

【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7月13日(2006.7.13)

【公表番号】特表2002-515253(P2002-515253A)

【公表日】平成14年5月28日(2002.5.28)

【出願番号】特願2000-549743(P2000-549743)

【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 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 9/88 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 R 1/77 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 9/88

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 1/15

C 1 2 R 1:77

C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:77

【手続補正書】

【提出日】平成18年5月19日(2006.5.19)

【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】 異種ポリペプチドの製造方法であって、

(a) 親系状菌細胞の変異体を前記異種ポリペプチドの生成の助けとなる条件下で培養し、ここで、前記変異体が、前記異種ポリペプチドをコードする第1核酸配列、及びtri3, tri4, tri5, tri6, tri11, tri12及びtri101から成る群から選択されるトリコテセンの生成に関与する遺伝子の少なくとも1つの遺伝子の修飾を含んで成る第2核酸配列を含んで成り、そして前記変異体が、同じ条件下で培養される場合、親系状菌細胞よりもトリコテセンを少なくとも約25%少なく生成し；そして

(b) 前記培養培地から前記異種ポリペプチドを単離する；

ことを含んで成る方法。

【請求項2】 前記系状菌細胞がフサリウム(Fusarium)の株である請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記異種ポリペプチドが、ホルモン、ホルモン変異体、酵素、受容体もしくはその一部、抗体もしくはその一部、又はレポーターである請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 前記変異体細胞が1又は複数の第3核酸配列の1又は複数の修飾をさらに含んで成り、ここで前記修飾が前記1又は複数の第3核酸配列の発現を低めるか又は排除する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】 前記 1 又は複数の第 3 核酸配列が、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、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リ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、インペルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、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、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、及びキシラナーゼから成る群から選択された酵素を独立してコードする請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 異種ポリペプチドをコードする第 1 核酸配列、及び tri3, tri4, tri5, tri6, tri11, tri12 及び tri101 から成る群から選択されるトリコテセンの生成を担当する遺伝子の少なくとも 1 つの修飾を含んで成る第 2 核酸配列を含んで成る、糸状菌細胞のトリコテセン - 欠失変異体細胞であって、同じ条件下で培養される場合、変異体細胞のトリコテセンの生成が親糸状菌細胞よりも少なくとも約 25% 少ない、ことを特徴とする変異体細胞。

【請求項 7】 前記糸状菌細胞がフサリウム (Fusarium) の株である請求項 6 に記載の変異体細胞。

【請求項 8】 前記異種ポリペプチドが、ホルモン、ホルモン変異体、酵素、受容体又はその一部、抗体又はその一部、又はレポーターである、請求項 6 又は 7 に記載の変異体細胞。

【請求項 9】 前記変異体細胞が 1 又は複数の第 3 核酸配列の 1 又は複数の修飾をさらに含んで成り、ここで前記修飾が前記 1 又は複数の第 3 核酸配列の発現を低めるか又は排除する請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の変異体細胞。

【請求項 10】 前記 1 又は複数の第 3 核酸配列が、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、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リ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、インペルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、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、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、及びキシラナーゼから成る群から選択された酵素を独立してコードする、請求項 9 に記載の変異体細胞。

【請求項 11】 請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項記載の変異体細胞を得るための方法であって、

(a) トリコテセンの生成を担当する少なくとも 1 つ遺伝子の修飾を含んで成る核酸配列を、親糸状菌細胞中に導入し；そして

(b) 同じ条件下で培養される場合、前記変異体細胞の親糸状菌細胞よりもトリコテセンを低く生成する変異体を、前記段階 (a) から同定することを含んで成る方法。

【請求項 12】 トリコジエンシンターゼをコードする単離された核酸であって、当該トリコジエンシンターゼが、

(a) 配列番号 2 アミノ酸配列を含んであるトリコジエンシンターゼ；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入を含んで成る、トリコジエンシンターゼの変異体；

(c) 上記 (a) 又は (b) の対立遺伝子変異体；及び

(d) トリコジエンシンターゼ活性を有する、(a) 又は (c) のフラグメント；

から成る群から選択される、トリコジエンシンターゼをコードする核酸。

【請求項 13】 変異体細胞を得るための方法であって、

(a) 第 1 遺伝子生成物をコードする第 1 核酸配列を有する親細胞中に、選択マーカーとしての硝酸レダクターゼ遺伝子及び前記第 1 核酸配列の修飾体を含んで成る第 1 核酸構造体を導入し、前記修飾された第 1 核酸配列により前記内因性第 1 核酸配列が置換され、

ここで前記第1構造体が親細胞のゲノム中に組み込まれ、同じ条件下で培養される場合、親細胞に比較して、前記第1遺伝子生成物の低められた生成をもたらす；そして

(b) 前記硝酸レダクターゼ遺伝子の存在、及び前記第1遺伝子生成物の低められた生成について、段階(a)から変異体細胞を選択する；

ことを含んで成る方法。

【請求項14】 (c) 硝酸レダクターゼ遺伝子が欠失されている培養条件下で段階(b)からの変異体細胞を選択することをさらに含んで成る、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 (c) 段階(b)からの変異体細胞中に、修飾された第1核酸配列の5'及び3'側領域を含んで成る第2核酸配列を含んで成るが、しかし硝酸レダクターゼ遺伝子を欠いている第2核酸構造体を導入し、ここで前記第2構造体が親細胞のゲノム中に組み込まれ、前記第2核酸配列により前記修飾された第1核酸配列が置換され；そして

(d) 硝酸レダクターゼ遺伝子が欠失されている培養条件下で段階(c)からの変異体細胞を選択する；

ことをさらに含んで成る請求項13記載の方法。

【請求項16】 請求項13~15のいずれか1項に記載の方法により得られる変異体細胞。

【請求項17】 ポリペプチドの製造方法であって、

(a) ポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る請求項16に記載の変異体細胞を、前記ポリペプチドの生成を助ける条件下で培養し；そして

(b) 前記変異体細胞の培養培地から前記ポリペプチドを単離する；

ことを含んで成る方法。

【請求項18】 細胞に含まれる標的核酸配列中に変更を導入するための方法であって；

(a) マーカーカセットを形成するために、ヌクレオチド配列反復体を末端に有する硝酸レダクターゼ選択マーカー遺伝子を含んで成る核酸構造体を、親細胞中に導入することによって親細胞の変異体細胞を得、ここで前記反復体は標的DNAの5'側に隣接するヌクレオチド配列又は3'側に隣接するヌクレオチド配列から成り；そしてさらに、

前記端に接するヌクレオチド配列反復体が標的DNAの5'側ヌクレオチド配列から成る場合、前記核酸構造体がさらに、前記マーカーカセットの3'側に、且つそのカセットに隣接して、前記標的DNA配列の3'側のヌクレオチド配列から成る追加のヌクレオチド配列を含んで成り；そして

前記端に接するヌクレオチド配列反復体が標的DNAの3'側ヌクレオチド配列から成る場合、前記核酸構造体がさらに、前記マーカーカセットの5'側に、且つそのカセットに隣接して、前記標的DNA配列の5'側のヌクレオチド配列から成る追加のヌクレオチド配列を含んで成り；

(b) 前記硝酸レダクターゼ遺伝子の存在について選択することによって、段階(a)から変異体細胞選択し；

(c) 前記選択された変異体細胞を、前記端に接するヌクレオチド配列反復体間での組換えによる前記硝酸レダクターゼ遺伝子の欠失をもたらす条件下で培養し；そして

(d) 前記硝酸レダクターゼ遺伝子が前記変異体細胞から欠失されている標的核酸配列における変更を有する変異体細胞を選択する；

ことを含んで成る方法。

【請求項19】 請求項18に記載の方法により得られる変異体細胞。

【請求項20】 ポリペプチドを生成するための方法であって、

(a) ポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る請求項19に記載の変異体細胞を、前記ポリペプチドの生成を助ける条件下で培養し；そして

(b) 前記変異体細胞の培養培地から前記ポリペプチドを単離する；

ことを含んで成る方法。