

【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8月2日(2007.8.2)

【公表番号】特表2007-502123(P2007-502123A)

【公表日】平成19年2月8日(2007.2.8)

【年通号数】公開・登録公報2007-005

【出願番号】特願2006-523447(P2006-523447)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 N	9/88	(2006.01)
C 12 N	1/15	(2006.01)
C 12 N	1/19	(2006.01)
C 12 N	1/21	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	9/88	
C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	
C 12 N	5/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成19年6月1日(2007.6.1)

【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】

組換えハロヒドリンデハロゲナーゼ(HHDH)ポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号2の野生型Agrobacteriumsp.のHHDHポリペプチドと比較して少なくとも1.4倍高いHHDH活性でエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートをエチル(R)-4-シアノ-3-ヒドロキシブチレートへと変換可能であり、該ポリペプチドは、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項2】

請求項1に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、2位の(残基)位置におけるT、3位におけるAまたはPまたはS、4位におけるV、6位におけるD、9位におけるIまたはFのいずれか、10位におけるL、13位におけるS、14位におけるS、15位におけるK、16位におけるC、17位におけるTまたはR、20位におけるCまたはSまたはKのいずれか、24位におけるT、26位におけるQ、28位におけるF、29位におけるT、30位におけるA、31位におけるL、33位におけるG、34位におけるR、35位におけるL、36位におけるN、37位におけるH、40位におけるD、44位におけるL、45位におけるP、47位におけるPまたはAのいずれか、52位におけるN、54位におけるV、55位におけるR、56位におけるD、58位におけるK、61位におけるGまたはD、63位におけるV、72位におけるR、75位におけるI、76位におけるP、78位におけるC、82位におけるY、84位におけるSまたはL

のいずれか、85位におけるA、91位におけるE、93位におけるD、95位におけるQまたはG、96位におけるN、107位におけるK、112位におけるA、114位におけるT、SまたはGのいずれか、115位におけるA、117位におけるP、120位におけるN、121位におけるE、122位におけるP、126位におけるR、130位におけるV、133位におけるS、134位におけるAまたはV、136位におけるL、WまたはV、139位におけるH、142位におけるIまたはR、144位におけるS、146位におけるS、152位におけるT、153位におけるS、154位におけるSまたはAのいずれか、168位におけるV、169位におけるT、177位におけるF、178位におけるV、180位におけるI、181位におけるGまたはI、184位におけるK、186位におけるY、194位におけるL、198位におけるN、199位におけるM、215位におけるE、236位におけるG、237位におけるV、238位におけるL、240位におけるT、245位におけるIまたはAまたはVのいずれか、249位におけるY、252位におけるVまたはI、および、254位におけるVからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基を含む、ポリペプチド。

**【請求項3】**

75位におけるIを少なくとも含む、請求項2に記載のポリペプチド。

**【請求項4】**

153位におけるSを少なくとも含む、請求項2に記載のポリペプチド。

**【請求項5】**

134位におけるAを少なくとも含む、請求項2に記載のポリペプチド。

**【請求項6】**

186位におけるYを少なくとも含む、請求項2に記載のポリペプチド。

**【請求項7】**

請求項1に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号34、配列番号38、配列番号44、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号66、配列番号68、配列番号80、配列番号84、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号100、配列番号110、配列番号114、配列番号118、配列番号154、配列番号158、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号170、配列番号180、配列番号200、配列番号262、配列番号264、配列番号266、配列番号270、配列番号422、配列番号440、配列番号442、配列番号448、配列番号470、配列番号476、配列番号520、配列番号702、配列番号726、配列番号728、配列番号730、配列番号734、配列番号736、配列番号738、配列番号740、および配列番号742からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド。

**【請求項8】**

請求項1に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号34、配列番号38、配列番号44、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号66、配列番号68、配列番号80、配列番号84、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号100、配列番号110、配列番号114、配列番号118、配列番号154、配列番号158、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号170、配列番号180、配列番号200、配列番号262、配列番号264、配列番号266、配列番号270、配列番号422、配列番号440、配列番号442、配列番号448、配列番号470、配列番号476、配列番号520、配列番号702、配列番号726、配列番号728、配列番号730、配列番号732、配列番号734、配列番号736、配列番号738、配列番号740、または配列番号742に対応するアミノ酸配列を有し、該ポリペプチドのアミノ酸残基のうちの

5 %未満は、該配列番号の配列と比較した場合に保存的に変異している、ポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 2 の野生型 *A gr obacterium sp.* の HHDH ポリペプチドと比較して少なくとも 2 倍高い HHDH 活性でエチル (S) - 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシブチレートをエチル (R) - 4 - シアノ - 3 - ヒドロキシブチレートへと変換可能であり、該ポリペプチドは、配列番号 9 0 、配列番号 9 2 、配列番号 9 4 、配列番号 9 6 、配列番号 1 0 0 、配列番号 7 2 6 、配列番号 7 2 8 、配列番号 7 3 0 、配列番号 7 3 2 、配列番号 7 3 4 、配列番号 7 3 6 、配列番号 7 4 0 、および配列番号 7 4 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 2 の野生型 *A gr obacterium sp.* の HHDH ポリペプチドと比較して少なくとも 100 倍高い HHDH 活性でエチル (S) - 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシブチレートをエチル (R) - 4 - シアノ - 3 - ヒドロキシブチレートへと変換可能であり、該ポリペプチドは、配列番号 1 0 0 、配列番号 7 2 6 、配列番号 7 3 0 、配列番号 7 3 2 、配列番号 7 3 4 、および配列番号 7 3 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 2 の野生型 *A gr obacterium sp.* の HHDH ポリペプチドと比較して少なくとも 500 倍高い HHDH 活性でエチル (S) - 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシブチレートをエチル (R) - 4 - シアノ - 3 - ヒドロキシブチレートへと変換可能であり、該ポリペプチドは、配列番号 7 2 6 または配列番号 7 3 0 のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 4 、配列番号 1 2 、配列番号 1 6 、配列番号 1 8 、配列番号 3 4 、配列番号 3 8 、配列番号 4 4 、配列番号 4 8 、配列番号 5 2 、配列番号 6 6 、配列番号 8 0 、配列番号 8 4 、配列番号 1 1 4 、配列番号 1 5 4 、配列番号 1 5 8 、配列番号 1 7 0 、または配列番号 2 7 0 と少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号 1 0 、配列番号 1 4 、または配列番号 6 8 、配列番号 1 1 8 、配列番号 1 6 4 、配列番号 1 6 6 、または配列番号 1 8 0 と少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 1 1 0 、配列番号 1 6 2 、配列番号 2 6 2 、配列番号 4 2 2 、配列番号 4 4 0 、または配列番号 5 2 0 と少なくとも 97 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 1 1 6 または配列番号 4 4 8 と少なくとも 96 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号 2 6 4 、配列番号 2 6 6 、配列番号 4 7 0 、または配列番号 4 7 6 と少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号 2 0 0 と少なくとも 93 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 18】

配列番号 4 4 2 と少なくとも 89 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

配列番号 702 と少なくとも 88 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

**【請求項 20】**

請求項 2 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、核酸配列によってコードされ、該核酸配列は、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 33、配列番号 37、配列番号 43、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 65、配列番号 67、配列番号 79、配列番号 83、配列番号 109、配列番号 113、配列番号 115、配列番号 117、配列番号 153、配列番号 157、配列番号 161、配列番号 163、配列番号 165、配列番号 169、配列番号 179、配列番号 161、配列番号 199、配列番号 261、配列番号 263、配列番号 265、配列番号 269、配列番号 421、配列番号 439、配列番号 441、配列番号 447、配列番号 469、配列番号 475、配列番号 519、配列番号 701、配列番号 725、配列番号 729、配列番号 731、配列番号 733、配列番号 735、および配列番号 737 に対して相補的である別の核酸配列の実質的に全長にわたって、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする、ポリペプチド。

**【請求項 21】**

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 2 に対応するアミノ酸配列を有するが、S 2 T ; T 3 A または T 3 P のいずれか ; A 4 V ; V 6 D ; V 9 I または V 9 F のいずれか ; K 10 L ; G 13 S ; G 14 S ; M 15 K ; G 16 C ; S 17 T または S 17 R のいずれか ; R 20 S、R 20 C または R 20 K のいずれか ; A 24 T ; H 26 Q ; V 28 F ; A 29 T ; C 30 A ; H 31 L ; E 33 G ; S 34 R ; F 35 L ; K 36 N ; Q 37 H ; E 40 D ; F 44 L ; A 45 P ; T 47 P または T 47 A のいずれか ; K 52 N ; M 54 V ; S 55 R ; E 56 D ; E 58 K ; E 61 G または E 61 D のいずれか ; I 63 V ; Q 72 R ; V 75 I ; L 76 P ; S 78 C ; F 82 Y ; P 84 S または P 84 L のいずれか ; E 85 Q ; K 91 E ; A 93 D ; E 95 Q または E 95 G ; D 96 N ; R 107 K ; V 112 A ; A 114 T または A 114 G または A 114 S のいずれか ; V 115 A ; S 117 P ; K 120 N ; K 121 E ; R 122 P ; H 126 R ; I 130 V ; A 133 S ; T 134 A または T 134 V ; F 136 L または F 136 W または F 136 V ; W 139 H ; L 142 I または L 142 R ; T 144 S ; T 146 S ; A 152 T ; C 153 S ; T 154 S または T 154 A のいずれか ; I 168 V ; P 169 T ; Y 177 F ; L 178 V ; S 180 I ; E 181 G または E 181 I ; P 184 K ; F 186 Y ; T 194 I ; H 198 N ; V 199 M ; K 215 E ; V 236 G ; F 237 V ; W 238 L ; A 240 T ; M 245 I または M 245 A または M 245 V のいずれか ; W 249 Y ; M 252 V または M 252 I ; および E 254 V ; からなる群より選択される 1 つ以上の置換を有する、ポリペプチド。

**【請求項 22】**

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドはさらに、生成物であるエチル (R) - 4 - シアノ - 3 - ヒドロキシブチレートの存在下で HHDH 活性を維持することが可能であり、かつ該ポリペプチドはさらに、配列番号 2 と整列された場合に、A 4 V、F 82 Y、T 134 V、F 136 W、F 136 V、L 142 R、L 178 V、W 238 L、A 240 T、W 249 Y および M 252 I からなる群より選択される残基変化のうちの 1 つ以上を有する、ポリペプチド。

**【請求項 23】**

請求項 1 ~ 請求項 22 のうちのいずれか 1 項に記載されるポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

**【請求項 24】**

請求項 23 に記載のポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、アミノ酸位置 5 においてイソロイシンをコードする ATT、アミノ酸位置 36 においてリジンをコードす

るAAG、アミノ酸位置63においてイソロイシンをコードするATT、アミノ酸位置95においてグルタミン酸をコードするGAG、および、アミノ酸位置188においてプロリンをコードするCCCからなる群より選択される1つ以上のコドンを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項25】

プロモーターに作動可能に連結された請求項23に記載されるポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項26】

請求項25に記載される発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項27】

HHDHポリペプチドを生成する方法であって、該方法は、

(a) 請求項26に記載の宿主細胞を、該HHDHポリペプチドの産生のために適切な条件下で培養する工程、および

(b) 該HHDHポリペプチドを回収する工程、  
を包含する、方法。