(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 3 月 27 日(27.03.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/046111 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/075116

(22) 国際出願日: 2013 年 9 月 18 日(18.09.2013)

(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 2012-204882 2012 年 9 月 18 日(18.09.2012) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 米崎　哲朗(YONESAKI, Tetsuro); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 山田　威一郎, 外(YAMADA, Iichiro et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島６－２－４０　中之島インテス２１階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2014/046111 A1

(54) **Title**: VECTOR USING TOXIN-ANTITOXIN SYSTEM

(54) 発明の名称 : トキシン－アンチトキシン系を利用したベクター

(57) **Abstract**: The main problem addressed by the present invention is the provision of a vector that makes it possible to easily clone a target gene with a high degree of efficiency. This problem is solved by a cloning vector that: contains a base sequence for encoding a toxin that is arranged so as to be expressed under the control of a promoter; and that comprises a cloning site within the base sequence for encoding said toxin.

(57) 要約: 本発明は、高効率且つ簡便に目的の遺伝子をクローニングすることが可能なベクターを提供することを主な課題とする。 前記課題は、プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有する、クローニングベクターにより解決される。

明　細　書

発明の名称 ： トキシンーアンチトキシン系を利用したベクター

技術分野

[0001] 本発明は、トキシンーアンチトキシン系を利用した、遺伝子クローニング効率の高いベクターに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子クローニングは、目的の遺伝子を増幅するために利用される技術である。一般的に、遺伝子クローニングは、目的の遺伝子（又はその一部）のＤＮＡ断片をプラスミドベクターにつなぐ操作を行って宿主細胞である大腸菌に戻し（形質転換を行い）、大腸菌内で自律的にプラスミドを複製させ、このプラスミドが細胞分裂後の娘細胞にも分配されることから、このような細胞を培養することにより目的の遺伝子のＤＮＡ断片が導入されたプラスミドを大量に得る方法を指す。目的の遺伝子をプラスミドベクターにつなぐ操作は、実行者の技術レベル、確率等により左右され、熟練者が行った場合でも目的の遺伝子がつながらなかったプラスミドがバックグラウンドとして多く出現する。その結果、大量の候補の中から目的にかなうものを１つ見つけ出すために、多大な手間と時間を要することが問題となっている。

[0003] 大腸菌等の原核生物にはトキシンーアンチトキシン系（ＴＡ系）と呼ばれる防御機構が広く保存されていることが知られている（例えば、非特許文献１及び図１を参照）。ＴＡ系は、細胞毒性をもつトキシンとその毒性を中和するアンチトキシンの対、或いはそれらをコードする遺伝子の対を指す。トキシンはタンパク質であり、ｍＲＮＡを切断することによって遺伝子発現を抑制するエンドリボヌクレアーゼ、ＤＮＡ複製に必要なＤＮＡトポイソメラーゼの阻害因子、細胞分裂の阻害因子等の様々なタイプのものが知られている。また、ＴＡ系は、アンチトキシンがＲＮＡであり、トキシンのｍＲＮＡに対合して翻訳を阻害することでトキシンの発現を抑制する場合にはｔｙｐｅＩ；アンチトキシンがタンパク質であり、トキシンタンパク質に直接結合

することによって不活性化させる場合にはｔｙｐｅＩＩ；そして、アンチトキシンがＲＮＡであり、トキシンタンパク質に結合して毒性を阻害する場合にはｔｙｐｅＩＩＩと分類されている。いずれのタイプであってもアンチトキシン自身は極めて不安定な分子であるが、通常はトキシンｍＲＮＡ或いはトキシンタンパク質に対して過剰に生産されることで毒性の中和が保証されている。しかしながら、細胞が栄養飢餓などストレスに晒されることによってＴＡ系遺伝子の発現が低下した時に、不安定なアンチトキシンは優先的に消失してしまい、その結果トキシンが活性化して細胞増殖の停止や、細胞死をもたらす。

[0004] 例えば、特許文献１や非特許文献２には、ＴＡ系を利用した遺伝子クローニング技術が提案されている。これらの文献には、クローニングサイトを有するβガラクトシダーゼα（ＬａｃＺα）遺伝子と、トキシンであるｃｃｄＢをコードする遺伝子を融合して得られるベクターが開示されている。ｃｃｄＢは細胞毒性を有しており、アンチトキシン（解毒剤（ａｎｔｉｄｏｔｅ）とも呼ばれる）であるｃｃｄＡとＴＡ系を構成している。このベクターは、トキシン（又はトキシンの発現を制御するプロモーター）と融合させたＬａｃＺαドナー内にクローニングサイトを有しており、そこに目的遺伝子のＤＮＡ断片を導入することによってトキシンの発現が阻害されることに基づいてポジティブセレクションを行い、クローニング効率を高めるというものである。しかし、この方法は、トキシンをコードする塩基配列内に目的遺伝子のＤＮＡ断片を導入するものではない。また、ＬａｃＺα遺伝子の翻訳が下流に及ぶことによって目的遺伝子のＤＮＡ断片が翻訳されるため、途中でストップコドンが出現しなかったり、導入されたヌクレオチド数が３の倍数であると、翻訳がそのまま続行してｃｃｄＢ遺伝子の翻訳が正常に行われる可能性がある。従って、確実にクローニング効率を向上させるという観点からは十分な技術とは言えない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表平０８－５００４８４号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｙｏｓｈｉｈｉｒｏ　Ｙａｍａｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｍｉｃｏｒｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．９，Ｎｏｖ．２０１１，７７９－７９０

非特許文献2：Ｐｈｉｌｉｐｐｅ　Ｂｅｒｎａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｎｅｎｅ，１４８（１９９４）７１－７４

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、原核生物が有しているトキシンーアンチトキシン系を利用することによってバックグラウンドが顕著に低減され、高い効率で目的の遺伝子等を含むＤＮＡ断片をクローニングすることが可能なベクター、及び当該ベクターの製造方法等を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、原核生物に広く保存されるトキシンーアンチトキシン系（ＴＡ系）を含むプラスミドベクターにおいて、トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを作製して、クローニングの目的とするＤＮＡ断片（挿入ＤＮＡ断片）を導入することによって、細胞に対する毒性が消失するためにポジティブセレクションを容易に行うことができ、簡便且つ効率的にクローニング操作を行うことができることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて更に研究を重ねた結果完成されたものである。即ち、本発明は下記態様のベクター、形質転換体、ベクターの増幅方法、ベクターの製造方法、キット等を提供する。

[0009] 項１．プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有する、クローニングベクター。

項２．前記トキシンが、ｍａｚＦ、ｃｈｐＢＫ、ｈｉｃＡ、ｙｈａＶ、ｍｑｓＲ、ｒｎｌＡ、ｒｅｌＥ、ｙｏｅＢ、ｙａｆＯ、ｙａｆＱ、ｈｉｇＡ、ｃｂｔＡ、ｙｋｆＩ、ｙｐｊＦ、ｇｎｓＡ、ｈｉｐＡ、ｙｊｈＸ、ｙｄａＳ、ｓｙｍＥ、ｌｄｒＡ、ｌｄｒＢ、ｌｄｒＣ、ｉｂｓＡ、ｉｂｓＢ、ｓｈｏＢ、ｉｂｓＣ、ｉｂｓＤ、ｉｂｓＥ、ｌｄｒＤ、ｔｉｓＢ、ＩｓｏＡ、ｔｘｅ、ｐｅｚＴ、ｖａｐＣ－１、ｂｒｎＴ及びｃｃｄＢからなる群より選択される少なくとも１種である、項１に記載のクローニングベクター。

項３．更に薬剤耐性遺伝子及び／又は栄養要求性を相補する遺伝子を含む、項１又は２に記載のクローニングベクター。

項４．配列番号１に示される塩基配列を含む、項１～３のいずれかに記載のクローニングベクター。

項５．項１～４のいずれかに記載のクローニングベクターにおいて、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクター。

項６．項５に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

項７．プロモーターの制御下に発現するように配置され、内部にクローニングサイトを有するトキシンをコードする塩基配列を、宿主細胞内で複製可能なプラスミドベクター中に組込む工程、を含むクローニングベクターの製造方法。

項８．クローニングベクターの増幅方法であって、

（ｉ’）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクターを、前記トキシンに対して非感受性の宿主細胞へ導入する工程；及び

（ｉｉ’）前記工程（ｉ’）においてクローニングベクターが導入された宿主細胞を培養し、クローニングベクターを増幅する工程

を含む方法。

項９．前記トキシンに対して非感受性の宿主細胞が、トキシンに対するアンチトキシンを発現する細胞である、項８に記載の方法。

項１０．前記トキシンがｒｎｌＡであり、前記アンチトキシンがｒｎｌＢ又はｄｍｄである、項９に記載の方法。

項１１．下記工程を含む、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの製造方法：

（ｉ”）挿入ＤＮＡ断片を調製する工程；及び

（ｉｉ”）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクター中に前記挿入ＤＮＡ断片を導入し、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを得る工程。

項１２．更に下記工程を含む、項１１に記載の製造方法：

（ｉｉｉ”）前記組換えベクターを、前記トキシンに対して感受性の宿主細胞に導入し培養する工程；及び

（ｉｖ”）生存している宿主細胞を選択し、当該細胞から挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを得る工程。

項１３．組換えベクターを製造するためのキットであって、

（ａ）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクター、と

（ｂ）前記トキシンに対して感受性を有する宿主細胞

とを含むキット。

発明の効果

[0010] 本発明のプラスミドベクターを使用してクローニングを行うことにより、従来の方法よりもバックグラウンドが飛躍的に低減されるために、高い効率で目的のＤＮＡ断片を得ることができる。また、本発明のベクターを使用すれば、所望のＤＮＡ断片が導入されなかった形質転換体はトキシンによって細胞死が引き起こされるため、生存している細胞には必ず目的の遺伝子が導入されている。即ち、従来の方法では、バックグラウンドとして目的の遺伝

子が導入されなかったものが多く出現するために、１００～１万もの候補の中から目的にかなうものを１つ探し出す必要があったが、本発明によれば、このような作業や時間を省略することができ、簡便に目的の遺伝子のクローニングを行うことが可能である。

[0011] また、従来は取得しようとするＤＮＡ断片の量が微量である場合にはクローニングがほぼ不可能とされていた。前述のように、本発明のベクターを使用して形質転換体を得た場合、クローニングしようとするＤＮＡ断片が導入された形質転換体のみが生存するようにベクターを設計できることから、クローニングしようとするＤＮＡ断片の量がわずかであってもクローニングを行うことが可能である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]トキシンーアンチトキシン系の概念図を示す。図１中、P_{at}はアンチトキシンートキシンの遺伝子を転写するプロモーターを示す。

[図2]Ｔ４ファージｄｍｄによるアンチトキシン作用の概念図を示す。

[図3]ｒｎｌＡ遺伝子中の制限酵素サイトの候補を示す図である。

[図4]ｒｎｌＡ遺伝子の塩基配列（配列番号３）及び対応するアミノ酸配列（配列番号４）を示す図である。

[図5]実施例において構築されたトキシンをコードする塩基配列を含むクローニングベクターの概略図を示す。

[図6]実施例において構築されたｒｎｌＡ遺伝子を含むクローニングベクターの塩基配列を示す。図６中、小文字はｐＢＲ３２２由来の配列を示し、大文字は挿入されたｒｎｌＡプロモーターとｒｎｌＡ遺伝子の配列、及びｐＢＩｕｅｓｃｒｉｐｔのＭＣＲ（マルチクローニング領域）に由来する配列を示す。このうち、ｒｎｌＡプロモーターのー３５とー１０配列はイタリックにより示され、ｒｎｌＡ遺伝子配列は下線により示され、制限酵素ＳｐｈＩサイトは二重下線により示される。

発明を実施するための形態

[0013] 本明細書において、アミノ酸、ペプチド、タンパク質は、以下に示すＩＵ

ＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名委員会（ＣＢＮ）で採用された略号を用いて表される。

Ａ＝Ａｌａ＝アラニン、Ｃ＝Ｃｙｓ＝システイン、

Ｄ＝Ａｓｐ＝アスパラギン酸、Ｅ＝Ｇｌｕ＝グルタミン酸、

Ｆ＝Ｐｈｅ＝フェニルアラニン、Ｇ＝Ｇｌｙ＝グリシン、

Ｈ＝Ｈｉｓ＝ヒスチジン、Ｉ＝Ｉｌｅ＝イソロイシン、

Ｋ＝Ｌｙｓ＝リシン、Ｌ＝Ｌｅｕ＝ロイシン、

Ｍ＝Ｍｅｔ＝メチオニン、Ｎ＝Ａｓｎ＝アスパラギン、

Ｐ＝Ｐｒｏ＝プロリン、Ｑ＝Ｇｌｎ＝グルタミン、

Ｒ＝Ａｒｇ＝アルギニン、Ｓ＝Ｓｅｒ＝セリン、

Ｔ＝Ｔｈｒ＝スレオニン、Ｖ＝Ｖａｌ＝バリン、

Ｗ＝Ｔｒｐ＝トリプトファン、Ｙ＝Ｔｙｒ＝チロシ

[0014] また、特に明示しない限り、ペプチドおよびタンパク質のアミノ酸残基の配列は、左端から右端にかけてＮ末端からＣ末端となるように表される。

[0015] クローニングベクター

本発明のクローニングベクターは、プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有することを特徴とする。以下、本発明のクローニングベクターについて詳述する。

[0016] 本明細書において「トキシン（ｔｏｘｉｎ）」とは、細菌の染色体又はプラスミドＤＮＡにコードされたタンパク質からなる毒素を指す。また、トキシンには、対応する「アンチトキシン（ａｎｔｉｔｏｘｉｎ）」又は「アンチドート（ａｎｔｉｄｏｔｅ）」と呼ばれる抗毒素が存在する。前述のように、正常な状態では、トキシンによる細胞毒性をアンチトキシンが中和するため細菌は生存することができる。しかしながら、細菌がストレス環境下におかれると不安定なアンチトキシンが優先的に分解されることによってトキシンーアンチトキシンの均衡が崩れ、トキシンの毒性が発現して細胞死が引き起こされる。

[0017] これらトキシン及びアンチトキシンのタンパク質のアミノ酸配列、及びそれらをコードする遺伝子配列はすでに公知であり、本発明においてはいずれのトキシンを利用してクローニングベクターを作製してもよい。また、トキシンのタンパク質をコードする遺伝子は、その遺伝子配列に基づいて、大腸菌等のトキシンを有する微生物から通常の遺伝子工学の手法に従ってクローニングを行うことにより取得することができる。

[0018] 例えば、大腸菌Ｋ１２株においては下表１に示されるトキシン及びアンチトキシンのペアが知られている。なお、下表１に示されるアクセッション番号（ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ｎｏ．）はＥｃｏＣＹＣ：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｃｙｃ．ｏｒｇ／ｅｃｏｃｙｃ／ｉｎｄｅｘ．ｓｈｔｍｌ）に基づくものである。トキシンは全てタンパク質であるが、アンチトキシンはタンパク質又はＲＮＡである。表１中、アンチトキシンがタンパク質の場合はｔｙｐｅＩＩ、アンチトキシンがＲＮＡの場合はｔｙｐｅＩとして表記される。

[0019]

[表1]

トキシン	accession no.	アンチトキシン	accession no.	type
mazF	EG11249	mazE	EG10571	II
chpBK	EG12096	chpBI	EG11250	II
hicA	G0-10451	hicB	G6749	II
yhaV	G7629	prlF	EG10955	II
mqsR	G7572	mqsA	G7571	II
rnlA	G7365	rnlB	G7366	II
relE	EG11131	relB	EG10836	II
yoeB	G0-9121	yefM	EG12844	II
yafO	G6117	yafN	G6116	II
yafQ	G6109	dinJ	G6110	II
higA	G7601	higB	G7602	II
cbtA	G7085	yeeU	G7084	II
ykfI	G6120	yafW	G6121	II
ypjF	G7381	yfjZ	G7380	II
gnsA	G0-9662	ymcE	G6512	II
hipA	EG10443	hipB	EG10442	II
yjhX	G0-10473	yjhQ	G7917	II
ydaS	G6681	ydaT	G6682	II
symE	G7940	symR	G0-10610	I
ldrA	G0-9602	rdlA	G0-9603	I
ldrB	G0-9605	rdlB	G0-9606	I
ldrC	G0-9607	rdlC	G0-9608	I
ibsA	G0-10633	sibA	G0-8884	I
ibsB	G0-10632	sibB	G0-8885	I
shoB	G0-10634	ohsC	G0-10598	I
ibsC	G0-10631	sibC	G0-8886	I
ibsD	G0-10630	sibD	G0-8913	I
ibsE	G0-10629	sibE	G0-10602	I
ldrD	G0-9041	rdlD	G0-9042	I
tisB	G0-9962	lstR	EG10547	I

[0020] また、上記表１に示されるトキシン及びアンチトキシンのホモログも本発明におけるトキシンとして利用することができる。このようなトキシン及び

アンチトキシンのペアは下表２に例示される。また、下表２に示されるアクセッション番号は（ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ｎｏ．）は、Ｇｅｎｂａｎｋ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｎｂａｎｋ／）に基づくものである。

[0021] [表2]

由来	トキシン	accession no	アンチトキシン	accession no.
大腸菌O-157 株	IsoA	NP_052606	IsoB	NP_052605
エンテロコッカス・ファシエンス pRUM プラスミド	txe	ADV60046	axe	ADV60047
ストレプトコッカス・ニューモニエ	pezT	ADX31253	pezA	ADX31251
ヘモフィルス・インフルエンザ	vapC－１	Q4QNL7	vapB－１	Q4QNL8
ブルセラ・アボルタス	brnT	CAJ10949	brnA	CAJ10950
大腸菌 K12のプラスミドである F 因子	ccdB	AAA96062	ccdA	AAA96061

[0022] 上記表１及び２において具体的に示されるトキシンには未だ機能が明らかになっていないものも含まれているが、例えば、エンドヌクレアーゼ作用を有するもの（例えば、ｍａｚＦ、ｃｈｐＢＫ、ｙｈａＶ、ｍｑｓＲ、ｒｎｌＡ、ｒｅｌＥ、ｙｏｅＢ、ｙａｆＯ、ｙａｆＱ、ｓｙｍＥ、ＩｓｏＡ、ｔｘｅ、ｖａｐＣ－１、ｂｒｎＴ）、ＤＮＡトポイソメラーゼの阻害因子（例えばｃｃｄＢ）、細胞壁合成の阻害因子（例えばｐｅｚＴ）、細胞骨格蛋白質の阻害因子（例えばｃｂｔＡ）として作用するものが知られている。これらのトキシンの中でも好ましくは、エンドヌクレアーゼ作用を有するトキシンが挙げられ、より具体的には、ｒｎｌＡが本発明において好適なトキシンとして挙げられる。

[0023] これらのトキシンをコードする塩基配列を１種単独で使用することもでき、２種以上を組合せてプラスミドベクターに挿入することもできる。

[0024] 本発明においては、トキシンをコードする塩基配列内にクローニングの目的とするＤＮＡ断片を導入することによってトキシンの機能を失わせ、目的とするＤＮＡ断片が組み込まれたクローンを選択する手間を大幅に削減でき

ることを特徴としている。従って、トキシンをコードする塩基配列内に前記ＤＮＡ断片を導入することが可能なクローニングサイト（制限酵素サイト）が含まれている必要がある。または、トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトが存在すれば、これを利用して前記ＤＮＡ断片を導入することができる。例えば、大腸菌Ｋ１２株の場合ではｒｎｌＡ遺伝子中に一か所クローニングサイトとして利用できる部位（具体的には、図３に示されるヌクレオチド番号第８１０位のＳｐｈＩ制限酵素サイト）が存在し、これを利用することができる。或いは、トキシンをコードする塩基配列のアミノ酸配列を変更せずに塩基配列を変えて所望のクローニングサイトを予め作製しておいてもよい。

[0025] クローニングサイトを導入する位置は、クローニングの目的とするＤＮＡ断片が導入された場合にトキシンが細胞に対する毒性を失う部位であれば特に限定されず、例えば、トキシンをコードする塩基配列において細胞毒性を生じる機能を担う部位に導入することができる。塩基配列中で細胞毒性を担う部位は各トキシンによって異なり、使用するトキシンの種類に応じて適宜、前記ＤＮＡ断片の導入部位（即ちクローニングサイト）を設定すればよい。トキシンをコードする塩基配列において細胞毒性を生じる機能を担う部位は、複数種の細菌に保存されているトキシンのアミノ酸配列を比較し、保存度の高いアミノ酸配列は毒性を担う可能性が高い部位であると予測することができる。例えば、トキシンがｒｎｌＡの場合であれば、第５５～９６９塩基、好ましくは第２６８～９６９塩基の領域が他の細菌と比較して保存性が高く、クローニングサイトを導入する部分を含む領域として好適である。クローニングサイト（制限酵素サイト）としては、公知のものから適宜選択すればよく、例えばＥｃｏＲＩ、ＳｍａＩ、ＰｓｔＩ、ＡｖａＩ、ＣｌａＩ、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＫｐｎＩ、ＳａｃＩ、ＳａｃＩＩ、ＳａｌＩ、ＸｂａＩ等が挙げられるが、これらに限定されない。但し、塩基配列を変更することによりＲａｒｅ　ｃｏｄｏｎとなるものについては、トキシンの効果が減弱される可能性があるため、このような塩基配列の変更は避けることが好ましい

。変更後の塩基配列がＲａｒｅ　ｃｏｄｏｎに該当するか否かは、Ｒａｒｅ　ｃｏｄｏｎ　ｓｅａｒｃｈ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｌｉｎｅ．ｃｏｍ／ｃａｌｃｕｌａｔｏｒ／０１＿１１．ｈｔｍｌ）等のＲａｒｅ　Ｃｏｄｏｎ解析ツールを利用して確認することができる。

[0026] また、上述の細胞毒性を生じる機能を担う部位以外であっても、トキシンタンパク質の立体構造を変化させ得る部位にクローニングサイトを導入することによってトキシンの毒性を失わせることも可能である。タンパク質の立体構造を変化させ得る部位は、アミノ酸配列やアミノ酸残基の側鎖の性質等に基づきバイオインフォマティクスの手法を利用して予測することができる。

[0027] 好適な例として、ｒｎｌＡ遺伝子の塩基配列中に形成可能なクローニングサイト（制限酵素サイト）の具体例を図３に示す。

[0028] 或いは、変異を導入することによってトキシンの毒性が消失する部位に基づいて、クローニングの目的とするＤＮＡ断片を導入するためのクローニングサイトを形成してもよい。例えば、本発明者らはトキシンであるｒｎｌＡ遺伝子の塩基配列において特定の位置の塩基を置換することにより、ｒｎｌＡ遺伝子の毒性が消失することを確認している。具体的な塩基の位置と種類、及び対応するアミノ酸については以下の通りである（ヌクレオチドの変異（左側に元の塩基、右側に変異後の塩基）、及びそれに伴うアミノ酸の置換（左側に元のアミノ酸、右側に変異後のアミノ酸）を示す）。

Ｇ５５Ａ　：Ｅ１９Ｋ

Ｇ２６８Ａ：Ｅ９０Ｋ

Ｃ３７０Ｔ：Ｈ１２４Ｙ

Ｃ４９９Ｇ：Ｐ１６７Ｒ

[0029] また、トキシンのホモログ間で保存されている塩基配列中にクローニングサイトを形成してもよい。具体的には、ｒｎｌＡであれば図４に示されるアミノ酸配列において第３１１～３２３残基（ヌクレオチド番号で９３１～９６９）の範囲に全てのｒｎｌＡホモログで保存されている領域が存在する。

例えば、大腸菌Ｏ１５７株のｒｎｌＡトキシンホモログであるＬｓｏＡにおいて図４に示されるアミノ酸配列中の第３１８番目に対応するアミノ酸アルギニン（Ｒ）をリジン（Ｌ）に置換する変異を導入するとｒｎｌＡトキシンの毒性が消失する。

[0030] 特定の部位にクローニングサイトを形成する方法としては特に限定されず、従来公知の方法に基づいて実施することが可能であるが、例えば、コドンの縮重を利用して配列を改変し、改変した配列に制限酵素部位が現れるような配列を設計する方法が挙げられる。このように設計された配列を有するオリゴＤＮＡをプライマーとしてトキシンの残りの配列をＰＣＲによってつなげることで目的の改変トキシン遺伝子を構築することができる。

[0031] 本発明のクローニングベクターにおいて、前述のクローニングサイトを含むトキシンをコードする塩基配列は、プロモーターの制御下に発現するように配置されている。ここで、「プロモーター」とは、ＲＮＡポリメラーゼが結合することによって目的とするＤＮＡ断片を発現することが可能な転写開始に関与するＤＮＡ上の特定領域の塩基配列のことである。プロモーターとしては、このような機能を有する塩基配列であれば特に限定されるものでなく、大腸菌等のクローニングベクターを増幅するための宿主細胞中でトキシンを発現することが可能なプロモーター領域を用いることができる。本発明においてはプロモーターとして公知のものから適宜選択して使用することができ、具体的には、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、Ａｒａプロモーター、ｒｎｌＡプロモーター等の大腸菌やファージに由来するプロモーターが例示される。また、ｔａｃプロモーター、Ｔ７プロモーター、ＰｌｅｔＩプロモーター等の人工的に設計改変が加えられたプロモーターを使用してもよい。

[0032] また、公知のプロモーター領域を構成するＤＮＡ塩基配列からなる領域に１若しくは複数個（好ましくは２～３個、更に好ましくは１個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されたＤＮＡ塩基配列であって、ＲＮＡポリメラーゼにより制御を受けることが可能な塩基配列も本発明におけるプロモー

ターとして包含される。

[0033] 本発明のクローニングベクターは、宿主細胞内で複製可能な公知のプラスミドベクター、シャトルベクター等のベクターに前記プロモーター配列及びトキシンをコードする塩基配列を挿入して得ることができる。また、前述のプロモーターや、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子等の選択マーカーをもともと有しているベクターを使用してもよい。このような選択マーカーは公知であり、薬剤耐性遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子が例示される。また栄養要求性を相補する遺伝子としては、ヒスチジン等の各種アミノ酸やウラシル等の各種塩基に対する要求性を相補する遺伝子が例示される。また、ベクターは、他に、リボソーム結合領域、ターミネーター領域等を含んでいてもよい。ベクターに挿入される配列として具体的には配列番号１で示される塩基配列が例示される。

[0034] 本発明において使用されるプラスミドベクターとして具体的には、ｐＵＣ１１８、ｐＵＣ１８、ｐＢＲ３２２、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ、ｐＧＷ７等の原核生物細胞において複製可能なプラスミドベクターが例示される。また、原核生物と真核生物の両方において複製可能なベクターとしてシャトルベクターを使用することができ、具体的には、ｐＳＢＩ４０等が例示される。これらのベクターが有しているマルチクローニングサイト（ＭＳＣ）中に、トキシンをコードする塩基配列内に導入しようとするクローニングサイト（制限酵素サイト）と同じものが含まれている場合には、予めＭＳＣ中の該当するクローニングサイト（制限酵素サイト）を除去しておくことが望ましい。また、本発明のクローニングベクターには、トキシン遺伝子、プロモーター配列等をクローニングする際に使用されたベクターに由来する配列が含まれていてもよい。これらのベクター中にプロモーター配列、トキシンをコードする塩基配列等を導入する方法は特に限定されず、従来公知の方法に従えばよいが、例えば、制限酵素及びリガーゼを用いて順次連結して作製すれば

よい。また、必要に応じてＰＣＲ増幅法を組み合わせてもよい。

[0035] このようにして構築されたクローニングベクターを、必要に応じて増幅させてからクローニングの目的とするＤＮＡ断片を導入してもよい。増幅させる場合には、前記クローニングベクターを宿主細胞に導入し、これを増殖させることによって行う。この時、宿主細胞としては、通常、導入されるクローニングベクターにより発現されるトキシンに対して非感受性であるものから適宜選択して使用することができ、例えば、エシェリヒア属、クレブシエラ属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属等に属する微生物が例示され、好ましくはエシェリヒア属に属する微生物が挙げられる。また、トキシンをコードする塩基配列を含むクローニングベクターは、アンチトキシンの存在下で増幅させる必要があるため、好ましくはＴＡ系を有する微生物が挙げられる。或いは、後述のようにＴ４ファージｄｍｄを利用することによりＴＡ系を有していない微生物細胞をクローニングベクターの増幅のための宿主細胞とすることもでき、例えば、酵母等の真核生物細胞を使用することもできる。

[0036] ＴＡ系を有するエシェリヒア属に属する微生物として、具体的には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＸＬ２－Ｂｌｕｅ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ１、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＣ１０００、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＫＹ３２７６、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｗ１４８５、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＪＭ１０９、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＨＢ１０１、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｎｏ．４９、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｗ３１１０、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＮＹ４９、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５等が例示される。

[0037] ＴＡ系を有していない宿主細胞中でクローニングベクターを増幅すると、トキシンによる細胞毒性が中和されないために細胞死が引き起こされるので、そのままではクローニングベクター増幅用の宿主として使用することがで

きない。また、ＴＡ系を有する宿主細胞であっても、クローニングベクターのコピー数が多い（例えば、２００～３００コピー）場合には、宿主細胞が本来保持しているアンチトキシン量では、宿主細胞中に本来存在するトキシンとクローニングベクターにより発現されるトキシンの細胞毒性の中和が不十分となり細胞死が引き起こされる場合がある。しかし、このような場合であっても、アンチトキシン作用を有するポリペプチドを、宿主細胞中で発現させることによりクローニングベクターの増幅を行うことができる。より具体的には、例えばトキシンをコードする塩基配列としてｒｎｌＡ遺伝子を使用する場合であれば、宿主細胞中でｄｍｄポリペプチドを発現させる方法が挙げられる。ｄｍｄは、ｒｎｌＡトキシンに対するアンチトキシンｒｎｌＢと同等の作用を有していることが確認されている（図２及びＹｕｉｃｈｉ Ｏｔｓｕｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ（２０１２），８３（４），６６９－６８１を参照）。ｄｍｄ遺伝子はクローン化されており、従来公知の方法に従って宿主細胞中で発現させることができ、例えば、プラスミドベクターを利用して宿主細胞中で発現させてもよく、或いはｄｍｄ遺伝子を宿主ＤＮＡ中に組み込ませて細胞内で発現させてもよい。しかし、前者のプラスミドベクターを利用する方法では２種類のベクターが宿主細胞中に存在することになるため、後者の宿主ＤＮＡ中に組み込む方法を採用することが望ましい。

[0038] また、突然変異等によりトキシンに対して耐性を獲得した宿主細胞を用いてクローニングベクターの増幅を行うこともできる。このような細胞として具体的には、ＤＮＡ複製に必須の酵素であるＤＮＡジャイレースＧｙｒＡポリペプチドのアミノ酸配列においてアルギニン４２６がシステインに変異することによりｃｃｄＢ（ＤＮＡトポイソメラーゼＩＩに毒性を有するトキシン）に対して耐性を獲得した大腸菌株が例示される。

[0039] また、例えば、ベクターとしてシャトルベクターを使用することにより酵母等の真核生物の細胞においても本発明のクローニングベクターの増幅を行うことも可能である。真核生物の細胞におけるクローニングベクターの増幅

に際しては、使用する細胞の種類に応じてクローニングベクターの複製に必要となる配列をクローニングベクターのＤＮＡ配列中に適宜付加して行うことができる。例えば、クローニングベクターを増幅するための宿主細胞として酵母を使用する場合、ｔｗｏ　ｍｉｃｒｏｎ　ＤＮＡの複製起点配列等を付加すればよい。

[0040] 宿主細胞中へのクローニングベクターの導入方法は、従来公知の方法に従って実施され得るが、例えば、コンピテントセルの使用、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、これらの宿主細胞の培養条件は、クローニングベクターが増幅され得る限り、使用する宿主細胞の種類に応じて従来公知の条件に基づいて適宜設定することができ、特に限定されないが、例えば大腸菌を宿主細胞とする場合であれば、ＬＢ培地、３７℃、播種濃度１～１０^{8}／ｍｌで１６～２４時間培養することによりクローニングベクターを増幅させることができる。また、必要に応じて培地にアンピシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0041] 更に、増幅したクローニングベクターを必要に応じてアルカリ法（Ｂｉｒｎｂｏｉｍ，Ｈ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．ｖｏｌ７，１５１３（１９７９））やボイル法（Ｈｏｌｄｅｓ，ｄ．ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．ｖｏｌ１１４，１９３（１９８１））等の公知の精製工程に供してもよい。簡便には商業的に入手可能なプラスミド精製キットを使用してもよい。また、必要に応じて、ＤＮＡシーケンス、トキシンの毒性を調べるためのバイオアッセイ（具体的には、アンチトキシンを有していない細胞にトランスフェクションして細胞の生存率を評価する方法等が例示される）等によりトキシンをコードする塩基配列が正しく挿入されているかどうかを確認してもよい。

[0042] 組換えベクター

本発明は、所望のＤＮＡ断片をクローニングするために使用される、前記トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを提供する。即ち、本発明の組換えベクターは、前述のクローニングベクター

のトキシンをコードする塩基配列中にクローニングの目的とするＤＮＡ断片が導入されたものである。挿入ＤＮＡ断片としては本発明の組換えベクターによりクローン化が可能なＤＮＡ断片であれば特に限定されない。本発明において組換えベクターに導入され、クローニングに供される前記挿入ＤＮＡ断片は、特定のタンパク質をコードする塩基配列（即ち遺伝子）に加え、特定のタンパク質の一部をコードするＤＮＡ塩基配列（即ち、遺伝子の一部）を含み、更にはタンパク質をコードしない塩基配列をも含むものとする。

[0043] 本発明に係るベクターに組込まれる挿入ＤＮＡ断片としては、例えば、通常１００～２００００ｂｐ、好ましくは５００～１００００ｂｐ、更に好ましくは１０００～５０００ｂｐの大きさのものが例示される。挿入ＤＮＡ断片の取得方法は特に限定されず、従来公知の方法に従えばよいが、例えば、染色体ＤＮＡを制限酵素で消化することによって切断し、ＤＮＡ断片として得ることができる。また、ＰＣＲによって増幅された特定の遺伝子の塩基配列をもつＤＮＡ断片として得ることもできる。ＤＮＡ断片の単離方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌ ”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ” Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ ＨａｒｂｏｒＬａｂｏｒｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ等に記載される。

[0044] 本発明において挿入ＤＮＡ断片はクローニングの目的とするＤＮＡ断片そのものであってもよく、当該ＤＮＡ断片とプロモーター、それらに加えて真核生物の場合はポリＡ付加領域を含む発現単位の形態であってもよい。また、例えば、特定の遺伝子のＤＮＡ断片の一部しか含まれていないもののように、発現単位として不完全な形態であってもよい。トキシンをコードする塩基配列内に導入されるクローニングの目的とするＤＮＡ断片は、１種類でもよく、又は２種類以上であってもよい。

[0045] 発現単位に含まれるプロモーターとしては、形質転換体を作製する際に前記組換えベクターが導入される細胞種に応じて公知のプロモーター配列から適宜選択して使用することができる。プロモーターとして具体的には、前述の大腸菌やファージ由来のプロモーターを使用することもでき、他に、ｇａ

Ｉ１プロモーター、ｇａｌ１０プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、ＭＦαプロモーター、ＣＵＰ１プロモーター等の酵母菌株中で発現し得るプロモーター；サイトメガロウイルスのＩＥ（Ｉｍｍｉｄｉａｔｅ　Ｅｒａｌｙ）遺伝子プロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、メタロチオネインプロモーター等の動物細胞中で発現し得るプロモーターが例示される。また、公知のプロモーター領域を構成するＤＮＡ塩基配列からなる領域に１若しくは複数個（好ましくは２～３個、更に好ましくは１個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されたＤＮＡ塩基配列であって、ＲＮＡポリメラーゼにより制御を受けることが可能な塩基配列も本発明におけるプロモーターとして包含される。

[0046] また、「ポリＡ」とは、ｍＲＮＡの３’末端に付加した２０～２００塩基のアデニン（Ａ）ヌクレオチドのことをいう。本願におけるポリＡは、好ましくは５０～２００塩基のアデニン（Ａ）ヌクレオチドをいい、より好ましくは１００～２００塩基のアデニン（Ａ）ヌクレオチドをいう。また本発明における発現単位は、その他の配列、例えば、複製起点、Ｋｏｚａｋ配列、ＵＴＲ領域、ターミネーター領域、エンハンサー領域、分離精製用タグ、選択マーカー（前述の薬剤耐性遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子等）等を含むものであってもよい。

[0047] 発現単位は、クローニングの目的とするＤＮＡ断片にプロモーター領域及びポリＡ付加領域を付加することにより作製することができ、或いは、ＤＣＣ法、リン酸トリエステル法、ホスファイト法、アミダイト法等の核酸の化学合成法によって作製することもできる。また、発現単位を構成するプロモーター領域、クローニングの目的とするＤＮＡ断片、ポリＡ付加領域等の各塩基配列を化学的合成法、又はクローニング法によって個々に調製し、これらを制限酵素及びリガーゼを用いて順次連結して作製することもできる。また、必要に応じてＰＣＲ増幅法を組み合わせてもよい。

[0048] 挿入ＤＮＡ断片を前述のトキシンをコードする塩基配列中へ導入する方法は特に限定されず、トキシン遺伝子に含まれるクローニングサイト（制限酵

素サイト）の種類に対応する制限酵素を用いて挿入ＤＮＡ断片、及びクローニングベクターを処理し、リガーゼを用いてクローニングサイトに導入することができる。

[0049] 本発明において挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの選択は、当該挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターにより形質転換された場合には宿主細胞が生存し、当該挿入ＤＮＡ断片を含まない組換えベクターにより形質転換された場合にはトキシンの細胞毒性によって宿主細胞の細胞死が引き起こされることに基づいて行う。従って、組換えベクターの選択において、宿主細胞としては前記クローニングベクターに挿入されるトキシンに対して感受性の細胞を使用する。例えば、トキシンｒｎｌＡに対する感受性を有する細胞としては、ＯＳ０３６（＝Ｗ３１１０　Δｒｎｌ ＡＢ（ｒｎｌＡとｒｎｌＢの欠失変異体））、ＴＹ０８０２（＝ＭＨ１　Δｒｎｌ ＡＢ）、元々ｒｎｌＡＢを有していない大腸菌Ｂ株等が挙げられる。また、トキシンｍａｚＦに対する感受性を有する細胞としては、ＴＹ０９０１（ＭＨ１　ΔｍａｚＥＦ）が挙げられる。また、宿主細胞の培養条件は、使用する宿主細胞の種類に応じて従来公知の条件に基づいて適宜設定することができ、前述のクローニングベクターの増幅の際に採用される培養条件と同様の条件下で培養を行ってもよい。また、宿主細胞中への組換えベクターの導入方法についても上記クローニングベクターの場合と同様に行うことができる。

[0050] 挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの選択において、宿主細胞中にアンチトキシンが存在すると、挿入ＤＮＡ断片を含まないベクターが導入された細胞（バックグラウンド）も生存してしまう。従って、組換えベクターの選択には、クローニングベクターに含まれるトキシンに感受性の細胞を用いるか、或いは、前述のクローニングベクターに含まれるトキシンをコードする塩基配列（トキシン遺伝子）に対応する、宿主細胞が有しているアンチトキシン遺伝子を予めノックアウトして用いる。アンチトキシン遺伝子のノックアウトは、従来公知の方法を採用して実施することができ、例えばＫｏｇａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１１０，１２３－１３０及

びＤａｔｓｅｎｋｏ ａｎｄ Ｗａｎｎｅｒ（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９７，６６４０－６６４５等に記載される方法に基づいて行うことができる。宿主細胞がアンチトキシンを有しているかどうかについては、各細胞のゲノム情報に基づいて確認することができる。

[0051] 本発明の組換えベクターによれば、挿入ＤＮＡ断片を含まないクローン（即ちバックグラウンド）の出現率が従来の１万分の１以下にまで低下するか、好ましくはバックグラウンドが出現しないため、多数の候補クローンから挿入ＤＮＡ断片を含むクローンを選択する必要がない。従って、本発明によれば、挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの作製及び選択の手間や時間を大幅に削減することができる。但し、ＤＮＡシーケンス等を行い得られた組換えベクターに挿入ＤＮＡ断片が含まれていることを確認することを制限するものではない。

[0052] 挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを選択する方法は、宿主細胞の生存や増殖を確認できる方法であれば特に限定されず、使用する宿主細胞の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、宿主細胞として大腸菌を用いた場合であれば、寒天培地上に播種して得られるコロニーから従来公知の方法に従ってプラスミドベクターとして組換えベクターを取得することができる。また、より簡便には、コロニーを形成させずに挿入ＤＮＡ断片を含むクローン（宿主細胞）を得ることができる。例えば、宿主細胞として大腸菌を用い、液体培地中で培養すれば、挿入ＤＮＡ断片がトキシンをコードする塩基配列内に導入されなかった大腸菌は死滅し、液体培地中に生存している全ての大腸菌には挿入ＤＮＡ断片が含まれることから、生存している大腸菌を分離し、更にプラスミドベクターとして組換えベクターを取得することができる。

[0053] 形質転換体

本発明は、前記組換えベクターを含む形質転換体を提供する。当該形質転換体は、前記組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる。本発明の組換

えベクターを導入する細胞としては、前記組換えベクターに適合し、形質転換され得る細胞であればその由来や種類は特に限定されず、原核細胞又は真核細胞のいずれであってもよい。細胞としては、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｌｉｓｔｏｎｅｌｌａ ａｎｇｕｉｌａｒｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓｋ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ等の原核生物細胞；酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓａｒ、Ｓｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ ｐｕｌｌｕｌａｎｓ、Ｓｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ａｌｌｕｖｉｕｓ等）、動物細胞（例えば、ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞、ＨｅＬａ細胞、Ｖｅｒｏ細胞等）、植物細胞（ＢＹ－２細胞等）、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９、Ｓｆ２１、Ｔｎ５等）等の真核生物細胞が例示される。これらの中でも好ましい細胞種としては原核生物細胞が挙げられ、具体的には前述のクローニングベクターの増幅において宿主細胞として使用される大腸菌が例示される。

[0054] 本発明の組換えベクターを細胞へ導入し、形質転換体を得る方法は、当業者に公知の遺伝子導入法を採用することができ、特に限定されない。遺伝子導入法としては、例えば、コンピテントセルの使用、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等を挙げることができる。これらの方法で得られた形質転換体の培養は、細胞の種類に応じて従来公知の培養条件等に基づいて適宜行うことができる。

[0055] 例えば、大腸菌等の原核生物又は酵母等を宿主として得られる形質転換体を培養する場合、培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

[0056] 炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フ

ラクトース、スクロース、デンプン若しくはデンプン加水分解物等の炭水化物；酢酸、プロピオン酸等の有機酸；エタノール、プロパノール等のアルコール類等が挙げられる。また、窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸；有機酸のアンモニウム塩；その他の含窒素化合物；ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物等が例示される。

[0057] 無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

[0058] 培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は３０～４０℃、培養時間は通常２～１６時間、培養液のｐＨ６～８が通常の培養条件として例示される。ｐＨの調整は、公知の無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行うことができる。また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0059] 例えば、動物細胞を宿主として得られる形質転換体を培養する場合、培地としては、具体的には、ＲＰＭＩ１６４０培地、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地等、又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が挙げられる。培養条件としては、通常５％CO_2、３５～３７℃の条件下で行うことができ、培養時間は、通常２～１０日間である。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0060] クローニングベクターの製造方法

本発明は、プロモーターの制御下に発現するように配置され、内部にクローニングサイトを有するトキシンをコードする塩基配列を、宿主細胞内で複製可能なプラスミドベクター中に組込む工程、を含むクローニングベクターの製造方法、を提供する。本方法において、トキシンをコードする塩基配列、プラスミドベクター、及びトキシンをコードする塩基配列をプラスミドベ

クター中に組み込む方法等については上記「クローニングベクター」に記載の通りである。

[0061] クローニングベクターを増幅する方法

本発明は、下記工程を含むクローニングベクターを増幅する方法を提供する。

（ｉ’）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクターを、前記トキシンに対して非感受性の宿主細胞へ導入する工程；及び（ｉｉ’）前記工程（ｉ’）においてクローニングベクターが導入された宿主細胞を培養し、クローニングベクターを増幅する工程。

[0062] 本方法においてクローニングベクター、トキシンに対して非感受性の宿主細胞、当該宿主細胞の培養等については、上記「クローニングベクター」に記載の通りである。

[0063] トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの製造方法

下記工程を含む、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの製造方法：

（ｉ”）挿入ＤＮＡ断片を調製する工程；及び

（ｉｉ”）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクター中に前記挿入ＤＮＡ断片を導入し、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを得る工程。

[0064] 本発明の組換えベクターの製造方法は、挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの増幅及び選択のために、更に以下の工程を含んでもよい。

（ｉｉｉ”）前記組換えベクターを、前記トキシンに対して感受性の宿主細胞に導入し培養する工程；及び

（ｉｖ”）生存している宿主細胞を選択し、当該細胞から挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを得る工程。

[0065] 本発明の検出方法において挿入ＤＮＡ断片、クローニングベクター、組換えベクター、トキシンに対して感受性の宿主細胞、挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの選択方法等については、上記「クローニングベクター」及び「組換えベクター」の欄に記載の通りである。

[0066] 組換えベクターを製造するためのキット

本発明は、以下を含む組換えベクターを製造するためのキットを提供する。

（ａ）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクター、と

（ｂ）前記トキシンに対して感受性を有する宿主細胞。

[0067] クローニングベクター及びトキシンに対して感受性の宿主細胞は上記「クローニングベクター」及び「組換えベクター」の欄に記載の通りである。また、本発明のクローニングキットは、更に、宿主細胞を培養するための培地、緩衝溶液、制限酵素、ＤＮＡリガーゼ、シーケンスプライマー等を含んでいてもよい。

実施例

[0068] 以下、実施例及び比較例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0069] トキシンをコードする塩基配列を含むクローニングベクターの構築

大腸菌株（Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０株）から、プライマー（5’末端をリン酸化した２つのプライマー５’－ａｔｇｔｔｔｃｔａｔｇｇｇａｔｃｃａｇ－３’（配列番号５）及び５’－ｇｃｔａｔｔｔｇａｔｃａｔａｔｔｇｇａｃ－３’（配列番号６））を用いて、ＰＣＲ法（９４℃　３秒、５０℃　３秒、７２℃　１．５分　を３０サイクル。ＤＮＡポリメラーゼとしてＫＯＤ－ｄａｓｈ（ＴＯＹＯＢＯ製）を使用した。）によりトキシン（ｒｎｌＡ）

をコードする遺伝子断片を増幅した。得られたｒｎｌＡ遺伝子断片をプラスミドベクター（ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ＋（国立遺伝学研究所より入手））（５０ｎｇ／μｌ）をＥｃｏＲＶ制限酵素処理および５’端の脱リン酸化に供しＬｉｇａｔｉｏｎ　ｍｉｘ（日本ジーン社製）を使用して、ｒｎｌＡ遺伝子断片（３０ｎｇ／μｌ）と共にライゲーションを行い、ｒｎｌＡ遺伝子断片を含むｐＢＳＮＯを得た。

[0070] ｒｎｌＡプロモーター配列は以下のようにクローニングした。大腸菌Ｗ３１１０株のＤＮＡを鋳型とし、５’－ｃｇａｔｃｇａｔｇｔｔｇｃｔｇｃｔｔｇｇ－３’（フォワードプライマー：配列番号７）、及び５’－ｃｇａａｇｃｃａｇｃｃｃｔｔｇａｃｃｃ－３’（リバースプライマー：配列番号８）をプライマー、ＤＮＡポリメラーゼとしてＫＯＤ－ｄａｓｈ（ＴＯＹＯＢＯ製）を用いたＰＣＲにより得られたｒｎｌＡプロモーター断片を制限酵素のＣｌａＩとＢａｍＨＩの処理に供した。またｐＢＲ３２２（５０ｎｇ／μｌ）を同様の制限酵素処理に供した後に、ｒｎｌＡプロモーター断片（２０ｎｇ／μｌ）と共に日本ジーン社のＬｉｇａｔｉｏｎ　ｍｉｘを用いたライゲーションを行ってｒｎｌＡプロモーター断片を含むｐＢＲｐを得た。ｐＢＲｐの有するＥｃｏＲＩ部位を破壊するために、ＥｃｏＲＩで切断した後にＴ４ＤＮＡポリメラーゼにより平滑化を行い、セルフライゲーションによってｐＢＲｐ＊を得た。

[0071] 前記ｐＢＳＮＯをＢａｍＨＩとＳａｌＩで切断することによって得られるｒｎｌＡを含むＤＮＡ断片とｐＢＲｐ＊をＢａｍＨＩとＳａｌＩで切断することによって得られるｒｎｌＡプロモーターを含むベクター配列をライゲーションに供してｒｎｌＡプロモーターの直下にｒｎｌＡを配置することによってｐＢＲｐＮＯを得た。

[0072] 次に、ｒｎｌＡの下流に存在するｒｎｌＢを除去するために、ｐＢＲｐＮＯを鋳型として、２種のプライマー５’－ｃｃｇｃａｔｃｔｃｃａｃｇｔｇａｃｔｇｃ－３’（フォワードプライマー：配列番号９）と５’－ｇｇａａｔｔｃｔｃａａａｃａａｔａｔａａｇｔｃｃ－３’（リバースプライマー：配

列番号１０）を用いたＰＣＲを行い、得られた断片をＳｐｈＩとＥｃｏＲＩによる制限酵素処理に供した。予めＳｐｈＩとＥｃｏＲＩによる制限酵素に供したｐＢＲｐＮＯの複製起点を含む断片とライゲーションすることによってクローニングベクターを得た。

[0073] 構築したクローニングベクターの概略図を図５、及び塩基配列を図６（配列番号２）に示す。このクローニングベクターを、後述する実施例１に対するコントロールとして使用した。

[0074] クローニングベクターを増幅するためにｒｎｌＢを有している大腸菌ＭＨ１株のコンピテントセルを用いて形質転換体を作製した。形質転換体を３７℃の温度条件下、ＬＢ培地中で一晩培養した後、形質転換体（細胞濃度：３×１０^{9}／ｍｌ以下）からクローニングベクターを精製した。クローニングベクターの精製は、アルカリ－ＳＤＳ法による細胞融解、酢酸カリウムによる核酸沈殿、塩化リチウムによる高分子ＲＮＡ除去、ＲＮａｓｅ Ａによる低分子ＲＮＡの消化、ポリエチレングリコールによるプラスミド沈殿、及びフェノールクロロフォルムによるタンパク除去により行った。

[0075] 挿入ＤＮＡ断片を含むクローニングベクターの調製

大腸菌ＭＨ１株のＤＮＡを、制限酵素ＳｐｈＩを用いた制限酵素処理に供し、様々な長さのＤＮＡ断片を得た。上述のように調製されたクローニングベクター（４ｎｇ／μｌ）をＳｐｈＩによる制限酵素処理に供し、大腸菌ＭＨ１株から得られた様々な長さ（１～１０ｋｂ）のＤＮＡ断片を含む混合物（１０ｎｇ／μｌ）をライゲーションして、ｒｎｌＡ遺伝子内に大腸菌ＭＨ株から得られたＤＮＡ断片を導入した。ライゲーションは、ｌｉｇａｔｉｏｎ ｍｉｘ（(株)ニッポンジーン製）を使用して行った。このようにして得られたＭＨ１由来断片を含むクローニングベクターを実施例１とした。

[0076] また、前記ＭＨ１のＤＮＡ断片を、前記実施例１と同様の方法に従ってライゲーションを行い、ｒｎｌＡ遺伝子が挿入されていないプラスミドベクター（ｐＢＲ３２２）に、導入した。このクローニングベクターを比較例１（ｐＢＲ３２２）とした。また、大腸菌ＭＨ１株由来のＤＮＡ断片が導入され

ていないプラスミドベクターを比較例１のコントロールとして使用した。

[0077] 形質転換体の作製

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ　ＴＹ０８０２）のコンピテントセル（１．４×１０^{9}／ｍｌ）に前述のようにして得たクローニングベクター（０．２μｇ／ｍｌ）をそれぞれ添加してピペッティングにより混合し、ＬＢ培地（ＬＢ培地１リットル当たり、ペプトン１０ｇ、酵母エキス５ｇ及びＮａＣｌ１０ｇを含む）８０μＬを加えて３７℃で６０分間振とう培養を行った。

[0078] コロニー数の計測及びＤＮＡ断片導入の有無の確認

上記方法により回収された大腸菌細胞を、直径９ｃｍのシャーレ中のＬＢ寒天培地に播種し、３７℃で１６時間培養し、目視にてコロニー数を数えた。各ベクターのコロニー数を下表３に示す。

[0079] また、目的のＤＮＡ断片が導入されているかどうかについては、次のように確認を行った。実験例１のＤＮＡ断片の導入有から得られたコロニー全３７個中、１４個について、プラスミドを回収した。これらのプラスミドを、制限酵素ＳｐｈＩによって消化した後、アガロース電気泳動によって分析したところ、プラスミドは全てベクターに加えて導入されたＤＮＡ断片を含んでいた。なお、導入されたＤＮＡ断片の長さは１～１０ｋｂと様々であった。

[表3]

ベクター	ＤＮＡ断片の導入無（コントロール）	ＤＮＡ断片の導入有
実施例１	０個	３７個
比較例１	５６４個	５８９個

[0080] 表３に示されるように、実施例１のベクターを使用した場合には、ＤＮＡ断片が導入されていないコロニー（即ちバックグラウンド）は０個であり、ＤＮＡ断片を含む組換えベクターにより形質転換が行われたコロニー３７個のうち１４個について実際にＤＮＡの導入を確認したところ、１４個全てにＤＮＡ断片の導入が認められた。

[0081] これに対し、比較例１のベクターを使用した場合には、ＤＮＡ断片が導入されてないコロニーは５６４個、ＤＮＡ断片が導入され、形質転換が行われたコロニーは５８９個であり、バックグラウンドが高いことが示された。即ち、従来のクローニング方法（比較例１のベクターを用いる方法）では、高いバックグラウンドとなるために、後の選別作業に手間と時間がかかるのに対し、本発明のベクター（実施例１）を使用することにこのような操作を省略することができ、しかも非常に高い効率で目的のクローニングベクターを得ることができる。

配列表フリーテキスト

[0082] 配列番号１は、実施例１においてクローニングベクターに導入されたｒｎｌＡプロモーター及びｒｎｌＡ遺伝子の塩基配列を示す。

配列番号２は、実施例１で作製されたクローニングベクターの塩基配列を示す。

配列番号３は、ｒｎｌＡ遺伝子の塩基配列を示す。

配列番号４は、ｒｎｌＡ遺伝子にコードされるアミノ酸配列を示す。

配列番号５は、ｒｎｌＡ遺伝子断片を得るために用いたフォワードプライマーの塩基配列を示す。

配列番号６は、ｒｎｌＡ遺伝子断片を得るために用いたリバースプライマーの塩基配列を示す。

配列番号７は、ｒｎｌＡプロモーター断片を得るために用いたフォワードプライマーの塩基配列を示す。

配列番号８は、ｒｎｌＡプロモーター断片を得るために用いたリバースプライマーの塩基配列を示す。

配列番号９は、ｒｎｌＢの除去に用いたフォワードプライマーの塩基配列を示す。

配列番号１０は、ｒｎｌＢの除去に用いたリバースプライマーの塩基配列を示す。

請求の範囲

[請求項1] プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有する、クローニングベクター。

[請求項2] 前記トキシンが、ｒｎｌＡ、ｍａｚＦ、ｃｈｐＢＫ、ｈｉｃＡ、ｙｈａＶ、ｍｑｓＲ、ｒｅｌＥ、ｙｏｅＢ、ｙａｆＯ、ｙａｆＱ、ｈｉｇＡ、ｃｂｔＡ、ｙｋｆＩ、ｙｐｊＦ、ｇｎｓＡ、ｈｉｐＡ、ｙｊｈＸ、ｙｄａＳ、ｓｙｍＥ、ＩｄｒＡ、ＩｄｒＢ、ＩｄｒＣ、ｉｂｓＡ、ｉｂｓＢ、ｓｈｏＢ、ｉｂｓＣ、ｉｂｓＤ、ｉｂｓＥ、ＩｄｒＤ、ｔｉｓＢ、ＩｓｏＡ、ｔｘｅ、ｐｅｚＴ、ｖａｐＣ－１、ｂｒｎＴ及びｃｃｄＢからなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１に記載のクローニングベクター。

[請求項3] 更に薬剤耐性遺伝子及び／又は栄養要求性を相補する遺伝子を含む、請求項１又は２に記載のクローニングベクター。

[請求項4] 配列番号１に示される塩基配列を含む、請求項１～３のいずれかに記載のクローニングベクター。

[請求項5] 請求項１～４のいずれかに記載のクローニングベクターにおいて、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクター。

[請求項6] 請求項５に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

[請求項7] プロモーターの制御下に発現するように配置され、内部にクローニングサイトを有するトキシンをコードする塩基配列を、宿主細胞内で複製可能なプラスミドベクター中に組込む工程、を含むクローニングベクターの製造方法。

[請求項8] クローニングベクターの増幅方法であって、

（ｉ’）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクターを、前記トキ

シンに対して非感受性の宿主細胞へ導入する工程；及び
（ｉｉ’）前記工程（ｉ’）においてクローニングベクターが導入された宿主細胞を培養し、クローニングベクターを増幅する工程
を含む方法。

[請求項9] 前記トキシンに対して非感受性の宿主細胞が、トキシンに対するアンチトキシンを発現する細胞である、請求項８に記載の方法。

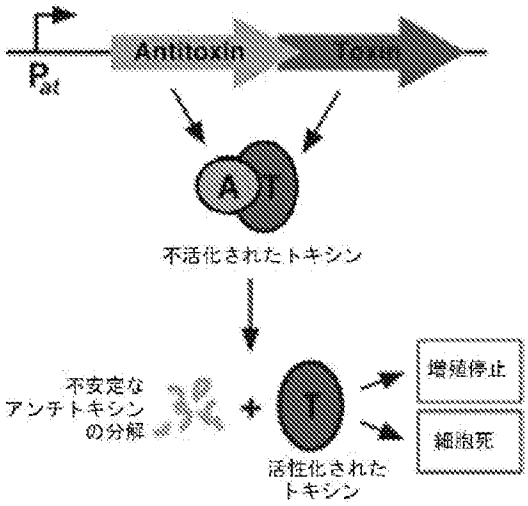
[請求項10] 前記トキシンがｒｎｌＡであり、前記アンチトキシンがｒｎｌＢ又はｄｍｄである、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 下記工程を含む、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターの製造方法：
（ｉ”）挿入ＤＮＡ断片を調製する工程；及び
（ｉｉ”）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、且つ該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクター中に前記挿入ＤＮＡ断片を導入し、トキシンをコードする塩基配列内に挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを得る工程。

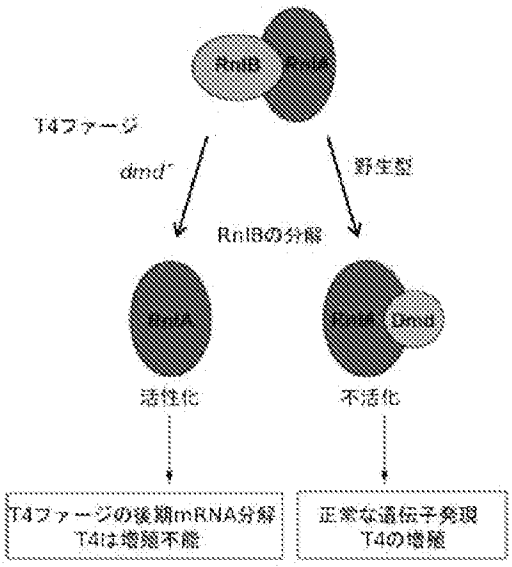
[請求項12] 更に下記工程を含む、請求項１１に記載の製造方法：
（ｉｉｉ”）前記組換えベクターを、前記トキシンに対して感受性の宿主細胞に導入し培養する工程；及び
（ｉｖ”）生存している宿主細胞を選択し、当該細胞から挿入ＤＮＡ断片を含む組換えベクターを得る工程。

[請求項13] 組換えベクターを製造するためのキットであって、
（ａ）プロモーターの制御下に発現するように配置されたトキシンをコードする塩基配列を含み、該トキシンをコードする塩基配列内にクローニングサイトを有するクローニングベクター、と
（ｂ）前記トキシンに対して感受性を有する宿主細胞
とを含むキット。

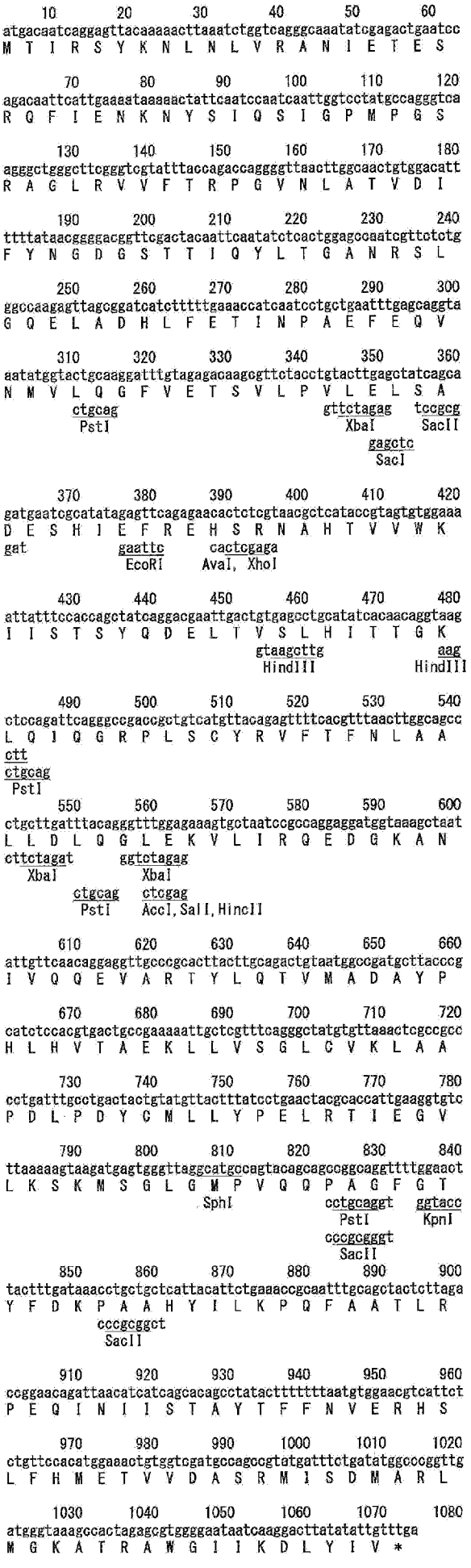
[図1]


Antitoxin
Toxin
P_{at}
A
T
不活化されたトキシン
不安定な
アンチトキシン
の分解
T
活性化された
トキシン
増殖停止
細胞死

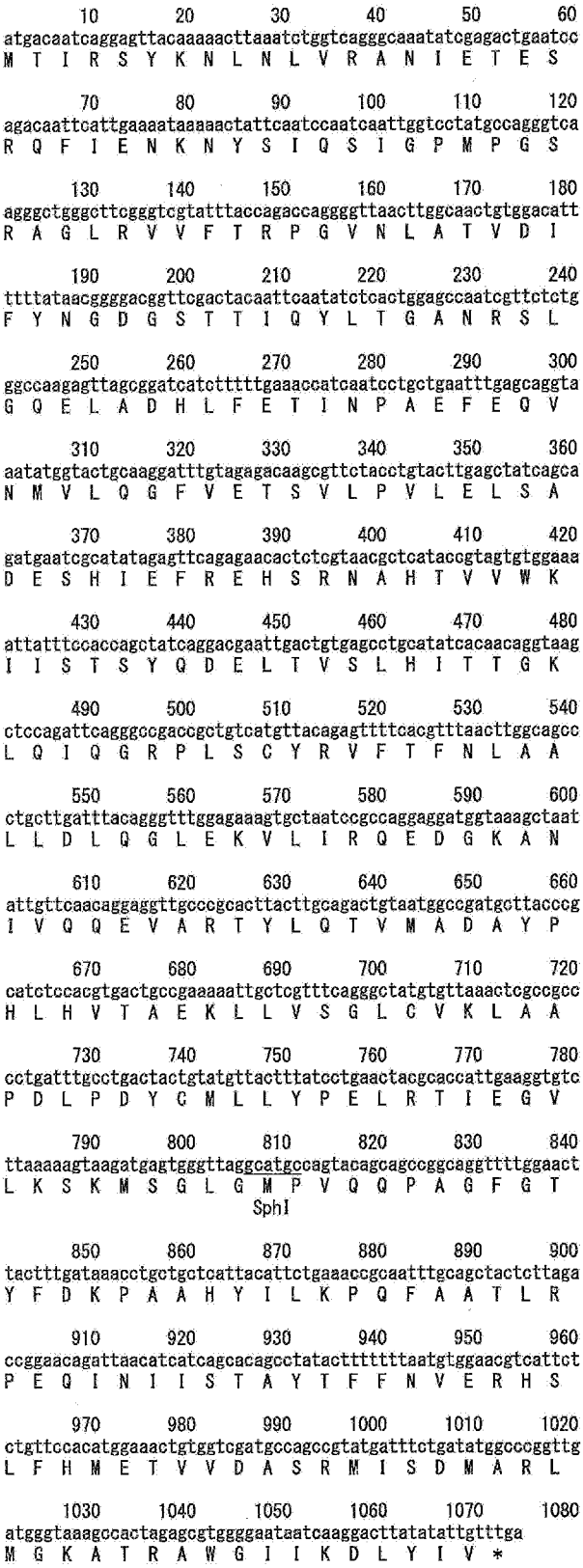
[図2]


RnlB
RnlA
T4ファージ
dmd⁻
野生型
RnlBの分解
RnlA
RnlB
Dmd
活性化
不活化
T4ファージの後期mRNA分解
T4は増殖不能
正常な遺伝子発現
T4の増殖

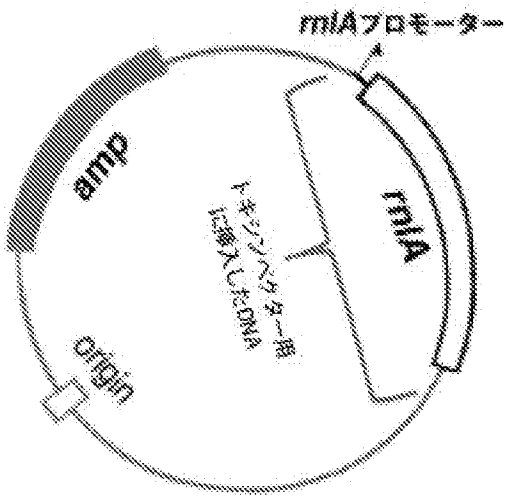
[図3]


10 20 30 40 50 60
atgacaatcaggagttacaaaaacttaaatctggtcagggcaaatatcgagactgaatcc
M T I R S Y K N L N L V R A N I E T E S
70 80 90 100 110 120
agacaattcattgaaaataaaaactattcaatccaatcaattggtcctatgccagggtca
R Q F I E N K N Y S I Q S I G P M P G S
130 140 150 160 170 180
agggctgggcttcgggtcgtatttaccagaccaggggttaacttggcaactgtggacatt
R A G L R V V F T R P G V N L A T V D I
190 200 210 220 230 240
ttttataacggggacggttcgactacaattcaatatctcactggagccaatcgttctctg
F Y N G D G S T T I Q Y L T G A N R S L
250 260 270 280 290 300
ggccaagagttagcggatcatcttttgaaaccatcaatcctgctgaatttgagcaggta
G Q E L A D H L F E T I N P A E F E Q V
310 320 330 340 350 360
aatatggtactgcaaggatttgtagagacaagcgttctacctgtacttgagctatcagca
N M V L Q G F V E T S V L P V L E L S A
ctgcag gttctagag tccgcg
PstI XbaI SacII
gagctc
SacI
370 380 390 400 410 420
gatgaatcgcatatagagttcagagaacactctcgtaacgctcataccgtagtgtggaaa
D E S H I E F R E H S R N A H T V V W K
gat gaattc cactcgaga
EcoRI AvaI, XhoI
430 440 450 460 470 480
attatttccaccagctatcaggacgaattgactgtgagcctgcatatcacaacaggtaag
I I S T S Y Q D E L T V S L H I T T G K
gtaagcttg aag
HindIII HindIII
490 500 510 520 530 540
ctccagattcagggccgaccgctgtcatgttacagagttttcacgtttaacttggcagcc
L Q I Q G R P L S C Y R V F T F N L A A
ctt
ctgcag
PstI
550 560 570 580 590 600
ctgcttgatttacagggtttggagaaagtgctaatccgccaggaggatggtaaagctaat
L L D L Q G L E K V L I R Q E D G K A N
cttctagat ggtctagag
XbaI XbaI
ctgcag ctcgag
PstI AccI, SalI, HincII
610 620 630 640 650 660
attgttcaacaggaggttgcccgcacttacttgcagactgtaatggccgatgcttacccg
I V Q Q E V A R T Y L Q T V M A D A Y P
670 680 690 700 710 720
catctccacgtgactgccgaaaaattgctcgtttcagggctatgtgttaaaactcgccgcc
H L H V T A E K L L V S G L C V K L A A
730 740 750 760 770 780
cctgatttgcctgactactgtatgttacttttatcctgaactacgcaccattgaaggtgtc
P D L P D Y C M L L Y P E L R T I E G V
790 800 810 820 830 840
ttaaaaagtaagatgagtgggttaggcatgccagtacagcagccggcaggttttggaact
L K S K M S G L G M P V Q Q P A G F G T
SphI
cctgcaggt ggtacc
PstI KpnI
ccccgcgggt
SacII
850 860 870 880 890 900
tactttgataaacctgctgctcattacattctgaaaccgcaatttgcagctactcttaga
Y F D K P A A H Y I L K P Q F A A T L R
cccgcggct
SacII
910 920 930 940 950 960
ccggaacagattaacatcatcagcacagcctatacttttttttaatgtggaacgtcattct
P E Q I N I I S T A Y T F F N V E R H S
970 980 990 1000 1010 1020
ctgttccacatggaaactgtggtcgatgccagccgtatgatttctgatatggcccggttg
L F H M E T V V D A S R M I S D M A R L
1030 1040 1050 1060 1070 1080
atgggtaaagccactagagcgtggggaataatcaaggacttatatattgtttga
M G K A T R A W G I I K D L Y I V *

[図4]


10 20 30 40 50 60
atgacaatcaggagttacaaaaacttaaatctggtcagggcaaatatcgagactgaatcc
M T I R S Y K N L N L V R A N I E T E S
70 80 90 100 110 120
agacaattcattgaaaataaaaactattcaatccaatcaattggtcctatgccagggtca
R Q F I E N K N Y S I Q S I G P M P G S
130 140 150 160 170 180
agggctgggcttcgggtcgtatttaccagaccaggggttaacttggcaactgtggacatt
R A G L R V V F T R P G V N L A T V D I
190 200 210 220 230 240
ttttataacggggacggttcgactacaattcaatatctcactggagccaatcgttctctg
F Y N G D G S T T I Q Y L T G A N R S L
250 260 270 280 290 300
ggccaagagttagcggatcatctttttgaaaccatcaatcctgctgaatttgagcaggta
G Q E L A D H L F E T I N P A E F E Q V
310 320 330 340 350 360
aatatggtactgcaaggatttgtagagacaagcgttctacctgtacttgagctatcagca
N M V L Q G F V E T S V L P V L E L S A
370 380 390 400 410 420
gatgaatcgcatatagagttcagagaacactctcgtaacgctcataccgtagtgtggaaa
D E S H I E F R E H S R N A H T V V W K
430 440 450 460 470 480
attatttccaccagctatcaggacgaattgactgtgagcctgcatatcacaacaggtaag
I I S T S Y Q D E L T V S L H I T T G K
490 500 510 520 530 540
ctccagattcagggccgaccgctgtcatgttacagagttttcacgtttaacttggcagcc
L Q I Q G R P L S C Y R V F T F N L A A
550 560 570 580 590 600
ctgcttgatttacagggtttggagaaagtgctaatccgccaggaggatggtaaagctaat
L L D L Q G L E K V L I R Q E D G K A N
610 620 630 640 650 660
attgttcaacaggaggttgcccgcacttacttgcagactgtaatggccgatgcttacccg
I V Q Q E V A R T Y L Q T V M A D A Y P
670 680 690 700 710 720
catctccacgtgactgccgaaaaattgctcgtttcagggctatgtgttaaactcgccgcc
H L H V T A E K L L V S G L C V K L A A
730 740 750 760 770 780
cctgatttgcctgactactgtatgttactttatcctgaactacgcaccattgaaggtgtc
P D L P D Y C M L L Y P E L R T I E G V
790 800 810 820 830 840
ttaaaaagtaagatgagtgggttaggcatgccagtacagcagccggcaggttttggaact
L K S K M S G L G M P V Q Q P A G F G T
SphI
850 860 870 880 890 900
tactttgataaacctgctgctcattacattctgaaaccgcaatttgcagctactcttaga
Y F D K P A A H Y I L K P Q F A A T L R
910 920 930 940 950 960
ccggaacagattaacatcatcagcacagcctatacttttttaatgtggaacgtcattct
P E Q I N I I S T A Y T F F N V E R H S
970 980 990 1000 1010 1020
ctgttccacatggaaactgtggtcgatgccagccgtatgatttctgatatggcccggttg
L F H M E T V V D A S R M I S D M A R L
1030 1040 1050 1060 1070 1080
atgggtaaagccactagagcgtggggaataatcaaggacttatatattgtttga
M G K A T R A W G I I K D L Y I V *

[図5]



[図6]

aattctcatgtttgacagcttatcatcgatGTTGCTGCTTGGTGAGATCAGGAAGAGGTTACCGAAACGATGGACATCATCCCCCATTTTG
TGGACTGCCCCCCCGGTAGACGATCCTGCCCTATAGTTGGAGTGCCCCCTATTCAGGTGGCTAAATTTAGCAAATCAA*TAC*
*ACT*TCAGGGGGGTATTATTG*TAGAGT*TTCCCCATATGTTTCTATGGGATCCAGGAAATGACAATCAGGAGTTACAAAAACT
TAAATCTGGTCAGGGCAAATATCGAGACTGAATCCAGACAATTCATTGAAAATAAAAACTATTCAATCCAATCAATTGGTC
CTATGCCAGGGTCAAGGGCTGGGCTTCGGGTCGTATTTACCAGACCAGGGGTTAACTTGGCAACTGTGGACATTTTTTAT
AACGGGGACGGTTCGACTACAATTCAATATCTCACTGGAGCCAATCGTTCTCTGGGCCAAGAGTTAGCGGATCATCTTTTT
GAAACCATCAATCCTGCTGAATTTGAGCAGGTAAATATGGTACTGCAAGGATTTGTAGAGACAAGCGTTCTACCTGTACTT
GAGCTATCAGCAGATGAATCGCATATAGAGTTCAGAGAACACTCTCGTAACGCTCATACCGTAGTGTGGAAAATTATTTCC
ACCAGCTATCAGGACGAATTGACTGTGAGCCTGCATATCACAACAGGTAAGCTCCAGATTCAGGGCCGACCGCTGTCATG
TTACAGAGTTTTCACGTTTAACTTGGCAGCCCTGCTTGATTTACAGGGTTTGGAGAAAGTGCTAATCCGCCAGGAGGATG
GTAAAGCTAATATTGTTCAACAGGAGGTTGCCCGCACTTACTTGCAGACTGTAATGGCCGATGCTTACCCGCATCTCCACG
TGACTGCCGAAAAATTGCTCGTTTCAGGGCTATGTGTTAAACTCGCCGCCCCTGATTTGCCTGACTACTGTATGTTACTTT
ATCCTGAACTACGCACCATTGAAGGTGTCTTAAAAAGTAAGATGAGTGGGTTAGGCATGCCAGTACAGCAGCCGGCAGGT
TTTGGAACTTACTTTGATAAACCTGCTGCTCATTACATTCTGAAACCGCAATTTGCAGCTACTCTTAGACCGGAACAGATT
AACATCATCAGCACAGCCTATACTTTTTTTAATGTGGAACGTCATTCTCTGTTCCACATGGAAACTGTGGTCGATGCCAGC
CGTATGATTTCTGATATGGCCCGCTTGATGGGTAAAGCCACTAGAGCGTGGGGAATAATCAAGGACTTATATATTGTTTGA
GAATTCGCCCTTTTGGCATGATATTAACTTGTCCAATATGATCAAATAGCATCAAGCTTATCGATACCGTCGACcgatgcccttga
gagccttcaacccagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcat
tttcggcgaggaccgctttcgctggagcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacgccctcgctcaagccttcgtcactggtcccgccaccaaacgtttcggcg
agaagcaggccattatcgccggcatggcggccgacgcgctgggctacgtcttgctggcgttcgcgacgcgaggctggatggccttccccattatgattcttctcgcttccggcggcatcgg
gatgcccgcgttgcaggccatgctgtccaggcaggtagatgacgaccatcagggacagcttcaaggatcgctcgcggctcttaccagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcac
ggcgatttatgccgcctcggcgagcacatggaacgggttggcatggattgtaggcgccgccctataccttgtctgcctccccgcgttgcgtcgcggtgcatggagccgggccacctcgac
ctgaatggaagccggcggcacctcgctaacggattcaccactccaagaattggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaatgcgcaaaccaaccccttggcagaacatatccatcg
cgtccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcgggcagcgttgggtcctggccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggacccggctaggctggcggggttgccttа
ctggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtctg
gaaacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggctaccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgaccctgagtg
atttttctctggtcccgccgcatccataccgccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatca
ttaccccatgaacagaaattcccccttacacggaggcatcaagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaa
ctcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgaca
catgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtc
acgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgc
atcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataac
gcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacg
ctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttt
ctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgc
cttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttct
tgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccacc
gctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacg
ttaagggattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttacca
atgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctg
caatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctatt
aattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccg
gttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttat
ggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccg
gcgtcaacacgggataatacgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgat
gtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaa
atgttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgc
acatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggcccttcgtcttcaagaatt

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/075116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i

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)
C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, Thomson, Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2004/106526 A1 (INSTITUT PASTEUR and CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE), 09 December 2004 (09.12.2004), claims 1 to 23; examples; fig. 2 & CA 2429235 A1	1-3,5-9, 11-13/2-6,10
X/Y	KIM, Han Geun et al., pTOC-KR: a positive selection cloning vector based on the ParE toxin, BioTechniques, 2004, Vol. 36, No. 1, p. 60-62, 64, Figure 1, 2	1,3,5-9, 11-13/2-6,10
X/Y	KIM, Han Geun et al., Construction of a pTOC-T vector using GST-ParE toxin for direct cloning and selection of PCR products, Biotechnol. Lett., 2004, Vol. 26, p. 1659-1663, Fig. 2, 3., Table 2.	1,3,5-9, 11-13/2-6,10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent 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	Date of mailing of the international search report
31 October, 2013 (31.10.13)	12 November, 2013 (12.11.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/075116

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	KOGA, Mitsunori et al., Escherichia coli rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system, Genetics, 2011, Vol. 187, No. 1, p. 123-130, TABLE 1, FIGURE 1, 2, 5, 6, MATERIALS AND METHODS	1-4,7-10,13/ 2-6,10

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０７５１１６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

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.Cl.　C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３年

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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, Thomson Innovation

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	関連する請求項の番号
Ｘ／Ｙ	WO 2004/106526 A1 (INSTITUT PASTEUR and CENTRE NATIONAL DELA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 2004.12.09, 請求項１－２３、実施例、図２ & CA 2429235 A1	１－３、５－９、１１－１３／２－６、１０
Ｘ／Ｙ	KIM, Han Geun et al., pTOC-KR: a positive selection cloning vector based on the ParE toxin, BioTechniques, 2004, Vol. 36, No. 1, p. 60-62, 64, Figure 1, 2	１、３、５－９、１１－１３／２－６、１０

☑　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	国際調査報告の発送日
３１．１０．２０１３	１２．１１．２０１３

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）　４Ｂ　４５０４
小倉　梢
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	関連する請求項の番号
Ｘ／Ｙ	KIM, Han Geun et al., Construction of a pTOC-T vector using GST-ParE toxin for direct cloning and selection of PCR products, Biotechnol. Lett., 2004, Vol. 26, p. 1659-1663, Fig. 2, 3., Table 2.	１、３、５－９、１１－１３／２－６、１０
Ｘ／Ｙ	KOGA, Mitsunori et al., Escherichia coli rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system, Genetics, 2011, Vol. 187, No. 1, p. 123-130, TABLE 1, FIGURE 1, 2, 5, 6, MATERIALS AND METHODS	１－４、７－１０、１３／２－６、１０