

【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2月2日(2006.2.2)

【公表番号】特表2005-511049(P2005-511049A)

【公表日】平成17年4月28日(2005.4.28)

【年通号数】公開・登録公報2005-017

【出願番号】特願2003-549524(P2003-549524)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	14/47	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/02	E
C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	5/00	B

【手続補正書】

【提出日】平成17年12月7日(2005.12.7)

【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】

人工転写因子をコーディングする異種核酸を含む変形細胞であって、前記人工転写因子は、前記変形細胞と実質的に同じであり、かつ異種核酸および人工転写因子を欠く対照細胞に比べて変形細胞にストレス抵抗性を与える、変形細胞。

【請求項2】

前記人工転写因子が2つのジンクフィンガードメインを含む請求項1記載の変形細胞。

【請求項3】

前記細胞が細菌細胞である請求項1記載の変形細胞。

【請求項4】

前記細胞が真核細胞である請求項1記載の変形細胞。

【請求項5】

前記ストレス抵抗性が、熱抵抗性、溶媒抵抗性、重金属抵抗性、浸透圧抵抗性、極限pH抵抗性、化学物質抵抗性、寒さ抵抗性、遺伝子毒性製剤抵抗性および放射能抵抗性の形質のうち一つ以上を含む請求項2記載の変形細胞。

【請求項6】

前記変形細胞が、人工転写因子を発現し、人工転写因子を欠く実質的に同一の培養細胞に比べて増大したストレス抵抗性を示すことを特徴とする請求項1記載の変形細胞。

【請求項7】

標的タンパク質をコーディングする遺伝子、および前記人工キメラタンパク質をコーディングする配列を含む異種核酸を含み、前記人工キメラタンパク質が(1)異種核酸を含まない細胞に比べて細胞のタンパク質生産量を増加させ、また(2)標的タンパク質をコーディングする遺伝子の転写を直接的に調節する転写調節領域に結合していない細胞。

【請求項8】

前記人工キメラタンパク質が2つのジンクフィンガードメインを含み、DNAに結合することを特徴とする請求項7記載の細胞。

【請求項9】

前記細胞が真核細胞であり、人工キメラタンパク質がゲノム(genomic)DNA部位に結合するためにP B 0 8、K\_F 0 2またはK\_D 1 0と競争することを特徴とする請求項7記載の細胞。

【請求項10】

前記人工キメラタンパク質が細胞の細胞周期進行速度を変化させる請求項7記載の細胞。

【請求項11】

前記遺伝子が内生遺伝子である請求項7記載の細胞。

【請求項12】

(1)人工転写因子を含まない細胞に比べて真核細胞による標的タンパク質の生産量を増加させ、また(2)標的タンパク質をコーディングする遺伝子の転写を直接的に調節する転写調節領域に結合しない人工転写因子。

【請求項13】

分泌タンパク質をコーディングする内生遺伝子および人工転写因子をコーディングする配列を含む異種核酸を含む細胞であって、前記人工転写因子が異種核酸を含まない細胞に比べて細胞の分泌タンパク質の生産量を増加させる細胞。

【請求項14】

前記細胞が真核細胞であり、分泌タンパク質がインシュリンである請求項13記載の細胞。

。

【請求項15】

前記人工転写因子が、08\_D04\_p65が特異的に結合する内生DNA部位に特異的に結合することを特徴とする請求項13記載の細胞。

【請求項16】

前記人工転写因子が、内生DNA部位に特異的に結合し、内生DNA部位に結合するために08\_D04\_p65と競争する請求項13記載の細胞。

【請求項17】

前記人工転写因子が下記のアミノ酸配列を含む請求項13記載の細胞：

C X ( 2 - 5 ) C X X X B X R X S H J X R H X ( 3 - 5 ) H X ( 1 - 6 ) B X C X ( 2 - 5 ) C X X X B X R X D H J X T H X ( 3 - 5 ) H ( 配列番号：45 ) ; または C X ( 2 - 5 ) C X X X B X R X D H J X T H X ( 3 - 5 ) H X ( 1 - 6 ) B X C X ( 2 - 5 ) C X X X B X V X S S J X R H X ( 3 - 5 ) H ( 配列番号：46 )

(ここで、Bはフェニルアラニンまたはチロシンであり、Jは疎水性アミノ酸である。)

**【請求項 18】**

3つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子をコーディングする配列を含み、前記人工転写因子の発現が少なくとも一つの脊椎動物細胞において神経細胞の表現型を誘導する核酸。

**【請求項 19】**

前記ジンクフィンガードメインのうち、少なくとも一つが下記の配列を有する請求項 18 記載の核酸：

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Glu - X<sub>b</sub> - X - Ser - Asn - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：250)

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Glu - X<sub>b</sub> - X - Ser - Asn - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：251)；または

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Cys - X<sub>b</sub> - X - Ser - Asn - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：252)

(ここで、X<sub>a</sub> はフェニルアラニンまたはチロシンであり；X<sub>b</sub> は疎水性アミノ酸である。)

**【請求項 20】**

前記人工転写因子が下記の配列を含む請求項 19 記載の核酸：

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Glu - X<sub>b</sub> - X - Ser - Asn - His - X<sub>3</sub> - 5 - His - X<sub>1</sub> - 6 - Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Glu - X<sub>b</sub> - X - Ser - Asn - His - X<sub>3</sub> - 5 - His - X<sub>1</sub> - 6 - Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Cys - X<sub>b</sub> - X - Ser - Asn - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：253)

(ここで、X<sub>a</sub> はフェニルアラニンまたはチロシンであり；X<sub>b</sub> は疎水性アミノ酸である。)

**【請求項 21】**

3つのジンクフィンガードメインからなる人工転写因子をコーディングする配列を含み、前記人工転写因子の発現が少なくとも一つの脊椎動物細胞において骨細胞形成 (osteogenesis) を誘導する核酸。

**【請求項 22】**

前記ジンクフィンガードメインの少なくとも一つが下記の配列を有する請求項 21 記載の核酸：

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Arg - X<sub>b</sub> - X - Asp - Lys - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：254)；

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Glu - X<sub>b</sub> - X - Thr - His - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：255)；

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Val - X<sub>b</sub> - X - Ser - Thr - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：256)；または

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Arg - X<sub>b</sub> - X - Asp - Lys - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：257)

(ここで、X<sub>a</sub> はフェニルアラニンまたはチロシンであり；X<sub>b</sub> は疎水性アミノ酸である。)

**【請求項 23】**

前記人工転写因子が下記のアミノ酸配列を含む請求項 22 記載の核酸：

Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Arg - X<sub>b</sub> - X - Asp - Lys - His - X<sub>3</sub> - 5 - His - X<sub>1</sub> - 6 - Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Glu - X<sub>b</sub> - X - Thr - His - His - X<sub>3</sub> - 5 - His - X<sub>1</sub> - 6 - Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Val - X<sub>b</sub> - X - Ser - Thr - His - X<sub>3</sub> - 5 - His - X<sub>1</sub> - 6 - Cys - X<sub>2</sub> - 5 - Cys - X<sub>3</sub> - X<sub>a</sub> - X - Arg - X<sub>b</sub> - X - Asp - Lys - His - X<sub>3</sub> - 5 - His (配列番号：258)

(ここで、X<sub>a</sub> はフェニルアラニンまたはチロシンであり；X<sub>b</sub> は疎水性アミノ酸である)

。 )

【請求項 2 4】

複数のジンクフィンガードメインを含み、幹細胞の分化能力を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸および幹細胞を提供する段階；

前記核酸を幹細胞に導入する段階；および

前記人工転写因子が生産され、前記幹細胞の分化能力を変化させる条件下で前記幹細胞を保持する段階を含む、幹細胞の分化能力を変化させる方法。

【請求項 2 5】

前記人工転写因子が幹細胞の分化を誘導することを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記人工転写因子が幹細胞の自家複製 (self-renewal) 能力を増大させることを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記幹細胞が胚性幹細胞である請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記幹細胞が脊椎動物幹細胞または植物幹細胞である請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記幹細胞が造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)、神経前駆細胞 (neuronal progenitor cell) または筋肉前駆細胞 (muscular progenitor cell) である請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 0】

各々少なくとも 2 つのジンクフィンガードメイン、および転写を活性化または抑制する調節ドメイン配列を含む異なる人工転写因子をコーディングする複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；

所定の形質 (trait) を有する細胞を提供する段階；

前記核酸ライブラリーの構成員を前記細胞内に導入する段階；

前記所定の形質を変化させるライブラリーの構成員を同定する段階；および

前記同定された構成員のジンクフィンガードメイン配列は含むが、同定された構成員の調節ドメインと同一の調節ドメインは含まない DNA 結合ポリペプチドをコーディングする配列を含むコーディング核酸を製造する段階を含む、人工転写因子の同定方法。

【請求項 3 1】

前記 DNA 結合ポリペプチドが、同定された構成員の調節ドメインを有しない請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 DNA 結合ポリペプチドが、同定された構成員の調節ドメインに比べて突然変異された調節ドメインを含む請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記 DNA 結合ポリペプチドが、同定された構成員の調節ドメインと反対の機能を果たす調節ドメインを含む請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記細胞に前記コーディング核酸を導入し、前記細胞の所定形質を評価することをさらに含む請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 5】

前記同定段階が、所定の環境条件に対する抵抗性；分化；逆分化；増殖；アポトーシス (apoptosis)；血清 - 独立性 (serum-independence)；病原体抵抗性；および病原体感受性からなる群から選ばれる特性を有する細胞を同定することを含む請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 6】

少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含むが、少なくとも一つのジンクフィンガードメインが天然型タンパク質から由来することを特徴とする、異なる人工キメラタンパ

ク質を各々コーディングする複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；所定の形質を有する細胞に前記核酸ライブラリー構成員を導入する段階；および前記所定の形質を変化させるライブラリー構成員を有する細胞を同定する段階を含む、キメラタンパク質の同定方法。

【請求項 3 7】

少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含む異なる人工キメラタンパク質を各々コーディングする複数の核酸を含むが、前記複数核酸のうち少なくとも一つの構成員の少なくとも一つのジンクフィンガードメインが表 1 に記載されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする核酸ライブラリーを提供する段階；

前記核酸ライブラリー構成員を所定の形質を有する細胞に挿入する段階；および前記ライブラリー構成員が前記所定の形質を変化させた細胞を同定する段階を含む、キメラタンパク質の同定方法。

【請求項 3 8】

(1) 核酸によってコーディングされるポリペプチドの第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインが各々天然型タンパク質由来のジンクフィンガードメインであるが、(i) 同じ天然型タンパク質では同時に現れず、または(ii) 同じ天然タンパク質では前記ポリペプチドにおける配列とは異なり、(2) 前記第 1 のジンクフィンガードメインが複数の核酸の間で多様に変化し、(3) 前記第 2 のジンクフィンガードメインが複数の核酸の間で多様に変化する、第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインを含むポリペプチドをコーディングする核酸を含む複数の細胞を含む細胞ライブラリーを提供する段階；

対照細胞と表現型が異なるライブラリー細胞を同定する段階；および前記同定されたライブラリー細胞から核酸を回収する段階を含む、キメラタンパク質の同定方法。