

【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(IMR)に変異を生成するためのプロセスであって、細菌がCRISPR/Cas系を含み、且つIMRが細菌のCRISPR/Cas系によって認識されることの可能なCRISPR PAM/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

(ii) 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IMR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IMR内のCRISPR/PAMプロトスペーサーを認識するcRNAによって認識されることの可能なCRISPR PAM/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IMR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CRISPR PAM/プロトスペーサーがそれらの細菌のゲノム内のIMRから除去されるかまたはIMR内のCRISPR/PAMプロトスペーサーを認識するcRNA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CRISPR PAM/プロトスペーサーが除去されていないか、cRNA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IMR内のCRISPR PAM/プロトスペーサーを標的としたcRNA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cRNAによって認識されるそれらのCRISPR PAM/プロトスペーサーのCAS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 を產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. arbutini*、*C. aurantibutyricum*、*C. beijerinckii*、*C. cellulovorans*、*C. cellulolyticum*、*C. thermocellum*、*C. thermobutyricum*、*C. pasteurianum*、*C. kluyveri*、*C. novyi*、*C. saccharobyticum*、*C. thermosuccinogenes*、*C. thermopalmarium*、*C. saccharolyticum*、*C. saccharoperbutylicum*、*C. tyrobutyricum*、*C. tetanomorphum*、*C. magnum*、*C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum*、*C. butyricum*、*C. puniceum*、*C. dioliss*、*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。