

【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17年12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2004-525624(P2004-525624A)

【公表日】平成16年8月26日(2004.8.26)

【年通号数】公開・登録公報2004-033

【出願番号】特願2002-559584(P2002-559584)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/00 Z C C U

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成17年1月24日(2005.1.24)

【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】

個々の細胞のコレクションを含んで成るライブラリーであって、当該細胞が細胞₁、細胞₂・・・、細胞_i(ここで、i 2である)で表され、各細胞が発現可能なヌクレオチド配列を含んで成り、前記発現可能なヌクレオチド配列が、

a) 個々のオリゴヌクレオチドカセットのコンカテマーであって、以下の式：

$[rs_2\text{-SP-PR-X-TR-SP-rs}_1\text{]}_n$

(ここで、

rs₁とrs₂は一緒に制限部位を表し、

SPは少なくとも2つの塩基のスペーサーを表し、

Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

PRは、細胞内でXの発現を制御することができるプロモーターを表し、

TRはターミネーターを表し、そして

n 2である)のヌクレオチド配列を含んで成るコンカテマー、あるいは

b) 一般式：

$[PR\text{-X}]$

(ここで、

Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

そしてPRは、Xと作用可能に関連している、独立して制御可能なプロモーターを表す)を有する異種のオリゴヌクレオチドのランダムな組み合わせ、
c)以下の式：

$[rs_2\text{-SP-PR-X-TR-SP-rs}_1]$

(ここで、

rs_1 と rs_2 は一緒に制限部位を表し、

SPは少なくとも2つの塩基のスペーサーを表し、

PRは、細胞内で機能することができるプロモーターを表し、

Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

TRはターミネーターを表し、そして

前記細胞が少なくとも2つの発現カセットを含んで成り、当該発現カセットのうちの少なくとも1つが、前記細胞に対して異種の発現可能なヌクレオチド配列を含んでなる)のヌクレオチド配列を含んで成る発現カセット、

に含まれ、

そして、細胞₁の少なくとも1つのコンカテマーあるいは独立して制御可能なプロモーター又は発現カセットが、細胞₂のコンカテマーあるいは独立して制御可能なプロモーター又は発現カセットと異なる、ライブラリー。

【請求項2】

前記ライブラリーがサブライブラリーのコレクションを含んで成り、サブライブラリーが少なくとも1つ共通の表現型を有する個々の細胞のコレクションであり、当該少なくとも1つの表現型が、異例な基質上での増殖能、亜致死性濃度の毒上での増殖能、高温での増殖能、低温での増殖能、上昇した浸透圧での増殖能、低浸透圧での増殖能、高塩濃度での増殖能、低塩濃度での増殖能、上昇した金属濃度での増殖能、高CO₂濃度での増殖能、低CO₂濃度での増殖能、高O₂濃度での増殖能、低O₂濃度での増殖能、特別な分光特性を提供する能力、特別な色を提供する能力、逸脱しているGST活性を有する能力、逸脱しているP450活性を有する能力、を含んで成る群から選択される、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項3】

前記細胞が酵母細胞であり、前記酵母細胞が、出芽酵母、クルイベロマイセス・マリキシャヌス(Kluyveromyces marxianus)、K.ラクチス(K. lactis)、カンジダ・ウチリス(Candida utilis)、ファフィア・ロドザイマ(Phaffia rhodozyma)、サッカロマイセス・ボウラジイ(Saccharomyces boulardii)、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)、ハンセヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)、ヤロウィア・リポリチカ(Yarrowia lipolytica)、カンジダ・パラフィニカ(Candida paraffinica)、シュワニオマイセス・カステリイ(Schwanniomyces castellii)、ピキア・スチピチス(Pichia stipitis)、カンジダ・シェハタエ(Candida shehatae)、ロドトルラ・グルチニス(Rhodotorula glutinis)、リポマイセス・リポフェル(Lipomyces lipofer)、クリプトコッカス・クルバツス(Cryptococcus curvatus)、カンジダ種(Candida spp)(例えば、C.パルミオレオフィリア(C. palmioleophila))、ヤロウィア・リポリチカ(Yarrowia lipolytica)、カンジダ・ギリエルモンジイ(Candida guilliermondii)、カンジダ属(Candida)、ロドトルラ種(Rhodotorula spp)、サッカロマイセス種(Saccharomycopsis spp)、アウレオバシジウム・プルランス(Aureobasidium pullulans)、カンジダ・ブルンプチイ(Candida brumptii)、カンジダ・ハイドロカーボフマリカ(Candida hydrocarbofumarica)、トルロプシス属(Torulopsis)、カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis)、サッカロマイセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)、ロドトルラ・ルブラ(Rhodotorula rubra)、カンジダ・フラベリ(Candida flaveri)、エレモテシウム・アシュビイ(Eremothecium ashbyii)、ピキア種(Pichia spp.)、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)、クルイベロマイセス属(Kluyveromyces)、ハンセヌラ属(Hansenula)、クロエケラ属(Kloeckera)、ピキア属(Pichia)、パチソレン種(Pachysohlen spp.)、又はトルロプシス・ボンピコラ(Torulopsis bombicola)、あるいはそれらの変異体を含んで成る群から選択される、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項4】

実質的に全ての rs_1 - rs_2 配列が同一の制限酵素によって認識され、更に好ましくは実質的に全ての rs_1 - rs_2 配列が実質的に同一である、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項5】

1つの細胞内の少なくとも1つのカセットが、プロモーターと発現可能なヌクレオチド配列との間にイントロンを含んで成り、更に好ましくは実質的に全ての細胞内の実質的に全てのカセットが、プロモーターと発現可能なヌクレオチド配列との間にイントロンを含んで成る、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項6】

少なくとも2つの発現可能なヌクレオチド配列が異なる発現状態に由来し、当該異なる発現状態が、少なくとも2つの異なる組織、例えば少なくとも2つの器官、例えば少なくとも2つの種、例えば少なくとも2つの属を表す、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項7】

異種のオリゴヌクレオチド及び/又は発現カセットの少なくとも1つのコンカテマー及び/又はランダムな組み合わせが宿主ゲノム内に組み込まれる、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項8】

異種のオリゴヌクレオチド及び/又は発現カセットの少なくとも1つのコンカテマー及び/又はランダムな組み合わせが宿主ゲノムの人工染色体内に組み込まれる、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項9】

ランダムな組み合わせがプロモーターと異種の発現可能なヌクレオチド配列の2次元アレイから作られる、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項10】

外部から制御可能なプロモーターを含んで成る、請求項1又は2に記載のライブラリー。

【請求項11】

個々の細胞コレクションを含んで成るライブラリーを生成する方法であって：

i) 一般式 $[rs_2$ -SP-PR-X-TR-SP- $rs_1]$ (ここで、 rs_1 と rs_2 は一緒に制限部位を表し、SPは少なくとも2つの塩基のスペーサーを表し、Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、PRは細胞内でXの発現を制御することができるプロモーターを表し、TRはターミネーターを表す) を有するヌクレオチドカセット群を提供し、そして

ii) 当該カセットのランダムなサブセットを、少なくとも2つのカセットを含んで成るコンカテマー内に構築し、

iii) コンカテマーをベクター内にライゲーションし、

iv) ベクターを宿主細胞内に導入し、

v) 第一細胞の少なくとも1つのコンカテマーが、第二細胞のカセットのランダムなサブセットと異なるカセットのランダムなサブセットを含んで成るように、少なくとも2つの細胞を混合する、

段階を含んで成る方法。

【請求項12】

ベクターが人工染色体を含んで成る、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

個々の細胞コレクションを含んで成るライブラリーを生成する方法であって、

i) 5' 3' 方向に、一般式： $[RS1$ -RS2-SP-PR-CS-TR-SP-RS2-RS1'] (ここで、RS1及びRS1'は制限部位を表し、RS2はRS1及びRS1'と異なる制限部位を表し、SPは少なくとも2つのヌクレオチドのスペーサーを表し、PRはプロモーターを表し、CSはクローニング部位を表し、そしてTRはターミネーターを表す) のヌクレオチド配列を含んで成るカセットを含んで成る少なくとも2つの一次ベクターのクローニング部位内に、少なくとも2つの発現可能なヌクレオチド配列を挿入し、

ii)RS1, RS1', RS2及びRS2' に特異的な少なくとも1つの制限酵素を用いて当該カセットを切り出し、一般式[rs₂-SP-PR-X-TR-SP-rs₁] (ここで、rs₁-rs₂は一緒に制限部位を表し、そしてXは発現可能なヌクレオチド配列を表す)を有する発現カセットを獲得し、
iii)当該発現カセットをベクター内に挿入し、
iv)当該発現カセットを少なくとも2つの宿主細胞内に伝達し、そして
v)異なるカセットを有する少なくとも2つの宿主細胞を混合する、
段階を含んで成る方法。

【請求項14】

個々の細胞コレクションを含んで成るライブラリーを生成する方法であって、

i)少なくとも1つの発現可能なヌクレオチド配列を提供し、
ii)少なくとも1つの発現可能なヌクレオチド配列を、宿主細胞内で機能することができ
る制御可能なプロモーターとライゲーションして、第一の発現コンストラクトを獲得し、
iii)少なくとも1つの発現可能なヌクレオチド配列を、宿主細胞内で機能することができ
る別の独立して制御可能なプロモーターとライゲーションして、第二の発現コンストラク
トを獲得し、
iv)段階ii)及び段階iii)のコンストラクトを少なくとも2つの宿主細胞内に挿入し、
v)独立して制御可能なプロモーターと発現可能なヌクレオチド配列の異なる組み合わせを
有する少なくとも2つの細胞を混合する、
段階を含んで成る方法。

【請求項15】

請求項11～14のいずれか1項に記載の方法によって得ることができる発現ライブラ
リー。