

【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、インビトロ又はインビ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（PCA）を含み、該 PCA は 5 サイクルの PCA 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産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）を組立てる工程を含み、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、目的生成物の産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、目的生成物の産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、目的生成物の産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、目的生成物の産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、目的生成物の産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、該目的生成物を産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産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、該目的生成物を産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 3 6') 上記形態 3 5' 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 3 7') 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 3 8') 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。