

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3592350号
(P3592350)

(45) 発行日 平成16年11月24日(2004.11.24)

(24) 登録日 平成16年9月3日(2004.9.3)

(51) Int.Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 9/16

C 1 2 N 9/16 A

//C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 7 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-192936

(22) 出願日 平成5年7月7日(1993.7.7)

(65) 公開番号 特開平6-189776

(43) 公開日 平成6年7月12日(1994.7.12)

審査請求日 平成12年5月29日(2000.5.29)

(31) 優先権主張番号 909947

(32) 優先日 平成4年7月7日(1992.7.7)

(33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 69028

(73) 特許権者 591021970

ニュー・イングランド・バイオレイプス・
インコーポレイテッドアメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
915、ピバリー、トザー・ロード・32

(74) 代理人 100062007

弁理士 川口 義雄

(74) 代理人 100080403

弁理士 中村 至

(74) 代理人 100094776

弁理士 船山 武

(72) 発明者 シュアン・ヨン・ク

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
915、ピバリー、ピバリー・コモンズ・
ドライブ・2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A a t I I 制限エンドヌクレアーゼ及びメチラーゼのクローニング及び産生方法並びに制限エン
ドヌクレアーゼの過剰発現関連方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離DNAが大腸菌BL21宿主細胞 NEB#725:ATCC69028から得られ
ることを特徴とするA a t I I 制限エンドヌクレアーゼをコードする単離DNAセグメン
ト。

【請求項2】

大腸菌BL21宿主細胞 NEB#725:ATCC69028から得られることを特徴
とするA a t I I 制限エンドヌクレアーゼをコードするDNAを含む組換えベクター。

【請求項3】

単離DNAが大腸菌BL21宿主細胞 NEB#725:ATCC69028から得られ
ることを特徴とするA a t I 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セグメント。

【請求項4】

請求項3において定義されたA a t I 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DNAセグメントを含む組換えベクター。

【請求項5】

請求項4に記載の組換えベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項6】

A a t I I M 遺伝子の核酸配列が下記に示される、請求項3に記載の単離DNAセグメン
ト。

【化 1】

1	ATGACCGCTCGTCCGCAAGAAAAGCAAACAAACGCAATCAAATCAAACCTCATGGAAG	60	
	TACTGGCGAGCAGGCGTTCTTTTCGTTTGTTCGTTTAGTTTAGTTTGTAGTACCTTC		
	MetThrAlaArgProGlnGluLysGlnThrLysArgLysSerAsnGlnAsnSerTrpLys		
81	AGTAATTTAGAAGAAAGCATATCTTCAACGTGGGAAGATATTAGAGAAATTGGTGATCAG	120	
	TCATTAAATCTTCTTTTCGTATAGAAGTTGCACCGTTCTATAATCTCTTTAACCACTAGTC		
	SerAsnLeuGluGluSerIleSerSerThrTrpGluAspIleArgGluIleGlyAspGln		
121	CGGCGATCACATCTTTCAAATCGCACACCTACGTTCTTGATGATGCAATTCATTTCTTA	180	10
	GCCGCTAGTGTAGAAAGTTTAGCGTGTGGATGCAAGAACTACTACGTTAAGTAAAGAAAT		
	ArgArgSerHisLeuSerAsnArgThrThrTyrValLeuAspAspAlaIleHisPheLeu		
181	TCAGAGCTTCCTCCAAACTCTATCCATGCTGTTGTTACCGATCCTCCGTATGGAGTCATT	240	
	AGTCTCGAAGGAGTTTGAGATAGGTACGACAACAATGGCTAGGAGGCATACCTCAGTAA		
	SerGluLeuProProAsnSerIleHisAlaValValThrAspProProTyrGlyValIle		
241	GAGTATGAAGACAAACACCACCAGAAAATGCGCTCTGGCGGGGGCGGGTCTGGCGAATT	300	
	CTCATCTTCTGTTTGTGGTGGTCTTTAACGCGAGACCGCCCCCGCCAGACCGCTTAA		
	GluTyrGluAspLysHisHisGlnLysLeuArgSerGlyArgGlyGlyValTrpArgIle		
301	CCTCCTTCATTTGACGGTGTGAAACGTAGCCCTCTCCCGCGCTTCACCGTGCTTTCTGAA	360	20
	GGAGGAAGTAAACTGCCACACTTTGCATCGGGAGAGGGCGCGAAGTGGCAGGAAAGACTT		
	ProProSerPheAspGlyValLysArgSerProLeuProArgPheThrValLeuSerGlu		
361	GATGAATTAACAGATTAAGCAGCTTTTTTCTGCTTTAGCCTACGTTTACACCGCGCC	420	
	CTACTTAATTTGTCTAATTCGTGAAAAAAGACGAAATCGGATGCCAAATGTGGCGCGG		
	AspGluLeuAsnArgLeuSerSerPhePheSerAlaLeuAlaTyrGlyLeuHisArgAla		
421	CTTGTTCTGGCGGCCATGTTTTCATGGCCGCCAACCTTTGCTATCCTCAATGGTGTTTC	480	30
	GAACAAGGACCGCCGGTACAAAAGTACCGGCGGTTGGGAAACGATAGGAGTTACCACAAG		
	LeuValProGlyGlyHisValPheMetAlaAlaAsnProLeuLeuSerSerMetValPhe		
481	CATGCTTTCAGACCGCTGGTTTTGAGAAACGAGGTGAAGTTATTCGGTTAGTACAAACC	540	
	GTACGAAAGGTCTGGCGACCAAACTCTTTGCTCCACTTCAATAAGCCAATCATGTTTGG		
	HisAlaPheGlnThrAlaGlyPheGluLysArgGlyGluValIleArgLeuValGlnThr		
541	CTGCGCGCGCGTGACCGACCAAAAGGAGCAGAGAAAGAGTTTTCCGACGTCTCCATGATG	600	
	GACGCGCGCCCACTGGCTGGTTTTCTCGTCTCTTTCTCAAAAGGCTGCAGAGGTACTAC		
	LeuArgGlyGlyAspArgProLysGlyAlaGluLysGluPheSerAspValSerMetMet		
601	GCTCGAAGCTGTTGGGAACCATGGGGCATGTTCCGTAAACCGTTCAGTGGTCTGTCATCC	660	40
	CGAGCTTCGACAACCTTGGTACCCCGTACAAGGCATTTGGCAAGTCACCAGGACGTAGG		
	AlaArgSerCysTrpGluProTrpGlyMetPheArgLysProPheSerGlyProAlaSer		

661 ACCAACCTACGCACATGGGGAACAGGCGGTCTTCGGCGCATCTCTGATACTGAGCCGTTCT 720
 TGGTTGGATGCGTGTACCCCTTGTCCGCCAGAAGCCGCTAGAGACTATGACTCGGCAAG
 ThrAsnLeuArgThrTrpGlyThrGlyGlyLeuArgArgIleSerAspThrGluProPhe
 721 AAAGATGTAATTCTCTGCTCACCGACCAGAGGTGCTGAACGTGAAATTGCACCACATCCG 780
 TTTCTACATTAAGAGACGAGTGGCTGGTCTCCAGCACTTGCAGCTTTAACGTGGTGTAGGC
 LysAspValIleLeuCysSerProThrArgGlyArgGluArgGluIleAlaProHisPro
 781 TCATTGAAACCACAGCGTTTTTTAAGGCAGGTGGTGGTGCAGCCTTACCCCTAGGAATT 840
 AGTAAGTTTTGGTGTGCGAAAAAATTCGCTCCACCACGCACGTCCGAATGGGGATCCTTAA
 SerLeuLysProGlnArgPheLeuArgGlnValValArgAlaAlaLeuProLeuGlyIle
 841 GGGATTATCTACGACCCCTTTGCTGGTAGCGGTTCCACGCTCGCAGCAGCAGAAGCCGTT 900
 CCCTAATAGATGCTGGGAAACGACCATCGCCAAGGTGCGAGCGTGGTCTCTTCGGCAA
 GlyIleIleTyrAspProPheAlaGlySerGlySerThrLeuAlaAlaAlaGluAlaVal
 901 GGCTATCGTGCTATCGGCACAGATAGAGACGCTCAATACTTTGGGATTGGAACCAAAGCG 960
 CCGATAGCAGGATAGCCGTGTCTATCTCTGCGAGTTATGAAACCCCTAACCTTGGTTTCGC
 GlyTyrArgAlaIleGlyThrAspArgAspAlaGlnTyrPheGlyIleGlyThrLysAla
 961 TTTTCATCTCTTTCCACTCTGGATATCAACAAATGA 996
 AAAAGTAGAGAAAGGTGAGACCTATAGTTGTTTACT
 PheSerSerLeuSerThrLeuAspIleAsnLysEnd

10

20

【請求項 7】

(a) 請求項 3 に記載の DNA および制限エンドヌクラーゼの発現を制御するためのベクターで形質転換し、
 (b) 発現した AatII エンドヌクラーゼを取得するためにステップ (a) の宿主細胞を培養するステップを含む、AatII 制限エンドヌクラーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

30

本発明は、AatII 制限エンドヌクラーゼ及び修飾メチラーゼをコードする組換え DNA、組換え DNA からのこれらの酵素の製造並びにエンドヌクラーゼの過剰発現 (overexpressing) に関する関連方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

II 型制限エンドヌクラーゼは、天然で微生物中に存在する酵素の一種である。これらを他の微生物が混ざった成分から精製すると、制限エンドヌクラーゼは、研究室で、DNA 分子を分子クローニング及び遺伝子キャラクタリゼーション用に小さなフラグメントに切断するために使用し得る。

【0003】

40

制限エンドヌクラーゼは、DNA 分子に沿ってヌクレオチドの特定の配列 (制限配列) を識別し且つ結合することにより作用する。一旦結合すると、これらは、制限配列の内部またはこの一端で分子を切断する。異なる制限エンドヌクラーゼは、異なる認識配列に対する親和性を持つ。今日まで、実験された数百種の微生物種の中で特徴的な特異性を持つ 150 種類以上の制限エンドヌクラーゼが、同定された。

【0004】

微生物は、1 種当たりせいぜい数種の制限エンドヌクラーゼしか持っていない。通常、エンドヌクラーゼは、それらが誘導された微生物にちなんで名付けられている。従って、例えば、Deinococcus radiophilus 種は、DraI、DraII 及び DraIII と名付けられた 3 種類の制限エンドヌクラーゼを合成する。これら

50

の酵素は、各々配列 T T T A A A、P u G G N C C P y 及び C A C N N N G T G を認識し且つ切断する。他方、E s c h e r i c h i a c o l i R Y 1 3 は、配列 G A A T T C を認識するたった 1 種の酵素 E c o R I を合成する。

【 0 0 0 5 】

理論に拘束されるつもりはないが、実際に制限エンドヌクレアーゼは微生物細胞の繁栄 (w e l f a r e) に保護的な役割を示すと考えられている。これらのエンドヌクレアーゼは、微生物を破壊または寄生するウイルス及びプラスミド等の外来 D N A 分子に感染しないようにする。これらは、認識配列が発生する度に侵入する外来 D N A 分子を切断することにより耐性を付与する。切断が起きると、多くの感染遺伝子が無能になり、D N A を非特異的なエンドヌクレアーゼによりさらに分解し易くする。

10

【 0 0 0 6 】

微生物保護系の第 2 の成分は、修飾メチラーゼである。これらの酵素は、制限エンドヌクレアーゼに対して相補的であり、これら自身の D N A を保護し、外来の感染 D N A を区別する手段を提供する。修飾メチラーゼは、対応する制限エンドヌクレアーゼと同一ヌクレオチド認識配列を認識且つ結合するが、D N A を切断する代わりに、これらはメチル基を付加することにより配列内で 1 個以上のヌクレオチドを化学的に修飾する。メチル化後、認識配列は制限エンドヌクレアーゼによってもはや結合も切断もしない。微生物細胞の D N A は通常、その修飾メチラーゼの活性により完全に修飾されている。従って、内因性制限エンドヌクレアーゼの存在には、全く感受性がない。制限エンドヌクレアーゼの認識及び切断に感受性であるのは、未修飾で識別可能な外来 D N A だけである。

20

【 0 0 0 7 】

遺伝子工学技術の出現により、現在では、遺伝子をクローニングし且つ慣用の精製技術で得られるよりももっと多量に該遺伝子によってコードされる蛋白質及び酵素を産生し得る。制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のクローンを単離する解決策は、該クローンが 10^{-3} ~ 10^{-4} ぐらいの低い頻度で生じる際には、複雑な「ライブラリー」即ち「ショットガン」法により誘導したクローン集団内でこのようなクローンを識別する簡単且つ信頼性の高い方法を開発することである。好ましくは、本方法は、望ましくない多くのクローンを破壊し、望ましい希なクローンを生存させるように選択的でなければならない。

【 0 0 0 8 】

I I 型制限 - 修飾系は、高頻度でクローニングされている。第 1 のクローニング系では、制限エンドヌクレアーゼクローンを同定または選択する手段としてバクテリオファージ感染が使用された [E c o R I I : K o s y k h ら, M o l e c . g e n . G e n e t 1 7 8 : 7 1 7 - 7 1 9 , (1 9 8 0) ; H h a I I : M a n n ら, G e n e 3 : 9 7 - 1 1 2 , (1 9 7 8) ; P s t I : W a l d e r ら, P r o c . N a t . A c a d . S c i . 7 8 1 5 0 3 - 1 5 0 7 (1 9 8 1)]。微生物中に制限 - 修飾系が存在するとバクテリアオファージによる感染に耐えられるので、クローニングした制限 - 修飾遺伝子を保持する細胞は、一般に、ファージに暴露されたライブラリーから残存物として選択的に単離し得る。しかしながら、この方法では、非常に少量しか得られない。特に、クローニングした制限 - 修飾遺伝子は、常に選択的に生存させるのに十分ファージ耐性であるとは限らないことが明らかになった。

30

40

【 0 0 0 9 】

もう一つのクローニングの試みとしては、大腸菌クローニングプラスミドへのプラスミド - ボーン (p l a s m i d - b o r n e) として最初の特徴付けられたトランスファー系を包含する [E c o R V : B o u g u e l e r e t ら, N u c l . A c i d . R e s . 1 2 : 3 6 5 9 - 3 6 7 6 , (1 9 8 4) ; P a e R 7 : G i n g e r a s 及び B r o o k s , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 0 : 4 0 2 - 4 0 6 , (1 9 8 3) ; T h e r i a u l t 及び R o y , G e n e 1 9 : 3 5 5 - 3 5 9 (1 9 8 2) ; P v u I I : B l u m e n t h a l ら, J . B a c t e r i o l . 1 6 4 : 5 0 1 - 5 0 9 , (1 9 8 5)]。

【 0 0 1 0 】

50

第3の試みは、多くの系をクローニングするのに使用されており、この系は、現在活性メチラーゼ遺伝子に関する選択によりクローニングされている[本出願人の欧州特許出願公開第193,413号(1986年9月3日)及びBsuRI:Kissら, Nucl. Acid. Res. 13:6403-6421, (1985)参照]。制限及び修飾遺伝子は近接して結合していることが多いため、両方の遺伝子は同時にクローニングされ得る。この選択は、完全な制限系を常に与えるとは限らないが、その代わりメチラーゼ遺伝子のみを与える[BspRI:Szomolanyiら, Gene 10:219-225, (1980); Bcn I:Janulaitisら, Gene 20:197-204 (1982); Bsu RI:Kiss及びBaldauf, Gene 21:111-119, (1983); 及びMsp I:Walderら, J. Biol. Chem. 258:1235-1241 (1983)]。 10

【0011】

ある系に於いては、修飾によっては通常保護されない宿主に、エンドヌクレアーゼ遺伝子を導入しようとする、クローニングに問題がある。メチラーゼ遺伝子及びエンドヌクレアーゼ遺伝子を共通のDNAフラグメントに導入する場合、エンドヌクレアーゼ遺伝子が宿主ゲノムを切断する前に、メチラーゼ遺伝子は宿主を修飾または保護しなくてはならない。

【0012】

大腸菌でこれらの系をクローニングするもう一つの障害が、種々のメチラーゼをクローニングする方法で知見された。多くの大腸菌株(クローニングで通常使用するものを含む)は、シトシンメチル化を含むDNAの導入に耐える系を有する[Raleigh及びWilson, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 83:9070-9074, (1986)]。従って、クローニングに使用するためには大腸菌株を注意深く考慮する必要がある。 20

【0013】

外来の制限修飾系をクローニングし、大腸菌に導入する場合、大腸菌での遺伝子の転写または翻訳が不十分なため、エンドヌクレアーゼの収量は、天然のエンドヌクレアーゼ産生株と比較して非常に低いこともある。クローニングされた制限修飾系を保持する大腸菌細胞が、殆ど生長しない場合もある。これは、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子の不十分なメチル化保護及び未制御の構成発現(constitutive expression)によるものと考えられる。従って、よく制御された発現系は、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子などの大腸菌毒性遺伝子中で発現させるのに望ましい。 30

【0014】

非誘導条件下ではエンドヌクレアーゼを最小レベルで産生し、誘導時に所望のエンドヌクレアーゼを多量に産生する発現系が望ましい。このようにして外来制限修飾系は、大腸菌宿主に安定して保持され得る。

【0015】

精製した制限エンドヌクレアーゼ及び修飾メチラーゼは、研究室での遺伝子の特徴付けに有用な道具であり、多量にこれらの酵素を合成する組換えDNA技術により細菌株を得るための商業的誘因である。このような株は、精製を簡便化し、並びに商業的に有用な量を産生する手段を提供するため、有用である。 40

【0016】

一態様に於いて、本発明は、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子を発現させるための発現ベクターと、大腸菌で当該制限エンドヌクレアーゼに対してDNAを保護し得るレベルにメチラーゼ遺伝子を発現し得るメチラーゼ遺伝子を発現させるための中(medium)または高(high)コピー数適合性ベクターとを含む制限エンドヌクレアーゼを過剰発現させる方法に関する。好ましい発現系は、発現ベクター(例えば、エンドヌクレアーゼ遺伝子を挿入するためのT7発現ベクター)、発現ベクターを制御する第2の適合性ベクター(例えば、その遺伝子産物がT7 RNAポリメラーゼを阻害し、T7 lacプロモーターからの基底レベルのターゲット遺伝子発現を減少させるT7 リゾチーム遺伝子を含 50

むベクター)及びメチラーゼ遺伝子をクローニングするための第3の適合性プラスミドからなる。好ましい態様に於いて、メチラーゼ遺伝子をクローニングするための第3のプラスミドは、好ましくはコピー数を増やすためにUV突然変異誘発により突然変異したコピー数変異株(copy-number mutant)である[Miller, J. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1972 p. 121-124]。本発明の発現系では、低レベルの構成発現を有する高レベルの誘導を可能にするので、大腸菌(例えば、制限エンドヌクレアーゼ)での毒性蛋白質の発現には有用である。

【0017】

10

もう一つの態様に於いて、本発明は、Acetobacter acetiiから得られるAatII制限エンドヌクレアーゼ及び修飾メチラーゼに関する遺伝子をコードする組換えDNA並びに、組換えDNAからのAatII制限酵素の製造の関連方法に関する。本発明は、制限エンドヌクレアーゼAatIIを発現する形質転換宿主、DNA配列5'-GACGTC-3'を認識し、両方のDNA鎖のTとCの間で切断して、3'から突き出る4個の塩基を放出する酵素にも関する[Sugisaki, H., Nucleic Acids Res. 10: 5747-5752]。本発明により産生したAatIIエンドヌクレアーゼは実質的に純粋で、実施例1に記載の慣用方法により製造した制限エンドヌクレアーゼ製剤で通常知見された汚染源を含まない。

【0018】

20

AatII制限-修飾系をクローニングするための好ましい方法の一つは、好適なベクターを選択し、Acetobacter Acetii由来のDNAを含む幾つかのライブラリーを形成し、AatII修飾メチラーゼをコードするDNAを含むこれらのクローンを単離し、ベクターを使用してメチラーゼ遺伝子に隣接する付加的染色体DNAをクローニングし、AatIIエンドヌクレアーゼを産生するこれらのクローンをスクリーニングし、クローンの上にaatIIR及びaatIIM遺伝子をマッピング(aatIIR及びaatIIMは、各々AatIIエンドヌクレアーゼ及びAatIIメチラーゼをコードする遺伝子である)し、aatIIR及びaatIIM遺伝子のDNA配列を決定し、次いで大腸菌でaatIIR及びaatIIM遺伝子を過剰発現させることからなる。

【0019】

30

【課題を解決するための手段】

本発明は、エンドヌクレアーゼ遺伝子が発現ベクターに含まれ、メチラーゼ遺伝子が発現ベクターと適合性である別個の中コピー数または高コピー数ベクター上に含まれている発現系を使用することからなる制限エンドヌクレアーゼの過剰発現方法に関する。

【0020】

好ましい一態様としては、以下のものがある。

【0021】

1) エンドヌクレアーゼ遺伝子をクローニングするためのT7lacプロモーター及びColEI複製開始点を含むT7発現ベクター[Novagen Inc, Dubendorf, J.W.及びStudier, F.W., J. Mol. Biol. 219: 45-59, (1991)]並びに、p15A複製開始点及び、その遺伝子産物がT7 RNAポリメラーゼを阻害し且つT7プロモーターからの基底レベル(basal level)のターゲット遺伝子発現を減少させるT7 リゾチーム遺伝子を含む第2の適合性ベクター[Studier, F.W., J. Mol. Biol. 219: 37-44, (1991)]。他の発現ベクター、例えば、Plac、PlacUV5、Ptac及びPLなどのエンドヌクレアーゼ発現に使用し得るプロモーターを含むpUC19及びpBR322誘導体も使用し得る。

40

【0022】

2) lac プロモーターから発現されるメチラーゼ遺伝子をクローニングするためのpSC101複製開始点を含む中コピー数クローニングベクター[Wang, R.F.及び

50

Kushner, S. R., Gene 100:195-199, (1991)]. 他の増加されたコピー数の適合性クローニングベクターは、例えば突然変異の誘発、好ましくはUV突然変異の誘発(Miller, J., 上掲)を用いて、例えば、RP4、RP1、R18、R68、RSF1010、R1162及びR300B[Kues., U及びStahl, U, Microbiological Reviews 491-516 1989]のような低コピー数の適合性ベクターから製造し得た。

【0023】

本発明は、AatII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、このような組換えDNAからAatII制限エンドヌクレアーゼを製造する方法に関する。

10

【0024】

本明細書中に記載する方法により、AatII制限遺伝子及びメチラーゼ遺伝子は、図1に記載の如くクローニング及び発現されるのが好ましい。本方法は以下の段階を含む。

【0025】

1. *Acetobacter acetii* のゲノムDNAを精製する。

【0026】

2. DNAを、無傷のAatIIメチラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを産生する制限エンドヌクレアーゼ(例えば、HindIII)またはその任意のアイソシゾマーで一部消化する。あるいは、完全制限修飾系[例えば、NdeIゲノムライブラリー]を含むライブラリーを作成し得る(段階7にスキップする)。フラグメントは、クローン化可能なサイズ、即ち1.5~14kbでなければならない。

20

【0027】

3. HindIII - 消化ゲノムDNAをpUC19クローニングベクターに連結する。得られた混合物を使用して、好適な宿主、即ちhsdR⁻、mcrBC⁻、mrr⁻株、例えば大腸菌株RR1を形質転換する。DNA/細胞混合物を、形質転換細胞用のアンピシリン選択培地にプレートする。インキュベーション後、形質転換細胞コロニーを一緒に収穫して、一次(primary)細胞ライブラリーを形成する。上記の如く、このような一次細胞ライブラリーを全部で10個を、個々のクローニングエンドヌクレアーゼによる*Acetobacter acetii* DNAの完全または部分消化物及び宿主株を使用することにより構築した。

30

【0028】

4. 組換えプラスミドを一次細胞ライブラリーからin totoで精製し、一次プラスミドライブラリーを作成する。精製したプラスミドライブラリーを、*Acetobacter acetii* 細胞または任意のAatIIアイソシゾマーから調製されるAatIIエンドヌクレアーゼでin vitroで完全に消化する。AatIIエンドヌクレアーゼ消化により、未修飾の、非メチラーゼ含有クローンを選択的に破壊し、AatIIメチラーゼ - 保持クローンの相対頻度を高める。

【0029】

5. AatIIメチラーゼクローンの同定: 消化したプラスミドライブラリーDNAを宿主(例えば、大腸菌株RR1)に戻し形質転換し、形質転換したコロニーを再びアンピシリンプレートにプレートして得る。コロニーを拾い出し、そのDNAをAatIIメチラーゼ遺伝子の存在に関して、精製したプラスミドDNAをin vitroでAatIIエンドヌクレアーゼとインキュベートし、AatII消化に対して耐性であるかどうかを決定することにより分析する。

40

【0030】

6. メチラーゼ遺伝子がクローニングしたことが確認できたら、クローンをAatIIエンドヌクレアーゼ活性に関して分析する。活性が検出される場合、AatII制限遺伝子はメチラーゼ遺伝子に結合しており、そのクローン中に存在する。このような場合には、以下の段階にスキップする。しかしながら、本発明の方法では、全く制限活性は検出できなかった。制限活性の欠失は、制限遺伝子がメチラーゼ遺伝子に結合していないか、結合

50

していてもメチラーゼ遺伝子と共に完全にクローニングされていないか、完全にクローニングされていても発現されていないか、若しくは完全系がクローニングされていてもメチラーゼ遺伝子の発現が制限エンドヌクレアーゼに対して十分に保護するのに不十分であるということ、即ち、選択から生存するクローンだけがエンドヌクレアーゼ遺伝子に於いて自然発生的突然変異若しくは欠失を起こしたということを示している。上記のどの可能性がこの場合であるかを検出するために、クローニングしたフラグメントを制限 - マッピングし、クローニングフラグメント内でメチラーゼ遺伝子の相対位置がどこであるかを決定するために欠失を行なう。次いで情報を使用して、結合している場合、メチラーゼ遺伝子のいずれかの側に制限遺伝子をコードするのに十分なDNAが存在するかどうかを検出する。十分な長さのDNAがある場合、制限遺伝子は結合していないか、発現せずにクローン内に存在すると想定される（段階10にスキップする）。クローニングしたDNAのメチラーゼ遺伝子の両側に、結合した制限遺伝子をコードするのに十分なDNAが無い場合、本発明のHindIIIクローン、p(UC)AatIIM18に関して知見されるように、メチラーゼ遺伝子の一部を使用して、存在するクローン化DNAの境界を越えて伸長する領域のゲノムマップをサザンハイブリダイゼーションにより作成するためにAcetobacter acetii染色体の消化物を精査する。このデータは、ある種のエンドヌクレアーゼ、例えば、メチラーゼ遺伝子並びに多量の隣接DNAを保持する個々のフラグメントに制限 - 修飾領域を切断するNdeIの同定に役立つ。このようなエンドヌクレアーゼにより生成したフラグメントの正確なサイズは、同様にデータから計算される。制限及び修飾遺伝子が結合していることが知見される場合、このようなフラグメントは制限遺伝子もコードするだろう。

10

20

【0031】

7. 豊富なライブラリーを、NdeIでAcetobacter acetii DNAを消化し、次いで生成したフラグメントを例えばpUC19などの好適なベクターに連結することにより構築する。DNA、メチラーゼ遺伝子並びに隣接領域を保持するクローンを、メチラーゼ選択により単離する[欧州特許出願公開第193,413号(1986年9月3日)及びBsuri:Kissら, Nucleic Acids Res. 13:6403-6421, (1985)]。

【0032】

8. 制限遺伝子クローンの同定: メチラーゼ選択及び形質転換後、アンピシリン耐性形質転換細胞を、存在するメチラーゼクローンの境界を越えて伸長するDNA挿入物に関してスクリーニングする。このようなクローンを同定したら、粗な細胞抽出物をこれらのクローンから調製し、細胞抽出物を連続希釈し、次いでAatIIエンドヌクレアーゼ活性に関してアッセイする。aatIIM及びaatIIR遺伝子の両方を保持するクローンを、これらの細胞抽出物のAatIIエンドヌクレアーゼ活性アッセイ及びAatIIエンドヌクレアーゼ切断に対するベクターバックボーン(backbone)耐性を与える活性により同定する。

30

【0033】

9. aatIIR及びaatIIM遺伝子を含む領域を、欠失マッピングによりマップ化し、サブクローニングし、ジデオキシヌクレオチド終止法によりDNA配列を決定した[Sanger, F., ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 1977, 74: 5463-5467]。

40

【0034】

10. 過剰発現: 本発明のもう一つの好ましい態様によると、AatII制限エンドヌクレアーゼ及び/または他の制限エンドヌクレアーゼに関する好ましい一つのアプローチとしては、以下のものが挙げられる。

【0035】

1) 例えば、pSC101複製開始点を含む増加コピー数の変異株を構築し、aatIIM遺伝子または他のメチラーゼ遺伝子を上記で作成した中コピー数のプラスミドにクローニングして、大腸菌宿主を予備修飾且つ保護する。aatIIM遺伝子(または他のメチ

50

ラーゼ遺伝子)をlacプロモーターから発現する。

【0036】

2)aatIIRに関しては、制限エンドヌクレアーゼ遺伝子を発現ベクター[例えば、pSYX22(pSYX22の構築に関しては実施例1に詳細を説明する)]上のT7lacプロモーターの下流に挿入し得る。これは、ポリメラーゼ連鎖反応によりエンドヌクレアーゼ遺伝子を増幅するためのプライマー中に制限部位を組み込む(Saik, R. K.ら。Science 230:1350-1354)か、または特定部位の突然変異誘発によりエンドヌクレアーゼ遺伝子の始めと終わりに制限部位を組み込む(Kunkel, T. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492, (1985))により実施し得る。さらに、強力なリボソーム結合部位[Shine & Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342-1346 (1974)]を遺伝子の前に配置して、翻訳効率を高め得る。エンドヌクレアーゼ発現に使用し得る他のプロモーターとしては、pUC19及びpBR322誘導体上のPlac、PlacUV5、Ptac、PR、T3及びPLが挙げられる。しかし、これらのプロモーターは、非誘発条件下では厳格に抑制されないで、低い誘発率を与える。

10

【0037】

aatIIR及びaarIIM遺伝子のDNA配列は、大腸菌でより効率良く使用されるコドンを使用する慣用のホスホアミダイト(phosphoramidite)またはホストリエステル(phosphotriester)化学により合成し得る[Applied Biosystems user bulletins #13, 1988; Usman, N.ら, J. Am. Chem. Soc., 109:7845-7854, 1987]。

20

【0038】

11. AatII産生及び精製: AatIIメチラーゼまたはエンドヌクレアーゼは、抗生物質(例えば、アンピシリン、クロラムフェニコール及びカナマイシン)を含む富栄養培地中、発酵器で増殖することにより、AatIIメチラーゼ遺伝子(または異種メチラーゼ)及び過剰発現制限エンドヌクレアーゼを保持するクローンから産生し得る。その後、細胞を遠心分離して収穫し、超音波処理して破壊して、AatIIメチラーゼ及び制限エンドヌクレアーゼ活性を含む粗な細胞抽出物を得る。AatIIメチラーゼ及びエンドヌクレアーゼを含む粗な細胞抽出物を、標準蛋白質精製技術(例えば、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過またはイオン交換クロマトグラフィー)により精製する。

30

【0039】

上記概略の段階は本発明を実施するための好ましい態様であるが、上記のアプローチは、当業界で公知の技術に従って改変し得ることは当業者には公知である。

【0040】

以下の実施例は、実施するのに好ましい本発明の態様を説明するものである。この実施例は単なる説明であり、特許請求の範囲に示されるものを除いて、本発明は実施例によって制限されるものではない。

【0041】

40

【実施例】

実施例1

1. AatII制限及び修飾系のクローニング: まずaatIIM遺伝子を、AatIIエンドヌクレアーゼでプラスミドライブラリーをチャレンジすることによるメチラーゼ選択を使用してHindIIIフラグメントにクローニングし、次いで形質転換後の生存物を探した。後に、aatIIR遺伝子のほんの一部がこのHindIII挿入物中に存在することが知見された。Acetobacter acetigenom DNAの制限マッピングにより、NdeIフラグメントは、aatIIR遺伝子の隣のDNAの一端を伸長すべきであることが示された。AatII制限-修飾系、aatIIR及びaatIIM遺伝子を、メチラーゼ選択法によりpUC19ベクター中のNdeI制限フラグメントにク

50

ローニングした。このクローンを $p(UC)AatIIR^+M^+18$ と名付けた。これは、湿潤大腸菌細胞 1 グラム当たり $AatI$ エンドヌクレアーゼ 200 単位を作る。 $p(UC)AatIIR^+M^+21$ は、同一 $NdeI$ 挿入物を含んでいたが、反対方向であった。

【0042】

2. $aatIIM$ 及び $aatIIR$ 遺伝子の制限マッピング: $aatIIM$ 及び $aatIIR$ 遺伝子を以下のようにマッピングした。5500-bp $NdeI$ フラグメント挿入物には 2 個の $XbaI$ 部位 (約 300 bp 離れている) があり、 $pUC19$ の多重クローニング部位には 1 個の $XbaI$ 部位がある。2 個の $XbaI$ 制限フラグメントを欠失する $XbaI$ フラグメント欠失サブクローン (約 1000 bp の欠失) を構築した。 $p(UC)AatIIR^+M^+18$ 2 μg を、1 \times 制限緩衝液 (50 mM $NaCl$, 10 mM $Tris-HCl$, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ジチオスレイトール) 50 μl 中、37 で 1 時間、 $XbaI$ 20 単位で消化した。消化した DNA をフェノール- $CHCl_3$ 及び $CHCl_3$ の等容量で抽出し、エタノールで沈澱させて乾燥した。得られた DNA 0.2 μg を、1 \times 連結緩衝液 (50 mM $Tris-HCl$, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM ジチオスレイトール、ウシ血清アルブミンの 1 mM ATP 25 $\mu g/ml$) 50 μl 中、16 で一晩、 $T4$ DNA リガーゼで連結した。連結した DNA に、滅菌-蒸留水を等量添加して希釈した。希釈した DNA 10 μl を、 $ER1821$ ($hsd-mrr-mcrBC$) コンピテント細胞 0.1 ml と混合し、4 で 30 分間、42 で 3 分間インキュベートした。LB 培地 0.1 ml を添加して、37 で 1 時間インキュベートした後、細胞/DNA 混合物を LB 寒天プレート+アンピシリン (Ap) 50 $\mu g/ml$ 上にプレートし、37 で一晩インキュベートした。12 個の個々のアンピシリン耐性 (Ap^r) 形質転換細胞を拾いだし、LB+ Ap 2 ml 中に接種し、37 で一晩振蕩した。各細胞 1.5 ml を、1.5 ml エッペンドルフ管中で遠心分離し、 $Birnboim$ 及び $Doly$ の方法により改造したミニプレパレーション方法によりプラスミド DNA を作成した [*Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523 (1979)]。

【0043】

プラスミドミニプレパレーション法: 一晩培養した培地 1.5 ml を、6,000 $\times g$ で 3 分間ペレット化した。上清を捨て、細胞ペレットを 25 mM $Tris-HCl$ (pH 8.0)、10 mM $EDTA$ 、50 mM グルコース、20 $\mu g/ml$ $RNase A$ の 0.2 ml 中に再懸濁させた。室温で 5 分後、0.2 M $NaOH$ 、1% SDS の 0.2 ml を添加し、細胞を溶解させるために管を逆さにした。室温で 5 分後、3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) 0.15 ml を添加し、逆さにして十分に混合した。形成した沈澱を 12,000 $\times g$ 、4 で 10 分間遠心分離した。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。層を、12,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離することにより分離した。上層を新しい遠心分離管に取り出し、等容量のクロロホルムで抽出した。DNA を 95% エタノール 0.9 ml と混合した。管を 12,000 $\times g$ で 10 分間回転させ、沈澱した核酸をペレット化した。上清を捨て、ペレットを再び 70% エタノール 1 ml で洗浄し、再ペレット化し、15 分間真空下で乾燥した。一旦乾燥させたら、ペレットは TE 緩衝液 (10 mM $Tris-HCl$, 1 mM $EDTA$, pH 8.0) 100 μl 中に再懸濁させた。

【0044】

12 個のプラスミド DNA を $XbaI$ エンドヌクレアーゼ消化及びアガロースゲル電気泳動により分析し、 $XbaI$ 欠失を確認した。これら総ては正しいサイズの欠失を含んでいた。 $XbaI$ 欠失クローン、即ち $p(UC)AatIIM^+(XbaI)$ は、 $AatI$ エンドヌクレアーゼでチャレンジしてもプラスミド DNA が $AatI$ 開裂に対して耐性であることから、まだ無傷の $aatIIM$ 遺伝子を含んでいた。さらに $aatIIM$ 遺伝子のサイズを小さくするために、 $Eco0109I$ フラグメントをベクターの $Eco0109I$ 部位と残りの挿入物の $Eco0109I$ 部位の間で欠失した。この欠失は、 E c

o o 1 0 9 I 末端がまず大腸菌 DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントを用いて充填され、次いで自己連結された以外には X b a I 欠失と同一方法で構築した。得られた E c o 0 1 0 9 I 欠失クローンは、A a t I I エンドヌクレアーゼ消化に対して一部耐性であり、a a t I I M 遺伝子がまだクローン中に含まれていることを示している。X b a I 欠失クローン及び E c o 0 1 0 9 I 欠失クローンは、約 1 8 0 0 b p の DNA フラグメント内に a a t I I M を規定した。X b a I 欠失クローンを、これが無傷の a a t I I R 遺伝子を含んでいるかどうかに関して A a t I I エンドヌクレアーゼ活性に関してもアッセイした。粗な細胞抽出物を以下のようにして調製した。L B + A p 2 0 0 m l を細胞 2 m l と一晩接種し、3 7 °C で一晩振蕩した。細胞を遠心分離し、細胞ペレットを超音波緩衝液 (1 0 m M T r i s - H C l , 1 0 m M β - メルカプトエタノール) 2 0 m l 中に再懸濁させ、3 0 秒間 1 0 回超音波処理し、1 5 0 0 0 × g で 3 0 分間遠心分離して、細胞片を分離した。細胞抽出物 1 μ l 、2 μ l 、4 μ l 及び 8 μ l を、1 × A a t I I 制限緩衝液 (5 0 m M 酢酸カリウム、2 0 m M T r i s 酢酸塩、1 0 m M 酢酸マグネシウム、1 m M ジチオスレイトール) 3 0 μ l 中で 3 7 °C 1 時間、DNA 1 μ g と一緒にインキュベートした。停止溶液 3 m l を添加し、DNA をアガロース電気泳動により分析した。X b a I 欠失クローン中には A a t I I エンドヌクレアーゼ活性は検出されず、エンドヌクレアーゼ遺伝子の一部が欠失したことを示していた。

【 0 0 4 5 】

a a t I I R 遺伝子の境界をマッピングするために、a a t I I M 遺伝子をまず P t a c 及び多重クローニング部位を含むベクター p R 9 7 6 、即ち p A C Y C 1 8 4 誘導体 (P a u l R i g g s , N e w E n g l a n d B i o l a b s , B e v e r l y , M A により構築されたもの) にクローニングした。a a t I I M 遺伝子を含む 3 0 0 0 b p P s t I フラグメントを p R 9 7 6 の P s t I 部位に挿入した。得られたプラスミド、即ち p R 9 7 6 A a t I I M⁺ を、大腸菌株 E R 1 8 2 1 (h s d - m r r - m c r B C) に形質転換した。欠失サブクローンを予備修飾した E R 1 8 2 1 [p (R 9 7 6) A a t I I M⁺] に形質転換し、無傷の a a t I I R 遺伝子を含むかどうかを見た。

【 0 0 4 6 】

p (U C) A a t I I R⁺ M⁺ 1 8 には H i n c I I 部位が 2 個、ベクターの多重クローニング部位に 1 個及び挿入物にもう 1 個ある。H i n c I I 欠失、則ち約 4 5 0 0 b p の欠失は、X b a I 欠失クローンと同一方法で構築した。このプラスミドを E R 1 8 2 1 [p (R 9 7 6) A a t I I M⁺] 細胞に形質転換し、細胞抽出物を形質転換細胞から調製したが、A a t I I エンドヌクレアーゼ活性は検出されなかった。もう 1 つの欠失クローンは、約 4 2 0 0 b p の DNA を欠失した E c o R V / S m a I フラグメント欠失を含んでいる。この欠失クローンは、粗な細胞抽出物中に A a t I I エンドヌクレアーゼ活性を示す。これらの結果から、a a t I I R 遺伝子は、約 1 3 0 0 b p の DNA フラグメント内にあることが解った。

【 0 0 4 7 】

3 . a a t I I M 及び a a t I I R 遺伝子の DNA 配列分析 : a a t I I M 及び a a t I I R 遺伝子の両方を含む DNA 領域を配列決定するために、さらに 4 つの欠失サブクローン (B a m H I フラグメント欠失、E c o R I フラグメント欠失、H i n d I I I フラグメント欠失及び P s t I フラグメント欠失) を個々のエンドヌクレアーゼ開裂及び自己連結により X b a I フラグメント欠失で実施したのと同じ方法で構築した。全部で 3 3 6 5 b p の DNA を、S a n g e r のジデオキシ - 終止配列決定方法により両方の鎖上で配列決定した [S a n g e r , F r a , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 7 4 : 5 4 6 3 - 5 4 6 7] 。2 個の大きな読み取り枠、則ち各々 9 9 6 b p 及び 1 0 3 8 b p は、a a t I I M 及び a a t I I R 遺伝子がマッピングされる領域に知見された。プラスミド中で 9 9 6 b p 読み取り枠をサブクローニングすると、A a t I I 部位修飾を示し、この読み取り枠を a a t I I M 遺伝子と帰属した (図 2) 。a a t I I M 遺伝子から予想されたアミノ酸配列から、これが N - 6 アデニンメチラーゼに関する保存されたモチーフ (モチーフ D P P Y 及び D P F - G S G - T) を含むことが解った。プラスミド中

10

20

30

40

50

で1038bp読み取り枠をサブクローニングし、AatIIメチラーゼ-修飾細胞を形質転換すると、粗な細胞抽出物中にAatIIエンドヌクレアーゼ活性が見られた。従って、この読み取り枠を、aatIIR遺伝子と帰属した(図3)。

【0048】

4. 大腸菌でのaatIIR遺伝子の過剰発現:

A. P_Lプロモーター下でのaatIIM及びaatIIR遺伝子の過剰発現: aatIIM及びaatIIR遺伝子の両方を含むBspEI/NdeI DNAを、発現ベクターpDNEV5、則ちP_Lプロモーター及び温度-感受性リプレッサ-遺伝子cI₈₅₇を含むpUC19誘導体(Donald Nwankwo, New England Biolabs, Beverly, MAにより構築されたpDNEV5)にクローニ

10

ングした。得られたプラスミドをp(DNEV5)AatIIR⁺M⁺と名付けた。ER1821[p(DNEV5)AatIIR⁺M⁺]細胞は、43で一晩インキュベーション後に湿潤細胞1g当たりAatIIエンドヌクレアーゼを40,000単位製造した。収率は、天然のAcetobacter acetii株の20倍以上であった。しかしながら、この過剰産生株は不安定である。これは、100リットル発酵器中で殆ど生長せず、幾つかの細胞は培地で溶解した。従って、より安定なクローンの構築を試みた。

【0049】

B. P_{tac}プロモーター下でのaatIIR遺伝子の発現: AatIIエンドヌクレアーゼ産生クローンを安定化させるために、PstI/NdeIフラグメント中に含まれていたaatIIM遺伝子をpUC19にサブクローニングした。得られたプラスミド、則

20

ちp(UC)AatIIM⁺(PstI/NdeI)の4つのAatII部位を、AatIIメチラーゼにより完全に修飾した。aatIIR遺伝子を保持するEcoRI制限フラグメントを、P_{tac}プロモーター及びLacリプレッサ制御下で、適合性発現プラスミドpR976にクローニングした。大腸菌細胞ER2267[p(UC)AatIIM⁺(PstI/NdeI)、p(R976)-AatIIR⁺(EcoRI/EcoRI)]を1リットル細胞培地中0.5mM IPTGを添加することにより誘発すると、AatIIエンドヌクレアーゼの収率は、湿潤細胞1g当たり10,000単位であり、天然のAcetobacter acetii株の5倍の過剰発現であった。しかしながら、培地を100リットルの発酵器にスケールアップすると、収率は湿潤細胞1g当たり2000単位に減少した。スケールアップに失敗した原因は解らない。

30

【0050】

C. 発現ベクターpRRS上でのP_{lacUV5}プロモーター下でのaatIIR遺伝子の発現:

1) aatIIM遺伝子のpWSK129へのクローニング

プラスミドpWSK129は、pUC19及びpBR322誘導ベクター上に保持したColEIオリジンと適合性であるpSC101複製開始点並びにカナマイシン耐性(Kan^r)遺伝子を含む低コピー数のプラスミドである[Wang R. F. 及びKushner, S. R. Gene, 100: 195-199, 1991]。プラスミドpWSK129も、T7及びT3 RNAポリメラーゼプロモーターによりフランキングされた多重クローニング部位を含む。aatIIM遺伝子は、2個のプライマー(プライマー1は、

40

5'末端付近にBamHI部位を有する: 5' CGG GAT CCG GAG GA A TAA AAT GAC CGC TCG TCC 3', SEQ ID: 1, プライマー2は、5'末端付近にPstI部位を含む: 5' CCT TAA CTG CA G TCA TTT GTT GAT ATC CAG AG 3', SEQ ID: 2)を使用してp(UC)AatIIR⁺M⁺21からPCRにより増幅した。このPCR産物を精製し、BamHI及びPstIで切断し、BamHI/PstIで消化したpWSK129に連結した。連結したDNAを使用して大腸菌ER2206細胞を形質転換し、形質転換細胞をカナマイシン耐性に関して選択した。18個の個々の形質転換細胞を、ミニプレパレーションプラスミドDNA中でaatIIM挿入物に関してスクリーニングした。11個の形質転換細胞は正しいサイズの挿入物を含んでおり、得られたプラスミド

50

を $p(WSK129)AatIIM^+$ と名付けた。プラスミドは、 $AatII$ の消化に対して耐性であり、 $AatII$ メチラーゼにより十分に修飾されていることを示している。

【0051】

2) 発現ベクター $pRRS2$ への $aatIIR$ 遺伝子のクローニング

発現ベクター $pRRS$ は、 $lacUV5$ プロモーター、多重クローニング配列及び多重クローニング部位の下流に正のレトロ制御 (*retroregulator*) ステム-ループ要素を含む $pUC19$ -誘導ベクターである [Skoglund C.M.ら, *Gene*, 88:1-5 (1990)]。 $pRRS$ 誘導体、即ち $pRRS2$ を、 $lacUV5$ プロモーターに対し遠位の $EcoRI$ 部位に充填し、次いで新しい $RcoRI$ リンカーをプロモーター近辺の $HindIII$ 部位に挿入することにより構築した。2個のプライマーを使用して $p(UC)AatIIR^+M^+21$ からの $aatIIR$ 遺伝子を増幅した。プライマー1は、 $EcoRI$ 部位トリボソーム結合部位を含んでいた (5' CTG AAT T TCG GAG GTT TAA AAT ATG AAC CCA GAC GA A GTA TTT TCA 3', SEQ ID:3)。 $SalI$ 部位をプライマー2に作成した (5' TCTG AGG GTC GAC TTT AGG ATT CTG ATT GTG GGA 3', SEQ ID:4)。 $aatIIR$ 遺伝子を、Vent (登録商標) DNAポリメラーゼを用いてPCR反応により増幅した (95 で1分間, 50 で2分間, 72 で1分間, 20サイクル)。DNA産物をフェノール- $CHCl_3$ で2回、 $CHCl_3$ で2回抽出し、エタノール沈澱させた。 $EcoRI$ 及び $SalI$ で37 で1時間制限消化後、DNAを再びフェノール- $CHCl_3$ 及び $CHCl_3$ で抽出し、エタノールで沈澱させ、乾燥させ、次いでTE緩衝液100 μ l中に再懸濁させた。 $aatIIR$ 遺伝子を $EcoRI/SalI$ で切断した $pRRS2$ に連結し、ER2206 [$p(WSK129)AatIIM^+$] / F' $lacI^q$, $Tn10(Tc^r)$ に形質転換した。2種類のコロニーモルフォロジーが形質転換細胞中に知見され、その一方は通常のコロニーであり、他方は平坦で透明なコロニーであった。後者のコロニーは、 $pRRS2$ に $aatIIR$ 挿入物を含んでおり、10mlの小培養中に $AatII$ エンドヌクレアーゼを産生した。これは200mlサブカルチャー中で $AatII$ エンドヌクレアーゼの産生に失敗したが、これはクローンが不安定であることを示す。この不安定性は、多分、メチル化条件下では、 $pUC19$ -誘導ベクターのコピー数が細胞1個当たり400と多すぎたためと予想されたが、プラスミドを含むメチラーゼのコピー数が細胞1個当たりたったの約6~8コピーである。他の理由としては、 $lacI^q$ 遺伝子が F' 低コピー数プラスミド上に保持されているので、非誘導条件下では $aatIIR$ 遺伝子の発現を抑制するのに十分な Lac リプレッサーが細胞中に産生しなかったことが考えられる。厳格に制御された発現系が $AatII$ 発現に必要である。

【0052】

D. 大腸菌中で $aatIIM$ 遺伝子を発現するための中コピー数のベクターの構築：安定して $AatII$ エンドヌクレアーゼを過剰発現させるために、増加コピー数の変異プラスミドを以下のように $pWSK129$ から単離した。 $pWSK129$ を保持する $XL1-Blue$ 細胞を増殖させて、LB+カナマイシン (Kan) 50 μ g/ml中に 2×10^8 細胞/mlとし、細胞を回転させて10倍に濃縮し、10mM $Tris-HCl$ 、10mM $MgSO_4$ (pH7.8)の1/10倍容量に再懸濁させた。細胞を15秒間UV処理で突然変異を誘発させた (6 J/秒)。突然変異誘発した細胞を、通常の Kan プレートより40倍も Kan が多い2mg/ml Kan プレートにプレートし、37で一晩インキュベートした。35個の Kan^r コロニーが知見され、これを一緒にプールして、LB+2mg/ml Kan 10mlに接種した。宿主の突然変異のため2mg/ Kan で増殖し得るコロニーを除去するために、プラスミドDNAを1.5mlの一晩培養物から調製し、新しい宿主ER1821に形質転換し、2mg Kan /mlプレートにプレートした。プラスミドのコピー数を評価するために、 Kan^r 形質転換細胞をLB+ Kan 中で生長させ、プラスミドDNAを、 $pWSK129$ 及び $pBR322$ プラスミドを用いて平行的にミニプレパレーション法により等数の細胞から調製した。 $pWSK12$

9 5 ml、コピー数変異体及び pBR322 DNA をアガロースゲル電気泳動により分析した。ゲル中で臭化エチジウムで染色した DNA の写真を撮った。写真のネガを、各レーンの DNA の相対量を評価するためにデンストメトリーでスキャンした。変異体 1 個 (# 3) はプラスミドのコピー数を 3 倍 (細胞 1 個当たり 18 ~ 24 個) に増加させることが知見された。このプラスミドを pSYX19 と名付けた。aatIIM 遺伝子を pSYX19 にクローニングするために、2 個のプライマーを設計して aatIIM 遺伝子を、第 1 のプライマーが上端ストランド (Watson ストランド) 上の aatIIM 遺伝子の開始部分にアニールし、第 2 のプライマーが底部ストランド (Crick ストランド) 上の aatIIM 遺伝子の末端にアニールするようにして、aatIIM 遺伝子を増幅した。プライマー 1 (5' CGG GAT CCG GAG GAA TAA AAT 10
GAC CGC TCG TCC 3', SEQ ID: 1) は、BamHI 部位と ATG 開始コドンの 6 塩基上流の部位に結合する有効なリボソーム結合部位を含む。プライマー 2 (5' CCT TAA CTG CAG TCA TTT GTT GAT ATC CAG AG 3', SEQ ID: 2) は、5' 末端の近くに PstI 部位を含む。aatIIM 遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応により Vent (登録商標) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs, Inc.) で増幅した (95 1 分間, 50 2 分間, 72 1 分間, 20 サイクル)。DNA 産物をフェノール - CHCl₃ で 2 回、CHCl₃ で 2 回抽出し、エタノールで沈澱させた。BamHI 及び PstI で、37 で 1 時間制限消化した。DNA をフェノール - CHCl₃ 及び CHCl₃ で 20
再び抽出し、エタノールで沈澱させ、乾燥させ、TE 緩衝液 100 µl 中に再懸濁させた。pSYX19 ベクター DNA 5 µg を BamHI 及び PstI でも切断し、フェノール - CHCl₃ 及び CHCl₃ で抽出し、エタノール沈澱させ、TE 緩衝液 100 µl 中に再懸濁させた。aatIIM DNA 10 µl 及び pSYX19 ベクター DNA 10 µl を、全容量 30 µl 中 1 × 連結緩衝液中、16 で一晩連結した。連結した DNA を滅菌 - 蒸留水 70 µl を添加して希釈し、DNA 10 µl を使用して ER1821 細胞を形質転換し、Kan (50 µl / ml) プレートにプレートした。18 個の Kan^r 形質転換細胞を 1.5 ml LB + カナマイシンで一晩生長させ、プラスミド DNA をこれらの一晩生長させた培養物から調製した。18 個の内 11 個が、BamHI 及び PstI 制限消化による正しいサイズの挿入物を含んでいる。これらのうち 5 個を AatIIEndヌクレアーゼで消化した時、これらの 5 個全部のプラスミドは AatIIEnd 消化に対して耐性であ 30
った。1 個のプラスミドを p (SYX19) AatIIM⁺ と名付け、AatIIEndヌクレアーゼの共発現 (coexpression) に使用した。

【 0053 】

T7lac プロモーター下での中コピー数プラスミドに於ける aatIIR 遺伝子の発現 : pET-11a は、T7 プロモーター (この T7 プロモーター + lac オペレーター は、T7lac プロモーターと呼ばれる) の 4 bp 下流の lac オペレーター、lacI^q 遺伝子及びクローニングするための 2 個の制限部位 (即ち、NdeI 及び BamHI) を含む pBR322 から誘導した T7 発現ベクターである (Dubendorff, J. W. 及び Studier, F. W., J. Mol. Biol. 219: 45 - 59, 1991)。pET-11a 誘导体、即ち T7 プロモーターの上流に rrnB 転写ターミネーターのコピーを 4 個含む pAII17 (William Jack at New England Biolabs, Beverly, MA により構築された pAII17) を構築した。T7 プロモーターの上流の転写ターミネーターはさらに、ターゲット遺伝子の発現を基底レベルに減少する。BamHI 部位は aatIIR 遺伝子中に生じるため、ベクター上の BamHI 部位を大腸菌 DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントで充填し、SalI リンカーを挿入して BamHI 部位を置き換えた。このプラスミドを pSYX22 と名付けた。2 個のプライマーを、第 1 のプライマーが aatIIR 遺伝子の開始部分にアニールする NdeI 部位を含み、SalI 部位は aatIIR 遺伝子の末端に相補的である第 2 のプライマー中に作成されるように設計される (プライマー 1 : 5' C 30
AA CAT ATG AAT CCA GAC GAA GTA TTT TCA 3

' , SEQ ID : 5 ; プライマー 2 : 5 ' TCG AGG GTC GAC TTT
 AGG ATT CTG ATT GTG GGA 3 ' , SEQ ID : 6) 。 a a
 t I I R 遺伝子を、V e n t (登録商標) DNA ポリメラーゼにより P C R で増幅した (9 5 1 分間 , 5 0 2 分間 , 7 2 1 分間 , 2 0 サイクル) 。 P C R 産物をフェノール
 - C H C l ₃ 及び C H C l ₃ で抽出し、エタノール沈澱させ、N d e I 及び S a l I で切
 断した。DNA を再びフェノール - C H C l ₃ 及び C H C l ₃ で抽出し、エタノール沈澱
 させ、次いで T E 緩衝液 1 0 0 μ l 中に再懸濁させることにより精製した。a a t I I R
 DNA 1 0 μ l を N d e I / S a l I で処理した p S Y X 2 2 0 . 5 μ g に、1 6
 で一晚連結した。連結した DNA を滅菌 - 蒸留水 7 0 μ l を添加して希釈して、このうち
 1 0 μ l を使用して B L 2 1 (D E 3) (h s d - m r r - m c r B C) [p (S Y X 1 9) A a t I I M ⁺ , K a n ^r ; p L y s S , C m ^r] を形質転換し、L B 寒天 + A p (5 0 μ g / m l) 、C m (3 0 μ g / m l) 、K a n (5 0 μ g / m l) 上にプレー
 トした。プラスミド p L y s S は、T 7 RNA ポリメラーゼを阻害して T 7 l a c プロ
 モーターからの基底レベルのターゲット遺伝子の発現を減少させるファージ T 7 リゾチー
 ムをコードする (S t u d i e r , F . W . , J . M o l . B i o l . 2 1 9 : 3 7 - 4 4 , 1 9 9 1) 。プラスミド DNA は、1 2 個の個々の形質転換細胞の 1 . 5 m l 培養物
 から調製し、a a t I I R DNA 挿入物に関して分析した。4 個のプラスミドは正しい
 サイズの挿入物を含んでいる。1 個のクローン、即ち p (S Y X 2 2) A a t I I R ⁺ を
 以下の如く A a t I I エンドヌクレアーゼ活性に関して試験した。2 0 0 m l の富裕なブ
 ロス培地 + A p (5 0 μ g / m l) 、C m (3 0 μ g / m l) 、K a n (5 0 μ g / m l) を 2 m l 、細胞に一晚接種し、3 7 で振蕩して K l e t t 1 0 0 の細胞密度とした
 (中間対数増殖期 (m i d l o g p h a s e)) 。I P T G インデューサーを培養物に
 添加して、終濃度 0 . 5 m M とした。細胞を 2 時間誘発し、K l e t t 1 7 5 で収穫し
 た。細胞を 4 、5 0 0 0 \times g で 1 5 分間遠心分離してペレット化し、2 0 m l 超音波緩
 衝液 (1 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 8 , 1 0 m M - メルカプトエタノール) 2 0 m l 中に再懸濁させ、氷上で 3 0 秒間で 1 0 回超音波処理した。細胞破砕片を 4
 1 5 0 0 0 \times g で 3 0 秒間遠心分離することにより除去した。上清を新しい管に移し、超
 音波緩衝液中 1 0 ¹ 、1 0 ² 、1 0 ³ 及び 1 0 ⁴ 倍に希釈し、希釈した抽出物 2 μ l を使
 用して、全容量 3 0 μ l の 1 \times A a t I I 制限緩衝液中 H i n d I I I - 直線化 p U C 1
 9 1 μ g を切断した。p U C 1 9 には単一 A a t I I 部位があった。H i n d I I I -
 直線化 p U C 1 9 を A a t I I エンドヌクレアーゼで切断すると、2 個のフラグメント、
 即ちサイズ 5 1 6 b p 及び 2 1 7 0 b p ができた。3 7 で 1 時間後、反応を停止溶液 3
 μ l を添加して停止し、アガロースゲル電気泳動により DNA を分析した。1 0 0 倍に希
 釈した細胞抽出物を用いて完全な消化が達成されたことが知見された。このクローンは湿
 潤細胞 1 g 当たり A a t I I エンドヌクレアーゼを 1 0 ⁶ 単位作成すると評価された。A
 a t I I の 1 単位は、5 0 μ l の反応液中、3 7 で 1 時間 DNA 1 μ g を完全に消化
 する酵素量である。

【 0 0 5 4 】

5 . 安定性試験 : B L 2 1 (D E 3) (h s d - m r r - m c r B C) [p (S Y X 2 2) A a t I I R ⁺ , p (S Y X 1 9) A a t I I M ⁺ , p L y s S] 細胞を 2 5 % グ
 リセロール中、- 7 0 で一晚凍結した。細胞を凍結ストックから L B 寒天 + A p 、C m
 及び K a n 上に画線培養し、単一コロニーを得た。5 0 0 m l の富裕なブロス + 抗生物質
 を、単一コロニーに接種し、一晚振蕩した。コロニー形成単位を、富裕な寒天プレートま
 たは、A p 、C m 及び K a n を補った富裕な寒天プレート上で一晚培養した培養物から決
 定した。過剰産生株は両方のプレート上で同一プレート率を有することが知見された (1
 . 5 \times 1 0 ⁹ コロニー形成単位 / m l) 。一晚培養した培養物 5 m l を、5 0 0 m l の新
 しい、富裕なブロス + 抗生物質に接種し、K l e t t 単位が 1 0 0 になるまで生長させた
 。培養物に I P T G を 0 . 5 m M まで添加して誘発し、3 7 でインキュベーションを継
 続した。細胞を遠心分離により収穫した。細胞抽出物を調製し、A a t I I エンドヌクレ
 アーゼ活性を直線化した p U C 1 9 DNA 上で決定した。少なくとも 1 0 ⁶ 単位の A a

10

20

30

40

50

t I I エンドヌクレアーゼ / 湿潤細胞 g が検出された。

【 0 0 5 5 】

6 . A a t I I 過剰産生株 (N E B # 7 2 5) 由来の A a t I I 制限エンドヌクレアーゼの精製 (A m e r i c n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n に 1 9 9 2 年 7 月 7 日 に 寄 託 し 、 受 託 番 号 # _ _ を 受 け た) : 富 裕 な プ ロ ス 培 地 2 リ ッ ト ル に 5 0 μ g / m l A p 、 3 0 μ g / m l C m 及 び 5 0 μ g / m l K a n を 足 し た も の を 、 A a t I I 過 剰 産 生 プ ラ ス ミ ド p (S Y X 2 2) A a t I I R ⁺ 、 p (S Y X 1 9) A a t I I M ⁺ 及 び p L y s S を 保 持 す る B L 2 1 細 胞 を 2 0 m l と 一 晩 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 細 胞 を m i d - l o g p h a s e (K l e t t 単 位 1 0 0) ま で 3 7 $^{\circ}$ C で 生 長 さ せ た 。 I P T G イ ン デ ュ ー サ ー を 培 養 物 に 添 加 し 、 終 濃 度 0 . 5 m M と し 、 2 時 間 イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン を 継 続 し た 。 細 胞 を 4 $^{\circ}$ C で 5 0 0 0 \times g , 2 0 分 間 遠 心 分 離 し 、 細 胞 ペ レ ッ ト を 超 音 波 緩 衝 液 (1 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 8 , 1 0 m M β - メ ル カ プ ト エ タ ノ ー ル) 8 0 m l 中 に 再 懸 濁 さ せ 、 超 音 波 処 理 し た 。 以 下 の 精 製 方 法 を 4 $^{\circ}$ C で 実 施 し た 。 抽 出 物 を 1 5 0 0 0 \times g で 3 0 分 間 遠 心 分 離 し 、 上 清 を D E A E セ フ ア ロ ー ス カ ラ ム (1 . 5 \times 1 5 c m) に 載 置 し た 。 塩 勾 配 液 0 ~ 1 M N a C l を 適 用 し 、 画 分 を 収 集 し 、 A a t I I エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ 活 性 に 関 し て ア ッ セ イ し た 。 A a t I I エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ を 含 む 画 分 を プ ー ル し 、 7 5 m M N a C l 、 1 0 m M K P O ₄ (p H 7) 、 1 m M D T T 、 1 m M E D T A を 含 む 緩 衝 液 で 透 析 し た 。 酵 素 混 合 物 を ヘ パ リ ン セ フ ア ロ ー ス カ ラ ム (1 . 5 \times 1 5 c m) に 載 置 し 、 N a C l 0 ~ 1 M の 勾 配 液 で 蛋 白 質 を 溶 離 し た 。 A a t I I エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ を 含 む 画 分 を 同 様 に プ ー ル し 、 0 . 1 5 M N a C l 緩 衝 液 に 対 し て 透 析 し た 。 溶 液 を 1 . 5 \times 1 5 c m の ホ ス ホ セ ル ロ ー ス カ ラ ム に 載 置 し 、 N a C l の 0 . 1 5 M ~ 1 M の 勾 配 液 を 適 用 し た 。 A a t I I エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ を 含 む 画 分 を プ ー ル し 、 貯 蔵 緩 衝 液 (5 0 % グ リ セ ロ ー ル , 5 0 m M K C l , 1 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 4 , 0 . 1 m M E D T A , 1 m M D T T 及 び 2 0 0 μ g / m l B S A) に 対 し て 透 析 し た 。 最 終 収 量 は 、 細 胞 9 g か ら A a t I I エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ が 1 0 ⁶ 単 位 で あ っ た (2 4 0 , 0 0 0 単 位 A a t I I / m l) 。 酵 素 を 1 0 倍 に 希 釈 し て 2 4 , 0 0 0 単 位 / m l と し 、 希 釈 し た 酵 素 2 μ l ~ 1 0 μ l を S D S - ポ リ ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ル 電 気 泳 動 で 分 析 し た 。 I P T G - 誘 導 及 び 未 誘 導 細 胞 抽 出 物 も 同 一 ゲ ル に 載 置 し た 。 図 4 に 示 さ れ た 結 果 か ら 、 精 製 し た A a t I I エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ 蛋 白 質 は 少 な く と も 9 0 % の 純 度 で あ っ た こ と が 解 っ た (注 : 6 8 , 0 0 0 ダ ル ト ン ウ シ 血 清 ア ル ブ ミ ン は 汚 染 蛋 白 質 で は な け っ た 。 こ れ は A a t I I エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ を 安 定 化 す る た め に A a t I I 酵 素 製 剤 に 添 加 し た 。) 。

【 0 0 5 6 】

こ の 精 製 法 か ら 得 ら れ た A a t I I 制 限 エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ は 、 実 質 的 に 純 粋 で 非 特 異 的 エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ 及 び エ キ ソ ナ ク レ ア ー ゼ を 含 ん で い な け っ た 。 A a t I I 制 限 エ ン ド ナ ク レ ア ー ゼ 製 剤 の 純 度 を 以 下 の 基 準 に 従 っ て チ ェ ッ ク し た 。

【 0 0 5 7 】

1) 連 結 : D N A の 1 0 倍 過 剰 消 化 後 、 生 成 し た D N A フ ラ グ メ ン ト の 9 0 % 以 上 を T 4 D N A リ ガ ー ゼ で 連 結 し た 。 連 結 し た フ ラ グ メ ン ト の 9 5 % は 、 A a t I I で 再 切 断 可 能 で あ っ た 。

【 0 0 5 8 】

2) 長 時 間 の 消 化 : D N A 1 μ g 及 び 酵 素 7 2 単 位 を 含 む 反 応 液 5 0 μ l を 1 6 時 間 イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン 後 、 酵 素 1 単 位 で 1 時 間 実 施 し た 反 応 と 同 一 の D N A バ ン ド パ タ ー ン が 生 じ た 。

【 0 0 5 9 】

3) エ キ ソ ナ ク レ ア ー ゼ 活 性 : 1 μ g の 超 音 波 処 理 し た ³ H D N A (1 0 ⁵ c p m / μ g) を 含 む 5 0 μ l 反 応 液 中 酵 素 7 2 単 位 と 3 7 $^{\circ}$ C で 4 時 間 イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン 後 、 0 . 0 1 % 未 満 の 放 射 能 が 放 出 さ れ た 。 試 験 は 総 て 以 下 の 緩 衝 液 (5 0 m M 酢 酸 カ リ ウ ム , 2 0 m M T r i s - 酢 酸 塩 , 1 0 m M 酢 酸 マ グ ネ シ ウ ム , 1 m M ジ チ オ ス レ イ ト ー ル) 中 で 実 施 し た 。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

実施例 2

大腸菌に於ける N l a I I I エンドヌクレアーゼの過剰発現：N l a I I I メチラーゼ遺伝子 (n l a I I I M) 及び N l a I I I エンドヌクレアーゼ遺伝子 (n l a I I I R) をクローニングし (欧州特許出願公開第 4 7 7 , 5 3 2 号 , 1 9 9 2 年 4 月 1 日) 、次いで配列決定した。N l a I I I クローニング及びクローンからの N l a I I I エンドヌクレアーゼの産生法に関する特許出願は為されている (特許出願番号第 0 7 / 5 7 5 , 2 8 5 号) 。以下に本出願人は、本発明の発現系を使用する大腸菌に於ける N l a I I I エンドヌクレアーゼの過剰発現方法について記載する。

【 0 0 6 1 】

構成発現ベクターを構築するために、l a c Z a 遺伝子を含む B s s H I I 制限フラグメントを p S Y X 1 9 から欠失し、テトラサイクリン耐性 (T c^r) 遺伝子を保持する S s p I / P v u I I 制限フラグメントを残りの DNA と連結した。得られたプラスミド p S Y X 2 0 は、K a n^r 遺伝子及び T c^r 遺伝子の両方を含んでいた。これを 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 に 1 9 9 2 年 7 月 7 日に寄託し、受託番号 # _____ を受けた。DNA を T c^r 遺伝子にクローニングするとこれを不活化し、挿入物を検出するのに容易なスクリーニング方法を提供する。単一の E c o R V 、B a m H I 、S a l I 及び S p h I 制限部位は、T c^r 遺伝子にクローニングするのに都合の良い部位である。挿入された外来遺伝子は、T c プロモーターから構成的に発現される。

【 0 0 6 2 】

1 . n l a I I I M 遺伝子の p S Y X 2 0 ベクターへのクローニング：プラスミド p S Y X 2 0 は、K a n^r 及び T c^r 遺伝子並びに p S C 1 0 1 複製開始点を保持する中コピー数プラスミドである。T c^r 遺伝子に挿入された n l a I I I M 遺伝子は、T c プロモーターから構成的に発現され得る。2 個のプライマーを使用して p (U C) N l a I I I R⁺ M⁺ から n l a I I I M 遺伝子を増幅した。プライマー 1 は、5' 末端の近くに B a m H I 部位及び A T G 開始コドンの 7 b p 上流に効率のよいリボソーム結合部位を含んでいる (5' C G G G A T C C G G A G G T T A A T T A A A T G A A C T A C A T C G G C T C C A A A C T A 3' , S E Q I D : 7) 。プライマー 2 は、5' 末端の近くに S a l I 部位を有する (5' C A A G T C G A C T T A A A A G G T C T T T T C T A A A A T A T G 3' , S E Q I D : 8) 。n l a I I I M 遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応により V e n t (登録商標) D N A ポリメラーゼで増幅した (9 5 1 分間、5 0 2 分間、7 2 1 分間、2 0 サイクル) 。P C R 産物をフェノール - C H C l₃ で 2 回、C H C l₃ で 2 回抽出し、エタノール沈澱させ、T E 緩衝液 1 0 0 μ l で再懸濁させた。B a m H I 及び S a l I で 3 7 1 時間制限消化させた後、DNA を再びフェノール - C H C l₃ 及び C H C l₃ で抽出し、エタノール沈澱させ、乾燥し、T E 緩衝液 1 0 0 μ l に再懸濁させた。p S Y X 2 0 ベクター DNA 5 μ g を B a m H I 及び S a l I で切断し、フェノール - C H C l₃ 及び C H C l₃ で抽出し、エタノール沈澱させ、T E 緩衝液 1 0 0 μ l 中に再懸濁させた。n l a I I I M DNA 1 0 μ l 及び p S Y X 2 0 ベクター DNA 1 0 μ l を、全容量 3 0 μ l 中で 1 × 連結緩衝液中 1 6 で一晩連結した。連結した DNA を滅菌 - 蒸留水 7 0 μ l を添加して希釈し、DNA 1 0 μ l を使用して E R 1 8 2 1 細胞を形質転換し、K a n (5 0 μ g / m l) プレートにプレートした。1 8 個の K a n^r 形質転換細胞を 1 . 5 m l L B + K a n で一晩生長させ、プラスミド DNA を製造し、B a m H I 及び S a l I 制限消化により分析した。4 個のクローンが正しいサイズの挿入物を含んでいた。これらを N l a I I I エンドヌクレアーゼでチャレンジすると、4 個全部のプラスミドは N l a I I I の消化に対して耐性であり、N l a I I I メチラーゼによる完全な修飾を示した。1 個のプラスミドを p (S Y X 2 0) N l a I I I M⁺ と名付け、B L 2 1 (D E 3) (h s d - m r r - m c r B C) [p L y s S] 細胞を形質転換するのに使用し、L B 寒天プレート + 3 0 μ g / m l C m^r、5 0 μ g / m l K a n にプレートした。C m^r 及び K a

n^r 形質転換細胞が得られ、Nl a I I I エンドヌクレアーゼの発現用宿主として後で使
用した。

【 0 0 6 3 】

2. 発現ベクター p S Y X 2 2 への n l a I I I R 遺伝子のクローニング：発現ベクター
p S Y X 2 2 は、T 7 l a c プロモーター、l a c I^q 遺伝子、翻訳融合クローニング用
の2個の制限部位 (N d e I 及び S a l I) を含んでいる。p S Y X 2 2 の構築は実施例
1に記載した。2個のプライマーを、第1のプライマーが n l a I I I R 遺伝子の開始部
分にアニールされている N d e I 部位を含み、S a l I 部位が n l a I I I R 遺伝子の末
端に相補的である第2のプライマーに作成されるように設計した (プライマー 1 : 5 '

T T G C A T A T G A A A A T C A C A A A A A C A G A A C T A 10
3 ' , S E Q I D : 9 , プライマー 2 : 5 ' C G A G T C G A C T C A T C
C G T T A T C T T C T T C A T A T A A 3 ' , S E Q I D : 1 0) 。

n l a I I I R 遺伝子を、V e n t (登録商標) D N A ポリメラーゼを使用して P C R で
p (U C) N l a I I I R⁺ M⁺ から増幅した (9 5 で 1 分、5 0 で 2 分、7 2 で 1
分、2 0 サイクル) 。P C R 産物をフェノール - C H C l₃ 及び C H C l₃ で抽出し、エ
タノール沈澱させ、N d e I 及び S a l I で切断した。D N A を再びフェノール - C H C
l₃ 及び C H C l₃ で抽出し、エタノール沈澱させ、T E 緩衝液 1 0 0 μ l 中に再懸濁さ
せた。n l a I I I R D N A 1 0 μ g を、N d e I / S a l I で処理した p S Y X 2 2

0 . 5 μ g に 1 6 で一晩連結した。連結した D N A を滅菌 - 蒸留水 7 0 μ l を添加して 20
希釈し、その 1 0 μ l を使用して、大腸菌株 E R 2 2 6 7 r e c A 1 (h s d - m

r r - m c r B C) を形質転換し、A p プレートにプレートした。4 8 個の個々の形質転
換細胞を 2 m l L B + A p に接種し、3 7 で一晩振蕩した。プラスミド D N A を製造
し、N d e I 及び S a l I 制限消化により分析した。プラスミドは、正しいサイズの挿入
物を含んでいた。1 個のクローン p (S Y X 2 2) N l a I I I R⁺ (# 4) を使用して

、B L 2 1 (D E 3) (h s d - m r r - m c r B C) [p (S Y X 2 0) N l a I
I I M⁺ , p L y s S] を形質転換し、L B 寒天 + A p (5 0 μ g / m l) 、C m (3 0
μ g / m l) 、K a n (5 0 μ g / m l) 上で形質転換細胞を選択した。プラスミド p L
y s S は、T 7 R N A ポリメラーゼを阻害して T 7 l a c プロモーターからの基底レベ
ルのターゲット遺伝子の発現を減少させるファージ T 7 リゾチームをコードする (S t u
d i e r , F . W . , J . M o l . B i o l . 2 1 9 : 3 7 - 4 4 , 1 9 9 1) 。大腸菌 30

株 B L 2 1 (D E 3) (h s d - m r r - m c r B C) [p (S Y X 2 2) N l a I
I I R⁺ , p (S Y X 2 0) N l a I I I M⁺ , p L y s S] を以下のように N l a I I
I エンドヌクレアーゼ産生に関して試験した。富裕なブロス培地 2 0 0 m l + A p (5 0
μ g / m l) 、C m (3 0 μ g / m l) 、K a n (5 0 μ g / m l) に細胞 2 m l を一晩
接種し、K l e t t 7 5 の細胞密度に到達するまで 3 7 で振蕩した。I P T G インデ
ューサーを培地に添加し、終濃度 0 . 5 m M とした。細胞を 2 時間誘導し、K l e t t

1 7 5 で収穫した。細胞を、4 、5 0 0 0 × g で 1 5 分間遠心分離することによりペレ
ット化し、超音波緩衝液 (1 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 8 , 1 0 m M - メ
ルカプトエタノール) 2 0 m l に再懸濁させ、3 0 秒間 1 0 回氷上で超音波にかけた。細
胞片を 4 1 5 0 0 0 × g で 3 0 分間遠心分離して除去した。上清を新しい管に移し、超 40
音波緩衝液中 1 0¹、1 0²、1 0³ 及び 1 0⁴ 倍に希釈し、希釈した抽出物 5 μ l を使
用して、全容量 3 0 μ l の 1 × N l a I I I 制限緩衝液中 D N A 1 μ g を切断した。

3 7 で 1 時間消化後、停止溶液 3 μ l を添加して反応を停止し、アガロースゲル電気泳
動により D N A を分析した。細胞抽出物 1 0³ 倍希釈で完全に消化できたことが知見され
た。このクローンは湿潤細胞 1 g 当たり N l a I I I エンドヌクレアーゼ 2 × 1 0⁶ 単位
を生成した。非誘導条件下で生長時に N l a I I I 過剰産生株を N l a I I I エンドヌク
レアーゼ産生に関して分析すると、細胞抽出物は、湿潤未誘発細胞 1 g 当たりたったの 1
0 0 0 単位しか含んでいなかった。従って、誘導比は 2 0 0 0 倍である。高レベルの誘発
及び低基底レベル発現を特徴とする本発明の発現系は、例えば大腸菌に於ける制限エンド
ヌクレアーゼ遺伝子などの毒性遺伝子の発現に対して非常に有用な発現系である。 50

【0064】

3. NlaIIIエンドヌクレアーゼの精製：1リットルの培養物からの細胞約5gを超音波緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.8, 10mM -メルカプトエタノール)75mlに再懸濁させ、超音波処理した。細胞片を15000×gで30分間遠心分離して除去し、10%グリセロールを添加して、上清を-70で凍結した。融解時、KClを添加して終濃度0.2Mとし、細胞抽出物をホスホセルロースカラム(2.5×7cm)に載置した。次いで、塩勾配液(0.2M~2M KCl)を適用し、画分を収集して、NlaIIIエンドヌクレアーゼ活性に関して分析した。NlaIII活性を有するこれらの画分をプールした。BSA 200μg/mlを添加後、これらを緩衝液(10mM KPO₄, pH7, 10mM -メルカプトエタノール, 0.1mM EDTA, 0.3M NaCl, 10%グリセロール)で平衡化させたヒドロキシアパタイトカラムに載置した。酵素をホスフェート勾配液10mM~0.7M KPO₄で溶離した。NlaIIIエンドヌクレアーゼを含む画分をプールし、緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM -メルカプトエタノール, 0.1mM EDTA, 50mM NaCl及び10%グリセロール)で透析した。BSA 200μg/mlをプールしておいた酵素に再び添加して、これをDEAEセファロースカラム(2.5×4.5cm)に適用した。酵素を流し、ヒドロキシアパタイトカラムにすぐに適用した。酵素をホスホネート勾配液10mM~0.7M KPO₄で溶離した。NlaIIIエンドヌクレアーゼを有する画分をプールし、貯蔵緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1mM EDTA, 1mM ジチオスレイトール, 0.2M KCl, 50%グリセロール)で透析し、-70で貯蔵した。上記精製法により、総収量400,000単位のNlaIIIが得られた。精製したNlaIIIエンドヌクレアーゼをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。明らかに分子量27000ダルトンを有するNlaIIIエンドヌクレアーゼ蛋白質は少なくとも90%の純度であった(図5.注：68000ダルトンBSA蛋白質は、汚染蛋白質ではない。これをエンドヌクレアーゼを安定化するためにNlaIII調製物に添加した。)

10

20

【0065】

この精製法から得られたNlaIIIエンドヌクレアーゼは実質的に純粋で、非特異的なエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼを含んでいなかった。NlaIII制限エンドヌクレアーゼ製剤の純度は、以下の基準に従ってチェックした。

30

【0066】

1) 連結：精製酵素で xDNAを20倍過剰消化(20-fold overdigestion)した後、産生したDNAフラグメント95%以上をT4DNAリガーゼで連結した。この3個の連結したフラグメントの内、95%はNlaIIIで再切断可能であった。

【0067】

2) 長時間の消化：x174 DNA 1μg及び酵素200単位を含む50μl反応液を16時間インキュベーション後、酵素1単位で1時間実施した反応と同一のDNAバンドが生じた。

【0068】

3) エキソヌクレアーゼ活性：超音波処理した³H DNA 1μg(10⁵cpm/μg)を含む50μl反応液中で、酵素200単位を37で4時間インキュベーション後、0.21%の放射能が放出した。全試験は以下の反応緩衝液中で実施した：50mM 酢酸カリウム, 20mM Tris-酢酸塩, 10mM 酢酸マグネシウム, 1mM ジチオスレイトール。

40

【0069】

実施例3

1. pSYX20ベクターへのメチラーゼ遺伝子のクローニング：プラスミドpSYX20は、Kan^r及びTc^r遺伝子並びにpSC101複製開始点を保持する中コピー数プラスミドである。Tc^r遺伝子に挿入されたメチラーゼ遺伝子は、Tcプロモーターから

50

構成的に発現し得る。pSYX20の構築は、実施例2に詳しく記載済みである。あるいは、ColEI及びp15Aと適合性である任意のプラスミドベクター、好ましくは、中コピー数ベクターは、メチラーゼ遺伝子のクローニングにも使用し得る。また、バクテリオファージベクターを使用して、メチラーゼ遺伝子をクローニングし、宿主DNA修飾のために大腸菌宿主染色体に組み込むことも可能である。所望の制限部位を備えた2個のプライマーを使用して、プラスミドからまたはゲノムDNAからポリメラーゼ連鎖反応によりメチラーゼ遺伝子を増幅し得る。効率的なリボソーム結合部位、例えば、GGAGGTは、ATG開始コドンので7~10bp上流のプライマー中に作成し得る。ポリメラーゼ連鎖反応条件は、通常、95 で1分間、50 で2分間、72 で1~2分間である。PCR産物をフェノール-CHCl₃で2回、CHCl₃で2回抽出し、エタノール沈澱させ、TE緩衝液に再懸濁させた。制限消化した後、DNAをフェノール-CHCl₃及びCHCl₃で抽出し、エタノール沈澱させ、TE緩衝液に再懸濁させた。ベクターDNA pSYX20を同一制限エンドヌクレアーゼで切断し、フェノール-CHCl₃及びCHCl₃で抽出し、エタノール沈澱させ、TE緩衝液に再懸濁させた。pSYX20ベクターDNA及びメチラーゼ遺伝子を含むDNAを、1x連結緩衝液中で16で一晩連結した。連結したDNAを必要により滅菌-蒸留水を添加して希釈し得、DNA画分を使用して大腸菌細胞(mcrA⁻, mcrBC⁻, hsd⁻, mrr⁻)を形質転換し、次いでKan(50 µl/ml)プレートにプレートした。Kan^r形質転換細胞をプラスミドDNAのミニプレパレーション及び制限消化により正しいサイズの挿入物に関してスクリーニングした。正しいサイズの挿入物を有するプラスミドを、完全な修飾を確認するために同種のエンドヌクレアーゼでチャレンジした。プラスミドを含むメチラーゼ遺伝子を使用して、例えばBL21(DE3)(hsd-mrr-mcrBC)[pLysS]細胞を形質転換し、LB寒天プレート+Cm 30 µg/ml、Kan 50 µg/mlにプレートした。Cm^r及びKan^r形質転換細胞が得られ、これを対応するエンドヌクレアーゼの発現用宿主として使用した。あるいは、無傷のメチラーゼ遺伝子を含む制限フラグメントを、制限部位(AatII, EcoRI, ClaI/BspDI, EcoRV, BamHI, SphI, SalI, PshAI, EagI, NruI, BspMI, SmaIまたはXhoI)を使用してpSYX20に直接クローニングし得る。

【0070】

2. 発現ベクターpSYX20への制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のクローニング：発現ベクターpSYX20は、T7lacプロモーター、T7lacプロモーターの上流のrrmB転写ターミネーター、lacI^q遺伝子、翻訳融合クローニング用に2個の制限部位(NdeI及びSalI)を含む。pSYX20の構築については実施例1に記載済みである。あるいは、pSYX22の誘導体は、挿入物クローニング用にNcoI、SphI、BspHIまたはAflIII制限部位を含むように構築し得る。2個のプライマーは、第1のプライマーがエンドヌクレアーゼ遺伝子の開始部分にアニールされたNdeI部位及びエンドヌクレアーゼ遺伝子の末端に相補的である第2のプライマー中に作成されたSalI部位を含むように設計し得る。エンドヌクレアーゼ遺伝子は、熱安定性のDNAポリメラーゼ、例えばVent(登録商標)でPCRによりゲノムDNAまたはプラスミドクローンから増幅し得る(95 1分間、50 2分間、72 1~2分間、20~30サイクル)。PCR産物を、フェノール-CHCl₃及びCHCl₃で抽出し、エタノール沈澱させ、NdeI及びSalIで切断した。DNAを再びフェノール-CHCl₃及びCHCl₃で抽出し、エタノール沈澱させ、TE緩衝液に再懸濁させた。エンドヌクレアーゼ遺伝子を含むDNAをNdeI/SalIで処理したpSYX22に16で一晩連結し得る。連結したDNAを滅菌-蒸留水を添加して希釈し、この一部を使用して大腸菌細胞を形質転換し、Apプレートにプレートした。個々の形質転換細胞をLB+Ap 2 mlに接種し、37で一晩振蕩した。プラスミドDNAを製造し、NdeI及びSalI制限消化により分析し得る。あるいは、所望のエンドヌクレアーゼ遺伝子を含む制限フラグメントを、pSYX22発現ベクターのT7lacプロモーターの下流に直接クローニングし得る。正しいサイズの挿入物を含むプラスミドを使用して、例えばBL21

(DE3) (hsd - mrr - mcrBC) [p (SYX20) メチラーゼ⁺ , p LysS] 細胞を形質転換し、LB寒天プレート + Ap (50 μ g / ml)、Cm (30 μ g / ml)、Kan (50 μ g / ml) にプレートした。大腸菌株 BL21 (DE3) (hsd - mrr - mcrBC) [p (SYX22) R⁺ , p (SYX20) M⁺ , p LysS] を以下の如くエンドヌクレアーゼ産生に関して試験し得る。富裕ブロス培地 200 ~ 1000 ml + Ap (50 μ g / ml)、Cm (30 μ g / ml)、Kan (50 μ g / ml) に一晩増殖した細胞 2 ml を接種し、Klett 75 ~ 100 の細胞密度になるまで 37 で振蕩し得る。IPTG インデューサー (終濃度 0.5 mM) を培養物に添加し得る。この細胞を 2 ~ 14 時間誘導して収穫した。細胞を 4、5000 \times g で 15 分間遠心分離してペレット化し、超音波緩衝液 (10 mM Tris - HCl , pH 7.8 , 10 mM -メルカプトエタノール) に再懸濁させ、氷上で完全に細胞が溶解するまで超音波処理した。細胞片を 4 15000 \times g で 30 分間遠心分離して除去した。上清を新しい管に移し、超音波緩衝液で希釈し、希釈抽出液 1 ~ 10 μ l を使用して、1 \times 制限緩衝液中で DNA または任意の基質 DNA 1 μ g を切断し得る。37 で 1 時間消化後、反応を停止溶液を添加して停止し、アガロースゲル電気泳動で DNA 分析した。エンドヌクレアーゼの収量は、湿潤誘導細胞の 1 g 当たりで評価した。所望の制限エンドヌクレアーゼをイオン交換カラム、ゲル濾過またはアフィニティーカラムで精製し得る。精製した制限エンドヌクレアーゼを SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し得る。

10

【図面の簡単な説明】

20

【図 1】AatII 制限エンドヌクレアーゼをクローニング及び産生するためのスキームを示す図である。

【図 2 A】aatIIM 遺伝子の DNA 配列及びそのコードされた蛋白質配列を示す図である。

【図 2 B】aatIIM 遺伝子の DNA 配列及びそのコードされた蛋白質配列を示す図である。

【図 3 A】aatIIR 遺伝子の DNA 配列及びそのコードされた蛋白質配列を示す図である。

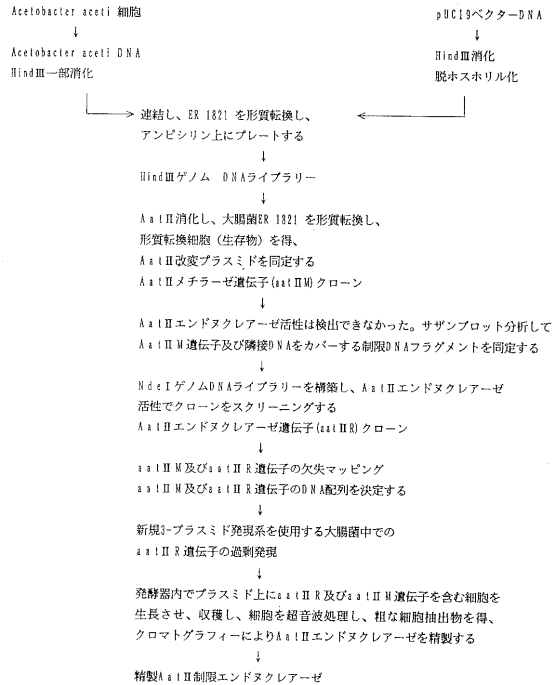
【図 3 B】aatIIR 遺伝子の DNA 配列及びそのコードされた蛋白質配列を示す図である。

30

【図 4】IPTG - 誘導及び未誘導細胞抽出物及び精製 AatII エンドヌクレアーゼ蛋白質を示す電気泳動写真である。矢印 A 及び B は、各々 AatII エンドヌクレアーゼ蛋白質及びウシ血清アルブミン (BSA) を示す。

【図 5】IPTG - 誘導及び未誘導細胞抽出物及び精製 NlaIII エンドヌクレアーゼ蛋白質を示す電気泳動写真である。矢印 A 及び B は、各々 NlaIII エンドヌクレアーゼ蛋白質及びウシ血清アルブミン (BSA) を示す。

【 図 1 】



【 図 2 A 】

	ATGACCGGTCGTGGCGACGAAAGAACAAAGACGAAATCAATCAAAAGTCATGGAG	58
	TACTGGGACGAGCGGTGGTTTTGGTTGTTTGGCTTTAGTTAGTTTGAGTACCTG	
	MetThrAlaArgProGlnGlnLysGlnThrLysLysSerAsnGlnIAsnSerTrpLys	
81	AGTAATTTAGAGAAAGCATATCTCAACGTGGCAAGATTAGAGAAATGGGTGTCAG	128
	TCATTAAATGTTTTCGTATAGAAAGTTGGACGGTTTGTATAATGTTTACCAAGCTG	
	SerAsnLeuGlnGluLysGlnIleSerSerThrTrpGlnLysAspIleArgGluIleGlyAspGln	
121	CGGGGATCACAATTTTCAAATGGCACACGTACGTTTGTGATGACATCAATTCCTTTA	168
	GGCGCTAGTGTAGAAAGTTTAGGGTGTTGGATGCAAGAAGCTACTGGTTAAGTAAGAAT	
	ArgArgSerHisLauSerAsnArgThrThrTrpValLeuAspAspAlaGlnHisIlePheLeu	
181	TCAGAGGTTGGCGAAAGTCATGCCATGCGTTTGGTTCAGGTCCTGGTATGGGCTAATT	240
	AGTGTGAGAGGAGTTTGGATAGTACGACACCAATGGCTAGGAGGAGGCTACGTCAGTA	
	SerGlnLeuLeuProProAsnSerIleHisAlaValValThrAspProProTrpGlyValIle	
241	GAGTATGAAGACAAACACCCAGAAAAITGGCGTTTGGCGGGGGGGGGTGTGGCGAATT	300
	CTCATCTGTTTGTGTTGGTGGTTTAAAGCGAGCGCGCGCGCGCGCGAGCGGGTTAA	
	GlyTrpGlnAspLysHisAlaGlnLysLeuArgSerGlyArgGlyValTrpArgIle	
361	CCTCGTCTCATTGACGGTGTGAAGCGTAGCCGTGCCGGGCTTCACGGTGCTTTGTGAA	360
	GGAGGAAGTAAATGGCAGCTTGCATGGCGAGAGGGCGGAGTGGCGACAAAGACTT	
	ProProGlnPheAspGlyValLysArgSerProLeuPheArgPheThrValLeuSerGlu	
381	GATGAATTAAGAAGATTAAACAGCTTTTTTGGTGTATAGCTACGGTTTACACCGGGCG	420
	GTACTTAATTTGTGTAAATCGTGGAAAAAAGACGAAATCGGATGGCAATGTGGCGGG	
	AspGlnLeuAsnArgLeuSerSerPhePheSerAlaLeuAlaTrpGlyLeuHisArgAla	
421	GTGTTCGCTGGCGGCATGTTTTCATCGGCGCGCAACGTTTGGTATGCTCAATGGTGTTC	
	GAACAGTAAGGTGTACCAAAATACCGCGGTTGGGAAGAATAGAGATTACACAGAG	
	LeuValIleProGlyGlyHisValPheMetAlaAlaGlnProLeuLeuLeuSerSerMetValPhe	
481	CATGGTTTCCAGACGGCTGGTTTTGAGAAAGCAGGTGAAGTATTGGCTTATGTCACAAAC	540
	GTACGAAAGGTTGTGGGACGAAACCTTTTGTGCGACTTCATTAAGCCAAATCATGTTTGG	
	HisAlaPheGlnThrAlaGlyPheGlnGlyGlyGlyValGluValIleArgLeuGlnIleThr	
541	GTGGCGGGCGGGTGACCGACCAAAAGGACGACGAGAAGAGTTTCCGACGTGTCATGATG	580
	GAGCGCGCGCACTGGGTGGTTTTGGCTGGTTTGTGTTGTTGTAAGAGGCTGAGAGGTA	
	LeuArgGlyGlyAspArgProLysGlyAlaGlnGlyLysGlnLeuSerAspValSerMetGln	
601	GCTCGAAGCTGTTGGGAACCATGGGGCATGTTCCGTAACCGTTCAGGTGCTCGCATCC	560
	CGAGCTTCGCACACGGCTGGTACCGGCTACAAGGCAATGGCACTGACGAGCAGATAGG	
	AlaArgSerCysTrpGluValTrpGlnGlnGlnArgLysProPheGlnGlnGlyProAlaGln	

Figure 2A

【 図 2 B 】

681 ACCAACGCTACGCACATGGGGAACGGGGCTCTGGGGCATTCTGTATCTAGCGCGTTC
TGGTTGGATCGGCTGTACCGCTTGTCCGGCAGAACGGCGGCTAGAGACTATAGCTCGGCAG
ThrAsnLeuArgThrTrpGlyThrGlyGlyLeuArgArgIleGlnSerThrGluProPhe
721 AAAGATGTAAATTCTCTGTCCACGACGAGGTGGTGAAGCTGAAATTCGCACACATCGG
TTTCTACATTAAAGACAGGTGGCTGGTCTCCACAGCTTTGCACCTTAAGGTGGTGTAGGC
ValAspValIleLeuGlySerProThrArgGlyArgGlyGlyIleIleGlyProIlePro
761 TCATTGAACACACAGGTTTGTAAAGCAGCTGGTGGCTGGCGTACCGCTACGGAT
ACTAACTTTGGTGTCCGAAAAATTCGGCTGCACGCGACGCTCGGAATTCGGCTGTAA
SerLeuLeuProGlnArgPheLeuArgGlyValValArgAlaIleLeuProLeuGlyIle
801 GGGATTATCTACGACCGGCTTGGCTGGTACGGCTTCCACGCTCGCAGCAGCAAGCGGAA
CGGTAATAGATGGTGGGGAACAGCAGCTGGCAAGCGTGGGAGGCTGGCTGGCTTTCGGAA
GlyIleIleIleThrAspProPheAlaGlySerGlySerThrLeuAlaIleAlaIleVal
841 GGGTATCGTGGTATCGGCGACAGATAGAGACGGCTCAATACTTTGGGATTGGACCAAAAGG
CGGATAGCAGCATAGCGGTGTCTATCTGTCCGAGTATTGAACCGCTAAGCTGTGTTTGGG
GlyThrArgAlaIleGlyThrAspAspAlaGlnThrPheGlyIleGlyThrLeuAla
881 TTTTCATCTCTTTCACACTCTGGATTCACCAAAATGA
AAAGTATGCAAAAGGTGTAGCACTATAGTTGTTTACT
PheSerSerLeuSerThrLeuAspIleAsnLeuIle
921

Figure 2B

【 図 3 A 】

	ATGAAATCGACAGCAAGTATTTTCAGACATTTCAGCGTGCGTTTTTTTGGAGAAAAATTTACT	60
	TACTTAGGTGTGGCTGTCAATAAGGTGTGAAGTCGGCAGCAAAAAAGCTTTTATTAATGA MetAsnProAspGluValIlePheSerAspPheGlnArgGlyIlePheGlyArgLysPheThr	
81	GCGTGGCGTTCGTGTGCTGATTCAGTTAAATGTGTGAAATTAGAAACTCGAAAAGTTGGC	120
	CGACGGCGAAGCAGGCAAGTAAGTAAGTCAATACAGACGTTAAATGTTTGTAGGTTTGAACCG AlaGlyLeuLeuValSerPheIleAspLeuMetSerGlyLeuGluThrProLysLeuGly	
121	ATTGGGGAATGTGTGGGTTCTCAAAGATTCGCCAAGCAACTAAAAATAGCGCAGGG	180
	TAAAGCGTTAAAGTACCGAAGAGTTTCGATAAGGGTTCTGTGTGATTTTGTATCGGCTGCC IleAlaCaspPheAspGlyIlePheLeuLysAlaPheProArgGlnLeuLysThrSerAlaGly	
181	AAAGCGCGCTAATACGTTCTAAATTGTAGAAAAGAAGATGGGAAAAATCTTCTCTAAGAAG	240
	TTTGGCGGATATTGGAATTAAGATGTTTTTTGTACGGTTCTGTGTAAAGAAGATTTCTTC LysArgAlaasnThrLeuLysIleValGluLysGluAspGlyLysThrIleSerLeuArgLys	
241	TTGTATAATTGCATTGAAAAATTTTACGGCGGTGAGGAGCAACGGTTCGATTTCGGAGG	300
	AGGATATAAGGTAACTTTTAAAAAGCGCGCACTCGTTTCTGGGAGCAATAAGGTCGG PheThrAsnSerIleGluLysPheThrArgGlnGluLysArgPheAspPheProSer	
301	GCGGCTCGCCCATCGCAGCCAAAGCGTGGGCTGATTATAAACTTTGGGTTGATGCATTTGTA	360
	CGCGGAGAGGTCAGCGGGTCTGGCAGCGCACTAAATTTTGAACGGCAACACTGCGAAGCAT AlaAlaProIleAlaThrGlnAlaThrAlaTrpAlaAspTyrLysThrTrpAlaAspAlaLeuVal	
361	ACCTTTCTCGGAAAGCAACTTGGAGAAATACGTCGGGCGGTTAAACCAATTGTGTATGAG	420
	TGAAGAGGCGTTTGTGTGAACCTGTTAATCGACCGCGCAATTGGTTAAACAGAAATCTG GlnGlnSerGluGluGlnLeuGlyGluLeuArgAlaAsnGlyIlePheValLeuAsp	
421	ACCGTAAAAGCGCAGAATTTTGAATCGCAATTCGGTAAAGATAGAAGCTGATTATTTCCG	480
	TGGGATTTTTCGGTTCTTAAAGTAACTGTGAAGCAATTTCATCTTGGAGGTAATAAAGCG ThrLeuLysSerGlnGluPheAspProThrSerValLysValGluProProLeuPheArg	
481	ATTCTTGTAGAAAAAATTCGAAATGACCGCCGCAAAAAGCGCAGCGTACAGGGGCTTTCTTC	540
	TAAAGAAGCTTTTAAAGCTTTACGTGGGGGTTTCTTCGGTGAGTGTGCTCCGCAAGAAG IleLeuLysGluLysPheGluMetThrAlaGlnLysLysGluProThrGlyAlaSerPhe	
541	CAAGGAATAGTGTTTGGATTGTCGAGCGCGACAACTCCTCATTTCTCAAAATGAAAATGCAC	600
	GTTCCGTTATCGAAGAACTAAGAAGAGTCGGGCTGTAGGATAGAGTAAATTTAACTTAGGTG GlnGlyIleValPhePheGlyPheLeuArgAlaAspAsnProIleLeuGlnIleGluIleAsp	
601	AAAGTCGCGACTGGGTCGAAAGCACTGCAGCGCATCGGTGATGTGCGATGGATGGGAAGGA	660
	TTTCAGGCGTCGACGGAGGTTTGTGCGATCGGGTAGGCCATACAGAGCTAGCTGACGTTCTG LysValArgThrGlySerLysArgLeuAlaGlnIleGlyIleAspValAspGlyTrpGluIleGly	

Figure 3A

【 図 3 B 】

```

661 GAACGATTAGCTATCTCCGCTGAAGTAAACAAATATGAAATAAATCTGAATCAATAGAT
CTTGCTAATCGATAGAGGGAGTTCATTTTGTATAGTTTATTTATAGCTTAGTTATCTA
GluArgLeuAlaIleSerAlaGluValLysGlnTyrGluIleAsnThrGluSerIleAsp
721 GACGTTGCTGATTTTCCCAACAGGAGTGGTCAGCGTGGCGGTTGGGGTTATTCCAGCA
CTGGAACGAGTAAACGGTTTGTGTCGACGAGTGGACGCGGCAACCGCAATACGCTGCT
AspLeuAlaGspPheAlaGlnArgThrGlyGlnArgGlyAlaLeuGlyValIleAlaAla
781 TTGAGTTTTAGCGAAGAAGCAAAACCACTTCTAGAAAACATGGGAGTAATAGGTCGAC
AACTCAAAATCGCTTCTGCTTTTGGTGAAGATCTTTTGTACGCTGATTATCGAGAGTG
LeuSerPheSerGluGluAlaLysProLeuLeuGluAsnMetGlyLeuIleAlaLeuAsp
841 AAAGAAGGTATGCTTAAATTTGTGCAATTATGGCATCCAGTGAACAAAGAACCGAGTT
TTTCTTCATACGAAITTTAACAGCTTAATACGCTAGGTGACTTTGTTCTTGGCGTCAA
LysGluGlyMetLeuLysIleValGluLeuTrpAspProValLysGlnArgThrAlaVal
901 AGCTGTTTCATTTACTATGCAACCATGTGCGACAAAAATTCAGTTTGGCGCGCGTCTT
TGGAGAAAGTAAATGATACGTTGGGTACAGCTCTTTTAAAGTCAAACTCGCGGCGAGAA
SerSerPheIleTyrThrAlaThrIleValGluLysAsnSerSerLeuSerAlaArgLeu
961 AACATTTTCCTTGAAGCTTGTGCTTGTGAATGGGCTGAGCAGCGCAAGCAGCAATTGTC
TTGTAAAAGCAACTCGAAGAGCAAGACTTACCGAGCTGTCGCGGTTGCTGTTAAGAG
AsnIlePheLeuGluAlaSerAlaSerGluTrpAlaGluGlnArgGlnAlaAlaIleLeu
1021 CCACAATCAGAAATCGTAA
GGTGTAGTCTTAGGATT
ProGlnSerGluSerEnd
1038

```

Figure 3B

【 図 4 】

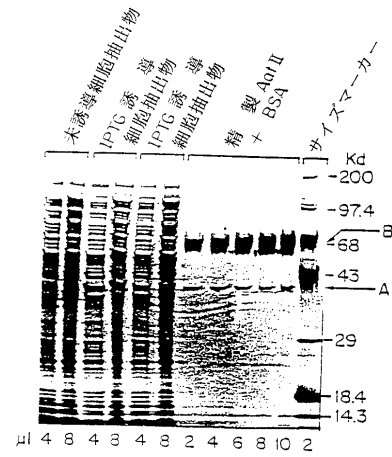


Figure 4

【 図 5 】

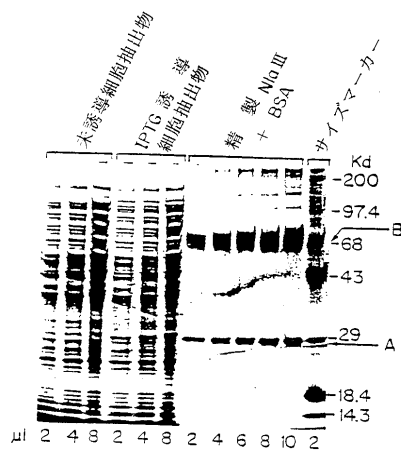


Figure 5

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I
C 1 2 R 1:19)	C 1 2 R 1:02
(C 1 2 N 9/16	C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)	C 1 2 R 1:19
(C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 9/16
C 1 2 R 1:02)	C 1 2 R 1:19

(72)発明者 ドナルド・オー・ヌワンコー
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01960、ピーボディ、フォスター・ストリート・111

審査官 高 美葉子

(56)参考文献 特開昭61-067483(JP,A)
 国際公開第91/18916(WO,A1)
 特開平04-293489(JP,A)
 特開平04-211378(JP,A)
 特開平03-224488(JP,A)
 Nucleic Acids Res(1982),Vol.10,No.19,p.5747-5752
 Agric Biol Chem.(1990),Vol.54,No.12,3319-3325
 Gene(1988),Vol.74,No.1,p.25-32