

【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22年1月28日(2010.1.28)

【公表番号】特表2009-518038(P2009-518038A)

【公表日】平成21年5月7日(2009.5.7)

【年通号数】公開・登録公報2009-018

【出願番号】特願2008-544524(P2008-544524)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 P	1/00	(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 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 P	1/00	Z
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成21年12月4日(2009.12.4)

【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】

合成ゲノムを構築する方法であって、

化学的に合成されオーバーラップするオリゴヌクレオチド（複数）を組立てることにより、前記合成ゲノムの隣接部位（複数）を含む複数の核酸カセットを構築する工程、及び

前記核酸カセット（複数）を組立てることにより、前記合成ゲノムを構築する工程

を含み、

各カセットは、隣接するカセットと少なくとも凡そ80ヌクレオチドのオーバーラップをし、かつ、凡そ4キロベースから凡そ7キロベースの長さであること

を特徴とする合成ゲノムの構築方法。

【請求項2】

前記カセットは、凡そ4.5キロベースから凡そ6.5キロベースの長さ、オーバーラップを含まない凡そ4キロベースから凡そ6.5キロベースの長さ、又は凡そ5キロベースの長さであること

を特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

1又は2以上の前記カセットは、凡そ30ヌクレオチド、凡そ50ヌクレオチド、又は凡そ200ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドから構築されること

を特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記合成ゲノムは、細菌ゲノム、最小ゲノム、若しくは最小複製ゲノムであり、又は自然発生ゲノムと実質的に同一であること

を特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の方法。

【請求項5】

化学的に合成された核酸成分（複数）から、又は化学的に合成された核酸成分（複数）のコピー（複数）から、全体（entire）の合成ゲノムが構築されること

を特徴とする請求項1～4の何れか1項に記載の方法。

【請求項6】

各カセットは、隣接するカセットと少なくとも凡そ200ヌクレオチドの、凡そ200～凡そ250ヌクレオチドの、又は凡そ200ヌクレオチドのオーバーラップをすること

を特徴とする請求項1～5の何れか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記合成ゲノムを小胞内に導入する工程、及び任意的に該合成ゲノムから目的生成物の產生に効果的な条件下で該小胞を培養する工程を更に含むこと、

前記小胞は細胞又は合成膜境界小胞であること

を特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記ゲノムを構築する前に前記カセット（複数）をクローニング又は増幅する工程を更に含むこと

を特徴とする請求項1～7の何れか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記ゲノムを構築するための前記カセット（複数）の組立ては、インピトロ又はインピボ組換え方法を含むこと

を特徴とする請求項1～8の何れか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記カセットの構築は、ポリメラーゼサイクルアセンブリ（P C A）を含み、該P C Aは5サイクルのP C Aからなること

を特徴とする請求項1～9の何れか1項に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

発明の概要

上記の課題を解決するために、本発明の一視点により、合成ゲノムを構築する方法が提供される。この方法は、

化学的に合成されオーバーラップするオリゴヌクレオチド（複数）を組立てることにより、前記合成ゲノムの隣接部位（複数）を含む複数の核酸カセットを構築する工程、及び前記核酸カセット（複数）を組立てることにより、前記合成ゲノムを構築する工程を含み、

各カセットは、隣接するカセットと少なくとも凡そ80ヌクレオチドのオーバーラップをし、かつ、凡そ4キロベースから凡そ7キロベースの長さであることを特徴とする（形態1・基本構成）。

更に、上記の方法において、前記カセットは、凡そ4.5キロベースから凡そ6.5キロベースの長さ、オーバーラップを含まない凡そ4キロベースから凡そ6.5キロベースの長さ、又は凡そ5キロベースの長さであることが好ましい（形態2）。

更に、上記の方法において、1又は2以上の前記カセットは、凡そ30ヌクレオチド、凡そ50ヌクレオチド、又は凡そ200ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドから構築されることが好ましい（形態3）。

更に、上記の方法において、前記合成ゲノムは、細菌ゲノム、最小ゲノム、若しくは最小複製ゲノムであり、又は自然発生ゲノムと実質的に同一であることが好ましい（形態4）。

更に、上記の方法において、化学的に合成された核酸成分（複数）から、又は化学的に合成された核酸成分（複数）のコピー（複数）から、全体（entire）の合成ゲノムが構築されることが好ましい（形態5）。

更に、上記の方法において、各カセットは、隣接するカセットと少なくとも凡そ200ヌクレオチドの、凡そ200～凡そ250ヌクレオチドの、又は凡そ200ヌクレオチドのオーバーラップをすることが好ましい（形態6）。

更に、上記の方法において、前記合成ゲノムを小胞内に導入する工程、及び任意的に該合成ゲノムから目的生成物の產生に効果的な条件下で該小胞を培養する工程を更に含むこと、

前記小胞は細胞又は合成膜境界小胞であることが好ましい（形態7）。

更に、上記の方法において、前記ゲノムを構築する前に前記カセット（複数）をクローニング又は増幅する工程を更に含むことが好ましい（形態8）。

更に、上記の方法において、前記ゲノムを構築するための前記カセット（複数）の組立ては、インビトロ又はインビボ組換え方法を含むことが好ましい（形態9）。

更に、上記の方法において、前記カセットの構築は、ポリメラーゼサイクルアセンブリ（PCA）を含み、該PCAは5サイクルのPCAからなることが好ましい（形態10）。

更に、好ましい実施の形態として以下のものがある：

（形態1'）合成ゲノムを構築する方法であって、

合成ゲノムの部分（複数）を含む核酸カセット（複数）を組立てての工程を含み、該核酸カセットの少なくとも1つは、化学的に合成された核酸成分（複数）から、又は化学的に合成された核酸成分（複数）のコピー（複数）から構築されることを特徴とする合成ゲノムの構築方法は上記課題の解決に資する。

（形態2'）上記形態1'の方法において、前記核酸カセットの1又は2以上は、化学的に合成されオーバーラップする凡そ50ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド（複数）を組立てることによって調製されることが好ましい。

（形態3'）上記形態1'の方法において、前記カセットは、凡そ4キロベースから凡そ7キロベースの長さであることが好ましい。

（形態4'）上記形態1'の方法において、前記カセットは、凡そ4.5キロベースから凡そ6.5キロベースの長さであることが好ましい。

（形態5'）上記形態1'の方法において、前記カセットは、凡そ5キロベースの長さであることが好ましい。

（形態6'）上記形態1'の方法において、前記カセット（複数）は、隣接するカセット（複数）と少なくとも凡そ200ヌクレオチドのオーバーラップをすることが好ましい。

（形態7'）上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、真核細胞小器官であることが好ましい。

（形態8'）上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、細菌ゲノムであることが好ましい。

（形態9'）上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、最小ゲノムであることが好ましい。

（形態10'）上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、最小複製ゲノムであることが好ましい。

（形態11'）上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、自然発生ゲノムと実質的に同一であることが好ましい。

（形態12'）上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、非自然発生ゲノムであることが好ましい。

(形態13') 上記形態1'の方法において、前記カセットの1又は2以上は、前記合成ゲノム中において容易に除去及び置換可能であることが好ましい。

(形態14') 上記形態1'の方法において、化学的に合成された核酸成分(複数)から、又は化学的に合成された核酸成分(複数)のコピー(複数)から、全体(entire)の合成ゲノムが構築されることが好ましい。

(形態15') 上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、合成細胞ゲノムであることが好ましい。

(形態16') 上記形態15'の方法において、化学的に合成された核酸成分(複数)から、又は化学的に合成された核酸成分(複数)のコピー(複数)から、全体の合成細胞ゲノムが構築されることが好ましい。

(形態17') 上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムは、更に、目的生成物の產生を可能にする配列(複数)を含むことが好ましい。

(形態18') 上記形態17'の方法において、前記目的生成物は、エネルギー源であることが好ましい。

(形態19') 上記形態14'の方法において、前記全体の合成ゲノムは、更に、目的生成物の產生を可能にする配列(複数)を含むことが好ましい。

(形態20') 上記形態19'の方法において、前記目的生成物は、エネルギー源であることが好ましい。

(形態21') 上記形態15'の方法において、前記合成細胞ゲノムは、更に、目的生成物の產生を可能にする配列(複数)を含むことが好ましい。

(形態22') 上記形態21'の方法において、前記目的生成物は、エネルギー源であることが好ましい。

(形態23') 上記形態16'の方法において、前記全体の合成細胞ゲノムは、更に、目的生成物の產生を可能にする配列(複数)を含むことが好ましい。

(形態24') 上記形態23'の方法において、前記目的生成物は、エネルギー源であることが好ましい。

(形態25') 上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムの成分(複数)を合理的に設計する工程を更に含むことが好ましい。

(形態26') 上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムを小胞内に導入することによって、合成細胞を構築する工程を更に含むことが好ましい。

(形態27') 上記形態15'の方法において、任意的に(自己複製)合成細胞の複製に効果的な条件下で、前記合成細胞ゲノムを小胞内に導入することによって該自己複製合成細胞を構築することを更に含むことが好ましい。

(形態28') 上記形態26'の方法において、目的生成物の產生に効果的な条件下で前記合成細胞を培養することによって、該目的生成物を產生する工程を更に含むことが好ましい。

(形態29') 上記形態27'の方法において、前記自己複製合成細胞の複製及び目的生成物の產生に効果的な条件下で該自己複製合成細胞を培養することによって、該目的生成物を產生する工程を更に含むことが好ましい。

(形態30') 上記形態1'の方法において、前記方法を自動化することを更に含むことが好ましい。

(形態31') 上記形態1'の方法において、前記合成ゲノムを更に含むことが好ましい。

(形態32') 合成ゲノムは上記課題の解決に資する。

(形態33') 上記形態26'の方法において、前記合成細胞を更に含むことが好ましい。

(形態34') 合成ゲノムを含む合成細胞は上記課題の解決に資する。

(形態35') 合成細胞を作成する方法であって、

微生物から内在ゲノム(resident genome)の部分又は全体を除去する工程；及び前記内在ゲノムを該内在ゲノムと異なる少なくとも1つの性質を示す合成ゲノムで置換

する工程

を含む方法は上記課題の解決に資する。

(形態 36') 上記形態 35' の方法において、前記合成細胞を更に含むことが好ましい。

(形態 37') 内在ゲノムの部分又は全体が除去された 1 つの種の微生物；及び前記内在ゲノムと異なる少なくとも 1 つの性質を示す合成ゲノムを含む合成細胞は上記課題の解決に資する。

(形態 38') 合成ゲノムを設計する工程；

前記合成ゲノムを構築する工程；

前記合成ゲノムを生物学的系に導入する工程；及び

前記合成ゲノムを発現させる工程

を含む方法は上記課題の解決に資する。

合成ゲノムの設計、合成、組立て及び発現のための複数の実施形態及び方法（複数）が提供される。本発明には、ゲノムの成分（複数）の合理的設計；小さな核酸フラグメントの生成及び該ゲノムの部分（複数）を含むカセット（複数）への該フラグメントの組立て（アセンブリ）；該カセットの配列（複数）におけるエラーの修正；該カセットのクローニング（例えばローリングサークル型増幅のようなインビトロ方法による）；カセット（複数）の組立て（アセンブリ）による合成ゲノムの形成（例えばインビトロ組換え方法による）；及び生化学的な系への該合成ゲノムの導入（ないし移植）（例えば無傷 intact 細胞、機能的 DNA を欠くゴースト細胞又は他の小胞への該合成ゲノムの移植による）のための方法が含まれる。1 つの実施形態においては、合成ゲノムは、当該ゲノムが存在する小胞（vesicle；例えば細胞）の複製を達成するために十分な情報を含む。本発明の技術は、合成ゲノム系が産生することができる有用な最終生成物、例えばエネルギー源（例えば水素又はエタノール）及び治療薬及び工業用ポリマーのようなバイオ分子に及ぶ。