

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5804601号
(P5804601)

(45) 発行日 平成27年11月4日(2015.11.4)

(24) 登録日 平成27年9月11日(2015.9.11)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 1/13 (2006.01) C 1 2 N 1/13

請求項の数 3 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2012-500578 (P2012-500578)	(73) 特許権者	504174180 国立大学法人高知大学 高知県高知市曙町二丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成23年2月10日(2011.2.10)	(73) 特許権者	501168814 国立研究開発法人水産総合研究センター 神奈川県横浜市西区みなとみらい二丁目3番3号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/052924	(74) 代理人	100075409 弁理士 植木 久一
(87) 国際公開番号	W02011/102301	(74) 代理人	100129757 弁理士 植木 久彦
(87) 国際公開日	平成23年8月25日(2011.8.25)	(74) 代理人	100115082 弁理士 菅河 忠志
審査請求日	平成26年2月10日(2014.2.10)	(74) 代理人	100125243 弁理士 伊藤 浩彰
(31) 優先権主張番号	特願2010-32633 (P2010-32633)		
(32) 優先日	平成22年2月17日(2010.2.17)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 藻類を形質転換するために用いられる新規プロモーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(1)~(3)の何れかの構造を有することを特徴とするプロモーター。

(1) 配列番号1の塩基配列を有するポリヌクレオチド

(2) 上記ポリヌクレオチド(1)の1以上、10以下のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

(3) 上記ポリヌクレオチド(1)の配列と95%以上の相同性を有し、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

【請求項2】

請求項1に記載のプロモーター、および任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有することを特徴とするベクター。

【請求項3】

請求項2に記載のベクターを調製する工程；および
上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程；
を含むことを特徴とする藻類の形質転換方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、藻類を形質転換するために用いられる新規のプロモーター、当該プロモータ

ーを含むベクター、および当該ベクターを用いる藻類の形質転換方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

恒久的かつ安定的なエネルギー源である太陽光を利用することは、エネルギー対策を考える上で非常に重要である。植物類による光合成は、太陽光エネルギーを最も効率的に化学エネルギーへ変換できる優れたシステムであり、環境中の二酸化炭素や過剰栄養塩を吸収同化する上に、酸素も放出する。よって植物を利用する技術の開発は、エネルギー問題を解決し得るものとして期待されているところである。

【0003】

植物類の中でも藻類は、多量に存在する海水および淡水中に生息することからその量は莫大なものであり、また、著しい光合成能を有する。さらに、藻類の中には不飽和脂肪酸や抗腫瘍化合物などの有用化合物を生産するものがある。また、珪藻類の中には有用な無機物を生産するものがあるので、珪藻類によるバイオミネラルゼーションという技術が注目されている。このように、藻類は有用資源として重要な生物といえる。

【0004】

一般的に、生物を産業で利用する場合には、有用な遺伝子を導入する形質転換技術が用いられる。この形質転換技術は、遺伝子の機能を解明すべく、特定遺伝子をノックアウトしたりその働きを抑制したりするためにも用いられる。

【0005】

これまでに、珪藻や緑藻を中心として藻類の形質転換が行われている。しかし、かかる方法は内在性のプロモーターを分離し、それに遺伝子を結合させて藻類に導入するものであった。それでは、内在性プロモーターの分離に多大な労力と時間がかかるために、決して効率的なものではなかった。また、藻類、とりわけ海産藻類の形質転換効率自体が極めて低いという問題もある。

【0006】

一方、藻類以外の植物や動物の形質転換では、内在性のプロモーターではなく、ウィルス由来のプロモーターが汎用されている。例えば、アブラナ科植物に感染するカリフラワーモザイクウィルス(CaMV)より分離されたCaMV 35Sプロモーターが、アブラナ科植物に限定されず幅広い植物の形質転換に利用されている。また、動物細胞の形質転換には、サイトメガロウィルス(CMV)より分離されたCMVプロモーターや、シアンウィルス40(SV40)より分離されたSV40プロモーターが広く利用されている。

【0007】

それに対して、藻類の形質転換においては、外来性のウィルスプロモーターが用いられた例はほとんど知られていない。

【0008】

例えば非特許文献1には、CaMV 35Sプロモーターを用いて珪藻*Cyclotella cryptica*を形質転換した実験例が記載されているが、形質転換体は得られなかったとされている。

【0009】

一方、非特許文献2には、CMVプロモーター、CaMV 35Sプロモーターおよびラウス肉腫ウィルス(RSV)プロモーターを用いて珪藻*Phaeodactylum tricornutum*へGUS遺伝子を導入したところ、いずれの場合もGUS(-グルクロニダーゼ)が発現したことが記載されている。

【0010】

さらに非特許文献3には、CaMV 35Sプロモーターを用いて渦鞭毛藻*Amphidinium*と*Symbiodinium*へGUS遺伝子を導入したところ、GUSが発現したことが記載されている。しかし他文献(非特許文献4)によれば、懸命の努力にもかかわらず、他のグループが渦鞭毛藻類の形質転換に成功したとの報告はされていないとのことである。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Dunahay, T.G.ら, Journal of Phycology (ジャーナル・オブ・ファイコロジー), vol.31, pp.1004-1012 (1995)

【非特許文献2】Sakaue, Kら, Physiologia plantarum (フィジオロギア・プランタラム), vol.133, pp.59-67 (2008)

【非特許文献3】Lohuis, M.R.ら, The Plant Journal (ザ・プラント・ジャーナル), vol.13, pp.427-435 (1998)

【非特許文献4】Walker, T.L.ら, Journal of Phycology (ジャーナル・オブ・ファイコロジー), vol.41, pp.1077-1093 (2005)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

上述したように、その数は極めて少ないものの、カリフラワーモザイクウイルスに由来するCaMV35Sプロモーターなどのウィルスプロモーターを用いて藻類を形質転換した報告例はある。

【0013】

しかし、形質転換体が得られなかったり再現性が無いという報告もある。また、一般的に、藻類、とりわけ海産藻類の形質転換効率は非常に低いことから、高効率な形質転換技術の開発が切望されている。

20

【0014】

そこで本発明が解決すべき課題は、効率の高い形質転換技術、具体的には、藻類を形質転換するために用いられる高効率のプロモーター、当該プロモーターを含むベクター、および当該ベクターを用いる藻類の形質転換方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。その結果、Chaetoceros cf. lorenzianus DNAウイルス(ClorDNAウイルス)の構造タンパク質をコードすると考えられる遺伝子上流に位置するプロモーターが、藻類を極めて効率的に形質転換できることを見出して、本発明を完成した。

30

【0016】

本発明に係る新規プロモーターは、下記(1)~(3)の何れかの塩基配列を有することを特徴とする。

【0017】

下記(1)~(3)の何れかの構造を有することを特徴とするプロモーター。

(1) ClorDNAウイルスの構造タンパク質をコードする遺伝子上流に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド

(2) 上記ポリヌクレオチド(1)の1または複数のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

40

(3) 上記ポリヌクレオチド(1)の配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

【0018】

本発明に係るベクターは、上記新規プロモーター、および任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有することを特徴とする。

【0019】

また、本発明に係る藻類の形質転換方法は、上記ベクターを調製する工程；および、上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程を含むことを特徴とする。

50

【発明の効果】

【0020】

本発明に係るプロモーターを含むベクターを用いれば、藻類を効率的に形質転換し得る。よって、高い光合成能を有し、有用物質の産生能を示すなど優れた特性を有する上に、多量に存在するものでありながら、形質転換が難しくこれまで十分にその技術が検討されていなかった藻類を、本発明により形質転換することにより、有用物質の大量生産が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明に係るプロモーターを含むプラスミドベクターの構造の一例を示す図である。 10

【図2】本発明に係るプロモーターの比較対照であるプラスミドベクターの構造を示す図である。図2(1)は*T. pseudonana*のfcpプロモーターを含むプラスミドベクターの構造を示し、図2(2)はプロモーターを有さないプラスミドベクターの構造を示す。

【図3】本発明方法により形質転換された藻類細胞等に含まれる導入遺伝子の有無の確認実験の結果を示す電気泳動写真である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明に係る第一のプロモーターは、(1)ClorDNAウィルスの構造タンパク質をコードする遺伝子上流に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド、を有する。 20

【0023】

ClorDNAウィルスは、珪藻*Chaetoceros cf. lorenzianus*に感染するウィルスである。これまで藻類、とりわけ海産藻類に対して感染性を示すウィルスの報告例は少なかったが、近年、本発明者らは、ラフィド藻、渦鞭毛藻、珪藻などの藻類から様々なウィルスの分離に成功している。本発明に係るClorDNAウィルスは、本発明者らにより分離された海産藻類感染性ウィルスの一つである。

【0024】

構造タンパク質をコードする遺伝子は、ClorDNAウィルスの構造タンパク質の複製に関与するものであり且つ活発に発現するものであれば特に制限されないものとする。 30

【0025】

本発明において、コード領域とはmRNAを経てタンパク質に翻訳される部分をいい、非コード領域とはコード領域以外の部分をいう。即ち、非コード領域は、ATGなどの開始コドンの上流に位置する部分をいい、mRNAに転写されない部分の他、mRNAに転写はされるがタンパク質には翻訳されない部分を含むものとする。

【0026】

一般的に、プロモーターは、転写の鍵を握るCore elementと、転写を促進または抑制するRegulatory elementを有し、遺伝子を導入する際には、特にCore elementを利用することが重要である。Core elementとしては、TATAボックス、イニシエーターエレメント(Inr)、ダウンストリートエレメントなどが知られており、Regulatory elementとしてはCAATボックスやGATAボックスなどが知られている。本発明者らがClorDNAウィルスのORF領域の上流の塩基配列を調べたところ、CAATボックスIである5'-CAAT-3'、TATAボックスである5'-TATAAA-3'、ACGTAボックスである5'-ACGTA-3'および珪藻類のイニシエーターエレメント(Inr)と思われる5'-TCA₊₁TAAA-3'が見られた。これに関連して、本発明者らは、本発明に係るClorDNAウィルスに近縁なウィルスの1種であるCsetDNAウィルスに由来する、上記Inrを含むプロモーターが、中心目珪藻には働かないことを明らかにしている。この点を考慮すると、本発明に係るポリヌクレオチド(1)が高い形質転換能を発揮できる理由としては、上記イニシエーターエレメント等以外の未知の配列がCor 40 50

e l e m e n tとして働いている可能性が高いといえる。

【0027】

上記ポリヌクレオチド(1)としては、配列番号13(SEQ ID NO:13)、配列番号12(SEQ ID NO:12)、配列番号11(SEQ ID NO:11)および配列番号1(SEQ ID NO:1)の塩基配列を有するものを挙げることができる。

【0028】

本発明に係る第二のプロモーターは、(2)上記ポリヌクレオチド(1)の1または複数のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド、である。

10

【0029】

上記ポリヌクレオチド(2)において、欠失、置換または付加されるヌクレオチドの数としては、1以上、200以下が好ましく、1以上、100以下がより好ましく、1以上、70以下がさらに好ましく、1以上、30以下がさらに好ましく、1以上、20以下がさらに好ましく、1以上、10以下がさらに好ましく、1以上、5以下が特に好ましい。

【0030】

本発明に係る第三のプロモーターは、(3)上記ポリヌクレオチド(1)配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド、である。

20

【0031】

上記ポリヌクレオチド(3)において、ストリンジェントな条件とは、0.1% SDSを含む2×SSC中、65℃でハイブリダイズさせた後、0.1×SSC-0.1% SDSで2回洗浄することをいう。

【0032】

上記ポリヌクレオチド(2)および(3)において、任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチドとは、藻類細胞内に導入されることによって、その下流に結合された任意のタンパク質をコードする遺伝子を発現させることができるものをいう。

【0033】

上記ポリヌクレオチド(2)および(3)において、上記ポリヌクレオチド(1)との相同性としては、50%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、80%以上がさらに好ましく、90%以上がさらに好ましく、95%以上がさらに好ましく、98%以上がさらに好ましく、99%以上が特に好ましい。

30

【0034】

上記ポリヌクレオチド(1)~(3)は、Clor DNAウィルスまたはその変異体の構造タンパク質をコードする遺伝子上流から分離することができる。但し、化学的に合成してもよい。これらポリヌクレオチド(1)~(3)は、鋳型からPCRにより増幅して用いることができる。

【0035】

本発明に係るベクターは、上記プロモーターと、任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有する。

40

【0036】

ベクターの種類は、藻類細胞へ導入され得るものであれば特に制限されず、プラスミドベクター、ウィルスベクターの何れも用いることができる。但し、藻類、とりわけ海産藻類に感染するウィルスの研究は十分に進んでいるとはいいいないので、好適にはプラスミドベクターを用いる。

【0037】

ここで「任意のタンパク質」は特に限定されるものではなく、生産の望まれる有用なタンパク質であればよい。

50

【0038】

本発明に係るベクターには、一般的なベクターに含まれるその他の配列を含んでいてもよい。かかる配列としては、例えば、本発明ベクターが導入された藻類を特定するための選択マーカー遺伝子や、藻類細胞で働くターミネーターを挙げることができる。

【0039】

本発明ベクターの調製方法としては、常法を用いることができる。例えば、上記各配列とドナーベクターとを制限酵素で切断した後にアニーリングし、DNAリガーゼにより結合させればよい。或いは、クローゼ反応を利用した簡便な公知方法により、各配列をベクターにクローニングすることも可能である。

【0040】

本発明に係る藻類の形質転換方法は、上記ベクターを調製する工程；および、上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程を含むことを特徴とする。

【0041】

本発明ベクターの調製方法は、上述したとおり、当業者公知の方法を用いることができる。

【0042】

本発明ベクターの藻類細胞への導入方法としては、パーティクルガン法、ガラスビーズ攪拌法、マイクロインジェクション法、アグロバクテリウム法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法などの公知方法を用いることができる。但し、海産藻類の場合、塩濃度の高い培地で増殖せしめる必要があるため、エレクトロポレーション法は適切でない。

【0043】

本発明ベクターにより形質転換された藻類細胞は、導入されている選択マーカー遺伝子に応じた選択培地で培養することにより特定することができる。

【実施例】

【0044】

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

【0045】

実施例1 本発明に係るClorDNAウイルスプロモーターの分離

(1) 海産藻類に感染するウイルスのゲノムDNAの抽出

Tomaru, Y.ら, Aquatic Microbial Ecology, vol.50, pp.103-112 (2008)に記載の方法に従って、中心目珪藻Chaetoceros cf. lorenzianusを宿主とするChaetoceros lorenzianus DNAウイルス(ClorDNAウイルス)からゲノムを抽出した。

【0046】

具体的には、まず、ウイルス液(10mL)を0.22μmフィルター(MILLIPORE社製, Millex-GS, 孔径: 0.22μm)で濾過することにより、藻細胞の破片などを除いた。得られた濾液に40%ポリエチレングリコール6000溶液(Wako社製)を最終濃度が10w/v%となるように加え、4にて一晩静置した。当該液を遠心分離用チューブ(Nalgen社製, UltraBottle Assemblies)に移し、超遠心分離機(BECKMAN社製, Ultracentrifuge L8-70M)を用いて57,000×g、4にて1.5時間遠心分離した後、その上清を除いた。得られた沈殿にリン酸緩衝液(10mMリン酸二水素ナトリウム, 10mMリン酸水素ナトリウム, pH7.2, 5mL)を加え混合することによりウイルス粒子を洗浄した。再度、217,000×g、4にて4時間遠心分離し、同様に上清を除いた後、得られた沈殿を滅菌した精製水(Millipore社製, milliQ(登録商標), 300μL)に溶解した。当該溶液を1.5mL容エッペンドルフチューブに移し、プロテイナーゼKと10%サルコシルを、それぞれ最終濃度が1mg/mLおよび1w/v%となるように加え、55にて1.5時間インキュベート

10

20

30

40

50

した。その後、常法を用いてフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理を行い、得られた上清に、その10分の1量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)を加え、さらにその2.5倍量のエタノールを加えた。当該溶液を-80℃にて1時間静置した。その後、微量高速遠心機(KUBOTA社製, KUBOTA3740)を用いて14,000rpm、4分で10分間遠心分離を行い、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄した後、乾燥させた。これを滅菌milliQ水(20μL)に溶解してDNA溶液を得た。

【0047】

(2) ClorDNAウィルスプロモーターの分離

上記(1)で得たClorDNAウィルスのゲノムDNAの配列情報を、ORF finder (NCBI)を用いて、それに含まれるORFを検索した後、Blast (DDBJ)を用いてデータベースと比較し構造タンパク質のORFを検出した。当該ORF配列の上流における塩基数507の配列を配列番号7 (SEQ ID NO: 7)に示す。配列番号7の3'末端のATGは、当該ORFの開始コドンである。この配列中の翻訳開始点と思われるATG配列の26塩基上流である第482番目の塩基から第9番目の塩基の領域を、CLP2L/attB1プライマー(配列番号2, SEQ ID NO: 2)およびCLP2/attB4プライマー(配列番号3, SEQ ID NO: 3)を用いたPCR反応により増幅させた。なお、配列番号2 (SEQ ID NO: 2)における5~29の塩基配列および配列番号3 (SEQ ID NO: 3)における5~28の塩基配列は、後述するプラスミドの構築のためのBPクローゼ反応に必要なattB配列を示す。また、得られたClorDNAウィルスプロモーターの塩基配列を配列番号1 (SEQ ID NO: 1)に示す。なお、配列番号1の塩基配列における460番目のTは、転写開始点であると考えられる。

【0048】

PCR反応の条件を以下に示す。PCR反応液として、5×バッファー(TaKaRa社製, 5μL)、dNTP Mix (TaKaRa社製, 2μL)、Prime Star HS (TaKaRa社製, 0.25μL, 5U/μL)、ClorDNAウィルスのゲノムDNA (1μL)、および2種のプライマー(10pmol/μL, 各1μL)を混合し、最後に滅菌milliQ水を全量が25μLとなるように添加混合した。次いで、98.0℃で10秒間、40.0℃で30秒間、72.0℃で60秒間のサイクルを30回繰り返す、最後に72.0℃で5分間反応させた。

【0049】

フラグメントの増幅を確認するために電気泳動を行った。電気泳動には、TAEバッファー(トリス酢酸緩衝液)と、アガロースS(ニッポンジーン社製)1.5%ゲルを用いた。電気泳動用試料として、PCR産物各9μLに10×ローディングバッファー(TaKaRa社製)を1μLずつ添加し、混合したものをを用いた。また、DNA分子量マーカーとして100bpラダー(TOYOBO社製, コードNo. DNA-030X, 2μL)を用い、同時に泳動した。また、Mupid電気泳動槽(ADVANCE社製)を用い、100Vの条件下で約30分間泳動した。泳動終了後、臭化エチジウムを用い、定法(Sambrook and Russell 2001)により染色し、紫外線照射下で写真撮影を行った。

【0050】

実施例2 本発明に係るClorDNAウィルスプロモーターを含むベクターの調製

(1) 各エンタークローンプラスミドの調製

上記実施例1で得たClorDNAウィルスプロモーター、導入遺伝子としてノールセオスリシン耐性遺伝子(nat)(Poulsen, N. ら, Journal of Phycology, 42, pp1059-1065. (2006))、およびThlassiosira pseudonanaのfcpターミネーター(Poulsen, N. ら, Journal of Phycology, 42, pp1059-1065. (2006))がそれぞれ導入されたエンタークローンプラスミドベクターを、Multisite Gateway(登録商標) Pro Kit(in vitro gen社製)を用いて調製した。

【0051】

詳しくは、プラスミドの構築のためのクローゼ反応に必要なattB配列を有する、

10

20

30

40

50

上記実施例1で得たClorDNAウィルスプロモーター溶液を、High pure PCR Cleanu
p Micro Kit (Roche社製)を用いて、その取り扱い説明書に従って精製した。次に、当該
溶液(50 fmol)とドナーベクター(invitrogen社製, pDONR2
21 P1-P4, 100 ng/μL)を混合し、当該溶液へ滅菌milliQ水を加え
ることにより計8 μLの混合液とした。なお、当該ドナーベクターは、プラスミドの構築
のためのBPクローゼ反応に必要なattP配列を有する。当該混合液へ、さらにBP
クローゼ(商標)II Enzyme Mix(invitrogen社製, 2 μL)を加えて混合
し、25℃で1時間反応させた。その後、反応液にプロテイナーゼK(invitrog
en社製, 1 μL)を加え、37℃で10分間処理した。当該反応液(2.5 μL)を、
One Shot Mach1 T1(登録商標)chemically competent cells(invitrogen
社製, 25 μL)に混合し、氷上にて30分間静置した。その後、42℃にて30秒間ヒ
ートショック処理を行い、直ちに氷上に移し、2分間静置した。次いで、SOC(inv
itrogen社製, 250 mL)を加え、37℃にて1.5時間振とう培養した。培養
した菌液(275 μL)を、50 μg/mLカナマイシンを含むLB寒天培地(1%トリ
プトン, 0.5%イーストエクストラクト, 1%NaCl, 1.5%アガー)に塗抹した
。当該培地をマルチシェーカーオープン(タイテック社製)内で37℃にて一晩(10時
間程度)倒置培養した。得られたコロニーは、白金耳を用いてLB液体培地(10 mL)
に接種し、37℃にて一晩振とう培養した。当該培養液(3 mL)より、Pure Yield Pla
smid Miniprep System(Promega社製)を用いて、LRクローゼ反応に必要なattL配列を有するClorDNAウィルスプロモーターが導入されたエン
トリークローンプラスミドを抽出した。

【0052】

また、プラスミドの構築のためのBPクローゼ反応に必要なattB配列を有するノ
ールセオスリシン耐性遺伝子(nat)を上記実施例1と同様に増幅し、上記と同様にし
てBPクローゼ反応に必要なattP配列を有するドナーベクターであるpDONR2
21 P4r-P3rへ導入し、LRクローゼ反応に必要なattL配列を有する抗生
物質耐性遺伝子が導入されたエントリークローンプラスミドを得た。

【0053】

さらに、プラスミドの構築のためのBPクローゼ反応に必要なattB配列を有する
Thalassiosira pseudonanaのfcpターミネーターを上記実施例1と同様に増幅し、上記
と同様にしてBPクローゼ反応に必要なattP配列を有するドナーベクターであるp
DONR221 P3-P2へ導入し、LRクローゼ反応に必要なattL配列を有す
るターミネーターが導入されたエントリークローンプラスミドを得た。

【0054】

(2) ディスティネーションプラスミドの調製

Gateway Vector Conversion System with One Shot ccdB Survival(登録商標)Compet
ent Cells(invitrogen社製)を用いて、pBluescript SK-(Stratagene社製)へLRクローゼ反応に必要なattR配列を持つReading Frame Casetteを
組み込むことにより、ディスティネーションプラスミドを調製した。

【0055】

まず、pBluescript SK-(2 μg)に対し、制限酵素EcoRI 20 U(TOYOBO
社製, 10 U/μL)を用いて、37℃にて3時間消化した。当該反応液へ常法に従って
エタノールを添加することにより、DNAを沈殿させて回収した。次に、T4 DNAポリ
メラーゼを用いて末端を平滑化した。即ち、回収したDNAへ、10×バッファー(5 μ
L)、2.5 mM dNTP(TAKARA社製, 2 μL)、T4 DNAポリメラーゼ(
TOYOBO社製, 0.5 U/μL, 1 μL)および滅菌milliQ水(42 μL)を
加え、計50 μLとなるように反応液を調製した。この反応液を12℃にて15分間イン
キュベートした。この反応液に滅菌milliQ水(350 μL)を直ちに加え、常法に
従ってフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理をした後、続いてエタノール沈
殿を行ってDNAを回収した。次に、制限酵素にて切断したプラスミドの再環状化を防ぐ

10

20

30

40

50

ために、C I A P (T a K a R a 社製 , C a l f i n t e s t i n e A l k a l i n e P h o s p h a t a s e) を用いて、その切断断片の5'末端の脱リン酸処理を行った。平滑化処理を施したDNAに10×C I A P バッファー(5 μ L)とC I A P (0 . 1 U / μ L , 1 μ L) を加え、滅菌 m i l l i Q 水により計50 μ L になるように反応液を調製した。当該反応液を37 °Cにて15分間、続いて56 °Cにて15分間インキュベートした後、C I A P (0 . 1 U / μ L , 1 μ L) を再び加え、37 °Cにて15分間、続いて56 °Cにて15分間インキュベートした。当該反応液に、10% SDS 溶液(2.5 μ L)、500 mM EDTA 溶液(0.5 μ L)、プロテイナーゼK 溶液(20 mg / μ L , 0.5 μ L) をそれぞれ加えた後、56 °Cにて30分間、続いて75 °Cにて10分間インキュベートした。その後、常法に従ってフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理を施した。次に、エタノール沈殿によりDNAを回収し、滅菌 m i l l i Q 水(10 μ L)に溶解した。

10

【0056】

得られた平滑末端を有するpBluescript SK-と、Reading Frame Cassette A (i n v i t r o g e n 社製 , R f A) とを混合し、pGEM-T Vector Systems Kit (P r o m e g a 社製) 添付のT4 DNAリガーゼを用いて連結した。まず、オートクレーブ滅菌した0.2 mL 容のPCR用チューブに、2×ラピッドライゲーションバッファー(P r o m e g a 社製 , 5 μ L)、pBluescript SK- (100 ng / μ L , 0.5 μ L)、R f A (5 ng / μ L , 2 μ L)、T4 DNAリガーゼ(P r o m e g a 社製 , 3 U / μ L , 1 μ L) および滅菌 m i l l i Q 水(1.5 μ L)を加え、計10 μ L となるように反応液を調製した。この反応液を室温にて1時間保存し、4 °Cにて一晩(16時間以上)インキュベートした。このライゲーション溶液(5 μ L)をccdB Survival Competent Cells (i n v i t r o g e n 社製 , 50 μ L) に混合し、氷上にて30分間静置した。その後、42 °Cにて30秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移し、2分間静置した。次いでSOC (250 mL) を加え、37 °Cにて1.5時間振とう培養した。培養した菌液(300 μ L)を、25 μ g / mL クロラムフェニコールおよび50 μ g / mL アンピシリンを含むLB寒天培地に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオープン内で37 °Cにて一晩倒置培養した。

20

【0057】

得られたコロニーは、白金耳を用いてLB培地(10 mL)に植菌し、37 °Cにて一晩振とう培養した。当該培養液(3 mL)より、Pure Yield Plasmid Miniprep System (P r o m e g a 社製) を用いて、ディスティネーションプラスミドを抽出した。

30

【0058】

(3) エクスプレッションクローンプラスミドベクターの調製

Multisite Gateway Pro Kit (i n v i t r o g e n 社製) を用い、上記実施例2(1)で得たエンタリークローンプラスミドと、上記実施例2(2)で得たディスティネーションプラスミドとの間でLRクロナーゼ反応を行うことにより、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子およびターミネーターが連結されたエクスプレッションクローンプラスミドベクターを調製した。

【0059】

具体的には、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子、ターミネーターがそれぞれ組み込まれた3種のエンタリークローンプラスミド(それぞれ10 fmol)とディスティネーションベクター(20 fmol)を混合し、さらに滅菌 m i l l i Q 水を加えることにより計8 μ L の混合液を調製した。当該液にLR Clonase II PLUS Enzyme Mix (i n v i t r o g e n 社製 , 2 μ L) を加えて混合し、25 °Cにて16時間を反応させた。その後、当該反応液にプロテイナーゼK (i n v i t r o g e n 社製 , 1 μ L) を加え、37 °Cにて10分間処理した。当該反応液(2.5 μ L)を、One Shot Mach1 T1 (登録商標) chemically competent cells (i n v i t r o g e n 社製 , 25 μ L) に混合し、氷上にて30分間静置した。次いで42 °Cにて30秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移して2分間静置した。その後、SOC (250 μ L) を加え、37 °Cにて1.5時間振とう培養した。培養した菌液(275 μ L)を、50 μ g / mL アンピシリンを

40

50

含むLB寒天培地に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオープン内で37℃にて一晩倒置培養した。得られたコロニーを、白金耳を用いてLB培地(200mL)に植菌し、37℃にて一晩振とう培養した。培養液より、NucleoBond(登録商標)Xtra Midi(MACHEREY-NAGEL社製)を用いて、その取り扱い説明書に従い、プラスミドDNAを抽出した。

【0060】

(4) DNA配列の確認

目的とするエクスペリメンタルプラスミドベクターが作製されたことを確認するために、Dideoxy法を用いて塩基配列を決定した。

【0061】

上記実施例2(3)にて調製したエクスペリメンタルプラスミドベクター(200ng)を鋳型として用いて、サイクルシークエンシングPCRを行った。その反応条件を以下に示す。反応液(10μL)は、鋳型DNA(100ng/μL, 2μL)、Big Dye Terminator Cycle Sequencing ver.3.1(Applied Biosystems社製, 0.5μL)、5×シークエンシングバッファー(2μL)、プライマー(1.6pmol/μL, 0.66μL)、滅菌蒸留水(4.84μL)からなる。プライマーは、M13M3プライマー(配列番号4, SEQ ID NO:4)を用いた。反応条件としては、95℃で5分間加熱した後、96℃で10秒、50℃で5秒、60℃で4分の反応を40サイクル行った。反応後、反応液を1.5mL容のエッペンドルフチューブに移し、3M酢酸ナトリウム(1μL)、99.5%エタノール(25μL)および125mMEDTA溶液(1μL)を加え、指ではじきよく混合させた後、15分間室温で放置した。14,000rpm、4℃で20分間遠心分離後、上清をイエローチップで丁寧に除き、70%エタノール(35μL)を加え、よく混合した。再び、14,000rpm、4℃で10分間遠心分離した後、上清をイエローチップで完全に除去し、蓋を開けたまま室温で10分間放置して沈殿を乾燥させた。

【0062】

乾燥させたペレットにホルムアミド(Applied Biosystems社製, 10μL)を加え、高知大学総合研究センター遺伝子実験施設内のABI PRISM(登録商標)3100-Avant Genetic Analyzer(Applied Biosystems社製)を用いて解析した。あらかじめ、遺伝子解析ソフトVector NTI Advance Ver10.0(invitrogen社製, <http://www.invitrogen.com/vntgateway>)を用いて、ディスティネーションプラスミドの塩基配列に、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子およびターミネーターの塩基配列を組み込むことにより、エクスペリメンタルプラスミドベクターの塩基配列を作成した。次に、このコンピューター上で作成したエクスペリメンタルプラスミドベクターの塩基配列と、上記の方法により実験的に決定したエクスペリメンタルプラスミドベクターの塩基配列とを、Vector NTI Advance Ver10.0のAlignXを用いてアライメントを行って比較することにより、上記実施例2(3)で調製したエクスペリメンタルプラスミドベクターに目的遺伝子が導入されていることを確認した。

【0063】

得られたエクスペリメンタルプラスミドベクターの構造を図1に示す。

【0064】

また、対照として、前述したプラスミドの構成要素のうち、ClorDNAウィルスのプロモーターを中心目珪藻*Thalassiosira pseudonana*のfcpプロモーターに置き換えたプラスミド(pTpfcpPro/nat/TpfcpTer)と、さらにプロモーターを含まないプラスミド(pNat/TpfcpTer)も、同様に構築した。これらの構造を、それぞれ図2(1)と図2(2)に示す。

【0065】

実施例3 中心目珪藻の形質転換

上記実施例2の3種のプラスミドベクターを用い、中心目珪藻*Chaetoceros* sp. を形質転換した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

具体的には、ClorDNAウィルス(ClorDNAV)のプロモーターまたはThalassiosira pseudonanaのfcpプロモーターを有し、且つ抗生物質耐性遺伝子およびThalassiosira pseudonanaのfcpターミネーターを組み込んだプラスミドベクターを平均粒子径1.1 μmのタングステン粒子M17に付着させた。同時に、プロモーターを含まないプラスミドベクターも、タングステン粒子に付着させた。別途、中心目珪藻Chaetoceros sp.を1プレートあたり 1×10^8 cellsを固相培地に塗抹した。パーティクルガン(Bio-Rad社製, Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System)を用い、上記タングステン粒子を、ラプチャーディスク650psi (Bio-Rad社製)を2枚重ねることにより、Heガス圧1350 psiで細胞に打ち込んだ。次いで、ノールセオスリシン500 μg/mLを含む0.3%アガロースHGS(高強度アガロース、和光純薬工業社製) f/2培地にて当該細胞を培養し、全細胞数 1×10^8 当たりのコロニー数を計測した。結果を表1に示す。

【 0 0 6 7 】

【表1】

プロモーター	形質転換体数 (コロニー/ 10^8 cells)
ClorDNAVのプロモーター (本発明プロモーター)	13
T.pseudonanaの fcpプロモーター	1
無し	0

【 0 0 6 8 】

また、上記抗生物質含有培地で生育した細胞のコロニーが形質転換していることを、PCRにて確認した。生育した細胞のコロニーを100 mLの培地を用いて培養し、藻類細胞を回収した後、DNA抽出キット(Giagen社製, DNeasy(登録商標) Plant Mini Kit)を用い、ゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNAを鋳型とし、C1P2プロモーターに特異的なプライマー(配列番号5, SEQ ID NO: 5)および導入した抗生物質遺伝子(nat)に特異的なプライマー(配列番号6, SEQ ID NO: 6)と、Mighty Amp(商標) DNA Polymerase(Takara社製)を使ってPCRを行った。PCR反応の条件は、基本的には上記実施例1(2)と同様とし、サイクル数は30サイクル、アニーリング温度は55とした。得られた増幅DNAを分析した電気泳動写真を図3に示す。

【 0 0 6 9 】

図3中、「M」は分子量マーカーであり、「1~4」は本発明に係るプロモーターと抗生物質遺伝子(nat)を含むプラスミドベクターで形質転換した株のレーン、「5」は本発明に係るプロモーターと抗生物質遺伝子(nat)を含むプラスミドベクターを用いた陽性対照のレーン、「6」はChaetoceros sp.の野生株を用いた陰性対照レーンである。

【 0 0 7 0 】

実験結果の考察

(1) 形質転換能について

上記実施例3の結果のとおり、プロモーターを導入しない場合には形質転換体を得られず、また、従来型ウィルスプロモーターを用いた場合には、僅かに形質転換体を得られた。

【 0 0 7 1 】

それに対して、本発明に係るプロモーターを用いた場合には、10倍以上もの形質転換体を得ることができる。よって、本発明に係るプロモーターは、高効率に海産藻類を形質転換可能と考えられる。

【 0 0 7 2 】

(2) 本発明プロモーターの塩基配列について

一般的に、真核生物のプロモーター領域には、転写を開始させる転写結合因子が結合するコアプロモーター領域と、その上流に位置する遺伝子転写調節領域が存在する。ウィルスプロモーターにおいても同様に、TATAボックス(5'-TATAWAW-3'(式中、WはAまたはTを表す))やイニシエーターエレメント(Inr)といった真核生物のコアプロモーター領域によく見られるモチーフ配列が存在することが知られている。このことを踏まえ、本発明プロモーターの配列1をPLACE Signal Scan Search(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)を用いて解析し、比較した。

【0073】

その結果、配列番号1の本発明プロモーターに、TATAボックス(配列番号1中、285~289)、ACGTAボックス(配列番号1中、337~341)、および珪藻類のイニシエーターエレメントと考えられる5'-TCAT₊₁AAA-3'(配列番号1中、457~463)を見出した。このイニシエーターエレメントは、哺乳類の5'-YYA₊₁NWYY-3'(式中、WはAまたはTを示し、YはCまたはTを示す。以下、同じ)(Javahery, R.ら, Molecular and Cellular Biology, 14, pp. 116-127(1994))、卵菌類の5'-YCA₊₁TTY-3'(McLeod, Aら, Eukaryotic Cell, 3, pp. 91-99(2004))、ショウジョウバエの5'-TCA₊₁KTY-3'(式中、KはGまたはTを表す)(Purnell, B. A.ら, Genes & Development, 8, pp. 830-842(1994))、トリコモナスの5'-TCA₊₁YW-3'(Liston, D. R.ら, Molecular and Cellular Biology, 19, pp. 2380-2388(1999))など、他の生物のInr配列とはやや異なる。

【0074】

これに関連して、本発明者らは、本発明に用いたClorDNAウィルスに極めて近縁なウィルスの1種であるCsetDNAウィルスに由来する、上記Inrを含むプロモーターが、珪藻の中心目種には働かないことを明らかにしている。この点を考慮すると、本発明に係るポリヌクレオチド(1)が高い形質転換能を発揮できる理由として、イニシエーターエレメント以外の未知の配列が、Core elementとして働いている可能性が高いと考えられる。

【0075】

以下、さらに実験を進めた。

【0076】

実施例4 プロモーターの重要部位の特定

(1) ClorDNAウィルスプロモーターの分離

上記実施例1(2)のPCRにおいてプライマーを表2のものに変更した以外は同様にして、構造タンパク質のORFの上流配列中から長さの異なる3種の配列を調製した。なお、表2中のアニーリング部位は、ORF配列の上流配列である配列番号7(SEQ ID NO: 7)中における塩基番号を示す。

【0077】

【表2】

プライマー名	配列番号	アニーリング部位
CIP2L/attB1	2	9-25
CIP2L/2/attB1	8	281-298
CIP2L/5/attB1	9	424-440
CIP2R/2/attB4	10	490-507

【0078】

具体的には、3'側のプライマーとしてCIP2R/2/attB4を用い、5'側のプライマーとして表2中の1から3番目のプライマーを用い、長さの異なるClorDNAウィルスプロモーターDNAを得た。以下、得られたDNAを、長いものからプロモーター1, 2, 3という。

【0079】

(2) プラスミドベクターの調製

上記実施例2と同様にして、上記(1)で得られたClorDNAウィルスプロモーター

ーDNAが導入されたプラスミドベクターを調製した。また、比較のため、中心目珪藻Thalassiosira pseudonanaの内在性プロモーターを含むベクターと、プロモーターを含まないベクターも同様に調製した。

【0080】

(3) 形質転換実験

上記(2)で得られたプラスミドベクターを用い、上記実施例3と同様にして中心目珪藻Chaetoceros sp.の形質転換実験を行い、全細胞数 5×10^8 当たりのコロニー数を計測した。実験は各3例行った。結果を表3に示す。

【0081】

【表3】

プロモーター	形質転換コロニー数
1	8.35±4.59
2	5.00±4.10
3	0
内在性プロモーター	8.35±4.59
無し	0

【0082】

表3に示す結果のとおり、上記(1)で調製したClorDNAウィルスプロモーターDNAのうち、中程度の長さのプロモーター2(配列番号12;配列番号7中、第281から第507番目の塩基配列)で十分な形質転換効率が示された。一方、最も短いプロモーター3(配列番号7中、第424から第507番目の塩基配列;配列番号12中、第144から第230番目の塩基配列)では、全く活性が見られなかった。従って、配列番号12の第1から第143番の塩基配列(配列番号13)の中に、藻類の形質転換に重要な配列が含まれていると考えられる。

【0083】

また、長いプロモーター1(配列番号11;配列番号7中、第9から第507番目の塩基配列)では、さらに高い形質転換効率を得られた。従って、配列番号7中、第9から第280番目の塩基配列には、藻類の形質転換に補助的役割を示す配列が含まれていると考えられる。

【0084】

以上のとおり、配列番号13のプロモーターには、藻類の形質転換を行う上で非常に重要な配列が含まれており、また、配列番号12のプロモーターは、藻類の形質転換に非常に有用であり、配列番号11のプロモーターは、さらに形質転換効率の高いものであることが明らかにされた。

【0085】

実施例5 プロモーターの重要部位の特定

配列番号12のプロモーターを導入したプラスミドベクターを用い、中心目珪藻に加えて羽状目珪藻についても形質転換実験を行った。即ち、上記実施例3と同様にして、表4に示す珪藻を形質転換した。全細胞数 1×10^8 当たりのコロニー数を計測した。実験は各3例行った。また、陰性対照として、プロモーターを有さないプラスミドベクターを用い、同様に実験を行った。結果を表4に示す。

【0086】

【表4】

珪藻		プロモーター	形質転換コロニー数
種名	株名		
中心目珪藻		1	5.00±8.66
<i>Chaetoceros neogracile</i>		無し	0
羽状目珪藻		1	2.00±1.73
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> UTEX 646		無し	0

【0087】

表4の結果のとおり、珪藻は羽状目珪藻と中心目珪藻に大きく分類されるところ、従来

10

20

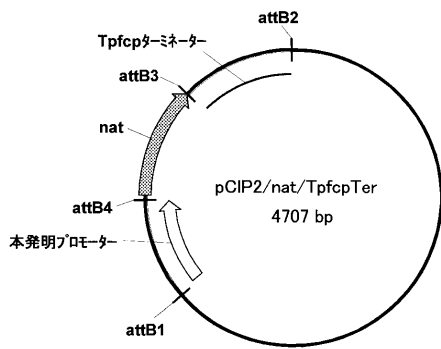
30

40

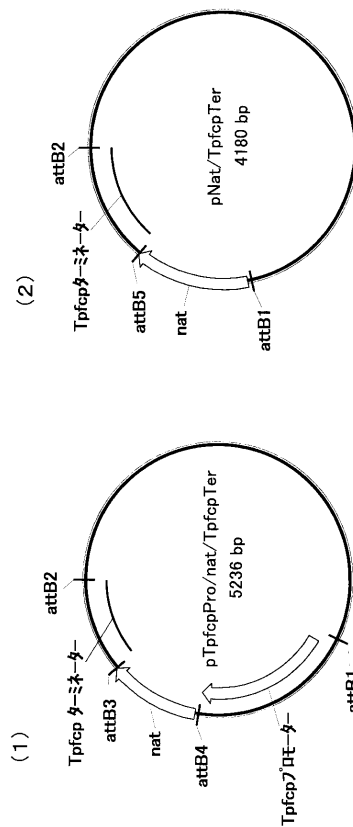
50

のプロモーターの特異性が高いのに対して、本発明に係るプロモーターは特異性が低く、様々な珪藻の効率的な形質転換に幅広く用いられ得ることが示された。

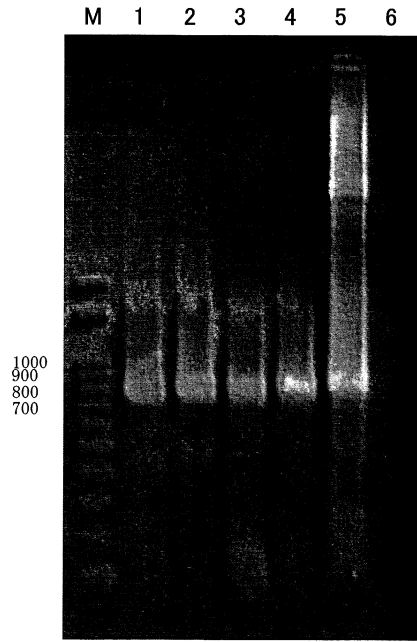
【図1】



【図2】



【 図 3 】



【 配列表 】

0005804601000001 . app

フロントページの続き

- (72)発明者 足立 真佐雄
高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内
- (72)発明者 岡見 卓馬
高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内
- (72)発明者 長崎 慶三
広島県廿日市市丸石2丁目17番5号 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所内
- (72)発明者 外丸 裕司
広島県廿日市市丸石2丁目17番5号 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所内

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, 2009年, vol.12, p.104[2-3P-8]
日本水産学会秋季大会講演要旨集, 2009年, p.61[433]
マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, 2007年, vol.10, p.76[B-13]
日本水産学会秋季大会講演要旨集, 2007年, p.139[1017]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
DDBJ / GeneSeq
CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS /
WPIDS (STN)
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
PubMed