

【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】 令和 4 年 8 月 9 日(2022.8.9)

【国際公開番号】 WO2020/045473
【出願番号】 特願 2019-559122(P2019-559122)
【国際特許分類】

C 1 2 N 1/15(2006.01)
C 1 2 P 21/02(2006.01)
C 1 2 N 9/42(2006.01)
C 1 3 K 1/02(2006.01)
C 1 2 N 15/52(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 1/15
C 1 2 P 21/02 C Z N A
C 1 2 N 9/42
C 1 3 K 1/02
C 1 2 N 15/52 Z

【手続補正書】

20

【提出日】 令和 4 年 8 月 1 日(2022.8.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0021

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0021】

配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、*Trichoderma reesei* が有するポリペプチドであり、National Center for Biotechnology Information では、*Trichoderma reesei* QM6a 株が持つ predicted protein の EGR50654 として登録されている。配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは機能未知のポリペプチドであるが、National Center for Biotechnology Information の Conserved Domain Architecture Retrieval Tool によれば、N 末端側から 95 番目～277 番目のアミノ酸残基は Middle domain of eukaryotic initiation factor 4G ドメイン（以降 MIF4G ドメインと記載する。）、N 末端側から 380～485 番目のアミノ酸残基は MA-3 ドメインを有すると開示されている。MIF4G および MA-3 の両ドメインは、DNA または RNA に結合する機能を有することが知られている（Biochem. 44, 12265-12272 (2005)、Mol. Cell. Biol. 1, 147-156 (2007)）。これらの記載により配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、少なくとも DNA および／または RNA に結合する機能を有すると推定される。

30

40

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0023

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0023】

配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、*Trichoderma*

50

reesei が有するポリペプチドであり、National Center for Biotechnology Information では、Trichoderma reesei QM6a 株が持つ predicted protein の EGR44419 として登録されている。配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは機能未知のポリペプチドであるが、National Center for Biotechnology Information の Conserved Domain Architecture Retrieval Tool によれば、N 末端側から 26 番目～499 番目のアミノ酸残基は Sugar (and other) Transporter ドメインを有すると開示されている。この記載により配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、少なくとも菌体の内側と外側の間における糖の輸送に関与していると推定される。

10

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

(グルコース濃度の測定)

グルコースは、ACQUITY UPLC システム (Waters) を用いて、以下の条件で定量分析した。グルコースの標品で作製した検量線をもとに、定量分析した。

20

カラム：ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μ m 2.1 $\times$ 100 mm Column

分離法：HILIC

移動相：移動相 A：80% アセトニトリル、0.2% TEA 水溶液、移動相 B：30% アセトニトリル、0.2% TEA 水溶液とし、下記グラジエントに従った。グラジエントは下記の時間に対応する混合比に到達する直線的なグラジエントとした。

開始条件：(A 99.90%、B 0.10%)、開始 2 分後：(A 96.70%、B 3.30%)、開始 3.5 分後：(A 95.00%、B 5.00%)、開始 3.55 分後：(A 99.90%、B 0.10%)、開始 6 分後：(A 99.90%、B 0.10%)。

検出方法：ELSD (蒸発光散乱検出器)

30

流速：0.3 mL/min

温度：55℃。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0078

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0078】

<実施例 3> 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能が欠損した Trichoderma reesei の変異株の作製その 2

40

Trichoderma reesei QM9414 株の経代株である QM9414-A 株に対し、遺伝子変異処理を行って変異株である QM9414-C 株を取得した。遺伝子変異処理は、QM9414-A 株の胞子を、表 1 に示す前培養培地 1 mL あたり 1.0×10^5 胞子になるよう接種し、前培養培地 15 mL を半日培養した後に遠心分離を行い、胞子を回収した。そして、回収した胞子をトリス-マレイン酸バッファー (pH 6.0) にて 10 mL の胞子溶液になるよう懸濁し、そこへトリス-マレイン酸バッファー (pH 6.0) で 1.0 g/L になるよう溶解させた NTG 溶液を 0.5 mL 添加し、28℃、100 分間、遺伝子変異処理を行った。遺伝子変異処理した胞子は、遠心分離にて回収した後に、トリス-マレイン酸バッファー (pH 6.0) で 3 回洗浄し、最終的にトリス-マレイン酸バッファー (pH 6.0) 10 mL にて懸濁したものを遺伝子変異処理胞

50

子とした。その遺伝子変異処理胞子を結晶セルロースを添加して調製した寒天培地へ添加し、コロニー周囲に生じるセルラーゼによる結晶セルロース分解領域であるハ口の大きさを指標とし、ハ口の大きかった Q M 9 4 1 4 - C 株を選抜した。

10

20

30

40

50