

【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3月16日 (2017.3.16)

【公開番号】特開2017-29159(P2017-29159A)

【公開日】平成29年2月9日 (2017.2.9)

【年通号数】公開・登録公報2017-006

【出願番号】特願2016-185318(P2016-185318)

【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 Q 1/68 (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 5/10

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月17日 (2017.1.17)

【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】

互いに異なる配列を有する複数のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド・ライブラリーであって、それぞれのポリヌクレオチドは、2つの天然起源の非相同の完全長オープンリーディングフレームをランダムな様式でインフレームで融合することにより形成される単一の融合ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含み、

ここで1つのオープンリーディングフレームは、完全長オープンリーディングフレームの第一のポリヌクレオチド・コレクションに含まれるポリヌクレオチドの一つであり、ここで当該第一のコレクションは単一の生物の配列決定されたゲノムから同定および単離された完全長オープンリーディングフレームの少なくとも75%を含み、そして当該第一のコレクション中の他の配列に対して非相同な配列を有する複数のポリヌクレオチドを含むものであり、そして

ここで1つのオープンリーディングフレームは、完全長オープンリーディングフレームの第二のポリヌクレオチド・コレクションに含まれるポリヌクレオチドの一つであり、ここで当該第二のコレクションは単一の生物の配列決定されたゲノムから同定および単離された完全長オープンリーディングフレームの少なくとも75%を含み、そして当該第二のコレクション中の他の配列に対して非相同な配列を有する複数のポリヌクレオチドを含むものであり、

ここで当該2つの完全長非相同オープンリーディングフレームは、リンカー配列を介して連結されており、および

ここで当該第一のコレクションおよび第二のコレクションに関して当該単一の生物はサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、大腸菌 (*E. coli*) またはシアノバクテリアである、  
前記ポリヌクレオチド・ライブラリー。

【請求項 2】

リンカーが、配列番号 2 5 1 0 4 に示されるアミノ酸をコードする、請求項 1 に記載のライブラリー。

【請求項 3】

ポリヌクレオチドが、さらに単一の融合ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームの発現を制御する少なくとも 1 つの制御配列を含む、請求項 1 に記載のライブラリー。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの制御配列がプロモーターである、請求項 3 に記載のライブラリー。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの制御配列がターミネーターである、請求項 3 に記載のライブラリー。

【請求項 6】

第一および第二のポリヌクレオチド・コレクション中のオープンリーディングフレームが、5 1 ~ 3 , 0 0 0 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 に記載のライブラリー。

【請求項 7】

第一および第二のポリヌクレオチド・コレクション中のオープンリーディングフレームの数が 2 , 9 2 5 ~ 5 , 0 9 5 である、請求項 1 に記載のライブラリー。

【請求項 8】

第一および第二のポリヌクレオチド・コレクションのオープンリーディングフレームが、配列番号 1 ~ 5 0 1 9 である、請求項 1 に記載のライブラリー。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の単一の融合ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含むベクター。

【請求項 10】

発現ベクターである、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の単一の融合ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のライブラリーを製造する方法であって、以下：

( a ) プライマーセットを用いて生物の完全長オープンリーディングフレームを増幅することにより、互いに異なる配列を有する複数のポリヌクレオチドを含む第一のコレクションを生成する、ここで当該プライマーセットは、発現ベクターのプロモーター領域に相補的な 5 ' プライマーおよびリンカー配列に相補的な 3 ' プライマーを含む；

( b ) プライマーセットを用いて生物の完全長オープンリーディングフレームを増幅することにより、互いに異なる配列を有する複数のポリヌクレオチドを含む第二のコレクションを生成する、ここで当該プライマーセットは、リンカー配列に相補的な 5 ' プライマーおよび発現ベクターのターミネーター領域に相補的な 3 ' プライマーを含む；および

( c ) 工程 ( a ) のコレクションを工程 ( b ) のコレクションとランダムな様式で融合して、互いに異なる配列を有する複数のランダムに組み合わせられたポリヌクレオチドを含むライブラリーを生じる、ここでそれぞれのランダムに組み合わせられたポリヌクレオチドはインフレームで連結された 2 つの完全長非同義オープンリーディングフレームを含む単一の融合ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含み、ここで一つの完全長オープンリーディングフレームは工程 ( a ) に由来し、そして一つのオープンリーディングフレームは工程 ( b ) に由来する；

前記方法。

**【請求項 13】**

増幅した完全長オープンリーディングフレームの第一のコレクションが単一の生物の配列決定されたゲノムから同定および単離された完全長オープンリーディングフレームの少なくとも75%を含み、そして増幅した完全長オープンリーディングフレームの第二のコレクションが単一の生物の配列決定されたゲノムから同定および単離された完全長オープンリーディングフレームの少なくとも75%を含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

工程(a)のプライマーセットが、発現ベクターのプロモーター領域の一部である16ヌクレオチドの配列を含む5'プライマー、および、リンカー配列の一部に相補的な16ヌクレオチドの配列をその5'末端において含む3'プライマー、を含み；そして

工程(b)のプライマーセットが、リンカー配列の一部である16ヌクレオチドの配列を含む5'プライマー、および、発現ベクターのターミネーター領域に相補的な16ヌクレオチドの配列をその5'末端において含む3'プライマー、を含む；

請求項12に記載の方法。

**【請求項 15】**

工程(b)の5'プライマーがさらに配列番号25101に示される配列を含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 16】**

工程(b)の3'プライマーがさらに配列番号25102に示される配列を含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 17】**

工程(a)の3'プライマーがさらに配列番号25100に示される配列を含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 18】**

工程(a)のプライマーセットが、配列番号25099に示される配列を含む5'プライマーおよび配列番号25100に示される配列を含む3'プライマーを含み、そして工程(b)のプライマーセットが、配列番号25101に示される配列を含む5'プライマーおよび配列番号25102に示される配列を含む3'プライマーを含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 19】**

工程(a)のプライマーセットが、配列番号25127に示される配列を含む5'プライマーおよび配列番号25128に示される配列を含む3'プライマーを含み、そして工程(b)のプライマーセットが、配列番号25129に示される配列を含む5'プライマーおよび配列番号25130に示される配列を含む3'プライマーを含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 20】**

新規表現型を産生する方法であって、以下：

(a) 請求項1に記載のライブラリーをサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に導入する；および

(b) 同じ条件下で培養した同じ種の対照細胞と比較した際に、異なる表現型を示す細胞を単離する；

ことを含む、前記方法。

**【請求項 21】**

表現型がブタノール許容性である、請求項20に記載の方法。

**【請求項 22】**

表現型が熱許容性である、請求項20に記載の方法。

**【請求項 23】**

互いに異なる配列を有する複数のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド・ライブラリーであって、それぞれのポリヌクレオチドは、2つの非相同の完全長オープンリーディングフレームをランダムな様式でインフレームで融合することにより形成される単一の融

合ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含み、

ここで1つのオープンリーディングフレームは、完全長オープンリーディングフレームの第一のポリヌクレオチド・コレクションに含まれるポリヌクレオチドの一つであり、ここで当該第一のコレクションは、当該第一のコレクション中の他の配列のそれぞれに対して非相同な配列を有する複数のポリヌクレオチドを含む完全長のオープンリーディングフレームを含み、それは単一の生物の配列決定されたゲノムから同定および単離されたものであり、そして

ここで1つのオープンリーディングフレームは、完全長オープンリーディングフレームの第二のポリヌクレオチド・コレクションに含まれるポリヌクレオチドの一つであり、ここで当該第二のコレクションは、当該第二のコレクション中の他の配列のそれぞれに対して非相同な配列を有する複数のポリヌクレオチドを含む完全長のオープンリーディングフレームを含み、それは単一の生物の配列決定されたゲノムから同定および単離されたものであり、

当該第一のコレクションに含まれる1つのオープンリーディングフレームは、それが融合される当該第二のコレクションに含まれる1つのオープンリーディングフレームに対して上流側または下流側のいずれかに配置されており、ここで上流側のオープンリーディングフレームおよび下流側のオープンリーディングフレームは配列番号25104に示されるアミノ酸配列をコードするリンカー配列を介して連結されている、

前記ポリヌクレオチド・ライブラリー。

【請求項24】

第一のコレクションおよび第二のコレクションに関して単一の生物が、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、大腸菌 (*E. coli*) またはシアノバクテリアである、請求項23に記載のライブラリー。

【請求項25】

互いに異なる配列を有する複数のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド・ライブラリーであって、それぞれのポリヌクレオチドは、2つの天然起源の非相同の完全長オープンリーディングフレームをランダムな様式でインフレームで融合することにより形成される単一の融合ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含み、ここで

(a) プライマーセットを用いて生物の完全長オープンリーディングフレームを増幅することにより、互いに異なる配列を有する複数のポリヌクレオチドを含む第一のコレクションが生成され、ここで当該プライマーセットは、発現ベクターのプロモーター領域に相補的な5'プライマーおよびリンカー配列に相補的な3'プライマーを含む；

(b) プライマーセットを用いて生物の完全長オープンリーディングフレームを増幅することにより、互いに異なる配列を有する複数のポリヌクレオチドを含む第二のコレクションが生成され、ここで当該プライマーセットは、リンカー配列に相補的な5'プライマーおよび発現ベクターのターミネーター領域に相補的な3'プライマーを含む；そして

(c) 工程(a)のコレクションを工程(b)のコレクションとランダムな様式で融合して、互いに異なる配列を有する複数のランダムに組み合わせられたポリヌクレオチドを含むライブラリーを生じる、ここでそれぞれのランダムに組み合わせられたポリヌクレオチドはインフレームで連結された2つの完全長非同義オープンリーディングフレームを含む単一の融合ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含み、ここで一つの完全長オープンリーディングフレームは工程(a)に由来し、そして一つのオープンリーディングフレームは工程(b)に由来する；

前記ポリヌクレオチド・ライブラリー。