

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成23年1月13日(2011.1.13)

【公表番号】特表2010-507367(P2010-507367A)

【公表日】平成22年3月11日(2010.3.11)

【年通号数】公開・登録公報2010-010

【出願番号】特願2009-533566(P2009-533566)

【国際特許分類】

C 1 2 P	17/10	(2006.01)
C 1 2 N	9/10	(2006.01)
C 1 2 N	1/20	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 2 3 L	1/226	(2006.01)

【F I】

C 1 2 P	17/10	Z N A
C 1 2 N	9/10	
C 1 2 N	1/20	A
C 1 2 N	15/00	A
A 2 3 L	1/226	H

【手続補正書】

【提出日】平成22年10月18日(2010.10.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

モナチンを生成するための経路におけるある反応の生成物を、モナチンを生成するための経路における他の反応の反応物として再生するための方法であって、

L-トリプトファンが反応してI3Pを生成する場合に、アルファ-ケト基質からL-アミノ酸を生成し、

アミノ酸ラセマーゼを用いてL-アミノ酸をD-アミノ酸に変換し、

I3PからMPを生成し、

MPを反応させてモナチンを形成し、次いで

MPが反応してモナチンを形成する場合に、D-アミノ酸からアルファ-ケト基質を再生成することを含み、

アルファ-ケト基質は、アルファ-ケトグルタル酸、オキサロ酢酸、ピルビン酸、およびその組合せから選ばれ、

アミノ酸ラセマーゼは、アルファ-ケト基質がピルビン酸である場合、アラニンラセマーゼであり、アルファ-ケト基質がアルファ-ケトグルタル酸である場合、グルタミン酸ラセマーゼであり、アルファ-ケト基質がオキサロ酢酸である場合、アスパラギン酸ラセマーゼであることを特徴とする該方法。

【請求項2】

該アラニンラセマーゼが、バチルス・ステアロサーモフィルスからのアラニンラセマーゼおよびゲオバチルス・ステアロテルモフィルスからのアラニンラセマーゼの熱安定性相同体から選ばれ、該グルタミン酸ラセマーゼが、L-ブレビスグルタミン酸ラセマーゼおよびP-ペントサセウスグルタミン酸ラセマーゼから選ばれ、該アスパラギン酸ラセマ-

ゼは Biocatalytics 社の ASPR-101 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

I3P からの MP の生成が、R-MP を S-MP に対して約 1:1 よりも大きな比で優先的に生成する 1 つまたは複数のアルドラーーゼ酵素によって促進されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

1 つまたは複数のアルドラーーゼ酵素が、R 特異的アルドラーーゼ酵素であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

L-トリプトファンから D-トリプトファンを生成し、

D-トリプトファンから I3P を生成し、

I3P から R-MP を生成し、次いで

R-MP からモナチンを生成することを含む経路を介して R, R モナチンまたはその塩を生成することを含むことを特徴とする方法であって、

L-トリプトファンからの D-トリプトファンの生成は、トリプトファンラセマーゼ、トリプトファンラセマーゼの活性を有するラセマーゼ、広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有するラセマーゼ、およびその組合せから選ばれる 1 つまたは複数の酵素によって促進され、

トリプトファンラセマーゼの活性を有するラセマーゼは、配列番号 41 に対応し、Y354C 突然変異、Y354T 突然変異、Y354G 突然変異、Y354L 突然変異、Y354N 突然変異、Y354S 突然変異、Y354I 突然変異、Y354M 突然変異、Y354P 突然変異、ならびに Y354A、M35V、および R195H の突然変異の組合せから選ばれる突然変異を有するアラニンラセマーゼ、配列番号 43 のアラニンラセマーゼ、配列番号 41 に対応し、M35C 突然変異、F66E 突然変異、Y354A 突然変異、および P197L 突然変異ならびにその組合せから選ばれる突然変異を有するアラニンラセマーゼから選ばれ、

広域特異性アミノ酸ラセマーゼは、

a) 配列番号 120 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、Y396C 突然変異を有する、配列番号 120 に対応する広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 128 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、I384M 突然変異を有する、配列番号 128 に対応する広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、ビブリオ・フィシェリからのアラニンラセマーゼ、Genbank 受入番号 AAW85230.1 のアラニンラセマーゼ、Genbank 受入番号 YP_204118 のアラニンラセマーゼ、シュードモナス・タエトロレンスから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、I384M 突然変異を有する、シュードモナス・タエトロレンスから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼに対応する広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、シュードモナス・ブチダ（シュードモナス・ストリアタとしても知られている）から単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 116 の配列を含む広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、Genbank 受入番号 ZP_00898332.1 GI:82735470 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、ATCC4683 からの広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 204 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、I384M 突然変異を有する、配列番号 204 に対応する広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.ブチダKT2440 から単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.ブチダNBR C12996 から単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、ATCC7966 からの広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、シュードモナス株 2150 から単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.オレオボランスから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.オーレオファシエンスから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.ブチダ12633 から単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.フルオレッセンスから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.ブチダSCRC744 から単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.グラベオレンスから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、P.ストリ

アタ A K U 0 8 3 から単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 2 0 4 のアミノ酸 2 4 ~ 4 0 9 を含有する、シュードモナス・タエトロレンスから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、配列番号 2 0 4 のアミノ酸 2 4 ~ 4 0 9 を含有する広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、エロモナス・ジャンディから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、A T C C 4 9 5 7 2 からの広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、配列番号 1 9 4 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、エロモナス・ソブリアから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、A T C C 3 5 9 9 4 からの広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、配列番号 1 9 2 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、L 3 8 3 M 突然変異を有する、エロモナス・キャビエから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼに対応する酵素、L 3 8 3 M 突然変異を有する、A T C C 1 4 4 8 6 からの広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、配列番号 1 9 5 を含む遺伝子によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、配列番号 1 9 6 を含む遺伝子によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、配列番号 2 0 1 を含む広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、配列番号 2 0 2 を含む広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、D 7 6 N 突然変異を有する、エロモナス・キャビエからのアミノ酸ラセマーゼに対応する酵素、D 7 6 N 突然変異を有する、配列番号 1 7 9 に対応する広域特異性アミノ酸ラセマーゼの活性を有する酵素、エロモナス・ハイドロフィラから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 7 7 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 1 9 によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 4 6 を含む広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、エロモナス・キャビエから単離された広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 7 9 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 7 9 のアミノ酸 2 2 ~ 4 0 8 を含有する広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 5 5 の部分配列を含有する広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 5 1 の広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、およびその活性断片、

b) a) の広域特異性アミノ酸ラセマーゼのいずれかに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性パーセントを有する配列およびその活性断片を含む酵素、

c) G e n b a n k 受入番号 A B 0 9 6 1 7 6 によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、ラセマーゼが I 3 8 4 M 突然変異を含むような置換を有する、G e n b a n k 受入番号 A B 0 9 6 1 7 6 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 1 9 によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、C P 0 0 0 0 2 0 . 1 G I : 5 9 4 7 8 7 0 8 の領域 8 0 0 8 4 2 . . 8 0 2 0 5 3 によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、N C _ 0 0 6 8 4 0 によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、K T 2 4 4 0 B a r D N A によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、ラセマーゼが Y 3 9 6 C 突然変異を含むような置換を有する、配列番号 1 1 9 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、ラセマーゼが I 3 8 4 M 突然変異を含むような置換を有する、配列番号 1 2 7 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 5 1 を含む広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 5 4 を含む配列によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、N Z _ A A L M 0 1 0 0 0 0 0 2 ヌクレオチド 5 3 1 7 3 . . 5 4 4 0 2 によってコードされた広域特異性アミノ酸ラセマーゼ、配列番号 1 4 0 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性ラセマーゼ、ラセマーゼが I 3 8 4 M 突然変異を含むような置換を有する、配列番号 1 4 0 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性ラセマーゼ、配列番号 1 7 8 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性ラセマーゼ、ラセマーゼが L 3 8 3 M 突然変異を含むような置換を有する、配列番号 1 7 8 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性ラセマーゼ、配列番号 1 9 3 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性ラセマーゼ、配列番号 1 7 6 に対応する核酸配列によってコードされた広域特異性ラセマーゼ、ならびに

d) c) の広域特異性アミノ酸ラセマーゼをコードする遺伝子のいずれかに対して少な

くとも 90 % の配列同一性パーセントを有する配列を含む酵素から選ばれ、

R - MP からの R , R モナチンの生成は、広域特異性を有する D - アミノトランスフェラーゼによって促進される該方法。

【請求項 6】

D - トリプトファンからのインドール - 3 - ピルビン酸の生成が 1 つまたは複数の酵素によって促進され、R - モナチン前駆体からの R , R モナチンの生成が D - トリプトファンからのインドール - 3 - ピルビン酸の生成を促進する酵素と同じ 1 つまたは複数の酵素によって促進されることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

R - MP からの R , R モナチンの生成が、

a) T 2 4 3 S 突然変異、T 2 4 3 N 突然変異、N 1 0 0 A 突然変異、T 2 4 3 Q 突然変異、T 2 4 3 N および N 1 0 0 A の突然変異、F 2 0 0 M 突然変異、F 2 0 0 Y 突然変異、ならびに F 2 0 0 M および T 2 4 3 N の突然変異を有する、配列番号 8 6 に対応する D - アミノトランスフェラーゼのうちの 1 つまたは複数から選ばれる D - アミノトランスフェラーゼの活性を有する酵素、

b) a) の酵素のいずれかに対して少なくとも 90 % の配列同一性パーセントを有する配列を含む酵素、

c) バチルス・ハロデュランス D - アミノトランスフェラーゼ、ジオバチルス・ステアロサーモフィルス D - アミノトランスフェラーゼとバチルス・スファエリクス D - アミノトランスフェラーゼのハイブリッドであるハイブリッド D - アミノトランスフェラーゼ、バチルス・スファエリクス D - アミノトランスフェラーゼ、ジオバチルス・ステアロサーモフィルス D - アミノトランスフェラーゼ、バチルス・リケニホルミス D - アミノトランスフェラーゼ、A T C C 7 0 6 3 からの D - アミノトランスフェラーゼ、D - アミノトランスフェラーゼ活性を有するバチルス・リケニホルミス分岐鎖アミノトランスフェラーゼ、または

d) a ~ c の組合せ

から選ばれる広域特異性 D - アミノトランスフェラーゼによって促進されることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

I 3 P からの R - MP の生成が、R - MP を S - MP に対して 1 : 1 よりも大きな比で優先的に生成するアルドラーーゼ酵素によって促進されることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

アルドラーーゼ酵素が R 特異的アルドラーーゼ酵素であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

a) T 2 4 3 S 突然変異、T 2 4 3 N 突然変異、N 1 0 0 A 突然変異、T 2 4 3 Q 突然変異、T 2 4 3 N および N 1 0 0 A の突然変異の組合せ、F 2 0 0 M 突然変異、F 2 0 0 Y 突然変異、ならびに F 2 0 0 M および T 2 4 3 N の突然変異の組合せから選ばれる突然変異を有する、配列番号 8 6 に対応する D - アミノトランスフェラーゼ、

b) a) のいずれかに対して少なくとも 90 % の配列同一性パーセントを有し、突然変異を有する配列を含む酵素、

c) バチルス・ハロデュランス D - アミノトランスフェラーゼ、ハイブリッド D - アミノトランスフェラーゼ、ジオバチルス・ステアロサーモフィルス D - アミノトランスフェラーゼ、バチルス・リケニホルミス D - アミノトランスフェラーゼ、A T C C 7 0 6 3 からの D - アミノトランスフェラーゼ、D - アミノトランスフェラーゼ活性を有するバチルス・リケニホルミス分岐鎖アミノトランスフェラーゼ、およびバチルス・スファエリクス D - アミノトランスフェラーゼから選ばれる D - アミノトランスフェラーゼ、ならびに

d) a) ~ c) の組合せ

から選ばれるD-アミノトランスフェラーゼを用いてD-トリプトファンをアミノ基転移することを含むことを特徴とする方法。

【請求項11】

モナチンを生成することをさらに含み、少なくとも1つの精製工程をさらに含み、該R,Rモナチンが、全有機化合物の少なくとも約60重量%の純度の程度まで精製されることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】

生成されたモナチンの少なくとも約75重量%が、R,Rモナチンであることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項13】

生成されたモナチンの少なくとも約80重量%が、R,Rモナチンであることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項14】

1つまたは複数のD-アミノトランスフェラーゼの存在下でモナチン前駆体を反応させて、モナチンを生成することを含み、1つまたは複数のD-アミノトランスフェラーゼは

a) T 2 4 3 S 突然変異、T 2 4 3 N 突然変異、N 1 0 0 A 突然変異、T 2 4 3 Q 突然変異、T 2 4 3 N およびN 1 0 0 A の突然変異の組合せ、F 2 0 0 M 突然変異、F 2 0 0 Y 突然変異、ならびにF 2 0 0 M およびT 2 4 3 N の突然変異の組合せまたはその組合せから選ばれる突然変異を有する、配列番号86に対応するD-アミノトランスフェラーゼ

b) a)の酵素のいずれかに対して少なくとも90%の配列同一性パーセントを有し、突然変異を含むD-アミノトランスフェラーゼ酵素、ならびに

c) バチルス・ハロデュランスD-アミノトランスフェラーゼ、ジオバチルス・ステアロサーモフィルスD-アミノトランスフェラーゼとバチルス・スファエリクスD-アミノトランスフェラーゼのハイブリッドであるハイブリッドD-アミノトランスフェラーゼ、ジオバチルス・ステアロサーモフィルスD-アミノトランスフェラーゼ、バチルス・リケニホルミスD-アミノトランスフェラーゼ、ATCCC4978からのD-アミノトランスフェラーゼ、ATCCC7063からのD-アミノトランスフェラーゼ、D-アミノトランスフェラーゼ活性を有するバチルス・リケニホルミス分岐鎖アミノトランスフェラーゼ、またはその組合せから選ばれる1つまたは複数のD-アミノトランスフェラーゼから選ばれることを特徴とする方法。