

【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21年2月26日(2009.2.26)

【公表番号】特表2008-527987(P2008-527987A)

【公表日】平成20年7月31日(2008.7.31)

【年通号数】公開・登録公報2008-030

【出願番号】特願2007-551737(P2007-551737)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成21年1月7日(2009.1.7)

【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】

標的ポリペプチドのアミノ酸配列を、そのポリペプチドをコードする標的DNA配列を改変することにより改変する方法であって、標的DNA配列にトランスポゾンを導入するステップを含み、該トランスポゾンは、その末端のそれぞれに向かう第1の制限酵素の認識配列を含み、該認識配列は、トランスポゾンの残りの部分にも、標的DNA配列中にも、あるいは標的DNA配列を含む構築物中にも存在せず、該第1の制限酵素の認識配列は、アウトサイドカッターである第1の切断酵素によって認識され、また、該トランスポゾンの末端の端を越えて位置するDNA切断部位を該第1の制限酵素が有するように位置することを特徴とする、方法。

【請求項2】

前記アミノ酸配列が、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、挿入又は置換によって改変される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

a) 前記トランスポゾン、前記標的DNA及びトランスポザーゼ酵素を混合することを含む転移反応を行うステップ、

b) 前記トランスポゾンに含まれる第1の制限酵素の認識配列を認識する第1の制限酵素により、(a)由来のDNAを消化するステップ、

c) 前記トランスポゾンを含まないDNAを分離するステップ、

d) (c)由来のDNAの分子内ライゲーション反応を行うステップ、及び

e) (d)由来のDNAからタンパク質を発現させるステップ

を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記標的ポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項5】

a) 前記トランスポゾン、前記標的DNA及びトランスポザーゼ酵素を混合することを含む転移反応を行うステップ、

b) 前記トランスポゾンに含まれる第1の制限酵素の認識配列を認識する第1の制限酵素により、(a)由来のDNAを消化するステップ、

- c) 前記トランスポゾンを含まないDNAを分離するステップ、
 - d) (c) 由来のDNAと第2のDNA配列との分子間ライゲーションを行うステップであって、第2のDNA配列は少なくとも2つの第2の制限酵素の認識部位を含み、第2の制限酵素の認識部位は切断部位の少なくとも1つが第2のDNA配列の末端にはないよう位置することを特徴とする、ステップ、
 - e) (d) 由来のDNAで宿主生物を形質転換し、前記第2のDNA配列を含む細胞を選択するステップ、
 - f) (e) において選択される細胞からDNAを単離し、そのDNAを第2の制限酵素の認識部位を認識する第2の制限酵素で消化するステップであって、第2の制限酵素はアウトサイドカッターであることを特徴とする、ステップ、
 - g) (f) 由来のDNAの分子内ライゲーションを行うステップ、及び
 - h) (g) 由来のDNAからタンパク質を発現させるステップ
- を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記第2の制限酵素が、前記第1の制限酵素と同じである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記第2のDNA配列が、第2のDNA配列を含まない細胞と比較して選択可能な特徴を第2のDNA配列を含む宿主細胞に与える遺伝子を含む、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項8】

前記標的ポリペプチドのアミノ酸配列が、さらなるアミノ酸配列の挿入により改変される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項9】

a) 前記トランスポゾン、前記標的DNA及びトランスポザーゼ酵素を混合することを含む転移反応を行うステップ、

b) 前記トランスポゾンに含まれる第1の制限酵素の認識配列を認識する第1の制限酵素により、(a) 由来のDNAを消化するステップ、

c) 前記トランスポゾンを含まないDNAを分離するステップ、

d)さらなるアミノ酸配列をコードする第3のDNA配列と(c) 由来のDNAとの分子間ライゲーションを行うステップ、及び

e) (d) 由来のDNAからタンパク質を発現させるステップ

を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記さらなるアミノ酸配列が、全タンパク質、タンパク質ドメイン又はタンパク質断片である、請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】

前記タンパク質断片がエピトープ、結合ドメイン、アロステリック部位、明確な機能領域、またはオリゴマー化の接合部分である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記第3のDNA配列が、第3のDNA配列を含まない細胞と比較して選択可能な特徴を第3のDNA配列を含む宿主細胞に与える遺伝子を含む、請求項9～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記第3のDNA配列が、前記標的DNAのものと同じオープンリーディングフレームを有する、請求項9～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記第3のDNA配列が終止コドンまたは開始コドンを含む、請求項9～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

前記第1の制限酵素がIIS型酵素である、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

前記トランスポゾンは標的部位の選択性が低い、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記トランスポゾンが、トランスポゾンを含まない細胞と比較して選択性をトランスポゾンを含む宿主細胞に与える遺伝子を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記トランスポゾンが、5'末端として5' - N G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C N - 3'のDNA配列を含むか、又は、5'末端として5' - N N N N G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C N N N N - 3'のDNA配列を含むか、又は、5'末端として5' - T G T T G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C A A C A - 3'のDNA配列を含むか、又は、5'末端として5' - C T G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C A G - 3'のDNA配列を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 19】

前記標的DNAがプラスミド中に保持される、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

末端のそれぞれに向かって制限酵素の認識配列を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法に使用するに適したトランスポゾンであって、該認識配列はトランスポゾンの残りの部分には存在せず、アウトサイドカッターである制限酵素に対する認識配列であり、また、トランスポゾンの末端の端を越えて位置するDNA切断部位を該制限酵素が有するように位置していることを特徴とする、トランスポゾン。

【請求項 21】

それぞれの制限酵素の認識配列が、トランスポゾンの末端から1から20ヌクレオチドの位置に存在している、請求項20に記載のトランスポゾン。

【請求項 22】

前記制限酵素がM1yIである、請求項20または21に記載のトランスポゾン。

【請求項 23】

a) 5'末端として5' - N G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C N - 3'のDNA配列、

b) 5'末端として5' - N N N N G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C N N N N - 3'のDNA配列、

c) 5'末端として5' - T G T T G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C A A C A - 3'のDNA配列、

d) 5'末端として5' - C T G A C T C - 3'及び3'末端として5' - G A G T C A G - 3'のDNA配列、ならびに

e) 5'末端及び/又は3'末端のDNA配列において少なくとも1つの変異を含み、転移能力を有することを特徴とする、(c)または(d)の配列、のいずれかを含む、請求項22に記載のトランスポゾン。

【請求項 24】

配列番号100で示されるDNA配列を有するプラスミドまたはその誘導体。

【請求項 25】

請求項20～23のいずれかに記載のトランスポゾンを含むキット。

【請求項 26】

a) 請求項24に記載のプラスミド、

b) トランスポザーゼ

c) 少なくとも1つの緩衝液、および

d) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチド

のいずれかをさらに含む、請求項25に記載のキット。

【請求項 27】

標的ポリペプチドに突然変異を導入することがそのポリペプチドの検出可能な活性を変えるか否かを判定する方法であって、請求項1～19のいずれかに記載の方法を含み、

a) 改変されていない標的ポリペプチドと比較して、改変された標的ポリペプチドの活性

の相違をスクリーニングするステップ、及び

b) 改変された標的ポリペプチドをシークエンシングして、アミノ酸の挿入、欠失又は置換の位置を決定するステップ
をさらに含む、方法。