

(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.C1.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K	1/16	(2006.01)	C 07 K	1/16	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N	9/12	(2006.01)	C 12 N	9/12	
C 12 Q	1/68	(2006.01)	C 12 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  
ムベーハー  
ドイツ連邦共和国 ティー—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, ワルトラウド  
ドイツ連邦共和国 ティー—82377  
ベンツベルク, オペランガー 18  
マルカウ, ウルスラ  
ドイツ連邦共和国 ティー—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 ヒドロゲノホルマンス由来の熱安定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 ヒドロゲノホルマ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 ヒドロゲノホルマ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。 10

## 【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の增幅方法。

## 【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ス (*Carboxydothermus 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。さちに、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鑄型から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)。いくつかの生物においては、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. 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、RNアーゼH-活性を有するという欠点を有する。この活性は、逆転写反応中に鑄型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鑄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、マンガンイオンの存在下においてのみ逆転写酵素活性を示す。マンガンイオンの存在下ではポリメラーゼは低い忠実度で鑄型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、よって鑄型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、

- ・高温で作用して鑄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を产生させ、
- ・高い忠実度でRNA鑄型から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产生するために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ス (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スの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スの熱安定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ス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 Zenllkulturen 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「実質的にまたは实际上」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錆型からの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スは、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スの試料は、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ス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.ヒドロゲノホルマン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の直線グラジェントを用いて行う。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-トヨーパール(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ェントで溶出する。活性を含むプールを透析し、再びD E A E -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の直線グラジェントで溶出する。第4のカラムにはトリス-アクリル-ブルー(Biosepra)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マンスからの組換え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dTTP(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「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マンスDNAポリメラーゼは、図1に示されているようにマンガンイ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

20

20

30

40

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. filiformis* (*T. filiformis*)、*A. thermophilum* (*A. thermophilum*) および逆転写に最も一般的に用いられている*T. thermophilus* (*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、原鉄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<sup>2+</sup>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。  
10

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ことである。

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンスDNAポリメラーゼの組換え体の产生には、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™ 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。鉄型としては、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。  
20  
30  
40

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 / 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、適當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產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 ヒドロゲノホルマ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 ヒドロゲノホルマ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 ヒドロゲノホルマ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當なベクターとしては、例えは、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、例えは、ラムダgt<sup>11</sup> (Promega)、ラムダDash (Stratagene)、ラムダZap<sup>II</sup> (Stratagene) が挙げられる。プラスミドとしては、例えは、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 pETIIC (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 ヒドロゲノホルマンス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.3134  
3)、BL21(DE3)pUBS520(Brinkmann, U.ら(1989)Gene 85, 109-114)およびBL21(DE  
3)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)Nu  
cleic 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  
度増殖させ、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  
。これらの方針としては、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を产生す  
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、pBR3  
22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 Laborator  
y Manual(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ニューヨーク)pp.28  
0-281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マンス由来の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マンス由来の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可  
能である。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マンス由来の  
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  
ヒドロゲノホルマンス由来のDNAポリメラーゼの使用により、以前、各ステップに対し  
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ス由来の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の增幅を、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ス由来の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ス由来の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ス由来の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<sup>o</sup>C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プロットし、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ス由来の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ス由来の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、鋸型DNAの12bp5'突出部 (overhang) を残したままの34mer鋸型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ス、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、ナイロン膜にプ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ス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ス、アナエロセラム サーモフィラム (*Anaeroceatum 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<sup>++</sup> (5 mM) の存在下での逆転写酵素活性、およびMn<sup>++</sup> (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 μgのプラスミドDNAを、パラフィン油で上を被った50 μl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<sup>o</sup>C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 μgを、100 μl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：3μgのMS2RNAを、20μl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、MOPSゲル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の取り込み、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2μl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; 5mMのMgCl<sub>2</sub>; 10mMの2-メルカプトエタノール; 33μMのdNTP; 200μg/mlのBSA; 12μgの子ウシ胸腺由来のDNAアーゼI活性化DNAおよび0.036μMのジゴキシゲニン-dNTPを含む、50μl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2μl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。8μlの5M NaClおよび150μl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100μlの70%エタノール(予め-20℃に冷却したもの)および0.2M NaClで洗浄し、再び遠心分離して減圧乾燥する。

ペレットを50μlのトリス-EDTA(10mM/0.1mM; pH7.5)に溶解する。5μl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、100μlの0.45μm-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。洗浄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100μl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200μlの洗浄緩衝液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)で洗浄する。さらに2回減圧下で、それぞれ200μlの洗浄緩衝液2(10mMのトリス-HCl、100mMのNaCl、50mMのMgCl<sub>2</sub>、pH9.5)で洗浄した後、ウェルを洗浄緩衝液2で1:100に希釈した50μl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, Wildbad, 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：1μgのポリdT-(dT)<sub>15</sub>、33μMのdTTP、0.36μMのジゴキシゲニン-dUTP、200mg/mlのBSA、10mMのトリス-HCl、pH8.5、20mMのKCl、5mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTT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

10

20

30

40

50

### 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 μM) 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 μg 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、50 mM 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 μM の dATP を含む同緩衝液中で 4 時間攪拌せずに一晩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 μM の dATP、dCTP、dTTP、8 μM の dGTP および 4 μM 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 °C、45 °C、55 °C、65 °C、および 72 °C 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 を接触プロッティングまたはキャピラリープロッティング (15 × S SC, 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 ~ 105 kDa 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. Freeman & 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鑄型に適合し、プライ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鑄型 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 μM まで低減されており、活性化子ウシ胸腺 DNA が 500 fMol プライマーまたは鑄型 / 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 (50mM のトリス - HCl、pH8.4；12.5 mM の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；10 mM の KCl；5 mM の MgCl<sub>2</sub>；10 mM 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、

10

20

30

30

40

50

### 配列番号8 : Dig-GCATGGATCCCACTGCCAGGG(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鑄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10μl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；プ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60V、2000Vで2.5時間行う。

分離後、DNAを、30分間の接触プロッティングによって正荷電ナイロン膜(Boehringer Mannheim)上に移す。DNAを120mJのUV照射(Stratalinker, Stratagene)によって膜に架橋する。膜を、プロッキング溶液(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分間プロックし、ジゴキシゲニン-標識プライマー-DNAをプロッキング溶液で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.1093274)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>-ソルビタン-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、1μg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50μl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断片を臭化工チジウムを含む1%アガロースゲル上で分離した。dNTPの存在下では、DNA断片のヌメアが検出されるか、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

カルボキシドテルムスヒドロゲノホルマンスDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング  
カルボキシドテルムスヒドロゲノホルマンスからの染色体DNAの調製

カルボキシドテルムスヒドロゲノホルマンスのバイオマス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、50μg/mlのRNアーゼA)に再懸濁し、その後1mlの20% SDSおよび50μl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の增幅

PCR技術によるカルボキシドテルムスヒドロゲノホルマンスのDNAポリメラーゼをコードする遺伝子の增幅のために、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'

P C R 増幅を、カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンス由来の750ngのゲノム D N A 、10mMのトリス - HCl、pH8.8、2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、50mMのKCl、200 μ M の d N T P 、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100 μ l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™ 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D N A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)P C R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P C R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った。カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンス由来の5 μ gのゲノムD N Aを、製造業者の仕様書(Boehringer Mannheim GmbH)にしたがってEcoR I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D N Aを遠心分離によって回収した。

環化のために、消化D N Aをライゲーション緩衝液(Boehringer Mannheim GmbH, FRG)で50ng / μ lの濃度まで希釈した。ライゲーション反応を、T4 D N Aリガーゼ(Boehringer Mannheim GmbH, FRG)を0.2単位 / μ l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D N Aをエタノールで沈殿させ、遠心分離によって回収した。

P C R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) D M S O、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D N A、50pmolの各プライマー、500 μ M のd N T P および0.75 μ lの酵素混合物(Expand Long Template PCR System, Boehringer Mannheim GmbH)を含む50 μ l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：

1 × 92°C、2分間の鋳型の変性

10×

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

10

20×

92°C、10秒間の変性
64°C、30秒間のアニーリング
68°C、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。

20

PCRを、鋳型としてカルボキシドテルムスヒドロゲノホルマンス由来の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'

30

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択した。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-プロス中で増殖させ、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-プロス中で増殖させ、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マンス由来のDNAポリメラーゼを発現する組換え体が得られた。この株は、E.coli AR96

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"

( xi ) 配列 :

**CCNAAYYTNC ARAAYATH**

10

**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 :

**GGGCAGAAC 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

( iii ) 配列の種類 : 他の核酸

( A ) 記載 : /desd = "oligonucleotide"

( xi ) 配列 :

**CGAATTCAAT CCATGGGAAA AGTAGTCCTG GTGGAT**

36

配列番号 : 6 :

( i ) 配列の特色 :

( A ) 配列の長さ : 3 6 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

10

( D ) トポロジー : 直鎖状

( iii ) 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 : 2 4 9 6 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

20

( D ) トポロジー : 直鎖状

( iii ) 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 . . 2 4 9 6

( xi ) 配列 :

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

45

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

90

30

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

135

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

180

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 Gin 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  
 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  
 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 Lys Ile Lys Lys Glu Tyr Gln Glu Gly Lys Asp Leu Val Gln Val 290 295 300	900
GAA ACT GTA GAA ACG GAA GGA CAG ATT GCA GTA GTT TTT AGT GAT Glu Thr Val Glu Thr Glu Gly Gln Ile Ala Val Val Phe Ser Asp 305 310 315	945
GGA TTT TAT GTT GAT GAC GGG GAA AAA ACA AAG TTT TAC TCT TTA Gly Phe Tyr Val Asp Asp Gly Glu Lys Thr Lys Phe Tyr Ser Leu 320 325 330	990
GAC CGG CTG AAT GAA ATA GAG GAA ATA TTT AGG AAT AAA AAA ATT Asp Arg Leu Asn Glu Ile Glu Glu Ile Phe Arg Asn Lys Lys Ile 335 340 345	1035
ATT ACC GAC GAT GCC AAA GGA ATT TAT CAT GTC TGT TTA GAA AAA Ile Thr Asp Asp Ala Lys Gly Ile Tyr His Val Cys Leu Glu Lys 350 355 360	1080
GGT CTG ACT TTT CCC GAA GTT TGT TTT GAT GCG CGG ATT GCA GCT Gly Leu Thr Phe Pro Glu Val Cys Phe Asp Ala Arg Ile Ala Ala 365 370 375	1125
TAT GTT TTA AAC CCG GCC GAC CAA AAT CCC GGC CTC AAG GGG CTT Tyr Val Leu Asn Pro Ala Asp Gln Asn Pro Gly Leu Lys Gly Leu 380 385 390	1170
TAT CTA AAG TAT GAC TTA CCG GTG TAT GAA GAT GTA TCT TTA AAC Tyr Leu Lys Tyr Asp Leu Pro Val Tyr Glu Asp Val Ser Leu Asn 395 400 405	1215
ATT AGA GGG TTG TTT TAT TTA AAA AAA GAA ATG ATG AGA AAA ATC Ile Arg Gly Leu Phe Tyr Leu Lys Lys Glu Met Met Arg Lys Ile 410 415 420	1260
TTT GAG CAG GAG CAA GAA AGG TTA TTT TAT GAA ATA GAA CTT CCT Phe Glu Gln Glu Gln Glu Arg Leu Phe Tyr Glu Ile Glu Leu Pro 425 430 435	1305
TTA ACT CCA GTT CTT GCT CAA ATG GAG CAT ACC GGC ATT CAG GTT Leu Thr Pro Val Leu Ala Gln Met Glu His Thr Gly Ile Gln Val 440 445 450	1350
GAC CGG GAA GCT TTA AAA GAG ATG TCG TTA GAG CTG GGA GAG CAA Asp Arg Glu Ala Leu Lys Glu Met Ser Leu Glu Leu Gly Glu Gln 455 460 465	1395
ATT GAA GAG TTA ATC CGG GAA ATT TAT GTG CTG GCG GGG GAA GAG Ile Glu Glu Leu Ile Arg Glu Ile Tyr Val Leu Ala Gly Glu Glu 470 475 480	1440
TTT AAC TTA AAC TCG CCC AGG CAG CTG GGA GTT ATT CTT TTT GAA Phe Asn Leu Asn Ser Pro Arg Gln Leu Gly Val Ile Leu Phe Glu 485 490 495	1485
AAA CTT GGG CTG CCG GTA ATT AAA AAG ACC AAA ACG GGC TAC TCT Lys Leu Gly Leu Pro Val Ile Lys Lys Thr Lys Thr Gly Tyr Ser 500 505 510	1530

10

20

30

40

ACC GAT GCG GAG GTT TTG GAA GAG CTC TTG CCT TTC CAC GAA ATT 1575  
 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 10  
 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  
 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 20  
 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 30  
 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  
 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 40  
 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

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 GGC 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 20  
 Asn Trp Tyr Glu Ala Lys \*  
     830

配列番号 : 8 :

( i ) 配列の特色 :

- ( A ) 配列の長さ : 831 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

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 10  
 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 20  
 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 30  
 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 40  
 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

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 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

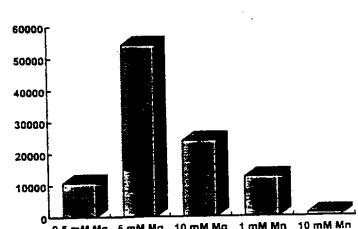
Asn Trp Tyr Glu Ala Lys \*  
830

10

20

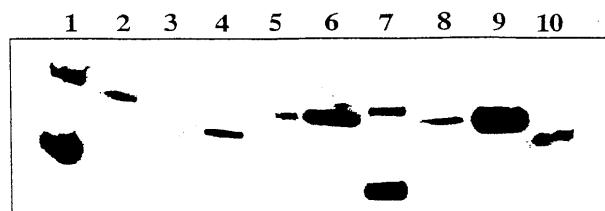
【図1】  
Figure 1:

RLU



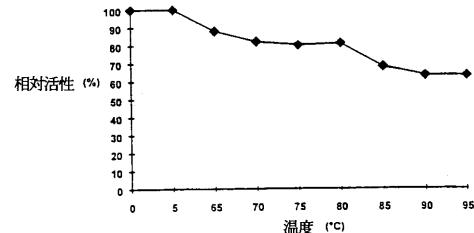
【図2】  
Figure 2:

カルボキシドテルムス ヒドロゲノホルマンス由来の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



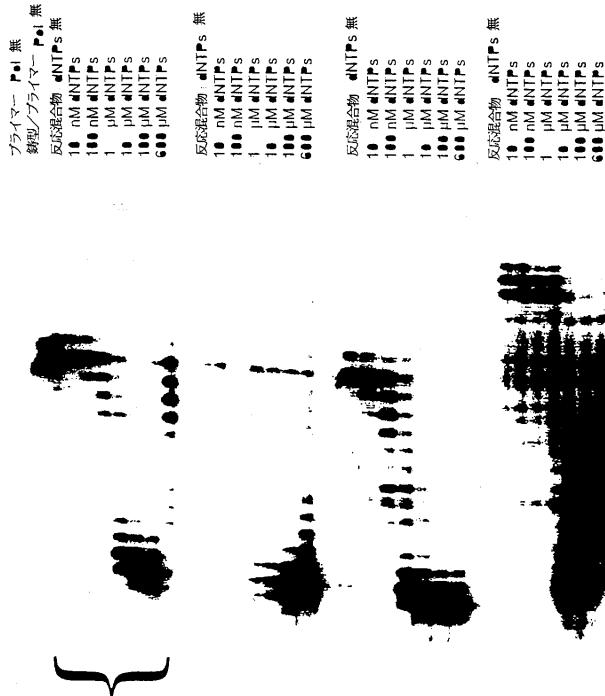
- 1: E.coli pol I (20U) + クレノウフラグメント (10U)
- 2: C.ヒドロゲノホルマンス由來の細胞抽出物 (2μl)
- 3: Chy ポリメラーゼ, rec. (7U)
- 4: Taq ポリメラーゼ (20U)
- 5: C.ヒドロゲノホルマンス由來の細胞抽出物 (2μl)
- 6: Chy polymerase, rec. (14U)
- 7: E.coli pol I (10U) + クレノウフラグメント (5U)
- 8: C.ヒドロゲノホルマンス由來の細胞抽出物 (4μl)
- 9: Chy ポリメラーゼ, rec. (70U)
- 10: Taq 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

【図3】  
Figure 3:



【図4】

Figure 4:



## 【図5】

Figure 5/1:

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

ATG GGA AAA GTA GTC CGG GTG GAT GGA AAT AGT TTA TTA CAT AGA GCG 48  
M G H L S R A F A G Q S H E V Y 128  
TTT TTT GGC CTT CGG CGG TTA AAA ACT ACT AAA GGA GAG CCT ACC GGG 96  
E F A L P F L K T T K S E P T G 32  
GGG GTT TAC GGG TTT TTA AGC ATG CTT TTT CGG STA ATA AAA GAT GAA 144  
A V Y G F I T M L F R V I K D E 48  
AAA CCC GAA TAT TTA CGG GTA GCT TTT GAT ATT AGC CGG AAA ACT TTT 192  
K P E Y L A V A F D I S R K T F 64  
CGT ACC GAG GAG TTT ACT GCA TAC AAA GGG CAC CGG AAA GAA GCG CGG 240  
R T E Q F T A Y K G R R K E A P 80  
GAT GAG CTT GCA CGG CGG TTT CGG GTG GTG CGG GAA STA TTA AAG GTT 288  
D E L V F I F A L V R E V L K V 96  
TTA AAT GTT CGC TAT ATT GAA CTT GAC GGT TAT GAG CGG GAT GAT ATT 336  
L N V S Y I E L D G Y E A D D I 112

Figure 5/2

ATC GGC CAC CTA TCA AGG GCT TTT CGG GGA CAA GGA CAT GAA GTG GTG 384  
I G H L S R A F A G Q S H E V Y 128  
ATT TAT ACC GCT GAC CGG GAC ATG CTG CAA TTG GAA GAT GAA AAA AGC 432  
S Y T A C 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 D V K M D 160  
TTA GCT CGG ATT TTA GAA AAC TAC GGC TTA AAG CCT AAA CGG CTT GTG 528  
L A A I L S N Y G L K F K D 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 CGG CGT AAA GAT GAG TTA AAA CCT AAA TTA 672  
S V E E V L A R K D E L K P K L 224  
AGA GAA AAG CTT CGC GAA CAC GAA AAT TTA GCA ARA ATA TCG AAA CAA 720  
R E K L A E H E N L A K I S K Q 240

Figure 5/3

TCA GCT AGA ATC CTG CGG GAA ATA CGG TTA GAA ATC TCC CGG GAA GAT 768  
L A T I L R E I P L E I S L E D 286  
TTA AAA GTT AAA GAA CCT RAT TRT GAA GAA GTT GCT AAA TTA TTT CTT 816  
L K V K E P N Y E E V A K L F L 272  
CAC CTT GAG TTT AAA AGC TTT TTA AAA GAA ATC GAA CGA AAA ATA AAG 864  
H L E F K S F L K E I E P K I K 288  
AAA GAA TAC CAG GAA GGT AAA GAT TTG GTG CAA GTT GAA ACT GAA GAA 912  
K E Y Q E G K D L V Q W 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 CGG CTG AAT GAA ATA 1008  
D G E K T H F Y S L D R L H E I 336  
GAG GAA ATA TTT AGG AAT AAA AAA ATT ATT ACC GAC CAT GGC 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 CGC GAA GTT GTT 1104  
I Y H V C L E K G L T F P E V C 368

Figure 5/4

TTT GAT CGG CGG ATT GCA GGT TAC CGG CCT TTA AAC CGG CGG GAC CAA ATT 1152  
F D A R I A A Y V L H F A D D H 384  
CGG CGG CGT AAG CGG CCT TAT GCA AAG TAT GAC TTA CGG GTG TAT GAA 1200  
P G I K G L V L K V D L P V Y E 400  
GAT STA TCT TTA AAC ATT AGA GGG TTG TTG TAT TTA AAA AAA GAA ATG 1248  
D V S L H I R G L F V L K K E M 416  
ATG AGA AAA ATC TTT GAG CAG GAG CGA GAA AGG TTA TTT TAT GAA ATA 1296  
M R K I F E Q E Q E R L F Y E I 432  
GAA CTT CCT TTA ACT CGA GTT CCT GCT CGA ATG GAG CAT ACC CGC ATT 1344  
E L P L T F V L A Q M E H T G I 448  
CAG CTT GAC CGG GAA GGT TTA AAA GAG ATG TCG TTA GAG CGG CGA GAG 1392  
I V S R A S A L H E N E L E L T E 464  
GAA ATT GAA GAG TTA ATG CGG GAA ATT TAT GTG CGG CGG GAA GAG 1440  
D I E E L I P E I Y V L A G E E 480  
TTT AAC TTA AAC TCG CGG AGG CGG CTG CGA GTT ATT CCT 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

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

Figure 5/6

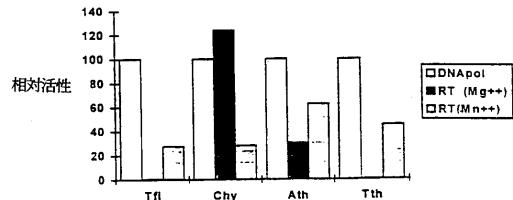
AAG CCT ATT GAA GCT TAC CAA AAA GGG GAG GAT ATT CAC CGG AAA ACG 1920  
 K L I E A V Q K G E D I H R K T 640  
 CGC TCC GAG GTG TTC GGT GTA TCT TTG GAA GAA GTT ACT CCC GAG ATG 1968  
 A S E V F S V S L E E V T P E M 656  
 CGC GCT CAT GCC AAG TCG GTG AAC TTC GGC ATT GTT TAT GGC ATT AGT 2016  
 R A H A K S V H F G I V Y G I S 672  
 GAT TTT GGT TTA GGC AGR GAC TTA AAG ATT CCC CGG GAG GTT GCC GGT 2064  
 D F G L G R D I K I P R E V A G 688  
 AAG TAC ATT AAA AAT TAT TAT TTT GCC AAC TAT CCC AAA GTG CGG GAG TAT 2112  
 K Y I K N Y F A N Y P K V R E Y 704  
 CTC GAT GAA CCT GTC CGT ACG GCA AGA GAA AAG GSA TAT GTG ACC ACT 2160  
 L D E L V R T A R E K S V V T T 720  
 TTA TTT GGG CGA AGA CGC TAT ATT CCT GAG CTA TCT TCA AAA AAC CGC 2208  
 L F G R R R Y I P E L S S K N R 736  
 ACG GTT CAG GGT TTT GGC GAA AGG ACG GGC 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 GCG GAT ATT ATT AAG CCT GCA ATG ATT ATT GTC GAA AAA 2304  
 G S A A D I I K L A M I N V E K 768  
 GAA CCT AAA GCC CGT AAG CCT AAG TCC CGG CTC CCT CCT TCG GTG CAC 2352  
 E L K A R K L K S R L L S V H 784  
 GAT GAG TTA GTT TTA GAA GTG CGG CGG GAA GAG CTC GAA GAG GTG 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 CTC AAA GTG CCT 2448  
 A L V K G V M E S V V E L K V P 816  
 TTA ATC GCT 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 ディー 95448 ベイレウス, ウォーメンステインハイマー シュトラーセ  
　　91ジー

(72)発明者 シュミツツ アゲグイアン, ガドラム  
　　ドイツ連邦共和国 ディー 82347 ベルンリエド, ウェテルスティンシュトラーセ 3

(72)発明者 ライセル, アストリッド  
　　ドイツ連邦共和国 ディー 82387 アントドルフ, シュライエル ヴェグ 20

(72)発明者 アンジェリア, ベルンハード  
　　ドイツ連邦共和国 ディー 83024 ローゼンハイム, シューツエンシュトラーセ 20

(72)発明者 エベンビシュラー, クリストイン  
　　ドイツ連邦共和国 ディー 82387 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 ディー 82396 フェアル, シーシュトラーセ 16

(72)発明者 ボンク オスマロヴスカヤ, エリザヴェータ  
　　ロシア連邦国 117192 モスクワ, 33 2 60, ロモノソブスキー アベニュー

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 國際公開第96/010640 (WO, A1)  
Nucleic Acids Res. (1993) vol.21, no.4, p.787-802

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

PubMed

BIOSIS/WPI (DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq