

【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20年8月28日(2008.8.28)

【公表番号】特表2008-511305(P2008-511305A)

【公表日】平成20年4月17日(2008.4.17)

【年通号数】公開・登録公報2008-015

【出願番号】特願2007-529038(P2007-529038)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 C 11/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/566 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z C C A

C 1 2 N 9/12 Z N A

C 1 2 Q 1/68 A

C 4 0 B 40/06

C 1 2 N 15/00 F

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 C 11/02

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 37/00 1 0 2

【手続補正書】

【提出日】平成20年5月28日(2008.5.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

近年、染色体上の構造遺伝子または遺伝子間領域の部分配列を有するDNA断片またはヌクレオチド・オリゴマーを固定支持体に固定したDNAアレイを用いて、トランスクリプトーム解析が行われている。例えば、Olesenらは、GeneFilters (Research Genetics社製)を用いて、醸造中の下面発酵酵母の網羅的遺伝子発現解析を行った(例えば非特許文献3参照)。しかしながら、下面発酵酵母のゲノム配列が、いまだに解明されていないことから、正確にはどの遺伝子の発現をモニターしたのかは不明である。したがって、代謝解析および有用酵母の育種、ならびにビール醸造プロセス制御に適用するには、下面発酵酵母に関わる情報は極めて不十分である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

(a)で調製したゲノムDNAにTE緩衝液を加え、そしてHydroShear (Gene Machines製)等を用いてゲノムDNAを断片化する。DNA平滑化キット(タカラバイオ製)等を用いて、ゲノム断片の末端を平滑化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分画する。次いで、約1.5~2.5kbのゲノム断片をゲルから切り出し、そして該ゲルにDNA溶出用緩衝液、例えばMG溶出緩衝液(0.5mol/l酢酸アンモニウム、10mmol/l酢酸マグネシウム、1mmol/l EDTAおよび0.1% SDS)等を加えた後、約25~40で終夜振盪してDNAを溶出する。DNA溶出液をフェノール/クロロホルム処理し、そしてエタノール沈殿して、ゲノムライブラリー挿入物を得る。上記挿入物全量と、適当なベクター、例えばpUC18 SmaI/BAP (Amersham Biosciences製)等とを約10~20で、約20~50時間、T4リガーゼ(タカラバイオ製)を用いて連結に供する。連結反応産物をエタノール沈殿し、そして生じた組換えベクターDNAを適量のTE緩衝液に溶解する。エレクトロポレーション等の手段により、大腸菌、例えばElectro Cell DH5株(タカラバイオ製)を組換えベクターDNAで形質転換する。エレクトロポレーションを添付実験マニュアルに示された条件下で行うことが推奨される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

(c)コスミド・ライブラリーの調製

(a)で調製したゲノムDNAを適切な制限酵素、例えばSau3AI(タカラバイオ製)を用いた部分消化に供する。Sau3AIによって消化したDNA断片を、Super CosIベクター(Stratagene製)などのコスミド・ベクターのBamHI部位に挿入することが可能である。制限酵素処理および連結は、添付のプロトコールにしたがって行ってもよい。こうした方法によって得た連結産物を、例えばGigapack III Gold(Stratagene製)を用いたパッケージングに供し、そして添付実験手順マニュアルにしたがい、大腸菌、例えばXL1-Blue MR株(Stratagene製)に導入する。これをアンピシリンを含有するLB平板培地に塗布し、そして約30~37で終夜培養して、形質転換体を得る。生じた形質転換体を、約0.1mg/mlのアンピシリンを含有するLB培地中、96ウェルタイタープレートを用いて、約30~37終夜培養し、LBと等容量の50%グリセロール水溶液を加え、そして攪拌してグリセロールストックを得る。グリセロールストックは通常約-80で保存が可能である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

(d)DNA配列決定用のDNA断片の調製

工業用酵母のゲノム配列は、主にゲノム・ショットガン法を用いて決定可能である。上記(b)で調製したショットガン・ライブラリーを用いたPCRによって、DNA配列を決定するDNA断片を調製してもよい。具体的には、アンピシリンを含有するLB培地を、各ウェルに、各々、約50µlずつ入れた384ウェルタイタープレートに、レプリケ

ーター (Gene Solution 製) を用いて、ゲノム・ショットガン・ライブラリーのクローンを接種し、そして約 30 ~ 37 で振盪させずに終夜培養する。該培養液を、PCR 用反応溶液 (タカラバイオ製の TaKaRa Ex Taq) を、各々、約 10 μ l ずつ入れた 384 ウェル反応プレート (AB Gene 製) に、レプリケーター (Gene Solution 製) 等を用いて移し、そして Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems 製) 等を用い、牧野らによるプロトコール (DNA Research, 第 5 巻, 1 - 9 ページ (1998)) 等にしたがって PCR を行い、挿入された断片の増幅を行う。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

該反応溶液および Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosciences 製) を用いて、約 50 ~ 70 サイクルのダイターミネーター配列決定反応を行ってもよい。商業的に入手可能なキット、例えば DYEnamic ET Terminator 配列決定キットを用いる場合には、サイクルパラメータは、その添付マニュアルにしたがう。MultiScreen HV プレート (Millipore 製) 等を用い、Millipore のマニュアルにしたがって試料の精製を行う。精製した反応産物をエタノール沈殿し、そして生じた沈殿物を乾燥させ、そして約 4 の暗所で保存する。商業的に入手可能な配列決定装置および解析装置、例えば MegaBACE 1000 Sequencing System (Amersham Bioscience 製) および ABI PRISM 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems 製) 等を用い、添付のマニュアルにしたがって、乾燥産物を解析する。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

解析用ソフトウェア (Microarray Suite 5.0) を用いて、醸造用酵母の DNA とハイブリダイズした各プローブのシグナルを、半数体実験室酵母株 S288C のものに対して標準化して、そしてシグナル対数比 (2^n) として示す。表計算プログラム (マイクロソフト Excel 2000) を用いて、各染色体中の遺伝子順にしたがってシグナル対数比を並べ、そしてシグナル対数比を棒グラフで表す (例えば図 5 参照)。非 Sc 型遺伝子は、S・セレビスエ・アレイにハイブリダイズせず、したがって Sc 型遺伝子量 (gene dosage) はシグナル対数比に影響を及ぼし、そしてシグナル対数比が顕著な変化を示す箇所は、Sc 型および非 Sc 型染色体間の転座位置と見なされる。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0106

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0106】

例えば、SSU1 遺伝子および MET14 遺伝子は、それぞれ、亜硫酸輸送活性およびアデニル硫酸キナーゼ活性を有することが知られる。どちらの遺伝子も、ビールの香味を安定化させるために重要な役割を果たすことが知られる。ビール製造工程において、何ら

かの役割を果たすことが知られる S c 遺伝子との相同性解析 から得られた他の遺伝子を、以下の実施例 7 の表 2 に列挙する。しかし、これらの遺伝子は、風味があるビールの製造に十分な活性を発揮しない。したがって、いかなる限定も伴わず、アルコールまたは酒類の製造において、生産性の向上および / または香味の改善に関わる遺伝子を、工業用酵母から同定する目的のため、これらの S c 型遺伝子に対応する非 S c 型遺伝子を選択してもよい。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

配列番号 33 ~ 6236 は、本発明の非 S C タンパク質をコードする O R F に相当する。これらの配列を、c D N A プローブとして、D N A アレイに固定してもよい。配列番号 6237 ~ 75336 は、配列番号 33 ~ 6236 の各々から選択される約 25 の連続ヌクレオチドの短いヌクレオチド配列である。配列番号 166182 ~ 166489 は、配列番号 166154 ~ 166181 の D N A 配列に基づくオリゴヌクレオチドの配列に相当する。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0158

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0158】

好ましい態様において、(5) の D N A は、配列番号 75337 ~ 82784、または配列番号 82785 ~ 166153 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列を有する。配列番号 75337 ~ 82784 は、本発明の S c タンパク質 をコードする O R F に相当する。配列番号 82785 ~ 166153 は、配列番号 75337 ~ 82784 の各々から選択される、約 25 の連続ヌクレオチドの短いヌクレオチド配列である。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0171

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0171】

固体支持体へポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを高密度で付着させることにより、後述の解析を効率よく実施可能であるが、高い固定密度は常に必要なわけではない。高密度を達成するためのアレイヤーロボット等の装置は、タカラバイオ (G M S 4 1 7 A r r a y e r) 等から商業的に入手可能であり、そして商業的に入手可能な該製品を用いることも可能である。また、光リソグラフィ法等により本発明のオリゴヌクレオチドを固体支持体上で直接合成してもよい (N a t . G e n e t . 2 1 , 2 0 - 2 4 (1 9 9 9)) 。この方法では、光照射によって除去可能な保護基を有するリンカーをまず、スライドガラス等の固体支持体に付着させる。次いで、マスク (光リソグラフィマスク) を通じて光を照射して、付着部分の限定された部分にのみ、光を透過させる。次に、光照射によって除去可能な保護基を有するオリゴヌクレオチドをこの部分に添加する。したがって、ヌクレオチドとの連結反応は、照射された部分でのみ生じる。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0191

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0191】

(m) - 5 データ解析

技術マニュアルにしたがって、商業的に入手可能なソフトウェア（例えば、Affymetrix製のGCOS (GeneChip Operating Software) ; Silicon Genetics製のGeneSpring ; タカラバイオ製のImageGene ; 富士フイルム製のArray Gauge ; Amersham Pharmacia Biotech製のImageQuant等)を用い、DNAアレイのデータ解析を行うことも可能である。特徴的な発現プロフィールを示す遺伝子を同定し、そして機能解析のために選択してもよい。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0257

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0257】

形質転換に用いる選択マーカーに関しては、醸造用酵母の場合は栄養要求性マーカーが利用不能であり、そしてしたがって、G418耐性遺伝子(G418^r)、銅耐性遺伝子(CUP1)“M. Karinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第81巻, 337ページ(1984)”、セルレニン(cerulenin)耐性遺伝子(fas2m、PDR4) (“猪腰淳嗣ら, 生化学, 第64巻, 660ページ(1992)”、“M. Hussainら, Gene, 第101巻, 149ページ(1991)”)等が適用可能である。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0261

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0261】

(実施例2)

ショットガン・ライブラリーの調製

TE緩衝液を用いて、実施例1で調製した34/70株のゲノム溶液濃度を1mg/mlに調整した。その0.1mlをHydroShear (GeneMachines製; スピード: 6; 周期: 20)で処理して、ゲノムDNAを断片化した。DNA平滑化キット(タカラバイオ製)を用いて、ゲノム断片の末端を平滑化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって分画した。1.5~2.5kbのゲノム断片をゲルから切り出し、そしてDNAを溶出した。DNA溶出液をフェノール/クロロホルム処理し、そしてエタノール沈殿してゲノムライブラリー挿入物を得た。T4リガーゼ(タカラバイオ社製)を用いて、上記挿入物全量およびpUC18 SmaI/BAP (Amersham Bioscience製) 0.5 µgを、15 で15時間の連結に供した。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0262

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0262】

連結反応産物をエタノール沈殿し、そして10 µlのTE緩衝液に溶解した。添付実験マニュアルに示された条件下で、エレクトロポレーションによって、連結溶液(1 µl)を、大腸菌Electro Cell DH5 (タカラバイオ製) 40 µl挿入した。0.1 mg/mlのアンプシリン、0.1 mg/mlのX-galおよび1 mmol/l

のイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) を含有し、1.6%の寒天を含有するLB平板培地 (LB培地 (1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキスおよび1%塩化ナトリウム ; pH 7.0)) に、生じた産物を塗布し、そして37 終夜インキュベーションした。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0264

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0264】

(実施例3)

コスミド・ライブラリーの作製

実施例1で得たゲノムDNA約0.1mgをSau3AI (タカラバイオ社製) で部分消化した。マニュアルにしたがって、この断片を、Super Cos Iベクター (Stratagene製) のBamHI部位に挿入した。Gigapack III Gold (Stratagene製) を用いて、この方法によって調製した連結産物を、パッケージングに供し、そしてマニュアルにしたがって、大腸菌XL1-Blue MR株 (Stratagene製) に導入した。アンピシリン0.1mg/mlを含有するLB平板培地にこれを塗布し、そして37 で終夜インキュベーションした。96ウェルタイタープレートを用いて、0.1mg/mlのアンピシリンを含有するLB培地 (各ウェル : 50 μ l) 中、生じた形質転換体を37 で終夜培養し、そして次いで、50%グリセロール溶液50 μ lを加えた後、攪拌し、そして混合物をグリセロールストックとして用いた。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0265

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0265】

(実施例4)

DNA配列の決定

(4 - 1) DNA断片の調製

主にゲノム・ショットガン法を用いて、34/70株のゲノム配列を決定した。上記実施例2で調製したショットガン・ライブラリーから、PCR法を用いて、該方法によってDNA配列を決定しようとするDNA断片を調製した。具体的には、0.1mg/mlのアンピシリンを含有するLB培地50 μ lを各ウェルに入れた384ウェルタイタープレートに、レプリケーター (Gene Solution製) を用いて、ゲノム・ショットガン・ライブラリー由来クローンを接種し、振盪せずに、37 で終夜培養した。10 μ lのPCR用反応混合物 (タカラバイオ製 のTakara Ex Taq) を含有する384ウェル反応プレート (AB Gene製) に、レプリケーター (Gene Solution製) を用いて、該培養液を移し、そしてGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems製) を用い、牧野らのプロトコール " DNA Research , 第5巻 , 1 - 9ページ (1998) " にしたがってPCRを行い、挿入断片の増幅を行った。その後、PCR産物精製用キット (Amersham Bioscience製) によって過剰なプライマーおよびヌクレオチドの除去を行い、そしてこれをテンプレートとして用いて、配列決定反応を行った。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0267

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0267】

(4-2) 配列決定反応

2 μ l の D Y E n a m i c E T T e r m i n a t o r 配列決定キット (A m e r s h a m B i o s c i e n c e 製) および適切なプライマーと、上記 (4 - 1) で調製した PCR 産物またはコスミド DNA を混合して、約 8 μ l の反応混合物を得た。ショットガン DNA 由来の PCR 産物の配列決定反応には、M13 順方向 (M 1 3 - 2 1) プライマーおよび M13 逆方向 (M 1 3 R V) プライマー (タカラバイオ製) を用い、一方、コスミド DNA には、順方向プライマー、S S - c o s F . 1 (配列番号 7) および逆方向プライマー、S S - c o s R . 1 (配列番号 8) を用いる。プライマーおよび DNA 断片の量は、それぞれ、3 . 2 p m o l および 5 0 ~ 2 0 0 n g であった。Gene Amp PCR System 9700 を用いて、前記反応溶液を、60 サイクルのダイターミネーター配列決定反応に供した。サイクルパラメータは D Y E n a m i c E T T e r m i n a t o r 配列決定キットに添付されたマニュアルにしたがった。Multi Screen HV プレート (Millipore 製) を用い、Millipore のマニュアルにしたがって試料の精製を行った。精製した反応物を 4 の暗所で保存した。Mega BACE 1000 配列決定システム (A m e r s h a m B i o s c i e n c e 製) および A B I P R I S M 3 7 0 0 DNA 解析装置 (A p p l i e d B i o s y s t e m s 製) を用い、添付のマニュアルにしたがって、精製反応物を解析した。Mega BACE 1000 配列決定システムで得た 332, 592 配列、および 3700 DNA 解析装置で得た 13, 461 配列のデータを、サーバー Enterprise 6500 (S u n M i c r o s y s t e m s 製) へ転送し、そして保存した。346, 053 配列分のデータはゲノムサイズの約 7 倍に相当した。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0270

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0270】

(実施例6)

S . セレシエ・ゲノム配列との比較データベースの作成

S . パストリアヌスは、S . セレシエとその近縁種との自然交雑体であると信じられている “ I n t . J . S y s t . B a c t e r i o l . , 第 3 5 巻 , 5 0 8 - 5 1 1 ページ (1 9 8 5) ” 。したがって、(4 - 2) で得たコスミド DNA クローンの両端 DNA 配列 (1 0 , 0 4 4 塩基を含む) を、S . セレシエ・ゲノム配列に対しての相同性検索アルゴリズムによる相同性検索に供して、各 DNA 配列について、S . セレシエ・ゲノム配列上での相同領域の配列並列およびその同一性を決定して、データベースを作成した。コスミド DNA 配列に関して、対応する S . セレシエ・ゲノム DNA 配列との同一性分布図を図 2 に示す。コスミドの DNA 配列は、S . セレシエ・ゲノム DNA 配列と 9 4 % 以上の同一性を示す DNA 配列群、および 8 4 % 前後の同一性を示す DNA 配列群に大別された。9 4 % 以上の同一性を示す DNA 配列群を、S . セレシエ由来の S c 型 DNA 配列と名づけ、そして 8 4 % 前後の同一性を示す DNA 配列群を、近縁種のゲノム由来の非 S c 型 DNA 配列と名づける。同様に (4 - 2) で得たショットガン・クローンの両端 DNA 配列と S . セレシエ・ゲノム DNA 配列との比較データベースを作成した (表 1) 。表 1 は、3 , 6 4 8 個のコスミド・クローンの両端 DNA 配列と S . セレシエ・ゲノム DNA 配列との比較データベースの例を示す。DNA 配列決定に供したコスミドの順方向配列および逆方向配列の各 S . セレシエ・ゲノム DNA 配列上での相同領域およびその同一性を示す。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0276

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0276】

解析ソフトウェア (Microarray Suite 5.0: Affymetrix 製) を用いて、半数体実験室酵母株 S288C のものに標準化して、そしてシグナル対数比 (2^n) として示す。表計算プログラム (Microsoft Excel 2000) を用いて、各染色体中の遺伝子順にしたがってシグナル対数比を並べ、そして図 5 に示すようにシグナル対数比を棒グラフで表す。非 Sc 型遺伝子は、S. セレビスエ・アレイにハイブリダイズせず、したがって Sc 型遺伝子量はシグナル対数比に影響を及ぼし、そしてシグナル対数比が顕著な変化を示す点は、Sc 型および非 Sc 型染色体間の転座位置であると見なされる。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0304

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0304】

生じた Sc 型 MET14 および非 Sc 型 MET14 遺伝子の DNA 配列を、サンガーの方法 “Science, 第 214 巻, 1215 ページ (1981)” によってチェックした (図 11)。