

【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尔斯・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・スペーシス (*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エ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 に示すバ尔斯ス・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 のバシリス・リケニホルメス - アミラーゼと同一であるハイブリドバ尔斯ス - 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ドバ尔斯ス - 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・レンタス (*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・コアグラーンス (*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・ツリンギエンシス (*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)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尔斯・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。