

【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30年5月31日(2018.5.31)

【公表番号】特表2017-511156(P2017-511156A)

【公表日】平成29年4月20日(2017.4.20)

【年通号数】公開・登録公報2017-016

【出願番号】特願2017-505733(P2017-505733)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

【手続補正書】

【提出日】平成30年4月12日(2018.4.12)

【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】

細菌ゲノム内の目標変異生成領域 (I M R) に変異を生成するためのプロセスであって、細菌が C R I S P R / C a s 系を含み、且つ I M R が細菌の C R I S P R / C a s 系によって認識されることの可能な C R I S P R P A M / プロトスペーサーを含み、プロセスが：

(a) 前記細菌の集団を組換えベクターで形質転換するステップであって、組換えベクターが組換えエレメントを含み、組換えエレメントが：

(i) 変異を含む置換エレメント、および

(i i) 置換エレメントに隣接する相同アームであって、細菌ゲノム内の I M R の全体または一部を、置換エレメントを含むエレメントで置換することを促進することが可能な相同アームを含み、

組換えエレメントが I M R 内の C R I S P R / P A M プロトスペーサーを認識する c r R N A によって認識されることの可能な C R I S P R P A M / プロトスペーサーを含まない、ステップ；

(b) 細菌集団内の 1 つまたはそれ以上の細菌において、それらの細菌のゲノム内の I M R の全体または一部が置換エレメントを含むエレメントによって置換され、これにより C R I S P R P A M / プロトスペーサーがそれらの細菌のゲノム内の I M R から除去されるかまたは I M R 内の C R I S P R / P A M プロトスペーサーを認識する c r R N A によって認識されることが不可能となる条件下で、細菌集団を培養するステップ；

(c) 前記集団における C R I S P R P A M / プロトスペーサーが除去されていないか、c r R N A によって認識されることが不可能となっていない任意の細菌の I M R 内の C R I S P R P A M / プロトスペーサーを標的とした c r R N A の産生を誘導することの可能な死滅ベクターで細菌集団を形質転換し、これにより c r R N A によって認識されるそれらの C R I S P R P A M / プロトスペーサーの C A S エンドヌクレアーゼ誘導開裂と、これに続くそれらの細菌の死滅を促進するステップ；および

(d) そのゲノムが変異を含む置換エレメントを含む 1 つまたはそれ以上の細菌を前記集団から選択するステップを含む、前記プロセス

【請求項 2】

請求項 1 に記載のプロセスであって、前記細菌が非高度組換え誘導細菌である前記プロセス。

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 に記載のプロセスであって、ステップ (c) に先立ち、1 つまたはそれ以上の形質転換された細菌が分離され且つさらに継代培養されて 1 つまたはそれ以上のさらなる細菌集団を生成した後これを前記死滅ベクターで形質転換する前記プロセス。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のうちいずれか 1 つに記載のプロセスであって、前記 I M R 内の前記 P A M / プロトスペーサーが前記組換えエレメントにおいて：

- (i) 前記置換エレメント；
- (i i) 前記上流相同アームと前記置換エレメントのオーバーラップ；
- (i i i) 前記下流相同アームと前記置換エレメントのオーバーラップ；
- (i v) 前記上流相同アーム；または
- (v) 前記下流相同アームに対応する D N A 領域内に存在する前記プロセス。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のプロセスであって、前記 I M R 内の前記 P A M / プロトスペーサーが前記組換えエレメントにおいて：

- (i) 前記置換エレメント；
- (i i) 前記上流相同アームと前記置換エレメントのオーバーラップ；または
- (i i i) 前記下流相同アームと前記置換エレメントのオーバーラップに対応する D N A 領域内に存在する前記プロセス。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のプロセスであって、前記 I M R 内の前記 P A M / プロトスペーサーが前記置換エレメントに対応する D N A 領域内に存在する前記プロセス。

【請求項 7】

前述の請求項のうちいずれか 1 つに記載のプロセスであって、前記死滅ベクターが：

- (i) C a s リーダーエレメント
- (i i) 第 1 の C a s 直列反復エレメント
- (i i i) 前記 I M R 内の前記 C R I S P R P A M / プロトスペーサーを標的とする c r R N A を産生することの可能な C a s スペーサーエレメント；および
- (i v) 第 2 の C a s 直列反復エレメントを含む前記プロセス。

【請求項 8】

前述の請求項のうちいずれか 1 つに記載のプロセスであって、前記変異が 1 つまたはそれ以上のヌクレオチドの置換、欠失または挿入、または 1 つまたはそれ以上の置換、欠失または挿入の組み合わせである前記プロセス。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のプロセスであって、前記変異が前記 P A M / プロトスペーサー内にある前記プロセス。

【請求項 10】

請求項 8 または請求項 9 に記載のプロセスであって、前記変異が S N P である前記プロセス。

【請求項 11】

前述の請求項のうちいずれか 1 つに記載のプロセスであって、前記細菌が内因性 C R I S P R / C a s 系を有する前記プロセス。

【請求項 12】

前述の請求項のうちいずれか 1 つに記載のプロセスであって、前記細菌が I 型 C R I S P R / C a s 系を有する前記プロセス。

【請求項 13】

前述の請求項のうちいずれか１つに記載のプロセスであって、前記細菌がグラム陽性菌である前記プロセス。

【請求項１４】

前述の請求項のうちいずれか１つに記載のプロセスであって、前記細菌が*Clostridia*綱、好ましくは*Clostridiaceae*目、より好ましくは*Clostridium*属であるかまたは細菌が*Actinomycetales*目または*Bacillus*属である前記プロセス。

【請求項１５】

請求項１４に記載のプロセスであって、前記細菌が*C. acetobutylicum*、*C. arbusti*、*C. aurantibutyricum*、*C. beijerinckii*、*C. cellulovorans*、*C. cellulolyticum*、*C. thermocellum*、*C. thermobutyricum*、*C. pasteurianum*、*C. kluyveri*、*C. novyi*、*C. saccharobutylicum*、*C. thermosuccinogenes*、*C. thermopalmarium*、*C. saccharolyticum*、*C. saccharoperbutylacetonicum*、*C. tyrobutyricum*、*C. tetanomorphum*、*C. magnum*、*C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum*、*C. butyricum*、*C. puniceum*、*C. diolis*、*C. homopropionicum*および*C. roseum*からなる群から選択される前記プロセス。

【請求項１６】

請求項１～１５のいずれか一項に記載のプロセスによって細菌ゲノム内の目標変異生成領域（IMR）に変異を生成することを含む、変異細菌を作製するためのプロセス。