

【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Tm、(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Tm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G H 6 1ポリペプチドは、真菌グリコシルヒドロラーゼ6 1 a (G H 6 1 A)であり、かつ前記真菌G H 6 1 Aは、ヒポクレア・ジェコリーナ(*Hypocre a je corina*)、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・サツリスポラム(*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.*)、スプロトリクム属(*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G H 6 1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・コニンギ(*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 thermophilica*)、グリオクラジウム(*Gliocladium*)、アスペルギルス(*Aspergillus*)、フサリウム(*Fusarium*)、ニューロスボラ(*Neurospora*)、ヒポクレア(*Hypocreasea*)、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】

G H 6 1ポリペプチドの変異体を產生する方法であって、前記変異体を產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G H 6 1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G H 6 1ポリペプチドと接触させることを含む、方法。

【請求項 18】

エタノールを產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G H 6 1ポリペプチドと接触させることを含む、方法。