

(19)日本国特許庁(J P)

(12)特 許 公 報 (B 1)

(11)特許番号

第2992635号

(45)発行日 平成11年(1999)12月20日

(24)登録日 平成11年(1999)10月22日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I		
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
//(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:46)				

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平10 - 347133

(22)出願日 平成10年(1998)12月 7 日

審査請求日 平成10年(1998)12月 7 日

微生物の受託番号 F E R M P - 1 7 0 1 0

微生物の受託番号 F E R M P - 1 7 0 1 1

(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 中村 睦

茨城県牛久市上柏田 3 - 52 - 1 C - 20
2

(72)発明者 日野 常男

神奈川県相模原市鶴野森 1 - 28 - 24 F
5 - 204

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

審査官 本間 夏子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プラスミド

1

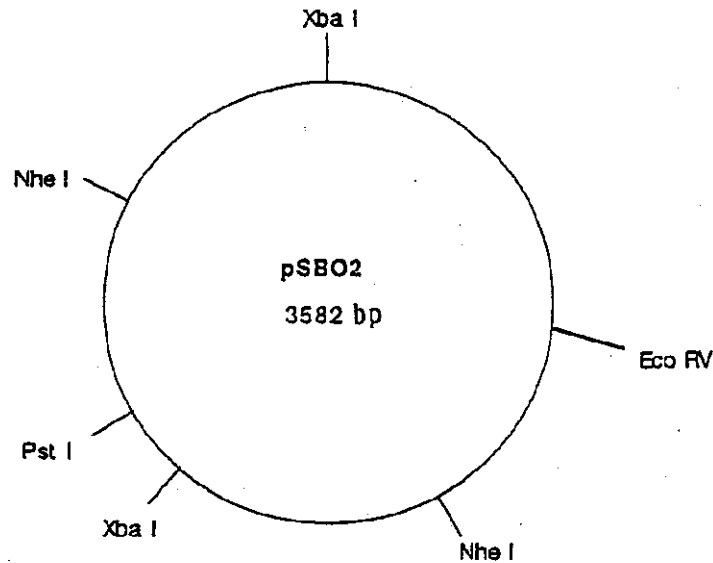
(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の制限酵素地図を有する 3 5 8 2 b p のプラスミドであって、ストレプトコッカス・ポビス

2

由来の自己複製配列を含むプラスミド。

【化 1】



【請求項 2】 以下の (a) 又は (b) の DNA を含むプラスミド。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 で表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】

【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】

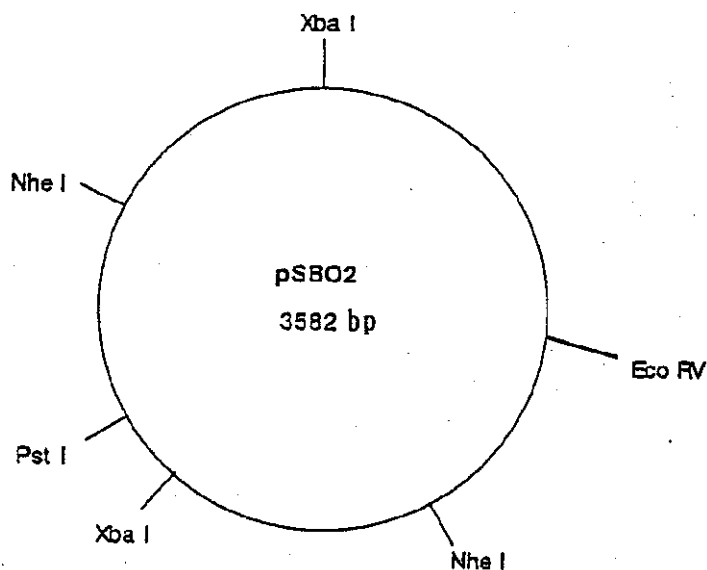
【発明が解決しようとする課題】本発明は、ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドを提供することを目的とする。

【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、ルーメン内で多種類の可溶性糖類やデンプン、ペクチン、タンパク質などを分解する細菌、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*) 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 3582bp のプラスミドである。

【0006】

【化 2】



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

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号1で表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。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明のプラスミドは、ストレプトコッカス・ボvis (Streptococcus bovis) より分離されたものであり、大腸菌内で複製することができる任意の配列と本発明のプラスミドとを結合させることにより、大腸菌内での自己複製が可能である。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み換えプラスミドを得、該組み換えプラスミドを用いてストレプトコッカス・ボvisを宿主菌として有用物質を産生することが可能となる。本発明のプラスミドは、例えば以下の通り作製される。

【0009】まず、反すう動物(例えばウシ、ヒツジ、ヤギ等)のルーメンからストレプトコッカス・ボvisを採取する。採取方法は以下の通りである。すなわち、ルーメン液を希釈し、ストレプトコッカス選択培地(TATAC寒天培地)を用いて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、PCR法により選択された菌の16SrRNA配列を決定する。この決定された配列と、データベースに登録されているストレプトコッカス・ボvisの16SrRNA配列(GenBankアクセスNo. X58317)とを比較し、両者の配列間において近似する配列を有する場合は、採取した菌がストレプトコッカス・ボvisであると判断(確認)する。本発明においては、市販のストレプトコッカス・ボvis菌株を入手してもよい。

【0010】次に、得られたストレプトコッカス・ボvis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 調整法(「新しい遺伝子操作技術の基礎」、大田美智男、菜根出版 pp23-25, 1989年)により得ることができる。得られた全DNAをアガロースで電気泳動後、プラスミドのバンドを切り出して得る。このストレプトコッカス・ボvisのプラスミドを、適当な制限酵素(例えばXbaI、NheI)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。

【0011】得られた増幅断片をアガロースで電気泳動後、メンブレンにプロットングし、ストレプトコッカス・ボvisのプラスミドをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行う。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。サザンハイブリダイゼーションの結果に基づいて、ストレプトコッカス・ボvisのプラスミド断片を持つ遺伝子ライブラリー中のプラスミドを選択し、その挿入断片の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)]により決定することができるが、通常は、ABI社の自動塩基配列決定装置を用いて分析及び決定される。

【0012】このようにして得られたプラスミドは、3582 bpの長さを有し(配列番号1)、ストレプトコッカス・ボvis由来の自己複製配列を含むものである。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

7

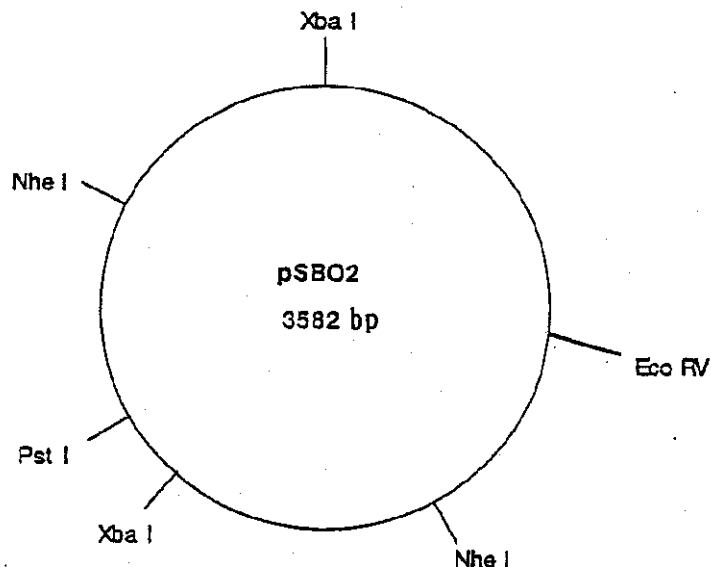
DNAを含むものも本発明のプラスミドに含まれる。ストリンジントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が75~100mM、好ましくは75mMであり、温度が40~42、好ましくは40の条件をいう。また、本発明のプラスミドは、以下に示す通り、制限酵素部位としてEcoRV及

8

びPstIを1カ所、XbaI及びNheIを2カ所有するものである。

【 0 0 1 3 】

【 化 3 】



【 0 0 1 4 】なお、各制限酵素部位間の距離は、EcoRV及びPstIで切断した場合は、長い断片が2176 bp、短い断片が1406bpであり、XbaIで切断した場合は、長い断片が2196bp、短い断片が1386bpであり、NheIで切断した場合は、長い断片が2124bp、短い断片が1458bpである。

【 0 0 1 5 】以上のようにして得られたプラスミドを「pSB02」と命名し、該プラスミドを含む大腸菌（名称：「E.coli pSB2X1」及び「E.coli pSB2X2」）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9月28日付で、E.coli pSB2X1についてはFERM P-17010として、E.coli pSB2X2についてはFERM P-17011としてそれぞれ寄託されている。なお、大腸菌 pSB2X1にはpSB02のうち第2~2198番目までの断片が含まれている（図1において2番から時計回りに2198番まで）。また、大腸菌 pSB2X2にはpSB02のうち、第2199~1番目までの断片が含まれている（図1において2199番から時計回りに1番まで）。従って、pSB2X1に含まれるプラスミド及びpSB2X2に含まれるプラスミドともに制限酵素XbaI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pSB02を得ることができる。

【 0 0 1 6 】

【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。

【実施例1】プラスミドの調製

菌株はストレプトコッカス・ボビスJB1を用いた。菌の培養は、Scott and Dehorty 培地を用い、37で4時間

行った。培養液10mlから遠心分離（5000rpm）によって菌体を回収し、25mg/mlのリゾチームを100μl加えて懸濁した後、37で10分静置した。その後、TESKEDバッファー（200mM Tris-HCl, pH8.0, 20mM EDTA, 2%ドデシル硫酸ナトリウム, 2mg/mlプロテイナーゼk, 25 mMジチオスレイトール）を500μl加えて室温にて10分静置し、溶菌させた。得られた溶菌液に500μlのフェノールを加え、穏やかに攪拌し、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、エタノール沈殿を行った。

【 0 0 1 7 】50μlのTEバッファー（pH8.0）に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（1kbpラダー（BRL）で2.0~4.0kbp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 1 8 】〔実施例2〕制限酵素地図の作製

プラスミド pSB02を制限酵素XbaI及びNheI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、XbaI及びNheI処理したプラスミドDNAを、同じXbaI及びNheI処理しアルカリフォスファターゼ処理したpBluescript SK+（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。

【 0 0 1 9 】形質転換体のプラスミドDNAをテンプレートとして、M13-M4プライマー及びM13リバースプライマー（TakKaRa）を用いてPCRを行った。PCRは、TakKaRa 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 2分の反応を1サイクルとして30サイクル行った。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。

【0020】また、プローブは、ストレプトコッカス・ボビスのプラスミドDNA をDIG HighPrime (Boehringer Mannheim) で標識したものをを用いた。サザンハイブリダイゼーションの結果、シグナルの認められた陽性クローンpSE1X1、pSE1X2及びpSE2N1(NheIで切断した場合の長い断片が含まれる) が得られた。これらの形質転換体のプラスミドをテンプレートとし、プライマーを用いて、Li-COR4000L DNAシーケンサーにかけて塩基配列を解析した。

【0021】プラスミドpSB02の領域内において、pSE2X1、pSE2X2及びpSE2N1のプラスミドでは塩基配列を解析できなかった領域が存在したため、その領域については、pSE2X1、pSE2X2及びpSE2N1より決定した塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて塩基配列の決定を行った。なお、プライマーは、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 (PF11, PF12, PF13) 及び逆向きのプライマー (PR11, PR12) を合計5個設計し、合成した。

【0022】

PF11 : GCGAATTAGACCAAAAAGA (配列番号2)

PF12 : GCTATTACGGCAGTTGTT (配列番号3)

PF13 : GAGTTGAAAAATGTGTC (配列番号4)

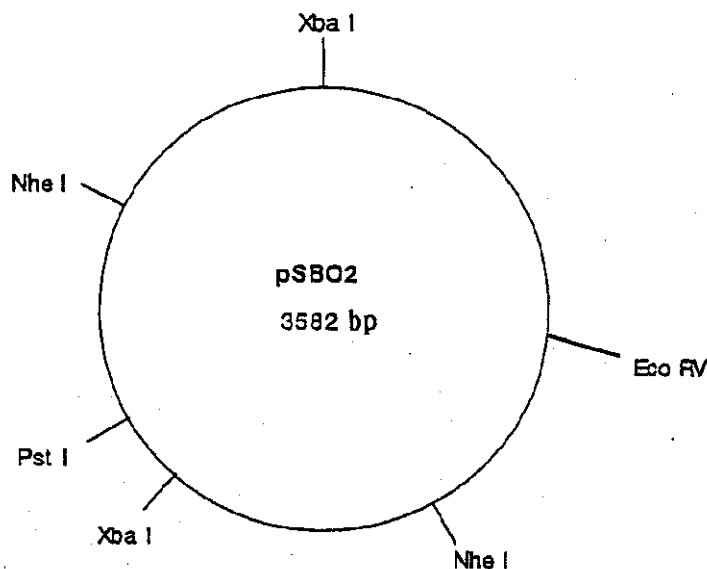
PR11 : TTTTCCCAGTCCAACAA (配列番号5)

PR12 : CAAGTCGCCCAAGCCATT (配列番号6)

【0023】ストレプトコッカス・ボビスのプラスミドDNAをテンプレートとし、上記の合成プライマーを用いてABI社の373Sシーケンサーにかけて解析した。その結果、配列番号1で表される3582 bpの塩基配列が得られた。得られた塩基配列を基にGENETYX-MAC (SDCソフトウェア開発株式会社、日本) を用いて解析し、制限酵素部位の推定を行った。単一の制限酵素部位しかないと考えられた制限酵素EcoRV部位及びSau3AI部位については、プラスミドDNA 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、本発明のプラスミドは以下に示す制限酵素地図を有するものであることがわかった。

【0024】

【化4】



【0025】
【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、ストレプトコッカス・ボビスと大腸菌とのシャトル

40 ベクターとして利用できる点で有用である。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yoshihiro Yamashita
 Director General of National Institute of Animal Industry
 Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

<120> Plasmid

11

12

<130> P98-0531

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3582

<212> DNA

<213> Streptococcus bovis

<400>

tctagatgaa gctggtgcac ctcagtctca ttttaacggt gttcctgttg ctacaggata 60
taaaaaaggc ttggagaaac aaccaagttt tactaaagca ctttatcaag aaggcaatca 120
tacgaaaggt agaggacaat acagagagtt tagaaaagaa gaggttgcta aacttgaaga 180
aaagctaaaa gaattgggtt atgaccgaaa attagttgga actaataata tcaaggatat 240
gcacgaatac aaagaaattg ttggtcaagc taataaagaa ttagacgaaa aactagtttc 300
taagtatggt gctccagaat atatcaacga aacaactggt gaatattatg attgggtgga 360
atatcataat ttttagagt ttccaagcga agaacaagaa ggtcaaattg cgagagaaac 420
aacatacgct gaaaaaatag attgggtcaa acgatattac caacaagatt tgaataaact 480
agaatcgtct cagaagctct cagaagcccg tataagcgaa ttagaccaa agattaagaa 540
aaagtatgag gaggttatcta aaatcgattt taaagcttct aaaggggctt ctagggtgtc 600
tcaattagaa aatgctatag atagtcgttc agatgctctt gcagctgtta aacgagattt 660
taaagcttat caagcgtttt tgaagagagg tgaacagatt gctaataatt ggcaacaaga 720
aattactgga gaattgaaaa aaacagcttt tgggaaagaa tataatcgta tggatccaga 780
agtccttgaa aaagctcgta tgagtaacca ttggtttcaa gttaaacaag atagtttgcg 840
acaagaaatt agacggcttg aaactgactt ggagaatagt aatcgagcac gtttcaagtt 900
gcttgatgaa aacaagaat tgaaggctga aagtaaatgg ttacgtgaag ataataaaaa 960
gctatttgag cgattggata tcacaactaa aaaactcaaa ttatggcgtg ataaaaacag 1020
gaaattgttg cctaaaaaag aatttaaagc tattacggca gttgttaata ctgaaatcat 1080
agaaattatg acaccagtag caaaagttgt aaaagcagtt acgaaaacta tcaaaaaaat 1140
gacgctgtag agcgatttat gccgagaaaa ctctgtcag taagctagac gaatttagac 1200
taaattgac gaggttgtcag gctggaaagc tgacgaccga caaattagga aaaaagcagt 1260
ctaggttact tgctgacaag aggaaattgg aataaagtaa gcgactagcg taggtagat 1320
ttgaaaggt tatagggtca tgatataata accaatgctg aagcaaaacc ttccgcaaat 1380
ctatgcgaaa ggaggtggag cgagtgcat acattttcga cgtcttactt gctatgtgg 1440
cagaagtgac ggcacattac atttgcaagt ggttagatag caaggacaaa cgctgaagct 1500
agcccaacac cgacaaaaaa agcccctagg gaactggcat tccttagggg cttcggtgtg 1560
cttgtgcatc acattttcgc aagctcatta taacatgagt tggaaaaatg tgtcaaaaag 1620
ttggtgctcg gaaggaaaa attagccgcc ctttctaaca ggcggttaag tgtaaaaact 1680
ttttacacc tggcaaaatt tgggtgattt ttcgacgaa aaatctaaaa tctggggggg 1740
ttactacgac ccccatata gtgccgagt ccaaattcga aaaaaagtg ctttgagcct 1800
tagagcccca agggattaag agcggtgaaa tcttggcgac ttttcggcga cttttcggt 1860
actttttgag tttttttga aaaaagtaca ttttaggtt atttaagtaa gcgctagtgg 1920
tacacttita acaaggcgaa acaaaggaga aaaagatggc aacaagaaa aaaagagtac 1980
aggttagttt tactgatgaa cagcataaaa tgttagtgga tttagctaaa caaaaaggtt 2040

13

14

ttctaaatc tgctatcgtt gtattagcgc ttgaagaata ttgaaatct caaaatcaaa 2100
 aatagaagg tcaagaaata taaaaaaga gccacggcaa tggctctaaa atcaagatac 2160
 ttcttgaagg tattatatca aatggcaaaa gaaaaatcta gatattttac gtttttactc 2220
 tatcccgaat caatccctga agattgggag ttaaaacttg aaacgcttgg agtgccgata 2280
 gcggttagtc cgcttcacga taaggacaag agtgatgtag agggacagaa atataaaaaa 2340
 ccgcaactatc atgtgattta cattgctaaa aatccagtta ctgcagatag gtttcgtaag 2400
 aaaattaaat tgctacttgg agagaagagt ttagcaatgg tgcaaatgt tctaaacggt 2460
 gaaaatacat acttgatatt gactcatgaa agcaaagatg ctattgctaa gaaaaagcat 2520
 gtttatgata aagctgatat aaagcttatt aataattttg atattgaccg ttatatgtg 2580
 gttgatgttg aaacaaaaa tcaagttttg aagtcgcttt tacaattat tcgagcttac 2640
 tcaattccta atgttcttga ttacatgat ttatcgagg aaaacggtga agattatggg 2700
 attgatatga atttattttt aagtacgatt gaaagtaagt cgagtatttt acgtctatat 2760
 ttgatgggtg cttaccaacg cagtaagcga ggagaaataa aaaaagccgg agaaaattag 2820
 tccgacaata gcggagcggg cggactgccca ttttttcaa atggcttggg cgacttgatg 2880
 gagtcacca acatgacaaa aatgtccttg tgattcgagg gctttttgt ttgctcgct 2940
 ttttattttg ggcgagctag ctctctgcaa gagtccctcg gaagagcgtt tggttttga 3000
 ttagcggag ctatgtcaa actacccaa cgttactctt tgtcaaagag taacagaaat 3060
 gataaaataa aattgaaatt ttattttatc taggtggaag taatagactt tgcggcttc 3120
 cacttggcga cctttgggag acaaaattat gccagaaatg agtatatcgt tcacaactgg 3180
 aacggggatg acaaaactta ggcataataa ccgagaatg actgagaaaag aatttaatga 3240
 gcctgctcat aagcatatca agcgtgattt aagtcaaaat aatatcgtga taaagcaaga 3300
 aagtctcgac gaagtctatg agcgagaatt tggcgaagct ttaaaaaaat ataatgcaaa 3360
 gcaaaagcga aaagatagaa ttatcacaga ttataaaat catgtttatc acagtaaatc 3420
 tttggatttg caacgagaat ttattgttgg actgggaaaa aaatctgatt gggataatct 3480
 ttctccgaa atgaaacaac aagcgggtga gaaaatcgct gagtatattc aagaatttga 3540
 ggtagacat ccgcaactaa aaatttttaa tgcagtagtt ca 3582

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids pSE2X1, pSE2X2 or pSE2N1.

<400> 2

gcgaattaga ccaaaaga

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids pSE2X1, pSE2X2 or pSE2N1.

<400> 3

gctattacgg cagttggt

18

15

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE2X1, pSE2X2 or pSE2N1.

<400> 4
 gagttggaaa aatgtgtc

16

18

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

<220>
 <223> Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE2X1, pSE2X2 or pSE2N1.

<400> 5
 tttttcccag tccaacaa

18

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

<220>
 <223> Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE2X1, pSE2X2 or pSE2N1.

< 4 0 0 > 6
 c a a g t c g c c c a a g c c a t t

1 8

【 0 0 2 7 】

【配列表フリーテキスト】配列番号 2 : プラスミド p S E 2 X 1、 pSE2X2 又は pSE2N1 の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【 0 0 2 8 】配列番号 3 : プラスミド pSE2X1、 pSE2X2 又は pSE2N1 の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【 0 0 2 9 】配列番号 4 : プラスミド pSE2X1、 pSE2X2 又は pSE2N1 の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【 0 0 3 0 】配列番号 5 : プラスミド pSE2X1、 pSE2X2 又は pSE2N1 の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌク 50

レオチド。

【 0 0 3 1 】配列番号 6 : プラスミド pSE2X1、 pSE2X2 又は pSE2N1 の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【 図面の簡単な説明 】

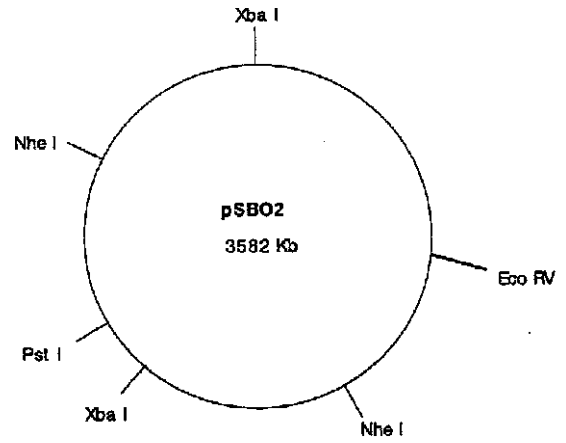
【 図 1 】 本発明のプラスミドを示す図である。

【 要約 】

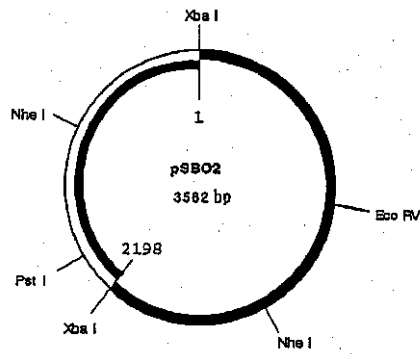
【 課題 】 ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドの提供

【 解決手段 】 下記の制限酵素地図を有し、ストレプトコッカス・ボビス由来の自己複製配列を含むプラスミド。

【化 1】



【 1】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)

C12N 15/70 - 15/78

BIOSIS (DIALOG)

CA (STN)

GenBank / EMBL / DDBJ

REGISTRY (STN)

WPI (DIALOG)