(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 32 024 T2** 2004.06.24

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 704 530 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 32 024.6**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 112 298.5**
(96) Europäischer Anmeldetag: **04.08.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.04.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **29.10.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.06.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/52**
C12N 15/65, C12N 1/21, C12N 15/74, C07K 14/35

(30) Unionspriorität:
20158294 04.08.1994 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, FR, GB, LI

(73) Patentinhaber:
Mitsubishi Rayon Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Yu, Fuji, Yokohama-shi, Kanagawa 227, JP; Kato, Mami, Yokohama-shi, Kanagawa 235, JP

(54) Bezeichnung: **Kanamycin-Resistenzgen aus Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Gen, das aus Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus abgeleitet ist und Bakterien Kanamycinresistenz verleiht, sowie einen Vektor, der dasselbe enthält.
[0002] Mikroorganismen, die zur Gattung Rhodococcus gehören, sind als bakterielle Katalysatoren bekannt, die Nitrile in die entsprechenden Amide oder Säuren hydrieren oder hydrolysieren (japanisches Patent Nr. 4873/92 und japanische Offenlegungsschriften Nr. 91189/87, 470/90 und 84198/90), und insbesondere Mikroorganismen, die zur Art Rhodococcus rhodochrous gehören, verfügen über Nitril-Hydrierungsaktivität von extrem hoher Leistung (japanische Offenlegungsschrift Nr. 470/90).
[0003] Unter solchen Umständen fand einer der Erfinder verborgene Plasmide in einem bestimmten Stamm der Art Rhodococcus rhodochrous und konstruierte hybride Plasmidvektoren, um ein Wirt-Vektor-System der Gattung Rhodococcus zu entwickeln (japanische Offenlegungsschriften Nr. 148685/92, 64589/93 und 68566/93).
[0004] Zur Konstruktion eines selbstklonierenden Systems höherer Sicherheit ist es außerdem notwendig, Markergene zu entwickeln, die von Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus abgeleitet werden. Jedoch sind nur Arsensäure- und Cadmiumresistenzgene als solche Medikamentenresistenzgene bekannt (Plasmid 23, 242–247, 1990).
[0005] Mit dem Ziel, ein selbstklonierendes System der Gattung Rhodococcus herzustellen, haben die Erfinder umfassend Medikamentenresistenzgene untersucht, die aus Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus gewonnen werden, insbesondere aus der Art Rhodococcus rhodochrous, so dass sie das Kanamycinresistenzgen der vorliegenden Erfindung fanden.
[0006] Das heißt, dass die vorliegende Erfindung ein isoliertes Gen betrifft, das aus Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus abgeleitet wird und Wirts-Mikroorganismen Kanamycinresistenz verleiht, wobei dieses Gen die als Sequenz Nr. 1 bezeichnete Aminosäuresequenz codiert.
[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem ein isoliertes Gen, das einem Wirts-Mikroorganismus Kanamycinresistenz verleiht, umfassend die als Sequenz Nr. 2 bezeichnete DNA-Sequenz oder eine DNA-Sequenz, welche

(a) sich von dieser DNA-Sequenz aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes unterscheidet;
(b) mit dieser DNA-Sequenz oder der Sequenz nach Abschnitt (a) hybridisiert; oder
(c) ein Fragment, ein allelische oder eine andere Variation der vorstehenden DNA-Sequenz repräsentiert.

[0008] In diesem Zusammenhang bezieht sich die Bezeichnung „Hybridisierung" auf herkömmliche Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf stringente Hybridisierungsbedingungen.
[0009] **Fig.** 1 zeigt eine Restriktionsenzym-Karte für das Plasmid pKM001
[0010] **Fig.** 2 zeigt die Konstruktion der Plasmide pKM002, pKM003 und pKM004.
[0011] **Fig.** 3 zeigt eine Restriktionsenzym-Karte für das Plasmid pKM011.
[0012] Als der DNA-Donor in der vorliegenden Erfindung soll die Kanamycin-Mutante KM-02 (hinterlegt als FERM BP-5137 beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan) erwähnt werden, die durch spontane Mutation von Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674 erhalten wurde.
[0013] Als in der vorliegenden Erfindung zur Klonierung verwendete Vektoren, sollen Plasmidvektoren einschließlich aber nicht ausschließlich E. coli-Vektoren, wie pTrc99A, pUC18, etc. und Phagen-Vektoren wie λgt11 etc. erwähnt werden. Die Wirts-Mikroorganismen schließen E. coli JM109, E. coli JM105 und Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674 ein, sind aber nicht auf diese beschränkt.
[0014] Plasmide, die Plasmidvektoren bereitstellen, welche aus dem Kanamycinresistenzgen der Erfindung konstruiert wurden, mit einer Region, die zur Replikation in Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus fähig ist, beinhalten sind aber nicht beschränkt auf die Plasmide pR0001, pR0002, pR0003 und pR0004. Die Plasmide pR0001, pR0002, pR0003 und pR0004 sind abgeleitet von Rhodococcus rhodochrous ATCC 4276, ATCC 14349, ATCC 14348 und IFO3338, und diese Plasmide sind beschrieben in den vorstehend erwähnten japanischen Offenlegungsschriften Nr. 148685/92, 64589/93 und 68566/93.
[0015] Das vorliegende, von Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus abgeleitete, Kanamycinresistenzgen ist verwendbar, um Vektoren für Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus, speziell Vektoren zur Selbstklonierung von Rhodococcus rhodochrous, zu konstruieren.
[0016] Die vorliegende Erfindung wird eingehender beschrieben durch Erwähnung der folgenden Beispiele, die aber den Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung nicht einschränken sollen.

Beispiel 1

Klonierung des Kanamycinresistenzgens aus der Mutante KM-02 in E. coli JM109

(1) Herstellung von genomischer DNA aus KM-02 und Herstellung einer DNA-Genbank

[0017] Der Stamm KM-02 wurde unter Schütteln bei 30°C in 100 ml MY-Medium (0,5% Polypepton, 0,3% Bacto-Hefeextrakt, 0,3% Bacto-Malzextrakt) gezüchtet, und aus den Bakterien wurde gemäß der Methode von Saito und Miura (Biochim. Biophys. Acta 72, 619, 1963) genomische DNA hergestellt. Ein Teil der resultierenden DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3 AI teilweise verdaut und dann in die BamHI-Schnittstelle des E.coli Vektors pTrc99A insertiert, um eine rekombinante DNA-Genbank zu erzeugen.

(2) Auswahl von Transformanten und Herstellung der rekombinanten DNA

[0018] Die in Schritt (1) hergestellte rekombinante Genbank wurde verwendet, um E. coli JM109 unter Verwendung der Calciumchlorid-Methode zu transformieren, und die Transformanten mit Resistenz gegenüber Kanamycin wurden auf die im folgenden beschriebene Weise ausgewählt.
[0019] Die vorstehend erhaltenen Transformanten wurden auf LB-Agarmedium (1% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 1,5% Agar), welches 40 µg/ml Kanamycinhydrochlorid und 1 mM IPTG (Isopropy-β-thiogalactosid) enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die darauf erscheinenden Kolonienen wurden entfernt und auf das gleiche Agarmedium gegeben, und ihr Wachstum wurde bestätigt.
[0020] Aus den so erhaltenen Transformanten wurde Plasmid-DNA gemäß der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. 7, 1513–1523, 1979) hergestellt und als pKM001 bezeichnet. Dieses Plasmid wurde wieder in E. coli eingebracht, und die resultierende Transformante mit Kanamycinresistenz wurde als JM109/pKM001 bezeichnet und als FERM BP-5138 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, hinterlegt. Zur Ausprägung der Kanamycinresistenz von E. coli JM109/pKM001 wurde IPTG benötigt.

(3) Restriktionsenzym-Karte von pKM001 und Lokalisierung des Kanamycinresistenzgens

[0021] Es wurde eine Restriktionsenzym-Karte des in Schritt (2) erhaltenen Plasmids pKM001 hergestellt (**Fig.** 1). Danach wurde dieses Plasmid pKM001 verwendet, um kleinere Plasmide herzustellen. Die das Zielgen enthaltende Region wurde anhand des Vorhandenseins oder der Abwesenheit der Kanamycinresistenz in Transformanten, die in gleicher Weise wie in Schritt (2) hergestellt wurden, ermittelt. Während dieses Vorganges wurde das Plasmid pKM002 (**Fig.** 2) konstruiert.

(4) Nukleotid-Sequenzierung

[0022] Die Nukleotidsequenz des Kanamycinresistenzgens in Plasmid pKM002 wurde unter Verwendung eines Floureszenz-Sequenzers ALF II (Pharmacia) bestimmt (Sequenz Nr. 3).

Beispiel 2

[0023] Herstellung des hybriden (E. coli-Rhodococcus) Plasmidvektors, welcher das Kanamycinresistenzgen trägt, das von Rhodococcus rhodochrous abgeleitet ist.
[0024] Ein hybrider Plasmidvektor pK4, der früher von einem der Erfinder durch Ligierung des von Rhodococcus abgeleiteten Plasmids pR0004 mit dem E. coli-Vektor pHSG299 konstruiert worden ist und als FERM BP-3731 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (japanische Offenlegungsschriften Nr. 64589/93 und 68566/93) hinterlegt wurde, wurde zur Herstellung eines 3,1 kb HindIII-Fragmentes, welches pR0004 komplett und einen Teil von pHSG299 enthielt, verwendet, und das resultierende Fragment wurde mit dem Plasmid pKM002 ligiert.
[0025] Als Ergebnis wurden zwei Plasmide erhalten, welche die Insertion in jeweils gegenläufiger Richtung trugen und mit pKM003 beziehungsweise pKM004 bezeichnet wurden. Diese Plasmide lassen sich sowohl in der Gattung Rhodococcus als auch in E. coli replizieren. Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674 wurde mit diesen Plasmiden durch Elektroporation transformiert, wodurch eine Transformante erhalten wurde, die fähig war in MY-Medium, welches 75 µg/ml Kanamycin enthielt, zu wachsen. Die aus der Transformante erhaltenen Plasmide waren die gleichen Plasmide wie die eingebrachten. Wo Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus als Wirt verwendet wurden, war die Anwesenheit von IPTG nicht nötig für die Expression der Kanamycinresistenz.

Beispiel 3

Konstruktion eines Vektors für Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus

[0026] Der hybride Plasmidvektor pKM004 wurde mit dem Restriktionsenzym KpnI gespalten, um ein 4,3 kb KpnI-Fragment zu ergeben, das dann selbstligiert wurde und in Rhodococcus rhodochrous ATCC 12674 durch Elektroporation eingebracht wurde. Die resultierende Transformante zeigte den gleichen Grad an Kanamycin-resistenz wie die Transformante aus Beispiel 2. Aus dieser Transformante wurde ein Plasmid erhalten und als pKM011 bezeichnet (**Fig.** 3).

SEQUENZTABELLE

Sequenz Nr: 1

Länge: 171

Sequenztyp : Aminosäure

Topologie: linear

Art : Protein

Herkunft

Mikroorganismus: Rhodococcus rhodochrous

Stamm: KM-02

Sequenz:

```
Met Ser Asp Asn Gly Ser Gly Thr Thr Arg Pro Glu Gly Ala Pro Leu
1               5                  10                  15

Pro Arg Arg Ala Arg Ser Ser Arg Pro Ser Ala Gly Asn Ser Pro Ala
            20                  25                  30

Pro Gly Arg Arg Ala Val Val Ala Lys Ser Arg Arg Arg Leu Ala Ala

        35                  40                  45

Ala Pro Glu Ala Gly Thr Thr His Tyr Ser Ile Phe His Gly Asp Gln
    50                  55                  60

Leu Ile Gly Phe Ile Gln Trp Tyr Glu Ala Glu Asp Asn Pro Asp Phe
65                  70                  75                  80

Arg His Ala Gly Leu Asp Leu Phe Leu Asp Pro Asp Phe His Gly Arg
                85                  90                  95

Gly Phe Gly Arg Glu Ser Ile Arg Val Leu Cys Ala His Leu Ile Asp
            100                 105                 110

Asp Leu Ala Phe His Arg Leu Val Ile Asp Pro Glu Val Asp Asn Ser
        115                 120                 125

Val Ala Ile Ala Cys Tyr Arg Ser Val Gly Phe Lys Asp Val Gly Val
    130                 135                 140

Met Arg Glu Tyr Ser Arg Asp Arg His Gly Val Trp Lys Asp Gly Leu
145                 150                 155                 160

Leu Met Asp Leu Leu Ala Arg Glu Phe Ile Arg
                165                 170
```

Sequenz Nr: 2

Länge : 516

Sequenztyp: Nucleinsäure

Strangform: doppelsträngig

Topologie : linear

Herkunft

Mikroorganismus : Rhodococcus rhodochrous

Stamm : KM-02

Sequenz :

ATG AGT GAC AAC GGC TCC GGA ACT ACG CGG CCC GAG GGT GCT CCT CTC 48

CCC CGT CGC GCC CGA TCA TCA CGC CCG TCT GCG GGC AAT TCA CCT GCA 96

CCC GGA CGT CGT GCA GTG GTG GCA AAA TCC CGA CGA CGA CTG GCT GCG 144

GCG CCA GAA GCC GGA ACC ACG CAC TAC AGC ATC TTC CAC GGC GAC CAA 192

CTG ATC GGC TTC ATC CAG TGG TAC GAA GCG GAA GAC AAC CCC GAC TTC 240

CGC CAC GCC GGG CTC GAC TTG TTC CTC GAT CCC GAC TTC CAC GGC CGA 288

GGG TTC GGT CGC GAA TCG ATT CGC GTG CTG TGT GCC CAC CTG ATC GAC 336

GAC CTC GCA TTC CAC CGT CTG GTC ATC GAC CCG GAG GTC GAC AAC TCC 384

GTC GCC ATC GCG TGC TAC CGA TCG GTG GGG TTC AAA GAC GTC GGG GTG 432

ATG CGC GAG TAT TCG CGA GAT CGC CAT GGT GTG TGG AAG GAC CGA CTG 480

CTG ATG GAT CTG CTC GCA CGG GAA TTC ATC CGC TGA 516

Sequenz Nr: 3

Länge : 748

Sequenztyp : Nucleinsäure

Strangform : doppelsträngig

Topologie : linear

Herkunft

Mikroorganismus : Rhodococcus rhodochrous

Stamm: KM-02

Sequenz:

GGATCCGGGG TCGTCGCCCA CCAGGATGGT ACCCAAGCCG GGTGTGATGC CCTCTGCCTT 60

CGAGCGCTCA CCCGCACCTT CAGGTCTTCG AAGATTTCGT CGCGGGTAGC TTTGCCGTCG 120

AGGATCGTTG CAGTCACGGC GACCATTGTT CCAGGTTAGG GTCGATGAGT GACAACGGCT 180

CCGGAACTAC GCGGCCCGAG GGTGCTCCTC TCCCCCGTCG CGCCCGATCA TCACGCCCGT 240

CTGCGGGCAA TTCACCTGCA CCCGGACGTC GTGCAGTGGT GGCAAAATCC CGACGACGAC 300

TGGCTGCGGC GCCAGAAGCC CGAACCACGC ACTACAGCAT CTTCCACGGC GACCAACTGA 360

TCCGCTTCAT CCAGTGGTAC GAAGCGGAAG ACAACCCCGA CTTCCGCCAC GCCGGGCTCG 420

ACTTGTTCCT CGATCCCGAC TTCCACGGCC GAGGGTTCGG TCGCGAATCG ATTCGCGTGC 480

TGTGTGCCCA CCTGATCGAC GACCTCGCAT TCCACCGTCT GGTCATCGAC CCGGAGGTCG 540

ACAACTCCGT CGCCATCGCG TGCTACCGAT CGGTGGGGTT CAAAGACGTC GGGGTGATGC 600

GCGAGTATTC GCGAGATCGC CATGGTGTGT GGAAGGACGG ACTGCTGATG GATCTGCTCG 660

CACGGGAATT CATCCGCTGA TCGACTGGGA CGAGTTCGAA AGGACCGACA TCATGTTGCT 720

GGACAAGGAA TTCACGGCCA CCCTGCAG 748

Patentansprüche

1. Isoliertes Gen, das einem Wirts-Mikroorganismus Kanamycinresistenz verleiht, wobei das Gen die Aminosäuresequenz von Sequenz Nr. 1 codiert.

2. Isoliertes Gen nach Anspruch 1, umfassend die DNA-Sequenz von Sequenz Nr. 2.

3. Isoliertes Gen, das einem Wirt Kanamycinresistenz verleiht und eine DNA-Sequenz umfasst, welche
(a) sich von der DNA-Sequenz nach Anspruch 2 in der Codonsequenz aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes unterscheidet;
(b) mit der DNA-Sequenz nach Anspruch 2 oder Abschnitt (a), vorstehend, hybridisiert; oder
(c) ein Fragment, eine allelische oder eine andere Variation der DNA-Sequenz nach Anspruch 2 repräsentiert.

4. Isoliertes Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Wirts-Mikroorganismus ein Mikroorganismus der Gattung Rhodococcus oder Escherichia coli ist.

5. Plasmidvektor, umfassend ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und einen DNA-Abschnitt, der zur Replikation in einem Mikroorganismus der Gattung Rhodococcus fähig ist.

6. Plasmidvektor nach Anspruch 5, wobei der DNA-Abschnitt, der zur Replikation in einem Mikroorganismus der Gattung Rhodococcus fähig ist, abgeleitet ist von einem Plasmid, ausgewählt aus pRC001 (ATCC 4276), pRC002 (ATCC 14349), pR0003 (ATCC 14348) oder pRC004 (IFO 3338).

7. Wirtszelle, transformiert mit dem Plasmid nach Anspruch 5 oder 6.

8. Wirtszelle nach Anspruch 7, die eine Zelle eines Mikroorganismus der Gattung Rhodococcus oder von

Escherichia coli ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG.1

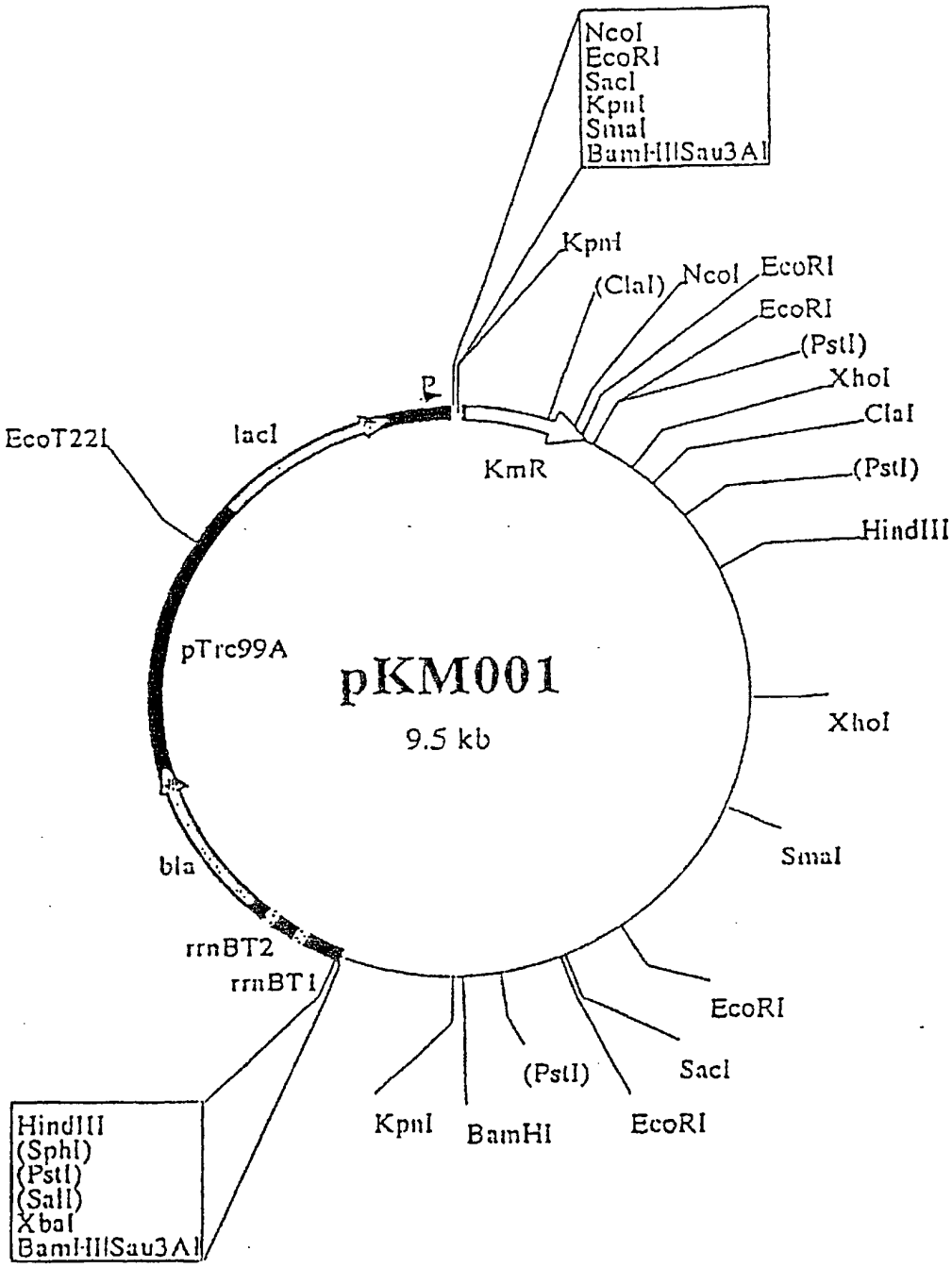


FIG. 2-a

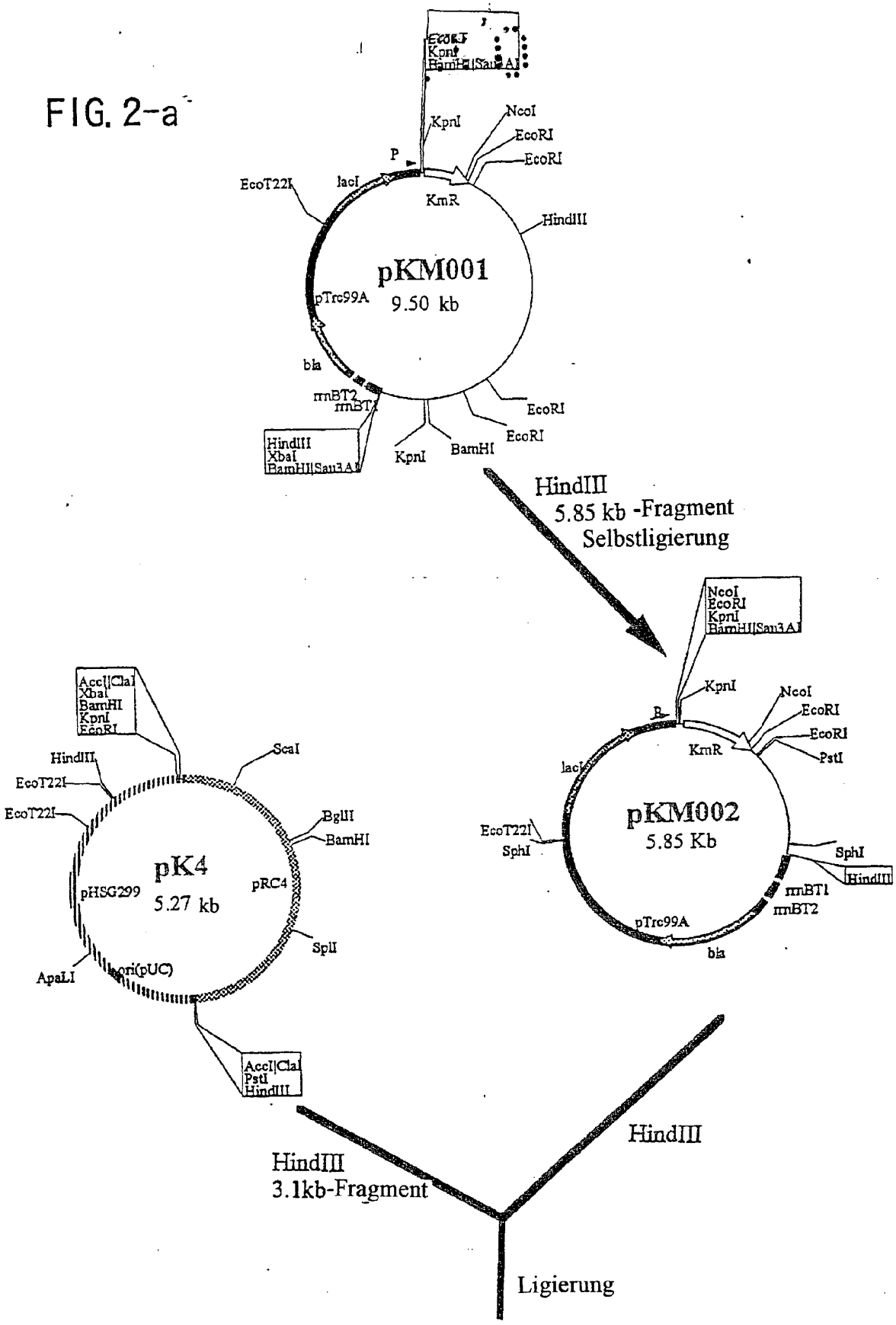

pKM001
9.50 kb
pTrc99A
lacI
P
KmR
bla
rrnBT2
rrnBT1
KpnI
NcoI
EcoRI
EcoRI
HindIII
EcoRI
EcoRI
BamHI
KpnI
EcoT22I
HindIII
XbaI
BamHI|Sau3AI
HindIII
5.85 kb -Fragment
Selbstligierung
NcoI
EcoRI
KpnI
BamHI|Sau3AI
pKM002
5.85 Kb
pTrc99A
lacI
P
KmR
KpnI
NcoI
EcoRI
EcoRI
PstI
EcoT22I
SphI
SphI
HindIII
rrnBT1
rrnBT2
bla
pK4
5.27 kb
pHSG299
pRC4
ori(pUC)
AccI|ClaI
XbaI
BamHI
KpnI
EcoRI
HindIII
EcoT22I
EcoT22I
ScaI
BglII
BamHI
SpII
ApaLI
AccI|ClaI
PstI
HindIII
HindIII
3.1kb-Fragment
HindIII
Ligierung

FIG. 2-b

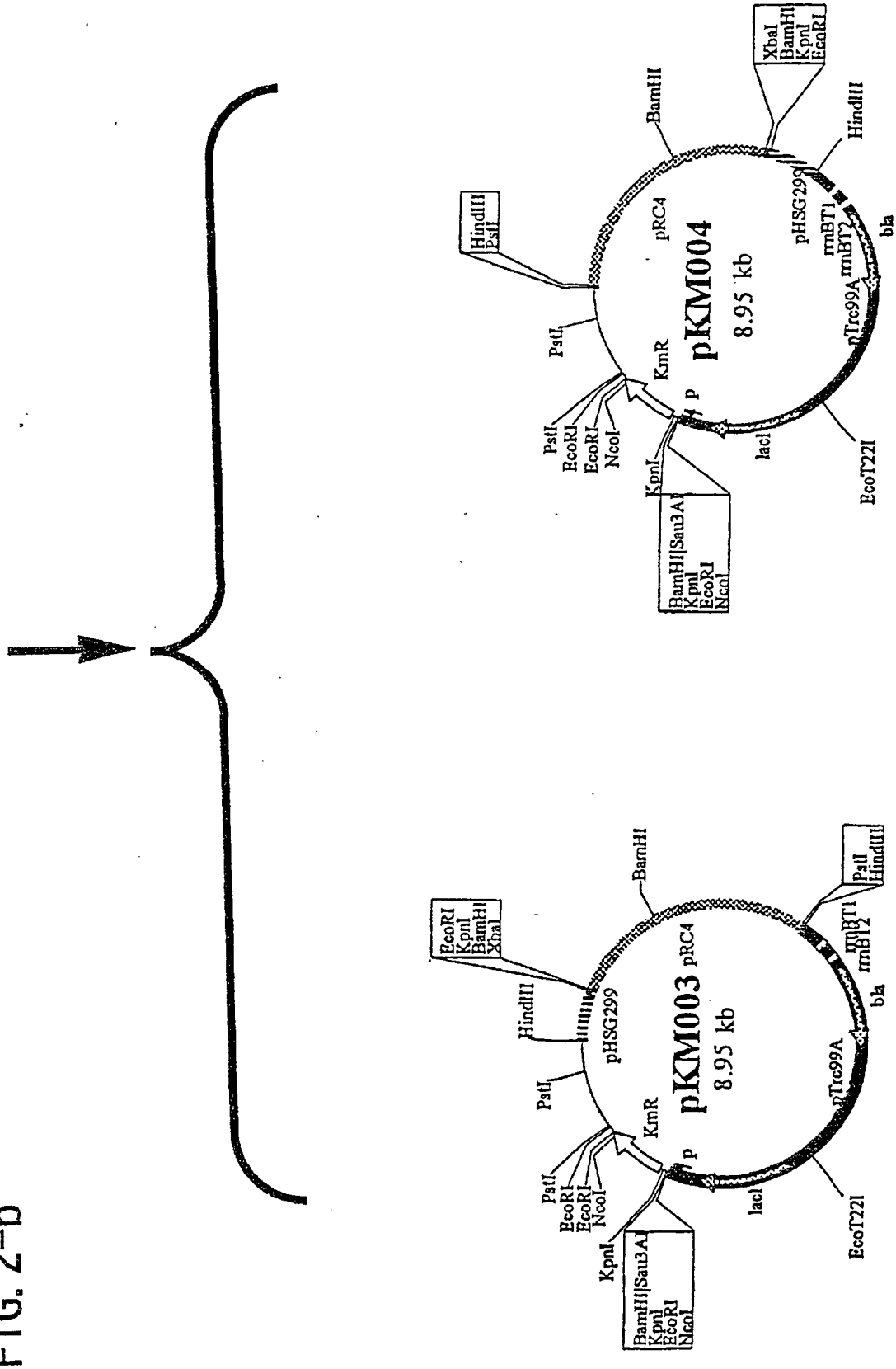
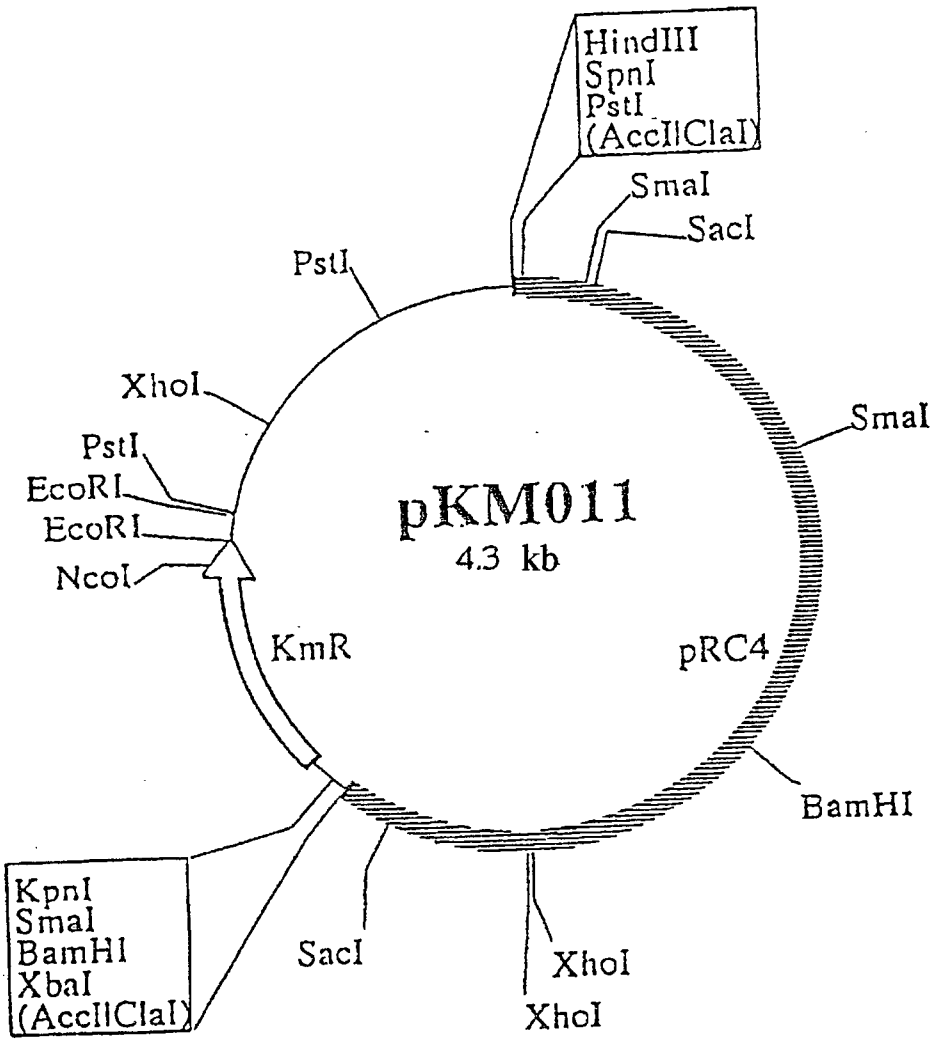

pKM004
8.95 kb
pRC4
pHSG299
KmR
lacI
pTrc99A
bla
rrnBT1
rrnBT2
EcoT22I
BamHI
HindIII
PstI
XbaI
BamHI
KpnI
EcoRI
PstI
EcoRI
EcoRI
NcoI
KpnI
BamHI|Sau3AI
KpnI
EcoRI
NcoI
pKM003
8.95 kb
pRC4
pHSG299
KmR
lacI
pTrc99A
bla
rrnBT1
rrnBT2
EcoT22I
BamHI
PstI
HindIII
EcoRI
KpnI
BamHI
XbaI
HindIII
PstI
EcoRI
EcoRI
NcoI
KpnI
BamHI|Sau3AI
KpnI
EcoRI
NcoI

FIG. 3


HindIII
SpnI
PstI
(AccIIClaI)
SmaI
SacI
PstI
XhoI
PstI
EcoRI
EcoRI
NcoI
KmR
pKM011
4.3 kb
SmaI
pRC4
BamHI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
(AccIIClaI)
SacI
XhoI
XhoI