

【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22年5月13日(2010.5.13)

【公表番号】特表2009-529856(P2009-529856A)

【公表日】平成21年8月27日(2009.8.27)

【年通号数】公開・登録公報2009-034

【出願番号】特願2008-544686(P2008-544686)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(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	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	9/88	(2006.01)
C 1 2 P	13/06	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	9/88	
C 1 2 P	13/06	C

【手続補正書】

【提出日】平成22年3月19日(2010.3.19)

【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】

(a)配列番号1の塩基配列を含むDNA、

(b)配列番号1の塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリン杰ントな条件下でハイブリダイズし、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(c)配列番号2のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA、

(d)配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA、および

(e)配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列を有し、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA、  
からなる群から選択されるDNA。

【請求項2】

請求項1に記載のDNAとベクターDNAとを含む組み換えDNA。

【請求項3】

請求項2に記載の組み換えDNAで形質転換された単離細胞。

【請求項4】

培地中で請求項3に記載の細胞を培養すること、及び該培地、細胞又はその両方において

アルドラーーゼ活性を有するタンパク質を蓄積させることを含む、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質を製造する方法。

【請求項 5】

- ( a ) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質、
- ( b ) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、1又数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質、及び
- ( c ) 配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 70 % の相同性を有し、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質、

からなる群から選択されるタンパク質。

【請求項 6】

下記性質を有するタンパク質：

- ( A ) アセトアルデヒドと - ケト酪酸からの 4 - ヒドロキシ - 3 - メチル - 2 - ケト - ペンタン酸の生成を触媒する活性を有する、
- ( B ) 該活性が  $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、及び  $Mg^{2+}$  からなる群から選択される二価カチオンに依存する、
- ( C ) ゲル濾過によって測定される分子量が約 186 kDa、および
- ( D ) SDS - PAGE によって測定される 1 サブユニット当たりの分子量が約 27 kDa。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本発明の別の目的は、

( 1 ) 水性溶媒中で、

( a ) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質、

( b ) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質、および

( c ) 配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 70 % の相同性を有し、アルドラーーゼ活性を有するタンパク質、

からなる群から選択される少なくとも 1 つのアルドラーーゼの存在下で、アセトアルデヒド及び - ケト酪酸を反応させること、

( 2 ) 生成した 4 - ヒドロキシ - 3 - メチル - 2 - ケト - ペンタン酸を 4 - ヒドロキシ - L - イソロイシンに変換させること、並びに

( 3 ) 生成した 4 - ヒドロキシ - L - イソロイシンを単離すること

を含む、4 - ヒドロキシ - L - イソロイシン又はその塩を製造する方法を提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0154

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0154】

【表3】

表3. 金属<sup>2+</sup>イオン依存性のa s i H P A L活性

タンパク質	補因子 (濃度 2 mM)			
	E D T A	Z n <sup>2+</sup>	M g <sup>2+</sup>	M n <sup>2+</sup>
a s i H P A L	N D. <sup>a)</sup>	1 <sup>b)</sup>	0. 5	0. 5

<sup>a)</sup> 検出不能<sup>b)</sup> 活性は測定され、表1の脚注に記載された。Z n<sup>2+</sup>イオンの存在下で測定したa s i H P A L活性の値を1とする。