

【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29年8月31日(2017.8.31)

【公表番号】特表2016-533740(P2016-533740A)
 【公表日】平成28年11月4日(2016.11.4)
 【年通号数】公開・登録公報2016-062
 【出願番号】特願2016-531774(P2016-531774)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 9/24 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/34 (2006.01)
 C 1 1 D 3/386 (2006.01)
 A 2 3 K 20/189 (2016.01)
 A 2 3 K 20/153 (2016.01)
 A 2 3 K 20/147 (2016.01)
 A 2 3 K 20/142 (2016.01)

【F I】

C 1 2 N 9/24 Z N A
 C 1 2 N 15/00 A
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 Q 1/34
 C 1 1 D 3/386
 A 2 3 K 20/189
 A 2 3 K 20/153
 A 2 3 K 20/147
 A 2 3 K 20/142

【手続補正書】

【提出日】平成29年7月24日(2017.7.24)

【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】

親グリコシルヒドロラーゼ61(GH61)酵素の変異体であって、セルラーゼ強化活性を有し、配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有し、かつ、前記親GH61酵素に比べて、(a)発現、(b)熱安定性及び/又はTm、(c)全加水分解物希釈酸前処理トウモロコシ茎葉(whPCS)の加水分解アッセイでの性能、(f)希釈アンモニア前処理トウモロコシ茎葉(dacs)加水分解アッセイでの性能、から選択される少なくとも1つの改善された特性を有する、変異体。

【請求項2】

前記変異体が、T287、W13、L288、P19、T20、P29、A37、L3

9、D47、A48、S68、T107、S121、G122、T127、S164、G166、Q167、A168、N216、I218、I219、V224、T289、Y291、S297、T303、R304、A306、P308、S312、T313、N315、Y317、Y318、N5、I7、V12、Q15、T21、F22、S26、P28、V32、G33、T35、A36、N41、Q50、N51、K58、N59、V80、P89、T108、G116、L120、G123、V132、S135、N147、A161、A181、S183、S185、Q189、G195、T196、H200、A201、T202、I208、P222、T223、S226、S231、G235、L290、G295、G296、G298、Y299、S300、G301、P302、P307、A309、T310、P316、A319、L322、I4、I9、N10、P23、Y24、E25、N27、D38、F43、V44、Y49、P52、I54、T61、N62、K64、V69、K70、A71、I90、V91、N96、N98、D100、T103、E110、V117、L119、D124、P125、G126、V141、D146、A149、I160、H163、A171、N173、P175、I180、S187、L188、S191、L194、D197、P204、V206、L207、N209、Y211、S213、P214、Y217、T230、V232、A233、G292、Q293、Q320、及びN323からなる群から選択される位置に少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、各アミノ酸置換の前記位置が配列番号3に対応している、請求項1に記載の変異体。

【請求項3】

前記変異体が、

H、A、F、G、S、及びIからなる群から選択される、位置T287のアミノ酸置換；G、L、N、R、T、V、F、Q、Y、A、E、I、K、及びMからなる群から選択される、位置W13のアミノ酸置換；E、F、G、I、K、M、N、R、S、T、A、C、D、V、及びWからなる群から選択される、位置L288のアミノ酸置換；F、M、E、H、Q、T、K、及びWからなる群から選択される、位置P19のアミノ酸置換；K、P、G、M、R、Y、A、及びNからなる群から選択される、位置T20のアミノ酸置換；C、E、F、K、T、Y、D、G、M、R、及びSからなる群から選択される、位置P29のアミノ酸置換；D、S、E、L、W、F、K、及びQからなる群から選択される、位置A37のアミノ酸置換；A、D、E、M、T、Y、F、I、N、P、Q、S、及びVからなる群から選択される、位置L39のアミノ酸置換；A、K、T、H、R、P、及びWからなる群から選択される、位置D47のアミノ酸置換；C、E、G、K、L、N、T、Y、Q、W、H、I、及びSからなる群から選択される、位置A48のアミノ酸置換；E、I、L、M、N、T、V、及びYからなる群から選択される、位置S68のアミノ酸置換；A、D、E、K、M、R、S、及びGからなる群から選択される、位置T107のアミノ酸置換；E、F、N、T、C、L、V、D、G、K、M、及びYからなる群から選択される、位置S121のアミノ酸置換；E、N、S、V、A、M、T、F、及びLからなる群から選択される、位置G122のアミノ酸置換；A、E、F、I、L、M、V、W、及びYからなる群から選択される、位置T127のアミノ酸置換；A、D、E、G、K、L、M、Q、R、V、及びYからなる群から選択される、位置S164のアミノ酸置換；A、D、E、F、H、K、M、N、Q、及びSからなる群から選択される、位置G166のアミノ酸置換；E、A、D、F、G、K、L、N、R、V、及びYからなる群から選択される、位置Q167のアミノ酸置換；E、M、D、F、I、L、N、P、Q、R、T、及びYからなる群から選択される、位置A168のアミノ酸置換；D、Q、T、K、及びPからなる群から選択される、位置N216のアミノ酸置換；T、A、D、E、K、M、N、P、S、及びVからなる群から選択される、位置I218のアミノ酸置換；M、A、D、L、N、P、及びQからなる群から選択される、位置I219のアミノ酸置換；Q、I、A、E、N、P、S、及びTからなる群から選択される、位置V224のアミノ酸置換；A、D、K、L、M、R、及びSからなる群から選択される、位置T289のアミノ酸置換；A、F、G、I、K、L、M、N、R、S、V、W、D、及びEからなる群から

選択される、位置 Y 2 9 1 のアミノ酸置換 ; D、E、K、N、Q、R、及び T からなる群から選択される、位置 S 2 9 7 のアミノ酸置換 ; K、M、P、R、S、V、及び Y からなる群から選択される、位置 T 3 0 3 のアミノ酸置換 ; A、C、D、E、N、Q、T、及び V からなる群から選択される、位置 R 3 0 4 のアミノ酸置換 ; E、F、G、I、K、L、M、Q、T、及び Y からなる群から選択される、位置 A 3 0 6 のアミノ酸置換 ; A、G、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、W、及び Y からなる群から選択される、位置 P 3 0 8 のアミノ酸置換 ; Q、F、G、I、K、L、M、N、T、V、D、R、及び Y からなる群から選択される、位置 S 3 1 2 のアミノ酸置換 ; S、D、G、L、P、V、E、F、I、K、M、及び Y からなる群から選択される、位置 T 3 1 3 のアミノ酸置換 ; S、H、L、Q、R、V、Y、E、K、及び M からなる群から選択される、位置 N 3 1 5 のアミノ酸置換 ; Q、S、V、R、E、G、L、M、P、及び T からなる群から選択される、位置 Y 3 1 7 のアミノ酸置換 ; Y 3 1 8 T アミノ酸置換 ; A、D、G、及び S からなる群から選択される、位置 N 5 のアミノ酸置換 ; L、M、及び V からなる群から選択される、位置 I 7 のアミノ酸置換 ; M 及び T からなる群から選択される、位置 V 1 2 のアミノ酸置換 ; H、K、及び D からなる群から選択される、位置 Q 1 5 のアミノ酸置換 ; I、K、M、及び S からなる群から選択される、位置 T 2 1 のアミノ酸置換 ; K、I、L、及び R からなる群から選択される、位置 F 2 2 のアミノ酸置換 ; M、P、及び T からなる群から選択される、位置 S 2 6 のアミノ酸置換 ; M、S、及び V からなる群から選択される、位置 P 2 8 のアミノ酸置換 ; A 及び P からなる群から選択される、位置 V 3 2 のアミノ酸置換 ; Q、A、及び S からなる群から選択される、位置 G 3 3 のアミノ酸置換 ; A、D、E、K、N、及び S からなる群から選択される、位置 T 3 5 のアミノ酸置換 ; T、I、N、S、及び Y からなる群から選択される、位置 A 3 6 のアミノ酸置換 ; D、E、L、及び M からなる群から選択される、位置 N 4 1 のアミノ酸置換 ; A、T、Y、D、E、及び K からなる群から選択される、位置 Q 5 0 のアミノ酸置換 ; S、E、H、K、L、及び T からなる群から選択される、位置 N 5 1 のアミノ酸置換 ; I、R、及び V からなる群から選択される、位置 K 5 8 のアミノ酸置換 ; G、E、Q、及び S からなる群から選択される、位置 N 5 9 のアミノ酸置換 ; A、E、L、及び M からなる群から選択される、位置 V 8 0 のアミノ酸置換 ; T、S、V、及び L からなる群から選択される、位置 P 8 9 のアミノ酸置換 ; A、Q、R、及び S からなる群から選択される、位置 T 1 0 8 のアミノ酸置換 ; H、Q、及び S からなる群から選択される、位置 G 1 1 6 のアミノ酸置換 ; V、T、I、及び S からなる群から選択される、位置 L 1 2 0 のアミノ酸置換 ; E、Q、及び R からなる群から選択される、位置 G 1 2 3 のアミノ酸置換 ; D、E、M、及び R からなる群から選択される、位置 V 1 3 2 のアミノ酸置換 ; A、E、G、H、M、及び N からなる群から選択される、位置 S 1 3 5 のアミノ酸置換 ; E、M、S、及び T からなる群から選択される、位置 N 1 4 7 のアミノ酸置換 ; E、G、L、及び S からなる群から選択される、位置 A 1 6 1 のアミノ酸置換 ; K、N、及び R からなる群から選択される、位置 A 1 8 1 のアミノ酸置換 ; E、K、N、及び T からなる群から選択される、位置 S 1 8 3 のアミノ酸置換 ; D、G、及び T からなる群から選択される、位置 S 1 8 5 のアミノ酸置換 ; E、L、M、R、G、及び T からなる群から選択される、位置 Q 1 8 9 のアミノ酸置換 ; A、E、及び S からなる群から選択される、位置 G 1 9 5 のアミノ酸置換 ; H、Y、及び R からなる群から選択される、位置 T 1 9 6 のアミノ酸置換 ; R、A、Q、及び S からなる群から選択される、位置 H 2 0 0 のアミノ酸置換 ; P、K、及び Q からなる群から選択される、位置 A 2 0 1 のアミノ酸置換 ; S、E、及び Q からなる群から選択される、位置 T 2 0 2 のアミノ酸置換 ; F、L、及び V からなる群から選択される、位置 I 2 0 8 のアミノ酸置換 ; D 及び G からなる群から選択される、位置 P 2 2 2 のアミノ酸置換 ; S、E、及び Q からなる群から選択される、位置 T 2 2 3 のアミノ酸置換 ; D、G、K、M、P、及び Q からなる群から選択される、位置 S 2 2 6 のアミノ酸置換 ; C 及び I からなる群から選択される、位置 S 2 3 1 のアミノ酸置換 ; A、F、I、M、N、Q、V からなる群から選択される、位置 G 2 3 5 のアミノ酸置換 ; K、M、及び T からなる群から選択される、位置 L 2 9 0 のアミノ酸置換 ; A、F、H、Q、及び R からなる群から選択される、位置 G 2 9 5 のアミノ酸置換 ;

ノ酸置換；A及びMからなる群から選択される、位置G296のアミノ酸置換；K、A、I、N、及びQからなる群から選択される、位置G298のアミノ酸置換；N、S、F、及びPからなる群から選択される、位置Y299のアミノ酸置換；F、L、N、T、及びQからなる群から選択される、位置S300のアミノ酸置換；D、S、及びYからなる群から選択される、位置G301のアミノ酸置換；G、L、T、V、Y、及びFからなる群から選択される、位置P302のアミノ酸置換；A、F、H、L、及びVからなる群から選択される、位置P307のアミノ酸置換；I、K、R、T、V、及びYからなる群から選択される、位置A309のアミノ酸置換；L、M、Q、S、及びWからなる群から選択される、位置T310のアミノ酸置換；D、N、R、及びTからなる群から選択される、位置P316のアミノ酸置換；Q、W、D、F、及びSからなる群から選択される、位置A319のアミノ酸置換；A、E、S、T、及びVからなる群から選択される、位置L322のアミノ酸置換；V及びTからなる群から選択される、位置I4のアミノ酸置換；V及びAからなる群から選択される、位置I9のアミノ酸置換；N10Dアミノ酸置換；P23Gアミノ酸置換；Y24Tアミノ酸置換；N及びQからなる群から選択される、位置E25のアミノ酸置換；N27Eアミノ酸置換；E及びNからなる群から選択される、位置D38のアミノ酸置換；F43Yアミノ酸置換；V44Iアミノ酸置換；Y49Wアミノ酸置換；A及びNからなる群から選択される、位置P52のアミノ酸置換；Q及びEからなる群から選択される、位置I54のアミノ酸置換；Q及びSからなる群から選択される、位置T61のアミノ酸置換；N62Pアミノ酸置換；A及びQからなる群から選択される、位置K64のアミノ酸置換；V69Yアミノ酸置換；K70Rアミノ酸置換；Y及びPからなる群から選択される、位置A71のアミノ酸置換；I90Vアミノ酸置換；L及びIからなる群から選択される、位置V91のアミノ酸置換；A及びSからなる群から選択される、位置N96のアミノ酸置換；N98Hアミノ酸置換；P及びSからなる群から選択される、位置D100のアミノ酸置換；T103Aアミノ酸置換；E110Kアミノ酸置換；V117Aアミノ酸置換；N及びTからなる群から選択される、位置L119のアミノ酸置換；D124Nアミノ酸置換；P125Dアミノ酸置換；M及びQからなる群から選択される、位置G126のアミノ酸置換；V141Tアミノ酸置換；D146Eアミノ酸置換；A149Eアミノ酸置換；F及びMからなる群から選択される、位置I160のアミノ酸置換；H163Aアミノ酸置換；A171Tアミノ酸置換；N173Hアミノ酸置換；P175Fアミノ酸置換；I180Lアミノ酸置換；A及びDからなる群から選択される、位置S187のアミノ酸置換；A及びDからなる群から選択される、位置L188のアミノ酸置換；S191Dアミノ酸置換；D及びMからなる群から選択される、位置L194のアミノ酸置換；A及びVからなる群から選択される、位置D197のアミノ酸置換；P204Aアミノ酸置換；V206Iアミノ酸置換；L207Fアミノ酸置換；N209Dアミノ酸置換；Y211Aアミノ酸置換；S213Tアミノ酸置換；P214Sアミノ酸置換；Y217Hアミノ酸置換；T230Sアミノ酸置換；F及びYからなる群から選択される、位置V232のアミノ酸置換；F及びSからなる群から選択される、位置A233のアミノ酸置換；D及びKからなる群から選択される、位置G292のアミノ酸置換；K及びPからなる群から選択される、位置Q293のアミノ酸置換；Q320Rアミノ酸置換；及びN323Vアミノ酸置換のうちの1つ又は2つ以上を含む、請求項1又は2に記載の変異体。

【請求項4】

前記変異体が、1～10個のアミノ酸置換を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項5】

前記変異体が、コンビナトリアル変異体である、請求項4に記載の変異体。

【請求項6】

前記親GH61ポリペプチドが、真菌グリコシルヒドロラーゼ61a(GH61A)である、請求項1～5のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項7】

前記真菌GH61Aが、ヒボクレア ジェコリーナ (*Hypocrea jecorina*)、ヒボクレア ルーファ (*Hypocrea rufa*)、ヒボクレア オリエンタリス (*Hypocrea orientalis*)、ヒボクレア アトロビリディス (*Hypocrea atroviridis*)、ヒボクレア ビレンス (*Hypocrea virens*)、エメリセラ ニヂュランス (*Emericella nidulans*)、アスペルギルス テレウス (*Aspergillus terreus*)、アスペルギルス オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス カワチ (*Aspergillus kawachii*)、アスペルギルス フラーブス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス クラバタス (*Aspergillus clavatus*)、ゴウマノマイセス グラミニス (*Gaeumannomyces graminis*)、トリコデルマ サツニスボラム (*Trichoderma saturnisporum*)、ニューロスポラ テトラスペルマ (*Neurospora tetrasperma*)、ニューロスポラ クラッサ (*Neurospora crassa*)、ネオサルトリア フミゲート (*Neosartorya fumigata*)、ネオサルトリア フィシェリ (*Neosartorya fischeri*)、シエラビア テレストリス (*Thielavia terrestris*)、タラロマイセス属 (*Talaromyces* sp.)、スポロトリコム属 (*Sporotricum* sp.)、及びシエラビア ヘテロタリック (*Thielavia heterothallica*) 由来である、請求項6に記載の変異体。

【請求項8】

前記変異体が、配列番号3との少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項1~7のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項9】

前記変異体が、配列番号3との少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項1~8のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項10】

請求項1~9のいずれか一項に記載の親GH61ポリペプチドの変異体をエンコードするポリヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項11】

請求項10に記載のポリヌクレオチドを含むベクターであって、前記ベクターが発現ベクターである、ベクター。

【請求項12】

請求項10に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、前記宿主細胞が真菌細胞又は細菌細胞である、宿主細胞。

【請求項13】

前記真菌細胞が、トリコデルマ レーシ (*Trichoderma reesei*)、トリコデルマ ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ ビリデ (*Trichoderma viride*)、トリコデルマ コニング (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ ハルジアナム (*Trichoderma harzianum*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、フミコーラ (*Humicola*)、フミコーラ インソレンス (*Humicola insolens*)、フミコーラ グリセア (*Humicola grisea*)、クリソスポリウム (*Chrysosporium*)、クリソスポリウム ラクノウエンス (*Chrysosporium lucknowense*)、ミセリオフトラサーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、グリオクラジウム (*Gliocladium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、フザリウム (*Fusarium*)、ニューロスポラ (*Neurospora*)、ヒボクレア (*Hypocrea*)、エメリセラ (*Emericella*)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス アワモリ (*Aspergi*

illus awamori)、アスペルギルス アクレタス(Aspergillus aculeatus)、及びアスペルギルス ニヂュランス(Aspergillus nidulans)からなる群から選択される糸状菌細胞である、請求項12に記載の宿主細胞。

【請求項14】

請求項12に記載の宿主細胞を、前記変異体を産生するのに好適な条件下で、好適な培地において培養する工程を含む、変異体GH61ポリペプチドの産生方法。

【請求項15】

請求項1～9のいずれか一項に記載のGH61変異体を含む組成物であって、前記組成物が、洗剤、動物飼料、飼料添加剤、及び細胞培養上清からなる群から選択される、組成物。

【請求項16】

セルロース性基質を加水分解する方法であって、前記基質を、請求項1～9のいずれか一項に記載の変異体GH61ポリペプチドと接触させる工程を含む、方法。

【請求項17】

エタノールを産生する方法であって、セルロース性基質を、請求項1～9のいずれか一項に記載の変異体GH61ポリペプチドと接触させる工程を含む、方法。