

【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11月24日 (2017.11.24)

【公表番号】特表2017-505636(P2017-505636A)

【公表日】平成29年2月23日 (2017.2.23)

【年通号数】公開・登録公報2017-008

【出願番号】特願2016-567156(P2016-567156)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/30 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/14 (2006.01)

C 1 2 C 7/00 (2006.01)

C 1 2 C 5/00 (2006.01)

A 2 3 K 20/189 (2016.01)

A 2 3 K 10/12 (2016.01)

A 2 3 K 20/174 (2016.01)

A 2 3 K 20/20 (2016.01)

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 P 7/04 (2006.01)

C 1 2 P 7/16 (2006.01)

C 1 2 P 5/00 (2006.01)

C 1 2 C 1/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/30

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/14

C 1 2 C 9/02

C 1 2 C 5/00

A 2 3 K 20/189

A 2 3 K 10/12

A 2 3 K 20/174

A 2 3 K 20/20

C 1 2 P 21/00

C 1 2 P 7/04

C 1 2 P 7/16

C 1 2 P 5/00

C 1 2 C 1/00

【手続補正書】

【提出日】平成29年10月11日 (2017.10.11)

【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】

酵素であって、前記酵素が、GH10キシラナーゼ又はそのキシラナーゼ活性を有するフラグメントであり、前記酵素又はそのフラグメントが、親GH10キシラナーゼ酵素と比較して向上した熱安定性を有しており、親GH10キシラナーゼが、7、33、79、217、及び298番目のうち、2ヶ所又はそれ以上の位置で改変されており、この番号付けが、FveXyn4（配列番号1）のアミノ酸番号に基づくものである、酵素。

【請求項 2】

前記親GH10キシラナーゼが、7、33、79、217及び298番目のうち、3ヶ所又はそれ以上の位置で改変されている、請求項1に記載の酵素。

【請求項 3】

前記親GH10キシラナーゼが、少なくとも、7、33、79、217及び298番目の位置で改変されている、請求項1又は請求項2に記載の酵素。

【請求項 4】

前記改変が、好ましくは、

N7D；

T33V；

K79Y、V、F、I、L又はM（好ましくはK79Y、F又はV、より好ましくはY）；

A217Q、E、P、D又はM（好ましくはA217Q、E又はP、より好ましくはQ）；及び

T298Y、F又はW（好ましくはY又はF、より好ましくはY）から選択される、請求項1～3に記載の酵素。

【請求項 5】

前記親GH10キシラナーゼが、25、57、62、64、89、103、115、147、181、193、219番目のうち、1ヶ所又はそれ以上の位置で更に改変されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の酵素。

【請求項 6】

前記改変が、

N25P；

S57Q、T若しくはV（好ましくはQ）；

N62T若しくはS（好ましくはT）；

G64T若しくはS（好ましくはT）；

S89G、N、Q、L若しくはM（好ましくはG若しくはQ、より好ましくはG）；

T103M若しくはK（好ましくはM）；

V115E若しくはL（好ましくはL）；

N147Q；

G181Q、A、D若しくはP（好ましくはQ）；

S193Y若しくはN（好ましくはY）、及び／又は

G219D若しくはP（好ましくはP）から選択される、請求項5に記載の酵素。

【請求項 7】

前記改変が、

i . N7D、N25P、T33V、G64T、K79Y、S89G、A217Q、及びT298Y；

ii . N7D、N25P、T33V、K79Y、S89G、A217Q、及びT298Y、

iii . N7D、N25P、T33V、S57Q、N62T、G64T、K79Y、T103M、V115L、N147Q、G181Q、S193Y、A217Q、G219P

、及び T 2 9 8 Y ;

i v . N 7 D、N 2 5 P、T 3 3 V、S 5 7 Q、N 6 2 T、K 7 9 Y、S 8 9 G、T 1 0 3 M、V 1 1 5 L、N 1 4 7 Q、G 1 8 1 Q、S 1 9 3 Y、A 2 1 7 Q、G 2 1 9 P、及び T 2 9 8 Y ;

v . N 7 D、T 3 3 V、S 5 7 Q、N 6 2 T、G 6 4 T、K 7 9 Y、S 8 9 G、A 2 1 7 Q、及び T 2 9 8 Y ;

v i . K 7 9 F _ _ A 2 1 7 Q _ _ T 2 9 8 F ;

v i i . N 7 D _ _ T 3 3 V _ _ A 2 1 7 Q _ _ T 2 9 8 F ;

v i i i . N 7 D _ _ K 7 9 F _ _ T 2 9 8 F ;

i x . T 3 3 V _ _ K 7 9 F _ _ A 2 1 7 Q ;

x . N 7 D _ _ T 3 3 V _ _ T 2 9 8 Y ;

x i . T 3 3 V _ _ A 2 1 7 Q _ _ T 2 9 8 Y ;

x i i . N 7 D _ _ A 2 1 7 Q _ _ T 2 9 8 F ;

x i i i . N 7 D _ _ T 3 3 V _ _ A 2 1 7 Q ;

x i v . K 7 9 F _ _ T 2 9 8 F ;

x v . N 7 D _ _ K 7 9 F ;

x v i . T 3 3 V _ _ K 7 9 F ;

x v i i . T 3 3 V _ _ T 2 9 8 Y ;

x v i i i . N 7 D _ _ T 3 3 V ;

x i x . T 3 3 V _ _ A 2 1 7 Q から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の酵素。

【請求項 8】

前記親 G H 1 0 キシラナーゼが、

a) 配列番号 1、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 3、配列番号 2 8、配列番号 2 9、若しくは配列番号 5 からなる群から選択される、アミノ酸配列を含むキシラナーゼ ; 又は

b) 配列番号 1、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 3、配列番号 2 8、配列番号 2 9、若しくは配列番号 5 と、少なくとも 7 0 % の同一性 (好適には少なくとも 8 0 %、好適には少なくとも 9 0 %、好適には少なくとも 9 5 %、好適には少なくとも 9 8 %、好適には少なくとも 9 9 % の同一性) を有するアミノ酸配列を含む、キシラナーゼ酵素 ; 又は

c) 配列番号 2、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 4、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 6、配列番号 3 2、若しくは配列番号 3 3 として本明細書に示されるヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列によってコードされるキシラナーゼ酵素 ; 又は

d) 配列番号 2、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 4、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 6、配列番号 3 2、若しくは配列番号 3 3 と、少なくとも 7 0 % の同一性 (好適には少なくとも 8 0 %、好適には少なくとも 9 0 %、好適には少なくとも 9 5 %、好適には少なくとも 9 8 %、好適には少なくとも 9 9 % の同一性) を有するヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列によってコードされる、キシラナーゼ酵素 ; 又は

e) 高ストリンジェンシー条件下で、配列番号 2、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 4、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 6、配列番号 3 2、若しくは配列番号 3 3 にハイブリダイズできるヌクレオチド配列によってコードされる、キシラナーゼ酵素である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の酵素。

【請求項 9】

酵素であって、前記酵素が、G H 1 0 キシラナーゼ又はそのキシラナーゼ活性を有するフラグメントであり、前記酵素が、7 D ; 3 3 V ; 7 9 Y、V、F、I、L 又は ; M 2 1 7 Q、E、P、D 又は M ; 及び 2 9 8 Y、F 又は W で示される位置のうち、2 ヶ所又はそれ以上においてこれらのアミノ酸を含み、この番号付けが、F v e X y n 4 (配列番号 1) のアミノ酸番号に基づくものである、酵素。

【請求項 1 0】

前記酵素が、

2 5 P ;

5 7 Q、T 若しくは V (好ましくは Q) ;

6 2 T 若しくは S (好ましくは T) ;

6 4 T 若しくは S (好ましくは T) ;

8 9 G、N、Q、L 若しくは M (好ましくは G 又は Q、より好ましくは G) ;

1 0 3 M 若しくは K (好ましくは M) ;

1 1 5 E 若しくは L (好ましくは L) ;

1 4 7 Q ;

1 8 1 Q、A、D 若しくは P (好ましくは Q) ;

1 9 3 Y 若しくは N (好ましくは Y)、及び / 又は

2 1 9 D 若しくは P (好ましくは P) で示される位置において、これらのアミノ酸のうち少なくとも 1 つを更に含む、請求項 9 に記載の酵素。

【請求項 1 1】

前記酵素が、

i . 7 D、2 5 P、3 3 V、6 4 T、7 9 Y、8 9 G、2 1 7 Q 及び 2 9 8 Y ;

ii . 7 D、2 5 P、3 3 V、7 9 Y、8 9 G、2 1 7 Q 及び 2 9 8 Y、

iii . 7 D、2 5 P、3 3 V、5 7 Q、6 2 T、6 4 T、7 9 Y、1 0 3 M、1 1 5 L、1 4 7 Q、1 8 1 Q、1 9 3 Y、2 1 7 Q、2 1 9 P 及び 2 9 8 Y ;

iv . 7 D、2 5 P、3 3 V、5 7 Q、6 2 T、7 9 Y、8 9 G、1 0 3 M、1 1 5 L、1 4 7 Q、1 8 1 Q、1 9 3 Y、2 1 7 Q、2 1 9 P 及び 2 9 8 Y ;

v . 7 D、3 3 V、5 7 Q、6 2 T、6 4 T、7 9 Y、8 9 G、2 1 7 Q 及び 2 9 8 Y

;

vi . 7 9 F __ 2 1 7 Q __ 及び 2 9 8 F ;

vii . 7 D __ 3 3 V __ 2 1 7 Q __ 及び 2 9 8 F ;

viii . 7 D __ 7 9 F __ 及び 2 9 8 F ;

ix . 3 3 V __ 7 9 F __ 及び 2 1 7 Q ;

x . 7 D __ 3 3 V __ 及び 2 9 8 Y ;

xi . 3 3 V __ 2 1 7 Q __ 及び 2 9 8 Y ;

xii . 7 D __ 2 1 7 Q 及び __ 2 9 8 F ;

xiii . 7 D __ 3 3 V __ 及び 2 1 7 Q ;

xiv . 7 9 F 及び __ 2 9 8 F ;

xv . 7 D __ 及び 7 9 F ;

xvi . 3 3 V __ 及び 7 9 F ;

xvii . 3 3 V __ 及び 2 9 8 Y ;

xviii . 7 D __ 及び 3 3 V ; 又は、

xi x . 3 3 V __ 及び 2 1 7 Q で示される位置においてこれらのアミノ酸を含む、請求項 9 又は 1 0 に記載の酵素。

【請求項 1 2】

前記酵素が、配列番号 1、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 3、配列番号 2 8、配列番号 2 9、若しくは配列番号 5 ; 又は、配列番号 2、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 4、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 6、配列番号 3 2、若しくは配列番号 3 3 として本明細書に示されるヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列によってコードされるキシラナーゼ酵素に対し ; 又は、高ストリンジェンシー条件下で、配列番号 2、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 4、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 6、配列番号 3 2、若しくは配列番号 3 3 にハイブリダイズできるヌクレオチド配列によってコードされる、キシラナーゼ酵素に対し、少なくとも 9 4 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の酵素。

【請求項 1 3】

前記酵素が、a) 配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、若しく

は配列番号 21 として本明細書に示されるアミノ酸配列のうち 1 つを含む、又は、b) 7、33、79、217 及び 298 番目の位置のアミノ酸が、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、若しくは配列番号 21 に示されるものと同一である限りは、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、若しくは配列番号 21 として本明細書に示されるアミノ酸配列と、少なくとも 96%、好ましくは少なくとも 98.5% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の酵素。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の酵素をコードする、組み換え核酸分子。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の組み換え核酸を含む、ベクター、組み換え構築物、又は宿主細胞。

【請求項 16】

前記細胞が、真菌細胞、酵母細胞、糸状菌細胞及び植物細胞からなる群から選択される、請求項 15 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】

GH10 キシラナーゼの熱安定性を向上する方法であって、親 GH10 キシラナーゼを、7、33、79、217 及び 298 番目の位置のうち少なくとも 2 ヶ所で改変することを含み、この番号付けが、FveXyn4 (配列番号 1) のアミノ酸番号に基づくものである、方法。

【請求項 18】

前記親 GH10 キシラナーゼを、7、33、79、217 及び 298 番目の位置のうち少なくとも 3 ヶ所において改変することを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 13 に記載の酵素を含む、酵素組成物又は飼料添加剤組成物。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の改変されたキシラナーゼ酵素、又は、請求項 19 に記載の酵素組成物又は飼料添加剤組成物と、少なくとも 1 種類のビタミン及び / 若しくは少なくとも 1 種類のミネラルと、を含む、プレミックス。

【請求項 21】

プロテアーゼ (例えば、スブチリシン (E.C. 3.4.21.62) 若しくはバシロリシン (E.C. 3.4.24.28) 若しくはアルカリセリンプロテアーゼ (E.C. 3.4.21.x) 若しくはケラチナーゼ (E.C. 3.4.x.x))、並びに / 又は、アミラーゼ (α -アミラーゼ (E.C. 3.2.1.1)、G4 形成アミラーゼ (E.C. 3.2.1.60)、 β -アミラーゼ (E.C. 3.2.1.2) 及び γ -アミラーゼ (E.C. 3.2.1.3) を含む)、並びに / 又は、フィターゼ (例えば、6-フィターゼ (E.C. 3.1.3.26) 若しくは 3-フィターゼ (E.C. 3.1.3.8)) からなる群から選択される、1 種類又はそれ以上の酵素を更に含む、請求項 19 に記載の飼料添加剤組成物又は請求項 20 に記載のプレミックス。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の前記酵素、又は、請求項 19 に記載の酵素組成物若しくは飼料添加剤組成物を含む、飼料 (又は家畜飼料)。

【請求項 23】

キシラン含有材料中のアラビノキシラン含有材料を分解するための、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の前記酵素、又は、請求項 19 に記載の酵素組成物若しくは飼料添加剤組成物の使用。

【請求項 24】

前記キシラン含有材料が、飼料又は家畜飼料; 飼料成分; グレイン系材料; マッシュ; 麦汁; 麦芽; 大麦麦芽; 副原料、大麦マッシュ; 及び、穀物粉からなる群のうち、1 種類又はそれ以上から選択される、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

前記キシラナーゼ酵素が、エンドグルカナーゼ (E.C. 3.2.1.4); セロビオ

ヒドロラーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 9 1)、 β - グルコシダーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 2 1)、セルラーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 7 4)、リケナーゼ (E . C . 3 . 1 . 1 . 7 3)、リパーゼ (E . C . 3 . 1 . 1 . 3)、脂質アシルトランスフェラーゼ (一般に、E . C . 2 . 3 . 1 . x に分類される)、ホスホリパーゼ (E . C . 3 . 1 . 1 . 4、E . C . 3 . 1 . 1 . 3 2、又は E . C . 3 . 1 . 1 . 5)、フィターゼ (例えば、6 - フィターゼ (E . C . 3 . 1 . 3 . 2 6) 若しくは 3 - フィターゼ (E . C . 3 . 1 . 3 . 8))、アミラーゼ、 α - アミラーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 1)、他のキシラナーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 8、E . C . 3 . 2 . 1 . 3 2、E . C . 3 . 2 . 1 . 3 7、E . C . 3 . 1 . 1 . 7 2、E . C . 3 . 1 . 1 . 7 3)、グルコアミラーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 3)、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ (例えば、スブチリシン (E . C . 3 . 4 . 2 1 . 6 2) 若しくは バシロリシン (E . C . 3 . 4 . 2 4 . 2 8) 若しくは アルカリセリンプロテアーゼ (E . C . 3 . 4 . 2 1 . x) 若しくは ケラチナーゼ (E . C . 3 . 4 . x . x))、脱分枝酵素、クチナーゼ、エステラーゼ、及び / 又は、マンナナーゼ (例えば、 β - マンナナーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 7 8)) から選択される、1 種類又はそれ以上の酵素と組み合わせて使用される、請求項 2 4 に記載の使用。