

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 5 日 (05.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/011655 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/65

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009543

(22) 国際出願日: 2003 年 7 月 28 日 (28.07.2003)

(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:
特願2002-218735 2002 年 7 月 26 日 (26.07.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 町田 雅之 (MACHIDA, Masayuki) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 正木 春彦 (MASAKI, Haruhiko) [JP/JP]; 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 東京大学大学院農学生命科学研究科内 Tokyo (JP). 國廣 澄子 (KUNIHIRO, Sumiko) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独

立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 萩原 央子 (HAGIWARA, Hiroko) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MARKER FOR SELECTING TRANSFORMANT WITH THE USE OF LETHAL GENE

(54) 発明の名称: 致死遺伝子を用いた形質転換体選択用マーカー

(57) Abstract: A marker for selecting a transformant which is a DNA fragment having a translation termination codon inserted into the 5' -upstream side of the active site of a lethal gene; and a vector having this marker inserted therein. By using this lethal gene as a gene marker, it is possible to obtain a maker for selecting a transformant whereby a transformant carrying no foreign gene can be completely exterminated and, at the same time, a vector containing the foreign gene can be stably amplified in a host. It is also possible to obtain a marker by which gene analysis using a DNA microarray, etc. can be carried out more accurately and efficiently.

(57) 要約: 致死遺伝子の活性部位の 5' 上流側に、翻訳終止コドン挿入した DNA 断片を得、これを形質転換体選択用マーカーとし、また、該マーカーが挿入されたベクター。この致死遺伝子を遺伝子マーカーとするものであって、外来遺伝子を保持しない形質転換体の完全な死滅を達成するとともに、宿主において外来遺伝子を含むベクターの安定な増幅が図れる形質転換体の選択用マーカーが得られる。また、DNA マイクロアレイなどの遺伝子解析をさらに正確、効率化しうるベクターが得られる。

WO 2004/011655 A1

明細書

致死遺伝子を用いた形質転換体選択用マーカー

技術分野

本発明は、形質転換体の選択用マーカーとして有用なDNA断片、該DNA断片を挿入したベクター、及び該DNA断片からなる形質転換体選択用マーカーに関する。

背景技術

従来、外来遺伝子をベクターに挿入し、これにより宿主を形質転換させて所定の形質転換体を得るに際し、目的とする形質転換体のみを選択するため、種々の遺伝子マーカーを使用している。例えば、 β ガラクトシダーゼ遺伝子をマーカーとする場合には、該遺伝子と外来遺伝子とを接合してベクターに挿入し、これにより宿主を形質転換する。外来遺伝子を保持した形質転換体は、 β ガラクトシダーゼ遺伝子が発現するのに対し、これ以外のものは β ガラクトシダーゼ遺伝子が発現しないので、 β ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を、培地に添加した発色物質の構造変化に基づくコロニーの色の变化として検出することにより、所定の形質転換体を選択するものである（Sanbrook et al. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual -, 2nd ed, 1.85-1.86）。

また、トポイソメラーゼやコリシンE1遺伝子など、致死遺伝子を遺伝子マーカーとして利用する方法も知られている（特開昭57-139095号公報）。この方法は、致死遺伝子の翻訳領域に外来遺伝子が挿入されることによって、該遺伝子の発現が抑制され、外来遺伝子を保持するクローンのみを選択的に生育させるものである。しかし、 β ガラクトシダーゼ遺伝子などを用いた発色による選択では、培地にX-galなどの発色物質を添加する必要があるばかりでなく、挿入断片を保持しない形質転換体も生育することから、

多くの形質転換体を分離するためには広い寒天培地の面積を必要とした。一方、致死遺伝子を用いた場合には、挿入断片を保持しない形質転換体は死滅することから、形質転換体を分離するための培地面積を減少したり、液体培地を用いた選択も可能である。しかし、致死遺伝子の致死性が高すぎる場合には、(1)培養中に高い頻度で致死遺伝子に変異が挿入され、致死性が安定して保持できないこと、(2)ベクターを増幅するためには、致死遺伝子の毒性を調節するために、不活化遺伝子あるいは変異を導入した宿主を用いるなどの必要があった。また、致死遺伝子の致死性が低い場合には、過剰発現によって致死性を発揮させるために、発現活性の高いプロモーターが必要であった。

さらに、プラスミドベクターあるいはファージベクターなどでライブラリーを構築する場合、ライブラリーのクローンの挿入断片の存在確率を向上させるために、過剰量の制限酵素を用いた完全な切断が重要である。一方、過剰量の制限酵素による完全な切断は、制限酵素に混入するエクソヌクレアーゼ活性などの他のヌクレアーゼ活性の混在により、ライブラリーを構成する独立したクローン数の減少や、末端塩基の欠失によってlacZなどの断片の挿入マーカーの擬陽性を引起す。従って、ライブラリーを構成する独立したクローンについて最大数を確保するためには、制限酵素による切断を過剰に行えない場合が多い。このような場合には、挿入断片を保持しないクローンを確実に死滅させることが最も効果的であり、これが達成されれば、クローンの挿入断片の挿入確率を下げることなく、ライブラリーを構成する独立したクローンの数が大きく高品質なライブラリーを作製することが可能になる。

発明の開示

本発明の課題は、致死遺伝子を遺伝子マーカーとするものであって、外来遺伝子を保持しない形質転換体の完全な死滅を達成するとともに、宿主において外来遺伝子を含むベクターの安定な増幅が図れる形質転換体の選択用マーカーを提供しようとするものであり、特に、致死遺伝子に対する各宿主

の耐性の程度に応じて、致死遺伝子の活性を適宜制御するための簡便な手段を提供し、上記従来技術の問題点を解消しようとするものである。

本発明者等は、鋭意研究の結果、致死遺伝子の 5' 上流側に翻訳終止コドン を 1 または複数個挿入して、形質転換体の選択用マーカーとすることにより、上記課題を解決しうることを見だし本発明を完成させるに至ったものである。

すなわち本発明は以下の (1) ~ (12) に関する。

(1) 致死遺伝子の活性部位の 5' 上流に、翻訳終止コドンが挿入されていることを特徴とする DNA 断片。

(2) 両端側に制限酵素切断部位を有することを特徴とする上記 (1) に記載の DNA 断片。

(3) 翻訳終止コドンが 1 個または 2 個以上挿入されていることを特徴とする上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の DNA 断片。

(4) 活性部位がコリシン由来のポリペプチドをコードするものである上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の DNA 断片。

(5) 上記活性部位が配列番号 18 または 19 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するものである (1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA 断片。

(6) 配列番号 14 で示される塩基配列を有する DNA 断片。

(7) 致死遺伝子の活性部位の 3' 下流側に、中和遺伝子を接合したものである上記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の DNA 断片。

(8) 中和遺伝子の塩基配列が配列番号 15 に示されるものである (7) に記載の DNA 断片。

(9) 上記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の DNA 断片からなることを特徴とする形質転換体選択用マーカー。

(10) 形質転換体が大腸菌を形質転換させたものである上記 (9) に記載の形質転換体選択用マーカー。

(11) 上記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の DNA 断片が挿入された組

み換えベクター。

(12)致死遺伝子に対する発現プロモーターを含まないことを特徴とする上記(11)に記載の組み換えベクター。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、形質転換体の選択用マーカーとして使用するDNA断片を構成する致死遺伝子としては、例えば宿主が大腸菌の場合には、コリシンのE1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, Ia, Ib, D, B, A, M, N, K, クロアシンDF13、クレビシンのA1, A2, A3、ピオシンのAP41, S1, S2, S3, S4、barnase、pemK、等が利用できる。また、宿主がエンテロバクターなどの大腸菌以外の腸内細菌群、緑膿菌、バチルス族などについても、上記あるいは上記のホモログが同様の目的で利用される。イミュニティーE3に対応する中和遺伝子としては、各致死遺伝子に対応するインヒビター(コリシン、クロアシン、クレビシン、ピオシンに対しては各イミュニティー遺伝子、barnaseに対してはbarstar遺伝子、pemKに対してはpemI遺伝子)を用いることができる。酵母に対しては、キラートキシンをコードする遺伝子を、乳酸菌などのグラム陽性バクテリアに対しては、50アミノ酸程度の小型のペプチドおよびファージ様のバクテリオシンを用いることができる。キラートキシンに対する中和遺伝子は特定されていないが、乳酸菌のバクテリオシンに対しては、その不活化遺伝子を利用することができる。本発明が適用可能な生物種の範囲については、上記に限られるものではなく、上記以外の微生物、菌類、植物、動物など、致死性遺伝子を利用可能なあらゆる生物種に適用することができる。

本発明においては、これら致死遺伝子の活性部位だけを人工的に取り出して遺伝子サイズを短縮化したものを用い、この活性部位の5'上流側に1個ないし複数個の翻訳終止コドン(TAG、TGA、TAA)を挿入して、形質転換体選択用マーカーとするためのDNA断片を得る。

上記致死遺伝子の致死性活性は、挿入する翻訳終止コドンの数により、調

節する。さらに、宿主の有する終止コドンに対するサプレッサー強度は様々ではあるが、このサプレッサー強度に応じて、翻訳終止コドンの数を調節することにより、各々の宿主に対し最も好適なマーカを調製することができる。例えば、致死遺伝子として極めて強い致死性を有するものを使用する場合においては、挿入する翻訳終止コドンの数を多くし、また、形質転換しようとする宿主のサプレッサー強度も高ければ、さらに翻訳終止コドンの数を増加させる。反対に致死遺伝子の致死活性が高くても、サプレッサー強度が低い宿主を用いる場合においては、挿入する翻訳終止コドンの数を少なくする。すなわち本発明においては、挿入する致死遺伝子の致死活性と宿主のサプレッサー活性強度の両面から挿入する翻訳終止コドンの数を決定する。

また、本発明においては、例えば、コリシン等の極めて高い致死活性を有する致死遺伝子の活性部位を用いる場合においては、翻訳終止コドンに加えて、さらに致死遺伝子に対する中和遺伝子（イミュニティー遺伝子）を保持させたDNA断片を調製して形質転換体選択用マーカとしてもよい。このような致死活性の低減化手段により、致死遺伝子の毒性に対して敏感な大腸菌も宿主として用いることが可能となる。さらにこの中和遺伝子を用いる手段は、致死遺伝子の発現が高いベクターを用いる場合にも有効である。また、致死活性の低減化手段としては、選択マーカとして挿入するDNA断片に対する発現プロモータを用いないという手法も有効であり、この場合には、翻訳の読み枠などのベクターDNAとの機能的な関連を考慮する必要がなく、極めて自由度が高いベクターの設計が可能となる。

本件発明における翻訳終止コドンの挿入は、コリシン等の致死活性の高い遺伝子を用いる場合に特に有利な結果を与える。すなわち、上記したように、このような高い致死活性を有する致死遺伝子を用いると、培養中に致死遺伝子に高い頻度で変異が生じ、宿主の耐性化が生じ、外来遺伝子を保持していない宿主も生育し、選択マーカによる目的とする形質転換体の選択効率は低下する。しかし、本発明の場合、翻訳終止コドンの挿入及びその挿入する数の調節により、致死遺伝子の変異を抑制するとともに、外来遺伝子を保持

しない形質転換体は完全な死滅させるように、致死遺伝子の致死活性を人為的に適度に抑制することが可能となる。また、さらに、もともと致死活性の高い致死遺伝子の活性部位を用いているため、致死遺伝子の発現を増強させるために強力なプロモーターの下流に位置させたり、他のペプチドとの融合化を行う必要もなく、簡便な手段で各宿主毎に最適な、形質転換体の選択マーカーDNAを調製できる。

本発明の選択用マーカーに使用するDNA断片について、コリシンE3遺伝子を使用する場合を例に取り、さらに具体的に説明する。コリシンE3は、大腸菌が産生する抗菌性のポリペプチドであって、バクテリオシンの一種であり、その遺伝子はプラスミド上にある。該プラスミド (plamid ColE3-CA38)の全長遺伝子を配列表の配列番号16に示す。該遺伝子中、331～1986 (終止コドンを含む) 番目の塩基配列がコリシンE3の構造遺伝子部分であり、中和遺伝子 (イミュニティー遺伝子) E3の構造遺伝子部分は、1996～2253番目の塩基配列にあり、また、中和遺伝子E8の構造遺伝子部分は2420～2677番目にある。

このコリシンE3遺伝子に対応するアミノ酸配列を同配列番号17に示す。コリシンE3の活性部位は、配列番号17で示されるアミノ酸配列の442番目のアラニン (配列番号16の1654～1656番目のGCTに対応) ないしは同455番目のリジン (同1693～1695番目AAAに対応) から、同551番目のロイシン (同1981～3番目のCTTに対応) に至る部分であり、本発明においては、このアミノ酸配列部分をコードするDNAをマーカー遺伝子として使用する。配列番号18及び19にそれぞれ上記アラニン、リジンから始まるコリシン活性部位のアミノ酸配列を示す。本発明においては、これらのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するものであれば使用でき、また、該塩基配列においては、核酸の一個または複数個が欠失、置換または付加されたものであっても、宿主に対して致死性活性を有するものであれば使用できる。

翻訳終止コドン (TAG; アンバー終止コドン) は、上記活性部位の5'

上流に設け、さらに、この終止コドンの上流及び活性部位の3'末の終止コドンの下流側に制限酵素切断部位を設ける。また、必要があれば、中和遺伝子（イミュニティー遺伝子）を、3'末側の制限酵素切断部位の下流側に付加する。このコリシンE3に対する中和遺伝子の塩基配列を配列番号15に示すが、該塩基配列においては、核酸の一個または複数個が欠失、置換または付加されたものであっても、使用する致死遺伝子に対して中和活性を有するものであればいずれのものでも使用できる。このように構成された、形質転換体選択用マーカーとして使用するDNA断片の塩基配列を配列番号20に示すが、該配列においては、上記活性部位の5'上流に翻訳終止コドン（TGA）を3個設けており。また、2カ所のSfiI制限酵素切断部位の突出末端の配列が異なるようにしている。

以上は、コリシンE3遺伝子を使用する例について説明したが、本発明の終止コドンを付加する手段は、その原理から見て、上記の例に限定されず広い普遍性を有するものであることは容易に理解されよう。

本発明において、選択マーカーとして使用するDNA断片を調製するには、使用する致死性遺伝子の短縮化および翻訳終止コドンを付加するなどの目的で、該致死性遺伝子が大腸菌などに導入する際には、一般的に該大腸菌内で該致死性遺伝子の中和遺伝子が発現できるようにしておく必要がある。このために、該致死性遺伝子を導入するために用いるベクターに、該中和遺伝子が発現できるように共存させるか、あるいは、該大腸菌に、あらかじめ中和遺伝子が発現できるように構築されたプラスミドなどを導入しておく。好適と思われる数の終止コドンが導入された致死遺伝子を構築した後、該致死遺伝子を保持するDNA断片を制限酵素で切り出し、電気泳動などの適当な手段を用いて該DNA断片を分離回収する。このDNA断片を、最終的にライブラリーの作製などに用いるベクターの対応する制限酵素部位にリガーゼなどで連結させ、増幅に用いる大腸菌に形質転換する。

なお、増幅に用いる大腸菌としては、ライブラリーの構築などの最終的に宿主として用いる大腸菌よりも弱いサプレッサー変異を有するか、あるいは、

該致死遺伝子を中和する遺伝子をあらかじめ保持している必要がある。また、増幅に用いる大腸菌は、最終的に宿主として用いる大腸菌と同じものであっても良いが、その場合には、ベクター上の該致死遺伝子の発現強度が、適当な誘導物質（誘導条件）あるいは抑制物質（抑制条件）などにより、転写レベルなどで制御ができる必要がある。この場合、ベクターを増幅するときには、該致死性遺伝子は、上記の方法によってその発現が抑制されているか、あるいは、最終的にライブラリーの構築などの最終的な目的に用いる時には、上記の方法によってその発現が誘導される。好適な数の終止コドンが導入された該致死性遺伝子は、上記の上記のいずれかの方法によって、安定に増幅することが可能であり、ライブラリーの構築などの最終的な目的に用いる際には、効果的に宿主を致死に至らしめることができる。

本発明のDNA断片を選択マーカーとして使用してベクターを構築するには、(1)通常の、ガラクトシダーゼの、フラグメントなどと同様に、該DNA断片の翻訳開始コドンと活性部位の間あるいは活性部位の中に唯一の制限酵素切断部位を導入してベクターに結合し、外来遺伝子断片をこの挿入部位に導入することによって該選択マーカーを不活化させるか、あるいは(2)ベクターを2ヶ所で切断し、2つの異なる突出末端を生じさせたクローニング部位に本発明のDNA断片をあらかじめ挿入しておき、外来挿入断片をこの部分に置換える形で挿入する方法がある。本発明においてはこれらのいずれの方法も使用できるが、この2種の方法のうち、(1)の方法は、制限酵素の切断部位が1ヶ所で実現されるが、往々にして制限酵素に混入するエクソヌクレアーゼ活性などによって1塩基以上の欠失が生じることがあり、この場合、クローニング部位に外来遺伝子断片が挿入されなくても、翻訳のフレームシフトや活性に必要なアミノ酸残基の欠失によってマーカー遺伝子である致死性遺伝子が不活化されることによって擬陽性が生じ、有効な選択が不可能になる場合がある。一方、(2)の方法では、2ヶ所の制限酵素切断部位が必要であるが、翻訳のフレームシフトによる擬陽性の問題が生じないので、(2)の方法の方が望ましい。

使用するベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド等いずれのものであってもよく特に制限されない。

また、上記2ヶ所の制限酵素切断部位の導入によってベクターを構築する場合においては、切断部位上流からの翻訳の継続性を必要とせず、本発明におけるDNA断片内に致死性遺伝子活性部位の翻訳の開始および終止コドンの両方を設定することができるから、クローニング部位の上流に翻訳開始コドンが必要としない。したがって、クローニング部位の上流に翻訳開始コドンを設けない場合にあっては、クローニングされた挿入断片の発現を極めて低いレベルに抑えることも可能となる。したがって、宿主細胞に毒性が強い外来遺伝子であっても、容易なクローニングが実現可能となる。しかし、クローニング部位に翻訳開始コドンを設けて、外来遺伝子を発現させてももちろんよく、この場合には、外来遺伝子を挿入しないベクターを有する形質転換体は死滅するから外来遺伝子のみを発現させることができる。さらに、所望するDNA断片がベクターに挿入されクローンとして取得された場合には、本発明による致死性遺伝子部位は全て除去されることから、該導入遺伝子と選択マーカーとの生物機能的な干渉がなく、ベクターを設計する際の自由度が高い。また、該遺伝子導入後のベクターの大きさを縮小できることから、形質転換や宿主細胞内での増幅の効率が高い。

一方、2ヶ所の制限酵素切断部位の導入によるデメリットは、挿入断片の量を入れすぎると効率が落ちることである。しかし、これを防ぐために挿入断片量を減少させると、外来遺伝子断片が挿入されずに繋ぎ戻ったベクターを保持するクローンが増えてくる。繋ぎ戻りクローンの数を減少させるためには、アルカリフォスファターゼ処理による脱リン酸化や、ベクターDNA断片を電気泳動によりゲルから回収する必要があるが、これにより繋ぎ戻りクローンの比率は減らせても、一般的にライブラリーを構成する独立したクローンの数が大幅に減少する。一方、本発明においては、ベクターの2ヶ所の制限酵素切断部位の突出末端が各々異なり、さらにこれら制限酵素切断部位に挟まれた断片中に致死遺伝子が位置するようにベクターを構成したこと

により、外来遺伝子断片を該ベクターに挿入する際に生じる繋ぎ戻りクローンは、外来遺伝子断片を含まず、かつ致死性遺伝子の活性部位を含むことになるから、この致死遺伝子の活性部位の発現によって繋ぎ戻りクローンは死滅し、これを特異的に除くことができる。また、このため、外来遺伝子の挿入断片量を少なくして効率的に外来遺伝子が挿入されたクローンの存在確率を向上させることが可能となり、従来のように該クローンの存在確率を向上させるために制限酵素を過剰量使う必要もない。

挿入断片を有する形質転換体を選択する場合には、通常は、形質転換体を寒天培地上に生育させコロニーを形成させることによって実施する。なぜならば、挿入断片の存在を、適当な薬剤を含む寒天培地上でのコロニーの発色の有無などで判定する必要があるからである。しかし、致死性の遺伝子を用いれば、挿入断片を保持しない形質転換体は生育できないことから、寒天培地などの固体上にコロニーを形成させる必要はなく、単に液体培地で培養することにより、生育するか否に基づいて選択すれば良い。従って、寒天培地などの固体上でコロニーを形成させることが不可能な、例えば10万個以上の数の形質転換体から選択する場合であっても、挿入断片を保持するもののみを効率的に濃縮・選別することができる。

外来のDNA断片の宿主細胞への導入は、導入されたDNA断片の塩基配列や該DNA断片の有する生物学な機能を明らかにすることを目的としているが、後者については、単にDNA断片を導入するだけではなく、抗生物質に対する抵抗性などの化学的要因、通常の培養温度よりも高い温度で生育できるなどの物理的要因、あるいはその他の何らかの設定可能な要因に対して、該DNA断片を導入したことによる生物的な効果が判別される必要がある。この場合には、着目する要因における生物の増殖能力を指標として、目的とする生物的機能を有するDNA断片を選別することになるが、多くの場合、寒天培地などの固体培地上において、上記の要因を設定することにより、コロニーを形成させることによって判別し、該コロニーが保持するDNA断片の解析を行う。

しかし、該コロニーを形成させ得るDNA断片の種類が多数存在し、例えば、

数十から数百種類の異なるDNA断片の獲得が期待される場合には、前記のコロニーについて、期待される種類の数以上、通常はその数の10倍から100倍以上の数のコロニーについて、DNAシーケンスなどの方法で解析する必要がある。一方、ゲノム科学的な解析技術が進んだ近年では、多数のDNA断片を一括して解析することが可能であり、例えば、前記コロニーが保持するDNA断片について、その種類を数千種以上の異なる塩基配列を有するDNAマイクロアレイを用いて解析することができる。この場合、解析試料の調製方法については、従来法によれば、以下の2種類の方法が利用される。

第一の方法は、形質転換体よりプラスミドなどの形で挿入DNA断片を含んだ状態で調製し、蛍光標識などの適当な標識を施した後に、該DNAマイクロアレイで解析する。この場合には、DNAマイクロアレイのハイブリダイゼーションに必要な挿入断片以外に、解析に不必要なプラスミドなどのベクターに由来するDNAを多量に含むため、不必要な標識DNA断片が多量に混在することにより、バックグラウンドの上昇を引起し、シグナル・ノイズ比の減少につながる。また、十分な感度を確保するために、多量のDNAの分離精製が必要となる。

第二の方法は、第一の方法の問題点を改善するために、PCRを用いることができる。この場合、挿入断片近傍のベクター由来の塩基配列に基づいて、挿入断片を挟む1組のPCRプライマーを設計し、前記コロニーの集団より抽出したDNAを鋳型として、全ての挿入断片を一括してPCRを行う。PCR反応と平行して、あるいはPCR反応後に、PCR産物であるDNA断片を蛍光などで標識し、DNAマイクロアレイで解析する。この方法によれば、増幅産物に混入するベクター由来のDNA部分は、前記PCRプライマーに必要な部分を最小として、極めて少量に限定することが可能であることから、高いシグナル・ノイズ比を実現することができる。また、この方法によれば、PCRによる増幅が可能であることから、前記コロニーの集団からのDNAの調製は少量でよく、簡便に高い検出感度を実現することができる。しかし、前記PCRでは、挿入断片を保持しないベクターも鋳型として増幅されるが、その増幅断片は、挿入断片

を保持するベクターに由来する増幅断片に比較して、一般的に数分の一以下の長さの短いDNA断片となる。PCRによる増幅では、短いDNA断片は、長いDNA断片に比較して高い効率で増幅されることから、挿入断片を保持しないベクターの存在により、解析の対象とならない短いDNA断片の大量の混入を引起す。また、PCRによる増幅に必要な基質が、挿入断片を有しない無駄な短いDNA断片の増幅に消費されることにより、解析に必要な挿入断片の増幅を著しく妨げることになる。この結果、シグナル・ノイズ比、および検出感度のいずれも損なわれることになる。

本発明によるベクターを用いれば、挿入断片を有しない形質転換体をほぼ完全に除去することができる。従って、従来法による第二の方法における問題点である、シグナル・ノイズ比および検出感度の減少のいずれについても、大幅に改善することができる。また、本発明では選択マーカーは致死性であることから、寒天培地などの固体培地上だけではなく、液体培養の状態でも選択的に濃縮することが可能である。従って、形質転換体の選択について、固体培地上では一般的に不可能である、例えば10万個以上の数の形質転換体を選択することも可能であり、ヒトのような大きなゲノムサイズの生物からのスクリーニングや、低い発現頻度の遺伝子に由来するcDNAのスクリーニングなど、これまで不可能であった多数の遺伝子についての網羅的な解析の実施を実現することができる。

実施例 1

大腸菌コリシンE3プラスミド (pSH350)、(独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市1丁目1番地1 中央第6)宛、平成15年7月25日 FERM BP-8436として寄託)より、配列番号1および配列番号2で示されるプライマーを用いて、コリシンE3のCRD領域(ref.)を含むDNA断片を、配列番号3および配列番号4で示されるプライマーを用いて、コリシンE3のイミュニティー(ref.)を含むDNA断片を、それぞれ、PCRによって増幅した。次に、両断片が融合した断片を鋳型として、配列5および配列6で示されるプライマーを用いてPCRを行い、配列7で示

されるDNA断片を得た。このDNA断片の構造を以下に示す。

[97T シリーズ (598bp)]

```
GCATGCCCCGCTCGCCCGAAAGGTTTTAAAGATTACGGGCATGATTATCATCC
AGCTCCGAAAACTGAGAATATTAAAGGGCTTGGTGATCTTAAGCCTGGGATAC
CAAAAACACCAAAGCAGAATGGTGGTGGAACGCAAGCGCTGGACTGGAGA
TAAAGGGCGTAAGATTTATGAGTGGGATTCTCAGCATGGTGAGCTTGAGGGGT
ATCGTGCCAGTGATGGTCAGCATCTTGGCTCATTTGACCCTAAACAGGCAAT
CAGTTGAAAGGTCCAGATCCGAAACGAAATATCAAGAAATATCTTTGAGGCCA
TAGCCGCCAAGTTATGGGACTTAAATTGGATTAACTTGGTTTGATAAAAGTA
CAGAAGATTTTAAGGGTGAGGAGTATTCAAAAGATTTTGGAGATGACGGTTCA
GTTATGGAAAGTCTAGGTGTGCCTTTTAAGGATAATGTTAATAACGGTTGCTTT
GATGTTATAGCTGAATGGGTACCTTTGCTACAACCATACITTAATCATCAAATT
GATATTTCCGATAATGAGTATTTTGTTCGTTTGATTATCGTGATGGTGATTGG
TGAGAATTCATCG
```

網掛け■；SfiI サイト、■；EcoRI サイト

アンダーライン実線部；Colicin E3 CRD (97a.a.)、点線部；Immunity E3

TGA；終止コドン

次いで、このDNA断片をpGEM T easy vector (プロメガ社)を用いてTAクローニングを行い、シーケンス解析によって正しい塩基配列の挿入断片を有するプラスミドpGEM-97col+immを得た。なお、コリシンE3イミュニティー遺伝子は、コリシンE3のCRD領域をプラスミド上に安定に保持するために用いた。

次に、上記プラスミドを鋳型として、配列番号8と配列番号6で示されるプライマーで増幅した断片を、さらに、配列9から配列13の各々と配列6で示されるプライマーを用いてPCRを行うことにより、コリシンE3のCRD領域の上流直近に1から5個のamber終止コドン(TAG)を有し、下流に前記コリシンE3イミュニティー遺伝子を有するDNA断片を得た。このうち3個のamber終止コドンを挿入したDNA断片(配列番号14)の構造を以下に示す。

〔A 2 - 9 7 T〕

GCATGCGCGCCTCGCGCGTAGTAGTAGAAAGGTTTTAAAGATTACGGGCAT
 GATTATCATCCAGCTCCGAAAACCTGAGAATATTAAAGGGCTTGGTGATCTTAA
 GCCTGGGATACCAAAAACACCAAAGCAGAATGGTGGTGGAAAACGCAAGCGC
 TGGACTGGAGATAAAGGGCGTAAGATTTATGAGTGGGATTCTCAGCATGGTGA
 CCTTGAGGGGTATCGTGCCAGTGATGGTCAGCATCTTGGCTCATTGACCTA
 AAACAGGCAATCAGTTGAAAGGTCCAGATCCGAAACGAAATATCAAGAAATA
 TCTTTGAGCGCAATAGCGCGCAAGTTATGGGACTTAAATTGGATTAACTTGGTT
 TGATAAAAGTACAGAAGATTTTAAAGGGTGAGGAGTATTCAAAAGATTTTGGAG
 ATGACGGTTCAGTTATGGAAAGTCTAGGTGTGCCTTTTAAAGGATAATGTTAAT
 AACGGTTGCTTTGATGTTATAGCTGAATGGGTACCTTTGCTACAACCATACTTT
 AATCATCAAATTGATATTTCCGATAATGAGTATTTGTTTCGTTTGATTATCGT
 GATGGTGAATTGGTGAATTCATCG

網掛け ; SfiI サイト、 ; EcoRI サイト

アンダーライン実線部 ; Colicin E3 CRD (97a.a.)、点線部 ; Immunity E3

TAGTAGTAG ; 挿入した amber 終止コドン部分

TGA ; 終止コドン

この 1～5 個の amber 終止コドンを有する各 DNA 断片を pGEM T easy vector (プロメガ社) を用いて TA クローニングを行い、シーケンス解析によって正しい塩基配列の挿入断片を有する pCI3A1 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 宛、平成 15 年 7 月 24 日 FERM BP-8437 として寄託)、pCI3A2 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 宛、平成 15 年 7 月 24 日 FERM BP-8438 として寄託)、pCI3A3 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 宛、平成 15 年 7 月 24 日 FERM BP-8439 として寄託)、pCI3A4 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 宛、平成 15 年 7 月 24 日 FERM BP-8440 として寄託)、

pCI3A5 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 宛、平成 15 年 7 月 24 日 FERM BP-8441 として寄託) の 5 種類のプラスミドを得た。なお、これらはそれぞれ順に 1、2、3、4、5 個の終止コドン (TAG) を挿入した DNA 断片を有する。

一方、ベクターについては、配列 21 と配列 22 で示される 2 本の合成一本鎖オリゴヌクレオチドをアニールし、生じた二本鎖 DNA 断片を pBluscriptII SK(+) の BamHI と EcoRI との間に挿入して、突出末端の配列が異なる 2 つの SfiI 切断部位 (下線で示した) を導入したプラスミド pBS2SKP-SfiI を構築した。このプラスミドを SfiI で消化した後、前記 1 から 3 個の amber 終止コドンを有する コリシン E3 CRD 遺伝子断片とライゲーションし、エレクトロポレーション法によって大腸菌 XL1-Blue に形質転換した。得られた大腸菌懸濁液を 100 mg/l アンピシリンおよび 0.1% グルコースを含む寒天培地に塗布し、37. で一昼夜培養した結果、amber 終止コドンが 3 個挿入された場合にのみ、寒天培地上に形質転換体を得られた。得られた形質転換体からプラスミド pBS-Sfi-a3col を回収し、XL1-Blue に形質転換した後、大腸菌懸濁液を 100 mg/l アンピシリン + 0.1% グルコースを含む寒天培地、および 100 mg/l アンピシリン + 200 .M IPTG

(isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) を含む寒天培地に塗布し、37. で一昼夜培養したところ、グルコースを含む培地で培養した場合のみ、多数のコロニーの形成が見られ、IPTG を含む培地上には、コロニーの形成が全く見られなかった。

実施例 2

配列 23 および 24 で示された、GAL4DBD および ENOAPL の 2 種類の二本鎖 DNA 断片を作製し、実施例 1 で作製したプラスミド pBS-Sfi-a3col を SfiI で切断した DNA 断片と混合して DNA リガーゼによって連結反応を行い、大腸菌 XL1-Blue 株に形質転換した。得られた形質転換体のクローンを任意に選択し、プラスミドを回収して挿入された DNA 断片を解析したところ、グルコース存

在下では挿入断片を保持していないクローンが10～30%存在していたのに対し、IPTG存在下で生育させた場合には、挿入断片を保持しないクローンは全く検出されなかった。ベクターに挿入されたコリシンE3の改変による致死性遺伝子の発現は、その上流に位置する調節可能なプロモーターにより、グルコース存在下では抑制され、IPTG存在下では誘導される。従って、該致死性遺伝子が発現できる状態にしておくことにより、挿入断片を有しないクローンを完全に排除することができることが示された。なお、本発明による終止コドン挿入されていない場合には、本実施例による転写制御レベルでの調節は不可能であり、グルコースを存在させても、宿主である大腸菌に安定して保持させることはできなかった。この場合には、ベクターDNAを増幅するためには、イミュニティーE3遺伝子を保持させた大腸菌を用いるなどの手間が必要になる。

以上より、配列番号14で示されたSfiI切断によるDNA断片は、外来のDNA断片を高効率でクローニングするための致死性マーカーとして機能しうること、およびこの断片を組込んだプラスミドベクターは、外来DNA断片のクローニング用として利用できることが示された。

表 1

挿入 DNA 断片	GAL4DBD	ENOAPL
IPTG(+)	21 (0)	18 (0)
グルコース(+)	20 (8)	19 (2)

挿入断片を有するあるいは有しないクローンの数

表中の数値は、解析した形質転換体のクローンの中で、挿入断片を保持していたクローンの数を、括弧内は挿入断片を保持していなかったクローンの数を示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、コリシンなどの致死遺伝子を用いて、形質転換の際に、外来挿入遺伝子断片を有するクローンを効率的に選択するための極めて有効な手段を提供できる。特に本発明の形質転換体選択用マーカーは、使用する致死遺伝子の致死活性の程度及び利用する宿主が有するサプレッサー変異の強度に応じて、自由に構築および選択が可能であり、利用する宿主に対して最も効率的な選択マーカーを構築及び選択することが可能となり、致死遺伝子の致死活性が強すぎるための宿主の耐性化に基づく選択性の低下を防止できるとともに、該選択マーカーを含むベクターは宿主中において、安定的に増幅することが可能である。また、イミュニティーなどの致死遺伝子に対する耐性化遺伝子をさらに致死遺伝子の活性部分に付加するか、あるいはこのような耐性化遺伝子を保持するプラスミドをあらかじめ宿主大腸菌に保持させておくことにより、同様に安定的に増幅することが可能である。したがって、本発明は、外来挿入遺伝子のクローニング手段として極めて有用な手段を提供する。

請求の範囲

1. 致死遺伝子の活性部位の 5' 上流側に、翻訳終止コドンが挿入されていることを特徴とする DNA 断片。
2. 両端側に制限酵素切断部位を有することを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の DNA 断片。
3. 翻訳終止コドンが 1 個または 2 個以上挿入されていることを特徴とする請求の範囲第 2 項または第 3 項に記載の DNA 断片。
4. 活性部位がコリシン由来のポリペプチドをコードするものである請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の DNA 断片
5. 上記活性部位が配列番号 18 または 19 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するものである請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれかに記載の DNA 断片。
6. 配列番号 14 で示される塩基配列を有する DNA 断片。
7. 致死遺伝子の活性部位の 3' 下流側に、致死遺伝子に対する中和遺伝子を接合したものである請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれかに記載の DNA 断片。
8. 中和遺伝子の塩基配列が配列番号 15 に示されるものである請求の範囲第 7 項に記載の DNA 断片。
9. 請求の範囲第 1 項～第 8 項のいずれかに記載の DNA 断片からなることを特徴とする形質転換体選択用マーカー。
10. 形質転換体が大腸菌を形質転換させたものである請求の範囲第 9 項に記載の形質転換体選択用マーカー。
11. 請求の範囲第 1 項～第 8 項のいずれかに記載の DNA 断片が挿入された組み換えベクター。
12. 致死遺伝子に対する発現プロモーターを含まないことを特徴とする請求の範囲第 11 項に記載の組み換えベクター。

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Lethal gene markers for transformant selection

<130> -23603055

<140>

<141>

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

gctgatgctg cattgagttc tgctatgg

28

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

gttaaatacca atttaagtcc cataacttgg cgcctatggc ctcaaagata tttcttg 57

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

caagaaatat ctttgaggcc atagcggcca agttatggga cttaaattgg atttaac 57

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

tcatccctga taatatttga tcaccaat

28

<210> 5

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gcatggccgc ctcggccgaa aggtttttaa gattacgggc atg

43

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

cgatgaattc tcaccaatca ccatcacgat aatc

34

<210> 7

<211> 598

<212> DNA

<213> E.coli

<400> 7

gcattggccgc ctccggccgaa aggtttttaa gattacgggc atgattatca tccagctccg 60
aaaactgaga atattaaagg gcttggtgat cttagcctg ggataccaaa aacaccaaag 120
cagaatggtg gtggaaaacg caagcgttg actggagata aaggcgtaa gatttatgag 180
tggtgatttc agcatggtga gcttgagggg tatcgtgcca gtgatggtca gcattttggc 240
tcatttgacc ctaaaacagg caatcagttg aaaggtccag atccgaaacg aaatatcaag 300
aaatatcttt gaggccatag cggccaagtt atgggactta aattggattt aacttggttt 360
gataaaagta cagaagattt taagggtgag gattattcaa aagatttttg agatgacggt 420
tcagttatgg aaagtctagg tgtgcctttt aaggataatg ttaataacgg ttgctttgat 480
gttatagctg aatgggtacc tttgctacaa ccatacttta atcatcaa atgatatttc 540
gataatgagt attttgtttc gtttgattat cgtgatggtg attggtgaga attcatcg 598

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

tagtagtagt agtagaaagg ttttaaagat tacgggcatg 40

<210> 9

<211> 46

<212> DNA

<213> E.coli

<400> 9

gcatggccgc ctcggccgta gaaaggTTTT aaagattacg ggcattg 46

<210> 10

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gcatggccgc ctcggccgta gtagaaaggt tttaaagatt acgggcatg 49

<210> 11

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

gcatggccgc ctcggccgta gtagtagaaa ggttttaag attacgggca tg 52

<210> 12

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

gcatggccgc ctcggccgta gtagtagtag aaaggtttta aagattacgg gcatg 55

<210> 13

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

gcatggccgc ctcggccgta gtagtagtag tagaaagggtt ttaaagatta cgggcatg 58

<210> 14

<211> 607

<212> DNA

<213> E.coli

<400> 14

gcatggccgc ctcggccgta gtagtagaaa ggtttttaaag attacgggca tgattatcat 60
ccagctccga aaactgagaa tattaagggg cttggtgac ttaagcctgg gataccaaaa 120
acaccaaagc agaatggtgg tggaacacgc aagcgtgga ctggagataa agggcgtaag 180
atztatgagt gggattctca gcatggtgag cttgaggggt atcgtgccag tgatggtcag 240
catcttggct catttgaccc taaaacaggc aatcagttga aaggtccaga tccgaaacga 300
aatatcaaga aatatctttg aggccatagc ggccaagtta tgggacttaa attggattta 360
acttggtttg ataaaagtac agaagatttt aagggtgagg agtattcaaa agattttgga 420
gatgacggtt cagttatgga aagtctaggt gtgcctttta aggataatgt taataacggt 480
tgctttgatg ttatagctga atgggtacct ttgctacaac catactttta tcatcaaatt 540

gatatttccg ataatgagta ttttgtttcg ttgattatc gtgatggtga ttggtgagaa 600
ttcatcg 607

<210> 15

<211> 258

<212> DNA

<213> E.coli

<400> 15

atgggactta aattggatth aacttggtth gataaaagta cagaagatth taagggtgag 60
gagtattcaa aagatthttgg agatgacggt tcagttatgg aaagtctagg tgtgccttht 120
aaggataatg ttaataacgg ttgctthtgat gttatagctg aatgggtacc ttgctacaa 180
ccatactthta atcatcaaat tgatatttcc gataatgagt atthttgtthc gtttgattat 240
cgtgatggtg attggtga 258

<210> 16

<211> 3066

<212> DNA

<213> E.coli

<400> 16

aactcggtth taatcagacc tggcatgagt ggaagcggga cgaacagcac aggcaacaac 60
aacgcgcgcc cgggcacttc cggggcatga gtatgtgata tccggggctg caccgccgac 120
cccgccaaca catcacgggc cacaaaatth tttgtggccc gctctgcgtt ttctaagtgt 180
tatccctcct gatttctaaa aaatthttcca cctgaacttg acagaaaaaa cgatgacgag 240

tactttttga tctgtacata aaccagtggt ttttatgtac agtattaatc gtgtaatcaa 300
ttgttttaac gcttaaaaga gggaattttt atgagcgggtg gcgatggacg cggccataac 360
acgggcgcgc atagcacaag tggtaacatt aatggtggcc cgaccgggct tgggttaggt 420
ggtggtgctt ctgatggctc cggatggagt tcggaaaata acccgtgggg tgggtggttcc 480
ggtagcggca ttcactgggg tgggtggttcc ggtcatggtg atggcggggg gaatggtaat 540
tccggtggtg gttcgggaac aggcggtaat ctgtcagcag tagctgcgcc agtggcattt 600
ggttttccgg cactttccac tccaggagct ggcggtcttg cggtcagtat ttcagcggga 660
gcattatcgg cagctattgc tgatattatg gctgccctga aaggaccgtt taaatttggt 720
ctttgggggg tggttttata tgggtgtattg ccatcacaaa tagcgaaaga tgacccaat 780
atgatgtcaa agattgtgac gtcattaccg gcagatgata ttactgaatc acctgtcagt 840
tcattacctc tcgataaggc aacagtaaag gtaaagtgtc gtgttggtga tgatgtaaaa 900
gacgagcgac agaataattc ggttggttca ggtgttccga tgagtgttcc ggtggttgat 960
gcaaaacctc ccgaacgtcc ggggtgtttt acggcatcaa ttccagggtc acctgttctg 1020
aatatttcag ttaataacag tacgccagca gtacagacat taagcccagg tgttaciaat 1080
aatactgata aggatgttcg cccggcagga tttactcagg gtggttaatac cagggatgca 1140
gttattcgat tcccgaagga cagcggctcat aatgccgtat atgtttcagt gagtgatgtt 1200
cttagccctg accaggtaaa acaacgtcaa gatgaagaaa atcgccgtca gcaggatgg 1260
gatgctacgc atccggttga agcggctgag cgaaattatg aacgcgcgcg tgcagagctg 1320
aatcaggcaa atgaagatgt tgccagaaat caggagcgac aggctaaagc tgttcagggtt 1380
tataattcgc gtaaaagcga acttgatgca gcaataaaaa ctcttgctga tgcaatagct 1440
gaaataaaac aatttaatcg atttgeccat gaccaatgg ctggcgggtc cagaatgtgg 1500
caaatggccg ggcttaaagc ccagcgggcg cagacggatg taaataataa gcaggctgca 1560
tttgatgctg ctgcaaaaga gaagtcagat gctgatgctg cattgagttc tgctatggaa 1620
agcaggaaga agaaagaaga taagaaaagg agtgctgaaa ataattttaa cgatgaaaag 1680
aataagccca gaaaagggtt taaagattac gggcatgatt atcatccagc tccgaaaact 1740
gagaatatta aagggtcttg tgatcttaag cctgggatac caaaaacacc aaagcagaat 1800
ggtggtggaa aacgcaagcg ctggactgga gataaagggc gtaagattta tgagtgggat 1860

tctcagcatg gtgagcttga ggggtatcgt gccagtgatg gtcagcatct tggctcattt 1920
gaccctaaaa caggcaatca gttgaaaggt ccagatccga aacgaaatat caagaaatat 1980
ctttgagagg aagttatggg acttaaattg gatttaactt ggtttgataa aagtacagaa 2040
gattttaagg gtgaggagta ttcaaaagat tttggagatg acggttcagt tatggaaagt 2100
ctaggtgtgc cttttaagga taatgttaat aacggttgct ttgatgttat agctgaatgg 2160
gtacctttgc tacaaccata ctttaatcat caaattgata tttccgataa tgagtatttt 2220
gttttcgtttg attatcgtga tgggtgattgg tgatcaaata ttatcaggga tgagttgata 2280
tacgggcttc tagtgttcat ggatgaacgc tggagcctcc aaatgtagaa atgttatatt 2340
ttttattgag ttcttggtta taattgctcc gcaatgattt aaataagcat tatttaaaac 2400
attctcagga gaggtgaagg tggagctaaa aaaaagtatt ggtgattaca ctgaaaccga 2460
attcaaaaaa tttattgaag acatcatcaa ttgtgaaggt gatgaaaaaa aacaggatga 2520
taacctcgag tattttataa atgttactga gcacccatgt ggttctgac tgatttatta 2580
cccagaaggt aataatgatg gtagccctga aggtgttatt aaagagatta aagaatggcg 2640
agccgctaac ggtaagtcag gatttaaaca gggctgaaat atgaatgccg gttgtttatg 2700
gatgaatggc tggcattctt tcacaacaag gagtcgttat gaaaaaata acagggatta 2760
ttttattgct tcttgcagtc attattctgt ctgcatgtca ggcaactat atccgggatg 2820
ttcagggegg gaccgtatct ccgtcatcaa cagctgaagt gaccggatta gcaacgcagt 2880
aacccgaaat cctctttgac aaaaacaaag cgtgtcaggc tgattctgat gcgctttttt 2940
tttgaaatgt cacaaaaatt ccatgtggga gatgggatct aaaatcctcg tgcagaactt 3000
tccatccagg gggagaaaaac ttgtcgtttt gagccgttcg gtgttcagaa cgcacgaaac 3060
cgatcg 3066

<210> 17

<211> 551

<212> PRT

<213> E.coli

<400> 17

Met Ser Gly Gly Asp Gly Arg Gly His Asn Thr Gly Ala His Ser Thr

1 5 10 15

Ser Gly Asn Ile Asn Gly Gly Pro Thr Gly Leu Gly Val Gly Gly Gly

20 25 30

Ala Ser Asp Gly Ser Gly Trp Ser Ser Glu Asn Asn Pro Trp Gly Gly

35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Ile His Trp Gly Gly Gly Ser Gly His Gly Asn

50 55 60

Gly Gly Gly Asn Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gly Gly Asn

65 70 75 80

Leu Ser Ala Val Ala Ala Pro Val Ala Phe Gly Phe Pro Ala Leu Ser

85 90 95

Thr Pro Gly Ala Gly Gly Leu Ala Val Ser Ile Ser Ala Gly Ala Leu

100 105 110

Ser Ala Ala Ile Ala Asp Ile Met Ala Ala Leu Lys Gly Pro Phe Lys

115 120 125

Phe Gly Leu Trp Gly Val Ala Leu Tyr Gly Val Leu Pro Ser Gln Ile

130

135

140

Ala Lys Asp Asp Pro Asn Met Met Ser Lys Ile Val Thr Ser Leu Pro

145

150

155

160

Ala Asp Asp Ile Thr Glu Ser Pro Val Ser Ser Leu Pro Leu Asp Lys

165

170

175

Ala Thr Val Asn Val Asn Val Arg Val Val Asp Asp Val Lys Asp Glu

180

185

190

Arg Gln Asn Ile Ser Val Val Ser Gly Val Pro Met Ser Val Pro Val

195

200

205

Val Asp Ala Lys Pro Thr Glu Arg Pro Gly Val Phe Thr Ala Ser Ile

210

215

220

Pro Gly Ala Pro Val Leu Asn Ile Ser Val Asn Asn Ser Thr Pro Ala

225

230

235

240

Val Gln Thr Leu Ser Pro Gly Val Thr Asn Asn Thr Asp Lys Asp Val

245

250

255

Arg Pro Ala Gly Phe Thr Gln Gly Gly Asn Thr Arg Asp Ala Val Ile

260

265

270

Arg Phe Pro Lys Asp Ser Gly His Asn Ala Val Tyr Val Ser Val Ser

275 280 285
Asp Val Leu Ser Pro Asp Gln Val Lys Gln Arg Gln Asp Glu Glu Asn
290 295 300
Arg Arg Gln Gln Glu Trp Asp Ala Thr His Pro Val Glu Ala Ala Glu
305 310 315 320
Arg Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ala Asn Glu Asp
325 330 335
Val Ala Arg Asn Gln Glu Arg Gln Ala Lys Ala Val Gln Val Tyr Asn
340 345 350
Ser Arg Lys Ser Glu Leu Asp Ala Ala Asn Lys Thr Leu Ala Asp Ala
355 360 365
Ile Ala Glu Ile Lys Gln Phe Asn Arg Phe Ala His Asp Pro Met Ala
370 375 380
Gly Gly His Arg Met Trp Gln Met Ala Gly Leu Lys Ala Gln Arg Ala
385 390 395 400
Gln Thr Asp Val Asn Asn Lys Gln Ala Ala Phe Asp Ala Ala Ala Lys
405 410 415
Glu Lys Ser Asp Ala Asp Ala Ala Leu Ser Ser Ala Met Glu Ser Arg

420

425

430

Lys Lys Lys Glu Asp Lys Lys Arg Ser Ala Glu Asn Asn Leu Asn Asp

435

440

445

Glu Lys Asn Lys Pro Arg Lys Gly Phe Lys Asp Tyr Gly His Asp Tyr

450

455

460

His Pro Ala Pro Lys Thr Glu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asp Leu Lys

465

470

475

480

Pro Gly Ile Pro Lys Thr Pro Lys Gln Asn Gly Gly Gly Lys Arg Lys

485

490

495

Arg Trp Thr Gly Asp Lys Gly Arg Lys Ile Tyr Glu Trp Asp Ser Gln

500

505

510

His Gly Glu Leu Glu Gly Tyr Arg Ala Ser Asp Gly Gln His Leu Gly

515

520

525

Ser Phe Asp Pro Lys Thr Gly Asn Gln Leu Lys Gly Pro Asp Pro Lys

530

535

540

Arg Asn Ile Lys Lys Tyr Leu

545

550

<210> 18

<211> 110

<212> PRT

<213> E.coli

<400> 18

Ala Glu Asn Asn Leu Asn Asp Glu Lys Asn Lys Pro Arg Lys Gly Phe

1

5

10

15

Lys Asp Tyr Gly His Asp Tyr His Pro Ala Pro Lys Thr Glu Asn Ile

20

25

30

Lys Gly Leu Gly Asp Leu Lys Pro Gly Ile Pro Lys Thr Pro Lys Gln

35

40

45

Asn Gly Gly Gly Lys Arg Lys Arg Trp Thr Gly Asp Lys Gly Arg Lys

50

55

60

Ile Tyr Glu Trp Asp Ser Gln His Gly Glu Leu Glu Gly Tyr Arg Ala

65

70

75

80

Ser Asp Gly Gln His Leu Gly Ser Phe Asp Pro Lys Thr Gly Asn Gln

85

90

95

Leu Lys Gly Pro Asp Pro Lys Arg Asn Ile Lys Lys Tyr Leu

100

105

110

<210> 19

<211> 97

<212> PRT

<213> E.coli

<400> 19

Lys Gly Phe Lys Asp Tyr Gly His Asp Tyr His Pro Ala Pro Lys Thr
1 5 10 15

Glu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asp Leu Lys Pro Gly Ile Pro Lys Thr
20 25 30

Pro Lys Gln Asn Gly Gly Gly Lys Arg Lys Arg Trp Thr Gly Asp Lys
35 40 45

Gly Arg Lys Ile Tyr Glu Trp Asp Ser Gln His Gly Glu Leu Glu Gly
50 55 60

Tyr Arg Ala Ser Asp Gly Gln His Leu Gly Ser Phe Asp Pro Lys Thr
65 70 75 80

Gly Asn Gln Leu Lys Gly Pro Asp Pro Lys Arg Asn Ile Lys Lys Tyr
85 90 95

Leu

<210> 20

<211> 330

<212> DNA

<213> E.coli

<400> 1

```
ggccgcctcg gccgtagtag tagaaagggtt ttaaagatta cgggcatgat tatcatccag 60
ctccgaaaac tgagaatatt aaagggttg gtgatcttaa gcctgggata ccaaaaacac 120
caaagcagaa tgggtggtgga aaacgcaagc gctggactgg agataaaggg cgtaagattt 180
atgagtggga ttctcagcat ggtgagcttg aggggtatcg tgccagtgat ggtcagcatc 240
ttggctcatt tgaccctaaa acaggcaatc agttgaaagg tccagatccg aaacgaaata 300
tcaagaaata tctttgaggc catagcggcc 330
```

<210> 21

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter

<400> 2

```
gatccccggg taccgaggcc gcctcggccg agctcgaatt cggccggcca tagcgccgc 60
```

<210> 22

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter

<400> 3

aattgcggcc gctatggccg gccgaattcg agctcggccg aggcggcctc ggtaccggg 60

<210> 23

<211> 650

<212> DNA

<213> *S.cerevisiae*

<400> 4

ggccgcctcg gccaggatct ggtggcgaac aagcatgca tatttgccga cttaaaaage 60
tcaagtgetc caaagaaaaa ccgaagtgcg ccaagtgtct gaagaacaac tgggagtgtc 120
gctactctcc caaaaccaa aggtctccgc tgactagggc acatctgaca gaagtggaat 180
caaggctaga aagactggaa cagctatttc tactgatttt tctcgagaa gaccttgaca 240
tgattttgaa aatggattct ttacaggata taaaagcatt gttacagga ttatttgtac 300
aagataatgt gaataaagat gccgtcacag atagattggc ttcagtggag actgatatgc 360
ctctaacatt gagacagcat agaataagtg cgacatcatc atcggaagag agtagtaaca 420
aaggtaaag acagttgact gtatcgattg actcggcagc tcatcatgat aactccacaa 480

ttccgttgga ttttatgccc agggatgctc ttcattggatt tgattggtct gaagaggatg 540
acatgtcgga tggttgccc ttctgaaaa cggaccccaa caataatggg ttctttggcg 600
acggttctct cttatgtatt cttegtgac tgactgagge catagcgccc 650

<210> 24

<211> 535

<212> DNA

<213> A. oryzae

<400> 5

ggcgcctcg gccattacta gtctactagt aactctgtct tategtcatc tcccataggt 60
gagtttggtt gttttgtttc cactgagatc atgacctcct cctaccccac cateccacta 120
tttttgttac ggtagccatg acccctccat ggcaaagaga gaggaggacg aggacgatca 180
ggaaactgtg tctcgccgtc ataccacaat cgtgttatcc tgattgacat cttcttaaata 240
atcgttgtaa ctgttcctga ctctcggtca actgaaattg gatctcccca ccactgcctc 300
taccttgtag tccgtgactg aaccatccga tcattctttt tgggtcgctc gtgaacacaa 360
ccccgctgc tagtctcctt ccaacacga tccagaattg ttttgatttt ccattccctt 420
cgtttatata tgtcgtctct cctcccttct cgtctctttt cttecgctct ccaagttagt 480
cgactgacca attccgcagc tcgtcaaaat gcctatcacc aaggccatag cgccc 535

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/65

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/65

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ESCUYER V. et al., DNA sequence analysis of three missense mutations affecting colicin E3 bactericidal activity., Mol.Microbiol., 1987, Vol.1, No.1, pages 82 to 85	<u>1-8</u> 9-12
A	WO 94/03616 A2 (UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES), 17 February, 1994 (17.02.94), & BE 1006085 A3 & AU 9345530 A & EP 652963 A1 & JP 8-500454 A & DE 69314180 E & US 5910438 A & US 6180407 B1	1-12
A	HENRITH B. et al., Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on variant of phi X174 phage gene E., Gene., 1995, Vol.154, No.1, pages 51 to 54	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 "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 "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 "&" document member of the same patent family
--	--

Date of the actual completion of the international search
28 October, 2003 (28.10.03)

Date of mailing of the international search report
11 November, 2003 (11.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09543

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BERNARD P. et al., Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene., Gene., 1994, Vol.148, No.1, pages 71 to 74	1-12
A	JAMES C. et al., A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system:Improved cloning efficacy., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1992, Vol.89, pages 2056 to 2060	1-12
A	HENRITH B. et al., Use of the lysis gene of bacteriophage phi X174 for the construction of a positive selection vector., Gene., 1986, Vol.42, No.3, pages 345 to 349	1-12
A	OZAKI LS. et al., A novel ColE1::Tn3 plasmid vector that allows direct selection of hybrid clones in E.coli., Gene., 1980, Vol.8, No.3, pages 301 to 304	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/65

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/65

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

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)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

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 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	ESCUYER V. et al. DNA sequence analysis of three missense mutations affecting colicin E3 bactericidal activity. Mol Microbiol. 1987, Vol. 1, No. 1, p. 82-85	<u>1-8</u> 9-12
A	WO 94/03616 A2 (UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES) 1994.02.17 & BE 1006085 A3 & AU 9345530 A & EP 652963 A1 & JP 8-500454 A & DE 69314180 E & US 5910438 A & US 6180407 B1	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「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

「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)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「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

「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「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

「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

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.10.03

国際調査報告の発送日

11.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
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 請求の範囲の番号
A	HENRITH B. et al. Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of phi X174 phage gene E. Gene. 1995, Vol. 154, No. 1, p. 51-54	1-12
A	BERNARD P. et al. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. Gene. 1994, Vol. 148, No. 1, p. 71-74	1-12
A	JAMES C. et al. A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: Improved cloning efficacy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992, Vol. 89, p. 2056-2060	1-12
A	HENRITH B. et al. Use of the lysis gene of bacteriophage phi X174 for the construction of a positive selection vector. Gene. 1986, Vol. 42, No. 3, p. 345-349	1-12
A	OZAKI LS. et al. A novel ColE1::Tn3 plasmid vector that allows direct selection of hybrid clones in E. coli. Gene. 1980, Vol. 8, No. 3, p. 301-304	1-12