

【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20年6月5日(2008.6.5)

【公表番号】特表2004-535773(P2004-535773A)

【公表日】平成16年12月2日(2004.12.2)

【年通号数】公開・登録公報2004-047

【出願番号】特願2002-563325(P2002-563325)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成20年4月9日(2008.4.9)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸分子の配列を改変するための方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 第 1 の核酸分子を、ファージアニーリングタンパク質、またはその機能的等価物もしくはフラグメントの存在下で第 2 の核酸分子に、該第 1 の核酸分子と該第 2 の核酸分子との間で修復組換えが生じるに適切な条件下で接触させる工程であって、該第 1 の核酸分子は、該第 2 の核酸分子と共有された配列相同性の少なくとも 2 つの領域を含む、工程；ならびに

b) 該第 2 の核酸分子由来の配列を含むように配列が改変された核酸分子を選択する工程、

を包含し、

R e c E タンパク質も R e d タンパク質も、原核生物細胞において行われるいずれの配列改変反応の間にも存在しないことを条件とする、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ファージアニーリングタンパク質が、宿主種内に含まれるか、または宿主種によりコードされる、方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記宿主種が、ウイルス、寄生生物、原核生物または真核生物細胞である、方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、前記宿主種が、グラム陰性細菌細胞である、方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、前記細菌細胞が、E s c h e r i c h i a c o l i 細胞である、方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法であって、前記 E s c h e r i c h i a c o l i 細胞が、J C 5 5 1 9 株、J C 8 6 7 9 株、または J C 9 6 0 4 株のような E s c h e r i c h i a c o l i K 1 2 株の細胞である、方法。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の方法であって、前記宿主種が、K l e b s i e l l a、B a c i l l u

s、Neisseria、真菌、およびS.cerevisiaeからなる群より選択される、方法。

【請求項 8】

請求項 3 に記載の方法であって、前記宿主種が ES 細胞である、方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、前記宿主がマウス ES 細胞である、方法。

【請求項 10】

請求項 2 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記宿主種が、ファージアニーリングタンパク質、その機能的等価物またはフラグメントをコードする遺伝子を発現し得る少なくとも 1 つのベクターで形質転換される、方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記ファージアニーリングタンパク質、機能的等価物またはフラグメントをコードする遺伝子の発現が、調節可能なプロモーターの制御下にある、方法。

【請求項 12】

請求項 2 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記ファージアニーリングタンパク質、機能的等価物またはフラグメントが、前記宿主種に導入されたメッセンジャー RNA 分子から発現される、方法。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記ファージアニーリングタンパク質が、RecT (rac プロファージ)、Red (ファージ)、および Erf (p22)、またはその機能的等価物もしくは活性なフラグメントからなる群より選択される、方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法であって、前記ファージアニーリングタンパク質が、RecT であり、該ファージアニーリングタンパク質は、配列番号 1 に示される配列を有する、方法

。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の方法であって、前記ファージアニーリングタンパク質が、Red であり、該ファージアニーリングタンパク質は、配列番号 2 に示される配列を有する、方法

。

【請求項 16】

請求項 13 に記載の方法であって、前記ファージアニーリングタンパク質が、Erf であり、該ファージアニーリングタンパク質は、Genbank ID X05268 (V01152) に示される配列を有する、方法。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 16 のうちのいずれか 1 項に記載の方法であって、前記相同性の領域のうちの一方または両方が、前記第 1 の核酸分子の内部に位置する、方法。

【請求項 18】

請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 1 の核酸分子が直鎖状である、方法。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法であって、前記第 1 の核酸分子は、一本鎖 DNA 分子、一本鎖 RNA 分子、RNA 分子、二本鎖 DNA 分子、5' オーバーハングを有する二本鎖 DNA 分子、および 3' オーバーハングを有する二本鎖 DNA 分子からなる群より選択される、方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法であって、前記第 1 の核酸分子が、一本鎖核酸分子である、方法

。

【請求項 21】

請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 1 の DNA 分子が、増幅反応により得られる、方法。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のうちのいずれか 1 項に記載の方法であって、核酸分子の異種性集団が、前記第 1 の核酸分子として使用される、方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 2 の核酸分子が、環状である、方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 2 の核酸分子が、宿主細胞において作動する複製起点を含む染色体外核酸分子である、方法。

【請求項 25】

請求項 23 または請求項 24 に記載の方法であって、前記第 2 の核酸分子が、プラスミド、コスミド、P1ベクター、BACベクターおよびPACベクターからなる群より選択される、方法。

【請求項 26】

請求項 23 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 2 の核酸分子が宿主細胞染色体である、方法。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の方法であって、前記宿主細胞染色体が、C. elegans 染色体、Arabidopsis 染色体、またはDrosophila 染色体である、方法。

【請求項 28】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 2 の核酸分子が、二本鎖RNAである、方法。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 1 の核酸分子と前記第 2 の核酸分子との間で共有される配列相同性の領域が、各々少なくとも 9 ヌクレオチドである、方法。

【請求項 30】

請求項 2 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 1 および / または前記第 2 の核酸分子が、形質転換により前記宿主種に導入される、方法。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の方法であって、前記形質転換法がエレクトロポレーションである、方法。

【請求項 32】

請求項 2 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 1 および前記第 2 の核酸分子が、同時形質転換により前記宿主種に導入される、方法。

【請求項 33】

請求項 2 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記第 1 の核酸分子が、前記第 2 の核酸分子が既に存在する宿主細胞に導入される、方法。

【請求項 34】

請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記組換え事象がインビトロで生じる、方法。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記組換え事象がインビボで生じる、方法。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 35 のうちのいずれか 1 項に記載の方法であって、recBCD が不活化されておらず、従って、前記組換え事象が、recBCD + バックグラウンドにおいて生じる、方法。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 3 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法であって、R e c A が発現しない宿主細胞において実施される、方法。

【請求項 3 8】

多キ口塩基対の長さの核酸分子の欠失、挿入、または置換のための、請求項 1 ~ 3 7 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

ファージアニーリングタンパク質、またはその機能的等価物もしくはフラグメントをコードする遺伝子を発現し得る細胞の、修復組換えを含むクローニング法のための宿主としての使用であって、

該細胞が原核生物でありかつ該細胞が R e c E も R e d も含まないことを条件とする、使用。

【請求項 4 0】

ファージアニーリングタンパク質、またはその機能的等価物もしくはフラグメントをコードする遺伝子を発現し得るベクターの、修復組換えを含むクローニング法のための宿主種における使用であって、

該宿主種が原核生物でありかつ該宿主種が R e c E も R e d も含まないことを条件とする、使用。

【請求項 4 1】

核酸分子の配列を改変するための方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 第 1 の核酸分子を、第 2 の核酸分子の存在下で、ファージアニーリングタンパク質、またはその機能的等価物もしくはフラグメントに曝して、結合分子を生成する工程であって、該第 1 および該第 2 の核酸分子は、配列相同性の少なくとも 2 つの領域を共有する、工程；

b) 該結合分子を、該第 1 の核酸分子と該第 2 の核酸分子との間に組換え修復が生じるに適切な条件下でインキュベートする工程；ならびに

c) 該第 2 の核酸分子由来の配列を含むように配列が改変された核酸分子を選択する工程、
を包含し、

R e c E タンパク質も R e d タンパク質も、原核生物細胞において行われる配列改変反応の過程の間に存在しないことを条件とする、方法。

【請求項 4 2】

核酸分子の配列を改変するための方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 第 1 の核酸分子を、ファージアニーリングタンパク質またはその機能的等価物もしくはフラグメントに曝して、コートされた核酸分子を生成する工程；

b) 該コートされた分子を、第 2 の核酸分子に、該第 1 の核酸分子と該第 2 の核酸分子との間に修復組換えが生じるに適切な条件下で接触させる工程であって、該第 1 および該第 2 の核酸分子は、配列相同性の少なくとも 2 つの領域を共有する、工程；ならびに

c) 該第 2 の核酸分子由来の配列を含むように配列が改変された核酸分子を選択する工程、
を包含し、

R e c E タンパク質も R e d タンパク質も、原核生物細胞において行われる配列改変反応の過程の間に存在しないことを条件とする、方法。

【請求項 4 3】

酵母、古細菌、C . e l e g a n s 、D r o s o p h i l a 、X . l a e v i s 、ウイルス、および寄生生物から選択される宿主において外因性核酸分子および内因性核酸分子を操作するための、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

核酸をクローニングするための方法であって、

請求項 1 ~ 3 8 または請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の配列を改変する方法を利用する、

方法。

【請求項 4 5】

核酸分子の配列を操作するための方法であって、

請求項 1 ~ 3 8 または請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法の工程を包含する、方法。

【請求項 4 6】

改変されたタンパク質リーディングフレームの作製のための、請求項 1 ~ 4 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法または使用。

【請求項 4 7】

核酸分子の混合物から所望の核酸分子を選択する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 該所望の核酸分子の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド分子を、コートされた分子または結合分子複合体の形成に適切な条件下で、ファージアニーリングタンパク質、またはその機能的等価物もしくはフラグメントに曝す工程；

b) 該コートされた分子または結合分子の複合体を、該核酸分子の混合物とともにインキュベートする工程；ならびに

c) ファージアニーリングタンパク質に結合された核酸分子を選択する工程、を包含し、

RecE タンパク質も Red タンパク質も、原核生物細胞において行われるいずれの配列改変反応の間にも存在しないことを条件とする、方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の方法であって、前記オリゴヌクレオチドがタグを含む、方法。

【請求項 4 9】

請求項 4 7 または請求項 4 8 に記載の方法であって、前記工程 c) において選択された核酸分子は、タグ化されたオリゴヌクレオチドを単離するためにアフィニティー分離方法を使用して選択される、方法。

【請求項 5 0】

遺伝子導入のための、請求項 2 5 に記載の BAC ベクターの使用。

【請求項 5 1】

アンチセンス戦略のための、請求項 4 2 に記載のコートされた核酸分子の使用。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 8

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 8】

この方法は、例えば、正確な部位特異的変異誘発（配列の欠失、挿入および置換を含む）のような多くの異なる適用に使用され得る。欠失、挿入または置換される配列の量は、1 ヌクレオチド（点変異の導入の場合）と長さ多キロ塩基対の核酸分子との間で変化し得る。適切に操作され得る核酸分子型の例としては、プラスミド（例えば、ES 細胞標的化のために使用される標的構築物）、細菌人工染色体（BAC）（例えば、遺伝子導入（transgenesis）において使用される）、内因性の原核生物染色体および真核生物細胞染色体が挙げられる。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 4 8

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 4 8】

「コート分子」と本明細書中でいわれる、ファージアニーリングタンパク質またはその機能的等価物もしくはフラグメントによってコートされる核酸分子（例えば、ssDNA

オリゴヌクレオチドまたはdsDNA分子)が、「裸の」コートされていない核酸分子と比較して高効率で組換え得ることが、本明細書において提唱される。これは、多くの種(原核生物および真核生物(酵母、マウス、植物、古細菌、ヒト細胞、C.elegans、Drosophila、X.laepisなどを含む)の両方を含む)ならびにウイルスおよび寄生生物における外因性核酸分子および内因性核酸分子の操作のような技術において重要な適用である。この方法で組み換えられ得る外因性核酸分子(本明細書中で使用される場合、第1の置換核酸分子)の例としては、トランスポゾン、HAC、YAC、プラスミドが挙げられるが、内因性核酸分子(本明細書中で使用される場合、第2の標的核酸分子)の1つの好ましい例は、染色体である。