

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6226869号
(P6226869)

(45) 発行日 平成29年11月8日(2017.11.8)

(24) 登録日 平成29年10月20日(2017.10.20)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q 1/68	Z N A Z
G O 1 N 33/50	(2006.01)	G O 1 N 33/50	P
G O 1 N 27/02	(2006.01)	G O 1 N 27/02	D
G O 1 N 27/00	(2006.01)	G O 1 N 27/00	J
C 12 M 1/00	(2006.01)	G O 1 N 27/00	Z

請求項の数 19 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-536328 (P2014-536328)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月18日 (2012.10.18)
 (65) 公表番号 特表2014-534812 (P2014-534812A)
 (43) 公表日 平成26年12月25日 (2014.12.25)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2012/052579
 (87) 國際公開番号 WO2013/057495
 (87) 國際公開日 平成25年4月25日 (2013.4.25)
 審査請求日 平成27年10月19日 (2015.10.19)
 (31) 優先権主張番号 61/549,998
 (32) 優先日 平成23年10月21日 (2011.10.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/599,244
 (32) 優先日 平成24年2月15日 (2012.2.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 511252899
 オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
 イギリス国 オックスフォードシャー オーエックス4 4ジーイー、オックスフォード、オックスフォード サイエンス パーク、ロバート ロビンソン アベニュー4、エドマンド カートライト ハウス
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酵素法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、
 (a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよびヘリカーゼに接触させて、
 ヘリカーゼがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するようにするステップ；および
 (b) 1つまたは複数の相互作用の間に標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含む、方法。

【請求項 2】

1つまたは複数の特性が、(i) 標的ポリヌクレオチドの長さ、(ii) 標的ポリヌクレオチドの同一性、(iii) 標的ポリヌクレオチドの配列、(iv) 標的ポリヌクレオチドの二次構造および(v) 標的ポリヌクレオチドがメチル化によって、酸化によって、損傷によって、1つもしくは複数のタンパク質で、または1つもしくは複数の標識、タグもしくはスペーサーで修飾されているか否か、から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性が電気的測定および/または光学的測定によって測定され、電気的測定が電流測定、インピーダンス測定、トンネル測定または電界効果トランジスタ(FET)測定である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよびHe1308ヘリカーゼに接触させて、ヘリカーゼがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するようにするステップ；および

(b) 1つまたは複数の相互作用の間にポアを通過する電流を測定して、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップ

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ポアに電圧を印加して、ポアとヘリカーゼとの複合体を形成するステップをさらに含み、前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部が2本鎖である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。10

【請求項6】

ポアが、膜貫通タンパク質ポアまたはソリッドステートポアであり、膜貫通タンパク質ポアが、-ヘモリジン(hemolysin)、ロイコシジン(leukocidin)、スメグマ菌(*Mycobacterium smegmatis*)ポリン(porin)A(MspA)、外膜ポリン(porin)F(OmpF)、外膜ポリン(porin)G(OmpG)、外膜ホスホリパーゼA、ナイセリア(*Neisseria*)オートトランスポーターリポタンパク質(NalP)およびWZAから選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

膜貫通タンパク質が、(a)配列番号2に示す8個の同一のサブユニットから形成されている、または(b)7個のサブユニットの1つもしくは複数が配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号2に対して少なくとも90%の相同性を有し、ポアを形成する能力を保持しているその変種である、または(c)配列番号4に示す7個の同一サブユニットから形成されている-ヘモリジンである、または(d)7個のサブユニットの1つまたは複数が配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号4に対して少なくとも90%の相同性を有し、ポアを形成する能力を保持しているその変種である、請求項6に記載の方法。20

【請求項8】

He1308ヘリカーゼが、アミノ酸モチーフQ-X1-X2-G-R-A-G-R(配列番号8)を含み、X1はC、MまたはLであり、X2は任意のアミノ酸残基である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。30

【請求項9】

X2が、A、F、M、C、V、L、I、S、TまたはPである、請求項8に記載の方法。。

【請求項10】

He1308ヘリカーゼが、表4もしくは5に示すヘリカーゼの内の1つもしくはその変種である、またはHe1308ヘリカーゼが、(a)配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58のいずれか1つに示す配列、もしくは(b)配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58のいずれか1つに示す配列に対して少なくとも90%の相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持しているその変種、もしくは(c)アミノ酸同一性に基づいて配列番号10の残基20から211もしくは20から727に対して少なくとも90%の相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持している配列を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。40

【請求項11】

He1308ヘリカーゼが標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。50

【請求項 12】

少なくとも 0.3 M または少なくとも 1.0 M の塩濃度を用いて実行される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

塩が KCl である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法であって、
 ここで、センサーは、膜貫通ポアと Hel 308 ヘリカーゼとの複合体であり、前記方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドの存在下でポアとヘリカーゼとを接触させ、次いで、
 ポアに電位を印加するステップまたは (b) ポアをヘリカーゼに共有結合的に付着するステップによって、膜貫通ポアと Hel 308 ヘリカーゼとの複合体を形成し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成するステップを含む、方法。
10

【請求項 15】

複合体が、(a) 標的ポリヌクレオチドの存在下でポアとヘリカーゼとを接触させるステップおよび (b) ポアに電位を印加するステップによって形成され、前記電位が、電圧電位または化学電位である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

複合体が、ポアをヘリカーゼに共有結合的に付着するステップによって形成される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

膜貫通ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための Hel 308 ヘリカーゼの使用。
20

【請求項 18】

(a) 膜貫通ポアおよび (b) Hel 308 ヘリカーゼを含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。

【請求項 19】

試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための分析装置であって、

複数の膜貫通ポア；

複数の Hel 308 ヘリカーゼ；

複数のポアを支持でき、前記ポアおよびヘリカーゼを用いてポリヌクレオチド特性決定を実施するために作動可能であるセンサーデバイス；
30

特性決定を実施するための材料を保持するための少なくとも 1 つのリザーバー；

前記少なくとも 1 つのリザーバーから前記センサーデバイスに材料を制御可能に供給するように構成された流体系；ならびに

各試料を受けるための複数の容器

を含み、前記流体系が前記容器から前記センサーデバイスに前記試料を選択的に供給するように構成されている、分析装置。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定する新規方法に関する。方法は、ポアおよび Hel 308 ヘリカーゼまたは標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーターを用いる。ヘリカーゼまたは分子モーターは、ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御する。

【背景技術】**【0002】**

迅速で安価なポリヌクレオチド（例えば DNA または RNA）配列決定および同定技術が、幅広い応用にわたって現在必要である。既存の技術は、主にそれらが、大量のポリヌクレオチドを生成するための増幅技術に依存し、シグナル検出のために多量の専門的な蛍光化学物質を必要とするために、遅く高価である。
40

50

【0003】

膜貫通ポア（ナノポア）は、ポリマーおよび種々の小分子のための直接的、電気的バイオセンサーとして大きな将来性を有する。特に、将来性のあるDNA配列決定技術としてナノポアが近年注目されている。

【0004】

電位がナノポア全体に印加される場合、スクレオチドなどの分析物が一定時間バレルに一過的に存在する場合に電流が変化する。スクレオチドのナノポア検出は、既知のサインおよび持続時間での電流変化をもたらす。「鎖配列決定」法では、1本のポリスクレオチド鎖がポアを通り、スクレオチドのアイデンティティが得られる。鎖配列決定は、ポアを通るポリスクレオチドの移動を制御するためのスクレオチドハンドリングタンパク質の使用を含み得る。10

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0005】**

本発明者らはHe1308ヘリカーゼが、特に電圧などの電位が印加されている場合に、ポアを通るポリスクレオチドの移動を制御できることを実証した。ヘリカーゼは、印加された電圧から生じる場と反対にまたはそれに沿って制御された段階的な様式で標的ポリスクレオチドを移動させることができる。驚くべきことに、ヘリカーゼは、ポリスクレオチドを特性決定するために、特に、鎖配列決定を用いてその配列を決定するために有利である高塩濃度で機能できる。これは、下により詳細に考察される。20

【0006】

したがって、本発明は、
(a) 標的ポリスクレオチドを膜貫通ポアおよびHe1308ヘリカーゼに接触させて、ヘリカーゼがポアを通る標的ポリスクレオチドの移動を制御し、標的ポリスクレオチド中のスクレオチドがポアと相互作用するようにするステップ；および
(b) 1つまたは複数の相互作用の間に標的ポリスクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリスクレオチドを特性決定するステップを含む、標的ポリスクレオチドを特性決定する方法を提供する。

【0007】

本発明は、
- ポアとHe1308ヘリカーゼとの複合体を形成し、それにより標的ポリスクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成するステップを含む、標的ポリスクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法、
- ポアを通る標的ポリスクレオチドの移動を制御するためのHe1308ヘリカーゼの使用、
- (a) ポアおよび(b) He1308ヘリカーゼを含む標的ポリスクレオチドを特性決定するためのキット、ならびに
- 複数のポアおよび複数のHe1308ヘリカーゼを含む、試料中の標的ポリスクレオチドを特性決定するための分析装置も提供する。30

【0008】

本発明者らは、特に電圧などの電位が印加されている場合にも、標的ポリスクレオチドに内部スクレオチドで結合できる分子モーターがポアを通るポリスクレオチドの移動を制御できることを実証した。モーターは、印加された電圧から生じる場と反対にまたはそれ沿って制御された段階的な様式で標的ポリスクレオチドを移動させることができる。驚くべきことに、モーターが本発明の方法において用いられる場合に、モーターはナノポアを通る標的ポリスクレオチドの鎖全体の移動を制御できる。これはポリスクレオチドを特性決定するために、特に、鎖配列決定を用いてその配列を決定するために有利である。40

【0009】

このように本発明は、
(a) 標的ポリスクレオチドを膜貫通ポアおよび分子モーターに接触させて、標的ポリス50

クレオチドに内部スクレオチドで結合する分子モーターがポアを通る標的ポリスクレオチドの移動を制御し、標的ポリスクレオチド中のスクレオチドがポアと相互作用するようとするステップ、および

(b) 1つまたは複数の相互作用の間に標的ポリスクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリスクレオチドを特性決定するステップを含む、標的ポリスクレオチドを特性決定する方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】a) ナノポアを通るDNAの移動を制御するためのヘリカーゼの使用の模式的例を示す図である。1)コレステロール(cholesterol)タグ(c)を含有するアニールされたプライマー(b)を有するssDNA基質(a)が二重層(d)のcis側に添加される。コレステロールタグが二重層に結合し、二重層表面に基質を濃縮する。2)cisコンパートメントに添加されたヘリカーゼ(e)はDNAに結合する。二価金属イオンおよびNTP基質の存在下でヘリカーゼは、DNAに沿って移動する。3)印加された電圧下でDNA基質は、DNA上のリーダーセクションを介してナノポア(f)によって捕捉される。DNAは、DNAに結合したヘリカーゼがポアの先端に接触し、さらなる未制御なDNA移行を防ぐまで印加された電位の力の下でポアを通じて引かれる。このプロセスの際にdsDNAセクション(プライマーなど)は除去される。DNAに沿った3'から5'方向へのヘリカーゼの移動は、挿入されたDNAを印加される場と反対にポアの外側に引く。4)ヘリカーゼは、DNAをナノポアの外側に引き、cisコンパートメントへ戻す。ナノポアを通るDNAの最後のセクションは5'-リーダーである。5)ヘリカーゼがDNAをナノポアの外側へ移動させると、それはcisコンパートメントに戻って外れる。b)実施例において用いられるDNA基質設計を示す図である(a=50Tリーダー-(b)を有するDNAの400塩基長鎖、c=プライマー、d=コレステロールタグ)。

【図2】ヘリカーゼはDNAを制御された様式でナノポアを通して移動させることができ、DNAがナノポアを通って移動するときに電流に段階的变化を生じさせることを示す図である。例示的ヘリカーゼ-DNA事象(上セクションに小矢印で示す)(180mV、400mM KCl、Hepes pH 8.0、0.15nM 400塩基長DNA、100nM Hel308Mbu、1mM DTT、1mM ATP、1mM MgCl₂)。上)Hel308 400塩基長DNA事象の電流(y軸、pA)対捕捉時間(x軸、秒)のセクション。オープンポア電流は約180pA(Aと標識される)である。DNAは印加された電位の力(+180mV)の下でナノポアによって捕捉される。付着している酵素を有するDNAは長期遮断(この条件では約60pA)を生じ、酵素がポアを通してDNAを移動させるときの電流における段階的变化を示す。中央)中央のセクションは、DNA事象(1)の1つの拡大図であり、DNA-酵素捕捉、DNAがポアを通って引かれるときの段階的電流变化、およびナノポアを抜ける前の特徴的な長いポリTレベルでの終了を示す。下)DNAがナノポアを通って移動するときの電流における段階的变化の拡大図。

【図3】ヘリカーゼは、DNA移動を制御し、DNAがナノポアを通るときに電流遷移の一貫したパターンを生じる(図3aおよび3bについて、y軸=電流(pA)、x軸=時間(秒))。ポリTレベルで終了する4つの典型的DNA事象由来の最後の約80電流遷移の例。4つの例(3aに2つ、3bに2つ)は、電流遷移の一貫したパターンが観察されたことを例示する。

【図4】塩濃度の増加は、ポア電流を増加させ、より広いDNA識別範囲(範囲=DNA電流遷移での最小電流から最大電流)をもたらすことを示す図である。例示的ヘリカーゼ-DNA事象(図4a~cについて、y軸=電流(pA)、x軸=時間(秒)、180mV、Hepes pH 8.0、0.15nM 400塩基長DNA配列番号59および60、100nM Hel308Mbu、1mM DTT、1mM ATP、1mM MgCl₂)、400mM、1Mおよび2M KClにおいて、図4および4cに示されてい

10

20

30

40

50

る。上トレースは、ポリ T レベルで終了する完全事象を (A) によって示される I - オープンと共に) 示し、下トレースは、 150 pA の一定 y 軸電流スケールでの各事象の最後の 10 秒間の拡大セクションを示す。 400 mM KC1 から 2M KC1 への塩濃度の増加は、オープンポア電流における約 350 % の増加 (I - オープン、約 180 pA から約 850 pA) および識別範囲における約 200 % の増加 (約 25 pA から約 75 pA) をもたらす。図 4d は、塩濃度の関数としての DNA 識別範囲のプロットである (y 軸 = 範囲 (pA) 、 x 軸 = 塩 (mM))。

【図 5】ヘリカーゼ (a) は、DNA (b) の移動を少なくとも 2 種のモードの操作で制御できることを示す図である。ヘリカーゼは、DNA に沿って 3' - 5' 方向に移動するが、ナノポア (c) 中での DNA の方向 (DNA のどちらの端が捕捉されているかに依存する) は、酵素が印加された場と反対にナノポアの外側へ DNA を移動させるため (図 5b) 、または印加された場に沿ってナノポア内へ DNA を移動させるためのいずれでも用いられ得ることを意味する (図 5a) 。図 5b) DNA の 5' 末端が捕捉されている場合、ヘリカーゼは電圧によって印加された場の方向とは反対に作動し、挿入された DNA をナノポアの外側に DNA が cis チャンバーに戻って放されるまで引く。右は、印加された場と反対に 5' に下がる He1308 からの例示的 DNA - ヘリカーゼ事象である (y 軸 = 電流 (pA) 、 x 軸 = 時間 (秒))。図 5a) DNA が 3' を下にナノポアに捕捉される場合、酵素は DNA を場の方向にナノポア中へ、ポアを通って完全に移行され、二重層の trans 側へ放すまで移動させる。右は、印加された場で 3' に下がる He1308 からの例示的 DNA - ヘリカーゼ事象である (y 軸 = 電流 (pA) 、 x 軸 = 時間 (秒))。電流トレースは、DNA の 5' 下方向と 3' 下方向との間で変化する。

【図 6】酵素活性を検査するための蛍光アッセイを示す図である。 a) 通例の蛍光基質がハイブリダイズされた dsDNA を置換するヘリカーゼ (a) の能力をアッセイするために用いられた。 1) 蛍光基質鎖 (最終 100 nM) は 3' ssDNA オーバーハング、およびハイブリダイズされた dsDNA の 40 塩基セクションを有する。主要な上部鎖 (b) は、カルボキシフルオレセイン塩基 (c) を 5' 末端に有し、ハイブリダイズされた相補物 (d) はブラックホールクエンチャー (BHQ - 1) 塩基 (e) を 3' 末端に有する。ハイブリダイズされると、フルオレセイン由来の蛍光は局在 BHQ - 1 によって消光され、基質は基本的に非蛍光性である。蛍光基質 (d) の短い鎖に相補的である捕捉鎖 (f) 1 μM がアッセイに含まれる。 2) ATP (1 mM) および MgCl₂ (5 mM) の存在下で、基質に添加されたヘリカーゼ (100 nM) は、蛍光基質の 3' テールに結合し、主要な鎖に沿って移動し、示すとおり相補鎖を置換する。 3) BHQ - 1 を有する相補鎖が完全に置換されると、主要な鎖上のフルオレセインが蛍光を発する。 4) 過剰量の捕捉鎖が相補的 DNA に優先的にアニールし、初期基質の再アニールおよび蛍光の消失を防ぐ。 b) 400 mM から 2M のさまざまな濃度の KC1 (x 軸、 mM) を含有する緩衝溶液 (10 mM Hepes pH 8.0 、 1 mM ATP 、 5 mM MgCl₂ 、 100 nM 蛍光基質 DNA 、 1 μM 捕捉 DNA) における活性の初期速度のグラフ (y 軸、相対活性)。

【図 7】さまざまな He1308 ヘリカーゼを用いるヘリカーゼ制御 DNA 事象の例を示す図である (図 7a ~ c について、 y 軸 = 電流 (pA) 、 x 軸 = 時間 (分) 、 180 mV 、 Hepes pH 8.0 、 0.15 nM 400 塩基長 DNA 配列番号 59 および 60 、 100 nM He1308 、 1 mM DTT 、 1 mM ATP 、 1 mM MgCl₂) : He1308 Mhu (a) 、 He1308 Mok (b) および He1308 Mma (c) 。これらは、ポリ T レベルで終了する Ms pA ナノポアを通る制御された DNA 移動の典型例を表す。

【図 8】ヘリカーゼ内部結合活性を検査するための蛍光アッセイを示す図である。 A) 天然 3' 末端を欠失している DNA に結合し、次いでハイブリダイズされた dsDNA を置換するヘリカーゼの能力をアッセイするために通例の蛍光基質を用いた。蛍光基質鎖 (最終 50 nM) は、 3' ssDNA オーバーハングおよびハイブリダイズされた dsDNA の 40 塩基セクションを有する。主要な上部鎖 (a) は、 4 個の連続した非 DNA 由来ト

10

20

30

40

50

リエチレングリコールスペーサー（「スペーサー9」基と称される、bと標識される）で3'末端または内部、オーバーハングとdsDNAとの間の接合部（陰性対照として）のいずれかで修飾される。さらに主要な上部鎖は、カルボキシフルオレセイン塩基（c）を5'末端に有し、ハイブリダイズされた相補物（d）はブラックホールクエンチャー（BHQ-1）塩基（e）を3'末端に有する。ハイブリダイズされると、フルオレセインからの蛍光は局在BHQ-1によって消光され、基質は基本的に非蛍光性である。蛍光基質の短い鎖（d）に相補的である捕捉鎖（1 μM、f）がアッセイに含まれる。B) ATP（1 mM）およびMgCl₂（1 mM）の存在下で、3' - 末端「スペーサー9」基を含有する基質に添加されたHe1308ヘリカーゼ相同体（20 nM、g）は、蛍光基質のssDNAオーバーハングに結合でき、主要な鎖に沿って移動し、相補鎖を置換する。C) HQ-1を有する相補鎖が完全に置換されると主要な鎖上のフルオレセインが蛍光を発する。D) 過剰量の捕捉鎖が相補的DNAに優先的にアニールし、初期基質の再アニールおよび蛍光の消失を防ぐ。

【図9】He1308 - 調節dsDNA代謝回転の相対速度を、400 mM NaCl、10 mM Hepes、pH 8.0、1 mM ATP、1 mM MgCl₂、50 nM 蛍光基質DNA、1 μM 捕捉DNA中で、3' - 非修飾DNAおよび3' - 「スペーサー9」DNAと比較して示すグラフである（y軸 = 相対「3' - Sp9」活性（% wrt 天然3'）、x軸 = a (Mbu)、b (Csy)、c (Tga)、d (Mma)、e (Mhu)、f (Min)、g (Mig)、h (Mmaz)、i (Mac)、j (Mok)、k (Mth)、l (Mba)、m (Mzh)）。

【図10】実施例5において使用されるナノポアを通るDNA移動を制御するためのヘリカーゼの使用の模式図である。A) 付着しているコレステロール（cholesterol）タグを有するアニールされたプライマー（配列番号69（yと標識される））を有するDNA基質（配列番号67（wと標識される）および68（xと標識される））は二重層のcis側に添加される。コレステロールタグ（zと標識される）が二重層に結合し、二重層表面に基質を濃縮する。cisコンパートメントに添加されたヘリカーゼ（1と標識される）は配列番号67の4bpリーダーに結合する。B) 印加された電圧下でDNA基質は、DNA上の5'リーダーセクションを介してナノポアによって捕捉され、配列番号69が外れる。C) 印加された場の力の下でDNAは、結合したヘリカーゼ（1）がポアの先端に接触し、さらなる未制御な移行を防ぐまでポア内に引かれる。このプロセスではアンチセンス鎖配列番号68はDNA鎖から外れる。D) 二価金属イオンおよびNTP基質の存在下でポアの先端のヘリカーゼ（1）は、DNAに沿って移動し、ポアを通るDNAの移行を制御する。DNAに沿った3'から5'方向へのヘリカーゼの移動は、挿入されたDNAを印加される場と反対にポアの外側に引く。cis側（この場合には3'）に曝された1本鎖DNAは、末端ヌクレオチドまたは内部ヌクレオチドのいずれかに結合するさらなるヘリカーゼ（2～4）に利用可能である。E) ポアのヘリカーゼ（1）がDNAから離れる場合、DNA上の次のヘリカーゼ（2）がポアに達するまでDNAは場によってポアの中に引かれる。ポアのヘリカーゼは、DNAをナノポアの外側へ引き、cisコンパートメントへ戻す。ナノポアを通るDNAの最後のセクションは5' - リーダーである。F) ヘリカーゼはDNAをナノポアの外側へ移動させると、cisコンパートメントに戻つて外れる。矢印はDNAの移動方向を示す。

【図11】900塩基長のナノポアにおけるDNAの領域の位置（y軸）が、各ヘリカーゼ事象の際に、He1308ヘリカーゼ相同体MbuがMspAポア（x軸）を通るDNA鎖の移行を制御する場合にどのように変化したかを示すデータプロットである（y軸 = 900塩基長における位置、x軸 = インデックス）。A～Cは、鎖のほぼ最初から鎖の最後までの（ポリTリーダーを介して抜ける）DNA鎖全体の典型的移行事象の例を示し、事象Dは不完全DNA移行（酵素脱離は、DNAが鎖の末端まで作られなかったことを意味する）の例を示す。ずれ（例えば、点線円によって強調される大きなずれなど）は、配列が鎖中の以前のポイントに戻っていることを示し、酵素脱離の結果である。酵素が脱離すると、DNAは、鎖沿いのさらなる別の酵素がポアに接触するまで場の力の下でナノポ

10

20

30

40

50

ア内へ引き戻され、次いでヘリカーゼ移動が継続する。

【図12】900塩基長の位置が、He1308ヘリカーゼ相同体TgαがMspAポアを通るDNA鎖の移行を制御する場合にどのように変化したかを示すデータプロットである(y軸=900塩基長における位置、x軸=インデックス)。事象A~Dは、DNA鎖全体の移行を示す。

【図13】He1308Mbuヘリカーゼ(配列番号10)の酵素前進性をHe1308Mokヘリカーゼ(配列番号29)のそれと比較するために用いた蛍光アッセイを示す図である。通常の蛍光基質がハイブリダイズされたdsDNAを置換するヘリカーゼの能力をアッセイするために用いられた。蛍光基質(最終50nM)は3'ssDNAオーバーハングならびにハイブリダイズされたdsDNA(セクションA、配列番号70)の80(a1)および33塩基対セクション(a2)を有する。主要な下部「テンプレート」鎖(1)は、5'および3'末端でそれぞれカルボキシフルオレセイン(FAM)(4)およびブラックホールクエンチャー(BHQ-1)(5)塩基で標識されている3'オーバーハングおよび33nt蛍光プローブ(3、配列番号72)に隣接して、80nt「プロッカー」鎖(2、配列番号71)にハイブリダイズされる。ハイブリダイズされると、FAMはBHQ-1から離れ、基質は基本的に蛍光を発する。セクションBに示すとおり、ATP(1mM)およびMgCl₂(10mM)の存在下(ATPおよびMgCl₂の添加は7および8でそれぞれ示される)でヘリカーゼ(6、20nM)は、基質の3'オーバーハング(配列番号70)に結合し、下鎖に沿って移動し80ntプロッカー鎖(配列番号71)を置換し始める。前進性の場合、ヘリカーゼは、蛍光プローブも置換する(セクションC、配列番号72、カルボキシフルオレセイン(FAM)で5'末端で、ブラックホールクエンチャー(BHQ-1)で3'末端で標識されている)。蛍光プローブは、その5'および3'末端が自己相補的であり、それにより一度置換されると動力学的に安定なヘアピンを形成しプローブのテンプレート鎖(セクションD)への再アニールを防ぐように設計される。ヘアピン産物の形成により、FAMはBHQ-1の近傍に運ばれ、その蛍光は消光される。80塩基長「プロッカー」(配列番号71)および蛍光(配列番号72、カルボキシフルオレセイン(FAM)でその5'末端、ブラックホールクエンチャー(BHQ-1)でその3'末端で標識されている)鎖を置換できる前進性酵素は、したがって、蛍光の経時的な減少をもたらす。しかし酵素が80nt未満の前進性を有する場合は、蛍光鎖(配列番号72、カルボキシフルオレセイン(FAM)でその5'末端で、ブラックホールクエンチャー(BHQ-1)でその3'末端で標識されている)を置換することができず、したがって「プロッカー」鎖(配列番号71)は主要な下部鎖に再アニールする(セクションE)。

【図14】制御目的にも用いられた追加的な通常の蛍光基質を示す図である。陰性対照として用いられる基質は、図3に記載のものと同一であったが、3'オーバーハング(セクションA、(配列番号71(1と標識される)、72(2と標識される)(カルボキシフルオレセイン(FAM)(3)でその5'末端で、ブラックホールクエンチャー(BHQ-1)(4)でその3'末端で標識されている)および73(5と標識される、80bpセクション(a1)および33bpセクション(a2)からなる))を欠失していた。図3に記載のものに類似しているが80塩基対セクション(配列番号72(2と標識される))(カルボキシフルオレセイン(FAM)(3)でその5'末端で、ブラックホールクエンチャー(BHQ-1)(4)でその3'末端で標識されている)および74(6と標識される、28bpセクション(a3)からなる))を欠失している基質が活性だが前進性である必要はないヘリカーゼの陽性対照として用いられた(セクションB)。

【図15】緩衝溶液(400mM NaCl、10mM Hepes pH 8.0、1mM ATP、10mM MgCl₂、50nM 蛍光基質DNA(配列番号70、71および72(カルボキシフルオレセイン(FAM)でその5'末端で、ブラックホールクエンチャー(BHQ-1)でその3'末端で標識されている)中での図13に示す前進性基質に対してHe1308Mbuヘリカーゼ(配列番号10、白丸)およびHe1308Mokヘリカーゼ(配列番号29、黒三角)を検査した場合の時間依存性蛍光変化のグラフ

10

20

30

40

50

である（y軸 = 蛍光（任意単位）、x軸 = 時間（分））。He1308Mokによって提示された蛍光の減少は、He1308Mbu（配列番号10）と比較してこれらの複合体の前進性の増大を示す。

【図16】緩衝溶液（400 mM NaCl、10 mM Hepes pH 8.0、1 mM ATP、10 mM MgCl₂、50 nM 蛍光基質DNA（配列番号72（カルボキシフルオレセイン（FAM）でその5'末端で、ブラックホールクエンチャー（BHQ-1）でその3'末端で標識されている）および74）中で陽性対照前進性基質（図14、セクションBに示すとおり、配列番号72（カルボキシフルオレセイン（FAM）でその5'末端で、ブラックホールクエンチャー（BHQ-1）でその3'末端で標識されている）および74）に対して、He1308Mbuヘリカーゼ（配列番号10、白丸）およびHe1308Mokヘリカーゼ（配列番号29、黒三角）を検査した場合の時間依存性蛍光変化のグラフである（y軸 = 蛍光（任意単位）、x軸 = 時間（分））。この陽性対照は、両試料に対する蛍光減少によって示されたとおり、両方のヘリカーゼが実際に活性であることを実証した。 10

【発明を実施するための形態】

【0011】

配列表の記載

配列番号1は、MS-B1変異MspA单量体をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。この変異体は、シグナル配列を欠失しており、次の変異：D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139Kを含む。 20

【0012】

配列番号2は、MspA单量体のMS-B1変異体の成熟形態のアミノ酸配列を示す。この変異体は、シグナル配列を欠失しており、以下の変異：D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139Kを含む。

【0013】

配列番号3は、-ヘモリジン-E111N/K147N（-HL-NN；Stoddartら、PNAS、2009;106(19):7702-7707）の1つのサブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

【0014】

配列番号4は、-HL-NNの1つのサブユニットのアミノ酸配列を示す。 30

【0015】

配列番号5から7は、MspB、CおよびDのアミノ酸配列を示す。

【0016】

配列番号8は、He1308モチーフのアミノ酸配列を示す。

【0017】

配列番号9は、拡張He1308モチーフのアミノ酸配列を示す。

【0018】

配列番号10から58は、He1308ヘリカーゼおよび表5におけるモチーフのアミノ酸配列を示す。 40

【0019】

配列番号59から74は、実施例で用いられた配列を示す。

【0020】

配列番号75は、57ページ以降の配列比較でのHe1308Dthの配列を示す。

【0021】

配列番号76は、57ページ以降の配列比較でのHe1308Mmarの配列を示す。

【0022】

配列番号77は、57ページ以降の配列比較でのHe1308Nthの配列を示す。

【0023】

配列番号78は、57ページ以降の配列比較での共通配列を示す。

【0024】

発明の詳細な記載

本開示の生成物および方法のさまざまな応用が当技術分野における具体的な必要性に適合され得ることは理解される。本明細書で用いられる用語は本発明の詳細な実施形態を記載する目的のみであり、限定されることを意図しないことも理解される。

【0025】

付加的に、本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が他を明確に記す場合を除いて複数の参照物を含む。したがって、例えば「1つのポア(a pore)」を参照することは2つ以上のそのようなポアを含み、「1つのヘリカーゼ(a helicase)」を参照することは2つ以上そのようなヘリカーゼを含み、「1つのポリヌクレオチド(a polynucleotide)」を参照することは2つ以上のそのようなポリヌクレオチドを含むなど。10

【0026】

本明細書に引用する全ての刊行物、特許および特許出願は(上記または下記に関わらず)それら全体が参考により本明細書に組み込まれる。

【0027】

本発明のHe1308法

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するための方法を提供する。方法は、標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよびHe1308ヘリカーゼと接触させて、ヘリカーゼがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するようにするステップを含む。次いで、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を、当技術分野において公知の標準的方法を用いて測定する。ステップ(a)および(b)は、好ましくはポアに電位が印加されて実行される。下により詳細に考察されるとおり、印加された電位は、ポアとヘリカーゼとの複合体の形成を典型的には生じる。印加された電位は、電圧電位であってよい。代替的に印加された電位は、化学電位であってよい。この一例は、脂質膜全体に塩勾配を用いている。塩勾配は、Holdenら、J Am Chem Soc. 2007 Jul 11;129(27):8650-5に開示されている。20

【0028】

いくつかの場合では、1つまたは複数の相互作用の間にポアを通過する電流が、標的ポリヌクレオチドの配列を決定するために用いられる。これは鎖配列決定である。

【0029】

本方法は、いくつかの利点を有する。第一に、本発明者らは驚くべきことに、He1308ヘリカーゼが驚くべき高い耐塩性を有し、それにより本発明の方法が高塩濃度で実行され得ることを示した。鎖配列決定の内容では、標的ポリヌクレオチドを捕捉および移行するためならびにポリヌクレオチドがポアを通るときに生じる配列依存性電流変化を測定するために電圧オフセットを印加するための導電性溶液を作製するために、塩などの電荷担体が必要である。測定シグナルが塩の濃度に依存することから、得られるシグナルの振幅を増大させるために高塩濃度を用いることは有利である。高塩濃度は、高い信号対雑音比を提供し、通常の電流変動のバックグラウンドに対してヌクレオチドの存在を示す電流が同定されるようになる。鎖配列決定のために、100mMを超える塩濃度は理想的であり、1M以上の塩濃度は好ましい。本発明者らは、He1308ヘリカーゼが例えれば2Mの高い塩濃度で有效地に機能することを驚くべきことに示した。40

【0030】

第二に、電圧が印加されるとHe1308ヘリカーゼは、標的ポリヌクレオチドを2方向に(すなわち印加された電圧から生じる場に沿ってまたは反対に)驚くべきことに移動させ得る。したがって、本発明の方法は、2つの好ましいモードの内の1つで実行し得る。標的ポリヌクレオチドがポアを通って移動する方向(すなわち場の方向または反対)に依存して異なるシグナルが得られる。これは下により詳細に考察される。

【0031】

第三に、He1308ヘリカーゼは、ポアを通る標的ポリヌクレオチドを典型的には一度に1ヌクレオチドを移動させる。したがって、He1308ヘリカーゼは単一塩基ラチ50

エットのように機能できる。標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの全てではないが、実質的に全てがポアを用いて同定され得ることから、当然ながらこれは標的ポリヌクレオチドを配列決定する場合に有利である。

【0032】

第四に、He1308ヘリカーゼは、1本鎖ポリヌクレオチドおよび2本鎖ポリヌクレオチドの移動を制御できる。これは、種々の異なる標的ポリヌクレオチドが本発明により特性付けられ得ることを意味する。

【0033】

第五に、He1308ヘリカーゼは、印加された電圧から生じる場に非常に耐性があると考えられる。本発明者らは、「アンジッピング」条件下のポリヌクレオチドの非常に小さな移動を観察している。これは、印加された電圧から生じる場と反対にポリヌクレオチドが移動する場合に望まれない「逆」移動由来の複雑化要因がないことを意味することから重要である。10

【0034】

第六に、He1308ヘリカーゼは、生成が容易で、扱いが容易である。したがってそれらの使用は、配列決定の簡単でより費用のかからない方法に寄与する。

【0035】

本発明の方法は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのものである。核酸などのポリヌクレオチドは、2個以上のヌクレオチドを含む巨大分子である。ポリヌクレオチドまたは核酸は、任意のヌクレオチドの任意の組合せを含み得る。ヌクレオチドは、天然に存在するものまたは人工的であってよい。標的ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、酸化またはメチル化し得る。標的ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、損傷をうけ得る。標的ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、例えば標識またはタグで修飾し得る。標的ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のスペーサーを含み得る。20

【0036】

ヌクレオチドは、典型的には、核酸塩基、糖および少なくとも1つのリン酸基を含有する。核酸塩基は典型的には複素環である。核酸塩基は、これだけに限らないがプリンおよびピリミジンならびにより具体的にはアデニン、グアニン、チミン、ウラシルおよびシトシンを含む。糖は典型的には五炭糖である。ヌクレオチド糖は、これだけに限らないがリボースおよびデオキシリボースを含む。ヌクレオチドは、典型的にはリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドは典型的には一リン酸、二リン酸または三リン酸を含有する。リン酸は、ヌクレオチドの5'または3'側に付着できる。30

【0037】

ヌクレオチドは、これだけに限らないがアデノシン一リン酸(AMP)、グアノシン一リン酸(GMP)、チミジン一リン酸(TMP)、ウリジン一リン酸(UMP)、シチジン一リン酸(CMP)、環状アデノシン一リン酸(cAMP)、環状グアノシン一リン酸(cGMP)、デオキシアデノシン一リン酸(dAMP)、デオキシグアノシン一リン酸(dGMP)、デオキシチミジン一リン酸(dTMP)、デオキシリジン一リン酸(dUMP)およびデオキシチジン一リン酸(dCMP)を含む。ヌクレオチドは、好ましくはAMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTDP、dGMPまたはdCMPから選択される。40

【0038】

ヌクレオチドは、塩基を持たない場合がある(すなわち核酸塩基を欠失している)。

【0039】

ポリヌクレオチドは、1本鎖または2本鎖であってよい。ポリヌクレオチドの少なくとも一部は、好ましくは2本鎖である。

【0040】

ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)などの核酸であってよい。標的ポリヌクレオチドは、DNAの1本鎖にハイブリダイズしたRNA50

の1本鎖を含む場合がある。ポリヌクレオチドは、ペプチド核酸(PNA)、グリセロール核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、ロックド核酸(LNA)またはヌクレオチド側鎖を有する他の合成ポリマーなどの当技術分野において公知の任意の合成核酸であってよい。

【0041】

標的ポリヌクレオチドの全体または部分だけは、本方法を用いて特性付けられ得る。標的ポリヌクレオチドは、任意の長さであってよい。例えばポリヌクレオチドは、長さ少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも400または少なくとも500ヌクレオチド対であってよい。ポリヌクレオチドは、1000ヌクレオチド対以上、長さ500ヌクレオチド対以上または長さ100000ヌクレオチド対以上であってよい。10

【0042】

標的ポリヌクレオチドは、任意の好適な試料中に存在する。本発明は、標的ポリヌクレオチドを含有することが公知であるまたは含有すると考えられる試料について典型的には実行される。代替的に本発明は、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドの同一性を確認するために試料中のその存在が公知であるまたは期待される試料について実行し得る。

【0043】

試料は生物学的試料であってよい。本発明は、任意の生物または微生物から得られたまたは抽出された試料についてin vitroで実行されてよい。生物または微生物は典型的には始生代のもの、原核性または真核性であり、典型的には五界：植物界、動物界、菌界、モネラ界および原生生物界に属する。本発明は、任意のウイルスから得られたまたは抽出された試料についてin vitroで実行されてよい。試料は、好ましくは液体試料である。試料は典型的には、患者の体液を含む。試料は尿、リンパ液、唾液、粘液または羊水であってよいが、好ましくは血液、血漿または血清である。典型的には試料は、ヒト由来であるが、代替的に、ウマ、ウシ、ヒツジまたはブタなどの商業的に飼育される動物由来などの別の哺乳動物由来であってもよく、代替的にネコまたはイヌなどの愛玩動物であってもよい。代替的に植物由来の試料は、穀類、マメ、果実または野菜などの商品作物（例えばコムギ、オオムギ、カラスムギ、セイヨウアブラナ、トウモロコシ、ダイズ、イネ、バナナ、リンゴ、トマト、ジャガイモ、ブドウ、タバコ、マメ、レンズマメ、サトウキビ、ココア、ワタ）から典型的には得られる。2030

【0044】

試料は、非生物学的試料であってよい。非生物学的試料は、好ましくは液体試料である。非生物学的試料の例は、手術用液(surgical fluids)、水(飲料水、海水または河川水など)および検査室検査のための試薬を含む。

【0045】

試料は、典型的にはアッセイされる前に例えば遠心分離によってまたは、不要の分子または細胞(赤血球細胞など)をろ過して除く膜を通すことによって処理される。試料は採取されてから直ちに測定されてよい。試料は、典型的にはアッセイの前に好ましくは-70より低くで、保存されてもよい。40

【0046】

膜貫通ポアは、水和イオンが印加された電位によって膜の一方の側から膜の他方の側へ流れるように駆動されるようにする構造である。

【0047】

任意の膜が本発明により用いられ得る。好適な膜は、当技術分野において周知である。膜は、好ましくは両親媒性層である。両親媒性層は、親水性および親油性特性の両方を有するリン脂質などの両親媒性分子から形成される層である。両親媒性層は、単層または二重層であってよい。

【0048】

膜は、好ましくは脂質二重層である。脂質二重層は細胞膜のモデルであり、さまざまな実験研究のための優れたプラットフォームとして役立つ。例えば、脂質二重層は、单一チ50

ヤネル記録による膜タンパク質の *in vitro* 調査のために用いられ得る。代替的に脂質二重層は、さまざまな物質の存在を検出するためのバイオセンサーとして用いられ得る。脂質二重層は、任意の脂質二重層であつてよい。好適な脂質二重層は、これだけに限らないが平面状脂質二重層、支持された二重層またはリポソームを含む。脂質二重層は好ましくは平面状脂質二重層である。好適な脂質二重層は、国際出願第 PCT / GB 08 / 000563号 (WO 2008 / 102121として公開)、国際出願第 PCT / GB 08 / 004127号 (WO 2009 / 077734として公開) および国際出願第 PCT / GB 2006 / 001057号 (WO 2006 / 100484として公開) に開示されている。

【0049】

10

脂質二重層を形成するための方法は、当技術分野において公知である。好適な方法は実施例に開示する。脂質二重層は、脂質单層が水溶液 / 空気界面にその界面に垂直である開口部のいずれかの端を通って運ばれる、モンタルおよびミューラーの方法 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、1972;69:3561-3566) によって一般的には形成される。

【0050】

モンタルおよびミューラーの方法は、タンパク質ポア挿入のために好適である良質な脂質二重層を形成する対費用効果が高くて比較的簡単な方法であることから一般的である。二重層形成の他の一般的方法は、チップディッピング、ペインティング二重層およびリポソーム二重層のパッチクランピングを含む。

【0051】

20

好ましい実施形態では、脂質二重層は国際出願第 PCT / GB 08 / 004127号 (WO 2009 / 077734として公開) に記載のとおり形成される。

【0052】

別の好ましい実施形態では、膜は、ソリッドステート層である。ソリッドステート層は生物由来ではない。換言すると、ソリッドステート層は、生物または細胞などの生物学的環境由来でなく、またはそれから単離されず、生物学的に入手可能な構造の合成的に製造されたバージョンでもない。ソリッドステート層は、これだけに限らないがミクロ電子材料、Si₃N₄、Al₂O₃ および SiOなどの絶縁材料、ポリアミドなどの有機および無機ポリマー、Teflon (登録商標) などのプラスチックまたは2要素添加硬化シリコンゴム (two-component addition-cure silicone rubber) などのエラストマーならびにガラスを含む有機材料ならびに無機材料の両方から形成され得る。ソリッドステート層は、グラフェン (graphene) などの一原子層からまたは数原子厚だけである層から形成され得る。好適なグラフェン (graphene) 層は、国際出願第 PCT / US 2008 / 010637号 (WO 2009 / 035647として公開) に開示されている。

30

【0053】

方法は、(i) ポアを含む人工二重層、(ii) ポアを含む単離された天然に存在する脂質二重層、または(iii) 挿入されたポアを有する細胞を用いて典型的には実行される。方法は、人工脂質二重層を用いて好ましくは実行される。二重層は、ポアに加えて他の膜貫通タンパク質および / または膜内タンパク質ならびに他の分子を含んでもよい。好適な装置および条件は、下に考察される。本発明の方法は、典型的には *in vitro* で実行される。

40

【0054】

ポリヌクレオチドは、膜にカップリングされ得る。これは、任意の公知の方法を用いてされ得る。膜が脂質二重層などの両親媒性層である場合は (下に詳細に考察されるとおり)、ポリヌクレオチドは、膜に存在するポリペプチドまたは膜に存在する疎水性アンカーを介して膜に好ましくはカップリングされる。疎水性アンカーは、好ましくは脂質、脂肪酸、ステロール、カーボンナノチューブまたはアミノ酸である。

【0055】

ポリヌクレオチドは膜に直接カップリングされ得る。ポリヌクレオチドは好ましくは膜にリンカーを介してカップリングされる。好ましいリンカーは、これだけに限らないがボ

50

リヌクレオチド、ポリエチレングリコール(PEG)およびポリペプチドなどのポリマーを含む。ポリヌクレオチドが膜に直接カップリングされる場合、膜とヘリカーゼとの間の距離のためにポリヌクレオチドの末端まで特性決定が継続できないことから、いくらかのデータが失われる。リンカーが用いられる場合、ポリヌクレオチドは完了まで処理され得る。リンカーが用いられる場合、リンカーはポリヌクレオチドの任意の位置に付着され得る。リンカーは、テールポリマーでポリヌクレオチドに好ましくは付着される。

【0056】

カップリングは、安定または一過的であってよい。ある種の応用に関してカップリングの一過的な性質は好ましい。安定カップリング分子がポリヌクレオチドの5'末端または3'末端のいずれかに直接付着された場合、二重層とヘリカーゼ活性部位との間の距離のためにポリヌクレオチドの末端まで特性決定が継続できないことから、いくらかのデータが失われる。カップリングが一過的である場合、カップリングされた端は無作為に二重層から遊離し、ポリヌクレオチドは完了まで処理され得る。安定なまたは一過的連結を膜と形成する化学基は、下により詳細に考察される。ポリヌクレオチドは、コレステロール(cholesterol)または脂肪酸アシル鎖を用いて両親媒性層または脂質二重層に一過的にカップリングされ得る。ヘキサデカン酸などの長さ6から30までの炭素原子を有する任意の脂肪酸アシル鎖は用いられ得る。

10

【0057】

好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドは、脂質二重層にカップリングされる。合成脂質二重層へのポリヌクレオチドのカップリングは、種々の異なるテザーリング戦略で既に実行されている。これらを下の表1に要約する。

20

【0058】

【表1】

表1

付着基	カップリングの種類	参考文献
チオール	安定	Yoshina-Ishii,C.およびS.G.Boxer(2003)."Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers." <i>J Am Chem Soc</i> 125 (13):3696-7
ビオチン	安定	Nikolov,V.,R.Lipowskyら、(2007)."Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules." <i>Biophys J</i> 92 (12):4356-68
コレステロール	一過的	Pfeiffer,I.およびF.Hook(2004)."Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies." <i>J Am Chem Soc</i> 126 (33):10224-5
脂質	安定	van Lengerich,B.,R.J.Rawleら、"Covalent attachment of lipid vesicles to a fluid-supported bilayer allows observation of DNA-mediated vesicle interactions." <i>Langmuir</i> 26 (11):8666-72

30

【0059】

ポリヌクレオチドは、合成反応において修飾ホスホラミダイトを用いて官能基化されることができる、チオール、コレステロール、脂質およびビオチン基などの反応基の付加に容易に適合される。これらのさまざまな付着化学物質は、ポリヌクレオチドに一連の付着選択肢をもたらす。さまざまな各修飾基は、わずかに異なる方法でポリヌクレオチドを繋ぎ止め、カップリングは常に永久的ではなく、二重層へのさまざまな残存時間をポリヌクレオチドにもたらす。一過的カップリングの有利点は、上に考察される。

40

【0060】

ポリヌクレオチドのカップリングは、反応基がポリヌクレオチドに付加され得る限り多数の他の手段によっても達成され得る。DNAのいずれかの端への反応基の付加は既に報告されている。チオール基はポリヌクレオチドキナーゼおよびATP-Sを用いてssDNAの5'に付加され得る(Grant,G.P.およびP.Z.Qin (2007) "A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5' terminus of nucleic acids." *Nucleic Acids*

50

Res 35(10):e77)。ビオチン、チオールおよびフルオロフォア (fluorophore) などの化学基のより多様な選択は、修飾オリゴヌクレオチドを s s D N A の 3' に組み込むためにターミナルトランスフェラーゼを用いて付加し得る(Kumar,A.,P.Tchenら、(1988)."Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase." Anal Biochem 169(2):376-82)。

【0061】

代替的に反応基は、二重層に既にカップリングされたものに相補的な D N A の短片の付加のために考慮される場合があり、付着はハイブリダイゼーションを介して達成し得る。s s D N A の短片のライゲーションは、T 4 R N A リガーゼ I を用いて報告されている(Troutt,A.B.,M.G.McHeyzer-Williamsら、(1992)."Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity." Proc Natl Acad Sci U S A 89(20):9823-5)。代替的に s s D N A または d s D N A のいずれかは、天然 d s D N A にライゲーションすることができ、次いで 2 本鎖は熱的または化学的変性によって分離された。天然 d s D N A について、s s D N A の 1 片を二重鎖の 1 つもしくは両方の端に、または d s D N A を 1 つまたは両方の端へのいずれかで付加できる。次いで、二重鎖が融解される際に、s s D N A が 5' 末端、3' 末端もしくは両端でのライゲーションもしくは修飾のために用いられ、d s D N A がライゲーションのために用いられた場合、各一重鎖は 5' または 3' 修飾のいずれかを有する。ポリヌクレオチドが合成鎖である場合、カップリング化学はポリペプチドの化学合成の際に組み込まれ得る。例えばポリヌクレオチドは、反応基が付着されたプライマーを用いて合成され得る。10

【0062】

ゲノム D N A のセクションの増幅のための一般的な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いている。本明細書では、2 個の合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて D N A の同じセクションの多数の複製物が作製される場合があり、各複製物について二重鎖中の各鎖の 5' は合成ポリヌクレオチドである。コレステロール、チオール、ビオチンまたは脂質などの反応基を有するアンチセンスプライマーを用いるステップによって、増幅された標的 D N A の各複製物は、カップリングのための反応基を含有する。20

【0063】

膜貫通ポアは、好ましくは膜貫通タンパク質ポアである。膜貫通タンパク質ポアは、分析物などの水和イオンが膜の一方の側から膜の他方の側へ流れるようにするポリペプチドまたはポリペプチドの集積物である。本発明では膜貫通タンパク質ポアは、水和イオンが印加された電位によって膜の一方の側から他方へ流れるように駆動されるようにするポアを形成できる。膜貫通タンパク質ポアは、ヌクレオチドなどの分析物が膜（脂質二重層など）の一方の側から他方へ流れるように好ましくはする。膜貫通タンパク質ポアは、D N A または R N A などのポリヌクレオチドがポアを通って移動されることを可能にする。30

【0064】

膜貫通タンパク質ポアは、単量体またはオリゴマーであってよい。ポアは、いくつかの反復サブユニット (6、7 または 8 サブユニット) から好ましくは作られる。ポアはより好ましくは七量体または八量体ポアである。

【0065】

膜貫通タンパク質ポアは、イオンが通って流れることができるバレルまたはチャネルを典型的には含む。ポアのサブユニットは、典型的には中央軸を取り囲み、膜貫通 バレルもしくはチャネルまたは膜貫通 ヘリックス束もしくはチャネルに鎖を供する。40

【0066】

膜貫通タンパク質ポアのバレルまたはチャネルは、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸などの分析物との相互作用を促進するアミノ酸を典型的には含む。これらのアミノ酸は、バレルまたはチャネルの狭窄部付近に好ましくは位置する。膜貫通タンパク質ポアは、アルギニン、リシンもしくはヒスチジンなどの 1 つもしくは複数の正に荷電したアミノ酸またはチロシンもしくはトリプトファンなどの芳香族アミノ酸を典型的には含む。これらのアミノ酸は、ポアとヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸との間の相互作50

用を典型的には促進する。

【0067】

本発明による使用のための膜貫通タンパク質ポアは、 β -バレルポアまたは β -ヘリックス束ポアから生じ得る。 β -バレルポアは、 β -鎖から形成されるバレルまたはチャネルを含む。好適な β -バレルポアは、これだけに限らないが、 β -ヘモリジン(hemolysin)、炭疽毒素およびロイコシジン(leukocidin)などの β -毒素、スメグマ菌(Mycobacterium smegmatis)ポリン(porin)(Msp)、例えばMspA、外膜ポリン(porin)F(OmpF)、外膜ポリン(porin)G(OmpG)、外膜ホスホリバーゼAおよびナイセリア(Neisseria)オートトランスポーターリポタンパク質(NalP)などの細菌の外膜タンパク質/ポリン(porin)を含む。 β -ヘリックス束ポアは、 β -ヘリックスから形成されたバレルまたはチャネルを含む。好適な β -ヘリックス束ポアは、これだけに限らないが内膜タンパク質ならびに、WZAおよびC1yA毒などの外膜タンパク質を含む。膜貫通ポアは、Msp由来または β -ヘモリジン(β -HL)由来である場合がある。

【0068】

膜貫通タンパク質ポアは、好ましくはMspに由来し、好ましくはMspAに由来する。そのようなポアはオリゴマーであり、典型的にはMsp由来の7、8、9または10個の単量体を含む。ポアは、同一の単量体を含むMsp由来のホモオリゴマーポアであってよい。代替的にポアは、少なくとも1個の他とは異なる単量体を含むMsp由来のヘテロオリゴマーポアであってもよい。好ましくはポアは、MspAまたはその相同体もしくはパラログ由来である。

【0069】

Msp由来の単量体は、配列番号2に示す配列またはその変種を含む。配列番号2はMspA単量体のMS-(B1)8変異体である。それは次の変異:D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139Kを含む。配列番号2の変種は、配列番号2のものから変化し、ポアを形成する能力を保持しているアミノ酸配列を有するポリペプチドである。ポアを形成する変種の能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてアッセイし得る。例えば変種は、他の適切なサブユニットと共に脂質二重層に挿入されることができ、ポアを形成するためにオリゴマー化するその能力を測定し得る。サブユニットを脂質二重層などの膜に挿入するための方法は、当技術分野において公知である。例えばサブユニットは、脂質二重層に拡散し、脂質二重層に結合するステップおよび機能的状態に会合するステップによって挿入されるように脂質二重層を含有する溶液中に精製された形態で懸濁し得る。代替的にサブユニットは、M.A.Holden,H.Bayley,J.Am.Chem.Soc.2005, 127, 6502-6503および国際出願第PCT/GB2006/001057号(WO2006/100484として公開)に記載の「ピックアンドプレース」法を用いて膜に直接挿入し得る。

【0070】

配列番号2のアミノ酸配列の全長にわたって変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも50%相同である。より好ましくは変種は、配列全体にわたって配列番号2のアミノ酸配列にアミノ酸同一性に基づいて少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同である。少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性が100以上(例えば125、150、175もしくは200またはそれ以上)のストレッチの連続アミノ酸にわたってある場合がある(「高い相同性」)。

【0071】

相同性を決定するために当技術分野における標準的方法が用いられ得る。例えばUWGCGパッケージは、相同性を算出するために用いられ得るBESTFITプログラム(例えばその初期設定で用いられる)を提供する(Devereuxら、(1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395頁)。PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは、相同性を算出す

るためまたは配列を列挙するために（等価残基または対応する配列を同定するステップなど（典型的にはその初期設定で））用いられ得る、例えばAltschul S.F.(1993)J Mol Evol 36:290-300 ; Altschul,S.Fら、(1990) J Mol Biol 215:403-10に記載のとおり。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて公開で入手可能である。

【0072】

配列番号2は、MspA単量体のMS-(B1)8変異体である。変種は、MspAと比較してMspB、CまたはD単量体中の任意の変異を含み得る。MspB、CおよびDの成熟形態は配列番号5から7に示される。詳細には変種は、MspBに存在する次の置換：A138Pを含む場合がある。変種は、MspCに存在する次の置換：A96G、N102EおよびA138Pの1つまたは複数を含む場合がある。変種はMspDに存在する次の置換：G1の欠失、L2V、E5Q、L8V、D13G、W21A、D22E、K47T、I49H、I68V、D91G、A96Q、N102D、S103T、V104I、S136KおよびG141Aの1つまたは複数を含む場合がある。変種は、MspB、CおよびD由来の1つまたは複数の変異および置換の組合せを含み得る。変種は、好ましくは変異L88Nを含む。配列番号2の変種は、MS-B1の全変異に加えて変異L88Nを有し、MS-B2と称される。本発明において用いられるポアは、好ましくはMS-(B2)8である。

【0073】

アミノ酸置換は、上に考察したものに加えて配列番号2のアミノ酸配列に作出し得る（例えば1、2、3、4、5、10、20または30置換まで）。保存的置換は、アミノ酸を同様の化学構造、同様の化学的特性または同様の側鎖容積を有する他のアミノ酸で置き換える。導入されるアミノ酸は、それらが置き換えるアミノ酸と同様の極性、親水性、疎水性、塩基性度、酸性度、中性度または電荷を有してよい。代替的に保存的置換は、既存の芳香族または脂肪族アミノ酸の代わりに芳香族または脂肪族である別のアミノ酸を導入する場合がある。保存的アミノ酸変更は、当技術分野において周知であり、下の表2に定義のとおり20種の主なアミノ酸の特性に従って選択し得る。アミノ酸が同様の極性を有する場合、これは表3におけるアミノ酸側鎖についてのハイドロパシースケールを参照することによっても決定し得る。

【0074】

【表2】

表2-アミノ酸の化学的特性

Ala	脂肪族、疎水性、中性	Met	疎水性、中性
Cys	極性、疎水性、中性	Asn	極性、親水性、中性
Asp	極性、親水性、荷電(-)	Pro	疎水性、中性
Glu	極性、親水性、荷電(-)	Gln	極性、親水性、中性
Phe	芳香族、疎水性、中性	Arg	極性、親水性、荷電(+)
Gly	脂肪族、中性	Ser	極性、親水性、中性
His	芳香族、極性、親水性、荷電(+)	Thr	極性、親水性、中性
Ile	脂肪族、疎水性、中性	Val	脂肪族、疎水性、中性
Lys	極性、親水性、荷電(+)	Trp	芳香族、疎水性、中性
Leu	脂肪族、疎水性、中性	Tyr	芳香族、極性、疎水性

10

20

30

40

50

【0075】

【表3】

表3-ハイドロパシースケール

側鎖	ハイドロパシー	
Ile	4.5	
Val	4.2	
Leu	3.8	
Phe	2.8	
Cys	2.5	10
Met	1.9	
Ala	1.8	
Gly	-0.4	
Thr	-0.7	
Ser	-0.8	
Trp	-0.9	
Tyr	-1.3	
Pro	-1.6	
His	-3.2	
Glu	-3.5	
Gln	-3.5	
Asp	-3.5	20
Asn	-3.5	
Lys	-3.9	
Arg	-4.5	

【0076】

配列番号2のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸残基は、上に記載のポリペプチドから追加的に欠失し得る。1、2、3、4、5、10、20または30残基までまたはそれ以上を欠失し得る。

【0077】

変種は、配列番号2の断片を含み得る。そのような断片は、ポア形成活性を保持する。断片は、長さ少なくとも50、100、150または200アミノ酸であってよい。そのような断片は、ポアを生成するために用いられ得る。断片は、配列番号2のポア形成ドメインを好ましくは含む。断片は、配列番号2の残基88、90、91、105、118および134の1つを含まなければならない。典型的には断片は、配列番号2の残基88、90、91、105、118および134の全てを含む。

【0078】

1つまたは複数のアミノ酸は、上に記載のポリペプチドに代替的または追加的に付加し得る。伸長は、配列番号2のアミノ酸配列またはそのポリペプチド変種もしくは断片のアミノ末端またはカルボキシ末端に与えられ得る。伸長は極めて短い（例えば長さ1から10アミノ酸）場合がある。代替的に伸長はより長くても（例えば50または100アミノ酸まで）よい。担体タンパク質は、本発明によるアミノ酸配列に融合し得る。他の融合タンパク質は、下により詳細に考察される。

【0079】

上に考察したとおり変種は、配列番号2から変更され、ポアを形成する能力を保持しているアミノ酸配列を有するポリペプチドである。変種は、ポア形成に関与する配列番号2の領域を典型的には含有する。-バレルを含有するMspのポア形成能力は、各サブユニットのシートによって与えられる。配列番号2の変種は、-シートを形成する配列番号2中の領域を典型的には含む。1つまたは複数の修飾が、得られる変種がポアを形成する能力を保持する限り、-シートを形成する配列番号2の領域に作出され得る。配列番号2の変種は、置換、付加または欠失などの1つまたは複数の修飾を-ヘリックスおよび/またはループ領域内に好ましくは含む。

10

20

30

40

50

【0080】

Msp由来の単量体は、それらの同定または精製を支援するために、例えばヒスチジン残基(histタグ)、アスパラギン酸残基(asptタグ)、ストレプトアビジンタグもしくはフラッグタグの付加によって、または(細胞からのそれらの分泌を促進するためのシグナル配列の付加によってポリペプチドが天然でそのような配列を含有しない場合に)修飾し得る。遺伝子タグを導入するための別法は、ポア上の天然のまたは操作された位置にタグを化学的に反応させることである。この例は、ポアの外側に操作されたシステインにゲルシフト試薬を反応させることである。これは、ヘモリジンヘテロオリゴマーを分離するステップのための方法として実証されている(Chem Biol. 1997 Jul;4(7):497-505)。

10

【0081】

Msp由来の単量体は、明示標識(revealing label)で標識し得る。明示標識は、ポアが検出されるようにする任意の好適な標識であってよい。好適な標識は、これだけに限らないが蛍光分子、放射性同位元素(例えば¹²⁵I、³⁵S)、酵素、抗体、抗原、ボリヌクレオチドおよびリガンド(ビオチンなど)を含む。

【0082】

Msp由来の単量体は、D-アミノ酸を用いても生成し得る。例えばMsp由来の単量体は、L-アミノ酸とD-アミノ酸との混合物を含み得る。これは、そのようなタンパク質またはペプチドを生成するための当技術分野における従来法である。

【0083】

Msp由来の単量体は、ヌクレオチド識別を促進するために1つまたは複数の特異的修飾を含有する。Msp由来の単量体は、他の非特異的な修飾をそれらがポア形成を干渉しない限り含有できる。多数の非特異的側鎖修飾が当技術分野において公知であり、Msp由来の単量体の側鎖に作出し得る。そのような修飾は、例えばアルデヒドとの反応に続くNaBH₄での還元によるアミノ酸の還元的アルキル化、メチルアセトイミダート(methylacetimidate)でのアミジン化または無水酢酸でのアシル化を含む。

20

【0084】

Msp由来の単量体は、当技術分野において公知の標準的方法を用いて生成し得る。Msp由来の単量体は、合成的にまたは組換え手段によって作出し得る。例えばポアはin vitro翻訳および転写(I V T T)によって合成し得る。ポアを生成するため的好適な方法は、国際出願第PCT/GB09/001690号(WO2010/004273として公開)、第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)または第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)に考察されている。ポアを膜に挿入するための方法は考察されている。

30

【0085】

膜貫通タンパク質ポアは、好ましくは-ヘモリジン(-HL)由来でもある。野生型- HLポアは、7個の同一単量体またはサブユニットから形成される(すなわち七量体である)。-ヘモリジン- NNの1個の単量体またはサブユニットの配列は配列番号4に示されている。膜貫通タンパク質ポアは、配列番号4に示す配列またはその変種をそれぞれ含む7個の単量体を好ましくは含む。配列番号4のアミノ酸1、7から21、31から34、45から51、63から66、72、92から97、104から111、124から136、149から153、160から164、173から206、210から213、217、218、223から228、236から242、262から265、272から274、287から290および294はループ領域を形成する。配列番号4の残基113および147は- HLのバレルまたはチャネルの狭窄の一部を形成する。

40

【0086】

そのような実施形態では、配列番号4に示す配列またはその変種をそれぞれ含む7個のタンパク質または単量体を含むポアは、本発明の方法において好ましくは用いられる。7個のタンパク質は、同じ(ホモ七量体)または異なっていて(ヘテロ七量体)よい。

【0087】

50

配列番号4の変種は、配列番号4のものから変化したアミノ酸配列を有し、ポア形成能力を保持しているタンパク質である。ポアを形成する変種の能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてアッセイし得る。例えば変種は、他の適切なサブユニットと共に脂質二重層に挿入されることができ、ポアを形成するためにオリゴマー化するその能力を決定し得る。サブユニットを脂質二重層などの膜に挿入するための方法は当技術分野において公知である。好適な方法は上に考察されている。

【0088】

変種は、ヘリカーゼへの共有結合付着または相互作用を促進する修飾を含み得る。変種は、ヘリカーゼへの付着を促進する1つまたは複数の反応性システイン残基を好ましくは含む。例えば変種は、配列番号4の位置8、9、17、18、19、44、45、50、51、237、239および287ならびに/またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端の1つまたは複数にシステインを含み得る。好ましい変種は、配列番号4の位置8、9、17、237、239および287の残基のシステインでの置換を含む(A8C、T9C、N17C、K237C、S239CまたはE287C)。変種は、好ましくは国際出願第PCT/GB09/001690号(WO2010/004273として公開)、第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)、または第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)に記載の変種のいずれか1つである。

【0089】

変種は、ヌクレオチドとの任意の相互作用を促進する修飾も含み得る。

20

【0090】

変種は、生物(例えば細菌ブドウ球菌(*Staphylococcus*))によって天然で発現される天然に存在する変種であってよい。代替的に変種は、大腸菌(*Escherichia coli*)などの細菌によって*in vitro*または組換え的に発現されてもよい。変種は、組換え技術によって生成される天然に存在しない変種も含む。配列番号4のアミノ酸配列の全長にわたって変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも50%相同である。より好ましくは変種ポリペプチドは、配列全体にわたって配列番号4のアミノ酸配列にアミノ酸同一性に基づいて少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同である。少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性が200以上(例えば230、250、270もしくは280またはそれ以上)のストレッチの連続アミノ酸にわたってある場合がある(「高い相同性」)。相同性は上に考察のとおり決定し得る。

30

【0091】

アミノ酸置換は、上に考察したものに加えて配列番号4のアミノ酸配列に作出し得る(例えば1、2、3、4、5、10、20または30置換まで)。保存的置換は、上に考察の通り作出し得る。

【0092】

配列番号4のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸残基は、上に記載のポリペプチドから追加的に欠失され得る。1、2、3、4、5、10、20または30残基までまたはそれ以上を欠失し得る。

40

【0093】

変種は、配列番号4の断片であり得る。そのような断片はポア形成能力を保持する。断片は、長さ少なくとも50、100、200または250アミノ酸であってよい。断片は、配列番号4のポア形成ドメインを好ましくは含む。断片は典型的には配列番号4の残基119、121、135、113および139を含む。

【0094】

1つまたは複数のアミノ酸は、上に記載のポリペプチドに代替的にまたは追加的に付加し得る。伸長は、配列番号4のアミノ酸配列またはその変種もしくは断片のアミノ末端ま

50

たはカルボキシ末端に与えられ得る。伸長は極めて短い（例えば長さ1から10アミノ酸）場合がある。代替的に伸長は、より長くても（例えば50または100アミノ酸まで）良い。担体タンパク質は、ポアまたは変種に融合されてもよい。

【0095】

上に考察したとおり、配列番号4の変種は、配列番号4のものから変更され、ポアを形成する能力を保持しているアミノ酸配列を有するサブユニットである。変種は、ポア形成に関する配列番号4の領域を典型的には含有する。-バレルを含有する-HLのポア形成能力は、各サブユニットのシートによって与えられる。配列番号4の変種は、鎖を形成する配列番号4の領域を典型的には含む。鎖を形成する配列番号4のアミノ酸は上に考察されている。1つまたは複数の修飾は、得られる変種がポアを形成する能力を保持する限り-鎖を形成する配列番号4の領域に作出し得る。配列番号4の鎖領域に作られ得る具体的な修飾は、上に考察されている。10

【0096】

配列番号4の変種は、置換、付加または欠失などの1つまたは複数の修飾を-ヘリックスおよび/またはループ領域内に好ましくは含む。-ヘリックスおよびループを形成するアミノ酸は、上に考察されている。

【0097】

変種は、上に考察のとおり、その同定または精製を支援するために修飾し得る。

【0098】

-HL由来のポアは、MSP由来のポアに関連して上に考察のとおり作出し得る。20

【0099】

いくつかの実施形態では膜貫通タンパク質ポアは、化学的に修飾される。ポアは、任意の方法および任意の部位で化学的に修飾し得る。膜貫通タンパク質ポアは、1つもしくは複数のシステインへの分子の付着（システイン連結）、1つもしくは複数のリシンへの分子の付着、1つもしくは複数の非天然アミノ酸への分子の付着、エピトープの酵素修飾または末端の修飾によって好ましくは化学的に修飾される。そのような修飾を実行するための好適な方法は、当技術分野において周知である。膜貫通タンパク質ポアは、任意の分子の付着によって化学的に修飾され得る。例えばポアは、色素またはフルオロフォアの付着によって化学的に修飾し得る。

【0100】

ポア中の任意の数の単量体は、化学的に修飾し得る。1つまたは複数（2、3、4、5、6、7、8、9または10個など）の単量体は、上に考察のとおり好ましくは化学的に修飾される。30

【0101】

システイン残基の反応性は、隣接残基の修飾によって増強し得る。例えば近接アルギニン、ヒスチジンまたはリシン残基の塩基性基は、システインチオール基のpKaをより反応性のS-基のものに変化させる。システイン残基の反応性は、dTNBなどのチオール保護基によって保護し得る。これらは、リンカーが付着する前にポアの1つまたは複数のシステイン残基と反応できる。

【0102】

（ポアが化学的に修飾される）分子は、国際出願第PCT/GB09/001690号（WO2010/004273として公開）、第PCT/GB09/001679号（WO2010/004265として公開）または第PCT/GB10/000133号（WO2010/086603として公開）に開示のとおりポアに直接付着し得るか、またはリンカーを介して付着し得る。40

【0103】

本発明に従って、任意のHe1308ヘリカーゼを使用し得る。He1308ヘリカーゼはsk12様ヘリカーゼとしても公知であり、2つの用語は互換的に用いられ得る。

【0104】

He1308ヘリカーゼは、アミノ酸モチーフQ-X1-X2-G-R-A-G-R（50

本明細書以下で H e l 3 0 8 モチーフと称する；配列番号 8) を典型的には含む。 H e l 3 0 8 モチーフは、典型的にはヘリカーゼモチーフ V I の部分である (Tuteja and Tuteja, Eur.J.Biochem.271 1849-1863(2004)) 。 X 1 は、 C 、 M または L であってよい。 X 1 は、好ましくは C である。 X 2 は、任意のアミノ酸残基であってよい。 X 2 は、典型的には疎水性または中性残基である。 X 2 は、 A 、 F 、 M 、 C 、 V 、 L 、 I 、 S 、 T 、 P または R であってよい。 X 2 は、好ましくは A 、 F 、 M 、 C 、 V 、 L 、 I 、 S 、 T または P である。 X 2 は、より好ましくは A 、 M または L である。 X 2 は、最も好ましくは A または M である。

【 0 1 0 5 】

H e l 3 0 8 ヘリカーゼは、好ましくはモチーフ Q - X 1 - X 2 - G - R - A - G - R - P (本明細書以下で伸張された H e l 3 0 8 モチーフと称される；配列番号 9) を含み、式中 X 1 および X 2 は上に記載のとおり。 10

【 0 1 0 6 】

最も好ましい H e l 3 0 8 モチーフおよび伸張された H e l 3 0 8 モチーフは、下の表 5 に示される。 H e l 3 0 8 ヘリカーゼは、これらの好ましいモチーフのいずれをも含み得る。

【 0 1 0 7 】

H e l 3 0 8 ヘリカーゼは、好ましくは下の表 4 に示すヘリカーゼの 1 つまたはその変種である。

【 0 1 0 8 】

【表4】

表4-好ましいHel308ヘリカーゼ

アクセッション	説明	
NP_578406.1	ski2様ヘリカーゼ[ピロコックス・フリオスス(<i>Pyrococcus furiosus</i>)DSM3638]>sp O73946.1 HELS_PYRFU Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>pdb 2ZZ2 A A鎖、古細菌DnaヘリカーゼHjm1形態Apo State>pdb 2ZJ5 A A鎖、1形態Adpとの複合体古細菌DnaヘリカーゼHjm>pdb 2ZZ8 A A鎖、2形態古細菌DnaヘリカーゼHjm Apo State>pdb 2ZJA A A鎖、2形態Amppcpとの複合体古細菌DnaヘリカーゼHjm>dbj BAA32016.1 ヘリカーゼ[ピロコックス・フリオスス(<i>Pyrococcus furiosus</i>)]>gb AAL80801.1 ヘリカーゼ[ピロコックス・フリオスス(<i>Pyrococcus furiosus</i>)DSM3638]	10
NP_126564.1	ski2様ヘリカーゼ[パイロコックス・アビシ(<i>Pyrococcus abyssi</i>)GE5]>sp Q9V0A9.1 HELS_PYRAB Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>emb CA B49795.1 DNAヘリカーゼ[パイロコックス・アビシ(<i>Pyrococcus abyssi</i>)GE5]	
NP_143168.1	ski2様ヘリカーゼ[パイロコックス・ホリコシイ(<i>Pyrococcus horikoshii</i>)OT3]>sp O59025.1 HELS_PYRHO Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>dbj BAA30383.1 715aa長仮定タンパク質[パイロコックス・ホリコシイ(<i>Pyrococcus horikoshii</i>)OT3]	
YP_004424773.1	ski2様ヘリカーゼ[パイロコックス菌種(<i>Pyrococcus</i> sp.)NA2]>gb AEC52769.1 ski2様ヘリカーゼ[パイロコックス菌種(<i>Pyrococcus</i> sp.)NA2]	
YP_004623750.1	ski2様ヘリカーゼ[パイロコックス・ヤヤノシイ(<i>Pyrococcus yayanosii</i>)C H1]>gb AEH24478.1 ski2様ヘリカーゼ[パイロコックス・ヤヤノシイ(<i>Pyrococcus yayanosii</i>)CH1]	20
YP_002307730.1	ski2様ヘリカーゼ[サーモコックス・オンヌリネウス(<i>Thermococcus onnurineus</i>)NA1]>gb ACJ16833.1 DNAヘリカーゼ[サーモコックス・オンヌリネウス(<i>Thermococcus onnurineus</i>)NA1]	
YP_004763427.1	ski2様ヘリカーゼ[サーモコックス菌種(<i>Thermococcus</i> sp.)4557]>gb AEK73750.1 ski2様ヘリカーゼ[サーモコックス菌種(<i>Thermococcus</i> sp.)4557]	
YP_002959236.1	ski2様ヘリカーゼ[サーモコックス・ガンマトレラント(<i>Thermococcus gammatolerans</i>)EJ3]>gb ACS33372.1 ski2型ヘリカーゼ、推定[サーモコックス・ガンマトレラント(<i>Thermococcus gammatolerans</i>)EJ3]	
YP_004071709.1	ski2型ヘリカーゼ[サーモコックス・バロフィルス(<i>Thermococcus barophilus</i>)MP]>gb ADT84486.1 推定ski2型ヘリカーゼ[サーモコックス・バロフィルス(<i>Thermococcus barophilus</i>)MP]	30
YP_002994328.1	推定ski2型ヘリカーゼ[サーモコックス・シビリクス(<i>Thermococcus sibiricus</i>)MM739]>gb ACS89979.1 推定ski2型ヘリカーゼ[サーモコックス・シビリクス(<i>Thermococcus sibiricus</i>)MM739]	
ZP_04875329.1	TypeIII制限酵素、resサブユニットファミリー[アキドリプロファンダム・ブーネイ(<i>Aciduliprofundum boonei</i>)T469]>gb EDY35111.1 TypeIII制限酵素、resサブユニットファミリー[アキドリプロファンダム・ブーネイ(<i>Aciduliprofundum boonei</i>)T469]	
YP_003436565.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[フェログロバス・プラシダス(<i>Ferroglobus placidus</i>)DSM10642]>gb ADC66290.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[フェログロバス・プラシダス(<i>Ferroglobus placidus</i>)DSM10642]	
YP_004485304.1	ski2型ヘリカーゼ[メタノトリス・イグネウス(<i>Methanotorris igneus</i>)K05]>gb AEF97239.1 ski2型ヘリカーゼ[メタノトリス・イグネウス(<i>Methanotorris igneus</i>)K05]	40
YP_004616424.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノサルスム・ジリナエ(<i>Methanosalsum zhilinae</i>)DSM4017]>gb AEH61205.1 DEA	

ZP_04873370.1	D/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノサルスム・ジリナエ(<i>Methanosalsum zhilinae</i>)DSM4017] TypeIII制限酵素、resサブユニットファミリー[アキドリプロファンダム・ブーネイ(<i>Aciduliprofundum boonei</i>)T469]>ref YP_003482774.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[アキドリプロファンダム・ブーネイ(<i>Aciduliprofundum boonei</i>)T469]>gb EDY36687.1 TypeIII制限酵素、resサブユニットファミリー[アキドリプロファンダム・ブーネイ(<i>Aciduliprofundum boonei</i>)T469]>gb ADD08212.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[アキドリプロファンダム・ブーネイ(<i>Aciduliprofundum boonei</i>)T469]
YP_004342552.1	ski2型ヘリカーゼ[アーケオグロブス・ベネフィクス(<i>Archaeoglobus veneficus</i>)SNP6]>gb AEA47837.1 ski2型ヘリカーゼ[アーケオグロブス・ベネフィクス(<i>Archaeoglobus veneficus</i>)SNP6]
NP_071282.1	SKI2ファミリーヘリカーゼ[アーケオグロブス・フルギダス(<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)DSM4304]
2P6R_A	A鎖、未結合Dnaとの複合体のスーパーファミリー2ヘリカーゼHel308の結晶構造>pdb 2P6U A A鎖、Hel308スーパーファミリー2ヘリカーゼのApo構造
YP_685308.1	ski2様ヘリカーゼ[未培養メタノゲニック・アーカエオン(methanogenic archaeon)RC-I]>sp Q0W6L1.1 HELS_UNCMA Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>emb CAJ35982.1 推定ski2型ヘリカーゼ[未培養メタノゲニック・アーカエオン(methanogenic archaeon)RC-I]
YP_001048404.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノクレウス・マリスニグリ(<i>Methanoculleus maris nigris</i>)JR1]>gb ABN58422.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質 [メタノクレウス・マリスニグリ(<i>Methanoculleus marisnigri</i>)JR1]
YP_919908.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[サーモフィルム・ペンドンス(<i>Thermofilum pendens</i>)Hrk5]>gb ABL77905.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[サーモフィルム・ペンドンス(<i>Thermofilum pendens</i>)Hrk5]
YP_843229.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノサエタ・テルモフィラ(<i>Methanosaeta thermophila</i>) PT]>gb ABK14589.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノサエタ・テルモフィラ(<i>Methanosaeta thermophila</i>)PT]
ZP_08045937.1	ski2様ヘリカーゼ[ハラダプタツス・パウキハロフィルス(<i>Haladaptatus paucihalophilus</i>)DX253]>gb EFW90585.1 ski2様ヘリカーゼ[ハラダプタツス・パウキハロフィルス(<i>Haladaptatus paucihalophilus</i>)DX253]
NP_280985.1	ski2様ヘリカーゼ[ハロバクテリウム菌種(<i>Halobacterium sp.</i>)NRC-1]>ref YP_001690117.1 ski2様ヘリカーゼ[ハロバクテリウム・サリナルム(<i>Halobacterium salinarum</i>)R1]>sp Q9HMV6.1 HELS_HALSA Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>sp B0R7Q2.1 HELS_HALS3 Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb AAG20465.1 DNA修復タンパク質[ハロバクテリウム菌種(<i>Halobacterium sp.</i>)NRC-1]>emb CAP14771.1 推定DNAヘリカーゼ[ハロバクテリウム・サリナルム(<i>Halobacterium salinarum</i>)R1]
YP_003357840.1	ホリデージャンクション移動ヘリカーゼ[メタノセラ・パルディコラ(<i>Methanocella paludicola</i>)SANAЕ]>dbj BAI62857.1 ホリデージャンクション移動ヘリカーゼ[メタノセラ・パルディコラ(<i>Methanocella paludicola</i>)SANAЕ]
YP_003457479.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコックス菌種(<i>Methanocaldococcus sp.</i>)FS406-22]>gb ADC68743.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコックス菌種(<i>Methanocaldococcus sp.</i>)FS406-22]
YP_003127632.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコ

10

20

30

40

	ツクス・フェルベンス(<i>Methanocaldococcus fervens</i>)AG86]>gb ACV2413 2.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコックス・フェルベンス(<i>Methanocaldococcus fervens</i>)AG86]	
YP_003735335.1	ski2様ヘリカーゼ[ハラルカリコックス・ジェトガリ(<i>Halalkalicoccus jeotgali</i>)B3]>gb ADJ13543.1 ski2様ヘリカーゼ[ハラルカリコックス・ジェトガリ(<i>Halalkalicoccus jeotgali</i>)B3]	
YP_503885.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノスピリルム・フンガティ(<i>Methanospirillum hungatei</i>)JF-1]>gb ABD42166.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ様タンパク質[メタノスピリルム・フンガティ(<i>Methanospirillum hungatei</i>)JF-1]	10
BAJ48115.1	ヘリカーゼ[カンジダタス・カルディアーカエウム・サブテラネウム(<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>)]>dbj BAJ48144.1 ヘリカーゼ[カンジダタス・カルディアーカエウム・サブテラネウム(<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>)]>dbj BAJ50919.1 ヘリカーゼ[カンジダタス・カルディアーカエウム・サブテラネウム(<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>)]	
YP_001405615.1	ski2様ヘリカーゼ[カンジダタス・メタノレグラ・ブーネイ(<i>Candidatus Methanoregula boonei</i>)6A8]>sp A7IB61.1 HELS_METB6 Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb ABS56972.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノレグラ・ブーネイ(<i>Methanoregula boonei</i>)6A8]	
YP_306959.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノサルキナ・バークリ(<i>Methanosarcina barkeri</i>)str.フサロ]>sp Q465R3.1 HELS_METBF Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb AAZ72379.1 ヘリカーゼ[メタノサルキナ・バークリ(<i>Methanosarcina barkeri</i>)str.フサロ]	20
YP_001031179.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノコルプスクルム・ラブレアヌム(<i>Methanocorpusculum labreanum</i>)Z]>gb ABN07912.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコルプスクルム・ラブレアヌム(<i>Methanocorpusculum labreanum</i>)Z]	
YP_003541733.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[メタノハロフィルス・マヒイ(<i>Methanohalophilus mahii</i>)DSM5219]>gb ADE36088.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノハロフィルス・マヒイ(<i>Methanohalophilus mahii</i>)DSM5219]	
YP_004384692.1	推定Ski2型ヘリカーゼ[メタノサエタ・コンシリイ(<i>Methanoaeta concili</i> i)GP6]>gb AEB68874.1 推定Ski2型ヘリカーゼ[メタノサエタ・コンシリイ(<i>Methanoaeta concili</i> i)GP6]	30
YP_003725904.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノハロビウム・エベスチガツム(<i>Methanohalobium evestigatum</i>)Z-7303]>gb ADI73108.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノハロビウム・エベスチガツム(<i>Methanohalobium evestigatum</i>)Z-7303]	
YP_003405271.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ハロテリルリゲナ・ツルクメニカ(<i>Haloferrolytus turkmenica</i>)DSM5511]>gb ADB62598.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロテリルリゲナ・ツルクメニカ(<i>Haloferrolytus turkmenica</i>)DSM5511]	
YP_004244914.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ブルカニサエタ・モウトノブスキア(<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i>)768-28]>gb ADY01412.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ブルカニサエタ・モウトノブスキア(<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i>)768-28]	40
YP_001540156.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[カルジビルガ・マクイリングンシス(<i>Caldivirga maquilingensis</i>)IC-167]>sp A8MB76.1 HELS_CALMQ Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb ABW01166.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[カルジビルガ・マクイリングンシス(<i>Caldivirga maquilingensis</i>)IC-167]	
NP_618094.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノサルシナ・アセチボランス(<i>Methanosarcina ac</i>]	

	etivorans)C2A]>sp Q8TL39.1 HELS_METAC Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb AAM06574.1 ヘリカーゼ[メタノサルシナ・アセチボランス(Methanosarcina acetivorans)C2A]	
YP_003900980.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ブルカニサエタ・ジストリブータ(Vulcanisaeta distributa)DSM14429]>gb ADN49929.1 DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ブルカニサエタ・ジストリブータ(Vulcanisaeta distributa)DSM14429]	
YP_003896003.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノプランス・ペトロレアリウス(Methanoplanus petrolearius)DSM11571]>gb ADN37565.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノプランス・ペトロレアリウス(Methanoplanus petrolearius)DSM11571]	10
YP_003615773.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコックス・インフェルナス(methanocaldococcus infernus)ME]>gb ADG12809.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコックス・インフェルナス(Methanocaldococcus infernus)ME]	
YP_183745.1	RNAヘリカーゼSki2様タンパク質[サーモコックス・コダカレンシス(Thermococcus kodakarensis)KOD1]>sp Q5JGV6.1 HELS_PYRKO Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ;Contains:Rec名称:全長=エンドヌクレアーゼPI-PkoHel;Alt名称:全長=Pko Helインテイン>dbj BAD85521.1 RNAヘリカーゼSki2相同体[サーモコックス・コダカレンシス(Thermococcus kodakarensis)KOD1]	
YP_001322557.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・バンニエリ(Methanococcus vannielii)SB]>sp A6UN73.1 HELS_METVS Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb ABR53945.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・バンニエリ(Methanococcus vannielii)SB]	20
YP_002467772.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノスファエルラ・パルストリス(Methanospaerula palustris)E1-9c]>gb ACL18049.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノスファエルラ・パルストリス(Methanospaerula palustris)E1-9c]	
YP_003480097.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ナトリアルバ・マガディ(Natrialba magadii)ATCC43099]>gb ADD05535.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ナトリアルバ・マガディ(Natrialba magadii)ATCC43099]	
YP_004577043.1	ski2型ヘリカーゼ[メタノサーモコックス・オキナウェンシス(Methanotermococcus okinawensis)IH1]>gb AEH07265.1 ski2型ヘリカーゼ[メタノサーモコックス・オキナウェンシス(Methanothermococcus okinawensis)IH1]	30
YP_004742641.1	スーパーファミリーIIヘリカーゼ[メタノコックス・マリパルディス(Methanococcus maripaludis)XI]>gb AEK19898.1 スーパーファミリーIIヘリカーゼ[メタノコックス・マリパルディス(Methanococcus maripaludis)XI]	
NP_632449.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノサルシナ・マゼイ(Methanosarcina mazei)Go1]>sp Q8PZR7.1 HELS_METMA Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb AAM30121.1 ヘリカーゼ[メタノサルシナ・マゼイ(Methanosarcina mazei)Go1]	
YP_001097223.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・マリパルディス(Methanococcus maripaludis)C5]>gb ABO35008.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・マリパルディス(Methanococcus maripaludis)C5]	40
YP_004742247.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・マリパルディス(Methanococcus maripaludis)XI]>gb AEK19504.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコッ	

	クス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)X1]
YP_004794766.1	ski2様ヘリカーゼ[ハロアルクラ・ヒスパニカ(<i>Haloarcula hispanica</i>)ATC C33960]>gb AEM55778.1 ski2様ヘリカーゼ[ハロアルクラ・ヒスパニカ(<i>Haloarcula hispanica</i>)ATCC33960]
NP_988010.1	スーパーファミリーIIヘリカーゼ[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)S2]>emb CAF30446.1 スーパーファミリーIIヘリカーゼ[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)S2]
YP_565780.1	ski2様ヘリカーゼ[メタノコッコイデス・ブルトニイ(<i>Methanococcoides burtonii</i>)DSM6242]>sp Q12WZ6.1 HELS_METBU Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb ABE52030.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ様タンパク質[メタノコッコイデス・ブルトニイ(<i>Methanococcoides burtonii</i>)DSM6242]
YP_001549808.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C6]>gb ABX02576.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C6]
YP_001548609.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C6]>gb ABX01377.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C6]
YP_001329359.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C7]>gb ABR65208.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C7]
YP_004595982.1	ski2型ヘリカーゼ[ハロピゲル・キサナドエンシス(<i>Halopiger xanaduensis</i>)SH-6]>gb AEH36103.1 ski2型ヘリカーゼ[ハロピゲル・キサナドエンシス(<i>Halopiger xanaduensis</i>)SH-6]
YP_656795.1	ski2様ヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(<i>Haloquadratum walsbyi</i>)DSM16790]>emb CAJ51138.1 ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(<i>Haloquadratum walsbyi</i>)DSM16790]
CCC38992.1	ATP依存性DNAヘリカーゼHel308[ハロクアドラツム・ワルスビイ(<i>Haloquadratum walsbyi</i>)C23]
YP_004035272.1	スーパーファミリーiiヘリカーゼ[ハログオメトリクム・ボリンクエンス(<i>Halogeometricum borinquense</i>)DSM11551]>gb ADQ65833.1 スーパーファミリーIIヘリカーゼ[ハログオメトリクム・ボリンクエンス(<i>Halogeometricum borinquense</i>)DSM11551]
YP_137330.1	ski2様ヘリカーゼ[ハロアルクラ・マリスモルツイ(<i>Haloarcula marismortui</i>)ATCC43049]>sp Q5UYM9.1 HELS_HALMA Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb AAV47624.1 推定ski2型ヘリカーゼ[ハロアルクラ・マリスモルツイ(<i>Haloarcula marismortui</i>)ATCC43049]
YP_001581577.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ニトロソプミルス・マリチムス(<i>Nitrosopumilus maritimus</i>)SCM1]>gb ABX12139.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ニトロソプミルス・マリチムス(<i>Nitrosopumilus maritimus</i>)SCM1]
EET90255.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[カンジダタス・ミクラーカエウム・アキジフィルム(<i>Candidatus Micrarchaeum acidiphilum</i>)ARMAN-2]
NP_376477.1	ヘリカーゼ[スルホロブス・トコダイイ(<i>Sulfolobus tokodaii</i>)str.7]>sp Q974S1.1 HELS_SULTO Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb BAK54341.1 ホリデージャンクション移動ヘリカーゼ[スルホロブス・トコダイイ(<i>Sulfolobus tokodaii</i>)str.7]
YP_001097792.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコッ

10

20

30

40

	クス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C5]>gb ABO35578.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C5]	
ZP_08667240.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[ニトロソプミラス菌種(<i>Nitrosopumilus</i> sp.)MY1]>gb EGP92972.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[ニトロソプミラス菌種(<i>Nitrosopumilus</i> sp.)MY1]	10
YP_254972.1	DNAヘリカーゼ[スルフォロブス・アキドカルダリウス(<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)DSM639]>sp Q4JC00.1 HELS_SULAC Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb AAY79679.1 DNAヘリカーゼ[スルフォロブス・アキドカルダリウス(<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)DSM639]	
EFD92533.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[カンジダタス・パルブアーカエウム・アキドフィラス(<i>Candidatus Parvarchaeum acidophilus</i>)ARMAN-5]	
YP_003176527.1	ski2様ヘリカーゼ[ハロミクロビウム・ムコハタエイ(<i>Halomicrobium mukohataei</i>)DSM12286]>gb ACV46820.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロミクロビウム・ムコハタエイ(<i>Halomicrobium mukohataei</i>)DSM12286]	
EGD71904.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[カンジダタス・パルブアーカエウム・アキドフィラス(<i>Candidatus Parvarchaeum acidophilus</i>)ARMAN-5 '5-way FS']	
YP_001040230.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[スタフィロテルムス・マリヌス(<i>Staphylothermus marinus</i>)F1]>gb ABN69322.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スタフィロテルムス・マリヌス(<i>Staphylothermus marinus</i>)F1]	20
ABZ07376.1	推定DEAD/DEAHポックスヘリカーゼ[未培養海洋性クレンオーキアテ(<i>crenarchaeote</i>)HF4000_ANIW133M9]	
YP_001097458.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C5]>gb ABO35243.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・マリパルディス(<i>Methanococcus maripaludis</i>)C5]	
ABZ08606.1	推定DEAD/DEAHポックスヘリカーゼ[未培養海洋性クレンオーキアテ(<i>crenarchaeote</i>)HF4000_APKG3H9]	
YP_325906.1	ski2様ヘリカーゼ[ナトロノモナス・ファラオニス(<i>Natronomonas pharaonis</i>)DSM2160]>sp Q3IU46.1 HELS_NATPD Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>emb CAI48337.1 ATP依存性DNAヘリカーゼ1[ナトロノモナス・ファラオニス(<i>Natronomonas pharaonis</i>)DSM2160]	30
YP_930665.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ピロバクルム・イスランディクム(<i>Pyrobaculum islandicum</i>)DSM4184]>gb ABL8832.2.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[ピロバクルム・イスランディクム(<i>Pyrobaculum islandicum</i>)DSM4184]	
YP_001435870.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼ[イグニコックス・ホスピタリス(<i>Ignicoccus hospitalis</i>)KIN4/I]>gb ABU82463.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[イグノコックス・ホスピタリス(<i>Ignicoccus hospitalis</i>)KIN4/I]	
YP_003668634.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[スタフィロテルムス・ヘレニクス(<i>Staphylothermus hellenicus</i>)DSM12710]>gb ADI31735.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スタフィロテルムス・ヘレニクス(<i>Staphylothermus hellenicus</i>)DSM12710]	40
ZP_08558598.1	ski2様ヘリカーゼ[ハロルハブダス・チアマテア(<i>Halorhabdus tiamatea</i>)SARL4B]>gb EGM36528.1 ski2様ヘリカーゼ[ハロルハブダス・チアマテア(<i>Halorhabdus tiamatea</i>)SARL4B]	
YP_002428409.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[デスルフロ	

	コックス・カムカトケンシス(Desulfurococcus kamchatkensis)1221n]>gb ACL11042.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[デスルフロコックス・カムカトケンシス(Desulfurococcus kamchatkensis)1221n]	
YP_004336918.1	ATP依存性、DNA結合ヘリカーゼ[サーモプロテウス・ウゾニエンシス(Thermoproteus uzoniensis)768-20]>gb AEA11606.1 ATP依存性、DNA結合ヘリカーゼ[サーモプロテウス・ウゾニエンシス(Thermoproteus uzoniensis)768-20]	
ZP_08257442.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[カンジダタス・ニトロソーカエウム・リムニア(Candidatus Nitrosoarchaeum limnia)SFB1]>gb EGG41989.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[カンジダタス・ニトロソーカエウム・リムニア(Candidatus Nitrosoarchaeum limnia)SFB1]	10
YP_004459284.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[アキダヌス・ホスピタリス(Acidianus hospitalis)W1]>gb AEE94986.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[アキダヌス・ホスピタリス(Acidianus hospitalis)W1]	
NP_558924.1	ATP依存性、DNA結合ヘリカーゼ[ピロバクルム・エロフィルム(Pyrobaculum aerophilum)str.IIM2]>gb AAL63106.1 ATP依存性、DNA結合ヘリカーゼ[ピロバクルム・エロフィルム(Pyrobaculum aerophilum)str.I M2]	
YP_004409449.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタスファエラ・クプリナ(Metallosphaera cuprina)Ar-4]>gb AEB94965.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタロスフファエラ・クプリナ(Metallosphaera cuprina)Ar-4]	20
YP_003649556.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[サーモスファエラ・アグレガヌス(Thermosphaera aggregans)DSM11486]>gb ADG90604.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[サーモスファエラ・アグレガヌス(Thermosphaera aggregans)DSM11486]	
ZP_06387115.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルフォロブス・ソルファタリクス(Sulfolobus solfataricus)98/2]>gb ACX90562.1 DEAD/DEAH ポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルフォロブス・ソルファタリクス(Sulfolobus solfataricus)98/2]	
2VA8_A	A鎖、Dna修復ヘリカーゼHel308>pdb 2VA8 B鎖、Dna修復ヘリカーゼHel308>emb CAO85626.1 DNAヘリカーゼ[スルフォロブス・ソルファタリクス(Sulfolobus solfataricus)]	30
YP_004809267.1	ski2型ヘリカーゼ[ハロフィリック・アレハエオン(halophilic arehaeon)DL31]>gb AEN06894.1 ski2型ヘリカーゼ[ハロフィリック・アレハエオン(halophilic arehaeon)DL31]	
ADX84345.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(Sulfolobus islandicus)REY15A]>gb ADX81629.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(Sulfolobus islandicus)HVE10/4]	
YP_002828439.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼ[スルホロブス・イスランディクス(Sulfolobus islandicus)M.14.25]>ref YP_002842325.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(Sulfolobus islandicus)M.16.27]>gb ACP37141.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(Sulfolobus islandicus)M.14.25]>gb ACP54280.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(Sulfolobus islandicus)M.16.27]	40
YP_002913571.1	DEAD/DEAH ポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(Sulfolobus islandicus)M.16.4]>gb ACR40903.1 DEA	

	D/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)M.16.4]	
Q97VY9.1	Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ	
YP_002841682.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)Y.N.15.51]>gb ACP49760.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)Y.N.15.51]	10
YP_002831080.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)L.S.2.15]>ref YP_003418425.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)L.D.8.5]>gb ACP34435.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)L.S.2.15]>gb ADB86055.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)L.D.8.5]	
YP_001054984.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ピロバクルム・カリジフォンティス(<i>Pyrobaculum calidifontis</i>)JCM11548]>sp A3MSA1.1 HELS_PYRCJ Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb ABO07518.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質 [ピロバクルム・カリジフォンティス(<i>Pyrobaculum calidifontis</i>)JCM11548]	
NP_343811.1	DNAヘリカーゼ関連タンパク質[スルフォロブス・ソルファタリクス(<i>Sulfolobus solfataricus</i>)P2]>ref YP_002836469.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼ[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)Y.G.57.14]>gb AAK42601.1 DNAヘリカーゼ関連タンパク質[スルフォロブス・ソルファタリクス(<i>Sulfolobus solfataricus</i>)P2]>gb ACP44547.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[スルホロブス・イスランディクス(<i>Sulfolobus islandicus</i>)Y.G.57.14]	20
YP_001152379.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ピロバクルム・アルセナティクム(<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>)DSM13514]>gb ABP49727.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[ピロバクルム・アルセナティクム(<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>)]DSM13514]	
YP_001191456.1	DEAD/DEAH ポックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタロスマフエラ・セドラ(<i>Metallosphaera sedula</i>)DSM5348]>gb ABP95532.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタロスマフエラ・セドラ(<i>Metallosphaera sedula</i>)DSM5348]	30
NP_147034.2	ホリデージャンクション移動ヘリカーゼ[アエロピルム・ペルニクス(<i>Aeropyrum pernix</i>)K1]>sp Q9YFQ8.2 HELS_AERPE Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>dbj BAA79103.2 ホリデージャンクション移動ヘリカーゼ[アエロピルム・ペルニクス(<i>Aeropyrum pernix</i>)K1]	
YP_024158.1	ski2様ヘリカーゼ[ピクロフィルス・トルリダス(<i>Picrophilus torridus</i>)DSM9790]>gb AAT43965.1 UV-保護に関与するヘリカーゼ[ピクロフィルス・トルリダス(<i>Picrophilus torridus</i>)DSM9790]	
YP_003816358.1	推定ski2型ヘリカーゼ[アキジロブス・サッカロボランス(<i>Acidilobus saccharovorans</i>)345-15]>gb ADL19327.1 推定ski2型ヘリカーゼ[アキジロブス・サッカロボランス(<i>Acidilobus saccharovorans</i>)345-15]	
YP_003860265.1	DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[イグニスファエラ・アグレガヌス(<i>Ignisphaera aggregans</i>)DSM17230]>gb ADM28385.1 DEAD/DEAHポックスヘリカーゼドメインタンパク質[イグニスファエラ・アグレガヌス(<i>Ignisphaera aggregans</i>)DSM17230]	40
NP_394295.1	ski2様ヘリカーゼ[サーモプラズマ・アキドフィルム(<i>Thermoplasma acidophilum</i>)DSM1728]>sp Q9HJX7.1 HELS_THEAC Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>emb CAC11964.1 DNAヘリカーゼ関連タンパク質[サーモ	

	プラズマ・アキドフィルム(<i>Thermoplasma acidophilum</i>)】
YP_876638.1	スーパーファミリーIIヘリカーゼ[ケナルカエウム・シムビオスム(<i>Cenarchaeum symbiosum</i>)A]>gb ABK78334.1 スーパーファミリーIIヘリカーゼ[ケナルカエウム・シムビオスム(<i>Cenarchaeum symbiosum</i>)A]
ZP_05571398.1	ski2様ヘリカーゼ[フェロプラズマ・アキダルマヌス(<i>Ferroplasma acidarmanus</i>)fer1]
YP_004176252.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[デスルフロコックス・ムコサス(<i>Desulfurococcus mucosus</i>)DSM2162]>gb ADV64770.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[デスルフロコックス・ムコサス(<i>Desulfurococcus mucosus</i>)DSM2162]
YP_001737782.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[カンジダタス・コルアーカエウム・クリプトフィルム(<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i>)OPF8]>gb ACB08099.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[カンジダタス・コルアーカエウム・クリプトフィルム(<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i>)OPF8]
EGQ40435.1	スーパーファミリーIIヘリカーゼ[カンジダタス・ナノサリナルム菌種(<i>Candidatus Nanosalinarum</i> sp.)J07AB56]
YP_002567343.1	ski2様ヘリカーゼ[ハロルブルム・ラクスプロフンディ(<i>Halorubrum lacusprofundi</i>)ATCC49239]>gb ACM58273.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルブルム・ラクスプロフンディ(<i>Halorubrum lacusprofundi</i>)ATCC49239]
YP_001793507.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[サーモプロテウス・ニュートロフィルス(<i>Thermoproteus neutrophilus</i>)V24Sta]>gb ACB39061.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[サーモプロテウス・ニュートロフィルス(<i>Thermoproteus neutrophilus</i>)V24Sta]
YP_003534088.1	ATP依存性DNAヘリカーゼHel308a[ハロフェラックス・ボルカニイ(<i>Haloferax volcanii</i>)DS2]>gb ADE04048.1 ATP依存性DNAヘリカーゼHel308a[ハロフェラックス・ボルカニイ(<i>Haloferax volcanii</i>)DS2]
YP_004037165.1	スーパーファミリーiiヘリカーゼ[ハログオメトリクム・ボリンクエンス(<i>Halogeometricum borinquense</i>)DSM11551]>gb ADQ67720.1 スーパーファミリーIIヘリカーゼ[ハログオメトリクム・ボリンクエンス(<i>Halogeometricum borinquense</i>)DSM11551]
NP_111333.1	ski2様ヘリカーゼ[サーモプラズマ・ボルカニウム(<i>Thermoplasma volcanium</i>)GSS1]>sp Q97AI2.1 HELS_THEVO Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>dbj BAB59970.1 DNAヘリカーゼ[サーモプラズマ・ボルカニウム(<i>Thermoplasma volcanium</i>)GSS1]
YP_002565871.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ハロルブルム・ラクスプロフンディ(<i>Halorubrum lacusprofundi</i>)ATCC49239]>gb ACM56801.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルブルム・ラクスプロフンディ(<i>Halorubrum lacusprofundi</i>)ATCC49239]
CCC39675.1	ATP依存性DNAヘリカーゼHel308[ハロクアドラツム・ワルスビイ(<i>Haloquadratum walsbyi</i>)C23]
YP_657401.1	ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(<i>Haloquadratum walsbyi</i>)DSM16790]>emb CAJ51759.1 ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(<i>Haloquadratum walsbyi</i>)DSM16790]
YP_003535028.1	ATP依存性DNAヘリカーゼHel308b[ハロフェラックス・ボルカニイ(<i>Haloferax volcanii</i>)DS2]>gb ADE02398.1 ATP依存性DNAヘリカーゼHel308b[ハロフェラックス・ボルカニイ(<i>Haloferax volcanii</i>)DS2]
YP_003706863.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・ボルタエ(<i>Methanococcus voltae</i>)A3]>gb ADI35890.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・ボルタエ(<i>Methanococcus voltae</i>)A3]

10

20

30

40

ABD17736.1	ヘリカーゼ[メタノコックス・ボルタエ(<i>Methanococcus voltae</i>)PS]	
NP_613398.1	スーパーファミリーIIヘリカーゼ[メタノピルス・カンドレリ(<i>Methanopyrus kandleri</i>)AV19]>gb AAM01328.1 予測スーパーファミリーIIヘリカーゼ[メタノピルス・カンドレリ(<i>Methanopyrus kandleri</i>)AV19]	
CBH38575.1	推定ski2型ヘリカーゼ[未培養古細菌]	
EEZ93258.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[カンジダタス・パルプアーカエウム・アキジフィルム(<i>Candidatus Parvarchaeum acidiphilum</i>)ARMAN-4]	10
EGQ40350.1	スーパーファミリーIIヘリカーゼ[カンジダタス・ナノサリナルム菌種(<i>Candidatus Nanosalinarum</i> sp.)J07AB56]	
YP_004004246.1	dead/deahボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノテルムス・フェルビダス(<i>Methanothermus fervidus</i>)DSM2088]>gb ADP77484.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノテルムス・フェルビダス(<i>Methanothermus fervidus</i>)DSM2088]	
YP_003850109.1	ヘリカーゼ[メタノサーモバクター・マルブルゲンシス(<i>Methanothermobacter marburgensis</i>)str.マールブルグ]>gb ADL58796.1 予測ヘリカーゼ[メタノサーモバクター・マルブルゲンシス(<i>Methanothermobacter marburgensis</i>)str.マールブルグ]	
YP_003424423.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノブレビバクター・ルミナンチウム(<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>)M1]>gb ADC47531.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノブレビバクター・ルミナンチウム(<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>)M1]	20
YP_004291107.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノバクテリウム菌種(<i>Methanobacterium</i> sp.)AL-21]>gb ADZ10135.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノバクテリウム菌種(<i>Methanobacterium</i> sp.)AL-21]	
YP_447162.1	ヘリカーゼ[メタノスマファエラ・スタドタマナエ(<i>Methanospaera stadtmanae</i>)DSM3091]>gb ABC56519.1 予測ヘリカーゼ[メタノスマファエラ・スタドタマナエ(<i>Methanospaera stadtmanae</i>)DSM3091]	
YP_004519549.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノバクテリウム菌種(<i>Methanobacterium</i> sp.)SWAN-1]>gb AEG17748.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノバクテリウム菌種(<i>Methanobacterium</i> sp.)SWAN-1]	
NP_275949.1	DNAヘリカーゼ関連タンパク質[メタノサーモバクター・サーマウトロフィカス(<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>)str.デルタH]>sp O26901.1 HELS_METTH Rec名称:全長=推定ski2型ヘリカーゼ>gb AAB85310.1 DNAヘリカーゼ関連タンパク質[メタノサーモバクター・サーマウトロフィカス(<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>)str.デルタH]	30
ZP_05975717.2	推定Ski2型ヘリカーゼ[メタノブレビバクター・スミスイ(<i>Methanobrevibacter smithii</i>)DSM2374]>gb EFC93382.1 推定Ski2型ヘリカーゼ[メタノブレビバクター・スミスイ(<i>Methanobrevibacter smithii</i>)DSM2374]	
ZP_03607647.1	仮定タンパク質METSMIALI_00751[メタノブレビバクター・スミスイ(<i>Methanobrevibacter smithii</i>)DSM2375]>gb EEE41862.1 仮定タンパク質METSMIALI_00751[メタノブレビバクター・スミスイ(<i>Methanobrevibacter smithii</i>)DSM2375]	
YP_001273412.1	ATP依存性ヘリカーゼ[メタノブレビバクター・スミスイ(<i>Methanobrevibacter smithii</i>)ATCC35061]>gb ABQ87044.1 ATP依存性ヘリカーゼ[メタノブレビバクター・スミスイ(<i>Methanobrevibacter smithii</i>)ATCC35061]	40
YP_003247505.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコックス・ブルカニウス(<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>)M7]>gb ACX73023.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノカルドコックス・ブルカニウス(<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>)M7]	

NP_248116.1	SKI2ファミリーへリカーゼ[メタノカルドコックス・ヤンナスキイ(Methanocaldococcus jannaschii)DSM2661]>sp Q58524.1 HELS_METJA Rec 名称:全長=推定ski2型へリカーゼ;Contains:Rec名称:全長=エンドヌクレアーゼPI-MjaHel;Alt名称:全長=Mja_Helインテイン;Alt名称:全長=Mja_Pep3インテイン>gb AAB99126.1 推定SKI2-ファミリーへリカーゼ[メタノカルドコックス・ヤンナスキイ(Methanocaldococcus jannaschii)DSM2661]	
YP_001324295.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メタノコックス・エオリカス・ナンカイ-3(Methanococcus aeolicus Nankai-3)]>gb ABR55683.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メタノコックス・エオリカス・ナンカイ-3(Methanococcus aeolicus Nankai-3)]	10
YP_003536960.1	Pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロフェラックス・ボルカニイ(Haloferax volcanii)DS2]>gb ADE02332.1 Pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロフェラックス・ボルカニイ(Haloferax volcanii)DS2]	
YP_003131029.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルハブダス・ウタヘンシス(Halorhabdus utahensis)DSM12940]>gb ACV12296.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルハブダス・ウタヘンシス(Halorhabdus utahensis)DSM12940]	
YP_002567151.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ハロルブルム・ラクスプロフンディ(Halorubrum lacusprofundi)ATCC49239]>gb ACM58081.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルブルム・ラクスプロフンディ(Halorubrum lacusprofundi)ATCC49239]	20
YP_004035351.1	スーパーファミリーIIヘリカーゼ[ハログオメトリクム・ボリンクエンス(Halogeometricum borinquense)DSM11551]>gb ADQ65912.1 スーパーファミリーIIヘリカーゼ[ハログオメトリクム・ボリンクエンス(Halogeometricum borinquense)DSM11551]	
YP_004808851.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ハロフィリック・アーカエオン(halophilic archaeon)DL31]>gb AEN06478.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロフィリック・アーカエオン(halophilic archaeon)DL31]	
XP_002716686.1	予測:DNAポリメラーゼシータアイソフォーム1[ウサギ(Oryctolagus cuniculus)]	
YP_656834.1	ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(Haloquadratum walsbyi)DSM16790]>emb CAJ51176.1 ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(Haloquadratum walsbyi)DSM16790]	30
XP_003248103.1	予測:DNAポリメラーゼシータ様アイソフォーム1[エンドウヒゲナガアブラムシ(Acyrthosiphon pisum)]	
ABC72356.1	ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(Haloquadratum walsbyi)]	
CCC39031.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ハロクアドラツム・ワルスビイ(Haloquadratum walsbyi)C23]	
XP_001165150.2	予測:DNAポリメラーゼシータアイソフォーム1[チンパンジー(Pan troglodytes)]	
XP_003225852.1	予測:DNAポリメラーゼシータ様[ミドリアノール(Anolis carolinensis)]	
XP_615375.3	予測:DNAポリメラーゼシータ[ウシ(Bos taurus)]>ref XP_002684835.1 予測:ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ様[ウシ(Bos taurus)]>gb DAA33456.1 ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ様[ウシ(Bos taurus)]	40
XP_002813286.1	予測:低品質タンパク質:DNAポリメラーゼシータ様[スマトラオランウータン(Pongo abelii)]	
AAR08421.2	DNAポリメラーゼシータ[ヒト(Homo sapiens)]	
EAW79510.1	ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ、アイソフォームCRA_a[ヒト(Homo sapiens)]	

NP_955452.3	DNAポリメラーゼシータ[ヒト(Homo sapiens)]>sp O75417.2 DPOLQ_HUMAN Rec名称:全長=DNAポリメラーゼシータ;Alt名称:全長=DNAポリメラーゼ->gb AAI72289.1 ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ[合成ポリヌクレオチド]	
NP_001099348.1	DNAポリメラーゼシータ[ラット(Rattus norvegicus)]>gb EDM11249.1 ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ(予測)、アイソフォームCRA_a[ラット(Rattus norvegicus)]	10
XP_003341262.1	予測:低品質タンパク質:DNAポリメラーゼシータ様[ハイイロジネズミオポッサム(Monodelphis domestica)]	
XP_001502374.3	予測:DNAポリメラーゼシータ[ウマ(Equus caballus)]	
XP_545125.3	予測:低品質タンパク質:DNAポリメラーゼシータ[イヌ(Canis lupus familiaris)]	
XP_002928855.1	予測:低品質タンパク質:DNAポリメラーゼシータ様[ジャイアントパンダ(Ailuropoda melanoleuca)]	
NP_084253.1	DNAポリメラーゼシータアイソフォーム1[マウス(Mus musculus)]>gb AAL77225.1 DNAポリメラーゼシータ[マウス(Mus musculus)]>gb EDK97951.1 ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ、アイソフォームCRA_a[マウス(Mus musculus)]>gb AAI38361.1 ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ[マウス(Mus musculus)]>gb AAI57901.1 ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ[マウス(Mus musculus)]	
AAK39635.1	DNAポリメラーゼシータ[ヒト(Homo sapiens)]	
AAN39838.1	DNAポリメラーゼQ[マウス(Mus musculus)]	
XP_003412882.1	予測:DNAポリメラーゼシータ[アフリカゾウ(Loxodonta africana)]	20
YP_003735206.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ハラルカリコックス・ジェトガリ(Halalkalicoccus jeotgali)B3]>gb ADJ13414.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハラルカリコックス・ジェトガリ(Halalkalicoccus jeotgali)B3]	
YP_004794841.1	pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロアルクラ・ヒスピニカ(Haloarcula hispanica)ATCC33960]>gb AEM55853.1 pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロアルクラ・ヒスピニカ(Haloarcula hispanica)ATCC33960]	
XP_416549.2	予測:DNAポリメラーゼシータに類似[ニワトリ(Gallus gallus)]	
XP_003427319.1	予測:ヘリカーゼPOLQ様アイソフォーム2[キヨウソヤドリコバチ(Nasonia vitripennis)]	
XP_003202748.1	予測:DNAポリメラーゼシータ様[シチメンチョウ(Meleagris gallopavo)]	30
XP_969311.1	予測:DNAポリメラーゼシータに類似[コクヌストモドキ(Tribolium castaneum)]>gb EEZ97532.1 仮定タンパク質TcasGA2_TC011380[コクヌストモドキ(Tribolium castaneum)]	
ZP_08046037.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハラダプタツス・パウキハロフィルス(Haladaptatus paucihalophilus)DX253]>gb EFW90685.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハラダプタツス・パウキハロフィルス(Haladaptatus paucihalophilus)DX253]	
YP_461714.1	ヘリカーゼ[シントロフス・アキジトロフィクス(Syntrophus aciditrophicus)SB]>gb ABC77546.1 ヘリカーゼ [シントロフス・アキジトロフィクス(Syntrophus aciditrophicus)SB]	
YP_003176510.1	DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ[ハロミクロビウム・ムコハタエイ(Halomicromium mukohataei)DSM12286]>gb ACV46803.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロミクロビウム・ムコハタエイ(Halomicromium mukohataei)DSM12286]	40
YP_137400.1	Pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロアルクラ・マリスモルツイ(Haloarcula marismortui)ATCC43049]>gb AAV47694.1 Pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロアルクラ・マリスモルツイ(Haloarcula maris	

	mortui)ATCC43049]	
NP_001184156.1	ポリメラーゼ(DNA指向性)、シータ[ツメガエル(シリラナ)・トロピカリス(<i>Xenopus(Silurana)tropicalis</i>)]	
NP_280861.1	pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロバクテリウム菌種(<i>Halobacterium sp.</i>)NRC-1]>ref YP_001689987.1 ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロバクテリウム・サリナルム(<i>Halobacterium salinarum</i>)R1]>gb AAG20341.1 pre-mRNAスプライシングヘリカーゼ[ハロバクテリウム菌種(<i>Halobacterium sp.</i>)NRC-1]>emb CAP14641.1 ATP依存性DNAヘリカーゼ[ハロバクテリウム・サリナルム(<i>Halobacterium salinarum</i>)R1]	10
YP_004595640.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[ハロビゲル・キサナドエンシス(<i>Halopiger xanaduensis</i>)SH-6]>gb AEH35761.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロビゲル・キサナドエンシス(<i>Halopiger xanaduensis</i>)SH-6]	
XP_001521144.2	予測:DNAポリメラーゼシータ、部分[オルニトリンカス・アナチヌス(<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)]	
XP_003261953.1	予測:DNAポリメラーゼシータ、部分[ノマスクス・レウコゲニス(<i>Nomascus leucogenys</i>)]	
XP_001358456.2	GA19301 [ウスグロショウジョウバエ(<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>)]>gb EAL27595.2 GA19301[ウスグロショウジョウバエ(<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>)]	
ZP_08560003.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルハブダス・チアマテア(<i>Halorhabdus tiamatea</i>)SARL4B]>gb EGM34502.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルハブダス・チアマテア(<i>Halorhabdus tiamatea</i>)SARL4B]	20
XP_002187783.1	予測:ポリメラーゼ(DNA指向性)に類似、シータ[タエニオピギア・グッタタ(<i>Taeniopygia guttata</i>)]	
XP_002112587.1	仮定タンパク質TRIADDRFT_25163[トリコプラックス・アドハエレンス(<i>Trichoplax adhaerens</i>)]>gb EDV24697.1 仮定タンパク質TRIADDRFT_25163[トリコプラックス・アドハエレンス(<i>Trichoplax adhaerens</i>)]	
YP_003405139.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ハロテリルリゲナ・ツルクメニカ(<i>Haloterrigena turkmenica</i>)DSM5511]>gb ADB62466.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロテリルリゲナ・ツルクメニカ(<i>Haloterrigena turkmenica</i>)DSM5511]	
EGV92665.1	DNAポリメラーゼシータ[クリセツルス・グリセウス(<i>Cricetulus griseus</i>)]	30
CBY24305.1	無名タンパク質産物[オイコプレウラ・ジオイカ(<i>Oikopleura dioica</i>)]	
YP_003130565.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルハブダス・ウタヘンシス(<i>Halorhabdus utahensis</i>)DSM12940]>gb ACV11832.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ハロルハブダス・ウタヘンシス(<i>Halorhabdus utahensis</i>)DSM12940]	
YP_003479811.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[ナトリアルバ・マガディ(<i>Natrialba magadii</i>)ATCC43099]>gb ADD05249.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ナトリアルバ・マガディ(<i>Natrialba magadii</i>)ATCC43099]	
EFB22383.1	仮定タンパク質PANDA_000253[ジャイアントパンダ(<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)]	
YP_003357334.1	推定ATP依存性ヘリカーゼ[メタノセラ・パルディコラ(<i>Methanocella paludicola</i>)SANAЕ]>dbj BAI62351.1 推定ATP依存性ヘリカーゼ[メタノセラ・パルディコラ(<i>Methanocella paludicola</i>)SANAЕ]	40
YP_325942.1	ATP依存性DNAヘリカーゼ2[ナトロノモナス・ファラオニス(<i>Natronomonas pharaonis</i>)DSM2160]>emb CAI48373.2 ATP依存性DNAヘリカーゼ2[ナトロノモナス・ファラオニス(<i>Natronomonas pharaonis</i>)DSM2160]	
XP_002912509.1	予測:低品質タンパク質:ヘリカーゼPOLQ様[ジャイアントパンダ(<i>Ailuro</i>	

	poda_melanoleuca)]	
XP_002704678.1	予測:ヘリカーゼ、POLQ様[ウシ(Bos taurus)]	
CAE47762.2	ヒトDNA指向性ポリメターゼシータに類似する新規タンパク質(POLQ) [ゼブラフィッシュ(Danio rerio)]	10
XP_003205636.1	予測:ヘリカーゼPOLQ様[シチメンチョウ(Meleagris gallopavo)]	
XP_544959.2	予測:ヘリカーゼ、POLQ様[イヌ(Canis lupus familiaris)]	
EFX86757.1	仮定タンパク質DAPPUDRAFT_312857[ミジンコ(Daphnia pulex)]	
YP_003389641.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼ[スピロソマ・リングアレ(Spirosoma linguale)DSM74]>gb ADB40842.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[スピロソマ・リングアレ(Spirosoma linguale)DSM74]	
XP_002602932.1	仮定タンパク質BRAFLDRAFT_251779[プランキオストーマ・フロリダエ(Branchiostoma floridae)]>gb EEN58944.1 仮定タンパク質BRAFLDRAFT_251779[プランキオストーマ・フロリダエ(Branchiostoma floridae)]	
YP_004144962.1	ペプチダーゼC14カスパー触媒サブユニットp20[メソルヒゾビウム・キセリ・ビオバル・ビセルラエ(Mesorhizobium ciceri biovar biserrulae)WSM1271]>ref YP_004614892.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメイン含有タンパク質[メソルヒゾビウム・オポルツニスタム(Mesorhizobium opportunistum)WSM2075]>gb ADV14912.1 ペプチダーゼC14カスパー触媒サブユニットp20[メソルヒゾビウム・キセリ・ビオバル・ビセルラエ(Mesorhizobium ciceri biovar biserrulae)WSM1271]>gb AEH90798.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[メソルヒゾビウム・オポルツニスタム(Mesorhizobium opportunistum)WSM2075]	20
XP_002124758.1	予測:DNAポリメラーゼシータに類似[ユウレイボヤ(Ciona intestinalis)]	
XP_694437.5	予測:DNAポリメラーゼシータ[ゼブラフィッシュ(Danio rerio)]	
XP_420565.1	予測:DNAヘリカーゼHEL308に類似[ニワトリ(Gallus gallus)]	
XP_003129397.1	予測:ヘリカーゼPOLQ様[イノシシ(Sus scrofa)]	
EDL20278.1	mCG128467、アイソフォームCRA_b[マウス(Mus musculus)]	
XP_001517710.2	予測:ヘリカーゼPOLQ、部分[オルニトリンカス・アナチヌス(Ornithorhynchus anatinus)]	
AAH82601.1	ヘリカーゼ、mus308様(ショウジョウバエ)[マウス(Mus musculus)]	
XP_003384429.1	予測:DNAポリメラーゼシータ様[アムフィメドン・クイーンズランディカ(Amphimedon queenslandica)]	
XP_003221282.1	予測:ヘリカーゼPOLQ様[ミドリアノール(Anolis carolinensis)]	
NP_524333.1	変異原感受性308[キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)]>gb AAB67306.1 Mus308[キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)]>gb AAF54858.1 変異原感受性308[キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)]>gb ACH92234.1 FI03732p[キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)]	30
AAX33507.1	LP14642p[キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)]	
NP_001074576.1	ヘリカーゼPOLQ様[マウス(Mus musculus)]>sp Q2VPA6.2 HELQ_MOUSE Rec名称:全長=ヘリカーゼPOLQ様;Alt名称:全長=Mus308様ヘリカーゼ;Alt名称:全長=POLQ様ヘリカーゼ>gb AAI09171.2 ヘリカーゼ、mus308様(ショウジョウバエ)[マウス(Mus musculus)]	
YP_003523727.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[シデロキシダンス・リトロフィクス(Sideroxydans lithotrophicus)ES-1]>gb ADE11340.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[シデロキシダンス・リトロフィクス(Sideroxydans lithotrophicus)ES-1]	40
XP_002120889.1	予測:DNAヘリカーゼHEL308に類似[ユウレイボヤ(Ciona intestinalis)]	
XP_001892566.1	III型制限酵素、resサブユニットファミリータンパク質[マレー糸状虫(Brugia malayi)]>gb EDP38603.1 III型制限酵素、resサブユニットファミリータンパク質[マレー糸状虫(Brugia malayi)]	
ABZ09232.1	推定ヘリカーゼ保存C末端ドメインタンパク質[未培養海洋性クレンオ	

	一キアテ(crenarchaeote)HF4000_APKG7F11]	
XP_002814981.1	予測:低品質タンパク質:ヘリカーゼPOLQ様[スマトラオラウータン(Pongo abelii)]	
XP_002717082.1	予測:DNAヘリカーゼHEL308[ウサギ(Oryctolagus cuniculus)]	
XP_001104832.1	予測:ヘリカーゼ、POLQ様[アカゲザル(Macaca mulatta)]	
AAL85274.1	DNAヘリカーゼHEL308[ヒト(Homo sapiens)]	
NP_598375.2	ヘリカーゼPOLQ様[ヒト(Homo sapiens)]>gb EAX05934.1 DNAヘリカーゼHEL308、アイソフォームCRA_a[ヒト(Homo sapiens)]>gb AAI41525.1 ヘリカーゼ、POLQ様[合成ポリヌクレオチド]	10
Q8TDG4.2	Rec名称:全長=ヘリカーゼPOLQ様;Alt名称:全長=Mus308様ヘリカーゼ;Alt名称:全長=POLQ様ヘリカーゼ	
XP_003265889.1	予測:ヘリカーゼPOLQ[ノマスクス・レウコゲニス(Nomascus leucogenys)]	
XP_002745688.1	予測:ヘリカーゼPOLQ様[マーモセット(Callithrix jacchus)]	
XP_003310356.1	予測:低品質タンパク質:ヘリカーゼ POLQ様[チンパンジー(Pan troglodytes)]	
NP_001014156.2	ヘリカーゼ、POLQ様[ラット(Rattus norvegicus)]>ref XP_001060858.1 予測:ヘリカーゼ、POLQ様[ラット(Rattus norvegicus)]>gb EDL99554.1 r CG37823、アイソフォームCRA_c[ラット(Rattus norvegicus)]	
XP_001850567.1	ATP依存性DNAヘリカーゼMER3[クレックス・クインケファシアツス(Culex quinquefasciatus)]>gb EDS32308.1 ATP依存性DNAヘリカーゼME R3[クレックス・クインケファシアツス(Culex quinquefasciatus)]	20
XP_003427318.1	予測:ヘリカーゼPOLQ様アイソフォーム1[キヨウソヤドリコバチ(Nasonia vitripennis)]	
XP_003143912.1	仮定タンパク質LOAG_08332[ロア糸状虫(Loa loa)]>gb EFO20157.1 仮定タンパク質LOAG_08332[ロア糸状虫(Loa loa)]	
CAG11187.1	無名タンパク質産物[テトラオドン・ニグロヴァリディス(Tetraodon nigroviridis)]	
XP_001111254.2	予測:DNAポリメラーゼシータアイソフォーム2[アカゲザル(Macaca mulatta)]	
XP_003414242.1	予測:ヘリカーゼPOLQ[アフリカゾウ(Loxodonta africana)]	
XP_002681870.1	予測:タンパク質[ナエグレリア・グルベリ(Naegleria gruberi)]>gb EFC49126.1 予測:タンパク質[ナエグレリア・グルベリ(Naegleria gruberi)]	
EAX05935.1	DNAヘリカーゼHEL308、アイソフォームCRA_b[ヒト(Homo sapiens)]	
AAH59917.1	Ascc3タンパク質[マウス(Mus musculus)]	30
ZP_07082808.1	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[スフィンゴバクテリウム・スピリチボルム(Sphingobacterium spiritivorum)ATCC33861]>gb EFK55937.1 DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[スフィンゴバクテリウム・スピリチボルム(Sphingobacterium spiritivorum)ATCC33861]	
XP_001494572.3	予測:低品質タンパク質:ヘリカーゼPOLQ様[ウマ(Equus caballus)]	
XP_002714920.1	予測:活性化シグナルコインテグレーター1複合体サブユニット3[ウサギ(Oryctolagus cuniculus)]	
XP_002598278.1	仮定タンパク質BRAFLDRAFT_204526[ランキオストーマ・フロリダエ(Branchiostoma floridae)]>gb EEN54290.1 仮定タンパク質BRAFLDRAFT_204526[ランキオストーマ・フロリダエ(Branchiostoma floridae)]	40
XP_001943294.1	予測:ヘリカーゼPOLQ様アイソフォーム1[エンドウヒゲナガアブラムシ(Acyrtosiphon pisum)]>ref XP_003240510.1 予測:ヘリカーゼPOLQ様アイソフォーム2[エンドウヒゲナガア布拉ムシ(Acyrtosiphon pisum)]	
XP_002803889.1	予測:活性化シグナルコインテグレーター1複合体サブユニット3様[アカゲザル(Macaca mulatta)]	
XP_001651546.1	DNAポリメラーゼシータ[ネッタイシマカ(Aedes aegypti)]>gb EAT4259	

	9.1 DNAポリメラーゼシータ[ネッタイシマカ(<i>Aedes aegypti</i>)]
CAA11679.1	RNAヘリカーゼ[ヒト(<i>Homo sapiens</i>)]
XP_002837795.1	仮定タンパク質[ツベル・メラノスボルム(<i>Tuber melanosporum</i>)Mel28]>emb CAZ81986.1 無名タンパク質産物[ツベル・メラノスボルム(<i>Tuber melanosporum</i>)]
EGT47882.1	仮定タンパク質CAEBREN_02542[カエノルハブディティス・ブレンナリ(<i>Caenorhabditis brenneri</i>)]
EDL99655.1	活性化シグナルコインテグレーター1複合体サブユニット3(予測)、アイソフォームCRA_b[ラット(<i>Rattus norvegicus</i>)]
NP_932124.2	活性化シグナルコインテグレーター1複合体サブユニット3[マウス(<i>Mus musculus</i>)]
EDL05054.1	mCG119534[マウス(<i>Mus musculus</i>)]
gi 352115865	DEAD/DEAHボックスヘリカーゼドメインタンパク質[ナトリネマ・ペリルブルム(<i>Natrinema pellirubrum</i>)DSM15624]
ZP_08963952.1	

10

20

【0109】

H e 1 3 0 8 ヘリカーゼは、より好ましくは下の表5に示すヘリカーゼの1つまたはその変種である。H e 1 3 0 8 ヘリカーゼは、より好ましくは表5に示すヘリカーゼの1つの配列、すなわち配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58の1つまたはその変種を含む。

【0110】

【表5】

表5-より好ましいHel308ヘリカーゼならびに最も好ましいHel308モチーフおよび伸張されたHel308モチーフ

配列番号:	ヘリカーゼ	名称	%同一性	%同一性	Hel308モチーフ	伸張されたHe l308モチーフ
			Hel308 Pfu	Hel308 Mbu		
10	Hel308 Mbu	メタノコッコイデス・ブルトニイ(<i>Methanococcoides burtonii</i>)	37%	-	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
13	Hel308 Pfu	ピロコックス・フリオスス(<i>Pyrococcus furiosus</i>)DSM	-	37%	QMLGRAGR (配列番号:14)	QMLGRAGRP (配列番号:15)
16	Hel308 Hvo	ハロフェラックス・ボルカニイ(<i>Haloferax volcanii</i>)	34%	41%	QMMGRAGR (配列番号:17)	QMMGRAGR P (配列番号:18)
19	Hel308 Hla	ハロルブルム・ラクスプロンディ(<i>Halorubrum lacus profundii</i>)	35%	42%	QMCGRAGR (配列番号:20)	QMCGRAGRP (配列番号:21)
22	Hel308 Csy	ケナルカエウム・シムビオスマ(<i>Cenarchaeum symbiosum</i>)	34%	34%	QLCGRAGR (配列番号:23)	QLCGRAGRP (配列番号:24)
25	Hel308 Sso	スルフォロブス・ソルファタリクス(<i>Sulfolobus solfataricus</i>)	35%	33%	QMSGAGR (配列番号:26)	QMSGAGRP (配列番号:27)
28	Hel308 Mfr	メタノゲニウム・フリギダム(<i>Methanogenium frigidum</i>)	37%	44%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
29	Hel308 Mok	メタノサーモコックス・オキナウエニシス(<i>Methanothermococcus okinawensis</i>)	37%	34%	QCIGRAGR (配列番号:30)	QCIGRAGRP (配列番号:31)
32	Hel308 Mig	メタノトリス・イグネウス(<i>Methanotrix igneus</i>)Kol5	40%	35%	QCIGRAGR (配列番号:30)	QCIGRAGRP (配列番号:31)
33	Hel308 Tga	サーモコックス・ガンマトレランス(<i>Thermococcus gammaterolans</i>)EJ3	60%	38%	QMMGRAGR (配列番号:17)	QMMGRAGR P (配列番号:18)
34	Hel308 Tba	サーモコックス・バロフィルス(<i>Thermococcus barophilus</i>)MP	57%	35%	QMIGRAGR (配列番号:35)	QMIGRAGRP (配列番号:36)
37	Hel308 Tsi	サーモコックス・シビリクス(<i>Thermococcus sibiricus</i>)MM739	56%	35%	QMMGRAGR (配列番号:17)	QMMGRAGR P (配列番号:18)

10

20

30

40

38	Hel308 Mba	メタノサルキナ・バークリ(Methanosa rcina barkeri)strフ サロ	39%	60%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
39	Hel308 Mac	メタノサルシナ・アセチボランス(M ethanosarcina aceti vorans)	38%	60%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
40	Hel308 Mma h	メタノハロフィル ス・マヒイ(Metha nohalophilus mahii)DSM5219	38%	60%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
41	Hel308 Mma z	メタノサルシナ・ マゼイ(Methanosar cina mazei)	38%	60%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
42	Hel308 Mth	メタノサエタ・テ ルモフィラ(Metha noseta thermophil a)PT	39%	46%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
43	Hel308 Mzh	メタノサルスム・ ジリナエ(Methanos alsum zhilinae)DS M4017	39%	57%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
44	Hel308 Mev	メタノハロビウム ・エベスチガツム (Methanohalobium evestigatum)Z-7303	38%	61%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
45	Hel308 Mma	メタノコックス・ マリパルディス(M ethanococcus marip aludis)	36%	32%	QCIGRAGR (配列番号:30)	QCIGRAGRP (配列番号:31)
46	Hel308 Nma	ナトリアルバ・マ ガディ(Natrialba magadii)	37%	43%	QMMGRAGR (配列番号:17)	QMMGRAGR P (配列番号:18)
47	Hel308 Mbo	メタノレグラ・ボ ーネイ(Methanoreg ula boonei)6A8	38%	45%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
48	Hel308 Fac	フェロプラズマ・ アキダルマヌス(F erroplasma acidarm anus)	34%	32%	QMIGRAGR (配列番号:35)	QMIGRAGRP (配列番号:36)
49	Hel308 Mfe	メタノカルドコッ クス・フェルベン ス(Methanocalco ccus fervens)AG86	40%	35%	QCIGRAGR (配列番号:30)	QCIGRAGRP (配列番号:31)
50	Hel308 Mja	メタノカルドコッ クス・ヤンナスキ イ(Methanocalco ccus jannaschii)	24%	22%	QCIGRAGR (配列番号:30)	QCIGRAGRP (配列番号:31)
51	Hel308 Min	メタノカルドコッ クス・インフェル ナス(Methanocaldo coccus infernus)	41%	33%	QCIGRAGR (配列番号:30)	QCIGRAGRP (配列番号:31)
52	Hel308 Mhu	メタノスピリルム	36%	40%	QMAGRAGR	QMAGRAGRP

10

20

30

40

		・フンガティ(Met hanospirillum hung atei)JF-1			(配列番号:11)	(配列番号:12)
53	Hel308 Afu	アーケオグロブス ・フルギダス(Arc haeoglobus fulgidu s)DSM 4304	40%	40%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMAGRAGRP (配列番号:12)
54	Hel308 Htu	ハロテリルリゲナ ・ツルクメニカ(H aloterrigena turkme nica)	35%	43%	QMAGRAGR (配列番号:11)	QMMGRAGR P (配列番号:12)
55	Hel308 Hpa	ハラダプタツス・ パウキハロフィル ス(Haladaptatus pa ucihalophilus)DX25 3	38%	45%	QMFGRAGR (配列番号:56)	QMFGRAGRP (配列番号:57)
58	ski2-like heli case	ハロバクテリウム 菌種(Halobacterium sp.)NRC-1	36.8%	42.0%	QMFGRAGR (配列番号:56)	QMFGRAGRP (配列番号:57)

【表6】

表6－ポア電流およびDNA範囲への塩濃度増加の影響

塩(KCl)(M)	オープンポア電流(pA)	DNA範囲(pA)
0.4	180	25
1.0	440	55
2.0	840	75

【0111】

He1308ヘリカーゼは、より好ましくは(a)He1308Mb uの配列(すなわち、配列番号10)もしくはその変種、(b)He1308Pfuの配列(すなわち、配列番号13)もしくはその変種、(c)He1308Mokの配列(すなわち、配列番号29)もしくはその変種、(d)He1308Mmaの配列(すなわち、配列番号45)もしくはその変種、(e)He1308Facの配列(すなわち、配列番号48)もしくはその変種または(f)He1308Mhuの配列(すなわち配列番号52)もしくはその変種を含む。He1308ヘリカーゼは、より好ましくは配列番号10に示す配列またはその変種を含む。

【0112】

He1308ヘリカーゼは、より好ましくは(a)He1308Tgaの配列(すなわち、配列番号33)もしくはその変種、(b)He1308Csyの配列(すなわち、配列番号22)もしくはその変種、または(c)He1308Mhuの配列(すなわち配列番号52)もしくはその変種を含む。He1308ヘリカーゼは、最も好ましくは配列番号33に示す配列もしくはその変種を含む。

【0113】

He1308ヘリカーゼの変種は、野生型ヘリカーゼの配列から変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。特に、配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58の任意の1つの変種は、配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および5

10

20

30

40

50

8の任意の1つから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。配列番号10または33の変種は配列番号10または33の配列から変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。変種はヘリカーゼ活性を保持している。変種は、下に考察する2つのモードの少なくとも1つで作動しなければならない。好ましくは、変種は両方のモードで作動する。変種は、ヘリカーゼをコードするポリヌクレオチドの操作を促進するならびに／または高塩濃度および／もしくは室温でのその活性を促進する修飾を含む場合がある。変種は、上で考察したHe1308モチーフまたは伸張されたHe1308モチーフの外の領域において野生型ヘリカーゼとは典型的には異なる。しかし変種は、これらのモチーフ（複数可）内に修飾を含む場合がある。

10

【0114】

配列番号10または33などの配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58の任意の1つのアミノ酸配列全長にわたって、変種は好ましくは、アミノ酸同一性に基づいてその配列に対して少なくとも30%相同である。より好ましくは、変種ポリペプチドは、配列番号10または33などの配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58の任意の1つのアミノ酸配列に対して、配列全長にわたるアミノ酸同一性に基づいて、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であってよい。少なくとも70%、例えば少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性が150以上のストレッチ、例えば200、300、400、500、600、700、800、900または1000以上の連続するアミノ酸にわたってあり得る（「高い相同意」）。相同意は上に記載のとおり決定される。変種は配列番号2および4を参照して上に考察したいずれの方法においても野生型配列と異なっていてよい。

20

【0115】

30

配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58の任意の1つの変種は、関連する野生型配列のHe1308モチーフまたは伸張されたHe1308モチーフを好ましくは含む。例えば配列番号10の変種は、好ましくは配列番号10のHe1308モチーフ（QMAGRA GR；配列番号11）または配列番号10の伸張されたHe1308モチーフ（QMAGRAGRP；配列番号12）を含む。配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58のそれぞれのHe1308モチーフおよび伸張されたHe1308モチーフは、表5に示される。しかし、配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58の任意の1つの変種は、異なる野生型配列由来のHe1308モチーフまたは伸張されたHe1308モチーフを含む場合がある。例えば、配列番号10の変種は、配列番号13のHe1308モチーフ（QMLGРАGR；配列番号14）または配列番号13の伸張されたHe1308モチーフ（QMLGРАGRAGRP；配列番号15）を含む場合がある。配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58の任意の1つの変種は、表5に示す好ましいモチーフの任意の1つを含む場合がある。配列

40

50

番号 10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55 および 58 の任意の 1 つの変種は、関連する野生型配列の He1 308 モチーフまたは伸張された He1308 モチーフ内に修飾も含む場合がある。X1 および X2 での好適な修飾は、2 つのモチーフを定義する際に上に考察されている。

【0116】

配列番号 10 の変種は、配列番号 10 の最初の 19 アミノ酸を欠失しているおよび / または配列番号 10 の最後の 33 アミノ酸を欠失している場合がある。配列番号 10 の変種は、配列番号 10 のアミノ酸 20 から 211 または 20 から 727 にアミノ酸同一性に基づいて少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% またはより好ましくは少なくとも 95%、少なくとも 97% もしくは少なくとも 99% 相同である配列を好ましくは含む。
10

【0117】

ヘリカーゼは、ポアに共有結合的に付着されていてもよい。ヘリカーゼは、好ましくはポアに共有結合的に付着されていない。ポアおよびヘリカーゼへの電圧の印加は、典型的には標的ポリヌクレオチドを配列決定できるセンサーの形成を生じる。これは、下により詳細に考察される。

【0118】

本明細書に記載の任意のタンパク質、すなわち膜貫通タンパク質ポアまたは He1308 ヘリカーゼは、それらの同定または精製を支援するために、例えばヒスチジン残基 (his タグ)、アスパラギン酸残基 (asp タグ)、ストレプトアビジンタグ、フラッグタグ、SUMO タグ、GST タグもしくはMBP タグの付加によって、または、それらの細胞からの分泌を促進するために (ポリペプチドが天然でそのような配列を含有していない場合に) シグナル配列の付加によって修飾され得る。遺伝子タグを導入するための別法は、ポアまたはヘリカーゼ上の天然のまたは操作された位置にタグを化学的に反応させることである。この例は、ポアの外側の操作されたシステインにゲルシフト試薬を反応させることである。これは、ヘモリジンヘテロ - オリゴマーを分離するステップのための方法として実証されている (Chem Biol. 1997 Jul; 4(7):497-505)。
20

【0119】

ポアおよび / またはヘリカーゼは明示標識 (revealing label) で標識し得る。明示標識は、ポアが検出されるようにする任意的好適な標識であってよい。好適な標識は、これだけに限らないが蛍光分子、放射性同位元素 (例えば¹²⁵I、³⁵S)、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチドおよびリガンド (ビオチンなど) を含む。
30

【0120】

タンパク質は、合成的にまたは組換え手段によって作出し得る。例えばポアおよび / またはヘリカーゼは、in vitro 翻訳および転写 (IVTT) によって合成し得る。ポアおよび / またはヘリカーゼのアミノ酸配列は、天然に存在しないアミノ酸を含むようにまたはタンパク質の安定性を増大させるように修飾し得る。タンパク質が合成的手段によって生成される場合、そのようなアミノ酸は、生成の際に導入され得る。ポアおよび / またはヘリカーゼは、合成的にまたは組換え生成のいずれかに統いて変更し得る。
40

【0121】

ポアおよび / またはヘリカーゼは、D - アミノ酸を用いても生成し得る。例えばポアまたはヘリカーゼは、L - アミノ酸と D - アミノ酸との混合物を含み得る。これは、そのようなタンパク質またはペプチドを生成するための当技術分野における従来法である。

【0122】

ポアおよび / またはヘリカーゼは、他の非特異的修飾もそれらがポア形成またはヘリカーゼ機能を干渉しない限り含有できる。多数の非特異的側鎖修飾は当技術分野において公知であり、タンパク質 (複数可) の側鎖に作出し得る。そのような修飾は、例えばアルデヒドとの反応に続く NaBH₄ での還元によるアミノ酸の還元的アルキル化、メチルアセトイミデート (methylacetimidate) でのアミジン化または無水酢酸でのアシリ化を含む
50

。

【0123】

ポアおよびヘリカーゼは、当技術分野において公知の標準的方法を用いて生成し得る。ポアまたはヘリカーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を用いて得られ、複製し得る。ポアまたはヘリカーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的技術を用いて細菌宿主細胞において発現し得る。ポアおよび／またはヘリカーゼは、組換え発現ベクターからのポリペプチドの原位置での発現によって細胞において生成し得る。場合により発現ベクターは、ポリペプチドの発現を制御するために誘導性プロモーターを保持する。これらの方法は、Sambrook,J.and Russell,D.(2001).Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 3rd Edition.Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載されている。10

【0124】

ポアおよび／またはヘリカーゼは、大規模に生成することができ、タンパク質生成生物または組換え発現からの任意のタンパク質液体クロマトグラフィー系による精製が続く。典型的なタンパク質液体クロマトグラフィー系は、FPLC、AKTA systems、Bio-Cad system、Bio-Rad Biologic systemおよびGillson HPLC systemを含む。

【0125】

本発明の方法は、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定するステップを含む。方法は、標的ポリヌクレオチドの2つ、3つ、4つまたは5つ以上の特性を測定するステップを含み得る。1つまたは複数の特性は、好ましくは(i)標的ポリヌクレオチドの長さ、(ii)標的ポリヌクレオチドの同一性、(iii)標的ポリヌクレオチドの配列、(iv)標的ポリヌクレオチドの二次構造および(v)標的ポリヌクレオチドが修飾されているか否か、から選択される。(i)から(v)の任意の組合せは本発明により測定し得る。20

【0126】

(i)に関して、ポリヌクレオチドの長さは、標的ポリヌクレオチドとポアとの間の相互作用の数を用いて測定できる。

【0127】

(ii)に関して、ポリヌクレオチドの同一性は、多数の方法において測定し得る。ポリヌクレオチドの同一性は、標的ポリヌクレオチドの配列の測定を伴ってまたは標的ポリヌクレオチドの配列の測定を伴わずに測定され得る。前者は、簡単であり、ポリヌクレオチドは配列決定され、それにより同定される。後者は、いくつかの方法で行い得る。例えばポリヌクレオチド中の具体的なモチーフの存在は(ポリヌクレオチドの残りの配列を測定するステップを伴わずに)測定し得る。代替的に、方法における具体的な電気的および／または光学的シグナルの測定は、標的ポリヌクレオチドを具体的な供給源由来であるとして同定できる。30

【0128】

(iii)に関して、ポリヌクレオチドの配列は、以前記載されたとおり決定し得る。好適な配列決定方法、詳細には電気的測定を用いるものは、Stoddart Dら、Proc Natl Acad Sci、12;106(19):7702-7、Lieberman KRら、J Am Chem Soc.2010;132(50):17961-72および国際出願第WO 2000 / 28312号に記載されている。40

【0129】

(iv)に関して、二次構造は、種々の方法において測定し得る。例えば方法が電気的測定を含む場合、二次構造は残存時間における変化またはポアを通って流れる電流における変化を用いて測定し得る。これは、1本鎖と2本鎖のポリヌクレオチドの領域を区別できるようにする。

【0130】

(v)に関して、任意の修飾の存在または非存在を測定し得る。方法は、好ましくは標的ポリヌクレオチドが、メチル化によって、酸化によって、損傷によって、1つまたは複

10

20

30

40

50

数のタンパク質でまたは1つまたは複数の標識、タグもしくはスペーサーで修飾されているかどうかを決定するステップを含む。具体的な修飾は、下に記載の方法を用いて測定し得るポアとの特異的な相互作用を生じる。例えばメチルシトシン (methylcytosine) は、各ヌクレオチドとのその相互作用の際にポアを通って流れる電流に基づいてシトシンから区別し得る。

【0131】

種々の異なる種類の測定が作出されてよい。これは、非限定的に：電気的測定および光学的測定を含む。可能性のある電気的測定は、電流測定：インピーダンス測定、トンネル測定 (Ivanov APら、Nano Lett. 2011 Jan 12;11(1):279-85) および FET 測定 (国際出願第 WO 2005 / 124888 号) を含む。光学的測定は、電気的測定 (Soni GVら、Rev Sci Instrum. 2010 Jan;81(1):014301) と組み合わされ得る。測定は、ポアを通って流れるイオン電流の測定などの膜貫通電流測定であってよい。

10

【0132】

電気的測定は、Stoddart Dら、Proc Natl Acad Sci. 12;106(19):7702-7、Lieberman K Rら、J Am Chem Soc. 2010;132(50):17961-72 および国際出願第 WO - 2000 / 28312 号に記載の標準的単一チャネル記録機器を用いて作出し得る。代替的に電気的測定は、例えば国際出願第 WO - 2009 / 077734 号および国際出願第 WO - 2011 / 067559 号に記載のマルチチャネル系を用いても作出し得る。

20

【0133】

好ましい実施形態では方法は、
(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよび He 1308 ヘリカーゼに接触させて、ヘリカーゼがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するようにするステップ；および
(b) 1つまたは複数の相互作用の間にポアを通って流れる電流を測定して、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップ
を含む。

20

【0134】

本方法は、ポアが膜に挿入されている膜／ポア系を調べるために好適である任意の装置を用いて実行し得る。本方法は、膜貫通ポアセンシングに好適である任意の装置を用いて実行し得る。例えば装置は、水性溶液および、チャンバーを2つのセクションに分離する障壁を含むチャンバーを含む。障壁はポアを含有する膜が形成される開口部を有する。

30

【0135】

本方法は、国際出願第 PCT / GB 08 / 000562 号 (WO 2008 / 102120) に記載の装置を用いて実行し得る。

【0136】

本方法は、ヌクレオチド（複数可）との1つまたは複数の相互作用の間にポアを通過する電流を測定するステップを含み得る。したがって装置は、電位を印加でき、膜およびポアを通る電気シグナルを測定できる電気回路も含む。方法は、パッチクランプまたは電圧クランプを用いても実行し得る。方法は、電圧クランプの使用を好ましくは含む。

40

【0137】

本発明の方法は、ヌクレオチドとの1つまたは複数の相互作用の際にポアを通過する電流の測定を含み得る。膜貫通タンパク質ポアを通るイオン電流を測定するための好適な条件は、当技術分野において公知であり、実施例で開示される。方法は、膜およびポア全体に印加される電圧と共に典型的には実行される。用いられる電圧は典型的には、+2Vから-2Vまで、典型的には-400mVから+400mVまでである。好ましくは用いられる電圧は、-400mV、-300mV、-200mV、-150mV、-100mV、-50mV、-20mV および 0mV から選択される下限値および +10mV、+20mV、+50mV、+100mV、+150mV、+200mV、+300mV および +400mV から独立に選択される上限値を含む範囲内である。用いられる電圧は、より好

50

ましくは 100 mV から 240 mV までの範囲内、最も好ましくは 120 mV から 220 mV までの範囲内である。印加される電位を増加させることによってポアによるさまざまなスクレオチド間の識別を向上させることは可能である。

【 0 1 3 8 】

本方法は、金属塩（例えばアルカリ金属塩）、ハロゲン化塩（例えばアルカリ金属塩化物塩などの塩化物塩）などの任意の電荷担体の存在下で典型的には実行される。電荷担体は、イオン液体または有機塩、例えばテトラメチル塩化アンモニウム、トリメチルフェニル塩化アンモニウム、フェニルトリメチル塩化アンモニウムもしくは1-エチル-3メチルイミダゾリウムクロリド(1-ethyl-3-methyl imidazolium chloride)を含み得る。上に考察した例示的装置では、塩はチャンバー中の水性溶液中に存在する。塩化カリウム(KCl)、塩化ナトリウム(NaCl)または塩化セシウム(CsCl)が典型的には用いられる。KClが好ましい。塩濃度は飽和であってよい。塩濃度は、3M以下があり得、典型的には0.1から2.5Mまで、0.3から1.9Mまで、0.5から1.8Mまで、0.7から1.7Mまで、0.9から1.6Mまでまたは1Mから1.4Mまでである。塩濃度は、好ましくは150mMから1Mまでである。上に考察したとおりHe1308ヘリカーゼは、高塩濃度下で驚くべきことに作用する。方法は、少なくとも0.4M、少なくとも0.5M、少なくとも0.6M、少なくとも0.8M、少なくとも1.0M、少なくとも1.5M、少なくとも2.0M、少なくとも2.5Mまたは少なくとも3.0Mなどの少なくとも0.3Mの塩濃度を用いて好ましくは実行される。高塩濃度は、高い信号対雑音比を提供し、通常の電流変動のバックグラウンドに対してヌクレオチドの存在を示す電流が同定されることを可能にする。

[0 1 3 9]

本方法は、緩衝剤の存在下で典型的には実行される。上に考察した例示的装置では、緩衝剤はチャンバー中の水性溶液に存在する。任意の緩衝剤が本発明の方法において用いられ得る。典型的には、緩衝剤はHEPESである。別の好適な緩衝剤はTris-HCl緩衝剤である。方法は、4.0から12.0まで、4.5から10.0まで、5.0から9.0まで、5.5から8.8まで、6.0から8.7までまたは7.0から8.8までまたは7.5から8.5までのpHで典型的には実行される。用いられるpHは好ましくは約7.5である。

【 0 1 4 0 】

本方法は、0 °C から 100 °C まで、15 °C から 95 °C まで、16 °C から 90 °C まで、17 °C から 85 °C まで、18 °C から 80 °C まで、19 °C から 70 °C までまたは 20 °C から 60 °C までで実行し得る。方法は典型的には室温で実行される。方法は、約 37 などの酵素機能を支持する温度で場合により実行される。

【 0 1 4 1 】

本方法は、遊離ヌクレオチドまたは遊離ヌクレオチド類似物およびヘリカーゼの作用を促進する酵素補因子の存在下で典型的には実行される。遊離ヌクレオチドは、上に考察した個々のヌクレオチドの任意の1つまたは複数であってよい。遊離ヌクレオチドは、これだけに限らないがアデノシン一リン酸(AMP)、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン三リン酸(ATP)、グアノシン一リン酸(GMP)、グアノシンニリン酸(GDP)、グアノシン三リン酸(GTP)、チミジン一リン酸(TMP)、チミジンニリン酸(TDP)、チミジン三リン酸(TTP)、ウリジン一リン酸(UMP)、ウリジンニリン酸(UDP)、ウリジン三リン酸(UTP)、シチジン一リン酸(CMP)、シチジンニリン酸(CDP)、シチジン三リン酸(CTP)、環状アデノシン一リン酸(cAMP)、環状グアノシン一リン酸(cGMP)、デオキシアデノシン一リン酸(dAMP)、デオキシアデノシンニリン酸(dADP)、デオキシアデノシン三リン酸(dATP)、デオキシグアノシン一リン酸(dGMP)、デオキシグアノシンニリン酸(dGDP)、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)、デオキシチミジン一リン酸(dTMP)、デオキシチミジンニリン酸(dTDP)、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)、デオキシリジン一リン酸(dUMP)、デオキシリジンニリン酸(dUDP)、デオキシリ

リジン三リン酸 (dUTP)、デオキシシチジンーリン酸 (dCMP)、デオキシシチジンニリン酸 (dCDP) およびデオキシチジン三リン酸 (dCTP) を含む。遊離ヌクレオチドは、好ましくはAMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTTP、dGMP または dCMP から選択される。遊離ヌクレオチドは、好ましくはアデノシン三リン酸 (ATP) である。酵素補因子は、ヘリカーゼを機能させる因子である。酵素補因子は、好ましくは二価金属カチオンである。二価金属カチオンは好ましくはMg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺ または Co²⁺ である。酵素補因子は、最も好ましくはMg²⁺ である。

【0142】

標的ポリヌクレオチドは、He1308ヘリカーゼおよびポアと任意の順序で接触し得る。標的ポリヌクレオチドがHe1308ヘリカーゼおよびポアと接触される場合、標的ポリヌクレオチドは最初にヘリカーゼと複合体を形成することは好ましい。ポアに電圧が印加される場合、標的ポリヌクレオチド/ヘリカーゼ複合体は次いでポアと複合体を形成し、ポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御する。

【0143】

上に考察したとおり、He1308ヘリカーゼは、ナノポアに関して2つのモードで作動できる。第一に、本方法は、印加された電圧から生じる場に沿ってポアを通って標的配列を移動させるようにHe1308ヘリカーゼを用いて好ましくは実行される。このモードでは、DNAの3'末端が最初にナノポアに捕捉され、標的配列が最終的に二重層のtrans側に移行するまで場に沿ってナノポアを通るように、酵素はDNAをナノポア中に移動させる。代替的に、本方法は、印加された電圧から生じる場とは反対に酵素が標的配列をポアを通して移動させるように好ましくは実行される。このモードでは、DNAの5'末端が最初にナノポアに捕捉され、酵素は、標的配列が最終的に二重層のcis側に戻って放されるまで印加された場とは反対にナノポアの外側へ引かれるようにDNAをナノポアを通して移動させる。

【0144】

本発明の方法は、MspA由来のポアおよび配列番号8もしくは10に示す配列またはその変種を含むヘリカーゼを最も好ましくは含む。MspAならびに配列番号8および10を参照して上に考察した任意の実施形態は、組合せで用いられ得る。

【0145】

他の方法
本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法も提供する。本方法は、ポアとHe1308ヘリカーゼとの複合体を形成するステップを含む。複合体は、ポアとヘリカーゼとを標的ポリヌクレオチドの存在下で接触させ、次いで、ポアに電位を印加するステップによって形成し得る。印加される電位は、上に記載のとおり化学電位または電圧電位であってよい。代替的に複合体は、ポアをヘリカーゼに共有結合的に付着するステップによっても形成し得る。共有結合付着のための方法は、当技術分野において公知であり、例えば国際出願第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)および第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)において開示されている。複合体は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーである。方法は、MspA由来のポアとHe1308ヘリカーゼとの複合体を形成するステップを好ましくは含む。本発明の方法を参照して上に考察した任意の実施形態は、この方法に等しく適用される。

【0146】

キット

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキットも提供する。キットは、(a) ポアおよび(b) He1308ヘリカーゼを含む。本発明の方法に関連して上に考察された任意の実施形態は、キットに等しく適用する。

【0147】

キットは、脂質二重層を形成するために必要なリン脂質などの膜の構成成分をさらに含

10

20

30

40

50

んでよい。

【0148】

本発明のキットは、上に述べた任意の実施形態が実行されるようにする1つまたは複数の他の試薬または器具を追加的に含んでよい。そのような試薬または器具は、次の：好適な緩衝剤（複数可）（水性溶液）、対象から試料を得るための手段（容器もしくは、針を含む器具など）、ポリヌクレオチドを増幅および／もしくは発現するための手段、上に定義の膜または電圧もしくはパッチクランプ装置、の1つまたは複数を含む。試薬は、液体試料が試薬を再懸濁するように乾燥状態でキット中に存在する場合がある。キットは、キットが本発明の方法において用いられ得るようにする説明書、またはいずれの患者に方法が用いられ得るかに関する詳細も場合により含む場合がある。キットは、場合によりヌクレオチドを含み得る。10

【0149】

装置

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するための装置も提供する。装置は、複数のポアおよび複数のH e 1 3 0 8ヘリカーゼを含む。装置は、本発明の方法を実行するための説明書を好ましくはさらに含む。装置は、アレイまたはチップなどのポリヌクレオチド分析のための任意の従来装置であってよい。本発明の方法に関連して上に考察された任意の実施形態は、本発明の装置に等しく適用可能である。

【0150】

装置は、本発明の方法を実行するために好ましくはセットアップされている。20

【0151】

装置は、

膜および複数のポアを支持でき、ポアおよびヘリカーゼを用いてポリヌクレオチド特性決定を実施するために作動可能であるセンサーデバイス；
特性決定を実施するための材料を保持するための少なくとも1つのリザーバー；
少なくとも1つのリザーバーからセンサーデバイスに材料を制御可能に供給するように構成された流体系；および

各試料を受けるための複数の容器を好ましくは含み、
流体系は、容器からセンサーデバイスに試料を選択的に供給するように構成されている。
装置は、国際出願第P C T / G B 0 8 / 0 0 4 1 2 7号（W O 2 0 0 9 / 0 7 7 7 3 4として公開）、第P C T / G B 1 0 / 0 0 0 7 8 9号（W O 2 0 1 0 / 1 2 2 2 9 3として公開）、国際出願第P C T / G B 1 0 / 0 0 2 2 0 6号（未公開）または国際出願第P C T / U S 9 9 / 2 5 6 7 9号（W O 0 0 / 2 8 3 1 2として公開）において記載の任意のものであってよい。30

【0152】

内部結合分子モーター

分子モーターは、ポリマー（特に、ポリヌクレオチド）のナノポアを通る移行を制御するための手段として一般に用いられている。驚くべきことに、本発明者らは、標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで（すなわち5'末端または3'末端ヌクレオチド以外の位置で）結合できる分子モーターが、分子モーターがナノポアを通るポリヌクレオチドの移行を制御することから、ポリヌクレオチドの読み取り長さの増大を提供できることを見いたした。分子モーターの制御下でナノポアを通ってポリヌクレオチド全体を移行する能力は、その配列などのポリヌクレオチドの特性を改善された確度および公知の方法を超える速度で推定できるようにする。鎖長が長くなるにつれてこれはより重要になり、分子モーターは前進性の改善を必要とする。本発明において用いられる分子モーターは、500ヌクレオチド以上、例えば1000ヌクレオチド、5000、10000または20000以上の標的ポリヌクレオチドの移行を制御することにおいて特に有効である。40

【0153】

したがって、本発明は、

(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよび分子モーターに接触させて、標的ポリヌ50

クレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーターがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するよう¹⁰にするステップ、および

(b) 1つまたは複数の相互作用の間に標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法を提供する。

【0154】

本発明のH e 1 3 0 8法との関連において上に考察した任意の実施形態は、本発明この方法に等しく適用される。

【0155】

ポリヌクレオチド、特に、500ヌクレオチド以上のものを配列決定することにおいて生じる問題は、ポリヌクレオチドの移行を制御する分子モーターがポリヌクレオチドから離される場合があることである。これは、ポリヌクレオチドが印加された場の方向に急速かつ制御されない様式でポアを通って引かれるようにする。本発明において用いられる分子モーターの多く場合は、比較的短い距離でポリヌクレオチドに結合し、それによりさらなる分子モーターがポアと会合する前にポアを通って引かれ得るポリヌクレオチドの長さは比較的短い。

【0156】

内部ヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド中の末端ヌクレオチドではないヌクレオチドである。例えばそれは、3'末端ヌクレオチドまたは5'末端ヌクレオチドではない。²⁰環状ポリヌクレオチド中の全てのヌクレオチドは内部ヌクレオチドである。

【0157】

一般的に内部ヌクレオチドに結合できる分子モーターは、末端ヌクレオチドにも結合できるが、いくつかの分子モーターが内部ヌクレオチドに結合する傾向は他より大きい。本発明における使用のために好適な分子モーターは、典型的にはポリヌクレオチドへのその結合の少なくとも10%が内部ヌクレオチドへの結合である。典型的にはその結合の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%が内部ヌクレオチドへの結合である。末端ヌクレオチドでの結合は、両方の末端ヌクレオチドおよび隣接する内部ヌクレオチドへの結合を同時に含み得る。本発明の目的のためにこれは、内部ヌクレオチドでの標的ポリヌクレオチドへの結合ではない。換言すると本発明において用いられる分子モーターは、1つまたは複数の隣接する内部ヌクレオチドとの組合せで末端ヌクレオチドに結合できるだけではない。分子モーターは、末端ヌクレオチドに同時に結合することなく内部ヌクレオチドに結合できなければならない。

【0158】

内部ヌクレオチドに結合できる分子モーターは、2個以上の内部ヌクレオチドに結合できる。典型的には分子モーターは、少なくとも2個の内部ヌクレオチドに、例えば少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも10個または少なくとも15個の内部ヌクレオチドに結合する。典型的には分子モーターは、少なくとも2個の隣接する内部ヌクレオチドに、例えば少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも10個または少なくとも15個の隣接する内部ヌクレオチドに結合する。少なくとも2個の内部ヌクレオチドは隣接していても隣接しなくてもよい。

【0159】

ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合する分子モーターの能力は、比較アッセイを実行することによって決定し得る。制御ポリヌクレオチドAに結合するモーターの能力は、同じポリヌクレオチドだが末端ヌクレオチドにブロッキング基が付着しているもの(ポリヌクレオチドB)へ結合する能力と比較される。ブロッキング基は、B鎖の末端ヌクレオチドでのいかなる結合も妨げ、それにより分子モーターの内部結合だけを可能にする。この種類のアッセイの例は、実施例4に開示されている。

【0160】

好適な分子モーターは当技術分野において周知であり、典型的には、これだけに限らな

10

20

30

40

50

いが、ポリメラーゼなどの1および2本鎖トランスロカーゼ、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼおよびエキソヌクレアーゼなどのヌクレアーゼを含む。好ましくは、分子モーターは、ヘリカーゼ、例えばHe1308ヘリカーゼである。内部ヌクレオチドで結合できるHe1308ヘリカーゼの例は、これだけに限らないが、He1308Tg a、He1308MhuおよびHe1308Csyを含む。それにより分子モーターは、(a)He1308Tg a(すなわち配列番号33)もしくはその変種の配列または(b)He1308Csy(すなわち配列番号22)もしくはその変種の配列または(c)He1308Mhu(すなわち配列番号52)の配列もしくはその変種を好ましくは含む。典型的には変種は、その配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号33、22または52に対して少なくとも40%の相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持している。さらに可能性のある変種は、上に考察されている。

10

【0161】

本発明において用いられる分子モーターは、上で考察した任意の方法によって作出でき、上で考察したとおり修飾または標識し得る。分子モーターは、本明細書に記載の方法においてまたは本明細書に記載の装置の部分として用い得る。本発明は、ポアと(標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる)分子モーターとの複合体を形成すし、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するセンサーを形成するステップを含む標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法をさらに提供する。本発明は、ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するために標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーターの使用も提供する。本発明は、(a)ポアおよび(b)標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーター、を含む標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキットも提供する。本発明は、複数のポアおよび、標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる複数の分子モーターを含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための分析装置も提供する。

20

【0162】

次の実施例は本発明を例示する。

実施例

【実施例1】

【0163】

本実施例は、ナノポアを通るインタクトなDNA鎖の移動を制御するためのHe1308ヘリカーゼ(He1308MBu)の使用を例示する。本実施例全般に使用される一般的な方法および基質を図1に示し、図の解説に記載する。

30

【0164】

材料および方法

Phix174の約400bp断片を増幅するためにプライマーを設計した。これらのプライマーの各5'末端は、5'ヌクレオチド非相補性領域(ホモポリマーストレッチまたは10ヌクレオチドホモポリマーセクションの反復単位のいずれか)を含んでいた。これらは、ナノポアを通る鎖の移行を制御するためおよび移行の方向性を決定するための識別子として役立つ。付加的に順方向プライマーの5'末端を、2'-O-メチル-ウラシル(mU)ヌクレオチド4個を含むように「キャップ」し、逆方向プライマーの5'末端を化学的にリン酸化した。その結果、これらのプライマー修飾は、ラムダエキソヌクレアーゼを用いる主にアンチセンス鎖だけの制御された消化を可能にする。mUキャッピングがセンス鎖をヌクレアーゼ消化から保護する一方で、アンチセンス鎖の5'のPO4はそれを促進する。したがって、ラムダエキソヌクレアーゼとのインキュベーション後に、二重鎖のセンス鎖だけがインタクトで、1本鎖DNA(ssDNA)として残る。次いで、作製されたssDNAを既に記載のとおりPAGE精製した。

40

【0165】

本明細書に記載の全ての実験において用いたDNA基質設計を図6に示す。DNA基質は、ナノポアによる捕捉を補助するための5'リーダーを有するPhix由来のssDNAの400塩基セクションからなる(配列番号59)。5'リーダー直後の

50

この鎖にアニールするのは、二重層の表面上のDNAを濃縮し、捕捉効率を改善する3'コレステロールタグを含有するプライマー(配列番号60)である。

【0166】

緩衝溶液: 400 mM ~ 2 M KCl、10 mM Hepes pH 8.0、1 mM ATP、1 mM MgCl₂、1 mM DTT
ナノポア: 大腸菌(E.coli)MS(B2)8 MsPA ONLP3271MS - (L88N/D90N/D91N/D93N/D118R/D134R/E139K)8
酵素: Hel308Mbu(ONLP3302、約7.7 μM)12.5 μl -> 最終100 nM

【0167】

1,2-ジフィタノイル-グリセロ-3-ホスホコリン脂質(Avantipolar Lipids)二重層に挿入された単一のMsPAナノポアから電気計測値を得た。二重層は、モンタル-ミューラー技術によって開口部直径約100 μm、厚さ20 μmのPTFEフィルム(Delrin chambers注文生産)で形成され、2個の1 mL緩衝溶液に分けた。全ての実験は、上記の緩衝溶液中で実行した。单一チャネル電流を1440 Aデジタイザーを備えたAxopatch 200B amplifiers(Molecular Devices)で測定した。Ag/AgCl電極を緩衝溶液に繋ぎ、cisコンパートメント(ナノポアおよび酵素/DNAの両方が添加されている)をAxopatch headstageのアースに繋ぎ、transコンパートメントをheadstageの探査電極に繋ぐ。二重層中の単一ポアを達成した後、DNAポリヌクレオチドおよびヘリカーゼを緩衝液100 μLに加え、5分間予備インキュベートした(DNA = 1.5 nM、酵素 = 1 μM)。MsPAナノポアでのヘリカーゼDNA複合体の捕捉を開始するためにこの予備インキュベーション混合物を電気生理学チャンバーのcisコンパートメント中の緩衝液900 μLに添加した(DNA = 0.15 μM、酵素 = 0.1 μMの最終濃度をもたらす)。ヘリカーゼATPase活性を必要に応じてcisコンパートメントへの二価金属(1 mM MgCl₂)およびNTP(1 mM ATP)の添加によって開始させた。実験を+180 mVの一定電位で実行した。
10

【0168】

結果および考察

図1に示すヘリカーゼ-DNA基質のMsPAナノポアへの添加は、図2に示す特性的電流遮断を生じる。ヘリカーゼ結合を含まないDNAは、ナノポアと一過的に相互作用し、電流に短い遮断(<<1秒間)を生じる。ヘリカーゼ結合を有し、活性な(すなわち、ATPase作用の下でDNA鎖に沿って移動する)DNAは、図2に示す電流における段階的变化を含む長い特性的な遮断レベルを生じる。ナノポア中のさまざまなDNAモチーフは、独特の電流遮断レベルを生じさせる。
20

【0169】

所与の基質に関して本発明者らは、DNA配列を反映する電流移行の特性的パターンを観察する(図3の例)。

【0170】

図1に示す実行では、鎖に沿った無作為な位置でDNAがヘリカーゼに捕捉されることから、DNA鎖は無作為な開始点から配列決定される。しかし、酵素が解離しない限り、鎖は50 Tリーダーで同じように全て終了する(図1)。図2に示すとおり本発明者らは、長い残存時間ポリTレベルでの電流移行終末を伴って大部分の鎖に同じ特性的な終末を観察する(図3)。
40

【0171】

耐塩性

この種のナノポア鎖配列決定実験は、イオン性塩を必要とする。DNAを捕捉および移行させるため、およびDNAがナノポアを通るときに生じる配列依存性電流変化を測定するために電圧オフセットを印加するための導電性溶液を作製するためにイオン性塩が必要である。測定シグナルがイオンの濃度に依存することから、得られるシグナルの振幅を増
50

大させるために高濃度イオン性塩を用いることは有利である。ナノポア配列決定のために、100 mM KClを超える塩濃度は理想的であり、1 M KCl以上の塩濃度は好ましい。

【0172】

しかし、多数の酵素（いくつかのヘリカーゼおよびDNAモータータンパク質を含む）は、高塩濃度条件を許容しない。高塩濃度条件下で、酵素は、アンフォールドするか構造的完全性を失うかのいずれかであるか、または適正に機能できない。公知および研究されたヘリカーゼについての最新文献は、ほとんど全てのヘリカーゼがおよそ100 mM KCl / NaClを超える塩濃度で機能できず、400 mM KCl以上の条件で正確な活性を示す報告されたヘリカーゼはないことを示す。耐塩性種由来の類似酵素の有望な好塩性変種が存在するが、それらを標準的発現系（例えば大腸菌（E.coli））において発現および精製することは非常に困難である。10

【0173】

本発明者らは驚くべきことに、本実施例においてMb u由来のHel308が非常に高いレベルのKClまでの耐塩性を示すことを示す。本発明者らは、400 mM KClから2 M KClの塩濃度において酵素が機能性を保持することを、蛍光実験またはナノポア実験のいずれかで見いだしている（図4）。図4は、400 mM KCl、1 M KClおよび2 M KCl塩条件で図1に記載したものと同じ系を用いて実行したHel308 Mb u DNA事象を示す。本発明者らは、塩濃度範囲にわたって同様の移動を観察している。本発明者らは、塩濃度が増加するにつれて、固定電圧でナノポアを通る電流（I-オープン）が増大することを観察している。これは、溶液の伝導性の増大および印加された場の下でナノポアを流れて通るイオンの数の増加を反映する。さらに、本発明者らは、DNA事象の電流レベルにおける識別の最小から最大範囲の拡大も観察している（図4拡大図および下右プロットを参照されたい）。本発明者らは、塩濃度が400 mM KClから2 M KClに増加する場合のDNA識別範囲における約200%の拡大を観察している（下の表6）。20

【0174】

【表6】

表6－ポア電流およびDNA範囲への塩濃度增加の影響

塩(KCl)(M)	オープンポア電流(pA)	DNA範囲(pA)
0.4	180	25
1.0	440	55
2.0	840	75

【0175】

操作の順方向および逆方向モード

大部分のヘリカーゼは、1本鎖ポリヌクレオチド基質に沿って單一方向様式で移動し、各NTPase代謝回転について特定数の塩基を移動する。図1は挿入されたDNAをナノポアの外へ引くこの移動の使用を例示するが、ヘリカーゼ移動は、制御されたやり方でナノポアを通るDNAを供給する他の様式に利用され得る。図5は、操作の基本的な「順方向」および「逆方向」モードを例示する。順方向モードではDNAは、印加された場の力の下でDNAが移動するのと同じ方向にヘリカーゼによってポアへ供給される。Hel308 Mb u（3' - 5' ヘリカーゼである）に関して、これはヘリカーゼがナノポアの先端に接触するまでナノポア中のDNAの3'末端の捕捉を必要とし、次いで印加された電位からの場でのヘリカーゼの制御下でDNAはナノポアに供給され、最終的に二重層のtrans側に出る。逆方向モードは、DNAの5'末端の捕捉を必要とし、その後ヘリカーゼは印加された電位からの場と反対に挿入されたDNAをナノポアの反対に引くために進み、最終的にそれを二重層のこのcis側に放す。図5は、Hel308 Mb uを用4050

いる操作のこれら 2 つのモードおよび典型例 D N A 事象を示す。

【実施例 2】

【0176】

本実施例は、酵素活性を検査するための蛍光アッセイを用いる H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ (H e 1 3 0 8 M B u) の耐塩性を例示する。

【0177】

通常の蛍光基質を、ハイブリダイズされた d s D N A を置換するヘリカーゼの能力をアッセイするために用いた (図 6 A) 。図 6 A の 1) に示すとおり、蛍光基質鎖 (最終 1 0 0 n M) は、 3 ' s s D N A オーバーハングおよびハイブリダイズされた d s D N A の 4 0 塩基セクションを有する。主要な上部鎖は 5 ' 末端にカルボキシフルオレセイン塩基を有し、ハイブリダイズされた相補物は 3 ' 末端にブラックホールクエンチャー (B H Q - 1) 塩基を有する。ハイブリダイズされると、フルオレセイン由来の蛍光は局在 B H Q - 1 によって消光され、基質は基本的に非蛍光性である。蛍光基質の短い鎖に相補的である捕捉鎖 1 μ M がアッセイに含まれる。 2) に示されるとおり A T P (1 mM) および M g C l 2 (5 mM) の存在下で基質に添加されたヘリカーゼ (1 0 0 n M) は、蛍光基質の 3 ' テールに結合し、主要な鎖に沿って移動し、示すとおり相補鎖を置換する。 3) に示すとおり、 B H Q - 1 を有する相補鎖が完全に置換されると、主要な鎖上のフルオレセインは蛍光を発する。 4) に示すとおり、過剰量の捕捉鎖が相補的 D N A に優先的にアニールし、初期基質の再アニールおよび蛍光の消失を防ぐ。

【0178】

基質 D N A : 5 ' F A M - 配列番号 6 1 および配列番号 6 2 - B H Q 1 - 3 ' 、 F A M = カルボキシフルオレセインおよび B H Q 1 = ブラックホールクエンチャー - 1

【0179】

捕捉 D N A : 配列番号 6 2

【0180】

図 6 中のグラフは、 4 0 0 mM から 2 M の K C l のさまざまな濃度を含有する緩衝溶液 (1 0 mM H e p e s p H 8 . 0 、 1 mM A T P 、 5 mM M g C l 2 、 1 0 0 n M 蛍光基質 D N A 、 1 μ M 捕捉 D N A) 中での活性の初期速度を示す。ヘリカーゼは 2 M で作動する。

【実施例 3】

【0181】

本実施例では、 3 種の異なる H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ、すなわち H e 1 3 0 8 M h u (配列番号 5 2) 、 H e 1 3 0 8 M o k (配列番号 2 9) および H e 1 3 0 8 M m a (配列番号 4 5) を用いた。全ての実験は、実施例 1 に既に記載のとおりの同じ実験条件下で実施した (ポア = M s p A B 2 、 D N A = 4 0 0 塩基長 配列番号 5 9 および 6 0 、緩衝液 = 4 0 0 mM K C l 、 1 0 mM H e p e s p H 8 . 0 、 1 mM d t t 、 1 mM A T P 、 0 . 1 mM M g C l 2) 。結果を図 7 に示す。

【実施例 4】

【0182】

本実施例は、蛍光アッセイを用いて多数の H e 1 3 0 8 ヘリカーゼの内部結合能力を測定する。

【0183】

通常の蛍光基質を使用して、天然の 3 ' 末端を欠失している D N A で開始するヘリカーゼの能力をアッセイし、続いてハイブリダイズされた d s D N A を置換させた (図 8) 。図 8 のセクション A に示すとおり、蛍光基質鎖 (最終 5 0 n M) は、 3 ' s s D N A オーバーハング、およびハイブリダイズされた d s D N A の 4 0 塩基セクションを有する。主要な上部鎖を 4 個の連続する「スペーサー 9 」基で、 3 ' 末端または、オーバーハングと d s D N A との間の接合部で (陰性対照として) 内部的に、のいずれかで修飾する。さらに主要な上部鎖は、 5 ' 末端にカルボキシフルオレセイン塩基を有し、ハイブリダイズされた相補物は 3 ' 末端にブラックホールクエンチャー (B H Q - 1) 塩基を有する。ハイ

10

20

30

40

50

ハイブリダイズされると、フルオレセイン由来の蛍光は局在 BHQ - 1 によって消光され、基質は基本的に非蛍光性である。蛍光基質の短い鎖に相補的である捕捉鎖 (1 μM) がアッセイに含まれる。ATP (1 mM) およびMgCl₂ (1 mM) の存在下で、3' - 末端「スペーサー9」基を含有する基質に添加されたHe1308ヘリカーゼ相同体 (20 nM) は、蛍光基質のssDNAオーバーハングに結合でき、主要な鎖に沿って移動し、セクションBに示すとおり相補鎖を置換する。BHQ - 1 を有する相補鎖が完全に置換されると(セクションC) 主要な鎖上のフルオレセインは蛍光を発する。過剰量の捕捉鎖が相補的DNAに優先的にアニールし、初期基質の再アニールおよび蛍光の消失を防ぐ(セクションD)。

【0184】

10

基質DNA : 5' FAMを有する配列番号63；5' FAMおよび3'スペーサー((スペーサー9)₄)を有する配列番号63；配列番号：64(5' FAMを有する)およびスペーサー((スペーサー9)₄)によって分離された65；ならびに3' HQ1を有する配列番号62。

【0185】

捕捉DNA : 配列番号66

【0186】

He1308Mbu、He1308Csy、He1308Tga、He1308Mma、He1308Mhu、He1308Min、He1308Mig、He1308Mmaz、He1308Mac、He1308Mok、He1308Mth、He1308Mb aおよびHe1308Mzhを含むいくつかの異なるHe1308ヘリカーゼ相同体を中心結合能力について調べた。図9中のグラフは、He1308 - 調節dsDNA代謝回転の相対速度を、400 mM NaCl、10 mM Hepes、pH 8.0、1 mM ATP、1 mM MgCl₂、50 nM 蛍光基質DNA、1 μM 捕捉DNA中の3' - 未修飾DNAおよび3' - 「スペーサー9」DNAと比較して示す。He1308Csy、He1308Tga、He1308Mma、He1308MhuおよびHe1308Minを含むいくつかのHe1308相同体は、He1308 - 調節dsDNA代謝回転より20%大きな相対速度を有することを観察した。

20

【実施例5】

【0187】

30

本実施例は、2つのHe1308ヘリカーゼ、He1308MBuおよびHe1308Tgaの使用と、インタクトな長いDNA鎖(900塩基長)のナノポアを通る移動を制御するそれらの能力を比較する。本実施例全体を通じて使用された一般的方法および基質は、図10に示され、図上の記述に記載されている。

【0188】

材料および方法

50 - ポリT5'リーダーをPhiX dsDNAの約900塩基断片にライゲーションすることによって、DNAを形成した。リーダーは、DNAが二重層に挿入されるようにするためにCholタグを有する配列番号69がハイブリダイズされた相補性セクションも含有する。最後にACGTの4nt 3' - オーバーハングを得るためにPhiX dsDNAの3'末端をAatII消化酵素で消化した。

40

【0189】

配列決定：配列番号67 - 5'リーダーおよびテザーを含む900塩基長センス鎖；配列番号68 - アンチセンスマイナス4塩基対リーダー5'；およびいくつかのスペーサーおよび3'末端にChol - タグを有する配列番号69。

【0190】

緩衝溶液：400 mM ~ 2 NaCl、10 mM フェロシアン化カリウム、10 mM フェリシアン化カリウム、100 mM Hepes、pH 8.0、1 mM ATP、1 mM MgCl₂、

ナノポア：MS - (B1 - G75S - G77S - L88N - Q126R)8 (ONT R

50

e f B 2 C)

酵素 : H e 1 3 0 8 M b u 最終 1 0 0 0 n M または H e 1 3 0 8 T g a 最終 4 0 0 n M

【 0 1 9 1 】

脂質二重層に挿入された単一ポアを達成するために、電気的実験を実施例 1 に記載のとおり準備した。二重層中の単一ポアを達成した後に、A T P (1 mM) および M g C l₂ (1 mM) をチャンバーに加えた。 + 140 mV での対照記録を 2 分間実行した。次いで D N A ポリヌクレオチド配列番号 : 67、68 および 69 (D N A = 0 . 15 n M) を添加し、D N A 事象を観察した。最後に H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ (M b u 1 0 0 0 n M または T g a 、 4 0 0 n M) を電気生理学的チャンバーの c i s コンパートメントに M s p A ナノポアでのヘリカーゼ - D N A 複合体の捕捉を開始するために添加した。実験は、 + 140 mV の一定電位で実行した。

【 0 1 9 2 】

結果および考察

図 10 に示すとおり、ヘリカーゼ - D N A 基質の M s p A ナノポアへの添加は、ヘリカーゼがポアを通る D N A の移行を制御することから特徴的電流遮断を生じる。図 11 は、 H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ相同体 M b u が M s p A ポアを通る D N A 鎖の移行を制御したときに 900 塩基長の位置がどのように変化したかを示す追跡事象例を示す。このヘリカーゼは、 D N A 移行の制御を調節することが見いだされたが、ヘリカーゼが D N A から脱離すると、外部から印加された電位によってかかる力のために鎖がポアを通って戻ることが観察された。 H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ相同体 M b u の場合では、 900 塩基長鎖はヘリカーゼが離れるごとに多くの位置（およそ 100 ~ 200 塩基）が滑り戻る。位置におけるこれらの急速な変化は、図 11 に点線円で示されている。この実験に関して H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ相同体 M b u が分子モーターとして用いられた場合は、検出された全事象の 32 % が 900 塩基長鎖配列の全長を読み取ったことが見いだされた。図 12 は、 H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ相同体 T g a が M s p A ポアを通る D N A 鎖の移行を制御した場合に 900 塩基長の位置がどのように変化したかを示す同様の追跡事象例を示す。 T g a ヘリカーゼが離れた場合（図 12 において黒から灰色への色の変化によって示される）に D N A 鎖が比較的小ない距離 (< 50 塩基) だけポアを通って戻ることから、この酵素は M b u 相同体よりも内部に結合するより大きな傾向を示した。この実験に関して、 H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ相同体 T g a が分子モーターとして用いられた場合は、検出された全事象の 74 % が 900 塩基長鎖配列の全長を読み取ったことが見いだされた。これは、内部に結合する傾向の増大のために M b u ヘリカーゼ相同体と比較して T g a ヘリカーゼ相同体が 1 本鎖 D N A の読み取り長さの増大を提供できることを意味する。

【 実施例 6 】

【 0 1 9 3 】

本実施例は、 H e 1 3 0 8 ヘリカーゼ相同体 T g a を使用することによって D N A の 5 k b 鎖の移行を制御できることを例示する。

【 0 1 9 4 】

実施例 5 に記載のものと類似の実験手順に従った。 H e 1 3 0 8 T g a を使用することによって M S - (B 1 - G 7 5 S - G 7 7 S - L 8 8 N - Q 1 2 6 R) 8 を通る D N A の 5 k b 鎖全体の制御された移行を検出できたことを観察した。 H e 1 3 0 8 M b u を用いる同一の実験では、 5 k B 鎖全体の移行を検出できなかった。

【 実施例 7 】

【 0 1 9 5 】

本実施例は、蛍光に基づくアッセイを用いて H e 1 3 0 8 M b u ヘリカーゼ（配列番号 10 ）の酵素前進性を H e 1 3 0 8 M o k （配列番号 29 ）と比較する。

【 0 1 9 6 】

通常の蛍光基質をハイブリダイズされた d s D N A を置換するヘリカーゼの能力をアッセイするために用いた（図 3 ）。蛍光基質（最終 50 n M ）は、 3 ' s s D N A オーバーハングならびにハイブリダイズされた d s D N A の 80 および 33 塩基対セクション（図

13セクションA、配列番号70)を有する。主要な下部「テンプレート」鎖は、80nt「プロッカー」鎖(配列番号71)にハイブリダイズし、その3'オーバーハングおよび33nt蛍光プローブに隣接し、その5'および3'末端をカルボキシフルオレセイン(FAM)およびブラックホールクエンチャー(BHQ-1)塩基でそれぞれ標識される(配列番号72)。ハイブリダイズされると、FAMはBHQ-1から離れ、基質は基本的に蛍光性である。ATP(1mM)およびMgCl₂(10mM)の存在下でヘリカーゼ(20nM)は、図13セクションBに示すとおり基質の3'オーバーハング(配列番号70)に結合し、下部鎖に沿って移動し、80ntプロッカー鎖(配列番号71)を置換し始める。前進性である場合、ヘリカーゼは、蛍光プローブ(その5'末端をカルボキシフルオレセイン(FAM)でおよびその3'末端をブラックホールクエンチャー(BHQ-1)で標識された配列番号72)も置換する(図13セクションC)。蛍光プローブは、その5'および3'末端が自己相補的であり、それにより一度置換されると力学的に安定なヘアピンを形成し、プローブのテンプレート鎖への再アニーリングを防ぐよう設計される(図13セクションD)。ヘアピン産物の形成ではFAMはBHQ-1の近傍に運ばれ、その蛍光は消光される。80塩基長「プロッカー」(配列番号71)および蛍光(その5'末端をカルボキシフルオレセイン(FAM)でおよびその3'末端をブラックホールクエンチャー(BHQ-1)で標識された配列番号72)鎖を置換できる前進性酵素は、したがって経時的な蛍光における減少をもたらす。しかし酵素が80nt未満の前進性を有する場合は、蛍光鎖(その5'末端をカルボキシフルオレセイン(FAM)でおよびその3'末端をブラックホールクエンチャー(BHQ-1)で標識された配列番号72)を置換することができず、それにより「プロッカー」鎖(配列番号71)は主要な下部鎖(図13セクションE、配列番号70)に再アニールする。

【0197】

追加的な通例の蛍光基質も制御目的で用いた。陰性対照として用いた基質は、図13に記載されたものと同一であったが、3'オーバーハング(図14セクションA、(配列番号71、72(その5'末端をカルボキシフルオレセイン(FAM)でおよびその3'末端をブラックホールクエンチャー(BHQ-1)で標識された)および73))を欠失している。図13に記載されたものと同様だが80塩基対セクションを欠失している基質を活性ヘリカーゼの(しかし前進性である必要はない)陽性対照として用いた(図14セクションB、(配列番号72(その5'末端をカルボキシフルオレセイン(FAM)でおよびその3'末端をブラックホールクエンチャー(BHQ-1)で標識された)、ならびに74))。

【0198】

図15は、緩衝溶液(400mM NaCl、10mM Hepes pH 8.0、1mM ATP、10mM MgCl₂、50nM蛍光基質DNA(配列番号70、71および72(その5'末端をカルボキシフルオレセイン(FAM)でおよびその3'末端をブラックホールクエンチャー(BHQ-1)で標識された))中での図13に示す前進性基質に対するHe1308MbUヘリカーゼ(配列番号10)およびHe1308Mokヘリカーゼ(配列番号29)の試験での時間依存性蛍光変化のグラフを示す。He1308Mokによって示された蛍光の減少は、He1308MbU(配列番号10)と比較したこれらの複合体の前進性の増大を示す。図16は、全ての試料に関して蛍光が減少したことから全てのヘリカーゼが実際に活性であったことを実証する陽性対照を示す。

配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54および55(表4)を下に配列比較する。

*の下の数字は配列番号を示す。「-」は、配列比較目的のためだけに示されており、配列の部分を形成しない。

1	10	Heil308	Mbu	(1)	- MIRELDIPRD11GFGDSGKIELYPPQAEMGLE - KRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLK
	53	Heil308	Afu	(1)	- MRYTELLAESISSYAVGILKEEGIEELPPQAEMVFS - GRNLLAMPACTTLIAEAMVFS
	22	Heil308	Csy	(1)	- MRSILDIPRATFELSEGGKLYPPQAAKAGLTD - GKSYLVSSAPTAESCKTLIAEAMIS
	75	Heil308	Dth	(1)	- MTCYDELLQMQGQDQLQGLSTVAKEIIPAREAFSGCIEGLPPLQALTESCIEFLNTYEVLE
	48	Heil308	Fac	(1)	- MKLUSIDTPELKLVNDTFLZEHOPEAFLVYK - KNTVVAUTPASCKTLIAEAML
	19	Heil308	Hla	(1)	- MOPSSULGPAGVSELAFAEGVAD - GEHSVAAVTPASCKTLIAEAMLS
	55	Heil308	Hpa	(1)	- MNVADITLGDPGATHFRCEGIEELPPQAEEAGITE - GESTVAAIPASCKTLIAEAMLS
	54	Heil308	Htu	(1)	- MNVLELTGDPGATHFRCEGIEELPPQAEEAGATD - GENVAAVTPASCKTLIAEAMLS
	16	Heil308	Hvo	(1)	- MRTADITGLPTGEALDEGIEELPPQAEEAGLTD - GESLVAAVTPASCKTLIAEAMLS
	39	Heil308	Mac	(1)	- MKIESLIDLEDEVFTYNGSIMEILYPPQAEEVGLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLK
	38	Heil308	Mba	(1)	- MKISLIDLEDEVFTYNGSIMEILYPPQAEEVGLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLK
	47	Heil308	Mbo	(1)	- MKIQPLATEPFLPQQYLGTRIYPPQAECVLLD - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLR
	44	Heil308	May	(1)	- METCGKLELPFVVTOFLQYDGTGIEELPPQAEEVGLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAML
	49	Heil308	Mfe	(1)	- MPTNKLLILEDKGIEELPPQAEEVGLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLN
	28	Heil308	Mfr	(1)	- DLSLEKAFOYKDQGKIESLYPPQSCINCILLD - GADLVLIAPTASCKTLIAEAMWA
	52	Heil308	Mfu	(1)	- MELIASLIPLEDSPFRAZKGIGSLYPPQACIEERGELLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMWA
	32	Heil308	Mig	(1)	- MKYSHTEVILKENGTEKLRLPQKVEVGLLNKEKNTLICIPASCKTLIAEAMLN
	51	Heil308	Min	(1)	- MDELLFQGKIELRPPQKALLGILDKKKNNLISIPTGAGKTYTAEMALIN
	45	Heil308	Mna	(1)	- MHVDLIKESEADEVVLOAGIEELPPQDADEVGLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLN
	76	Heil308	Mnar	(1)	- MKTBLDIPSEAEDEVVLOAGIEELPPQDADEVGLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLK
	40	Heil308	Mnh	(1)	- MDVADLGVPEWLPHLDRGDIEELPPQDAEVGVE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLS
	29	Heil308	Mnz	(1)	- MKIESLIDPDETEKFYENSGTILEYPPQAEEVGLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLK
	42	Heil308	Mth	(1)	- MLI7RDLIRWPLSESTYELPGQDQHLLPQQAECVLLD - GRNLLIISYPTASCKTLIAEAMLR
	43	Heil308	Mzh	(1)	- MINNINNLPEKVKYTYDTGIVDLYPPQRAVDGLLD - GENVAAVTPASCKTLIAEAMLK
	46	Heil308	Nma	(1)	- MNEVEELSGLEPGALKSFQGQDQHLLPQQAECVLLD - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMLN
	77	Heil308	Nch	(1)	- MSETYLISSEROKKTMENMGDEFTPVQDTEPIYANT - NKNUVYSSSTASCKTLIAEAMLS
	13	Heil308	Pru	(1)	- MRYDELRL - VDERKLSTLBERGETSFYPPQASALKSCLLE - GRNLLIISIPTASCKTLIAEAMV
	25	Heil308	Sso	(1)	- MSLELNPMPD1KLPSNSVIEIJKRGKMKLNLPOTEAVKGLLE - GRNLLSSEPTGSECKTLIAEAMLS
	33	Heil308	Tba	(1)	- MUSLTKPKAYRFPSIG - YAMQDVELP - VDERKLAVLBERGETSFYPPQASALKSCLLE - GRNLLAIAPTASCKTLIAEAMVN
	37	Heil308	Tga	(1)	- MKLNKLKSYINAFLIGHTMSMKYDLSKLGUDERLRLRERGIELYPPQDALKTEVKL - GRNLLVLPATASCKTLIAEAMLN
*	77	Heil308	Tgn	(1)	- MDKLLBLLDQFGLPQKALLERGELLNKEKNTLICIPASCKTLIAEAMLN
	78	Heil308	Wma	(1)	- T P C T V U P Q C A E T T I I N C O N T R A C T I P M S C E N T T A F T A M T
	79	Heil308	Wmn	(1)	- T P V

96

1.90

He1308 Mbu	(63) AIREGG-----KALIYIVPLRALLESEKFERFK-EELAP-----FGIKVG1STGDLDSRADWLGVNDIIVATSEKTDSSLRNNGTSWMD-----EIT
He1308 Afu	(64) EA1KGG-----KSLYVVPRLAAGEKYESFK-KWEK-----IGLRIG1STGYESRDEHILGDCDIIIVTTSEKADSLIRNRASWIK-----AVS
He1308 Csy	(63) EILSRNR-----GKAVYILSPRLAIAAEKFAEFGKIGGIPL-GRPVRYGVYSTGDFEKAGRSLGNNDLIVLTNERMDSLIRRDPDWM-----EYG
He1308 Dth	(94) SIINDP-----ASRALYLFPKLALTRDQLTSLEEFARLLAGKVHD SAVYDGGDTPQARARIRSKPPNILLTPDMILHRSFLPYHRSWQKFESALK
He1308 Fac	(60) TYLKKG-----KSMYIVPLRSIAMKEFSELL-SLRN-----LGVKVTMSIGDYDVPPSFVKNYDVIIATSERADSMIHLRDPDILN-----YFG
He1308 Hla	(64) SIERGG-----KALIYIVPLRALLESEKKTTEFE-RWE-----FGTVTGYSTGNYYESDGEWLATRDIVATSEKVDSSLIRNGAPWID-----DLT
He1308 Hpa	(64) SVARGG-----KALIYIVPLRALLESEKKEFE-EFEQ-----YGSISIGVSTGNYYESDGDWLNASRDIIIVATSEKVDSSLVRNGAKWD-----DLS
He1308 Htu	(64) AVORG-----KALIYIVPLRALLESEKKEFE-AYE-----FGVTTGVTGNYYESSTDWLWATKDIIIVATSEKVDSSLVRNGADWL-----ELT
He1308 Hvo	(64) SYARGG-----KALIYIVPLRALLESEKKAFFE-RWE-----YGDVGVGSTGNYYESDGEWLSSRDIIVATSEKVDSSLVRNNAAAMD-----QLT
He1308 Mac	(63) SVLAGG-----KALIYIVPLRALLESEKFRFQ-DFSE-----LGIRVGL1STGDYDRDREGLGINDIVATSEKTDSSLRNNETAWMO-----EIS
He1308 Mba	(63) SILAGG-----KALIYIVPLRALLESEKFRFR-EFSE-----LGIRVGL1STGDYDRDREGLGINDIVATSEKTDSSLRNNETAWMO-----EIS
He1308 Mbo	(63) HIANGG-----KCLIXYIVPLKALASEKYEFG-NK-----GVKVLGSTGDLDRRDALGKNDIVATSEKTDSSLRNNGARWIP-----DIT
He1308 Mev	(63) SISNGG-----KCLIXYIVPLKALASEKFERFK-QFSS-----IGVNIG1STGDFDSTDEWLGSNDIVATSEKVDSSLRNNTSMWK-----DIT
He1308 Mfe	(58) HILDENKNPTNKKGIFTIVPLKALASEKYEFRNKYER-----YGLRVALSIGDYD-EDEDLSRYHLIITTAEKLDSSLWRHKIDWID-----DVS
He1308 Mfr	(59) AIARGG-----MCLYIVPLKALATEKAQEFK-GK-----GAEIGVATGVDYDOKEKRGLGSNDIVATSEKVDSSLRNNGPWL-----QVT
He1308 Mhu	(63) RIAAGG-----KCLIXYIVPLRALLESEKYEDEFS-KKG-----VIRVGLATGDLDRRTDAYLGENDIVATSEKTDSSLRNRTPWLS-----QIT
He1308 Miq	(59) HILDENKPTNKKGIFTIVPLKALASEKYEFRKRYER-----YGLRVALSIGDYD-EKEDLSSYNTIITTAEKLDSSLIMRHEIDWLW-----YVS
He1308 Min	(53) HILLDK-----GKKGVYTIVPLKALASEKYEFRKKYER-----FGYRVALSIGDYD-EDEDLENYDIIITTAEKFDSSLWRHGKIKL-----DIS
He1308 Mma	(55) HILDENKNLTGKKGLIFTIVPLKALANEKEFDFREKEYK-----YGIKVGLSIGDFD-TKENLSKFEHIIITTSEKLDSSLMRHNVIEWIN-----DVS
He1308 Mmh	(63) AIKGG-----KALIYIVPLRALLESEKFRDFK-RFES-----LGIKTAISSTGDFDSRDEWLGSNDIVATSEKTDSSLRNISTPWK-----DIT
He1308 Mmar	(64) SYARGG-----KALIYIVPLRALLESEKQADF-EFEQ-----YGLDIGVSTGNYYESEGGWLADKDIVATSEKVDSSLVRNDAPWIE-----DLT
He1308 Mmaz	(63) SVLNGG-----KALIYIVPLRALLESEKFRFQ-EFSV-----LGMRVGL1STGDYDRDREGLGINDIVATSEKTDSSLRNNETAWMO-----EIS
He1308 Mok	(56) HILDNNKPTPNKKGIFTIVPLKALANEKYEFKGYER-----YGLKIALSIGDFD-EKEDLKGYDIIITTAEKLDSSLIRHKVEWIK-----DIS
He1308 Mth	(66) GALSGK-----RSLYIVPLRALLESEKFESES-RESK-----LGILRGV1STGDFEKRDERLGNDIIITATSEKADSSLIRNGASWV-----RIG
He1308 Mzh	(63) SIGMGG-----KCLIXYIVPLKALASEKYSRFR-EFES-----LGIKVGTATGDLDSREWLGKNDIIITATSEKVDSSLRNNTSMWK-----EIN
He1308 Nma	(64) AVORG-----KALIYIVPLRALLESEKKAED-AYE-----FGVTTGVTGNYESTSEWLTKDIIITTYEKLDSLWRHRPEWL-----DVT
He1308 Nth	(63) QIEKDAT-----KDLKILYISPLKALINDQFERRIKLCESKY-IPIHWRWHGDVNQNKKQLTKNPAGLQITPESIESLFTNRTNEINYIL-----SDIE
He1308 Pfu	(63) RILTQG-----GKAVYIVPLKALAEKFOEQ-DWEK-----IGLRVAMATGDYDSSKDEWLGYDKIIITATEKFDSSLRHGSSWIK-----DVK
He1308 Sso	(70) FLLKNG-----GRA1YIVPLRALLNEKYLTFK-DWE L-----IGFKVAMTSGDYDTDDAWLKNYDIIITTYEKLDSLWRHRPEWL-----EVN
He1308 Tba	(84) KLFTEG-----GKAVYIVPLKALAEKYEKFKEFK-TWE D-----LGVRVAVTGDYDSSEEWLGKYDIIITATEKFDSSLRHKSRWIR-----DVT
He1308 Tga	(63) KLIQEG-----GKAVYIVPLKALAEKYEKFKEFK-EWEK-----LGKVAATTGDYDSTDWLGRYDIIIVATAEKFDSSLRHEGARWIN-----DVK
He1308 Tsi	(86) KILREG-----GKTVYIVPLKALAEKYEKFKEFK-FWEK-----LGIRIATMTGDYDSTEWLGKYDIIITATEKFDSSLRHKSPWIK-----DIN
He1308 Mja	(56) HILDGNNKNPTNKKGIFTIVPLKALASEKYEFRKSKYER-----YGRIRIALSIGDYD-EDEDLSKYHLLITTAEKLDSSLWRHKIDWIN-----DVS
Consensus	(96) IL GG KALIYIVPLRALLESEKYE EFK FE GVRVG1STGDYD DEWLG DIVATSEKVDSSLRN WI DIT

191

285

He1308 Mbj	(140) TVVDEIHLDSKRNRGPTLEVTITKLMRINPD----VQVVALSATVGNAREMADWLG--
He1308 Afu	(141) CLVVDEIHLIDSEKRGATLETTIVTKMRMRMKAA----IRVIGLSATAPNVTEIAEWLD--
He1308 Csy	(145) LVIADEIHLIGDRSRGPTLEMTITKLRLGRSS----POVVALSATISNADELIAGWLD--
He1308 Dth	(185) YIVDEVHTYRG-VMGSNMAWVTRRICAQYGREPVFIFISSATIANPQLCSALTGHEPEVIQGGAPAKKKHFLILLPEMQGAQS----
He1308 Fac	(137) LVIIDEIHMISDPSRGPRPLETVISSLILYNPE----ILLIGLSATVTSNIQEIAEMWN--
He1308 Hla	(141) CVVSDEVHLVDDPNRGPTLEVTIAKLRKVNPG----LQTVALSATVGNADVIAEWLD--
He1308 Hpa	(141) CVADEVHLVNDAHRGPTLEVTIAKLRVNPD----LOTVALSATVGNAGEMADWL--
He1308 Htu	(141) CVVSDEVHLIDDRNRGPTLEVTIAKLRRLNPQ----MQVVALSATVGNADETIADWL--
He1308 Hvo	(141) CVVADEVHLVDDRHRGPTLEVTIAKLRINTN----LQVVALSATVGNAGVVSIDLW----
He1308 Mac	(140) VVVDEVHLIDSADRGPTLEVTIAKLRKMNP----CQILALSATVGNADELAALWLD--
He1308 Mba	(140) VVADEVHLIDSPDRGPTLEVTIAKIRKMNP----CQILALSATVGNADELAWVLE--
He1308 Mbo	(137) LVIIDEIHLIDSPDRGPTLEMVIAKMRSKNPQ----MQLIGLSATIGNPKVLAGWL-----
He1308 Mev	(140) TIVVDEIHLIDSADRGPTLEITIAKLLRINPN----SQIIGLSATIGNAEIAGWL-----
He1308 Mfe	(141) VVVDEVHLINDESRRGGTLEIILTLLKFKN----IOTIGLSATIGNPEELANWLN--
He1308 Mfr	(133) CLVVDEVHLIDDESRRGGTLEMTITKLRHASPD----MQVIGLSATIGNPKELAGWL-----
He1308 Mhu	(138) CIVLDEVHLIGSENRGATLEMTITKLRYTNPV----MQIIGLSATIGNPAQLAEWLD--
He1308 Mig	(142) VAIVDEIHLIMINDEKRGGTLEVLTLLKLNLD----VQIIGLSATIGNPEELAEWLN--
He1308 Min	(131) VVVDEVHLIDSANRGPTLEVLTLLKLN-----VQIIGLSATIGNPEELSNWLN--
He1308 Mna	(138) LAVIDEIHLIGDNERGGTLEVLTLLKLN-----AQIVGLSATIGNPEELAOWLE--
He1308 Mmeh	(140) AVIVDEVHLIDSANRGPTLEVLTLLKLNPG----AQVVALSATVGNAMETIAOWLE--
He1308 Mnar	(141) CVVTDEVHLVDDGERGGTLEVLTAKLRLINPD----IOTVALSATVGNAAEALATWL-----
He1308 Mnaz	(140) VVADEVHLIDSPDRGPTLEITLSSLKLRMNP----COVLAISATVGNADELAALWLD--
He1308 Mok	(139) YVVIDEIHLIGDESRRGGTLEVLTLLKTKKT----IOTIGLSATIGNPEELAKWLN--
He1308 Mth	(143) VLVDEVHLIDSANRGPTLEMTITKLMLHINP----MQVIGLSATIANGREIADWK--
He1308 Mzh	(140) TVVADEVHLINSVNRGPTLEITIAKLIHNGP----SQIIALSATIGNPEDIAKGWL--
He1308 Nma	(141) CVVSDEVHLIDDRNRGPTLEVTIAKLRINPNQ----LQVVALSATVGNADELAEWLD--
He1308 Nth	(152) FIIIDELHAFLDNERGVHLSLRSRLNEYIKEK--PRYFALSATLNNFKLIKWIN--YNDIKNVEIIDSNEDDKDLLLSIMHFDKGKDYKPP
He1308 Pfu	(141) ILVADEIHLIGSRDREGATLEVLLAHMLGKA----QIIGLSATIGNPEELAEWLN--
He1308 Sso	(148) YFVLDLHYLNDPERGPVVESTVITAKRNN----LLALSATISNYKQIAKWL-----
He1308 Tba	(162) LIVADEIHLIGSYDRCATLEMILSHMLGKA----QILGLSATVGNAAEELAEWLN--
He1308 Tga	(141) LIVADEIHLIGSYDRCATLEMILTHMLGRA----QILGLSATVGNAAEELAEWLN--
He1308 Tsi	(164) LVIADEIHLINDETRGGTLEIILTLLKDFKA----QILGLSATVGNAAEELAEWLN--
He1308 Mja	(139) VVVDEVHLINDETRGGTLEIILTLLKFEFN----VQIIGLSATIGNPDELAEWLN--
Consensus	(191) VVVDEVHLIDRGPTLEVLLAKLR LNP-----AELVVSDDWRVPVDLR GVFY L F D I

10

20

30

40

286

380

He1308 Mbu	(227) LEK-----DDAVNLVLDTIKAEGQ-----CLVFESSRRNCAGFAKTASS-----KVAKILDNDIMIKLAGIAEEVES-----TGETDTAIVLANCIRKGV
He1308 Afu	(225) TSRR----VKFEEELVEECVAENGG-----VLFESTIRRGAEKTAVKLSA-----ITAKYVEN-----EGLEKAILE-----ENEGEMSRKLAECVORKGA
He1308 Csy	(233) TGGG-----PAVDLAAESVAEGGQ-----SLIFADTRARSASIAKASA-----VIPEAKGADAIAKLAIAKKLISS-----GGETKLAKTIAELVERGKA
He1308 Dth	(273) -----AIRVLQKALELGLR-----TIVYTOQSRRKMTTEIAMIWAQRAGRLKKYISAYRAGFLPEORREIEQKLASCELLAVVTSALELGI
He1308 Fac	(217) -EKKHLGRDDEVSLLIKESESQQ-----ALVFRNSRRNAEAKYAQSMVN-----FFDFQNDFEKLEIPPDLFNEAQANMVAHGV
He1308 Hla	(229) ERGE----DOTARLIVADALDTEEDGQGGSSLVNFNSRRNAEASSARKLTD-----VTGPRLTDERDQLRELADEIRS-----GSDTDTASDILADDAVEQGS
He1308 Hpa	(229) GNE----KETAALIVRTDLEDGS-----SLVFVNNSRRNAEAAKRLAD-----VTKTHLTDDERRDLIDAOQIRD-----VSDTETSDDLATAIEKGKA
He1308 Htu	(229) EGSE----KOEAAALIVRDILREGGS-----SLVFVNNSRRNAEAAKRLGQ-----VSSREITEDEERAELAELADDIRD-----DSDETSDDLADCVERGA
He1308 Hvo	(229) GRGE----ROTPALIVADALEGGDGDQGSSLVVFVNNSRRNAEAAARMAD-----VTERVTGDERSDIAELAEEIRD-----VSDTETSDDLANAVAKGA
He1308 Mac	(227) PTK----DEA1NLVLDTLREGGQ-----CLVFESSRKNCMGFAKRTS-----AVRKTLSAEDKEKLAGIADEILLE-----NSEDTDTASVTLASCVRAGT
He1308 Mba	(227) STK----DEAVNLALDTLKDKGQ-----CLVFESSRKNCMAFAKKAA-----TVRKTKLTSaedRNAALAGIADEILLE-----NSEDTDTSTNLAVCIRSGT
He1308 Mbo	(224) VSKN----YDDLNLCCLDTIAEGSQ-----CLVFVSSRRNAEAAFAKRAAG-----AIKSEDA-----ALAACAERLLE-----GTPTEMVKTLAACVAKGA
He1308 Mev	(227) IVK----DTAVNLVLDTIDENGQ-----CLVFESSRRNCAGFAKKAKS-----KVGKSLDKGLLAELNNIAEEFVLE-----TSDTETTKELASCIKRGT
He1308 Mfe	(222) REIKAINNNDIYNLWVDCVKGDDGC-----CIVFCNTKRGAVNEAKLN-----LKKFLTNEEKRLKEVAEEILSILEBPPTEMCKTLAECLINGS
He1308 Mfr	(220) PAK----TEDINLLDCVADGGQ-----CLVFVSSRRNAEYAKRAAT-----ALKCSHA-----ALDSIAECKLE-----AEETDMGRVLATCVKKGA
He1308 Mhu	(225) KTK----HDDLNLCCLDTIEEGQ-----CLVFVSSRRNAEAAFAKKAAG-----ALKAGSP-----DSKALAQELR-----LDRDEGNVLADCVERGA
He1308 Miq	(223) KELPNFSNNPMNLNVLDCKVKEGGC-----CLVFCSNSKNGAVSEAKLN-----LKKYLSNESEKYELOKLKEEILSILDDBPPTETCKTLAECLEKGV
He1308 Min	(211) -----VRECQDIYKEVVKDNGS-----V1FCPTKKAENRALSLD-----LSDLIKKSEKRKLEEISESELLSFLDBPPTELCKKLASCVRKGI
He1308 Mma	(219) KK1KQVSRRNNLTDLIVDSVEEKGS-----CLIFCNSKRNNAVGEAKKH-----LAKYLTRTEQHELNKLSEELLISLDRPVETCKALSKCQNGV
He1308 Mmah	(227) RHK----EDSYNLVLDTIVQGGQ-----CLVFEDSSRRNCVGFAKKCAP-----AVGELLDQRQNTEEVKEYLE-----NGETKLTTETLAYCIIKGV
He1308 Mmar	(229) ONNE----KOTAA1IVRTDLEDGS-----TIVPHLSTEERDQLADIAEEIRD-----VSDTETSDDLADAVIDAGA
He1308 Mmaz	(227) PTK----DEAVNLVLDTIKEGGQ-----CLVFESSRKNCMGFAKKAVS-----AVKKTLSNEDRETLAGIADEILLE-----AGETE1ADVLLSRCVRQGV
He1308 Mok	(226) VIVDE1SKNNMFMNLWVDSLKDG-----C1IFCNSKRGAVGEAKLN-----LKKYLSPD1SELRLKEEVLSVLDNP1KTCKDLAECIEKGV
He1308 Mth	(230) RNR----DPVNLVLDTVDQGGQ-----MLIFESTRRNAEAAAGRLAN-----GEGTAKKLLAMCLRHGA
He1308 Mzh	(227) ESR----DDAVNLVLDTVKDQGQ-----WVSKILLDEHTD1IOLKLSOELIGE-----VSSRELTAQEONDLAAATEIRE-----DSDETTSQDLADCVERGA
He1308 Nma	(229) EAGE----KQEAAALIVRDILQEGGS-----SLVFVNNSRRNAEAAARRLGQ-----VHSLIFCNSRRAEVEETTLYLNR-----LANREVNTELYLAHHSSIDEKKER-----EYVEKTMANSKSPKSVTT
He1308 Nth	(241) -----ID-LYQDLRELTKN-----WEELYVDAIRKKKG-----ALIFVNMRKAERVALESK-----ENPTNEKLAKA1IRGV
He1308 Pfu	(226) -----WEELYVDAIRKKKG-----KVKSLLTKEIRALNELADSLE-----VLSLKS1ISKV
He1308 Sso	(232) TKKVHG-DDAIIAYTLDLSKNGQ-----YLFRNSRKAESTALKIAN-----YMNFTS1DEN-----ALSE1LKQOLDDIEEGGSDEKE1LKSLISKV
He1308 Tba	(247) Q-----WDSLVIDAVKKGKQ-----ALVFVNTRRSAAKEAGMLGK-----KVRRLTKPEARLKELAESLE-----SNPTNDKLKEVLVNGA
He1308 Tga	(226) N-----WYSLVVDAVKRGKG-----ALVFVNTRRSAAKEALALSK-----LVSSHLLTKPEKRALESLASOLE-----DNPTSEKLLKRALRGV
He1308 Tsi	(249) Q-----WDSLVIDALKKGKQ-----ALVFVNTRRSAAKEALLAG-----KIORFLTKPEERKLKOLADGLD-----TTPTNOKLKEALTGV
He1308 Mja	(225) VDN-----NDIYNLWVDCVKEGGC-----CLVFCTNTKRGAVNEAKLN-----LKKFLTTEEKIRLKEIAEEILSILEBPPTEMCKTLAECLINGS
Consensus	LVF NSRRNAE ARKLA V K LT E L LAEEI ETETS LA CV KG

10

20

30

40

He1308 Mbj	(307) AFHHAGLNSNH-----RKLVENGFRQNLIKVISSTPTLAA-----
He1308 Afu	(300) AFHHAGLJINGQ-----RRVVEDAFREGNLIKVVVATPTLAA-----
He1308 Csy	(313) AFHHAGLNQDC-----RSVVEEEFRSGRIRLLASTPTLAA-----
He1308 Dth	(353) DIGHLDLCLLVGPGSVMATMQRGGRVGRSGRDSAIMLIGHEDALDQYLIRNPIMRRHVLVCAAAEKPIALQEMMLD-----
He1308 Fac	(290) MFHHAGLNSNDQ-----RTMIEKLFKGQYIKLTATPTLAA-----
He1308 H1a	(315) AFHHAGLRSED-----RARVEDAFRDRLIKCISATPTLAA-----
He1308 Hpa	(309) AFHHAGLASDH-----RSILVEDAFRDRLKLIKVISATPTLAA-----
He1308 Htu	(310) AFHHAGLSSTQ-----RSILVEDAFRDRLKLKVISATPTLAA-----
He1308 Hvo	(315) AFHHAGLAAEH-----RTLVEDAFRDRLIKCICATPTLAA-----
He1308 Mac	(307) AFHHAGLTSPL-----RELVETGFREGYTKLISSTPTLAA-----
He1308 Mba	(307) AFHHAGLTTPL-----RELVETGFREGRIKLISSSTPTLAA-----
He1308 Mbo	(300) AFHHAGLSRK-----RSIVEAFRKNLIKLKCISSTPTLAA-----
He1308 Mev	(307) AFHHAGLNSAQ-----RKIVEDNFRNNKKIVISSTPTLAA-----
He1308 Mfe	(307) AFHHAGLTYQH-----RKIVEDAFRNKLIKVICCTPTLSV-----
He1308 Mfr	(295) AFHHAGMNRMQ-----RTLVEGGERDGFKISISSTPTLAA-----
He1308 Mhu	(300) AFHHAGLIRQE-----RTLIEEGFRNGYIEVIAATPTLAA-----
He1308 Miq	(308) AFHHAGLTYEH-----RKIVEDAFRNKLIKVICCTPTLSA-----
He1308 Min	(289) AFHHAGLTYEH-----RKLIKEAFRERILKVICCTPTLAF-----
He1308 Mma	(304) AFHHAGLTYKH-----RKIVEDAFRNRLIKVICCTPTLSA-----
He1308 Mnah	(307) AFHHAGLNSAH-----RRIVEDAFRNNLKRMICSTPTLAA-----
He1308 Mnar	(310) AFHHAGLNSRH-----RELVEDAFRDRLVKVCATPTLAA-----
He1308 Mnaz	(307) AFHHAGLTTPL-----RELVENGFREGRIKLISSSTPTLAA-----
He1308 Mok	(311) AFHHAGLTYEQ-----RKIVEDAFRNKLIKIAICCTPTLSA-----
He1308 Mth	(302) AFHHAGLPEQ-----RRLIELGERQNYVKVIACTPTLAA-----
He1308 Mzh	(307) AFHHAGLNSEH-----RRMVEEGFRKNLIKMISSTPTLAA-----
He1308 Nma	(310) AFHHAGLSSTQ-----RSILVEDAFRDRLKLKVISATPTLAA-----
He1308 Nth	(318) SSLELGIDIGA-----IDYVQIDDHTVSSLKORIIGRSG-----
He1308 Pfu	(298) AFHHAGLGRDE-----RVLVENEFRKGIIKAVVATPTLSA-----
He1308 Sso	(316) AYHHAGLSKAL-----RDLIEEGFRQKIKVIVATPTLAA-----
He1308 Tba	(320) AFHHAGLGRAE-----RTLIEDAFREGLIKVLTAATPTLAM-----
He1308 Tga	(299) AFHHAGLSRVE-----RTLIEDAFREGLIKVITATPTLSA-----
He1308 Tsi	(322) AFHHAGLGRTE-----RSIIEDAFREGLIKVITATPTLSA-----
He1308 Mja	(305) AFHHAGLTYQH-----RKLVEDAFERKRLIKVICCTPTLSA-----
Consensus	(381) AFHHAGL-----R LVEDAFR LIKVI ATPTLAA-----

476

570

(342)	Mbu	GJNL PARRYIIRSYRFRDS -NFG
(335)	Afu	GVNL PARRYIIRSLYRFDG -YSK
(348)	Csy	GJNL PARRYIISVMERYNS -SSGM
(448)	NEAGKCIIKSLEKDGELLA SRDRSEYYTRARYPPHKDVDLRGTCOTYNLIFEHTSTG EYLGEV DGYRAFKEETHPGAVYIHMGETTYVYQDLDLETFAYVA	GJNL PARTVIIIRDITRFSD -- GY
(325)	Dth	GJNT PARRYIIVRDWRYRDG -EFGG
(350)	Fac	GJNL PARRYIIVRDWRYRDG -DIGG
(350)	H1a	GJNL PARRYIIVRDWRYRDG -EFGG
(344)	Hpa	GJNT PARRYIIVRDWRYRDG -SAGG
(345)	Htu	GJNT PARRYIIVRDWRYRDG -DAGG
(350)	Hvo	GJNT PARRYIIVRDWRYRDG -DYGG
(342)	Mac	GJNL PARRYIISYRYYSS -DSC
(342)	Mba	GJNL PARRYIIRNYRYYSS -EDG
(335)	Mbo	GJNL PARRYIIRDYLFRSA -GEG
(342)	Mev	GJNL PARRYIIVRDYRFS -NFG
(342)	Mfe	GJNL PCRRAIVKDLTRYT -- NRG
(330)	Mfr	GJNL PARRYIIRDYLFRSG -GEG
(335)	Mhu	GJNL PARRYIIRDYNFRAS -GLG
(343)	Mig	GJNIP CRRAIVDLMEFS -- NGR
(324)	Min	GJNL PCRRVIISELKRYT -- REG
(339)	Mma	GJNL PCRRAIIRDYLKRYS -- QNG
(342)	Mnh	GJNL PARRYIIVRDYRFS -NAG
(345)	Mmar	GJNT PARRYIIVRDWRYRDG -SAGG
(342)	Mmaz	GJNL PARRYIISYRYYSS -DSC
(346)	Mok	GJNMP CRRAIIRDYLFRS -- SRG
(337)	Mth	GJNL PARRYIISYKRYEA -GLG
(342)	Mzh	GJNL PARRYIIVRDWRYRDG -NFG
(345)	Nma	GJNT PARRYIIVRDWRYRDG -SAGG
(353)	Nlh	RKLGTNOVLQVSTINDSLVQSLA
(333)	Peu	GINTPAFRVIIIRDYLWRS -- DFG
(351)	Sso	GJNL PARTVIIIGDIYRFENKKIAGY
(355)	Tba	GJNL PSFRVIIIRDYLKRYS -- TFG
(334)	Tga	GJNL PSFRVIIIRDYLKRYA -- GFG
(357)	Tsi	GJNL PAYRVIIIRDYLKRYS -- NFG
(340)	Mja	GJNL PCRRAIVKDLTRFTN -- KG
(476)	Consensus	M PIPVLE

(62)

JP 6226869 B2 2017.11.8

10

20

30

40

571

65

He.1308 Mbj	(372)	YKOMAGAGRPHILDPYGEVLLAKTYDEF--AQIMENYEADEAIDIWSKLGTENALERTHVLSTIVNGFASTROELFDFFGATFFAYQQ-DKWMLE
He.1308 Afu	(363)	YKOMAGAGRPGMDERGEAIIIVGKRDR---EIAVKRYIFGPERITSKLGVEHTLRFHSLSIICDGYAKTLEEDFFADTEFFRQN--EISLS
He.1308 Csy	(379)	YKQLCGGRAGRPQYDKSGEAIVYGGVNAD---EITFDRYIGGEPEPIRSAMVDDRAIRIHVLSSVTTSPGIKEEDDVTEFFFLGQQS-GESTVK
He.1308 Dth	(543)	AKSEANYYTTRPITEKYTEIIVEQATRATAAGELCIGRLKVTEHVSAYERKLVRGQAFRIGLIPLDPLPVETQGMWETLDSQVRDVEDRRLHFM
He.1308 Fac	(354)	IQQMIGAGRGPKYDKKGYYITYAASP---MLRVZEGYLGELEPVISRMDNSLIRENVNLALISSGLATDLKGIQDFYGTLLAAQN-DIDGYE
He.1308 Hla	(381)	VHQMCGRAGRGPLDPYGEAVLLANDADTK--EELETERYLWADPEPVRSKLAEPALARTHVLATVASGFAHRTREGGLEFLDQTLYATQTDDEGRLA
He.1308 Hpa	(375)	VHQMFGRAGRGPLDPHGEAVLLAKSHDEL--QELFDQYWADEPEPVHSKLAEPALARTHVLATVASGFAHRTREGGLEFLDQTLYATQTDDEGRLE
He.1308 Htu	(376)	VHQMMGRAGRGPLDPYGEAVLLAKSHDES--EELFDRYIWADPEPVRSKLAEPALARTHVLATVASGFAHRTREGGLEFLDQTLYATQTDPERLG
He.1308 Hvo	(381)	VHQMMGRAGRGPLDPYGEAVLLAKDADAR--DELIVERYIWADAEVRSKLAEPALARTHVLATVASGFAHRTREGGLEFLDQTLYATQTDPERLG
He.1308 Mac	(372)	YKOMAGAGRPRLDPYGEAVLLAKSYEL--LFLFEKYIEAGAEDIWSKLGTENALERTHVLSTISNGFARTKEELMDFLREATFFAYQQ-SNFGLS
He.1308 Mba	(372)	YKOMAGAGRPHILDPYGEAVLVAKSYKEF--VFLFENYIEANAEDIWSKLGTENALERTHVLSTISNGFARTYDELMDFLEATFFAYQQ-SNFGLS
He.1308 Mbo	(365)	YROMAGAGRPRLDPYGEAVLLAKEAEQV--PELETEVYIEAEAEDVHSRIAEPALYTHVLVSLVASGFAHRTREGGLEFLDQTLYATQTDPERLG
He.1308 Mew	(372)	YKOMAGAGRPSLDPYGEVSLISHTYNEF--TDLLDRYDAEPEPDILSKLGTENALERTHVLSTIVNGFATTROGMVDGMSSFFAYQQ-QKWSLLI
He.1308 Mfe	(371)	IQCICIGAGRGLDPYGEGIIVAKNDR--DYLRSYOVLTKOPEPIYSKLSNOAVLTOLLGLIATTEIRDEYDLEFLWEFLRNTTFYAYQYGNLREVA
He.1308 Mfr	(360)	YROMAGAGRPHILDPYGEALLIATKTEYAV--NDLHEEYVEAPDEDVTSCRGEGKVLTAHILSLIATGARYASDELMALFLEKTLYAYQHTGKKALT
He.1308 Mhu	(365)	YROMAGAGRPHILDPYGEAVLDAPS--ERLETFETDAAEERVDSQCYDDASLCAHILSLIATGFAHDEQALSSFMERTFYFFQHPKTRSLP
He.1308 Miq	(372)	IQCICIGAGRPHILDPYGEVYIYSKLSNOAVLERTOLLGMIATREIENFDLISFKNTFYAHQYGNLGGVL
He.1308 Min	(353)	VQQCIGAGRGPGLDPEYGEVYIYSKLSNDSVLRQIGLIAATPVYDLEEFKNTFYAYQYKALDEIK
He.1308 Mna	(368)	IQCICIGAGRPHILDPYGEVYIYKNER--DAEKAYEILTGSEVENYSKLANQKVLRHLGLISTGEIKDQNLVNFMKNTFYAHQYGNLGGVL
He.1308 Mnah	(372)	YKOMAGAGRPHILDPYGEAVVTVKTYEF--TDVILERVISASAEDIWSKLGTENALERTHILSTIASGFANCHREILITLGSTFFAHQQ-QSWNFE
He.1308 Mnar	(376)	VHQMMGRAGRGPLDPYGEAVLIASSHDEV--DELIVERYWADPEPVRSKLAEPALARTHVLATVASGFAHRTREGGLEFLDQTLYASQTDGSQLE
He.1308 Mmaz	(372)	YKOMAGAGRPHILDPYGEAVLLAKSYEF--VFLFEKYIEAGAEDIWSKLGTENALERTHILSTISNGFARTREGGLEFLDQTLYASQTDGSQLE
He.1308 Mok	(375)	IQCICIGAGRPNLDPYGEVYIYINNTENPELLENAKNYLIGNVEIYSKLSNOVLRTHMLGLITTDIKNNKNDLEEFFKNTFYAYQYQNTKKIL
He.1308 Mth	(367)	YROMAGAGRPGPLDPYGEVSLIMARSESEL--QRIMDHYMGEPEDIWSKLASERAERTHVLATIASRFADSVDLSRIMASTFYAROO-DPSYLG
He.1308 Mzh	(372)	YKOMAGAGRPHILDPYGEVSLIARSYDEF--MDIMENYNADPEDIWSKLGTENALERTHVLSTIVNGFAYTYRGLMDFTVKMTFFAYQK-EASDLH
He.1308 Nma	(376)	VHQMMGRAGRGPLDQIGESIVVVRDKEDV--DRVETKVVLSDEPIESKLGSERAFYFLGIIASAEGLNSEEKOLENFAYESLLAKQL----VD
He.1308 Nth	(385)	WIEPATEYPLPLDILFHQJISITCHEANGVRLDPLDNKANAFYKLKEEDINHVINTMENDFLQLIRNSAELIVGEGERLRLRGKEYAVFMT
He.1308 Pfu	(362)	VHQMLGRAGRPKYDEVGEGIIVSTSD---PREVMNHYIFGKPEKLFSOLSNESNLSRQVLAATFGYSTVEILKFISNTFYAYQRKDTYLE
He.1308 Sso	(383)	YKOMSGGRAGRGPFQIGESIVVVRDKEDV--DRVETKVVLSDEPIESKLGSERAFYFLGIIASAEGLNSEEKOLENFAYESLLAKQL----VD
He.1308 Tba	(384)	IQQMIGAGRGPKYDKEGAIIIVAKTEK--PEELMEKYIFGKPEKLFSMNSDAAFRSQVLAITNGFVSERELIGLEKTFYYHORKDLEILE
He.1308 Tga	(363)	IQQMIGAGRGPKYDKEGAIIIVARTDE--PGKLMERYIRGKPEKLFSMLANEQAFFRSQVLAITNGFIRSFPELVFLERTFYAHQRKDLSSE
He.1308 Tsi	(386)	IQQMIGAGRGPKYDIEGOAIILAKTEK--PEDIMKRYVLGKPEKLFSMLSNEASFRSQVLAITNGVGNNFKELVNFLERTFYHORKNLEALE
He.1308 Mja	(369)	IQCICIGAGRGPGLDPYGEVYIYKNER--LRAYQALTKOPEPIYSKLSNOAVLRTOLLGLIATGEIRDEYDLEFLWEFLRNTTFYAHQYGNLREVA
Consensus	(571)	EL E YI ADPE IWSKLA E AIRTHVLALIASGFA T ELLDTL TFYAYQ L

666

760

10

20

30

40

(464) EVINDOLEFTIDKAMVSET. E----- -DIEDASKLFLRGTRIGSIVSMIYIDPISGSKIVDGF
 He1308 Mbu (453) YELERVVRQOLENNGRIVVERAH----- -LAFTKLGSIVSLRVIDPUTGFIPIHDFVL
 He1308 Afu (469) FSVAYALRFQEGMIGRK----- -GGRLLAATKMRGLYRSLIMDPMATVILRDAY
 He1308 Csy (638) GCLHALERGLIGCAMPILLITDRNDLGCIASPVHEQLHKG----- -AVFTYDGPGGIGLCRQAFELGRUAMIGLVSLSCTENG
 He1308 Dth (445) LAFESALYETKONDIFTEREN----- -DIYSATKERGRUTSDIDLIDPYSSLILKCL
 He1308 Fac (474) AVTDTVLDYLVANDFIERD----- -GESESTITATGHTYVSRLYDPMASAEMIDGL
 He1308 H.la (468) TTYORVLDYLDRNCFLEERD----- -RURATGIGHRYVSOLYDPMASAETIDGL
 He1308 Hpa (465) SVTDDVLDYLERNDLERSR -DEADSGEDDGFTSANDLAEQ----- -REBETATPGHTYVSRLYDPMASAETIDGL
 He1308 Htu (474) QVTDRVLDYLVENGFVEFG----- -ETIOATPGHTYVSRLYDPMASAETIDGL
 He1308 Hvo (464) VVDECJLFNTFQEGMLEQDS----- -DALISTMFEGKLYVSRLYDPMASAETIDGL
 He1308 Mac (464) TVVNECJLFNRFQEGMLEQDS----- -DALITPSFKLYVSRLYDPMASAETIDGL
 He1308 Mba (458) RAIDEALQFLITTAEVY----- -GENITALQFLITTAEVY
 He1308 Mbo (464) DVDDDCIEFLQDNEMIKD----- -DG -ER -LYATRUGOVSTLVIDPUSGAIIIDKL
 He1308 Mev (463) KNINEVTRFLEK----- -EMIDITPTELGKRVAEYLIDPLSAKYMIDGL
 He1308 Mfe (453) RTLDDDALGFTTEAMXVTD----- -SGMLHATEYGDJNSRLYDPMASAETIDTL
 He1308 Mfr (458) RIVADAIRUTTTAGMVEER----- -ENTLUSATRIGSIVSLRVLINPCATARLILDSL
 He1308 Muu (464) RNKEVINFLEEN----- -DEFIADYTFPTKRGKRVSELYDPMASAETIDGL
 He1308 Mi.g (445) KKIKEIIEFLEDCN----- -FLKNETVTPGKVSNLYDPMASAETIDGL
 He1308 Min (460) INVSEVVEFLERNKFLETTIKETENKRVELSFS----- -S -NN - LVLDSKETSFDLNPNSNLIDPMASAETIDGL
 He1308 Mma (464) ELLEDCLLIFLKNEGMLEQ-N----- -ET-----
 He1308 Mnah (469) RVVDDVLTQNRNDFLETAG----- -IRATELGRMISSLYDPMASAETIDGL
 He1308 Mnar (464) AVVDECUDFLREGMLEKDP----- -ELDATSLIGHTYVSRLYDPMASAETIDGL
 He1308 Mnz (470) ENYIEFLERNGFIEINYRDENOKSNSHRNKKNISNTNSTKMLVNONNLTIRKHEEDVYNTPLGKRVSELYDPMASAETIDGL
 He1308 Mok (459) ETIASYLEFLVRSMDIKD----- -LTPTPGALGVSLRVIDPUSAMVMEI
 He1308 Mth (464) DVIEECVRFUDNEMIISD-S----- -NULIPES -APRSTAGTKLISMYIDPLSGSLIMDG
 He1308 Mzh (469) RVTDDVLSYLERNDTTERSGGPDTINSEADASATSADLADS----- -DGDSGCTTGOPEDLEATSLIGHTYVSRLYDPMASAETIDGL
 He1308 Nma (480) QEEFEFREGKRTGSIDES----- -IMVSEGONILLAGOMTNIKIDIERDLYVAKA
 He1308 Nth (454) EKIRNLYFLEEN----- -EFEISLEDKIRPLSUGIRAKLYDPTAKMPDRM
 He1308 Pfu (471) VYFDRARMLLEHSFIKEE----- -GNTTALTMGKRVADLYINPTADFLRKGL
 He1308 Sso (476) GRAKSLIVYFLEEN----- -ETIDIDINDSFIALPFGIRSLQVLDLTTAKKFDAF
 He1308 Tba (455) YKAKEYVYFLEEN----- -EFIDDLIDEDRFPLPGKRUQSOLVIDPUTAKKFDAF
 He1308 Tga (478) GRAKSLIVYFLEEN----- -EFIDIDINDQFMPLPUGIRTSQVLDPTTAKKFDAF
 He1308 Tsi (461) KNINEVTRFLEENFT----- -IDMPTELGKRVSELYDPMASAETIDGL
 Consensus (666) I EVI FL N I ----- L AT LG VS LIDPLSA LIDGL

He1308 Mbu (520) RDIGKSTGGNMGSLEDDKG-----
 He1308 Afu (501) SRMELS-----
 He1308 Csy (518) GEASPGR-----
 He1308 Dth (719) PGCIHSPKGSGNR-----
 He1308 Fac (494) DLEFS-----
 He1308 Hla (527) RSVARDAAADTGASAEEADNG-EFVRTGDAADDASGGDEPGFGTYTRAGDDESGER-----
 He1308 Hpa (516) RDADG-----
 He1308 Htu (547) ERADER-----
 He1308 Hvo (523) EWAADHRTEKIRALAGETPEKPTRDRSESESGGFQRASEMVAADDGGGGEDGVGANGGDSDADGVETTDRTYPTPLGLYHHLISRTPDMYQLY
 He1308 Mac (513) REAGT-----
 He1308 Mba (512) KGAKS-----
 He1308 Mbo (507) REQEK-----
 He1308 Mev (513) KADK-----
 He1308 Mfe (508) NEMENED-----
 He1308 Mfr (502) REEGE-----
 He1308 Mhu (507) KSCKT-----
 He1308 Mig (509) KEMGNVDNE-----
 He1308 Min (490) EVKDDLH-----
 He1308 Mma (545) HELKKKKCDQLDR-----
 He1308 Mmab (513) EKTTK-----
 He1308 Mmar (518) RDWERGASDSTSASGGSPAD-----AOAEP-PANSGFTTASELAADEDADESDAARD-----
 He1308 Mmaz (513) REAGT-----
 He1308 Mok (565) KNLHKKTLNSPKNM-----
 He1308 Mth (505) RGIRR-----
 He1308 Mzh (519) RKADY-----
 He1308 Nma (555) EDADER-----
 He1308 Nth (532) VDGKPPK-----
 He1308 Pfu (504) EEVVKDPN-----
 He1308 Sso (520) EGHKAS-----
 He1308 Tba (526) PQIEENPN-----
 He1308 Tga (505) PAIERNPN-----
 He1308 Tsi (528) EKLEKNPN-----
 He1308 Mja (506) EEMENE-----
 Consensus (761)

He1308	Mbu	(563) LRNTDTIVNEYIVAHSDDEFH---EIPDKLIKETDYEFMGEVKTAMLEEW-----	-VTEVSAEDITRHFMVGEVDIHALADTSEW
He1308	Afu	(525) VFKTDSWVEEEAFLRKELSY---YPSDFS-VEYDWFILSEVKTALCLKDW-----	-IEEKDEDEICAKYGIAPGDLRRISETAEW
He1308	Csy	(545) AIRQDKHEVAEMMLEAGRGEILLR---P-----	-IGESPEAKLAEDLKFESGDVERMVESSGW
He1308	Dth	(754) ARKRDVSCTETDEGSMELDSG-YTKSDQAEELPYAVLDIETRYSAQEVGWWGNCHRMGVSEAVVFSRNOEFYTFDQEQAADLGSFLEDFSLVVG	
He1308	Fac	(517) YRASDYEYLEEFLDRHNISDFS-----	-INEVPNTNTIAETFGIGPGDIQAKASSADW
He1308	Hla	(615) LKSGDRETYTELGYERETEFLG---DVPSSEYEDVRFEDWLASLTKARILEDW-----	-VNEVDEDRITERYCGPGDIRGKVDTAEW
He1308	Hpa	(542) LRGSDRERYTEAYEREPFLG---HMPSFEFDNAFEDWLSALKTAKILLEDW-----	-ASELDEDRITERYAIGPGDIRGKVDTAEW
He1308	Htu	(573) LRGSGDEKEGYELFYERETELLG---DAPSEYYEDRFEDWLAALKTAKILLEDW-----	-ADETDETTIDRYKIGPGDIRGKVETSEW
He1308	Hvo	(618) LKSGDRETYTELGYEREPFLG---RVPSSEYEDVAFEDWLSALKTAKILLEDW-----	-VGEVDEDRITERYGVGPDIRGKVETSEW
He1308	Mac	(538) MRSQDYQDINDFVMAHAEFFS---KVPSPFNIVEYEWFLSEVKTSLIMDW-----	-IHERPENEICLRFGTGEGLIHTTADIAEW
He1308	Mba	(537) MRSHDYQDINDYVMAHASEFFV---KVPSPFDTTEYEWFLGEVKTSLIMDW-----	-IHERSENIEICLKFGTGEGLIHSIADIAEW
He1308	Mbo	(532) AKNADLPALSRMLEVGRADIW---LPP-PLDDDAETTYYRAVKTAMLLSDW-----	-TDELSEEKICERYCGPGDVFGMVENTNW
He1308	Mev	(538) LRSKEYEKINNEYMMTHSDEFV---EVPNPKTSIEYEWFLGEVKTALLINEW-----	-IDEKTLDITAEFGTGEGLINALSDISEW
He1308	Mfe	(533) RYVKSEE-ILNLIDEMENLG---IKSF---IDLEAFKTAKMLYDW-----	-ISEVPEDEILKKYKIEPGILRKYVENAWW
He1308	Mfr	(527) VKNDLGTLEKFFFEEEEEFR---T---EFSYDEMDEFRSILKTAAMLSDW-----	-TDEIGDDOTICTRFGVGPDIENAVQGISW
He1308	Mhu	(532) LKAADTQLLRTFLFKHDDLI---LPL-PFEQEEEELWLSSLKTAVLVLTDW-----	-ADEFSEGMIIEERYGIGAGDLYNIVDSGW
He1308	Miq	(536) RVNSFEE--LDLILEMEEAG----TYDR----YDIAAFAKNAKMLYDW-----	-INEVPEDEILKKYKIEPGILRKYVEQAKW
He1308	Min	(512) RYTRKEE--EELAAEELNYE-----I-FIS-----	-INEVPEDEILKTYKIEPGILRKYVEVARW
He1308	Mma	(578) RIRPNEE--LDLILEMDKMG-----LKDS-----	-VSEIPEEFILEKYGYEPGILRKYVEQAKW
He1308	Mmah	(538) LENRDYEILNDYVMNHTEIFI---EVPSPFQKIEYEWFLSEVKTALLIEW-----	-INEKSLEKIVENYQYGEGLIYASSDIAEW
He1308	Mmar	(589) LRGSDREEYEMELFEREEELLG---PTPSEFEEGRFWLSALKTAKILLEDW-----	-ATEVDEATITDRYGVGPDIRGKVETAEW
He1308	Mmaz	(538) MRSQDYQEVNDYVMAHAGEFFS---KVPNPFNIAEYEWFLGEVKTSLIMDW-----	-IHEKPENEICLKFGIGEGDIHATAADIAEW
He1308	Mok	(600) RVRKREE--NDLINDMIKLIDDDVVIYGIS----SENLEYFKNAKLFLYDW-----	-INEIPEEEELLGYNIEPGILRKYNEQAKW
He1308	Mth	(530) VQQS-DNWLEDFISEHSSELG---NEKN----FDWLLREVKTASMLMDW-----	-INEVHEDRIEDRYSISPGDILVRIAETAEW
He1308	Mzh	(544) MRSSDYENVNMYYLQNOKDFI---SMPSPFKTMIEYEWFLGEVKTALLIDW-----	-INEVPAADDICKKYGIGEGDIRMFSETAEW
He1308	Nma	(581) LRGSGDEKEGYELLYERERELLG---DAPSEFFEEERFEDWLAALKTAKILLEDW-----	-ATEDDEEQITERYKIGPGDIRGKVDTAEW
He1308	Nth	(559) CERNNFETDNMMAQNLHEEQR----	-PNERTVWNNGDELFETYTGTKIFQTLLAW-----
He1308	Pfu	(530) YSKREFEREEEEEYEFDRLYFDDPYISGYDPYLERKFRAFKTAVLLAW-----	-INEVPGEIVEKYSVEPGDIYRIVETAEW
He1308	Sso	(545) VGRNEEEELIELLEDIDCELL---IEPYEDEOESLYINALKVALIMKDW-----	-MDEVDEDTILSKYNIGSGDLRNMVETMDW
He1308	Tba	(552) IKRKEQESYLDAYEMDYLRSIPLYWEDY---FQKFLSEVKTAKLLIDW-----	-INEVSEAKLIEAYGIDTGDLYRRIELADW
He1308	Tga	(531) ARREMEDYLDLAYELEDKLYASIPIYYEDSR---FOGFLGQVKTAKVLLIDW-----	-INEVPEARIYETSIDPGDLYRRIELADW
He1308	Tsi	(554) VIKRKEQDILIDAYEMEEVLYONIPWEDYK---FEKFLGETKTAKLLIDW-----	-INEVNWKILETYEIDTGDLYRRIELADW
He1308	Mja	(531) RYTNSEE--ILNLIDEMDSLGIK-----SFEI	-INEVPEDEILKKYKIEPGILRKYVENAWW
Consensus			I EV ED I ERYGIGPDL VE AEW
(856)	LR D E L E I E E	F FE FL VKTA LL DW	

951

1045

He1308 Mbo	(640) IMHAACAKLAEILGVEYSS--	-HAYSLERKTRYGSGLDIMELVIGRGIVGRVARKLYNAGFYS--	--VAKLGADISVLSKLVGP-
He1308 Arf	(600) ISNAMMIRIKAETVG-N-T	-SVSLMIRIKAETVLRHIGVTEELVIRHIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--AEDIVRUREKTYASLITRG-
He1308 Csy	(614) IIRCWIWEISKHOERDING	-ELDVLRSRVARYGKEEALYPLVSIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--PDIAVAPVYELSRVYRIG-
He1308 Dth	(848) FNLKFDYRVLQGLSDYDFSSLPTDMLRETEARLGHRLSDHLARHTGNTKSANGIMLKWKGEGLDXIVYCRQDVSTRDLYLFRDKGY	-	--DDIANARVEELISRIGFS
He1308 Fac	(584) ISYSLYLGSMFDKENN	-NUFLHNRIRKGVEEITRIIEPOVERGRVARKLYNAGFYS--	--RADLREADKSVYLGALGR
He1308 Hla	(693) LURAETLARUVEGVDRDV	-AVREKARYVGEELDLAGYVNERGRVARKLYNAGFYS--	--RADLREADKSVYLGALGR
He1308 Hpa	(620) LINAAERLAALORDDAEGSIPSAATTAVEREKARYVGEELDLAGYVNERGRVARKLYNAGFYS--	-	--PDLRSADKGIVLVSIG-
He1308 Htu	(651) LIGAAERLAELDSWTV	-AVREARARVEHGGEELLELVSVGIVGRVARKLYNAGFYS--	--PDLRSADKGIVLVSIG-
He1308 Hvo	(696) LIGAAERLAELDSWTV	-AVREKARYVGEELDLAGYVNERGRVARKLYNAGFYS--	--RADLREADKPEVLAALGR
He1308 Mac	(615) INEVATLARLIDIGAK	-EAELLERIHYGAEPELIDLINRIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--TADLAGATPERVALIGP-
He1308 Mba	(614) INEVTSOLAGLUDIGAK	-EAELLERKTRYGAEPELIDLINRIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--SABLAETDEPKVALLIGP-
He1308 Mbo	(608) LLHATSOARMVPEKFY-G	-QIADECICMNGTIREELPIVLRIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--PEELSHKKEDLVKIGS-
He1308 Mev	(615) IMHSAYVNLANLTIDAD	-KAOELKEKIHGVNDLTOVLSINIVGRVARKLYNAGFYS--	--VSDIKNTKLHLSNTYIGR-
He1308 Mfe	(601) IMHALKEMAKLIGKN	-SEIPKELETRUYGAEDDIELINVNTYIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--VEDINNPSK--VASTIG
He1308 Mir	(601) LHASGRARLUVAPBHD	-AVETTLRVEHGIRELLIPLVRYKGIVGRVARKLYNAGFYS--	--PELLAADPSVGHITVG-
He1308 Mhu	(608) LHGTTERLUVSEMPMSQ	-VYKTLSYRHGVNSELLPVALRNIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--PEVARAGLSPTRATIGE-
He1308 Mi.g	(604) MYSKREIKAJLUNKNP	-IDTLSKLETRUYGAEDDIELLKTKYIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--VEDINNPKK--VASSLLG
He1308 Min	(579) LSYSIKEIKAJLUNKNP	-NPLRLRUEYGAKEELIELLKTKYIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--REDINNPKK--VANLLG
He1308 Mna	(646) MYSKREIKAJLUNNSE	-TYKSLKMEVRIEYGAKEELIELLNVKVNERGRVARKLYNAGFYS--	--KLEINKNPK--ILLELFG
He1308 Mnash	(615) LAKATORLAKRINPOLET	-ECAKLERKTRYGASELLELVEPNVGRVARKLYNAGFYS--	--ROKLADDERKOLAGITVG-
He1308 Mnar	(667) LIGAAERLASEVDDAR	-AISEARARVEHGSEELLELVIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--RAQLRDAKAVLALGR
He1308 Mnaz	(615) IMEVTAOLAGLUDIGAK	-EASELLERKTRYGAEPELIDLIRSYGRVARKLYNAGFYS--	--TABLAASPELIAVIGP-
He1308 Mok	(674) MHSAKEIENLINTDNKV	-IKDCINDLETRMEYGAODDIELLKTHIGRARILNAGFYS--	--ANDINNOKN--TINNLG
He1308 Mth	(600) IMBALRHSKMLDGTY	-LAERLARLHYGAEDELLQOLEIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--LEDLKADKSTLSEIIGP-
He1308 Mzh	(621) IMBATSRLSGULKVSSEA	-ESKELERKRSYGINSELIVNALVKGIVGRVARKLYNAGFYS--	--TDDLKADPLKLSKTVGS-
He1308 Nma	(659) LIGAAERLASEIDSEWA	-AVREARARVEHGGEELLELVIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--PAALRSADKGIVLVSIG-
He1308 Nth	(618) ILRSYNNIKETIDGIGRN	-LEGIDLPSYLODKEIDDMREYLDFTEOEKFKSPSYLP--	--KOLODKMHIAHLDIEGVK
He1308 Pfu	(610) IWTSLRKEIAYKVG-AVE	-IVDYLLETLRVKGIRELLIPMQLLVGRARALNAGFYS--	--IEDISQARPEELIKEIGIG
He1308 Sso	(621) IMYSAYNLSRKLNEHAD	-KLRLLMLRVGDGKEELIELVOLSGIVGRVARKLYNAGFYS--	--LGDVVNPDKVNLIGOK-
He1308 Tba	(629) IMYSLIELAKVNAGSE	-TIKILRMLRLRKGVREELLELVMIGERRARALNAGFYN--	--VNDIVAKPSELLAVEIGIG
He1308 Tga	(608) IMYSLIELYKLFPEKE	-TINYLRLDLHLRLRKGVREELLELVMIGERRARALNAGFYS--	--VETIANAKPSELLAVEIGIG
He1308 Tsj	(631) IMYSLIELYKLFPEKE	-VLDFLKELRLRURHGREELLELVMIGERRARALNAGFYS--	--IDIVAKASELLIKVIGIG
He1308 Mja	(599) IMHALKEIKAJLIGKSSDI	-PEKLETRUYGADEDIELLSIKYIGIVGRVARKLYNAGFYS--	--IEPINNPSK--VASTIG
Consensus	(951) IMHEA LAKUL	L EL IRI YGVKEELLEV IR IGRVARKLY AGIRS	Dl A L IIG

10

20

30

1046

1140

He1308 Mbz	(717) -KVAYNILSFIGVRYNDKFNSAPISSNTLD	-TLLDKNQKTFDNFQ
He1308 Afu	(674) --IAERVEGIGSVKSLNPEAALEHHHHH	
He1308 Csy	(693) ATLANNIKSQLRKGG-	
He1308 Dth	(943) LLFFKNKAGKKVRIPWSWDTAFAQV	
He1308 Fac	(662) TKLAKDIIENAGKLNRYR--	
He1308 Hla	(774) ERTAERILEHAGREDPSMDDVPRDKSASAATAGS-	--ASDEDGEQGAISLGDEFR
He1308 Hpa	(706) KTKTAENILENVGRQDPSLDDVEADAET--	--AA--TSARATNDGGQQSSLGDFE
He1308 Htu	(728) EKTAENILENAGREDPSMDGVEPADGGPAVGAAATNGSSGGSETDETGRADAAESDDSSQSSLGDF-	
He1308 Hvo	(774) RKTAEENILEAGRKDPSMDAVDEDDAPDAVPTDA--G	--FETAKERADQQAISLGDFEGS
He1308 Mac	(692) -KIAERIFRQIGRREAVEEISDSERLEKS-	--SDQGSTISDF-
He1308 Mba	(691) -KIADRIFKOIJRGRTGSSGIIASEPPEKS	--PYSGQKTTISDY-
He1308 Mbo	(685) -GIAEQVLEOLHPSKDTGKKEPPSGDKNTN	--PG-QSTLFHFHG
He1308 Mev	(691) -KTAVKVLEQLGVEPEDNQIDEPESTRSY	--SGNDQGQKTFNDF-
He1308 Mfe	(675) EKITKKKILEDIG--1KFGQ--	--OKLIF--
He1308 Mfr	(678) -KTAESIIL-	--PE-LITDIPGIGKMAEKLQNAGITIVSDLTLADEVLLSDV
He1308 Mhu	(685) -GIARQVIDEITGVKRSGIHSSDDDYQQKT	--
He1308 Mig	(678) EKIAKKILGEIG--MKFGQ-	--QTLQI--
He1308 Min	(650) EKISKKIFEEIG--VRYGQ-	--ORLI--
He1308 Mma	(724) EKIGKKKILGEHG--MKYQ-	--QTLLNNFN
He1308 Mmh	(692) -KIAQKILSYLGLRETDSNGYVEPETLENK	--KO-QKTFQDFI
He1308 Mmar	(745) RKTAEENLENAGHRDOPSMEGVEPAPDVSVLDINDGADGD	--ASAESTANDDOASLGFDF-
He1308 Mmaz	(692) -KITERIFKQIGRREAVESEFS DIEPLEKG	--SSDGQRTISDY--
He1308 Mok	(752) EKIARKKILSELGVDTKFGQ--	--MRLSI--
He1308 Mth	(677) -KIAEGVYISQLK-EPGVSA--	
He1308 Mzh	(699) -KISQKIKLQDIDVUDISEIKEKDSDTVP-E	--P--ESSQKTTISDFT
He1308 Nma	(736) EKTAENILENAGREDPSMDGVEPVPEGSGSGSSSEPNADANATEDADDNNQSSLGDF-	
He1308 Nth	(699) TFLENKKIKEIKL-	--KPRKSTLDYFIKS
He1308 Pfu	(689) VKTVEAIFKFLGKNVKISE--	
He1308 Sso	(699) -LGEKVVQEARI.LNRFH--	
He1308 Tba	(709) VKVLERIYRHFGVELPLKNIMDPDKPKEKP-	--KPKRGTLDFIJK
He1308 Tga	(688) AKILDGIVRHIGTEKRVTE--	--EK--FKRKGTLEDFTLR
He1308 Tsi	(711) TGVTEKIVYQHFGVELPTNE---KK--	--K--KVVKGTLDFFTK
He1308 Mja	(673) EKIAKKKILDELGVKTKQQKLISESGGSAAWSHPQFEKGSSGGSSGGSAWSHPOFEK--KL	
Consensus	(1046) KIAEKIL LG	TL F

30

10

20

1141

1141

He1308 Mbū He1308 Afū He1308 CsY He1308 Dth He1308 Fac He1308 Hla He1308 Hpa He1308 Htu He1308 Hvō He1308 Mac He1308 Mba He1308 Moō He1308 Mēv He1308 Mfē He1308 Mfr He1308 Mhu He1308 Mig He1308 Min He1308 Mma He1308 Mmāh He1308 Mmar He1308 Mmaz He1308 Mok He1308 Mth He1308 Mzh He1308 Nma He1308 Nth He1308 Pfu He1308 Sso He1308 Tba He1308 Tga He1308 Tsī Consensus	(761) (703) (708) (967) (682) (825) (753) (792) (830) (731) (730) (724) (734) (697) (685) (754) (700) (671) (748) (730) (800) (731) (776) (694) (740) (800) (712) (721) (716) (756) (721) (745) (730) (1141)
--	---

本発明は、以下の態様を包含し得る。

[1]

標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、

(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよび He 1 3 0 8 ヘリカーゼに接触させて、
ヘリカーゼがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中

10

20

30

40

50

のヌクレオチドがポアと相互作用するようにするステップ；および

(b) 1つまたは複数の相互作用の間に標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含む、方法。

[2]

1つまたは複数の特性が、(i) 標的ポリヌクレオチドの長さ、(i i) 標的ポリヌクレオチドの同一性、(i i i) 標的ポリヌクレオチドの配列、(i v) 標的ポリヌクレオチドの二次構造および(v) 標的ポリヌクレオチドが修飾されているか否か、から選択される、上記 [1] に記載の方法。

[3]

標的ポリヌクレオチドがメチル化によって、酸化によって、損傷によって、1つまたは複数のタンパク質でまたは1つまたは複数の標識、タグもしくはスペーサーで修飾されている、上記 [2] に記載の方法。

[4]

標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性が電気的測定および／または光学的測定によって測定される、上記 [1] から [3] のいずれか一項に記載の方法。

[5]

電気的測定が電流測定、インピーダンス測定、トンネル測定または電界効果トランジスタ(F E T)測定である、上記 [4] に記載の方法。

[6]

(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよびH e 1 3 0 8ヘリカーゼに接触させて、ヘリカーゼがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するようにするステップ；および

(b) 1つまたは複数の相互作用の間にポアを通過する電流を測定して、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップ

を含む、上記 [1] に記載の方法。

[7]

ポアに電圧を印加して、ポアとヘリカーゼとの複合体を形成するステップをさらに含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[8]

ポリヌクレオチドの少なくとも一部が2本鎖である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[9]

ポアが、膜貫通タンパク質ポアまたはソリッドステートポアである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[10]

膜貫通タンパク質ポアが、ヘモリジン(hemolysin)、ロイコシジン(leukocidin)、スメグマ菌(Mycobacterium smegmatis)ポリン(porin) A (M s p A)、外膜ポリン(porin) F (O m p F)、外膜ポリン(porin) G (O m p G)、外膜ホスホリパーゼA、ナイセリア(Neisseria)オートトランスポーターリポタンパク質(N a l P)およびW Z Aから選択される、上記 [9] に記載の方法。

[11]

膜貫通タンパク質が、(a) 配列番号2に示す8個の同一のサブユニットから形成されている、または(b) 7個のサブユニットの1つもしくは複数が配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号2に対して少なくとも50%の相同性を有し、ポア活性を保持しているその変種である、上記 [10] に記載の方法。

[12]

膜貫通タンパク質が、(a) 配列番号4に示す7個の同一サブユニットから形成されている - ヘモリジンである、または(b) 7個のサブユニットの1つまたは複数が配列全

10

20

30

40

50

体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号4に対して少なくとも50%の相同性を有し、ポア活性を保持しているその変種である、上記[10]に記載の方法。

[13]

H e 1 3 0 8ヘリカーゼが、アミノ酸モチーフQ-X1-X2-G-R-A-G-R(配列番号8)を含む(式中、X1はC、MまたはLであり、X2は任意のアミノ酸残基である)、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[14]

X2が、A、F、M、C、V、L、I、S、TまたはPである、上記[13]に記載の方法。

[15]

H e 1 3 0 8ヘリカーゼが、表4もしくは5に示すヘリカーゼの内の1つまたはその変種である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

10

[16]

H e 1 3 0 8ヘリカーゼが、(a)配列番号10、13、16、19、22、25、28、29、32、33、34、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および58のいずれか1つに示す配列、または(b)配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて関連配列に対して少なくとも40%の相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、上記[15]に記載の方法。

[17]

20

H e 1 3 0 8ヘリカーゼが、(a)配列番号10もしくは33に示す配列、または(b)配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号10もしくは33に対して少なくとも40%の相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、上記[16]に記載の方法。

[18]

H e 1 3 0 8ヘリカーゼが、アミノ酸同一性に基づいて配列番号10の残基20から211または20から727に対して少なくとも70%の相同性を有する配列を含む、上記[17]に記載の方法。

[19]

H e 1 3 0 8ヘリカーゼが標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

30

[20]

少なくとも0.3Mの塩濃度を用いて実行され、塩が場合によりKClである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[21]

塩濃度が、少なくとも1.0Mである、上記[20]に記載の方法。

[22]

ポアとH e 1 3 0 8ヘリカーゼとの複合体を形成し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成するステップを含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法。

40

[23]

複合体が、(a)標的ポリヌクレオチドの存在下でポアとヘリカーゼとを接触させるステップおよび(a)ポアに電位を印加するステップによって形成される、上記[22]に記載の方法。

[24]

電位が、電圧電位または化学電位である、上記[23]に記載の方法。

[25]

複合体が、ポアをヘリカーゼに共有結合的に付着するステップによって形成される、上記[22]に記載の方法。

[26]

50

ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための H e 1 3 0 8 ヘリカーゼの使用。

[2 7]

(a) ポアおよび(b) H e 1 3 0 8 ヘリカーゼを含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。

[2 8]

複数のポアおよび複数の H e 1 3 0 8 ヘリカーゼを含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための分析装置。

[2 9]

複数のポアを支持でき、前記ポアおよびヘリカーゼを用いてポリヌクレオチド特性決定を実施するために作動可能であるセンサーデバイス；

10

特性決定を実施するための材料を保持するための少なくとも1つのリザーバー；

前記少なくとも1つのリザーバーから前記センサーデバイスに材料を制御可能に供給するよう構成された流体系；および

各試料を受けるための複数の容器

を含み、前記流体系が前記容器から前記センサーデバイスに前記試料を選択的に供給するよう構成されている、上記[2 8]に記載の分析装置。

[3 0]

標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、

20

(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよび分子モーターに接触させて、標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーターがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するようするステップ、および

(b) 1つまたは複数の相互作用の間に標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含む方法。

[3 1]

分子モーターが、ヘリカーゼまたは H e 1 3 0 8 ヘリカーゼである、上記[3 0]に記載の方法。

[3 2]

30

上記[2]から[2 1]のいずれか一項に記載のとおりである、上記[3 0]または[3 1]に記載の方法。

[3 3]

標的ポリヌクレオチドが少なくとも5000ヌクレオチドを含む、上記[3 0]から[3 2]のいずれか一項に記載の方法。

[3 4]

分子モーターが、(a)配列番号22、33もしくは52に示す配列、または(b)配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号22、33もしくは52に対して少なくとも40%の相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、上記[3 0]から[3 3]のいずれか一項に記載の方法。

40

[3 5]

ポアと標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーターとの複合体を形成し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成するステップを含む標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法。

[3 6]

ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための、標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーターの使用。

[3 7]

(a) ポアおよび(b) 標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる分子モーターを含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。

50

[3 8]

複数のポアおよび標的ポリヌクレオチドに内部ヌクレオチドで結合できる複数の分子モーターを含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための分析装置。

[3 9]

標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、
(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよび少なくとも 0 . 3 M の塩濃度に耐性があるヘリカーゼに接触させて、ヘリカーゼがポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御し、標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチドがポアと相互作用するようにするステップ、および

(b) 1 つまたは複数の相互作用の間に標的ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性を測定し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含み、少なくとも 0 . 3 M の塩濃度を用いて実行される方法。

10

[4 0]

ポアと少なくとも 0 . 3 M の塩濃度に耐性があるヘリカーゼとの複合体を形成し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成するステップを含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法。

[4 1]

ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための、少なくとも 0 . 3 M の塩濃度に耐性があるヘリカーゼの使用。

20

[4 2]

(a) ポアおよび(b) 少なくとも 0 . 3 M の塩濃度に耐性があるヘリカーゼを含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。

[4 3]

複数のポアおよび少なくとも 0 . 3 M の塩濃度に耐性がある複数のヘリカーゼを含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための分析装置。

【図 1 a】

【図 1 b】

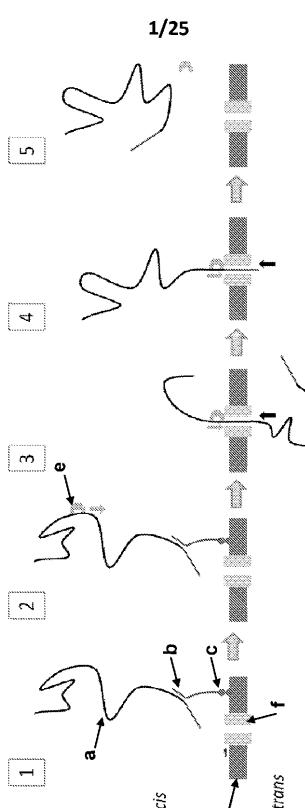


Fig. 1a

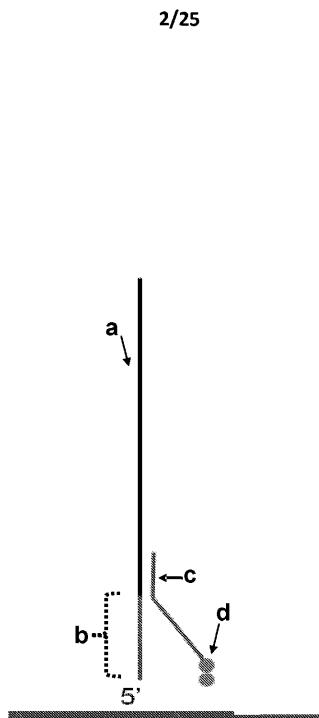


Fig. 1b

【図2】

3/25

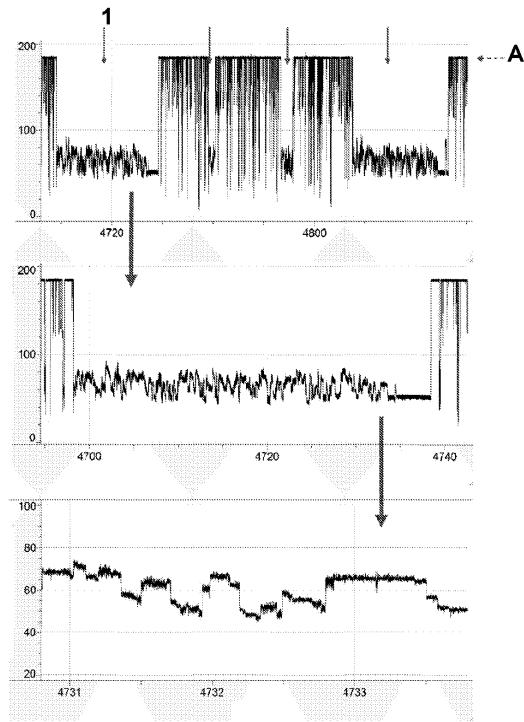


Fig. 2

【図3 a】

4/25

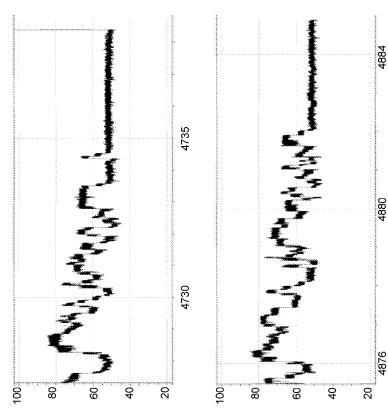


Fig. 3a

【図3 b】

5/25

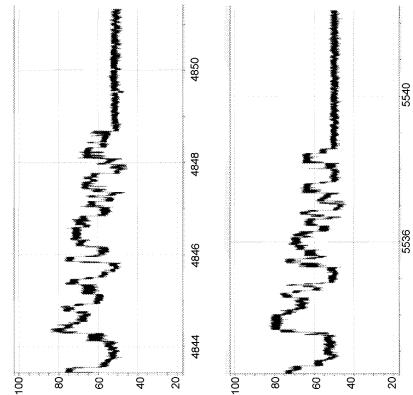


Fig. 3b

【図4 a】

6/25

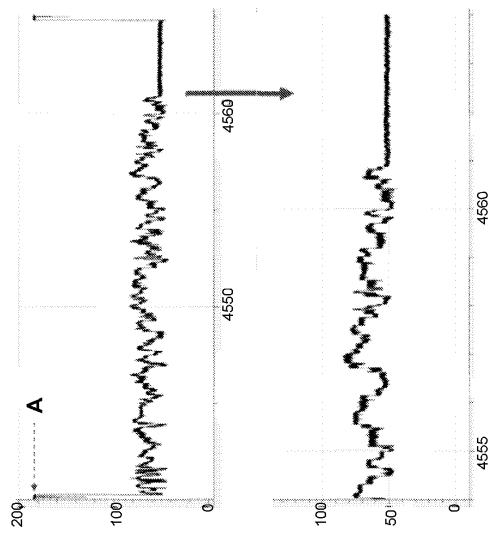


Fig. 4a

【図 4 b】

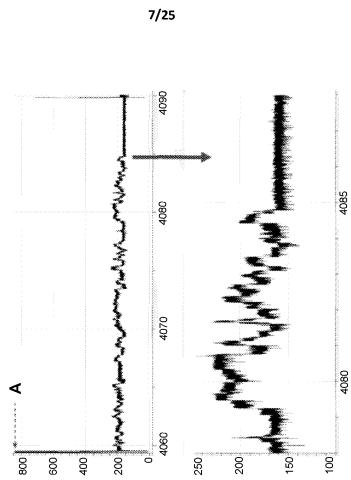


Fig. 4b

【図4c】

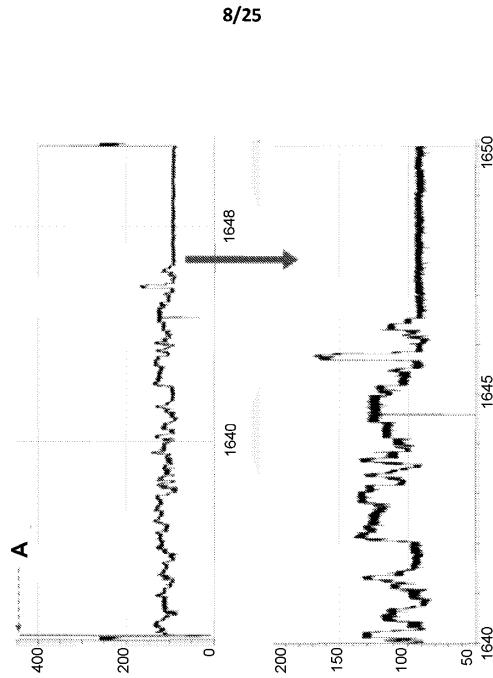


Fig. 4c

【図4d】

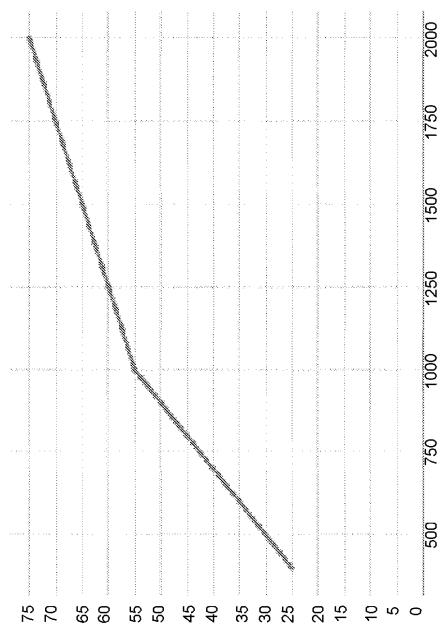


Fig. 4d

【図 5 a】

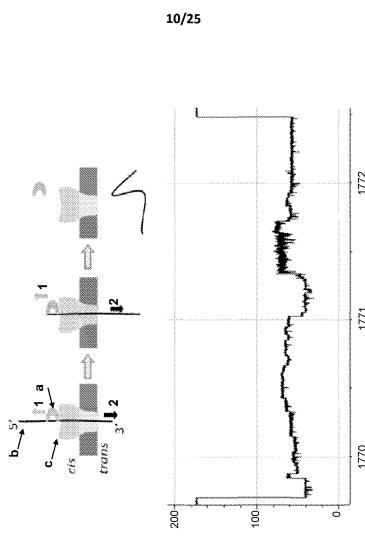


Fig. 5a

【図 5 b】

11/25

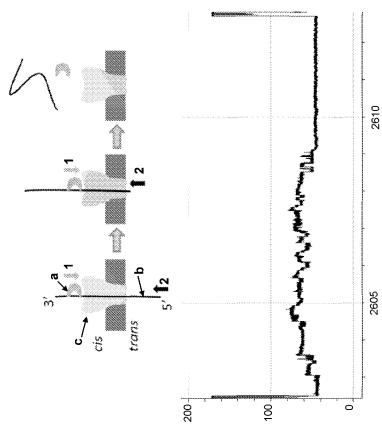


Fig. 5b

【図 6 a】

12/25

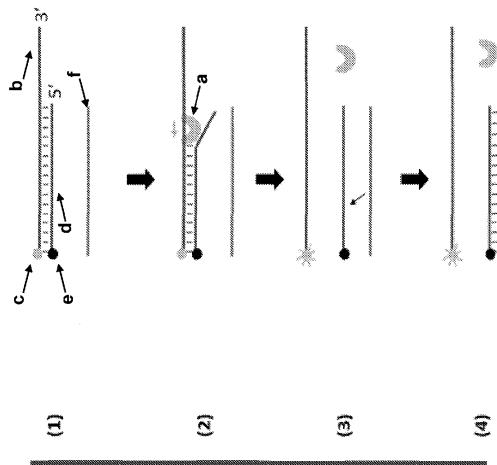


Fig. 6a

【図 6 b】

13/25

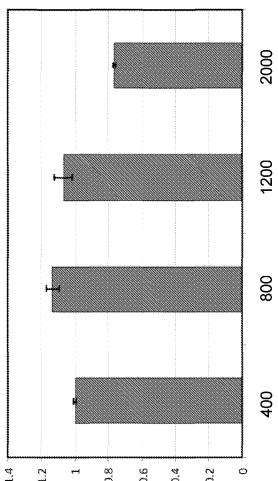


Fig. 6b

【図 7 a】

14/25

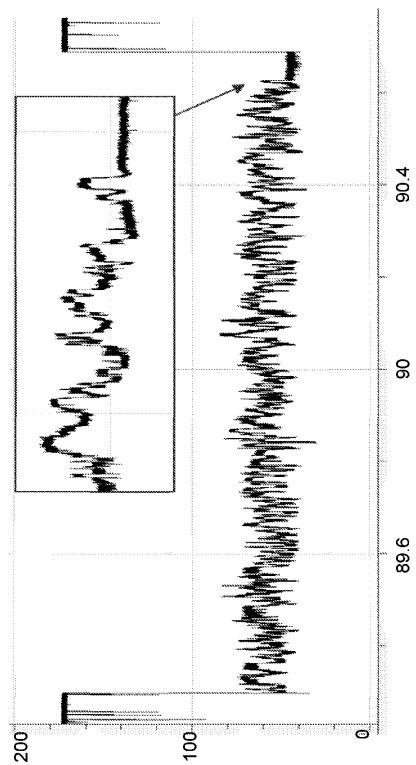


Fig. 7a

【図 7 b】

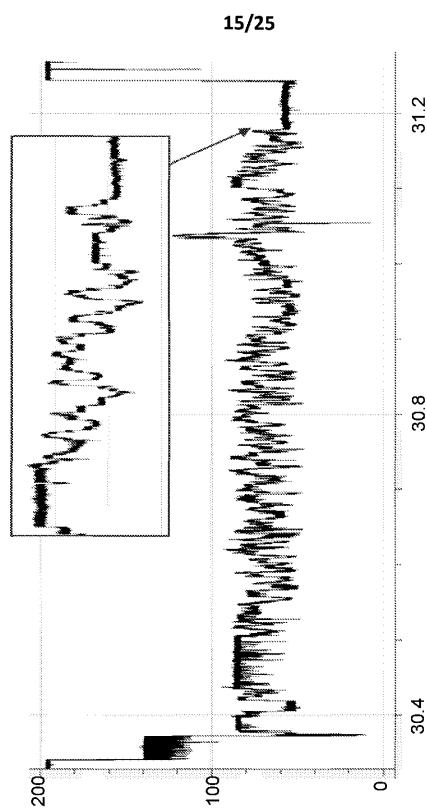


Fig. 7b

【図 7 c】

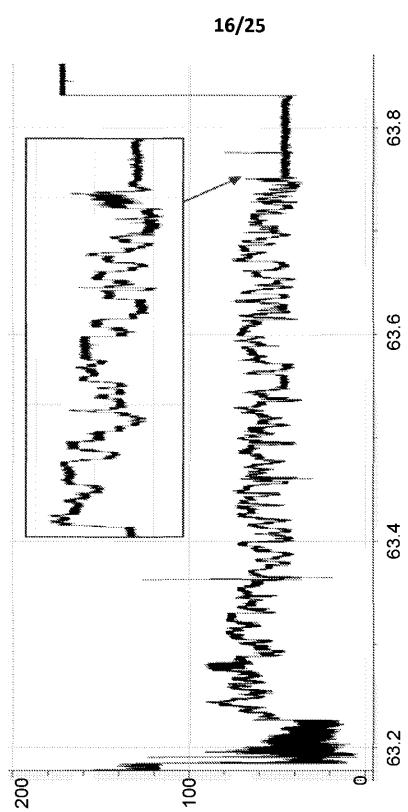


Fig. 7c

【図 8】

17/25

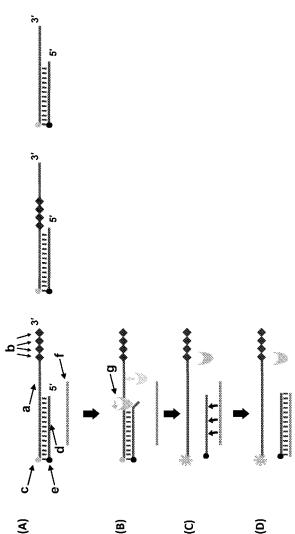


Fig. 8

【図 9】

18/25

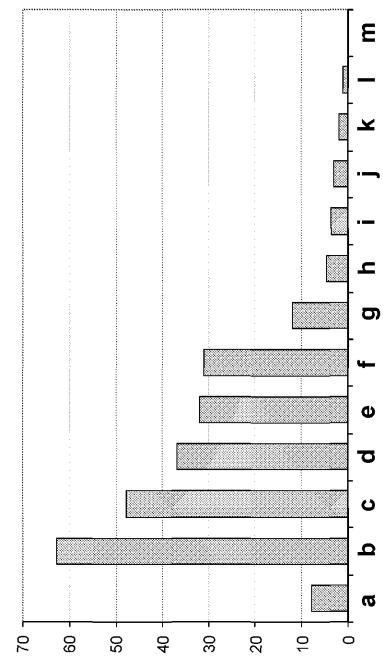


Fig. 9

【図10】

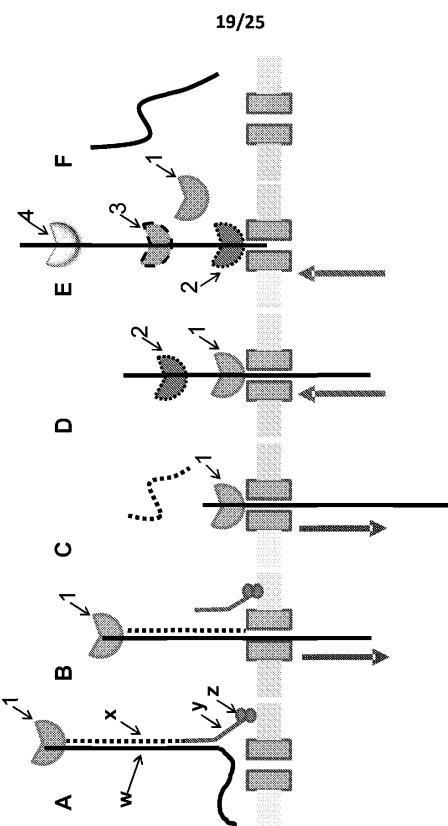


Fig. 10

【図11】

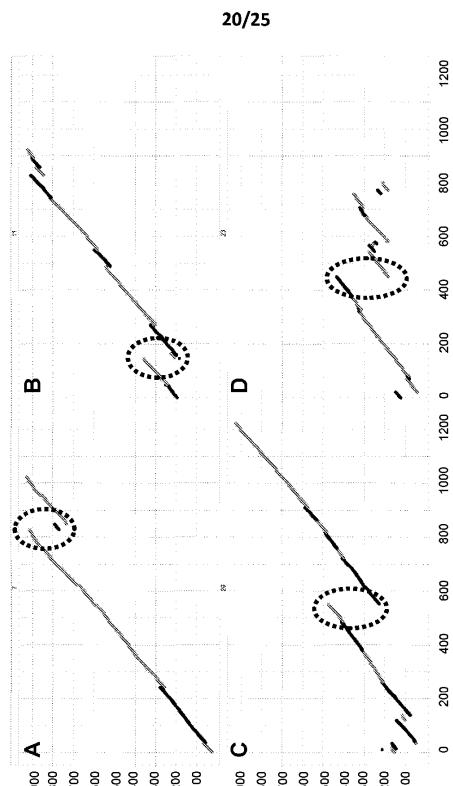


Fig. 11

【図12】

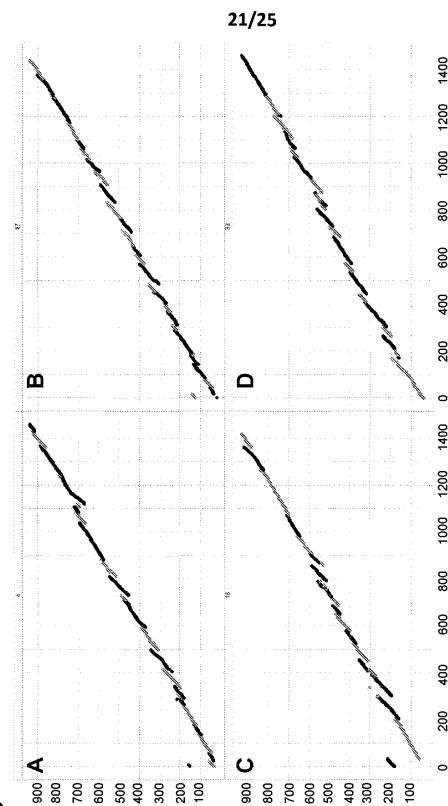


Fig. 12

【図13】

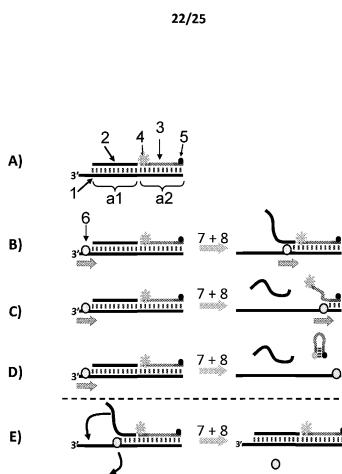


Fig. 13

【図14】

23/25

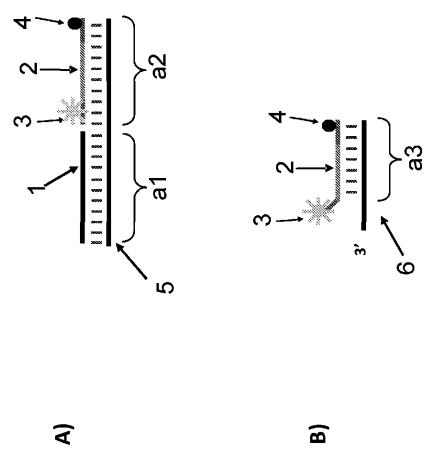


Fig. 14

【図15】

24/25

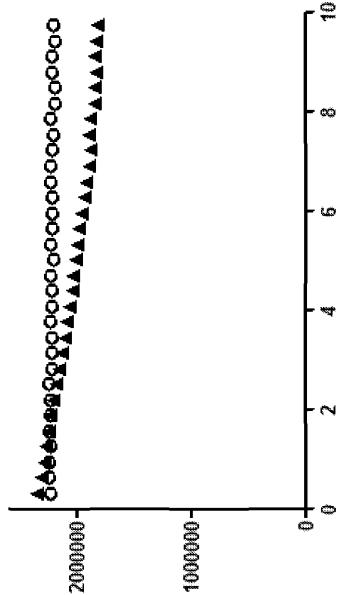


Fig. 15

【図16】

25/25

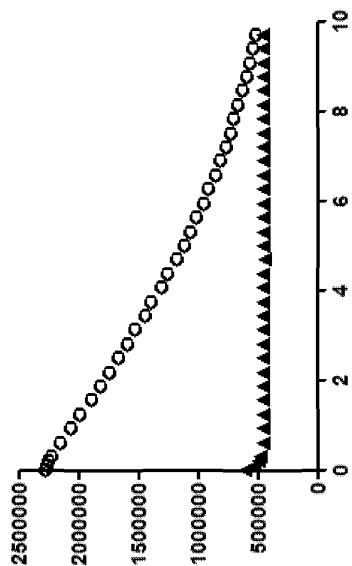


Fig. 16

【配列表】

0006226869000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 Q 1/34 (2006.01)	C 12 M 1/00 A
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 Q 1/34
	C 12 N 15/00 A

(72)発明者 モイズィー, ラス
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク、ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドマンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 ヘロン, アンドリュー ジョン
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク、ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドマンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第2008/102120 (WO, A1)
国際公開第2011/067559 (WO, A1)
国際公開第2010/004265 (WO, A1)
Biochem. Soc. Trans., 2011 Jan., vol.39, p.140-144
Biochem. Soc. Trans., 2009, vol.37, p.74-78
Nat. Struct. Mol. Biol., 2007, vol.14, p.647-652

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00 - 90
Caplus / MEDLINE / BIOSIS (STN)