

【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1月13日(2005.1.13)

【公表番号】特表2000-509988(P2000-509988A)

【公表日】平成12年8月8日(2000.8.8)

【出願番号】特願平9-540153

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/19

//(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:72)

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:84)

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:85)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:72

C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:84

C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:85

【手続補正書】

【提出日】平成16年4月23日(2004.4.23)

【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】

手 続 補 正 書

平成16年4月23日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

平成 9年 特許願 第540153号

2. 補正をする者

名 称 パーデュー・リサーチ・ファンデーション

3. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区
ニアサハラ法律特許事務所

電 話 3270-6641~6646

氏 名 (8970) 弁理士 社 本 一 夫

住 所 同 所

担当者 氏 名



4. 補正対象書類名

請求の範囲



5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

別紙の通り

方
式
審
査


(別紙)

請求の範囲

1. キシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ及びキシルロキナーゼをコードする遺伝子が、酵母の複数反復リボゾームDNA部位の各々に組込まれた酵母を含む、キシロースをエタノールに発酵する酵母。
2. さらにグルコースのエタノールへの発酵も行なう請求項1記載の酵母。
3. *Saccharomyces* である請求項2記載の酵母。
4. 前記部位が非転写DNA部位である請求項3記載の酵母。
5. 前記遺伝子が、非グルコース抑制プロモーターに融合されており、酵母がグルコースとキシロースのエタノールへの発酵を同時に行なう請求項1記載の酵母。
6. 前記プロモーターが誘導にキシロースを要求しない請求項5記載の酵母。
。
7. 前記遺伝子が、非グルコース抑制プロモーターに融合されており、酵母がグルコースとキシロースのエタノールへの発酵を同時に行なう請求項3記載の酵母。
8. 前記遺伝子が、非グルコース抑制プロモーターに融合されており、酵母がグルコースとキシロースのエタノールへの発酵を同時に行ない、該プロモーターが誘導にキシロースを要求しない請求項4記載の酵母。
9. 前記キシロースリダクターゼ及びキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子が、キシロースをエタノールに発酵する天然酵母由来である請求項6記載の酵母。
10. 前記天然酵母が、*Candida Shehatae*, *Pichia stipitis* または *Pachysolen tannophilus* である請求項9の酵母。
11. 前記キシルロキナーゼ遺伝子が酵母または細菌由来である請求項9記載の酵母。
12. 前記キシルロキナーゼ遺伝子が、*Candida Shehatae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*

s pombe または *Escherichia coli* 由来である請求項 1 1 記載の酵母。

13. 酵母の少なくとも約 10 個のリボソーム DNA 部位に組込まれた前記遺伝子を有する請求項 1 記載の酵母。

14. 外来 DNA の複数のコピーを細胞の反復染色体 DNA に組み込むための方法であつて、

(a) 第 1 の選択マーカーを含む外来 DNA を有する複製及び組込みプラスミドで細胞を形質転換し、そして

(b) 工程 (a) で得られた細胞を繰り返し複製し、選択マーカー含む細胞を選択しながら複数の世代の子孫細胞を生じさせ、その結果、子孫細胞の次の世代における複製及び組込プラスミドの保持を促進し、外来 DNA の複数の挿入コピーを有する子孫細胞を生じさせる

ことを含む方法。

15. 前記プラスミド DNA が、プラスミドを含む細胞を選択するための第二の選択マーカーをも含む請求項 1 4 記載の方法。

16. 細胞が酵母または真核細胞であり、さらに、工程 (b) で得られた子孫細胞を、選択マーカーを含む細胞の選択をせずに繰り返し複製して、複数の世代の子孫細胞を生じさせ、その結果次の世代の子孫細胞におけるプラスミドの喪失を促進し、外来 DNA の複数のコピーが各々染色体 DNA に組込まれた酵母細胞を回収することを含む請求項 1 4 記載の方法。

17. 前記細胞が酵母細胞であり、前記外来の DNA が、第一の選択マーカーとしても機能するキシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、及びキシリロキナーゼをコードする遺伝子を含む請求項 1 6 記載の方法。

18. (i) 酵母細胞を選択マーカーを含む外来 DNA を有する複製プラスミドで形質転換し、該外来 DNA が、宿主の DNA の反復配列に相同的な DNA 配列により各末端にフランкиングしており、

(ii) 工程 (i) で得られた形質転換された酵母細胞を繰り返し複製し、選択マーカーを含む細胞を選択しながら複数の世代の子孫細胞を生じさせ、その結果、子孫細胞の次の世代における複製プラスミドの保持を促進し、外来 DNA の複数の挿入コピーを有する子孫細胞を生じさせ、そして

(iii) 工程 (ii) からの子孫細胞を、選択マーカーを含む細胞の選択をせずに複製して、複数の世代の子孫細胞を製造し、その結果、次の世代の子孫細胞におけるプラスミドの喪失を促進し、外来DNAの複数のコピーが各々染色体DNAに組込まれた酵母細胞を回収することを含む請求項14記載の方法。

19. 請求項18記載の方法により生産される酵母細胞。

20. 前記外来DNAが、キシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、及びキシルロキナーゼをコードする遺伝子を含み、前記酵母細胞が、キシロースをエタノールに発酵する請求項19記載の酵母細胞。

21. 前記遺伝子が、誘導にキシロースを要求しない非グルコース抑制プロモーターに融合しており、前記酵母細胞が、グルコースとキシロースを同時にエタノールに発酵する請求項20記載の酵母細胞。

22. 非選択性条件で培養した場合に、キシロースをエタノールに発酵する能力を、少なくとも20世代の間実質的に維持する請求項21記載の酵母細胞。

23. キシロースをエタノールに発酵する酵母であって、

該酵母の染色体DNAに組み込まれた外来DNAの複数のコピーを有し、前記外来DNAが、非グルコース抑制プロモーターに融合したキシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、及びキシルロキナーゼをコードする遺伝子を含み、前記酵母が、グルコースとキシロースを同時にエタノールに発酵し、そして非選択性条件で培養した場合に、キシロースをエタノールに発酵する能力を、少なくとも20世代の間実質的に維持する酵母を含む酵母。

24. 前記プロモーターが誘導にキシロースを要求しない請求項23記載の酵母。

25. キシロースをエタノールに発酵する酵母であって、

キシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、及びキシルロキナーゼをコードする遺伝子を有する、導入されたDNAの複数のコピーを含み、前記酵母がキシロースをエタノールに発酵し、そして非選択性条件で培養した場合に、キシロースをエタノールに発酵する能力を、少なくとも20世代の間実質的に維持する酵母を含む酵母。

26. 前記プロモーターが誘導にキシロースを要求しない請求項25記載の酵母。

27. 請求項1、22、23、24、25または26記載の酵母を用いて、キシロース含有培地を発酵してエタノールを生産することを含む、キシロースのエタノールへの発酵方法。

28. 第一の選択マーカーを含む外来DNA配列を標的酵母細胞の染色体DNAに組込むためのプラスミドベクターであって、機能的な酵母DNA複製起点と、標的酵母細胞のリボソームDNAの反復配列に相同的なDNAフランкиング配列により各末端にフランкиングする外来DNAを含み、該プラスミドは、さらに第二の選択マーカーをDNAフランкиング配列の間以外の位置に有するプラスミドベクター。

29. 外来DNA配列を酵母に組み込んで、キシロースをエタノールに発酵する安定な組込み体を形成するためのプラスミドベクターであって、機能的な酵母DNA複製起点と、標的酵母細胞の反復DNA配列に相同的なDNAフランкиング配列により各末端にフランкиングするキシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、及びキシリロキナーゼをコードする遺伝子を含む外来DNAを含むプラスミドベクター。

30. 外来DNA断片のコピーが複数組み込まれた細胞を形成するための方法であって、反復ゲノムDNAを有し、外来DNAを含む複製及び組込プラスミドを含む細胞を複製し、選択マーカーを含む細胞を選択しながら複数の世代の子孫細胞を生じさせ、その結果、子孫細胞の次の世代における複製及び組込みプラスミドの保持を促進し、外来DNAの複数の組込コピーを有する子孫細胞を生じさせることを含む方法。