

【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29年7月27日 (2017.7.27)

【公表番号】特表2016-523559(P2016-523559A)

【公表日】平成28年8月12日 (2016.8.12)

【年通号数】公開・登録公報2016-048

【出願番号】特願2016-525411(P2016-525411)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/19

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月19日 (2017.6.19)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 1】

ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*) では、C a s 9 は、タンパク質中の 2 つの触媒ドメイン、すなわち D N A の相補鎖を切断する H N H ドメインおよび非相補鎖を切断する R u v C 様ドメインが仲介するプロセスにより、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) の 3 b p 上流に平滑末端の二本鎖切断を形成する。その全体が参照により援用される Jinke et al., Science 337, 816-821 (2012) を参照されたい。C a s 9 タンパク質は、Makarova et al., Nature Reviews, Microbiology, Vol. 9, June 2011, pp. 467-477 の補足情報で確認されている以下のものを含む、多数の I I 型 C R I S P R システム中に存在することが知られている。メタノコッカス・マリバルディス (*Methanococcus maripaludis*) C 7 株; コリネバクテリウム・ジフテリアエ (*Corynebacterium diphtheriae*); コリネバクテリウム・エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*) Y S - 3 1 4 株; コリネバクテリウム・グルタニカム (*Corynebacterium glutamicum*) A T C C 1 3 0 3 2 K i t a s a t o 株; コリネバクテリウム・グルタニカム A T C C 1 3 0 3 2 B i e l e f e l d 株; コリネバクテリウム・グルタニカム R 株; コリネバクテリウム・クロッペンステッティ (*Corynebacterium kroppenstedtii*) D S M 4 4 3 8 5 株; マイコバクテリウム・アブセサス (*Mycobacterium abscessus*) A T C C 1 9 9 7 7 株; ノカルディア・ファルシニカ (*Nocardia farcinica*) I F M 1 0 1 5 2 株; ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) P R 4 株; ロドコッカス・ジョスティ (*Rhodococcus jostii*) R H A 1 株; ロドコッカス・オパカス (*Rhodococcus opacus*) B 4 u i d 3 6 5 7 3 株; アシドサーマス・セルロリティカス (*Acidothermus cellulolyticus*) 1 1 B 株; アルスロバクター・クロロフェノリカス (*Arthrobacter chlorophenolicus*) A 6 株; クリベラ・フラビダ (*Kribbella flavida*) D S M 1 7 8 3 6 u i d 4 3 4 6 5 株; サーマモノスポラ・カーバタ (*Thermomonospora curvata*) D S M 4 3 1 8 3 株; ビフィドバクテリウム・デンティウム (*Bifidobacterium dentium*) B d 1 株; ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) D J O 1 0 A 株; スラッキア・ヘリオトリニレデューセンス (*Slackia heliotrinireducens*) D S M 2 0 4 7 6 株; パーセフォネラ・マリナ (*Persephonella marina*) E X H 1 株; バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) N C T C 9 4 3 4 株; カブノサイトファガ・オクラセア (

Capnocytophaga ochracea) D S M 7 2 7 1 株; フラボバクテリウム・サイクロフィルム
(Flavobacterium psychrophilum) J I P 0 2 8 6 株; アッカーマンシア・ムシニフィラ
(Akkermansia muciniphila) A T C C B A A 8 3 5 株; ロゼイフレクサス・キャスト
ンホルツィイ (Roseiflexus castenholzii) D S M 1 3 9 4 1 株; ロゼイフレクサス (*Ros*
eiflexus) R S 1 株; シネコシスティス (*Synechocystis*) P C C 6 8 0 3 株; エルシミ
クロビウム・ミヌトゥム (Elusimicrobium minutum) P e i 1 9 1 株; 未培養細菌 T e r
m i t e g r o u p 1 p h y l o t y p e R s D 1 7; フィブロボクター・サク
シノゲネス (Fibrobacter succinogenes) S 8 5 株; バチルス・セレウス (*Bacillus cer*
eus) A T C C 1 0 9 8 7 株; リステリア・イノキュア (*Listeria innocua*); ラクトバ
チルス・カゼイ (Lactobacillus casei); ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacill*
us rhamnosus) G G 株; ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) U
C C 1 1 8 株; ストレプトコッカス・アガラクティアエ (*Streptococcus agalactiae*) A
9 0 9 株; ストレプトコッカス・アガラクティアエ (N E M 3 1 6 株; (*Streptococcu*
s agalactiae 2 6 0 3 株; ストレプトコッカス・ディスガテクティアエ亜種エクイシミ
リス (Streptococcus dysgalactiae equisimilis) G G S 1 2 4 株; ストレプトコッカス
・エクイ亜種ズーエピデミカス (Streptococcus equi zooepidemicus) M G C S 1 0 5 6
5 株; (*Streptococcus gallolyticus*) U C N 3 4 u i d 4 6 0 6 1 株; ストレプトコ
ッカス・ゴルドニイ (Streptococcus gordonii Challis subst) C H 1 株; ストレプトコ
ッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans) N 2 0 2 5 u i d 4 6 3 5 3 株; スト
レプトコッカス・ミュータンス; ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyog
enes) M 1 G A S 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 5 0 0 5; ストレプ
トコッカス・ピオゲネス M G A S 2 0 9 6 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G
A S 9 4 2 9 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 1 0 2 7 0 株; ストレプ
トコッカス・ピオゲネス M G A S 6 1 8 0 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A
S 3 1 5 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス S S I - 1; ストレプトコッカス・ピオ
ゲネス M G A S 1 0 7 5 0 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス N Z 1 3 1 株; スト
レプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) C N R Z 1 0 6 6 株;
ストレプトコッカス・サーモフィラス L M D - 9 株; ストレプトコッカス・サーモフィ
ラス L M G 1 8 3 1 1 株; クロストリジウム・ボツリヌム (*Clostridium botulinum*)
A 3 L o c h M a r e e 株; クロストリジウム・ボツリヌム B E k l u n d 1
7 B 株; クロストリジウム・ボツリヌム B a 4 6 5 7 株; クロストリジウム・ボツリ
ヌム F L a n g e l l a n d 株; クロストリジウム・セルロリディカム (*Clostridium*
cellulolyticum) H 1 0 株; フィネゴルディア・マグナ (*Finegoldia magna*) A T C C 2
9 3 2 8 株; ユウバクテリウム・レクターレ (*Eubacterium rectale*) A T C C 3 3 6 5
6 株; マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*); マイコプラズ
マ・モービレ (Mycoplasma mobile) 1 6 3 K 株; マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycop*
lasma penetrans); マイコプラズマ・シノビアエ (*Mycoplasma synoviae*) 5 3 株; スト
レプトバチルス・モニリフォルミス (Streptobacillus moniliformis) D S M 1 2 1 1 2
株; ブラジリゾビウム (Bradyrhizobium) B T A i l 株; ニトロバクター・ハンブルゲン
シス (Nitrobacter hamburgensis) X 1 4 株; ロドシュードモナス・バルストリス (*Rhod*
opseudomonas palustris) B i s B 1 8 株; ロドシュードモナス・バルストリス B i
s B 5 株; パルビバクラム・ラバメンティボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*) D
S - 1 株; ディノロセオバクター・シバエ (*Dinoroseobacter shibae*) D F L 1 2 株; グ
ルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス (Gluconacetobacter diazotrophicus) P a
l 5 F A P E R J 株; グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス P a l 5 J G
I 株; アゾスピリillum (*Azospirillum*) B 5 1 0 u i d 4 6 0 8 5 株; ロドスピリillum
・ルブラム (Rhodospirillum rubrum) A T C C 1 1 1 7 0 株; ディアフォロバクター (*D*
iaphorobacter) T P S Y u i d 2 9 9 7 5 株; フェルミネフォロバクター・エイセニ
アエ (Verminephrobacter eiseniae) E F 0 1 - 2 株; ナイセリア・メニンジティディス
(Neisseria meningitidis) 0 5 3 4 4 2 株; ナイセリア・メニンジティディス a l p

h a 1 4 株；ナイセリア・メニンジティディス Z 2 4 9 1 株；デスルホビブリオ・サレキシゲンス (*Desulfovibrio salexigens*) D S M 2 6 3 8 株；キャンピロバクター・ジェジュニ亜種ドイレイ (*Campylobacter jejuni doylei*) 2 6 9 9 7 株；キャンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 8 1 1 1 6 株；キャンピロバクター・ラリ (*Campylobacter lari*) R M 2 1 0 0 株；ヘリコバクター・ヘパティカス (*Helicobacter hepaticus*)；ウォリネラ・サクシノゲネス (*Wolinetella succinogenes*)；トルモナス・アウエンシス (*Tolomonas auensis*) D S M 9 1 8 7 株；シュードアルテロモナス・アトランティカ (*Pseudoalteromonas atlantica*) T 6 c 株；シューワネラ・ペアレアナ (*Shewanella pealeana*) A T C C 7 0 0 3 4 5 株；レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) P a r i s 株；アクチノバチルス・サクシノゲネス (*Actinobacillus succinogenes*) 1 3 0 Z 株；パスツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)；フランシセラ・ツラレンシス亜種ノビシダ (*Francisella tularensis novicida*) U 1 1 2 株；フランシセラ・ツラレンシス亜種ハラークティカ (*Francisella tularensis holarctica*)；フランシセラ・ツラレンシス (*Francisella tularensis*) F S C 1 9 8 株；フランシセラ・ツラレンシス；フランシセラ・ツラレンシス W Y 9 6 - 3 4 1 8 株；およびトレポネマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) A T C C 3 5 4 0 5 株。したがって、本開示の態様は、I I 型 C R I S P R システム中に存在する C a s 9 タンパク質に関する。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 2】

実施例 I

酵母における C R I S P R - C a s 9 を用いた多重遺伝子編集の一般的プロセス

ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) の C R I S P R 免疫系由来の C a s 9 を用いて、相同組換えを促進し、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において形質転換 D N A を組み換ええない細胞に対して選択する。C a s 9 を用いた R N A 誘導型 D N A 切断の一般的な方法を図 1 に示す。C a s 9、ガイド R N A、および標的 D N A の間で共局在複合体が形成される。C a s 9 により標的 D N A 中に二本鎖切断が生じる。次に、相同組換えによりドナー D N A が D N A に挿入される。ドナー D N A には、切断部位の両側に隣接配列、および C a s 9 切断部位を除去する配列が含まれる。その結果、ドナー D N A が、ゲノム D N A であってもよい D N A 中に組み込まれる。

【手続補正 3】

【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】

標的 D N A に相補的な R N A と共局在複合体を形成、且つ前記標的 D N A を部位特異的に切断する酵素を発現する細胞において前記標的 D N A に複数の変化を生じさせる方法であって、

(a) 標的 D N A に相補的であり且つ前記酵素を前記標的 D N A にガイドする、1 種類または複数種類の R N A をコードする第 1 の外来核酸を前記細胞に導入すること、ここで、前記 1 種類または複数種類の R N A および前記酵素が、前記標的 D N A への共局在複合体の構成要素である、

1 種類または複数種類のドナー核酸配列をコードする第 2 の外来核酸を前記細胞に導入

すること、ここで、前記 1 種類または複数種類の RNA および前記 1 種類または複数種類のドナー核酸の配列が発現し、前記 1 種類または複数種類の RNA および前記酵素が前記標的 DNA に共局在し、前記酵素により前記標的 DNA が切断され、前記ドナー核酸が前記標的 DNA に挿入されて前記細胞中に変化した DNA が生成する、および、

ステップ (a) を複数回繰り返して前記細胞において前記 DNA に複数の変化を生じさせることを含む、方法。

【請求項 2】

前記酵素が、RNA 誘導型 DNA 結合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酵素が Cas 9 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞が真核細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞が、酵母細胞、植物細胞、または動物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 RNA が、10 ~ 500ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 RNA が、20 ~ 100ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 種類または複数種類の RNA が、ガイド RNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 種類または複数種類の RNA が、tracrRNA - crRNA 融合体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記標的 DNA が、ゲノム DNA、ミトコンドリア DNA、ウイルス DNA、または外来性 DNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 1 種類または複数種類のドナー核酸配列が、組換えにより挿入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 種類または複数種類のドナー核酸配列が、相同組換えにより挿入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 1 種類または複数種類の RNA および前記 1 種類または複数種類のドナー核酸配列が、1 種類または複数種類のプラスミド上に存在する、請求項 1 に記載の方法。