

【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17年9月15日(2005.9.15)

【公表番号】特表2005-505250(P2005-505250A)

【公表日】平成17年2月24日(2005.2.24)

【年通号数】公開・登録公報2005-008

【出願番号】特願2002-587384(P2002-587384)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

A 0 1 H 5/00

A 2 3 K 1/16

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 9/02

C 1 2 P 7/64

G 0 6 F 17/30

// A 2 3 L 1/30

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 H 5/00 A

A 2 3 K 1/16 3 0 4 C

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 9/02 Z T D

C 1 2 P 7/64

G 0 6 F 17/30 1 7 0 F

A 2 3 L 1/30 B

【手続補正書】

【提出日】平成16年2月5日(2004.2.5)

【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】

コンピューター的突然変異誘発を含むチオレドキシンレダクターゼのコファクター特異性を変化させるための方法。

【請求項2】

チオレドキシンレダクターゼのコファクター特異性を変化させるための請求項1の方法であって、

(a)アミノ酸位置を含むチオレドキシンレダクターゼ(TR)スキヤフォルドタンパク質の座標のセットを入力し、

(b)少なくとも1つのタンパク質設計サイクルを適用し、そして

(c)変化したコファクター依存性を有する候補変異体タンパク質のセットを生成することを含む方法。

【請求項3】

当該変異体TRの当該コファクター特異性が、NADPHまたはNADHである、請求項1または2の方法。

【請求項4】

当該変異体TRの当該コファクター特異性が、NADHに切り替えられている、請求項1または2の方法。

【請求項5】

当該変異体TRの当該コファクター特異性が変化し、その結果、当該変異体がNADHと比較してNADPHに、または、NADPHと比較してNADHに優先的に結合する、請求項1または2の方法。

【請求項6】

当該変異体TRの当該コファクター特異性が変化し、その結果当該変異体が、野生型TRタンパク質と比較して、NADPHについての改善された触媒効率を示す、請求項1または2の方法。

【請求項7】

チオレドキシンレダクターゼの基質特異性を変化させるための方法であって、

(a)アミノ酸位置を含むチオレドキシンレダクターゼスキヤフォルドタンパク質の座標のセットを入力し、

(b)少なくとも1つのタンパク質設計サイクルを適用し、そして

(c)変化した基質依存性を有する候補変異体タンパク質のセットを生成させることを含む方法。

【請求項8】

当該変異体TRタンパク質が、*E. coli*、*Bacillus subtilis*、*Mycobacterium leprae*、*Saccharomyces*、*Neurospora crassa*、*Arabidopsis*、およびヒトからなる群より選択される、生物から取得されるチオレドキシンタンパク質を還元する、請求項7の方法によって得られる変異体チオレドキシンレダクターゼ(TR)タンパク質。

【請求項9】

当該変異体タンパク質が、第2タンパク質にリンカーを介することもあって融合されている、請求項1または2の方法によって得られる変異体TRタンパク質であって、当該第2タンパク質が野生型TRタンパク質、チオレドキシン、または変異体TRタンパク質である、タンパク質。

【請求項10】

当該変異体TRタンパク質が野生型*Arabidopsis*TRタンパク質と比較して、1ないし3つのアミノ酸置換を有する、請求項1又は2の変異体TRタンパク質。

【請求項11】

標的タンパク質のコファクター特異性を変化させるための方法であって、

(a)アミノ酸位置を含む、スキヤフォルドタンパク質のための座標のセットを入力し、

(b)少なくとも1つのタンパク質設計サイクルを適用しそして

(c)変化したコファクター特異性を有する候補変異体タンパク質のセットを生成することを含む方法。

【請求項12】

式1の単離ポリペプチド分子を含む変異体チオレドキシンレダクターゼ(TR)タンパク質；

(1)S₁-A₁-A₂-S₂-A₃-A₄-A₅-S₃-A₆-S₄

[式中]

a)S₁は配列番号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、および配列番号7、またはそれに実質的類似性を有する配列からなる群より選択されるポリペプチド配列を含む；

b)S₂は配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、および配列番号14、またはそれに実質的類似性を有する配列からなる群より選択されるポリペプチド配列を含む；

c)S₃は配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、および配列番号21、またはそれに実質的類似性を有する配列からなる群より選択されるポリペプチド配列を含む；

d)S₄は配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、および配列番号28、またはそれに実質的類似性を有する配列からなる群より選択されるポリ

ペプチド配列を含む；

e) A₁はセリン、バリン、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸部分である；

f) A₂はアラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸部分である；

g) A₃はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ロイシン、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、およびチロシンからなる群より選択されるアミノ酸部分である；

h) A₄はアルギニン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸部分である；

i) A₅はアルギニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、セリン、トレオニン、およびリジンからなる群より選択されるアミノ酸部分である；かつ

j) A₆はアルギニン、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、システイン、セリン、トレオニン、およびリジンからなる群より選択されるアミノ酸部分である；

ただし少なくとも

A₁はセリンでない；

A₂はアラニンでない；

A₃はヒスチジンでない；

A₄はアルギニンでない；

A₅はアルギニンでない；または

A₆はアルギニンでない]。

【請求項 13】

請求項12の単離ポリペプチド分子；ここで当該ポリペプチドが、第2ポリペプチドにリンカーを介することもあって融合されている。

【請求項 14】

請求項13のポリペプチド分子；ここで当該第2ポリペプチドがチオレドキシンである。

【請求項 15】

請求項13のポリペプチド分子；ここで当該ポリペプチドが、第3ポリペプチドにリンカーを介することもあってさらに融合されている。

【請求項 16】

請求項13または15のポリペプチド分子；ここで当該ポリペプチドがオレオシンである。

【請求項 17】

修飾されたTRタンパク質を有する植物を生産する方法であって、

(a) アミノ末端クロロプラスチド移行ペプチドを含む、請求項1または11の修飾されたチオレドキシンレダクターゼ(TR)をコードするDNA分子に作動可能に連結された植物細胞内で機能性であるプロモーターを含む発現カセットを、植物細胞内に導入し、形質転換植物細胞を得ること、および

(b) 当該形質転換植物細胞を再生し、区別される形質転換植物を提供すること、ここで当該植物での修飾されたTRタンパク質をコードするDNA分子の発現が、非形質転換植物と比較して、コファクター特異性が変化していることを含む方法。

【請求項 18】

請求項17の方法であって、ここで当該形質転換植物が、当該コファクター特異性がNADPHまたはNADHである修飾されたTRタンパク質を発現する、方法。

【請求項 19】

請求項17の方法であって、ここで当該形質転換植物が、当該コファクター特異性がNADHに切り替えられている修飾されたTRタンパク質を発現する、方法。

【請求項 20】

当該形質転換植物が、修飾されたTRタンパク質を発現し、ここで当該コファクター特異性が変化して、その結果当該修飾されたTRタンパク質が優先的に、NADHと比較してNADPHに結合する、請求項17の方法。

【請求項 21】

当該形質転換植物が、修飾されたTRタンパク質を発現し、ここで当該コファクター特異性が変化して、その結果当該修飾されたTRタンパク質が、非形質転換植物における野生型TRタンパク質と比較して、NADPHについての改善された触媒効率を示す、請求項1または2の方法。

【請求項 22】

請求項17の方法によって調製される、種子であってもよい形質転換植物。

【請求項 23】

修飾されたチオレドキシンレダクターゼ(TR)タンパク質を含む油体を作成するための方法であって、

- a)請求項1または2の修飾されたTRタンパク質を細胞中で生産し、
- b)修飾されたTRタンパク質および当該油体を連関できる油体ターゲティングタンパク質によって当該TRタンパク質と油体を連関させ、および
- c)当該修飾されたTRタンパク質と連関された当該油体を取得することを含む方法。

【請求項 24】

さらに

- a)該油体を洗浄し、当該修飾されたTRタンパク質を含む、洗浄された油体を取得する、および
- b)当該洗浄された油体を、乳化物中に製剤化することを含む、請求項23の方法。

【請求項 25】

当該油体を、非アレルゲン性食品の調製で使用する、請求項23の方法。

【請求項 26】

当該油体を動物飼料の調製で使用し、当該飼料の消化可能性を改良する、請求項23の方法。

【請求項 27】

請求項23の方法によって調製される、修飾されたTRタンパク質を含む油体。