

【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19年2月15日(2007.2.15)

【公表番号】特表2002-533133(P2002-533133A)

【公表日】平成14年10月8日(2002.10.8)

【出願番号】特願2000-591212(P2000-591212)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 N	1/15	(2006.01)
C 12 N	9/00	(2006.01)
C 12 N	9/20	(2006.01)
C 12 N	9/42	(2006.01)
C 12 P	21/02	(2006.01)
C 12 N	15/01	(2006.01)
C 12 R	1/69	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	1/15	
C 12 N	9/00	
C 12 N	9/20	
C 12 N	9/42	
C 12 P	21/02	C
C 12 N	15/00	X
C 12 N	1/15	
C 12 R	1:69	

【手続補正書】

【提出日】平成18年12月21日(2006.12.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 着目のポリペプチドの生産方法であって、

(a) 親のアスペルギルス細胞の変異体を培養し、ここで(i) 前記変異体は前記ポリペプチドをコードする第一の核酸配列を含んでなり、そして(ii) 前記変異体は同一条件下で培養した時に、コウジ酸、3-ニトロプロピオン酸、エモジン、マルフォルミン、オクラトキシンおよびセカロン酸からなる群より選ばれる少なくとも1つの毒素を親のアスペルギルス細胞よりも少量生産し；そして

(b) 培地から前記ポリペプチドを単離することを含んでなる方法。

【請求項2】 前記変異体が、1または複数の毒素の生合成または分泌の原因となる少なくとも1つの遺伝子の改变の結果として前記毒素を少量生産する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記変異体が同一条件下で培養した時に前記毒素を親細胞よりも少なくとも約90%少なく生産する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 前記変異体が同一条件下で培養した時に、親のアスペルギルス細胞よりも少量の毒素を生産し、そして更にシクロピアゾン酸とアフラトキシンから選択される

少量の第二の毒素を生産する、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】 前記アスペルギルス細胞がアスペルギルス亜群ユーロチウム、ケトサルトリ亞、スクレロクレイスタ、サトイア、ネオサルトリ亞、ヘミカーペンテレス、ペトロミセス、エメリセラおよびフェネリアからなる群より選ばれる、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】 着目のポリペプチドがアスペルギルス宿主細胞にとって生来である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】 前記着目のポリペプチドがアスペルギルス宿主細胞にとって異種性である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】 前記ポリペプチドが、ホルモンまたはその前駆体形、酵素もしくは酵素変異体またはその前駆体形、抗体またはその機能性断片、レセプターまたはその機能性断片、およびレポーターからなる群より選ばれる、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】 前記酵素がアミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、ガラクトナーゼ、-ガラクトシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リバーゼ、リアーゼ、ペクテートリーゼ、マンナーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、オキシゲナーゼ、ペクチナーゼ、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼおよびキシラナーゼからなる群より選ばれる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 着目の異種ポリペプチドの生産に有用な毒素欠失アスペルギルス変異体宿主細胞であって、同一条件下で培養した時にアスペルギルス親細胞に比較して、コウジ酸、3-ニトロプロピオン酸、エモジン、マルフォルミン、オクラトキシンおよびセカロン酸からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの毒素をより少量生産させるために該細胞が遺伝的に改变されていることを特徴とする変異体細胞。

【請求項 11】 着目のポリペプチドをコードする第一の核酸配列と、前記毒素の合成または分泌の原因となる少なくとも 1 つの遺伝子の改变を含んでなる第二の核酸配列とを含んでなる、請求項 10 に記載の変異体細胞。

【請求項 12】 前記着目のポリペプチドが前記変異体細胞にとって異種性である、請求項 10～11 のいずれか一項に記載の変異体細胞。

【請求項 13】 細胞が更に、より少量のシクロピアゾン酸および/またはアフラトキシンを生産する、請求項 10～12 のいずれか一項に記載の変異体細胞。

【請求項 14】 配列番号 1 に記載のものと実質的に同じ、ジメチルアリル-シクロアセトアセチル-L-トリプトファンシンターゼをコードする核酸配列。

【請求項 15】 糸状菌宿主株における類似遺伝子の破壊のための、請求項 14 に記載の核酸配列またはその活性断片の使用。

【請求項 16】 アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 株より得られる単離されたジメチルアリル-シクロアセトアセチル-L-トリプトファンシンターゼであつて、

(a) 実質的に配列番号 2 のアミノ酸配列を有するジメチルアリル-シクロアセチル-L-トリプトファンシンターゼ；

(b) (a) の対立遺伝子変異体；および

(c) ジメチルアリル-シクロアセトアセチル-L-トリプトファンシンターゼ活性を有する、(a)または(b)の断片

からなる群より選ばれる、単離されたジメチルアリル-シクロアセトアセチル-L-トリプトファンシンターゼ。

【請求項 17】 コウジ酸、3-ニトロプロピオン酸、エモジン、マルフォルミン、

オクラトキシンおよびセカロン酸からなる群より選ばれる 1 または複数の毒素遺伝子が除去されている、異種ポリペプチドの発現に適当な変異体アスペルギルス細胞。

【請求項 18】 前記 1 または複数の毒素遺伝子の全部または一部の不可逆的欠失または破壊により 1 または複数の毒素遺伝子が除去されている、請求項 1\_7 に記載の変異体。

【請求項 19】 前記アスペルギルス細胞がアスペルギルス亜群ユーロチウム、ケトサルトリ亞、スクレロクレイスタ、サトイア、ネオサルトリ亞、ヘミカーベンテレス、ペトロミセス、エメリセラおよびフェネリアからなる群より選ばれる、請求項 1\_7 または 1\_8 のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 20】 前記毒素遺伝子が、シクロピアゾン酸、およびアフラトキシンからなる群より選ばれる 1 または複数の毒素を更にコードする、請求項 1\_7 ~ 1\_9 のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 21】 問題の前記毒素遺伝子がアフラトキシンをコードする、請求項 1\_7 ~ 2\_0 のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 22】 前記毒素遺伝子が A . オリゼのアフラトキシンクラスターからの遺伝子であり、特に omtA, afIR, pksA, Nor-1, fas-beta, fas-alpha, vber-1, avnA, ord-2 からなる群より選ばれる、請求項 1\_7 ~ 2\_1 のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 23】 親のアスペルギルス細胞が A . オリゼ、特に A . オリゼ A1560 (IF 0 0417)である、請求項 2\_2 に記載の変異体。

【請求項 24】 前記アフラトキシン遺伝子が omtA および afIR から成る群より選ばれる、請求項 2\_3 に記載の変異体。