

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2024年3月21日(21.03.2024)



(10) 国際公開番号  
**WO 2024/058155 A1**

(51) 国際特許分類:

C12N 15/63 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)  
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)  
C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/55 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)  
C12N 9/12 (2006.01)

特願 2022-144282 2022年9月12日(12.09.2022) JP  
特願 2022-144285 2022年9月12日(12.09.2022) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 重田 美津紀 (SHIGETA Mitsuki); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 大島 勘二 (OSHIMA Kanji); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 西輝之 (NISHI Teruyuki); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 前田 博文 (MAEDA Hirofumi); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/033127

(22) 国際出願日: 2023年9月12日(12.09.2023)

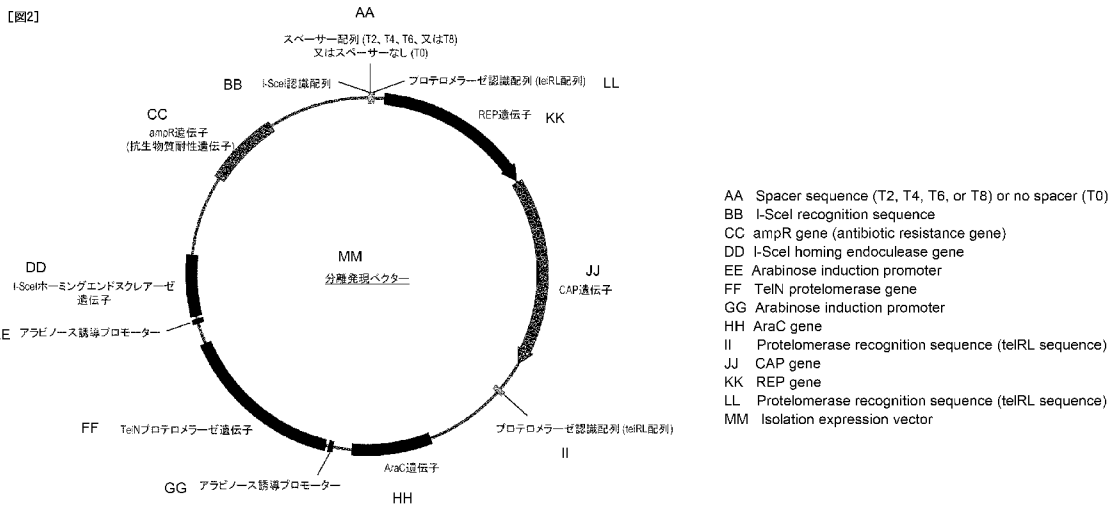
(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

(54) Title: DOUBLE STRANDED CIRCULAR DNA VECTOR, METHOD FOR PRODUCING LINEAR COVALENTLY CLOSED DNA, AND FUSION POLYPEPTIDE CONTAINING PROTELOMERASE AND ENDONUCLEASE

(54) 発明の名称: 二本鎖環状DNAベクター、直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法、並びにプロテロメラーゼ及びエンドヌクレアーゼを含む融合ポリペプチド



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a new method for simply and efficiently producing linear covalently closed DNA. Provided is a double stranded circular DNA vector, wherein the double stranded circular DNA vector contains a protelomerase gene sequence that encodes a protelomerase or an active fragment thereof, an endonuclease gene sequence that encodes an endonuclease or an active fragment thereof, a pair of protelomerase recognition sequences for recognition by the protelomerase or active fragment thereof to cleave the vector, at least one endonuclease recognition sequence for recognition by the endonuclease or active fragment thereof to cleave the vector,

前町 1 - 8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).  
水口 和信(MINAKUCHI Kazunobu); 〒6768688  
兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 株式  
会社カネカ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所  
(HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都  
港区愛宕二丁目 5 - 1 愛宕グリーンヒルズ  
MOR I タワー 3 2階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,  
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,  
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,  
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,  
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,  
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,  
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,  
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,  
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,  
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,  
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
(規則5.2(a))

and a nucleic acid sequence of interest; the protelomerase gene sequence, the endonuclease gene sequence, and the endonuclease recognition sequence in the double stranded circular DNA vector are placed within the same region between the pair of protelomerase recognition sequences; the nucleic acid sequence of interest is placed within another region between the pair of protelomerase recognition sequences; and the protelomerase gene sequence and endonuclease gene sequence are placed under the control of a promoter capable of controlling expression.

(57) 要約: 直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製するための新たな方法を提供することを課題とする。二本鎖環状DNAベクターであって、プロテロメラーゼ又はその活性断片をコードするプロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片をコードするエンドヌクレアーゼ遺伝子配列、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための一対のプロテロメラーゼ認識配列、前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び目的の核酸配列を含み、前記二本鎖環状DNAベクターにおいて前記プロテロメラーゼ遺伝子配列、前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及び前記エンドヌクレアーゼ認識配列は、前記一対のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、前記目的の核酸配列は前記一対のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されており、かつ前記プロテロメラーゼ遺伝子配列及び前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列は、発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている、前記二本鎖環状DNAベクターを提供する。

## 明 細 書

発明の名称：

二本鎖環状DNAベクター、直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法、並びにプロテロメラーゼ及びエンドヌクレアーゼを含む融合ポリペプチド

### 技術分野

[0001] 本発明は、二本鎖環状DNAベクター、形質転換細胞、及び直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法に関する。

### 背景技術

[0002] 二本鎖環状DNAベクターは、簡便に操作可能なDNAベクターとして広く利用されている。二本鎖環状DNAベクターには、目的の遺伝子配列に加えて、プラスミドの維持や複製に必要な配列である複製起点配列や抗生物質耐性遺伝子等が含まれている。二本鎖環状DNAベクターを動物の組織や細胞に導入する際には、これらの配列も目的の遺伝子配列と共に送達されるが、これは免疫原性を回避する観点から望ましくない。

[0003] 二本鎖環状DNAベクターから不要な配列を除いて目的の遺伝子配列のみを取得するための手段として、直鎖状共有結合閉鎖DNA (Linear covalently closed DNA; LCC DNA) が使用されている (特許文献1、特許文献2)。

[0004] 直鎖状共有結合閉鎖DNAは、末端部分がヘアピン構造で閉じた直鎖状二本鎖DNAであり、プロテロメラーゼが二本鎖DNAを切断する際に切断された末端にヘアピン構造を形成する活性を利用して作製することができる。例えば、目的の遺伝子配列を一对のプロテロメラーゼ認識配列間に配置した二本鎖環状DNAベクターを用意する。次に、この二本鎖環状DNAベクターに対してプロテロメラーゼ活性を作用させることによって、目的の遺伝子配列のみを含み、末端がヘアピン構造で閉じた直鎖状共有結合閉鎖DNAを作製することができる。このようにして作製された直鎖状共有結合閉鎖DNAは、エキソヌクレアーゼに対して耐性を有するため安定であり、サイズが

小さいために細胞への導入効率が高いという利点も有する。また、プロテロメラーゼ認識配列の配置によって、目的の遺伝子を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAから複製起点配列や抗生物質耐性遺伝子等を除くことができるため、免疫原性等のリスクを軽減することもできる。

[0005] 特許文献1には、直鎖状共有結合閉鎖DNAを *in vitro* で製造する方法が開示されている。特許文献1に記載の方法は、DNAポリメラーゼを用いて二本鎖DNA分子を *in vitro* で合成し、続いてプロテロメラーゼで処理して二本鎖DNA分子を切断することで、直鎖状共有結合閉鎖DNAを作製する方法である。しかしながら、この方法は各種酵素を *in vitro* で反応させる手順が煩雑である。さらに、目的の遺伝子を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAと同時に生成される、目的の遺伝子以外のベクター配列に由来する不要な第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAを分解除去するために、単離された各種酵素が必要になるためコストが高い。

特許文献2には、直鎖状共有結合閉鎖DNAを細胞内で製造する方法が開示されている。特許文献2に記載の方法は、二本鎖DNA分子を細胞内で増幅し、続いて細胞内でプロテロメラーゼの発現を誘導することにより二本鎖DNA分子を切断することで、直鎖状共有結合閉鎖DNAを作製する方法である。しかしながら、この方法でも、目的の遺伝子を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAと共に、目的の遺伝子以外のベクター配列に由来する不要な第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAが同時に生成する。それ故、第1及び第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAを大腸菌から単離した後に、第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAを *in vitro* で選択的に分解除去する手順が依然として必要である。

[0006] したがって、直鎖状共有結合閉鎖DNAをさらに簡便かつ効率よく作製するための新たな方法が必要とされている。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0007] 特許文献1：米国特許公報第9109250号

特許文献2：国際公開第2022/209987号

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製するための新たな方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0009] プロテロメラーゼ活性によって二本鎖環状DNAベクターを切断して直鎖状共有結合閉鎖DNAを生成させる反応では、目的の遺伝子を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAに加えて、目的の遺伝子以外のベクター配列に由来する直鎖状共有結合閉鎖DNAが、不要な第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAとして生成される。

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために、細胞内で直鎖状共有結合閉鎖DNAを生成する際に必要な要素の全てを1つの二本鎖環状DNAベクターに導入することによって、簡便に直鎖状共有結合閉鎖DNAを生産する方法を着想した。具体的には、細胞内で二本鎖環状DNAベクターから第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAを生成し、同時に生成される不要な第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解を誘導するために、1つの二本鎖環状DNAベクター内において、プロテロメラーゼ認識配列間に位置する目的の遺伝子、並びにプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域に位置する、プロテロメラーゼ及びエンドヌクレアーゼを含む融合ポリペプチドをコードする融合遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列を配置した。エンドヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼ認識配列は、不要な第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解を誘導するために導入した。

[0011] 本発明者らは、上記二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞として大腸菌に導入し、プロテロメラーゼ及びエンドヌクレアーゼを含む融合ポリペプチドの発現を誘導した結果、第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解を誘導することによって、目的の遺伝子配列を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく生産できることを見出した。

[0012] 本発明では、細胞内で直鎖状共有結合閉鎖DNAを生成する際に必要な要素の全てが1つの二本鎖環状DNAベクターに導入されているため、極めて簡便に直鎖状共有結合閉鎖DNAを生産できる利点がある。本発明は、上記知見に基づくものであって以下を提供する。

[0013] (1) 二本鎖環状DNAベクターであって、

プロテロメラーゼ又はその活性断片及びエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチドをコードする融合遺伝子配列、

前記プロテロメラーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための一对のプロテロメラーゼ認識配列、

前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び

目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含み、

前記二本鎖環状DNAベクターにおいて前記融合遺伝子配列、及び前記エンドヌクレアーゼ認識配列は、前記一对のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、また前記目的遺伝子配列は前記一对のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されており、かつ

前記融合遺伝子配列は発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている、

前記二本鎖環状DNAベクター。

(2) 前記融合ポリペプチドにおいて、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片が、前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片のN末端側に配置されている、(1)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(3) 前記融合ポリペプチドが、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片と前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片との間にリンカー配列をさらに含む、(1)又は(2)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(4) 前記エンドヌクレアーゼ認識配列と前記プロテロメラーゼ認識配列との間に配置されたスペーサー配列をさらに含む、(1)～(3)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(5) 前記スペーサー配列が200塩基長以下である、(4)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(6) 前記エンドヌクレアーゼ認識配列が、前記プロテロメラーゼ認識配列の一方と隣接して配置されている、(1)～(3)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(7) プラスミドである、(1)～(6)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(8) 前記プロテロメラーゼが、TelNプロテロメラーゼ、TelAプロテロメラーゼ、又はTelKプロテロメラーゼである、(1)～(7)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(9) 前記エンドヌクレアーゼがホーミングエンドヌクレアーゼである、(1)～(8)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(10) (1)～(9)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクターを含む形質転換細胞。

(11) 直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法であって、

(10)に記載の形質転換細胞を培養する培養工程、

前記培養工程後の形質転換細胞において前記融合ポリペプチドの発現を誘導する発現誘導工程、及び

前記発現誘導工程後の形質転換細胞からDNAを抽出するDNA抽出工程を含む前記方法。

(12) 前記DNA抽出工程後に直鎖状共有結合閉鎖DNAを分離する分離工程をさらに含む、(11)に記載の方法。

(13) 前記培養工程前に(1)～(9)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞に導入し、形質転換細胞を得る導入工程をさらに含む、(11)又は(12)に記載の方法。

(14) 前記宿主細胞又は形質転換細胞がエキソヌクレアーゼを発現する、

(11)～(13)のいずれかに記載の方法。

(15) N末端側のプロテロメラーゼ又はその活性断片及びC末端側のエン

ドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチド、又はそれをコードする核酸。

[0014] また、本発明者らは、細胞内で二本鎖環状DNAベクターから第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAを生成し、同時に生成される不要な第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解を誘導するために、1つの二本鎖環状DNAベクター内において、プロテオメラーゼ認識配列間に位置する目的の遺伝子、並びにプロテオメラーゼ認識配列間の他の領域に位置する、プロテオメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列を配置した。エンドヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼ認識配列は、不要な第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解を誘導するために導入した。

[0015] 本発明者らは、上記二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞として大腸菌に導入し、プロテオメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの発現を誘導した結果、第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解を誘導することによって、目的の遺伝子配列を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく生産できることを見出した。本発明は、上記知見に基づくものであって以下を提供する。

[0016] (1) 二本鎖環状DNAベクターであって、

プロテオメラーゼ又はその活性断片をコードするプロテオメラーゼ遺伝子配列、

エンドヌクレアーゼ又はその活性断片をコードするエンドヌクレアーゼ遺伝子配列、

前記プロテオメラーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための一対のプロテオメラーゼ認識配列、

前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び

目的の核酸配列（例えば、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的の遺伝子配列）を含み、

前記二本鎖環状DNAベクターにおいて前記プロテオメラーゼ遺伝子配列

、前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及び前記エンドヌクレアーゼ認識配列は、前記一对のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、前記目的の核酸配列（例えば、前記目的遺伝子配列）は前記一对のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されており、かつ

前記プロテロメラーゼ遺伝子配列及び前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列は、発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている、前記二本鎖環状DNAベクター。

(2) プラスミドである、(1)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(3) 前記プロテロメラーゼが、T e l Nプロテロメラーゼ、T e l Aプロテロメラーゼ、又はT e l Kプロテロメラーゼである、(1)又は(2)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(4) 前記エンドヌクレアーゼが、ホーミングエンドヌクレアーゼである、(1)～(3)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(5) 前記ホーミングエンドヌクレアーゼがI-S c e lホーミングエンドヌクレアーゼ、I-C e u lホーミングエンドヌクレアーゼ、又はI-C r e lホーミングエンドヌクレアーゼである、(4)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(6) (1)～(5)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクターを含む形質転換細胞。

(7) 細胞が細菌細胞又は真核細胞である、(6)に記載の形質転換細胞。

(8) 細菌が大腸菌又は枯草菌である、(7)に記載の形質転換細胞。

(9) エキソヌクレアーゼを発現する、(6)～(8)のいずれかに記載の形質転換細胞。

(10) 直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法であって、

(6)～(9)のいずれかに記載の形質転換細胞を培養する培養工程、

前記培養工程後の形質転換細胞において前記プロテロメラーゼ又はその活性断片及び前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片の発現を誘導する発現誘導工程、及び

前記発現誘導工程後の形質転換細胞からDNAを抽出するDNA抽出工程を含む前記方法。

(11) 前記DNA抽出工程後に直鎖状共有結合閉鎖DNAを分離する分離工程をさらに含む、(10)に記載の方法。

(12) 前記培養工程前に(1)～(5)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞に導入し、形質転換細胞を得る導入工程をさらに含む、(10)又は(11)に記載の方法。

(13) 前記形質転換細胞がエキソヌクラーゼを発現する、(10)～(12)のいずれかに記載の方法。

[0017] さらに本発明は以下を提供する。

(1) 二本鎖環状DNAベクターであって、

プロテロメラーゼ又はその活性断片をコードするプロテロメラーゼ遺伝子配列、

エンドヌクラーゼ又はその活性断片をコードするエンドヌクラーゼ遺伝子配列、

前記プロテロメラーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための一对のプロテロメラーゼ認識配列、

前記エンドヌクラーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための少なくとも1つのエンドヌクラーゼ認識配列、及び

目的の核酸配列(例えば、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列)を含み、

前記二本鎖環状DNAベクターにおいて前記プロテロメラーゼ遺伝子配列、前記エンドヌクラーゼ遺伝子配列、及び前記エンドヌクラーゼ認識配列は、前記一对のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、前記目的の核酸配列(例えば、前記目的遺伝子配列)は前記一对のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されており、かつ

前記プロテロメラーゼ遺伝子配列及び前記エンドヌクラーゼ遺伝子配列は、発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている、

前記二本鎖環状DNAベクター。

(2) 前記プロテロメラーゼ遺伝子配列及び前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列が、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片及び前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチドをコードする、(1)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(3) 前記融合ポリペプチドにおいて、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片が、前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片のN末端側に配置されている、(2)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(4) 前記融合ポリペプチドが、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片と前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片との間にリンカー配列をさらに含む、(2)又は(3)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(5) 前記エンドヌクレアーゼ認識配列と前記プロテロメラーゼ認識配列との間に配置されたスペーサー配列をさらに含む、(1)～(4)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(6) 前記スペーサー配列が200塩基長以下である、(5)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(7) 前記エンドヌクレアーゼ認識配列が、前記プロテロメラーゼ認識配列の一方と隣接して配置されている、(1)～(6)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(8) プラスミドである、(1)～(7)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(9) 前記プロテロメラーゼが、T e | Nプロテロメラーゼ、T e | Aプロテロメラーゼ、又はT e | Kプロテロメラーゼである、(1)～(8)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(10) 前記エンドヌクレアーゼがホーミングエンドヌクレアーゼである、(1)～(9)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクター。

(11) 前記ホーミングエンドヌクレアーゼがI - S c e |ホーミングエンドヌクレアーゼ、I - C e u |ホーミングエンドヌクレアーゼ、又はI - C

reIホーミングエンドヌクレアーゼである、(10)に記載の二本鎖環状DNAベクター。

(12)(1)～(11)のいずれかに記載の二本鎖環状DNAベクターを含む形質転換細胞。

(13)細菌細胞又は真核細胞である、(12)に記載の形質転換細胞。

(14)細菌が大腸菌又は枯草菌である、(13)に記載の形質転換細胞。

(15)エキソヌクレアーゼを発現する、(12)～(14)のいずれかに記載の形質転換細胞。

(16)直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法であって、

(12)～(15)のいずれかに記載の形質転換細胞を培養する培養工程

、  
前記培養工程後の形質転換細胞において前記プロテロメラーゼ又はその活性断片及び前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片の発現を誘導する発現誘導工程、及び

前記発現誘導工程後の形質転換細胞からDNAを抽出するDNA抽出工程を含む前記方法。

(17)前記DNA抽出工程後に直鎖状共有結合閉鎖DNAを分離する分離工程をさらに含む、(16)に記載の方法。

(18)前記培養工程前に請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞に導入し、形質転換細胞を得る導入工程をさらに含む、(16)又は(17)に記載の方法。

(19)前記形質転換細胞がエキソヌクレアーゼを発現する、(16)～(18)のいずれかに記載の方法。

(20)N末端側のプロテロメラーゼ又はその活性断片及びC末端側のエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチド、又はそれをコードする核酸。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2022-144282号及び日本国特許出願番号2022-144285号の開示内容を包含する。

## 発明の効果

[0018] 本発明によれば、直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製するための新たな方法が提供される。

## 図面の簡単な説明

[0019] [図1]直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用のコントロールベクターを示す図である。

[図2]直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用の分離発現ベクターを示す図である。

[図3]T e l NプロテロメラーゼのC末端側にリンカー配列を介してI - S c e lホーミングエンドヌクレアーゼが融合された融合ポリペプチド及びDNAを示す図である。

[図4]直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用の融合発現ベクターを示す図である。

[図5]直鎖状共有結合閉鎖DNAの電気泳動結果を示す図である。パッケージングタンパク質をコードする核酸を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを「目的の直鎖状共有結合閉鎖DNA」として、T e l NプロテロメラーゼとI - S c e lホーミングエンドヌクレアーゼをコードする核酸を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを「不要な直鎖状共有結合閉鎖DNA」として示す。「C o n」はコントロールベクターを示し、「M」はDNAマーカー（New England Biolabs社製，N3200）を示す。

[図6]発現誘導条件を検討した結果を示す図である。図中、「方法A」は37℃にて6時間振盪培養する方法、「方法B」は30℃にて4時間振盪培養した後、37℃にて2時間振盪培養する方法を示す。pHは発現誘導時に添加したプラスグロウII培地のpHを示す。「M」はDNAマーカー（New England Biolabs社製，N3200）を示す。

[図7]比較例1で作製した直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用の2つのベクターのうち、コントロールベクター（T6）を示す図である。

[図8]比較例1で作製した直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用の2つのベクターのうち、I - S c e lベクターを示す図である。

[図9]比較例2における直鎖状共有結合閉鎖DNAの電気泳動結果を示す図で

ある。パッケージングタンパク質をコードする核酸を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを「目的の直鎖状共有結合閉鎖DNA」として、それ以外の直鎖状共有結合閉鎖DNAを「不要な直鎖状共有結合閉鎖DNA」として示す。図中、泳動度の高いバンドは、残存しているI-SceIベクターに対応する。「M」はDNAマーカー（New England Biolabs社製，N3200）を示す。

### 発明を実施するための形態

#### [0020] 1. 二本鎖環状DNAベクター

##### 1-1. 概要

本発明の第1の態様は、二本鎖環状DNAベクターである。本態様の二本鎖環状DNAベクターは、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に、プロテロメラーゼ又はその活性断片及びエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチドをコードする融合遺伝子配列、並びにエンドヌクレアーゼ認識配列を含み、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に目的の核酸配列を含む。

本態様の二本鎖環状DNAベクターによれば、目的の核酸配列を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製することができる。

#### [0021] 1-2. 用語の定義

本明細書で頻用する以下の用語について定義する。

本明細書において「直鎖状共有結合閉鎖DNA (linear covalently closed DNA; LCC DNA)」とは、末端がヘアピン構造で閉じた直鎖状二本鎖DNAをいう。直鎖状共有結合閉鎖DNAの各末端では、2本のDNA鎖の5'末端と3'末端とが連結されてヘアピン構造を形成する。直鎖状共有結合閉鎖DNAは、ヘアピン構造で保護された末端部分がエキソヌクレアーゼによる分解に対して耐性を有する。

[0022] 本明細書において「プロテロメラーゼ」とは、二本鎖DNA分子における特定の配列を認識して、その認識配列内又はその近傍の位置で二本鎖DNA分子を切断し、切断された末端における5'末端と3'末端とを連結して共

有結合閉鎖末端 (covalently closed end) を形成させる活性 (以下、「プロテロメラーゼ活性」という) を有するポリペプチドを意味する。本明細書においてプロテロメラーゼの種類は、上記活性を有する限り特に限定しない。例えば、*Agrobacterium fabrum* 由来のプロテロメラーゼ (TelA プロテロメラーゼ、ACCESSION No. AAK88254)、*Halomonas virus HAP1* 由来のプロテロメラーゼ (ACCESSION No. ABY90402)、*Vibrio virus VP882* 由来のプロテロメラーゼ (ACCESSION No. ABM73418)、*Klebsiella phage phiK02* 由来のプロテロメラーゼ (TelK プロテロメラーゼ、ACCESSION No. AAR83042)、*Rhizobium pusense* 由来のプロテロメラーゼ (ACCESSION No. QKJ91773)、*Feldmannia species virus* 由来のプロテロメラーゼ (ACCESSION No. ACH46812)、*Vibrio phage vB\_VpaM\_MAR* 由来のプロテロメラーゼ (ACCESSION No. AFV81380)、*Yersinia phage PY54* 由来のプロテロメラーゼ (Tel プロテロメラーゼ、ACCESSION No. CAD91792)、*Escherichia virus N15* 由来のプロテロメラーゼ (TelN プロテロメラーゼ、ACCESSION No. AAB81106)、又は上記いずれかのプロテロメラーゼの変異体等を挙げることができる。なお、本明細書においてプロテロメラーゼは、後述のエンドヌクレアーゼには含まれないものとする。

[0023] 本明細書において、プロテロメラーゼの「活性断片」とは、プロテロメラーゼの一部領域を含み、かつその断片がプロテロメラーゼ活性を保持する、例えば全長タンパク質の活性の1%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は同等以上を保持するポリペプチド断片である。本活性断片を構成するポリペプチドのアミノ酸の長さは、特に

制限はしない。例えば、プロテロメラーゼにおいて触媒ドメインを含む少なくとも100、150、200、250、300、350、又は400アミノ酸の連続する領域であればよい。

[0024] 本明細書において「プロテロメラーゼ遺伝子」は、プロテロメラーゼ又はその活性断片をコードする遺伝子である。プロテロメラーゼ遺伝子の例として、上述のいずれかのプロテロメラーゼ又はその活性断片をコードする遺伝子を挙げることができる。例えば、配列番号24で示されるアミノ酸配列からなるT e I Nプロテロメラーゼをコードするプロテロメラーゼ遺伝子、例えば配列番号2で示される塩基配列からなるT e I Nプロテロメラーゼ遺伝子等が挙げられる。

[0025] 本明細書において「プロテロメラーゼ認識配列」とは、プロテロメラーゼによって認識される配列を意味する。プロテロメラーゼは、プロテロメラーゼ認識配列を認識して、そのプロテロメラーゼ認識配列内又はその近傍の位置で二本鎖DNA分子を切断し、切断された末端を再結合する。プロテロメラーゼ認識配列は、パリンドローム配列又はパリンドローム様配列であることが知られている。

[0026] 本明細書において「エンドヌクレアーゼ」とは、ヌクレオチド鎖の内部でホスホジエステル結合を切断する活性を有する酵素を意味する。エンドヌクレアーゼのうち、特定の配列を認識してその配列内又はその近傍で二本鎖DNA分子を切断するエンドヌクレアーゼは、特に制限酵素と呼ばれる。制限酵素には、天然由来の制限酵素の他、T A L E N及びジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）等の人工制限酵素、C a s 9タンパク質等のゲノム編集酵素、又は上記いずれかのエンドヌクレアーゼの変異体等が挙げられる。なお、エンドヌクレアーゼは、2本のDNA鎖を切断する活性を有する酵素、又は一方のDNA鎖のみを切断する酵素（ニッカーゼ）のいずれであってもよい。

[0027] 制限酵素のうち、インテインやイントロン等において見出されるものは特に「ホーミングエンドヌクレアーゼ」と呼ばれている。一般にホーミングエ

ンドヌクレアーゼは、12～40bpの長い認識配列を認識することが知られており、認識配列はパリンドローム配列ではないことも知られている。本明細書においてホーミングエンドヌクレアーゼの種類は、特に限定しない。例えば、I-SceI (ACCESSION No. NP009324)、I-CeuI (ACCESSION No. CAA78934)、I-CreI (ACCESSION No. CAA26008)、I-AniI、I-ChuI、I-DmOI、I-CsmI、PI-SceI、PI-TliI、PI-MtuI、I-ScellI、I-ScellII、HO、PI-CiviI、PI-CtrlI、PI-AaeI、PI-BsulI、PI-DhaI、PI-DraI、PI-MaviI、PI-MchiI、PI-MfulI、PI-MfII、PI-MgalI、PI-MgolI、PI-MiniI、PI-MkaiI、PI-MmaiI、PI-MshiI、PI-MsmI、I-MsOI、PI-MthI、PI-MtuI、PI-MxeI、PI-NpuiI、PI-PfulI、PI-RmaiI、PI-SpbiI、PI-SsplI、PI-FaciI、PI-MjaiI、PI-PhoiI、PI-TagI、PI-ThyI、PI-TkoiI、PI-TsplI、又は上記いずれかのホーミングエンドヌクレアーゼの変異体等を挙げることができる。これらの中でもI-SceI、I-ChuI、I-DmOI、I-CreI、I-CsmI、PI-PfulI、PI-SceI、PI-TliI、I-MsOI、PI-MtuI、I-CeuI、I-ScellI、I-ScellII、HO、又は上記いずれかのホーミングエンドヌクレアーゼの変異体等が好ましく、I-SceI、I-ChuI、I-DmOI、I-CreI、I-CsmI、PI-SceI、PI-PfulI、PI-TliI、I-MsOI、PI-MtuI、I-CeuI、又は上記いずれかのホーミングエンドヌクレアーゼの変異体等がより好ましく、I-SceI、I-CeuI、I-CreI又は上記いずれかのホーミングエンドヌクレアーゼの変異体等がさらに好ましい。

[0028] 本明細書において、エンドヌクレアーゼの「活性断片」とは、エンドヌク

レアーゼの一部領域を含み、かつその断片がエンドヌクレアーゼ活性を保持する、例えば全長タンパク質の活性の1%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は同等以上を保持するポリペプチド断片である。本活性断片を構成するポリペプチドのアミノ酸の長さは、特に制限はしない。例えば、エンドヌクレアーゼにおいて触媒ドメインを含む少なくとも100、150、200、250、300、350、又は400アミノ酸の連続する領域であればよい。

[0029] 本明細書において「エンドヌクレアーゼ遺伝子」は、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片をコードする遺伝子である。エンドヌクレアーゼ遺伝子の例として、上述のいずれかのエンドヌクレアーゼ又はその活性断片をコードする遺伝子を挙げるができる。例えば、配列番号25で示されるアミノ酸配列からなる | - S c e | ホーミングエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子、例えば配列番号4で示される塩基配列からなる | - S c e | ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子等が挙げられる。

[0030] 本明細書において「エンドヌクレアーゼ認識配列」とは、エンドヌクレアーゼによって認識される配列を意味する。エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ認識配列を認識して、そのエンドヌクレアーゼ認識配列内又はその近傍の位置で二本鎖DNA分子を切断する。

[0031] 本発明において「二本鎖環状DNAベクター」は、細胞内で保持可能及び／又は複製可能な環状の二本鎖DNA分子を意味する。二本鎖環状DNAベクターは、細胞内での維持や複製に必要な配列、例えば複製起点及び／又は抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子等を含むことができる。二本鎖環状DNAベクターは、例えばプラスミドベクター又はバクミドベクターであってもよい。また、ベクターは、大腸菌等の細菌と哺乳動物細胞間とで複製可能なシャトルベクターであってもよい。

[0032] 1-3. 構成

本態様の二本鎖環状DNAベクターは、融合遺伝子配列、一对のプロテロ

メラゼ認識配列、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び目的の核酸配列を含む。本態様の二本鎖環状DNAベクターでは、融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列が、一对のプロテロメラゼ認識配列間の同一領域内に配置され、また目的の核酸配列は一对のプロテロメラゼ認識配列間の他の領域内に配置されている。また、融合遺伝子配列は発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている。

[0033] 本明細書において「融合遺伝子配列」とは、プロテロメラゼ又はその活性断片及びエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチドをコードする遺伝子配列を意味する。融合遺伝子配列は、二本鎖環状DNAベクターが導入される細胞におけるコドン使用頻度に合わせてコドン最適化してもよい。

[0034] 本明細書において「プロテロメラゼ又はその活性断片及びエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチド」とは、プロテロメラゼ又はその活性断片が、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片のN末端側に配置されている融合ポリペプチド、又はプロテロメラゼ又はその活性断片が、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片のC末端側に配置されている融合ポリペプチドのいずれであってもよい。好ましくは、プロテロメラゼ又はその活性断片が、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片のN末端側に配置されている。

[0035] 融合ポリペプチドに含まれるプロテロメラゼ又はその活性断片の種類は、プロテロメラゼ活性を有する限り特に限定せず、二本鎖環状DNAベクターにおいて一对のプロテロメラゼ認識配列以外の配列、特に目的の核酸配列を認識しないものであればよい。また、二本鎖環状DNAベクターを導入する細胞のゲノム配列中に、プロテロメラゼ認識配列がないものであってもよい。例えば、融合ポリペプチドに含まれるプロテロメラゼ又はその活性断片が認識するプロテロメラゼ認識配列の長さは限定しないが、5bp以上、6bp以上、7bp以上、8bp以上、9bp以上、10bp以上、15bp以上、20bp以上、25bp以上、30bp以上、35bp以

上、40bp以上、45bp以上、50bp以上、55bp以上、60bp以上、65bp以上、70bp以上、80bp以上、又は90bp以上であってもよい。上述のプロテロメラーゼの中で特に好ましい例として、TelNプロテロメラーゼ、TelAプロテロメラーゼ、又はTelKプロテロメラーゼ、又はその変異体が挙げられる。変異体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、元のアミノ酸配列との相溶性は、80%以上、90%以上、95%以上、又は99%以上であってもよい。

[0036] 融合ポリペプチドに含まれるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片は、エンドヌクレアーゼ活性を有する限り特に限定せず、二本鎖環状DNAベクターにおいてエンドヌクレアーゼ認識配列以外の配列、特に目的の核酸配列を認識しないものであればよい。また、二本鎖環状DNAベクターを導入する細胞のゲノム配列中に、エンドヌクレアーゼ認識配列がないものであってもよい。エンドヌクレアーゼ又はその活性断片は、制限酵素であってもよく、又はニッカーゼであってもよい。例えば、融合ポリペプチドに含まれるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片が認識するエンドヌクレアーゼ認識配列の長さは限定しないが、4bp以上、5bp以上、6bp以上、7bp以上、8bp以上、9bp以上、10bp以上、15bp以上、20bp以上、25bp以上、30bp以上、35bp以上、40bp以上、45bp以上、50bp以上、60bp以上、70bp以上、80bp以上、90bp以上、又は100bp以上であってもよい。

[0037] 本発明の一実施形態において、エンドヌクレアーゼは、ホーミングエンドヌクレアーゼであってもよい。ホーミングエンドヌクレアーゼとして、限定するものではないが、I-SceI、I-CeuI、I-CreI、I-AniI、I-ChuI、I-DmOI、I-CsmI、PI-SceI、PI-TliI、PI-MtuI、I-CeuI、I-ScellI、I-ScellII、HO、PI-CiviI、PI-CtrlI、PI-AaeI、PI-BsuI、PI-DhaI、PI-DraI、PI-MaviI、PI-M

chl、Pl-Mful、Pl-Mfll、Pl-Mgal、Pl-Mgol、Pl-Minl、Pl-Mkal、Pl-Mkal、Pl-Mmal、Pl-Mshl、Pl-Msml、Pl-Msol、Pl-Mthl、Pl-Mtul、Pl-Mxel、Pl-Npul、Pl-Pful、Pl-Rmal、Pl-Spbl、Pl-Sspl、Pl-Facl、Pl-Mjal、Pl-Phol、Pl-Tagl、Pl-Thyl、Pl-Tkol、Pl-Tspl、又はその変異体が例示される。変異体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、元のアミノ酸配列との相同性は、80%以上、90%以上、95%以上、又は99%以上であってもよい。

[0038] 本発明の二本鎖環状DNAベクターにおいて、融合遺伝子配列は発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている。

[0039] 本明細書において「発現制御可能なプロモーター」とは、二本鎖環状DNAベクターを導入した細胞において、下流（3'末端側）に配置された遺伝子等の発現を制御することのできる遺伝子発現調節領域であって、細胞内で対象遺伝子等の発現を任意の時期に誘導することができるプロモーターをいう。発現制御可能なプロモーターは、例えば特定の因子の存在又は非存在や温度等の条件によって誘導することができる。発現制御可能なプロモーターの種類は、限定せず、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、熱誘導プロモーター（lambda PR、lambda PL等）、アラビノース誘導プロモーター（araBADプロモーター等）、IPTG誘導プロモーター（LACプロモーター、LACUV5プロモーター、TACプロモーター、Trcプロモーター、LPPプロモーター等）、T7プロモーター、低温誘導プロモーター（cspAプロモーター等）、Trpプロモーター、ラムノース誘導プロモーター（rhaTプロモーター等）、proUPプロモーター、prpBプロモーター、phoAプロモーター、recAプロモーター、tetAプロモーター、cadAプロモーター、又はこれらの変異体等が挙げられ、IPTG誘導プロモーター及びアラビノース誘導プロモ

ーターが好ましい。

[0040] 本明細書において「発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている」とは、発現制御可能なプロモーターの制御下にあるプロモーター下流域に、発現すべき遺伝子等を配置していることをいう。

[0041] 上述の融合ポリペプチドは、プロテロメラーゼ又はその活性断片とエンドヌクレアーゼ又はその活性断片との間にリンカー配列を含むことができる。本明細書において「リンカー配列」とは、融合ポリペプチドにおいて、融合される各部分が目的の機能を果たすために、プロテロメラーゼ又はその活性断片とエンドヌクレアーゼ又はその活性断片との間に挿入され得るペプチドである。リンカー配列の長さは限定しないが、例えば1アミノ酸長以上、2アミノ酸長以上、3アミノ酸長以上、4アミノ酸長以上、5アミノ酸長以上、6アミノ酸長以上、7アミノ酸長以上、8アミノ酸長以上、9アミノ酸長以上、10アミノ酸長以上、11アミノ酸長以上、12アミノ酸長以上、13アミノ酸長以上、14アミノ酸長以上、15アミノ酸長以上、20アミノ酸長以上、25アミノ酸長以上、30アミノ酸長以上、35アミノ酸長以上、40アミノ酸長以上、45アミノ酸長以上、50アミノ酸長以上、60アミノ酸長以上、70アミノ酸長以上、80アミノ酸長以上、90アミノ酸長以上、100アミノ酸長以上、110アミノ酸長以上、120アミノ酸長以上、150アミノ酸長以上、200アミノ酸長以上、300アミノ酸長以上、400アミノ酸長以上、若しくは500アミノ酸長以上、及び／又は5000アミノ酸長以下、4000アミノ酸長以下、3000アミノ酸長以下、2000アミノ酸長以下、1000アミノ酸長以下、900アミノ酸長以下、800アミノ酸長以下、700アミノ酸長以下、若しくは600アミノ酸長以下、例えば1～500アミノ酸長、2～450アミノ酸長、3～400アミノ酸長、3～350アミノ酸長、3～300アミノ酸長、3～250アミノ酸長、3～200アミノ酸長、3～150アミノ酸長、4～100アミノ酸長、5～50アミノ酸長、6～40アミノ酸長、7～30アミノ酸長、8～20アミノ酸長、9～15アミノ酸長、10～14アミノ酸長、11～

13アミノ酸長、又は12アミノ酸長が例示される。リンカー配列には、側鎖が比較的小さいアミノ酸、例えばセリンやグリシンを多く含むペプチドが用いられることが多い。

[0042] 本態様の二本鎖環状DNAベクターにおける一对のプロテロメラーゼ認識配列は、融合ポリペプチドに含まれるプロテロメラーゼ又はその活性断片が認識するプロテロメラーゼ認識配列である。プロテロメラーゼ認識配列の具体例としては、TelAプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号26）、Halomonas virus HAP1由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号27）、Vibrio virus VP882由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号28）、TelKプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号29）、Rhizobium pusense由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列、Feldmannia species virus由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列、Vibriophage vB\_VpaM\_MAR由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列、Telプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号30）、TelNプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（telRL配列）（配列番号3）を挙げることができる。

[0043] 本態様の二本鎖環状DNAベクターにおけるエンドヌクラーゼ認識配列は、融合ポリペプチドに含まれるエンドヌクラーゼ又はその活性断片が認識するエンドヌクラーゼ認識配列である。エンドヌクラーゼ認識配列として、制限酵素認識配列、TALEN認識配列、ZFN認識配列、CRISPR/Cas9認識配列等が挙げられる。エンドヌクラーゼがホーミングエンドヌクラーゼである場合は、ホーミングエンドヌクラーゼ認識配列の例として、I-SceI認識配列（配列番号31）、I-CeuI認識配列（配列番号32）、及びI-CreI認識配列（配列番号33）等が挙げられる。

[0044] 本発明の二本鎖環状DNAベクターにおけるエンドヌクラーゼ認識配列

の個数は1つ以上であればよい。例えば、本発明の二本鎖環状DNAベクターは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10以上のエンドヌクレアーゼ認識配列を含むことができる。但し、一对のプロテオメラーゼ認識配列間に目的の核酸配列を含む領域には、エンドヌクレアーゼ認識配列は含まれないものとする。

[0045] 本明細書において「目的の核酸配列」は、2以上のヌクレオチドを含む配列であれば特に限定しない。より具体的には、目的の核酸配列は、タンパク質若しくはその断片又はRNAをコードする配列に制限されず、例えば核酸医薬として機能し得る配列等であってもよく、目的の核酸配列を導入するために利用可能な配列であってもよい。核酸配列の具体例としては、限定するものではないが、タンパク質又はその断片をコードする遺伝子配列；siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、又はリボザイム等のノンコーディングRNAをコードする核酸配列；又はアンチセンス核酸、アプタマー、又はベイト核酸等の核酸医薬が挙げられる。また、目的の核酸配列を導入するために利用可能な配列の例としては、制限酵素やゲノム編集酵素等のヌクレアーゼによって認識／切断可能な配列や、2以上のヌクレアーゼによって認識／切断可能な配列を含むマルチクローニングサイトを挙げることもできる。

[0046] 本明細書において「目的の遺伝子配列」とは、目的のタンパク質若しくはその断片又は目的のRNA分子をコードする遺伝子配列を意味する。目的のタンパク質又はその断片としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、ウイルスを構成するポリペプチド、動物、植物、菌類、藻類、細菌、ウイルス等が産生するポリペプチド、及びこれらの断片等が挙げられる。これらは、細胞／遺伝子治療薬、ワクチン、疾患治療薬等として使用することができる。動物、植物、菌類、藻類、細菌、ウイルス等が産生するポリペプチドは、特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、フィターゼ、アミラーゼ、グルコシダーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、グルタミナーゼ、ペプチダーゼ、オキシダーゼ、ラクターゼ、キシラナーゼ、トリプシン、ペクチナーゼ、イソメラーゼ等の

酵素、プロテインA、プロテインG、プロテインL等の抗体結合性タンパク質、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、ラマ抗体、アルパカ抗体、一本鎖抗体、重鎖抗体、多価抗体、Fab、F(ab')、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fc融合タンパク質、バイスペシフィック抗体、重鎖(H鎖)、軽鎖(L鎖)、単鎖Fv(scFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、Diabody、抗体様分子標的ペプチド(マイクロ抗体)等の抗体又は抗体断片や他の機能性タンパク質等抗体や抗体断片以外の化合物と抗体断片との複合体(抗体様分子)、ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン、ヒト上皮成長因子等の上皮成長因子、インシュリン、成長ホルモン、エリスロポエチン、インターフェロン、血液凝固第V因子、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、トロンボポエチン、IL-1、IL-6、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)、ウロキナーゼ、レプチン、幹細胞成長因子(SCF)、フィブロイン、蛍光タンパク質、B型肝炎ウイルス表面抗原、ヒルジン等が挙げられる。

[0047] 目的遺伝子配列等の目的の核酸配列は、目的の核酸配列(例えば、目的のタンパク質又はその断片をコードする配列)に加えて、プロモーターを含むこともできる。また、必要に応じてイントロン、エンハンサー、ターミネーター、及び/又はポリAシグナル等の構成要素をさらに含んでもよい。

[0048] 本態様の二本鎖環状DNAベクターでは、融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列は、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、目的の核酸配列は一对のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されている。エンドヌクレアーゼ認識配列は、プロテロメラーゼ認識配列の一方と隣接して配置されていてもよく、エンドヌクレアーゼ認識配列とプロテロメラーゼ認識配列との間にスペーサー配列が配置されていてもよい。

[0049] 本態様において「スペーサー配列」とは、融合ポリペプチドに含まれるプロテロメラーゼ又はその活性断片がプロテロメラーゼ認識配列を認識し、融

合ポリペプチドに含まれるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片がエンドヌクレアーゼ認識配列を認識し得るように、エンドヌクレアーゼ認識配列とプロテロメラーゼ認識配列との間に挿入され得る配列である。スペーサー配列の長さは1塩基以上であれば限定しないが、例えば1塩基以上、2塩基以上、3塩基以上、4塩基以上、5塩基以上、6塩基以上、7塩基以上、8塩基以上、9塩基以上、10塩基以上、11塩基以上、12塩基以上、13塩基以上、14塩基以上、15塩基以上、20塩基以上、25塩基以上、30塩基以上、35塩基以上、40塩基以上、45塩基以上、50塩基以上、55塩基以上、60塩基以上、65塩基以上、70塩基以上、75塩基以上、80塩基以上、85塩基以上、90塩基以上、95塩基以上、100塩基以上、120塩基以上、150塩基以上、若しくは200塩基以上、及び／又は1000塩基長以下、900塩基長以下、800塩基長以下、700塩基長以下、600塩基長以下、500塩基長以下、400塩基長以下、300塩基長以下、若しくは250塩基以下、例えば1～1000塩基長、1～500塩基長、1～400塩基長、1～300塩基長、1～250塩基長、1～200塩基長、1～150塩基長、1～100塩基長、1～70塩基長、1～50塩基長、1～40塩基長、1～30塩基長、1～20塩基長、1～10塩基長、2～10塩基長、3～10塩基長、4～9塩基長、5～9塩基長、若しくは6～8塩基長が例示される。

[0050] 一実施形態では、スペーサー配列の長さは、リンカー配列の長さに基づいて決定することができる。

[0051] 本態様の二本鎖環状DNAベクターは、融合遺伝子配列、一对のプロテロメラーゼ認識配列、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び目的の核酸配列に加えて、その他の配列を含むことができる。その他の配列としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、細胞内でのベクターの維持や複製に必要な配列、例えば複製起点及び／又は抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子等の、一般的なプラスミドベクターに必須な要素や、LacI遺伝子やAraC遺伝子等のアクチベータ

ー又はリプレッサータンパク質をコードする配列、クローニングサイト、Clontech社のIn-FusionクローニングシステムやNew England Biolabs社のGibson Assemblyシステム等を利用するためのオーバーラップ領域等が挙げられる。なお、抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子の例として、アンピシリン耐性を付与する $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子（「ampR遺伝子」と表記する場合がある）、カナマイシン耐性を付与するアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ遺伝子（「kanR遺伝子」と表記する場合がある）、テトラサイクリン耐性を付与するテトラサイクリン排出トランスポーター遺伝子、クロラムフェニコール耐性を付与するCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子等が挙げられる。

[0052] 本態様において、その他の配列は、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列と同一の領域内、又は一对のプロテロメラーゼ認識配列間の目的の核酸配列と同一の領域内のいずれかに配置することができるが、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列と同一の領域内に配置されることがより好ましい。例えば、目的の核酸配列以外の全ての要素を融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列と同一の領域内に配置することもできる。

[0053] 本態様の二本鎖環状DNAベクターの作製方法は、特に限定せず、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、全合成法、PCR法、Clontech社のIn-FusionクローニングシステムやNew England Biolabs社のGibson Assemblyシステム等を使用する方法が挙げられる。例えば、市販や公知のベクターを基に作製することもでき、pUCベクター、pETベクター、pGEMベクター等を基に作製することができる。特に、pUC19ベクターをはじめとするpUC系のoriを持つプラスミドを基に設計した場合、DNAの複製効率の高さの点において好ましい。これらの市販のベクターに、融合遺伝子配列、一对のプロテロメラーゼ認識配列、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列

、及び目的の核酸配列を追加することによって、本発明の二本鎖環状DNAベクターを作製することもできる。

[0054] 1-4. 効果

本態様の二本鎖環状DNAベクターから融合ポリペプチドの発現を誘導すると、融合ポリペプチドに含まれるプロテオメラーゼ又はその活性断片によりプロテオメラーゼ認識配列が認識され、切断された末端が再結合されることによって、目的の核酸配列を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNA、並びに融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAが生成する。第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは、融合ポリペプチドに含まれるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片によって、エンドヌクレアーゼ認識配列が認識されて切断される。これにより、第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは、内在性のエキソヌクレアーゼ活性によって分解されるため、第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAを効率よく取得することができる。

[0055] 本発明の二本鎖環状DNAベクターは、細胞内で直鎖状共有結合閉鎖DNAを生成する際に必要な要素の全てを1つのDNAベクターに含むため、目的の核酸配列を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく生産することができる。

[0056] 本発明によれば、N末端側のプロテオメラーゼ又はその活性断片及びC末端側のエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチドも提供される。さらに、融合ポリペプチドをコードする核酸も提供される。

[0057] 2. 二本鎖環状DNAベクターを含む形質転換細胞

2-1. 概要

本発明の第2の態様は、形質転換細胞である。本態様の形質転換細胞は、前記第1態様に記載の二本鎖環状DNAベクターを含む。

[0058] 2-2. 構成

本態様の形質転換細胞は、必須成分として二本鎖環状DNAベクターを含む。

本明細書において形質転換細胞の種類は、限定しない。形質転換細胞は、二本鎖環状DNAベクターを導入することができ、二本鎖環状DNAベクターを保持可能及び／又は複製可能な細胞であればよい。例えば、古細菌、細菌、又は真核細胞が挙げられる。細菌は、大腸菌、乳酸菌、又は枯草菌であってもよい。真核細胞の例としては、真菌細胞（例えば酵母細胞）、藻類細胞、植物細胞、原生動物細胞、昆虫細胞、線虫細胞、魚類細胞、鳥類細胞（例えばニワトリ細胞）、及び哺乳動物細胞（例えば、マウス細胞、チンパンジー細胞、及びヒト細胞）が挙げられる。中でも、二本鎖環状DNAベクターを複製できる細胞が好ましい。

[0059] 大腸菌の例として、*Escherichia*属が挙げられる。より具体的には、*Escherichia coli*（例：*Escherichia coli* K-12株、*Escherichia coli* B株）等を挙げることができる。

[0060] また、市販の大腸菌株や、生物資源リソースセンターの大腸菌株を使用することもでき、JM109株、DH5株、DH5 $\alpha$ 株、DH10B株、NEB10 $\beta$ 株、HST08株、HST16CR株、HB101株、W3110株、MG1655株、BL21株、BL21 DE3株等を使用することもできる。これらの株は、New England Biolabs社、タカラバイオ社、サーモフィッシャーサイエンティフィック社、東洋紡社、ATCC (American Type Culture Collection)、NBRP (National Bio Resource Project) 等から入手することができる。

[0061] また、本発明においては、上述の大腸菌株からの誘導株も使用できる。例えば、メチオニン要求性であればJW3973株（NBRPより入手可能）、ロイシン要求性であればJW2806株（NBRPより入手可能）、システイン要求性であればJW3582株（NBRPより入手可能）、チアミン及びヒスチジン要求性であればME5305株（NBRPより入手可能）等が挙げられる。

[0062] 一実施形態において、本態様の形質転換細胞は、エキソヌクレアーゼを発現している。ここでエキソヌクレアーゼは、融合ポリペプチドに含まれるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片によって切断されたDNAをその切断末端から分解可能なものであれば特に限定しない。エキソヌクレアーゼは、例えば内在性のエキソヌクレアーゼであってもよい。

[0063] 2-3. 効果

本態様の形質転換細胞において二本鎖環状DNAベクターから融合ポリペプチドの発現を誘導すると、目的の核酸配列を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを効率よく生産することができる。

[0064] 融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは、エンドヌクレアーゼによって切断された後、内在性のエキソヌクレアーゼ活性によって速やかに分解され得る。

[0065] 3. 直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法

3-1. 概要

本発明の第3の態様は、直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法である。本態様の作製方法は、必須工程として培養工程、発現誘導工程、及びDNA抽出工程を含み、選択工程として分離工程及び／又は導入工程を含む。本態様の作製方法によれば、直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製することができる。

[0066] 3-2. 方法

以下、本態様の直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法における各工程について具体的に説明をする。

[0067] (導入工程)

「導入工程」とは、第1態様の二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞に導入し、形質転換細胞を得る工程である。

[0068] 本工程において二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞に導入する方法は、特に限定はしない。例えば、Green & Sambrook、2012、Molecular Cloning: A Laboratory Manu

al Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York等に記載された当該分野で公知の遺伝子導入方法（形質転換方法）を用いればよい。具体的には、ヒートショック法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオン性脂質による導入、カチオン性ポリマー（例えばポリエチレンイミン（PEI））による導入、ナノ粒子による導入、ウイルスによる導入、粒子衝撃等が挙げられる。

[0069] 本工程において二本鎖環状DNAベクターが導入された宿主細胞は、二本鎖環状DNAベクター中の抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子に基づき、抗生物質を含む培地において適宜選択することが可能である。

[0070] （培養工程）

「培養工程」とは、形質転換細胞を培養する工程である。本工程は、後述の発現誘導工程の前に形質転換細胞を増殖させることによって、後述の発現誘導工程へと進む前に、二本鎖環状DNAベクターの細胞内のコピー数を増やすことを目的とする。

[0071] 本工程において形質転換細胞を培養する方法は、特に限定せず、形質転換細胞の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、Green & Sambrook、2012、Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York等に記載された当該分野で公知の培養方法を用いればよい。

[0072] 本工程で形質転換細胞を培養するための培地は、液体培地又は固形培地のいずれであってもよい。培地として、例えば、ペプトン、トリプトン等のタンパク酵素分解物、ポテトデキストロース、イーストエキス等の生物由来抽出物、グルタミン酸等のアミノ酸又はその塩、グルコース、グリセロール、スクロース等の糖類、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、リン酸二水素カ

リウム等の無機塩から選ばれる1つ以上の成分を含む培地であればよい。具体的な培地及び組成としては、LB培地（トリプトン、イーストエキス、塩化ナトリウム）、YPG培地（イーストエキス、ペプトン、グルコース）、PD培地（ポテトデキストロース）、TB培地（トリプトン、イーストエキス、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム）等が挙げられる。

[0073] 二本鎖環状DNAベクターが抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子を含む場合には、本工程は抗生物質存在下で行うことができる。抗生物質の例として、アンピシリン、カルベニシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、又はクロラムフェニコール等が挙げられる。

[0074] 本工程の培養条件は、形質転換細胞の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、20～42℃、25～40℃、30～38℃、又は35～37℃で本工程の培養を行うことができる。

[0075] 本工程における培養時間は、十分量の二本鎖環状DNAベクターが得られる時間であれば、限定しない。例えば、1時間以上、2時間以上、4時間以上、12時間以上、24時間以上、2日以上、3日以上、又は1週間以上であってもよい。

[0076] また、本工程に用いる培地のpHは、形質転換細胞が成育可能であれば特に限定しない。例えば、pH3以上、pH4以上、pH5以上、pH6以上、pH7以上、pH7.5以上、pH8以上、pH8.5以上、pH9以上、若しくはpH9.5以上、及び/又はpH11以下、pH10.5以下、pH10以下、pH9.5以下、pH9以下、pH8.5以下、pH8以下、若しくはpH7.5以下であってもよく、例えばpH3～11、pH4～10、pH5～9、若しくはpH7～9、又はpH7.5～pH10.5、pH8～pH10、若しくはpH8.5～pH9.5であってもよい。

[0077] (発現誘導工程)

本態様において「発現誘導工程」とは、培養工程後の形質転換細胞において融合ポリペプチドの発現を誘導する工程である。

[0078] 本工程において融合ポリペプチドの発現を誘導する方法は、特に限定せず

、発現制御可能なプロモーターの種類に応じて適宜選択することができる。

[0079] 一実施形態において、本工程では、発現誘導剤が培養工程後の培地に添加される。例えば、アラビノース誘導プロモーター、IPTG誘導プロモーター、又はラムノース誘導プロモーターであれば、培養工程後の形質転換細胞を含む培地に、発現誘導剤としてアラビノース、IPTG、又はラムノースを添加する方法が挙げられる。

[0080] 本工程において発現誘導剤の存在下で形質転換細胞を培養する時間は、融合ポリペプチドの発現が十分に誘導される時間であれば、特に限定しない。例えば、1分以上、5分以上、10分以上、20分以上、30分以上、1時間以上、2時間以上、3時間以上、6時間以上、12時間以上、又は24時間以上であってもよい。

[0081] 本工程に使用する培地のpHは、融合ポリペプチドが細胞内で機能し得る範囲、すなわちプロテロメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの両方が機能し得る範囲であればよく、例えばpH3~11、pH4~10、pH5~9、又はpH7~9であってもよい。例えば、プロテロメラーゼの至適pHとエンドヌクレアーゼの至適pHとの間のpH範囲を使用することもできる。

[0082] 本工程において発現誘導剤の存在下で形質転換細胞を培養する温度は、例えば20℃以上、25℃以上、26℃以上、27℃以上、28℃以上、29℃以上、30℃以上、31℃以上、32℃以上、33℃以上、34℃以上、35℃以上、36℃以上、若しくは37℃以上、及び/又は42℃以下、40℃以下、39℃以下、38℃以下、37℃以下、36℃以下、35℃以下、34℃以下、33℃以下、32℃以下、若しくは31℃以下、例えば、30~38℃、32~38℃、33~38℃、34~37℃、35~37℃、若しくは36~37℃、又は25~35℃、26~34℃、27~33℃、28~32℃、若しくは29~31℃であってもよい。例えば、プロテロメラーゼの至適温度とエンドヌクレアーゼの至適温度との間の温度範囲を使用することもできる。

[0083] さらに実施形態において、本工程では形質転換細胞を発現誘導剤の存在

下にて複数の温度条件下で培養することができる。複数の温度条件として、プロテロメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの各々の酵素活性の至適温度範囲が例示される。プロテロメラーゼの酵素活性の至適温度は、例えば26～37℃、27～35℃、28～33℃、又は29～31℃（例：30℃）であり得る。ホーミングエンドヌクレアーゼの酵素活性の至適温度は、例えば30～42℃、32～40℃、34～39℃、又は36～38℃（例：37℃）であり得る。本実施形態における各温度条件での培養時間は、10分以上、20分以上、30分以上、1時間以上、2時間以上、3時間以上、4時間以上、5時間以上、6時間以上、8時間以上、10時間以上、12時間以上、又は24時間以上とすることができる。本工程の培養は、上述の温度と培養時間との任意の組み合わせで行ってもよい。例えば、28～32℃で2時間以上（例えば4時間以上）培養した後、35℃～39℃で2時間以上（例えば4時間以上）培養することもできる。

[0084] 別の実施形態では、現制御可能なプロモーターが熱誘導プロモーター又は低温誘導プロモーターであれば、ヒートショック又は低温ショックを与えればよい。ヒートショック又は低温ショックの条件は、融合ポリペプチドの発現が十分に誘導される温度及び時間であれば特に限定しない。例えばヒートショックであれば、36℃～45℃、37℃～44℃、38℃～43℃、39℃～42℃、又は40℃～41℃で、10秒以上、20秒以上、30秒以上、40秒以上、50秒以上、1分以上、5分以上、10分以上、20分以上、30分以上、若しくは1時間以上、及び／又は24時間以下、12時間以下、6時間以下、3時間以下、若しくは2時間以下、例えば10秒～24時間、20秒～12時間、25秒～6時間、30秒～3時間、40秒～2時間、50秒～1時間、1分～30分、若しくは2分～5分で行うことができる。

[0085]本工程により、形質転換細胞において融合ポリペプチドが発現し、目的の核酸配列を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNA、並びに融合遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAが生

成し、第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは切断されて内在性のエキソヌクレアーゼ活性によって分解される。

[0086] (DNA抽出工程)

「DNA抽出工程」とは、発現誘導工程後の形質転換細胞からDNAを抽出する工程である。

[0087] 本工程においてDNAを抽出する方法は、当該分野で公知の常法を用いればよい。例えば、Green&Sambrook、2012、Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New Yorkに記載の方法に準じて調製すればよい。また、市販のDNA抽出キットを用いて調製してもよい。

本工程により、目的の核酸配列を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAが抽出される。

[0088] (分離工程)

「分離工程」とは、DNA抽出工程後に直鎖状共有結合閉鎖DNAを分離する工程である。本工程は、DNA抽出工程において抽出された目的の核酸配列を含む直鎖状共有結合閉鎖DNA以外のDNA成分、例えばゲノムDNA断片や切れ残ったDNA断片及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む不要な直鎖状共有結合閉鎖DNA等を除去することを目的とする。

[0089] 本工程において直鎖状共有結合閉鎖DNAを分離する方法は、特に限定せず、適宜選択することができる。例えば、市販のキットを用いて精製する方法、ゲル抽出、陽イオンクロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、フィルター、又は限外ろ過膜を用いて分離する方法等が挙げられる。

[0090] 3-3. 効果

本態様の直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法によれば、直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製することができる。本発明の作製方法に

に基づき、直鎖状共有結合閉鎖DNAの大量製造を少ない工程数で達成することができる。

[0091] 4. 二本鎖環状DNAベクター

4-1. 概要

本発明の第4の態様は、二本鎖環状DNAベクターである。本態様の二本鎖環状DNAベクターは、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に、プロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含み、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に目的の核酸配列を含む。

本態様の二本鎖環状DNAベクターによれば、目的の核酸配列を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製することができる。

[0092] 4-2. 構成

本態様の二本鎖環状DNAベクターは、プロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、一对のプロテロメラーゼ認識配列、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び目的の核酸配列を含む。本態様の二本鎖環状DNAベクターでは、プロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列が、一对のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、また目的の核酸配列は一对のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されている。また、プロテロメラーゼ遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ遺伝子配列は発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている。

[0093] 本明細書において「プロテロメラーゼ遺伝子配列」とは、プロテロメラーゼ又はその活性断片をコードする遺伝子配列を意味する。プロテロメラーゼ遺伝子配列は、二本鎖環状DNAベクターが導入される細胞におけるコドン使用頻度に合わせてコドン最適化してもよい。

[0094] プロテロメラーゼ遺伝子配列によってコードされるプロテロメラーゼ又はその活性断片の種類は、プロテロメラーゼ活性を有する限り特に限定せず、二本鎖環状DNAベクターにおいて一对のプロテロメラーゼ認識配列以外の

配列、特に目的の核酸配列を認識しないものであればよい。また、二本鎖環状DNAベクターを導入する細胞のゲノム配列中に、プロテオメラーゼ認識配列がないものであってもよい。例えば、プロテオメラーゼ又はその活性断片が認識するプロテオメラーゼ認識配列の長さは限定しないが、5 bp以上、6 bp以上、7 bp以上、8 bp以上、9 bp以上、10 bp以上、15 bp以上、20 bp以上、25 bp以上、30 bp以上、35 bp以上、40 bp以上、45 bp以上、50 bp以上、55 bp以上、60 bp以上、65 bp以上、70 bp以上、80 bp以上、又は90 bp以上であってもよい。上述のプロテオメラーゼの中で特に好ましい例として、TeINプロテオメラーゼ、TeIAプロテオメラーゼ、又はTeIKプロテオメラーゼ、又はその変異体が挙げられる。変異体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、元のアミノ酸配列との相同性は、80%以上、90%以上、95%以上、又は99%以上であってもよい。

[0095] 本明細書において「エンドヌクレアーゼ遺伝子配列」とは、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片をコードする遺伝子配列を意味する。エンドヌクレアーゼ遺伝子配列は、二本鎖環状DNAベクターが導入される細胞におけるコドン使用頻度に合わせてコドン最適化してもよい。

[0096] エンドヌクレアーゼ遺伝子配列によってコードされるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片は、エンドヌクレアーゼ活性を有する限り特に限定せず、二本鎖環状DNAベクターにおいてエンドヌクレアーゼ認識配列以外の配列、特に目的の核酸配列を認識しないものであればよい。また、二本鎖環状DNAベクターを導入する細胞のゲノム配列中に、エンドヌクレアーゼ認識配列がないものであってもよい。エンドヌクレアーゼ又はその活性断片は、制限酵素であってもよく、又はニッカーゼであってもよい。例えば、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片が認識するエンドヌクレアーゼ認識配列の長さは限定しないが、4 bp以上、5 bp以上、6 bp以上、7 bp以上、8 bp以上、9 bp以上、10 bp以上、15 bp以上、20 bp以上、25 bp以上、30 bp以上、35 bp以上、40 bp以上、45 bp以上、50

b p 以上、60 b p 以上、70 b p 以上、80 b p 以上、90 b p 以上、又は100 b p 以上であってもよい。

[0097] 本発明の二本鎖環状DNAベクターにおいて、プロテロメラーゼ遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ遺伝子配列は発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている。

[0098] 本態様では、例えば、プロテロメラーゼ遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ遺伝子配列はそれぞれ別の発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されていてもよく、或いは同一の発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されていてもよい。プロテロメラーゼ遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ遺伝子配列が同一の発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている場合は、プロテロメラーゼ遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ遺伝子配列は同一オペロン内に配置されていてもよく、或いはプロテロメラーゼ遺伝子配列とエンドヌクレアーゼ遺伝子配列との間に自己切断ペプチドをコードする配列やIRES配列等を配置することもできる。

[0099] 本態様の二本鎖環状DNAベクターにおける一对のプロテロメラーゼ認識配列は、プロテロメラーゼ遺伝子配列によってコードされるプロテロメラーゼ又はその活性断片が認識するプロテロメラーゼ認識配列である。プロテロメラーゼ認識配列の具体例としては、TelAプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号26）、Halomonas virus HAP1由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号27）、Vibrio virus VP882由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号28）、TelKプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号29）、Rhizobium pusense由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列、Feldmannia species virus由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列、Vibrio phage vB\_VpaM\_MAR由来のプロテロメラーゼによって認識される塩基配列、Telプロテロメラーゼによって認識される塩基配列（配列番号30）、TelNプロテロメラーゼ

によって認識される塩基配列（t e l R L 配列）（配列番号 3）を挙げることができる。

[0100] 本態様の二本鎖環状 DNA ベクターにおけるエンドヌクレアーゼ認識配列は、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列によってコードされるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片が認識するエンドヌクレアーゼ認識配列である。エンドヌクレアーゼ認識配列として、制限酵素認識配列、T A L E N 認識配列、Z F N 認識配列、C R I S P R / C a s 9 認識配列等が挙げられる。エンドヌクレアーゼがホーミングエンドヌクレアーゼである場合は、ホーミングエンドヌクレアーゼ認識配列の例として、I - S c e I 認識配列（配列番号 3 1）、I - C e u I 認識配列（配列番号 3 2）、及び I - C r e I 認識配列（配列番号 3 3）等が挙げられる。

[0101] 本態様の二本鎖環状 DNA ベクターでは、プロテオメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列は、一对のプロテオメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、目的の核酸配列は一对のプロテオメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されている。エンドヌクレアーゼ認識配列は、プロテオメラーゼ認識配列の一方と隣接して配置されていてもよく、エンドヌクレアーゼ認識配列とプロテオメラーゼ認識配列との間にスペーサー配列が配置されていてもよい。

[0102] 本態様書において「スペーサー配列」とは、プロテオメラーゼ又はその活性断片がプロテオメラーゼ認識配列を認識し、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片がエンドヌクレアーゼ認識配列を認識し得るように、エンドヌクレアーゼ認識配列とプロテオメラーゼ認識配列との間に挿入され得る配列である。スペーサー配列の長さは 1 塩基以上であれば限定しないが、例えば 1 塩基以上、2 塩基以上、3 塩基以上、4 塩基以上、5 塩基以上、6 塩基以上、7 塩基以上、8 塩基以上、9 塩基以上、10 塩基以上、11 塩基以上、12 塩基以上、13 塩基以上、14 塩基以上、15 塩基以上、20 塩基以上、25 塩基以上、30 塩基以上、35 塩基以上、40 塩基以上、45 塩基以上、50 塩基以上、55 塩基以上、60 塩基以上、65 塩基以上、70 塩基以上

、75塩基以上、80塩基以上、85塩基以上、90塩基以上、95塩基以上、100塩基以上、120塩基以上、150塩基以上、若しくは200塩基以上、及び／又は1000塩基長以下、900塩基長以下、800塩基長以下、700塩基長以下、600塩基長以下、500塩基長以下、400塩基長以下、300塩基長以下、若しくは250塩基以下、例えば1～1000塩基長、1～500塩基長、1～400塩基長、1～300塩基長、1～250塩基長、1～200塩基長、1～150塩基長、1～100塩基長、1～70塩基長、1～50塩基長、1～40塩基長、1～30塩基長、1～20塩基長、1～10塩基長、2～10塩基長、3～10塩基長、4～9塩基長、5～9塩基長、若しくは6～8塩基長が例示される。

[0103] 本態様の二本鎖環状DNAベクターは、プロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、一对のプロテロメラーゼ認識配列、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び目的の核酸配列に加えて、その他の配列を含むことができる。その他の配列としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、細胞内でのベクターの維持や複製に必要な配列、例えば複製起点及び／又は抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子等の、一般的なプラスミドベクターに必須な要素や、LacI遺伝子やAraC遺伝子等のアクチベーター又はリプレッサータンパク質をコードする配列、クローニングサイト、Clontech社のIn-FusionクローニングシステムやNew England Biolabs社のGibson Assemblyシステム等を利用するためのオーバーラップ領域等が挙げられる。なお、抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子の例として、アンピシリン耐性を付与するβラクタマーゼ遺伝子（amp<sup>R</sup>遺伝子）、カナマイシン耐性を付与するアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ遺伝子（kan<sup>R</sup>遺伝子）、テトラサイクリン耐性を付与するテトラサイクリン排出トランスポーター遺伝子、クロラムフェニコール耐性を付与するCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子等が挙げられる。

[0104] 本態様において、その他の配列は、一对のプロテロメラーゼ認識配列間のプロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列と同一の領域内、又は一对のプロテロメラーゼ認識配列間の目的の核酸配列と同一の領域内のいずれかに配置することができるが、一对のプロテロメラーゼ認識配列間のプロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列と同一の領域内に配置されることがより好ましい。例えば、目的の核酸配列以外の全ての要素をプロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列と同一の領域内に配置することもできる。

[0105] 本態様の二本鎖環状DNAベクターの作製方法は、特に限定せず、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、全合成法、PCR法、Clontech社のIn-FusionクローニングシステムやNew England Biolabs社のGibson Assemblyシステム等を使用する方法が挙げられる。例えば、市販や公知のベクターを基に作製することもでき、pUCベクター、pETベクター、pGEMベクター等を基に作製することができる。特に、pUC19ベクターをはじめとするpUC系のoriを持つプラスミドを基に設計した場合、DNAの複製効率の高さの点において好ましい。これらの市販のベクターに、プロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、一对のプロテロメラーゼ認識配列、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び目的の核酸配列を追加することによって、本発明の二本鎖環状DNAベクターを作製することもできる。

[0106] 本態様の一実施形態において、プロテロメラーゼ遺伝子配列及びエンドヌクレアーゼ遺伝子配列は、プロテロメラーゼ又はその活性断片及びエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチドをコードする。本実施形態は、上述の第1態様に対応し、本実施形態において融合ポリペプチドをコードする遺伝子配列は第1態様における融合遺伝子配列に対応する。

[0107] 4-3. 効果

本態様の二本鎖環状DNAベクターからエンドヌクレアーゼ又はその活性断片及びプロテロメラーゼ又はその活性断片の発現を誘導すると、プロテロメラーゼ又はその活性断片によりプロテロメラーゼ認識配列が認識され、切断された末端が再結合されることによって、目的の核酸配列を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNA、並びにプロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAが生成する。第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片によって、エンドヌクレアーゼ認識配列が認識されて切断される。これにより、第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは、内在性のエキソヌクレアーゼ活性によって分解されるため、第1の直鎖状共有結合閉鎖DNAを効率よく取得することができる。

[0108] 5. 二本鎖環状DNAベクターを含む形質転換細胞

5-1. 概要

本発明の第5の態様は、形質転換細胞である。本態様の形質転換細胞は、前記第4態様に記載の二本鎖環状DNAベクターを含む。

[0109] 5-2. 構成

本態様の形質転換細胞は、必須成分として二本鎖環状DNAベクターを含む。

[0110] 一実施形態において、本態様の形質転換細胞は、エキソヌクレアーゼを発現している。ここでエキソヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列によってコードされるエンドヌクレアーゼ又はその活性断片によって切断されたDNAの末端から分解可能なものであれば特に限定しない。エキソヌクレアーゼは、例えば内在性のエキソヌクレアーゼであってもよい。

[0111] 5-3. 効果

本態様の形質転換細胞において二本鎖環状DNAベクターからエンドヌクレアーゼ又はその活性断片及びプロテロメラーゼ又はその活性断片の発現が誘導されると、目的の核酸配列を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを効率よく生産することができる。

[0112] プロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは、エンドヌクレアーゼによって切断された後、内在性のエキソヌクレアーゼ活性によって速やかに分解され得る。

[0113] 6. 直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法

6-1. 概要

本発明の第6の態様は、直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法である。本態様の作製方法は、必須工程として培養工程、発現誘導工程、及びDNA抽出工程を含み、選択工程として分離工程及び／又は導入工程を含む。本態様の作製方法によれば、直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製することができる。

[0114] 6-2. 方法

以下、本態様の直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法における各工程について具体的に説明をする。

[0115] (導入工程)

「導入工程」とは、第1態様の二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞に導入し、形質転換細胞を得る工程である。本工程の構成については、第3態様の記載に準ずるため、ここでの説明は省略する。

[0116] (培養工程)

「培養工程」とは、形質転換細胞を培養する工程である。本工程は、後述の発現誘導工程の前に形質転換細胞を増殖させることによって、後述の発現誘導工程へと進む前に、二本鎖環状DNAベクターの細胞内のコピー数を増やすことを目的とする。本工程の構成については、第3態様の記載に準ずるため、ここでの説明は省略する。

[0117] (発現誘導工程)

本態様において「発現誘導工程」とは、培養工程後の形質転換細胞においてエンドヌクレアーゼ又はその活性断片及びプロテロメラーゼ又はその活性断片の発現を誘導する工程である。

- [0118] 本工程においてエンドヌクレアーゼ又はその活性断片及びプロテロメラーゼ又はその活性断片の発現を誘導する方法は、特に限定せず、発現制御可能なプロモーターの種類に応じて適宜選択することができる。
- [0119] 一実施形態において、本工程では、発現誘導剤が培養工程後の培地に添加される。例えば、アラビノース誘導プロモーター、IPTG誘導プロモーター、又はラムノース誘導プロモーターであれば、培養工程後の形質転換細胞を含む培地に、発現誘導剤としてアラビノース、IPTG、又はラムノースを添加する方法が挙げられる。
- [0120] 本工程において発現誘導剤の存在下で形質転換細胞を培養する時間は、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片及びプロテロメラーゼ又はその活性断片の発現が十分に誘導される時間であれば、特に限定しない。例えば、1分以上、5分以上、10分以上、20分以上、30分以上、1時間以上、2時間以上、3時間以上、6時間以上、12時間以上、又は24時間以上であってもよい。
- [0121] 本工程に使用する培地のpHは、エンドヌクレアーゼ若しくはその活性断片並びに／又はプロテロメラーゼ若しくはその活性断片が細胞内で機能し得る範囲であればよく、例えばpH3～11、pH4～10、pH5～9、又はpH7～9であってもよい。例えば、プロテロメラーゼの至適pHとエンドヌクレアーゼの至適pHとの間のpH範囲を使用することもできる。
- [0122] 本工程において発現誘導剤の存在下で形質転換細胞を培養する温度は、例えば20℃以上、25℃以上、28℃以上、30℃以上、若しくは31℃以上、及び／又は42℃以下、40℃以下、39℃以下、38℃以下、37℃以下、36℃以下、35℃以下、34℃以下、33℃以下、32℃以下、若しくは31℃以下、例えば、26～38℃、27～37℃、28～36℃、29～35℃、30～34℃、30～33℃、30～32℃、若しくは30～31℃であってもよい。例えば、プロテロメラーゼの至適温度とエンドヌクレアーゼの至適温度との間の温度範囲を使用することもできる。
- [0123] さらに実施形態において、本工程では形質転換細胞を発現誘導剤の存在

下にて複数の温度条件下で培養することができる。複数の温度条件は、プロテロメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの各々の酵素活性の至適温度範囲から選択することができる。プロテロメラーゼの酵素活性の至適温度は、例えば26～37℃、27～35℃、28～33℃、又は29～31℃（例：30℃）であり得る。ホーミングエンドヌクレアーゼの酵素活性の至適温度は、例えば30～42℃、32～40℃、34～39℃、又は36～38℃（例：37℃）であり得る。本実施形態における各温度条件での培養時間は、10分以上、20分以上、30分以上、1時間以上、2時間以上、3時間以上、6時間以上、12時間以上、又は24時間以上とすることができる。

[0124] 別の実施形態では、現制御可能なプロモーターが熱誘導プロモーター又は低温誘導プロモーターであれば、ヒートショック又は低温ショックを与えればよい。ヒートショック又は低温ショックの条件は、エンドヌクレアーゼ又はその活性断片及びプロテロメラーゼ又はその活性断片の発現が十分に誘導される温度及び時間であれば特に限定しない。例えばヒートショックであれば、36℃～45℃、37℃～44℃、38℃～43℃、39℃～42℃、又は40℃～41℃で、10秒以上、20秒以上、30秒以上、40秒以上、50秒以上、1分以上、5分以上、10分以上、20分以上、30分以上、若しくは1時間以上、及び／又は24時間以下、12時間以下、6時間以下、3時間以下、若しくは2時間以下、例えば10秒～24時間、20秒～12時間、25秒～6時間、30秒～3時間、40秒～2時間、50秒～1時間、1分～30分、若しくは2分～5分で行うことができる。

[0125] 本工程により、形質転換細胞においてエンドヌクレアーゼ又はその活性断片及びプロテロメラーゼ又はその活性断片が発現し、目的の核酸配列を含む第1の直鎖状共有結合閉鎖DNA、並びにプロテロメラーゼ遺伝子配列、エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAが生成し、第2の直鎖状共有結合閉鎖DNAは切断されて内在性のエキソヌクレアーゼ活性によって分解される。

[0126] (DNA抽出工程)

「DNA抽出工程」とは、発現誘導工程後の形質転換細胞からDNAを抽出する工程である。本工程の構成については、第3態様の記載に準ずるため、ここでの説明は省略する。

[0127] (分離工程)

「分離工程」とは、DNA抽出工程後に直鎖状共有結合閉鎖DNAを分離する工程である。本工程は、DNA抽出工程において抽出された目的の核酸配列を含む直鎖状共有結合閉鎖DNA以外のDNA成分、例えばゲノムDNA断片や切れ残ったDNA断片及びエンドヌクレアーゼ認識配列を含む不要な直鎖状共有結合閉鎖DNA等を除去することを目的とする。本工程の構成については、第3態様の記載に準ずるため、ここでの説明は省略する。

6-3. 効果

本態様の直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法によれば、直鎖状共有結合閉鎖DNAを簡便かつ効率よく作製することができる。本態様の作製方法に基づき、直鎖状共有結合閉鎖DNAの大量製造を少ない工程数で達成することができる。

**実施例**

[0128] 以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

[0129] <実施例1：直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクターの構築>

(目的)

直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクターを作製する。

[0130] (方法と結果)

以下の実施例では、以下の2つの文献を参考にして組換えDNA技術に基づく核酸操作を実施した：Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、及びCurrent Protocols in Molecular Biology (Greene Publ

ishing Associates and Wiley-Interscience)。

[0131] また、以下の実施例におけるPCRには、Prime STAR MAX DNA Polymerase (タカラバイオ社製)等を使用し、反応条件は添付のマニュアルに記載の方法に従った。

[0132] (1) 核酸断片の作製

直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクターの構築に用いる核酸断片を以下のように作製した。

(a) 融合ポリペプチドをコードする核酸 (配列番号1)

N末端側から順に、TeINプロテロメラーゼ (*Escherichia virus N15*由来のプロテロメラーゼ)、リンカー配列 (配列番号34で示す塩基配列によってコードされるアミノ酸配列)、及びI-SceIホーミングエンドヌクレアーゼ (*Saccharomyces cerevisiae*由来のホーミングエンドヌクレアーゼ)を連結してなる融合ポリペプチドをコードする核酸 (配列番号1)は、プライマー1 (フォワード、配列番号14)及びプライマー4 (リバーズ、配列番号17)を用いたPCRにより作製した。

(b) TeINプロテロメラーゼをコードする核酸 (配列番号2)

TeINプロテロメラーゼをコードする核酸 (配列番号2)は、上記の融合ポリペプチドをコードする核酸 (配列番号1)を鋳型として、プライマー1 (フォワード、配列番号14)及びプライマー2 (リバーズ、配列番号15)を用いたPCRにより作製した。

(c) 一对のプロテロメラーゼ認識配列 (teIRL配列、配列番号3)

一对のプロテロメラーゼ認識配列 (teIRL配列、配列番号3)を有する核酸は、全合成により作製した。

(d) I-SceIホーミングエンドヌクレアーゼをコードする核酸 (配列番号4)

*Saccharomyces cerevisiae*由来のI-SceI

ホーミングエンドヌクレアーゼをコードする核酸（配列番号4）は、上記の融合ポリペプチドをコードする核酸（配列番号1）を鋳型としてプライマー3（フォワード、配列番号16）及びプライマー4（リバーズ、配列番号17）を用いたPCRにより作製した。

(e) t e l R L 配列及び l - S c e l 認識配列を含む配列（配列番号5～9）

t e l R L 配列及び l - S c e l 認識配列を含む配列（配列番号5～9）は、全合成により作製した。配列番号5はスペーサー配列を介さずに t e l R L 配列と l - S c e l 認識配列とが隣接した配列である。配列番号6、7、8、及び9は、それぞれ t e l R L 配列と l - S c e l 認識配列との間のスペーサー配列として T 0（スペーサーなし）、T 2、T 4、T 6、及び T 8を含む。

(f) プロモーター制御下の A r a C 遺伝子配列（配列番号11）

プロモーター制御下の A r a C 遺伝子配列（配列番号11）は、プライマー5（フォワード、配列番号18）及びプライマー6（リバーズ、配列番号19）を用いたPCRにより作製した。

(g) アラビノース誘導プロモーター配列（配列番号12）

アラビノース誘導プロモーター配列（配列番号12）は、全合成により作製した。

(h) 制御配列を含むアラビノース誘導プロモーター配列（配列番号13）

制御配列を含むアラビノース誘導プロモーター配列（配列番号13）は、プライマー7（フォワード、配列番号20）及びプライマー8（リバーズ、配列番号21）を用いたPCRにより作製した。

#### [0133] (2) コントロールベクターの作製

直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクターとして、アラビノース誘導プロモーター制御下で T e l N プロテロメラーゼを発現するベクター（以下、「コントロールベクター」という）を作製した（図1）。

[0134] コントロールベクターの作製方法は以下の通りである。まず上記(c)の

t e l R L 配列を p R C 2 - m i 3 4 2 ベクター（タカラバイオ社製）の E c c o R V サイト及び S n a B l サイトに挿入した。次いで上記（b）、（f）、及び（g）をこのベクターの S m a l サイトに挿入した。

[0135] コントロールベクターでは、一対のプロテロメラーゼ認識配列（t e l R L 配列）間に R e p 遺伝子（配列番号 2 2）及び C a p 遺伝子（配列番号 2 3）が配置されている（図 1）。なお、R e p 遺伝子及び C a p 遺伝子は、それぞれアデノ随伴ウイルスのパッケージングタンパク質をコードする。

[0136] （3）分離発現ベクターの作製

直鎖状共有結合閉鎖 DNA 作製用ベクターとして、T e l N プロテロメラーゼ遺伝子と l - S c e l ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子を含むベクター（以下、「分離発現ベクター」という）を作製した（図 2）。

[0137] 分離発現ベクターの作製方法は以下の通りである。まず上記（c）の t e l R L 配列を p R C 2 - m i 3 4 2 ベクター（タカラバイオ社製）の S n a B l サイトに挿入した。次いで上記（b）、（d）、（f）、（g）、及び（h）をこのベクターの S m a l サイトに挿入した。得られたベクターの E c c o R V サイトにおいて、上記（e）の t e l R L 配列及び l - S c e l 認識配列を含む配列 5 種（配列番号 5 ~ 9）を挿入することによって、分離発現ベクター（T 0）、分離発現ベクター（T 2）、分離発現ベクター（T 4）、分離発現ベクター（T 6）、及び分離発現ベクター（T 8）を作製した（図 2）。

[0138] 分離発現ベクターでは、l - S c e l ホーミングエンドヌクレアーゼ及び T e l N プロテロメラーゼがそれぞれアラビノース誘導プロモーター制御下で分離発現するように設計されている。また、一対のプロテロメラーゼ認識配列（t e l R L 配列）間に R e p 遺伝子及び C a p 遺伝子が配置されている（図 2）。

[0139] <実施例 2：融合発現ベクターの構築>

（目的）

直鎖状共有結合閉鎖 DNA 作製用ベクターとして、T e l N プロテロメラ

ーゼと *lscE* ホーミングエンドヌクレアーゼとの融合ポリペプチドをコードする遺伝子を含むベクター（以下、「融合発現ベクター」という）を作製する。

[0140]（方法と結果）

（1）構造予測

*TeIN* プロテロメラーゼの立体構造を以下の方法で予測した。

*TeIN* プロテロメラーゼと同様のDNA切断／再結合反応を触媒する酵素として *TeIK* プロテロメラーゼ（配列相同性～83%）及び *TeIA* プロテロメラーゼ（配列相同性～8%）の結晶構造がそれぞれ部分的に解かれているが（PDB ID：2V6E、4DWP、4E0G等）、いずれについてもC末端側を含む全長の立体構造は解かれていない。*TeIN* プロテロメラーゼと *lscE* ホーミングエンドヌクレアーゼの融合ポリペプチドを使って効率良くDNA切断／再結合反応と不要直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解を同時に行うには、融合ポリペプチドにおける *lscE* ホーミングエンドヌクレアーゼ及び *TeIN* プロテロメラーゼの配置（N末端側又はC末端側の融合）、並びに *lscE* ホーミングエンドヌクレアーゼ認識配列及び *TeIN* プロテロメラーゼ認識配列（*teIRL* 配列）に対する相対位置が重要である。そこで、*TeIN* プロテロメラーゼの全長の立体構造を、高精度のタンパク質立体構造予測ソフトウェア ColabFold（Mir d i t a M, e t a l.、Nature Methods（2022）doi：10.1038/s41592-022-01488-1）を使って予測した。

[0141] *TeIN* プロテロメラーゼの予測構造から、*TeIN* プロテロメラーゼのN末端側はDNA認識配列（*teIRL* 配列）の中央近傍に位置する一方、C末端側（606～641位）は折り畳まれてDNA認識配列から遠方に位置し、DNAに対して様々な相対配置をとり得ることが明らかになった。これは、N末端側とC末端側との間に予測されたループ領域（535～583位）が柔軟であるため、N末端側がDNAに結合している場合であっても、

ループ領域を介して結合したC末端側は様々な配置をとり得るためである（図3）。したがって、T e l NプロテロメラーゼのC末端側にI - S c e lエンドヌクレアーゼのN末端側を融合させた融合ポリペプチド（実施例5のPH型融合ポリペプチド）では、逆に配置させた融合ポリペプチド（実施例5のHP型融合ポリペプチド）と比較して、両ポリペプチドの活性がより効率的に機能し得ることが予想された。PH型融合ポリペプチドとDNA認識配列の配置を図3に示す。

[0142] (2) 融合発現ベクターの作製

融合発現ベクターの作製方法は以下の通りである。まず実施例1における(c)のt e l R L配列をp R C 2 - m i 3 4 2ベクター（タカラバイオ社製）のS n a B Iサイトに挿入した。次いで実施例1における(a)、(f)、及び(g)をこのベクターのS m a Iサイトに挿入した。得られたベクターのE c o R Vサイトにおいて、実施例1における(e)のt e l R L配列及びI - S c e l認識配列を含む配列5種（配列番号5～9）を挿入することによって、融合発現ベクター（T0）、融合発現ベクター（T2）、融合発現ベクター（T4）、融合発現ベクター（T6）、及び融合発現ベクター（T8）を作製した（図4）。

[0143] 融合発現ベクターでは、I - S c e lホーミングエンドヌクレアーゼとT e l Nプロテロメラーゼとの融合ポリペプチドがアラビノース誘導プロモーター制御下で発現するように設計されている。また、一对のプロテロメラーゼ認識配列（t e l R L配列）間にR e p遺伝子及びC a p遺伝子が配置されている（図4）。

[0144] <実施例3：直鎖状共有結合閉鎖DNAの生産>

(目的)

実施例1で作製した直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクターで大腸菌を形質転換し、直鎖状共有結合閉鎖DNAを生産する。直鎖状共有結合閉鎖DNAの生産量を評価する。

[0145] (方法と結果)

## (1) 形質転換

実施例1で作製したコントロールベクター、分離発現ベクター(T0)、分離発現ベクター(T2)、分離発現ベクター(T4)、分離発現ベクター(T6)、分離発現ベクター(T8)、融合発現ベクター(T0)、融合発現ベクター(T2)、融合発現ベクター(T4)、融合発現ベクター(T6)、及び融合発現ベクター(T8)の各ベクターで大腸菌を形質転換した。

[0146] 大腸菌DH10B株のコンピテントセル溶液25 $\mu$ Lと100pgの各ベクターを含む溶液とを混合し、氷上で30分間静置した。30分間静置後、42 $^{\circ}$ C45秒間熱処理し、氷上で2分間静置した。次いで、SOC培地225 $\mu$ Lを添加し、大腸菌をLB寒天培地(1%トリプトン、0.5%乾燥酵母エキス、1%塩化ナトリウム、0.005%カルベニシリンニナトリウム(ナカライテスク社製))に塗布し、37 $^{\circ}$ C1日間の静置培養で生育する株を選択し、ベクターが導入された大腸菌を取得した。

## [0147] (2) 培養

得られた大腸菌を、2mLのプラスグロウII培地(4%PlusgrowII(ナカライテスク社製)、0.005%カルベニシリンニナトリウム)に接種し、これを37 $^{\circ}$ C、6時間振盪培養後、前培養液を得た。フラスコ中の100mLのプラスグロウII培地(4%PlusgrowII、0.005%カルベニシリンニナトリウム)に、前培養液を200 $\mu$ L植継ぎ、これを37 $^{\circ}$ C、16時間振盪培養した。

## [0148] (3) 発現誘導

得られた培養液にpH7.0の100mLのプラスグロウII培地(4%PlusgrowII、0.005%カルベニシリンニナトリウム)及び2mLのアラビノース溶液(10%アラビノース)を添加し、これを30 $^{\circ}$ C又は37 $^{\circ}$ Cにて、6時間振盪培養した。その後、遠心分離により菌体を回収した。

## [0149] (4) DNA抽出

回収した培養液1mLから、QIAprepSpinMiniprep

ep Kit (QIAGEN社製) を用いてDNAを抽出した。

[0150] (5) DNA総収量の評価

培養液200mLから得られたDNA総収量をNanodrop (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) による測定に基づいて計算した結果を以下の表1に示す。

[0151] [表1]

表1：DNA総収量の測定結果

直鎖状共有結合閉鎖DNA 作製用ベクター		培養液200mLからの DNA総収量 (mg)	
		発現誘導培養温度：3 0°C	発現誘導培養温度： 37°C
分離発現ベクター	T0	2.54	2.87
	T2	4.78	3.96
	T4	4.15	3.44
	T6	3.30	3.91
	T8	4.81	2.39
融合発現ベクター	T0	3.62	2.54
	T2	4.54	1.55
	T4	4.01	3.45
	T6	4.05	2.72
	T8	2.64	1.97
コントロールベクター		6.26	3.23

[0152] (6) 直鎖状共有結合閉鎖DNAの評価

直鎖状共有結合閉鎖DNAを電気泳動法により評価した。具体的には、上記(4)で得られたDNA溶液を2~10ng/μLに調製し、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (島津製作所社製) を用いて解析した。

[0153] MultiNAによる電気泳動結果を図5に示す。図5では、パッケージングタンパク質をコードする核酸を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを「目的の直鎖状共有結合閉鎖DNA」として、パッケージングタンパク質をコードする核酸以外のベクター配列に由来する直鎖状共有結合閉鎖DNAを「不要

な直鎖状共有結合閉鎖DNA」として示す。図中、左側は発現誘導培養温度 30℃ 6時間振盪培養、右側は発現誘導培養温度 37℃ 6時間振盪培養したサンプルを示す。

[0154] さらに目的の直鎖状共有結合閉鎖DNAと不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAのモル濃度から、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率を計算した。残存率を計算した式を以下に示す。

$$\text{残存率 (\%)} = (\text{不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAのモル数}) / (\text{目的の直鎖状共有結合閉鎖DNAのモル数}) \times 100$$

各条件における残存率の計算結果を以下の表2に示す。

[0155] [表2]

表2：不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率

直鎖状共有結合閉鎖DNA 作製用ベクター		不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率 (%)	
		発現誘導培養温度： 30℃	発現誘導培養温度： 37℃
分離発現ベクター	T0	49.2	12.6
	T2	65.2	9.1
	T4	49.1	11.5
	T6	76.9	4.9
	T8	66.5	1.9
融合発現ベクター	T0	19.0	25.1
	T2	50.8	22.5
	T4	44.7	25.4
	T6	48.5	9.7
	T8	56.6	13.4
コントロールベクター		115.8	90.7

[0156] 図5及び表2に示す結果により、コントロールベクターでは不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率が115.8% (30℃) 及び90.7% (37℃) であった。一方、分離発現ベクター及び融合発現ベクターでは、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率が大幅に減少した。この結果は、分離発現ベクター及び融合発現ベクター共に、I-SceIホーミングヌクレアーゼによりホーミングエンドヌクレアーゼ認識配列が切断され、その切断末

端から大腸菌菌体内の内在性のエキソヌクレアーゼにより分解されたことを示唆している。

[0157] <実施例4：発現誘導条件の検討>

(目的)

直鎖状共有結合閉鎖DNAを生産する際の培養条件を検討する。具体的には、形質転換大腸菌を培養する際のpH及び温度条件を検討する。

[0158] (方法と結果)

(1) 直鎖状共有結合閉鎖DNAの生産

実施例3の「(1) 形質転換」と同様の方法で大腸菌を形質転換した。得られた大腸菌を、2 mLのプラスグロウII培地(4% Plusgrow II (ナカライテスク社製)、0.005%カルベニシリンニナトリウム)に接種し、これを37℃、6時間振盪培養後、前培養液を得た。試験管中の1.4 mLのプラスグロウII培地(4% Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム)に、前培養液を100 μL植継ぎ、これを37℃、16時間振盪培養した。

[0159] 次いで、発現誘導のため、1M NaOH溶液を用いてpH7.0、pH7.5、pH8.0及びpH9.0に予め調製した、1.5 mLのプラスグロウII培地(4% Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム)及び30 μLのアラビノース溶液(10%アラビノース)を添加し、これを6時間振盪培養後、遠心分離により菌体を回収した。6時間振盪培養は、(方法A)37℃にて6時間振盪培養するか、又は(方法B)30℃にて4時間振盪培養した後、37℃にて2時間振盪培養することによって行った。

実施例2の「(4) DNA抽出」と同様の方法によりDNA抽出を行った。

[0160] (2) DNA総収量の評価

さらに実施例2の「(5) DNA総収量の評価」と同様の方法により、DNA総収量を評価した。結果を以下の表3に示す。

[0161] [表3]

表3：DNA総収量の測定結果

直鎖状共有結合閉鎖 DNA作製用ベクター	方法A <sup>*1</sup> ／方法B <sup>*2</sup>	プラスグロウII 培地のpH <sup>*3</sup>	培養液3.0mL からのDNA総収量 ( $\mu$ g)
コントロールベクター	方法A	7.0	37.5
		8.0	39.6
	方法B	7.0	27.0
		7.5	30.3
		8.0	29.3
分離発現ベクター (T6)	方法A	7.0	29.9
		8.0	28.7
	方法B	7.0	28.5
		7.5	30.2
		8.0	27.4
融合発現ベクター (T6)	方法A	7.0	20.2
		8.0	21.0
	方法B	7.0	21.2
		7.5	19.2
		8.0	20.6
		9.0	20.7

方法A<sup>\*1</sup>：37℃にて6時間振盪培養する。

方法B<sup>\*2</sup>：30℃にて4時間振盪培養した後37℃にて2時間振盪培養する。

プラスグロウII培地のpH<sup>\*3</sup>：1M NaOH溶液を用いて予め調製する。

[0162] (3) 直鎖状共有結合閉鎖DNAの評価

実施例2の「(6) 直鎖状共有結合閉鎖DNAの評価」と同様の方法により、直鎖状共有結合閉鎖DNAを解析した結果を図6に示す。さらに不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率を計算した結果を以下の表4に示す。

[0163]

[表4]

表 4 : 不要な直鎖状共有結合閉鎖 DNA の残存率

直鎖状共有結合閉鎖 DNA 作製用ベクター	方法 A <sup>*1</sup> / 方法 B <sup>*2</sup>	プラスグロウ II 培地の pH <sup>*3</sup>	不要な直鎖状共有結合閉鎖 DNA の残存率 (%)
コントロールベクター	方法 A	7.0	92.6
		8.0	90.6
	方法 B	7.0	109.4
		7.5	87.1
		8.0	101.2
		9.0	93.3
分離発現ベクター (T6)	方法 A	7.0	24.8
		8.0	21.9
	方法 B	7.0	57.8
		7.5	48.0
		8.0	46.6
		9.0	35.0
融合発現ベクター (T6)	方法 A	7.0	36.6
		8.0	26.6
	方法 B	7.0	45.1
		7.5	37.2
		8.0	34.7
		9.0	9.2

方法 A<sup>\*1</sup> : 37°Cにて6時間振盪培養する。

方法 B<sup>\*2</sup> : 30°Cにて4時間振盪培養した後37°Cにて2時間振盪培養する。

プラスグロウ II 培地の pH<sup>\*3</sup> : 1M NaOH 溶液を用いて予め調製する。

[0164] 図6及び表4の結果において、コントロールベクターを導入した大腸菌菌体と比較して、分離発現ベクター又は融合発現ベクターを導入した大腸菌菌体では、不要な直鎖状共有結合閉鎖 DNA の残存率が大幅に減少した。この結果は、分離発現ベクター及び融合発現ベクターでは、I-SceI ホーミングヌクレアーゼによりホーミングエンドヌクレアーゼ認識配列が切断され、その切断末端から大腸菌菌体内の内在性のエキソヌクレアーゼにより分解されたことを示唆している。

[0165] 図6及び表4の結果により、発現誘導工程において培養温度はプロテオメラーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼが細胞内で機能しうる範囲であれば特に限定されないが、アラビノース溶液添加後37°C 6時間振盪培養する条件(方法A)では、分離発現ベクターが、融合発現ベクターと比較して、

不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率が低かった。一方、アラビノース溶液添加後30℃4時間振盪培養後に37℃2時間振盪培養する条件（方法B）において融合発現ベクターでは、分離発現ベクターと比較して、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率が低かった。

[0166] この結果は、TeINプロテオメラーゼの酵素活性の至適温度が30℃であり、I-Scelホーミングエンドヌクレアーゼの酵素活性の至適温度が37℃であるため、アラビノース溶液添加後の温度を30℃にすることによって、TeINプロテオメラーゼ活性によって直鎖状共有結合閉鎖DNA生産効率が増加し、その後37℃にシフトさせることによって、I-Scelホーミングエンドヌクレアーゼ活性が増加し、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解効率が増加したことを示唆している。

[0167] また、同様に、図6及び表4の結果により、発現誘導工程においてpHはプロテオメラーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼが細胞内で機能しうる範囲であれば特に限定されないが、方法Aでは、分離発現ベクターと融合発現ベクター共に、発現誘導工程において添加した培地がpH8.0では、pH7.0と比較して、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率がより低かった。さらに、方法Bでは、分離発現ベクターと融合発現ベクター共に、発現誘導工程において添加した培地のpHが7.0から9.0へと高くなるにつれて、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率がより低くなった。

[0168] この結果は、TeINプロテオメラーゼの酵素活性の至適pHが8.8であり、I-Scelホーミングエンドヌクレアーゼの酵素活性の至適温度がpH7.9であるため、発現誘導工程において添加した培地のpHを7.0から9.0へと高くすることによって、TeINプロテオメラーゼ活性によって直鎖状共有結合閉鎖DNA生産効率が増加し、さらにI-Scelホーミングエンドヌクレアーゼ活性が増加し、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの分解効率が増加したことを示唆している。

[0169] <実施例5：融合ポリペプチドの検討>

（目的）

N末端側のT e I Nプロテロメラーゼ及びC末端側のI - S c e Iホーミングエンドヌクレアーゼを含む融合ポリペプチド（以下、「PH型融合ポリペプチド」という）、及びN末端側のI - S c e Iホーミングエンドヌクレアーゼ及びC末端側のT e I Nプロテロメラーゼを含む融合ポリペプチド（以下、「HP型融合ポリペプチド」という）を作製し、直鎖状共有結合閉鎖DNAの生産効率を比較する。

[0170]（方法と結果）

（1）PH型及びHP型の融合発現ベクターの作製

N末端側から順にT e I Nプロテロメラーゼ、リンカー配列（配列番号34で示す塩基配列によってコードされるアミノ酸配列）、及びI - S c e Iホーミングエンドヌクレアーゼを含むPH型融合ポリペプチドをコードする遺伝子を含む直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクター（以下、「PH型融合発現ベクター」という）として、実施例2で作製した「融合発現ベクター（T O）」を使用した。PH型融合発現ベクターでは、PH型融合ポリペプチドがアラビノース誘導プロモーター制御下で発現するように設計されている。

[0171] N末端側から順にI - S c e Iホーミングエンドヌクレアーゼ、リンカー配列（配列番号34で示す塩基配列によってコードされるアミノ酸配列）、及びT e I Nプロテロメラーゼを含むHP型融合ポリペプチドをコードする遺伝子を含む直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクター（以下、「HP型融合発現ベクター」という）は、上記PH型融合発現ベクターにおいてT e I Nプロテロメラーゼをコードする領域とI - S c e Iホーミングエンドヌクレアーゼをコードする領域を入れ替えることによって作製した。HP型融合発現ベクターでは、HP型融合ポリペプチドがアラビノース誘導プロモーター制御下で発現するように設計されている。

[0172]（2）直鎖状共有結合閉鎖DNAの生産量評価

PH型融合発現ベクター又はHP型融合発現ベクターを用いて、実施例3と同様の方法により、形質転換、培養、発現誘導、DNA抽出、DNA総収

量の評価、及び直鎖状共有結合閉鎖DNAの評価を行った。但し、本実施例では、アラビノース存在下での6時間の振盪培養は、30℃にて培養液200mLで行った。

[0173] 培養液200mLから得られたDNA総収量をNanodropによる測定に基づいて計算した結果を以下の表5に示す。

[0174] [表5]

表5：DNA総収量の測定結果

直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクター	培養液200mLからのDNA総収量 (mg)
PH型融合発現ベクター	3.07
HP型融合発現ベクター	2.06
コントロールベクター	3.15

[0175] 次に不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率を電気泳動法により評価した結果を以下の表6に示す。

[0176] [表6]

表6：不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率

直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用ベクター	不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率 (%)
PH型融合発現ベクター	32.32
HP型融合発現ベクター	40.75
コントロールベクター	85.63

[0177] 表5～6に示す結果から、PH型融合発現ベクターでは、HP型融合発現ベクターと比較して、DNA総収量が高く、不要な直鎖状共有結合閉鎖DNAの残存率が低いことが示された。

[0178] この結果は、実施例2の構造予測から予想されたように、TelNプロテロメラーゼをI-SceIホーミングエンドヌクレアーゼのN末端側に配置することによって、融合ポリペプチドのプロテロメラーゼ活性及びホーミングエンドヌクレアーゼ活性の両者が効率的に機能し得ることを示している。

[0179] <比較例1：直鎖状共有結合閉鎖DNA作製の2つのベクターの構築>

(目的)

直鎖状共有結合閉鎖DNA作製用の2つのベクターとして、コントロールベクター (T6) 及びI-SceIベクターを作製する。

(方法と結果)

(1) 核酸断片の作製

ベクターの構築に用いる核酸断片として、カナマイシン耐性を付与するアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼをコードする核酸 (配列番号35) を全合成により作製した。

[0180] (2) コントロールベクター (T6) の作製

t e l R L配列とI-SceI認識配列との間のスペーサー配列としてT6を含む、アラビノース誘導プロモーター制御下でT e l Nプロテロメラーゼを発現するベクター (以下、「コントロールベクター (T6)」) という) を作製した (図7)。

コントロールベクター (T6) の作製方法は以下の通りである。まず実施例1で作製した分離発現ベクター (T6) を鋳型として、プライマー9 (フォワード、配列番号36) 及びプライマー10 (リバーズ、配列番号37) を用いたPCRにより核酸断片を作製した。次に、得られた核酸断片末端のオーバーラップ領域を利用してNew England Biolabs社のGibson Assemblyシステムによって環状化させることによって、コントロールベクター (T6) を作製した (図7)。コントロールベクター (T6) は、分離発現ベクター (T6) からアラビノース誘導プロモーター制御下で発現するように設計されているI-SceIホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子を除いたベクターである。コントロールベクター (T6) では、一对のプロテロメラーゼ認識配列 (t e l R L配列) 間にR e p遺伝子及びC a p遺伝子が配置されている (図7)。

[0181] (3) I-SceIベクターの作製

カナマイシン耐性を付与するアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼをコードする核酸 (配列番号35) を含む、アラビノース誘導プロモ-

ター制御下でI-SceIホーミングエンドヌクレアーゼを発現するベクター（以下、「I-SceIベクター」という）を作製した（図8）。

[0182] I-SceIベクターの作製方法は以下の通りである。まず実施例1で作製した分離発現ベクター（T6）に含まれるアンピシリン耐性を付与するβラクタマーゼをコードする核酸を、カナマイシン耐性を付与するアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼをコードする核酸（配列番号35）に置換した。置換したベクターを鋳型として、プライマー7（フォワード、配列番号20）及びプライマー11（リバーズ、配列番号38）を用いたPCRにより核酸断片を作製した。次に、得られた核酸断片末端のオーバーラップ領域を利用してNew England Biolabs社のGibson Assemblyシステムによって環状化させることによって、I-SceIベクターを作製した（図8）。I-SceIベクターは、プロテロメラーゼ認識配列（teIRL配列）を含まないが、I-SceI認識配列を含む（図8）。

[0183] <比較例2：直鎖状共有結合閉鎖DNAの生産>

（目的）

比較例1で作製した2つのベクターで大腸菌を形質転換し、直鎖状共有結合閉鎖DNAを生産する。直鎖状共有結合閉鎖DNAの生産量を評価する。

（方法と結果）

（1）形質転換

比較例1で作製したコントロールベクター（T6）及びI-SceIベクターで大腸菌を形質転換した。また、対照群として、コントロールベクター（T6）のみで形質転換した大腸菌も作製した。

大腸菌DH10B株のコンピテントセル溶液25μLと各ベクターを含む溶液とを混合し、氷上で30分間静置した。30分間静置後、42℃45秒間熱処理し、氷上で2分間静置した。次いで、SOC培地225μLを添加した。コントロールベクター（T6）のみを導入した場合は大腸菌をLB寒天培地（1%トリプトン、0.5%乾燥酵母エキス、1%塩化ナトリウム、

0.005%カルベニシリンニナトリウム（ナカライテスク社製））に塗布した。コントロールベクター（T6）及びI-SceIベクターを導入した場合は大腸菌をLB寒天培地（1%トリプトン、0.5%乾燥酵母エキス、1%塩化ナトリウム、0.005%カルベニシリンニナトリウム（ナカライテスク社製）、0.005%カナマイシン硫酸塩（富士フィルム和光純薬社製））に塗布した。37℃1日間の静置培養で生育する株を選択し、ベクターが導入された大腸菌を取得した。

[0184] (2) 培養

実施例3で得られた分離発現ベクター（T6）が導入された大腸菌を、2 mLのプラスグロウII培地（4%Plusgrow II（ナカライテスク社製）、0.005%カルベニシリンニナトリウム）に接種し、これを37℃、6時間振盪培養後、前培養液を得た。フラスコ中の100 mLのプラスグロウII培地（4%Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム）に、前培養液を200 µL植継ぎ、これを37℃、16時間振盪培養した。

[0185] 上記で得られたコントロールベクター（T6）のみが導入された大腸菌を、2 mLのプラスグロウII培地（4%Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム）に接種し、これを37℃、6時間振盪培養後、前培養液を得た。フラスコ中の100 mLのプラスグロウII培地（4%Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム）に、前培養液を200 µL植継ぎ、これを37℃、16時間振盪培養した。

[0186] 上記で得られたコントロールベクター（T6）及びI-SceIベクターが導入された大腸菌を、2 mLのプラスグロウII培地（4%Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム、0.005%カナマイシン硫酸塩）に接種し、これを37℃、6時間振盪培養後、前培養液を得た。フラスコ中の100 mLのプラスグロウII培地（4%Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム、0.005%カナマイシン硫酸塩）に、前培養液を200 µL植継ぎ、これを37℃、16時

間振盪培養した。

[0187] (3) 発現誘導

分離発現ベクター (T6) が導入された大腸菌から得られた培養液に pH 7.0 の 100 mL のプラスグロウ II 培地 (4% Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム) 及び 2 mL のアラビノース溶液 (10%アラビノース) を添加し、これを 30℃又は 37℃にて、6時間振盪培養した。その後、遠心分離により菌体を回収した。

[0188] コントロールベクター (T6) のみが導入された大腸菌から得られた培養液に pH 7.0 の 100 mL のプラスグロウ II 培地 (4% Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム) 及び 2 mL のアラビノース溶液 (10%アラビノース) を添加し、これを 30℃又は 37℃にて、6時間振盪培養した。その後、遠心分離により菌体を回収した。

[0189] コントロールベクター (T6) 及び I-SceI ベクターが導入された大腸菌から得られた培養液に pH 7.0 の 100 mL のプラスグロウ II 培地 (4% Plusgrow II、0.005%カルベニシリンニナトリウム、0.005%カナマイシン硫酸塩) 及び 2 mL のアラビノース溶液 (10%アラビノース) を添加し、これを 30℃又は 37℃にて、6時間振盪培養した。その後、遠心分離により菌体を回収した。

[0190] (4) DNA抽出

回収した培養液 1 mL から、QIA prep Spin Miniprep Kit (QIAGEN社製) を用いて DNA を抽出した。

[0191] (5) DNA総収量の評価

培養液 200 mL から得られた DNA 総収量を Nanodrop (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) による測定に基づいて計算した結果を以下の表 7 に示す。

[0192]

[表7]

表7：DNA総収量の測定結果

直鎖状共有結合閉鎖DNA 作製用ベクター	培養液200mLからのDNA総収量 (mg)	
	発現誘導培養温度：30℃	発現誘導培養温度：37℃
分離発現ベクター (T6)	2.64	2.46
コントロールベクター (T6)	4.51	3.92
コントロールベクター (T6) 及び I-Scelベクター	2.67	2.31

## [0193] (6) 直鎖状共有結合閉鎖DNAの評価

直鎖状共有結合閉鎖DNAを電気泳動法により評価した。具体的には、上記(4)で得られたDNA溶液を2~10ng/μLに調製し、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MultiNA（島津製作所社製）を用いて解析した。

[0194] MultiNAによる電気泳動結果を図9に示す。図9では、パッケージングタンパク質をコードする核酸を含む直鎖状共有結合閉鎖DNAを「目的の直鎖状共有結合閉鎖DNA」として、パッケージングタンパク質をコードする核酸以外のベクター配列に由来する直鎖状共有結合閉鎖DNAを「不要な直鎖状共有結合閉鎖DNA」として示す。図中、左側は発現誘導培養温度30℃6時間振盪培養、右側は発現誘導培養温度37℃6時間振盪培養したサンプルを示す。

[0195] 図9に示す結果から、コントロールベクター (T6) 及びI-Scelベクターが導入された大腸菌では、I-Scelベクターの一部が残存してしまうため、目的の直鎖状共有結合閉鎖DNA以外のDNAが増大してしまうことが明らかになった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 二本鎖環状DNAベクターであって、  
プロテロメラーゼ又はその活性断片をコードするプロテロメラーゼ遺伝子配列、  
エンドヌクレアーゼ又はその活性断片をコードするエンドヌクレアーゼ遺伝子配列、  
前記プロテロメラーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための一対のプロテロメラーゼ認識配列、  
前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片が認識し、前記ベクターを切断するための少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識配列、及び  
目的の核酸配列を含み、  
前記二本鎖環状DNAベクターにおいて前記プロテロメラーゼ遺伝子配列、前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列、及び前記エンドヌクレアーゼ認識配列は、前記一対のプロテロメラーゼ認識配列間の同一領域内に配置され、前記目的の核酸配列は前記一対のプロテロメラーゼ認識配列間の他の領域内に配置されており、かつ  
前記プロテロメラーゼ遺伝子配列及び前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列は、発現制御可能なプロモーターの制御下に配置されている、  
前記二本鎖環状DNAベクター。
- [請求項2] 前記プロテロメラーゼ遺伝子配列及び前記エンドヌクレアーゼ遺伝子配列が、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片及び前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチドをコードする、  
請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクター。
- [請求項3] 前記融合ポリペプチドにおいて、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片が、前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片のN末端側に配置されている、  
請求項2に記載の二本鎖環状DNAベクター。
- [請求項4] 前記融合ポリペプチドが、前記プロテロメラーゼ又はその活性断片

と前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片との間にリンカー配列をさらに含む、請求項2に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項5] 前記エンドヌクレアーゼ認識配列と前記プロテロメラーゼ認識配列との間に配置されたスペーサー配列をさらに含む、請求項1又は2に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項6] 前記スペーサー配列が200塩基長以下である、請求項5に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項7] 前記エンドヌクレアーゼ認識配列が、前記プロテロメラーゼ認識配列の一方と隣接して配置されている、請求項1又は2に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項8] プラスミドである、請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項9] 前記プロテロメラーゼが、T e l Nプロテロメラーゼ、T e l Aプロテロメラーゼ、又はT e l Kプロテロメラーゼである、請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項10] 前記エンドヌクレアーゼがホーミングエンドヌクレアーゼである、請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項11] 前記ホーミングエンドヌクレアーゼがI - S c e lホーミングエンドヌクレアーゼ、I - C e u lホーミングエンドヌクレアーゼ、又はI - C r e lホーミングエンドヌクレアーゼである、請求項10に記載の二本鎖環状DNAベクター。

[請求項12] 前記目的の核酸配列が、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含む、請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクター。

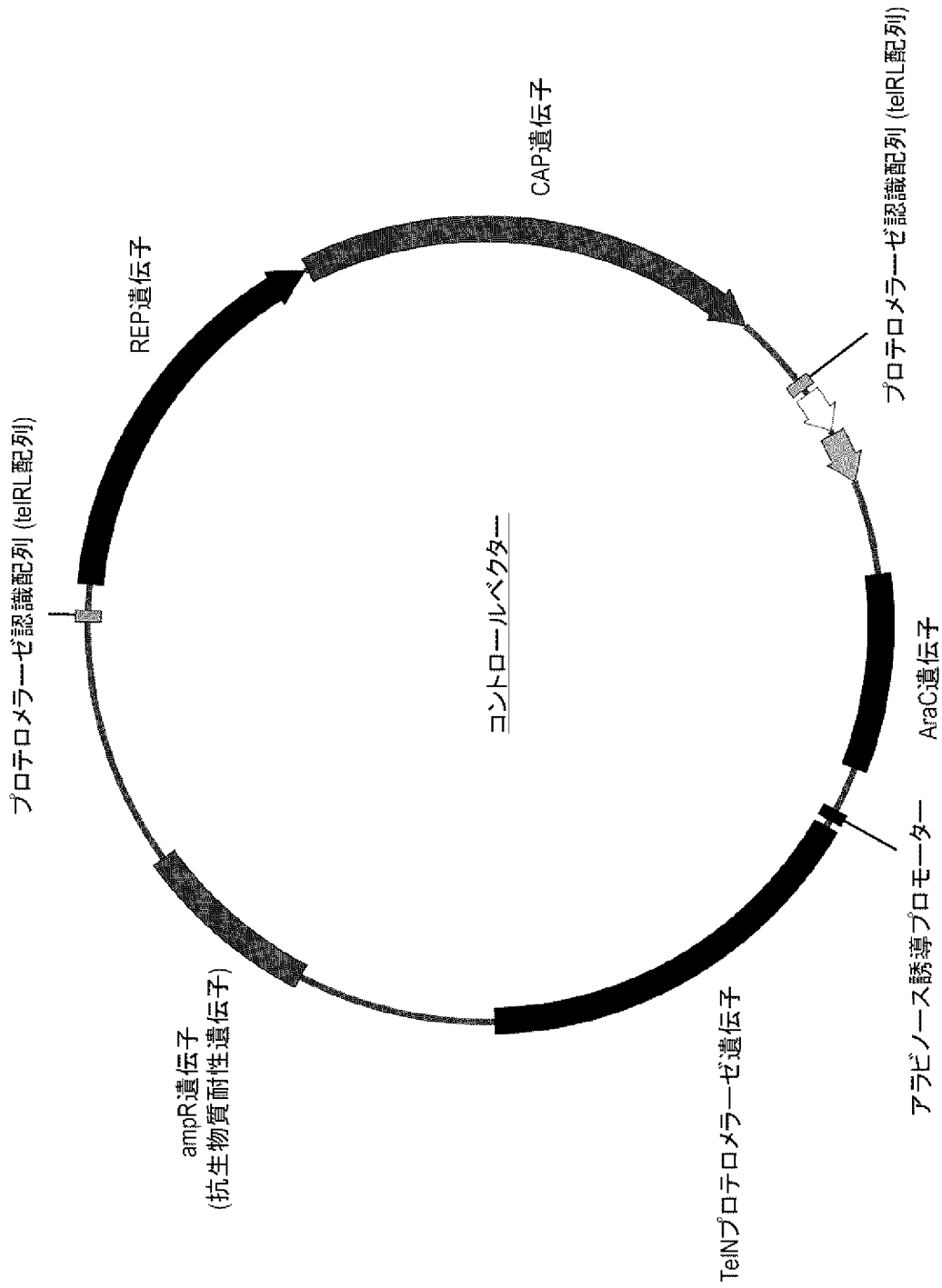
[請求項13] 請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクターを含む形質転換細胞。

[請求項14] 細胞が細菌細胞又は真核細胞である、請求項13に記載の形質転換細胞。

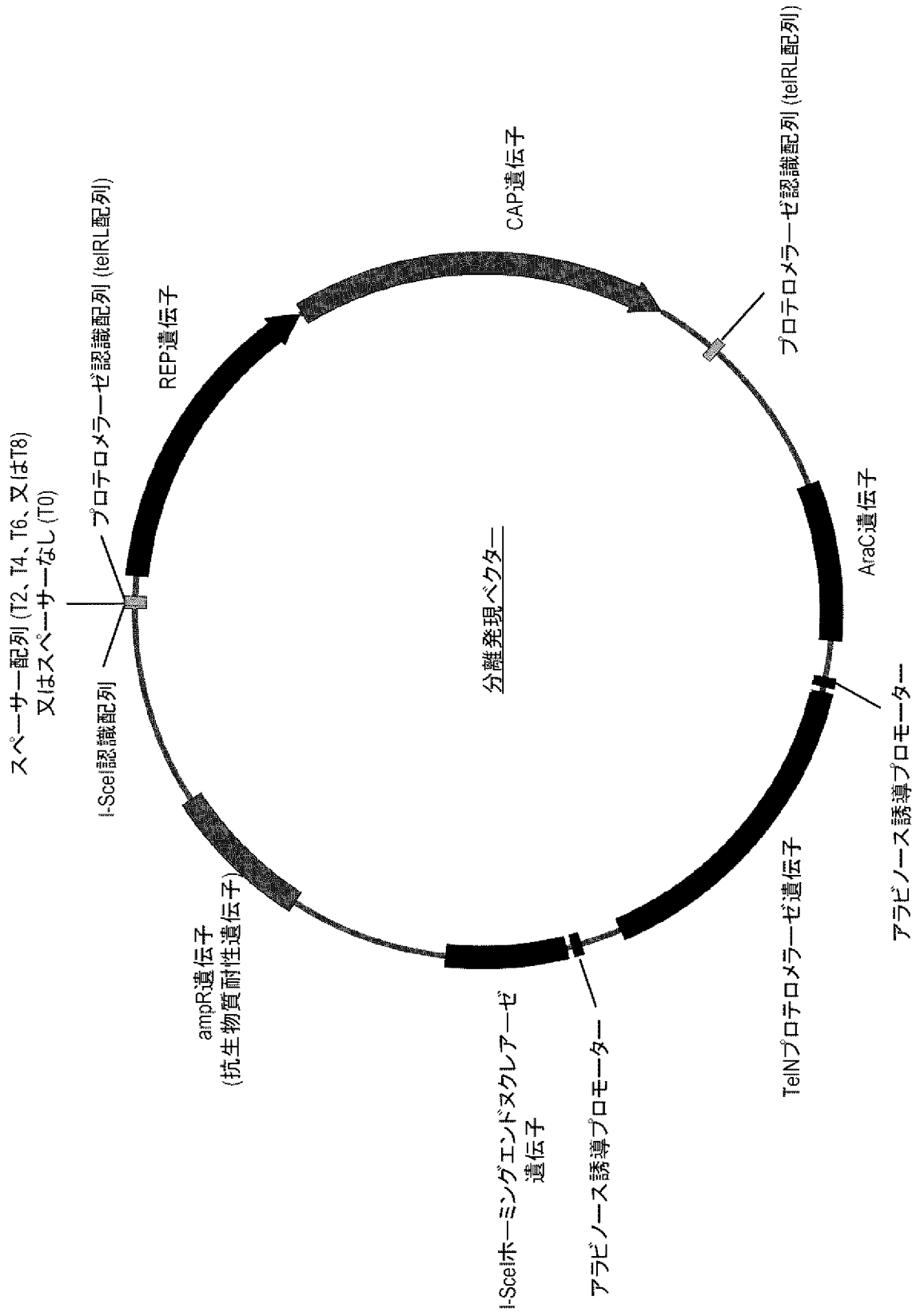
[請求項15] 細菌が大腸菌又は枯草菌である、請求項14に記載の形質転換細胞。

- [請求項16] エキソヌクレアーゼを発現する、請求項13に記載の形質転換細胞。
- [請求項17] 直鎖状共有結合閉鎖DNAの作製方法であって、  
請求項13に記載の形質転換細胞を培養する培養工程、  
前記培養工程後の形質転換細胞において前記プロテオメラーゼ又はその活性断片及び前記エンドヌクレアーゼ又はその活性断片の発現を誘導する発現誘導工程、及び  
前記発現誘導工程後の形質転換細胞からDNAを抽出するDNA抽出工程  
を含む前記方法。
- [請求項18] 前記DNA抽出工程後に直鎖状共有結合閉鎖DNAを分離する分離工程をさらに含む、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記培養工程前に請求項1に記載の二本鎖環状DNAベクターを宿主細胞に導入し、形質転換細胞を得る導入工程をさらに含む、請求項17に記載の方法。
- [請求項20] 前記形質転換細胞がエキソヌクレアーゼを発現する、請求項17に記載の方法。
- [請求項21] N末端側のプロテオメラーゼ又はその活性断片及びC末端側のエンドヌクレアーゼ又はその活性断片を含む融合ポリペプチド、又はそれをコードする核酸。

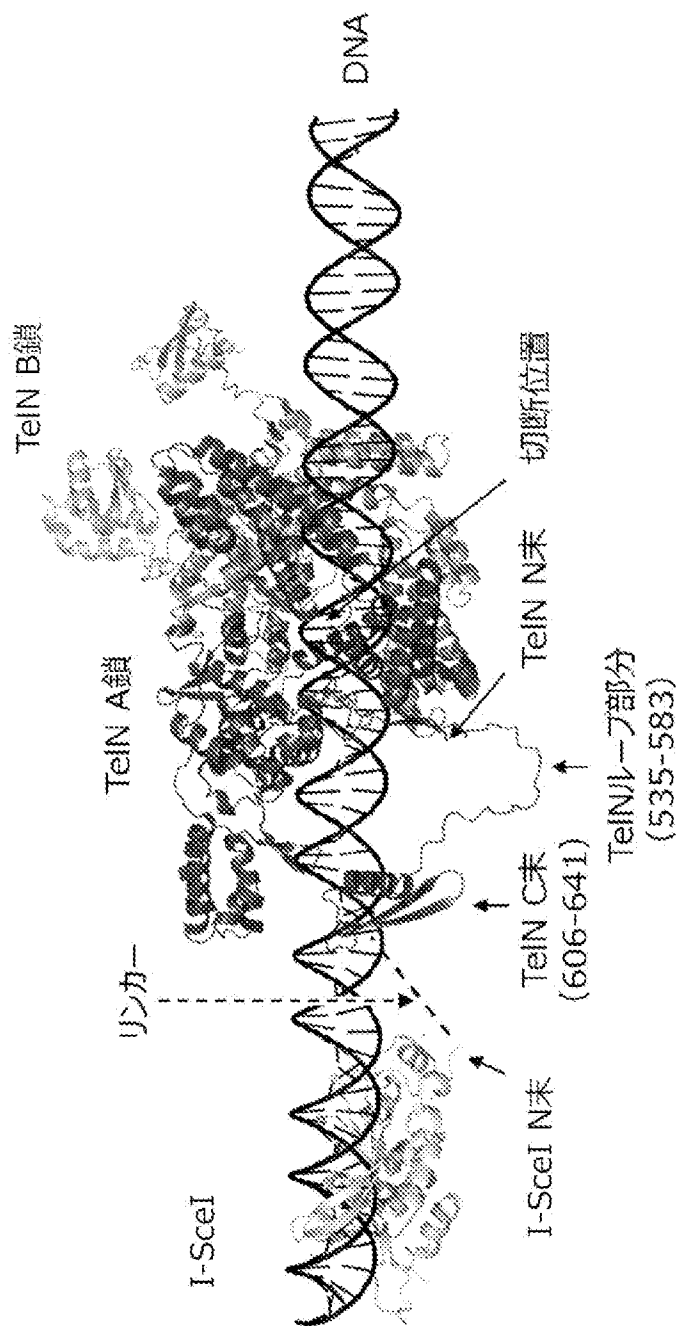
[図1]



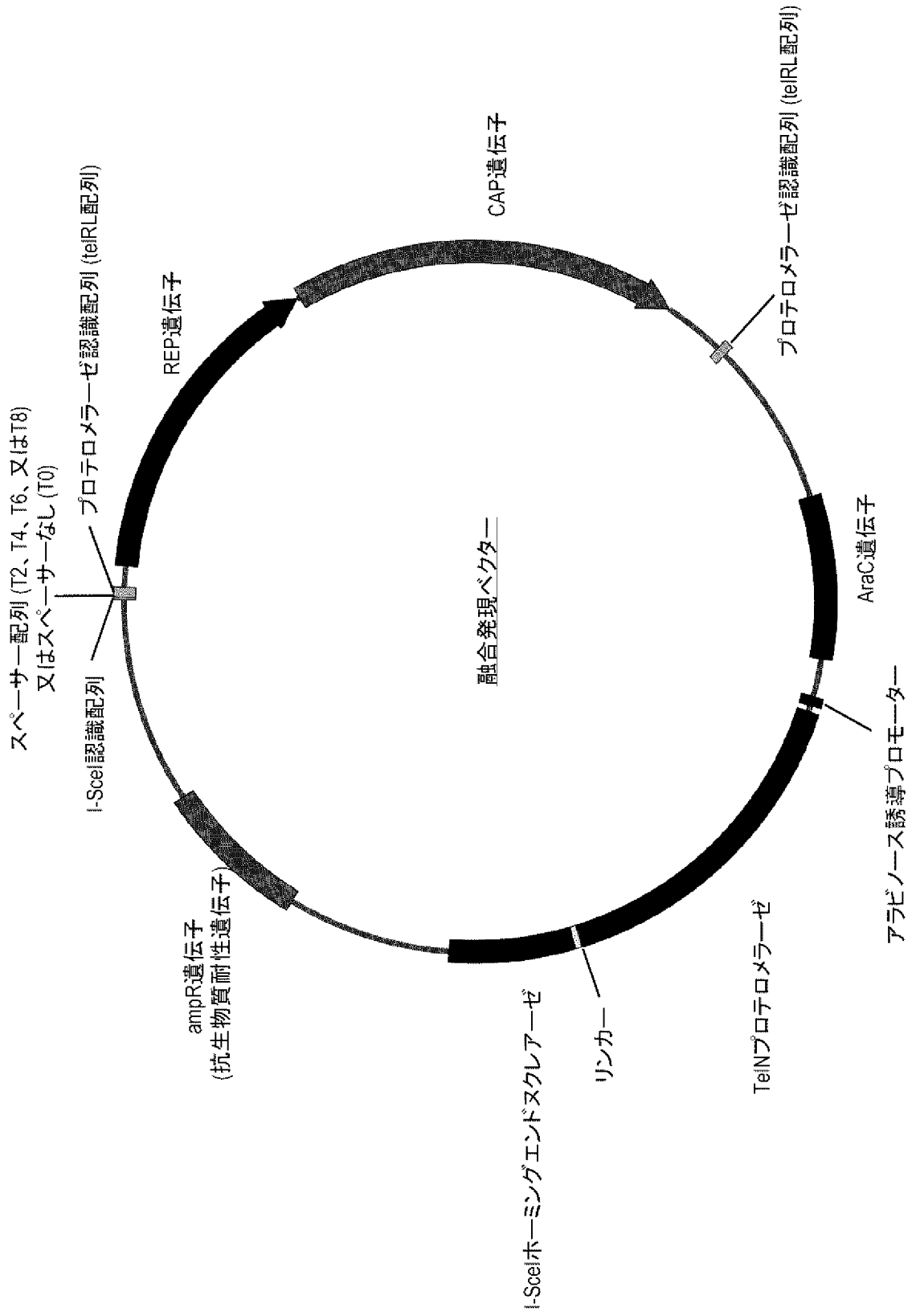
[図2]



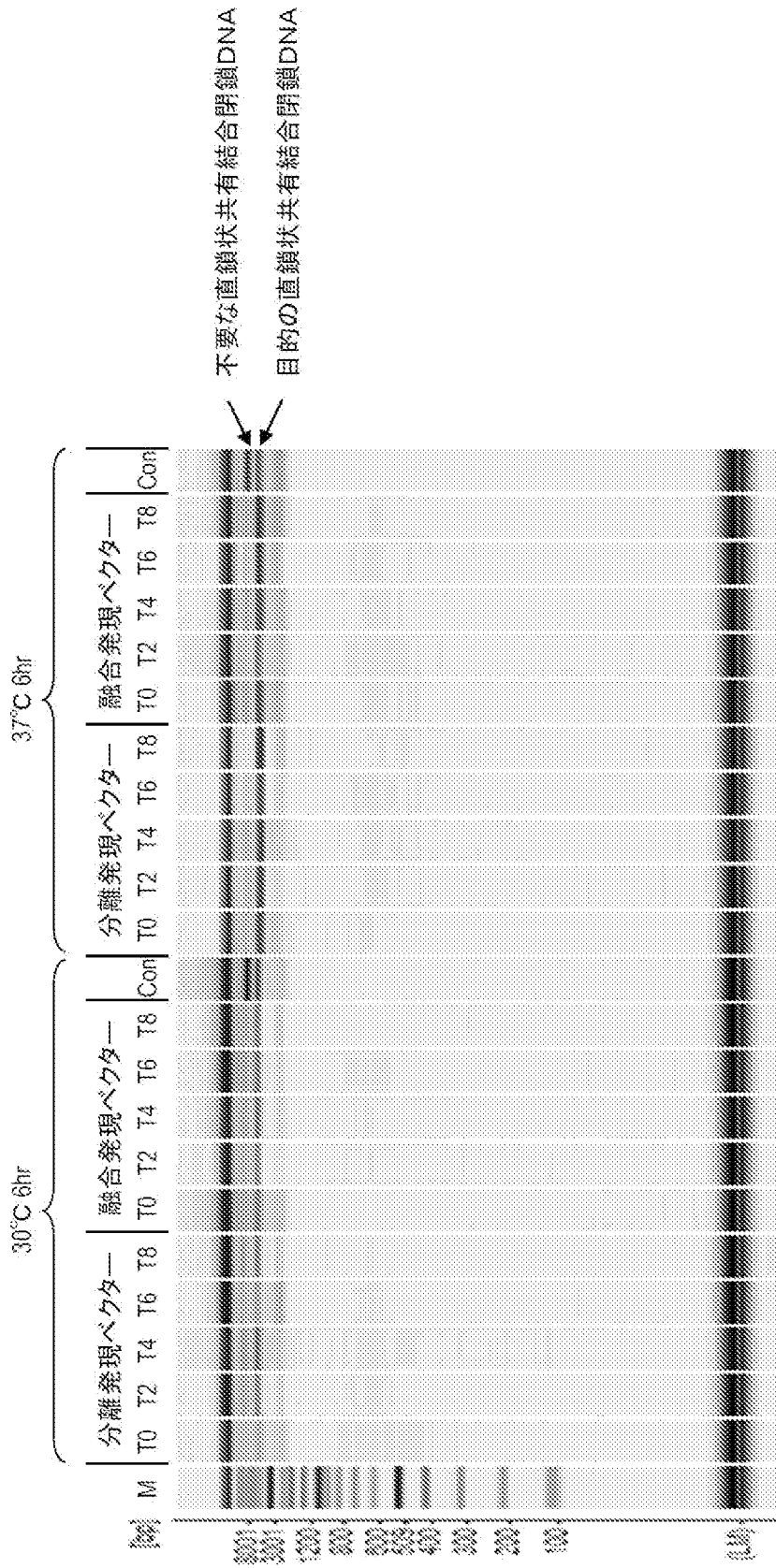
[図3]



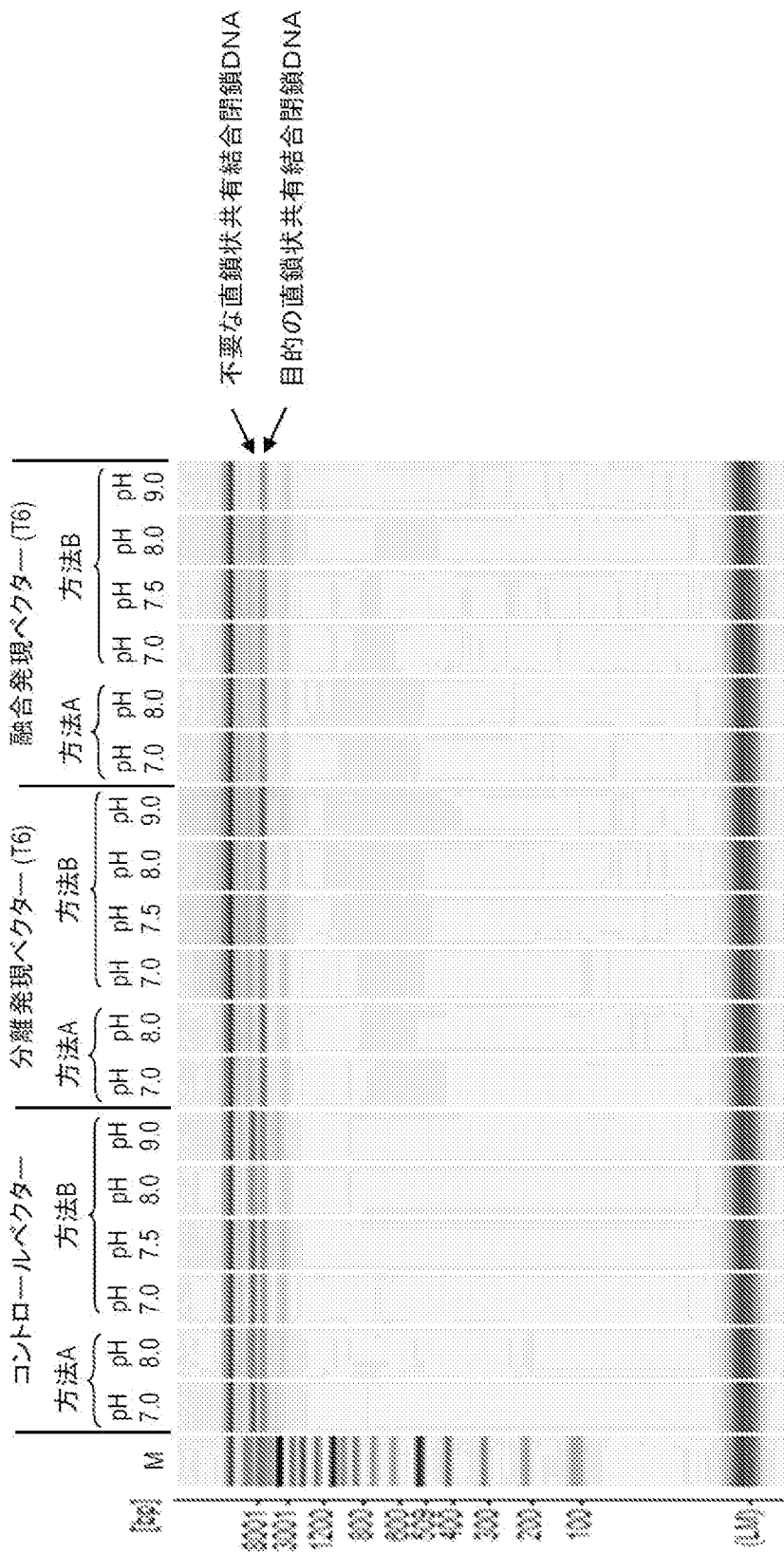
[図4]



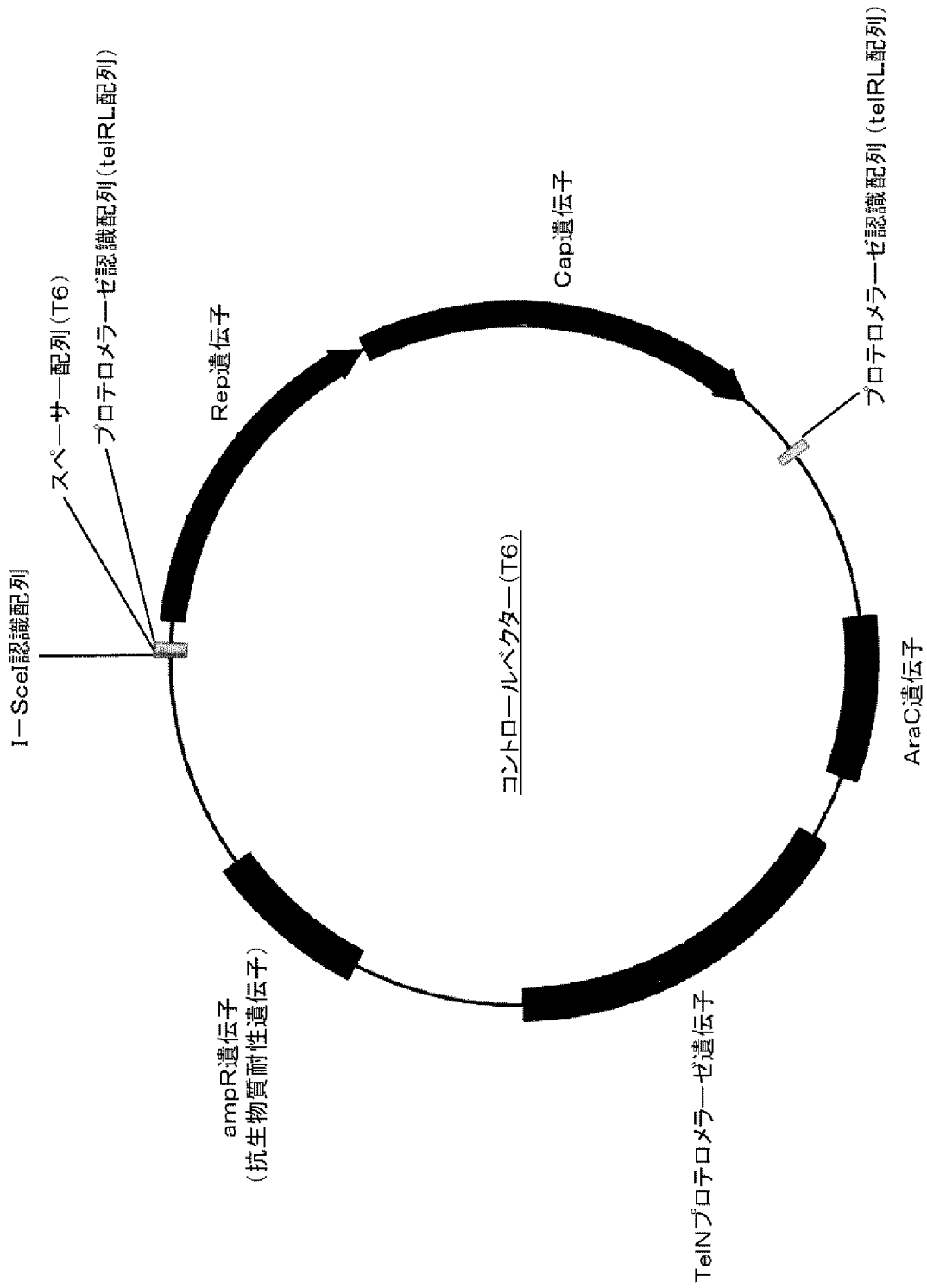
[図5]



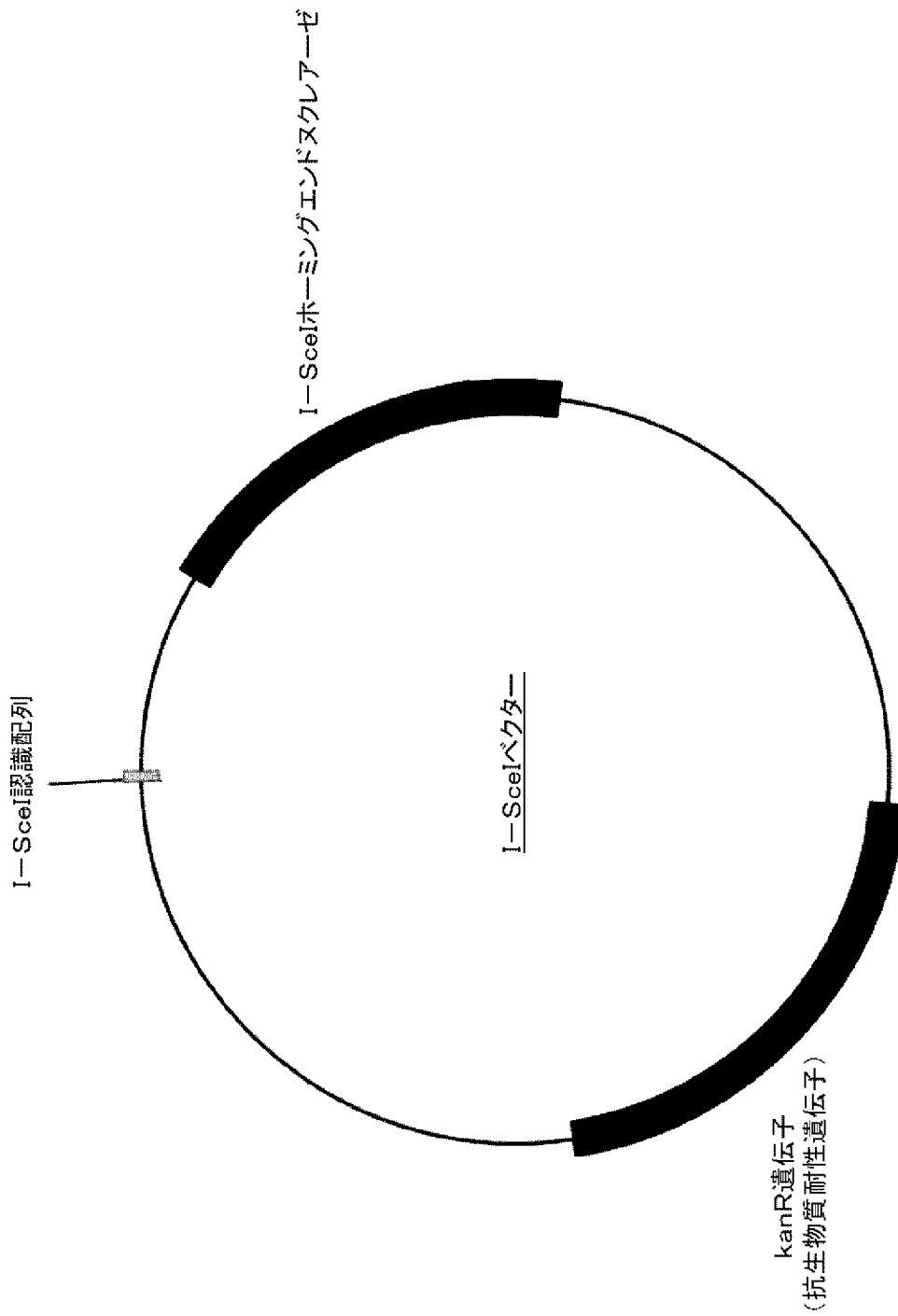
[図6]



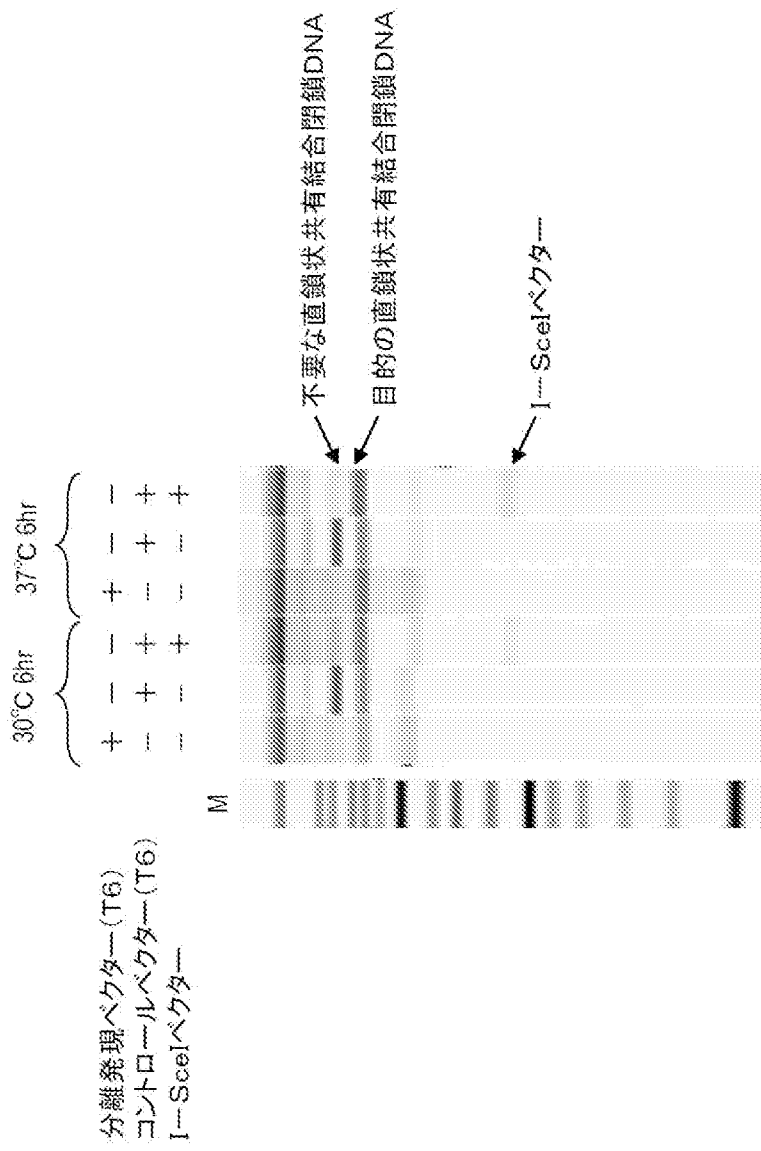
[図7]



[図8]



[図9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/033127

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><i>C12N 15/63</i>(2006.01)i; <i>C07K 19/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/15</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/19</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/21</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/12</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/16</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/11</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/54</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/55</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/62</i>(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/63 Z ZNA; C12N15/55; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/11 Z; C12N15/62 Z; C12N9/12; C12N15/54; C12N9/16 Z; C12N15/10 100Z; C07K19/00</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N15/63; C07K19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/12; C12N9/16; C12N15/10; C12N15/11; C12N15/54; C12N15/55; C12N15/62		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2023</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2023</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022/156188 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.) 28 July 2022 (2022-07-28) fig. 2, tables I-III	1-21
A	JP 2013-535210 A (TOUCHLIGHT GENETICS LTD.) 12 September 2013 (2013-09-12) claim 1, fig. 6	1-21
A	WONG, Shirley et al. Production of Double-stranded DNA Ministrings. Journal of Visualized Experiments. 2016, 108, e53177 abstract, fig. 1	1-21
P, A	WO 2022/264095 A1 (MEDIPHAGE BIOCEUTICALS, INC.) 22 December 2022 (2022-12-22) claims	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
02 November 2023		14 November 2023
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Telephone No.

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2023/033127</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022/156188 A1	28 July 2022	KR 10-2023-126735 A CN 116848253 A	
JP 2013-535210 A	12 September 2013	WO 2012/017210 A1 claim 1, fig. 6 US 2013/0216562 A1 EP 2601312 A1 CN 103080337 A	
WO 2022/264095 A1	22 December 2022	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/63(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i;                  C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i;                  C12N 15/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i;                  C12N 15/62(2006.01)i                  FI: C12N15/63 Z ZNA; C12N15/55; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/11 Z; C12N15/62 Z;                  C12N9/12; C12N15/54; C12N9/16 Z; C12N15/10 100Z; C07K19/00</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/63; C07K19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/12; C12N9/16; C12N15/10;                  C12N15/11; C12N15/54; C12N15/55; C12N15/62</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2022/156188 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.) 28.07.2022 (2022 - 07 - 28) FIG.2, Table I-III</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2013-535210 A (タッチライト ジェネティックス リミテッド) 12.09.2013 (2013 - 09 - 12) 請求項1、図6</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WONG, Shirley et al., Production of Double-stranded DNA Ministrings, Journal of Visualized Experiments, 2016, 108, e53177 Abstract, Figure 1</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>P, A</td> <td>WO 2022/264095 A1 (MEDIPHAGE BIOCEUTICALS, INC.) 22.12.2022 (2022 - 12 - 22) 特許請求の範囲</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	A	WO 2022/156188 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.) 28.07.2022 (2022 - 07 - 28) FIG.2, Table I-III	1-21	A	JP 2013-535210 A (タッチライト ジェネティックス リミテッド) 12.09.2013 (2013 - 09 - 12) 請求項1、図6	1-21	A	WONG, Shirley et al., Production of Double-stranded DNA Ministrings, Journal of Visualized Experiments, 2016, 108, e53177 Abstract, Figure 1	1-21	P, A	WO 2022/264095 A1 (MEDIPHAGE BIOCEUTICALS, INC.) 22.12.2022 (2022 - 12 - 22) 特許請求の範囲	1-21
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
A	WO 2022/156188 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.) 28.07.2022 (2022 - 07 - 28) FIG.2, Table I-III	1-21															
A	JP 2013-535210 A (タッチライト ジェネティックス リミテッド) 12.09.2013 (2013 - 09 - 12) 請求項1、図6	1-21															
A	WONG, Shirley et al., Production of Double-stranded DNA Ministrings, Journal of Visualized Experiments, 2016, 108, e53177 Abstract, Figure 1	1-21															
P, A	WO 2022/264095 A1 (MEDIPHAGE BIOCEUTICALS, INC.) 22.12.2022 (2022 - 12 - 22) 特許請求の範囲	1-21															
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>02.11.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>14.11.2023</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>田中 晴絵 4B 9739</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式  
     紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))  
     紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/033127

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2022/156188	A1	28.07.2022	KR	10-2023-126735	A	
				CN	116848253	A	
-----							
JP	2013-535210	A	12.09.2013	WO	2012/017210	A1	
					請求項 1、FIGURE 6		
				US	2013/0216562	A1	
				EP	2601312	A1	
				CN	103080337	A	
-----							
WO	2022/264095	A1	22.12.2022	(ファミリーなし)			
-----							