

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3963971号

(P3963971)

(45) 発行日 平成19年8月22日(2007.8.22)

(24) 登録日 平成19年6月1日(2007.6.1)

(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 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C

請求項の数 7 外国語出願 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願平7-296322	(73) 特許権者	592239707
(22) 出願日	平成7年10月6日(1995.10.6)		ニュー・イングランド・バイオレイブズ・
(65) 公開番号	特開平8-266288		インコーポレイテッド
(43) 公開日	平成8年10月15日(1996.10.15)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
審査請求日	平成14年9月6日(2002.9.6)		915、ビバリー、トザー・ロード・32
(31) 優先権主張番号	319621	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成6年10月6日(1994.10.6)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100080403
			弁理士 中村 至
微生物の受託番号	ATCC 75909	(74) 代理人	100094776
			弁理士 船山 武
		(72) 発明者	ジャック・エス・ベナー
			アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
			936、ハミルトン、オーチャード・ロー
			ド・24
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S s p I 制限エンドヌクレアーゼ及びメチラーゼの産生方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むS s p 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、ベクターp (p A I I 1 7) S s p R 7 . 2 - B 1 A T C C N o . 7 5 9 0 9 を B a m H I 及びN d e I で消化することにより得られ、9 0 0 b p長であることを特徴とする、前記単離DNA。

【請求項2】

請求項1に記載の単離DNAが挿入されたベクターから成る組換えDNAベクター。

【請求項3】

S s p 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、S s p I 制限エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列がベクターp (p A I I 1 7) S s p R 7 . 2 - B 1 A T C C N o . 7 5 9 0 9 を B a m H I 及びN d e I で消化することにより得られるDNAのコード領域のヌクレオチド配列に対応し、9 0 0 b p長であり、ここでS s p I 制限エンドヌクレアーゼは配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み、メチラーゼは配列番号14に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、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】

クローニングベクターがp (p A I I 1 7) S s p R 7 . 2 - B 1 A T C C N o . 20

7 5 9 0 9 から成ることを特徴とする請求項 4 に記載のクローニングベクター。

【請求項 6】

請求項 2、4 または 5 に記載のクローニングベクターによって形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 2、4 または 5 に記載のクローニングベクターによって形質転換された宿主細胞を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包含する S s p I 制限エンドヌクレアーゼの産生方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【発明の属する技術分野】

本発明は、S s p 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換え DNA、並びに、組換え DNA からこれらの酵素を産生する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

制限エンドヌクレアーゼは、細菌中に自然に存在する酵素の 1 つのクラスである。このクラスの酵素を他の夾雑細菌成分から分離して精製できれば、DNA 分子を正確なフラグメントに切断するために実験室で制限エンドヌクレアーゼを使用することが可能である。この酵素の特性は、DNA 分子を特異的に同定し、夫々の成分遺伝子に分画し得ることである。制限エンドヌクレアーゼが現代遺伝学研究に不可欠なツールであることは証明済みである。これらは、遺伝子を操作及び分析するための生化学的「鋏」の役割を果たし得る。

20

【0003】

制限エンドヌクレアーゼは、DNA 分子に沿った特定のヌクレオチド配列（「認識配列」）を認識し該配列に結合することによって作用する。即ち、エンドヌクレアーゼは該配列に結合し、分子を該配列の内部またはその一方側で開裂する。異なる制限エンドヌクレアーゼは異なる認識配列に親和性を有している。今日までの研究では数百種類の細菌種から百種類以上の異なる制限エンドヌクレアーゼが同定されている。

【0004】

細菌は通常、その種ごとに極めて少数の制限エンドヌクレアーゼを有している。エンドヌクレアーゼはそれらが由来する細菌に従って命名されている。例えば、S p h a e r o t i l u s 種 (A T C C 1 3 9 2 5) は S s p I と呼ばれる制限エンドヌクレアーゼを合成する。この酵素は配列 A A T ∇ A T T を認識し開裂する。

30

【0005】

理論に拘束されるつもりはないが、制限エンドヌクレアーゼは本来は、細菌細胞の自己防御的役割を果たすと考えられている。該酵素はウイルス及びプラスミドのような外来 DNA 分子感染に対する耐性を細菌に与える。このような耐性がなければ、外来 DNA 分子が細菌を破壊したり細菌に寄生したりするであろう。耐性を与えるために該酵素は、認識配列が発生する度毎に感染 DNA 分子に結合し該分子を開裂する。その結果として分子が分解され、感染遺伝子の多くが失活し、DNA はエキソヌクレアーゼによっていっそう分解され易くなる。

40

【0006】

細菌防御系の第 2 の成分は修飾メチラーゼである。該酵素は制限エンドヌクレアーゼに相補的であり、細菌がそれ自体の DNA を保護し該 DNA を感染外来 DNA から識別できるようにするための手段を提供する。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ヌクレオチド認識配列を認識してこれに結合するが、DNA を破壊するのではなく、配列内部の 1 つまたは別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。メチル化された認識配列は制限エンドヌクレアーゼによる結合及び開裂の対象外となる。細菌細胞の DNA はその修飾メチラーゼ活性によって常に完全に修飾されており、従って内在する制限エンドヌクレアーゼに対して完全に不感受性である。制限エンドヌクレアーゼによる認識及び攻撃に感受性を示すのは、非修飾であり従って外来であると同定される D

50

NAだけである。

【0007】

遺伝子工学技術の出現に伴って現在では、遺伝子のクローニングが可能であり、また、遺伝子がコードしているタンパク質及び酵素を従来の精製技術で得られたよりも大量に産生することが可能である。制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のクローンを単離するための重要な要件は、所望のクローンが $10^{-3} \sim 10^{-4}$ という低頻度で発生するときに、複合「ライブラリー」、即ち「ショットガン」タイプのクローニング手順で得られたクローン集団の内部から、所望のクローンを同定し得る簡単で確実な方法を開発することである。必要な少数のクローンを生存させながら不要な多数のクローンを破壊する選択的な方法が好ましい。

10

【0008】

タイプ I の制限修飾系は漸増頻度でクローニングされている。最初にクローニングされた系は、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を使用した (Hha I : Mannら, Gene 3 : 97-112, (1978) ; EcoRI : Kosykhら, Molec. Gen. Genet 178 : 717-719, (1980) ; Pst I : Walderら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78 : 1503-1507, (1981))。細菌中の制限修飾系の存在は細菌にバクテリオファージ感染に対する耐性を与えるので、クローニングされた制限修飾遺伝子を保有する細胞は原則として、ファージに接触したライブラリーから生存細胞として選択的に単離され得る。しかしながら、この方法は高い評価を得ることはできなかった。特に、クローニングされた制限修飾遺伝子が選択的生存を維持するに十分な耐性を必ずしも示さないことが知見された。

20

【0009】

別のクローニング方法では、先ずプラスミド由来 (plasmid-borne) として特徴付けられる系を大腸菌クローニングプラスミドに移入する (EcoRV : Bougueleretら, Nucleic Acids Res. 12 : 3659-3676, (1984) ; Paer7 : Gingeras & Brooks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 402-406, (1983) ; Theriault & Roy, Gene 19 : 355-359, (1982) ; PvuII : Blumenthalら, J. Bacteriol. 164 : 501-509, (1985))。

30

【0010】

より多数の系をクローニングするために使用されている第3のクローニング方法では、活性メチラーゼ遺伝子の選択を用いている (1986年9月3日公開のEPO公開No, 193, 413及びBsuRI : Kissら, Nucleic Acids Res. 13 : 6403-6421, (1985))。制限遺伝子と修飾遺伝子とは緊密な連関を有しているので、しばしば1つの遺伝子だけを選択することによって双方の遺伝子を含むクローンを単離し得る。しかしながらメチル化活性に基づく選択によって完全な制限修飾系が必ずしも得られることはなく、ときどきはメチラーゼ遺伝子だけが得られる (BspRI : Szomolanyiら, Gene 10 : 219-225, (1980) ; BcnI : Janulaitisら, Gene 20 : 197-204 (1982) ; BsuRI : Kiss & Baldauf, Gene 21 : 111-119, (1983) ; 及びMspI : Walderら, J. Biol. Chem. 258 : 1235-1242, (1983))。制限修飾系のクローニングの概要に関しては、例えばLunnenら, Gene 74 : 25-32 (1988) 及びWilson, G. G., Gene, 74 : 281-285 (1988) を参照するとよい。

40

【0011】

メチラーゼ及びエンドヌクレアーゼの遺伝子をクローニングするための別の方法は、DNA損傷の比色アッセイに基づく。メチラーゼをスクリーニングするためには、プラスミドライブラリーで宿主大腸菌AP1-200株を形質転換させる。メチラーゼの発現は、McrA⁺、McrBC⁺またはMrr⁺である大腸菌の菌株中でSOS応答反応を誘発す

50

る。A P 1 - 2 0 0 菌株はM c r 系及びM r r 系に対して温度感受性であり、大腸菌の損傷誘発性d i n D 遺伝子座に融合したl a c - Z 遺伝子を含む。メチラーゼまたはエンドヌクレアーゼの遺伝子をコードしている組換えプラスミドは、限定温度におけるl a c Z 遺伝子の誘発に基づいて検出される。メチラーゼ遺伝子をコードしている形質転換体は、X - g a l を含むL B 寒天プレート上で青色コロニーとして検出される。(P i e k a r o w i c z ら, N u c l e i c A c i d s R e s . 1 9 : 1 8 3 1 - 1 8 3 5 , (1 9 9 1) 及びP i e k a r o w i c z ら, J . B a c t e r i o l o g y 1 7 3 : 1 5 0 - 1 5 5 (1 9 9 1)) 。同様に、大腸菌E R 1 9 9 2 株は、d i n D 1 - L a c Z 融合を含むが、メチル化依存性制限系M c r A 、M c r B C 及びM r r が欠失している。(“ e n d o - b l u e ” 法と呼ばれる) この系においては、エンドヌクレアーゼが宿主細胞DNAに損傷を与えるとときにS O S 応答を誘発する同系メチラーゼの非存在下でエンドヌクレアーゼ遺伝子が検出され得る。S O S 誘発細胞は、X - g a l を補充したL B 寒天プレート上で深青色コロニーを形成する。(X u ら, N u c l e i c A c i d s R e s . 2 2 : 2 3 9 9 - 2 4 0 3 (1 9 9 4)) 。

【0012】

制限-修飾遺伝子のクローニングに関して考えられる障害は、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が導入され易いことにある。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とき、エンドヌクレアーゼによる宿主DNAの開裂が生じる前にメチラーゼによる修飾が生じて宿主DNAが保護される必要がある。従って場合によっては、最初にメチラーゼ、次いでエンドヌクレアーゼの順で遺伝子を順次にクローニングするしかない。制限-修飾系のクローニングに関する別の障害は、大腸菌のある種の菌株はシトシンまたはアデニンの修飾に対して不利な反応を示すことにある。これらの菌株は、メチル化シトシンを含有するDNAを破壊する系(R a l e i g h & W i l s o n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A 8 3 : 9 0 7 0 - 9 0 7 4 (1 9 8 6)) またはメチル化アデニンを含有するDNAを破壊する系(H e i t m a n & M o d e l , J . B a c t . , 1 6 9 : 3 2 4 3 - 3 2 5 0 , (1 9 8 7) ; R a l e i g h , T r i m a r c h i & R e v e l , G e n e t i c s , 1 2 2 : 2 7 9 - 2 9 6 (1 9 8 9) , W a i t e - R e e s , K e a t i n g , M o r a n . S l a t k o , H o r n s t r a & B e n n e r , J . B a c t e r i o l o g y , 1 7 3 : 5 2 0 7 - 5 2 1 9 (1 9 9 1)) を有している。シトシン特異的またはアデニン特異的なメチラーゼ遺伝子は、単独の場合にも対応するエンドヌクレアーゼ遺伝子と一緒にした場合にも、これらの菌株に容易にクローニングできない。この問題を回避するためには、これらの系が欠失した大腸菌の突然変異株(M c r A⁻ 及びM c r B⁻ またはM r r⁻) を使用することが必要である。

【0013】

精製された制限エンドヌクレアーゼは実験室内でDNAの特性決定及び再配列を行うための有用なツールであり、また修飾メチラーゼも多少程度は少ないが同様の有用ツールである。組換えDNA技術によってこれらの酵素を多量に合成する細菌株を得ることが産業上重要な理由はここにある。このような細菌株は、精製作業を容易にする、商業的に有用な量を産生する手段を提供する、などの理由によって有用であろう。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、S p h a e r o t i l u s 種(A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) から指定番号# 1 3 9 2 5 で得られるN E B 菌株# 3 1 5) に由来のS s p I 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換えDNA、並びに組換えDNAからこれらの酵素を産生する方法に関する。本発明はまた、制限エンドヌクレアーゼS s p I、即ちDNA配列A A T ∇ A T T を認識し矢印で示す第1の5' T と第3の5' A との間を開裂する酵素、を発現する形質転換宿主に関する。

【0015】

Ssp Iの好ましいクローニング方法は、ライブラリーDNAを適当な制限エンドヌクレアーゼ、即ちその非メチル化認識配列を開裂する酵素、と共にインキュベートすることによって、対応するメチラーゼ遺伝子を発現するDNAを含む十分な数のライブラリーを形成し、制限エンドヌクレアーゼと共にインキュベートしたときに開裂されなかった組換えDNAによって宿主を再度形質転換し、得られた形質転換体の生存物から陽性クローンをスクリーニングする段階を含む。

【0016】

しかしながら、Sphaerotilus種DNAの複数のライブラリーを構築した後で、メチラーゼ遺伝子またはメチラーゼ遺伝子の部分及びエンドヌクレアーゼ遺伝子の部分を得ることは可能であったが、完全エンドヌクレアーゼ遺伝子を得ることはできなかった。従って、Ssp Iエンドヌクレアーゼ遺伝子をクローニングするための代替的な戦略が必要になった。この戦略では、宿主細胞中にメチラーゼを存在させないでベクターpAI117中でT7プロモーター系の調節下にエンドヌクレアーゼ遺伝子を直接クローニングする。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本発明は、Ssp 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換えDNA、並びに、かかる組換えDNAから産生される酵素に関する。

【0018】

【発明の実施の形態】

Ssp Iの制限エンドヌクレアーゼ遺伝子及び修飾メチラーゼ遺伝子をクローニングし発現させるために好ましい本発明の方法は、図1、6及び7に示されており、以下の段階を含んでいる。

I. Ssp Iメチラーゼのクローニング

A. ライブラリーの調製

A-1. 実施例に詳細に記載されているようにNew England BiolabsのSphaerotilus種の標準増殖プロトコルに従ってSphaerotilus種を増殖させる。細胞を溶解させ、ゲノムDNAを、Brooksら、Nucleic Acids Research, 17: 979-997 (1989)に記載の技術によって精製する。

A-2. ゲノムDNAを以下の制限エンドヌクレアーゼ: Bgl II、EcoRI、Pst I、Sph I及びXho Iで完全に消化する。

A-3. これらの制限酵素フラグメントをクローニングベクターの対応するクローニング部位に結合する（例えば、Bgl II生成フラグメントはBgl IIクローニング部位に結合し、他も同様である）。理想的には、クローニングベクターはpBIIspl. 2、pUC19、pACYC177またはpACYC184のように1つまたは2つのSsp I部位と前記クローニング部位とを含むベクターであり、Mr r⁻である大腸菌RR1細胞またはMr r⁻及び／またはMc rA⁻である任意の他の大腸菌株のような適当な宿主細胞を形質転換させるために混合物が使用される。

A-4. 形質転換細胞をアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシンまたはクロラムフェニコールなどの抗生物質を含む形質転換細胞の選択培地で平板培養する。インキュベーション後、形質転換コロニーを単一培養物として一緒に収集して細胞ライブラリーを作製する。

A-5. 細胞ライブラリーから組換えプラスミドを完全に (in toto) 精製してプラスミドライブラリーを作製する。

B. ライブラリーの選択及びスクリーニング

B-1. Watsonら、前出、に記載の方法と同様の方法を用い、Sphaerotilus種から調製したSsp I制限エンドヌクレアーゼによってプラスミドライブラリーをin vitroで完全消化する。メチラーゼ非含有の未修飾クローンがSsp I消化によって特異的に破壊され、Ssp Iメチラーゼクローンの相対頻度が増加する。

10

20

30

40

50

B-2. 選択されたDNAを大腸菌RR1のような適当な宿主に戻して形質転換させ、形質転換体を選択培地で平板培養することによって回収する。コロニーを採取し、それらのDNA中のSspI修飾遺伝子の存在を分析する。該遺伝子を含むプラスミドを精製し、SspI制限エンドヌクレアーゼと共にインキュベートして消化に耐性か否かを判定する。全細胞性DNA（染色体及びプラスミド）も精製し、SspI制限エンドヌクレアーゼと共にインキュベートする。SspI修飾遺伝子を保有するクローンのDNAは完全に修飾されており、プラスミドDNA及び全DNAの双方が実質的に消化耐性である。

B-3. 作製したDNAライブラリーを、EcoRI、PstI、SphI及びXhoIなどでサザンブロットング用に調製し、pSspIM14.0-B6のようなクローン化したメチラーゼ遺伝子でプローブする。

10

C. 修飾メチラーゼ遺伝子のマッピング及び欠失サブクローンの調製

C-1. SspIメチラーゼクローンpSspIM14.0-B6を多数の異なる制限酵素でマッピングした。制限地図を図2に示す。

C-2. SspIメチラーゼクローンpSspIM14.0-B6を以下の制限酵素：PstI、AseI、BamHI、EcoRV及びXhoIによって消化し、再結合した。これらの欠失サブクローンをSspIで消化し生存物をスクリーニングすることによってそのメチラーゼ活性を検定した。これらの欠失サブクローンのいくつかはメチラーゼ活性を有しており、残りはメチラーゼ活性を有していなかった。これは、推定メチラーゼ遺伝子に相当する長さ約1.2キロ塩基の領域を示した（図2参照）。この領域はXhoI部位とBglII部位との間に存在した。pSspIM14.0-B6をBglII及びXhoIによって消化した。このフラグメントをpUC18上のSalIからBamHI部位まで及びpUC19中にサブクローニングした。

20

C-3. 最も小さいメチラーゼサブクローン、1.2KbのBglIIからXhoIまでのフラグメント、のDNA配列を決定した。この領域のDNA配列を図3に示す。

D. SspIエンドヌクレアーゼタンパク質の調製、SspIエンドヌクレアーゼタンパク質の配列決定、及び、エンドヌクレアーゼ位置のマッピング

D-1. SspI制限遺伝子及び修飾遺伝子を保有するSphaerotilus種の細胞からSspI制限エンドヌクレアーゼを産生させる。細胞を発酵槽中の富裕培地で増殖させる。細胞を遠心によって採集する。gaulinミルによって細胞を破壊し、SspI制限エンドヌクレアーゼ活性を含む粗細胞抽出物を産生させる。SspI制限エンドヌクレアーゼ活性を含む粗細胞抽出物を標準イオン交換法及びアフィニティクロマトグラフィー法によって精製する。図4はSspI制限エンドヌクレアーゼの産生スキームを示す。

30

【0019】

D-2. このように精製され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で均質であり、タンパク質は見掛け平均分子量32,000ダルトンを有し、ラムダDNA上で測定した比活性はタンパク質1mgあたり約140,000単位（またはそれ以上）である。

D-3. エンドヌクレアーゼのアミノ末端配列は、Applied Biosystems 470Aタンパク質シーケンサー（Brooksら、Nucleic Acids Research, 17:979-997, (1989)）を用いて得られる。また、タンパク質配列に基づいてDNAオリゴヌクレオチドプローブを作製する。

40

D-4. プローブを使用してSphaerotilus種のゲノム中のメチラーゼクローンに対するエンドヌクレアーゼの相対位置をマッピングする。図5はSphaerotilus種のゲノム中のメチラーゼ遺伝子及びエンドヌクレアーゼ遺伝子を示す。

I I. SspIエンドヌクレアーゼ遺伝子のクローニング

A. McrA⁻プレ保護宿主中の新しいライブラリーの構築

A-1. メチラーゼのDNA配列に基づいて、SspIメチラーゼ遺伝子の特異的にクローニングするためのプライマーを設計し得る。2つのPCRプライマーを設計した。SspIメチラーゼをpSspIM14.0-B6から増幅し、pUC18及びpUC19の

50

ポリリンカーに、pUC18構築物（構築物pSspM-B5）中ではメチラーゼ遺伝子の方向がlacプロモーターと同方向になり、pUC19構築物（構築物pSspM-A8）中ではlacプロモーターと逆方向になるようにサブクロニングした。

A-2. pACYC184中で新しいSphI及びXhoIライブラリーを作製した。これらのライブラリーで、過発現メチラーゼ構築物pSspM-B5またはpSspM-A8で予め保護したMc rA⁺宿主（ER1797）を形質転換させた。これらのライブラリーをサザンブロットィング用に調製し、エンドヌクレアーゼ遺伝子に特異的なオリゴマーによってプローブした。これらのライブラリーのいずれにも検出可能なSspI制限エンドヌクレアーゼ遺伝子は存在しなかった。

B. SspIゲノムDNAの逆方向（inverse）PCR

10

B-1. SspIゲノムDNAをSacIIで限定消化することによってSspIエンドヌクレアーゼ遺伝子の逆方向PCR用鋳型を調製した。標的SacIIフラグメントは長さ約4kbであり、メチラーゼ及びエンドヌクレアーゼの完全遺伝子をコードしていなければならない。消化後、DNAを希釈し再結合させて環状鋳型を形成した。

B-2. メチラーゼ遺伝子のAseI部位に結合（flank）するPCRプライマーを設計した。増幅を行って、予想された4Kbの産物を同定した。図6はゲノム鋳型に対して逆方向PCRを行うためのスキームを示す。

B-3. 4KbのPCR産物をランダムプライムし、これを使用してSphaerotilusゲノムDNAのサザンブロットをプローブした。エンドヌクレアーゼの位置までのPCR産物をマッピングした。

20

B-4. pSspM-A8またはpSspM-B5メチラーゼ構築物によって予め保護されたコンピテントER2252細胞に逆方向PCR産物をクローニングする試験は失敗に終わった。

B-5. 逆方向PCR産物をBglII及びXhoIで切断してエンドヌクレアーゼ遺伝子のN-末端半鎖を単離した。この産物をpUC19のBamHIからSalIまでの部位にクローニングした。

B-6. EcoRI、SacII、BamHI及びSalIによって逆方向PCR産物のBglII-XhoIフラグメントをマッピングし、SspIエンドヌクレアーゼ遺伝子のN-末端半鎖の正しい構造であることを確認した。このエンドヌクレアーゼ遺伝子のN-末端部分を、既にクローニングされていたC-末端部分に付加すると、完全機能性エンドヌクレアーゼが得られた。

30

C. PCRの使用による制限エンドヌクレアーゼ遺伝子の増幅

C-1. SspIエンドヌクレアーゼのN-末端及びC-末端に適したPCRプライマーを設計した。N-末端用の縮重プライマーは、遺伝子操作により作製されたNdeI部位を含むSspIエンドヌクレアーゼのタンパク質配列に基づく。C-末端のプライマーは遺伝子操作により作製されたBamHI部位を含む修飾メチラーゼのDNA配列に基づく。図7は、エンドヌクレアーゼ増幅用プライマーが由来した場所を示す。

C-2. dNTP及びMgSO₄の存在下にVent DNAポリメラーゼを用い、段階C-1で得られたプライマーによってSphaerotilus種のゲノム鋳型を増幅させた。

40

D. ベクターpAII17中へのPCR産物のクローニング

D-1. 900塩基対のPCR産物をベクターpAII17のNdeIからBamHIまでの部位にクローニングした。プラスミドpAII17はpET11cに基づくT7ベクターである（Kongら, Journal of Biological Chemistry, 268:1965-1975, (1993)）。結合産物で大腸菌RR1及びER2169の双方を形質転換させた。双方の細胞株がSspIメチラーゼによって予め保護されていなかった。

D-2. ER2169形質転換体の96個のコロニーを採取し、アンピシリン含有L-寒天プレート及び10mMのIPTGを加えたアンピシリン含有L-寒天プレートで再度平板培養した。IPTGの存在下に増殖しなかったコロニーに対応するコロニーを個別に増

50

殖させ、10 mMのIPTGで誘発した。ラムダDNAに対する粗細胞抽出物のSspI活性を検定した。図8は、ラムダDNAに対して検定した粗細胞抽出物中のSspI活性の写真である。

【0020】

上記に概説した各段階は本発明の好ましい実施モードを示しているが、上記方法を当業界で公知の技術に従って変更し得ることは当業者に明らかであろう。

【0021】

以下の実施例は現状で実施されるのが好ましい本発明の実施態様を示している。実施例は単なる例示であり、実施例によって本発明の範囲が特許請求の範囲以外の制限を受けてはならないことは理解されよう。

【0022】

【実施例】

SspI制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のクローニング

I. SspIメチラーゼのクローニング

A. ライブラリーの調製

A-1. ゲノムDNAの精製：約5 gのSphaerotilus種の細胞(ATCC # 13925)を解凍し、コーニング(Corning)プラスチック管(50 ml)中で0.1 MのTris-HCl, pH 7.1及び0.1 MのEDTA(25 ml)に再懸濁させた。35 mlの上記バッファ中に60 mgのリゾチームを含む溶液を2つの50 mlプラスチック管に分割し、各々に等しい分量(15 ml)の細胞懸濁液を添加した。溶液を37℃で15分間インキュベートした。20%ストック溶液からSDSを添加してSDSの最終濃度を1%に調整した。200 µlのプロテインナーゼK(ストック1 mlあたり20 mg)を添加し、37℃で1時間インキュベートした。この時点で粘性の拡散溶液が得られたが、溶液は透明ではなかった。2 mlの10% SDS / 8%サルコシルを管に添加し(各1 ml)、55℃で2時間加熱した。サンプルは粘性に維持されたが、完全に透明ではなかった。サンプルをTE(10 mMのTris-HCl, pH 7.1、1 mMのEDTA)(2 リットル)に一回交換して合計16時間透析した。透析後、溶液(98 ml)を等容量のTE, pH 8.0で希釈し、2つに分割し、各々に98.0 gのCsClと1 mlの5 mg/mlの臭化エチジウムとを添加することによって、CsCl勾配溶液を調製した。20個の管をTi70ロータに入れ44,000 rpmで48時間遠心した。バンドを取り出し、CsCl-水-飽和イソプロパノールで抽出した。溶液を上記と同じバッファに透析し、次いで、フェノール及びクロロホルムで抽出した(各々で1回ずつ)。この溶液を再度透析してフェノールを除去し、次いで電気泳動にかけた。

A-2. 限定消化：精製したDNAをBglIIで切断し、以下の手順で完全消化した。50 mMのTris, pH 7.5と10 mMのMgCl₂と100 mMのNaClと1 mMのDTTとから成るバッファ中に100 µg/mlのDNAを含む300 µlの溶液を調製し、この溶液を3つの管に分割した。50単位の適当な制限酵素を管に添加した。管を37℃で1時間インキュベートし、次にフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させた。ペレットを300 µlの10 mMのTris-HCl、1 mMのEDTA, pH 8.0に再溶解し、各10 µlをアガロースゲル電気泳動によって分析した。

A-3. 結合：フラグメント化したDNAをpBII Sp1.2(XcaIで切断したpBII01(ATCC # 67901)とSspI部位が挿入されたリンカー)に以下のごとく結合した。BglIIで消化した10.0 µgのSphaerotilus種のDNA(100 µl)を、2.0 µgのBglII開裂し脱リン酸化したpBII Sp1.2(20.0 µl)と混合し、エタノール沈殿させた。DNAを12,000 g、4℃で15分間遠心し、100 µlの70%エタノールで1回洗浄した。DNAを99 µlの1×結合バッファ(50 mMのTris, pH 7.5、10 mMのMgCl₂、10 mMのDTT、0.5 mMのATP)に再懸濁させ、1 µlのT4 DNAリガーゼを添加し、混合物を16℃で16時間インキュベートした。3 µlのアリコートを使用して大腸菌RR1株を以下のごとく形質転換させた。各アリコートを200 µlの氷冷したコンピテント

10

20

30

40

50

大腸菌 RR1 細胞と混合し、30 分間氷上に維持した。42℃で2分間熱衝撃した後、細胞を1mlのルリアブイヨン (L-broth) で希釈し、37℃で1時間増殖させた。A-4. 一次細胞ライブラリー：形質転換した細胞培養物を遠心し、250μlの容量に再懸濁させ、100μg/mlのアンピシリンを含むルリアー寒天 (L-寒天) プレートで平板培養した。37℃で一夜インキュベーション後、プレートを取り出し、約114,000コロニーを掻き取り、抗生物質を含む25mlのLB培地に導入した。これらの細胞から以下の手順でプラスミドDNAを調製した。細胞を遠心によってペレット化し、3gの細胞ペーストを14mlの25mMのTris-HCl、10mMのEDTA, pH 8.0及び50mMのグルコースに再懸濁させた。懸濁液をリゾチーム中で4.0mg/mlに希釈し、25℃で5分間インキュベートした。1%のドデシル硫酸ナトリウムと0.2NのNaOHとの27mlのアリコートを追加し、次いで溶液を攪拌し、0℃で5分間インキュベートした。氷冷した20mlの3M酢酸カリウム, pH 4.8を追加してゲノムDNAを沈殿させ、10秒間穏やかに攪拌し、氷上に5分間静置し、12,000×gで10分間遠心した。上清を除去し、等容量のフェノール/クロロホルム (1:1) で抽出した。10,000×gで5分間遠心することによって層を分離した。上層を除去し、等容量のクロロホルムで抽出した。10,000×gで5分間遠心することによって層を分離した。上層を除去し、2倍容のエタノールを追加することによって核酸を沈殿させた。12,000×gで20分間遠心することによって沈殿物を収集した。70%のエタノールでペレットを1回洗浄し、上記同様に再ペレット化した。ペレットを真空下に乾燥し、8mlの10mMのTris-HCl、1mMのEDTA, pH 8.0中に再懸濁させた。8gの塩化セシウムと0.5mlの臭化エチジウム溶液 (5mg/ml) とを追加することによって塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度遠心のためのDNA溶液を調製した。DNA溶液を44,000rpmで48時間遠心し、得られたプラスミドDNAのバンドを注射器及び18g針で取り出した。等容量のCsCl-水-飽和イソプロパノールで抽出することによって臭化エチジウムを除去した。塩化セシウムを透析によって除去した。DNAを等容量のフェノール/クロロホルム (1:1) によって抽出し、10mMのTris-HCl、1mMのEDTA, pH 8.0に一夜透析した。

B. ライブラリーの選択及びスクリーニング

B-1. 一次選択及び選択されたライブラリー：1μg (12.0μl) のBg1IIプラスミドライブラリーを、27μlの制限エンドヌクレアーゼ消化バッファ (10mMのTris, pH 7.5、10mMのMgCl₂、1mMのDTT、50mMのNaCl及び100μgのウシ血清アルブミン) に希釈した。100単位 (1μl) のSspI制限エンドヌクレアーゼを追加し、管を37℃で2時間インキュベートした。この時点で7単位 (1μl) の仔ウシ腸ホスファターゼを追加し、反応混合物を更に30分間インキュベートした。一次ライブラリーの場合と同様に、この反応混合物の5μlのアリコートを200μlの氷冷したコンピテント大腸菌RR1細胞と混合して形質転換させ、平板培養し、一夜増殖させた。

B-2. 個別コロニーの分析：上記の形質転換によって得られたコロニーを採取し、アンピシリン含有のLB寒天培地で平板培養した。18個のコロニーを10mlの培養物に増殖させ、それらに含まれるプラスミドを、Birnbom & Dolyの方法 (Nucleic Acids Res. 7:1513 (1979)) を応用した以下のミニ調製物 (mini prep) 精製手順によって調製した。

【0023】

ミニ調製物精製手順：各培養物を以下のごとく処理した。1. 5mlの一夜培養物を6,000×gで5分間遠心してペレット化した。上清を傾瀉し、細胞ペレットを2mg/mlのリゾチーム含有の150μlの25mMのTris、10mMのEDTA、50mMのグルコース, pH 8.0に再懸濁させた。室温で5分間維持後、200μlの0.2MのNaOH、1%のSDSを追加し、管を振盪して細胞を溶解し、次いで氷に載せた。5分後、150μlの3Mの酢酸ナトリウム, pH 4.8を追加し、振盪し、氷に載せ、更に5分間維持した。形成された沈殿物を4℃、12,000×gで5分間遠心した。上清

10

20

30

40

50

を除去し、等容量のフェノール／クロロホルム（１：１）によって抽出した。１０，０００×gで５分間遠心することによって層を分離した。８８０μlのエタノールを収容した遠心管に上清を注入し、混合した。室温で１０分間維持した後、管を１２，０００×gで１０分間遠心し、沈殿した核酸をペレット化した。上清を廃棄し、ペレットを１mlの７０％エタノール／水で再度洗浄し、再度ペレット化し、真空下に室温で３０分間乾燥した。いったん乾燥したペレットを、２０μg/mlのRNアーゼ含有の５０μlの１０mMのTris、１mMのEDTA、pH 8.0に再懸濁させ、３７℃で１時間インキュベートしてRNAを消化した。

【００２４】

引き続いて、プラスミドのミニ調製物をSspI及びBglIIで消化することによって分析した。 10

B-3. メチラーゼ遺伝子クローン：分析したプラスミドの１１％がSspIに耐性であり長さ約９．６KbのBglIIフラグメントを保有することが判明した。これらのプラスミドは機能性SspI修飾メチラーゼ遺伝子だけをコードしており制限エンドヌクレアーゼ遺伝子をコードしていないことが後で判明した。観察した他の８９％のプラスミドはSspIに耐性でなく、不要な（spurious）フラグメントを含むかまたはベクターに再結合していた。EcoRI、PstI、SphI及びXhoIから成る他の４つのライブラリー中では、SspIエンドヌクレアーゼによる開裂に対して耐性のクローンは全く検出されなかった。これらの４つのライブラリーを以下の手順でサザンブロッティング用に調製した。１μgのライブラリーDNAをSspIまたはクローニング酵素（即ちPstIライブラリー用にはPstI、EcoRIライブラリー用にはEcoRI、など）によって消化した。未切断のライブラリーDNA及びゲノムDNAを０．７％のアガロースゲル上でクローニング酵素によって一夜消化した。ゲルに対して、０．２５MのHClによる１５分間の洗浄を２回繰り返し、次いで０．５MのNaOH、１．５MのNaClによる１５分間の洗浄を２回繰り返し、最後に１MのNH₄OAc、０．０２MのNaOHによる３０分間の洗浄を２回繰り返した。DNAをニトロセルロースに転移させるために、細孔サイズ０．４５μmのニトロセルロースシートを１MのNH₄OAc、０．０２MのNaOHで湿潤させ、ゲルと同寸法の切片をゲルの片面に配置した。これを高さ２インチのペーパータオルの積層体の上に載せ、その上に別の２インチのペーパータオルの積層体をかぶせた。積層体の上にガラスプレートを載せ、一番上に小さい錘を載せた。一夜維持してDNAを転移させた。ニトロセルロースを８０℃で１時間ベーキングした。メチラーゼクローンpSspIM14.0-B6のニックトランスレーションを以下のごとく行って³²P標識プローブを調製した。１μgのpSspIM14.0-B6を０．５MのTris-HCl、pH 7.8、５０mMのMgCl₂、０．１Mのβ-メルカプトエタノール及び０．５mg/mlのBSAに再懸濁させた。４μlの各０．１mMのdCTP、dGTP及びdTTPを１０μlの６５０Ci/mmolのα³²-PのdATPと共に添加した。４ピコグラムのDNAアーゼIを１０単位の大腸菌DNAポリメラーゼIと共に添加した。この混合物を１６℃で３時間インキュベートした。 20 30

【００２５】

ニトロセルロースブロットを１５mlの５０×デンハルト（Denhardt's）溶液（５００mlのH₂O中に５gのフィコール（Ficoll）、５gのポリビニルピロリドン、５gのBSA）、２０×SSC（１リットルのH₂O中の１７５．３gのNaCl、８８．２gのクエン酸ナトリウム）、１０％のSDS及び１０％の硫酸デキストラン中でプレハイブリダイズした。室温で１時間プレハイブリダイズした後、標識プローブを添加し、ハイブリダイゼーション段階を６８℃で一夜実施した。ブロットを１時間にわたって６８℃の２×SSCで３回、０．１％のSDSを加えた２×SSCで３回洗浄した。ブロットをX線フィルムに４及び１８時間露光した。 40

【００２６】

EcoRIライブラリーだけがプローブにハイブリダイズするメチラーゼクローンを含むことが判明した。 50

C. S s p Iメチラーゼクロンのマッピング及び欠失サブクロンの調製

C-1. 5 μ g の p S s p I M14. 0-B6 を P s t I 制限エンドヌクレアーゼによって以下のごとく消化した。50 mM の T r i s, pH 7. 9、10 mM の M g C l₂、100 mM の N a C l、1 mM の D T T 中に 100 μ g / ml の濃度の DNA を含む 50 μ l の溶液を試験管に導入した。この管に、100 単位の P s t I エンドヌクレアーゼを添加し、反応混合物を 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。消化物全部を 0. 7 % アガロース分取ゲル上で泳動した。全メチラーゼ遺伝子を含有すると判定された約 7 kb の P s t I フラグメントから成る選択フラグメントをゲルから切り出した。ゲルフラグメントを 21 ゲージの針から交互に押し出して凍結させた。この処理を 3 回繰り返した。得られた混合物を 4 $^{\circ}$ C、100, 000 $\times$ g で 1 時間遠心してアガロースをペレット化した。残りの水溶液を N a C l 濃度 0. 4 M にし、2 倍容のイソプロパノールで沈殿させた。12, 000 $\times$ g で 20 分間遠心することによって DNA をペレット化し、低温の 70 % エタノールで 1 回洗浄した。DNA ペレットを 2 ml の T E (10 mM の T r i s、1 mM の E D T A, pH 8) に再懸濁させ、等容量のフェノールによって抽出した。10, 000 $\times$ g で 10 分間遠心することによって層を分離した。上層を除去し、等容量のフェノール / クロロホルム (1 : 1) で抽出し、10, 000 $\times$ g で 10 分間遠心することによって層を分離した。上層を除去し、等容量のクロロホルムで抽出し、10, 000 $\times$ g で遠心することによって層を分離した。水相を除去し、1 / 10 容量 (0. 2 ml) の 2. 75 M の酢酸ナトリウムと 2 倍容の冷エタノールとを添加することによって DNA を沈殿させた。12, 000 $\times$ g で 20 分間遠心して DNA をペレット化し、冷 70 % エタノールで 1 回

10

20

C-2. ゲル調製した DNA フラグメントを以下の手順で再結合した。5 μ l の 10 $\times$ 結合バッファ (50 mM の T r i s, pH 7. 5、10 mM の M g C l₂、10 mM の D T T、0. 5 mM の A T P) をゲル調製した 45 μ l の限定消化フラグメントに添加し、1 μ l の T 4 DNA リガーゼを添加し、混合物を 16 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベートした。1、2 及び 3 μ l のアリコートを使用して段階 I (A-3) に記載のように大腸菌 R R 1 株を形質転換させた。形質転換した細胞培養物を遠心し、250 μ l 容量に再懸濁させ、15 μ g / ml のテトラサイクリン含有の L-寒天で平板培養した。得られた平板培養物を 37 $^{\circ}$ C で一夜インキュベートした。

30

C-3. 段階 I (B-3) に記載の手順で複数のコロニーをミニ調製すると、正しいサイズのフラグメントが含まれることが知見された。P s t I 欠失クロンは S s p I 消化に耐性であり、従って完全メチラーゼ遺伝子を含んでいることが判明した。

【0027】

また、段階 I (C-1) の記載と同様にして、50 mM の T r i s-HC l, pH 7. 9、10 mM の M g C l₂、100 mM の N a C l、1 mM の D T T 中で p S s p I M14. 0-B6 を A s e I で消化し、5 Kb の消化産物をゲル調製し、再結合し、15 μ g / ml のテトラサイクリンを含む培地で平板培養した。次に、ミニ調製した DNA を S s p I 消化すると、S s p I に耐性でないことが判明した。また、p S s p I M14. 0-B6 を 10 mM の T r i s-HC l, pH 7. 9、10 mM の M g C l₂、150 mM の N a C l、1 mM の D T T 中の B a m H I で消化し、7 Kb の消化産物をゲル調製し、再結合し、100 μ g / ml のアンピシリンを含む培地で平板培養した。次に、ミニ調製した DNA を S s p I 消化すると、S s p I に耐性であることが判明した。また、p S s p I M14. 0-B6 を 10 mM の T r i s-HC l, pH 7. 9、10 mM の M g C l₂、50 mM の N a C l、1 mM の D T T 中の E c o R V で消化し、13 Kb の消化産物をゲル調製し、再結合し、100 μ g / ml のアンピシリンを含む培地で平板培養した。次に、ミニ調製した DNA を S s p I 消化すると、S s p I に耐性であることが判明した。また、p S s p I M14. 0-B6 を 10 mM の T r i s-HC l, PH 7. 9、10 mM の M g C l₂、50 mM の N a C l、1 mM の D T T 中の X h o I で消化し、次いで 6. 8 Kb の消化産物をゲル調製し、再結合し、100 μ g / ml のアンピシリンを含む培地

40

50

で平板培養した。次に、ミニ調製したDNAをSspI消化すると、SspIに耐性であることが判明した。また、pSspIM14.0-B6をClaI及びBstBIで二重消化した。まず、20mMのTris-酢酸塩、pH7.9、10mMの酢酸マグネシウム、50mMの酢酸カリウム及び1mMのDTT中のClaIで37℃で消化した。次いで、5,000単位のBstBIを添加し、混合物を65℃で1時間インキュベートした。11.4Kbの消化産物をゲル調製し、再結合し、100μg/mlのアmpiシリンを含む培地で平板培養した。ミニ調製したDNAをSspI消化すると、SspIに耐性でないことが判明した。SspIメチラーゼの欠失クローンを図2にまとめる。

【0028】

これらの欠失クローンの全部において、メチラーゼ含有DNAの最小領域はBglII部位とXhoI部位との間に存在していた。従って、50mMのTris-HCl, pH7.9、10mMのMgCl₂、100mMのNaCl、1mMのDTT中の5μgのpSspIM14.0-B6を、40単位のBglII及び40単位のXhoIによって1時間消化した。消化産物を0.7%の低融点アガロースゲル上で泳動した。1.2KbのBglII-XhoIフラグメントをゲルから切り出した。β-アガロースを用いて以下の手順でゲルからDNAを回収した。ゲル切片を55℃で融解し、10mMのTris-HCl (pH6.5)と1mMのEDTA中に導入した。6単位のβ-アガロースを添加し、アガロースを42℃で1時間消化した。4℃、15,000×gで15分間遠心することによって未消化の糖質をペレット化した。DNA含有上清に0.5MのNaClを加え、2倍容のイソプロパノールを添加した。これを攪拌し、-20℃で15分間冷却した後、15,000×gで15分間遠心した。DNAペレットを70%のイソプロパノールで洗浄して乾燥した。DNAを20μlのTEに再懸濁させた。10μlのBglII-XhoIメチラーゼフラグメントを夫々pUC18及びpUC19のSalI-BamHI部位に結合した。これらの2つのメチラーゼサブクローンのDNA配列を決定した。得られたDNA配列を図3に示す。

D. SspIエンドヌクレアーゼタンパク質の調製、SspIエンドヌクレアーゼタンパク質の配列決定、及び、SspIエンドヌクレアーゼの位置のマッピング

D-1. NEB#315と命名されたSphaerotilus種のSspIエンドヌクレアーゼを、37℃の発酵槽中で、10.0g/リットルのトリプトンと、5.0g/リットルの酵母エキスト、2.0g/リットルのNaClと、4.4g/リットルのK₂HPO₄と、2.0g/リットルのグルコースと、10mg/リットルのウシヘミンと、2.0mg/リットルのNAD⁺;DPNとから成るTRY-YEブイヨン培地中で増殖させた。細胞を遠心によって収集し、細胞ペーストを新鮮なうちに使用するかまたは-70℃で保存した。以後の段階はすべて4℃で行う。

D-2. 細胞ペースト(253g)を解凍し、細胞を500mlの音波処理バッファ(20mMのTris-HCl, pH7.6、0.1mMのEDTA、50mMのNaCl、1mMのDTT)に再懸濁させる。

D-3. 細胞をgaulinミルによって破壊して懸濁細胞1mlあたり約35mgの可溶性タンパク質を遊離させる。

D-4. 15,000×gで40分間遠心することによって不溶性細胞破片を除去する。

D-5. 上清に50gの細胞破片除去剤(Whatman)を添加し、10,000×gで10分間遠心する。

D-6. 20mMのK₂HPO₄, pH6.9、50mMのNaCl、0.1mMのEDTA、1mMのDTTで平衡させたホスホセルロースカラム(5×35cm)(Whatman P-11)に上清流体を加える。カラムの2倍容の上記バッファでカラムを洗浄する。カラムを素通りした流体を単一フラスコに収集する。SspIエンドヌクレアーゼはカラムに保持され、0.3~0.6MのNaClに溶出する。最も活性の画分をプールし、20mMのK₂HPO₄, pH7.4、50mMのNaCl、0.1mMのEDTA、1mMのDTTに対して一夜透析する。

D-7. ホスホセルロースカラムから得られたプールを、20mMのK₂HPO₄, pH

7. 4、0. 05 mMのNaCl、0. 1 mMのEDTA、1 mMのDTTで平衡させたヘパリンセファロースCL-6Bカラム(2. 5×25 cm)に導入し、カラムの2倍容の同じバッファで洗浄する。0. 05 Mから0. 8 MまでのNaClの直線勾配(総容量500 ml)を展開させ、カラムに導入する。3 mlの画分が収集される。ラムダDNAに対する画分中のSspI制限エンドヌクレアーゼの存在を検定する。活性画分をプールし、100倍容の20 mMのK₂HPO₄、pH 7. 4、0. 05 mMのNaCl、0. 1 mMのEDTA、1 mMのDTTに透析する。

D-8. 透析したSspI活性のプール(25 ml)を1 mlのMono SFPLCカラム(Pharmacia)に導入し、20 mMのK₂HPO₄、pH 7. 4、0. 05 mMのNaCl、0. 1 mMのEDTA、1 mMのDTTで洗浄し、同じバッファ中で50 mMのKClから1. 0 MのKClまでの40 mlの直線勾配を展開させ、カラムに導入する。1 mlの画分を収集し、SspI制限エンドヌクレアーゼ活性の存在を検定する。最も活性の4つの画分は均質であり、タンパク質1 mgあたり比活性約140, 000単位を有し、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分子量32, 000ダルトンを有することが判明した。

D-9. Applied Biosystems Model 470A気相タンパク質シーケンサー(Brooksら, Nucleic Acids Research, 17: 979-997, (1989))を用い、4 µgの均質なSspIエンドヌクレアーゼのアミノ末端タンパク質の配列を決定した。最初の30個の残基は分解していた。得られた最初の25個の残基の配列は以下の通りであった: SKAAYQDFTKXSLLIK KXXNLITM(配列番号1)(タンパク質配列の1文字コードの説明に関しては表1を参照されたい)。

D-10. タンパク質配列に基づいて、以下の配列をもつ2個の17merを作製した: 5' GCNGCNTAYCARGACTT3'(配列番号2)及び5' GCNGCNTAYCARGATTTT3'(配列番号3)(Y=TまたはC; D=A、GまたはT; R=AまたはG; N=A、C、GまたはT)。これらの17merを使用して、SphaerotilusゲノムDNA上のエンドヌクレアーゼのアミノ末端の位置をマッピングした。

【0029】

オリゴマープローブを以下の手順でγ-32-Pによって末端標識した。5 µlのオリゴマープローブ(250 ng)を、20 µlの70 mMのTris-HCl、pH 7. 6、10 mMのMgCl₂、5 mMのDTTに再懸濁させる。5 µlのγ-32-Pを添加し、次いで1 µlのT4ポリヌクレオチドキナーゼを添加する。これを37℃で30分間インキュベートした。

【0030】

サザンブロットを以下のごとく調製した。1 µgのSphaerotilusゲノムDNAをAseI、BamHI、BglII、BsmI、BstBI、BstEII、EcoRI、EcoRV、PstI、PvuII、SacI、SphIまたはXhoIによって消化した。消化物を0. 7%のアガロースゲル上で一夜泳動した。ゲルを0. 25 MのHClで15分間ずつ2回洗浄し、次いで0. 5 MのNaOH、1. 5 MのNaClで夫々15分間ずつ2回洗浄し、最後に1 MのNH₄OAc、0. 02 MのNaOHで30分間ずつ2回洗浄した。DNAをニトロセルロースに転移させるために、細孔サイズ0. 45 µmのニトロセルロースシートを1 MのNH₄OAc、0. 02 MのNaOHで湿潤させ、ゲルと同寸法の1つの切片をゲルの片面に配置した。これを高さ2インチのペーパータオルの積層体の上に載せ、その上に別の2インチのペーパータオルの積層体をかぶせた。積層体の上にガラスプレートを載せ、一番上に小さい錘を載せた。一夜維持してDNAを転移させた。ニトロセルロースを80℃で1時間ベーキングした。

【0031】

ニトロセルロースブロットを15 mlの50×デンハルト溶液(500 mlのH₂O中に5 gのフィコール、5 gのポリビニルピロリドン、5 gのBSA)、20×SSC(1リットルのH₂O中の175. 3 gのNaCl、88. 2 gのクエン酸ナトリウム)、10

10

20

30

40

50

%のSDS及び10%の硫酸デキストラン中でプレハイブリダイズした。室温で1時間プレハイブリダイズした後、標識プローブを添加し、ハイブリダイゼーション段階を37℃で一夜実施した。ブロットを1時間にわたって37℃の2×SSCで3回、0.1%のSDSを加えた2×SSCで3回洗浄した。ブロットをX線フィルムに4日間及び7日間露光した。

【0032】

このブロットから、pSspIM14.0-B6クローンの地図、制限エンドヌクレアーゼの領域のゲノム地図を作製した。図5は、Sphaerotilusゲノム中のSspI制限／修飾系の領域の制限部位の地図である。

II. SspI制限系のクローニング

10

A. McrA⁻宿主中の新しいライブラリーの調製

A-1. メチラーゼのDNA配列に基づいて、PCRプライマーを設計した。N-末端用プライマーは以下の配列：5' GCTTGAAGATCTAGAGGATTTTCATATGGGATCAATGTTTAAACACCCACACAA3'（配列番号4）を有していた。C-末端プライマーは以下の配列：5' TTCTTGTGTGGCGTTCGCTCGAGCACCCAGTTAGGA3'（配列番号5）を有していた。SspIメチラーゼをpSspIM14.0-B6から以下のごとく増幅した。2ngの鋳型DNAを、10mMのKCl、20mMのTris-HCl（pH8.8）、10mMの(NH₄)₂SO₄、6mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100、200μMのdNTP、プライマーに希釈し、1単位のVent DNAポリメラーゼを添加した。95℃で1分間変性し、72℃で1分間アニーリングし、75℃で2分間伸長させるサイクルをサーマルサイクラー中で35サイクル繰り返した。1.1KbのPCR産物が得られた。PCR産物をTEに対して1時間微量透析し、次いで10μlをBglII及びXhoIで以下のごとく消化した。10μlのPCR産物に、2μlの500mMのTris-HCl, pH7.9、100mMのMgCl₂、1MのNaCl、10mMのDTTと、4μlのH₂Oと、24単位のBglII及び20単位のXhoIとを添加し、37℃で一夜インキュベートした。

20

【0033】

ベクターを以下のごとく調製した。5μgのpUC18またはpUC19を、20μl中の150mMのNaCl、10mMのTris-HCl, pH7.9、10mMのMgCl₂、1mMのDTT中でインキュベートし、20単位のBamHIと60単位のSalIとを添加した。消化物を37℃で1時間インキュベートした。次にDNAをフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させた。DNAを50μlのTEに再懸濁させた。

30

【0034】

プラスミドとBglII-XhoI切断PCR産物とを16℃で一夜結合させた。増幅したメチラーゼ構築物で大腸菌ER2252株を形質転換させ、コンピテント細胞を調製した。（lacプロモーターの反対方向に伸びる）pUC19中のメチラーゼは構築物pSspM-A8である。（lacプロモーターと同方向に伸びる）pUC18中のメチラーゼは構築物pSspM-B5である。

40

A-2. 段階I（D-10）で得られたデータに基づいて、（段階I（A-1）に記載のごとく調製された）精製Sphaerotilus種のゲノムDNAを、SphIまたはXhoIを用いて以下の手順で限定消化した。10μgのゲノムDNAを10mMのTris-HCl, pH7.9、10mMのMgCl₂、50mMのNaCl、1mMのDTTに希釈し、50単位のSphIまたはXhoIと共に適当な管に導入した。管を37℃で1時間インキュベートし、次いでフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させた。ペレットを50μlの10mMのTris-HCl、1mMのEDTA, pH8.0に再溶解させ、各1μlの溶解物をアガロースゲル電気泳動によって分析した。

【0035】

pACYC184ベクターを以下の手順で調製した。10μgのpACYC184を20

50

0 μ l の 10 mM の T r i s - H C l , p H 7 . 9 、 10 mM の M g C l ₂ 、 50 mM の N a C l 、 1 mM の D T T に再懸濁させた。40 単位の S p h I または S a l I を添加し、消化物を 37 $^{\circ}$ C で 1 . 5 時間インキュベートし、ここで 4 単位の c i p を添加し、インキュベーションをさらに 30 分間継続した。消化物をフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させた。ペレットを 100 μ l の T E に再懸濁させた。

【0036】

結合を以下の手順で行った。S p h I 切断した 10 μ g のゲノム DNA と、S p h I 切断した 10 μ g の p A C Y C 184 とを、50 μ l の結合バッファ (50 mM の T r i s , p H 7 . 5 、 10 mM の M g C l ₂ 、 10 mM の D T T 、 0 . 5 mM の A T P) 中で混合し、1 μ l の T 4 DNA リガーゼを添加し、混合物を 16 $^{\circ}$ C で一夜インキュベートした。X h o I 切断した 10 μ g のゲノム DNA と、S a l I 切断し脱リン酸化した 10 μ g の p A C Y C 184 とを、50 μ l の結合バッファ中で混合した。1 μ l の T 4 DNA リガーゼを添加し、16 $^{\circ}$ C で一夜インキュベートした。

A-3. p S s p M-A8 または p S s p M-B5 によって予め保護された E R 2252 細胞を形質転換させる以外は段階 I (A-4) の手順を用いて一次細胞ライブラリーを調製した。一次細胞ライブラリーから得られた DNA を以下の制限酵素: A s e I 、 B a m H I 、 B g l I I 、 B s m I 、 B s t B I 、 B s t E I I 、 E c o R I 、 E v o R V 、 P s t I 、 P v u I I 、 S a c I I 、 S p h I または X h o I によって消化した。消化物を 0 . 7 % のアガロースゲル上で一夜泳動した。段階 I (B-3) と同様にサザンブロットィング用ゲルを調製した。サザンブロットを、段階 I (D-10) で使用した S s p エンドヌクレアーゼの N-末端用の 2 つの縮重オリゴによってプローブした。サザンブロットからエンドヌクレアーゼ含有クローンは全く同定されなかった。

B. S p h a e r o t i l u s 種のゲノム DNA の逆方向 P C R

B-1. P C R 用鋳型となる S p h a e r o t i l u s 種の DNA を段階 I (A-1) と同様にして調製した。次いで、DNA を S a c I I によって以下の手順で消化した。5 μ g のゲノム DNA を 95 μ l の 20 mM の T r i s - 酢酸塩、10 mM の酢酸マグネシウム、50 mM の酢酸カリウム、1 mM の D T T に再懸濁させ、5 μ l (100 単位) の S a c I I を添加し、混合物を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。消化物をフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させた。DNA ペレットを 500 μ l の 1 $\times$ リガーゼバッファ (50 mM の T r i s - H C l , p H 7 . 8 、 10 mM の M g C l ₂ 、 10 mM の D T T 、 1 mM の A T P 、 25 μ g / m l の B S A) に再懸濁させ、次いで 1 μ l の T 4 DNA リガーゼを添加した。結合を 16 $^{\circ}$ C で一夜進行させた。リガーゼを 65 $^{\circ}$ C で 15 分間熱失活させた。

B-2. 逆方向 P C R に使用したプライマーはメチラーゼ遺伝子内部の DNA 配列に由来した。右回りの 30 m e r は以下の配列を有している: T G A G T G G C T T A G G G A T G C A G A A G A G C C A A A (配列番号 6)。左回りのプライマーの配列は T T G G T C A C T T C A T T T C G C C A T G A C A T T T C G (配列番号 7) である。

【0037】

S a c I I 切断し再結合した 1 μ g のゲノム鋳型 (段階 I I (B-1) に記載のごとく調製) を、10 mM の K C l 、 20 mM の T r i s - H C l (p H 8 . 8) 、 10 mM の (N H ₄) ₂ S O ₄ 、 2 mM の M g S O ₄ 、 0 . 1 % の T r i t o n X-100 、 200 μ M の d N T P 、プライマーと混合し、1 単位の V e n t DNA ポリメラーゼを添加した。95 $^{\circ}$ C で 1 分間変性し、65 $^{\circ}$ C で 1 分間アニーリングし、72 $^{\circ}$ C で 4 分間伸長させるサイクルをサーマルサイクラー内で 30 サイクル繰り返した。4 K b の P C R 産物が観察された。

B-3. 4 K b の P C R 産物を 0 . 7 % の低融点アガロースゲル上で泳動した。P C R 産物をゲルから切り出し、N E B l o t キットを用いて以下のごとくランダムプライムした。ゲル切片は 65 $^{\circ}$ C で溶解し、その測定容量は 70 μ l であった。10 μ l の 10 $\times$ ランダムプライミングバッファを添加し、250 μ mol の d A T P 、 d T T P 及び d G T P を添加した。1 μ l の DNA-ポリメラーゼ I-クレノウフラグメントと 5 μ l の ³²P-

10

20

30

40

50

7-dCTPとを添加した。ランダムプライミング反応を37℃で6時間継続させた。ランダムプライミングしたPCR産物を使用して、AseI、BamHI、BglII、BsmI、BspHI、BstBI、BstEII、EcoRV、NcoI、NdeI、PstI、PvuII、SacII、SphIまたはXhoIによって消化したSspゲノムDNAのサザンブロットをプローブした。ハイブリダイゼーションを68℃で一夜行った。ブロットを2×SSCで5回洗浄した。ブロットをX線フィルムに4時間露光し、次いで現像した。SspIエンドヌクレアーゼの位置に対する逆方向PCR産物をマッピングした。

B-4. 逆方向PCR産物を以下の手順でpACYC184にクローニングした。最初に、ベクターをEcoRVによって切断し、脱リン酸化した。8μgのpACYC184を100μlの10mMのTris-HCl, pH7.9、10mMのMgCl₂、50mMのNaCl、1mMのDTTに再懸濁させ、6単位のEcoRVを添加し、消化物を37℃で1.5時間インキュベートした。10単位の仔ウシ腸ホスファターゼを添加し、反応をさらに30分間進行させた。DNAをフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させた。逆方向PCRによって得られたSspIエンドヌクレアーゼを、100μlの70mMのTris-HCl, pH7.6、10mMのMgCl₂、5mMのDTT、66μMのdATP中で10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼによってキナーゼ処理した。キナーゼ処理した逆方向PCR産物を次に、EcoRV切断し脱リン酸化したpACYC184に以下の手順で結合した。EcoRV切断し脱リン酸化した1μgのpACYC184を、1×リガーゼバッファ（50mMのTris-HCl, pH7.8、10mMのMgCl₂、10mMのDTT、1mMのATP、25μg/mlのBSA）に懸濁させた。キナーゼ処理した20μlの逆方向PCR産物を、800単位のT4 DNAリガーゼと共に添加した。結合反応を室温で1時間進行させ、次いで5μlを用いて、pSspM-A8及びpSspM-B5で予め保護したER2252細胞を形質転換させた（段階II（A-1）と同様にして調製）。

【0038】

細胞をプレートから掻き取り、一次細胞ライブラリーの場合と同様にしてDNAを調製した（段階I（A-4））。DNAを以下の酵素：AseI、BamHI、BglII、EcoRI、EcoRV、NsiI、PstI、SacII、SalI、SphI及びXhoIで消化し、次いで0.7%のアガロースゲル上で泳動し、サザンブロットした。サザンブロットを、配列GCTGTTTCAGCTCTGGCACGTGCGGCATCG（配列番号8）をもつSspIエンドヌクレアーゼのC-末端に特異的なキナーゼ処理した30mer（段階I（D-10）に記載のごとくキナーゼ処理）でプローブした。エンドヌクレアーゼ遺伝子をコードするDNAは検出されなかった。

B-5. エンドヌクレアーゼ遺伝子のN-末端半鎖を単離するために、逆方向PCR産物をXhoI及びBglIIによって切断した。10μlの逆方向PCRをTEに対して1時間微量透析した。次に、逆方向PCR産物を50mMのTris-HCl, pH7.9、10mMのMgCl₂、100mMのNaCl、1mMのDTTに導入し、8単位のBglII及び20単位のXhoIを添加した。これを37℃で1時間インキュベートした。65℃で20分間インキュベートすることによって制限酵素を熱失活させた。これをBamHI及びSalIで切断しておいたpUC19に結合した。BamHI及びSalI切断した100ngのpUC19をリガーゼバッファに再懸濁させた。BglII-XhoI切断した20μlの逆方向PCR産物を添加し、400単位のT4 DNAリガーゼを添加した。結合を16℃で一夜進行させた。20μlの結合産物でER2267を形質転換し、80ngのX-gal及び10mMのIPTGと共に50μg/mlのアmpiシリン含有培地で平板培養した。

【0039】

いくつかの白色ヒロニーを採取し、10mlの一夜培養物として増殖させた。これらの細胞をミニ調製すると50%がインサートを含むことが判明した。

B-6. インサートDNAを含むと判断されたミニ調製物（段階11（B-5））で得られ

10

20

30

40

50

たもの)をBamHI、SalI、EcoRI及びSacIIでマッピングして、インサートがSspIエンドヌクレアーゼのN-末端半鎖として正しい制限地図を有するか否かを判定した。BamHI及びSalI消化物を得るためには、150mMのNaCl、10mMのTris-HCl (pH7.9)、10mMのMgCl₂、1mMのDTTに再懸濁させてミニ調製した1μgのDNAを20単位のBamHIまたは20単位のSalIによって消化した。EcoRI消化物を得るためには、50mMのNaCl、100mMのTris-HCl (pH7.5)、10mMのMgCl₂、及び0.025%のトリトンX-100中で20単位のEcoRIによって消化した。SacII消化物を得るためには、50mMの酢酸カリウム、20mMのTris-酢酸塩 (pH7.9)、10mMの酢酸マグネシウム及び1mMのDTT中で20単位のSacIIによって消化した。上記反応の各々ではミニ調製した1μgのDNAを37℃で1.5時間消化した。マッピングしたインサートDNAの半鎖はSspIエンドヌクレアーゼのN-末端半鎖の正しい構造を有していた。

10

C. PCRを用いた制限エンドヌクレアーゼ遺伝子の増幅

C-1. ゲノムDNAからSspIエンドヌクレアーゼ遺伝子を直接増幅するために2つのオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。遺伝子のN-末端用プライマーは、段階I (D-9) で得られたような、遺伝子操作によって作製されたNdeI及びXbaI部位を含む縮重アミノ酸配列に基づいていた。N-末端オリゴの配列は、GCTCTAGACCCGGGCATATGTCVAAAGCMGCMTAYCAAGATTTTAA (配列番号9) (V=A、CまたはG; M=AまたはC; Y=CまたはT) である。C-末端用オリゴは、CAATTTTAGTTTGATCCGGGCATATTTTGGTACCTTGAGTTTCCGGAG (配列番号10) であった。

20

C-2. 段階I (A-1) と同様にして、PCR鑄型となるSphaerotilus種のゲノムDNAを調製した。鑄型となる1μgのゲノムDNAを、10mMのKCl、20mMのTris-HCl (pH8.8)、10mMの(NH₄)₂SO₄、6mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100、200μMのdNTP及び1単位のVent DNAポリメラーゼ中に再懸濁させた。95℃で1分間の変性、55℃で1分間のアニーリング及び73℃で2分間の伸長から成るサイクルをサーマルサイクラー内で30サイクル行った。完全SspIエンドヌクレアーゼ遺伝子に間違いないと考えられる900塩基対のPCR産物が主要産物として同定された。

30

【0040】

900bpのPCR産物をTEに対して1時間微量透析し、次いで、EcoRI、BglII及びBamHIでマッピングすることによって特性決定した。次にPCR産物をNdeI及びBamHIによって以下のごとく消化した。70μlのPCR産物を150mMのNaCl、10mMのTris-HCl (pH7.9)、10mMのMgCl₂、1mMのDTTに導入し、40単位のBamHIと40単位のNdeIとを添加した。消化物を37℃で1時間インキュベートし、次いで1%の低融点アガロースゲル上で泳動した。バンドを切り出し、β-アガロースを用いて以下の手順でゲルからDNAを回収した。ゲル切片を55℃で融解し、10mMのTris-HCl (pH6.5)、1mMのEDTAに導入した。6単位のβ-アガラーゼを添加し、アガロースを42℃で1時間消化した。未消化の糖質を4℃、15,000×gで15分間遠心することによってペレット化した。DNA含有上清を0.5MのNaClに導入し、2倍容のイソプロパノールを添加した。これを攪拌し、-20℃で15分間冷却し、その後、15,000×gで15分間遠心した。DNAペレットを70%イソプロパノールで洗浄し、乾燥した。DNAを20μlのTEに再懸濁させた。

40

D. ベクターpAII17中でのPCR産物のクローニング

D-1. 5μgのベクターpAII17 (pET11cに由来のT7発現ベクター; Kongら, J. Biol. Chem. 268:1965-1975 (1993)) を、50mMのTris-HCl, pH7.9、10mMのMgCl₂、100mMのNaCl、1mMのDTTに再懸濁させた。60単位のNdeI及び80単位のBamHIを添加し

50

、混合物を37℃で1時間インキュベートした。消化物を0.7%の低融点アガロースゲル上で泳動し、6.2Kbのバンドをゲルから切り出した。ゲルから得られたバンドを融解させ、段階II(C-2)と同様にβ-アガラゼによってDNAを回収した。DNAペレットを20μlのH₂Oに再懸濁させた。

【0041】

段階II(C-2)で得られたPCR産物を、NdeI-BamHI切断したpAII17に以下のごとく結合した。BamHI及びNdeIで切断した1μgのPCR産物と、NdeI-BamHIで切断した1μgのpAII17とを、50mMのTris-HCl, pH7.8、10mMのMgCl₂、10mMのDTT、1mMのATP、25μg/mlのBSAに再懸濁させた、400単位のT4 DNAポリメラーゼを添加した。結合を16℃で一晩進行させた。

10

【0042】

2μlの結合産物を非プレ保護SspIメチラーゼと共に用いてRR1を形質転換させ、また、同じく2μlを用いて同系メチラーゼの欠失したER2169を形質転換させ、50μg/mlのアmpiシリン含有培地で平板培養した。18時間後、各プレートから96個のコロニーを採取し、50μg/mlのアmpiシリン含有のマスタプレートで複製した。ER2169形質転換体も1mMのIPTGとアmpiシリンとを含有するプレート上で複製した。18時間後、IPTG上で増殖させたER2169から複数のコロニーが溶解したことが観察された。

D-2. ER2169プレートから採取した最初の18個のコロニーを10mlの一晩培養物として増殖させた。IPTGの存在下でコロニーが溶解することが観察されると、対応する10ml培養物の1mlを10倍に希釈し、対数増殖期中期に10mMのIPTGで誘発した。細胞培養物をIPTGの存在下で3時間増殖させた。1.5mlの培養物を微量遠心管で遠心した。細胞ペレットを400μlの20mMのKH₂PO₄、50mMのNaCl、1mMのDTTに再懸濁させた。細胞を10秒間音波処理して破壊した。細胞破片を15,000×gで5分間遠心した。ラムダDNAに対する上清のSspI活性を検定した。

20

【0043】

SspI活性のアッセイは以下の順で行った。1μgのラムダDNAを10mMのTris-HCl、10mMのMgCl₂、50mMのNaCl、1mMのDTTに総量20μlに希釈した。音波処理細胞から得られた1μlの上清を添加し、37℃で30分間インキュベートした。消化物を0.7%アガロースゲル上で泳動した。7つの粗細胞抽出物のうち6つでSspI活性が検出された。図8はSspI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。SspI活性を有するプラスミドを増殖させ、CsCl調製し、p(pAII17)SspR7.2-A3、p(pAII17)SspR7.2-A9、p(pAII17)-SspR7.2-A10、p(pAII17)SspR7.2-A12、p(pAII17)SspR7.2-B1及びp(pAII17)SspR7.2-B6と命名する。

30

【0044】

プラスミドp(pAII17)SspR7.2-B1はブダペスト条約の規約に従って1994年10月6日にAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託され、ATCC受託番号No. 75909で受託された。

40

【0045】

表1はアミノ酸配列の1文字コードの説明である。

【0046】

【表1】

配列番号：1

配列の長さ：24

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列の特徴

10

特徴を表す記号：タンパク質

存在位置：11

他の情報：11位のX=任意のアミノ酸

配列の特徴

特徴を表す記号：タンパク質

存在位置：18

他の情報：18位のX=s e rまたはH i s

20

配列の特徴

特徴を表す記号：タンパク質

存在位置：19

他の情報：19位のX=任意のアミノ酸

配列

Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Xaa Ser Leu Leu Ile

30

5

10

15

Lys Lys Xaa Xaa Asn Leu Ile Thr Met

20

配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：不明

40

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

GCNGCNTAYC ARGACTT

配列番号：3

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

10

GCNGCNTAYC ARGATTT

17

配列番号：4

配列の長さ：51

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

20

GCTTGAAGAT CTAGAGGATT TCATATGGGA TCAATGTTTA ACACCACACA A 51

配列番号：5

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

30

TTCTTGTTGG CGTTCGCTCG AGCACCCAGT TAGGAA

36

40

配列番号：6

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

10

TGAGTGGCTT AGGGATGCAG AAGAGCCAAA

30

配列番号：7

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

20

TTGGTCACTT CATTTGCCA TGACATTTTCG

30

配列番号：8

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

30

40

GCTGTTTCAG CTCTGGCACG TCGGGCATCG

30

配列番号：9

配列の長さ：46

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

10

GCTCTAGACC CGGGCATATG TCVAAAGCMG CMTAYCAAGA TTTTAA

46

配列番号：10

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列

20

CAATTTTAGT TTGGATCCGG CATATTTGGT ACCTTGAGTT TCCGGAG

47

配列番号：11

配列の長さ：2061

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：オリゴヌクレオチド

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：2..644

他の情報：これはエンドヌクレアーゼのC-末端部分を示す

配列

【0048】

【化1】

30

40

G GAT CTC TAT CGC GCA AAG TCA AAG GAA GAA GAT ATC ACG GTT GAG	46	
Asp Leu Tyr Arg Ala Lys Ser Lys Glu Glu Asp Ile Thr Val Glu		
1 5 10 15		
AAC GAA ATC ACA AAG GAA AAA TTC CCC ATC AGC CTC AAG GCT TAT GGG	94	
Asn Glu Ile Thr Lys Glu Lys Phe Pro Ile Ser Leu Lys Ala Tyr Gly		
20 25 30		
GAT GGT CCA CTA CAG CTT TCA ACT GAC AAA AAT TTT TTG ATG TAC CCT	142	
Asp Gly Pro Leu Gln Leu Ser Thr Asp Lys Asn Phe Leu Met Tyr Pro		
35 40 45		
CTT CTT GAG GAA ATT GGG GCG TTC ATC AAT GCC AAA GAA AAA ATA GAA	190	10
Leu Leu Glu Glu Ile Gly Ala Phe Ile Asn Ala Lys Glu Lys Ile Glu		
50 55 60		
GAA ATT TTT GCC AAT GAA GCA TTT TCG TGC TTC AGC GAA ATA AAT GTC	238	
Glu Ile Phe Ala Asn Glu Ala Phe Ser Cys Phe Ser Glu Ile Asn Val		
65 70 75		
CTA CCC TTG ATA TAC GAT GAG AAG AGG CAG CGA TGT AAT ATT TTG GTT	286	
Leu Pro Leu Ile Tyr Asp Glu Lys Arg Gln Arg Cys Asn Ile Leu Val		
80 85 90 95		
TTC GAT GCC GCA CGT GCC AGA GCT GAA ACA GCT TAC ATT CGC AAA GAA	334	
Phe Asp Ala Ala Arg Ala Arg Ala Glu Thr Ala Tyr Ile Arg Lys Glu		
100 105 110		
ACA GAG GGG TCA GGA CGA AAA CAC CCG GCT TAC AGA TTT TTT GAC AAA	382	20
Thr Glu Gly Ser Gly Arg Lys His Pro Ala Tyr Arg Phe Phe Asp Lys		
115 120 125		
AAT AAA AAT TAC ATC TGC GAA GTG CGC TAC GGG AAT GCT GCG GCA AAT	430	
Asn Lys Asn Tyr Ile Cys Glu Val Arg Tyr Gly Asn Ala Ala Ala Asn		
130 135 140		
GCG CTC CAA CGA GGA CTT TGG ACA AAC ACA AAA AAT GCT ACA TCA TTT	478	
Ala Leu Gln Arg Gly Leu Trp Thr Asn Thr Lys Asn Ala Thr Ser Phe		
145 150 155		
TTT GAT AGT GTA ACA AAC GGC TGG GTT GAT TAC TCT CAT AAC TTG GTC	526	
Phe Asp Ser Val Thr Asn Gly Trp Val Asp Tyr Ser His Asn Leu Val		
160 165 170 175		
TTA GTT AAG CTG CTT TCG CAC GCT TTG GTT TCA AGT CGC AAA GGC CAC	574	30
Leu Val Lys Leu Leu Ser His Ala Leu Val Ser Ser Arg Lys Gly His		
180 185 190		

【0049】

【化2】

```

GAA GCT GCA CTG GAA GAG ATC AAG AAA GAC ATC CTG CAA CTA AAG CAA 622
Glu Ala Ala Leu Glu Glu Ile Lys Lys Asp Ile Leu Gln Leu Lys Gln
      195                200                205

ACG AAT GGG ATC AAT GTT TAA C ACCACACAAC CATTGTTTGA AAAAGTAATT 674
Thr Asn Gly Ile Asn Val *
      210

TTAGACACTC CGGAAACTCA AGGAATAAAA TATGCCGGAT CAAAACATAA ATTGATCCAA 734
CACATTTTAT CCCTACTTGA CAACCTAGAT GTAAAAACCG TATTCGATGG ATTTTCTGGA 794
ACTACTAGGG TCTCGCAGGC CTTGGCGAAG TCGCGATTTC ATGTCACCAG CAACGACATT 854
TCAGATTGGT CTTATGTATT TGGCTTGTGC TACCTAAAAA ACAAAAAACA CCCCACGAA 914
TACAAGGAAC TAATTGAACA CCTTAACTCA ATAAATGGCT ACGACGGTTG GTTCACTGAG 974
AAGTATGGCG GCCTTGACTA TTCAGGCAGT GCTATTCAAC CTGACGGCAC AAAAAACCT 1034
TGGCAAGTCC ACAATACGCG GAAGCTAGAT GGGATCCGCG ACGAAATAGA TTCATTATCA 1094
CTGAATGAAA CCGAAAAAGC CGTCGCCCTT ACCAGTTTAA TTTTAGCAAT GGACGAAGTC 1154
GACAACACAC TTGGCCACTT CACTTCATAC CTAAAAGAAT GGTCCCCTCG ATCATTCAAA 1214
GAAATGCGAA TGAAATCCC AAAAATATTT ATTAACCTCG AAGACAACCA AGTATTAAAA 1274
GGCGATATAT TCGCATCAAT GACTAACATC AATGTCGATT TTGCTTACTT TGATCCACCT 1334
TACGGTTCAA ACAACGAAAA GATGCCTCCT TCGCGAGTAC GCTATGCATC GTATTATCAT 1394
TTATGGACAA CTATATGCAA GAATGATAAG CCGAGCATTT TCGGAGCCGC AGGCAGAAGA 1454
TTAGATACAT CAGATAAAAT TGCAGCAACC GTTTTTGAAG AGTTTCGAAA AGATGATGAT 1514
GGTAAATTTA TTGCAGTTAA AGCAATTGAT AAATTAATAA AAAACATTCA AGCAGGATAT 1574
GTTGCCCTTT CCTACAGTTC GGGCGGAAAA GCCACTGCCG AGGAGCTAGG CGAAATACTT 1634
AACCGCCACG GAAAAATTAT AAAACAATT GAAGTTGATC ACAAGCGAAA TGTCTATGCA 1694
GAAATGAAGT GGACCAATGA GTGGCTTAGG GATGCAGAAG AGCCAAATCG AGAGTTTATT 1754
TTTCTCATTG AAAAAAATTC CTAACCTGGT GGTCAAGCGA ACGCCAACAA GGACCACGGC 1814
TTCCGCCGTT TTACGGTCCC TGTGGTGCC ATTCACTCGC TTGCTCCTT CCGGAGCCGT 1874
GCTTGACACG GCGATCGGCT TTGGCCTGGT GTCCGTGGCC GCCGTGGCGG CGGTGTGTTG 1934
AAAATTTCTG CTCGGCGGGT TGCTGGCCGC ATTGGCGCTG GCGGTATTG TTGCTCTGAA 1994
GCGCCGCACG AAGTCCTGAG CGTCTGCACG GACGCGTTGT TCTCGATGTC GAACTGCGGG 2054
GCTCGAC 2061

```

配列番号：1 2

配列の長さ：2 1 4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

【 0 0 5 0 】

【 化 3 】

Asp Leu Tyr Arg Ala Lys Ser Lys Glu Glu Asp Ile Thr Val Glu Asn
 1 5 10 15
 Glu Ile Thr Lys Glu Lys Phe Pro Ile Ser Leu Lys Ala Tyr Gly Asp
 20 25 30
 Gly Pro Leu Gln Leu Ser Thr Asp Lys Asn Phe Leu Met Tyr Pro Leu
 35 40 45
 Leu Glu Glu Ile Gly Ala Phe Ile Asn Ala Lys Glu Lys Ile Glu Glu
 50 55 60
 Ile Phe Ala Asn Glu Ala Phe Ser Cys Phe Ser Glu Ile Asn Val Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Ile Tyr Asp Glu Lys Arg Gln Arg Cys Asn Ile Leu Val Phe
 85 90 95
 Asp Ala Ala Arg Ala Arg Ala Glu Thr Ala Tyr Ile Arg Lys Glu Thr
 100 105 110
 Glu Gly Ser Gly Arg Lys His Pro Ala Tyr Arg Phe Phe Asp Lys Asn
 115 120 125
 Lys Asn Tyr Ile Cys Glu Val Arg Tyr Gly Asn Ala Ala Ala Asn Ala
 130 135 140
 Leu Gln Arg Gly Leu Trp Thr Asn Thr Lys Asn Ala Thr Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Asp Ser Val Thr Asn Gly Trp Val Asp Tyr Ser His Asn Leu Val Leu
 165 170 175
 Val Lys Leu Leu Ser His Ala Leu Val Ser Ser Arg Lys Gly His Glu
 180 185 190
 Ala Ala Leu Glu Glu Ile Lys Lys Asp Ile Leu Gln Leu Lys Gln Thr
 195 200 205
 Asn Gly Ile Asn Val *
 210

10

20

30

配列番号：13

配列の長さ：2061

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：DNA (genomic)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：615..1780

他の情報：これは完全メチラーゼに対応する

配列

【0051】

【化4】

40

GGATCTCTAT CGCGCAAAGT CAAAGGAAGA AGATATCACG GTTGAGAACG AAATCACAAA 60
 GGAAAAATTC CCCATCAGCC TCAAGGCTTA TGGGGATGGT CCACTACAGC TTTCAACTGA 120
 CAAAAATTTT TTGATGTACC CTCTTCTTGA GGAAATTGGG GCGTTCATCA ATGCCAAAGA 180
 AAAAAATAGAA GAAATTTTTG CCAATGAAGC ATTTTCGTGC TTCAGCGAAA TAAATGTCCT 240
 ACCCTTGATA TACGATGAGA AGAGGCAGCG ATGTAATATT TTGGTTTTCG ATGCCGCACG 300
 TGCCAGAGCT GAAACAGCTT ACATTGCAA AGAACAGAG GGGTCAGGAC GAAAACACCC 360
 GGCTTACAGA TTTTTTGACA AAAATAAAAA TTACATCTGC GAAGTGCCT ACGGGAATGC 420
 TCGGCAAAAT GCGCTCCAAC GAGGACTTTG GACAAACACA AAAAATGCTA CATCATTTTT 480
 TGATAGTGTA ACAAACGGCT GGGTTGATTA CTCTCATAAC TTGGTCTTAG TTAAGCTGCT 540
 TTCGCACGCT TTGGTTTCAA GTCGCAAAGG CCACGAAGCT GCACTGGAAG AGATCAAGAA 600
 AGACATCCTG CAAC TAA AGC AAA CGA ATG GGA TCA ATG TTT AAC ACC ACA 650
 * Ser Lys Arg Met Gly Ser Met Phe Asn Thr Thr
 1 5 10
 CAA CCA TTG TTT GAA AAA GTA ATT TTA GAC ACT CCG GAA ACT CAA GGA 698
 Gln Pro Leu Phe Glu Lys Val Ile Leu Asp Thr Pro Glu Thr Gln Gly
 15 20 25
 ATA AAA TAT GCC GGA TCA AAA CTA AAA TTG ATC CAA CAC ATT TTA TCC 746
 Ile Lys Tyr Ala Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ile Gln His Ile Leu Ser
 30 35 40
 CTA CTT GAC AAC CTA GAT GTA AAA ACC GTA TTC GAT GGA TTT TCT GGA 794
 Leu Leu Asp Asn Leu Asp Val Lys Thr Val Phe Asp Gly Phe Ser Gly
 45 50 55 60
 ACT ACT AGG GTC TCG CAG GCC TTG GCG AAG TGC GGA TTT CAT GTC ACC 842
 Thr Thr Arg Val Ser Gln Ala Leu Ala Lys Cys Gly Phe His Val Thr
 65 70 75

10

20

30

【0052】

【化5】

AGC AAC GAC ATT TCA GAT TGG TCT TAT GTA TTT GGC TTG TGC TAC CTA Ser Asn Asp Ile Ser Asp Trp Ser Tyr Val Phe Gly Leu Cys Tyr Leu	890	
80 85 90		
AAA AAC AAA AAA CAC CCC AAC GAA TAC AAG GAA CTA ATT GAA CAC CTT Lys Asn Lys Lys His Pro Asn Glu Tyr Lys Glu Leu Ile Glu His Leu	938	
95 100 105		
AAC TCA ATA AAT GGC TAC GAC GGT TGG TTC ACT GAG AAG TAT GGC GGC Asn Ser Ile Asn Gly Tyr Asp Gly Trp Phe Thr Glu Lys Tyr Gly Gly	986	
110 115 120		
CTT GAC TAT TCA GGC AGT GCT ATT CAA CCT GAC GGC ACA AAA AAA CCT Leu Asp Tyr Ser Gly Ser Ala Ile Gln Pro Asp Gly Thr Lys Lys Pro	1034	10
125 130 135 140		
TGG CAA GTC CAC AAT ACG CGG AAG CTA GAT GGG ATC CGC GAC GAA ATA Trp Gln Val His Asn Thr Arg Lys Leu Asp Gly Ile Arg Asp Glu Ile	1082	
145 150 155		
GAT TCA TTA TCA CTG AAT GAA ACC GAA AAA GCC GTC GCC CTT ACC AGT Asp Ser Leu Ser Leu Asn Glu Thr Glu Lys Ala Val Ala Leu Thr Ser	1130	
160 165 170		
TTA ATT TTA GCA ATG GAC GAA GTC GAC AAC ACA CTT GGC CAC TTC ACT Leu Ile Leu Ala Met Asp Glu Val Asp Asn Thr Leu Gly His Phe Thr	1178	
175 180 185		
TCA TAC CTA AAA GAA TGG TCC CCT CGA TCA TTC AAA GAA ATG CGA ATG Ser Tyr Leu Lys Glu Trp Ser Pro Arg Ser Phe Lys Glu Met Arg Met	1226	20
190 195 200		
AAA ATC CCA AAA ATA TTT ATT AAC TCC GAA GAC AAC CAA GTA TTA AAA Lys Ile Pro Lys Ile Phe Ile Asn Ser Glu Asp Asn Gln Val Leu Lys	1274	
205 210 215 220		
GGC GAT ATA TTC GCA TCA ATG ACT AAC ATC AAT GTC GAT TTT GCT TAC Gly Asp Ile Phe Ala Ser Met Thr Asn Ile Asn Val Asp Phe Ala Tyr	1322	
225 230 235		
TTT GAT CCA CCT TAC GGT TCA AAC AAC GAA AAG ATG CCT CCT TCG CGA Phe Asp Pro Pro Tyr Gly Ser Asn Asn Glu Lys Met Pro Pro Ser Arg	1370	
240 245 250		
GTA CGC TAT GCA TCG TAT TAT CAT TTA TGG ACA ACT ATA TGC AAG AAT Val Arg Tyr Ala Ser Tyr Tyr His Leu Trp Thr Thr Ile Cys Lys Asn	1418	30
255 260 265		
GAT AAG CCG AGC ATT TTC GGA GCC GCA GGC AGA AGA TTA GAT ACA TCA Asp Lys Pro Ser Ile Phe Gly Ala Ala Gly Arg Arg Leu Asp Thr Ser	1466	
270 275 280		
GAT AAA ATT GCA GCA ACC GTT TTT GAA GAG TTT CGA AAA GAT GAT GAT Asp Lys Ile Ala Ala Thr Val Phe Glu Glu Phe Arg Lys Asp Asp Asp	1514	
285 290 295 300		

【0053】

【化6】

40

```

GGT AAA TTT ATT GCA GTT AAA GCA ATT GAT AAA TTA ATA AAA AAC ATT 1562
Gly Lys Phe Ile Ala Val Lys Ala Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Ile 315
305
CAA GCA CGA TAT GTT GCC CTT TCC TAC AGT TCG GGC GGA AAA GCC ACT 1610
Gln Ala Arg Tyr Val Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Gly Gly Lys Ala Thr 330
320
GCC GAG GAG CTA GGC GAA ATA CTT AAC CGC CAC GGA AAA ATT ATA AAA 1658
Ala Glu Glu Leu Gly Glu Ile Leu Asn Arg His Gly Lys Ile Ile Lys 345
335
ACA ATT GAA GTT GAT CAC AAG CGA AAT GTC ATG GCA GAA ATG AAG TGG 1706
Thr Ile Glu Val Asp His Lys Arg Asn Val Met Ala Glu Met Lys Trp 360
350
ACC AAT GAG TGG CTT AGG GAT GCA GAA GAG CCA AAT CGA GAG TTT ATT 1754
Thr Asn Glu Trp Leu Arg Asp Ala Glu Glu Pro Asn Arg Glu Phe Ile 380
365
TTT CTC ATT GAA AAA AAT TCC TAA CT GGGTGGTCAA GCGAACGCCA 1800
Phe Leu Ile Glu Lys Asn Ser *
385
ACAAGGACCA CGGCTTCGCC GTTTTACGG TCCCTGTTGG TGCCATTAC TCGCTTCGCT 1860
CCTTCCGGAG CCGTGCTTGA CACGGCGATC GGCTTTGGCC TGGTGTCCGT GGCCGCCGTG 1920
GCGGCGGTGT TTGAAAATT TCTGCTCGGC GGGTTGCTGG CCGCATTGGC GCTGGGCGTA 1980
TTTGTTCGTC TGAAGCGCCG CACGAAGTCC TGAGCGTCTG CACGGACGCG TTGTTCTCGA 2040
TGTCGAACTG CGGGGCTCGA C 2061

```

配列番号：14

配列の長さ：388

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

【0054】

【化7】

```

* Ser Lys Arg Met Gly Ser Met Phe Asn Thr Thr Gln Pro Leu Phe
1 5 10 15
Glu Lys Val Ile Leu Asp Thr Pro Glu Thr Gln Gly Ile Lys Tyr Ala
20 25 30
Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ile Gln His Ile Leu Ser Leu Leu Asp Asn
35 40 45
Leu Asp Val Lys Thr Val Phe Asp Gly Phe Ser Gly Thr Thr Arg Val
50 55 60

```

【0055】

【化8】

Ser Gln Ala Leu Ala Lys Cys Gly Phe His Val Thr Ser Asn Asp Ile
 65 70 75 80
 Ser Asp Trp Ser Tyr Val Phe Gly Leu Cys Tyr Leu Lys Asn Lys Lys
 85 90 95
 His Pro Asn Glu Tyr Lys Glu Leu Ile Glu His Leu Asn Ser Ile Asn
 100 105 110
 Gly Tyr Asp Gly Trp Phe Thr Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asp Tyr Ser
 115 120 125
 Gly Ser Ala Ile Gln Pro Asp Gly Thr Lys Lys Pro Trp Gln Val His
 130 135 140
 Asn Thr Arg Lys Leu Asp Gly Ile Arg Asp Glu Ile Asp Ser Leu Ser
 145 150 155 160
 Leu Asn Glu Thr Glu Lys Ala Val Ala Leu Thr Ser Leu Ile Leu Ala
 165 170 175
 Met Asp Glu Val Asp Asn Thr Leu Gly His Phe Thr Ser Tyr Leu Lys
 180 185 190
 Glu Trp Ser Pro Arg Ser Phe Lys Glu Met Arg Met Lys Ile Pro Lys
 195 200 205
 Ile Phe Ile Asn Ser Glu Asp Asn Gln Val Leu Lys Gly Asp Ile Phe
 210 215 220
 Ala Ser Met Thr Asn Ile Asn Val Asp Phe Ala Tyr Phe Asp Pro Pro
 225 230 235 240
 Tyr Gly Ser Asn Asn Glu Lys Met Pro Pro Ser Arg Val Arg Tyr Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Tyr His Leu Trp Thr Thr Ile Cys Lys Asn Asp Lys Pro Ser
 260 265 270
 Ile Phe Gly Ala Ala Gly Arg Arg Leu Asp Thr Ser Asp Lys Ile Ala
 275 280 285
 Ala Thr Val Phe Glu Glu Phe Arg Lys Asp Asp Asp Gly Lys Phe Ile
 290 295 300
 Ala Val Lys Ala Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Ile Gln Ala Arg Tyr
 305 310 315 320
 Val Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Gly Gly Lys Ala Thr Ala Glu Glu Leu
 325 330 335
 Gly Glu Ile Leu Asn Arg His Gly Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Val
 340 345 350

10

20

30

【0056】

【化9】

40

Asp His Lys Arg Asn Val Met Ala Glu Met Lys Trp Thr Asn Glu Trp
 355 360 365
 Leu Arg Asp Ala Glu Glu Pro Asn Arg Glu Phe Ile Phe Leu Ile Glu
 370 375 380
 Lys Asn Ser *
 385

配列番号：15

配列の長さ：209

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：DNA (genomic)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..209

配列

【0057】

【化10】

ATG	TCC	AAA	GCA	GCC	TAC	CAA	GAT	TTC	ACA	AAA	AGA	TTC	TCC	CTG	CTA	48
Met	Ser	Lys	Ala	Ala	Tyr	Gln	Asp	Phe	Thr	Lys	Arg	Phe	Ser	Leu	Leu	
1				5					10					15		
ATA	AAA	AAA	CAT	CCA	AAC	CTC	ATA	ACG	ATG	ACA	CTG	AGC	AAC	ATT	TTC	96
Ile	Lys	Lys	His	Pro	Asn	Leu	Ile	Thr	Met	Thr	Leu	Ser	Asn	Ile	Phe	
			20					25					30			
ACA	ATG	CGA	CTC	ATT	GGC	AAC	AAA	ACC	CAC	GGC	GAC	TTG	GCT	GAG	ATT	44
Thr	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Lys	Thr	His	Gly	Asp	Leu	Ala	Glu	Ile	
		35					40					45				
GCG	ATC	TCC	GAA	TTC	ATT	AAT	CAG	TAC	ATG	TAT	GAC	TTT	AAG	TCA	ATT	192
Ala	Ile	Ser	Glu	Phe	Ile	Asn	Gln	Tyr	Met	Tyr	Asp	Phe	Lys	Ser	Ile	
		50				55					60					
CAT	GTC	GGC	AAA	GAT	CT											209
His	Val	Gly	Lys	Asp												
65																

配列番号：16

配列の長さ：69

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

【0058】

【化11】

```

Met Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Arg Phe Ser Leu Leu
 1           5           10           15
Ile Lys Lys His Pro Asn Leu Ile Thr Met Thr Leu Ser Asn Ile Phe
          20           25           30
Thr Met Arg Leu Ile Gly Asn Lys Thr His Gly Asp Leu Ala Glu Ile
          35           40           45
Ala Ile Ser Glu Phe Ile Asn Gln Tyr Met Tyr Asp Phe Lys Ser Ile
          50           55           60
His Val Gly Lys Asp
          65

```

10

配列番号：17

配列の長さ：209

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：DNA (genomic)

20

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..209

配列

【0059】

【化12】

```

ATG TCG AAA GCA GCA TAT CAA GAT TTC ACA AAA AGA TTC TCC CTG CTA 48
Met Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Arg Phe Ser Leu Leu
 1           5           10           15
ATA AAA AAA CAT CCA AAC CTC ATA ACG ATG ACA CTG AGC AAC ATT TTC 96
Ile Lys Lys His Pro Asn Leu Ile Thr Met Thr Leu Ser Asn Ile Phe
          20           25           30
ACA ATG CGA CTC ATT GGC AAC AAA ACC CAC GGC GAC TTG GCT GAG ATT 144
Thr Met Arg Leu Ile Gly Asn Lys Thr His Gly Asp Leu Ala Glu Ile
          35           40           45
GCG ATC TCC GAA TTC ATT AAT CAG TAC ATG TAT GAC TTT AAG TCA ATT 192
Ala Ile Ser Glu Phe Ile Asn Gln Tyr Met Tyr Asp Phe Lys Ser Ile
          50           55           60
CAT GTC GGC AAA GAT CT
His Val Gly Lys Asp
          65

```

30

40

配列番号：18

配列の長さ：69

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

【0060】

10

【化13】

Met Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Arg Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15
Ile Lys Lys His Pro Asn Leu Ile Thr Met Thr Leu Ser Asn Ile Phe
20 25 30
Thr Met Arg Leu Ile Gly Asn Lys Thr His Gly Asp Leu Ala Glu Ile
35 40 45
Ala Ile Ser Glu Phe Ile Asn Gln Tyr Met Tyr Asp Phe Lys Ser Ile
50 55 60
His Val Gly Lys Asp
65

20

配列番号：19

配列の長さ：209

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

30

配列の種類：DNA (genomic)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..209

配列

【0061】

【化14】

40

```

ATG TCC AAA GCA GCC TAC CAA GAT TTC ACA AAA AGA TTC TCC CTG CTA 48
Met Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Arg Phe Ser Leu Leu
 1           5           10           15

ATA AAA AAA CAT CCA AAC CTC ATA ACG ATG ACA CTG AGC AAC ATT TTC 96
Ile Lys Lys His Pro Asn Leu Ile Thr Met Thr Leu Ser Asn Ile Phe
          20           25           30

ACA ATG CGA CTC ATT GGC AAC AAA ACC CAC GGC GAC TTG GCT GAG ATT 144
Thr Met Arg Leu Ile Gly Asn Lys Thr His Gly Asp Leu Ala Glu Ile
          35           40           45

GCG ATC TCC GAA TTC ATT AAT CAG TAC ATG TAT GAC TTT AAG TCA ATT 192
Ala Ile Ser Glu Phe Ile Asn Gln Tyr Met Tyr Asp Phe Lys Ser Ile
          50           55           60

CAT GTC GGC AAA GAT CT 209
His Val Gly Lys Asp
65

```

10

配列番号：20

配列の長さ：69

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20

配列の種類：タンパク質

配列

【0062】

【化15】

```

Met Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Arg Phe Ser Leu Leu
 1           5           10           15

Ile Lys Lys His Pro Asn Leu Ile Thr Met Thr Leu Ser Asn Ile Phe
          20           25           30

Thr Met Arg Leu Ile Gly Asn Lys Thr His Gly Asp Leu Ala Glu Ile
          35           40           45

Ala Ile Ser Glu Phe Ile Asn Gln Tyr Met Tyr Asp Phe Lys Ser Ile
          50           55           60

His Val Gly Lys Asp
65

```

30

配列番号：21

配列の長さ：209

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：DNA (genomic)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..209

配列

【0063】

【化16】

```
ATG TCG AAA GCA GCC TAC CAA GAT TTC ACA AAA AGA TTC TCC CTG CTA 48
Met Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Arg Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15
ATA AAA AAA CAT CCA AAC CTC ATA ACG ATG ACA CTG AGC AAC ATT TTC 96
Ile Lys Lys His Pro Asn Leu Ile Thr Met Thr Leu Ser Asn Ile Phe
20 25 30
ACA ATG CGA CTC ATT GGC AAC AAA ACC CAC GGC GAC TTG GCT GAG ATT 144
Thr Met Arg Leu Ile Gly Asn Lys Thr His Gly Asp Leu Ala Glu Ile
35 40 45
GCG ATC TCC GAA TTC ATT AAT CAG TAC ATG TAT GAC TTT AAG TCA ATT 192
Ala Ile Ser Glu Phe Ile Asn Gln Tyr Met Tyr Asp Phe Lys Ser Ile
50 55 60
CAT GTC GGC AAA GAT CT
His Val Gly Lys Asp 209
65
```

配列番号：22

配列の長さ：69

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

【0064】

【化17】

```

Met Ser Lys Ala Ala Tyr Gln Asp Phe Thr Lys Arg Phe Ser Leu Leu
 1           5           10           15

Ile Lys Lys His Pro Asn Leu Ile Thr Met Thr Leu Ser Asn Ile Phe
          20           25           30

Thr Met Arg Leu Ile Gly Asn Lys Thr His Gly Asp Leu Ala Glu Ile
          35           40           45

Ala Ile Ser Glu Phe Ile Asn Gln Tyr Met Tyr Asp Phe Lys Ser Ile
 50           55           60
His Val Gly Lys Asp
65

```

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 S s p I 制限メチラーゼのクローニングスキームの概略図である。

【図 2】 B g l I I クローンの欠失を伴う S s p I メチラーゼをコードする 9.6 K b の B g l I I フラグメントの制限地図である。

【図 3 A】 エンドヌクレアーゼの C-末端部分の D N A 配列（配列番号 1 1 及び配列番号 1 3）及び対応するアミノ酸配列（配列番号 1 2）と B g l I I - X h o I メチラーゼサブクロンの完全メチラーゼのアミノ酸配列（配列番号 1 4）である。

【図 3 B】 エンドヌクレアーゼの C-末端部分の D N A 配列（配列番号 1 1 及び配列番号 1 3）及び対応するアミノ酸配列（配列番号 1 2）と B g l I I - X h o I メチラーゼサブクロンの完全メチラーゼのアミノ酸配列（配列番号 1 4）である（図 3 A の配列の続き）。

20

【図 3 C】 エンドヌクレアーゼの C-末端部分の D N A 配列（配列番号 1 1 及び配列番号 1 3）及び対応するアミノ酸配列（配列番号 1 2）と B g l I I - X h o I メチラーゼサブクロンの完全メチラーゼのアミノ酸配列（配列番号 1 4）である（図 3 B の配列の続き）。

【図 3 D】 エンドヌクレアーゼの C-末端部分の D N A 配列（配列番号 1 1 及び配列番号 1 3）及び対応するアミノ酸配列（配列番号 1 2）と B g l I I - X h o I メチラーゼサブクロンの完全メチラーゼのアミノ酸配列（配列番号 1 4）である（図 3 C の配列の続き）。

30

【図 4】 S s p I 制限エンドヌクレアーゼの産生スキームを示す。

【図 5】 S p h a e r o t i l u s 種のゲノム D N A のメチラーゼ遺伝子及びエンドヌクレアーゼ遺伝子の領域のマップである。

【図 6】 S a c I I 切断し再結合したゲノム D N A に対する逆方向 P C R のスキームである。

【図 7】 エンドヌクレアーゼ遺伝子を直接増幅するために使用された P C R プライマーが由来した場所を示す地図である。

【図 8】 プラスミド p A I I 1 7 中のエンドヌクレアーゼ遺伝子を保有する大腸菌 E R 2 1 6 9 の細胞抽出物中の S s p I 制限エンドヌクレアーゼ活性を示すアガロースゲル電気泳動の写真である。

40

【図 9】 調製された種々のライブラリーの一覧表である。

【図 1 0 A】 S s p I 活性を有する 4 つの異なるクローンの D N A 配列及び対応するアミノ酸配列（A 9 = 配列番号 1 5、1 6、A 1 0 = 配列番号 1 7、1 8、A 1 2 = 配列番号 1 9、2 0、及び、B 1 = 配列番号 2 1、2 2）である。

【図 1 0 B】 S s p I 活性を有する 4 つの異なるクローンの D N A 配列及び対応するアミノ酸配列（A 9 = 配列番号 1 5、1 6、A 1 0 = 配列番号 1 7、1 8、A 1 2 = 配列番号 1 9、2 0、及び、B 1 = 配列番号 2 1、2 2）である（図 1 0 A の配列の続き）。

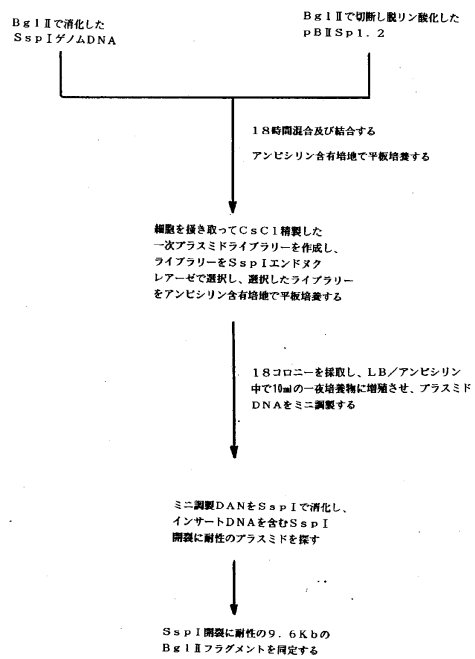
【図 1 0 C】 S s p I 活性を有する 4 つの異なるクローンの D N A 配列及び対応するアミノ酸配列（A 9 = 配列番号 1 5、1 6、A 1 0 = 配列番号 1 7、1 8、A 1 2 = 配列番号

50

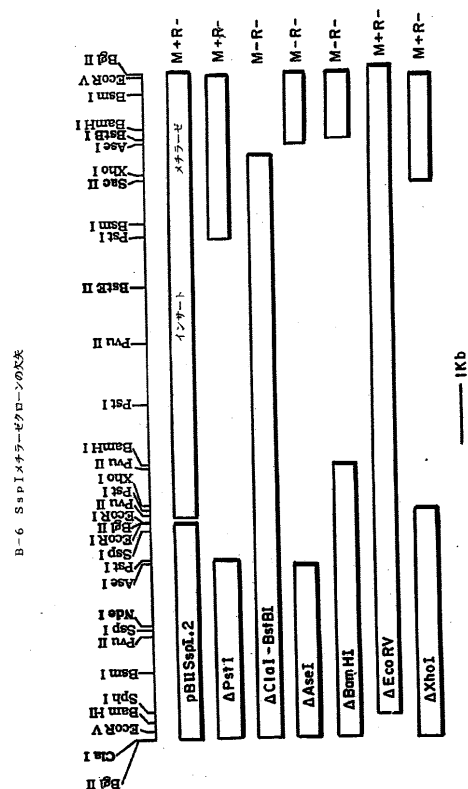
19、20、及び、B1＝配列番号21、22）である（図10Bの配列の続き）。

【図10D】 SspI活性を有する4つの異なるクローンのDNA配列及び対応するアミノ酸配列（A9＝配列番号15、16、A10＝配列番号17、18、A12＝配列番号19、20、及び、B1＝配列番号21、22）である（図10Cの配列の続き）。

【図1】



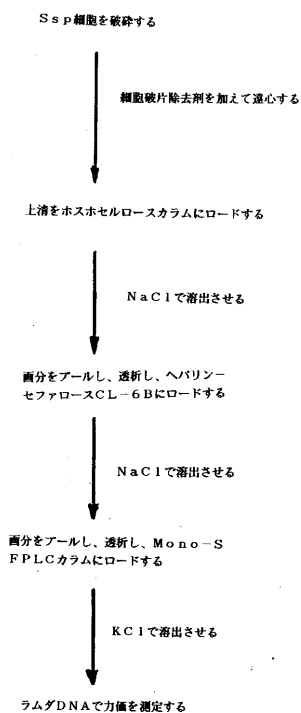
【図2】



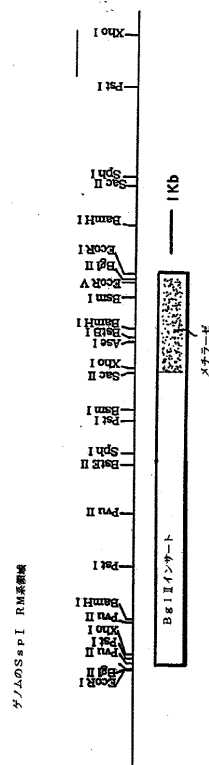
	GCGAAGAAACCTTGGCAGATTCGACAGATCCGAGCACTAGTAGTGATCCGCAGAA	1080
c	T K K F W Q V H N T R K L D G I R D E I -	
	TAGATTATCATCATGAATGACGAAAAAGCGGTGGCCCTTACCAGTTTAATTITAG	1140
c	D S L S T M T A G T E K A V A L T S L I L A -	
	CATGACGAGATGGACACACACTGGCCACACTCTACTCTACCTCAAAGAAGATGGTCC	1200
c	M D E V N T L G H F T S Y L K E W S P -	
	CTGATCTCTCMAGATGCGATGMAATGCCAAAATTTWTATCTCGAGACA	1260
c	R S F K E N R M K I P K I F I N S E D N -	
	ACCAAGTATTAAAGCGGATAATGGCTCAATGACTAACATCAATGCATTTTGCCTT	1320
c	Q V L G C D I F A S M T N I N V D F A Y -	
	ACTTGTACCTACTTAGCTTCAACAGAAAGTGGCTCTCGGAGTCCGTAG	1380
c	F D P Y Y G S N N E K M P P S R V R Y A -	
	CHCCTATTATTAAGCACATATPCCAGAGATGAGTAGCCGACATTTTGGAG	1440
c	S Y Y H L W T T I C K N D K K P S I F G A -	
	CCGCGACAGAGATTAGTACATCGATTAATTAATTCGACAAACGGTTTTGAGAGTTTC	1500
c	A G R L T D I T S D K I A A T V F E E F R -	
	GAAGAAGATGATGTAATTTATTCGCTTAGCACTATGAAATATATTAARAACA	1560
c	K D D D G K F I A V K A I D K L I K N I -	

[illegible]

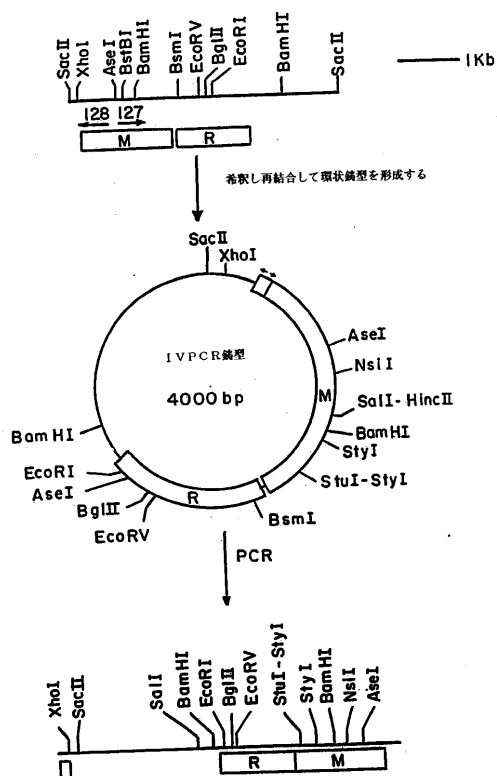
【图 4】



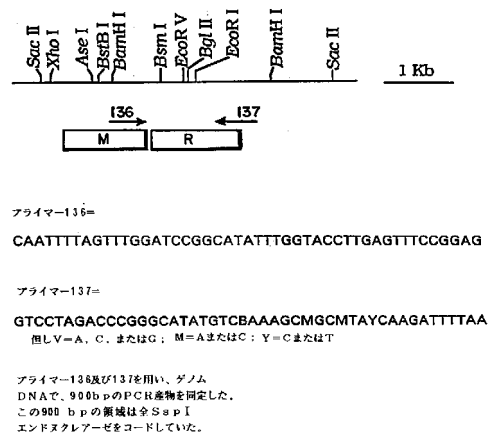
【图 5】



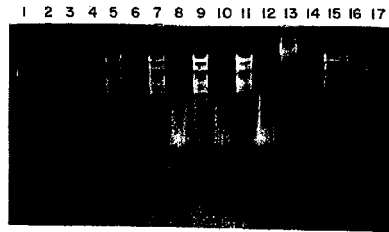
【图 6】



【图 7】



【図 8】



【図 9】

ライブラリー	ベクター	宿主細胞型	プレパレーション?
Bgl II	pBIISpl.2	RR1	無し
EcoRI	pBIISpl.2	RR1	無し
PstI	pBIISpl.2	RR1	無し
SphI	pBIISpl.2	RR1	無し
PstI	pUC 19	RR1	無し
SphI	pUC19	RR1	無し
PstI	pACYC177	RR1	無し
PstI	pACYC177	RR1	有り (Δ EcoRV)
SphI	pACYC184	ER1797	有り (Δ EcoRV)
PstI	pACYC177	ER1797	有り (Δ EcoRV)
XhoI	pUC19	RR1	無し
XhoI	pACYC177	ER1797	有り (pUC19 D2 M)
XhoI	pACYC177	ER2252	有り (pSSpm-A8 & B5)
SphI	pACYC184	ER2252	有り (pSSpm-A8 & B5)

pBIISpl. 2中のBgl IIライブラリーは9Kbの完全なクローンを与えた
pBIISpl. 2中のEcoRIライブラリーは部分クローンを与えた
RR1 = Mcl A+, MclBC+/-, mit-
ER 1797 = Mcl A-, MclBC-, mit-
ER 2252 = Mcl A-, Mcl BC-, mit-

【図 10 A】

プライマー-137= GCTTAGACCGCGCATATGTCVAAAGCGGCTATCAAGATTTTAA
（注）V=A, C, G, T; M=A, G, C, T; Y=C, G, A, T

プライマー-137
ATGTCVAAAGCGGCTATCAAGATTTTAA
A9 ATGTCVAAAGCGGCTATCAAGATTTCACAAAAGATTTCCTCGCTAATAAAAAACAT
1 M S K A A Y Q D F T K R F S L L I K K H
A10 ATGTCVAAAGCGGCTATCAAGATTTCACAAAAGATTTCCTCGCTAATAAAAAACAT
1 M S K A A Y Q D F T K R F S L L I K K H
A12 ATGTCVAAAGCGGCTATCAAGATTTCACAAAAGATTTCCTCGCTAATAAAAAACAT
1 M S K A A Y Q D F T K R F S L L I K K H
B1 ATGTCVAAAGCGGCTATCAAGATTTCACAAAAGATTTCCTCGCTAATAAAAAACAT
1 M S K A A Y Q D F T K R F S L L I K K H

【図 10 B】

A9 CCAACCTCATAAGCATGACACTGACGACACATTTTCAATGGGACTCATTTGGCAACAA
61 P N L I T M T L S N I F T M R L I G N K
A10 CCAACCTCATAAGCATGACACTGACGACACATTTTCAATGGGACTCATTTGGCAACAA
61 P N L I T M T L S N I F T M R L I G N K
A12 CCAACCTCATAAGCATGACACTGACGACACATTTTCAATGGGACTCATTTGGCAACAA
61 P N L I T M T L S N I F T M R L I G N K
B1 CCAACCTCATAAGCATGACACTGACGACACATTTTCAATGGGACTCATTTGGCAACAA
61 P N L I T M T L S N I F T M R L I G N K

【図 10 C】

```
A9  ACCACGGGACTTGGCTGAGATTGGGATCTCCGAATTCATTATCATGACATGATGAC
121  T H G D L A E I A I S E F I N Q Y M Y D
A10  ACCACGGGACTTGGCTGAGATTGGGATCTCCGAATTCATTATCATGACATGATGAC
121  T H G D L A E I A I S E F I N Q Y M Y D
A12  ACCACGGGACTTGGCTGAGATTGGGATCTCCGAATTCATTATCATGACATGATGAC
121  T H G D L A E I A I S E F I N Q Y M Y D
B1  ACCACGGGACTTGGCTGAGATTGGGATCTCCGAATTCATTATCATGACATGATGAC
121  T H G D L A E I A I S E F I N Q Y M Y D
```

【図 10 D】

```
A9  TTTAAGTCAATTTCATGTCGGCAAAGATCT
181  F K S I H V G K D
A10  TTTAAGTCAATTTCATGTCGGCAAAGATCT
181  F K S I H V G K D
A12  TTTAAGTCAATTTCATGTCGGCAAAGATCT
181  F K S I H V G K D
B1  TTTAAGTCAATTTCATGTCGGCAAAGATCT
181  F K S I H V G K D
```

フロントページの続き

(72)発明者 リンダ・ホーンストラ・コー
アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・03858、ニュートン、ホイットプアウイル・ドライ
ブ・11

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 BioChromatography, (1988), 3, [5], p.225-230

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/21

C12N 9/16

C12P 21/02

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq

PubMed