

【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19年1月11日(2007.1.11)

【公表番号】特表2002-530072(P2002-530072A)

【公表日】平成14年9月17日(2002.9.17)

【出願番号】特願2000-582544(P2000-582544)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 1 D 3/386 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 9/28 (2006.01)

C 1 2 N 9/96 (2006.01)

C 1 2 N 15/01 (2006.01)

C 1 2 R 1/07 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 1 D 3/386

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/28

C 1 2 N 9/96

C 1 2 N 15/00 X

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:07

C 1 2 N 9/28

C 1 2 R 1:07

C 1 2 N 9/96

C 1 2 R 1:07

【手続補正書】

【提出日】平成18年11月15日(2006.11.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：4に示すアミノ酸配列を有する親バスルス・リケニホルミス(Bacillus licheniformis) - アミラーゼ又は当該配列に対して少なくとも60%の配列同一性を有する - アミラーゼの変異体であって、S356及びY358からなる群から選択される1又は複数の位置の変化、あるいはE376K、S417S及びA420Q,Rからなる群から選択される1又は複数の置換を含み、ここで

(a) 前記変化が独立に、

(i) 前記位置を占めるアミノ酸の下流へのアミノ酸の挿入、

(ii) 前記位置を占めるアミノ酸の欠失、又は

(iii) 前記位置を占めるアミノ酸の他のアミノ酸による置換、

であり；

(b) 前記変異体は - アミラーゼ活性を有し；そして

(c) 各位置は配列番号：4のアミノ酸配列を有する親 - アミラーゼのアミノ酸配列の位置に対応する；

ことを特徴とする変異体。

【請求項2】 前記親 - アミラーゼが、バチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*)、特にバチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*) の株 ATCC 27811、バチルス・アミロリクエファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)、又はバチルス・スペースス (*Bacillus* sp.) NCIB 12289、NCIB 12512、NCIB 12513 もしくは DSM 9375 の菌株に由来する請求項1に記載の変異体。

【請求項3】 前記親 - アミラーゼが、配列番号：1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 及び8に記載の群から選択された - アミラーゼのいずれかである請求項1又は2に記載の変異体。

【請求項4】 前記親 - アミラーゼが、配列番号：4と、少なくとも65%、好ましくは70%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらにもっと好ましくは少なくとも約90%、さらにもっと好ましくは少なくとも95%、さらにもっと好ましくは少なくとも97%、そしてさらにもっと好ましくは少なくとも97%、という同一性を有するアミノ酸配列を有する請求項1～3のいずれか1項に記載の変異体。

【請求項5】 前記親 - アミラーゼが、配列番号：12の核酸配列と、中程度の、好ましくは高いストリンジェンシー条件の下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされる請求項1～4のいずれか1項に記載の変異体。

【請求項6】 前記親 - アミラーゼが、配列番号：4に示されているバチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*) - アミラーゼと配列番号：5に示されているバチルス・アミロリクエファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) - アミラーゼのハイブリッド、特に配列番号：5に示すバチルス・アミロリクエファシエンス - アミラーゼのN-末端の33アミノ酸によりN-末端の35アミノ酸が置換されている点を除き配列番号：4のバチルス・リケニホルミス - アミラーゼと同一であるハイブリッドバチルス - アミラーゼ、特にH156Y+181T+190F+209V+264S (配列番号：4のナンバリングを用いる) の変異を更に有するハイブリッドバチルス - アミラーゼである、請求項1～5のいずれか1項に記載の変異体。

【請求項7】 前記親 - アミラーゼが、さらに、次の位置：K176, I201, 及びH205 (配列番号：4の番号付けによる) の1又は複数に突然変異を有し、特に次の置換：K176R, I201F, 又はH205N (配列番号：4の番号付けによる) の1又は複数に突然変異を有し、あるいは親 - アミラーゼが、次の置換：K176R+201F+H205N (配列番号：4の番号付けによる) 、を有する請求項1～6のいずれか1項に記載の変異体。

【請求項8】 前記変異体が S356A又はY358F の1又は複数置換を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の変異体。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか1項に記載の - アミラーゼ変異体をコードするDNA配列を含むDNA構築物。

【請求項10】 請求項9に記載のDNA構築物を有する組換え発現ベクター。

【請求項11】 請求項9に記載のDNA構築物又は請求項10に記載のベクターによって形質転換された細胞。

【請求項12】 微生物、特に細菌又は菌類である、請求項11に記載の細胞。

【請求項13】 細胞がバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・コアグラランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・ラウトス (*Bacillus lautus*)、又はバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) などのグラム陽性細菌である請求項12に記載の細胞。

【請求項14】 請求項1～8のいずれか1項に記載の - アミラーゼ変異体を、例えばほこりがたたない顆粒、安定化された液体、又は保護された酵素という形態で、含む

洗剤添加物。

【請求項 15】 0.02-200 mg の酵素タンパク質 / g 添加物を含む請求項 14 に記載の洗剤添加物。

【請求項 16】 さらに、プロテアーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、他の澱粉分解酵素及び / 又はセルラーゼ、など別の酵素を含む請求項 14 又は 15 に記載の洗剤添加物。

【請求項 17】 請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の - アミラーゼ変異体を含む洗剤組成物。

【請求項 18】 さらに、プロテアーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、他の澱粉分解酵素及び / 又はセルラーゼ、など別の酵素を含む請求項 17 に記載の洗剤組成物。

【請求項 19】 請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の - アミラーゼ変異体を含む手動又は自動食器洗浄洗剤組成物。

【請求項 20】 さらに、プロテアーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、別の澱粉分解酵素及び / 又はセルラーゼ、など別の酵素を含む請求項 19 に記載の食器洗浄洗剤組成物。

【請求項 21】 請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の - アミラーゼ変異体を含む手動又は自動洗濯洗浄組成物。

【請求項 22】 さらに、プロテアーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、別の澱粉分解酵素、及び / 又は、セルラーゼ、など別の酵素を含む請求項 21 に記載の洗濯洗浄組成物。

【請求項 23】 (i) 配列番号 : 4 に示される配列を有するバチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*) からの - アミラーゼと、配列番号 : 3 に示される配列を有するバチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) - アミラーゼ (ターマミル (*Termamyl*) 様の親 - アミラーゼとしての) から得られる請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の 1 又は複数の変異体との混合物 ; 又は

(ii) 配列番号 : 3 に示される配列を有するバチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) からの - アミラーゼと、1 又は複数の他のターマミル (*Termamyl*) 様の親 - アミラーゼから得られる請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の 1 又は複数の変異体との混合物 ; 又は

(iii) 配列番号 : 3 に示される配列を有するバチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) - アミラーゼ (ターマミル (*Termamyl*) 様の親 - アミラーゼとしての) から得られる請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の 1 又は複数の変異体と、1 又は複数の他のターマミル (*Termamyl*) 様の親 - アミラーゼから得られる本発明による 1 又は複数の変異体との混合物 ;
を含む組成物。

【請求項 24】 請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の - アミラーゼ変異体又は請求項 23 に記載の組成物の、洗濯及び / 又は食器洗浄のため、織物のサイズ剤除去のため、又は澱粉液化のための使用。

【請求項 25】 配列番号 : 4 に示すアミノ酸配列を有する親バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) - アミラーゼ又は当該配列に対して少なくとも 60% の配列同一性を有する親 - アミラーゼの変異体を製造する方法であって、該変異体は高い温度で親に比べて大きな安定性を示し、

(a) 親 - アミラーゼをコード化している DNA 配列にランダム突然変異を誘発させるステップ ;

(b) ステップ (a) で得られた突然変異した DNA 配列を宿主細胞で発現させるステップ ; 及び

(c) 高い温度で親 - アミラーゼに比べて大きな安定性を示す突然変異した - アミラーゼを発現する宿主細胞をスクリーニングするステップ ;
を含む方法。