

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4108173号
(P4108173)

(45) 発行日 平成20年6月25日(2008.6.25)

(24) 登録日 平成20年4月11日(2008.4.11)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16 A
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10
C 1 2 R 1/01 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A

請求項の数 6 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-72455	(73) 特許権者	592239707
(22) 出願日	平成10年3月20日(1998.3.20)		ニュー・イングランド・バイオレイブズ・
(65) 公開番号	特開平10-286096		インコーポレイテッド
(43) 公開日	平成10年10月27日(1998.10.27)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
審査請求日	平成16年10月1日(2004.10.1)		915、ピバリー、トザー・ロード・32
(31) 優先権主張番号	821619	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成9年3月20日(1997.3.20)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100105393
微生物の受託番号	ATCC 98366		弁理士 伏見 直哉
		(72) 発明者	リチャード・デイ・モーガン
			アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
			949、ミドルトン、ドノバンズ・ウエイ
			・31

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Spe I 制限エンドヌクレアーゼをクローン化及び作製する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Spe I 制限エンドヌクレアーゼをコードする単離DNAであって、アガロースゲル電気泳動による測定で600bpの長さを有し、かつ、ATCC第98366号寄託物中のプラスミドpSpeIR7をNsiIおよびBamHIで切断することにより取得可能である前記単離DNA。

【請求項2】

請求項1に記載の単離DNAを挿入されたベクターを含む組み換えDNAベクター。

【請求項3】

Spe I 制限エンドヌクレアーゼ及びメチラーゼをコードする単離DNAであって、Spe I 制限エンドヌクレアーゼをコードする単離DNAは、アガロースゲル電気泳動による測定で600bpの長さを有し、かつ、ATCC第98366号寄託物中のプラスミドpSpeIR7をNsiIおよびBamHIで切断することにより取得可能であり；および

Spe I メチラーゼをコードする単離DNAは、アガロースゲル電気泳動による測定で1kbpの長さを有し、かつ、ATCC第98366号寄託物中のプラスミドpSYX20SpeIM9をBamHIおよびSalIで切断することにより取得可能である、前記単離DNA。

【請求項4】

請求項3に記載の単離DNAを含むクローニングベクター。

【請求項 5】

請求項 2 または 4 に記載のクローニングベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 6】

S p e I 制限エンドヌクレアーゼを作製する方法であって、請求項 2 または 4 に記載のベクターで形質転換した宿主細胞を前記エンドヌクレアーゼの発現に適した条件下に培養することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、S p e I 制限エンドヌクレアーゼ及び修飾メチラーゼをコードする組み換え D N A、並びに該 D N A から S p e I 制限エンドヌクレアーゼの作製に係わる。

10

【0002】

【従来の技術】

I I 型制限エンドヌクレアーゼは、細菌において天然に生じる一群の酵素である。この制限エンドヌクレアーゼは、他の細菌成分から精製すれば実験室において、D N A 分子を切断して分子クローニング及び遺伝子特性解明のための正確な断片を得るのに用いることができる。

【0003】

制限エンドヌクレアーゼは、D N A 分子中の特定のヌクレオチド配列（「認識配列」）を認識し、これに結合することによって機能する。結合した制限エンドヌクレアーゼは D N A 分子を、認識配列の途中または一端において切断する。異なる制限エンドヌクレアーゼは異なる認識配列への親和性を有する。今日までに調べられた幾百もの細菌種の中から、独自の特異性を具えた制限エンドヌクレアーゼが 1 8 0 余り同定されている。

20

【0004】

細菌には、各種毎に精々少数の制限エンドヌクレアーゼしか有しない傾向が有る。エンドヌクレアーゼは典型的には、当該エンドヌクレアーゼが由来する細菌に従って命名される。即ち、例えば Deinococcus radiophilus 種は、D r a I、D r a I I 及び D r a I I I と命名された三つの異なる I I 型制限エンドヌクレアーゼを合成する。これらの酵素は配列 T T T A A A、P u G G N C C P y 及び C A C N N N G T G をそれぞれ認識及び切断する。他方、大腸菌 R Y 1 3 は、配列 G A A T T C を認識する I I 型制限酵素 E c o R I ただ一つしか合成しない。

30

【0005】

自然界では、制限エンドヌクレアーゼは細菌細胞の繁殖において保護的役割を果たすと考えられる。制限エンドヌクレアーゼによって細菌は、前記酵素が存在しなかったら細菌を破壊し、または細菌に寄生するであろうウイルス及びプラスミドなどの外来 D N A 分子への感染に耐性となり得る。このような耐性は制限エンドヌクレアーゼが、侵襲する外来 D N A 分子を認識配列が出現する度に切断することによって実現される。前記のように行なわれる切断によって、感染遺伝子の多くは機能不能となり、D N A は非特異的ヌクレアーゼによって更に分解されるようになる。

【0006】

細菌保護系の第二の要素に修飾メチラーゼが有る。この酵素は制限エンドヌクレアーゼを補足し、細菌が細菌自体の D N A を外来の感染 D N A から区別して保護することを可能にする手段を提供する。修飾メチラーゼは、対応する制限エンドヌクレアーゼと同じ認識配列を認識してこれに結合するが、D N A を切断する代わりに前記配列内のいずれかのヌクレオチドをメチル基の付加によって化学的に修飾する。メチル化後、認識配列はもはや制限エンドヌクレアーゼによって切断されない。細菌細胞の D N A は、前記細胞が有する修飾メチラーゼの活性に基づき常に修飾されている。従って、内在制限エンドヌクレアーゼの存在には非感受性である。制限エンドヌクレアーゼによる認識及び切断に対して感受性であるのは修飾されていない、従って確実に外来の D N A のみである。

40

【0007】

50

遺伝子工学技術の出現によって今や、遺伝子をクローン化し、それによって該遺伝子がコードするタンパク質及び酵素を通常の精製技術で得られるよりも大量に生産することができる。制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のクローンを単離する上での重要点は、前記クローンが 10^{-3} から 10^{-4} といった低い頻度でしか出現しない場合に「ショットガン」操作によって派生させた複雑な「ライブラリー」即ちクローン集団内で前記クローンを同定する簡単でかつ確実な方法を開発することである。その方法は好ましくは、不要な大部分のクローンを破壊する一方で望ましい稀少クローンを生存させるような選択性を有するべきである。

【0008】

II型制限 - 修飾系はいよいよ頻繁にクローン化されている。最初にクローン化された系では、制限エンドヌクレアーゼクローンを同定または選択する手段としてバクテリオファージ感染が用いられた [その開示が本明細書に参考として含まれる Kosykh 等, Molec. Gen. Genet 178, pp. 717 - 719, 1980 (EcoRIIの場合); Mann 等, Gene 3, pp. 97 - 112, 1978 (HhaIIの場合); Walder 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 78, pp. 1503 - 1507, 1981 (PstIの場合) 参照]。細菌は、該細菌に制限 - 修飾系が存在することによりバクテリオファージへの感染に対して耐性となり得るので、クローン化制限 - 修飾遺伝子を移入した細胞は原則として、ファージに曝露したライブラリーから生存細胞として選択的に単離できる。しかし、この方法には限られた価値しか無いことが判明した。特に、クローン化された制限 - 修飾遺伝子は選択的生存の実現に十分なファージ耐性を必ずしももたらさないことが明らかになった。

【0009】

別のクローニング法では、プラスミド保持性 (plasmid-borne) であることを最初に解明した系を大腸菌クローニングプラスミドに移入する [その開示が本明細書に参考として含まれる Bougueleret 等, Nucl. Acid. Res. 12, pp. 3659 - 3676, 1984 (EcoRVの場合); Gingeras 及び Brooks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, pp. 402 - 406, 1983 (PaeR7の場合); Theriault 及び Roy, Gene 19, pp. 355 - 359, 1982; Blumenthal 等, J. Bacteriol. 164, pp. 501 - 509, 1985 (PvuIIの場合) 参照]。

【0010】

より多くの系のクローニングに用いられている第三の方法では、活性なメチラーゼ遺伝子を選択する [その開示が本明細書に参考として含まれる米国特許第 5, 200, 333 号; 及び Kiss 等, Nucl. Acid. Res. 13, pp. 6403 - 6421, 1985 (BsuRIの場合) を参照されたい]。制限遺伝子と修飾遺伝子とはしばしば近接して連結されているので、これら両遺伝子を同時にクローン化することはしばしば可能である。しかし、上記選択によって常に完全な制限系が得られるとは限らず、メチラーゼ遺伝子しか得られないこともある [その開示が本明細書に参考として含まれる Szomolanyi 等, Gene 10, pp. 219 - 225, 1980 (BspRIの場合); Janulaitis 等, Gene 20, pp. 197 - 204, 1982 (BcnIの場合); Kiss 及び Baldauf, Gene 21, pp. 111 - 119, 1983 (BsuRIの場合); 及び Walder 等, J. Biol. Chem. 258, pp. 1235 - 1241, 1983 (MspIの場合) 参照]。

【0011】

メチラーゼ遺伝子及びエンドヌクレアーゼ遺伝子をクローン化する更に別の方法は、DNA 損傷についての比色アッセイに基づく (米国特許第 5, 492, 823 号を参照されたい)。メチラーゼに関してスクリーニングを行なう場合、プラスミドライブラリーで AP 1 - 200 などの宿主大腸菌株を形質転換する。メチラーゼの発現により、McrA⁺、

10

20

30

40

50

McrBC⁺またはMr^r⁺である大腸菌株においてSOS応答が誘発される。AP1-200株はMcr系及びMr^r系に関して温度感受性であり、大腸菌の損傷誘導性dinD座に融合したlacZ遺伝子を有する。メチラーゼまたはエンドヌクレアーゼ遺伝子をコードする組み換えプラスミドの検出は、lacZ遺伝子の制限(restrictive)温度における誘導に基づく。メチラーゼ遺伝子をコードする形質転換体は、Xgalを含有するLB寒天プレート上で青色のコロニーとして検出される[その開示が本明細書に参考として含まれるPiekarowicz等, Nucleic Acids Res. 19, pp. 1831-1835, 1991; 及びPiekarowicz等, J. Bacteriology 173, pp. 150-155, 1991参照]。同様に、大腸菌株ER1992もdinD1-lacZ融合体を有するが、この菌株はメチル化依存性制限系McrA、McrBC及びMr^rを欠いている。上述のシステム(「エンド-ブルー(endo-blue)」法と呼称)においてエンドヌクレアーゼ遺伝子は、その同種(cognate)メチラーゼの不在下に検出でき、前記不在下ではエンドヌクレアーゼは宿主細胞DNAを損傷し、SOS応答を誘発する。SOS応答を誘発された細胞は、Xgalを補充されたLB寒天プレート上で紺色のコロニーを形成する(その開示が本明細書に参考として含まれるXu等, Nucleic Acids Res. 22, pp. 2399-2403, 1994参照)。

10

【0012】

単純なメチラーゼ選択法は時に、様々な障害に起因してメチラーゼ(及び/またはエンドヌクレアーゼ)クローンをもたらしなないことがある。例えば、その開示が本明細書に参考として含まれるLunnen等, Gene 74(1), pp. 25-32, 1988を参照されたい。制限-修飾遺伝子のクローニングにとっての潜在的障害の一つは、まだ修飾によって保護されていない宿主にエンドヌクレアーゼ遺伝子を導入する試みの中に存在する。メチラーゼ遺伝子とエンドヌクレアーゼ遺伝子とを単一クローンとして一緒に導入する場合、メチラーゼは宿主DNAを、エンドヌクレアーゼが前記DNAを切断する機会を得る前に修飾して保護しなければならない。従って、場合によっては、上記両遺伝子をまずメチラーゼ遺伝子、次いでエンドヌクレアーゼ遺伝子と逐次クローン化することしかできないこともある(米国特許第5,320,957号参照)。

20

【0013】

制限-修飾系のクローニングにとっての障害は、或る種の大腸菌株がシトシンまたはアデニン修飾に対して好ましくない反応を示すという発見中にも認められる。上記大腸菌株は、メチル化されたシトシン(その開示が本明細書に参考として含まれるRaleigh及びWilson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, pp. 9070-9074, 1986参照)またはメチル化されたアデニン(その開示が本明細書に参考として含まれるHeitman及びModel, J. Bact. 196, pp. 3243-3250, 1987; Raleigh, Trimarchi及びRevel, Genetics 122, pp. 279-296, 1989; Waite-Rees等, J. Bacteriology 173, pp. 5207-5219, 1991参照)を含むDNAを破壊する系を有する。このような菌株中へシトシン特異的またはアデニン特異的メチラーゼ遺伝子をクローン化することは当該遺伝子単独でも、また対応するエンドヌクレアーゼ遺伝子と一緒にでも不可能である。この問題を回避するには、上記のような系を欠く突然変異大腸菌株(McrA⁻及びMcrB⁻またはMr^r⁻)を用いなければならない。

30

40

【0014】

第三の潜在的障害は、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子及びメチラーゼ遺伝子の中には由来生物と大腸菌との、プロモーター及びリボソーム結合部位の相違などといった転写機序の相違に起因して大腸菌では発現しないものが有ることである。メチラーゼ選択法では、大腸菌においてメチラーゼが、遺伝子を保持するプラスミドの少なくとも幾分かを完全に保護するのに十分な量で発現されなければならない。

【0015】

50

精製された制限エンドヌクレアーゼと、この酵素ほどではないにせよ修飾メチラーゼとは実験室における遺伝子の特性解明に有用な手段であるので、これらの酵素を大量に合成する菌株を組み換えDNA技術によって得ることが商業的に求められている。上記のような菌株は、精製作業を簡略化し、また商業的有用量での生産の手段を提供するので有用である。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、SpeI制限エンドヌクレアーゼ及び修飾メチラーゼをコードする組み換えDNA、並びにこのような組み換えDNAから作製した酵素を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本発明は、Sphaerotilus属種から取得可能な、SpeI制限エンドヌクレアーゼ及び修飾メチラーゼの遺伝子をコードする組み換えDNAと、この組み換えDNAから前記酵素を作製する関連方法とを提供する。本発明はまた、DNA配列5'ACTAGT3'を認識し、前記認識配列のCの5'側のホスホジエステル結合を切断して5'側に4塩基延長部分を創出する酵素である制限エンドヌクレアーゼSpeIを発現させる形質転換宿主も提供する。本発明により作製したSpeI制限エンドヌクレアーゼは実質的に純粋であり、通常の技術で作製した制限エンドヌクレアーゼ調製物中に通常見出される汚染物質を含まない。

【0018】

SpeI制限エンドヌクレアーゼ遺伝子ではなくSpeIメチラーゼ遺伝子が、メチラーゼ選択と呼称される技術に概ね従って取得された(その開示が本明細書に参考として含まれる米国特許第5,200,333号参照)。しかし、メチラーゼ選択によって得られたクローンのうちで検出可能なSpeI制限エンドヌクレアーゼ活性を発現したものは無かった。メチラーゼクローンを配列決定し、SpeIメチラーゼ遺伝子を他のN6-アデニンメチラーゼとの相同性に基づき同定することが行なわれた。クローンはSpeIメチラーゼ遺伝子の5'側に約3kbのDNAを有した。しかし、クローン化DNAの3'側はメチラーゼ遺伝子の3'末端のごく近傍で終わっていた。メチラーゼクローンが検出可能なSpeIエンドヌクレアーゼ活性を示さなかったので、エンドヌクレアーゼ遺伝子はおそらくメチラーゼ遺伝子の3'側に位置すると推測された。従って、SpeIメチラーゼクローンの3'末端に続くDNAを逆向き(inverse)PCR技術によってSphaerotilus属種から増幅し、配列決定した。

【0019】

SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を、その位置を確定して正に(positively)同定するべく、Sphaerotilus属種から得て高度に精製したSpeI制限エンドヌクレアーゼタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。このアミノ酸配列を、メチラーゼ選択技術によって得られたメチラーゼクローンのDNA配列のアミノ酸翻訳と比較したところ、整合は認められなかった。推定アミノ酸配列がSpeIエンドヌクレアーゼのN末端アミノ酸配列と整合する読み取り枠は、逆向きPCR技術によって得られた、メチラーゼ遺伝子の3'側に位置するDNA配列中に観察された。エンドヌクレアーゼ読み取り枠はメチラーゼ遺伝子に対して収斂する(convergent)向きを有しており、該読み取り枠の直前の位置には制御タンパク質即ちCタンパク質読み取り枠が観察された。次に、SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を増幅し、発現ベクターに連結し、これを、別の相容性ベクターに載せたSpeIメチラーゼで予め修飾した宿主に導入した。その後、エンドヌクレアーゼ遺伝子及びメチラーゼ遺伝子を移入した宿主を増殖させ、誘導し、これを回収してSpeIエンドヌクレアーゼ生産に用いた。

【0020】

SpeI制限-修飾系をクローン化する好ましい方法は、メチラーゼ選択法に従ってメチラーゼ陽性クローンを得ること、SpeIメチラーゼ陽性クローンのDNA配列を決定すること、メチラーゼ遺伝子の3'側に隣接するDNAを逆向きPCR技術で増幅すること

10

20

30

40

50

、及び前記DNAを配列決定することから成る。Sphaerotilus属種由来のSpeIエンドヌクレアーゼタンパク質をほぼ均質に精製し、N末端アミノ酸配列を決定する。DNA配列及びアミノ酸配列データに基づきSpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を同定する。次に、Sphaerotilus属種ゲノムDNAから完全な遺伝子を増幅し、これをpRRS(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)などの発現ベクター中に連結することによってSpeIエンドヌクレアーゼを発現させる。構築物を、pSYX20(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)などといった別の相容性プラスミド上で発現するSpeIメチラーゼ遺伝子の移入によりSpeI部位において予め修飾した宿主に導入する。SpeIエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を移入した宿主を増殖させ、適当な発現条件で誘導し、細胞を回収し、SpeIエンドヌクレアーゼを精製することによってSpeIエンドヌクレアーゼを得る。

10

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明は、SpeI制限エンドヌクレアーゼ及びメチラーゼをコードする組み換えDNA、並びにこのような組み換えDNAから作製した酵素を提供する。

【0022】

Sphaerotilus属種由来のSpeI制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のクローニングは好ましいことが判明した。メチラーゼ選択操作によってメチラーゼクローンを得たが、このクローンはエンドヌクレアーゼ遺伝子をもたらしなかった。メチラーゼ選択を行なうべく、SpeI部位を有する12bpオリゴマーをpUC19のSspI及びHincII部位に挿入してベクターpSspIHincII/SpeIを形成することにより、2個のSpeI部位を有するベクターを創出した。pSspIHincII/SpeIベクター中に、PstIによって部分的に切断したSphaerotilus属種DNAの「ショットガン」ライブラリーを構築した。精製したショットガンプラスミドライブラリーのDNAをSpeIエンドヌクレアーゼで消化し、これを大腸菌に戻して該菌を形質転換した。機能性SpeIメチラーゼ遺伝子を含むクローンは、メチラーゼ修飾によってSpeI消化から保護される。このように、メチラーゼ遺伝子を含むクローンはエンドヌクレアーゼに攻撃されても無傷で生存するので、前記クローンの選択が可能となる。続いて、生存クローンから得たDNAを精製し、SpeIエンドヌクレアーゼによる消化からの保護によって活性メチラーゼ遺伝子の存在を確認した。同等の4kb挿入部分を有する二つのクローンがSpeI消化から保護されたことが判明した。メチラーゼ遺伝子の位置及び向きを確認するべく、上記二つのクローンのうちでpSpeIM1と命名した方に対してDNA配列決定を行なった。DNA配列の推定アミノ酸翻訳から、m⁶A型アデニンメチラーゼと一致する二つのアミノ酸配列モチーフを含む読み取り枠が明らかとなった(その開示が本明細書に参考として含まれるWilson, Methods in Enzymology 216, pp. 259-279, 1992参照)。

20

30

【0023】

メチラーゼ選択によって得られたメチラーゼクローンをSpeIエンドヌクレアーゼ活性について試験したが、検出可能なエンドヌクレアーゼ活性は観察されなかった。SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子がメチラーゼクローン上に存在はしても大腸菌において検出可能なレベルで発現しなかったか、またはメチラーゼクローンがSpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を含まなかったためである。

40

【0024】

SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を、その位置を確定して正に同定するべく、SpeI制限エンドヌクレアーゼのN末端アミノ酸配列を決定し、またメチラーゼ遺伝子の3側に隣接するSphaerotilus属種DNAに関するDNA配列情報を求めた。SpeI制限エンドヌクレアーゼタンパク質のN末端アミノ酸配列を得るために、SpeIタンパク質をほぼ均質に精製するタンパク質精製法を開発した。自動配列決定装置における精製タンパク質の逐次分解によって、最初の28アミノ酸残基を明らかにした。メチラー

50

ゼ遺伝子の3側に位置する Sphaerotilus 属種DNAに関するDNA配列情報は、前記DNAを逆向きPCR技術(その開示が本明細書に参考として含まれるOchman等, Genetics 120, p.621, 1988; Triglia等, Nucl. Acids Res. 16, p.8186, 1988; 並びにSilver及びKeerikatte, J. Cell. Biochem. (Suppl.) 13E, p.306, Abstract No. WH239, 1989参照)で増幅し、増幅産物を配列決定することにより得た。その後、上記DNA配列の6フレームアミノ酸翻訳とSpeIエンドヌクレアーゼタンパク質のN末端アミノ酸配列とを比較することによって、SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を正に同定した。

【0025】

SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子の5末端に隣接する246bpの読み取り枠(ORF)が、今日までに発見された他の幾つかの制限-修飾系の制御(C)遺伝子との広範な相同性を示すことも判明した。即ち、前記ORFはSpeI制御遺伝子であると考えられる。図2に、SpeIメチラーゼ遺伝子、SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子及び推定SpeI制御遺伝子の位置及び向きを示す。

【0026】

SpeIエンドヌクレアーゼをクローン化して発現させるべく、二段階クローニング法を試みた。SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を移入した細菌宿主の安定化のため、最初に宿主のDNAを、エンドヌクレアーゼ遺伝子を含む発現ベクターと相容性である別のベクターに載せたSpeIメチラーゼ遺伝子の導入によりSpeI部位においてメチル化した。そのために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計及び合成してSpeIメチラーゼ遺伝子を増幅し、この遺伝子の発現をpSYX20ベクター(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)中で促進した。メチラーゼ遺伝子は Sphaerotilus 属種DNAから増幅し、増幅産物を適当な制限酵素で切断したものを、同じ制限酵素で予め切断したベクターpSYX20中に連結し、得られた構築物で大腸菌ER2427(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)宿主細胞を形質転換した。個々の形質転換体を採取し、SpeIエンドヌクレアーゼ切断からの保護について分析した。

【0027】

制御遺伝子を伴わないエンドヌクレアーゼをクローン化するべく、合成DNAプライマーを設計してSpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を正確に増幅した。順配向プライマーは次の諸要素、即ちNsiIクローニング部位、lacZタンパク質の翻訳を終了させる、lacZ遺伝子と同枠内に有る終結コドン、強力に認識されるリボソーム結合部位、前記rbsとSpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子のATG開始コドンとの間に位置する7ヌクレオチドスペーサー、及び Sphaerotilus 属種DNAと相補的なハイブリダイゼーションのための配列を有した。3(逆配向)プライマーは、エンドヌクレアーゼ遺伝子のまさに3末端にハイブリダイズしてメチラーゼクローンとの重複を最小限に留めるように設計した。このプライマーにはBamHIによって切断される制限部位を導入し、それによってクローニングを容易にした。 Sphaerotilus 属種ゲノムDNAからエンドヌクレアーゼ遺伝子を増幅した。増幅したDNAをNsiI及びBamHIで切断したものを、PstI及びBamHIで予め切断し、かつゲル精製した発現ベクターpRRS中に連結した。連結反応混合物で、pSYX20に挿入したSpeIメチラーゼ遺伝子を移入した大腸菌ER2427コンピテント細胞を形質転換した。所望の大きさの挿入部分を有するベクターはミニプレップ操作で同定した。得られたクローンを対数期半ば(mid-log phase)まで増殖させ、IPTGで誘導した。その後、細胞を遠心によって回収し、音波処理用緩衝液中に再懸濁させ、音波処理によって溶解させた。抽出物をSpeIエンドヌクレアーゼ活性についてアッセイした。一つのSpeI発現宿主即ちpSpeIR7を増殖させてSpeI制限エンドヌクレアーゼ生産に用いた。SpeIエンドヌクレアーゼは、後述するタンパク質精製法で精製することができる。

【0028】

本明細書に開示した、Spe I制限エンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を好ましくクローン化し、かつ発現させる方法を図1に示す。この方法は次の諸ステップを含む。

【0029】

1. CGYA培地(ATCC #1103)を入れたフラスコ内でSphaerotilus属種(ATCC #13923)を増殖させ、細胞を溶解させ、ゲノムDNAを精製する。

【0030】

2. Sphaerotilus属種DNAのランダムライブラリーを構築する。Spe I部位を有するDNAオリゴマーをpUC19のHinc II及びSsp I部位に導入することにより、2個のSpe I部位を有するベクターpSsp IHinc II/Spe Iを構築する。Sphaerotilus属種DNAをPst Iで部分的に消化し、ベクターpSsp IHinc II/Spe I中に連結する。連結したDNAで大腸菌を形質転換し、形質転換体をプールし、プラスミド集団を精製してライブラリーを得る。

10

【0031】

3. メチル化選択法を用いてSpe Iメチラーゼクローンを選択する。Pst IライブラリーをSpe Iエンドヌクレアーゼで消化する。Spe I制限プラスミドを大腸菌に戻して該菌を形質転換し、それによって切断されなかったクローンを回収する。Spe I消化後も生存するプラスミドがもたらす形質転換体を幾つか個別に増殖させ、前記プラスミドのミニ調製物(mini-preparations)を作製する。プラスミドを、Spe Iエンドヌクレアーゼ消化に対する耐性に関して分析する。二つの同等クローンがSpe I切断から保護されたことが判明する。これらのクローンはいずれも4 kb挿入部分を有する。メチラーゼ陽性クローンをSpe I制限エンドヌクレアーゼ活性についてアッセイするが、活性を検出することはできない。

20

【0032】

4. Spe Iメチラーゼクローンの配列決定：クローンpSpe IM1の4 kb挿入部分のDNAの一部を配列決定する。m⁶A型メチラーゼの保存領域(モチーフI及びIV)と相同のアミノ酸配列を有する、メチオニンから始まる読み取り枠が観察され、これをSpe Iメチラーゼとして同定する。メチラーゼ読み取り枠は3'末端において開き、ベクター中へと続いていた(回収したメチラーゼクローンはSpe Iメチラーゼ遺伝子の最後の4個のアミノ酸コドンに欠くことが後に判明した)。

30

【0033】

5. メチラーゼ遺伝子の3'側に隣接するDNAを、Spe Iメチラーゼ遺伝子内でハイブリダイズするプライマーを用いる逆向きPCR技術で増幅する。逆向きPCR生成物のDNA配列を決定する。

【0034】

6. Sphaerotilus属種からSpe I制限エンドヌクレアーゼタンパク質を、New England Biolabsで開発されたタンパク質精製技術の組み合わせによってほぼ均質に精製する(実施例のステップ6参照)。上記のように精製したエンドヌクレアーゼはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の際にほぼ均質であり、約20 kDaの見掛けの分子量を有する。

40

【0035】

7. 上記エンドヌクレアーゼのアミノ末端アミノ酸配列を、Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Corporation(Foster City, California)470A Protein Sequencerを用いて調べる(その開示が本明細書に参考として含まれるP. A. Waite-Rees, C. J. Keating, L. S. Moran, B. E. Slatko, L. J. Hornstra及びJ. S. Benner, J. Bacteriol. 173, pp. 5207-5219, 1991参照)。

【0036】

50

8. Spe Iメチラーゼ遺伝子に隣接するDNA配列のアミノ酸翻訳をSpe IエンドヌクレアーゼのN末端アミノ酸配列から得られたアミノ酸配列データと比較することによってSpe Iエンドヌクレアーゼ遺伝子を同定する。Spe Iメチラーゼ遺伝子とエンドヌクレアーゼ遺伝子とは互いに対して収斂する向きを有し、その3'末端同士が14アミノ酸残基だけ重複する。エンドヌクレアーゼ遺伝子の5'側に該遺伝子と同じ向きを有する、82アミノ酸から成るペプチドをコードする読み取り枠が位置する。このORFのDNA配列は他の幾つかの制限・修飾系中に見出される制御遺伝子と高度に相同であり、即ち前記ORFはSpe I制御遺伝子と同定される。

【0037】

9. Spe Iエンドヌクレアーゼ遺伝子の過剰発現:

10

A. 全般的考察

制限遺伝子を過剰発現させ得る方法は幾つか存在する。DNA配列及び詳細な切断地図に関する情報を利用することにより、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子を過剰発現させる最良の方法を決定できる。

【0038】

或る過剰発現方法は、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子の制限エンドヌクレアーゼN末端に対応する末端に直接ハイブリダイズするプライマーと、前記遺伝子から幾分下流(3'側)にハイブリダイズするプライマーとを設計し、それによってポリメラーゼ連鎖反応を用いて完全な制限エンドヌクレアーゼ遺伝子を増幅することを含む。得られたDNA断片は、pAII17やpRRSといった発現ベクターの誘導性プロモーター(T7またはPlacUV5)の直ぐ下流に挿入し得る。

20

【0039】

あるいはまた、過剰発現はpAGR3(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)のPtacなどの、大腸菌によって強力に認識されるプロモーターを制限エンドヌクレアーゼ遺伝子の開始点の直前に挿入することによっても実現可能である。前記挿入は、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子の開始点及び終了点の近傍に適当な制限部位を見出すと共にpAGR3のプロモーターの近傍にも対応する制限部位を見出し、pAGR3に制限遺伝子を、Ptacプロモーターと前後に並び合うように導入することによって行ない得る。用い得る他の調節プロモーターに、pUC19及びpBR322誘導体のPlacUV5(その開示が本明細書に参考として含まれるFuller, Gene 19, pp. 43-54, 1982参照)及びIPL(その開示が本明細書に参考として含まれるShimatake及びRosenberg, Nature 254, p. 128, 1981参照)が有る。加えて、強力なりボソーム結合部位(その開示が本明細書に参考として含まれるShine及びDalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, pp. 342-346, 1974参照)を遺伝子の前に配置して発現を促進することも可能である。

30

【0040】

制限エンドヌクレアーゼを過剰発現する安定なクローンを得るために、通常宿主を制限エンドヌクレアーゼ消化から予め保護する。本発明ではこの保護を、別のプラスミドにおいてSpe Iメチラーゼをクローン化することによって行なう。用いるプラスミドは発現ベクターと相容性でなければならない。また、メチラーゼは、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子が発現する制限エンドヌクレアーゼによる消化から宿主のゲノムを保護するレベルで産生されなければならない。

40

【0041】

遺伝子のDNA配列を部位特異的突然変異誘発によって、または遺伝子自体の再合成によって変更し、それによって大腸菌においてより効率的に利用されるコドンを用いることが可能である(その開示が本明細書に参考として含まれるIkemura, J. Mol. Biol. 151, pp. 389-409, 1981参照)。

【0042】

B. 相容性ベクターにおけるSpe Iメチラーゼのクローニング

50

DNAプライマーを設計及び合成してSpeIメチラーゼ遺伝子を増幅する。順配向プライマーは次の諸要素、即ちクローニングを容易にするBamHI部位、テトラサイクリン遺伝子の翻訳を終了させる終結コドン、共通大腸菌リボソーム結合部位、前記rbsとSpeIメチラーゼのATG開始コドンとの間に位置する7ヌクレオチドスペーサー、及びSpeIメチラーゼ遺伝子DNA配列と整合するハイブリダイゼーションのための19ヌクレオチドを有する。逆配向プライマーは、クローニングを容易にするSalI部位、及びSpeIメチラーゼ遺伝子の3'末端部分のDNA配列と整合する19ヌクレオチドを有する。これらのプライマーを用いてメチラーゼ遺伝子をゲノムDNAから増幅し、ベクターpSYX20(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)中へクローン化する。個々のクローンをミニプレップ処理し、所望の大きさの挿入部分を有するプラスミドをメチラーゼ発現に関して検査する。この検査は、pSYX20メチラーゼ構築物を移入した大腸菌細胞に1個のSpeI部位を有するベクターLitmus38(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)を導入し、ミニプレップ処理し、SpeIで消化することによって行なう。検査したクローンはいずれも、プラスミドLitmus38をSpeIによる消化から完全に保護するのに十分なメチラーゼ活性を発現する。pSYX20SpeIM9と命名した単クローンからコンピテント細胞を調製し、これを次のSpeIエンドヌクレアーゼの発現に用いる。

【0043】

C. SpeIエンドヌクレアーゼの発現

DNAプライマーを設計及び合成してSpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を増幅する。順配向プライマーは次の諸要素、即ちNsiIクローニング部位、lacZ遺伝子と同枠内に有る終結コドン、強力な共通大腸菌リボソーム結合部位、前記リボソーム結合部位とSpeIエンドヌクレアーゼのATG開始コドンとの間に位置する7ヌクレオチドスペーサー配列、及びSpeIエンドヌクレアーゼDNA配列と整合するハイブリダイゼーションのための21ヌクレオチドを有する。逆配向(3')プライマーは、クローニングを容易にするBamHI部位、及びSphaerotilus属種DNA由来のエンドヌクレアーゼ遺伝子の3'末端部分と整合するハイブリダイゼーションのための20ヌクレオチドを有する。これらのプライマーを用いてエンドヌクレアーゼ遺伝子をゲノムDNAから増幅する。増幅したDNAをNsiI及びBamHIで切断し、PstI及びBamHIエンドヌクレアーゼで予め切断し、かつゲル精製した発現ベクターpRRS中に連結する。連結反応混合物で、pSYX20SpeIM9を移入した大腸菌ER2427コンピテント細胞を形質転換する。所望の大きさの挿入部分を有するベクターをミニプレップ操作で同定する。同定したクローンを幾つか対数期半ばまで増殖させ、0.5mM IPTGで16時間誘導する。その後、細胞を遠心によって回収し、音波処理用緩衝液中に再懸濁させ、音波処理によって溶解させ、抽出物をSpeIエンドヌクレアーゼ活性についてアッセイする。このようにして見出し、pSpeIR7と命名したSpeI発現宿主を増殖させ、SpeI制限エンドヌクレアーゼ生産に用いる。

【0044】

10. 生産： 過剰発現するSpeI制限エンドヌクレアーゼ遺伝子と、SpeIメチラーゼ遺伝子とを移入した宿主細胞を発酵装置において富裕培地中で増殖させ、適当な抗生物質選択及び誘導を行なうことにより、前記細胞からSpeIエンドヌクレアーゼを得ることができる。上記操作後、細胞を遠心によって回収し、かつ音波処理によって破壊して、SpeI制限エンドヌクレアーゼ活性を有する粗な細胞抽出物を作製する。

【0045】

11. 精製： SpeIエンドヌクレアーゼを含有する粗な細胞抽出物を、アフィニティークロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーといったタンパク質精製技術の組み合わせによって精製する。

【0046】

上述の諸ステップは本発明実施の好ましい形態ではあるが、これらのステップとして説明

10

20

30

40

50

した操作を当業者に公知の技術に従って改変し得ることは、当業者には明らかであろう。

【0047】

【実施例】

本発明の、現在好ましく実施できる具体例を以下の実施例に詳述する。この実施例は説明のためのものであり、該実施例に本発明が、特許請求の範囲各項に記された点以外で限定されるとは看做すべきでないことは理解されよう。

【0048】

Spe I 修飾メチラーゼ遺伝子及び Spe I 制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のクローニング

1. DNA 精製: *Sphaerotilus species* (ATCC # 13923) のゲノム DNA を調製するために、25% スクロース、0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) 5 mL 中で乳鉢と乳棒を用いて細胞壁をすりつぶして、細胞ペースト 28 g を再懸濁させた。25% スクロース、0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) 45 mL をすりつぶした細胞に加え、次に 0.25 M EDTA、pH 8.0 25 mL を加えた。リゾチーム溶液 (0.25 M Tris-HCl (pH 8.0) 中に 10 mg/mL リゾチーム) 24 mL を加え、溶液を 37 で 2 時間インキュベートした。次に、溶菌混合液 (1% Triton-X 100、50 mM Tris、62 mM EDTA、pH 8.0) 48 mL を加え、溶液を再度 37 で 30 分間インキュベートした。平衡化フェノール: クロロホルム (50:50, v/v) 1 容量で該溶液を抽出し、水相を回収し、クロロホルム 1 容量で 2 度抽出した。次に、該水溶液を、10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0 2 L を 4 回交換して透析した。透析液を 37 で 1 時間 RNase (100 µg/mL) で消化した。5 M NaCl 1/10 容量及び 2-プロパノール 0.55 容量を添加して DNA を沈殿させ、ガラス棒上に巻きつけた。DNA を空気乾燥し、濃度約 160 µg/mL になるように TE (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0) 15 mL に溶解し、4 で保存した。

【0049】

2. 選択可能ベクターでの *Sphaerotilus species* DNA のランダムライブラリーの構築
A. 選択可能ベクター pSspIHincII/Spe I の構築:
Spe I 部位を含む 12 個のヌクレオチド DNA オリゴマーを以下の様に合成した。連結を容易にするために 5' C 残基をリン酸化した。

【0050】

Spe I リンカー: 5' -pCCAAGTAGTTGG-3' (配列番号 1)
ベクター pUC19 内の 2 個の部位、SspI (2501) と HincII (429) に、該リンカーを挿入した。

【0051】

(1) 1 個の Spe I 部位を有するベクターの構築: 最終容量 50 µL の 1 × NEB # 2 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、50 mM NaCl、1 mM DTT、25 で pH 7.9) 中で、pUC19 DNA 6 µg を 37 で 2 時間 SspI 25 ユニットで消化した。ウシ腸アルカリホスファターゼ、即ち CLP (NEB # 290) 10 ユニットを加え、反応液を 1 時間インキュベートした。酵素を 78 で 20 分間熱不活化させた。最終容量 30 µL の 1 × リガーゼ緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、1 mM ATP) 中で、T4 DNA リガーゼ (New England Biolabs, Inc.; Beverly, MA) 1200 ユニットを用い、SspI 消化、脱リン酸化ベクター 240 ng (2 µL) を、自己アニールした Spe I リンカー 4.5 µg に連結させた。反応液を 16 で一晩インキュベートし、次に *E. coli* RRI 株 (ATCC 31343) を形質転換させた。形質転換細胞を、100 µg/mL アンピシリンを補充した Luria Broth (L-Broth) 寒天プレート上にまき、37 で一晩インキュベートした。mini prep を行い、精製 DNA を Spe I で消化し、アガロースゲル電気泳動によって分析して、所望の構築物のクローンを同定した。所望構築物を含む一つの

クローンを p S s p I / S p e I と命名し、以下の工程で使用した。

【 0 0 5 2 】

プラスミドクローンの分析： 1 0 0 μ g / m L アンピシリンを含む L - b r o t h の 1 . 8 m L の培養液に、個々の形質転換菌を植菌し、下記のように、B i r n b o i n と D o l y の方法 (N u c l e i c A c i d s R e s . 7 : 1 5 1 3 (1 9 7 3) (引用により本明細書に含まれるものとする)) から適合させた以下の m i n i p r e p プラスミド精製方法によって、該形質転換菌が有するプラスミドを調製した。S p e I 消化によってリンカーの存在についてプラスミドをアッセイした。

【 0 0 5 3 】

m i n i p r e p 方法： 各培養液 1 . 5 m L を 8 0 0 r p m で 2 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを、2 5 m M T r i s 、 1 0 m M E D T A 、 5 0 m M グルコース、p H 8 . 0 2 0 0 μ L に再懸濁した。新たに調製した 0 . 2 M N a O H 4 0 0 μ L 、 1 % S D S の溶液 4 0 0 μ L を各チューブに加え、チューブを振蕩し細胞を溶解した。溶液が清澄化した後、3 M 酢酸ナトリウム p H 4 . 8 3 0 0 μ L を各チューブに加え、振蕩して穏やかに混合した。形成した沈殿を 1 4 , 0 0 0 r p m 、 4 、 3 分間の遠心にかけた。各上清をイソプロパノール 7 0 0 μ L 含有遠心分離チューブに注ぎ、混合した。チューブを 1 4 , 0 0 0 r p m 、 4 、 5 分間の遠心にかき、沈殿した核酸をペレットにした。上清を捨て、ペレットを室温で 1 5 分間空気乾燥した。乾燥後、5 0 μ g / m L R N a s e 含有 1 0 m M T r i s (p H 8 . 0) 、 1 m M E D T A 2 5 0 μ L 中にペレットを溶解し、3 7 ° C で 1 時間インキュベートし、RNA を消化した。5 M N a C l 2 5 μ L 、次に 2 - プロパノール 1 7 5 μ L を添加して、DNA を沈殿させた。DNA を、4 ° C で 5 分間の遠心分離で集め、上清を捨て、ペレットを乾燥し、次に 1 0 m M T r i s 、 1 m M E D T A 、 p H 8 . 0 (1 × T E) 5 0 μ L に再溶解した。次に、種々の制限酵素による消化で、プラスミド m i n i p r e p を分析した。

【 0 0 5 4 】

(2) 2 個の S p e I 部位を有するベクターの構築： 最終容量 5 0 μ L の 1 × N E B # 4 緩衝液 (2 0 m M T r i s - 酢酸、 1 0 m M 酢酸マグネシウム、 5 0 m M 酢酸カリウム、 1 m M D T T 、 2 5 ° C で p H 7 . 9) 中で、p S s p / S p e I 0 . 5 μ g を 3 7 ° C で 2 時間 H i c I I 2 0 ユニットで消化し、次に、上記のように C l P 5 ユニットで脱リン酸化した。酵素を 7 8 ° C で 2 0 分間熱不活化させた。最終容量 3 0 μ L の 1 × リガーゼ緩衝液中で、T 4 DNA リガーゼ 1 2 0 0 ユニットを用い、H i n c I I 消化、脱リン酸化 DNA 4 0 n g を、S p e I リンカー 4 . 5 μ g に連結させた。反応液を 1 6 ° C で一晩インキュベートし、次に E . c o l i R R I 株を形質転換させた。形質転換細胞を、1 0 0 μ g / m L アンピシリンを補充した L B 寒天プレート上にまき、3 7 ° C で一晩インキュベートした。m i n i p r e p を行い、精製 DNA を S p e I で消化し、アガロースゲル電気泳動によって消化産物を分析して、所望の構築物のクローンを同定した。2 個の S p e I 制限部位を有する所望構築物を含む一つのクローンを p S s p I H i c I I / S p e I と命名し、S p e I ゲノムライブラリー構築物用選択可能ベクターとして使用した。

【 0 0 5 5 】

B . S p e I ゲノムライブラリーの構築： 最終容量 1 0 0 μ L の、0 . 1 m g / m L B S A 補充 N E B # 3 緩衝液 (5 0 m M T r i s - H C l 、 1 0 m M M g C l 2 、 1 0 0 m M N a C l 、 1 m M D T T 、 2 5 ° C で p H 7 . 9) 中で、S p h a e r o t i l u s s p e c i e s ゲノム DNA 約 1 5 μ g を、P s t I で部分消化し、3 7 ° C で 1 時間インキュベートした。P s t I 制限エンドヌクレアーゼの 2 . 7 ユニット / μ g DNA ~ 0 . 0 1 6 ユニット / μ g の連続希釈で部分消化を行った。次に、7 8 ° C で 2 0 分間加熱して反応を停止させた。最終容量 5 0 μ L の 1 × N E B リガーゼ緩衝液中で、T 4 DNA リガーゼ 1 0 0 0 ユニットを用いて、P s t I 部分消化反応液の各々からの消化 S p e I ゲノム DNA 5 μ g を、ベクター p S s p I H i n c I I / S p e I (前もって P s t I 開裂、ウシ腸アルカリホスファターゼで脱リン酸化、ゲル精製) 1 μ g に連結させた。反応液を室温で 1

10

20

30

40

50

6時間放置した。次に、各連結反応混合液10 μ Lで、E. coli RRI細胞を形質転換し、100 μ g/mLアンピシリンを補充したL-Broth寒天プレート上に播いた。プレートを37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。合計14,500個の別々の形質転換菌を得、10mM Tris、10mM MgCl₂、pH7.5 14mL中にかきとって一緒にプールし、十分に混合した。このプール2mLを用い、100 μ g/mLアンピシリンを補充したL-broth500mLに植菌し培養液を37 $^{\circ}$ Cで一晩振蕩しながら増殖させた。4000rpm、5分間の遠心分離で細胞を得た。25%スクロース、50mM Tris-HCl、pH8.0 10mL中に細胞ペレットを再懸濁させ、次に250mM EDTA、pH8.0 5mL及び250mM Tris-HCl、pH8.0中の10mg/mLリゾチーム3mLを添加した。この懸濁液を氷上に1時間放置し、次に溶菌混合液(50mM Tris-HCl、62.5mM EDTA、1% Triton X-100、pH8.0)12mLを加え、この混合液を氷上に10分間放置した。溶菌した混合液を17,000rpm、4、45分間の遠心分離にかけた。上清22gを、CsCl 20gと10mM Tris-HCl、1mM EDTA、100mM NaCl(pH8.0)中の臭化エチジウム5mg/mL 1mLと混合した。溶液を2個の5/8インチx3インチ遠心分離チューブに移し、Beckman Ti70ローターで50,000rpm、17、30時間の遠心を行った。バンドを紫外線光で照射し、注射器と注射針を用いてプラスミドを集めて、プラスミドを単離した。2個のチューブからのサンプルをプールし、緩衝液飽和、冷N-ブタノールで5度抽出して、臭化エチジウムを除去した。水溶液を10mm 透析チューブに入れ、2LのTE(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)に対し4度透析を行った。次に、透析した溶液を、冷2-プロパノール2容量と5M NaCl 1/10容量で沈殿させ、15,000rpmで15分間の遠心を行った。最終濃度1.4mg/mLで1mL TE中にペレットを再懸濁させた。

【0056】

3. SpeIメチラーゼ選別： 最終濃度50 μ L中の、0.1mg/mL BSAを補充した1xNEB#1緩衝液(10mM Bis Tris プロパン-HCl、10mM MgCl₂、1mM DTT、25 $^{\circ}$ CでpH7.0)中で、プラスミドライブラリー2.4 μ gをSpeI 12ユニットで消化した。フェノール：クロロホルム(50:50, v/v)でサンプルを抽出し、DNAを5M NaCl 1/10容量と2-プロパノール2容量で沈殿させた。CIP(ウシ腸アルカリホスファターゼ、NEB)10ユニットを加え、反応液を37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、次にCIPを更に10ユニット加え、反応を更に30分間進行させた。この反応液を平衡化フェノール：クロロホルム(50:50, v/v)1容量で抽出し、5M NaCl 1/10容量と2-プロパノール2容量でDNAを沈殿させた。次に、DNAペレットをTE(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH7.5)10 μ L中に再懸濁し、E. coli RRIコンピテント細胞を形質転換し、100 μ g/mLアンピシリン含有L-brothプレートにまいた。プレートを37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。総計18個の形質転換菌を以下のように分析した。各コロニーからのプラスミドをminiprep方法で単離し、SpeIエンドヌクレアーゼで消化した。2個のクローンが、SpeI消化から十分に保護されていることが知見された。更なる制限分析により、これらのクローンは同一であり、4kbの挿入配列を含んでいた。このようなメチラーゼ含有の一つのクローンをpSpeIM1と命名した。

【0057】

4. DNA配列決定： Circumvent DNA Sequencing kit(New England Biolabs, Inc.; Beverly, MA)を用い、製造業者の指示に基づき、pSpeIM1の4kb挿入配列のDNA配列決定を行った。配列決定を容易にするために、PvuII/XbaIサブクローンを、SpeIエンドヌクレアーゼ活性に抵抗性でもあるベクターpUC19中に作出した。このサブクローン構築物をpSpeIM2と命名した。プラスミドpSpeIM1とpSpeIM2上で

Exo-Size[®] deletion kit (New England Biolabs, Inc.; Beverly, MA) を用い、製造業者の指示に基づき、一連のエクソヌクレアーゼ欠失を行った。クローン pSpeIM1 と pSpeIM2、及び種々のエクソヌクレアーゼ欠失サブクローンの miniprep DNA 調製物を鋳型として用い、M13/pUC プライマー #1233 と #1224 (New England Biolabs, Inc.; Beverly, MA) を配列決定のプライマーとして用いた。DNA 配列情報を得た後、DNA 配列から翻訳される 6 個のフレームのアミノ酸配列を、公知のメチラーゼの保存アミノ酸モチーフと比較し、メチラーゼの m⁶A - タイプクラス

のモチーフ I と IV を同定した。モチーフ I の DNA 配列は、5' - CACTGCACCGTAAAGCACTTCCGTTGATGCTTAAGCTTGTGGGGATGATGGTTC CGCCTTTTGC AAACAACATCGTACTTGACCCGTTTGCTGGTTCGGGTACCACGCTTGTGGCCGCAAGCAGCTCGGTCTCACTTATCTTGGTATCGAG - 3' (配列番号 2) であることが知見された。それは以下のアミノ酸配列に翻訳される：HCTVKPLPLMLKLVGM MVPPFANNIVL DPFAGSGTTLVA AKQLGLTYLGLIE (配列番号 3) (下線のアミノ酸は保存又はほぼ保存の残基である)。モチーフ IV の DNA 配列は 5' - GGAGACTGCCGCGAACTACTGGCGAAAATCCCTGCAGCATCTATCGCGGCATGCATTACAGACCCACCCTAC - 3' (配列番号 4) であることが知見された。これは以下のアミノ酸配列に翻訳される：GDCRELLAKIPAA SIAACITDPPY (配列番号 5)。メチラーゼ読取り枠は、クローン pSpeIM1 中のベクターでオープンで連続的であった。次に、下記のように逆 PCR 法を用いてメチラーゼへの 3' 側の Sphaerotilus species DNA を増幅させたときに、SpeI メチラーゼの終止コドンは pSpeIM1 クローンの最後を超えた 4 個のアミノ酸残基に存在していることが知見された。

【0058】

5. SpeI メチラーゼ遺伝子への 3' 側の DNA のクローニング： 逆 PCR 増幅用鋳型調製物：50 μL 反応容量の 1 × NE 緩衝液 #2 中の HindIII 制限エンドヌクレアーゼ 10 ユニットを用い 37 °C で 1 時間 Sphaerotilus species DNA . 1 μg を消化した。75 °C、20 分間インキュベートして HindIII 酵素を熱不活化した。10 × T4 DNA リガーゼ緩衝液 50 μL と dH₂O 400 μL、次に T4 DNA リガーゼ (NEB #202) 5 μL (2000 NEB ユニット) を加え、16 °C で 16 時間インキュベートすることによって、HindIII 消化 DNA を環状化させた。次に、この環状化連結反応液の一部を、次の逆 PCR 反応の鋳型として使用した。環状化 EaeI 消化 Sphaerotilus species DNA を同様に調製した。

【0059】

下記の配列のプライマー SpeI - IP1 と SpeI - IP2 を合成した。これらのプライマーは SpeI メチラーゼ遺伝子内でハイブリダイズし、互いに反対向きである。

【0060】

プライマー SpeI - IP1
5' - GTTGGATCCGAGCAGTCTCACCG - 3' (配列番号 6)

プライマー SpeI - IP2
5' - GTTCTGCAGCTTTGTCAATGCCGAG - 3' (配列番号 7)

産物を増幅させるのに成功した反応において、反応混合液は、以下のものを混合して作出された：

- 10 μL 10 × Vent 剩ス応緩衝液
- 6 μL 4 mM dNTP 溶液
- 5 μL 濃度 10 μM のプライマー SpeI - IP1
- 5 μL 濃度 10 μM のプライマー SpeI - IP2
- 4 μL 100 mM MgSO₄ (最終濃度 6 mM Mg⁺⁺)
- 12.5 μL 環状化 DNA 鋳型 (約 25 ng)

58 μ L dH₂O

2 μ L (4ユニット) Venturina - ポリメラーゼ NEB # 257

PCR増幅条件は以下の通りであった：95 3分の1サイクル、続いて95 で20秒、52 で30秒、72 で1.5分の4サイクル、続いて95 で20秒、62 で30秒、72 で1.5分の20サイクル。PCR反応液10 μ Lを、0.8%アガロースゲルでの電気泳動で分析した。

【0061】

400bpの産物がHindIII環状鋳型PCR反応で観察され、1.2kb産物がEaeI環状鋳型PCR反応で観察された。これらの2個の産物をゲル精製し、1xTE 25 μ Lに再懸濁した。次に、製造業者の指示に従いABI373自動配列決定システムを使用し、配列決定プライマーとして上記PCRプライマーを用い、これらのPCR産物の配列決定を行った。次に、新しい読取り配列に相補的な2個の新規配列決定プライマーを下記のように合成し、それらを用い、EaeI 1.2kb PCR産物の配列決定を行った。

【0062】

プライマーSpeI-S1

5'-GAAC TATCAAGAGTACTGGCTC-3 (配列番号8)

プライマーSpeI-S2

5'-GTTGGATCCTCTGCTCGAGCGAGGGGTG-3

(配列番号9)

6. Sphaerotilus speciesからのSpeI制限エンドヌクレアーゼのほぼ均一の精製：Sphaerotilus specie(ATCC#13923)細胞を30 でCGYA培地(ATCC#1103)で増殖させた。20時間の増殖後、遠心分離で細胞を得、使用するまで-70 に保存した。以下の方法の全てを氷上又は4で行った。細胞ペレット(湿重量)35gを、緩衝液A.1(20mM Tris-HCl、1mM ジチオトレイトール(DTT)、0.1mM EDTA、0.1M NaCl、pH7.5)120mLに再懸濁し、音波破碎を行った。抽出液を、15,000rpm、4、10分間の遠心分離にかけた。緩衝液A.1で平衡化したヘパリン-セファロースカラム25mLに、上清を負荷した。カラムを緩衝液A.1 60mLで洗浄し、緩衝液A(20mM Tris-HCl、1mMジチオトレイトール(DTT)、0.1mM EDTA、pH7.5)250mLを用い、0.1M NaClから1M NaClのリニアグラジエント溶出を行った。5mL分画を集めた。T7 DNAに対するSpeI制限活性を各分画でアッセイし、制限酵素活性のピークは0.38Mから0.46M NaClでカラムから溶出することが知見され、それをプールした。SpeIエンドヌクレアーゼ量は250,000ユニットであると推定した。このヘパリン-セファロースプールを緩衝液A 2容量で希釈し、緩衝液A.1で平衡化したヘパリン-TSK FPLCカラム(TosoHaas; Philadelphia, PA)3mLにかけ、続いて緩衝液A 40mLを用い、0.1M NaClから0.6M NaClのリニアグラジエント溶出を行った。1mL分画を集めた。T7 DNAに対するSpeI活性を各分画でアッセイした。制限酵素活性のピークは0.26~0.32M NaClで溶出し、7分画をプールした。このヘパリン-TSKプールはSpeI活性を約210,000ユニット含んでいた。プールを緩衝液A 3.5容量で希釈し、60mM NaCl含有緩衝液A(A.06)で平衡化したMono Q FPLCカラム(Pharmacia: Piscataway, NJ)1mLにかけ、緩衝液A.06 6mLで洗浄し、続いて緩衝液A中の0.1M NaClから0.6M NaClのリニアグラジエント40mLを行った。1mL分画を集めた。T7 DNAに対するSpeI活性を各分画でアッセイした。SpeI活性は洗浄液で溶出し、それをプールした。次に、このMono Q プールを緩衝液A.06で平衡化したMono S FPLCカラム(Pharmacia: Piscataway, NJ)1mLに負荷し、緩衝液A.06 6mLで洗浄し、緩衝液A 40mLを用い、0.1M NaClから0.6M NaClのリニアグラジエント溶出を行った。1mL分画を集め

10

20

30

40

50

た。T7 DNAに対するSpeI活性を各分画でアッセイした。酵素活性の全てが洗浄液で溶出し、プールした。このMono Sプールを最終濃度0.1M NaClに調整し、緩衝液A.1で平衡化したヘパリン-TSK FPLCカラム(TosoHaas; Philadelphia, PA)3mLに負荷し、次に緩衝液A.40mLを用い、0.1M NaClから0.6M NaClのリニアグラジエント溶出を行った。1mL分画を集めた。T7 DNAに対するSpeI活性を各分画でアッセイした。酵素活性のピークは0.35M NaClで溶出した。SpeI活性約20,000ユニットがほぼ均一まで精製された。ピーク分画の16μLをSDS-PAGEタンパク質ゲルに負荷し、電気泳動を行った。ゲルをクーマシーブルーR-250で染色し、SpeI制限エンドヌクレアーゼ活性に対応する約20kDの顕著なバンドを観察した。

10

【0063】

7. アミノ末端SpeIタンパク質配列： 上記セクション6に記載したように調製したSpeI制限エンドヌクレアーゼを電気泳動にかけ、以前に記載されたように改変した(Looney, M.C., Moran, L.S., Jack, W.E., Feeher, G.R., Benner, J.S., Slatko, B.E., & Wilson, G.G., Gene 80:193-208, 1989)Matsudaira法(Matsudaira, P., J. Biol. Chem. 262:10035-10038, 1987)に基づき、電気プロットした。膜をクーマシーブルーR-250で染色し、約20kdのタンパク質バンドを切出し、Applied BioSystems Division, Perkin-Elmer Corporation(Foster City, California)モデル407A気相タンパク質配列決定機(Waite-Rees, P.A., Keating, C.J., Moran, L.S., Slatko, B.E., Hornstra, L.J., and Benner, J.S., J. Bacteriol. 173:5207-5219, 1991)で逐次分解を行った。20kdタンパク質の最初の28残基は、(Met)-Ser-Ile-Asp-Pro-Asn-Lys-Leu-Asn-Ser-Ala-Leu-Asp-Ala-Ile-Leu-Glu-Gly-Tyr-XXX-Gly-Glu-Phe-Ser-Asn-Lys-Val-Tyr(配列番号10)に対応する。このデータを用い、メチラーゼ遺伝子への3側のDNA配列から導かれるアミノ酸配列と比較し、エンドヌクレアーゼ遺伝子を同定した。

20

30

【0064】

8. SpeI制限-修飾系の同定： SpeIメチラーゼ遺伝子に隣接したDNA配列のアミノ酸翻訳を、SpeIエンドヌクレアーゼのN末端アミノ酸配列決定から得られたアミノ酸配列データと比較することによって、SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子を同定する。SpeIメチラーゼ遺伝子に収束し、それらの3'末端で14個のアミノ酸残基だけメチラーゼ遺伝子と重なる読取り枠が見出され、その読取り枠では、DNA配列にコードされた最初の28個のアミノ酸は、SpeIエンドヌクレアーゼタンパク質から決定されたアミノ酸配列と一致した。アミノ酸配列決定結果の位置20の不明の残基XはDNA配列からアルギニンであると知見された。更に、82個のアミノ酸のペプチドをコードする読取り枠はエンドヌクレアーゼ遺伝子の5'直前に位置し、エンドヌクレアーゼ遺伝子と同一方向に向いている。この読取り枠のアミノ酸配列は、他の幾つかの制限-修飾系で見出された制御遺伝子に高度な相同性を有し(Taoら, J. of Bacteriology, 183:1367-1375(1991)(引用により本明細書に含まれるものとする))、SpeI制御遺伝子と同定される。

40

【0065】

9. SpeIエンドヌクレアーゼの過剰発現：
A. 適合性ベクターへのSpeIメチラーゼのクローニング： tet遺伝子転写系を利用するために、pSYX20のテトラサイクリン遺伝子に遺伝子を挿入することによって、SpeIメチラーゼ遺伝子を発現させた。これを行うために、DNA配列データを利用して、2個のオリゴヌクレオチドプライマーを作出した。第1のオリゴヌクレオチドプラ

50

イマーは、クローニングを容易にするための *Bam*HI 部位、*tet* タンパク質の翻訳を終止させるためのテトラサイクリン遺伝子とフレームのあった終止コドン、*E. coli* コンセンサスリボソーム結合部位、リボソーム結合部位と *Spe*I メチラーゼ遺伝子の *ATG* 開始コドンの間の 7 個のヌクレオチドスペーサー、及びハイブリダイゼーションのための *Sphaerotilus species* DNA に相補的な 19 個のヌクレオチドを含んでいた。

【0066】

プライマー *Spe*Mexp1 :

5' - GTTGGATCCGTTAAGGAGGTTAATACTATGAGTGGCATGCG - 3' (配列番号11)

メチラーゼ遺伝子の 3' 末端にハイブリダイズするように逆プライマーを設計し、それはクローニングを容易にするために *Sal*I 部位を有した。

【0067】

プライマー *Spe*Mexp2 :

5' - CCTGACGTCGACTCATTAAGGAAC TACTCCTG - 3' (配列番号12)

これらの 2 個のプライマーを用い、

10 μ L 10x *Vent* 剰ス応緩衝液

6 μ L 4mM dNTP

2 μ L (400ng) *Sphaerotilus species* ゲノムDNA

5 μ L (10 μ M 保存) プライマー *Spe*Mexp1

5 μ L (10 μ M 保存) プライマー *Spe*Mexp2

4 μ L 100mM $MgSO_4$ (最終濃度 8mM Mg^{++})

68 μ L dH_2O

0.8 μ L (1.6 ユニット) *Vent* 刃|リメラーゼ (2 ユニット/ μ L 保存) ;

を混合し、95 $^{\circ}C$ 3分を 1 サイクル、続いて 95 $^{\circ}C$ 30秒、56 $^{\circ}C$ 30秒、72 $^{\circ}C$ 1分を 4 サイクル、続いて 95 $^{\circ}C$ 30秒、65 $^{\circ}C$ 30秒、72 $^{\circ}C$ 1分を 20 サイクル行い増幅させることによって、*Sphaerotilus species* ゲノムDNA から *Spe*I メチラーゼ遺伝子を増幅させた。PCR 反応液 15 μ L を、0.8% アガロースゲルでの電気泳動で分析した。約 1.0 kb のバンドが、DNA 配列データから予期されたように観察された。この

バンドをゲル精製し、最終容量 50 μ L の NEB 緩衝液 *Sal*I (150mM NaCl

、10mM *Tris*-HCl、10mM $MgCl_2$ 、1mM ジチオトレイトール、pH 7.9、約 25 $^{\circ}C$) 中で、*Bam*HI (20 ユニット) と *Sal*I (20 ユニット) を

用いて、ゲル精製 DNA 約 1 μ g を消化した。この反応液を、37 $^{\circ}C$ で 1 時間インキュベートし、78 $^{\circ}C$ で 20 分間加熱して反応を停止させた。16 $^{\circ}C$ で 2 時間、容量 20 μ L 中の T4 DNA リガーゼ 400 ユニットを用いて、*Bam*HI と *Sal*I で前もって開裂させたベクター pSYX20 (100ng) に、消化 DNA 5 μ L (100ng) を連結させ、アガロースゲル精製した。連結混合液 10 μ L で *E. coli* ER2427 株を形質転換し、別々のコロニーを得るために、50 μ g/mL カナマイシン含有 L-broth

プレートに播いた。12 個の別々のコロニーを、50 μ g/mL カナマイシン含有 L-broth 10 mL 中で、一晩攪拌しながら 37 $^{\circ}C$ で増殖させ、mini prep を行い

プラスミドを単離した。試験した 12 個の別々のプラスミドのうち 5 個が、*Bam*HI と *Sal*I による切断で切出すことができる 1 kb 挿入配列を含んでいた。これらの 5 個の構築物が *Spe*I メチラーゼ活性を発現するかどうかを試験するために、単一 *Spe*I 部位を含むベクター *Lit*mus 38 (New England Biolabs, Inc. ; Beverly, MA) を 5 個の予測される pSYX20 *Spe*I メチラーゼクローンと共に用いて、*E. coli* 2427 株を形質転換し、100 μ g/mL アンピシリンと 50 μ g/mL カナマイシン含有 L-broth プレートに播いた。mini prep を行い、個々の形質転換体を単離し、*Spe*I と *Sca*I で消化した。801 bp の *sca*I/*Spe*I フラグメントが無いことで示されるように、5 個のメチラーゼクローンの全てからのプラスミドは *Spe*I 消化から十分に保護されていた。このようなクロー

30

40

50

ンの一つを p S Y X 2 0 S p e I M 9 と命名し、エンドヌクレアーゼ発現のために使用した。

【 0 0 6 8 】

B . エンドヌクレアーゼクローニング： 制限エンドヌクレアーゼ遺伝子を、強い誘導性プロモーター (P l a c U V 5) と強く認識されるリボソーム結合部位の直下で、発現ベクター p R R S に挿入することによって制限エンドヌクレアーゼ遺伝子を発現させた。このことを行うために、D N A 配列データを用い、2 個のオリゴヌクレオチドプライマーを作出した。正方向オリゴヌクレオチドプライマーは、クローニングを容易にするための N s i I 部位、l a c Z タンパク質の翻訳を停止させるための l a c Z 遺伝子とフレームのあった終止コドン、強く認識されるリボソーム結合部位、リボソーム結合部位と S p e I エンドヌクレアーゼ遺伝子の A T G 開始コドンの間の 7 個のヌクレオチドスペーサー、及びハイブリダイゼーションのための Sphaerotilus species D N A に相補的な 2 1 個のヌクレオチドを含んでいた。

10

【 0 0 6 9 】

プライマー S p e I R e x p 1 :

5 - G G T T A T G C A T T T A A G G A G G T T T A A C A T A T G T C A A T C G A T C C C A A C A A G - 3 (配列番号 1 3)

S p e I エンドヌクレアーゼ遺伝子の 3 末端で Sphaerotilus species D N A にハイブリダイズするように、逆プライマーを設計した。それは、クローニングを容易にするための B a m H I 制限部位と T G A から T A A の終止コドンの変更を含んでいた。

20

【 0 0 7 0 】

プライマー S p e I R e x p 2 :

5 - G G T G G A T C C G T C G A C T T A C C G G A C A A C A G G A A A T T T T C - 3 (配列番号 1 4)

これらの 2 個のプライマーを用い、

1 0 μ L 1 0 × V e n t 剩ス応緩衝液

6 μ L 4 m M d N T P

2 μ L (4 0 0 n g) Sphaerotilus species ゲノム D N A

5 μ L (1 0 μ M 保存) プライマー S p e R e x p 1

5 μ L (1 0 μ M 保存) プライマー S p e R e x p 2

4 μ L 1 0 0 m M M g S O ₄

6 8 μ L d H ₂ O

0 . 6 μ L (1 . 2 ユニット) V e n t 刃 | リメラーゼ (2 ユニット / μ L 保存) ;

を混合し、9 5 3 分を 1 サイクル、続いて 9 5 3 0 秒、6 0 2 0 秒、7 2 4 5 秒を 4 サイクル、続いて 9 5 3 0 秒、6 5 2 0 秒、7 2 4 5 秒を 2 0 サイクル行い増幅させることによって、Sphaerotilus species ゲノム D N A から S p e I エンドヌクレアーゼ遺伝子を増幅させた。約 6 0 0 b p の増幅産物をゲル精製し、N s i I と B a m H I で開裂し、フェノール - クロロホルム抽出を行い、沈殿させ、T E に再懸濁させ、前もって P s t I と B a m H I で開裂させた p R R S ベクターに連結し、ゲル精製を行った。連結反応液で、S p e I メチラーゼ遺伝子構築物 p S Y X 2 0 S p e I M 9 で予め改変した E . c o l i E R 2 4 2 7 株を形質転換した。分析した 6 個の別々の形質転換菌のうち、全てが S p e I エンドヌクレアーゼ活性を発現した。これらのクローンの一つである p S p e I R 7 を S p e I エンドヌクレアーゼを産生させるために選別し、株名 N E B # 1 0 3 8 をつけた。株 N E B # 1 0 3 8 の粗抽出液から産生された S p e I 制限エンドヌクレアーゼ活性の滴定を図 4 に示す。酵素力価は約 2 × 1 0 ⁷ ユニット / g (細胞) であった。

30

40

【 0 0 7 1 】

1 0 . アンピシリン (1 0 0 μ g / m L) とカナマイシン (5 0 μ g / m L) 含有 L - b r o t h 培地を含む発酵槽中で対数中期まで増殖させることによって、N E B # 1 0 3 8 から S p e I 制限エンドヌクレアーゼを産生させることができる。最終濃度 0 . 3 m M

50

までIPTGを添加して培養液の誘導を行い、16時間生育を続けさせる。細胞を遠心分離で得て、その細胞は-70℃で保存できるし、又は直ちに使用できる。

【0072】

11. NEB#1038からのSpeI制限エンドヌクレアーゼの精製は、上記ステップ6で記載したように、アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーなどの標準的タンパク質精製技術の組合せによって達成できる。この精製で得られるSpeI制限エンドヌクレアーゼは実質的に純粋であり、非特異的なエンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼの夾雑は無い。

【0073】

pSYX20SpeIM9とpSpeIR7(NEB#1038)の両方を含むE.coliのサンプルは、ブダペスト条約の条件下、American Type Culture Collectionに1997年3月20日寄託し、ATCC受託番号98366を受けた。

【0074】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

配列

CCAAGTAGTT GG 12

配列番号:2

配列の長さ:152

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

配列

【0075】

【化1】

ACTGCACCG TAAAGCACTT CCGTTGATGC TTAAGCTTGT GGGGATGATG GTTCCGCCTT 60

TTGCAAACAA CATCGTACTT GACCCGTTTG CTGGTTCGGG TACCACGCTT GTGGCCGCAA 120

AGCAGCTCGG TCTCACTTAT CTGGTATCG AG 152

【0076】

配列番号 : 3

配列の長さ : 51

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

10

【 0 0 7 7 】

【 化 2 】

His Cys Thr Val Lys Pro Leu Pro Leu Met Leu Lys Leu Val Gly Met
1 5 10 15

Met Val Pro Pro Phe Ala Asn Asn Ile Val Leu Asp Pro Phe Ala Gly
20 25 30

Ser Gly Thr Thr Leu Val Ala Ala Lys Gln Leu Gly Leu Thr Tyr Leu
35 40 45

20

Gly Ile Glu
50

【 0 0 7 8 】

配列番号 : 4

配列の長さ : 72

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

10

GGAGACTGCC GCGAACTACT GGCGAAAATC CCTGCAGCAT 40

CTATCGCGGC ATGCATTACA GACCCACCCT AC 72

配列番号 : 5

配列の長さ : 24

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

20

配列の種類 : タンパク質

配列

Gly Asp Cys Arg Glu Leu Leu Ala Lys Ile Pro Ala Ala Ser Ile

1 5 10 15

Ala Ala Cys Ile Thr Asp Pro Pro Tyr

20

配列番号 : 6

30

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

GTTGGATCCG AGCAGTCTCA CCG 23

40

配列番号 : 7

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

GTTCTGCAGC TTTGTCAATG CCGAG 25 10

配列番号 : 8

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

GAACTATCAA GAGTACTGGC TC 22 20

配列番号 : 9

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

GTTGGATCCT CTGCTCGAGC GAGGGGTG 28 30

配列番号 : 10

配列の長さ : 28

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

【 0 0 7 9 】

【 化 3 】

Met Ser Ile Asp Pro Asn Lys Leu Asn Ser Ala Leu Asp Ala Ile Leu
 1 5 10 15

Glu Gly Tyr Xaa Gly Glu Phe Ser Asn Lys Val Tyr
 20 25

【 0 0 8 0 】

配列番号 : 11

配列の長さ : 41

配列の型 : 核酸

10

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

GTTGGATCCG TTAAGGAGGT TAATACTATG AGTGGCATGC G 41

配列番号 : 12

配列の長さ : 32

20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

CCTGACGTCG ACTCATTAAAG GAACTACTCC TG 32

配列番号 : 13

30

配列の長さ : 48

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

GGTTATGCAT TTAAGGAGGT TTAACATATG TCAATCGATC CCAACAAG 48

40

配列番号 : 14

配列の長さ : 38

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列

GGTGGATCCG TCGACTTACC GGACAACAGG AAATTTTC

38

【図面の簡単な説明】

【図1】Spe I制限エンドヌクレアーゼをクローン化及び作製する好ましい方法のフローチャートである。

【図2】メチラーゼクローンpSpeIM1が含むSphaerotilus属種DNAの制限地図である。クローンpSpeIM1はメチラーゼ選択によって得られ、機能性SpeIメチラーゼを含む。SpeIメチラーゼの位置及び向きを示す。 10

【図3】SpeIメチラーゼ遺伝子、SpeIエンドヌクレアーゼ遺伝子及びSpeI制御遺伝子の相対位置及び向きを示す説明図である。

【図4】pRRS由来プラスミドpSpeIR7上のSpeIエンドヌクレアーゼと、pSYX20由来プラスミドpSYX20SpeIM9上のSpeIメチラーゼとを移入した大腸菌ER2427の細胞抽出物のSpeI制限エンドヌクレアーゼ活性を示すアガロースゲルの写真である。1.8gの細胞ペーストを25mlの音波処理用緩衝液(20mMトリス-HCl、1mMジチオトレイトール、0.1mMEDTA、pH7.5)中に懸濁させ、音波処理によって細胞を破壊し、遠心によって懸濁液を清澄化した。抽出物の稀釈物を用いて、1×NEBuffer 2中に反応体積50μl当たり1μgの量で加えたT7 DNAを消化した。反応混合物を37℃で1時間インキュベートし、消化産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した。レーン1及び8はHindIII + HaeIII - X174寸法標準であり、レーン2は2×10⁻³μl粗抽出物であり、レーン3は1×10⁻³μl粗抽出物であり、レーン4は5×10⁻⁴μl粗抽出物であり、レーン5は2.5×10⁻⁴μl粗抽出物であり、レーン6は1.25×10⁻⁴μl粗抽出物であり、レーン7は6.25×10⁻⁵μl粗抽出物である。 20

【 図 1 】

Figure 1

*Sphaerotilus*属種 (ATCC #13923) のDNAを精製する。

↓

2個の *SpeI* 部位を有する選択性ベクター-pSspIHincII/*SpeI* を構築し、このベクターにおいて *Sphaerotilus*属種DNAのライブラリーを作製する。

↓

*SpeI*メチラーゼを発現するクローンをメチラーゼ選択法で同定する。

↓

*SpeI*メチラーゼクローンのDNAを配列決定し、*SpeI*メチラーゼ遺伝子の位置及び向きを確認する。

↓

*SpeI*メチラーゼ遺伝子の3'側に位置するDNAを逆向きPCR技術で増幅し、配列決定する。

↓

*SpeI*制限エンドヌクレアーゼタンパク質をほぼ均質に精製する。

↓

*SpeI*エンドヌクレアーゼのN末端アミノ酸配列を配列決定する。

↓

*SpeI*エンドヌクレアーゼ遺伝子及び制御遺伝子を同定する。

↓

*Sphaerotilus*属種DNAから *SpeI*メチラーゼ遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子をベクター-pSYX20に連結し、pSYX20*SpeIM9*を形成させることによって *SpeI*メチラーゼを発現させる。

↓

*Sphaerotilus*属種DNAから *SpeI*エンドヌクレアーゼ遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子を発現ベクター-pRRS中に連結し、この構築物を、*SpeI*メチラーゼ構築物pSYX20*SpeIM9*で予め修飾した大腸菌株に導入することによって *SpeI*エンドヌクレアーゼを発現させる。

↓

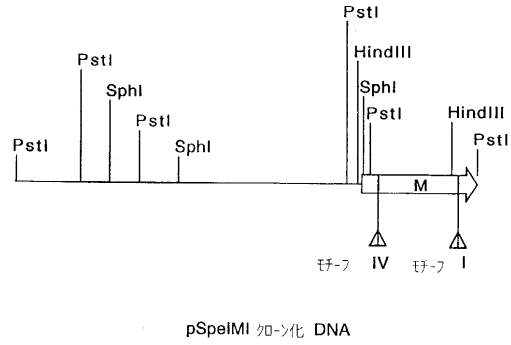
*SpeI*エンドヌクレアーゼクローンを発酵装置においてL-ブイヨン中で増殖させ、適当な抗生物質選択及び誘導を行なう。

↓

タンパク質精製技術によって *SpeI*エンドヌクレアーゼを精製する。

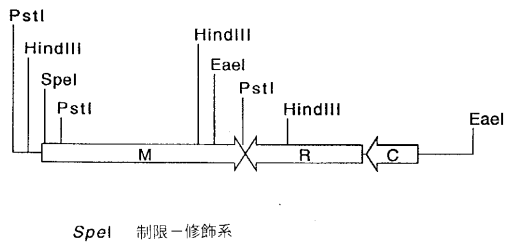
【 図 2 】

Figure 2



【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4

大腸菌株NEB#1038からの*SpeI*制限活性



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 R	1/19	(2006.01)	C 1 2 R 1:01
			C 1 2 N 1/21
			C 1 2 R 1:19
			C 1 2 N 9/16
			C 1 2 R 1:19
			A

(72)発明者 ツイユー・チャン
 アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10805、ニュー・ロツシエル、リランド・アベニュー・6
 8

(72)発明者 ファナ・ビー・マーシャ
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02143、サマービル、サマー・ストリート・104、ア
 パートメント・3・ビー

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特開平08-266288(JP,A)
 特許第3003117(JP,B2)
 遺伝子工学製品ガイド,TaKaRa,1995-1996,A-52

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00-15/90
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)
 SwissProt/PIR/Geneseq
 JMEDPlus(JDream2)
 JST7580(JDream2)
 JSTPlus(JDream2)