

(19)日本国特許庁(J P)

(12)特許公報(B 2)

(11)特許番号

特許第3103881号

(P 3 1 0 3 8 8 1)

(45)発行日 平成12年10月30日(2000.10.30)

(24)登録日 平成12年9月1日(2000.9.1)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00
/(C12N 15/09	ZNA	ZNA A
C12R 1:01)		

請求項の数2 (全8頁)

(21)出願番号 特願平10 - 224366

(22)出願日 平成10年8月7日(1998.8.7)

(65)公開番号 特開2000 - 50868(P 2000 - 50868 A)

(43)公開日 平成12年2月22日(2000.2.22)

審査請求日 平成10年8月7日(1998.8.7)

微生物の受託番号 F E R M P - 1 6 8 2 5

微生物の受託番号 F E R M P - 1 6 8 2 6

(73)特許権者 390026169

農林水産省畜産試験場長
茨城県稲敷郡茎崎町池の台2

(72)発明者 緒方 是嗣

茨城県つくば市観音台1 - 35 - 6

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 P l a m i d , 1996 , V o l . 35 , N o . 2 , p . 91 - 97

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)

C12N 15/00

B I O S I S (D I A L O G)

G e n B a n k / E M B L / D D B J

W P I (D I A L O G)

(54)【発明の名称】プラスミド

1

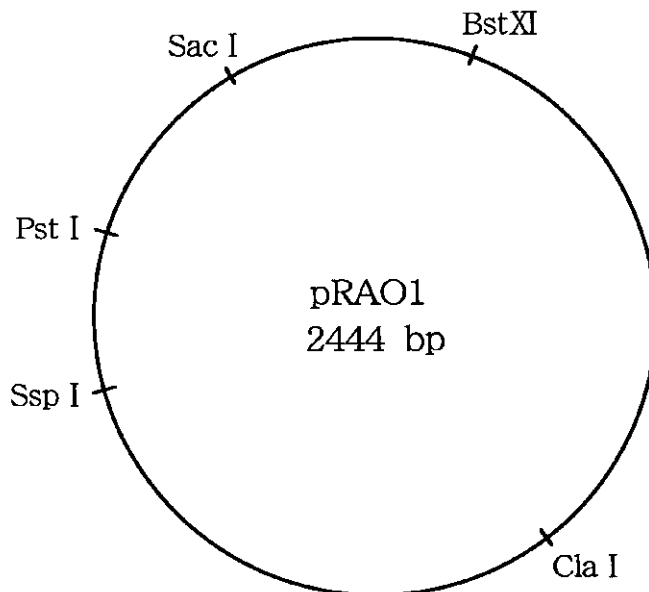
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の制限酵素地図を有する2444bpのプラスミドであって、ルミノバクター・アミロフィラス由

2

来の自己複製配列を含み、かつルーメン微生物内で増殖することができるプラスミド。

【化1】



【請求項 2】 以下の(a)又は(b)のDNAからなるプラスミド。

(a) 配列番号 1 で表わされる塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号 1 で表わされる塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ自己複製及びルーメン微生物内での増殖をすることができるDNA

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ルーメン微生物より分離したプラスミドに関する。

【0002】

【従来の技術】反すう家畜は4つの胃を持っており、このうち食べた飼料が最初に入る胃をルーメンという。ルーメンには、細菌、繊毛虫、真菌などの反すう家畜と共生しているルーメン微生物が多数生息している。ところで、遺伝子組換えを行うためには、外来遺伝子を微生物の遺伝子に運ぶ役割を担うベクターと、そのベクターを受け入れる微生物(宿主)とが必要である。従って、遺伝子組換えによって新たな機能を有するルーメン微生物を開発するためには、ルーメン微生物による宿主-ベクター系を作製する方法が考えられる。

【0003】ベクターとして利用できるものには、プラスミド、ファージ、トランスポゾンなどが挙げられるが、プラスミドが最も扱いやすく、開発も容易である。プラスミドは、宿主の染色体とは物理的に独立して存在するDNAであるが、複製して遺伝する能力は宿主に大きく依存しているため、特定の宿主においてのみ増殖する。従って、ルーメン微生物による宿主-ベクター系を作製するためには、ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドが必要である。

【0004】

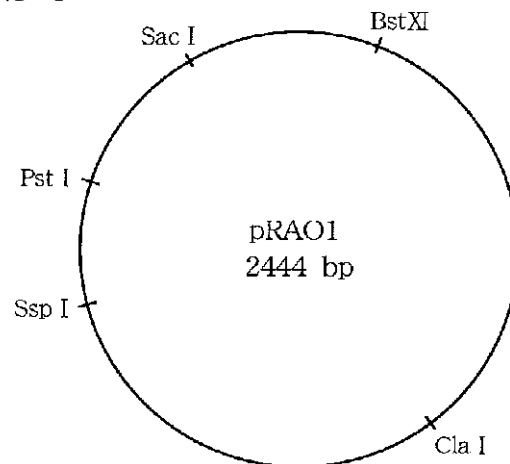
【発明が解決しようとする課題】本発明は、ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドを提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、ルーメン内でデンプン分解に重要な役割を担っていると考えられる細菌ルミノバクター・アミロフィラス(Ruminobacter amylophilus)よりプラスミドを分離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、下記の制限酵素地図を有する2444bpのプラスミドであって、ルミノバクター・アミロフィラス由来の自己複製配列を含むプラスミドである。

【0006】

【化 2】



【0007】上記プラスミドとしては、以下の(a)又は(b)のDNAからなるものが挙げられる。

(a) 配列番号 1 で表わされる塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号 1 で表わされる塩基配列からなるDNAとス

トリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ自己複製をすることができるDNA

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】本発明のプラスミドは、ルミノバクター・アミロフィラスの自己複製配列を含むものである。また、本発明のプラスミドは、分離源が大腸菌と比較して系統的に近いルミノバクター・アミロフィラスであることから、大腸菌とルミノバクター・アミロフィラスとの間でシャトルベクターともなり得るものである。従って、本発明のプラスミドに外来遺伝子を挿入し、大腸菌を形質転換させて大量の組換えプラスミドを得、該組換えプラスミドを用いてルミノバクター・アミロフィラスを宿主菌として有用物質を生産することが可能となる。

【 0 0 0 9 】本発明のプラスミドは、例えば以下の通り作製される。まず、反すう動物（例えばウシ、ヒツジ、ヤギ等）のルーメンからルミノバクター・アミロフィラスを採取する。採取の方法は以下の通りである。すなわち、ルーメン液を希釈し、嫌気性ロールチューブ法によりコロニーを出現させる。コロニーから釣菌し、デンプン、マルトースを利用する菌を選択する。PCR法により選択された菌の16SrRNA配列を決定し、この決定された配列と、データベースに登録されているルミノバクター・アミロフィラス（ATCC 29744）の16SrRNA（GenBank アクセッションNo. RAY15992）とを比較し、両者間において近似する配列を有する場合は、採取した菌がルミノバクター・アミロフィラスであると判断（確認）する。

【 0 0 1 0 】次に、得られたルミノバクター・アミロフィラスから全DNAを得る。全DNAは、公知の任意の手法（例えば染色体DNAのmini-scale調製法（「新しい遺伝子操作技術の基礎」, 太田美智男, 菜根出版pp23-25, 1989年）により得ることができる。

【 0 0 1 1 】得られた全DNAを適当な制限酵素（例えばHind III、Sca I）で消化して部分断片とし、これをpBluescriptなどのベクターに挿入した後大腸菌を形質転換させる。アンピシリン耐性、白コロニーとなったものを選択し、これにより各々プラスミドDNAを分離して遺伝子ライブラリーとする。適当なプライマー、例えばM13M4プライマー及びM13リバースプライマー（いずれもTakara社）を用いて上記ライブラリーを鋳型としてPCRを行う。得られた増幅断片をアガロースゲルで電気泳動後、メンブレンにブロッティングし、サザンハイブリダイゼーションを行う。なお、サザンハイブリダイゼーションはBoehringer Mannheim社のマニュアルに従って行うことができる。

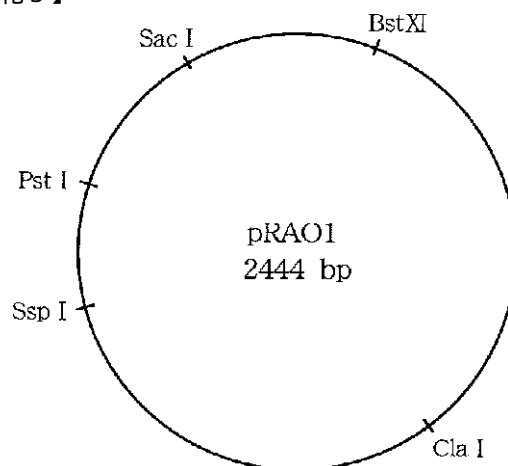
【 0 0 1 2 】サザンハイブリダイゼーションの結果得られたバンドを切り出し、塩基配列の決定を行う。本発明のプラスミドの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法

[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]により、あるいはABI社の自動塩基配列決定装置を用いて分析することにより、決定することができる。このようにして得られたプラスミドは、2444bpの長さを有し（配列番号1）、ルミノバクター・アミロフィラス由来の自己複製配列（配列番号1で表わされる塩基配列の第382～986番目）を含むものである。

【 0 0 1 3 】但し、本発明のプラスミドは、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAを含むもののほか、配列番号1で表わされる塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ自己複製をすることができるDNAを含むものも本発明のプラスミドに含まれる。ストリンジントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が75～100mM、好ましくは75mMであり、温度が40～42℃、好ましくは40℃での条件をいう。また、本発明のプラスミドは、以下に示す通り、制限酵素部位としてCla I、Bst XI、Sca I、Pst I及びSsp Iを有している。

【 0 0 1 4 】

【化3】



30

40

50

【 0 0 1 5 】なお、各制限酵素部位間の距離は、Bst XI-Cla I間では888bp、Ssp I-Cla I間では765bp、Pst I-Ssp I間では192bp、Sca I-Pst I間では278bp、Sca I-Bst XI間では321bpである。以上のようにして得られたプラスミドを「pRAO1」と命名し、該プラスミドを含む大腸菌（名称：E. coli pH21及びE. coli pPR34）は、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成10年5月25日付で、E. coli pH21についてはFERM P-16826として、E. coli pPR34についてはFERM P-16825として寄託されている。

【 0 0 1 6 】なお、大腸菌pH21にはpRAO1のうち1998～1698までの断片が含まれている（図1において1998番から時計回りに1698番まで）。また、pPR34にはpRAO1のうち1438～2163までの断片が含まれており（図1において1438番から時計回りに2163番まで）、pH21に含まれないHind III-Pst I-Hind IIIの断片を有する（図1）。従って、pH21に含まれるプラスミド及びpPR34に含まれるプ

ラスミドともに制限酵素HindIIIで処理し、両者をリガーゼ等により連結することにより完全型のプラスミドpRA01を得ることができる。

【 0 0 1 7 】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

【 0 0 1 8 】〔実施例1〕プラスミドの調製

菌株はルミノバクター・アミロフィラス NIAH-3 (家畜衛生試験場)を用いた。菌の培養は、改良RGCMS培地 (ルーメン液を10%、糖源としてデンプン及びマルトースをそれぞれ0.025%加えた培地)を用い、37℃で14時間行った。培養液15mlから遠心分離 (5000rpm)によって菌体を回収し、50µlの0.15M NaCl-0.1M EDTAに懸濁した。この菌液に400µlの0.1M NaCl-0.1M Tris HCl (pH8.0)-1% SDS溶液を加え、静かに攪拌することにより溶菌させた。得られた溶菌液に450µlのフェノールを加え、緩やかに攪拌し、遠心分離によって水層を回収した。等量のフェノール・クロロフォルムにより、DNAの抽出を行った後、エタノール沈殿した。

【 0 0 1 9 】30µlのTE buffer (pH8.0)によりDNAを溶解し、RNaseを混合して0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。プラスミドのバンド (1kbラダー (BRL)で1.5~3.0kb付近)をゲルから切り出し、フェノール融解法によってプラスミドDNAを抽出精製した。

【 0 0 2 0 】〔実施例2〕制限酵素地図の作成

プラスミドDNAを制限酵素Hind III及びSac Iで処理したところ、少なくとも2箇所以上で切断できることが明らかになった。そこでHind III処理をしたプラスミドDNAを、同じHind IIIで切断しアルカリフォスターゼ処理をしたpBluscriptII KS+(Stratagene, USA)に連結し、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体をアンピシリンによる選択にかけて白コロニーを選択し、形質転換体からプラスミドを抽出した。形質転換体のプラスミドDNAをテンプレートとして、M13-20プライマー及びM13リバープライマー (Takara)を用いてPCRを行った。PCRは、TaKaRa EX Taqのキットを用い、説明書に従って反応液を調製し、94℃30秒、55℃30秒、72℃60秒を1サイクルとして30サイクルを行った。

【 0 0 2 1 】得られた増幅断片をアガロースゲルで電気泳動後、メンブレンにプロットングし、サザンハイブリダイゼーションを行った。なお、サザンハイブリダイゼーションはBoehringer Mannheim社のマニュアルに従った。また、プローブは、ルミノバクター・アミロフィラスのプラスミドDNAをDIG High Prime (Boehringer Mannheim)で標識したものをを用いた。

【 0 0 2 2 】プラスミドの塩基配列は、Dye Terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer ABI)を用いて決定するため、上記PCR産物をテンプレートにし、合成したプライマー又は市販のプライマー (Takara)をマニユ

アルに従って反応させ、ABI社の373Sシークエンサーにかけて解析することとした。

【 0 0 2 3 】すなわち、サザンハイブリダイゼーションによりシグナルの認められた陽性クローンpH21をM13のプライマーセット (M13M4及びM13RV)で増幅し、得られたPCR産物を用いて、クローニングした部位からM13M4側の約500bp、及びM13RV側の約500bpの塩基配列を決定した。この配列を基にOligo プログラム (National Biosciences, UK) を用いて、以下の順向きのプライマーHM01及びHM02、並びに逆向きのプライマーHM03及びHM04の計4つのプライマーを設計した。

【 0 0 2 4 】HM01 : ATCTCTACTGGCGTCTAT (配列番号 2)

HM02 : CAAAWAGGGAAGTGGAG (配列番号 3)

HM03 : GCTTCCTTCTGGCGTTCC (配列番号 4)

HM04 : CCCAGGCTCGTTCGTTCT (配列番号 5)

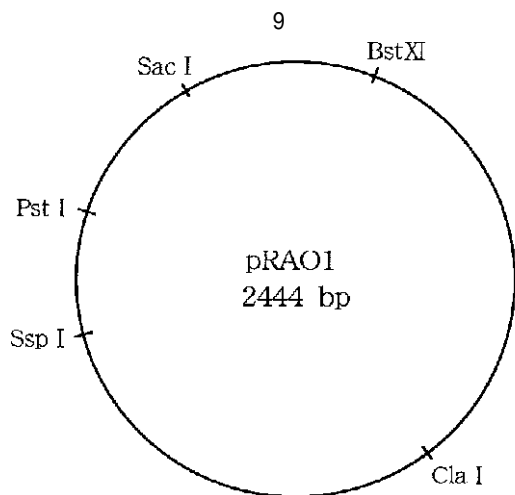
【 0 0 2 5 】R.アミロフィラスのDNAをテンプレートとし、HM01とHM02との組み合わせ (HM01-02という)又はHM03とHM04との組み合わせ (HM03-04という)によりPCRを行った。PCRは、TaKaRa EX Taqキット (Takara社)を使用し、94℃で30秒、50℃で30秒及び72℃で40秒を1サイクルとして30サイクルを行った。

【 0 0 2 6 】増幅した各PCR産物の塩基配列を決定し、さらに、決定したHM01-02のPCR産物の塩基配列よりHM05 (AAGCAGACATCGCARAAG (配列番号 6))及びHM06 (ACTCTCGTCTCTACCA (配列番号 7))のプライマーを合成し、HM02とHM06との組み合わせ (HM02-06という)、又はHM01とHM05との組み合わせ (HM01-05という)によりPCRを行った (TaKaRa EX Taqキットを使用 ; 94℃で30秒、50℃で30秒及び72℃で40秒を1サイクルとして30サイクル)。

【 0 0 2 7 】得られたPCR産物について塩基配列を決定した。その結果、配列番号 1 で表される2444bpの塩基配列が得られた。得られた塩基配列を基にGeneWorks ソフトウェア (IntelliGenetics, USA)を用いて解析し、制限酵素切断部位の推定を行った。単一の切断部位しかないと考えられた制限酵素については、プラスミドDNA又はPCR産物に対し、当該制限酵素の単独消化、あるいは二重消化を行い、電気泳動することで確認した。その結果、以下に示す制限酵素地図を有することが分かった。

【 0 0 2 8 】

【化 4】



【 0 0 2 9 】 HM03-04のプライマーセットで増幅したPCR産物を、TA Cloning kitを用いてpCR IIベクターにクローニングした。これをpPR34と名付けた。pPR34は、pRAO1の全長のうち、pH21に含まれないHind III-Pst I-Hind IIIの断片を含むものである(図1)。

【 0 0 3 0 】

【発明の効果】本発明により、ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドが提供される。本発明のプラスミドは、ルミノバクター・アミロフィラスと大腸菌とのシャトルベクターとして利用できる点で有用である。

【 0 0 3 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yoshihiro Yamashita

Director General of National Institute of Animal Industry

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

<120> Plasmid

<130> P97-0569

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2444

<212> DNA

<213> Ruminobacter amylophilus

<400> 1

```

aagtaagaat gtaggaattt caagggttta catgtttttt gtgatctttc tcctttat 60
accaattatg ttgtataaa acaccacaaa catggtatta tgcacggagt cggaagtgg 120
tgagattacc aactgaagt ggtgagatta ccaactgaag ttggtgagat taccaactga 180
agtgtgtgag attaccaact ttcaagggg aagaatgtag gaatttcaag ggtttgcacg 240
gatctctctt ctaattctat atatctgatt atttttttt ggtacttttt tatgaaaaac 300
gatgaaaaat taaacaaat taaacagctt caaaaaaca ccgtggaaga aatcgtagag 360
ggcattaatt ccattggcga aatggatatt tctgtaaagc tgcgaagaca aagaataaaa 420
ccagatcagg aattttttt ttactttctt acaaacatgg attccctgat tagcgatcct 480
gatattacta aacaggatat tgctgttctc atgaaatagc ctgcaaaaat gcaatcggc 540
aatcagatgt ccatagctca agcagacatc gcagaagatc ttggaatcga caaatcgaat 600
gtttccaaat cagttagaac acttacgcag aaaggcgttt ttcttaaga gagaagaagt 660
ctcgttatga attggaagta ccttgccaaa ggtaacttaa cggatttcat caaagcagac 720
aaagaaaaca gcaaaacttc aaaatttcaa ttggtagagg acgaagagta atggattgga 780
gtaaacaaga acttgaaaaa atcgaagctg taatgaagca tctcaatgcg attatcagcg 840

```

11

12

tcacaacagg cacttctgta aagctcgatg cggaaaagga gcaggtgcag ttttttccg 900
 aaagcggaag aatgtacaag acgatttcag tcgctggaga tagtccatta gctgttgcca 960
 aagacgtact caagcagatc gattaataag cgagaagccc ctgcgttgca ggtgcttctc 1020
 aagatcaata aaggggggct aaaaccccc tttaccccc tcctggggga ggggcacgta 1080
 ccatcttttt cagctactga tgaaaaatg gtgtaacgtg cttctacacc atttttcaat 1140
 tgtgcttgaa aaatgccttc ttttgcggtt accatthttc ctcgtacca cttttgttg 1200
 caaggagaaa aaaatggcac atgtaacgca ttatcacagg ggaagcgtgg cagaaattgt 1260
 gcaccacaat tcacgaacag aaaattattc aaacagggat atagacgcca gtagaagtaa 1320
 gtacaattac agcctttcgg ggcacgagaa tgatttttcg tattacacgc aaaggctctc 1380
 ggaagtacac tgcatgaagc gtgcaaacgt ttgtacgctt tctagtggg tcgtgacgct 1440
 tccttctggc gttcctcaag atcaacataa gttgtttttt gctgaaactg taaatttctt 1500
 aaaatctcgt tacggagaac agaactgcat aagtgcctgat gtacattacg atgaaacaac 1560
 tccgcatcta catttcactt ttattcctgt agtttttgac gaaaaaaaaac aaagggaaaa 1620
 agtctctcgc aaagagcttt ttacgcttaa ggagctttac tccttccatg aagatctcga 1680
 aaagcacctg caagaaaagc ttggaaaaaa cataaaaatt cgtaccggtg aaacagaaaa 1740
 aaatatttct gtaaggggat taaaacaaaa aaccgcacag aattgcgtag aaatcgtcga 1800
 gaatgcgaag caggaggcag agagtatctt gagtaaggca aacgaagaga aacgcaatat 1860
 agagcaattt tttcgattg agagcgtatg agcaaaaaaa tacaattat caaacagga 1920
 atacgacaaa gctgcagagc tggacttcaa agctgtaaac ggtcaactaa agcttccgtg 1980
 ggttctctgc cctaagaagc ttgtatcaaa gctagtgaga gggtagcccc acttacaggc 2040
 agtagaggag acaacgaaag caatcggaga aaaagccaaa gaactaaaaa gcaactacta 2100
 tgacatggtg cagttggagg ataccctagc gagaaaaacac caggagaacg aacgagcctg 2160
 ggcacttgtg aaggagctgg aaaagaagct ggaaaaatac gaaccaagg agctcaaca 2220
 gcaagaaaaa agcaaaaaac gtggattttc ccgataacca aagggggggg aaaggggggt 2280
 tttagcccc tttattaac cttgagaagc acctgcgtgc aggggcttct cgctttatta 2340
 atcaaaaaag ttgctaaaat aggcaactga agttgcccta tacgtcaact tttcaaaaaa 2400
 gttgccaaaa agggaactgg agttgcctat acgtcaactt ttca 2444

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

atctctactg gcgtctat

18

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

caaawaggga actggag

17

<210> 4

13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4
 gcttccttct ggcgttcc 18

<210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5
 cccaggctcg ttcgttct 18

<210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6
 aagcagacat cgcaraag 18

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7
 actcttcgtc ctctacca 18

【 0 0 3 2 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列番号 2 : 合成DNA
 配列番号 3 : 合成DNA
 配列番号 4 : 合成DNA

配列番号 5 : 合成DNA

配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 本発明のプラスミドの制限酵素地図である。

【 図 1 】

