスホリパーゼC酵素はガム形成を減少させ、リン脂質のジグリセリド部分を油に戻すことに留意されたい。

20

ある特徴では、本発明は、ガム形成で本発明のPLCを用いる方法を提供する。この方法のある特徴では、油が粗油に添加されて乳濁液を生成し、前記乳濁液はホスファチジルコリン、ホスファチジル-エタノールアミン及びホスファチジルイノシトールの水相（水脱ガム）への移動をもたらす。遠心の後で、これらのリン脂質は水性ガム分画の主要成分である。前記ガム分画のリン脂質は、ホスホリパーゼC又はホスホリパーゼD+ホスファターゼ（又は他の組合せ、下記に特記されている）で処理して、ジアシルグリセロール（DAG）及びリン酸エステルを生成することができる。この時点で、前記DAGは他のガム成分から抽出して、さらにDAGのエステル交換に適した条件下で処理して所望のトリアシルグリセロール（構造化（structured）脂質）を生成することができる。

30

【0200】

また別の特徴では、1,2-DAGの大半は、PLC反応に続いてガムのpHを増加させることによって（例えば苛性アルカリを添加することによって）、1,3-GAGに変換することができる。続いて前記1,3-DAGをガムから抽出し、1,3-DAGをエステル交換するために適した条件下でリパーゼと反応させて所望の構造化トリアシルグリセロールを生成することができる。

40

また別の特徴では、エステル交換反応で用いられる脂肪酸は、粗油で見出される遊離脂肪酸を含む多様な供給源からもたらされうるであろう。

ある特徴では、水脱ガムから得られるリン脂質を本発明のPLCと組み合わせて用い、構造化脂質が生成される。水で脱ガムした油を、PLC及び/又はPLD（いずれか一方又は両者が本発明の酵素でありうる）+ホスファターゼ又は前記の組合せの1つ、続いてPLA（本発明の酵素でありうる）に暴露して、苛性アルカリ精製又は物理的精製に適したレベルまでリンを減少させることができる。

また別の実施態様では、本発明の方法（これら脱ガムプロセスを含む）で用いることができる酵素の組合せは以下を含む（この場合、組合せ中の酵素の1つ、いくつか又は全て

50

が本発明の酵素を含む) :

- PLC + PI-PLC + PLA (PLAはPLC反応の完了後に添加される) ;
- PLD + ホスファターゼ + PI-PLC、続いてPLA ; 又は
- PLC又は (PLC + PI-PLC) + ホスファチジン酸に特異的なPLA (全ての酵素は一緒に添加されるか又は連続して添加される)。

【0201】

苛性アルカリ精製 : 本発明は苛性アルカリ精製でホスホリパーゼ (本発明の酵素を含む) を用いる方法を提供し、ここで前記酵素は苛性アルカリ精製補助剤として用いられる。また別の特徴では、PLC又はPLD及び/又はホスファターゼは、苛性アルカリ中和精製プロセス (連続精製又は回分精製のいずれか) の前、最中又は後のいずれかでドロップ-インとして前記方法で用いられる。添加される酵素の量はプロセスに応じて変動可能である。前記プロセスで用いられる水のレベルは低くてもよく、例えば約0.5から5%である。また別には、苛性アルカリは前記プロセスに何回も添加される。さらにまた、前記プロセスは種々の温度 (25 から 70) で、種々の酸又は苛性アルカリとともに、さらに多様なpH (4 - 12) で実施できる。ガムのかさを減少させるために、苛性アルカリの濃縮溶液 (例えば11%の工業的標準よりも濃縮されてある) を用いることができる。また別の特徴では、苛性アルカリの濃縮溶液は、約12%から50%濃縮、例えば20%、30%、40%、50%又は60%、又はそれよりも濃縮されている。

10

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼC酵素は、ホスファチドをグリセリルホスホエステル結合で加水分解して、ジグリセリド及び水溶性ホスフェート化合物を生成する。加水分解されたホスファチドは、図8に示したように水相へ移動し、ジグリセリドを油相に残す。PLC “ 苛性アルカリ精製補助 ” の1つの目的は、中和時に形成されたリン脂質ガムをジアシルグリセリド (前記は油相に戻るであろう) に変換することである。対照的に、“ PLC脱ガム補助 ” の1つの目的は、粗油中のリン脂質を百万分の10 (ppm) 未満のリン等価物に減少させることである。

20

【0202】

苛性アルカリ精製方法で用いられる酸にはリン酸、クエン酸、アスコルビン酸、硫酸、フマル酸、マレイン酸、塩酸及び/又は酢酸が含まれるが、ただしこれらに限定されない。酸を用いて非水和性リン脂質を加水分解する。用いることができる苛性アルカリにはKOH及びNaOHが含まれるが、ただしこれらに限定されない。苛性アルカリは遊離脂肪酸を中和するために用いられる。また別には、ホスホリパーゼ (またはより具体的にはPLC又はPLD) 及びホスファターゼは、ガム/ソープストックから植物ステリンを精製するために用いられる。

30

苛性アルカリ精製前にホスホリパーゼを添加する本発明のまた別の実施態様は、植物でホスホリパーゼを発現させることである。また別の実施態様では、ホスホリパーゼは、植物、種子又は植物の他の部分を破砕している間に添加される。また別には、ホスホリパーゼは破砕に続いて添加されるが、ただし精製前 (すなわち反応容器を保持しているとき) には添加されない。さらにまた、ホスホリパーゼは精製前処理として酸とともに又は酸を含まずに添加される。

本発明のまた別の実施態様は、既に述べたように、ホスホリパーゼを苛性アルカリ精製プロセスの最中に添加することである。この方法では、酸及び苛性アルカリのレベルは、リンレベル及び遊離脂肪酸レベルに応じて変動する。さらにまた、用いられる酵素のタイプに応じて、広い温度及びpH範囲が前記方法で用いられる。

40

本発明のまた別の実施態様では、ホスホリパーゼは苛性アルカリ精製後に添加される (図9)。ある事例では、ホスホリパーゼは、強力攪拌機中で又は保持攪拌機中で分離前に添加される。また別には、ホスホリパーゼは加熱工程に続いて添加される。また別の実施態様では、ホスホリパーゼは遠心工程で添加される。さらに別の実施態様では、ホスホリパーゼはソープストックに添加される。また別には、ホスホリパーゼは洗浄水に添加される。また別の事例では、ホスホリパーゼは漂白及び/又は脱臭工程時に添加される。

【0203】

50

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼ酵素（例えばホスホリパーゼC）は、中和させた粗油及び脱ガム油中の水和性及び非水和性リン脂質の両方に由来するホスファチドを、漂白及び脱臭前に加水分解する。本発明の例示的な“苛性アルカリ精製”方法は図9及び図13に示されている。図9は、固定攪拌機のための例示的時間、温度及びpH（30から60分、50から60、pH5から6）及び保持攪拌機のためのもの（3から10分、20から40）を含む。標的酵素は、図9に示すように、目下の苛性アルカリ中和プロセスでドロップ-イン生成物として適用することができる。この特徴では、酵素が苛性アルカリの添加後に添加される場合、前記酵素は極端なpHレベルに耐性であることは要求されないであろう。図13（酵素“フロントローディング”の例示的方法である）に示されているように、任意のホスホリパーゼ（例えば本発明のホスホリパーゼ、例えばPLC、PLB、PLA及び/又はPLCを含む）を粗油脱ガムプロセスで用いることができる（前記粗油脱ガムプロセスは例えば以下に記載されている：Bailey's Industrial Oil & Fat Products vol.4 (ed. Y.H. Hui)）。図14及び図15は本発明の方法の変型を示す。前記変型では、それぞれ2又は3遠心工程が前記方法で用いられ、前記変型は、図に示すように任意の油（例えば植物油、例えば不純大豆油）の加工に用いることができる。図15の例示的方法は、（苛性アルカリ精製後及び水洗浄前並びに水洗浄後の遠心工程に加えて）苛性アルカリ精製前に遠心工程を有し、一方、図14の例示的方法は、苛性アルカリ精製前には遠心工程をもたない。図16は、酸処理を用いさらに脱ガム工程前の遠心工程を有する、前記方法のまた別の例示的変型を示す。この例示的方法は、図に示すように任意の油（例えば植物油、例えば不純大豆油）の加工に用いることができる。

10

20

【0204】

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは、物理的精製で許容可能な低レベルまでリンを除去することを可能にする。ある特徴では、本発明のPLCは、粗油中の水和性及び非水和性リン脂質の両方に由来するホスファチドを漂白及び脱臭前に加水分解するであろう。標的酵素は、目下の脱ガム操作中にドロップ-イン生成物として適用することができる（例えば図10を参照されたい）。市販の装置で最適に達しない混合が与えられるならば、酸は、非水和性リン脂質を油/水の境界面で酵素と接触させることを要求されることは極めてありうることである。したがって、ある特徴では、本発明の酸安定性PLCが用いられる。

ある特徴では、本発明のPLC脱ガム補助は、表2に記載した1つまたは3つ全ての分野で損失を排除する。PLCプロセスに付随する損失は、ホスファチド除去による質量を基準にして5.2%に対して約0.8%と概算することができる。

30

【0205】

表2：PLC生成物によってもたらされる損失

		苛性アルカリ精製補助	脱ガム補助
1) ガム形成及び分離で失われる油	2.1%	X	X
2) 苛性アルカリ添加で鹸化される油	3.1%		X
3) 漂白時の粘土に捕捉される油*	<1.0%	X	X
全収量損失	~5.2%	~2.1%	~5.2%

40

【0206】

本発明のこのプロセスのさらに別の潜在的な利点には以下が含まれる：

- 吸着剤の削減：より少ない（<5ppm）リンでより少量の吸着剤が要求される、
- 化学物質使用量の削減：非水和性リン脂質の水和に伴う化学物質の削減及び加工コストの削減、
- 廃棄物生成の減少：油からリンを除去するために要求される水の減少。

本発明の方法によって加工される（例えば“脱ガムされる”）油には、植物の脂肪種子、例えば大豆油、菜種油、米ぬか油及びヒマワリ油が含まれる。ある特徴では、本発明の“PLC苛性アルカリ精製補助”は現在使用されている苛性アルカリ精製プロセスよりも1.2

50

%の節約になりうる。精製補助の利用は、レシチンのために脱ガムされた大豆油に向けられ、これらはまた価値/負担計算から除外されている。

本発明のプロセスの性能目標は、その適用、より具体的には酵素添加の時点にしたがって変動しうる（表3を参照されたい）。

【0207】

表3：適用による性能目標

	苛性アルカリ精製補助	脱ガム補助
投入油のリンレベル	<200ppm ¹⁾	600-1,400ppm
最終油のリンレベル	<10ppm ²⁾	<10ppm
水和性及び非水和性ガム	Yes	Yes
滞在時間	3-10分	30分 ³⁾
液体製剤	Yes	Yes
目標pH	8-10 ⁵⁾	5.0-5.5 ⁴⁾
目標温度	20-40℃	~50-60℃
水含有量	<5%	1-1.25%
酵素製剤純度	リパーゼ/プロテアーゼ無し	リパーゼ/プロテアーゼ無し
他の重要な要件	Feの除去	Feの除去

¹⁾ 水脱ガム油

²⁾ 目標レベルは上流の苛性アルカリ中和工程で達成されるが、維持される必要がある。

³⁾ 1-2時間存在する。

⁴⁾ 酸脱ガムはより強い酸性条件下で安定である酵素を必要とするであろう：5%のクエン酸の場合pH2.3（~Roehm USPN 6,001,640）。

⁵⁾ 中和された油のpHは中性ではない。POSでの検査では、pHは6.5-10のアルカリ性範囲にあることが示された（2002年12月9日）。典型的なpH範囲を決定する必要がある。

【0208】

本発明のホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼA₁）の場合に用いることができる他のプロセスは、固有の非水和性リン脂質を水和形に変換することができる。ある特徴では、酵素は熱に鋭敏である。これは、油の加熱が酵素を破壊するので好ましいかもしれない。しかしながら、脱ガム反応は、この酵素を受け入れるためにpH4-5及び60に調節されなければならない。300ユニット/kg油の飽和投与量で、この例示的プロセスは、以前に水で脱ガムした油のリン含有量を10ppm以下に下げること成功した。利点はH₂O含有量の減少並びに処理、操作及び廃棄物の排除でありうる。表4は、本発明の酵素を工業的に使用するための例示的な適用のリストである。

表4：例示的適用

	苛性アルカリ精製補助	脱ガム補助
大豆油の水/レシチン製造	X	
化学的精製大豆油、ヒマワリ油、キャノーラ油	X	X
低ホスファチド油（例えばパーム油）		X

これら種々の“脱ガム”プロセスの他に、本発明のホスホリパーゼは任意の植物油の加工工程で用いることができる。例えば、本発明のホスホリパーゼ酵素は、任意の植物油の加工工程でPLA（例えばホスホリパーゼA₂）の代わりに用いることができる。本発明の方法で“加工”又は“脱ガム”される油には、大豆油、菜種油、トウモロコシ油、ヤシの種子由来の油、キャノーラ油、ゴマ油、落花生油、米ぬか油などが含まれる。このプロセスの主生成物はトリグリセリドを含む。

【0209】

ある例示的プロセスでは、酵素を粗油に添加し反応させるとき、使用されるホスホリパ

ーゼの量は、粗油1kg当たり約10 - 10,000ユニット、また別には約100 - 2,000ユニットである。酵素処理は5分から10時間30 から90 の温度で、また別には約40 から70 で実施される。前記条件は酵素の最適温度にしたがって変動しうる。酵素を溶解させるために添加される水の量は、粗油100重量部に対して5 - 1000重量部、また別には粗油100重量部に対して約10 - 200重量部である。

そのような酵素処理の終了時に、酵素液を適切な手段（例えば遠心分離機）により分離して加工油を得る。そのようなプロセスで酵素組成物によって生成されたガム状物質のリン含有化合物は実際的には全てが水相に移動し、油相から除去される。酵素処理の終了時に、必要な場合には、加工油をさらに水又は有機若しくは無機酸（例えば酢酸、クエン酸、リン酸、コハク酸）、及び等価の酸又は塩溶液で洗浄することができる。

10

限外ろ過脱ガムのためのある例示的プロセスでは、酵素はフィルターに結合されるか、又は酵素はろ過前に油に添加されるか、又は酵素は周期的にフィルターを清浄にするために用いられる。

ホスホリパーゼ介在物理的精製補助のためのある例示的プロセスでは、水及び酵素は粗油（例えば不純植物油）に添加される。ある特徴では、本発明のPLC又はPLD並びにホスファターゼが前記プロセスで用いられる。ホスホリパーゼ介在物理的精製では、水のレベルは低くてもよく（すなわち0.5 - 5%）、さらに反応時間は短くあるべきである（2時間未満、又は60分未満、又は30分未満、又は15分未満、又は5分未満）。このプロセスは、種々の酸及び/又は苛性アルカリを用い、種々のpH（例えばpH3 - 10）で種々の温度（25 から70 ）で実施できる。

20

【0210】

また別の特徴では、水脱ガムは、先ず初めに遠心によってレシチンを採集し、続いて本発明のPLC又はPLCとPLAを添加して非水和性リン脂質を除去するために実施される（このプロセスは低い水分濃度で実施されるべきである）。また別の特徴では、粗油を水脱ガムで10ppm未満にし（食用油）、続いて物理的精製（バイオディーゼルの場合50ppm未満）が実施される。ある特徴では、乳化剤が添加され、及び/又は粗油は強力攪拌機に付されて混合が促進される。また別には、エマルジョン破壊剤が添加され、及び/又は粗油は加熱されて水相の分離が促進される。また別の特徴では、酸が添加されて非水和性リン脂質の水和が促進される。さらにまた、ガム/ソープストックから植物ステリンの精製を仲介するために、ホスホリパーゼを用いることができる。

30

ある特徴では、本発明は、ソープストックを生成することなく種々の量の酸及び塩基を用いることを含む、油の脱ガムのための組成物及び方法を提供する（前記は本発明のホスホリパーゼの使用を含むことができる）。本発明の油の脱ガムのためのこの特徴を用い、酸（リン酸及び/又はクエン酸を含む）は、高リン油（ダイズ、キャノーラ及びヒマワリを含む）中の非水和性リン脂質を加水分解するために用いることができる。いったんリン脂質が水和されたら、水相のpHを苛性アルカリの添加により上昇させることができる。添加される苛性アルカリの量は酵素活性に好ましいpHを作りだすことができるが、油中に顕著なソープストック分画の形成をもたらさないであろう。ソープストックが形成されないので、油中の遊離脂肪酸は下流で、脱ガム工程に続いて、漂白及び脱臭工程で除去することができる。

40

【0211】

本発明の酵素を用いて、油の抽出及び油の脱ガム（例えば植物油）を改善することができる。ある特徴では、本発明のPLC及び少なくとも1つの植物細胞壁分解物質（壁を軟化させ抽出での収量を高めるために例えばセルラーゼ、ヘミセルラーゼなど）が本発明のプロセスで用いられる。油の抽出及び油の脱ガムを改善するために本発明の酵素を用いるこの例示的アプローチでは、本発明のホスホリパーゼCが他のヒドロラーゼ（例えばセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ及び/又はホスファターゼ）と同様、油の製造（大豆油、キャノーラ油、ヒマワリ油、米ぬか油を含むが、ただしこれらに限定されない）に付随する破碎工程時に用いられる。溶媒抽出の前に、又は溶媒抽出の代わりに酵素を用いることによって、油の収量を増加させ、粗油中の水和性及び非水和性リン脂

50

質の量を減少させることが可能である。非水和性リン脂質の減少は、カルシウム又はマグネシウムによる複合体形成前の、潜在的に非水和性のリン脂質のジアシルグリセロール及び対応するリン酸エステルへの変換から生じるかもしれない。粗油中の全体的なリン脂質の減少は精製時の収量の改善をもたらし、このことは、漂白及び脱臭工程前の別個の脱ガム工程の必要性を排除する潜在性を秘めている。

ある特徴では、本発明は、本発明のホスホリパーゼ（例えば本発明のホスホリパーゼ特異的ホスホヒドロラーゼ）又は別のホスホリパーゼを改変“有機精製プロセス”（前記はクエン酸保持タンクへの酵素（例えばPLC）の添加を含むことができる）で用いるプロセスを提供する。

本発明の酵素は、任意の油加工方法（例えば脱ガム又は等価のプロセス）で用いることができる。例えば、本発明の酵素は、米国特許5,558,781号、5,264,367号、6,001,640号に記載されている方法で用いることができる。USPN 5,558,781号に記載されている方法は、ホスホリパーゼA1、A2又はBを用い、前記は、本質的には乳化剤として働く油中のレシチンを分解する。

10

【0212】

本発明の酵素及び方法は、大量の非水和性リンを含む食用油中のリン含有成分を減少させるプロセスで用いることができる。前記方法は、欧州特許EP0869167号に記載されているように、本発明のホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼA及び/又はB活性を有するポリペプチド）を使用することによって達成される。ある特徴では、前記食用油は粗油、いわゆる“非脱ガム油”である。ある特徴では、前記方法は、非脱ガム油（例えばナタネ、ダイズ、ゴマ、落花生、トウモロコシ、米ぬか又はヒマワリに由来する圧縮油若しくは抽出油又は前記の混合物を含む）を処理する。粗油中のホスファチド含有量は、200から1200ppmの範囲又は250から1200ppmの範囲のリン含有量に対応して0.5から3%w/wで変動しうる。ホスファチドとは別に、粗油はまた低濃度の炭水化物、糖化合物並びにCa、Mg及びFeの金属/ホスファチド酸複合体を含みうる。ある特徴では、前記方法は、本発明のホスホリパーゼによりリン脂質又はリゾリン脂質を処理して脂肪アシル基を加水分解することを含む。ある特徴では、前記リン脂質又はリゾリン脂質はレシチン又はリゾレシチンを含む。前記方法のある特徴では、食用油は約50から250ppmのリン含有量を含み、さらに前記方法は、本発明のホスホリパーゼにより油を処理してリン脂質の主要部分を加水分解し、加水分解されたリン脂質を含む水相を前記油から分離することを含む。ある特徴では、酵素的脱ガムプロセスの前に、油は水で脱ガムされる。ある特徴では、前記方法は、本発明のホスホリパーゼを飼料物質及び少なくとも1つのリン脂質と混合することを含む、動物飼料の製造を提供する。

20

30

【0213】

本発明の酵素及び方法は、例えばW098/18912に記載されたように油の脱ガムプロセスで用いることができる。本発明のホスホリパーゼは、食用油中のリン脂質の含有量を減少させるために用いることができる。前記方法は、本発明のホスホリパーゼで油を処理してリン脂質の主要部分を加水分解し、加水分解されたリン脂質を含む水相を前記油から分離することを含むことができる。このプロセスは、リン脂質を含む任意の食用油（例えば植物油（例えば大豆油、米ぬか油、菜種油及びヒマワリ油）、魚油、藻類及び動物の油など）の精製に適用することができる。酵素的処理の前に、前記植物油は、粘質物除去のために好ましくは（例えば湿潤精製により）前処理される。油は、ホスホリパーゼによる処理の開始時にリン脂質として、約50から250ppm、又は50から約1500ppm又はそれより多いリンを含み、本発明のプロセスは前記の値を約5から10ppmより低い値に減少させることができる。

40

本発明の酵素は、日本国特許出願H5-132283（1993年4月25日出願）に記載されたプロセスで用いることができる。前記は、油及び脂肪に存在するリン脂質をリン酸基を含む水溶性の物質に変換し、それらを水溶性物質として除去する工程を含む、油及び脂肪の精製プロセスを含む。酵素作用は水溶性物質への変換のために用いられる。前記酵素として、好ましくはホスホリパーゼC活性を有する酵素が用いられる。

50

本発明の酵素は、種子油の精製方法である、“有機精製プロセス”(ORP)(IPH, Omaha, NE)として記載されたプロセスで用いることができる。ORPは、伝統的な化学的精製と比較して、精製油の収量の改善、付加価値のある副産物、キャピタルコストの削減及び環境的経費の削減を含む利点を有しうる。

【0214】

本発明の酵素は、油又は脂肪(動物又は植物性、未加工、半加工又は精製)を処理するプロセスで用いることができる。前記プロセスは、例えばEP出願番号82870032.8に記載されたように、油中に含まれる非グリセリド化合物を加水分解及び/又は脱ポリマー化することを可能にする本発明の少なくとも1つの酵素を、前記のような油又は脂肪に添加することを含む。油中の非グリセリド化合物を加水分解及び/又は脱ポリマー化する本発明の例示的方法は以下のとおりである：

10

1) 少量の適切な溶媒(例えば水)に予め溶解した、本発明の酵素又は酵素複合物の油及び脂肪への添加及び混合。若干数の溶媒が可能であるが、ただし酵素にとって非毒性で適切な溶媒が選択される。前記添加は、連続的に付加するプロセスでも持続的プロセスと同様に実施しうる。本プロセスにしたがって油及び脂肪に添加される必要がある酵素は、酵素及び加工される生成物に応じて、約5から400ppm又は約20から400ppmの範囲(例えば1000kgの油又は脂肪に対して0.005kgから0.4kgの酵素)、及び好ましくは約5から100ppm(すなわち1000kgの油に対して0.005から0.1kgの酵素)の範囲でありうるが、これらの値は濃縮酵素についてであると理解される(すなわち希釈剤又は溶媒を含まない)。

2) 固相又は半固相支持体上の本発明の酵素の固定又は不溶性ろ過床に油又は脂肪を通過させる。前記支持体は好ましくは多孔性又は線維性構造を提示する。この技術では、酵素は前記支持体の多孔性又は線維性構造の極微空洞内に捕捉される。これらは、例えば樹脂又は合成ポリマー、セルロースカーボネート、ゲル(例えばアガロース)、ポリマー若しくは多孔性構造物とのコポリマーのフィラメントから成り、それらの空洞内の溶液中に酵素の小滴が捕捉される。酵素濃度に関しては、支持体の飽和まで高めることが可能である。

20

3) また別の特徴では、本発明の酵素の体積で約0.05から4%を含む、又は約0.2から4%を含む希釈酵素溶液中に、微小滴の形で油及び脂肪が分散される。この技術は、ベルギー特許595,219号に記載されている。高さが数メートルの円筒カラム(円錐形のふた付き)に希釈酵素溶液を満たす。この目的のために、毒性がなくさらに加工しようとする油又は脂肪に非混和性の溶媒(好ましくは水)が選択される。前記カラムの底に分配系を取り付ける(前記系に油又は脂肪が極端に分割された形態で(約10,000流速/m²)持続的に注入される)。したがって、無限数の油滴又は脂肪滴が形成され(前記はゆっくりと酵素溶液を上昇し、表面で合流する)、リアクターの円錐形のふたの最上部で持続的に排出される。

30

【0215】

パーム油は本発明の酵素による処理の前に前処理することができる。例えば、約30kgの未加工パーム油は+50 に加熱される。セルラーゼ及びペクチナーゼを用いて蒸留水で1%溶液を調製した。これらの各々の600gを前記油の水溶液に数分間強く攪拌しながら添加した。続いて穏やかに攪拌しながら総反応時間2時間の間、油を+50 に保持する。続いて温度を+90 に上昇させて酵素を不活化し、前記混合物をろ過及び更なる加工に備える。油を真空下で乾燥させ、ろ過補助装置(filtering aid)を用いてろ過する。

40

本発明の酵素は、欧州特許EP0,513,709B2に記載されたプロセスで用いることができる。例えば、本発明は、本発明のホスホリパーゼを用いて、酵素による分解によって動物油及び植物油中のリン含有成分を減少させるコンテンツプロセスを減少させるプロセスを提供する。また別の特徴では、リン含有量が50から1500ppm又は約50から250ppmの予め粘質物を除去した(predemucilaginated)動物又は植物油を有機カルボン酸とともに攪拌し、得られた混合物のpH値を約4からpH6に設定し、本発明のホスホリパーゼA₁、A₂又はBを含む酵素溶液を猛烈に攪拌して微細滴を形成させながら混合容器中で前記混合物に添加する。ここで、油に対して0.5から5重量%の乳濁液が形成され、前記乳濁液は、20 から80の範囲の温度で0.1から10時間の反応時間の間激しい運動下で、少なくとも1つの後続の反

50

応容器により処理され、さらに処理された油は、水溶液の分離後5ppm未満のリン含有量を有する。

前記有機精製プロセスは粗油及び脱ガム油の両方に適用することができる。前記プロセスは、プロセス制御条件下での有機酸のインライン添加を用い、通常の遠心分離が併用される。植物油のリン脂質（“VOP”）から自然に分離された水はリサイクルされ再使用される。使用される水の合計は、有機精製プロセスの結果として実質的に減少する。

【0216】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許6,162,623号に記載されたように、食用油の酵素的処理で用いることができる。この例示的方法では、本発明は、両親媒性酵素を提供する。両親媒性酵素は、例えば持続的疎水相を含む乳濁液及び酵素及び酵素のための担体を含む分散水相を提供し、さらに前記分散相が固体の酵素被覆粒子になるまでこの相から水を除去することによって固定される。前記酵素はリパーゼでありうる。前記固定リパーゼは、リパーゼによって触媒される反応（例えばモノ-、ジ-又はトリグリセリドのエステル交換、トリグリセリド油の脱酸、又はリパーゼがホスホリパーゼの場合はトリグリセリド油のリン脂質の除去）に用いることができる。前記水相は発酵液を含むことができ、食用トリグリセリド油は疎水相であってもよく、担体には糖、デンプン、水溶性セルロース誘導体及び発酵残留物が含まれる。この例示的方法は、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、グリセロール、リン脂質、糖脂質又は脂肪酸（前記は疎水相に存在することができる）の加工に用いることができる。ある特徴では、トリグリセリド油からリン脂質を除去するプロセスは、リン脂質を含むトリグリセリド油を本発明のホスホリパーゼを含む調製物と混合し、前記リン脂質をリゾリン脂質に加水分解し、前記加水分解されたリン脂質を前記油から分離する工程を含み、前記ホスホリパーゼは固定されたホスホリパーゼである。

10

20

【0217】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許6,127,137号に記載されたように、食用油の酵素的処理で用いることができる。この例示的方法は、完全なリン脂質中の両脂肪アシル基を加水分解する。この例示的方法で用いられる本発明のホスホリパーゼはリパーゼ活性をもたず、非常に低いpHで活性である。これらの特性によって、前記酵素は、油の酵素的加水分解及びアルカリ加水分解（鹼化）の両方が抑制されうるために油の脱ガムでの使用に非常に適切となる。ある特徴では、本発明は、リン脂質又はリゾリン脂質中の脂肪アシル基を加水分解するプロセスを提供する。前記プロセスは、リン脂質中の量脂肪アシル基を加水分解し、さらに本質的にリパーゼ活性を含まないホスホリパーゼでリン脂質及びリゾリン脂質を処理することを含む。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼは約50 の最適温度（pH3からpH4で10分間測定）、及び約pH3の最適pH（40 で約10分測定）を有する。ある特徴では、前記リン脂質及びリゾリン脂質はレシチン又はリゾレシチンを含む。ある特徴では、リン脂質の主要部分を加水分解した後、加水分解されたリン脂質を含む水相は油から分離される。ある特徴では、本発明は、食用油からリン脂質を除去するプロセスを提供する。前記プロセスは、本発明のホスホリパーゼの水溶液を分散させながら油をpH1.5から3で処理し、加水分解されたリン脂質を含む水相を油から分離することを含む。ある特徴では、前記油は、ホスホリパーゼによる処理の前に粘質物を除去するために処理される。ある特徴では、ホスホリパーゼ処理前の油は、50から250ppmのリンに相当する量のリン脂質を含む。ある特徴では、ホスホリパーゼによる処理は30 から45 で1から12時間、0.5から5%の水の存在下で0.1から10mg/Lのホスホリパーゼ用量で実施される。

30

40

【0218】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許6,025,171号に記載されたように、食用油の酵素的処理で用いることができる。この例示的方法では、本発明の酵素は、持続的な疎水相（例えばトリグリセリド油）を含む乳濁液、並びに両親媒性酵素（例えば本発明のリパーゼ又はホスホリパーゼ）及び水相に部分的に溶解され部分的に不溶である担体物質を含む分散水相を調製し、さらに前記分散相が固体の酵素被覆粒子になるまで

50

前記水相から水を除去することによって固定される。前記担体物質の不溶部分は、水及び油に不溶の物質でも、又は前記水相が既に水溶性物質で飽和されているために不溶形である水溶性物質でもよい。前記水相は、発酵残留物を含む不純なりパーゼ発酵液、及び担体物質として機能することができるバイオマスで構成され得る。固定りパーゼは、油のエステル再配置及び脱酸に有用である。反応後に、前記固定酵素は、水を添加し部分的に担体を溶解し、得られた酵素及び疎水相中に分散した担体含有水相の水を蒸発させて再び酵素被覆担体粒子を形成することによって再生させることができる。

【0219】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許6,143,545号に記載されたように、食用油の酵素的処理で用いることができる。この例示的方法は、大量の非水和性リン含量を含む食用油中のリン含有成分の含有量を、本発明のホスホリパーゼを用いて減少させるために用いられる。ある特徴では、以下のようにして測定された非水和性リン含量が、少なくとも50ppmである食用油でリン含有成分の含有量を減少させるために用いられる：水にクエン酸一水和物を含む溶液を30分添加することによって（油に対し添加される水は4.8重量％に等しい；（クエン酸）水相では=106mM、水/油では=4.6mM）、食用油を60 で前処理し；油の乳濁液中の前記前処理水の10mLを試験管に移し；沸騰水浴で30分間前記乳濁液を加熱し；5000rpmで10分遠心し、約8mLの上部（油）相を新しい試験管に移し、前記を24時間静置し；食用油中の非水和性リン含量（ppm）の測定のために上部の清澄な相から2gを抜き取る。前記方法はまた、約pH5 から8のpHで本発明のホスホリパーゼA又はB（例えばPLA1、PLA2又はPLB）の水溶液と油を接触させ（前記溶液は、前記油のリン含量が11ppm未満に減少するまで油中で乳化される）、続いて前記処理油から水相を分離することを含む。

10

20

【0220】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許5,532,163号に記載されたように、食用油の酵素的処理で用いることができる。本発明は、処理されるべき油及び脂肪中のリン脂質を効率的に分解及び除去することができる、油及び脂肪の精製プロセスを提供する。ある特徴では、本発明は、油及び脂肪を生成するプロセスであって、乳濁液中で油及び脂肪を本発明の酵素（例えばグリセロリン脂質のグリセロ-脂肪酸エステル結合を分解する活性を有する酵素、例えば本発明のPLA2）と反応させるプロセス；及び酵素処理油及び脂肪を水又は酸性水溶液で洗浄する別のプロセスを提供する。ある特徴では、洗浄工程で用いられるべき酸性水溶液は少なくとも1つの酸、例えばクエン酸、酢酸、リン酸及びその塩の溶液である。ある特徴では、乳化状態は、100重量部の油又は脂肪に対して30重量部又はそれ以上の水を用いて形成される。油及び脂肪を通常のアルカリ精製工程無しに精製することができるので、洗浄廃水及び産業廃棄物の発生を削減することができる、さらにまた、これら廃棄物への中性油及び脂肪の取り込みによる中性油及び脂肪の損失が本プロセスでは生じないので、油の回収収量が改善される。ある特徴では、本発明は、約100から10,000ppmのリン脂質を含む油及び脂肪を精製するプロセスを提供し、前記プロセスは、前記油および脂肪を乳化状態で、グリセロリン脂質のグリセロ-脂肪酸エステル結合を分解する活性を有する本発明の酵素と反応させることを含む。ある特徴では、本発明は、約100から10,000ppmのリン脂質を含む油及び脂肪を精製するプロセスを提供し、前記プロセスは、油および脂肪を乳化状態で、グリセロリン脂質のグリセロ-脂肪酸エステル結合を分解する活性を有する本発明の酵素と反応させ、その後、前記処理油及び脂肪を洗浄水で洗浄することを含む。

30

40

【0221】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許5,264,367号に記載されたように、食用油の酵素的処理で用いることができる。食用の植物油又は動物油、例えば油、例えば大豆油（前記は粘質物除去のために湿潤精製されていた）のリン含有成分の含有量及び鉄含有量は、酵素的分解によって減少する。前記は、本発明の酵素、例えばホスホリパーゼA1、A2又はBの水溶液と前記油を接触させ、続いて水相を前記処理油から分離することによって達成される。ある特徴では、本発明は、油（前記は粘質物を除去するため

50

に精製されている)のリン含有成分及び鉄含有成分の含有量を減少させる酵素的方法を提供する。これまで粘質物を除去するために精製されていた油は、本発明の酵素、例えばホスホリパーゼC、A1、A2又はBで処理することができる。5ppm未満のリン含有量及び1ppm未満の鉄含有量を達成することができる。低い鉄含有量は油の安定性に有益でありうる。

【0222】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許5,288,619号に記載されたように、エステル交換された油の調製に用いることができる。本発明は、超酸(trans-acid)の含有量が低くさらに鎖の長さが中等度の脂肪酸の含有量が低いマーガリン油を製造するために酵素的にエステル交換する方法を提供する。前記方法は、ステアリン酸供給物質及び食用の液状植物油を含むエステル交換反応混合物を提供する工程、前記ステアリン酸供給物質及び植物油を1-,3-位置特異的リパーゼを用いてエステル交換する工程、及び前記に続いて最終的に前記脂肪酸混合物に水素添加して、植物油とのリサイクル反応のためにステアリン酸供給物質のリサイクルを提供する工程を含む。本発明はまた、エステル交換油を製造するための向流方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：1-,3-位置特異的リパーゼを含むエステル交換反応ゾーンを提供し、前記エステル交換ゾーンに植物油を導入し、ステアリン酸供給物質を導入し、臨界超過ガス又は臨界未満液化ガス向流液を誘導し、前記反応ゾーン内でトリグリセリド流とステアリン酸又はステアリン酸モノエステル流とのエステル交換を実施し、エステル交換トリグリセリドマーガリン油流を回収し、向流液相を回収し、前記エステル交換ステアリン酸又はステアリン酸モノエステルに水素添加して水素添加されたステアリン酸供給物質のリサイクルを提供し、さらに前記リサイクル水素添加ステアリン酸供給物質を前記反応ゾーンに導入する。

【0223】

ある特徴では、本発明のホスホリパーゼCの適切な使用によって、高度に不飽和のリン脂質化合物をトリグリセリドに変換することができ、sn-3位のリン酸基を除去し、続いて1,3リパーゼアシルエステル合成が実施される。2-置換リン脂質を機能性食品成分として直接用いることができるが、または、続いて本発明の固定ホスホリパーゼCを用いてリアクター(160)で選択的に加水分解して、1-ジグリセリドを生成し、続いて本明細書に記載したように酵素的にエステル化して2-置換多不飽和脂肪酸成分を有するトリグリセリド生成物を生成してもよい。

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば米国特許6,001,640号に記載されたように、植物油の酵素的脱ガムプロセスで用いることができる。本発明のこの方法は、食用油の製造での脱ガム工程を含む。水和性ホスファチドが予め水性脱ガムプロセスによって除去されている植物油から、本発明のホスホリパーゼを用いた酵素処理によって非水和性ホスファチドが除去される。前記プロセスは、温和で、経済的で環境にやさしい。リゾレシチンのみを加水分解しレシチンを加水分解しないホスホリパーゼがこの脱ガムプロセスで用いられる。

ある特徴では、本発明の酵素を作用させるために、両方の相、油相及び酵素を含む水相が密接に混合される必要がある。それらを単に攪拌するだけでは充分でないかもしれない。酵素が少量の水(例えば油に対して0.5-5重量%)に溶解されこの形態で油中に乳化され、直径が10マイクロメートル未満(重量平均)の液滴を形成するならば、油中への酵素の良好な分散が促進される。前記液滴は1マイクロメートルよりも小さくありうる。猛烈な攪拌を100cm/秒を超える動径速度(radial velocity)で実施することができる。油はまた、外部ロータリーポンプを用いてリアクター内を循環させることができる。酵素を含む水相はまた、超音波の作用によって微細に分散させることができる。分散装置を用いてもよい。

【0224】

前記酵素反応は、おそらく油相と水相との間の境界面で生じる。酵素を含む水相に対して可能な最大表面を作り出すことがこれら全ての混合手段の目的である。界面活性剤の添加は水相のミクロ分散を増加させる。いくつかの事例では、したがって、9を超えるHLB値をもつ界面活性剤、例えばNa-ドデシル硫酸がEP-A 0513709に記載されているように酵素

溶液に添加される。乳化を改善するために同様に有効な方法はリゾレシチンの添加である。添加量は、油に対応して0.001%から1%の範囲に存在しうる。酵素処理中の温度は重大ではない。20 から80 の間の温度を用いることができるが、後者の温度は短時間のみ適用できる。この特徴では、良好な耐熱性及び/又は低pH耐性を有する本発明のホスホリパーゼが用いられる。30 から50 の間の温度が最適である。処理時間は温度に左右され、高い温度では処理時間は短くなりうる。0.1から10時間又は1から5時間が一般的には充分である。反応は脱ガムリアクター中で惹起され、例えばDE-A 4339556に記載されているように複数の段階に分けることができる。したがって、連続操作が回分操作に加えて可能である。反応は種々の温度段階で実施することができる。例えば、インキュベーションは40 で3時間、続いて60 で1時間実施することができる。反応を段階として進行させる場合は、これによって個々の段階で種々のpH値を調節できる可能性が広がる。例えば、第一段階では溶液のpHを例えば7に調節し、第二段階ではクエン酸を添加することによって2.5に調節することができる。しかしながら、少なくとも1つの段階で、酵素溶液のpHは4より下又は3より下でなければならない。pHを続いてこのレベルより下に調節した場合は、効果の低下が見出されるかもしれない。したがって、クエン酸は、酵素溶液が油に混合される前に酵素溶液に添加することができる。

10

【0225】

酵素処理の完了後に、前記酵素溶液は、その中に含まれるNHPの分解生成物とともに、油相から遠心の手段によってバッチとして又は連続的に分離することができる。前記酵素は高レベルの安定性を特徴とし、さらに前記溶液に含まれる分解生成物の量はわずかである（それらはスラッジとして沈殿するかもしれない）ので、同じ酵素水相を数回用いることができる。さらにまた酵素からスラッジを取り除き（例えばDE-A 4339556を参照されたい）、それによって本質的にスラッジを含まない酵素溶液を再び用いることができる。この脱ガムプロセスのある特徴では、15ppm未満のリンを含む油が得られる。ある目標は、10ppm未満、又は5ppm未満のリン含有量である。10ppm未満のリン含有量に関しては、蒸留脱酸プロセスにしたがって油をさらに加工することが極めて可能である。他の多数のイオン、例えばマグネシウム、カルシウム、亜鉛が鉄同様に油から例えば0.1ppm未満に除去することができる。したがって、この生成物は、更なる加工及び貯蔵時の良好な酸化耐性のための理想的な要件を保有する。

20

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば欧州特許EP0513709に記載されているように、リン含有成分の量を低下させるために用いることができる。この方法では、植物油及び動物油（予め粘質物が除去されている、例えば大豆油）のリン含有成分（本質的にはホスファチド、例えばレシチン）の含有量及び鉄含有量を、本発明のホスホリパーゼA1、A2又はBを用いて酵素的分解によって減少させる。

30

【0226】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えばJP06306386に記載されているように、脂肪又は油を精製するために用いることができる。本発明は、脂肪又は油中のリン脂質を水溶性のリン酸基含有物質に変換し、さらにこの物質を除去する工程を含む、脂肪又は油の精製プロセスを提供する。本発明の酵素（例えばPLC）の作用を利用して、リン脂質を前記物質に変換する。したがって、アルカリ性廃水及び大量の油を含む産業廃棄物を生じるアルカリ性精製工程を実施することなく、脂肪又は油を精製することが可能である。廃棄物中に逃げる中性脂肪又は油の損失を0に減少させることができるので、収量の改善を達成できる。ある特徴では、ホスホリパーゼC活性を有する本発明の酵素を粗油の脱ガム段階で添加し、酵素処理を実施することによって、ガム状物質は水溶性物質に変換され、水溶性物質として除去される。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼCは、リン脂質のグリセリンとリン酸のエステル結合を切断する活性を有する。必要な場合には、本方法は、酵素処理油を水又は酸性水溶液で洗浄することを含む。ある特徴では、本発明の酵素を粗油に添加し前記と反応させる。用いられるホスホリパーゼCの量は、粗油1kgにつき10から10,000ユニット又は約100から2,000ユニットでありうる。

40

【0227】

50

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば文献 (Albert J. Dijkstra et al. Oleagineux, Corps Gras, Lipides (1998), 5(5):367-370) に記載されているように、水脱ガムプロセスのために用いることができる。この例示的方法では、水脱ガムプロセスは、レシチン製造並びに脱ガム用酸及び漂白土を用いる乾燥脱ガムプロセスのために用いられる。本方法は、ホスファチド含有量が低い油、例えばパーム油、ラウリン油などのためにのみ経済的に有用でありうる。高NHP含有量を有する種子油の場合、酸精製プロセスが用いられ、前記により本プロセスはオイルミルで実施され、ひきわりとしてガムの廃棄が可能になる。ある特徴ではこの酸精製油は、物理的精製前に実施することができる、可能な“洗練 (polishing)” 操作である。

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば文献 (Dijkstra et al. Res. Dev. Dep. p., N.V. Vandemoortele Coord. Cent., Izegem, Belg. JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc. (1989), 66:1002-1009) に記載されているように、脱ガムプロセスのために用いることができる。この例示的方法では、全脱ガムプロセスは、酸 (例えば H_3PO_4 又はクエン酸) を大豆油に分散させ、接触時間を与え、続いて塩基 (例えば苛性ソーダ又は珪酸Na) を油中酸乳濁液に混合することを必要とする。これによって、中和の程度が石鹸の生成を回避するために充分低く保たれる (石鹸の生成は油の損失につながる)。続いて、油を遠心分離装置に通し、ここでガムの大半は油流から除去されて最小限の油含有量をもつガムが得られる。続いて、前記油流を第二の遠心分離装置に通して全ての残留ガムを除去して希薄ガム相 (前記は再循環される) を得る。全脱ガムプロセスの採用後に古典的アルカリ精製プロセスと比較したとき、全体的収量の約0.5%の改善が確認された。完全に脱ガムした油を続いてアルカリ精製して漂白及び脱臭するか、又は漂白して物理的精製を実施することができる。

【0228】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば文献 (Hvolby et al., Sojakagefabr., Copenhagen, Den., J. Amer. Oil Chem. Soc. (1971) 48:503-509) に記載されているように、植物油から非水和性リン脂質を除去するために用いることができる。この例示的方法では、水脱ガム油は、種々の固定pH値で緩衝溶液 (Ca^{++} 、Mg/Ca結合試薬及び界面活性剤を含む又は含まない) と混合される。非水和性リン脂質は非変換状態でミセルの成分又は混合乳濁液の成分として除去することができる。さらにまた、非水和性リン脂質は、解離形への変換によって、例えばホスファチドからMg及びCaを除去することによって取り除くことができる (前記除去は酸性化によって又はMg/Ca複合体形成試薬若しくはMg/Ca沈殿試薬による処理によって達成することができる)。非水和性リン脂質の除去又は前記の化学的変換は乳濁液形成の低下及び脱酸油の乳濁液層及びソープストックからの分離の改善をもたらす。

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば文献 (Buchold et al., Frankfurt/Main, Germany. Fett Wissenschaft Technologie (1993), 95(8):300-304) に記載されたように、植物油の脱ガムに用いることができる。食用植物油の脱ガムのための本発明のこの例示的プロセスでは、本発明の酵素 (例えばホスホリパーゼA2) の水性懸濁液を用いてリン脂質のsn2位に結合した脂肪酸が加水分解され、1-アシル-リゾリン脂質が生成される。前記は油に不溶性で、したがって物理的分離にいつそう適している。約700レシターゼユニット/kg油に相当する少量の添加でさえも、10ppm未満の残留P濃度が達成され、その結果、化学的精製は物理的精製で代用することができ、中和、ソープストックの分離及び廃水処理の必要性が省かれる。

【0229】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば文献 (EnzyMax, Klaus Dahlke, Dept. GPOD, Lurgi Oil-Gas, Chemie, GmbH, Frankfurt, Germany. Oleagineux, Corps Gras, Lipides (1977), 4(1):55-57) に記載されたように、植物油の脱ガムに用いることができる。この例示的プロセスは、ほぼ任意の種類の油の物理的精製のための脱ガムプロセスである。酵素触媒による加水分解によって、ホスファチドは、遠心によって油から分離される水溶性リゾホスファチドに変換される。酵素的に脱ガムされた油の残留リン含有量はP

が2ppmの低さである。

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば文献 (Cleenewerck et al., N.V.Vamo Mills, Izegen, Belg. Fett Wissenschaft Technologie (1992), 94:317-22; 及び Clausen, Kim; Nielsen, Munk. Novozymes A/S, Den. Danks Kemi (2002), 83(2):24-27) に記載されたように、植物油の脱ガムに用いることができる。本発明のホスホリパーゼ及び方法は、例えば文献 (Nilsson-Johansson, et al., Fats Oils Div., Alfa-Laval Food Eng. AB, Tumba, Swed. Fett Wissenschaft Technologie (1988), 90(11):447-51; 及び Munch, Ernst W. Cereol Deutschland GmbH, Mannheim, Germany. Editor(s): Wilson, Richard F. Proceedings of the World Conference on Oilseed Processing Utilization, Cancun, MX, Nov. 12-17, (2001), Meeting Date 2000, 17-20) に記載されたように、植物油の予備精製を取り入れることができる。

10

【0230】

本発明のホスホリパーゼ及び方法はまた、例えば文献 (Jerzewska et al., Inst. Przemyslu Miesnego i Tluszczowego, Warsaw, Pol., Tluszcz Jadalne (2001), 36(3/4):97-110) に記載されたように、植物油の脱ガムに用いることができる。本発明のこのプロセスでは、水和低エルカ酸菜種油の酵素的脱ガムは、本発明のホスホリパーゼA2の使用によって実施される。前記酵素は、リン脂質中のグリセロール部分の中心炭素原子との脂肪酸エステル結合の加水分解を触媒することができる。前記は、非水和性リン脂質を加水分解してそれらの対応する水和性リゾ化合物にすることができる。非精製酵素調製物を用い、2%調製物を4時間添加してより良好な結果を達成することができる (87%のPが除去される)。

20

油の脱ガムのための本発明のまた別の例示的プロセス (又は本発明の酵素を用いる油の脱ガムプロセス) では、酸性ポリマー (例えばアルギネート又はペクチン) が添加される。本発明のこの油の脱ガムプロセスでは、酸性ポリマー (例えばアルギン酸又はペクチン又はより可溶性の塩の形態) が、少量の水とともに (例えば約0.5から5%の範囲で) 粗油に添加される。この特徴では、酸性ポリマーは、粗油中のカルシウム及び/又はマグネシウムと結合することによって、リン脂質金属複合体を減少させ及び/又は破壊し、それによって非水和性リン脂質の可溶性を改善することができる。また別の特徴では、これらのリン脂質は油/水境界面に移動するか又は水相に入り、さらにジアシルグリセロールに変換され、対応する側鎖又は無傷のリン脂質はその後の遠心によって重い相の成分として除去されるであろう。水相中の酸性ポリマーの存在はまた、水相の密度を増加させ、油 (軽い) 相から重い相の分離を改善させる。

30

【0231】

油の脱ガムのための本発明のある例示的プロセス (又は本発明の酵素を用いる油の脱ガムプロセス) は、ジアシルグリセロール (DAG) を得るために脱臭方法を変更する。また別の特徴では、必要ならば又は所望されるならば、酵素利用 (enzyme-assisted) 脱ガムに続いて、脱臭条件 (温度、圧、蒸留装置の形態) を、ジアシルグリセロール/トリアシルグリセロール分画から遊離脂肪酸の分離を改善するという目標に合わせて改変するか、又はトリアシルグリセロール分画からジアシルグリセロールを分離するためにさらに改変することができる。これらの改変の結果として、本発明のこの方法を用い、もし本発明の酵素 (例えばホスファターゼ又はPLC又はPLCとホスファターゼの組合せ) が物理的精製プロセスで食用油の脱ガムに用いられるならば、食品級のFFA及びジアシルグリセロールを得ることができる。

40

種々の特徴では、本明細書に記載された本発明の方法の実施 (又は本発明の酵素の使用) は、例えば以下のような利点を有する: 溶媒及び溶媒回収の削減又は省略; キャピタルコストの削減; 下流の精製コストの削減、化学物質の使用、装置、工程時間、エネルギー (熱) 及び水の使用/廃水の発生量の減少; より高品質の油の製造; 連続圧搾機圧縮油のある種の料理及びソテーでの適用では精製しないで用いることができる (この圧縮油は優れた安定性、色及び臭いの特徴、並びに高いトコフェロール含有量を有する); より高品質のひきわりの生成; ひきわり中により低い脂肪含有量を生じる (従来の機械圧縮から得

50

られるひきわりは反芻動物で消化上の問題を引き起こす) ; 栄養的特性の改善をもたらす - グルコシノレート (glucosinolate)、タンニン、シナピン、フィッチン酸レベルの低下 (例えば以下の文献 (Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils, AOCS 1997) に記載されているとおり)。

【0232】

ある特徴では、本発明は、例えば米国特許6,172,248号、又は6,172,247号に記載されているように、植物油 (例えば大豆油、トウモロコシ油、パーム油、落花生油、菜種油、紅花油、ヒマワリの種子油、ゴマ種子油、米ぬか油、ココナッツ油又はキャノーラ油) 及び前記の副生成物を精製する方法、並びにレシチンを脱臭するプロセスを提供する。前記方法は、本発明の少なくとも1つの酵素 (例えば本発明のホスホリパーゼC) を使用することを含む。したがって、本発明は、本発明の少なくとも1つの酵素を含むレシチン及び植物油を提供する。例示的な有機酸精製プロセスでは、植物油は希薄な有機酸溶液と混合され、油中に前記酸溶液を微細に分散させるために高せん断に付される。得られた酸及び油の混合物は、水和不純物相に夾雑物を隔離するために十分な時間、低せん断で混合され精製植物油相を生成する。この例示的なプロセスでは、攪拌機又はリサイクル系 (例えばリサイクル水タンク) 及び/又はホスファチド若しくはレシチン貯蔵タンクを、例えば米国特許4,240,972号、4,049,686号、6,172,247号又は6,172,248号に記載されているように用いることができる。これらのプロセスは、回分プロセス又は連続プロセスとして実施することができる。粗又は脱ガム植物油は貯蔵タンクから (例えばポンプを介して) 供給することができ、さらに加熱することができる。精製されるべき植物油は粗油でも“脱ガム”油でもよい。

10

20

ある特徴では、本発明のホスファチジルイノシトール-PLC (PI-PLC) 酵素が植物油の脱ガムに用いられる。本発明のPI-PLC酵素は、植物油 (ダイズ、キャノーラ及びヒマワリを含む) の脱ガム時の油の収量を改善するために、単独で用いても又は他の酵素 (例えば本発明のPLC、PLD、ホスファターゼ酵素) と組み合わせて用いてもよい。PI-PLCはもっぱらホスファチジルイノシトールを1,2-ジアシルグリセロール (DAG) 及びホスホイノシトールに変換することができるが、前記はまた、他のリン脂質 (ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン又はホスファチジン酸又は前記の組合せに対する活性も示すことができる。収量における改善は、酵素処理植物油中のDAGの量の増加、及び中性油の増加 (植物油の酵素処理から生じるより小さなガム分画に取り込まれる油量の減少による) として確認されるであろう。

30

【0233】

脂肪種子の酵素による加工 : 本発明は、脂肪種子 (ダイズ、キャノーラ、ココナッツ、アボカド及びオリーブペーストを含む) を酵素により加工するための組成物 (例えば酵素) 及び方法を提供する。ある特徴では、本発明のこれらのプロセスは、油の収量の増加、及び獲られたひきわりの栄養的品質の改善を提供する。いくつかの特徴では、本発明の酵素及び方法を用いる脂肪種子の酵素による加工は、油の抽出並びに人間及び動物用加工食品のための技術とともに、経済的及び環境的利点を提供するであろう。また別の特徴では、本発明のプロセスは、本発明のホスホリパーゼ、他のホスホリパーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、フィターゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ (例えば -アミラーゼ)、グルカナーゼ (例えば -グルカナーゼ)、ポリガラクトツロナーゼ、ガラクトリパーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼ及び他の植物細胞壁分解酵素の他にも混合酵素調製物及び細胞溶解物の使用を含む。

40

また別の特徴では、本発明のプロセスは、他のプロセス、例えば酵素処理 (例えばカルボヒドラーゼ (セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、及び他の側鎖分解活性を含む) による)、又は化学的プロセス (例えば大豆油のヘキササン抽出) と併用して実施することができる。前記酵素処理は、酵素処理が溶媒抽出前に実施されるとき油の抽出能力を8 - 10% 高めることができる。

また別の特徴では、本発明のプロセスは水性抽出プロセスを用いて実施することができる。前記水性抽出方法は、環境的によりクリーンなまた別の油抽出技術でありうる。水性

50

抽出プロセスの低い抽出収量は、脂肪種子の細胞壁を形成する構造的な多糖類を加水分解する酵素、又は細胞及び脂質体膜を形成するタンパク質を加水分解する酵素を使用することによって、例えばダイズの細胞から油を抽出するためにセルラーゼ、ヘミセルラーゼ及び/又はプロトペクチナーゼを含む消化を利用することによって克服することができる。ある特徴では、複数の方法が、文献（Kasai (2003), J. Agric. Food Chem. 51:6217-6222）（前記著者は、細胞壁を消化するためにもっとも有効な酵素はセルラーゼであることを報告した）に記載されたように、本発明の酵素を用いて実施される。

【0234】

ある特徴では、プロテアーゼが本発明の方法と組み合わせて用いられる。作業変数並びにプロテアーゼ及びセルラーゼの酵素活性と他のプロセスパラメータ（例えば酵素濃度、加水分解時間、粒子サイズ及び固体対液体比）の油及びタンパク質抽出収量に対する組合せ効果が評価された。ある特徴では、複数の方法が、文献（Rosenthal (2001) Enzyme and Microb. Tech. 28:499-509）（前記著者は、プロテアーゼの使用は、加熱処理粉を用いたとき油及びタンパク質の収量は顕著に高めることができることを報告した）に記載されたように、本発明の酵素を用いて実施される。

ある特徴では、完全なタンパク質、ペクチン及びヘミセルロース抽出が本発明の方法と組み合わせて用いられる。植物細胞は、タンパク質又はフェノール化合物としばしば結合しているか又は前記によって置き換えられた一連の多糖類から成る。これらの炭水化物の大半は、消化酵素によっては部分的にしか消化されないか、又はほとんど利用されない。これらの構造をプロセッシング酵素又は分解酵素により破壊することによってそれらの栄養利用性が改善される。ある特徴では、複数の方法が、文献（Ouhida (2002) J. Agric. Food Chem. 50:1933-1938）（前記著者は、ダイズ細胞壁セルロースの顕著な分解（20%に達する）が完全なタンパク質、ペクチン及びヘミセルロース抽出後に達成されることを報告した）に記載されたように、本発明の酵素を用いて実施される。

【0235】

ある特徴では、本発明の方法はさらに、種子（例えばキャノーラ種子）の処理に種々の酵素処理を取り入れることを含み、これらの処理は、プロテアーゼ、セルラーゼ及びヘミセルラーゼ（前記を互いに、さらに本発明の1以上の酵素を種々組み合わせる）の使用を含む。例えば、前記方法は、例えば文献（Sosulski (1990), Proc. Can. Inst. Food Sci. Technol. 3:656）に記載されたように、通常のプロセスの前に酵素とのインキュベーション中に20から40モイスチャーでキャノーラ種子を酵素処理することを含むことができる。本発明の方法はさらに、例えば文献（McGlone (1986), J Food Sci. 51:695-697）に記載されたように、プロテアーゼ、 α -アミラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ（前記を互いに、さらに本発明の1以上の酵素と種々組み合わせる）を取り入れて、ココナッツのひきわり中の細胞性物質を加水分解しココナッツ油（前記は遠心によって回収することができる）を遊離させることを含むことができる。本発明の方法はさらに、例えば文献（Buenrostro (1986), Biotech. Letters 8(7):505-506）に記載されたように、種々の組合せのペクチナーゼ、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ（前記を互いに、さらに本発明の1以上の酵素と種々組み合わせる）を取り入れて、アボカド油の酵素抽出時に顕著な収量の改善（最善の事例では約70%）を得ることを含むことができる。オリーブ油の抽出のための本発明のプロセスでは、例えば文献（Montedoro (1976), Acta Vitamin. Enzymol. (Milano) 30:13）に記載されたように、オリーブペーストは、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ペクチン-メチルトランスフェラーゼ、プロテアーゼ及び前記の組合せ（前記を互いに、さらに本発明の1以上の酵素と種々組み合わせる）を用いて処理される。

【0236】

植物油から植物ステリンの精製：本発明は、植物油から植物ステリン及びトリテルペン又は植物ステロールを精製する方法を提供する。本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて精製することができる植物ステリンには、 α -シトステロール、キャンペステロール、スチグマステロール、スチグマスタノール、 β -シトスタノール、シトスタノール、デス

10

20

30

40

50

モステロール、カリナステロール、ポリフェラステロール、クリオナステロール及びブラシカステロールが含まれる。植物ステロールは、健康及び栄養産業のための重要な農産物である。したがって、本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、化粧品製造業者のための乳化剤並びにホルモン薬の製造のためのステロイド中間体及び前駆体が製造される。本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、心臓の健康維持に利点を有するコレステロール低下剤として使用される植物ステリンの類似体及びそれらのエステルが製造される。本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、腸管腔内のコレステロール吸収を阻害することによって血清コレステロールレベルを低下させることができる植物ステロールが精製される。本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、極めて低濃度で免疫調節特性（Tリンパ球の細胞性応答の強化及び癌細胞株に対するナチュラルキラー細胞の細胞障害性能力の強化を含む）を有する植物ステロールが精製される。本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、肺結核、慢性関節リウマチの治療、HIV感染患者の管理及び免疫侵襲の抑制（例えばマラソン走者の場合）に用いられる植物ステロールが精製される。

本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、商品食用油（例えばココナッツ、キャノーラ、カカオ脂、トウモロコシ、綿実、亜麻仁、オリーブ、パーム、落花生、米ぬか、紅花、ゴマ、ダイズ、ヒマワリ油）のステロール分画中に存在するステロール成分、例えばシトステロール（40.2 - 92.3%）、キャンベステロール（2.6 - 38.6%）、スチグマステロール（0 - 31%）及び5-アベンナステロール（1.5 - 29%）が精製される。

【0237】

本発明の方法は、脂肪種子の植物由来ステロールを、クロロホルム-メタノール、ヘキサン、メチレンクロリド又はアセトンによる溶媒抽出、続いて鹸化及び濃縮総ステロールを得るためのクロマトグラフィー精製の実施によって単離することを取り込むことができる。また別には、前記植物サンプルは、臨界超過二酸化炭素による臨界超過液抽出によって抽出して、ステロールを濃縮及び単離することができる総脂質抽出物を得ることができる。ステロール化合物のその後の性状決定及び定量のために、粗単離物を多様なクロマトグラフィー技術（カラムクロマトグラフィー（CC）、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー（TLC）、通常相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、逆相HPLC及びキャピラリー電気クロマトグラフィーを含む）によって精製し分離することができる。全てのクロマトグラフィー単離及び分離技術のうちで、CC及びTLC方法が、サンプルのクリーンアップ、精製、定性アッセイ及びテストサンプル中のステロールの予備的概算のためにもっとも利用しやすく、購入しやすく、さらに適切である。

植物ステリンは、食用油精製プロセス時に副生成物として失われる植物油中に失われる。本発明のホスホリパーゼ及び方法は、そのような副生成物から単離された植物ステリンを用いて、そのような副生成物から単離される植物ステリン濃縮生成物を製造する。本発明の植物ステリンの単離及び精製方法は、油加工工業の副生成物を取り入れることができ、例えば分子蒸留、液体-液体抽出及び結晶化のような操作を含むことができる。

本発明の方法は、脂質の抽出プロセスを取り入れ植物ステリンを抽出することができる。例えば、本発明の方法は、ヘキサン（ほとんどのタイプの植物油の抽出に一般的に用いられる）のような非極性溶媒を定量的に用いて、遊離植物ステリン及びフィトステリル脂肪酸エステルを抽出することができる。ステリルグリコシド及び脂肪-アシル化ステリルグリコシドはヘキサンで部分的にしか抽出されず、溶媒の極性の増加はより高いパーセンテージの抽出を提供する。用いることができるある方法は、全てのステロール脂質類（リン脂質を含む）の抽出のためのブライとダイヤー（Bligh & Dyer）クロロホルム-メタノール法である。植物ステリル脂質類の定性的分離及び定量的分析の両者のためのある例示的方法は、脂質抽出物のHPLC系への注入を含む。

【0238】

本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、例えば米国特許6,303,803号に記載されているように、脂肪及び油からステロールを除去することができる。前記は、ステロール含有脂肪及び油のステロール含有量を減少させる方法である。前記は、疎水性の流動二重層（例えばリン脂質二重層）を形成する両親媒性分子に対するコレステロール及び他のステ

ロールの親和性を基にした効果的で経費効率のよいプロセスである。例えばステロール含有脂肪又は油とリン脂質凝集物を水性環境で接触させ、続いて混合する。この凝集リン脂質混合物の分子構造はコレステロール及び他のステロールに対して高い親和性を有し、そのような分子を脂肪及び油から選択的に除去することができる。ステロールをリン脂質凝集物部分に分配することにより、脂肪／油の生産物中のステロール含有量を選択的に減少させるために十分な時間、水性分離混合物を混合する。前記ステロール減少脂肪又は油を前記水性分離混合物から分離する。また別に、ステロール濃縮分画もまた対応して水性分離混合物から単離することができる。これらの工程は周囲温度で実施することができ、加熱に必要な経費は最小限であり、生成物の熱による分解の可能性も最小限である。さらにまた、最少量の装置が要求され、全ての必要な材料は食品等級に属する物であるので、前記方法は、操作、廃棄物の廃棄又は最終生成物の汚染に関して特別な注意を必要としない。

10

【0239】

本発明のホスホリパーゼ及び方法を用いて、例えば米国特許5,880,300号に記載されているように、脂肪及び油からステロールを除去することができる。例えばステロール含有脂肪又は油とリン脂質凝集物を水性環境で接触させ、続いて混合する。適切な混合に続いて、前記ステロール減少脂肪又は油を前記水性分離混合物から分離する。また別に、ステロール濃縮分画もまた前記に対応して水性分離混合物から単離することができる。植物（例えば野菜の）油は、本発明の方法を用いて除去することができる植物ステロール（植物ステリン）を含む。この方法は、産業的プロセスのいずれの段階の脂肪／油生成物にも適用できる。例えば、本発明のプロセスは、精製、漂白及び脱臭された油（“RBD油”）に、又はRBD状態に到達する前の任意の加工段階に適用することができる。RBD油は前-RBD油と比較して改変密度を有しうるが、本発明の方法はRBD又は前-RBD油のどちらにも、又は種々の他の脂肪／油生成物にも、下記に記載するようにリン脂質の含有量、リン脂質の組成、リン脂質：水比、温度、圧、混合条件及び分離条件の変動によって容易に適合させることができる。

20

また別には、本発明の酵素及び方法を用いて、油の加工の中間工程で植物ステリン又は他のステロールを単離することができる。例えば、植物ステリンは植物油の脱臭中に失われることが知られている。例えば加工の中間段階のステロール含有蒸留液分画を上記に記載したステロール抽出方法に付すことができる。これは、ステロール濃縮レシチン、又は抽出ステロールを回収するためにさらに加工することができる他のリン脂質材料を提供する。

30

【0240】

洗剤組成物：本発明は、1以上の本発明のホスホリパーゼを含む洗剤組成物及びこれら組成物を製造及び使用する方法を提供する。本発明は、洗剤組成物を製造及び使用する全ての方法を取り入れる（例えば以下を参照されたい：米国特許6,413,928号；6,399,561号；6,380,147号）。前記洗剤組成物は、1つ及び2つの部分の水性組成物、非水性液状組成物、鑄造固体、顆粒形、粒子形、圧縮錠剤、ゲル及び／又はペースト並びにスラリー形でありうる。本発明はまた、これらの洗剤組成物を用いて、大きな食べ物の汚れ、食物残渣および他の食品組成物の小さな薄い層を迅速に除去することができる方法を提供する。本発明のホスホリパーゼは、リン脂質の触媒による加水分解によってシミの除去を促進することができる。本発明のホスホリパーゼは皿洗い洗剤として、織物の洗濯洗剤として用いることができる。

40

実際の活性酵素含有量は洗剤組成物の製造方法に左右されるが、洗剤溶液は所望の酵素活性を有すると考えられ、前記含有量は決定的な問題ではない。ある特徴では、最終溶液に存在するホスホリパーゼの量は、洗剤組成物1グラム当たり約0.001mgから0.5mgの範囲である。本発明のプロセス及び生成物で使用するために選択される具体的な酵素は、最終用途の条件（物理的な製品形態、使用pH、使用温度及び分解又は改変されるべき汚れのタイプを含む）に左右される。酵素は、最適活性及び与えられた任意の用途条件セットに対する安定性を提供するために選択することができる。ある特徴では、本発明のポリペプチ

50

ドは、約4から約12のpH範囲、及び約20 から約95 の温度範囲で活性を有する。本発明の洗剤は、陽イオン性、半極性非イオン性若しくは双性イオン性界面活性剤又は前記の組合せを含むことができる。

本発明のホスホリパーゼは、約0.01から約5重量%（好ましくは0.1から0.5重量%）のレベルで4.0から12.0の間のpHを有する粉末洗剤及び液体洗剤に製剤化することができる。これらの洗剤組成物はまた他の酵素、例えば公知のプロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ又はエンドグリコシダーゼとともにビルダー及び安定剤を含むことができる。通常の洗浄組成物への本発明のホスホリパーゼの添加は、特別ないかなる使用制限ももたらさない。換言すれば、洗剤に適したいずれの温度及びpHも、前記pHが上記範囲にある限り、さらに前記温度が記載の酵素の変性温度未満であるかぎり、本組成物に対してもまた適切である。さらにまた、本発明のポリペプチドは、洗剤を含まない洗浄組成物で用いることができ、くり返せば前記は単独でもビルダー及び安定剤と組み合わせてもよい。

10

【0241】

本発明は洗浄又は消毒組成物を提供し、前記は、硬質表面の洗浄及び/又は消毒のための洗剤及び/又は消毒組成物、織物の洗浄及び/又は消毒のための洗剤組成物、皿洗い組成物、口内洗浄組成物、歯磨き組成物、及び/又はコンタクトレンズ洗浄溶液を含む。

ある特徴では、本発明は対象物を洗浄する方法を提供し、前記方法は、本発明のホスホリパーゼと前記対象物を洗浄のために十分な時間接触させることを含む。本発明のホスホリパーゼは洗剤添加物として含有させることができる。本発明の洗剤組成物は、本発明のホスホリパーゼを含む、例えば手洗い又は機械洗浄洗剤組成物として製剤化することができる。汚染された織物の予備処理に適した洗濯添加剤は本発明のホスホリパーゼを含むことができる。繊維の柔軟剤組成物は本発明のホスホリパーゼを含むことができる。また別には、本発明のホスホリパーゼは、一般的な家事用硬質表面洗浄作業で使用される洗剤組成物として製剤化することができる。また別の特徴では、本発明の洗剤添加物及び洗剤組成物は、1以上の酵素、例えばプロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、また別のホスホリパーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、バクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、例えばラクターゼ、及び/又はペルオキシダーゼを含むことができる。本発明の酵素の特性は、選択される洗剤に適合するように（すなわち至適pH、他の酵素及び非酵素成分との適合性など）選択され、さらに前記酵素は有効量で存在する。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼ酵素は、悪臭物質を繊維から除去するために用いられる。種々の洗剤組成物及び前記を製造するために本発明の実施で用いることができる方法は、例えば米国特許6,333,301号、6,329,333号、6,326,341号、6,297,038号、6,309,871号、6,204,232号、6,197,070号、5,856,164号に記載されている。

20

30

【0242】

廃棄物処理：本発明のホスホリパーゼは廃棄物処理で用いることができる。ある特徴では、本発明は、本発明のホスホリパーゼを用いる固体廃棄物の消化プロセスを提供する。前記方法は実質的に未処理の固体廃棄物のかさ及び体積を減少させることを含む。固体廃棄物は、制御温度で酵素溶液（本発明のホスホリパーゼを含む）の存在下で酵素的消化により処理することができる。固体廃棄物は液化廃棄物及び任意の残渣固体廃棄物に変換することができる。生じた液化廃棄物は前記任意の残渣固体廃棄物から分離することができる。例えば米国特許5,709,796号を参照されたい。

40

【0243】

無毒化：ホスホリパーゼ（例えば本発明のPLC、パタチン）を、（例えば内毒素（例えばリポ多糖類（LPS）を含む組成物）の無毒化のために）無毒化プロセスで用いることができ、本発明は、少なくとも1つの本発明の酵素、例えば配列番号12（配列番号11によってコードされる）、配列番号14（配列番号13によってコードされる）、配列番号18（配列番号17によってコードされる）、配列番号26（配列番号25によってコードされる）、配列番号28（配列番号27によってコードされる）、配列番号34（配列番号33によってコードされる）、配列番号36（配列番号35によってコードされる）、配列番号44（配列番号43によっ

50

てコードされる)、配列番号46(配列番号45によってコードされる)、配列番号56(配列番号55によってコードされる)、配列番号60(配列番号59によってコードされる)、配列番号66(配列番号65によってコードされる)、配列番号72(配列番号71によってコードされる)、配列番号78(配列番号77によってコードされる)、配列番号87(配列番号86によってコードされる)、配列番号88(配列番号87によってコードされる)、配列番号92(配列番号91によってコードされる)、配列番号96(配列番号95によってコードされる)、配列番号100(配列番号99によってコードされる)、配列番号104(配列番号103によってコードされる)、配列番号126(配列番号125によってコードされる)、配列番号128(配列番号127によってコードされる)、配列番号132(配列番号131によってコードされる)、配列番号134(配列番号133によってコードされる)、配列番号136(配列番号135によってコードされる)、配列番号138(配列番号137によってコードされる)に示される配列を有するパタチンを用いる無毒化プロセスを提供する。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼを用いてリポ多糖類(LPS)が無毒化される。ある特徴では、この無毒化は脂質Aの2'及び/又は3'脂肪酸鎖の脱アシル化によって達成される。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼ(例えばPLC、パタチン)を用いて、脂質(例えば脂質A、例えば細菌の内毒素に由来する)の2'-ラウロイル及び/又は3'-ミリストイル鎖が加水分解される。ある特徴では、本発明のプロセスを用いて、内毒素、例えばグラム陰性細菌(例えば大腸菌)由来の毒素が破壊される。ある特徴では、本発明のホスホリパーゼ(例えばPLC、パタチン)を用いて、毒素中毒(例えば進行性グラム陰性菌感染に由来する)の作用を緩和するか、又は感染(例えば動物又は人での感染)時の内毒素の作用を予防する。したがって、本発明は、リポ多糖類(LPS)の毒性作用を軽減又は予防するために、本発明のホスホリパーゼ(例えばPLC、パタチン)を含む医薬組成物又は本発明のヒドロラーゼを用いる方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0244】

食品の加工：本発明のホスホリパーゼを用いて、食品を加工する(例えばそれらの安定性、保存期間、風味、手触りを変化させ、それらの栄養状態の改善等を行う)ことができる。例えばある特徴では、本発明のホスホリパーゼを用いて、食品の苦味を制御するために酸性リン脂質を生成する。

ある特徴では、本発明は、本発明のホスホリパーゼを用いてチーズの製造プロセスを提供する(したがって、本発明はまた、本発明のホスホリパーゼを含むチーズを提供する)。ある特徴では、本発明の酵素(例えばホスホリパーゼA、リゾホスホリパーゼ又は前記の組合せ)を用いて、風味の強化、収量の増加及び/又はチーズの“安定化”のために(例えば、“オイル-オフ”の傾向を減じることによって)チーズを加工する。又はある特徴では、本発明の酵素を用いて、チーズ乳からチーズを製造する。本発明のこれらのプロセスは、例えば米国特許6,551,635号及び6,399,121号、W003/070013、W000/054601に記載されている任意の方法又はプロトコルを取り入れることができる。例えばある特徴では、本発明のホスホリパーゼを用いて、牛乳又は乳含有組成物(例えばクリーム)中の脂肪乳濁液を安定化し、さらに前記ホスホリパーゼを用いて牛乳組成物を、例えばクリーム又はクリームリカーの製造のために安定化させる。ある特徴では、本発明は、少なくとも1つの本発明の酵素を用いてチーズの風味を強化するプロセスを提供する。前記プロセスは、例えばW099/66805に記載されているように、タンパク質、脂肪並びにプロテアーゼ及びリパーゼを、風味が強化されたチーズを製造する条件下で水性媒体中でインキュベートすることを含む。ある特徴では、例えば特許4,752,483号に記載されているように、本発明のホスホリパーゼを用い、プロテアーゼ及び(本発明の)リパーゼを高温(例えば約75 から95)で水と混合することによってチーズの風味が強化される。ある特徴では、例えば米国特許4,707,364号に記載されているように、本発明のホスホリパーゼを用い、チーズのエージングが加速される。前記は、牛乳に凝結剤を添加する前にチーズ(例えばチーズミルク)に本発明の酵素(例えばリパーゼ又はホスホリパーゼ)を添加するか、又は圧縮の前に凝乳に本発明の酵素を塩とともに添加することによって達成される。ある特徴では、本発明のリパーゼを用いて、牛乳の脂肪中のトリグリセリドを分解し、遊離脂肪酸を遊

離させて風味を強化する。プロテアーゼもまた、これらのプロセスのいずれにおいても用いることができる（例えば以下を参照されたい：Brindisi (2001) J. Food Sci. 66:1100-1107）。また別の特徴では、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ及び/又はプロテアーゼの組み合わせを、本発明のこれらのプロセス又は本発明の任意のプロセスで用いることができる。

ある特徴では、例えばW098/26057に記載されているように、本発明のホスホリパーゼを用いて、食品、例えば油（例えば高い非水和性リン含有量を有する植物油）中のリン成分の含有量を低下させる。

【0245】

本発明のホスホリパーゼのその他の使用：本発明のホスホリパーゼはまた、ホスホイノシチド（PI）シグナリング系の研究で；双極性障害の診断、予後及び治療の開発で（例えば以下を参照されたい：Pandey (2002) Neuropsychopharmacology 26:216-228）；抗酸化剤として；改変リン脂質として；起泡剤及びゲル化剤として；血管形成組織のための血管由来脂質の生成のために；抗腫瘍性、抗炎症性及び鎮痛剤としての使用を目的とするホスホリパーゼ、例えばPLA、PLB、PLC、PLD及び/又はパタチンモジュレーター（アゴニスト又はアンタゴニスト）（例えば阻害剤）の特定のために用いることができる。それらは、食品及び医薬品中の苦味を制御する酸性リン脂質を生成するために用いることができる。それらは、ウイルス性、炎症性、アレルギー性及び心脈管系疾患の治療のためのペプチド阻害剤の特定に用いることができる。それらは、ワクチンの製造に用いることができる。それらは、多不飽和脂肪酸グリセリド及びホスファチジルグリセロールの製造に用いることができる。 10 20

本発明のホスホリパーゼ、例えばPLA及びPLC酵素は、イムノトキシン及び抗癌治療のための種々の治療薬の作出に用いられる。

本発明のホスホリパーゼは、脱色（すなわち葉緑素除去）のための他の酵素と併用して、さらに洗剤中で（上記参照）、例えば他の酵素（例えばリパーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ホスファターゼ）と併用して用いることができる。例えば、PLCを用いる任意の事例において、PLD及びホスファターゼを組み合わせ用いて、PLC単独と同じ結果を得ることができる。

【0246】

以下の表は本発明のいくつかの例示的プロセス及び製剤の要約である：

30

本発明の例示的プロセス	目的
<u>PLC油脱ガムにおける化学物質の取り扱い</u> 酸不使用 苛性アルカリ不使用 酸及び苛性アルカリ使用の範囲（非過剰から過剰） 他のタイプの酸及び苛性アルカリ	化学物質の排除 化学物質の排除 化学物質削減/脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様
<u>PLC油脱ガムにおける水の影響</u> シリカゲルの使用 水分乾燥剤の使用 苛性アルカリ処理時の水分削減の影響 最小水分含有量（＜5%） 最大水分含有量（＞5%） PLC脱ガムにおける湿度プロファイル PLC脱ガムのための水分含有量に対する油の依存	水洗浄工程の代用 最終製品から水分の排除 最終製品から水分の排除 最終製品から水分の排除 プロセス代案 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様
<u>遊離脂肪酸（FFA）のin situ除去</u> FFAキレート剤の添加	脱ガムプロセスの代案実施態様；腐敗豆由来の油の状態を改善する
<u>PLC油脱ガムに対する混合形態の影響</u> 最小限の混合を用いるPLC脱ガム 初めにせん断混合、続い攪拌を用いるPLC脱ガム	混合により誘発される変性から酵素を保護、省エネルギー、 脱ガムプロセスの代案実施態様

10

20

<u>化学物質添加順序</u> 添加順序：酵素-水、続いて酸その後で苛性アルカリ	酸及び/又は苛性アルカリに暴露する前にPLCを作用させ、潜在的なpH又は金属キレーションによるPLC不活化を惹起させる	10
<u>温度及び時間のためのPLC油脱ガムプロセスの代案実施態様</u> 酵素処理工程（時間）：<60分、好ましくは<30分 酵素処理工程（温度）：50-70℃、 ことによると<50℃（例えばRT）	脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様	
<u>PLC油脱ガムの利点</u> 最小限のPL含有量によるソープストックの生成及び水溶性ホスフェートエステル中での濃縮 PLC使用によるガム中の中性油の減少 植物油中のDAG（例えば1,3-DAG）の増加をもたらすプロセス 健康上の利点のために他の油とともにDAG増加油を用いる利点 油中にPLC活性が残らない脱ガムプロセスの開発 油中に検出可能なPLCタンパク質が残らない脱ガムプロセスの開発 レシチンガム塊からDAGを精製する酵素の使用 PLCを特製油（PA、PI豊富）とともに使用 PA/PI特異的酵素（例えば596ES2/PI特異的）の使用 PA/PI特異的酵素（例えば596ES2/PI特異的）+PC/PE特異的酵素の使用；添加順序の影響 回分プロセス又は連続プロセス 更なる油の脱ガム操作のために再懸濁PLC処理ガムを使用 ガム中のDAG、FFA、P、金属、中性油の質量収支	脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 例示的な生成物の利点 脱ガムプロセスの代案実施態様/調節の改善 脱ガムプロセスの代案実施態様/調節の改善 例示的な生成物の利点 例示的な生成物の利点 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様	20
<u>その他</u> 押出し前に薄片化した脂肪種子の実にPLCを添加 小規模脱ガムアッセイ ガム質量を減少させるために他の酵素を使用（例えばPYROLASE(商標)酵素、クロロフィラーゼ、ペルオキシダーゼ、リパーゼ、ラッカーゼ、マンナーゼ、プロテアーゼ、ラクターゼ、アミラーゼなど、又は前記の組合せ） 油/ガム分離の良好な促進のために化合物を使用 PLC処理油のガムの硬化 ホスホリパーゼのグリコシル化/脱グリコシル化変種	プロセス代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様 脱ガムプロセスの代案実施態様	40

本発明の例示的製剤	目的
<p><u>安定性のための例示的液体製剤</u></p> <p>種々のpH及び温度範囲でPLCの安定性を増すために化合物を使用（ポリオール、塩、金属・・・）</p> <p>PLCのための疎水性デリバリー系を使用（リポソーム、精製油滴中の水和酵素）</p>	<p>最大のDAG生成のための酵素の安定性、おそらく基質特異性を変化させるか、又は1,3-DAG型へ生成物形成を誘導するため</p> <p>DAG生成、おそらく基質特異性を変化させるか、又は1,3-DAG型へ生成物形成を誘導するため</p>
<p><u>安定性のための固体製剤</u></p> <p>ホスホリパーゼ及び補酵素の安定のために種々のPLC、ホスホリパーゼ担体系（固定樹脂、多孔性マトリックス、ゲル、顆粒、散剤、錠剤、小胞/ミセル、被包化物、構造化液体など）を使用</p> <p>PLC製剤のために脱ガム廃棄物（ガム成分、種子外皮）を使用</p>	<p>酵素の安定化及び脱ガム後の油またはガム相からの酵素分離の容易さ；酵素調製物のリサイクル性；油加工中の酵素の物理的分離；PLCによるPI/PAの攻撃</p> <p>製剤成分のコスト削減、酵素と油の良好な混和性、酵素の熱安定性</p>
<p><u>活性上昇のための例示的製剤及びプロセス</u></p> <p>油中で酵素をより良好に分散させる化学物質又は酵素を使用（例えば発泡性マトリックスなど）</p> <p>更なる脱ガム反応のためにガム/酵素を再使用</p> <p>加水分解のためにPLの分断又は酵素捕捉を強化する製剤を使用</p> <p>異なるPL特異性をもつPLCを収納するために複数の製剤を使用</p> <p>あるPLCが異なる基質特異性をもつ別のPLC調製物中のある成分により不活化されるのを防止するために複数の製剤を使用</p> <p>あるPLCが別の酵素（ヒドロラーゼ、オキシダーゼ）の調製物中のある成分により不活化されるのを防止するために複数の製剤を使用</p> <p>正しいリズムで放出される苛性アルカリ添加剤のように間欠的苛性アルカリ添加を使用</p>	<p>より迅速な反応時間/脱ガムプロセス/化学物質使用の削減</p> <p>酵素のリサイクル性</p> <p>より迅速な反応時間/脱ガムプロセス/化学物質使用の削減</p> <p>プロセスの融通性；異なる酵素は別個の製剤を要求し、又はプロセスの別個の段階で添加することができる。</p> <p>マルチ酵素型の実施態様におけるPLC活性の保護</p> <p>マルチ酵素型の実施態様におけるPLC活性の保護</p> <p>混合により誘発される変性から酵素を保護する；省エネルギー</p>

10

20

30

40

50

【0248】

グリコシル化による酵素活性の不活化及び調節

本発明は、酵素又は他のタンパク質、例えば有害又は有毒酵素（この場合、前記酵素又はタンパク質は通常はグリコシル化されていない）を不活性又は活性が低いが再度活性化することができる形態で生成及び発現させる、組換え技術の使用を含む方法を提供する。前記方法は、1以上のグリコシル化部位（例えばN-結合又はO-結合グリコシル化）を生物学的活性を有する酵素（例えば本発明の酵素）又は他のタンパク質に、前記新規なグリコシル化部位を取り込んだコード配列を操作することによって添加し；前記変種コード配列を真核細胞で発現させるか、又は翻訳後グリコシル化の能力をもつ等価の操作された系又はin vitro系で発現させることを含む。例えば、3アミノ酸配列NXS/Tは真核細胞でのグリ

コシル化のための部位である（原核細胞はグリコシル化を行わない）。したがって、本発明は、少なくとも1つの3アミノ酸配列NXS/Tを前記タンパク質に付加し、それによって前記の活性を翻訳後グリコシル化により低下又は不活化する。

前記グリコシル化は、N-残基に付加された2分子のN-アセチルグルコサミン（NGlucNac）を生じうる。それに続く付加は生物特異的でありうる。ほとんどの種では、マンノース（Mann）糖が続いてNGlucNacに10から100の範囲のMann残基数で付加される。シアリン酸もまたいくつかの種で添加されうる。ピキア（Pichia）では、NGlucNacが付加された後で、10から25のMann残基を付加することができる。

【0249】

これらの方法は、任意の脱グリコシル化酵素又は酵素群（それらの多くは既に特定されているか又は市販されている）を用いることを含む。例えば、エンドグリコシダーゼHは最後のNGlucNacで切断し、N残基に結合したままの1つのNGlucNacを残す。PNGaseF酵素は全ての糖を切り離し、N残基のアミノ酸側鎖をヒドロキシル基に変換し、酵素内でアスパルテート（D）アミノ酸になるNアミノ酸を生じる。したがって、前記方法は、エンドグリコシダーゼH及び/又はPNGaseF又は等価の酵素をin vivo又はin vitroで用いて、前記操作された“一時的に不活化された”タンパク質を部分的又は完全に再活性化することを含む。

前記方法は、酵素がグリコシル化されるように、前記酵素又は他のポリペプチドを宿主の分泌経路に誘導することを含む。前記の新しいグリコシル化部位は、グリコシル化が前記酵素を不活化するか又はその活性を改変するように（例えば活性を低下させ又はそうでなければ活性を改変させるように）、例えば基質結合部位をブロックするように設計される。前記酵素は不活性であるか又は活性が低下しているので、有害又は有毒な酵素はより高レベルで発現させることが可能である。なぜならば、それらの活性の負の作用はもはや宿主細胞でどれほど多くの前記タンパク質が蓄積されうるかについての制限とならないからである。前記不活性なグリコシル化酵素は、例えば市販の脱グリコシル化酵素を用いて糖を除去することによって、例えばin vitroで糖を除去することによって、又はホールセル（whole cell）操作アプローチを用いて糖を除去することによって再度活性化することができる。

【0250】

ある特徴では、真核細胞グリコシル化標的部位（例えばNXS/T）が任意のタンパク質、例えば本発明の酵素に付加される。これによって、当業者は、前記タンパク質を真核細胞宿主で発現させ、宿主細胞の分泌経路に誘導することによって前記タンパク質をグリコシル化したとき、一時的に不活性なタンパク質に前記タンパク質が変換されることを予想して、問題のタンパク質にグリコシル化部位を付加することができる。

したがって、本発明は、通常は極めて有害又は有毒であり大量では宿主細胞が耐性をもたない酵素を生成する方法を提供する。前記作用は、活性酵素を必要とする更なる作業のために前記活性酵素を、脱グリコシル化によって、例えば翻訳後改変/脱グリコシル化によって再生させることができるので一過性でありうる。

ある特徴では、本発明は、以下の工程を含む、その活性がグリコシル化によって一時的に不活化される生物学的活性を有するタンパク質を生成及び発現させる方法を提供する：

（a）生物学的活性を有するタンパク質をコードする核酸を提供する工程（ここで前記タンパク質は通常はグリコシル化されていない）；（b）少なくとも1つのグリコシル化モチーフコード配列を前記タンパク質コード核酸に挿入する工程（ここで前記タンパク質のグリコシル化形は不活性である）；（c）標的配列をタンパク質に挿入し、それによって前記が宿主細胞の分泌経路に誘導させる工程（ここで前記宿主細胞はグリコシル化モチーフを認識し、前記タンパク質をグリコシル化することができる）；及び（d）前記改変核酸を前記宿主細胞で発現させる工程。ある特徴では、前記方法はさらに、前記発現されたタンパク質を脱グリコシル化し、それによって前記タンパク質、例えば酵素（例えば本発明の酵素）の活性を再活性化させることを含む。ある特徴では、前記宿主細胞は真核細胞である。ある特徴では、前記発現された不活化組換えタンパク質はin vitroで化学的又は酵

素的脱グリコシル化によって再活性化される。

【0251】

タンパク質を一時的に不活化するために1以上のグリコシル化モチーフの配置を決定することは、タンパク質コード核酸変種を作製する日常的な方法（例えばGSSM(商標)による）及び日常的なスクリーニングプロトコル（例えば活性又は結合アッセイ）を必要とするだけである。

その活性が宿主細胞にとって有害である酵素は、グリコシル化により不活性にされた。前記は不活性であるので、真核宿主細胞でより高レベルで蓄積されうる。前記は活性をもたないので、もはやその負の作用を表出することはできないであろう。EndoH又はPNGaseを用いる酵素の脱グリコシル化によって正常な活性が前記酵素で完全に再現されるので、有毒な酵素の不活化は一時的である。培養液に蓄積された大量のグリコシル化された不活性な酵素は、不活性な形態として前記に対して宿主が良好な耐性を示したことを示唆する。

10

本発明は、以下の実施例を参考にして更なる記述が提供されるが、しかしながら本発明はこれら実施例に制限されないことは理解されよう

【実施例1】

【0252】

実施例1：配列特定プロファイリングに用いられるBLASTプログラム

本実施例は、核酸が本発明の範囲内にあるか否かを決定するための例示的な配列同一性プログラムについて述べる。NCBI BLAST 2.2.2プログラムを使用し、規定値オプションはblastpである。規定値のフィルタリング設定を除いて全ての規定値を使用し（すなわち全てのパラメータはフィルタリングを除いて規定値に設定され、フィルタリングはOFFに設定される）、適切であれば“-F F”設定を用いる（前記はフィルタリングを無効にする）。規定値のフィルタリングはしばしば、配列の長さが短いためにKarlin-Altschulバイオリレーションを生じる。本実施例で用いられる規定値は以下のとおりである：

20

“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：Blosom62

>ギャップコスト：エグジスタンス：11

>エクステンション：1”

30

他の規定値設定は以下のとおりである：低コンプレキシティー用フィルターはOFF、タンパク質のためのワードサイズは3、BLOSUM62マトリックス、ギャップ存在のペナルティーは-11、およびギャップ伸長のペナルティーは-1。“-W”オプションは規定値0に設定される。これは、設定されなければワードサイズの規定値はタンパク質で3、ヌクレオチドで11であることを意味する。設定は以下の意味を有する：

README.bls.txt

>-----

>blastall arguments:

>

>-p プログラム名称 [String]

40

>-d データベース [String]

>規定値=nr

>-I クエリーファイル [File In]

>規定値=stdin

>-e 期待値(E) [Real]

>規定値=10.0

>-m アラインメントの見方についてのオプション：

>0=ペア毎

>1=クエリーに付けられて同一性を示す、

>2=クエリーに付けられて同一性無し、

50

- > 3 = フラットクエリーに付けられて同一性を示す、
- > 4 = フラットクエリーに付けられて同一性無し、
- > 5 = クエリーに付けられて同一性無し、及び平滑端
- > 6 = フラットクエリーに付けられて同一性無し、及び平滑端
- > 7 = XML Blast出力
- > 8 = 表示 (tabular)
- > 9 注釈付き表示 [Integer]
- > 規定値 = 0
- > -o Blastによる出力ファイルの報告 [File Out] オプション
- > 規定値 = stdout 10
- > -F クエリー配列のフィルター実施 (blastnによるDUST、その他によるSEG) [String]
- > 規定値 = T
- > -G ギャップを空けるためのコスト (0は規定値の動作を起こす) [Integer]
- > 規定値 = 0
- > -E ギャップを伸長させるためのコスト (0は規定値の動作を起こす) [Integer]
- > 規定値 = 0
- > -X ギャップのあるアラインメントのドロップオフ値 (ビットで) (0は規定値の動作 > を起こす) [Integer]
- > 規定値 = 0 20
- > -l デフライン (deflines) におけるGIを示す [T/F]
- > 規定値 = F
- > -q スクレオチドミスマッチのペナルティ (blastnのみ) [Integer]
- > 規定値 = 3
- > -r スクレオチドマッチの褒章 (blastnのみ) [Integer]
- > 規定値 = 1
- > -v (V) についてオンラインでの記述を示すデータベース配列の数 [Integer]
- > 規定値 = 500
- > -b (B) についてアラインメントを示すデータベース配列の数 [Integer]
- > 規定値 = 250 30
- > -f ヒット伸長のための閾値、0の場合は規定値 [Integer]
- > 規定値 = 0
- > -g ギャップのあるアラインメントの実施 (tblastxでは利用不可) [T/F]
- > 規定値 = T
- > -Q 使用されるクエリー遺伝暗号 [Integer]
- > 規定値 = 1
- > -D DB遺伝暗号 (tblast[nx]用のみ) [Integer]
- > 規定値 = 1
- > -a 使用されるプロセッサの数 [Integer]
- > 規定値 = 1 40
- > -O SeqAlignファイル [File Out] オプション
- > -J クエリーデフラインを信頼する [T/F]
- > 規定値 = F
- > -M マトリックス [String]
- > 規定値 = BLOSUM62
- > -W ワードサイズ、0の場合は規定値 [Integer]
- > 規定値 = 0
- > -z データベースの有効な長さ (現実のサイズについては0を使用) [String]
- > 規定値 = 0
- > -K 保持される領域の最大のヒット数 (規定値によりoffになる、使用する場合は 50

> 数値100が推奨される) [Integer]
 > 規定値 = 0
 > -P マルチヒット1-passのためには0、シングルヒット1-passのためには1、
 > 2-passのためには2 [Integer]
 > 規定値 = 0
 > -Y 検索スペースの有効な長さ (現実のサイズについては0を使用) [Real]
 > 規定値 = 0
 > -S データベースに対して検索されるべきクエリー鎖 (blast[nx]及びtblastx用)
 > 3は両方、1は上側、2は下側 [Integer]
 > 規定値 = 3
 > -T HTML出力を作成 [T/F]
 > 規定値 = F
 > -I GIのリストに対してデータベースの制限検索 [String] オプション
 > -U FASTA配列の小文字活字フィルタリングを使用 [T/F] オプション
 > 規定値 = F
 > -y blast伸長のためのビットで示されるドロップオフ (X) (0.0は規定値の動作を
 惹 > 起) [Real]
 > 規定値 = 0.0
 > -Z ギャップをもつ最後のアラインメントのためのXドロップオフ値 (ビット)
 > [Integer]
 > 規定値 = 0
 > -R RSI-TBLASTNチェックポイントファイル [File In] オプション
 > -n MegaBlast検索 [T/F]
 > 規定値 = F
 > -L クエリー配列上の位置) [String] オプション
 > -A マルチヒットウィンドウサイズ (シングルヒットアルゴリズムのためには0)
 > [Integer]
 > 規定値 = 40

10

20

【実施例2】

【0253】

30

実施例2：PLC介在脱ガムのシミュレーション

本実施例は、ホスホリパーゼC (PLC) 介在脱ガムのシミュレーションについて述べる。
 ホスファチジルコリン (PC) は水に難溶であるために、前記は最初エタノールに溶解された (100mg/mL)。最初のテストのために、50mMの3-モルフォリノプロパンスルホン酸又は60mMのクエン酸 / NaOH (pH6) 中のPCのストック溶液を調製した。前記PCストック溶液 (10μL、1μg/μL) をエッペンドルフ試験管中の500μLの精製大豆油 (水2%) に添加した。乳濁液を作製するために、前記試験管の内容物をヴォルテックス攪拌によって3分間混合した (図5A参照)。油相と水相を13,000rpmで1分間の遠心によって分離させた (図5B)。反応管を所望の温度 (37、50 又は60) で予備インキュベートし、バチルス・セレウス (Bacillus cereus) 由来のPLCの3μLを前記水相に添加した (図5C)。PCの消失は、溶媒系としてクロロホルム/メタノール/水 (65:25:4) を用いTLCによって分析し (例えば以下を参照されたい: Taguchi (1975) 上掲書)、I₂ 蒸気に暴露した後可視化した。

40

図5は、PLC介在脱ガムシミュレーションのための二相系モデルの模式図である。図5A: 夾雑ホスファチド (P) を水和するために水2%と粗油を混合することによって乳濁液を生成する。図5B: 油相と水相を遠心後に分離し、PLCを水相に添加する。前記水相は沈殿ホスファチド (“ガム”) を含む。PLC加水分解は水相で生じる。図5C: アリコットを水相から抜き取り、それらをTLCで分析することによって反応のタイムコースをモニターする。

【実施例3】

【0254】

50

実施例3：ホスホリパーゼの発現

本実施例は、複数のホスホリパーゼ（本発明の酵素を含む）を発現することができる本発明の市販用生産株の構築について述べる。食品等級の植物油（ダイズ、キャノーラ及びヒマワリ）の脱ガムに適したマルチ酵素製剤を製造するために、同じ発現宿主で別個の2つのホスホリパーゼ配列を発現する組換え発現株を作出することができる。例えば、前記株は、1以上のPLC遺伝子コピー及び1以上のホスファチジルイノシトール-PLC遺伝子コピーを含むように構築することができる。これらの遺伝子は、1つのプラスミド、複数のプラスミドに存在することができるが、又はこれらの遺伝子は発現宿主のゲノム中に相同性組換えにより挿入してもよい。前記遺伝子が相同性組換えにより導入されるときは、前記遺伝子は、両遺伝子の1以上のコピーを含むDNA発現カセットとして宿主ゲノムの単一部位に導入することができる。また別には、各遺伝子の1以上のコピーを宿主染色体の別個の部位に導入してもよい。これら2つの遺伝子配列の発現は1つのタイプのプロモーターによって駆動させてもよいが、また、各遺伝子配列はそれぞれ独立したプロモーターによって駆動させてもよい。各遺伝子のコピー数及びプロモーターのタイプに応じて、最終的な株は、種々の割合で各活性酵素型を発現するであろう。前記発現株は任意のパチルス（例えば*B. cereus*）又はストレプトミセス、大腸菌、*S. pombe*、*P. pastoris*、又は他のグラム陰性、グラム陽性若しくは酵母発現系を用いて構築することができる。

10

ある特徴では、本発明は大豆油の脱ガムのために二酵素系を提供する（前記では少なくとも1つの酵素は本発明の酵素である）。PLC+PI-PLCはどちらか1つの酵素のみよりも多くのDAGを生成する。とはいえ、両酵素は酵素無しのコントロールサンプルよりも多くのDAGを生成する。ある特徴では、反応条件は、1ミリリットルの大豆油、一切の添加の前に存在する約0.4%の初期水分、50℃、0.2%のクエン酸（2.75MのNaOHで中和される）、10UのPLC、15µLのPI-PLC（総タンパク質0.45mg）、総反応時間1時間である。図12は、本発明のこの二酵素脱ガム系から得られたデータを要約した表を示す。

20

また別の特徴では、本発明のPI-PLC酵素をPLCについて記載した同じ条件下で用いることができる。前記には植物油の化学的精製及び植物油の水脱ガムが含まれる。

【実施例4】

【0255】

実施例4：発現改善及びプロテアーゼ耐性改変ホスホリパーゼ

本発明は、グリコシル化作用をもつ宿主での発現が改善され、さらに分泌されたプロテアーゼに対する耐性が改変されたホスホリパーゼC変種（変異体）を選別する方法を提供する。

30

グリコシル化作用をもつ宿主での発現改善

アミノ酸コンセンサス配列（アスパラギン - 任意のアミノ酸 - セリン又はスレオニン（一文字アミノ酸コードではNXS/T））を有する潜在的なアスパラギン結合グリコシル化部位を、グリコシル化認識モチーフ中のアスパラギン又はセリン又はスレオニンを別個のアミノ酸に変化させて、前記配列がもはや潜在的なグリコシル化部位をコードしないように変化させる変異導入方法を用いてノックアウトした。グリコシル化部位（配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する本発明のホスホリパーゼC酵素（例えば配列番号1によってコードされる）のアミノ酸63、アミノ酸131及びアミノ酸134のアミノ酸位）の排除は下記に示すように実施した。前記グリコシル化部位の排除は、前記タンパク質が酵母ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）で異種発現されたときに、この変種（活性なホスホリパーゼC酵素、PLC、配列番号2）の発現を改善した。PLC酵素中の潜在的なグリコシル化部位の減少又は排除は、グリコシル化作用をもついずれの宿主においても活性なPLCの発現を改善することができる。したがって、本発明は、上記に記載したように、1つ若しくは2つ以上又は全てのグリコシル化部位が改変された本発明の例示的ホスホリパーゼのいずれかの配列を有するホスホリパーゼ酵素（及び前記をコードする核酸）を提供する。したがって、本発明は、宿主細胞での発現が高められた変種ホスホリパーゼコード配列を作製する方法を提供する。前記方法は、N-結合グリコシル化部位コードモチーフの1つ、いくつか又は全てが非グリコシル化モチーフに改変されるように本発明のホスホリパーゼコード配列

40

50

を改変することを含む。本発明はまた、本方法によって作製されたホスホリパーゼコード配列、及び前記がコードする酵素を提供する。

【0256】

プロテアーゼ耐性の改変

本発明は、プロテアーゼに対する耐性が増強されたホスホリパーゼをコードする変種ホスホリパーゼコード配列を作製する方法を提供する。前記方法は、配列番号2の131位に相当するアミノ酸を以下の残基の1つ、いくつか又は全てに改変することを含む：リシン（K）；セリン（S）；グリシン（G）；アルギニン（R）；グルタミン（Q）；アラニン（A）；イソロイシン（I）；ヒスチジン（H）；フェニルアラニン（F）；スレオニン（T）；メチオニン（M）；ロイシン（L）。前記ホスホリパーゼには、これら例示的改変を有する配列番号2に対する変種（及び前記をコードする核酸）が含まれる。本発明はまた、本方法によって作製される配列によってコードされる単離、合成又は組換えホスホリパーゼを提供する。本発明はまた、プロテアーゼに対する耐性が低下したホスホリパーゼをコードする変種ホスホリパーゼコード配列を作製する方法を提供する。前記方法は、配列番号2の131位に相当するアミノ酸を以下の残基の1つ、いくつか又は全てに改変することを含む：トリプトファン（W）；グルタメート（E）；チロシン（Y）。前記ホスホリパーゼには、これら例示的改変を有する配列番号2に対する変種（及び前記をコードする核酸）が含まれる。本発明はまた、本方法によって作製される配列によってコードされる単離、合成又は組換えホスホリパーゼを提供する。

10

【0257】

ピキア・パストリスが分泌する天然のプロテアーゼ混合物を含む上清を野生型及び変異PLC酵素調製物と混合しインキュベートする。反応を停止させ、プロテアーゼ無しの陰性コントロールに対して前記分解をSDS-PAGEによって可視化する。分解はまた残留PLC活性の測定によっても決定することができる。新規性は、グリコシル化をロックアウトする一定の変異によって、発酵時の分解に対する発現ホスホリパーゼの感受性の顕著な変化が観察されることに由来するものである。本方法の利点は、宿主生物によって分泌されるプロテアーゼに対する耐性が増強又は低下した変異体が、生産中に直接選別されることである。

20

本発明のこのプロセスは、位置特異的変異導入（例えばGSSM(商標)）を利用し、本発明のホスホリパーゼC酵素のアミノ酸配列、例えば下記に示されるように配列番号1によってコードされる配列番号2の部分配列を変化させることができる。下線（下記）で強調したアミノ酸の各々をアスパラギン（一文字コードではN）からアスパルテート（D）、セリン（S）又は下記に記載するように別のアミノ酸に変化させた。これらのアミノ酸は、下記配列のアミノ酸63、アミノ酸131及びアミノ酸134と称される（ここでトリプトファン（W）はアミノ酸1と称される）。これらの変異は、ピキア・パストリス発現系で発現されるタンパク質のグリコシル化を低下させることによって活性なホスホリパーゼCタンパク質の発現を増加させるために実施された。これらと同じ変異は、NXS/T系（Nはアスパラギン、Xは任意のアミノ酸、S/Tはセリン又はスレオニンである）にしたがってアスパラギンをグリコシル化する（N-結合グリコシル化）、他のいずれの発現系でも本発明のいずれの活性なホスホリパーゼCの発現も増強させることができる。したがって、本発明はまた、131位のアミノ酸を変化させることによって、発現されたホスホリパーゼCの感受性を改変する方法を提供する。

30

40

【0258】

配列番号2のアミノ酸39 - 286：

注記：改変位置を数えるために、最初のアミノ酸（W）を1位と数える。

WSAEDKHNEGINSHLWIVNRAIDIMSRNTTIVNPNETALLNEWRADLENGIYS
ADYENPPYDDSTYASHFYDPDTGTTYIPFAKHAKETGAKYFNLAGQAYQNN
DMQQAFFYLGLSLHYLGDVNQPMHAA\$FTDLSYPMGFH\$SKYENFVDTIKNN
YIVSDSNGYWNWKGANPEDWIEGA\$AAKQDYPGVVNDTTKDW\$FV\$KAAV
SQEYADKWRAEVPV\$TGKRLME\$AQRV\$TAGYIHLWFD\$TYVNR -

50

発現されたホスホリパーゼC変種を、下記に記載するようにP.パストリスのプロテアーゼの存在下でインキュベートし、以下の結果が得られた：配列番号2のアミノ酸131位の以下のアミノ酸は、P.パストリスプロテアーゼによる分解に対し発現されたホスホリパーゼCの耐性を増強させた：リシン（K）；セリン（S）；グリシン（G）；アルギニン（R）；グルタミン（Q）；アラニン（A）；イソロイシン（I）；ヒスチジン（H）；フェニルアラニン（F）；スレオニン（T）；メチオニン（M）；ロイシン（L）。配列番号2のアミノ酸131位の以下のアミノ酸は、P.パストリスプロテアーゼによる分解に対し発現されたホスホリパーゼの耐性を低下させた：トリプトファン（W）；グルタメート（E）；チロシン（Y）。したがって、本発明は、発現されたホスホリパーゼCのプロテアーゼによる分解に対する耐性を増加又は低下させようとする所望に応じて、これら改変のいずれか1つ、いくつか又は全てを有する変種ホスホリパーゼを提供する。本発明は、配列番号2の131位に相当する位置にこれら改変のいずれか1つ、いくつか又は全てを有する変種ホスホリパーゼを提供する。前記残基は配列番号2の131位に相当し、いずれの具体的なアミノ酸残基改変がプロテアーゼによる分解に対して酵素の耐性を増加又は低下させうるかは、当業界で周知のプロトコル、例えば下記に述べるようにホスホリパーゼC（配列番号2（配列番号1によってコードされる）のプロテアーゼ感受性を評価するために用いられる例示的アッセイ）によって日常的にかつ予測的に確認することができる：

10

【0259】

緩衝液：

- 1.0M MES、pH6.2；
- 0.7M 酢酸ナトリウム（“NaAc”）、pH5.2

20

チャレンジ：

- 別個の1.5mL極小遠心管を使用する；
- 25 μ LのPLC酵素サンプルに5 μ LのNaAc又は7 μ LのMES緩衝液を加え、混合する；
- 25 μ Lのプロテアーゼ含有ピキア・パストリス上清を加え、混合する；
- 2 μ Lの5%アジ化ナトリウムを加え、混合する；
- 加湿インキュベーターで予め加温した水のピーカー中の浮遊ラックに極小遠心管を静置する；
- コントロールはPLC + 緩衝液 + dH₂O及びピキア上清 + 緩衝液 + dH₂Oを含む；
- 0から24時間インキュベートし、所望の場合は複数のタイムポイントでサンプリングを実施する。

30

検出：

- サンプルを5mMのEDTAを含むサンプル緩衝液と1：2で混合し、100℃で4分加熱し、冷却し、遠心し、混合し、5 μ Lのサンプルを各レーンにロードし、クーマシー染色することによってSDS-PAGE上で可視化する；
- タイムポイントのサンプルはまた標準的PLC活性アッセイへ直接採取してもよい。

結果：SDS-PAGEゲルを泳動させ、結果は図17に示されている。図17はin vitroの消化実験を示し、この実験では、ホスホリパーゼC変種は粗プロテアーゼ抽出物中で37℃で22時間までインキュベートされた。各PLC変異体は、配列“DXD”（アミノ酸63位にアスパルテート アミノ酸131位に任意のアミノ酸 アミノ酸134位にアスパルテート）の“X”の位置に見出されるアミノ酸にしたがって命名される。前記ゲルは、粗プロテアーゼとのインキュベーション後の発現PLC変異タンパク質の安定性及び感受性を示す。安定な変異体は、“-”（コントロール、プロテアーゼ反応無し）及び“+”（反応はプロテアーゼを含む）で同様な染色強度のPLCバンドを示す。プロテアーゼに対しより感受性を有する変異体は、“-”レーンと比較して“=”レーンでPLCタンパク質バンド染色の強度の低下を示す。

40

【実施例5】

【0260】

実施例5：安定な高レベルPLC発現のためのプロセス

本発明は、酵母培養、例えばピキア・パストリス培養での安定で高レベルの発現及び高

50

い比活性のホスホリパーゼ、例えばPLCのための発酵プロセスを提供する。本方法によって生成された酵素を、例えば植物油精製（例えばダイズ、キャノーラ、ヒマワリ又は他の油）で用いることができる。

本発明は、g/L規模の回分培養として酵母細胞培養（例えばピキア・パストリス）で活性なホスホリパーゼ（例えばPLC）を製造することができるという特徴を含む製造方法を提供する。微生物培養における活性なPLCタンパク質の異種発現は、mg/L規模でのみ時折文献に報告された。本発明の方法は、とりわけピキア培養でのPLCタンパク質の発現はMeOH取り込み能力を障害するが、調べられた他の生理学的な増殖の特徴は障害されないという発見を基にしている。ピキア培養での通常の異種タンパク質発現とは対照的に、高い補助供給（co-feeding）速度（グルコース/又はグリセロール）が要求される。酵素産生の特徴の改善に加えて、より高い補助供給もまた全体的なプロテアーゼ活性の発現を低下させる（プロテアーゼ活性はPLC分解と相関性を有する）。さらにまた、貧弱なMeOH利用の特徴は、Mut⁺表現型に通常は付随する秤量性（scalability）への挑戦（したがって工業的規模では用いられない）に妥協することなく、Mut⁺表現型をもつピキア株でPLCを生産することによって克服することができ、それによって生産の特徴はさらに改善されうる。したがって、本発明の方法は、工業的規模のピキア系で通常適用される条件と比較して、活性なPLCの産生を>50倍（通常の方法を用いる100U/mLから>5000U/mL全ブロス）改善する。さらにまた、PLCは、適切な折りたたみ及び活性のために亜鉛の結合を必要とするメタロ-酵素であるので、ある特徴では、本発明は亜鉛の補給を含む。本発明の培養に対してこの亜鉛を補給する方法は、全ブロスとしてのPLC活性をほぼ完全（活性の低下は<5%）に安定させる（例えば4日>5日）。亜鉛補給は、以下の理由によりこの回収プロセスを顕著に支援する：1）不安定なタンパク質活性の産生は回収工程中ずっと悪化し続け、さらに2）亜鉛補給は、特に大規模でのより大きなプロセッシング融通性を可能にする。

10

20

30

40

50

【0261】

トリプトファニルアミノペプチダーゼマイクロプレートアッセイ：本発明はトリプトファニルアミノペプチダーゼマイクロプレートアッセイを提供する。前記アッセイは、ピキア発酵のタイムポイントサンプルにおける相対的なトリプトファニルアミノペプチダーゼ活性の決定のために開発された。このアッセイの処理能力は、多数の発酵の複数のタイムポイントでのサンプリングのために充分である。

材料と方法

緩衝液：

- 15mM のNaPO₄、2mMのMnCl₂、pH7.5水溶液

基質：

- HTrp-AMC (Bachem, I1670)

基質溶液：

- 基質をメタノールで10mMに溶解；
- 100μLの10mM基質を6mLの緩衝液に添加する。

サンプル：

- ピキア発酵のタイムポイント；
- 細胞除去のための遠心。

マイクロプレートの調製：

- 各サンプルレプリケート、ブランク及びリファレンスのために、黒色の96ウェルの各ウェルに90μL基質溶液を分注；
- 蛍光マイクロプレートリーダー（例えばSpectraMax, Molecular Dynamics）の台上にマイクロプレートを静置。

サンプル添加及び反応カイネティクス：

- Ex. 350nm/Em. 460nm；自動カットオフ（455nm）；PMT中；各ウェルに付き3回の読み取り；オートカリプレート“on”；
- RT；
- 0から30分のタイムコース；30秒毎に読み取り；

- 最初の読み取りの前に5秒間混合するために装置のプレートミックス機能を初期設定する；
- 96ウェルフォーマットにサンプルを分注し、マルチチャネルピペットを用いて各ウェルに10 μ Lのサンプルを移す；
- 蓋を取り除いたままで、マイクロプレートをマイクロプレートリーダーに戻す；
- 読み取りを開始する。

未知サンプルの固有の活性に応じて、サンプル希釈、アッセイ時間、及びカイネティックサンプリング（日常的スクリーニングによって決定することができる全ての変数）を変動させることが望ましい。

基質はこれらの条件下で非常に安定であることが示された。さらに陰性コントロールブランクは時間の経過中に吸収の増加を示してはならない。 10

【0262】

ボディピー-BSAプロテアーゼマイクロプレートアッセイ：本発明は、ピキアの発酵のタイムポイントサンプル中の全体的なプロテアーゼ活性の測定を支援するために、ボディピー（Bodipy）BSAプロテアーゼマイクロプレートアッセイを提供する。本アッセイの処理能力は、多数の発酵の複数のタイムポイントでのサンプリングのために充分である。

材料と方法

基質：

- DQ BSAグリーン（Molecular Probes, D12050）

基質溶液：

- 1本のバイアル中の基質内容物を0.1%のアジ化ナトリウムを含む1mLの水に溶解する。 20

サンプル：

- ピキア発酵のタイムポイント；
- 細胞除去のために遠心する。

陽性コントロール：

- 50mMの NaPO_4 （pH7.5）中の0.2mg/mLズブチリシン（Sigma, P5380）；
- 水で段階希釈する。

マイクロプレートの調製：

- 各サンプルレプリケート、ブランク及びリファレンスのために、黒色の96ウェルの各ウェルに90 μ L基質溶液を分注する。 30

サンプル添加及び反応：

- 96ウェルフォーマットにサンプルを分注し、マルチチャネルピペットを用いて各ウェルに10 μ Lのサンプルを移す；
- マイクロプレートの覆いを戻し、フویلで包み、37 °Cの加湿インキュベーターに静置し、3から4時間又は一晩インキュベートする。

蛍光測定：

- 蛍光マイクロプレートリーダーをセットアップする（SpectraMax）；
Ex. 495nm/Em. 525nm；自動カットオフ（455nm）；PMT低；各ウェルに付き3回の読み取り；オートカリプレート “on”；

RT

ボディピー-BSAは全体的なプロテアーゼ基質として選択された。ボディピー-BSAの加水分解の欠如はプロテアーゼが存在しないことを示すものではないが、前記はPLC酵素の加水分解及びPLC活性の低下と相関性を有することが示された。BSAは、ボディピー卵白アルブミン又はカゼインで代用されることが示された。

ある特徴では、前記活性は一時的及び一過性でありうるので、発酵のタイムコースの間ずっとプロテアーゼ活性の性状を調べることは有用である。

基質はこれらの条件下で非常に安定であることが示された。さらに陰性コントロールブランクは時間の経過中に吸収の増加を示してはならない。

【0263】

全培養ブロス又は上清中のPLC活性の測定：

10

20

30

40

50

本発明は、前培養ブロス又は上清におけるPLC活性の測定を提供する。前記は、例えば下記文献に記載された方法の改変である：Edward A. Dennis (1973) Kinetic dependence of phospholipase A2 activity on the detergent Triton X-100. J. Lipid Res. 14:152-159; USP 24/NF 19, Pancrealipase-Assay for lipase activity. Page 1256-1257。本発明のPLC活性測定アッセイは以下を含む：

溶液：

- 100mM硫酸亜鉛溶液
- 100mM塩化カルシウム溶液
- 基質溶液（20mMホスファチジルコリン、40mMトリトンX-100、5mM塩化カルシウム）
- 希釈緩衝液（0.1%トリトンX-100、1mM硫酸亜鉛、1%アラビアゴム）

10

アッセイ方法：

- 希釈緩衝液（1.0%アラビアゴム、1.0%トリトンX-100、1mM硫酸亜鉛、）を用いて、アッセイされるべきサンプルの希釈物を調製する。希釈物はアッセイの直前に氷冷緩衝液を用いて調製し、使用まで氷浴に保存する。
- 20mLの基質溶液を約50mLの容積をもつジャケット付きガラス容器に移す。前記容器の外側チャンバーは一定温度に制御された水浴につながっている。混合物に覆いをし、機械的攪拌装置を用いて持続的に攪拌する。混合物の温度を 37 ± 0.1 に維持しながら、前記覆いの開口部から挿入したマイクロピュレットから0.01NのKOH VSを用いて前記基質を予備タイトレートしてpHを7.3に調節し、続いて自動的に0.01NのKOH VSの添加を6分間継続してpHを7に維持する。

20

さらにまた、発酵培養の標準的なPAGEゲル電気泳動、ウェスタン及びノザンブロット分析とともに、オンライン/オフライン発酵パラメーター（バイオマスレベル、ガス分析など）のための標準的分析技術が用いられる。

【0264】

Mut⁺表現型のピキア株の作製：

本発明は、Mut⁺表現型をもつピキア株を用いることを含む、ホスホリパーゼC発現のための細胞、細胞系及び方法を提供する。前記方法は、異種PLC-コード核酸をピキア株に挿入することを含む。続いて細胞をPLCが発現される条件下で培養する。前記方法はさらに培養条件に亜鉛を補給することを含む。

ある特徴では、前記方法、細胞及び細胞系は配列番号2を使用し、配列番号2は亜鉛要求性メタロ酵素である。ある特徴では、亜鉛は3モル/モルで用いられる。前記はほぼ28kDaのMW及びほぼ52のPIを有し、さらに広い基質寛容性をもつ：PC>PE>PS>>PI。非プロセッシング酵素は24アミノ酸のシグナル配列、13アミノ酸のプロ配列及び245アミノ酸残基の“成熟”酵素を有する。

30

ある特徴では、本発明のMut⁺ピキア株は、アルコールオキシダーゼ遺伝子（A0X1及びA0X2）を2コピー有し、形質転換中に以下のように影響を受ける（“Mut”はメタノール利用（Methanol Utilization）を意味する）：

Mut⁺

- 単回のクロスオーバー事象、A0X1及びA0X2遺伝子は無傷である。
- メタノールだけで増殖及び発現する。補助供給可能。

40

Mut^s

- 二重クロスオーバー事象がA0X1遺伝子を破壊する。
- 増殖及び発現は補助供給により改善される。

Mut⁻

- 組換え事象がA0X1及び2遺伝子を破壊する。
- メタノールを代謝することができない。補助供給を要求する。

要約すれば、 $Mut^{-} < Mut^s_{plc} < Mut^{+}/Mut^s_{plc} < Mut^{+}$

Mut⁺とMut^sの間には発酵の違いが有り、前記には以下が含まれる：

- メタノールの最適誘発濃度
- 酸素消費速度

50

- より迅速な摂取能力のために、Mut⁺はMut^sより増殖が速い。
- 誘発後の遷移時間が容易
- Mut⁺は大規模の発現には用いられない。
 - 通気/冷却性能、メタノール感受性

ピキア・パストリスのメタノール利用経路は当分野では周知である。アルコールオキシダーゼ (AOX) はメタノールからホルムアルデヒドへの変換を触媒する。したがって、AOXが過剰に発現される場合、“酢漬け (pickled)” 酵母細胞を生じる。

本発明のある特徴で用いられるピキア・パストリスの例示的発酵プロトコルは以下を含む：

シード培養 (フラスコ又はタンク)：

- バイオマスを大きくするために富裕培地でのバッチ発酵

補給-バッチ発酵培養：

- バッチ相 (グリセロール)
 - 初期炭素供給源としてのバイオマス増殖が消費される。
- グルコース又はグリセロール補給相
 - D.O.含有量によって惹起されるフィード添加又はリニア/エクスponential供給
 - 誘発及び発現のために十分なバイオマスに増殖 (エタノールは存在しない、C-制限)

)

- メタノール誘発

- 制御 (D.O.%, メタノールセンサー、RQ) 又はプレセットフィーディングによるフィードの添加

- 表現型及び発現パラメーターにしたがってグルコース又はグリセロールの補助供給
- 1から3g/LのメタノールでMut⁺の誘発
- 4から7g/LのメタノールでMut^sの誘発

【0265】

図18は、グリセロールのみを用いる、上記で考察したバッチファーマンター培養の結果を示す。プロテアーゼ活性は、ピキアの内因性プロテアーゼ由来である。バッチ発酵はバイオマスを大きくするために富裕な培地でありうる。図18に注記したように、約69時間で開始するプロテアーゼ活性の漸進的増加は、PLC活性の漸進的低下と一致する。データを要約した下記の表が示すように、グリセロール (glyc) のより高い補助供給速度は、活性なPLCの発現を改善し、プロテアーゼ産生を低下させる (排除する)。

補助供給速度 (mL/分)	C-供給源 誘発前/後	誘発OD	PLC活性 (U/mL上清)	MeOH 消費 (L)	ボディピー プロテアーゼ	最終OD
0.5	Glyc/Glyc	250—300	100	1	Yes	450
1.5	Glyc/Glyc		1100	1.7	No	680
2	Glyc/Glyc		1550	1.3	No	860
2.5	Glyc/Glyc		1550	1.4	No	900
3	Glyc/Glyc		1715	1.4	No	820

これらの実験は、DSD-PLCを用いて30LのBBファーマンターで実施した。“全体的な培養状態 (overall culture health)” の指標又は良好な発現のための“バイオマーカー”としてのOUR又は酸素取り込み速度 (Oxygen Uptake Rate, “OUR”) を測定した。図19は、そのような実験結果、DSD-PLCを産生するP.パストリスMutSの30L培養OURプロフィルの比較の結果を示す (前記は、上記で考察したように1700U/mL、1100U/mL及び100U/mLのPLC、30、グリセロール補助供給を用いた)。

【0266】

図20は、上記で考察したように、グリセロールの補助供給下でのDSD-PLC産生 (pH6.2、PLC 1100U/mL及び100U/mL) 又は異種タンパク質産生P.パストリスMutSの30L培養におけるメタノール消費プロフィルの比較を示す。これはデマンド駆動 (demand-driven) MeOH供給

10

20

30

40

50

であり、残留メタノールレベルは4g/Lに制御された。

さらにまた、Mut⁺表現型は活性なPLC発現を改善し、さらにメタノール取り込みを強化した。このデータは下記の表に要約されている。

Mut	補助供給速度 (mL/分)	誘発OD	PLC活性 (U/mL上清)	MeOH 消費(L)	ボディピー プロテアーゼ	最終OD
S	0.5	250-300	100	1	Yes	450
	1.5		1100	1.7	No	680
	2		1550	1.3	No	860
	2.5		1550	1.4	No	900
	3		1715	1.4	No	820
+	0.5	250-300	1001	5.6	Yes	871
	0.5		1200	7	No	908
	1		1786	5.9	No	988
	1		2010	6.8	No	930
	1		1768	7.9	No	700
	1.5		2669	10	No	701
	1.5		2693	7.1	No	818
	1.5		2597	8.1	No	804
	2		2154	8.3	No	752

10

20

PLCは、このMut⁺表現型株の生理学的な増殖の特徴に影響を与えないように思われる（前記株は組換えPLC配列番号2を6Xのコピー数で発現する）。図21に示したデータは、図の説明に示されているようにOURプロファイルである。これは、サプライ駆動(supply-driven) MeOH供給であり、残留グルコース又はMeOHはMut⁺培養には存在しない。

【0267】

さらにまた、産生されたPLCタンパク質の品質は予想に反して変動し（例えば全PLCタンパク質の50% < < 又は > > が活性を有する（前記は図22にSDS-PAGEの結果の提示によって示されているとおりである）。OURプロファイル（上記で考察）データの要約グラフは、SDS-PAGEの図の上段に挿入されている。コントロールはJG（= 0.5 μL、1.6mg/mL）と称されている。プロテアーゼ又はアミノペプチダーゼ活性との相関性は存在しない。図23に示されているように（さらに実験プロトコルでも示されている）、顕著な量の活性なPLCは細胞内に存在していた。この場合、700U/mLを超えるPLCが細胞内で検出された（図23では、PLC（配列番号2）+アルファシグナルペプチド（サッカロミセス由来）+グリコシル化）。形態的变化は、図24に示されているように、活性なPLCの濃度と相関性を示した。形態的变化の規模は株及びC-供給源によって左右された。

30

亜鉛の増加は、下記の図表に要約されたように、2Xのコピー数を有するピキア株Mut+配列番号2（DSD変異をもつ）での発現を押し上げなかった（1Xを超える過剰は補助供給により供給された）（最初の上1列は空のベクターコントロールである）。亜鉛の増加は、全プロセスとしての貯蔵安定性（4で100時間を越えた後も同じ活性レベルであった）及び全体的なプロセスの厳しさを改善した。

40

Zn	MeOH (L)	塩基 (L)	70%(v/v) グリセロール(L)	OD600	PLC (U/mL)
1X(2.2mM)	7.1	2.3	9.6	765	0
0.2X	7.4	2.1	8.6	731	392
1X	7.1	2.8	9.0	776	2700
4X	6.1	2.2	10	780	2448
12X	6.4	2.3	9.8	776	2498

【0268】

図25は、ピキアでのTFT（総発酵時間、total fermentation time）95時間のPLC産生発

50

酵の状態を示すデータを要約したグラフである。グラフの右側の5本の棒線は、“Zeo株”又はPLC産生ピキア・パストリス株のゼオシン適応化から得た結果を示している。この株は、本発明のPLC（配列番号2）を異種遺伝子としてピキア・パストリス株で発現する抗生物質耐性無マーカー株である。この株を抗生物質ゼオシンに適応化させることによって、問題のタンパク質について極めて改善された発現レベルを有する新規な安定株を得ることができることが示された。

最初の抗生物質耐性無マーカー株、#1株（配列番号2を含む）を一連の希釈工程により各時点でゼオシン（抗生物質）の濃度を増加させながら増殖させた。各工程で、前の工程から得た培養の一部分について、600nmの光学密度（OD600）を新しい培養液で1.0に希釈し、ゼオシンの量を増加させて前記新しい培養にさらに24時間の増殖のために添加した。最終段階では、200 µg/mLのゼオシン濃度を用い、採集培養をMD/YPDプレートに画線接種して個々のコロニーを増殖させた。最終段階の培養から得られたコロニーはゼオシンに対して高い耐性を示し、一方親株はほとんど耐性を示さないことが判明した。それらのコロニーのうちの1つ、#2株（配列番号2を含む）は、最初のPLC株、#1株と比較して劇的なPLC発現改善（約70%上昇）を示した。さらにまた、#2株はゼオシン耐性及びPLC発現の両者について40代の継代後にも安定であることが示され、この新規株は高いPLC発現とゼオシン耐性の“永久的”属性を獲得したことを示唆した。

10

【0269】

高レベルのPLC活性が、本発明の“Zeo株”（ゼオシンピキア適応化）を用いて達成された（4100U/mLがミニタンクで達成された）。この結果は、6X 配列番号2を含むピキア株から得られた。簡単に記せば、この配列番号2発現株は、一連の工程（各工程はゼオシン濃度の増加を含む）で前記を増殖させることによって“適応化”された。明白に、この適応化プロセスはいくつかの変化（分子レベル又は遺伝子レベルで）を前記株/構築物に強制し、PLC活性レベルの顕著な改善をもたらした。例示的な結果は以下のとおりである：

20

- タンク1、2及び4（各々は異なるコロニーを表す）は全て、最初の予備適応化した配列番号2発現株より性能が優れていた。タンク1及び4は両タンクとも4100U/mLに達し、タンク2は3500U/mLに達した。

- タンク1及び4は75時間で3000U/mLを超え、最初の予備適応化配列番号2発現株（前記は通常同じ時間で2000U/mLよりはるかに低い）と比較してはるかに迅速な活性蓄積を示した。

30

【0270】

詳細な実験設計及び結果は以下のとおりである。

ゼオシン適応化の論理的根拠：

PLC発現のより初期段階の実験はピキアpPICZaベクター（前記はゼオシン耐性マーカーを含む）で実施された。したがって、ゼオシンは形質転換選別のために用いられた。それから後、我々は、市販用生成物候補を開発するために、低AMR型（AMR-less version）構築物に切り替えた。ミニタンク発酵を実施している間に、我々は、低AMR構築物を用いて顕著なPLC活性レベルの低下を観察した。すなわち、上清活性はpPICZa-DSD構築物で4000U/mLに達し、一方、2x DSDではほぼ2000U/mLしか得られなかった。顕著な生理学的な違い（例えばより低いメタノール消費速度及びはるかに多くの細胞溶解）もまた、特により高コピー数（5x、6x）構築物を同じ発酵プロトコルを用いて調べたときに低AMR構築物で観察された。

40

pPICZa構築物と低AMR構築物との間の明白な相違の1つは形質転換におけるゼオシンの使用であることから、どんな細胞がゼオシン選別を潜り抜けたのかという疑問が生じた。本発明は、ゼオシン存在下での低AMR構築物の増殖を提供する（前記細胞は続いてPLC発現にとって有利ないくつかの変化を潜り抜ける）。

【0271】

2x DSDによるゼオシン適応化実験：

実験では先ず初めに2x DSDが用いられた（前記はその時点では転移分子であったので）。1 µg/mLのゼオシン濃度（“zeo 1”）で実験を開始し、約24時間培養を増殖させた。そ

50

こからゼオシン濃度の zeo 5、zeo 10、zeo 15、zeo 20、zeo 40、zeo 60、zeo 80、zeo 100及び最後に zeo 200への段階的増加を実施した（zeo 100は形質転換選別のために通常用いられる）。各工程で新しい培養液を用い、その前の段階の培養を用いて次の段階の培養に1.0のODで接種し、約24時間増殖させた。各段階の培養はまた、保存のためにYPDプレートに画線接種して、個々のコロニーを得た。

【0272】

Zeo-適応化コロニーのミニタンク発酵の結果：

ゼオシン適応化の影響を調べるために、zeo 200及びzeo 100培養から12個ずつのコロニーを釣り上げ（前記はYPDプレートに画線接種された）、ミニタンクによりスクリーニングした。結果はスライド6に要約されている。我々は、最初の構築物（配列番号2を含むピキア株）よりも顕著に性能が優れたいくつかのコロニーを見つけることができた。とりわけ、zeo200培養から得たコロニー#5はPLC活性レベルについて約50%の改善を示した。スクリーニングでの観察は以下のとおりであった：

- zeo適応化培養と最初の配列番号2発現株との間で増殖プロファイルについて明白な相違は無かった。

- 適応化培養の安定性は徹底的に調べたわけではないが、それらは数回、YPD及び/又はMDプレートでゼオシンの非存在下で画線接種をくり返された。全ての発酵はまたゼオシンの非存在下で実施された。

- 増殖及びPLC発現の両方についてコロニー間で明白な多様性が存在した。

- 発酵に関するいくつかの技術的な問題が、この多様性の部分的な要因であるかもしれない。

【0273】

6x DSDのゼオシン適応化実験：

Zeo-適応化2x DSDの結果に力づけられて、続いて我々は、6x DSDで同じ実験を実施した（この時点では6x DSDは2x DSDより優れていると決定された）。我々は、5µg/mLのゼオシン濃度（“zeo5”）で開始し、培養を約24時間増殖させた。そこからゼオシン濃度のzeo15、zeo30、zeo50、zeo100及び最後にzeo 200への段階的増加を実施した。2x DSDの場合と同じように、各工程で新しい培養液を用い、その前の段階の培養を用いて次の段階の培養に1.0のODで接種し、約24時間増殖させた。各段階の培養はまた、保存のためにYPDプレートに画線接種して、個々のコロニーを得た。

【0274】

zeo-適応化6x DSDコロニーのミニタンク結果：

zeo 200培養（前記はYPDプレートに画線接種された）から6つのコロニーを釣り上げ、最初の配列番号2発現株と一緒にミニタンクで検査した。重要な観察は以下のとおりであった：

- 3つのコロニーは全て（タンク1、2及び4）、最初の配列番号2発現株より性能が優れており、タンク1及び4は両タンクとも4100U/mLに達し、タンク2は3500U/mLに達した。

- タンク1及び4は75時間で3000U/mLを超え、配列番号2発現株（前記は通常同じ時間で2000U/mLよりはるかに低い）と比較してはるかに迅速な活性蓄積を示した。

- PLCタンパク質レベルはまた、10Lタンクで稼働させた3000U/mLと比較してタンク1、2及び4で高いように思われる（スライド4参照）。したがって、見かけの比活性はタンク1、2及び4でより高いか否か、すなわち産生されたPLCが最初の配列番号2発現株とは相違しているか否かは明らかではない。

- コントロールのタンク7及び8はこの時点で3000U/mLに達しなかった。タンク1、2及び4がもっと高いレベルに達しうるか否かは明らかではない。パーセント増加（35%、4100U/mL対3000U/mL）は、2x適応化培養よりも小さいことに注目されたい。

- 6x DSDゼオシン適応化コロニーの発現スクリーニングの要旨は図26で見出される。最初の株で認められる最高の活性レベルは約3000U/mL（ミニタンク及び10Lタンク）であった。ゼオシン適応化6x DSDで達成されたレベルは4100U/mL（約35%増加）であった。図27は、上記で考察したように、PLCタンパク質レベルは、10Lタンク（及びタンク条件）で稼働

10

20

30

40

50

させた3000U/mLと比較してタンク1、2及び4で高いことを示すデータを提示している（ゲルローディングは5倍希釈のプロスで1.0 μ L、全プロスで0.2 μ Lであった）。図28は、zeo-適応化コロニー対コントロールの増殖比較を示す。ゼオシン適応化6x DSDコロニーは、最初の配列番号2発現株（6x DSD）と比較して類似の増殖プロファイルを有する。

【0275】

C-制限曝気酵母培養での分泌タンパク質のQpは、概して0.5 - 2.5mg/g.h⁻¹である（ μ = 0.10h⁻¹）。400mg/gDWのタンパク質含有量を基準にして、“代謝負荷”は全体的なタンパク質生産速度の10%未満である。PLCのmRNAレベルは高いスルーアウト発酵を維持し、発現と相関性を示さない。5g/L（150g）のPLCタンパク質を基準にして、合計5mol C/hのうちの0.1mol C/h未満（全C消費の約2%）がPLCの炭素になり、約25%がバイオマスになる。PLC活性は、これらの生産条件下では全般的な増殖の生理学的特徴に衝撃を与えないように思われる（ただしMeOH利用能力は影響を受ける）。

要約すれば、本発明は、異種タンパク質（例えば酵素、例えばPLC）を発現するゼオシン耐性酵母細胞系（例えば酵母細胞、細胞株及び/又は個々の細胞）を提供する。前記酵母細胞系は、異種核酸（例えば酵素コード配列；プロモータに機能的に連結されたORFを含むベクター）を含み異種タンパク質を発現することができるピキア種（例えばピキア・パストリス）細胞を提供する工程；前記細胞を開始濃度（いくつかの細胞を生存させるために十分に低い抗生物質耐性細胞を選別するために十分に高い濃度）のゼオシンを含む条件下で培養する工程；開始濃度のゼオシンに耐性をもつ細胞を選別し、より高い濃度のゼオシンを含む条件下で再培養する工程；及びより高濃度のゼオシンに耐性を有する細胞を選別する工程を含むプロセスによって作製される。本発明はまた、このプロセスによって作製された酵母細胞、細胞株及び/又は個々の細胞を提供する。日常的なスクリーニングによって、用いるべき抗生物質開始濃度、何回の選別が必要であるか又は所望される、及び選別ごとにどのくらい迅速に濃度を増加させるべきかを決定することができる。

【実施例6】

【0276】

実施例6：熱安定性PLC

本発明は熱安定性ホスホリパーゼ酵素を提供する。配列番号2に示される配列を有する例示的酵素の熱安定性が示された。本発明の互いに共通点を有するリン脂質の熱安定性が配列番号2を用いて示された。配列番号2の活性を2つの異なる系（水性及び油中系）で調べた。水性系では、代用基質（p-NPPC）を用いて活性を測定した。酵素は86 で失活し始めた。しかしながら、油中アッセイでは、酵素は、大豆油中に存在するPC及びPE基質の加水分解において85 で良好な活性を示した。同じ酵素のT_mをチェックし、前記は86C@15mg/mLであり、不可逆であることが判明した。

図29は、図に表示した条件下で配列番号2の10Uを用いた85 加熱実験の結果を示している。図30は、この加熱実験の要約NMRデータを示している。図31、32及び33は、図に示した条件下でp-NPPCを用いた場合の配列番号2の熱安定性の要約データを示している。図34は、15mg/mLの濃度の酵素及び86 のT_mを用いたときの配列番号2の熱安定性を示すDSC分析のデータである。

【0277】

以下の図面は本発明の実施態様の例示であり、特許請求の範囲で包含される本発明の範囲を制限しようとするものではない。

種々の図面中で同じ参照記号は同じ成分を示している。

【図面の簡単な説明】

【0278】

【図1】上記で詳細に説明したように、コンピュータシステムの組立図である。

【図2】上記で詳細に説明したように、新規なヌクレオチド又はタンパク質配列とデータベース配列を比較し、前記新規配列とデータベース配列との間の相同性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。

【図3】上記で詳細に説明したように、2つの配列が相同であるか否かを決定するコンピ

10

20

30

40

50

ュータプロセスの1つの実施態様を示す工程図である。

【図4】上記で詳細に説明したように、配列中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の1つの特徴を示す工程図である。

【図5】図5A、5B及び5Cは、上記実施例2で詳細に説明したように、PLC-仲介脱ガムのシミュレーションのためのモデル2-相系を模式的に示す。

【図6】本発明のホスホリパーゼを用いる例示的植物油精製プロセスの模式図である。

【図7】上記で詳細に考察したように、物理的に精製された油のための本発明の例示的脱ガムプロセスの模式図である。

【図8】上記で詳細に考察したように、本発明のホスホリパーゼCを用いるホスファチドの加水分解の模式図である。

【図9】上記で詳細に考察したように、本発明の例示的苛性アルカリ精製プロセスを模式的に示し、さらに“苛性アルカリ精製補助”(長時間混合苛性アルカリ精製)として本発明のホスホリパーゼCの利用を含むまた別の実施態様を示す。

【図10】上記で詳細に考察したように、脱ガム補助剤として本発明のホスホリパーゼCの利用を模式的に示す。

【図11】上記で詳細に説明したように、本発明の例示的核酸及びポリペプチドの選択された特徴を示す図表である。

【図12】上記実施例3で詳細に説明したように、本発明の2つの酵素系から得られたデータを模式的に示す。

【図13】上記で詳細に考察したように、本発明の例示的苛性アルカリ精製プロセスを模式的に示し、さらに“苛性アルカリ精製補助”(長時間混合苛性アルカリ精製)として本発明のホスホリパーゼCの利用を含むまた別の実施態様を示す。

【図14】上記で詳細に考察したように、2つの遠心工程がプロセス中で用いられる、本発明のまた別の变法を示す。

【図15】上記で詳細に考察したように、3つの遠心工程がプロセス中で用いられる、本発明のまた別の变法を示す。

【図16】上記で詳細に考察したように、脱ガム工程の前に酸処理及び遠心工程を用いる本プロセスのまた別の例示的变法を示す。

【図17】上記実施例4で詳細に考察したように、本発明のホスホリパーゼC変種を用いる *in vitro* 消化実験の結果を示す。

【図18】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明の例示的酵素を用いるファーマンターバッチ培養の結果を示す。

【図19】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明のP.パストリスMutS株培養の酸素取り込み速度(Oxygen Uptake Rate; “OUR”)比較の結果を示す。

【図20】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明のP.パストリスMutS株におけるメタノール消費プロフィルを示す。

【図21】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明の配列番号2の例示的PLC酵素の組換え型の培養における“OUR”プロフィルを示す。

【図22】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明の配列番号2の例示的PLC酵素の組換え型の培養で生成されたPLCタンパク質の品質を示すSDS-PAGEの結果、及び前記培養における対応するOURプロフィルを示す。

【図23】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明の配列番号2の例示的PLC酵素の組換え型の培養で、細胞内に存在する活性なPLCの品質を示すSDS-PAGEの結果を示す。

【図24】上記実施例5で詳細に考察したように、活性なPLC、本発明の配列番号2の例示的PLC酵素の組換え型に付随する酵母細胞における形態学的変化の視覚化を示す。

【図25】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明の配列番号2の例示的PLC酵素を用いた、ピキアにおける95時間TFT(総発酵時間、total fermentation time)でのPLC産生能力の状態を示すデータを要約したグラフである。

【図26】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明の例示的ゼオシン適応化細胞コロニーの発現スクリーニングのデータを要約した表である。

10

20

30

40

50

【図 27】上記実施例5で詳細に考察したように、PLCタンパク質レベルは、本発明の例示的ゼオシン適応化細胞コロニーを含む培養で高いことを示すデータである。

【図 28】上記実施例5で詳細に考察したように、本発明のzeo-適応化コロニーとコントロールとの増殖の比較を示すデータである。

【図 29】上記実施例6で詳細に考察したように、本発明の配列番号2の例示的酵素の熱安定性を示す加熱実験（図中に表示の条件を用いた）の結果を示す。

【図 30】上記実施例6で詳細に考察したように、本発明の配列番号2の例示的酵素の熱安定性を示す加熱実験を要約したNMRデータを示す。

【図 31】上記実施例6で詳細に考察したように、p-NPPCを用いた図中表示条件での配列番号2の熱安定性を示すデータである。

【図 32】上記実施例6で詳細に考察したように、p-NPPCを用いた図中表示条件での配列番号2の熱安定性を示すデータである。

【図 33】上記実施例6で詳細に考察したように、p-NPPCを用いた図中表示条件での配列番号2の熱安定性を示すデータである。

【図 34】上記実施例6で詳細に考察したように、DSC分析を用いた、配列番号2の熱安定性を示すデータである。

10

【図 1】

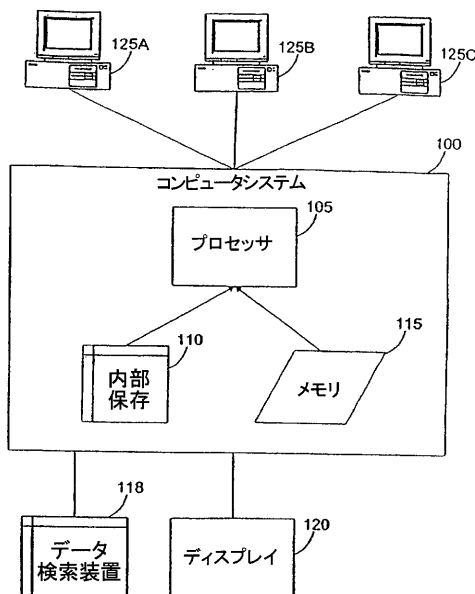


FIGURE 1

【図 2】

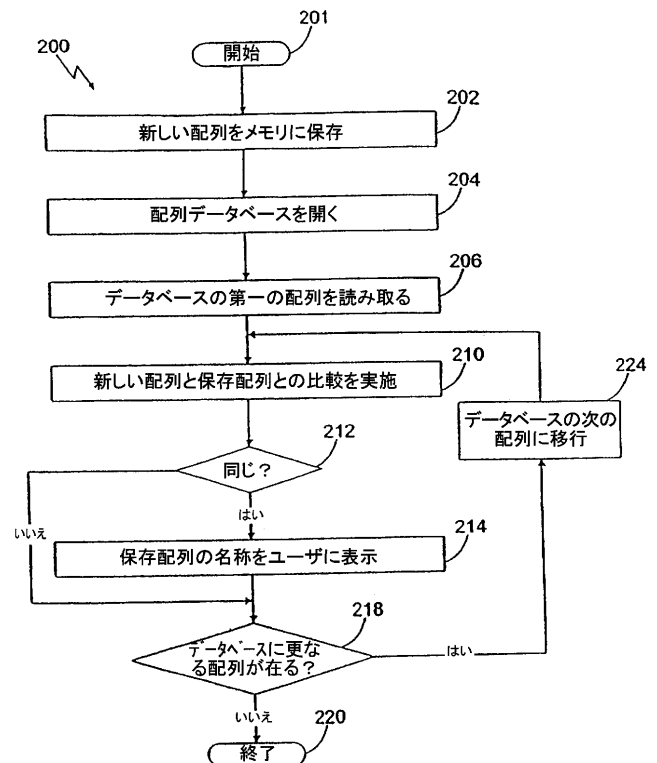


FIGURE 2

【図 3】

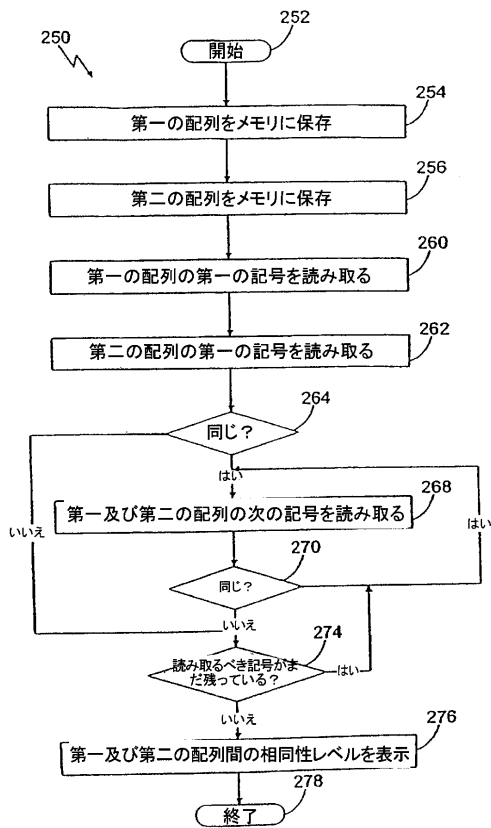


FIGURE 3

【図 5】

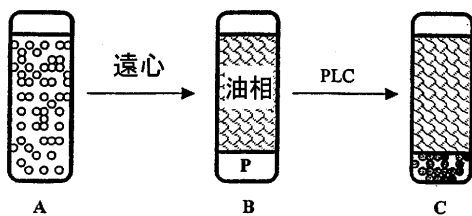


FIGURE 5

【図 4】

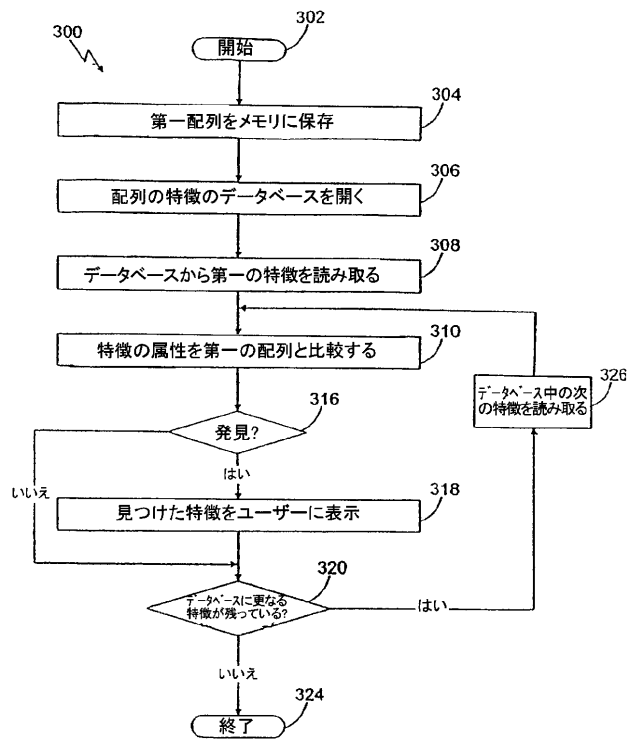


FIGURE 4

【図 6】

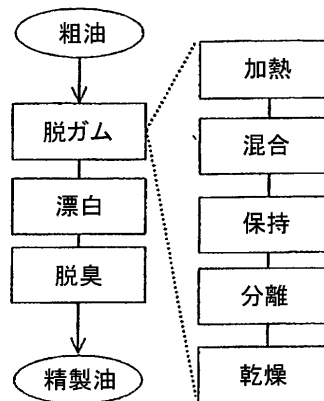


FIGURE 6

【 図 1 1 B 】

ヘーダーモザイク 黄色ドングリ産		黄色ドングリ 球座													
9.16		3.1,4.3	87734	95-34	14647283	999	332	993	331	3					
11.12		3.4,21	23474722	35-52	14576058	1644	348	N/A	338	3					
15.18		3.4,21	23474722	75-58	14530722	1659	348	N/A	339	3					
16.16	仮説的タングリ質 キヤントモサ・P01			15598172	15-102	9240021	1344	447	1329	443	40				
17.16		3.1,1.6	23127917	45-24	14670801	1137	373	N/A	384	3					
19.26			23748735	95	37465108	1248	415	N/A	417	73					
21.22	キヤントモサ・P 710モサ・P P01		3746053	15-162	37450252	1716	671	1716	572	63					
22.24	仮説的タングリ質 キヤントモサ・ カハスP.V. P01		21232226	25-61	4763846	1472	499	1344	448	31					
25.28		3.4,21	23474722	42-56	13638818	1098	359	N/A	339	36					
27.36		3.4,21	23474722	45-58	13173017	1287	438	N/A	339	27					
29.30	保存仮説的 キヤントモサ・ カハスP.V. ATCC33913		21233352	0.00007	14687673	753	250	1311	437	20					
31.32	キヤントモサ・P P01			2126777	25-48	11558558	1422	473	1776	552	35				
33.34	仮説的タングリ質 キヤントモサ・カハス P01		6889332	15-16	11260482	782	263	859	265	30					
35.36	仮説的タングリ質 キヤントモサ・カハス P01		8272806	55-14	2734324	1389	402	1230	410	30					
37.36	キヤントモサ・P P01		3746953	15-140	3746652	1320	443	1716	572	63					
39.40	仮説的タングリ質 キヤントモサ・カハス P01		15598128	15-106	0046021	1335	444	1329	443	49					
41.42	保存仮説的 キヤントモサ・ カハスP.V. Str.306		21241325	25-43	3965390	1418	472	1320	447	35					
43.44			23474722	46-20	13204564	1297	428	N/A	339	27					
45.46		3.4,21	23474722	45-49	14532026	1038	345	N/A	338	29					
47.48	仮説的タングリ質		23729032	65-68	9322016	1476	491	1365	450	23					
49.50			27367325	15-22	10004532	927	418	N/A	417	65					
51.52	保存仮説的タングリ質 キヤントモサ・カハス P01		21232226	25-50	13122711	1462	493	1344	443	30					
53.54	仮説的タングリ質 キヤントモサ・カハス P01		15598122	15-13	13282540	1491	499	1320	443	22					
55.56		3.4,21	23474722	25-33	8666136	1041	348	N/A	339	35					
57.58	仮説的タングリ質 キヤントモサ・カハス P01		15598123	15-11	3337362	1413	470	1329	443	22					
59.60		3.4,21	23474722	95-55	14280415	1028	349	N/A	339	35					
61.62	仮説的タングリ質 キヤントモサ・カハス P01		37464048		1267	418	1410	470	77						
63.64			27387635	15-17	14042626	1192	413	N/A	417	87					
65.66		3.1,1.6	23147169	35-12	11023857	1156	367	N/A	337	25					
67.68	仮説的タングリ質 キヤントモサ・P01		15598123	95-36	13880230	1418	472	1339	443	20					
69.70		3.4,21	23474722	95-56	14638220	1059	349	N/A	339	30					

FIGURE 11B

【 図 1 1 D 】

[illegible]

FIGURE 11D

【 図 1 1 C 】

[illegible]

FIGURE 11C

【 図 1 1 E 】

[illegible]

FIGURE 11E

【 図 1 1 F 】

[illegible]

FIGURE 11F

【 図 1 1 G 】

[illegible]

FIGURE 11G

【 図 1 1 H 】

[illegible]

FIGURE 11H

【 図 1 1 I 】

[illegible]

FIGURE 11I

【図 1 1 J】

37468553	1E-180	アロマト ス・トロ フイ	トイマ ラセII 結合カ ハク質 ユート配 列のた のた ヒヤ	AAV03183	3.2	アノキオ ンシ ン化分 析用オ コシロ 付 #2	AA028391	6.6	1692	553	1719	572	53	59
139	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140

FIGURE 11J

【図 1 2】

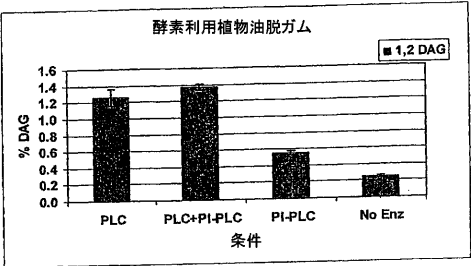
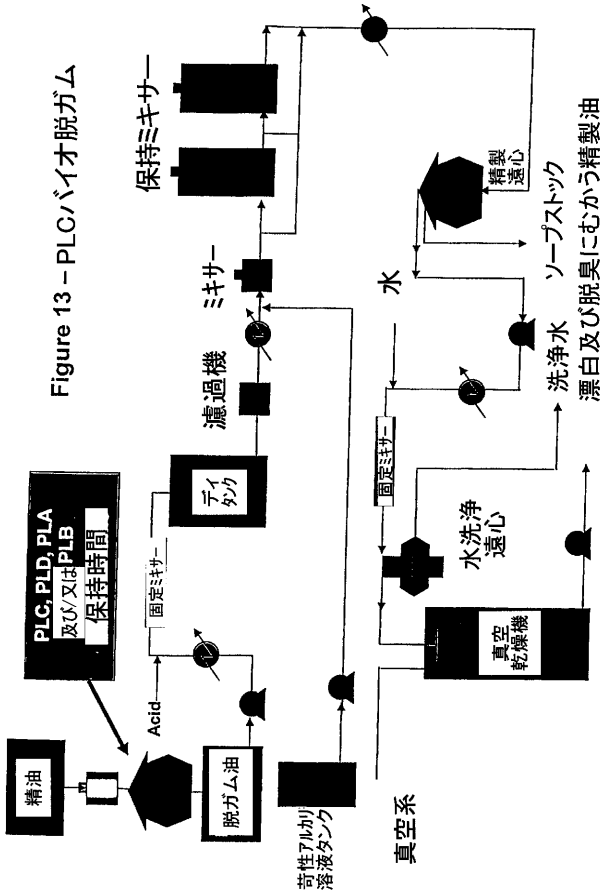


FIGURE 12

【図 1 3】



【図 1 4】

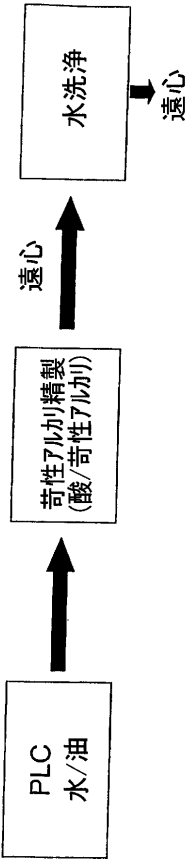


Figure 14

【図 15】

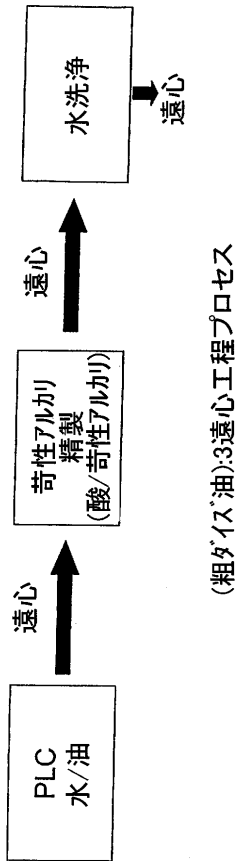


Figure 15

【図 16】

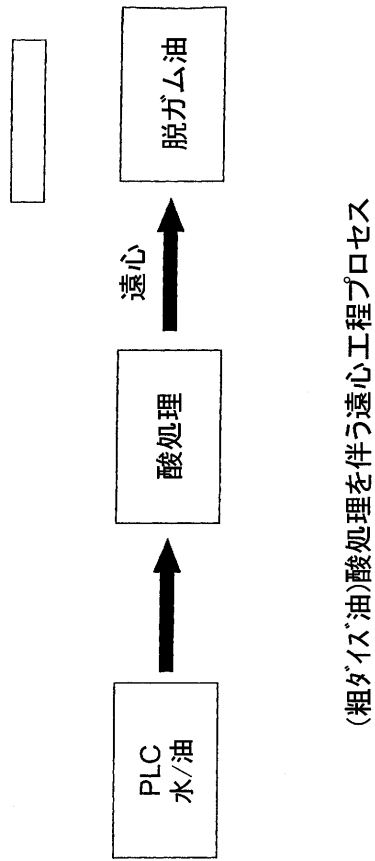
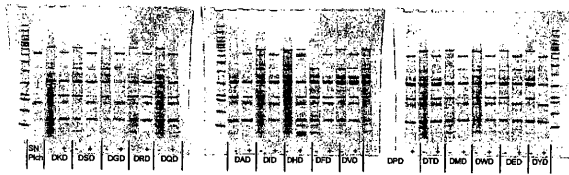


Figure 16

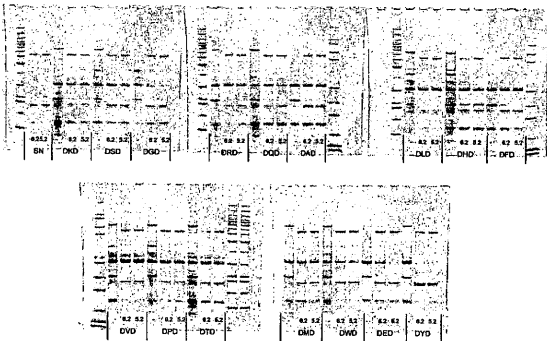
【図 17】

Figure 17

PLC検証:ヒキアSN;37°C;pH5.2、6時間

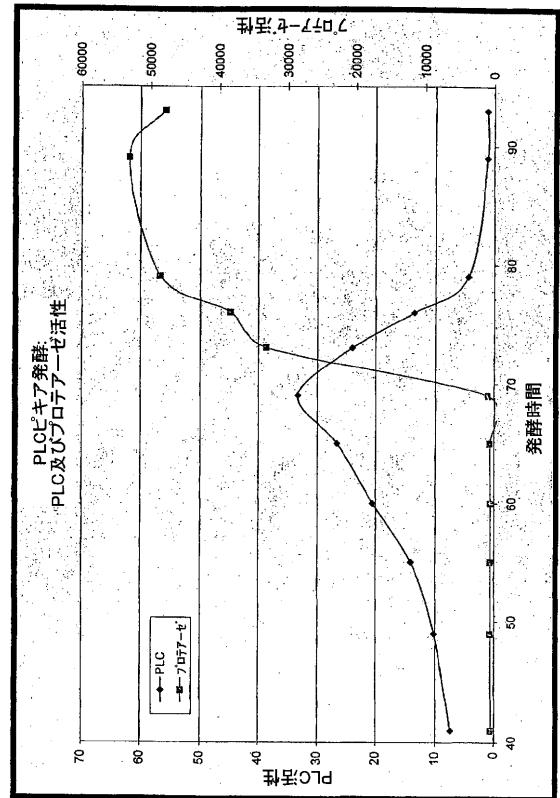


PLC検証:ヒキアSN;37°C;pH6.2及び5.2、22時間



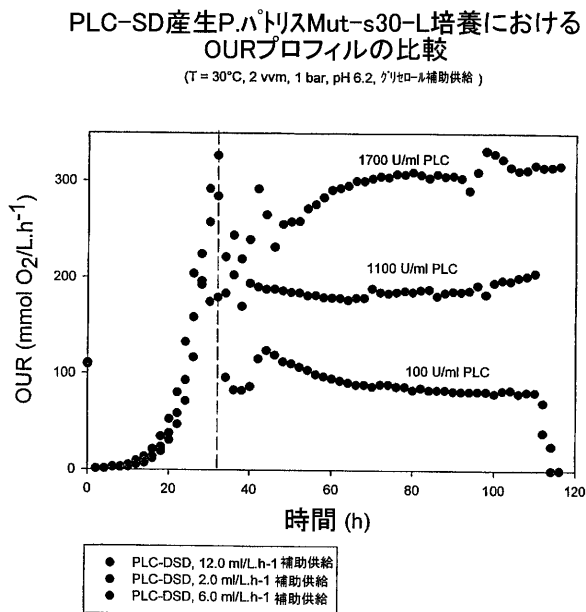
【図 18】

Figure 18



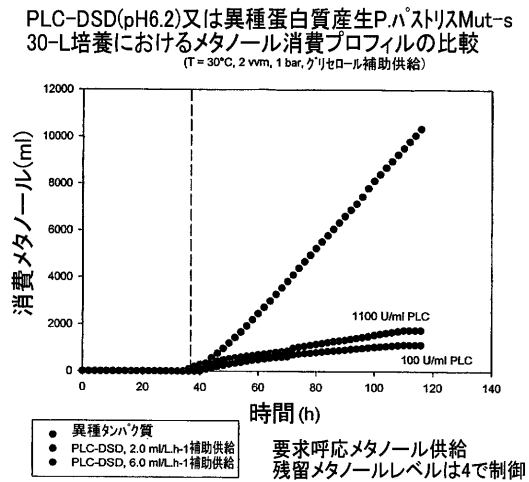
【図 19】

Figure 19

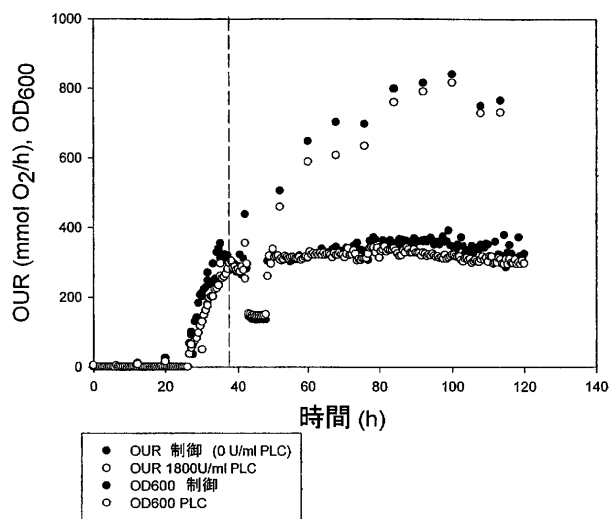


【図 20】

Figure 20

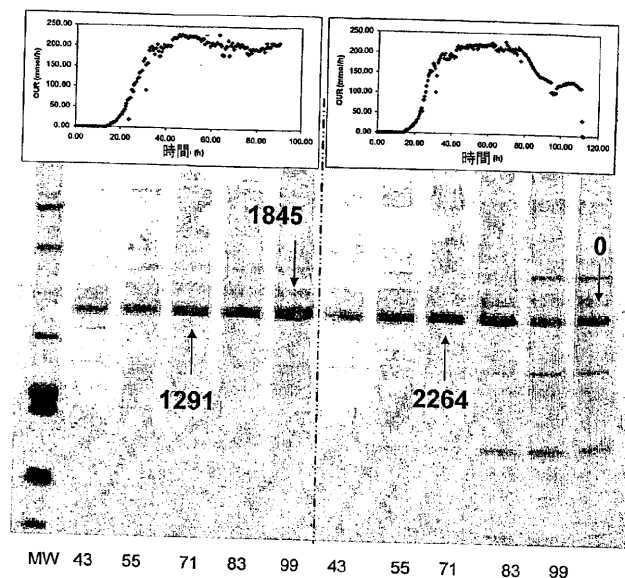


【図 21】

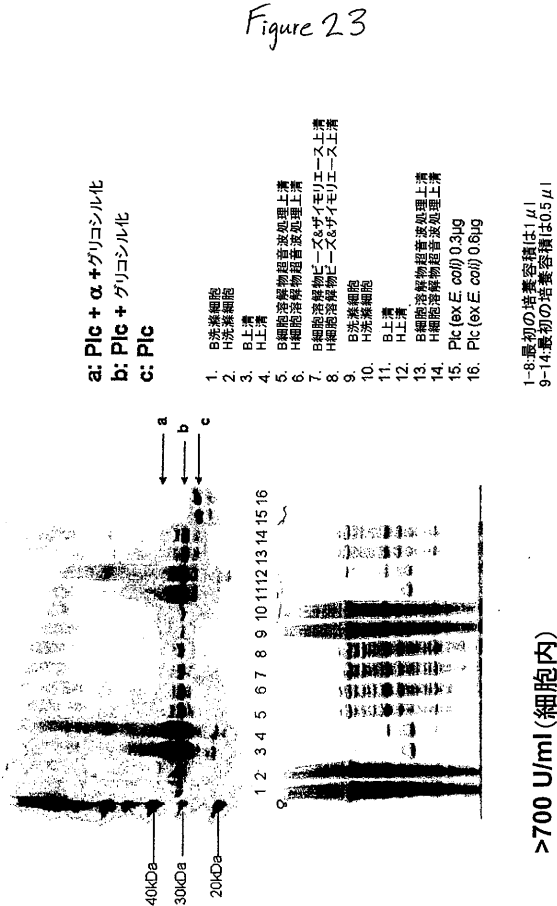


【図 22】

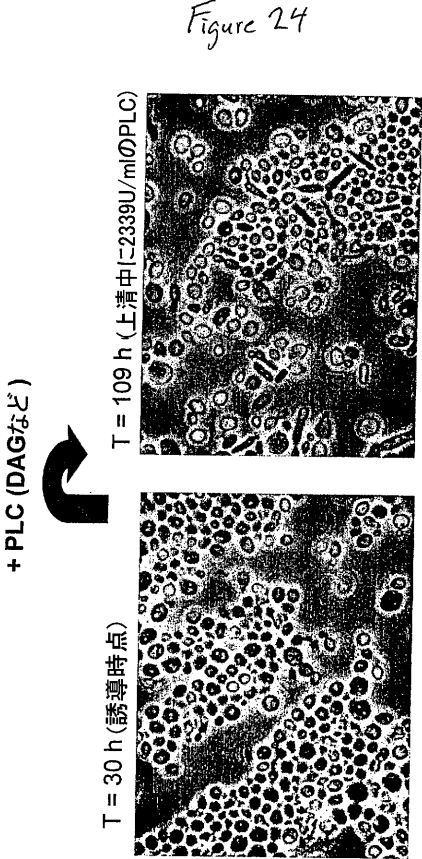
Figure 22



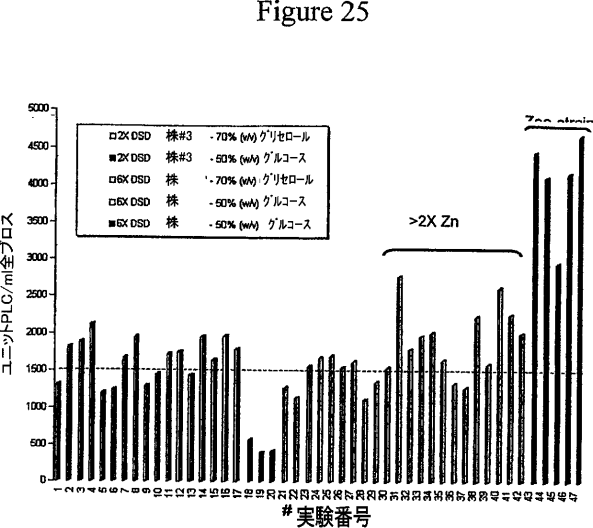
【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

Figure 26

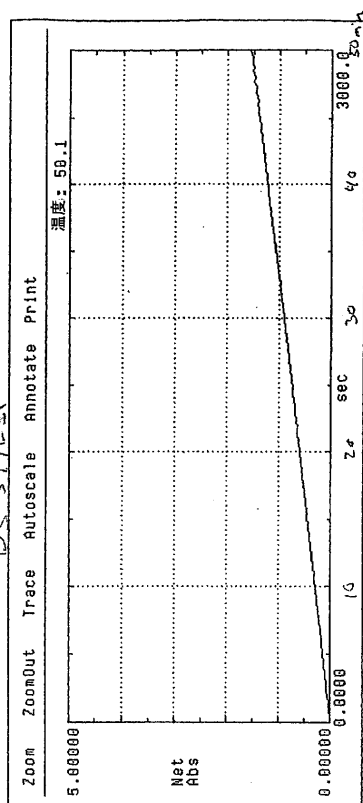
タンク	条件	供給 速度 ml/hr	供給 合計 ml	グルコース 供給速度 ml/hr	供給 合計 ml	OD600 (88 hr)	pH stat U/ml (5xブロス由来)
1	Zeo200培養、6xDSD由来 コロニー番号1	0.6-1.2 ml/hr	59 ml	1.8 ml/hr	135.3 ml	436	3119 @ 75 hr 3987 @ 88 hr 4138 @ 92 hr
2	Zeo200培養、6xDSD由来 コロニー番号2	0.6-1.2 ml/hr	61 ml	1.8 ml/hr	135.6 ml	461	3511 @ 92 hr
4	Zeo培養、6xDSD由来 コロニー番号3	0.6-1.2 ml/hr	58 ml	1.8 ml/hr	135.6 ml	444	3354 @ 75 hr 3988 @ 88 hr 4133 @ 92 hr
6	Zeo200培養、6xDSD由来 コロニー番号4	0.6-1.2 ml/hr	48 ml	1.8 ml/hr	112.1 ml	445	2117 @ 92 hr
7	6xDSDコントロロール	0.6-1.2 ml/hr	56 ml	1.8 ml/hr	135.1 ml	436	2369 @ 92 hr
8	タンク7の複製	0.6-1.2 ml/hr	53 ml	1.8 ml/hr	132.7 ml	428	1932 @ 92 hr

【図 3 1】

p-NPPC使用の場合の3D PLC(配列番号:2)熱安定性

- 50 °C, 50 min
- 1mlのp-NPPC(20mM)中に25 μ lの酵素
- 酵素濃度=0.048mU/ml

Figure 31

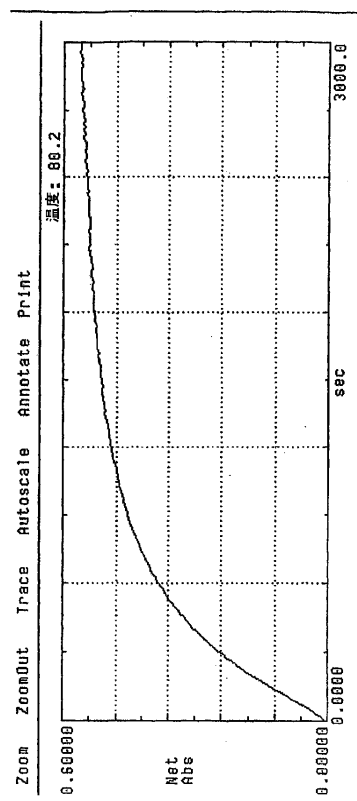


【図 3 3】

p-NPPC、80°C使用の場合の3D PLC(配列番号:2)の熱安定性

- 80 °C, 50 min
- 1mlのp-NPPC(20mM)中に25 μ lの酵素
- 酵素濃度 [] = 0.024 mU/mL

Figure 33



【図 3 2】

p-NPPC、65°C使用の場合の3D PLC(配列番号:2)の熱安定性

- 65.1 °C, 50 min
- 1mlのp-NPPC(20mM)中に25 μ lの酵素
- 酵素濃度 [] = 0.024 mU/mL

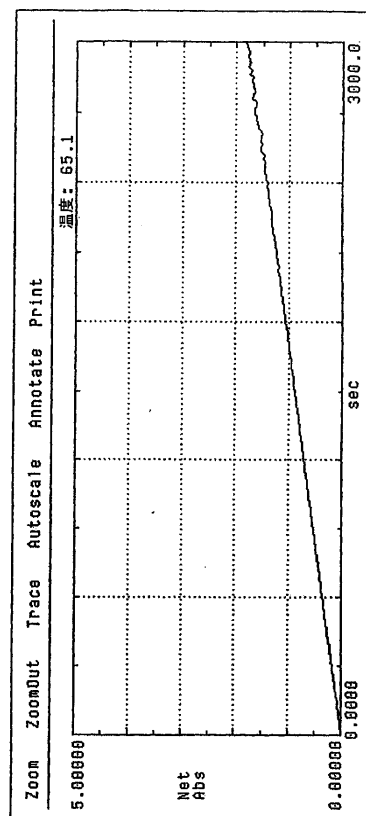


Figure 32

【図 3 4】

3D PLC(配列番号:2)のDSC分析

- 酵素濃度 [] = 15 mg/mL
- $T_m = 86$ °C
- 反応は可逆性ではない

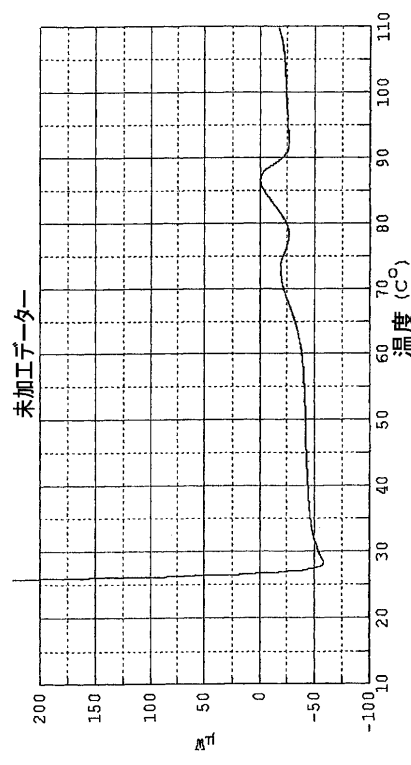


Figure 34

【配列表】

2007531516000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	4 B 0 6 4	
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	C 1 2 N	9/16	D	4 B 0 6 5	
A 0 1 H	5/00	(2006.01)	A 0 1 H	5/00	A	4 H 0 0 3	
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027		4 H 0 4 5	
C 0 7 K	17/00	(2006.01)	C 0 7 K	17/00		4 H 0 5 9	
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	F		
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 0 7 K	16/40			
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 1 2 Q	1/34			
C 1 2 P	7/64	(2006.01)	C 0 7 K	19/00			
C 1 2 P	33/00	(2006.01)	C 1 2 P	7/64			
G 0 1 N	37/00	(2006.01)	C 1 2 P	33/00			
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2		
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D		
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M		
C 1 1 D	3/386	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z		
C 1 1 B	3/02	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z		
C 1 1 B	11/00	(2006.01)	C 1 1 D	3/386			
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 1 B	3/02			
			C 1 1 B	11/00			
			C 1 2 P	21/08			

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. フロッピー

- (72) 発明者 グラマティコヴァ スヴェトラナ
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 アーランガー 5 7 0 9
- (72) 発明者 ヘイズルウッド ジェフ
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 カミニト バウティーズ 1
3 0 4 1
- (72) 発明者 ラム ディヴィッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 7 8 サン マルコス ウィンダミア ドライヴ 1
6 7 1
- (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 スタージス ブレイク ジー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 0 9 カールスバッド ヴィア エメラード 2 9 3
1
- (72) 発明者 ロバートソン ダン イー

- 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 オーランダー ウェイ 6 3
3 2
- (72)発明者 リー ジンカイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 1 5 サン ディエゴ フィフティフィフス ストリ
ート 5 4 2 0 アpartment 1 0
- (72)発明者 クレプス ジョエル エイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 2 4 エンシニータス リンダ スー レーン 1 6
4 5
- (72)発明者 フィールドینگ ロデリック
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 0 9 サン ディエゴ カルシドニー ストリート
8 6 1 アpartment エイ
- (72)発明者 ブラウン ロバート シー
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 カーメル クリーク 1 2 5
8 8 # 3 2
- (72)発明者 ヴァサヴァダ アミット
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 6 4 ポーウェイ マラバー ドライブ 1 2 2 6 7
- (72)発明者 タン シューキウ
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 カル マー デ アルモニア
4 5 6 2
- (72)発明者 バディロ エイドリアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 6 4 ポーウェイ ヒデン ヴァリー ドライブ 1
5 7 1 1
- (72)発明者 ファン ホーク ウィルヘルムス ペー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 0 1 2 カマリロ カレ オロヴィスタ 2 9 0
- (72)発明者 ジャンセン ジゼル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ コンパス ポイント ドライ
ヴ サウス 9 5 4 0 - 4
- (72)発明者 イサーク チャールズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 0 8 カールスバッド カルパティ サークル 8 1
3 # 3 1 8
- (72)発明者 バーク マーク ジェイ
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 インターメッツォ ウェイ
1 2 6 3 4

F ターム(参考) 2B030 AD08 CA14

2G045 AA29 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB20 CB21 DA12 DA13
DA14 DA20 DA36 FB01 FB02 FB03 JA01

4B024 AA03 AA05 AA17 BA11 BA80 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20
DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 EA01 EA02 EA04 FA02 GA01
GA11 HA01

4B050 CC03 CC05 DD01 LL02 LL04 LL05

4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ05 QQ13 QQ30 QQ42 QQ52 QR08 QR10
QR33 QR42 QR55 QR57 QR62 QR74 QR80 QR82 QS05 QS25
QS36 QX02

4B064 AD85 AH07 CA01 CA02 CA05 CA06 CA10 CA11 CA19 CB01
DA10 DA13 DA16 DA19

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA87X AA87Y AB01 AB02
BA01 BA08 CA13 CA31 CA46 CA50 CA54 CA56 CA57

4H003 BA01 BA09 BA12 BA17 DA01 EC01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA75 DA76 DA89 EA01 EA15 EA36
FA72 FA74

4H059 BB57 BC03 BC06 BC13 BC46 BC48 EA17 EA22

专利名称(译)	磷脂酶，编码它们的核酸以及制备和使用它们的方法		
公开(公告)号	JP2007531516A	公开(公告)日	2007-11-08
申请号	JP2007502990	申请日	2005-03-08
[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	グラマティコヴァスヴェトラーナ ヘイズルウッドジェフ ラムディヴィッド バートンネルソンアール スタージスブレイクジー ロバートソندانイー リージンカイ クレプスジョエルエイ フィールディングロデリック ブラウンロバートシー ヴァサヴァダアミット タンシューキウ バディロエイドリアン ファンホークウィルヘルムスパー ジャンセンゼセル イサークチャールズ バークマークジェイ		
发明人	グラマティコヴァ スヴェトラーナ ヘイズルウッド ジェフ ラム ディヴィッド バートン ネルソン アール スタージス ブレイク ジー ロバートソン ダン イー リー ジンカイ クレプス ジョエル エイ フィールディング ロデリック ブラウン ロバート シー ヴァサヴァダ アミット タン シューキウ バディロ エイドリアン ファン ホーク ウィルヘルムス ペー ジャンセン ジゼセル イサーク チャールズ バーク マーク ジェイ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/16 A01H5/00 A01K67/027 C07K17/00 C07K16/40 C12N15/02 C12Q1/34 C07K19/00 C12P7/64 C12P33/00 G01N37/00 G01N33 /53 G01N33/15 G01N33/50 C11D3/386 C11B3/02 C11B11/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61P3/06 A61P43/00 C07K2319/00 C12N9/16 C12N9/18 C12N9/20 C12N15/8242 C12N15/8247 C12P7/6418 C12P7/6481		

FI分类号

C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N9/16.D A01H5/00.A A01K67/027 C07K17/00 C12N15/00.F C07K16/40 C12N15/00.C C12Q1/34 C07K19/00 C12P7/64 C12P33/00 G01N37/00.102 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/15.Z G01N33/50.Z C11D3/386 C11B3/02 C11B11/00 C12P21/08

F-TERM分类号

2B030/AD08 2B030/CA14 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/JA01 4B024/AA03 4B024/AA05 4B024/AA17 4B024/BA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD01 4B050/LL02 4B050/LL04 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ30 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR10 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AD85 4B064/AH07 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CB01 4B064/DA10 4B064/DA13 4B064/DA16 4B064/DA19 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA57X 4B065/AA57Y 4B065/AA72X 4B065/AA72Y 4B065/AA87X 4B065/AA87Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA13 4B065/CA31 4B065/CA46 4B065/CA50 4B065/CA54 4B065/CA56 4B065/CA57 4H003/BA01 4H003/BA09 4H003/BA12 4H003/BA17 4H003/DA01 4H003/EC01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA01 4H045/EA15 4H045/EA36 4H045/FA72 4H045/FA74 4H059/BB57 4H059/BC03 4H059/BC06 4H059/BC13 4H059/BC46 4H059/BC48 4H059/EA17 4H059/EA22

代理人(译)

小川伸男

優先权

10/796907 2004-03-08 US

其他公开文献

JP2007531516A5

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本发明具有磷脂酶活性（包括例如磷脂酶A，B，C和D活性，patatin活性，磷脂酸磷酸酶（PAP）和/或脂质酰基水解酶（LAH）活性）新型多肽，编码该多肽的核酸和与该多肽结合的抗体。还提供了工业过程（例如油的脱胶）和包含使用这些磷脂酶的产品。

表2：PLC生成物によってもたらされる損失

	苛性アルカリ精製補助	脱ガム補助
1) ガム形成及び分離で失われる油	2.1%	×
2) 苛性アルカリ添加で鹸化される油	3.1%	×
3) 漂白時の粘土に捕捉される油*	<1.0%	×
全収量損失	~5.2%	~2.1%
		~5.2%