

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-82933

(P2016-82933A)

(43) 公開日 平成28年5月19日(2016.5.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2014-219147 (P2014-219147)	(71) 出願人	304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田1677-1
(22) 出願日	平成26年10月28日(2014.10.28)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
		(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100188352 弁理士 松田 一弘
		(74) 代理人	100131093 弁理士 堀内 真
		(74) 代理人	100150902 弁理士 山内 正子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺炎球菌における発現プロモーター

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】これまで大腸菌など一般的な細菌では高発現系の開発が進んでいるが、肺炎球菌は基本的な発現システムが異なるため、一般的な細菌の高発現系を肺炎球菌で利用しても、肺炎球菌で高発現させることができない。肺炎球菌内で目的遺伝子を高発現できるプロモーターの提供。

【解決手段】(a) 333bpからなる特定の塩基配列(Tp)を含有するポリヌクレオチド；(b) 上記の塩基配列を含有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、肺炎球菌において下流に連結した目的遺伝子を発現しうるポリヌクレオチド；の(a)又は(b)に示すポリヌクレオチドからなるプロモーター。

【選択図】 図4



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の ( a ) 又は ( b ) に示すポリヌクレオチドからなるプロモーター。

( a ) 配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチド；

( b ) 配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、肺炎球菌において下流に連結した目的遺伝子を発現しうるポリヌクレオチド；

## 【請求項 2】

配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、配列番号 3 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 記載のプロモーター。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載のプロモーターを含む組換えベクター。

## 【請求項 4】

請求項 3 記載の組換えベクターが導入された肺炎球菌の形質転換体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) において下流に連結した目的遺伝子を発現しうるポリヌクレオチドからなるプロモーターに関する。

## 【背景技術】

20

## 【0002】

肺炎は日本における死亡原因の 9.9% を占め、がん、心疾患に次ぐ第 3 位の疾患である。そして、市中における肺炎原因菌としてもっとも頻度が高いのが肺炎球菌である。

## 【0003】

この肺炎球菌は通性嫌気性のグラム陽性双球菌である。肺炎球菌は様々な病原性因子 (溶血毒、I g A 分解酵素など) を持ち、特に莢膜による宿主免疫細胞 (貪食細胞) からの回避及び補体が形成する膜侵襲複合体からの防御が、宿主定着 (感染) に重要である。莢膜は単純構造のため抗原性が弱く濾胞 B 細胞による T 細胞依存性の抗体生産が行なわれず、親和性の高い I g G 抗体産生 B 細胞が発現しない。代わりに、漿膜腔に局在する B 1 細胞や脾臓辺縁帯 B 細胞による T 細胞非依存性の抗体生産が行なわれ、親和性の低い I g M 抗体による応急的な免疫防御機構を誘導する。I g M 抗体が肺炎球菌莢膜に結合すると、補体系及び細胞性免疫を賦活化して肺炎球菌を駆除することができるが、本抗体産生機構においてはメモリー B 細胞が作られないために長期の「免疫記憶」が起こらず、肺炎球菌による再感染の危険を常にはらんでいる。さらに、肺炎球菌の莢膜は判明しているだけでも 90 種類以上に及ぶため、一度肺炎球菌感染を起こしても、異なる血清型のものに感染する可能性がある。

30

## 【0004】

このように肺炎球菌は巧みな免疫回避機構により感染を成立させるため、免疫機能の衰えた高齢者や免疫機能が未発達な乳幼児においては特に危険な細菌である。さらに、近年、第一選択薬として用いられる - l a c t a m 系の抗生物質に耐性の肺炎球菌が報告されており、治療が難しくなっている。現在、易感染者における効果的な感染予防のために、肺炎球菌の莢膜多糖を主成分とするワクチン及び莢膜多糖にアジュバントを付加したワクチンが開発されている。これらワクチンは海外での効果的な肺炎球菌感染予防実績を有し、我が国においても数年前に認可され、ワクチン接種が広まりつつある。

40

## 【0005】

肺炎球菌の病原性を理解するためには、肺炎球菌内で病原因子の遺伝子発現を調節し解析することが必要である。これまでに外来遺伝子を細胞内で発現させるためのプロモーターは、ヒトや大腸菌において、いくつか実用化されている。例えば、C M V - I E プロモーターは、ヒトに不顕性感染するサイトメガロウイルス由来のプロモーターであり、哺乳類細胞におけるタンパク質高発現のために使用される一般的なプロモーターである (非特

50

許文献 1 参照)。細菌に関しては、多様な大腸菌株に対応可能なプロモーターとして、*tac* プロモーター (非特許文献 2 参照) が広く用いられている。*tac* プロモーターは、大腸菌由来の *trp* プロモーターと *lac* プロモーターを組み合わせたプロモーターで、大腸菌に目的のタンパク質を発現させる際に有用である。しかし、肺炎球菌においては、*CMV-IE* プロモーターや *tac* プロモーターのような一般的な高発現プロモーターは実用化されていない。そのため、肺炎球菌の肺組織内での定着機構や宿主の免疫系を回避する機構の解析など、肺炎球菌の性状・機能解析がこれまで思うように進んでいないのが現状である。したがって、肺炎球菌内で標的分子を高発現できるような効率的な発現系の開発が求められていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Schmidt EV, Christoph G, Zeller R, Leder P. Mol Cell Biol. (1990) 10(8): 4406-4411

【非特許文献 2】de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. Proc Natl Acad Sci U S A (1983) 80(1): 21-25

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これまで大腸菌など一般的な細菌では高発現系の開発が進んでいるが、肺炎球菌は基本的な発現システムが異なるため、一般的な細菌の高発現系を肺炎球菌で利用しても、肺炎球菌で高発現させることができない。そこで、本発明の課題は、肺炎球菌内で目的遺伝子を高発現できるプロモーターを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明者らは、肺炎球菌において活性の高いプロモーターを探索するなかで、肺炎球菌の病原性因子のひとつとして知られている *PspA* タンパク質のプロモーターを用いれば、肺炎球菌内で目的タンパク質を発現誘導できると考えた。この *PspA* タンパク質は肺炎球菌の病原性因子のひとつであり、細胞表面分子である。この *PspA* タンパク質を欠損させると感染宿主内で貪食されやすくなり病原性が低下することが知られており、肺炎球菌内での発現が確実なタンパク質である。

【0009】

そこで、肺炎球菌 *GTC261* 株のクロモソームをテンプレートとして *PspA* タンパク質のプロモーター部位 (配列番号 1) を *PCR* で増幅し、さらに、*pmCherry* プラスミド (クロンテック社製) をテンプレートとして *mCherry* をコードする遺伝子を *PCR* で増幅し、これらの *PCR* 産物を利用して図 1 に示す組換え大腸菌・肺炎球菌シャトルベクター *pLS5-HSG398-PspA-mCherry* (*PspA-mCherry*) を作製した。さらに、かかる組換え大腸菌・肺炎球菌シャトルベクターを用いて大腸菌 *JM109* 株を形質転換した。その結果、赤色蛍光を発する複数の大腸菌 *JM109* 株が得られた。次に、肺炎球菌における赤色蛍光タンパク質 *mCherry* の発現を確認するため、赤色蛍光を発した大腸菌 *JM109* 株から発現プラスミドを抽出して肺炎球菌を形質転換したが、図 2 に示すように、*lac* プロモーターの下流に *mCherry* を連結した発現プラスミド (*lac\_promoter-mCherry*: 作製方法は後述) を肺炎球菌に導入した場合と同様、赤色蛍光を強く発する肺炎球菌は得られなかった。この結果から、肺炎球菌で目的分子の発現誘導を試みる場合、理論的に可能であると考えられるプロモーターを用いても効率のよい発現を誘導することが難しいことが明らかとなった。そのため、肺炎球菌内で目的遺伝子を高発現させるためには、新規のプロモーターの発見が必要であると考え、肺炎球菌のクロモソームを制限酵素で部分切断してスクリーニングを行ったところ、得られた膨大な断片の中から肺炎球菌内で目的遺伝子を高発現させることが可能な配列を見だし、本発明を完成した。

【0010】

10

20

30

40

50

すなわち、本発明は、以下に示すとおりのものである。

(1) (a) 配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、肺炎球菌において下流に連結した目的遺伝子を発現しうるポリヌクレオチド；の(a)又は(b)に示すポリヌクレオチドからなるプロモーター。

(2) 配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、配列番号 3 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドであることを特徴とする上記(1)記載のプロモーター。

(3) 上記(1)又は(2)記載のプロモーターを含む組換えベクター。

(4) 上記(3)記載の組換えベクターが導入された肺炎球菌の形質転換体。

10

#### 【発明の効果】

##### 【0011】

本発明のプロモーターは、肺炎球菌内で下流に連結した目的遺伝子を高発現できるという効果を奏する。かかるプロモーターを用いることで、目的遺伝子がコードするタンパク質の解析、肺炎球菌の肺組織内での定着機構や宿主の免疫系を回避する機構の解析など、肺炎球菌の性状・機能解析を行うことが可能となる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0012】

【図1】 P s p A タンパク質のプロモーター部位及び赤色蛍光タンパク質 m C h e r r y をコードする配列を含む大腸菌・肺炎球菌シャトルベクター pLS5-HSG398-PpspA-mCherry (PpspA-mCherry) のマップを示す。

20

【図2】 l a c プロモーター又は P s p A プロモーターの下流に m C h e r r y を連結した発現プラスミドを肺炎球菌に導入して培養し、蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。(a) が lac\_promoter-mCherry、(b) が PpspA-mCherry を導入した場合であり、それぞれ左が微分干渉像、右が蛍光像である。

【図3】 (a) pLS21、(b) pHSG398、及び(c) pLS5-HSG398 rev-mCherry rev のマップを示す。

【図4】 断片 T -mCherry に挿入されたクロモソーム断片の配列を示す図である。

【図5】 pLS5-HSG398 rev のマップを示す。

【図6】 ベクター pLS5-HSG398 rev に l a c プロモーター及び m C h e r r y 遺伝子を導入した pLS5-HSG398 rev-Plac-mCherry (lac\_promoter-mCherry) のマップを示す。

30

【図7】 実施例 1 で得られた断片 T -mCherry、及びコントロールとして lac\_promoter-mCherry を肺炎球菌に導入し、T S B Y 平板培地で培養して蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【図8】 pLS5-HSG398-rev-Tp-mCherry (Tp-mCherry) のマップを示す。

【図9】 断片 T のうち、図 4 に示す A 領域と B 領域を除いた配列 ( T p ) を含むプラスミド ( T p -mCherry ) 及びコントロールとして lac\_promoter-mCherry を肺炎球菌に導入し、T S B Y 平板培地で培養して蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【図10】 Tp-mCherry 及び断片 T -mCherry をそれぞれ大腸菌及び肺炎球菌に導入し、L B G 平板培地及び T S B Y 平板培地で培養して蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

40

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0013】

本発明のプロモーターとしては、(a) 配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号 2 に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、肺炎球菌において下流に連結した目的遺伝子を発現しうるポリヌクレオチド；の(a)又は(b)に示すポリヌクレオチドからなるプロモーターであれば特に制限されず、かかる肺炎球菌は肺炎双球菌や肺炎レンサ球菌とも呼ばれ、肺炎の原因となるグラム陽性の双球菌である。

##### 【0014】

本発明において、プロモーターとは、目的遺伝子配列の上流に配置され、RNA ポリメ

50

ラーゼが結合することにより、下流に配置された遺伝子の発現の制御に関わる領域の塩基配列を意味し、エンハンサー領域やリボソーム結合領域の塩基配列を含んでもよい。

【0015】

本発明における配列番号2に示す塩基配列は肺炎球菌のクロモソームを制限酵素BglIIで処理して得られた断片に含まれていた配列であり、配列番号2に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドとしては、配列番号2に示す塩基配列を含有している限り特に制限されず、配列番号3に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドを挙げることができ、下流に連結した目的遺伝子を発現しうるかぎり、上流又は下流に構造遺伝子の全部又は一部や、マーカー遺伝子や、micro RNAなどの他の塩基配列を含んでいてもよく、また、配列番号2に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドや、配列番号3に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドでもよい。

10

【0016】

本発明において、配列番号2に示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、肺炎球菌において下流に連結した遺伝子を発現しうるポリヌクレオチドにおける「ストリンジエントな条件下」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、より具体的には、70%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチド同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いポリヌクレオチド同士がハイブリダイズしない条件であり、例として、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗浄条件である65℃、1×SSC、0.1%SDS、又は0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件を挙げることができる。

20

【0017】

また、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、DNA又はRNAなどの核酸をプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるポリヌクレオチドを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のポリヌクレオチドの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍程度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリーマニュアル(Molecular cloning, A laboratory manual)、第3版、第6章に記載の方法で行うことができる。

30

【0018】

上記肺炎球菌において、下流に連結した目的遺伝子を発現しうるポリヌクレオチドとしては、肺炎球菌において下流に作動可能に連結した目的遺伝子を発現しうる限り特に制限されないが、たとえばlacプロモーターを用いた場合と比較して、目的遺伝子を5倍以上、好ましくは9倍以上、より好ましくは15倍以上発現させるポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0019】

目的遺伝子の発現は、たとえば、プロモーターの下流に、mCherry、GFPなどの蛍光遺伝子を作動可能に連結した組換えポリヌクレオチドを肺炎球菌に導入し、得られた形質転換体を、終濃度1.5%寒天末、5%脱繊維羊血液を加えたTSBY平板培地に塗布して37℃、5%CO<sub>2</sub>の環境で一晩培養したときの蛍光強度を測定・解析することによって求めることができる。また、蛍光強度の測定・解析は、画像統合ソフトNIS-elements(ニコン社製)などの市販のソフトを用いることによって行うことができる。

40

【0020】

上記目的遺伝子としては、用途に合わせて全長の遺伝子でも、その一部でもよい。また、その由来はいかなる生物から単離された遺伝子でも、遺伝子工学的に作製された人工的な遺伝子でもよい。

50

## 【 0 0 2 1 】

本発明の組換えベクターに用いるベクターとしては、本発明のプロモーターを含み、該プロモーターの下流に作動可能に組み込んだ目的遺伝子を発現できるものであれば特に制限されず、直鎖状でも環状でもよく、自立複製可能であるものや、染色体中へ組み込み可能であるものが好ましく、また、ターミネーターなどの制御配列や選択マーカーを含有しているものを用いてもよい。

## 【 0 0 2 2 】

本発明の組換えベクターが導入された肺炎球菌としては、本発明の組換えベクターが導入された肺炎球菌の形質転換体を意味する。本発明の組換えベクターの肺炎球菌への導入方法としては特に制限されず、酢酸リチウム法、リポフェクション法、リン酸カルシウム共沈殿法、リポソーム法、D E A E デキストラン法などの化学的方法；ウイルスベクターを利用する方法、細胞融合法などの生物学的的方法；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、遺伝子銃法、超音波遺伝子導入法などの物理的方法；などの公知の方法を例示することができる。

10

## 【 0 0 2 3 】

本発明の組換えベクターを含む肺炎球菌の形質転換体を培養することで、目的遺伝子がコードするタンパク質を効率よく生産することができる。培養方法としては肺炎球菌の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。例えば、本発明の組換えベクターが導入された肺炎球菌を37℃前後、pH7前後、5%CO<sub>2</sub>の環境で培養することができる。目的遺伝子がコードするタンパク質は培養液又は破碎した肺炎球菌から回収することができ、かかる回収する方法としては、公知のタンパク質の回収方法、例えば、遠心分離、次いで、ゲルろ過、イオン交換、アフィニティなどのクロマトグラフィーにより回収する方法を挙げることができる。

20

## 【 実施例 1 】

## 【 0 0 2 4 】

[ mCherry を発現しうる肺炎球菌の作製 ]

肺炎球菌において発現能力が高いプロモーターを探索するために、肺炎球菌のクロモソームを制限酵素で部分切断し、mCherryをコードする遺伝子を含む大腸菌・肺炎球菌シャトルベクターに挿入して発現プラスミドを作製し、かかる発現プラスミドを大腸菌及び肺炎球菌に導入してmCherryの発現を調べた。

30

## 【 0 0 2 5 】

(大腸菌・肺炎球菌シャトルベクター)

大腸菌はJM109株を用い、肺炎球菌はGTC261株を用いた。大腸菌・肺炎球菌シャトルベクターはpLS5-HSG398 rev-mCherry revを用いた。上記シャトルベクターは、pLS21(ATCC67492)のEcoRI断片とpHSG398のEcoRI断片を結合し、HindIII切断部位にmCherry遺伝子(Z2522N:pmCherry由来、タカラバイオ社製)を挿入して作製した。かかるシャトルベクターは、大腸菌の複製開始点(origin of replication)、肺炎球菌の複製開始領域(repA/B/D)をもつ。さらに、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、サンゴ由来の赤色蛍光タンパク質遺伝子mCherryを含んでいる。pLS21、pHSG398及びpLS5-HSG398 rev-mCherry revのマップを図3に示す。

40

## 【 0 0 2 6 】

(発現プラスミドの作製)

上記シャトルベクターpLS5-HSG398 rev-mCherry rev 50ngに、制限酵素BamHI(15U/μl)0.5μlとCIP(10-30U/μl)0.125μlを加えて30分で60分間反応させた(反応系50μl)。また、肺炎球菌GTC261株のクロモソーム500ngに制限酵素BglII(10U/μl)を128倍に希釈したものを1μl加え、37℃で60分間反応させた(反応系50μl)。反応後に酵素の失活処理を行い、シャトルベクターの反応液と肺炎球菌クロモソームの反応液を混合してエタノール沈殿処理を行った。濃縮及び乾燥させた上記反応液混合物にT4 DNA Ligase(350U/μl)を1μl添加して16℃で一晩反応させて(反応系10μl)、発現プラスミ

50

ド（肺炎球菌クロモソーム断片ライブラリー）を作製した。

【0027】

（大腸菌への発現プラスミドの導入）

井上・野島法（Inoue H, Nojima H, Okayama H. Gene(1990) 96(1):23-28）により作製した大腸菌JM109株コンピテントセル100 $\mu$ lを、上述で作製した、ライゲーション処理後の発現プラスミド溶液に加え、水中に30分間静置した。その後、42 $^{\circ}$ Cの環境に45秒間静置した。5分間水中に置いた後、LBG液体培地（終濃度2% LB培地、終濃度0.1% glucose）を1ml加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間静置し、テトラサイクリン（終濃度20 $\mu$ g/ml）を含むLBG平板培地（LBG液体培地に終濃度1.5% 寒天末を添加）に全量を塗布し、30 $^{\circ}$ Cで二晩培養した。

10

【0028】

（発現プラスミドの抽出）

適度な大きさになったコロニーを蛍光顕微鏡で観察し、赤色蛍光を発した40個のコロニーを、それぞれ各々テトラサイクリン（終濃度20 $\mu$ g/ml）を含むLBG液体培地5mlに植え継いで30 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。吸光度計を用いて濁度が1を超えていることを確認した後、一晩培養液を遠心し集菌してから、QIAprep（登録商標）Spin Miniprep Kit（Qiagen社製）を用いて、mCherryを発現した大腸菌JM109由来の発現プラスミド（以下、「JM109由来mCherry発現プラスミド」ともいう）を抽出し、40種類の発現プラスミドを得た。

【0029】

20

（肺炎球菌へのJM109由来mCherry発現プラスミドの導入）

肺炎球菌におけるmCherryの発現を確認するため、肺炎球菌へ40種類のJM109由来mCherry発現プラスミドをそれぞれ導入した。まず、対数増殖期にある肺炎球菌（GTC261株）1mlを、HCl（終濃度10mM）とグリシン（終濃度20mM）を加えたTSBY液体培地（終濃度3% Soybean-Casein Digest Broth、終濃度0.5% Yeast extract）100mlに移して37 $^{\circ}$ Cで3時間培養した。培養液は吸光度計を用いて濁度0.1程度まで肺炎球菌が増殖したことを確認した。培養液にNaOH（終濃度10mM）を加えて中和した後、4、7000rpm、5分間遠心した。菌体をTB（Transfer Buffer、終濃度4.88% glucose、終濃度10mM MgCl<sub>2</sub>、pH6.5）で3回洗い、TB800 $\mu$ lに懸濁した。このTB懸濁菌液200 $\mu$ lに上記抽出した40種類のJM109由来mCherry発現プラスミド75-225ngをそれぞれ添加したものをエレクトロポレーション用のキュベット（0.2cmギャップ）に注ぎ、MicroPulser（Bio-Rad社製）により2.9kVの電流を3.70~3.90ms流した。次にキュベット内の菌液に1mlのTSBY液体培地を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。この培養液を250 $\mu$ l分取し、新しいTSBY液体培地750 $\mu$ lに加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間培養した。その後、培養液を全量が各1mlとなるように1/10と1/1000濃度に希釈し、TSBY平板培地（TSBY培地に終濃度1.5% 寒天末、5% 脱繊維羊血液、終濃度0.5 $\mu$ g/mlテトラサイクリン添加）に全量塗布した。塗布した肺炎球菌は37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>の環境で一晩培養した。適度な大きさになったそれぞれのコロニーを蛍光顕微鏡で観察し、赤色蛍光を発しているコロニー、すなわち肺炎球菌でmCherryを強く発現している株（GTC261-T株）が得られた。なお、GTC261-T株に導入したJM109由来mCherry発現プラスミドを、以後「断片T-mCherry」ともいう。

30

40

【0030】

〔クロモソーム断片のシーケンス解析〕

断片T-mCherryに挿入されたクロモソーム断片を含む領域をPCRで増幅し、シーケンス解析を行った。

【0031】

（PCR法）

上記「発現プラスミドの抽出」で得た断片T-mCherry 200ngにつきPrimeSTAR HS

50

DNA Polymerase ( 2 . 5 U /  $\mu$  l ) 0 . 5  $\mu$  l、5 x PrimeSTAR Buffer 1 0  $\mu$  l、dNTP Mixture ( 2 . 5 m M e a c h ) 4  $\mu$  l、配列番号 4 に示すプライマー-seq Fと配列番号 5 に示すプライマー-seq R ( 1 0 p m o l /  $\mu$  l ) 各 1  $\mu$  l を加えて、5 0  $\mu$  l 系で反応を行った。アニーリング、伸長時の温度と反応時間は各々適切なものを選択した。PCR 反応後の DNA は、精製、濃度測定を行い、シーケンス解析に使用した。

#### 【 0 0 3 2 】

( シークエンス解析 )

上述で得られた PCR 反応後の DNA、すなわち断片 T-mCherry に挿入されたクロモソーム断片と mCherry 遺伝子の一部を含む範囲の配列をシーケンス解析した。すでに塩基配列が解析されたゲノムから相同性の高い配列を探すため、解析で得られた配列を、BLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BLASTSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BLASTSearch&LINK_LOC=blasthome)) で相同性検索した。

10

#### 【 0 0 3 3 】

( シークエンス解析結果 )

シーケンス解析の結果、断片 T-mCherry に挿入されたクロモソーム断片の配列は、配列番号 3 に示す塩基配列 ( 図 4 ) であることが明らかとなった。かかる結果より、配列番号 3 に示す塩基配列は肺炎球菌において目的遺伝子を発現しうるポリヌクレオチドであることが明らかとなった。なお、以下、配列番号 3 に示す塩基配列を、以後「断片 T」ともいう。また、BLAST による相同検索の結果、配列番号 3 に示す塩基配列のうち、1 ~ 2 2 9 番目の塩基配列の A 領域は推定多糖生合成フリッパーゼ ( putative polysaccharide biosynthesis flippase )、5 6 5 ~ 7 5 4 番目の塩基配列の B 領域は機能未知タンパク質 T ( conserved hypothetical protein ) をコードしていることが明らかとなった。

20

#### 【 実施例 2 】

#### 【 0 0 3 4 】

[ 断片 T を含むプラスミドで形質転換した肺炎球菌における蛍光強度の測定 ]

実施例 1 の結果より、断片 T-mCherry に挿入されたクロモソーム断片は配列番号 3 に示す断片 T であることが明らかとなった。そこで、断片 T の肺炎球菌におけるプロモーター活性を調べるために、実施例 1 で得られた断片 T-mCherry を実施例 1 と同様の方法で肺炎球菌に導入し、TSBY 平板培地で培養して蛍光顕微鏡で観察した。コントロールとしてベクター-pLS5-HSG398 rev に lac プロモーター及び mCherry 遺伝子を導入したプラスミド ( lac\_promoter-mCherry ) を以下に示す方法で調製し、上記と同様に肺炎球菌に導入し、TSBY 平板培地で培養して蛍光顕微鏡で観察した。なお、lac\_promoter-mCherry を導入した肺炎球菌の培養においては、IPTG 無しの群と IPTG を 1 0 0  $\mu$  M とするように加えた培地で培養した群の 2 群で行った。断片 T-mCherry を導入した肺炎球菌の培養においては、IPTG 無しである。

30

#### 【 0 0 3 5 】

( lac\_promoter-mCherry の作製 )

pmCherry プラスミド ( クロンテック社製 ) をテンプレートとし配列番号 6 に示すプライマー-Plac-mCherry F と配列番号 7 に示すプライマー-Plac-mCherry R を用いて PCR を行い、Plac-mCherry 断片を得た。得られた PCR 産物は制限酵素 BglII と SacI で切断した。また、pLS21 プラスミド ( ATCC 6749 ) と pHSG398 プラスミド ( クロンテック社製 ) に基づき作製した pLS5-HSG398 rev を制限酵素 BamHI と SacI で切断した。pLS5-HSG398 rev のマップを図 5 に示す。

40

#### 【 0 0 3 6 】

制限酵素処理済みの Plac-mCherry 断片とベクター-pLS5-HSG398 rev を混合し、T4 DNA Ligase ( 3 5 0 U /  $\mu$  l ) を 1  $\mu$  l 添加して 1 6 で一晩反応させた ( 反応系 1 0  $\mu$  l )。ライゲーション産物を上述の井上・野島法により作製した大腸菌 JM109 コンピテントセルに混合して大腸菌 JM109 へ遺伝子導入し、大腸菌 JM109 を形質転換した。得られたコロニーから上述のプラスミドの抽出と同様の方法でプラスミドを抽出し、pLS5-HSG398 rev-Plac-mCherry ( lac\_promoter-mCherry ) プラスミド ( 図 6 ) を

50



得た。

【 0 0 3 7 】

( 蛍光観察 )

培養した培地を蛍光顕微鏡で観察し、赤色蛍光がみられたコロニーを3つ選択し、プレパラートを作製した。蛍光顕微鏡でプレパラート上の菌の写真を露光時間2秒で複数視野撮影し、写真上の100個の菌について輝度を測定・解析した。100個の菌の輝度の平均値から背景部分の輝度を引いた値を、そのプラスミドを持った菌の蛍光強度とした。輝度の測定・解析には画像統合ソフトNIS-elements(ニコン社製)を使用した。

【 0 0 3 8 】

( 結果 )

各プラスミドを導入した肺炎球菌における蛍光強度を表1に、蛍光顕微鏡写真を図7示す。図7において、(a)、(b)がlac\_promoter-mCherryを導入した肺炎球菌、(c)が断片T-mCherryを導入した肺炎球菌である。また、蛍光強度の数値はNIS-elementsを用いて測定した際の実測値で、1 pixelあたりの「輝度」を表す。

【 0 0 3 9 】

【表1】

導入したプラスミド	蛍光強度
lac_promoter-mCherry IPTG 0 $\mu$ M	2.0
lac_promoter-mCherry IPTG 100 $\mu$ M	2.6
断片T-mCherry	39.6

10

20

【 0 0 4 0 】

表1及び図7に示すように、断片T-mCherryを導入した肺炎球菌では、lac\_promoter-mCherryで形質転換した肺炎球菌と比較して、IPTG無しに対して19倍以上、IPTG 100  $\mu$ Mに対して15倍以上も蛍光強度が高く、断片Tは肺炎球菌内でmCherry遺伝子を高発現させることが明らかとなった。

【実施例3】

【 0 0 4 1 】

[断片Tの一部を含むプラスミドで形質転換した肺炎球菌における蛍光強度の測定]

上記断片Tのうち、図4に示すA領域とB領域を除いた配列(Tp:配列番号4)を含むプラスミド(Tp-mCherry)を以下の方法で作製して肺炎球菌を形質転換し、蛍光強度を測定した。なお、Tpは、肺炎球菌の機能未知タンパク質Tをコードする遺伝子のプロモーターを含む領域に該当する。

【 0 0 4 2 】

GTC261株のクロモソームをテンプレートとし配列番号8に示すプライマーTp Fと配列番号9に示すプライマーTp Rを用いてPCRを行い、Tp断片を得た。得られたPCR産物は制限酵素SphIとNdeIで切断した。また、pmCherryプラスミド(クロンテック社製)をテンプレートとし配列番号10に示すプライマー-mCherry Fと配列番号11に示すプライマー-mCherry Rを用いてPCRを行い、Tp断片の下流に挿入するmCherry断片を得た。得られたPCR産物は制限酵素NdeIとBamHIで切断した。さらに、ベクターpLS5-HSG398 revを制限酵素SphIとBamHIで切断した。

30

40

【 0 0 4 3 】

得られた制限酵素処理済みのTp断片、mCherry断片及びベクターpLS5-HSG398 revを混合し、T4 DNA Ligase(350 U/ $\mu$ l)を1  $\mu$ l添加して16で一晩反応させた(反応系10  $\mu$ l)。ライゲーション産物を上述の井上・野島法により作製した大腸菌JM109コンピテントセルに混合して大腸菌JM109へ遺伝子導入し、大腸菌JM109を形質転換した。得られたコロニーから上述のプラスミドの抽出と同様の方法でプラスミドを抽出し、pLS5-HSG398-rev-Tp-mCherry(Tp-mCherry)プラスミド(図8)を得た。

【 0 0 4 4 】

50

上述で作製したTp-mCherry、及び実施例2で作製したlac\_promoter-mCherryそれぞれを用いて実施例1と同様の方法で肺炎球菌GTC261株を形質転換し、実施例2と同様の方法で培養し、蛍光強度を測定した。結果を表2及び図9に示す。図9において、(a)、(b)がlac\_promoter-mCherryを導入した肺炎球菌、(c)がTp-mCherryを導入した肺炎球菌である。

【0045】

【表2】

導入したプラスミド	蛍光強度
lac_promoter-mCherry IPTG 0 $\mu$ M	0.9
lac_promoter-mCherry IPTG 100 $\mu$ M	0.5
Tp-mCherry	8.6

10

【0046】

(結果)

表2及び図9に示すように、Tp-mCherryを導入した肺炎球菌では、lac\_promoter-mCherryで形質転換した肺炎球菌と比較してIPTG無しに対して9倍以上、IPTG100 $\mu$ Mに対して17倍以上も蛍光強度が高く、Tpは肺炎球菌内でmCherry遺伝子を高発現させることが明らかとなった。

【実施例4】

【0047】

[Tp-mCherry又は断片T-mCherryで形質転換した大腸菌及び肺炎球菌における蛍光強度の測定]

(蛍光強度の測定)

実施例3で作製したTp-mCherry及び実施例1で作製した断片T-mCherryそれぞれを用いて実施例1と同様の方法で大腸菌JM109株及び肺炎球菌GTC261株を形質転換し、実施例2と同様の方法で培養して蛍光強度を測定した。結果を表3及び図10に示す。図10において、(a)がTp-mCherryを大腸菌JM109株に導入した場合、(b)がTp-mCherryを肺炎球菌GTC261株に導入した場合、(c)が断片T-mCherryを大腸菌JM109株に導入した場合、(d)が断片T-mCherryを肺炎球菌GTC261株に導入した場合である。

20

30

【0048】

【表3】

導入したplasmid	蛍光強度	
	大腸菌JM109	肺炎球菌GTC261
Tp-mCherry	34.51	6.59
断片T-mCherry	3.22	17.75

【0049】

(結果)

表3及び図10に示すように、Tp-mCherry又は断片T-mCherryのいずれを導入しても肺炎球菌で蛍光が観察され、断片TだけでなくTpを用いてもmCherryを肺炎球菌内で発現可能であることが明らかとなった。

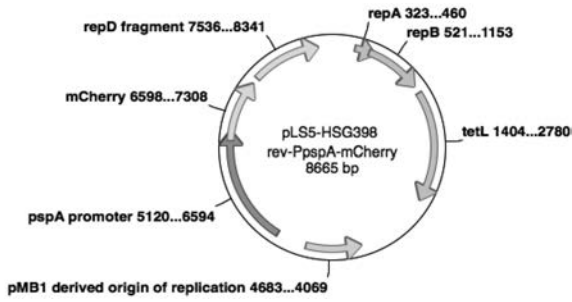
40

【産業上の利用可能性】

【0050】

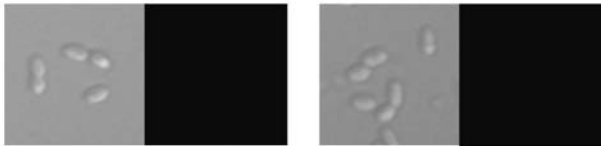
本発明のプロモーターは肺炎球菌内で目的遺伝子を高発現できることから、肺炎球菌の肺組織内での定着機構や宿主の免疫系を回避する機構の解析、又は肺炎球菌の病原因子を標的としたワクチン開発の分野において利用可能である。

【 図 1 】



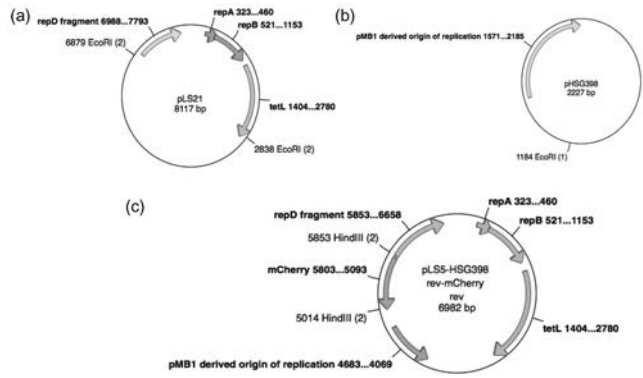
【 図 2 】

肺炎球菌の蛍光顕微鏡写真  
(左:微分干渉像、右:蛍光像)

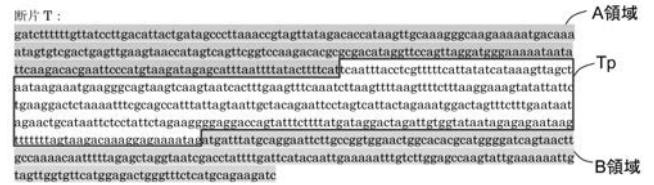


(a) lac\_promoter-mCherry IPTG 0μM (b) PspA-mCherry

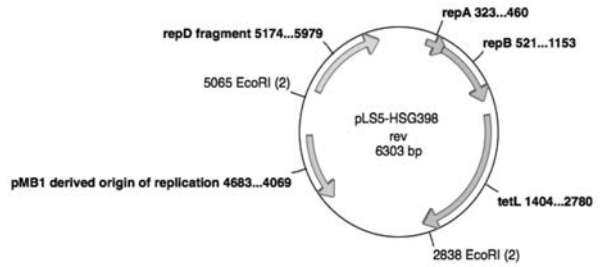
【 図 3 】



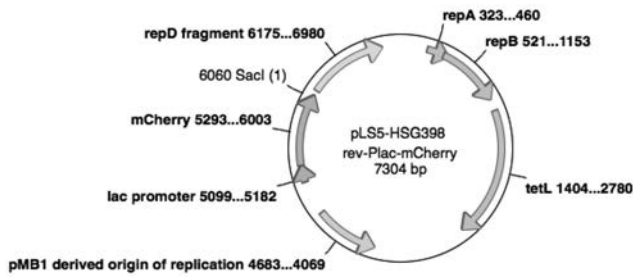
【 図 4 】



【 図 5 】

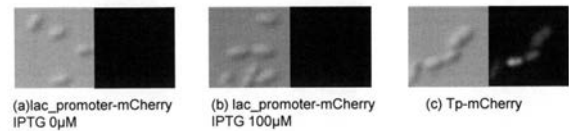


【 図 6 】



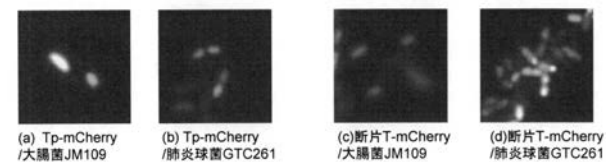
【 図 9 】

肺炎球菌の蛍光顕微鏡写真  
(左:微分干渉像、右:蛍光像)



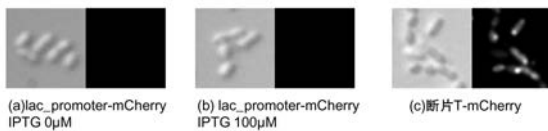
【 図 10 】

大腸菌JM109と肺炎球菌GTC261の蛍光顕微鏡写真

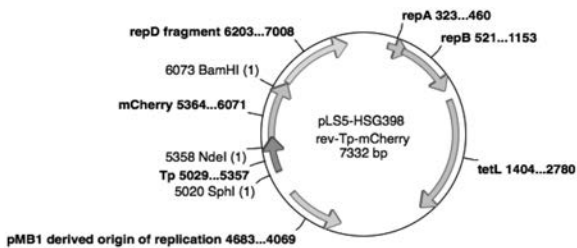


【 図 7 】

肺炎球菌の蛍光顕微鏡写真  
(左:微分干渉像、右:蛍光像)



【 図 8 】



【配列表】

2016082933000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100177714

弁理士 藤本 昌平

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(72)発明者 荻野 英賢

山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大学法人山口大学医学部内

(72)発明者 長谷川 明洋

山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大学法人山口大学医学部内

Fターム(参考) 4B024 AA20 DA05 DA06 EA04 FA02 GA11

4B065 AA49X AA49Y AB01 AC14 BA02 CA44 CA46