

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4005637号

(P4005637)

(45) 発行日 平成19年11月7日(2007. 11. 7)

(24) 登録日 平成19年8月31日(2007. 8. 31)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 1/16 (2006. 01)

C O 7 K 1/16

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/12 (2006. 01)

C 1 2 N 9/12

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z

請求項の数 6 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願平10-516242  
 (86) (22) 出願日 平成9年10月1日(1997. 10. 1)  
 (65) 公表番号 特表2001-502170 (P2001-502170A)  
 (43) 公表日 平成13年2月20日(2001. 2. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1997/005391  
 (87) 国際公開番号 W01998/014589  
 (87) 国際公開日 平成10年4月9日(1998. 4. 9)  
 審査請求日 平成16年8月27日(2004. 8. 27)  
 (31) 優先権主張番号 96115873.0  
 (32) 優先日 平成8年10月3日(1996. 10. 3)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者  
 ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエ  
 ムペーハー  
 ドイツ連邦共和国 ディー—68298  
 マンハイム、(番地なし)  
 (74) 代理人  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人  
 弁理士 石井 貞次  
 (72) 発明者  
 アンケンバウアー、ウルトラウド  
 ドイツ連邦共和国 ディー—82377  
 ベンツベルク、オペランガー 18  
 (72) 発明者  
 マルカウ、ウルスーラ  
 ドイツ連邦共和国 ディー—82398  
 ポーリング、ハンゲルヴィエセ 1  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス由来の熱安定DNAポリメラーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含んでなる単離されたDNAポリメラーゼ。

【請求項 2】

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンスから取得可能な請求項 1 に記載のポリメラーゼをコードする、配列番号 7 に示された式によって表される単離されたDNA。

【請求項 3】

請求項 2 に記載された単離されたDNAを含むベクター。

【請求項 4】

(a) 天然株カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンスを培養する工程、(b) 天然株の細胞を緩衝液に懸濁する工程、(c) 細胞を破壊する工程、(d) 1 以上のセファロースカラムの使用を含むクロマトグラフィー工程によってDNAポリメラーゼを精製する工程を含む、請求項 1 に記載のDNAポリメラーゼの調製方法。

【請求項 5】

請求項 3 に記載のベクターで形質転換された組換え体E.coli株を増殖させ、DNAポリメラーゼを精製し、単離する工程を含む、請求項 1 に記載のDNAポリメラーゼの調製方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリメラーゼを使用することを特徴とする、DNAの増幅方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ (Carboxydotherrnus hydrogenoformans) から取得可能なDNAポリメラーゼである熱安定酵素に関する。さらに、本発明は、分子生物の分野に関し、デオキシリボ核酸 (DNA) およびリボ核酸 (RNA) 配列の複製および増幅のための改良方法を提供する。好ましい実施態様においては、本発明は、熱反応性DNAポリメラーゼを用いてRNA型から相補的DNAコピーを合成する方法を提供する。別の態様においては、本発明は、熱安定DNAポリメラーゼを用いてRNAまたはDNA鋳型からDNAセグメントを増幅する方法 (RT-PCRまたはPCR) を提供する。

熱安定DNAポリメラーゼ (EC2.7.7.7. DNAヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNA特異的) は、多数の好熱性生物から単離されている (例えば、Kaledinら (1980) Biokimiya 45, 644-651; Kaledinら (1981) Biokimiya 46, 1247-1254; Kaledinら (1982) Biokimiya 47, 1515-1521; Ruttimannら (1985) Eur. J. Biochem. 149, 41-46; Neunerら (1990) Arch. Microbiol. 153, 205-207)。いくつかの生物に関しては、そのポリメラーゼ遺伝子がクローニングされており、発現されている (Lawyerら (1989) J. Biol. Chem. 264, 6427-6437; Engelkeら (1990) Anal. Biochem. 191, 396-400; Lundbergら (1991) Gene 108, 1-6; Perlerら (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5577)。

好熱性DNAポリメラーゼは、ますます分子生物学における使用のための重要なツールになってきており、RNAおよびDNAの診断的検出、遺伝子クローニングならびにDNA配列決定における使用により適した特性および活性を有する新規ポリメラーゼの発見に関心が高まりつつある。現在のところ、これらの目的のために主として用いられている好熱性DNAポリメラーゼは、T. アクアティカス (T. aquaticus) 由来のTaqポリメラーゼのようなテルムス (Thermus) 種由来のものである (Brockら (1969) J. Bacteriol. 98, 289-297)。

逆転写は、通常、鳥類骨髄芽球細胞症ウイルスまたはモロニーマウス白血病ウイルスから単離された酵素のようなウイルス逆転写酵素を用いて行なわれる。これらの酵素は、マグネシウムイオンの存在下で活性であるが、RNAアーゼH-活性を有するという欠点を有する。この活性は、逆転写反応中に鋳型RNAを破壊し、それぞれ42 または37 に最適な温度を有する。

高温で活性な好熱性生物のDNAポリメラーゼの逆転写酵素活性を用いる代替の方法が記載されている。高温での逆転写は、産物の早期終結が生じ得るRNA鋳型の二次構造に打ち勝つという利点を有する。逆転写酵素活性を有する熱安定DNAポリメラーゼは、通常、テルムス種から単離される。しかしながら、これらのDNAポリメラーゼは、マンガニオンの存在下においてのみ逆転写酵素活性を示す。マンガニオンの存在下ではポリメラーゼは低い忠実度で鋳型RNAをコピーするので、これらの反応条件は最適状態に及ばない。

通常用いられている逆転写酵素の別の特性は、それらが3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を含まないということである。したがって、誤って取り込まれたヌクレオチドを除去することができず、よって鋳型RNA由来のcDNAコピーは有意な程度の突然変異を含み得る。

したがって、

- ・高温で作用して鋳型の二次構造に打ち勝ち、反応の早期終結を回避し、欠失なしにcDNAを産生させ、
- ・高い忠実度でRNA鋳型からcDNAを調製するためにマグネシウムイオンの存在下で活性であり、そして
- ・誤って取り込まれたヌクレオチドをDNA合成の継続前に除去し、突然変異の頻度の低い産物を産生するために3'-5'エキソヌクレアーゼを有する

逆転写酵素を開発することが望まれている。

本発明はこれらの要求に取り組むものであり、マグネシウムイオンの存在下で逆転写酵素活性を有し、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する高温で活性な熱安定DNAポリメラーゼを提供する。

10

20

30

40

50

本発明の目的は、マグネシウムイオンの存在下、ならびにマンガンイオンの存在下で逆転写酵素活性を有することを特徴とする、ポリメラーゼ酵素 (EC2.7.7.7.) を提供することである。別の態様においては、本発明は、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, DSM No.8979) から単離されたDNAポリメラーゼを含む。さらなる態様においては、本発明は、マグネシウムイオンの存在下および実質的にマンガンイオンの不存在下で逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼを含む。さらなる態様においては、本発明は、in situ PAGE 分析によって測定された場合、約100~105kDaの分子量を有するDNAポリメラーゼを含む。さらなる態様においては、本発明は、熱安定性の逆転写酵素を含む。さらなる態様においては、本発明は、3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含む。さらなる態様においては、本発明は、微生物カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズのDNAポリメラーゼ活性をコードする組換えDNA配列を含む。関連した態様においては、DNA配列は、配列番号7に示される。第2の関連した態様においては、本発明は、本質的にアミノ酸残基1~831をコードする組換えDNA配列を含む。さらなる態様においては、本発明は、プラスミドベクターに挿入された本発明のDNA配列を含む組換えDNAプラスミドを含み、その組換えDNAプラスミドを用いることによってそのプラスミドで形質転換された宿主細胞中にカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズの熱安定DNAポリメラーゼの発現を誘導することができる。さらなる態様においては、本発明は、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズDNAポリメラーゼ遺伝子を有するpAR4と呼ばれるベクターpDS56を含む組換え株を含む。プラスミドpAR4を有するE.coli株 (BL21 (DE3) pUBS520) はDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig (DSM No.11179) に寄託され、AR96と呼ばれている。

その中に選択肢を提供しないリストにしたがって「実質的にまたは實際上」一連のアミノ酸から構成されるようなペプチド鎖に言及する場合、その参照の中に、本発明者らは、そのペプチド鎖からなるタンパク質の全体的な構造および全体的な機能が、非置換バージョンのものと実質的に同じか、または検出不能なくらいの違いであるような様式で1以上のアミノ酸に対してなされる置換を有するペプチド鎖のあらゆるバージョンを含むものである。例えば、一般的に、特に、変更される部位が折りたたまれたタンパク質の形態学に重要でない位置である場合、タンパク質の特性を大きく変更することなくアラニンとバリンを交換することが可能である。

DNAポリメラーゼが「熱安定な」とは、熱に対して安定であり、高温、特にDNA鎖の変性に用いられる高温で選択的に活性であることを意味する。より詳しくは、熱安定DNAポリメラーゼは、ポリメラーゼ連鎖反応に用いられる高温で実質的に不活性化されない。

「逆転写酵素」という用語は、RNA依存性DNAポリメラーゼと特性付けられるポリメラーゼのクラスを意味する。公知の逆転写酵素はすべて、RNA鋳型からのDNA転写物の合成にプライマーを必要とする。歴史的に、逆転写酵素は、主にmRNAを、その後さらなる操作のためのベクターにクローニングされ得るcDNAに転写することに用いられている。

その他の定義付けは、当技術分野と一致した様式で用いられる。

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズは、V.Svetlichnyによってカムチャッカの温泉から単離された。C.ヒドロゲノホルマンズの試料は、ブダペスト条約の約定の下にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) に寄託しており、受託番号DSM 8979を得ている。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズから単離された熱安定ポリメラーゼは、100~105kDaの分子量を有し、95℃で30分間加熱した後、その初期活性の60%以上を保持する。熱安定酵素は、5'-3'ポリメラーゼ活性、3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性、5'-3'-エキソヌクレアーゼ活性およびMg<sup>++</sup>依存性の逆転写酵素活性を有する。本発明のポリメラーゼは、マグネシウムイオンの存在下およびマンガンイオンの実質的に不存在下で逆転写酵素活性を有する。熱安定酵素は、天然でも組換え型のもの

10

20

30

40

50

でもよく、cDNAクローニング、DNA配列決定、DNA標識およびDNA増幅における第1および第2鎖cDNA合成に用いられる得る。

天然タンパク質を回収するために、Svetlichnyら(1991) System. Appl. Microbiol., 14, 205-208に記載された技術などの適当な技術を用いてC.ヒドロゲノホルムスを増殖させることができる。細胞増殖後の酵素の単離および精製のための一つの好ましい方法は、下記の多段プロセスを用いて行われる：

細胞を解凍し、緩衝液A(40mMのトリス-HCl、pH7.5、0.1mMのEDTA、7mMの2-メルカプトエタノール、0.4MのNaCl、10mMのPefabloc)に懸濁し、Gaulinホモジナイザーを二重通過させることによって溶解する。未処理の抽出物を遠心分離によって透明にし、上清を緩衝液B(40mMのトリス-HCl、pH7.5、0.1mMのEDTA、7mMの2-メルカプトエタノール、10%のグリセロール)に対して透析し、ヘパリン-セファロース(Pharmacia)を詰め込んだカラム上にのせる。各場合において、カラムは出発溶媒で平衡化し、試料を加えた後、その3倍の容量のかかる溶媒を用いて洗浄する。第1のカラムの溶出は、緩衝液B中、0~0.5MのNaClの直線グラジエントを用いて行う。ポリメラーゼ活性を示す画分をプールし、硫酸アンモニウムを最終濃度が20%になるまで加える。この溶液をブチル-TSK-トローパー(ToSoHass)を含む疎水性カラムに加える。この時、カラムを20%から0%の硫酸アンモニウムの下降グラジエントで溶出する。活性を含むプールを透析し、再びDEAE-セファロース(Pharmacia)を含むカラムに移し、緩衝液B中、0~0.5MのNaClの直線グラジエントで溶出する。第4のカラムにはトリス-アクリル-ブルー(Bioseptra)が含まれており、前出の場合と同様に溶出する。最後に、活性画分を緩衝液C(20mMのトリス-HCl、pH7.5、0.1mMのEDTA、7.0mMの2-メルカプトエタノール、100mMのNaCl、50%グリセロール)に対して透析する。

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルムスからの組換えDNAポリメラーゼの単離は、同じプロトコルまたはその他の通常用いられている手順で行われ得る。

DNAポリメラーゼ活性は、本質的に、Holtke, H.-J., Sanger, G., Kessler, C.およびSchmitz, G.(1992) Biotechniques 12,104-113に記載された方法にしたがって、合成されたDNAへのジゴキシゲニン標識dUTPの取込み、取り込まれたジゴキシゲニンの検出および定量によって測定した。

逆転写酵素活性の測定は、反応混合物が実施例3に記載されたような成分からなること以外は、本質的に、DNAポリメラーゼ活性の測定について記載されたようにして行われる。

ポリメラーゼ活性および逆転写酵素活性のin situ PAGE分析は、本質的に、Spanos A.およびHubscher U.(1983) Methods in Enzymology 91, 263-277)によって記載された方法にしたがって行った。オリジナルの方法に対するいくつかのマイナーではあるが本質的な変更は、SDS-変性ポリペプチドの再生をマグネシウムイオン(3mM)およびdATP(0.5~1μM)の存在下で行うことにより再折りたたみを助けることである。

3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、通常、DNAポリメラーゼの「プルーフリーディング」または「編集」活性と呼ばれている。この活性は、A型ポリメラーゼの大断片の小ドメインに位置する。この活性は、ヌクレオシド三リン酸の不存在下でDNAのプライマー末端の3'末端から不適性対合したヌクレオチドを除去するものである(Kornberg A.およびBaker T.A.(1992) DNA Replication W.H.Freemann & Company, ニューヨーク)。このヌクレアーゼ作用は、デオキシヌクレオシド三リン酸が鋳型に適合し、ポリマーに取り込まれ得る場合、そのデオキシヌクレオシド三リン酸によって抑制される。

請求の範囲に記載したDNAポリメラーゼの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、デオキシリボヌクレオシド三リン酸の不存在下もしくは存在下における鋳型DNA、またはデオキシリボヌクレオシド三リン酸の不存在下もしくは存在下におけるDNA断片上にアニールした5'-ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドの分解または短縮化として測定され得る。

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルムスDNAポリメラーゼは、図1に示されているようにマンガニオン存在下よりもマグネシウムイオン存在下において高い活性を有す

10

20

30

40

50

る、好熱性真正細菌から単離された最初のDNAポリメラーゼである。DNAポリメラーゼ活性と比較して、マグネシウムの存在下における逆転写酵素活性は相対的に高い。これは、図6において、T.フィリホルミス (T. filiformis)、A.サーモフィラム (A. thermophilum) および逆転写に最も一般的に用いられているT.サーモフィラス (T. thermophilus) 由来のDNAポリメラーゼとの比較において示されている。DNAポリメラーゼはマンガンの存在下よりもマグネシウムの存在下において高い忠実度でDNAを合成する (Beckmann R.A.ら (1985) Biochemistry 24, 5810-5817; Ricchetti M.およびBuc H. (1993) EMBO J. 12, 387-396) ので、マグネシウムに依存する逆転写酵素活性は都合がよい。低忠実度DNA合成は、原鋳型の突然変異コピーを生じさせる可能性が高い。さらに、 $Mn^{2+}$ イオンは、特に高温におけるRNA分解の速度増大に関係しており、このことによって逆転写反応において短い産物の合成が引き起こされ得る。

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼのDNA配列 (配列番号7) および該酵素の誘導アミノ酸配列を図5に示す。配列から推定される分子量は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動においては94348Daであるが、図2に示されているように、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼはE.coli pol I (109kDa) よりも高く、Taqポリメラーゼ (94kDa) およびクレノウフラグメント (76kDa) よりも低い電気泳動移動度を有する。TaqおよびE.coli DNAポリメラーゼの移動特性とカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼの移動特性を比較することにより、分子量100~105kDaが推定され得る。天然株から単離されたカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼは組換え酵素と同じ移動特性を有するので、SDSゲル電気泳動中の「より遅い」移動はクローニング人工産物というよりも酵素の特性であるに違いない。この現象についての可能な説明は、好熱性生物から誘導されるこの酵素は、用いられる標準変性条件下で完全に折りたたまれている非常に安定な構造を有するというものである。

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼの組換え体の産生には、一般的に、下記の工程が含まれる：カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼ由来の染色体DNAを、細胞を界面活性剤、例えばSDS、およびプロテイナーゼ、例えばプロテイナーゼKで処理することによって単離する。溶液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノールによる沈殿によって精製する。DNAをトリス/EDTA緩衝液に溶解し、DNAポリメラーゼをコードする遺伝子をPCR技術によって2つの混合オリゴヌクレオチド (プライマー1および2) を用いて特異的に増幅する。配列番号1および配列番号2に記載されたこれらのオリゴヌクレオチドは、Braithwaite D.K.およびIto J., 1993, Nucl. Acids Res. Vol. 21, p.787-802に記載されたファミリーA DNAポリメラーゼの保存領域に基づいて設計した。特異的に増幅された断片をベクター、好ましくはpCR<sup>TM</sup> IIベクター (Invitrogen) にライゲートし、サイクル - 配列決定法 (cycle-sequencing) によって配列を決定する。DNAポリメラーゼ遺伝子のコード領域および隣接配列の完全な単離は、スクリーニングの第1ラウンドのものとは別の制限酵素によるカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼDNAの制限断片化およびインバース (inverse) PCRによって行われ得る (Innisら, (1990) PCR Protocols: Academic Press. Inc., p.219-227)。これは、遺伝子部分の外側のDNA配列に、逆方向に結合する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われ得る。配列番号3および4に記載されたこれらのオリゴヌクレオチドは、上記の第1のPCR産物の配列決定によって決定される配列に基づいて設計した。鋳型としては、制限消化によって切断され、T4 DNAリガーゼと接触することによって環化するカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスポリメラーゼDNAが用いられる。全ポリメラーゼ遺伝子のコード領域を単離するために、配列番号5および6に示されたようなプライマーを用いて別のPCRを行って、ゲノムDNAおよび線状化発現ベクターと適合する導入末端から完全DNAポリメラーゼを直接増幅する。

配列番号 1 :

プライマー 1 : 5'-CCN AAY YTN CAR AAY ATH-3'

配列番号 2 :

プライマー 2 : 5'-YTC RTC RTG NAC YTG-3'

配列番号 3 :

プライマー 3 : 5'-GGG CGA AGA CGC TAT ATT CCT GAG C-3'

配列番号 4 :

プライマー 4 : 5'-GAA GCC TTA ATT CAA TCT GGG AAT AAT C-3'

配列番号 5 :

プライマー 5 : 5'-CGA ATT CAA TCC ATG GGA AAA GTA GTC CTG GTG GAT-3'

配列番号 6 :

プライマー 6 : 5'-CGA ATT CAA GGA TCC TTA CTT CGC TTC ATA CCA GTT-3'

遺伝子は、原核または真核宿主ノベクター系における発現に適した制御配列に作動可能なように (operably) 連結される。ベクターは、好ましくは、適当な宿主における形質転換および維持に必要な全ての機能をコードするものであり、ポリメラーゼ発現に対する選択可能なマーカーおよび/または制御配列をコードし得るものである。活性な組換え熱安定ポリメラーゼは、連続的に、または発現誘導後に形質転換宿主の培養によって産生することができる。活性熱安定ポリメラーゼは、宿主細胞から、またはそのタンパク質が細胞膜を通過して分泌される場合には培養培地から回収することができる。

また、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス熱安定ポリメラーゼ発現は、E.coli において、クローニングおよび発現中に厳しく制御されることも好ましい。本発明の実施に有用なベクターは、下記の制御上の特徴：(1) ポリメラーゼ遺伝子の出発点のすぐ隣にあるか、融合タンパク質としての転写開始のプロモーターまたは部位、(2) 遺伝子発現をオンにしたりオフにしたりするのに用いることができるオペレーター、(3) 翻訳増進のためのリボソーム結合部位、ならびに(4) 安定性増進のための転写または翻訳終結部位のいくつかまたは全てを付与することによってカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンスポリメラーゼの制御発現の程度を変化させるべきである。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンスポリメラーゼのクローニングおよび発現に使用するのに適当なベクターとしては、例えば、ファージおよびプラスミドが挙げられる。ファージとしては、例えば、ラムダgt11 (Promega)、ラムダDash (Stratagene)、ラムダZap11 (Stratagene) が挙げられる。プラスミドとしては、例えば、pBR322、pBTac2 (Boehringer Mannheim)、pBluescript (Stratagene)、pSP73 (Promega)、pET3A (Rosenberg, 上記同様、(1987) Gene 56:125-135)、pASK75 (Biometra)、pDS56 (Stuber, D., Matile, H. および Garotta G. (1990) Immunological Methods, Letkovcs, I. および Pernis, B. 編) および pET11C (Studier, F.W. (1990) Methods in Enzymology, 185:60-89)。本発明によれば、プラスミド、特にpDS56の使用が都合がよいことがわかった。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンスDNAポリメラーゼ遺伝子を有するプラスミドpDS56は、pAR4と呼ばれる。

形質転換、ファージ感染および細胞培養には標準プロトコルがある (Maniatisら (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press)。プラスミド形質転換に用いることができる多数のE.coli株の中で好ましい株としては、JM 110 (ATCC47013)、LE392pUBS520 (Maniatisら, 上記同様; Brinkmannら, (1989) Gene

10

20

30

40

50

85:109-114)、JM101(ATCC No.33876)、XL1(Stratagene)、およびRR1(ATCC No.31343)、BL21(DE3)pUBS520(Brinkmann, U.ら(1989)Gene 85, 109-114)およびBL21(DE3)plysS(Studier, F.W.ら,(1990)Methods in Enzymology, 上記同様)が挙げられる。本発明によれば、E.coli株BL21(DE3)pUBS520の使用が都合がよいことがわかった。プラスミドpAR4で形質転換されたE.coli株BL21(DE3)pUBS520は、AR96(DSM No.11179)と呼ばれる。E.coli株XL1-Blue(Stratagene)およびER1458(Raleigh, E.A.ら,(1988)Nucleic Acids Research 16:1563-1575)は、ラムダファージに対して使用され得る株に含まれ、Y1089はラムダgt11溶原性に対して使用され得る。形質転換細胞は、好ましくは37で増殖させ、クローニングされた遺伝子の発現はIPTGで誘導される。

組換えDNAポリメラーゼの単離は、標準技術によって行うことができる。E.coli抽出物からのDNAポリメラーゼの分離および精製は、標準的な方法によって行うことができる。これらの方法としては、例えば、塩沈降および溶媒沈降のような溶解性を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の相違を利用する方法、イオン交換カラムクロマトグラフィーのような電荷の相違を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーのような特異的相互作用を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーのような疎水性の相違を利用する方法、ならびに等電点電気泳動のような等電点の相違を利用する方法が挙げられる。

本発明は、効率的にRNAを転写し、RNAまたはDNAを増幅するための改良方法を提供する。これらの改良は、熱活性DNAポリメラーゼについての従来知られていない特性の発見および応用によって達成される。

本発明の熱安定酵素は、かかる酵素活性が必要であるか、望まれているあらゆる目的に対して使用され得る。特に好ましい実施態様においては、酵素は、PCRとして公知の核酸増幅反応を触媒する。核酸配列を増幅するためのこの方法は、米国特許第4,683,202号に開示されており、特許請求されている。PCR核酸増幅法は、核酸または核酸の混合物に含まれる少なくとも1つの特異的核酸配列を増幅することを含み、2本鎖DNAを産生するものである。精製された状態または未精製の状態のあらゆる核酸配列は、その核酸配列が所望の特異的核酸配列を含むか、または含むと推測される場合、出発核酸として利用することができる。増幅される核酸はあらゆる起源から取得することができ、例えば、pBR322などのプラスミド、クローニングされたDNAまたはRNA、細菌、酵母、ウイルス、オルガネラ、ならびに植物および動物などの高等動物を含むあらゆる起源由来の天然DNAまたはRNA、またはin vitroで作られた核酸の調製物などから取得することができる。

DNAまたはRNAは、血液、絨毛膜絨毛などの組織材料、または羊膜細胞から種々の技術によって抽出され得る。例えば、Maniatisら, 1982, molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ニューヨーク) pp.280-281を参照されたい。したがって、この方法は、例えば、DNAまたはメッセンジャーRNAなどのRNAを用い得るものであり、このDNAまたはRNAは、1本鎖または2本鎖であり得る。さらに、それぞれの1本の鎖を含むDNA-RNAハイブリッドが利用され得る。

DNA内、またはRNAからのターゲット配列の増幅を行うことによって、分析される核酸の試料中の特定の配列の存在を試験したり、特異的遺伝子をクローニングしたりすることができる。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス由来のDNAポリメラーゼは、これらの方法に非常に有用である。その3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のために、当技術分野における逆転写酵素としてより高い精度で産物を合成することができる。

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス由来のDNAポリメラーゼを用いることによって、試料中のRNAターゲット分子の検出のための方法を簡略化および改良することもできる。これらの方法において、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス由来のDNAポリメラーゼは、(a)逆転写、(b)第2のcDNA鎖合成、および所望により(c)PCRによる増幅を触媒し得る。記載された方法におけるカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス由来のDNAポリメラーゼの使用により、以前、各ステップに対し

10

20

30

40

50

て異なる酵素を使用するために必要であった2組のインキュベーション条件の必要性が排除される。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ由来のDNAポリメラーゼを用いることによって、RNA逆転写および得られる相補的DNAの増幅を、高い特異性で、そして従来のRNAクローニングおよび診断法よりも少ない工程で行うことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、マグネシウム塩およびマンガン塩の存在下におけるカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ由来のDNAポリメラーゼの相対的な逆転写酵素活性を示すものである。

図2は、in situで行ったDNAポリメラーゼアッセイの写真を示すものである。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ由来のDNAポリメラーゼと参照ポリメラーゼの活性はin situで検出される。C.ヒドロゲノホルマンズ由来のDNAポリメラーゼの画分と参照酵素を活性化子ウシ胸腺DNAを含むSDS-ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動にかけた。電気泳動後、SDSを除去し、タンパク質を再生し、65℃で、マグネシウム塩、dNTPおよびジゴキシゲニン標識dUTPの存在下にてインキュベートすることによってDNAを合成した。核酸をナイロン膜にブロットし、新たに合成されたDNAを化学発光反応によって検出した。

図3は、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ由来のDNAポリメラーゼの熱安定性を示すものである。DNAポリメラーゼのアリコートを図に示した温度で30分間インキュベートし、次いで残存酵素活性を測定した。

図4は、テルムス アクアティカス (*Thermus aquaticus*) およびピロコッカス ウーゼイ (*Pyrococcus woesei*) 由来のDNAポリメラーゼと比較したカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ由来のDNAポリメラーゼの3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性の分析を示すものである。この分析は、dNTPの存在下または不存在下で行う。5'末端をジゴキシゲニンで標識した22merプライマーを、鋳型DNAの12bp5'突出部 (overhang) を残したままの34mer鋳型DNAにアニールした。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ、テルムス アクアティカスおよびピロコッカス ウーゼイ由来のDNAポリメラーゼを、マグネシウムの存在下、dNTPとともにまたはdNTPなしにこの基質とインキュベートした。産物を配列決定ゲル上で分離し、ナイロン膜にブロットして化学発光反応によって検出した。

図5は、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズのポリメラーゼ遺伝子のDNA配列を配列番号7に示し、誘導されたDNAポリメラーゼタンパク質のペプチド配列を配列番号8に示すものである。

図6は、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ、アナエロセラム サーモフィラム (*Anaerocelum thermophilum*)、テルムス フィリホルミス (*Thermus filiformis*) (Pacific Enzymes) およびテルムス サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) の熱安定DNAポリメラーゼの逆転写酵素活性の比較を示すものである。同様の量 (単位) のDNAポリメラーゼを分析した。各酵素を、個々の酵素に対して最適な反応条件下で、DNAポリメラーゼ活性、 $Mg^{++}$  (5 mM) の存在下での逆転写酵素活性、および $Mn^{++}$  (1 mM) の存在下での逆転写酵素活性について試験した。DNA合成は、ジゴキシゲニン標識ヌクレオチドの取込みによって測定した。逆転写活性に対するDNAポリメラーゼの割合を比較するために、DNAポリメラーゼアッセイにおいて測定した相対光単位 (relative light units, RLU) を100にセットした。逆転写酵素活性試験において測定されたRLUは、ポリメラーゼ活性のパーセントで表される。

#### 実施例 1

エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼおよびリボヌクレアーゼ活性の検出

エンドヌクレアーゼ活性の欠如: 1  $\mu$ g のプラスミドDNAを、パラフィン油で上を被った50  $\mu$ l の試験緩衝液中で、過剰の精製DNAポリメラーゼとともに72℃にて4時間インキュベートする。

非特異的エキソヌクレアーゼ活性の欠如: ラムダDNAのEcoRI/HindIII-断片1  $\mu$ gを、100  $\mu$ lの試験緩衝液中、dNTPの不存在下および存在下で (1 mMの最終濃度)、過剰の

10

20

30

40

50



精製DNAポリメラーゼとともに72℃で4時間インキュベートする。

リボヌクレアーゼ活性の欠如：3 µgのMS2 RNAを、20 µlの試験緩衝液中で、過剰のDNAポリメラーゼとともに72℃で4時間インキュベートする。続いて、MOPSGelにおける電気泳動によってRNAを分析する（Maniatisら（1982）Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク）。

## 実施例 2

### DNAポリメラーゼ活性の測定

DNAポリメラーゼ活性を、本質的にHoltke, H. J., Sagner, G., Kessler, C.およびSchmitz, G.（1992）Biotechniques 12, 104-113に記載された方法にしたがって、合成DNAへのジゴキシゲニン標識dUTPの取込み、取り込まれたジゴキシゲニンの検出および定量によって測定した。反応は、1または2 µlの希釈（0.05U ~ 0.01U）DNAポリメラーゼならびに50mMのトリス - HCl、pH8.5；12.5mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；10mMのKCl；5 mMのMgCl<sub>2</sub>；10mMの2-メルカプトエタノール；33 µMのdNTP；200 µg/mlのBSA；12 µgの子ウシ胸腺由来のDNAアーゼI活性化DNAおよび0.036 µMのジゴキシゲニン - dNTPを含む、50 µlの反応容積で行う。

試料を72℃で30分間インキュベートし、反応を2 µlの0.5M EDTAを加えることによって停止させ、チューブを氷上に置く。8 µlの5 M NaClおよび150 µlのエタノール（予め-20℃に冷却したもの）を加えた後、氷上で15分間インキュベートすることによってDNAを沈殿させ、13000 × rpm、4℃で10分間遠心分離することによってペレットにする。ペレットを100 µlの70%エタノール（予め-20℃に冷却したもの）および0.2M NaClで洗淨し、再び遠心分離して減圧乾燥する。

ペレットを50 µlのトリス - EDTA（10mM / 0.1mM；pH7.5）に溶解する。5 µlの試料を、白色マイクロウェルプレート（Pall Filtrationstechnik GmbH, Dreieich, FRG, 製品番号SM045BWP）の底に付けたナイロン膜のウェルにスポットする。70℃で10分間ベーキングすることによってDNAを膜に固定する。DNA添加ウェルを、100 µlの0.45 µm - 濾過1%ブロッキング溶液（100mMのマレイン酸、150mMのNaCl、1%（w/v）カゼイン、pH7.5）で満たす。下記のインキュベーション工程はすべて室温で行う。2分間インキュベートした後、適当な減圧連結管を用いて-0.4バールで溶液を膜に吸収させる。洗淨工程を繰り返した後、ウェルを、抗ジゴキシゲニン - AP, Fabフラグメント（Boehringer Mannheim, FRG, No.1093274）を上記のブロッキング溶液で1：10000に希釈した希釈液100 µlで満たす。2分間インキュベートし、吸収させ、この工程を再度繰り返す。ウェルを、減圧下で2回、それぞれ200 µlの洗淨緩衝液1（100mMのマレイン酸、150mMのNaCl、0.3%（v/v）Tween<sup>TM</sup>20（ポリ（オキシエチレン）<sub>n</sub> - ソルビタン - モノラウレート）、pH7.5）で洗淨する。さらに2回減圧下で、それぞれ200 µlの洗淨緩衝液2（10mMのトリス - HCl、100mMのNaCl、50mMのMgCl<sub>2</sub>、pH9.5）で洗淨した後、ウェルを洗淨緩衝液2で1：100に希釈した50 µlのCSPD<sup>TM</sup>（Boehringer Mannheim, no:1655884）とともに5分間インキュベートする。このCSPD<sup>TM</sup>は、アルカリホスファターゼに対する化学発光基質として作用するものである。溶液を膜に吸収させ、10分間インキュベートした後、RLU / s（相対光単位 / 秒）をルミノメーター（luminometer）、例えばMicroLumat LB96P（EG&G Berthold, Wilmad, FRG）で検出する。

Taq DNAポリメラーゼの段階希釈を用いて、直線範囲が分析されるDNAポリメラーゼの活性測定に対する標準として役立つ参照曲線を作製する。

## 実施例 3

### 逆転写酵素活性の測定

本質的に、反応混合物が下記の成分：1 µgのポリdA - (dT)<sub>15</sub>、33 µMのdTTP、0.36 µMのジゴキシゲニン - dUTP、200mg / mlのBSA、10mMのトリス - HCl、pH8.5、20mMのKCl、5 mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTEおよび種々の量のDNAポリメラーゼからなる以外はDNAポリメラーゼ活性の測定について記載したようにしてアッセイを行う。用いられるインキュベーション温度は50℃である。

## 実施例 4

### in situ DNAポリメラーゼ活性の測定

ポリメラーゼ活性および逆転写酵素活性についてのin situ PAGE分析を、本質的に、Spanos A.およびHubscher U. (1983) Methods in Enzymology 91, 263-277によって記載された方法にしたがって行った。オリジナルの方法に対するいくつかのマイナーであるが本質的な変更は、SDS-変性ポリペプチドの再生をマグネシウムイオン(3 mM)およびdATP(0.5~1  $\mu$ M)の存在下で行って再折りたたみを助けることである。

簡単に言えば、この方法は下記のとおりである：

粗細胞抽出物またはゲル1 ml当たり150  $\mu$ gの活性化子ウシ胸腺DNAを含む変性8%ポリアクリルアミドゲル(積層ゲル5%アクリルアミド)上の精製試料からポリペプチドを分離した後、ゲルを、4回、それぞれ室温で30分間、適度に振盪しながら過剰の再生緩衝液(50mMのトリス-HCl、pH8.3、1 mMのEDTA、3 mMの2-メルカプトエタノール、50mMのKCl、5~10%グリセロール)中で洗浄してSDSを除去する。次いで、ゲルを3 mMのMgCl<sub>2</sub>および0.5~1  $\mu$ MのdATPを含む同緩衝液中で4で攪拌せずに一晚インキュベートする。翌日、最初の4回の洗浄を再生緩衝液を用いて繰り返す。SDSを除去し、タンパク質を再生した後、ゲルを、50mMのトリス-HCl、pH8.3、50mMのKCl、3 mMのDTT、7 mMのMgCl<sub>2</sub>、それぞれ12  $\mu$ MのdATP、dCTP、dGTP、8  $\mu$ MのdTTPおよび4  $\mu$ MのDig-dUTP、10% (vol/vol)グリセロールからなる反応混合物に移す。まず、ゲルを室温で1時間振盪しながらインキュベートし、次いで37、45、55、65、および72に段階的に加温する。各インキュベーション温度でDNA合成を60分間進行させた。

DNA合成後、DNAを接触プロットイングまたはキャピラリープロットイング(15×SSC、Maniatisら、上記同様)によってナイロン膜(Boehringer Mannheim GmbH)に移し、架橋する。

新たに合成されたジゴキシゲニン-標識DNAの検出は、前の項(DNAポリメラーゼ活性の測定)に記載した手順にしたがった。

分子量測定のために、公知の分子量のマーカーポリメラーゼ(例えば、クレノウ-ポリメラーゼ、Pol I、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、HIV RT、M-MuLV RT)を同ゲルの異なるレーンに加える。

請求の範囲に記載されたDNAポリメラーゼの本方法による分子量は100~105kDaである。

### 実施例 5

#### 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の検出

3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、通常、DNAポリメラーゼの「ブルーフリーディング」または「編集」活性と呼ばれている。この活性は、A型ポリメラーゼの大断片の小ドメインに位置する。この活性は、ヌクレオシド三リン酸の不存在下でDNAのプライマー末端の3'末端からヌクレオチドを除去するものである(Komberg A.およびBaker T.A. (1992) DNA Replication W.H.Freemann & Company, ニューヨーク)。このヌクレアーゼ作用は、デオキシヌクレオシド三リン酸が鋳型に適合し、ポリマーに取り込まれ得る場合、そのデオキシヌクレオシド三リン酸によって抑制される。

請求の範囲に記載したDNAポリメラーゼの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、デオキシリボヌクレオシド三リン酸の不存在下もしくは存在下における鋳型DNA、またはデオキシリボヌクレオシド三リン酸の不存在下もしくは存在下におけるDNA断片上にアニールされた5'-ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドの分解または短縮化として測定され得る。

ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドの分解：この反応混合物は、dNTP濃度が12.5  $\mu$ Mまで低減されており、活性化子ウシ胸腺DNAが500fMプライマーまたは鋳型/プライマー混合物に置換されている以外は、DNAポリメラーゼ活性の測定についてのもので(50mMのトリス-HCl、pH8.4；12.5mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；10mMのKCl；5 mMのMgCl<sub>2</sub>；10mMの2-メルカプトエタノール)と本質的に同じである。

プライマー配列は、

## 配列番号 8 : Dig-GCATGGATCCCCACTGCCAGGG(5'-3')

である。このプライマーは、種々の12bp 5 プライムオーバーハングの鋳型分子とアニールされる。典型的に0.1単位のDNAポリメラーゼ試料を、Perkin Elmerサーマルサイクラー (thermal cycler) 中、合計反応容量10  $\mu$ l で72 にて30分間インキュベートする。反応を等容量のホルムアミド - 緩衝液 (98%ホルムアミド ; 10mMのEDTA ; ブロムフェノールブルーおよびキシレンシアノール) を加えることによって停止させ、95 にて10分間加熱することによって変性させる。試料を、氷上ですばやく冷却して、20%変性ポリアクリルアミド / 尿素配列決定ゲルにのせる。電気泳動を60 、2000Vで2.5時間行う。

分離後、DNAを、30分間の接触プロットングによって正荷電ナイロン膜 (Boehringer Mannheim) 上に移す。DNAを120mジュールのUV照射 (Stratalinker, Stratagene) によって膜に架橋する。膜を、ブロッキング溶液 (100mMのマレイン酸、150mMのNaCl、1% (w/v) のカゼイン、pHは1MのNaOHを用いて7.5に調節) で室温にて少なくとも30分間ブロックし、ジゴキシゲニン - 標識プライマーDNAをブロッキング溶液で1 : 10000に希釈した抗ジゴキシゲニン - AP.Fab - フラグメント (Boehringer Mannheim, FRG, No.109 3274) で検出する (室温で30分間)。洗浄緩衝液 (100mMのマレイン酸、150mMのNaCl、0.3% (v/v) のTween (商品名) 20 (ポリ (オキシエチレン) <sub>n</sub> - ソルピタン - モノラウレート)、pH7.5) で3 ~ 4回 (それぞれ10 ~ 15分間) 洗浄することによって過剰の非結合抗体を除去する。膜を、10mMのトリス - HCl、100mMのNaCl (pH9.5) を含む緩衝液に移し、さらに室温で10 ~ 15分間の洗浄を2回行う。最後に、膜を、CDP-Star (商品名) (Boehringer Mannheim) の1 : 10000希釈溶液で浸漬する。CDP-Star (商品名) は、アルカリホスファターゼに対する化学発光基質として作用する。次いで、膜を濾紙 (Whatman 3MM) に移して過剰の液を除去し、2枚の透明なオーバーヘッドホイルの間に入れて、X線フィルム (化学発光検出フィルム、Boehringer Mannheim) に5 ~ 10分間曝す。3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を、対照 (ポリメラーゼを添加しないもの) と比べたプライマーの分解または短縮化によって検出する。陰性および陽性対照として、テルムス・アクアティカス (3'-5'エキソヌクレアーゼ活性無し) およびピロコッカス・ウーゼイ (3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示す) 由来のDNAポリメラーゼが含まれている。

デオキシヌクレオシド三リン酸の存在下または不存在下でのDNA断片の分解 : Chyポリメラーゼの段階希釈液を、1  $\mu$ gのDNA分子量マーカーIII (Boehringer Mannheim) とともに、それぞれ1mMのdNTPの存在下または不存在下で、パラフィンで上を被った50  $\mu$ lの下記のインキュベーション緩衝液 : 50mMのトリス - HCl、pH7.8 ; 10mMのMgCl<sub>2</sub> ; 7mMの2-メルカプトエタノール中、70 で2時間インキュベートした。DNA断片を臭化エチジウムを含む1%アガロースゲル上で分離した。dNTPの不存在下では、DNA断片のスミアが検出されるか、またはDNAは検出することができず、dNTPの存在下ではDNA断片は分解されないままであった。

### 実施例 6

カルボキシデルム スヒドロゲノホルモンスDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング  
カルボキシデルム スヒドロゲノホルモンスからの染色体DNAの調製

カルボキシデルム スヒドロゲノホルモンスのバイオマス0.8gを、20mlの1M KClに懸濁し、遠心分離した。次いで、ペレットを4.8mlのSET-緩衝液 (150mMのNaCl、15mMのEDTA、pH8.0、60mMのトリス - HCl、pH8.0、50  $\mu$ g/ $\mu$ lのRNAアーゼA) に再懸濁し、その後1mlの20% SDSおよび50  $\mu$ lのプロテイナーゼK (10mg/ml) を加えた。混合物を37 で45分間維持した。フェノールおよびクロロホルムによる抽出後、DNAをエタノールで沈殿させ、H<sub>2</sub>Oに溶解した。このようにして、約4.1mgのDNAが得られた。

PCRによる特異的DNAの増幅

PCR技術によるカルボキシデルム スヒドロゲノホルモンスのDNAポリメラーゼをコードする遺伝子の増幅のために、2つの混合オリゴヌクレオチド (プライマー1および2) を、Braithwaite D.K.およびIto J. (1993) Nucl. Acids Res. 21, 787-802に記載されたようにして、ファミリーA DNAポリメラーゼの保存領域に基づいて設計した。

## 配列番号 1

プライマー 1 : 5'-CCN AAY YTN CAR AAY ATH-3'

## 配列番号 2 :

プライマー 2 : 5'-YTC RTC RTG NAC YTG-3'

PCR増幅を、カルボキシデルムス ヒドロゲノホルモンス由来の750ngのゲノムDNA、10mMのトリス-HCl、pH8.8、2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、50mMのKCl、200μMのdNTP、100pmolの各プライマーおよび2.5単位のTaqポリメラーゼ(Boehringer Mannheim GmbH, FRG)を含む100μlの緩衝液中で行った。ターゲット配列を、まず、95℃で2分間変性させ、次いで95℃で0.5分間、47℃で1分間および72℃で2分間のサイクルを30サイクル行うことにより増幅させた。熱サイクル反応は、Perkin Elmer GenAmp9600サーマルサイクラーで行った。アガロースゲル電気泳動により、約600塩基対の断片が特異的に増幅されていることが示された。この断片をpCR<sup>TM</sup>IIベクター(Invitrogen)中にライゲートし、サイクル配列決定によって配列を決定した。このヌクレオチド配列から推定したアミノ酸配列は、他の公知のDNAポリメラーゼのものと非常に類似しており、プライマー3および4をインバース(inverse)PCR用に設計することができた。

## 配列番号 3

プライマー 3 : 5'-GGG CGA AGA CGC TAT ATT CCT GAG C-3'

## 配列番号 4 :

プライマー 4 : 5'-GAA GCC TTA ATT CAA TCT GGG AAT AAT C-3'

インバースPCRは、本質的に、Triglia T.ら(1988)Nucleic Acids Res. 16, 8186に記載されたようにして行なった。カルボキシデルムス ヒドロゲノホルモンス由来の5μgのゲノムDNAを、製造業者の仕様書(Boehringer Mannheim GmbH)にしたがってEcoRIで切断し、等容量のフェノール/クロロホルム混合物で処理した。水相を除去し、エタノールで沈殿させたDNAを遠心分離によって回収した。

環化のために、消化DNAをライゲーション緩衝液(Boehringer Mannheim GmbH, FRG)で50ng/μlの濃度まで希釈した。ライゲーション反応を、T4 DNAリガーゼ(Boehringer Mannheim GmbH, FRG)を0.2単位/μlの濃度まで加えることによって開始させ、反応を15℃で15時間進行させた。次いで、ライゲートされたDNAをエタノールで沈殿させ、遠心分離によって回収した。

PCRを、50mMのトリス-HCl、pH9.2、16mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2.25mMのMgCl<sub>2</sub>、2%(v/v)DMSO、0.1%(v/v)のTween(商品名)20、上記のようにして得られた700ngの環化DNA、50pmolの各プライマー、500μMのdNTPおよび0.75μlの酵素混合物(Expand Long Template PCR System, Boehringer Mannheim GmbH)を含む50μlの緩衝液中で行った。

サイクル条件は下記のとおりである：

10

20

30

1 × 92℃、2分間の鋳型の変性

10 × { 92℃、10秒間の変性  
64℃、30秒間のアニーリング  
68℃、2分間の伸長

20 × { 92℃、10秒間の変性  
64℃、30秒間のアニーリング  
68℃、2分間の伸長  
+各サイクルについて20秒のサイクル伸長。

アガロースゲル電気泳動によって、7000塩基対長のDNA断片が特異的に増幅されていることがわかった。このDNA断片をpCR (商品名) IIベクター (Invitrogen) にライゲートし、配列決定した。この配列から推定して、ポリメラーゼ領域の、5'末端および3'末端それぞれをコードするプライマー5および6を設計することができた。プライマー5はNcoI部位を含んでおり、プライマー6はBamHI部位を含んでいた。

PCRを、鋳型としてカルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス由来の750ngのゲノムDNAを用いて、上記 (インバースPCR) と同じ条件下で行った。

配列番号5:

プライマー5: 5'-CGA ATT CAA TCC ATG GGA AAA GTA GTC CTG GTG GAT-3'

配列番号6:

プライマー6: 5'-CGA ATT CAA GGA TCC TTA CTT CGC TTC ATA CCA GTT-3'

クローニングおよび発現

PCR産物を、0.8%アガロースゲルにおける20μlのPCR混合物の電気泳動によって精製した。2.496kbのポリメラーゼコード領域のバンドを、フェノール抽出によってアガロースから精製した。次いで、DNAをクロロホルムで処理して、エタノールで沈殿させた。ペレットを再懸濁し、製造業者の仕様書 (Boehringer Mannheim GmbH) にしたがってNcoIおよびBamHIで消化して、方向性のある (directional) クローニングのための付着末端を得た。DNAを、NcoIおよびBamHIで消化した発現ベクターpDS56 (Stuber D., Matile H. および Garotta G. (1990) Immunological Methods, Letkovcs, I および Pernis, B. 編) にライゲートした。ライゲートした産物を形質転換によってE.coli株BL21 (DE3) pUBS520 (Brinkmann U.ら (1989) Gene 85, 109-114) に導入した。形質転換体を、100μg/mlのアンピシリンおよび50μg/mlのカナマイシンを含むL-寒天上で増殖させて組換え体を選別した。コロニーを拾って、100μg/mlのアンピシリンおよび50μg/mlのカナマイシンを含むL-ブロス中で増殖させ、プラスミドDNAをアルカリ溶解によって調製した。プラスミドをBamHIによる消化によって、挿入についてスクリーニングした。挿入物を含むそれらの組換え体を、アンピシリンおよびカナマイシンを含むL-ブロス中で増殖させ、1mMのIPTGによる指数関数的に増殖する培養の誘導によって好熱性DNAポリメラーゼの発現について試験し、上記 (DNAポリメラーゼ活性の測定) のようにしてDNAポリメラーゼ活性について熱処理抽出物をアッセイした。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルモンス由来のDNAポリメラーゼを発現する組換え体を得られた。この株は、E.coli AR96

10

20

30

40

50

(DSM No.11179) およびプラスミドpAR4と命名した。

# 配列表

配列番号：1：

(i) 配列の特色：

(A) 配列の長さ：18塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：/desc="oligonucleotide"

10

(xi) 配列：

**CCNAAYYTNC ARAAYATH**

**18**

配列番号：2：

(i) 配列の特色：

(A) 配列の長さ：15塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：/desc="oligonucleotide"

20

(xi) 配列：

**YTCRTCRTGN ACYTG**

**15**

配列番号：3：

(i) 配列の特色：

(A) 配列の長さ：25塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

30

(A) 記載：/desc="oligonucleotide"

(xi) 配列：

**GGGCGAAGAC GCTATATTCC TGAGC**

**25**

配列番号：4：

(i) 配列の特色：

(A) 配列の長さ：28塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

40

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：/desc="oligonucleotide"

(xi) 配列：

**GAAGCCTTAA TTCAATCTGG GAATAATC**

**28**

配列番号：5：

(i) 配列の特色：

(A) 配列の長さ：36塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

50

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：/desd="oligonucleotide"

(xi) 配列：

**CGAATTCAAT CCATGGGAAA AGTAGTCCTG GIGGAT**

36

配列番号：6：

(i) 配列の特色：

(A) 配列の長さ：36塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

10

(D) トポロジ：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：/desc="oligonucleotide"

(xi) 配列：

**CGAATTCAAG GATCCTTACT TCGCTTCATA CCAGTT**

36

配列番号：7：

(i) 配列の特色：

(A) 配列の長さ：2496塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

20

(D) トポロジ：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：1...2496

(xi) 配列：

ATG	GGA	AAA	GTA	GTC	CTG	GTG	GAT	GGA	AAT	AGT	TTA	TTA	CAT	AGA	45
Met	Gly	Lys	Val	Val	Leu	Val	Asp	Gly	Asn	Ser	Leu	Leu	His	Arg	
1				5					10					15	

GCG	TTT	TTT	GCC	CTT	CCG	CCC	TTA	AAA	ACT	ACT	AAA	GGA	GAG	CCT	90	30
Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Thr	Thr	Lys	Gly	Glu	Pro		
			20						25					30		

ACC	GGG	GCG	GTT	TAC	GGG	TTT	TTA	ACG	ATG	CTT	TTT	CGG	GTA	ATA	135
Thr	Gly	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Leu	Thr	Met	Leu	Phe	Arg	Val	Ile	
			35						40					45	

AAA	GAT	GAA	AAA	CCC	GAA	TAT	TTA	GCG	GTA	GCT	TTT	GAT	ATT	AGC	180
Lys	Asp	Glu	Lys	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Val	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	
			50						55					60	

CGG AAA ACT TTT CGT ACC GAG CAG TTT ACT GCA TAC AAA GGG CAC	225	
Arg Lys Thr Phe Arg Thr Glu Gln Phe Thr Ala Tyr Lys Gly His		
65 70 75		
CGC AAA GAA GCC CCG GAT GAG CTT GTA CCC CAG TTT GCC CTG GTG	270	
Arg Lys Glu Ala Pro Asp Glu Leu Val Pro Gln Phe Ala Leu Val		
80 85 90		
CGG GAA GTA TTA AAG GTT TTA AAT GTT CCC TAT ATT GAA CTT GAC	315	
Arg Glu Val Leu Lys Val Leu Asn Val Pro Tyr Ile Glu Leu Asp		
95 100 105		
GGT TAT GAG GCC GAT GAT ATT ATC GGC CAC CTA TCA AGG GCT TTT	360	10
Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Ile Ile Gly His Leu Ser Arg Ala Phe		
110 115 120		
GCG GGA CAA GGA CAT GAA GTG GTG ATT TAT ACC GCT GAC CGG GAC	405	
Ala Gly Gln Gly His Glu Val Val Ile Tyr Thr Ala Asp Arg Asp		
125 130 135		
ATG CTG CAA TTG GTA GAT GAA AAA ACG GTG GTA TAC CTT ACC AAA	450	
Met Leu Gln Leu Val Asp Glu Lys Thr Val Val Tyr Leu Thr Lys		
140 145 150		
AAA GGC ATT ACC GAA CTG GTT AAA ATG GAT TTA GCT GCG ATT TTA	495	20
Lys Gly Ile Thr Glu Leu Val Lys Met Asp Leu Ala Ala Ile Leu		
155 160 165		
GAA AAC TAC GGC TTA AAG CCT AAA CAG CTT GTG GAT GTT AAA GGA	540	
Glu Asn Tyr Gly Leu Lys Pro Lys Gln Leu Val Asp Val Lys Gly		
170 175 180		
TTA ATG GGA GAT CCC TCG GAC AAC ATA CCC GGG GTT CCC GGG ATT	585	
Leu Met Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile Pro Gly Val Pro Gly Ile		
185 190 195		
GGG GAG AAA ACT GCT TTA GAT TTA ATT AAA ACT TAT GGC TCA GTG	630	30
Gly Glu Lys Thr Ala Leu Asp Leu Ile Lys Thr Tyr Gly Ser Val		
200 205 210		
GAA GAA GTT TTG GCC CGT AAA GAT GAG TTA AAA CCT AAA TTA AGA	675	
Glu Glu Val Leu Ala Arg Lys Asp Glu Leu Lys Pro Lys Leu Arg		
215 220 225		
GAA AAG CTT GCC GAA CAC GAA AAT TTA GCA AAA ATA TCG AAA CAA	720	
Glu Lys Leu Ala Glu His Glu Asn Leu Ala Lys Ile Ser Lys Gln		
230 235 240		
TTA GCT ACA ATC CTG CGG GAA ATA CCG TTA GAA ATC TCC CTG GAA	765	40
Leu Ala Thr Ile Leu Arg Glu Ile Pro Leu Glu Ile Ser Leu Glu		
245 250 255		
GAT TTA AAA GTT AAA GAA CCT AAT TAT GAA GAA GTT GCT AAA TTA	810	
Asp Leu Lys Val Lys Glu Pro Asn Tyr Glu Glu Val Ala Lys Leu		
260 265 270		
TTT CTT CAC CTT GAG TTT AAA AGC TTT TTA AAA GAA ATA GAA CCA	855	
Phe Leu His Leu Glu Phe Lys Ser Phe Leu Lys Glu Ile Glu Pro		
275 280 285		



AAA ATA AAG AAA GAA TAC CAG GAA GGT AAA GAT TTG GTG CAA GTT	900	
Lys Ile Lys Lys Glu Tyr Gln Glu Gly Lys Asp Leu Val Gln Val	290	300
GAA ACT GTA GAA ACG GAA GGA CAG ATT GCA GTA GTT TTT AGT GAT	945	
Glu Thr Val Glu Thr Glu Gly Gln Ile Ala Val Val Phe Ser Asp	305	315
GGA TTT TAT GTT GAT GAC GGG GAA AAA ACA AAG TTT TAC TCT TTA	990	
Gly Phe Tyr Val Asp Asp Gly Glu Lys Thr Lys Phe Tyr Ser Leu	320	330
GAC CGG CTG AAT GAA ATA GAG GAA ATA TTT AGG AAT AAA AAA ATT	1035	
Asp Arg Leu Asn Glu Ile Glu Glu Ile Phe Arg Asn Lys Lys Ile	335	345
ATT ACC GAC GAT GCC AAA GGA ATT TAT CAT GTC TGT TTA GAA AAA	1080	
Ile Thr Asp Asp Ala Lys Gly Ile Tyr His Val Cys Leu Glu Lys	350	360
GGT CTG ACT TTT CCC GAA GTT TGT TTT GAT GCG CGG ATT GCA GCT	1125	
Gly Leu Thr Phe Pro Glu Val Cys Phe Asp Ala Arg Ile Ala Ala	365	375
TAT GTT TTA AAC CCG GCC GAC CAA AAT CCC GGC CTC AAG GGG CTT	1170	
Tyr Val Leu Asn Pro Ala Asp Gln Asn Pro Gly Leu Lys Gly Leu	380	390
TAT CTA AAG TAT GAC TTA CCG GTG TAT GAA GAT GTA TCT TTA AAC	1215	
Tyr Leu Lys Tyr Asp Leu Pro Val Tyr Glu Asp Val Ser Leu Asn	395	405
ATT AGA GGG TTG TTT TAT TTA AAA AAA GAA ATG ATG AGA AAA ATC	1260	
Ile Arg Gly Leu Phe Tyr Leu Lys Lys Glu Met Met Arg Lys Ile	410	420
TTT GAG CAG GAG CAA GAA AGG TTA TTT TAT GAA ATA GAA CTT CCT	1305	
Phe Glu Gln Glu Gln Glu Arg Leu Phe Tyr Glu Ile Glu Leu Pro	425	435
TTA ACT CCA GTT CTT GCT CAA ATG GAG CAT ACC GGC ATT CAG GTT	1350	
Leu Thr Pro Val Leu Ala Gln Met Glu His Thr Gly Ile Gln Val	440	450
GAC CGG GAA GCT TTA AAA GAG ATG TCG TTA GAG CTG GGA GAG CAA	1395	
Asp Arg Glu Ala Leu Lys Glu Met Ser Leu Glu Leu Gly Glu Gln	455	465
ATT GAA GAG TTA ATC CGG GAA ATT TAT GTG CTG GCG GGG GAA GAG	1440	
Ile Glu Glu Leu Ile Arg Glu Ile Tyr Val Leu Ala Gly Glu Glu	470	480
TTT AAC TTA AAC TCG CCC AGG CAG CTG GGA GTT ATT CTT TTT GAA	1485	
Phe Asn Leu Asn Ser Pro Arg Gln Leu Gly Val Ile Leu Phe Glu	485	495
AAA CTT GGG CTG CCG GTA ATT AAA AAG ACC AAA ACG GGC TAC TCT	1530	
Lys Leu Gly Leu Pro Val Ile Lys Lys Thr Lys Thr Gly Tyr Ser	500	510

ACC GAT GCG GAG GTT TTG GAA GAG CTC TTG CCT TTC CAC GAA ATT	1575	10
Thr Asp Ala Glu Val Leu Glu Glu Leu Leu Pro Phe His Glu Ile	515 520 525	
GGC ATC GGC AAA ATA TTG AAT TAC CGG CAG CTT ATG AAG TTA AAA	1620	
Ile Gly Lys Ile Leu Asn Tyr Arg Gln Leu Met Lys Leu Lys Ser	530 535 540	
TCC ACT TAT ACT GAC TTA ATG CCT TTA ATA AAT GAG CGT ACC GGT	1665	
Thr Tyr Thr Asp Gly Leu Met Pro Leu Ile Asn Glu Arg Thr Gly	545 550 555	
AAA CTT CAC ACT ACT TTT AAC CAG ACC GGT ACT TTA ACC GGA CGC	1710	
Lys Leu His Thr Thr Phe Asn Gln Thr Gly Thr Leu Thr Gly Arg	560 565 570	
CTG GCG TCT TCG GAG CCC AAT CTC CAA AAT ATT CCC ATC CGG TTG	1755	
Leu Ala Ser Ser Glu Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Leu	575 580 585	
GAA CTC GGT CGG AAA TTA CGC AAG ATG TTT ATA CCT TCA CCG GGG	1800	20
Glu Leu Gly Arg Lys Leu Arg Lys Met Phe Ile Pro Ser Pro Gly	590 595 600	
TAT GAT TAT ATT GTT TCG GCG GAT TAT TCC CAG ATT GAA TTA AGG	1845	
Tyr Asp Tyr Ile Val Ser Ala Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg	605 610 615	
CTT CTT GCC CAT TTT TCC GAA GAG CCC AAG CTT ATT GAA GCT TAC	1890	
Leu Leu Ala His Phe Ser Glu Glu Pro Lys Leu Ile Glu Ala Tyr	620 625 630	
CAA AAA GGG GAG GAT ATT CAC CGG AAA ACG GCC TCC GAG GTG TTC	1935	
Gln Lys Gly Glu Asp Ile His Arg Lys Thr Ala Ser Glu Val Phe	635 640 645	
GGT GTA TCT TTG GAA GAA GTT ACT CCC GAG ATG CGC GCT CAT GCC	1980	
Gly Val Ser Leu Glu Glu Val Thr Pro Glu Met Arg Ala His Ala	650 655 660	
AAG TCG GTG AAC TTC GGC ATT GTT TAT GGC ATT AGT GAT TTT GGT	2025	30
Lys Ser Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Phe Gly	665 670 675	
TTA GGC AGA GAC TTA AAG ATT CCC CGG GAG GTT GCC GGT AAG TAC	2070	
Leu Gly Arg Asp Leu Lys Ile Pro Arg Glu Val Ala Gly Lys Tyr	680 685 690	
ATT AAA AAT TAT TTT GCC AAC TAT CCC AAA GTG CGG GAG TAT CTC	2115	
Ile Lys Asn Tyr Phe Ala Asn Tyr Pro Lys Val Arg Glu Tyr Leu	695 700 705	
GAT GAA CTT GTC CGT ACG GCA AGA GAA AAG GGA TAT GTG ACC ACT	2160	
Asp Glu Leu Val Arg Thr Ala Arg Glu Lys Gly Tyr Val Thr Thr	710 715 720	
TTA TTT GGG CGA AGA CGC TAT ATT CCT GAG CTA TCT TCA AAA AAC	2205	
Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Glu Leu Ser Ser Lys Asn	725 730 735	

10

20

30

40

CGC	ACG	GTT	CAG	GGT	TTT	GGC	GAA	AGG	ACG	GCC	ATG	AAT	ACT	CCC	2250
Arg	Thr	Val	Gln	Gly	Phe	Gly	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Asn	Thr	Pro	
				740					745					750	
CTT	CAG	GGC	TCG	GCT	GCC	GAT	ATT	ATT	AAG	CTT	GCA	ATG	ATT	AAT	2295
Leu	Gln	Gly	Ser	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Asn	
				755					760					765	
GTA	GAA	AAA	GAA	CTT	AAA	GCC	CGT	AAG	CTT	AAG	TCC	CGG	CTC	CTT	2340
Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Leu	
				770					775					780	
CTT	TCG	GTG	CAC	GAT	GAG	TTA	GTT	TTA	GAA	GTG	CCG	GCG	GAA	GAG	2385
Leu	Ser	Val	His	Asp	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Pro	Ala	Glu	Glu	
				785					790					795	
CTG	GAA	GAG	GTA	AAA	GCG	CTG	GTA	AAA	GGG	GTT	ATG	GAG	TCG	GTG	2430
Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Leu	Val	Lys	Gly	Val	Met	Glu	Ser	Val	
				800					805					810	
GTT	GAA	CTG	AAA	GTG	CCT	TTA	ATC	GCT	GAA	GTT	GGT	GCA	GCG	AAA	2475
Val	Glu	Leu	Lys	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	Val	Gly	Ala	Gly	Lys	
				815					820					825	
AAC	TGG	TAT	GAA	GCG	AAG	TAA									
Asn	Trp	Tyr	Glu	Ala	Lys	*									
				830											

10

20

配列番号 : 8 :

(i) 配列の特色 :

(A) 配列の長さ : 8 3 1 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 :

Met	Gly	Lys	Val	Val	Leu	Val	Asp	Gly	Asn	Ser	Leu	Leu	His	Arg	30
1				5					10					15	
Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Thr	Thr	Lys	Gly	Glu	Pro	
				20					25					30	
Thr	Gly	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Leu	Thr	Met	Leu	Phe	Arg	Val	Ile	
				35					40					45	
Lys	Asp	Glu	Lys	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Val	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	
				50					55					60	
Arg	Lys	Thr	Phe	Arg	Thr	Glu	Gln	Phe	Thr	Ala	Tyr	Lys	Gly	His	
				65					70					75	
Arg	Lys	Glu	Ala	Pro	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Gln	Phe	Ala	Leu	Val	
				80					85					90	

40

Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Tyr	Ile	Glu	Leu	Asp	
				95					100					105	
Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Ile	Ile	Gly	His	Leu	Ser	Arg	Ala	Phe	
				110					115					120	
Ala	Gly	Gln	Gly	His	Glu	Val	Val	Ile	Tyr	Thr	Ala	Asp	Arg	Asp	
				125					130					135	
Met	Leu	Gln	Leu	Val	Asp	Glu	Lys	Thr	Val	Val	Tyr	Leu	Thr	Lys	
				140					145					150	
Lys	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu	Val	Lys	Met	Asp	Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	
				155					160					165	
Glu	Asn	Tyr	Gly	Leu	Lys	Pro	Lys	Gln	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Gly	
				170					175					180	
Leu	Met	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	Asn	Ile	Pro	Gly	Val	Pro	Gly	Ile	
				185					190					195	
Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Tyr	Gly	Ser	Val	
				200					205					210	
Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu	Lys	Pro	Lys	Leu	Arg	
				215					220					225	
Glu	Lys	Leu	Ala	Glu	His	Glu	Asn	Leu	Ala	Lys	Ile	Ser	Lys	Gln	
				230					235					240	
Leu	Ala	Thr	Ile	Leu	Arg	Glu	Ile	Pro	Leu	Glu	Ile	Ser	Leu	Glu	
				245					250					255	
Asp	Leu	Lys	Val	Lys	Glu	Pro	Asn	Tyr	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	
				260					265					270	
Phe	Leu	His	Leu	Glu	Phe	Lys	Ser	Phe	Leu	Lys	Glu	Ile	Glu	Pro	
				275					280					285	
Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Tyr	Gln	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	Val	Gln	Val	
				290					295					300	
Glu	Thr	Val	Glu	Thr	Glu	Gly	Gln	Ile	Ala	Val	Val	Phe	Ser	Asp	
				305					310					315	
Gly	Phe	Tyr	Val	Asp	Asp	Gly	Glu	Lys	Thr	Lys	Phe	Tyr	Ser	Leu	
				320					325					330	
Asp	Arg	Leu	Asn	Glu	Ile	Glu	Glu	Ile	Phe	Arg	Asn	Lys	Lys	Ile	
				335					340					345	
Ile	Thr	Asp	Asp	Ala	Lys	Gly	Ile	Tyr	His	Val	Cys	Leu	Glu	Lys	
				350					355					360	
Gly	Leu	Thr	Phe	Pro	Glu	Val	Cys	Phe	Asp	Ala	Arg	Ile	Ala	Ala	
				365					370					375	
Tyr	Val	Leu	Asn	Pro	Ala	Asp	Gln	Asn	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	
				380					385					390	

Tyr Leu Lys Tyr Asp Leu Pro Val Tyr Glu Asp Val Ser Leu Asn  
 395 400 405  
 Ile Arg Gly Leu Phe Tyr Leu Lys Lys Glu Met Met Arg Lys Ile  
 410 415 420  
 Phe Glu Gln Glu Gln Glu Arg Leu Phe Tyr Glu Ile Glu Leu Pro  
 425 430 435  
 Leu Thr Pro Val Leu Ala Gln Met Glu His Thr Gly Ile Gln Val  
 440 445 450  
 Asp Arg Glu Ala Leu Lys Glu Met Ser Leu Glu Leu Gly Glu Gln  
 455 460 465  
 Ile Glu Glu Leu Ile Arg Glu Ile Tyr Val Leu Ala Gly Glu Glu  
 470 475 480  
 Phe Asn Leu Asn Ser Pro Arg Gln Leu Gly Val Ile Leu Phe Glu  
 485 490 495  
 Lys Leu Gly Leu Pro Val Ile Lys Lys Thr Lys Thr Gly Tyr Ser  
 500 505 510  
 Thr Asp Ala Glu Val Leu Glu Glu Leu Leu Pro Phe His Glu Ile  
 515 520 525  
 Ile Gly Lys Ile Leu Asn Tyr Arg Gln Leu Met Lys Leu Lys Ser  
 530 535 540  
 Thr Tyr Thr Asp Gly Leu Met Pro Leu Ile Asn Glu Arg Thr Gly  
 545 550 555  
 Lys Leu His Thr Thr Phe Asn Gln Thr Gly Thr Leu Thr Gly Arg  
 560 565 570  
 Leu Ala Ser Ser Glu Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Leu  
 575 580 585  
 Glu Leu Gly Arg Lys Leu Arg Lys Met Phe Ile Pro Ser Pro Gly  
 590 595 600  
 Tyr Asp Tyr Ile Val Ser Ala Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg  
 605 610 615  
 Leu Leu Ala His Phe Ser Glu Glu Pro Lys Leu Ile Glu Ala Tyr  
 620 625 630  
 Gln Lys Gly Glu Asp Ile His Arg Lys Thr Ala Ser Glu Val Phe  
 635 640 645  
 Gly Val Ser Leu Glu Glu Val Thr Pro Glu Met Arg Ala His Ala  
 650 655 660  
 Lys Ser Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Phe Gly  
 665 670 675

10

20

30

40

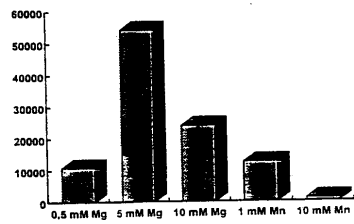
Leu	Gly	Arg	Asp	Leu	Lys	Ile	Pro	Arg	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr	
				680					685					690	
Ile	Lys	Asn	Tyr	Phe	Ala	Asn	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Tyr	Leu	
				695					700					705	
Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Thr	Ala	Arg	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Thr	Thr	
				710					715					720	
Leu	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Ile	Pro	Glu	Leu	Ser	Ser	Lys	Asn	
				725					730					735	
Arg	Thr	Val	Gln	Gly	Phe	Gly	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Asn	Thr	Pro	
				740					745					750	
Leu	Gln	Gly	Ser	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Asn	
				755					760					765	
Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Leu	
				770					775					780	
Leu	Ser	Val	His	Asp	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Pro	Ala	Glu	Glu	
				785					790					795	
Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Leu	Val	Lys	Gly	Val	Met	Glu	Ser	Val	
				800					805					810	
Val	Glu	Leu	Lys	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	Val	Gly	Ala	Gly	Lys	
				815					820					825	
Asn	Trp	Tyr	Glu	Ala	Lys										
				830											

10

20

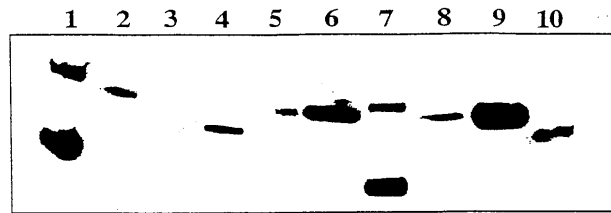
【図 1】  
Figure 1:

RLU



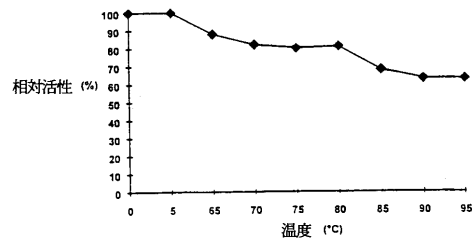
【Figure 2】  
Figure 2:

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンズ由来の DNA ポリメラーゼおよび  
参照ポリメラーゼの in situ での逆転写酵素活性の検出

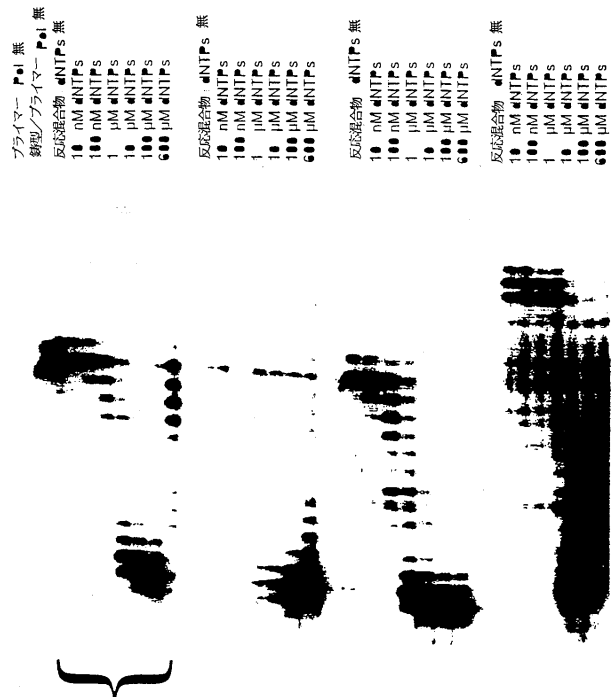


- 1: E.coli pol I (20U) + クレノウフラグメント (10U)
- 2: C.ヒドロゲノホルマンズ由来の細胞抽出物 (2μl)
- 3: Chy ポリメラーゼ, rec. (7U)
- 4: Taq ポリメラーゼ (20U)
- 5: C.ヒドロゲノホルマンズ由来の細胞抽出物 (2μl)
- 6: Chy polymerase, rec. (14U)
- 7: E.coli pol I (10U) + クレノウフラグメント (5U)
- 8: C.ヒドロゲノホルマンズ由来の細胞抽出物 (4μl)
- 9: Chy ポリメラーゼ, rec. (70U)
- 10: Taq ポリメラーゼ (20U)

【図 3】  
Figure 3:



【Figure 4】  
Figure 4:



## 【 5 】

Figure 5/1:

SEQ ID No.: 7  
SEQ ID No.: 8

ATG GGA AAA GTA GGC CCG GTG GAT GGA AAT AGT TTA TTA CAT AGA GCG 48  
M G K V V L V D G N E L L H R A 16  
TTT TTT GGC CTT CCG CCC TTA AAA ACT ACT AAA GGA GAG CCT ACC GGG 96  
F F A L F F L K T T K G E P T G 32  
GCG GTT CAC GGG TTT TTA ACG ATG CTT TTT CCG GTA ATA AAA GAT GAA 144  
A V Y G F L T M L F R Y I K D E 48  
AAA CCC GAA TAT TTA GCG GTA GCT TTT GAT ATT AGC CCG AAA ACT TTT 192  
K P E Y L A V A F D I S R K T F 64  
CGT ACC GAG CAG TTT ACT GCA TAC AAA GGG CAC CCG AAA GAA GCC CCG 240  
R T E Q F T A Y K G H R K E A P 80  
GAT GAG CTT GTA CCG GAG TTT GCG CTG GTG CCG GAA GTA TTA AAG GTT 288  
D E L V F Q F A L V R E V L K V 96  
TTA AAT GTT CCC TAT ATT GAA CTT GAC GGT TAT GAG CCC GAT GAT ATT 336  
L N V P Y I E L D G Y E A D D I 112

Figure 5/3

TTA GCT ACA ATC CTG CCG GAA ATA CCG TTA GAA ATC TTT CTG GAA GAT 768  
L A T I L R E I P L E I S L E I 256  
TTA AAA GTT AAA GAA CTT AAT TAT GAA GAA GTT GCT AAA TTA TTT CTT 816  
L K V K E F N Y E E V A K L F L 272  
CAC CTT GAG TTT AAA AGC TTT TTA AAA GAA ATA GAA CCA AAA ATA AAG 864  
H L E F K S F L K E I E F K I X 288  
AAA GAA TAC CAG GAA GGT AAA GAT TTG GTG CAA GTT GAA ACT GTA GAA 912  
K E Y Q E G K D L V Q V E T V E 304  
ACG GAA GGA CAG ATT GCA GTA GTT TTT AGT GAT GGA TTT TAT GTT GAT 960  
T E G Q I A V V F S D G F Y V D 320  
GAC GGG GAA AAA ACA AAG TTT TAC TCT TTA GAC CCG CTG AAT GAA ATA 1008  
D G E K T K F Y S L D R L N E I 336  
GAG GAA ATA TTT AGG AAT AAA AAA ATT ATT ACC GAC GAT GCC AAA GGA 1056  
E E I F R N K K I I T D D A K S 352  
ATT TAT CAT GTC TGT TTA GAA AAA GGT CTG ACT TTT CCG GAA GTT TGT 1104  
I Y H V C L E K G L T F P E V C 368

Figure 5/2

ATC GGC CAC CTA TCA AGG GCT TTT GCG GGA CAA GGA CAT GAA GTG GTG 384  
I G H L E R A F A G Q D H E V V 128  
ATT TAT ACC GCT GAC CCG GAC ATG CTG CAA TTG GTA GAT GAA AAA ACG 432  
I Y T A D R D M L Q L V D E K T 144  
GTG GTA TAC CTT ACC AAA AAA GGC ATT ACC GAA CTG GTT AAA ATG GAT 480  
V V Y L T K K G I T E L V K M D 160  
TTA GCT GCG ATT TTA GAA AAC TAC GGC TTA AAG CTT AAA CAG CTT GTG 528  
L A A I L E N Y G L K F K Q L V 176  
GAT GTT AAA GGA TTA ATG GGA GAT CCC TCG GAC AAC ATA CCC GGG GTT 576  
D V K G L M G D P S D N I P G V 192  
CCC GGG ATT GGG GAG AAA ACT GCT TTA GAT TTA ATT AAA ACT TAT GGC 624  
P G I G E K T A L D L I K T Y S 208  
TCA GTG GAA GAA GTT TTG GCC CGT AAA GAT GAG TTA AAA CTT AAA TTA 672  
S V E E Y L A R K D E L K P K L 224  
AGA GAA AAG CTT GCC GAA CAC GAA AAT TTA GCA AAA ATA TCG AAA CAA 720  
R E K L A E H E N L A K I S K Q 240

Figure 5/4

TTT GAT GCG CCG ATT GCA GCT TAT GTT TTA AAG CCG GCG GAC GAA AAT 1152  
F D A R I A A Y V L N F A D Q H 384  
CCC GCG CTG AAG GGG CTT TAT CTA AAG TAT GAC TTA CCG GTG TAT GAA 1200  
F G L K G L Y L H Y D L P V Y E 400  
GAT GTA TCT TTA AAC ACT AGA GGG TTG TTT TAT TTA AAA AAA GAA ATG 1248  
D Y S L N I R G L F Y L K K E M 416  
ATG AGA AAA ATC TTT GAG CAG GAG CAA GAA AGG TTA TTT TAT GAA ATA 1296  
M R H I F E Q E Q E R L F Y E I 432  
GAA CTT CTT TTA ACT CCA GTT CTT GCT CAA ATG GAG CAT ACC GGC ATT 1344  
E L F L T F V L A Q M E H T G I 448  
CAG GTT GAC CCG GAA GCT TTA AAA GAG ATG TCG TTA GAG CTG GGA GAG 1392  
I V D R E A L K E H E L E L F E 464  
GAA ATT GAA GAG TTA ATC CCG GAA ATT TAT GTG CTG CCG GGG GAA GAG 1440  
Q I E E L I P E I Y V L A G E E 480  
TTT AAC TTA AAC TCG CCC AGG CAG CTG GGA GTT ATT CTT TTT GAA AAA 1488  
F N L N S A P R Q L G V I L F E K 496



Figure 5/5

```

CTT GGG CTG CCG GTA ATT AAA AAG ACC AAA ACG GCG TAC TGT ACC GAT 1536
L G L P V C K K T K T G Y S T D 512
GCG GAG GTT TTG GAA GAG CTC TTG COT TTC CAC GAA ATT ATC GGC AAA 1584
A E V L E E L L P F H E E I G K 528
ATA TTG AAT TAC CGG CAG CTT ATG AAG TTA AAA TCG ACT TAT ACT GAC 1632
I L N Y R Q L M H L K S T Y T D 544
GCG TTA ATG COT TTA ATA AAT GAG COT ACC GGT AAA CTT CAC ACT ACT 1680
G L M P L I N E R T G H L H T T 560
TTT AAC CAG ACC GGT ACT TTA ACC GGA CCG CTG GCG TGT TCG GAG CCC 1728
F N Q T G T L T G R L A S S E P 576
AAT CTC CAA AAT ATT CCG ATC CCG TTG GAA CTC GGT CCG AAA TTA CCG 1776
H L Q N I F I R L E L E R H L R 592
AAG ATG TTT ATA COT TCA CCG GCG TAT GAT TAT ATT GTT TCG GCG GAT 1824
K M F I P S F G Y D Y I V S A D 608
TAT TCG CAG ATT GAA TTA AGG CTT CTT GCC CAT TTT TCG GAA GAG CCC 1872
Y S Q I E L R L L A H F S E E P 624

```

Figure 5/6

```

AAG CTT ATT GAA GGT TAC CAA AAA GGG GAG GAT ATT CAC CCG AAA ACG 1920
K L I E A Y Q K G E D I H R K T 640
GCC TCC GAG GTG TTC GGT GTA TCT TTG GAA GAA GTT ACT CCC GAG ATG 1968
A S E V F G V S L E E V T P E M 656
GCG GCT CAT GCC AAG TCG GTG AAC TTC GGC ATT GTT TAT GGC ATT AGT 2016
R A H A K S V H F G I V Y G I S 672
GAT TTT GGT TTA GGC AGA GAC TTA AAG ATT CCC CCG GAG GTT GCC GGT 2064
D F G L G R D L K I P R E V A G 688
AAG TAC ATT AAA AAT TAT TTT GCC AAC TAT CCC AAA GTG CCG GAG TAT 2112
K Y I K N Y F A N Y P K V R E Y 704
CTC GAT GAA CTT GTC COT ACG GCA AGA GAA AAG GSA TAT GTG ACC ACT 2160
L D E L V R T A R E K G Y V T T 720
TTA TTT GGG CGA AGA CCG TAT ATT COT GAG CTA TCT TCA AAA AAC CCG 2208
L F G R R R Y I P E L S S K M R 736
ACG GTT CAG GGT TTT GGC GAA AGG ACG GCC ATG AAT ACT CCC CTT CAG 2256
T V Q G F G E R T A M N T P L Q 752

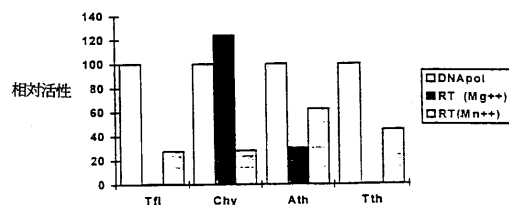
```

Figure 5/7

```

GGC TCG GCT GCC GAT ATT ATT AAG CTT GCA ATG ATT AAT GTA GAA AAA 2304
G S A A D I I K L A M I N V E K 768
GAA CTT AAA GCC CGT AAG CTT AAG TCC CCG CTC CTT CTT TCG GTG CAC 2352
E L K A R K L K S R L L L S V H 784
GAT GAG TTA GTT TTA GAA GTG CCG GCG GAA GAG CTC GAA GAG GTA AAA 2400
D E L V L E V P A E E L E E V K 800
GCG CTG GTA AAA GGG GTT ATG GAG TCG GTG GTT GAA CCG AAA GTG CCT 2448
A L V K G V M E S V V E L K V P 816
TTA ATC GGT GAA GTT GGT GCA GGC AAA AAC TGG TAT GAA GCG AAG TAA 2496
L I A E V G A G K N W Y E A K 831

```

【図 6】  
Figure 6:

## フロントページの続き

- (72)発明者 スヴェトリヒニー, ヴィタリー  
ドイツ連邦共和国 デー 9 5 4 4 8 ベイレウス, ウォーメンステイナハヤー シュトラーセ  
9 1 ジー
- (72)発明者 シュミッツ アゲグイアン, ガドラム  
ドイツ連邦共和国 デー 8 2 3 4 7 ベルンリエド, ウェテルSTEINシュトラーセ 3
- (72)発明者 ライセル, アストリッド  
ドイツ連邦共和国 デー 8 2 3 8 7 アントドルフ, シュライエル ヴェグ 2 0
- (72)発明者 アンジェリア, ベルンハード  
ドイツ連邦共和国 デー 8 3 0 2 4 ローゼンハイム, シューツェンシュトラーセ 2 0
- (72)発明者 エベンビシュラー, クリスティン  
ドイツ連邦共和国 デー 8 2 3 8 7 アンドルフ, ドルフシュトラーセ 5
- (72)発明者 ロウェ, フランク  
ドイツ連邦共和国 デー 8 2 3 9 6 フェアル, シーシュトラーセ 1 6
- (72)発明者 ボンク オスモロヴスカヤ, エリザヴェータ  
ロシア連邦国 1 1 7 1 9 2 モスクワ, 3 3 2 6 0, ロモノソフスキー アベニュー

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 1 0 6 4 0 (WO, A 1)  
Nucleic Acids Res. (1993) vol.21, no.4, p.787-802

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)  
C12N 15/00 - 15/90  
PubMed  
BIOSIS/WPI (DIALOG)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/Geneseq