

【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18年1月5日(2006.1.5)

【公表番号】特表2002-505590(P2002-505590A)

【公表日】平成14年2月19日(2002.2.19)

【出願番号】特願平11-504782

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成17年7月29日(2005.7.29)

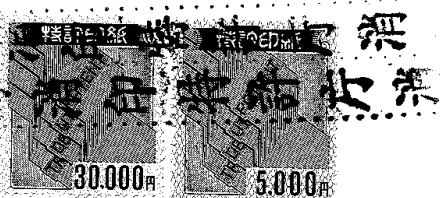
【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

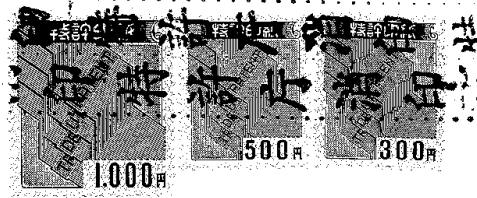
【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】



手続補正書



平成17年7月29日

(36,800円)

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成11年特許願第504782号

2. 補正をする者

名称 デイベルサ コーポレーション

3. 代理人

住所 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号  
神谷町MTビル19階

電話番号 03 (5425) 1800

氏名 (9109) 弁理士 平木 祐輔



4. 補正により増加する請求項の数 23

5. 補正対象書類名

請求の範囲

6. 補正対象項目名

請求の範囲

7. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正する。



(別紙)

## 請求の範囲

1. 原核生物のゲノム DNA サンプルをハイスループットスクリーニングにかけて、該サンプルの原核生物 DNA によりコードされる 1 以上の酵素を同定する方法であって、
  - a) 多特異的な原核生物発現ライブラリーを作製し、
  - b) 該ライブラリーのサンプルに生物活性基質を挿入し、
  - c) 生物活性蛍光を検出する蛍光検出器で該サンプルをスクリーニングし、
  - d) 生物活性蛍光について陽性と検出されたサンプルを分離する、ことを含み、DNA 配列がステップ d)で検出された生物活性基質を触媒する酵素を同定し、該酵素をコードするものである、上記方法。
2. 前記酵素がリパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、モノ-およびジオキシゲナーゼ、ハロペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ジアリールプロパンペルオキシダーゼ、エポキシドヒドロラーゼ、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、トランスアミナーゼ、アミダーゼ、およびアシラーゼからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。
3. 前記サンプルが原核細胞である、請求項 1 に記載の方法。
4. 原核細胞がグラム陰性である、請求項 3 に記載の方法。
5. 前記サンプルがゲルマイクロドロップ中にカプセル化されている、請求項 1 に記載の方法。
6. 原核生物発現ライブラリーが好極限性細菌を含む、請求項 1 に記載の方法。

7. 好極限性細菌が好熱菌である、請求項 6 に記載の方法。
8. 好極限性細菌が高好熱菌、好冷菌、好塩菌、低温菌、好塩基菌、および好酸菌からなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。
9. 生物活性基質が C12FDG である、請求項 1 に記載の方法。
10. 生物活性基質が親油性尾部をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。
11. ステップ b) の前にサンプルを加熱する、請求項 1 に記載の方法。
12. 前記加熱が約 70°C におけるものである、請求項 11 に記載の方法。
13. 前記加熱を約 30 分間行<sup>う</sup>、請求項 12 に記載の方法。
14. 蛍光分析器が FACS 装置である、請求項 1 に記載の方法。
15. 原核生物発現ライブラリーをステップ b) の前にバイオパンニングする、請求項 1 に記載の方法。
16. ステップ d) で同定された DNA によりコードされる酵素を、
  - a) 該酵素を非部位特異的突然変異誘発法にかけ、
  - b) ステップ a) で生成された変異型酵素をある変異型酵素についてスクリーニングする、各ステップを含む、一定の方向に進化させる追加のステップを含む、請求項 1 に記載の方法。
17. 標的細胞成分の活性をモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、その際、標的細胞成分と選択マーカーは組換え細胞により発現されるものであり、該薬剤を、標的細胞成分を発現する組換え細胞と検出マーカーとともに微小環境中に共カプセル化し、該薬剤が該細胞成分に及ぼす効果を検出することを含む、上記方法。
18. 前記薬剤が酵素または小さい分子である、請求項 17 に記載の方法。
19. 前記薬剤が多特異的発現ライブラリーから誘導される、請求項 17 に記載の方法。
20. 前記酵素がリパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、モノ-および

びジオキシゲナーゼ、ハロペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ジアリールプロパンペルオキシダーゼ、エポキシドヒドロラーゼ、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、トランスアミナーゼ、アミダーゼ、およびアシラーゼからなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

21. 前記薬剤が標的細胞成分の活性を抑制する、請求項 17 に記載の方法。
22. 前記薬剤が標的細胞成分の活性を増強する、請求項 17 に記載の方法。
23. 前記薬剤が標的細胞成分を発現する組換え細胞と検出マーカーとともに共カプセル化された組換え細胞から発現される、請求項 17 に記載の方法。
24. 組換え細胞が真核細胞である、請求項 23 に記載の方法。
25. 組換え細胞が原核細胞である、請求項 23 に記載の方法。
26. 微小環境がリポソーム、ゲルマイクロドロップ、ビーズ、アガロース、細胞、ゴースト赤血球、またはゴーストマクロファージである、請求項 17 に記載の方法。
27. リポソームが 1 種以上のリン脂質、糖脂質、ステロイド、リン酸アルキル、または脂肪酸エステルから調製される、請求項 26 に記載の方法。
28. リン脂質がレシチン、スフィンゴミエリンおよびジパルミトイルからなる群より選択される、請求項 27 に記載の方法。
29. ステロイドがコレステロール、コレスタノールおよびラノステロールからなる群より選択される、請求項 27 に記載の方法。
30. 検出マーカーが蛍光染料、可視染料、生物発光物質、化学発光物質、放射性物質、または酵素基質である、請求項 17 に記載の方法。
31. 生物発光物質が緑色蛍光タンパク質(GFP)または赤色蛍光タンパク質(RFP)である、請求項 30 に記載の方法。
32. 蛍光染料または可視染料の検出を蛍光光度測定または分光光度測定により行う、請求項 30 に記載の方法。

33. 前記細胞成分が伝達タンパク質である、請求項 17 に記載の方法。
34. 前記伝達タンパク質が G タンパク質である、請求項 33 に記載の方法。
35. 組換え細胞が真核細胞である、請求項 17 に記載の方法。
36. 組換え細胞が原核細胞である、請求項 17 に記載の方法。
37. DNA サンプル中の少なくとも 1 種の特定の活性の少なくとも部分的なコード領域を含む標的 DNA 配列を濃縮する方法であって、
- a) 微小環境中に、生物の混合物から得られた標的 DNA の混合物を、検出マーカーおよび特定の酵素活性を有する少なくとも 1 種の酵素をコードする DNA 配列の少なくとも一部を含む DNA プローブの混合物とともに共カプセル化し、
  - b) 共カプセル化した混合物を、相補的配列のハイブリダイゼーションを可能にする条件下および時間にわたりインキュベートし、
  - c) 特定の活性についてスクリーニングする、
- ことを含む、上記方法。
38. 回収した標的 DNA で宿主細胞を形質転換して、複数のクローンの発現ライブラリーを作製することをさらに含む、請求項 37 に記載の方法。
39. 前記生物が微生物である、請求項 37 に記載の方法。
40. 前記微生物が非培養微生物である、請求項 39 に記載の方法。
41. 前記発現ライブラリーを特定の酵素活性についてスクリーニングすることをさらに含む、請求項 37 に記載の方法。
42. DNA 集団から得られる標的 DNA が、
- a) 二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に変換し、
  - b) 変換した一本鎖 DNA から、プローブ DNA とハイブリダイズする一本鎖標的 DNA を回収し、
  - c) 回収した一本鎖標的 DNA を二本鎖 DNA に変換し、
  - d) ステップ c) の二本鎖 DNA で宿主細胞を形質転換する、
- ことにより選択される、請求項 37 に記載の方法。

43. 前記スクリーニングを FACS 分析で行う、請求項 37 に記載の方法。
44. 前記標的 DNA が遺伝子クラスター DNA である、請求項 37 に記載の方法。
45. 非培養微生物が環境サンプルに由来する、請求項 40 に記載の方法。
46. 非培養微生物が陸生微生物もしくは海洋微生物もしくは空中浮遊微生物の混合物、または陸生微生物と海洋微生物と空中浮遊微生物の混合物を含む、請求項 40 に記載の方法。
47. 前記クローンがファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、ウイルスベクター、および人工染色体からなる群より選択される構築物を含む、請求項 38 に記載の方法。
48. 標的 DNA が前記 DNA 集団の 1 以上のオペロンまたはその一部を含む、請求項 37 に記載の方法。
49. 前記オペロンまたはその一部が完全なまたは部分的な代謝経路をコードする、請求項 48 に記載の方法。
50. 非培養微生物が好極限性細菌である、請求項 40 に記載の方法。
51. 好極限性細菌が好熱菌、高好熱菌、好冷菌、好圧菌および低温菌からなる群より選択される、請求項 50 に記載の方法。
52. 宿主細胞が細菌、真菌、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞からなる群より選択される、請求項 42 に記載の方法。
53. 標的 DNA がタンパク質をコードする、請求項 37 に記載の方法。
54. 前記タンパク質が酵素である、請求項 53 に記載の方法。
55. 前記酵素がオキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、およびリガーゼからなる群より選択される、請求項 54 に記載の方法。
56. 微小環境がリポソーム、ゲルマイクロドロップ、ビーズ、アガロース、細胞、ゴースト赤血球、またはゴーストマクロファージである、請求項 37 に記載の方法。
57. リポソームが 1 種以上のリン脂質、糖脂質、ステロイド、リン酸アル

- キル、または脂肪酸エステルから調製される、請求項 56 に記載の方法。
58. リン脂質がレシチン、スフィンゴミエリンおよびジパルミトイルからなる群より選択される、請求項 57 に記載の方法。
59. ステロイドがコレステロール、コレスタノールおよびラノステロールからなる群より選択される、請求項 57 に記載の方法。
60. 検出マーカ―が蛍光染料、可視染料、生物発光物質、化学発光物質、放射性物質、または酵素基質である、請求項 37 に記載の方法。
61. 生物発光物質が緑色蛍光タンパク質(GFP)または赤色蛍光タンパク質(RFP)である、請求項 60 に記載の方法。
62. 蛍光染料または可視染料の検出を蛍光光度測定または分光光度測定により行う、請求項 60 に記載の方法。
63. DNA 結合成分に結合された第 1 の被験タンパク質と、転写活性化成分に結合された第 2 の被験タンパク質との相互作用をモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、該薬剤を第 1 の被験タンパク質および第 2 の被験タンパク質とともに適切な微小環境中に共カプセル化し、DNA 結合成分に結合された第 1 の被験タンパク質と転写活性化成分に共有結合された第 2 の被験タンパク質との相互作用をモジュレートする該薬剤の能力を判定することを含み、ここで、該薬剤は検出可能なタンパク質の発現を増強または抑制するものであり、該増強または抑制が FACS 分析により検出される、上記方法。
64. 前記薬剤が酵素または小さい分子である、請求項 63 に記載の方法。
65. 前記酵素がリパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、モノ-およびジオキシゲナーゼ、ハロペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ジアリールプロパンペルオキシダーゼ、エポキシドヒドロラーゼ、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、トランスアミナーゼ、アミダーゼ、およびアシラーゼからなる群より選択される、請求項 64 に記載の方

法。

66. 前記薬剤が第 1 タンパク質または第 2 タンパク質の活性を抑制する、請求項 63 に記載の方法。
67. 前記薬剤が第 1 タンパク質または第 2 タンパク質の活性を増強する、請求項 63 に記載の方法。
68. 前記薬剤が標的タンパク質を発現する組換え細胞と検出マーカーとともに共カプセル化された組換え細胞から発現される、請求項 63 に記載の方法。
69. 組換え細胞が真核細胞である、請求項 68 に記載の方法。
70. 組換え細胞が原核細胞である、請求項 68 に記載の方法。
71. 微小環境がリポソーム、ゲルマイクロドロップ、ビーズ、アガロース、細胞、ゴースト赤血球、またはゴーストマクロファージである、請求項 63 に記載の方法。
72. リポソームが 1 種以上のリン脂質、糖脂質、ステロイド、リン酸アルキル、または脂肪酸エステルから調製される、請求項 71 に記載の方法。
73. リン脂質がレシチン、スフィンゴミエリンおよびジパルミトイルからなる群より選択される、請求項 72 に記載の方法。
74. ステロイドがコレステロール、コレスタノールおよびラノステロールからなる群より選択される、請求項 72 に記載の方法。
75. 検出マーカーが蛍光染料、可視染料、生物発光物質、化学発光物質、放射性物質、または酵素基質である、請求項 63 に記載の方法。
76. 生物発光物質が緑色蛍光タンパク質(GFP)または赤色蛍光タンパク質(RFP)である、請求項 75 に記載の方法。
77. 蛍光染料または可視染料の検出を蛍光光度測定または分光光度測定により行う、請求項 75 に記載の方法。
78. ゲノム DNA のハイスループットスクリーニングを用いて、生物活性または生体分子を同定する方法であって、

- a) 複数のクローンを含む発現ライブラリーを提供し、該ライブラリーの作製に用いる DNA は混合生物集団から得られたものであり、
- b) 生物活性蛍光基質および該ライブラリーの少なくとも 1 つのクローンをゲルマイクロドロップ中にカプセル化し、基質は生物活性または生体分子の存在下において蛍光性であり、
- c) 生物活性蛍光を検出する蛍光検出器で該マイクロドロップをスクリーニングし、
- d) 生物活性蛍光について陽性と検出されたクローンを同定し、蛍光は生物活性または生体分子をコードする DNA を示すものである、  
ことを含む上記方法。
79. 前記生物活性がリパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、モノ-およびジオキシゲナーゼ、ハロペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ジアリールプロパンペルオキシダーゼ、エポキシドヒドロラーゼ、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、トランスアミナーゼ、アミダーゼ、およびアシラーゼからなる群より選択される酵素である、請求項 78 に記載の方法。
80. 前記ライブラリーが原核細胞中で作製される、請求項 78 に記載の方法。
81. 原核細胞がグラム陰性である、請求項 80 に記載の方法。
82. 原核細胞が大腸菌である、請求項 81 に記載の方法。
83. ステップ b)の前に、大腸菌が *Streptomyces* sp. に置き換えられる、請求項 82 に記載の方法。
84. *Streptomyces* sp. が *Streptomyces venezuelae* である、請求項 83 に記載の方法。
85. 発現ライブラリーが好極限性細菌から得られた DNA を含む、請求項 78 に記載の方法。
86. 好極限性細菌が好熱菌である、請求項 85 に記載の方法。

87. 好極限性細菌が好熱菌、好冷菌、好塩菌、低温菌、好塩基菌、および好酸菌からなる群より選択される、請求項 85 に記載の方法。
88. 生物活性基質が C12FDG である、請求項 78 に記載の方法。
89. 生物活性基質が親油性尾部を含む、請求項 78 に記載の方法。
90. ステップ b)の前にサンプルを加熱する、請求項 78 に記載の方法。
91. 前記加熱が約 70℃におけるものである、請求項 90 に記載の方法。
92. 前記加熱を約 30 分間行う、請求項 91 に記載の方法。
93. 蛍光分析器が FACS 装置である、請求項 78 に記載の方法。
94. 発現ライブラリーをステップ b)の前にバイオパンニングする、請求項 78 に記載の方法。
95. ステップ d)で同定された DNA によりコードされる酵素を、一定の方向への進化にかけ、該進化が、  
a) 該酵素を非部位特異的突然変異誘発法にかけ、  
b) ステップ a)で生成された変異型酵素をある変異型酵素についてスクリーニングする、  
各ステップを含む、請求項 78 に記載の方法。
96. 発現ライブラリーをステップ b)の前に標準化する、請求項 78 に記載の方法。
97. ステップ b)において、指標細胞を共カプセル化することをさらに含む、請求項 78 に記載の方法。
98. ライブラリーが原核生物発現ライブラリーである、請求項 78 に記載の方法。
99. 培養非依存系での原核生物ゲノム DNA のハイスループットスクリーニングを用いて、生物活性または生体分子を同定する方法であって、  
a) 複数のクローンを含む原核生物発現ライブラリーを作製し、該ライブラリーの作製に用いる DNA は混合生物集団から得られたものであり、  
b) 該ライブラリーのクローンに生物活性蛍光基質を挿入し、基質は生

物活性または生体分子の存在下において蛍光性であり、

c) 生物活性蛍光を検出する蛍光検出器で該クローンをスクリーニングし、

d) 生物活性蛍光について陽性と検出されたクローンを同定し、蛍光は生物活性または生体分子をコードする DNA を示すものである、

ことを含む上記方法。

100. スクリーニングに先立って、該クローンおよび該生物活性基質をカプセル化することをさらに含む、請求項 99 に記載の方法。