

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

**特開2000 - 50868**

( P 2 0 0 0 - 5 0 8 6 8 A )

(43)公開日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup>	(参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A 4B024
//(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:01 )				

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全7頁)

(21)出願番号	特願平10 - 224366	(71)出願人	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
(22)出願日	平成10年8月7日(1998.8.7)	(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)
		Fターム(参考)	4B024 AA20 DA06 EA04 FA15

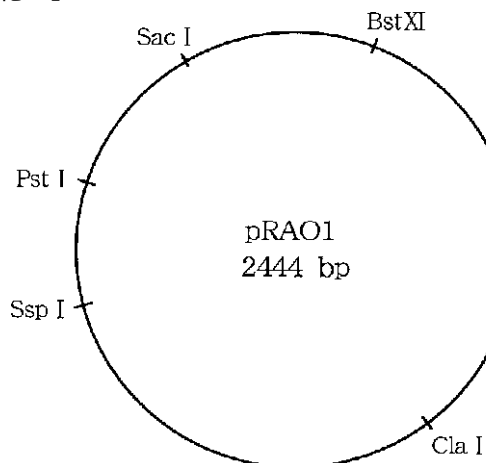
(54)【発明の名称】 プラスミド

(57)【要約】

【課題】 ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドの提供。

【解決手段】 下記の制限酵素地図を有し、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。

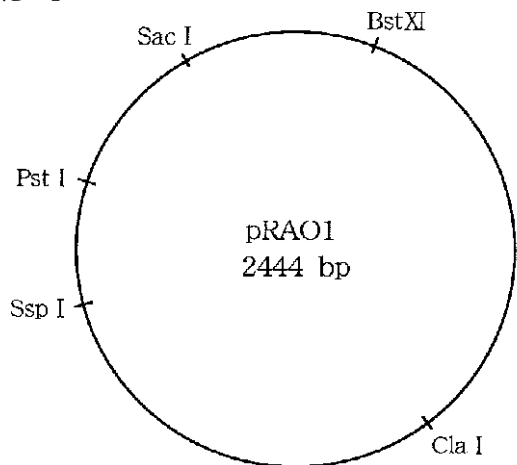
【化1】



【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、ルミノバクテ

【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、かつ自己複製をすることができるDNA

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1】

【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。

【 0 0 0 2】

【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。

【 0 0 0 3】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。

【 0 0 0 4】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ルーメン微

10

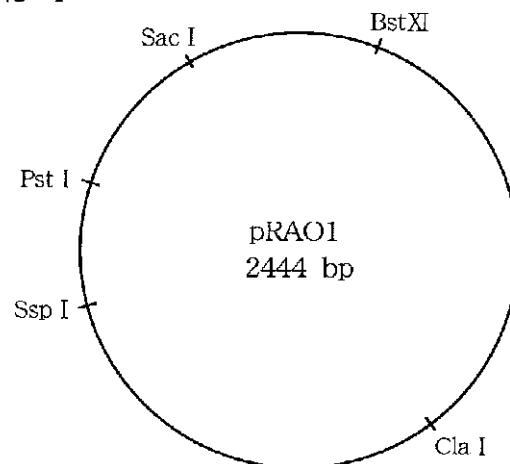
生物内で増殖できるプラスミドを提供することを目的とする。

【 0 0 0 5】

【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テ

【 0 0 0 6】

【化 2】



20

【 0 0 0 7】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、ルミノバクテ

40

【 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テ

50

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。

【0010】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。

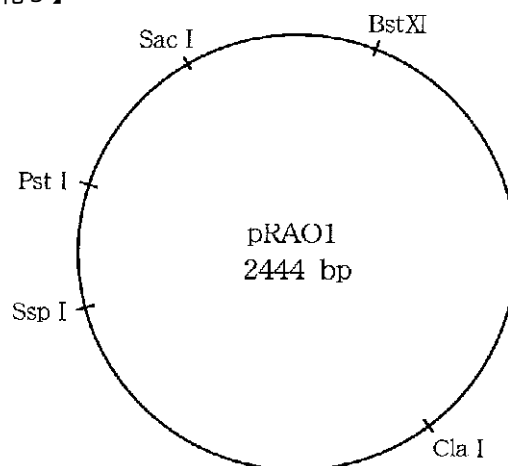
【0011】得られた全DNAを適当な制限酵素(例えばHindIII, ScaI)で消化して部分断片とし、これをpBluescriptなどのベクターに挿入した後大腸菌を形質転換させる。アンピシリン耐性、白コロニーとなったものを選択し、これにより各々プラスミドDNAを分離して遺伝子ライブラリーとする。適当なプライマー、例えばM13M4プライマー及びM13リバースプライマー(いずれもTakara社)を用いて上記ライブラリーを鋳型としてPCRを行う。得られた増幅断片をアガロースゲルで電気泳動後、メンブレンにブロットングし、サザンハイブリダイゼーションを行う。なお、サザンハイブリダイゼーションはBoehringer Mannheim社のマニュアルに従って行うことができる。

【0012】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。

【0013】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とストリンジェ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。ストリンジェントな条件とは、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ClaI, BstXI, SacI, PstI及びSspIを有している。

【0014】

【化3】



【0015】なお、各制限酵素部位間の距離は、BstXI-ClaI間では888bp、SspI-ClaI間では765bp、PstI-SspI間では192bp、SacI-PstI間では278bp、SacI-BstXI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。

【0016】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HindIII-PstI-HindIII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pRAO1を得ることができる。

【0017】

【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。

【0018】〔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・クロロホルムにより、DNAの抽出を

行った後、エタノール沈殿した。

【0019】30 $\mu$ l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。

【0020】〔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サイクル行った。

【0021】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 (BoehringerMannheim)で標識したものをを用いた。

【0022】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)をマニュアルに従って反応させ、ABI社の373Sシーケンサーにかけて解析することとした。

【0023】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。

【0024】HM01 : ATCTCTACTGGCGTCTAT (配列番号2)

HM02 : CAAAWAGGGAAGTGGAG (配列番号3)

HM03 : GCTTCCTCTCGGCGTTCC (配列番号4)

HM04 : CCCAGGCTCGTTCGTCT (配列番号5)

【0025】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

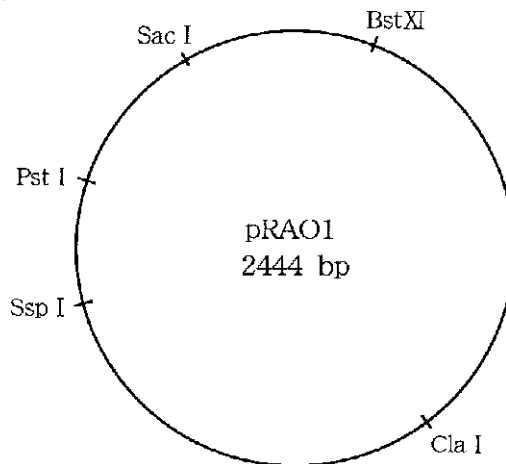
を行った。PCRは、TaKaRa EX Taqキット(Takara社)を使用し、94 で30秒、50 で30秒及び72 で40秒を1サイクルとして30サイクル行った。

【0026】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 (ACTCTTCGTCCTCTACCA (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)。

【0027】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。

【0028】

【化4】



30

40

【0029】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)。

【0030】

【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。

【0031】

【配列表】

<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 tcctttatft 60
accaattatg ttggtataaa acaccacaaa catggtatta tgcacggagt cggaagttgg 120
tgagattacc aactgaagtt ggtgagatta ccaactgaag ttggtgagat taccaactga 180
agttggtgag attaccaact ttcaaggtt aagaatgtag gaatttcaag ggtttgcacg 240
gatctctctt ctaattctat atatctgatt atttttttt ggtacttttt tatgaaaaac 300
gatgaaaaat taaacaaaat taaacagctt caaaaaaca ccgtggaaga aatcgtagag 360
ggcattaatt ccattggcga aatggatatt tctgtaaacg tgcgaagaca aagaataaaa 420
ccagatcagg aatttatttt ttactttctt acaaacatgg attccctgat tagcgatcct 480
gatattacta aacaggatat tgctgttctc atgaaatagc ctgcaaaaaat gcaatcggc 540
aatcagatft ccatagctca agcagacatc gcagaagatc ttggaatcga caaatcgaat 600
gtttccaaat cagttagaac acttacgcag aaaggcgttt ttcttaaaga gagaagaagt 660
ctcgttatga attggaagta ccttgccaaa ggtaacttaa cggatttcat caaagcagac 720
aaagaaaaca gcaactttc aaaatttcaa ttggtagagg acgaagagta atggattgga 780
gtaaacaaga acttgaaaa atcgaagctg taatgaagca tctcaatgag attatcagcg 840
tcacaacagg cacttctgta aagctcgatg cggaaaagga gcagggtcag ttttttccg 900
aaagcggaag aatgtacaag acgatftcag tgcctggaga tagtccatta gctgttgcca 960
aagacgtact caagcagatc gattaataag cgagaagccc ctgctgttga ggtgcttctc 1020
aagatcaata aaggggggct aaaaccccc ttaccctccc tcctggggga ggggcacgta 1080
ccatcttttt cagctactga tgaaaaatg gtgtaacgtg ctctacacc atttttcaat 1140
tgtgctttaa aaatgccttc ttttgcggtt accatftttc ctctaccaa cttttgttg 1200
caaggagaaa aaaatggcac atgtaacgca ttatcacagg ggaagcgtgg cagaaattgt 1260
gcaccacaat tcacgaacag aaaattattc aaacagggat atagacgcca gtagaagtaa 1320
gtacaattac agcctttcgg ggcacgagaa tgatftttcg tattacacgc aaaggctctc 1380
ggaagtacac tgcataaagc gtgcaaacgt ttgtacgctt tctagttggg tctgtacgct 1440
tccttctggc gttcctcaag atcaacataa gttgtttttt gctgaaactg taaatttct 1500
aaaatctcgt tacggagaac agaactgcat aagtgctgat gtacattacg atgaaacaac 1560
tccgatccta catftcactt ttattcctgt agtttttgac gaaaaaaaac aaagggaaaa 1620
agtctctcgc aaagagctft ttacgcttaa ggagctttac tccttccatg aagatctcga 1680
```

9

10

aaagcacctg caagaaaagc ttggaaaaa cataaaaatt cgtaccggta aaacagaaaa 1740  
 aaatatttct gtaagggat taaaacaaaa aaccgcacag aattgcgtag aaatcgtcga 1800  
 gaatgcgaag caggaggcag agagtatctt gagtaaggca aacgaagaga aacgcaatat 1860  
 agagcaatit tttgcgattg agagcgtatg agcaaaaaa tacaattat caaacagga 1920  
 atacgacaaa gctgcagagc tggacttcaa agctgtaaac ggtcaactaa agcttccgtg 1980  
 ggttcctgtc cctaagaagc ttgtatcaa gctagtgaga ggttacgccc acttacaggc 2040  
 agtagaggag acaacgaaag caatcggaga aaaagccaaa gaactaaaa gcaactacta 2100  
 tgacatgggtg cagttggagg ataccctagc gagaaaacac caggagaacg aacgagcctg 2160  
 ggcacttgtg aaggagctgg aaaagaagct ggaaaaatac gaaccaaagg agctcaaca 2220  
 gcaagaaaaa agcaaaaaac gtggattttc ccgataacca aaggggggggt aaaggggggt 2280  
 tttagccccc ttttattaac cttgagaagc acctgcgtgc aggggcttct cgctttatta 2340  
 atcaaaaaag ttgctaaaat aggcaactga agttgcccta tacgtcaact ttcaaaaaa 2400  
 gttgcaaaaa agggaactgg agttgcctat acgtcaactt ttca 2444

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

atctctactg gcgcttat 18

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 3

caaawaggga actggag 17

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

gcttccttct ggcgttcc 18

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

cccaggtctg 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

30 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 】

