

【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 2016-533739 (P2016-533739A)

【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 2016-531773 (P2016-531773)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/42 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 3 K 1/02 (2006.01)

C 1 1 D 3/386 (2006.01)

A 2 3 K 20/189 (2016.01)

【F I】

C 1 2 N 9/42

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/21

C 1 3 K 1/02

C 1 1 D 3/386

A 2 3 K 20/189

【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】

親グリコシドヒドロラーゼファミリー 61 (GH61) 酵素の変異体であって、前記変異体は、セルラーゼ活性を有し、配列番号 3 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有し、かつ (a) 発現、(b) 熱安定性及び / 又は T_m、(c) 全加水分解産物希酸前処理トウモロコシ茎葉 (whPCS) 加水分解アッセイの性能、並びに (d) 希アンモニア前処理トウモロコシ茎葉 (daCS) 加水分解アッセイの性能から選択される少なくとも 1 つにおいて、前記親 GH61 酵素よりも向上した性質を有し、前記変異体は、配列番号 3 のアミノ酸 111 ~ 114 及び 144 ~ 163 に対応する 1 つ又は 2 つ以上の位置にて、少なくとも 1 個のアミノ酸置換を含む、変異体。

【請求項 2】

前記変異体は、向上した熱安定性及び / 又は T_m を有し、前記少なくとも 1 個のアミノ酸置換は、I144G、D146F、L148P、A149P、G151Q、G151V、N152F、N152G、N152Q、N152S、N152Y、L155M、R156S、H157W、E158W、E158Y、I159Q、I160D、I160F、A161E、A161L、A161Y、L162A、L162F、H163L、H163R

、H 1 6 3 Y、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 3】

前記変異体は、w h P C S加水分解アッセイにて向上した性能を有し、前記少なくとも 1 個のアミノ酸置換は、I 1 4 4 K、I 1 4 4 R、I 1 4 4 S、P 1 4 5 G、P 1 4 5 H、P 1 4 5 I、P 1 4 5 K、P 1 4 5 R、P 1 4 5 S、P 1 4 5 V、D 1 4 6 A、D 1 4 6 C、D 1 4 6 E、D 1 4 6 F、D 1 4 6 K、D 1 4 6 M、D 1 4 6 Q、D 1 4 6 T、D 1 4 6 Y、N 1 4 7 F、N 1 4 7 M、L 1 4 8 K、L 1 4 8 V、A 1 4 9 C、A 1 4 9 D、A 1 4 9 F、A 1 4 9 G、A 1 4 9 I、A 1 4 9 N、A 1 4 9 V、P 1 5 0 A、P 1 5 0 C、P 1 5 0 D、P 1 5 0 E、P 1 5 0 F、P 1 5 0 G、P 1 5 0 H、P 1 5 0 I、P 1 5 0 K、P 1 5 0 L、P 1 5 0 Q、G 1 5 1 E、G 1 5 1 F、G 1 5 1 H、G 1 5 1 I、G 1 5 1 K、G 1 5 1 M、G 1 5 1 P、G 1 5 1 Q、G 1 5 1 S、G 1 5 1 V、G 1 5 1 W、G 1 5 1 Y、N 1 5 2 E、N 1 5 2 F、N 1 5 2 G、N 1 5 2 H、N 1 5 2 K、N 1 5 2 P、Y 1 5 3 F、Y 1 5 3 K、Y 1 5 3 L、Y 1 5 3 M、Y 1 5 3 P、Y 1 5 3 Q、Y 1 5 3 R、Y 1 5 3 S、Y 1 5 3 V、V 1 5 4 A、V 1 5 4 C、V 1 5 4 D、V 1 5 4 E、V 1 5 4 G、V 1 5 4 H、V 1 5 4 K、V 1 5 4 N、V 1 5 4 P、V 1 5 4 Q、V 1 5 4 R、V 1 5 4 T、L 1 5 5 C、L 1 5 5 F、L 1 5 5 K、L 1 5 5 M、L 1 5 5 N、R 1 5 6 A、R 1 5 6 C、R 1 5 6 D、R 1 5 6 E、R 1 5 6 F、R 1 5 6 H、R 1 5 6 I、R 1 5 6 K、R 1 5 6 L、R 1 5 6 M、R 1 5 6 P、R 1 5 6 Q、H 1 5 7 D、E 1 5 8 A、E 1 5 8 C、E 1 5 8 D、E 1 5 8 F、E 1 5 8 H、E 1 5 8 I、E 1 5 8 L、E 1 5 8 M、E 1 5 8 N、E 1 5 8 P、E 1 5 8 S、E 1 5 8 T、E 1 5 8 W、A 1 6 1 C、L 1 6 2 I、L 1 6 2 N、H 1 6 3 A、H 1 6 3 C、H 1 6 3 D、H 1 6 3 E、H 1 6 3 F、H 1 6 3 G、H 1 6 3 I、H 1 6 3 K、H 1 6 3 M、H 1 6 3 P、H 1 6 3 R、H 1 6 3 T、H 1 6 3 V、H 1 6 3 W、H 1 6 3 Y、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の変異体。

【請求項 4】

前記変異体は、d a C S加水分解アッセイにおいて向上した性能を有し、前記少なくとも 1 個のアミノ酸置換は、F 1 1 2 V、K 1 1 3 L、K 1 1 3 M、K 1 1 3 N、K 1 1 3 R、K 1 1 3 S、I 1 1 4 F、I 1 1 4 V、I 1 4 4 F、I 1 4 4 V、P 1 4 5 A、Y 1 5 3 F、V 1 5 4 T、H 1 6 3 D、H 1 6 3 Y、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1、2、又は 3 に記載の変異体。

【請求項 5】

前記変異体は、F 1 1 2 M、F 1 1 2 W、K 1 1 3 P、K 1 1 3 T、I 1 1 4 L、I 1 1 4 M、I 1 1 4 T、I 1 4 4 A、I 1 4 4 C、I 1 4 4 D、I 1 4 4 E、I 1 4 4 H、I 1 4 4 N、I 1 4 4 P、I 1 4 4 Q、I 1 4 4 T、I 1 4 4 W、I 1 4 4 Y、P 1 4 5 C、P 1 4 5 D、P 1 4 5 E、P 1 4 5 F、P 1 4 5 L、P 1 4 5 M、P 1 4 5 N、P 1 4 5 Q、P 1 4 5 T、P 1 4 5 W、P 1 4 5 Y、D 1 4 6 G、D 1 4 6 H、D 1 4 6 I、D 1 4 6 L、D 1 4 6 N、D 1 4 6 P、D 1 4 6 R、D 1 4 6 S、D 1 4 6 V、D 1 4 6 W、N 1 4 7 A、N 1 4 7 C、N 1 4 7 D、N 1 4 7 E、N 1 4 7 G、N 1 4 7 H、N 1 4 7 I、N 1 4 7 K、N 1 4 7 L、N 1 4 7 P、N 1 4 7 Q、N 1 4 7 R、N 1 4 7 S、N 1 4 7 T、N 1 4 7 V、N 1 4 7 W、N 1 4 7 Y、L 1 4 8 A、L 1 4 8 C、L 1 4 8 D、L 1 4 8 E、L 1 4 8 F、L 1 4 8 G、L 1 4 8 H、L 1 4 8 I、L 1 4 8 M、L 1 4 8 N、L 1 4 8 Q、L 1 4 8 R、L 1 4 8 S、L 1 4 8 T、L 1 4 8 W、L 1 4 8 Y、A 1 4 9 E、A 1 4 9 H、A 1 4 9 K、A 1 4 9 L、A 1 4 9 M、A 1 4 9 Q、A 1 4 9 R、A 1 4 9 S、A 1 4 9 T、A 1 4 9 W、A 1 4 9 Y、P 1 5 0 M、P 1 5 0 N、P 1 5 0 R、P 1 5 0 S、P 1 5 0 T、P 1 5 0 V、P 1 5 0 W、P 1 5 0 Y、G 1 5 1 A、G 1 5 1 C、G 1 5 1 D、G 1 5 1 L、G 1 5 1 N、G 1 5 1 R、G 1 5 1 T、N 1 5 2 A、N 1 5 2 C、N 1 5 2 D、N 1 5 2 I、N 1 5 2 L、N 1 5 2 M、N 1 5 2 R、N 1 5 2 T、N 1 5 2 V、N 1 5 2 W、Y 1 5 3 A、Y 1 5 3 C、Y 1 5 3 D、Y 1 5 3 E、Y 1 5 3 G、Y 1 5 3 H、Y 1 5 3 I、Y 1 5 3 N、Y 1 5 3 T、Y 1 5 3 W、V 1 5 4

F、V154I、V154L、V154M、V154S、V154W、V154Y、L155A、L155D、L155E、L155G、L155H、L155I、L155P、L155Q、L155R、L155S、L155T、L155V、L155W、L155Y、R156G、R156N、R156T、R156V、R156W、R156Y、H157A、H157C、H157E、H157F、H157G、H157I、H157K、H157L、H157M、H157N、H157P、H157Q、H157R、H157S、H157T、H157V、H157Y、E158G、E158K、E158R、E158V、I159A、I159C、I159D、I159E、I159F、I159G、I159H、I159K、I159L、I159M、I159N、I159P、I159R、I159S、I159T、I159V、I159W、I159Y、I160A、I160C、I160E、I160G、I160H、I160K、I160L、I160M、I160N、I160P、I160Q、I160R、I160S、I160T、I160V、I160W、I160Y、A161D、A161F、A161G、A161H、A161I、A161K、A161M、A161N、A161P、A161Q、A161R、A161S、A161T、A161V、A161W、L162C、L162D、L162E、L162G、L162H、L162K、L162M、L162P、L162Q、L162R、L162S、L162T、L162V、L162W、L162Y、H163Q、H163S、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1個の第2のアミノ酸置換を更に含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項6】

前記変異体は、1～10個のアミノ酸置換を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項7】

前記変異体は、組み合わせ変異体である、請求項6に記載の変異体。

【請求項8】

前記親GH61ポリペプチドは、真菌グリコシルヒドロラーゼ61a (GH61A) であり、かつ前記真菌GH61Aは、ヒポクレア・ジェコリーナ (Hypocrea jecorina)、ヒポクレア・ルーファ (Hypocrea rufa)、ヒポクレア・オリエンタリス (Hypocrea orientalis)、ヒポクレア・アトロピリデイス (Hypocrea atroviridis)、ヒポクレア・ビレンス (Hypocrea 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 kawachi)、アスペルギルス・フラバス (Aspergillus flavus)、アスペルギルス・クラバタス (Aspergillus clavatus)、ゲウマノミセス・グラミニス (Gaeumannomyces graminis)、トリコデルマ・サツリスボラム (Trichoderma saturnisporum)、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)、ニューロスボラ・フミゲート (Neosartorya fumigata)、ネオサルトリヤ・フミゲート (Neosartorya fumigata)、ネオサルトリヤ・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・ヘテロタリカ (Thielavia heterothallica)に由来する、請求項1～7のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項9】

前記変異体は、配列番号3に対して少なくとも90%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】

前記変異体は、配列番号 3 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の親 GH 61 ポリペプチドの変異体を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 12】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドを含むベクターであって、前記ベクターは発現ベクターである、ベクター。

【請求項 13】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、前記宿主細胞は真菌細胞又は細菌細胞である、宿主細胞。

【請求項 14】

前記真菌細胞は、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・ハルジアウム (*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・ラックノウエンス (*Chrysosporium lucknowense*)、ミセリオフトラ・セルモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、グリオクラジウム (*Gliocladium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、フサリウム (*Fusarium*)、ニューロスポラ (*Neurospora*)、ヒポクレア (*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 (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・アキュレアタス (*Aspergillus aculeatus*)、及びアスペルギルス・ニデュランス (*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 13 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

GH 61 ポリペプチドの変異体を産生する方法であって、前記変異体を産生するのに好適な条件下において、好適な培地にて、請求項 13 に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の GH 61 変異体を含む組成物であって、前記組成物は、洗剤、飼料、飼料添加物、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 17】

セルロース基質を加水分解する方法であって、前記基質を、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の変異 GH 61 ポリペプチドと接触させることを含む、方法。

【請求項 18】

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 ~ 10 のいずれか一項に記載の変異体 GH 61 ポリペプチドと接触させることを含む、方法。