

【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】

親グリコシリヒドロラーゼ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、D 4 7、A 4 8、S 6 8、T 1 0 7、S 1 2 1、G 1 2 2、T 1 2 7、S 1 6 4、G 1 6 6、Q 1 6 7、A 1 6 8、N 2 1 6、I 2 1 8、I 2 1 9、V 2 2 4、T 2 8 9、Y 2 9 1、S 2 9 7、T 3 0 3、R 3 0 4、A 3 0 6、P 3 0 8、S 3 1 2、T 3 1 3、N 3 1 5、Y 3 1 7、Y 3 1 8、N 5、I 7、V 1 2、Q 1 5、T 2 1、F 2 2、S 2 6、P 2 8、V 3 2、G 3 3、T 3 5、A 3 6、N 4 1、Q 5 0、N 5 1、K 5 8、N 5 9、V 8 0、P 8 9、T 1 0 8、G 1 1 6、L 1 2 0、G 1 2 3、V 1 3 2、S 1 3 5、N 1 4 7、A 1 6 1、A 1 8 1、S 1 8 3、S 1 8 5、Q 1 8 9、G 1 9 5、T 1 9 6、H 2 0 0、A 2 0 1、T 2 0 2、I 2 0 8、P 2 2 2、T 2 2 3、S 2 2 6、S 2 3 1、G 2 3 5、L 2 9 0、G 2 9 5、G 2 9 6、G 2 9 8、Y 2 9 9、S 3 0 0、G 3 0 1、P 3 0 2、P 3 0 7、A 3 0 9、T 3 1 0、P 3 1 6、A 3 1 9、L 3 2 2、I 4、I 9、N 1 0、P 2 3、Y 2 4、E 2 5、N 2 7、D 3 8、F 4 3、V 4 4、Y 4 9、P 5 2、I 5 4、T 6 1、N 6 2、K 6 4、V 6 9、K 7 0、A 7 1、I 9 0、V 9 1、N 9 6、N 9 8、D 1 0 0、T 1 0 3、E 1 1 0、V 1 1 7、L 1 1 9、D 1 2 4、P 1 2 5、G 1 2 6、V 1 4 1、D 1 4 6、A 1 4 9、I 1 6 0、H 1 6 3、A 1 7 1、N 1 7 3、P 1 7 5、I 1 8 0、S 1 8 7、L 1 8 8、S 1 9 1、L 1 9 4、D 1 9 7、P 2 0 4、V 2 0 6、L 2 0 7、N 2 0 9、Y 2 1 1、S 2 1 3、P 2 1 4、Y 2 1 7、T 2 3 0、V 2 3 2、A 2 3 3、G 2 9 2、Q 2 9 3、Q 3 2 0、及びN 3 2 3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T 2 8 7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W 1 3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L 2 8 8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P 1 9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T 2 0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P 2 9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A 3 7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L 3 9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D 4 7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A 4 8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S 6 8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T 1 0 7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S 1 2 1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G 1 2 2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T 1 2 7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S 1 6 4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G 1 6 6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Q 1 6 7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A 1 6 8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N 2 1 6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I 2 1 8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I 2 1 9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V 2 2 4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T 2 8 9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Y291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S297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T303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R304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A306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P308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S312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T313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N315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Y317のアミノ酸置換；Y318 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N5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I7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V12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Q15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T21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F22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S26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P28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V32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G33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T35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A36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N41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Q50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N51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K58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N59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V80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P89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T108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G116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L120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G123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V132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S135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N147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A161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A181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S183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S185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Q189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G195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T196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H200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A201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T202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I208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P222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T223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S226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S231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G235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L290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G295のアミ

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G H 6 1 ポリペプチドが、真菌グリコシルヒドロラーゼ6 1 a (G H 6 1 A) 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 G H 6 1 A が、ヒポクレア ジェコリーナ (*Hypocre a jecorina*)、ヒポクレア ルーファ (*Hypocre a rufa*)、ヒポクレア オリエンタリス (*Hypocre a orientalis*)、ヒポクレア アトロビリディス (*Hypocre a atroviridis*)、ヒポクレア ビレンス (*Hypocre a virens*)、エメリセラ ニデュランス (*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 saturni sporum*)、ニューロスボラ テトラスペルマ (*Neurospora tetrasperma*)、ニューロスボラ 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.*)、スポロトリクム属 (*Sporotrichum 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 G H 6 1 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 1 0 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 1 0 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 コニンギ (*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*)、クリソスボリウム (*Chrysosporium*)、クリソスボリウム ラクノウエンス (*Chrysosporium lucknowense*)、ミセリオフトラーサモフィラ (*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*)、ニューロスボラ (*Neurospora*)、ヒポクレア (*Hypocre a*)、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*

l l u s awamori)、アスペルギルス アクレタス (*A s p e r g i l l u s a c u l e a t u s*)、及びアスペルギルス ニヂュランス (*A s p e r g i l l u s n i d u l a n s*) からなる群から選択される糸状菌細胞である、請求項1 2に記載の宿主細胞。

【請求項 1 4】

請求項1 2に記載の宿主細胞を、前記変異体を產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 G H 6 1 ポリペプチドの產生方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の G H 6 1 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 1 6】

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 G H 6 1 ポリペプチドと接触させる工程を含む、方法。

【請求項 1 7】

エタノールを产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 G H 6 1 ポリペプチドと接触させる工程を含む、方法。