

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92/23972

※申請日期：92-08-29

※IPC 分類：C12N^{9/22, 11/11} (2006.01)

壹、發明名稱：(中文/日文)

耐熱性核糖核酸酶 H

耐熱性リボヌクレアーゼH

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日商寶生物股份有限公司

TAKARA BIO INC.

代表人：(中文/英文)

加藤 郁之進

IKUNOSHIN KATO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國滋賀縣大津市瀬田三丁目 4 番 1 號

4-1, SETA 3-CHOME, OTSU-SHI SHIGA, JAPAN

國籍：(中文/英文)

日本 JAPAN

參、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 外園 成和
SHIGEKAZU HOKAZONO
2. 上森 隆司
TAKASHI UEMORI
3. 田中 哲基
TETSUKI TANAKA
4. 加藤 郁之進
IKUNOSHIN KATO

住居所地址：(中文/英文)

1. 日本國滋賀縣大津市一里山 3 丁目 1-1
1-1, ICHIRIYAMA 3-CHOME, OTSU-SHI, SHIGA, JAPAN
2. 日本國滋賀縣大津市大江 3 丁目 1-16 謝爾馬可保第 2 瀨田 709 號
709, SHARUMANKOPO-DAINI-SETA, 1-16, OE 3-CHOME,
OTSU-SHI, SHIGA, JAPAN
3. 日本國滋賀縣守山市吉身 3-5-26
3-5-26, YOSHIMI, MORIYAMA-SHI, SHIGA, JAPAN
4. 日本國京都府宇治市南陵町 1-1-150
1-1-150, NANRYO-CHO, UJI-SHI, KYOTO, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

- 1.-4.均日本 JAPAN

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

本案申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本 2002 年 08 月 30 日 特願 2002-254153

2.

3.

4.

5.

主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本 2002 年 08 月 30 日 特願 2002-254153

2.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

食品工業發展研究所；2003 年 10 月 27 日；BCRC 940435

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

日本；獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心；

2002 年 8 月 20 日；FERM BP-8433

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種多肽，再者具體言之，係關於一種具於基因工程利用價值高的具核糖核酸酶H活性之多肽。又，本發明係關於一種對該多肽之基因工程生產有用之基因。再者，本發明係關於一種該多肽之基因工程製造方法。

【先前技術】

核糖核酸酶(RNA分解酶)中存在內切型與外切型，由於其基質特異性多樣，故參與複雜的生理活性。作為具核糖核酸酶活性之酶，已知有核糖核酸酶T₁、核糖核酸酶T₂、核糖核酸酶H、核糖核酸酶P、核糖核酸酶I、核糖核酸酶II、核糖核酸酶III、核糖核酸酶IV、核糖核酸酶L等酶。

核糖核酸酶H(於本發明說明，亦有稱為RNaseH之情形)係於1969年被W. H. Stein及P. Hausen從小牛胸腺首次單離。現在，RNaseH被分為於各種動物細胞、酵母等真核生物及大腸桿菌等原核生物廣泛存在之細胞性RNaseH、與存在於RNA腫瘤病毒之病毒性RNaseH。於1種細胞內存在數種RNaseH活性，係Mg²⁺、Mn²⁺等2價金屬離子需求性。

來源於大腸桿菌之RNaseH係包含155個胺基酸，分子量約17 kDa之水解酶，具僅對DNA/RNA雜交的RNA鏈特異性內切之基質特異性。生成的寡聚合物於5'末端有磷酸基，於3'末端有羥基。

作為來源於大腸桿菌之RNaseH，被鑑定為RNaseHI與RNaseHII。作為RNaseHI的生理功能，於Col E1質體之複

製，1)分解結合於非正常複製起點處之RNA，確保正常複製起點；2)表示於正常複製起點進行特異性RNA引子之合成。但是，RNaseHII之功能尚不明。

RNaseH基於其基質特異性，具下述列舉之用途，作為利用價值極高的酶被注意。

- 1) cDNA選殖之際的模板mRNA之去除。
- 2) mRNA的多聚A鏈之去除。
- 3) RNA之片段化。

RNaseH的重要性隨基因工程的發展被認為益加增大，該酶因於大腸桿菌內的表現量極低，藉由重組DNA技術之該酶之生產被嚐試，由BRL、Amersham Pharmacia Biotech及Takara Bio等藉由重組DNA技術生產之RNaseH已被供給。

該等市場上販賣之重組RNaseH，係以大腸桿菌為宿主被生產者[金谷等，The Journal of Biological Chemistry, 第264卷，第11546-11549頁(1989)]。又，較來源於大腸桿菌之RNaseH具極高穩定性之來源於嗜熱菌之RNaseH藉由大腸桿菌之製造法雖然亦被報導[金谷等，第2屆日本蛋白工程會年會日程・摘要集(1990)，69頁；專利第2533671號公報]，但是使用大腸桿菌生產之嗜熱菌RNaseH之酶活性係較來源於大腸桿菌之RNaseH低者。

如上所述，具耐熱性之RNaseH僅為較來源於大腸桿菌之RNaseH之生產性及酶活性低者，因RNaseH之用途擴大，具與大腸桿菌同樣或高於其之生產性及酶活性之耐熱性

RNaseH之開發被期望。

故，為解決上述問題點，各種具耐熱性之RNaseH被選殖。例如，國際公開第02/22831號手冊記載之來源於*Bacillus caldotenax*、高溫嗜熱菌(*Pyrococcus furiosus*)、*Thermotoga maritima*、*Archaeoglobus fulgidus*、海岸熱球菌(*Thermococcus litoralis*)、*Thermococcus celer*、*Pyrococcus horikoshii*之RNaseH可被列舉。

又，來源於Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 16, p4443-4449 (1991)；美國專利第5268289號記載之*Thermus thermophilus*、美國專利第5610066號記載之高溫嗜熱菌(*Pyrococcus furiosus*)、特開平11-32772號記載之*Pyrococcus* sp. KOD1株、*Journal of Molecular Biology*, Vol. 307, p541-556 (2001)記載之(*Archaeoglobus fulgidus*)之RNaseH被列舉。

但是，該等RNaseH包含很多耐熱性低、一旦DNA/RNA雜交之RNA鏈變短活性就降低、比活性低等應改善的問題。故，為適應隨基因工程發展被認為益加增大之RNaseH之重要性，具更強的耐熱性、基質特異性、作用機能之RNaseH之開發被期待著。

【發明內容】

本發明之目的在於提供具於基因工程利用價值高的RNaseH活性之多肽，編碼該多肽之基因及該多肽之基因工程製造方法。

本發明者等鑒於上述情況，為得到耐熱性RNaseH進行精

心研究及探索之結果，發現具高RNaseH活性之耐熱性RNaseH多肽。再者，亦發現得到之耐熱性RNaseH即使藉由基因工程方法製造，生產性亦優，從而完成本發明。

概述本發明，本發明之第1發明，係關於耐熱性核糖核酸酶H多肽，係關於一種多肽，其特徵在於選自下述之群，且具耐熱性核糖核酸酶H活性。

(a)具序列表之序列編號1之胺基酸序列之多肽；

(b)具於序列表之序列編號1之胺基酸序列中，至少一個胺基酸殘基之缺失、添加、插入或取代之多肽；

(c)具與序列表之序列編號1之胺基酸序列至少54%同源性之胺基酸序列之多肽。

本發明之第2發明，係關於編碼耐熱性核糖核酸酶H之核酸，係關於一種核酸，其選自下述之群，且編碼具耐熱性核糖核酸酶H活性之多肽。

(a)編碼具於序列表之序列編號1之胺基酸序列之多肽之核酸；

(b)編碼具於序列表之序列編號1之胺基酸序列中，至少一個胺基酸殘基之缺失、添加、插入或取代之多肽之核酸；

(c)編碼具與序列表之序列編號1之胺基酸序列至少54%同源性之胺基酸序列之多肽之核酸；

(d)具序列表之序列編號2之鹼基序列之核酸；

(e)其包含具於序列表之序列編號2之鹼基序列中，至少一個鹼基於被轉譯成胺基酸序列之際的缺失、添加、插入或取代之鹼基序列之核酸；

於本發明，所謂多肽具耐熱性RNaseH活性，非特別限定者，意味著於70°C以上之溫度保持15分鐘後仍具RNaseH活性。

耐熱性RNaseH活性，例如可如下測定。

多聚(rA)及多聚(dT) (均為Amersham Pharmacia Biotech製) 1 mg分別溶解於1 ml含1 mM EDTA之40 mM Tris-HCl (pH 7.7)，配製多聚(rA)溶液及多聚(dT)溶液。

其次，向含4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.003% BSA、4% 甘油之40 mM Tris-HCl (pH 7.7) 中，以終濃度為20 µg/ml添加多聚(rA)溶液，以終濃度為30 µg/ml添加多聚(dT)溶液，於37°C反應10分鐘後，冷卻至4°C，配製多聚(rA)-多聚(dT)溶液。

向該多聚(rA)-多聚(dT)溶液100µl中添加酶液1 µl，使其於40°C反應10分鐘，添加0.5M EDTA 10 µl使反應停止後，於260 nm測定吸光度。作為對照，向上述反應液中添加0.5M EDTA 10 µl後，使其於40°C反應10分鐘，測定吸光度。其後，藉由求出自於EDTA非添加使其反應求得之吸光度減去對照之吸光度的值(吸光度差)，自吸光度差求出藉由酶反應自多聚(rA)-多聚(dT)雜交游離之核苷酸的濃度，可測定本發明之耐熱性RNaseH活性。

又，向要活性測定之酶液1 µl中添加預先於40°C孵育之反應液[20 mM Hepes-氫氧化鉀緩衝液(pH 8.5)、0.01%牛血清白蛋白(Takara Bio.公司製)、1%二甲亞砷、4 mM醋酸鎂、20 µg/ml多聚(dT) (Amersham Pharmacia Biotech公司製)、

胞抽出液，例如於40°C以上之溫度，進行約10分鐘之熱處理，熱變性，去除不溶之來源於宿主之蛋白質亦可。又，該熱處理之溫度及時間，只要選擇適當，最適溫度及時間即可。

如上所述，將本發明之多肽，使用持有編碼該多肽之核酸的轉形體，於常溫，例如即使於37°C使其表現之情形，得到之表現產物保持著其活性，耐熱性等。即，本發明之多肽，即使於偏離其本來生產菌之繁殖溫度的溫度下使其表現之情形，亦可形成其固有之高級構造。

本發明之核酸，係編碼本發明之多肽之核酸，具體言之，為將記載於序列表之序列編號1的胺基酸序列，或將該序列中，一個以上之胺基酸殘基之缺失、添加、插入或取代中之至少1種形成之胺基酸序列表示之，且，具耐熱性RNaseH活性之多肽編碼之核酸(1)、序列表之序列編號2記載之鹼基序列表示之核酸(2)、及與上述核酸(1)或(2)於苛刻條件下可能雜交、或與(1)或(2)之鹼基序列具至少61%，70%為佳，80%更佳，90%較佳，之同源性之鹼基序列，且為編碼具耐熱性RNaseH活性之多肽的核酸(3)等。

上述鹼基序列之同源性，可藉由Computer Program DNASIS-Mac、Computer Algorithm FASTA (version 3.0)、BLAST (version 2.0)測定。

本發明說明中之核酸，意味著單鏈或雙鏈DNA或RNA。上述核酸(2)為RNA之情形，例如序列表之序列編號2記載之鹼基序列，以U取代T之鹼基序列表示。

本發明之核酸，例如可如下得到。

首先，以序列表之序列編號2記載的鹼基序列表示之核酸(2)，使用基因組DNA可從製作的DNA文庫中單離。其中，基因組DNA係從記載於本發明之多肽的說明中之方法培養的 *Archaeoglobus profundus* (DSM5631) 根據常法配製。又，藉由以該基因組DNA為模板之多聚酶鏈反應(PCR)，亦可藉由將記載於序列表之序列編號2之鹼基序列表示之核酸擴增而獲得。

又，由本發明提供之，編碼本發明之多肽的核酸之鹼基序列，例如可基於記載於序列表之序列編號2之鹼基序列，獲得編碼具與本發明之多肽同樣耐熱性RNaseH活性之多肽的核酸。即，藉由將編碼本發明之多肽的核酸，或其鹼基序列之一部分用於雜交的探針，可將編碼具耐熱性RNaseH活性之多肽的DNA，於從細胞抽出之DNA、以該DNA為模板得到之PCR產物等篩選。或藉由使用從上述鹼基序列設計之引子之PCR等基因擴增法，可將編碼具耐熱性RNaseH活性之多肽的DNA擴增。又，亦可將編碼具耐熱性RNaseH活性之多肽的DNA化學合成。藉由如此方法，可得到上述核酸(1)或(3)。

以上述方法有時可得到只含目的核酸之一部分之核酸片段，當時研究得到之核酸片段的鹼基序列，在確認其係目的核酸之一部分之基礎上，藉由將該核酸片段，或其一部分作為探針進行雜交，或使用基於該核酸片段之鹼基序列被合成之引子進行PCR，可獲得全部目的核酸。

上述之所謂「於苛刻條件下雜交」，意味著於1989年，Gold Spring Harvard Laboratory發行，T.Maniatis等編輯，分子選殖：實驗室指南第2版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.) 等記載之條件下可雜交，例如，稱為於以下條件雜交可能者。即，將固定著核酸之膜於含0.5% SDS、0.1%牛血清白蛋白(BSA)、0.1%聚乙烯吡咯烷酮、0.1% Ficoll 400、0.01%變性鮭精子核酸之 $6\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$ 具0.15 M NaCl、0.015 M檸檬酸鈉、pH 7.0)中，於 50°C 與探針一起孵育12-20小時。孵育結束後，於含0.5% SDS之 $2\times\text{SSC}$ 中，從於 37°C 之洗淨開始，使SSC濃度變化於到0.1倍為止之範圍內，又，溫度變化於到 50°C 為止之範圍內，於將膜洗淨至來源於被固定之核酸之信號可與背景區別開來之基礎上，進行探針之檢出。又，對於如此得到之新核酸，藉由以上述同樣方法研究接著被編碼之蛋白質所具活性，可確認得到之核酸是否為目的者。

又，使用寡聚核苷酸探針之情形下，作為前述「苛刻條件」，無特別限定，稱為例如，於含有 $6\times\text{SSC}$ 、0.5% SDS、 $5\times\text{Denhardt}$ 、0.01%變性鮭精子核酸之溶液中，於 $[T_m - 25^{\circ}\text{C}]$ 之溫度下過夜保溫之條件等。

寡聚核苷酸探針或引子之 T_m ，例如可藉由下述算式求出。

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G+C}) - (600/N)$$

(算式中，N為寡聚核苷酸探針或引子之鏈長，% G+C為寡聚核苷酸探針或引子中鳥嘌呤及胞嘧啶殘基之含量。)

如，特公平7-102146號公報)。不必說如此編碼特定胺基酸序列之多種核酸可人為地製作，即使於自然界中亦為可產生者。

編碼本發明之多肽的核酸，例如，可將具序列表之序列編號2記載之鹼基序列的核酸連接於適當載體，製成重組DNA。對於該重組DNA之製作被使用之載體，無特別限定，例如，可使用質體載體、嗜菌體載體、病毒載體等，只要應重組DNA之使用目的，選擇適當載體即可。

再者，可將該重組DNA轉入適當宿主，製成轉形體。對於轉形體之製作被使用之宿主亦無特別限定，除細菌、酵母、絲狀桿菌等微生物外，亦可使用動物、植物、昆蟲等培養細胞等。藉由培養該轉形體，使本發明之多肽被產生於培養物中，大量製造本發明之多肽成為可能。

(3) 本發明之多肽

如上所述得到之本發明之多肽，例如可利用記載於國際公開第00/56877號手冊、國際公開第02/16639號手冊之核酸擴增方法。再者，雖然於先前已知之RNaseH中，於如DNA-RNA-DNA之嵌合核酸中，亦有因RNA長度其RNaseH活性降低者，但是本發明之多肽很難受到RNA長度導致之影響。故，可適宜使用國際公開第02/064833號手冊記載之鹼基取代檢測方法、及BioTechniques, Vol. 20, No. 2, p240-248 (1996)記載之循環探針法(Cycling Probe)。又，具即使進行於95°C 15分鐘之處理，亦可保持其RNaseH活性之特徵，可用於多種用途。

實施例

以下，將本發明藉由實施例具體說明，但是本發明之範圍並非限定於該等實施例者。

實施例 1

Archaeoglobus Profundus RNaseH基因之選殖

(1) Archaeoglobus profundus基因組DNA之配製

收集 Archaeoglobus Profundus (Archaeoglobus profundus, 購於 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: DSM5631) 相當於 10 ml 之菌體，懸浮於 100 μ l 之 20% 蔗糖、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)，添加 20 μ l 之 0.5M EDTA、10 μ l 之 10 mg/ml 氯化溶菌酶 (Nacalaitesque 公司製) 水溶液，於 20°C 反應 2 小時。反應結束後，向該反應液中添加 800 μ l 之 150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 μ l 之 20 mg/ml 蛋白酶 K (Takara Bio. 公司製) 及 50 μ l 之 10% 聚氧乙烯烷基硫酸鈉水溶液，於 37°C 保溫 1 小時。反應結束後，酚-氯仿抽出、乙醇沈澱、風乾後，溶解於 50 μ l 之 TE，得到基因組 DNA 溶液。

(2) RNaseH 基因中間部分之選殖

以各種耐熱性 RNaseH 胺基酸序列之間保守存在之部分為基礎，合成寡聚核苷酸 RN-F1 (序列編號 3) 與寡聚核苷酸 RN-F2 (序列編號 4)。

將於上述實施例 1-(1) 配製之 Archaeoglobus Profundus 基因組 DNA 溶液 5 μ l 作為模板，將 100 pmol RN-F1 及 100 pmol RN-F2 用於引子，以 100 μ l 之體積進行 PCR。PCR 之 DNA 多

聚酶，根據添付之操作指南使用Takara Ex Taq (Takara Bio. 公司製)，PCR以於94°C 30秒、於45°C 30秒、於72°C 1分鐘為1個循環，進行50個循環。反應結束後，以Microcon-100 (Takara Bio. 公司製)去除引子之同時濃縮，得到約0.5 kb之DNA片段AprF1R2。

(3) RNaseH基因上游及下游部分之選殖

決定於上述實施例1-(2)得到之約0.5 kb之片段AprF1R2之鹼基序列，以其為基礎，合成為選殖上游之特異性寡聚核苷酸AprRN-1 (序列編號5)與為選殖下游之特異性寡聚核苷酸AprRN-2 (序列編號6)。再者，合成示於表1之48種引子。將表1中之標籤(tag)序列示於序列表之序列編號7。

表 1

5'-標籤序列-NN-SSSSSSS-3'

(N: G、A、T、C之混合物, S為示於下列之鹼基序列)

序號	鹼基序列	序號	鹼基序列	序號	鹼基序列
1	ggagcag	19	gtaacgg	37	gcgcaag
2	ggcaaag	20	gtaagcg	38	gcgcttg
3	ggcaacg	21	gtacacg	39	gcggacg
4	ggcacag	22	gtagacg	40	gcgtaag
5	ggcattg	23	gtagcgg	41	gctacgg
6	ggccaag	24	gtcaacg	42	gctcacg
7	ggccttg	25	gcaccag	43	gctccag
8	ggctaag	26	gcagacg	44	gcttgcg
9	ggctacg	27	gcagcag	45	gcttggg
10	ggctcag	28	gcatggg	46	ggacacg
11	ggctttg	29	gccaaag	47	ggaccag
12	gggacag	30	gccacag	48	ggagacg
13	gggcaag	31	gccattg		
14	gggcttg	32	gccaag		
15	gggtacg	33	gcccttg		
16	ggtaacg	34	gcctacg		
17	ggtacgg	35	gcctcag		
18	ggtagcg	36	gcctttg		

以於實施例1-(1)配製之 *Archaeoglobus Profundus* 基因組 DNA 溶液 1 μ l 作為模板，以 20 pmol AprRN-1 或 20 pmol AprRN-2，與各 20 pmol 表1記載之 48種引子組合，於含 20 mM Tris 醋酸 (pH 8.5)、50 mM 醋酸鉀、3 mM 醋酸鎂、0.01% BSA、各 30 μ M dNTP 混合物、2.5個單位 Takara Ex Taq DNA 多聚酶 (Takara Bio. 公司製) 之反應液中進行 PCR。PCR 於 94°C 孵育 3分鐘後，於以 98°C 10秒、於 50°C 10秒、於 72°C 40秒為 1個循環，進行 40個循環。將得到之 PCR 產物之一部分進行瓊脂膠電泳，選出成為一條帶者，將該等反應液藉由 Microcon-100 (Takara Bio. 公司製) 於去除引子之同時濃縮，進行直接序列測定，篩選出含 RNaseH 之上游或下游之片段。其結果，已清楚 RNaseH 基因之上游含於約 600bp 之 PCR 擴增片段 Apr-1A5，下游含於約 500 bp 之 PCR 擴增片段 Apr-2D9。

(4) RNaseH 基因全長之選殖

以上述鹼基序列為基礎，合成引子 AprNde (序列編號 8) 及 AprBam (序列編號 9)。

以於實施例 1-(1) 得到之 *Thermococcus Profundus* 基因組 DNA 溶液 1 μ l 作為模板，將 20 pmol AprRNde 及 20 pmol AprBam 用於引子，以 100 μ l 之體積進行 PCR。PCR 之 DNA 多聚酶，根據添付之操作指南使用 Takara Ex Taq (Takara Bio. 公司製)，PCR 以於 94°C 30秒、於 55°C 30秒、於 72°C 1分鐘為 1個循環，進行 40個循環。將擴增之約 0.7 kb 之 DNA 片段以 NdeI 及 BamHI (均為 Takara Bio. 公司製) 消化，將得到

之DNA片段插入質體載體pTV119Nd (將pTV119N之NcoI位點變換為NdeI位點者)或pET3a (Novagen公司製)之NdeI及BamHI之間，製作質體pAPR111Nd及pApr108。

(5) 含RNaseH基因之DNA片段之鹼基序列之決定

將於實施例1-(4)得到之pAPR111Nd及pApr108之插入DNA片段之鹼基序列藉由雙股去氧序列測定法決定。

分析得到之鹼基序列之結果，發現被認為係編碼RNaseH之開放性閱讀架構(open reading frame)。將pApr108之開放性閱讀架構之鹼基序列示於序列表之序列編號2。又，由該鹼基序列被推測之RNaseH胺基酸序列示於序列表之序列編號1。PCR片段AprF1R2相當於序列編號2之第11-449號鹼基，Apr-1A5相當於從第59號鹼基開始之5'末端側，Apr-2D9相當於從第373號鹼基開始之3'末端側。另，以質體pApr108轉形之大腸桿菌HMS174DE3，被命名、表示為*Escherichia coli* HMS174/pApr108，自平成14年8月20日(原寄存日)作為受托號FERM BP-8433被寄存於日本國〒305-8566茨城縣築波市東1丁目1番地1中央第6，獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心，並其於2003年10月27日寄存中華民國(台灣)食品工業發展研究所，寄存編號為BCRC 940435。使用DNA序列輸入分析系統DNASIS (Ver. 3.6, Takara Bio.公司製)分析時，得知其係24.4 kDa之蛋白質，等電點為8.50。又，從鹼基序列之比較，可推測出其係被分類於RNaseHII。

(6) *Archaeoglobus Profundus* RNaseH基因之表現

將以 pAPR111Nd 轉形之大腸桿菌 JM109 植於含 100 $\mu\text{g/ml}$ 胺苄青黴素及 1 mM IPTG 之 10 ml 之 LB 培养基，於 37°C 過夜振盪培養。培養結束後，將藉由離心分離收集之菌體懸浮於 176.3 μl 緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA)，以超音波破碎機處理。將該破碎液於 12000 rpm 進行 10 分鐘之離心分離，將得到之上清於 70°C 進行 10 分鐘之熱處理。其後，再次於 12000 rpm 進行 10 分鐘之離心分離，收集上清，得到熱處理上清液。同樣，將以 pApr108 轉形之大腸桿菌 HMS174 (DE3) 植於含 100 $\mu\text{g/ml}$ 胺苄青黴素之 10 ml 之 LB 培养基，於 37°C 過夜振盪培養。培養結束後，將藉由離心分離收集之菌體以上述方法處理，得到 Apr RNaseH 熱處理上清液。

使用於上述得到之熱處理上清液，藉由以下方法測定酶活性。

多聚 (rA) 及多聚 (dT) (均為 Amersham Pharmacia Biotech 製) 1 mg 分別溶解於 1 ml 含 1 mM EDTA 之 40 mM Tris-HCl (pH 7.7)，配製多聚 (rA) 溶液及多聚 (dT) 溶液。

其次，向含 4 mM MgCl_2 、0.1% DMSO、0.01% BSA 之 20 mM HEPES-KOH (pH 7.8) 以終濃度為 20 $\mu\text{g/ml}$ 添加多聚 (rA) 溶液，以終濃度為 30 $\mu\text{g/ml}$ 添加多聚 (dT) 溶液，於 40°C 反應 10 分鐘後，冷卻至 4°C，配製多聚 (rA)-多聚 (dT) 溶液。

向該多聚 (rA)-多聚 (dT) 溶液 100 μl 中添加 Apr RNaseH 熱處理上清液 1 μl ，使其於 40°C 反應 10 分鐘，添加 0.5M EDTA 10 μl 使反應停止後，於 260 nm 測定吸光度。作為對照，向

RNaseH完全通過DE52柱。

將完全通過DE52柱之蛋白溶液，供於以緩衝液B [20 mM Tris-HCl (pH 7.0)、1 mM EDTA、100 mM NaCl、10 mM 2-巰基乙醇]平衡過之P-II陽離子交換柱(Whatman公司製)，藉由100 mM-1000 mM NaCl直線濃度梯度溶出。其結果，於約500 mM NaCl處得到被溶出之RNaseH成分。

將該RNaseH成分150 ml以PEG(聚乙二醇(Polyethylene Glycol)) 20000濃縮至50 ml。向其添加150 mM之緩衝液C [20 mM Tris-HCl (pH 7.0)、1 mM EDTA、10 mM 2-巰基乙醇]，供於以緩衝液B平衡過之Heparin-Sepharose OL-6B肝素親和柱(Amarsham BioSciences公司製)，藉由100 mM-500 mM NaCl直線濃度梯度溶出。其結果，於約250 mM NaCl處得到被溶出之RNaseH成分。

將該RNaseH成分130 ml以PEG 20000濃縮至10 ml後，供於以緩衝液D [20 mM Tris-HCl (pH 7.0)、0.5 mM EDTA、200 mM NaCl、10 mM 2-巰基乙醇]平衡之HiLoad 26/60 SuperdexG200HR膠體濾過柱(Amarsham BioSciences公司製)，以緩衝液D進行溶出之結果，得到25 ml RNaseH成分。

向該RNaseH成分25 ml中添加35 ml緩衝液C，供於以緩衝液B平衡之SP-Sepharose FF陽離子交換柱(Amarsham BioSciences公司製)，藉由100 mM-500 mM NaCl直線濃度梯度溶出。其結果，於約250 mM NaCl處得到被溶出之RNaseH成分50 ml。

將該RNaseH成分50 ml用Ultrafree-4 BIOMAX-5K

(Millipore公司製)離心濃縮至11 ml。將該濃縮液11 ml相對於形狀緩衝液[25 mM Tris-HCl (pH 7.0)、0.5 mM EDTA、30 mM NaCl、5 mM 2-巰基乙醇、50%甘油]進行透析，得到4.5 ml RNaseH溶液。

將如此得到之RNaseH作為Apr RNaseH標準品。

使用上述得到之Apr RNaseH標準品，藉由實施例1-(6)記載之方法測定酶活性之結果，確認於Apr RNaseH標準品中有RNaseH活性。

實施例2 同族性檢索

對於於實施例1得到之Archaeoglobus Profundus (Apr) RNaseH之胺基酸序列與編碼其之鹼基序列，進行同族性檢索。同源性，作為檢索程序，以Computer Algorithm FASTA (version 3.2; Pearson, W. R.等, Pro. Natl. Acad. Sci., 85: 2444-2448, 1988)算出。

以Computer Algorithm FASTA關於Apr RNaseH檢索了基因數據庫。其結果，對於Apr RNaseH之胺基酸序列、鹼基序列，於被推測為核糖核酸酶之胺基酸序列、鹼基序列中同源性最高者分別有53%、60%之同源性。

實施例3 RNaseH之耐熱性之檢討

作為Archaeoglobus Profundus RNaseH，使用以實施例1-(6)得到之pApr108轉形之大腸桿菌研究耐熱性。即，培養上述大腸桿菌，將從培養液配製之酶抽出液於95°C，15分鐘之條件下進行熱處理，以與實施例1-(6)同樣之方法研究RNaseH活性。其結果，於來源於Archaeoglobus Profundus

之RNaseH確認有RNaseH活性。

再者，將熱處理緩衝液(2.5 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM 巰基乙醇、30 mM NaCl、0.5 mM EDTA、0.1% BSA、50% 甘油)中之5單位/ml之Apr RNaseH，分別於50°C、60°C、70°C、80°C、90°C之溫度條件下熱處理10分鐘，研究殘存活性。將未進行熱處理之樣品、熱處理後之樣品，以終濃度為0.2單位/ml，添加至終濃度分別為32 mM HEPES-氫氧化鉀緩衝液(pH 7.8)、100 mM醋酸鉀、1% DMSO、0.05% BSA、4 mM醋酸鎂、0.2 μ M基質DNA-RNA-DNA、1 μ M模板W49 (序列編號16)之活性測定溶液，求出對於探針W3 (序列編號15)之酶每單位之分解速度。以未進行熱處理之RNaseH活性作為100，其結果示於圖1。Apr RNaseH於50-80°C幾乎100%，即使於90°C 10分鐘之反應後，亦有86.9 \pm 7.0%之殘存活性。

實施例4使用來源於Apr之RNaseH之ICAN system之HBV檢出之檢討

將於序列表之序列編號10記載之HBV X蛋白基因一部分之560 bp於PCR反應擴增，將其片段藉由TA選殖插入pT7Blue T載體。以此作為HBV陽性對照質體。

反應成分係添加終濃度為32 mM HEPES-氫氧化鉀緩衝液(pH 7.8)、100 mM醋酸鉀、1% DMSO、0.01% BSA、4 mM醋酸鎂、各600 μ M dNTP混合物、11單位BcaBEST DNA多聚酶、及具序列表之序列編號11、12記載之鹼基序列之HBVF-2引子與HBVR-1引子分別50 pmol、HBV陽性對照

10^3 拷貝、及來源於Apr之RNaseH 1.625單位、或3.25單位、或6.5單位、或13單位，使終體積為25 μ l。將該反應液置於預先設為55之溫度循環儀(Thermal cycler)，保溫60分鐘。

反應結束後，將該反應液3 μ l進行3.0%瓊脂凝膠電泳。其結果，於任一RNaseH量，均可確認出目的擴增片段76 bp。

將同樣之實驗，於HBV陽性對照 10^2 拷貝、或HBV陽性對照10拷貝、或HBV陽性對照1拷貝之情形下亦進行，檢討對HBV陽性對照之敏感度。其結果，將Apr RNaseH添加6.5單位之情形下敏感度最高，可檢出HBV陽性對照1拷貝。

其次，將來源於*Pyrococcus furiosus*之RNaseHII (Pfu RNaseHII)、來源於*Archaeoglobus fulgidus*之RNaseHII (Afu RNaseHII)、來源於*Thermococcus litoralis*之RNaseHII (Tli RNaseHII)以國際公開第02/22831號手冊記載之方法配製，用於上述ICAN system之HBV檢出，將其敏感度與Apr RNaseH作一比較。使用Pfu RNaseHII之情形下，得到最高敏感度之酶添加量為2.2單位，對HBV陽性對照之敏感度為10拷貝。使用Afu RNaseHII之情形下，得到最高敏感度之酶添加量為2.2單位，對HBV陽性對照之敏感度為10拷貝。使用Tli RNaseHII之情形下，得到最高敏感度之酶添加量為8單位，對HBV陽性對照之敏感度為10拷貝。

如此，於此ICAN system之HBV基因檢出，於使用來源於Apr之RNaseH之情形下，檢出HBV陽性對照1拷貝為可能，且可確認得到最高敏感度。

實施例 5

Apr RNaseH之基質形狀之不同導致之基質分解速度之比較

包含於序列中之RNA數為不同之3個DNA-RNA-DNA，測定將探針W1（序列編號13）、探針W2（序列編號14）、探針W3（序列編號15）用於基質之情形之RNaseH所致之分解速度，研究其差異。同時，將來源於*Pyrococcus furiosus*之RNaseHII（Pfu RNaseHII）、來源於*Pyrococcus horikoshii*之RNaseHII（Pho RNaseHII）以國際公開第02/22831號手冊記載之方法配製，與來源於*Thermus thermophilus*之RNaseHI（Tth RNaseHI，東洋紡公司製）配合，比較使用上述基質時之切斷速度。

於將FAM最大激勵波長495 nm附近之波長用於含探針W1、探針W2、探針W3之溶液之情形，被各基質5'端修飾之FAM雖然發出最大波長519 nm之螢光，但是其螢光因與被3'端修飾之DABCYL之間引起之螢光共振能量轉移（Fluorescence resonance energy transfer, FRET）而衰減。基質因RNaseH而接受切斷之情形下，因FRET被削減，519 nm之螢光強度增大。故，藉由測定基質接受切斷前與被切斷後之519 nm之螢光強度差，可監測基質之分解。

於基質濃度對於酶濃度為足夠之情形，酶反應產物量與時間成比例增大。使用對於酶量足夠過剩量之基質，藉由519 nm之螢光強度之測定監測其分解速度時，反應初期之每單位時間之螢光強度上昇，可以線性式近似。該近似直

線之趨勢，成為平均時間之螢光強度上昇((螢光強度)/(分))。又，螢光強度上昇達到平台期，假定進一步螢光強度達到最大時，反應系中之基質完全分解，(最大之螢光強度)-(分解前之螢光強度)成為基質平均分解量之螢光強度上昇值。可從該值與平均時間之螢光強度上昇((螢光強度)/(分))，求出反應速度 v ((基質分解量)/(分))。

向終濃度分別為 32 mM Hepes-氫氧化鉀緩衝液(pH 7.8)、100 mM 醋酸鉀、1% DMSO、0.05% BSA、4 mM 醋酸鎂、0.2 μ M 基質 DNA-RNA-DNA、1 μ M 模板 W49 (序列編號 16)之活性測定溶液中分別以終濃度為 0.4 單位/ml、0.8 單位/ml、1.6 單位/ml、2.4 單位/ml 添加 Apr RNaseH。於 RNaseH 之反應與螢光強度之測定，使用 Takara Bio. 公司製實時 PCR 測定裝置 SmartCycler，於 55°C 使其反應 100 分鐘，求出反應速度 v ((基質分解量)/(分))。再者，針對 Apr RNaseH 之濃度，將反應速度 v ((基質分解量)/(分))製圖，製成定量曲線，由其趨勢求出酶平均單位之反應速度 ((基質分解量)/(分·單位))。又，對於 Pfu RNaseHII、Pho RNaseHII、Tth RNaseHI 亦以同樣方法進行活性測定，求出酶平均單位之反應速度((基質分解量)/(分·單位))。關於 Tth RNaseHI，向活性測定溶液中分別添加終濃度為 10 單位/ml、20 單位/ml、30 單位/ml、40 單位/ml 之 Tth RNaseHI。

將各酶之對於探針 W1、探針 W2、探針 W3 之酶平均單位之反應速度示於表 2。表中之數值表示 pmol/(分·單位)。

又，將以對於探針 W3 之酶平均單位之反應速度作為 100%

之情形之相對反應速度示於括號內。與其他RNaseH相比，Apr RNaseH於RNA數為任一之情形，切斷速度均大，對於RNA為2個之基質之切斷速度最大。對於RNA為1個或2個之基質之切斷速度，表示出與切斷RNA為3個之基質之速度之相近值。

表 2

	探針W1 (RNA=1)	探針W2 (RNA=2)	探針W3 (RNA=3)
Apr RNaseHII	17.0 (61.6)	41.1 (148.9)	27.6 (100)
Pfu RNaseHII	3.3 (34.8)	5.3 (55.9)	9.5 (100)
Pho RNaseHII	2.7 (55.6)	3.2 (67.8)	4.8 (100)
Tth RNaseHI	0.0 (0)	0.0 (2.2)	1.4 (100)

如上，切斷速度不易被RNA長度影響之Apr RNaseH，表示出對核酸擴增反應、核酸檢出反應有用。

【產業上利用之可能性】

藉由本發明，具於基因工程利用價值高的RNaseH活性之多肽，編碼該多肽之基因及該多肽之基因工程製造方法被提供。又，本發明之RNaseH具耐熱性，對工業有利之RNaseH之製造方法亦被提供。

藉由本發明，於各種用途使用本發明之RNaseH成為可能。

【圖式簡單說明】

圖1係表示本發明之RNaseH之耐熱性之圖。

序列表 free text

SEQ ID NO : 3 : 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之 PCR 引子 RN-F1

SEQ ID NO : 4 : 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之 PCR 引子 RN-R2

SEQ ID NO : 5 : 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之 PCR 引子 AprRN-1

SEQ ID NO : 6 : 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之 PCR 引子 AprRN-2

SEQ ID NO : 7 : 標籤序列

SEQ ID NO : 8 : 從 Archaeoglobus Profundus 擴增一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之 PCR 引子 AprNde

SEQ ID NO : 9 : 從 Archaeoglobus Profundus 擴增一編碼具 RNaseHIII 活性之多肽基因用之 PCR 引子 AprBam

SEQ ID NO : 11 : 擴增一部分 B 型肝炎病毒 X 蛋白質之嵌合寡聚核苷酸引子。"第 18-20 核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

SEQ ID NO : 12 : 擴增一部分 B 型肝炎病毒 X 蛋白質之嵌合寡聚核苷酸引子。"第 20-22 核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

SEQ ID NO : 13 : 設計為探針 W1 之嵌合寡聚核苷酸。
"第 9 核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

SEQ ID NO : 14 : 設計為探針 W2 之嵌合寡聚核苷酸。
"第 9-10 核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

酸"

SEQ ID NO : 15 : 設計為探針W3之嵌合寡聚核苷酸。

"第9-11核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

SEQ ID NO : 16 : 設計為模板W49之寡聚核苷酸。

<110> 寶生物股份有限公司

<120> 耐熱性核糖核酸酶H

<130>

<140> 092123972

<141> 2003-08-29

<150> JP 2002-254153

<151> 2002-08-30

<160> 16

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> Archaeoglobus profundus

<400> 9

Met	Ile	Ala	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala	Gly	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gly
1				5					10					15
Pro	Leu	Val	Ile	Cys	Gly	Val	Leu	Cys	Asp	Glu	Glu	Thr	Val	Glu
				20					25					30
Tyr	Leu	Lys	Ser	Val	Gly	Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp	Arg
				35					40					45
Arg	Lys	Arg	Glu	Glu	Leu	Tyr	Asn	Ile	Ile	Lys	Ser	Leu	Cys	Lys
				50					55					60
Val	Lys	Val	Leu	Lys	Ile	Ser	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Arg	Leu	Met
				65					70					75

Glu Tyr Met Ser Ile Asn Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Val Glu
 80 85 90
 Ile Ile Arg Ser Leu Met Pro Lys Val Val Tyr Ile Asp Cys Pro
 95 100 105
 Asp Ile Asn Val Glu Arg Phe Lys His Glu Ile Glu Glu Arg Thr
 110 115 120
 Gly Val Glu Val Phe Ala Ser His Lys Ala Asp Glu Ile Tyr Pro
 125 130 135
 Ile Val Ser Ile Ala Ser Ile Val Ala Lys Val Glu Arg Asp Phe
 140 145 150
 Glu Ile Asp Lys Leu Lys Lys Ile Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly
 155 160 165
 Tyr Pro Ser Asp Leu Arg Thr Ile Glu Phe Leu Arg Ser Tyr Leu
 170 175 180
 Arg Glu His Lys Ser Phe Pro Pro Ile Val Arg Lys Arg Trp Lys
 185 190 195
 Thr Leu Lys Arg Leu Thr Thr His Thr Leu Ser Asp Phe Phe Glu
 200 205 210

Val

211

<210> 2

<211> 636

<212> DNA

<213> *Archaeoglobus profundus*

<400> 2

atgattgctg ggatagacga agctggaaaa ggacctgtaa taggccctct tgtaatatgc 60
 ggagtactgt gcgatgaaga gaccgtagaa tacttgaaga gcgtagcgt taaagattca 120

aagaagctgg ataggaggaa gagagaggaa ctttacaata tcataaaatc gctttgcaag 180
 gttaaggat tgaaaatata tgcgaggat ttgaacaggt taatggaata catgagtata 240
 aatgaaatct tgaagagagc ttacgttgaa ataataaggt ctttgatgcc taaagttgtg 300
 tacatagact gtccagatat taatgtggag agatttaagc acgaaataga ggagagaacg 360
 ggagtggagg tatttgcgag ccataaagcg gacgagatat atccaatagt atctatagct 420
 tcgatagtcg caaaagttga aagggatttt gaaatagaca agctgaagaa gatttatgga 480
 gactttggga gtggatatcc atcagatcta agaaccatcg aatttttaag gagttatcta 540
 agggaacaca aaagttttcc accaatcgta agaaagagat ggaaaactct caaaagattg 600
 acaacgcaca ctttaagcga tttctttgaa gtttag 636

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之 PCR 引子 RN-F1

<400> 3

ggcattgatg aggctggnar rgg 23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活

性之多肽基因用之PCR引子RN-R2

<400> 4

ggtagggaaa gctgraancg

20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之PCR引子 AprRN-1

<400> 5

ctcttcatcg cacagtactc cg

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 從 Archaeoglobus Profundus 選殖一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之PCR引子 AprRN-2

<400> 6

tttgcgagcc ataaagcgga cg

22

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 標籤序列

<400> 7

ggcacgattc gataacg

17

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 從 Archaeoglobus Profundus 擴增一編碼具 RNaseH 活性之多肽基因用之 PCR 引子 AprNde

<400> 8

aatcgatggt gttcatatga ttgctgggat agacgaagc 39

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 從 Archaeoglobus Profundus 擴增一編碼具 RNaseHIII
 活性之多肽基因用之 PCR 引子 AprBam

<400> 9

gcccacgcc tgggatccct aggctacggg tcctttaag 39

<210> 10

<211> 560

<212> DNA

<213> B型肝炎病毒

<400> 10

ccttcccatg gctgctggg tgtgctgcca actggatcct gcgcgggacg tcctttgtct 60
 agtcccgtc ggcgtgaat cccgcggacg acccgtctcg gggccgtttg ggcctctacc 120
 gtcccttgtt ttctctgccg ttccagccga ccacggggcg cacctctctt tacgcggtct 180
 ccccgctgtg gccttctcat ctgccggacc gtgtgcactt cgcttcacct ctgcacgtcg 240
 catggagacc accgtgaacg gccaccaggt cttgcccag ctcttacata agaggactct 300
 tggactctca gcaatgtcaa caaccgacct tgaggcatac ttcaaagact gtttgtttaa 360
 agactgggag gagttggggg aggagattag gttaaaggtc tttgtactag gaggctgtag 420
 gcataaattg gtctgttcac cagcaccatg caactttttc acctctgect aatcatctca 480
 tgttcatgtc ctactgttca agcctccaag ctgtgccttg ggtggctttg gggcatggac 540
 attgaccctg ataaagaatt

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 擴增一部分B型肝炎病毒X蛋白質之嵌合寡聚核苷酸引子。"第18-20核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

<400> 11

ctcttgact ctcagcaaug

20

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 擴增一部分B型肝炎病毒X蛋白質之嵌合寡聚核苷酸引子。"第20-22核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

<400> 12

tcctcccagt ctttaacac ac

22

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 設計為探針W1之嵌合寡聚核苷酸。"第9核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

<400> 13

cctacgccac cagctccaac

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 設計為探針W2之嵌合寡聚核苷酸。"第9-10核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

<400> 14

cctacgccac cagctccaac

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 設計為探針W3之嵌合寡聚核苷酸。"第9-11核苷酸為核糖核苷酸，其他核苷酸為脫氧核糖核苷酸"

<400> 15

cctacgccac cagctccaac

20

<210> 16

<211> 49

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 設計為模板 W49 之寡聚核苷酸。

<400> 16

ataaacttgt ggtagttgga gctggtggcg taggcaagag tgccttgac

49

伍、中文發明摘要：

本發明係關於一種基因工程利用價值高之具有RNaseH活性之多肽、一種編碼該多肽之基因及一種該多肽之基因工程製造方法。

陸、日文發明摘要：

遺伝子工学において利用価値の高いRNaseH活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする遺伝子ならびに該ポリペプチドの遺伝子工学的製造方法。

拾壹、圖式：

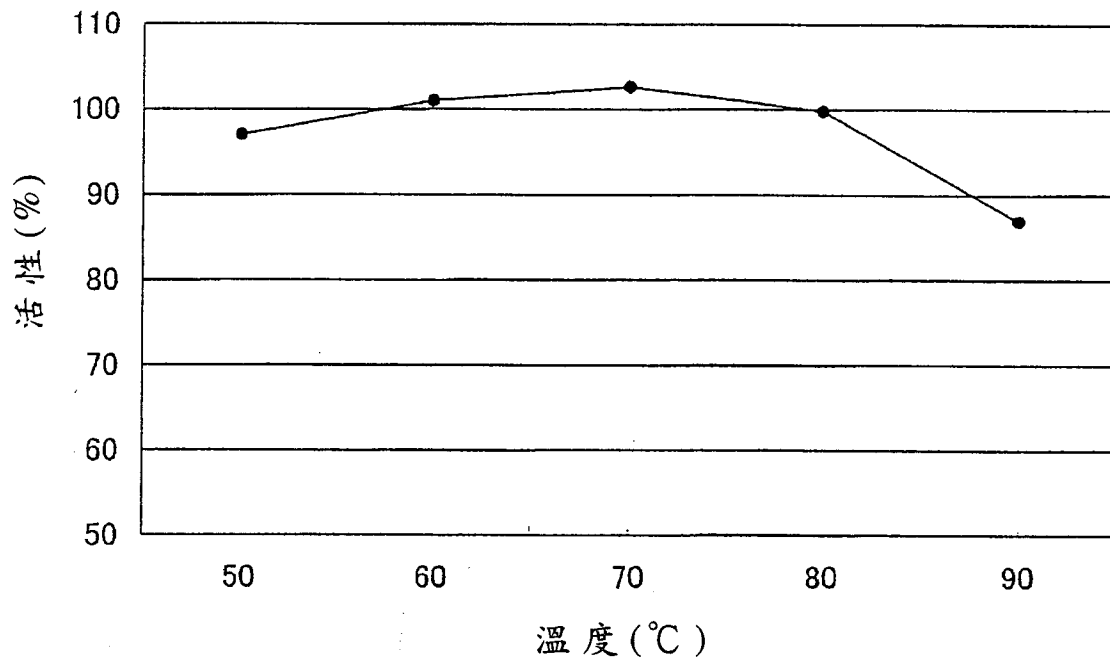


圖 1

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無元件代表符號)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

98. 4. -6
年 月 日修(更)正符號

(f)可與上述(a)-(d)中任一項之核酸或其互補鏈於苛刻條件下雜交之核酸；

(g)具與序列表之序列編號2之鹼基序列至少61%同源性的鹼基序列之核酸。

本發明之第3發明係關於一種重組DNA，其特徵在於包含第2發明之核酸而成者。

本發明之第4發明係關於一種轉形體，其特徵在於由第3發明之重組DNA轉形而成者。

本發明之第5發明係關於一種製造方法，其係用於具耐熱性核糖核酸酶H活性之多肽，其特徵在於包含培養第4發明之轉形體之步驟，及自該培養物中提取具耐熱性核糖核酸酶H活性之多肽的步驟。

第6發明係關於一種多肽，其係培養轉入質體pApr108之轉形體而得到，具耐熱性核糖核酸酶H活性。另，具該質體之大腸桿菌株，基於布達佩斯條約，於2002年8月20日(原寄存日)以FERM BP-8433之寄存編號，被寄存於日本國茨城縣築波市東1丁目1番地1中央第6(郵政編碼305-8566)，獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心。

【實施方式】

以下，關於本發明具體說明。

於本發明說明，所謂RNaseH，稱為具只將DNA/RNA雜交的RNA鏈進行特異性內切之基質特異性之水解酶，將生成之寡聚合物如於5'末端有磷酸基、於3'末端有羥基那樣切斷者。

30 $\mu\text{g/ml}$ 多聚(rA) (Amersham Pharmacia Biotech公司製)]
100 μl ，使其於40°C反應10分鐘後，以0.5M EDTA (pH 8.0)
10 μl 停止反應，藉由測定260 nm之吸光度，亦可測定本發明之耐熱性RNaseH活性。

RNaseH之1個單位(unit)，係將相當於1 nmol核苷酸游離之 A_{260} 作為10分鐘增加之酶量，可根據下式算出。

$$\text{單位 (unit)} = [\text{吸光度差} \times \text{反應液量 (ml)}] / 0.0152$$

作為本發明之多肽，被列舉為具示於序列表之序列編號1之胺基酸序列之多肽。又，本發明僅限於具耐熱性RNaseH活性，包含以示於序列表之序列編號1的胺基酸序列中1個以上胺基酸殘基缺失，添加，插入或取代之至少1種形成的胺基酸序列所表示的多肽。

即，對於天然存在之多肽，除編碼其之DNA的多型性及突變外，藉由產生後多肽之活體內及純化中的修飾反應等，可引起其胺基酸序列中胺基酸缺失，插入，添加，取代等突變。但是，該等突變存在於對該多肽之活性及構造的保持非重要部分之情形下，與無突變之多肽具實質上同等的生理，生物學活性者為所知。

人為地向多肽之胺基酸序列轉入如上述之突變之情形亦同樣，於該情形下進一步製作多種多樣的突變體成為可能。例如已知將人介白素2 (IL-2)胺基酸序列中某半胱胺酸殘基取代為絲胺酸之多肽保持介白素2的活性[科學 (Science)，第224卷，1431頁(1984)]。

又，已知某種多肽，具活性非必需之肽段。例如，存在

於被分泌到細胞外之多肽中之信號肽、蛋白酶之前驅物等中所見之原(pro)序列或前原(pre·pro)序列等相當於此，該等區間幾乎全部於轉譯後，或向活性型多肽轉換之際被去除。如此之多肽即使於一級構造上以不同形式存在，最終為表現同等功能之多肽。

具記載於序列表之序列編號1的胺基酸序列之多肽係被藉由本發明被單離之基因編碼，該基因係示於序列表之序列編號2之鹼基序列，該多肽具耐熱性RNaseH活性。還有，即使為活性非必須之肽段被刪除之多肽，亦包含於本申請書之多肽中。

於基因工程上進行多肽生產之情形下，有向目的多肽之胺基末端或羥基末端添加與該多肽活性無關之肽鏈者。例如，為提高目的多肽之表現量，有製作將被使用之宿主中高表現之多肽的胺基末端區間的一部分添加至目的多肽的胺基末端之融合多肽者。或，為使被表現之多肽之純化變為容易，亦進行將對特定物質具親和性之多肽添加至目的多肽之胺基末端或羥基末端。該等被添加之肽，於對目的多肽活性非帶來惡劣影響之情形下，保持添加狀態亦可；又，如果有必要，亦可進行適當處理，例如，藉由蛋白酶所致之限制性分解等可從目的多肽去除。

故，即使為藉由本發明被揭示之胺基酸序列(序列編號1)中，1個以上之胺基酸殘基缺失、插入、添加或取代所生成之胺基酸序列所表示之肽，只要具耐熱性RNaseH活性，即為屬於本發明範圍內者。

又，具與於本發明被揭示之胺基酸序列(序列編號1)至少54%，60%為佳，70%更佳，85%較佳，之同源性的胺基酸序列之多肽，只要具耐熱性RNaseH活性，即為屬於本發明範圍內者。

上述同源性，例如可藉由Computer Program DNASIS-Mac (Takara Bio.公司製)、Computer Algorithm FASTA (version 3.0; Pearson, W. R.等, Pro. Natl. Acad. Sci., 85: 2444-2448, 1988)、Computer Algorithm BLAST (version 2.0; Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997)測定。

例如，具上述胺基酸序列之同源性，與來源於Archaeoglobus profundus之核糖核酸酶H(序列表之序列編號1)至少54%之胺基酸序列之多肽，只要具耐熱性RNaseH活性，即為屬於本發明範圍內者。

本發明之多肽，例如可藉由(1)從產生本發明之多肽的微生物培養物之純化；(2)從含有編碼本發明之多肽的核酸之轉形體培養物之純化；等方法製造。

(1) 從產生本發明之多肽的微生物培養物之純化

作為產生本發明之多肽的微生物，例如為購於(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)之可能(Archaeoglobus profundus, DSM5631)等可被列舉。微生物之培養，只要於適於該微生物生育之條件下進行即可，使用使目的多肽之表現量變高之培養條件為佳。如此菌體或培養液中產生之目的多肽，可藉由用於通常蛋白質

純化之方法純化。

關於上述菌株之培養，通常可利用用於耐熱菌培養之方法，加入培基之營養素只要為該菌株可利用者即可。作為炭源，例如可利用澱粉等；作為氮源，例如可利用胰化蛋白、蛋白胨、酵母萃取物等。培基中，作為微量元素添加鎂鹽、鈉鹽、鐵鹽等金屬鹽亦可。又，例如，於海洋性耐熱菌之情形，於培基之配製使用人工海水為有利。

培養雖可進行靜置培養或攪拌培養，例如如應用與環境微生物學(Applied and Environmental Microbiology)，第55卷，第2086-2088頁(1992)記載，使用透析培養法亦可。培養條件及培養時間，根據使用之菌株，培基成分，以多肽生產量為最大而設定為佳。

關於提取多肽，首先，配製無細胞抽出液。無細胞抽出液，例如可藉由從培養液藉由離心分離，濾過等收集菌體，接著破碎菌體來配製。作為菌體的破碎方法，從超音波破碎，粒子破碎，溶菌酶處理等中選擇目的酶抽出效果最高的方法即可。又，於該多肽被分泌到培養液上清之情形，藉由硫酸胺鹽析法及超濾過法等將培養液上清中之多肽濃縮，以此作為無細胞抽出液。對於從如此得到之無細胞抽出液中單離多肽，可使用用於通常蛋白質純化之方法。例如可將硫酸胺鹽析處理、離子交換色譜、疏水色譜、凝膠濾過色譜等方法組合使用。

(2) 從藉由含編碼本發明之多肽的核酸之重組DNA轉形之轉形體培養物之純化

編碼本發明之多肽的核酸，例如可藉由重組DNA轉形之轉形體獲得本發明之多肽，其中重組DNA係含具示於序列表之序列編號2的鹼基序列之核酸。從示於序列編號2之鹼基序列產生示於序列編號1之胺基酸序列之多肽。

再者，亦可從培養轉入本發明之質體pApr 108之轉形體而得到之培養物純化本發明之多肽。

被轉形之宿主無特別限定，例如可列舉為大腸桿菌，枯草桿菌，酵母，絲狀桿菌，植物，動物，植物培養細胞，動物培養細胞等重組DNA領域中通常被使用之宿主。

例如，本發明之多肽可藉由下述條件，使其於培養菌體中表現：將持有於lac啟動子及T7噬菌體啟動子下游連結本發明之核酸的質體之大腸桿菌，於通常之培養條件，例如，含100 $\mu\text{g/ml}$ 胺卡青黴素之LB培养基(胰化蛋白10 g/l，酵母萃取物5 g/l，NaCl 5 g/l，pH 7.2)中，於37°C培養至對數生長期後，添加異丙基- β -D-硫乳吡喃糖至1 mM，藉由繼續於37°C培養，可使多肽表現於培養菌體中。

培養結束後，以超音波破碎藉由離心分離收集之菌體，繼續離心分離，收集上清，作為無細胞抽出液。該無細胞抽出液具耐熱性RNaseH活性。再者，藉由使用離子變換色譜、凝膠濾過、疏水色譜、硫酸銨沈澱等眾所週知之方法，可從該無細胞抽出液純化本發明之多肽。於上述純化過程中得到之部分純化品，當然亦具RNaseH活性。另，因於持有連結本發明之核酸的質體之大腸桿菌表現之本發明的多肽，具耐熱性，作為純化手段，對於培養菌體及/或無細

又，於寡聚核苷酸探針或引子之鏈長比18個鹼基短之情形， T_m 可藉由例如A+T(腺嘌呤+胸腺嘧啶)殘基含量與 2°C 之積，與G+C殘基含量與 4°C 之積的和 $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4]$ 推算。

於本發明，與編碼本發明之多肽的核酸於苛刻條件下可能雜交之核酸，即使與揭示於本發明說明之鹼基序列非同一鹼基序列，如上所述，只要其編碼具耐熱性RNaseH活性之多肽，即為包含於本發明之範圍內者。

即，已知於基因上指定胺基酸之密碼子(3個鹼基之組合)於每種胺基酸各存在1~6種。故，編碼某胺基酸序列之核酸，根據其胺基酸序列亦可存在多數。核酸於自然界絕非穩定存在者，於其鹼基序列引起突變者非少見。於核酸上引起之突變亦有不給被編碼之胺基酸序列帶來變化之情形(被稱為沉默突變)，可以說於此情形，產生編碼相同胺基酸序列之不同核酸。故，編碼某特定胺基酸序列之核酸即使被單離，亦不能否定於含有其之生物在傳代過程中，編碼相同胺基酸序列之多種核酸產生的可能性。再者，人為地製作編碼相同胺基酸序列之多種核酸，只要使用各種基因工程方法，並非難事。

例如，於基因工程蛋白質之生產，於編碼目的蛋白質之原核酸上被使用之密碼子，為宿主中使用頻率低者之情形下，有蛋白質表現量低之事。於如此之情形，並非給被編碼之胺基酸序列帶來變化，而是藉由將密碼子人為地變換成於宿主中被頻繁使用者，可謀求目的蛋白質之高表現(例

上述反應液中添加0.5M EDTA 10 μ l後，使其於40°C反應10分鐘，測定吸光度。其後，求出自於EDTA非添加使其反應求得之吸光度減去對照之吸光度的值(吸光度差)。即，自吸光度差求出藉由酶反應自多聚(rA)-多聚(dT)雜交游離之核苷酸的濃度。RNaseH之1個單位，係將相當於1 nmol核苷酸游離之A₂₆₀作為10分鐘之增加之酶量，根據下式算出。另，於將酶液稀釋之情形下，將下式之值以稀釋率補正。

$$\text{單位}(\text{unit}) = [\text{吸光度差} \times \text{反應液量}(\text{ml})] / 0.0152$$

其結果，於Apr RNaseH熱處理上清液中確認有RNaseH活性。

(7) 純化RNaseH標準品之配製

以於實施例1-(4)得到之pApr108將大腸桿菌BL21 (DE3)轉形，將含得到之pApr108之大腸桿菌BL21 (DE3)植於含100 μ g/ml胺苄青黴素之400 ml之LB培养基，於37°C振盪培養17小時。培養結束後，將藉由離心分離收集之菌體懸浮於500 ml緩衝液A [20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、2 mM PMSF (phenylmethanesulphonyl fluoride)、10 mM 2-巰基乙醇]，以超音波破碎機處理。將該破碎液於14000 rpm進行30分鐘之離心分離，將得到之上清於70°C進行15分鐘之熱處理。其後，再次於14000 rpm進行30分鐘之離心分離，收集上清，得到400 ml熱處理上清液。

將該熱處理上清液供於以緩衝液A平衡過之DE52陰離子交換柱(Whatman公司製)，以緩衝液A洗淨。其結果，

拾、申請專利範圍：

1. 一種經單離之多肽，其特徵在於選自下述之群，且具耐熱性核糖核酸酶H活性：
 - (a)具序列表之序列編號1之胺基酸序列之多肽；
 - (b)可與具序列表之序列編號2所示之鹼基序列之核酸或其互補鏈於苛刻條件下雜交之核酸所編碼之多肽；
 - (c)具與序列表之序列編號1之胺基酸序列至少85%同源之胺基酸序列之多肽。
2. 一種經單離之核酸，其係選自下述之群，且編碼具耐熱性核糖核酸酶H活性之多肽：
 - (a)編碼具於序列表之序列編號1之胺基酸序列之多肽之核酸；
 - (b)具序列表之序列編號2之鹼基序列之核酸；
 - (c)可與具序列表之序列編號2所示之鹼基序列之核酸或其互補鏈於苛刻條件下雜交之核酸；
 - (d)具與序列表之序列編號2之鹼基序列至少90%同源性的鹼基序列之核酸。
3. 一種重組DNA，其係包含申請專利範圍第2項之核酸而成者。
4. 一種轉形體，其係藉由申請專利範圍第3項之重組DNA轉形而成者。
5. 一種製造具耐熱性核糖核酸酶H活性之多肽之方法，其特徵在於包含培養申請專利範圍第4項轉形體之步驟，及自該培養物中提取具耐熱性核糖核酸酶H活性之多肽之步驟。