(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6478441号
(P6478441)
(45)発行日　平成31年3月6日(2019.3.6)　(24)登録日　平成31年2月15日(2019.2.15)

(51)Int.Cl.			F I		
C12Q	1/34	(2006.01)	C12Q	1/34	ZNA
C12N	9/16	(2006.01)	C12N	9/16	A
C12N	15/10	(2006.01)	C12N	15/10	200

請求項の数 6　(全 73 頁)

(21)出願番号	特願2012-552141 (P2012-552141)
(86)(22)出願日	平成23年2月7日(2011.2.7)
(65)公表番号	特表2013-518596 (P2013-518596A)
(43)公表日	平成25年5月23日(2013.5.23)
(86)国際出願番号	PCT/US2011/023944
(87)国際公開番号	WO2011/097590
(87)国際公開日	平成23年8月11日(2011.8.11)
審査請求日	平成26年2月4日(2014.2.4)
審判番号	不服2017-10892 (P2017-10892/J1)
審判請求日	平成29年7月21日(2017.7.21)
(31)優先権主張番号	61/301,666
(32)優先日	平成22年2月5日(2010.2.5)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	61/387,800
(32)優先日	平成22年9月29日(2010.9.29)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　591021970
ニュー・イングランド・バイオレイブス・インコーポレイテツド
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１９３８、イプスウイツチ、カウンテイ・ロード・２４０
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ジユウ，ジエンユイ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１９１５、ビバリー、ゴールドスミス・アベニユー・２１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高忠実度制限エンドヌクレアーゼ

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
制限エンドヌクレアーゼ及びその変異体の忠実度指数（ＦＩ）の同定方法であって、
反応バッファーと、制限エンドヌクレアーゼの結合及び切断部位を含むＤＮＡ基質を選択する段階と；
順次希釈した制限エンドヌクレアーゼ又はその変異体にＤＮＡ基質を切断させる段階と；
制限エンドヌクレアーゼ及びその１種以上の変異体の各々のＦＩを求める段階と
を含み、
変異体が、所定バッファー中において前記所定バッファー中における前記変異を有さない酵素よりも高いＦＩをもち、
前記制限エンドヌクレアーゼが、ＭｌｕＩ制限エンドヌクレアーゼであり、前記変異体がＥ１１２及びＲ１３２位に変異を有する配列番号２８のアミノ酸配列を含む、方法。
【請求項２】
更に制限エンドヌクレアーゼとその変異体のＦＩを比較し、変異体の改善倍率を得る段階を含む請求項１に記載の方法。
【請求項３】
改善倍率が２を上回る請求項２に記載の方法。
【請求項４】
反応バッファーが酢酸カリウム、トリス酢酸、及び酢酸マグネシウム又は塩化マグネシ

ウムを含む請求項１に記載の方法。
【請求項５】
Ｅ１１２及びＲ１３２位に変異を有する配列番号２８のアミノ酸配列を含む酵素を含む組成物であって、変異酵素が所定バッファー中において前記所定バッファー中における前記変異を有さない酵素よりも高いＦＩをもつ組成物。
【請求項６】
変異がＥ１１２Ａ及びＲ１３２Ａである、請求項５に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
制限エンドヌクレアーゼは２本鎖ＤＮＡを配列特異的に切断する酵素である（Ｒｏｂｅｒｔｓ，Ｒ．Ｊ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０２：５９０５－５９０８（２００５）；Ｒｏｂｅｒｔｓ，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３１：１８０５－１８１２（２００３）；Ｒｏｂｅｒｔｓ，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３３：Ｄ２３０－２３２（２００５）；Ａｌｖｅｓ，ｅｔ ａｌ．Ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ Ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ，“Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ Ｅｎｚｙｍｅｓ，”ｅｄ．Ｐｉｎｇｏｕｄ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ Ｂｅｒｌｉｎ Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，３９３－４０７（２００４））。これらは原核生物に遍在しており（Ｒａｌｅｉｇｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ｇｅｎｏｍｅｓ Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｃｈ．８，ｅｄｓ．Ｄｅ Ｂｒｕｉｊｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｈａｐｍａｎ ＆ Ｈａｌｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，７８－９２（１９９８））、主にエンドヌクレアーゼとメチルトランスフェラーゼから構成される制限修飾系の一部を形成している。系のメチルトランスフェラーゼは対を成すエンドヌクレアーゼが認識する配列と同一の特定配列をメチル化し、修飾されたＤＮＡをエンドヌクレアーゼによる切断に対して耐性にし、宿主ＤＮＡを適切に防御することができる。他方、外来ＤＮＡ、特にバクテリオファージＤＮＡの侵入があると、外来ＤＮＡは完全にメチル化される前に分解される。制限修飾系の主要な生物学的機能は宿主をバクテリオファージ感染から防御することである（Ａｒｂｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０５：３６１－３６５（１９７９））。組換えと転位への関与等の他の機能も示唆されている（Ｃａｒｌｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，２７：６７１－６７６（１９９８）；Ｈｅｉｔｍａｎ，Ｇｅｎｅｔ Ｅｎｇ（Ｎ Ｙ）１５：５７－１０８（１９９３）；ＭｃＫａｎｅ，ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １３９：３５－４３（１９９５））。
【０００２】
制限エンドヌクレアーゼは約３，０００種が知られており、２５０種を越えるその異なる標的配列に対する特異性をその最も興味深い特徴であるとみなすことができる。最初の制限エンドヌクレアーゼの配列特異性（Ｄａｎｎａ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ６８：２９１３－２９１７（１９７１）；Ｋｅｌｌｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５１：３９３－４０９（１９７０））が発見されてから、所定の制限エンドヌクレアーゼが非最適条件下でその指定認識配列と同一ではないが、類似する配列を切断することを科学者らが発見するまでに時間はかからなかった（Ｐｏｌｉｓｋｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ，７２：３３１０－３３１４（１９７５）；Ｎａｓｒｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １４：８１１－８２１（１９８６））。この特異性のゆらぎを制限エンドヌクレアーゼのスター活性と言う。
【０００３】
スター活性は分子生物学的反応における課題である。スター活性はクローニングベクター又は他のＤＮＡに望ましくない切れ目を導入する。固有の指紋を作成するために所定のＤＮＡ基質を制限エンドヌクレアーゼにより切断する必要がある法廷用途等の場合、スタ

ー活性は切断パターンプロファイルを変化させ、分析を複雑にする。スター活性の回避は鎖置換増幅（Ｗａｌｋｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８９：３９２－３９６（１９９２））や、遺伝子発現の順次解析（Ｖｅｌｃｕｌｅｓｃｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７０：４８４－４８７（１９９５））等の用途でも重要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Ｒｏｂｅｒｔｓ，Ｒ．Ｊ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１０２：５９０５－５９０８（２００５）

【非特許文献２】Ｒｏｂｅｒｔｓ，ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３１：１８０５－１８１２（２００３）

【非特許文献３】Ｒｏｂｅｒｔｓ，ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３３：Ｄ２３０－２３２（２００５）

【非特許文献４】Ａｌｖｅｓ，ｅｔ　ａｌ．Ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　Ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ，“Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｏｆ　Ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　Ｅｎｚｙｍｅｓ，”ｅｄ．Ｐｉｎｇｏｕｄ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ　Ｂｅｒｌｉｎ　Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，３９３－４０７（２００４）

【非特許文献５】Ｒａｌｅｉｇｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂａｃｔｅｒｉａｌ　Ｇｅｎｏｍｅｓ　Ｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｃｈ．８，ｅｄｓ．

【非特許文献６】Ｄｅ　Ｂｒｕｉｊｉｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈａｐｍａｎ　＆　Ｈａｌｌ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，７８－９２（１９９８）

【非特許文献７】Ａｒｂｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０５：３６１－３６５（１９７９）

【非特許文献８】Ｃａｒｌｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，２７：６７１－６７６（１９９８）

【非特許文献９】Ｈｅｉｔｍａｎ，Ｇｅｎｅｔ　Ｅｎｇ（Ｎ　Ｙ）１５：５７－１０８（１９９３）

【非特許文献１０】ＭｃＫａｎｅ，ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１３９：３５－４３（１９９５）

【非特許文献１１】Ｄａｎｎａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　６８：２９１３－２９１７（１９７１）

【非特許文献１２】Ｋｅｌｌｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　５１：３９３－４０９（１９７０）

【非特許文献１３】Ｐｏｌｉｓｋｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，７２：３３１０－３３１４（１９７５）

【非特許文献１４】Ｎａｓｒｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　１４：８１１－８２１（１９８６）

【非特許文献１５】Ｗａｌｋｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８９：３９２－３９６（１９９２）

【非特許文献１６】Ｖｅｌｃｕｌｅｓｃｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７０：４８４－４８７（１９９５）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本発明の１実施形態では、制限エンドヌクレアーゼ及びその変異体の忠実度指数（ＦＩ）の同定方法として、反応バッファーと、制限エンドヌクレアーゼの結合・切断部位を含むＤＮＡ基質を選択する段階と；順次希釈した制限エンドヌクレアーゼ又はその変異体にＤＮＡ基質を切断させる段階と；制限エンドヌクレアーゼ及びその１種以上の変異体の各々のＦＩを求める段階を含む方法を提供する。

【０００６】
１実施形態において、前記方法は更に、制限エンドヌクレアーゼとその変異体のＦＩを比較し、変異体に例えば２倍を上回る改善倍率を得る段階を含む。
【０００７】
本発明の１実施形態では、酢酸カリウム、トリス酢酸及び酢酸マグネシウム、又は塩化マグネシウムを含む緩衝液を選択する。
【０００８】
他の実施形態を以下に挙げる。
（ａ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＳ３６、Ｋ７７、Ｐ１５４、Ｅ１６３、Ｙ１６５及びＫ１８５から構成される群から選択される前記組成物。
（ｂ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＫ１９８及びＱ１４８から構成される群から選択される前記組成物。
（ｃ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号３を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＳ１５、Ｈ２０、Ｅ３４、Ｍ５８、Ｑ９５、Ｒ１０６、Ｋ１０８、Ｔ１８１、Ｒ１８７及びＲ１９９から構成される群から選択される前記組成物。
（ｄ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号４を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＤ１６、Ｄ１４８及びＥ１３２から構成される群から選択される前記組成物。
（ｅ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号５を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＫ７５、Ｎ１４６及びＤ２５６から構成される群から選択される前記組成物。
（ｆ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号６を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＥ１９８及びＤ２００から構成される群から選択される前記組成物。
（ｇ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号７を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＫ２２９、Ｅ０２５、Ｒ０３４及びＱ２６１から構成される群から選択される前記組成物。
（ｈ）変異の位置がＫ２２５である配列番号８を含む酵素を含む組成物。
（ｉ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号９を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＨ１３７、Ｄ１７７、Ｋ３６３、Ｋ４０８、Ｒ４１１、Ｑ２１５、Ｑ２２６及びＱ２３０から構成される群から選択される前記組成物。
（ｊ）変異の位置がＦ３７６である配列番号１０を含む酵素を含む組成物。
（ｋ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１１を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＲ７８、Ｔ１４０、Ｅ１５２、Ｒ１９９及びＦ２１７から構成される群から選択される前記組成物。
（ｌ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１２を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＧ２６、Ｐ１０５、Ｔ１９５、Ｑ２１０、Ｙ１４７、Ｙ１９３、Ｋ１１４、Ｔ１９７、Ｓ２４５、Ｄ２５２及びＹ０２７から構成される群から選択される前記組成物。
（ｍ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１３を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＨ１０、Ｎ２０８、Ｋ４８、Ｋ７４、Ｒ７５、Ｙ５６、Ｋ５８及びＭ１１７から構成される群から選択される前記組成物。
（ｎ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１４を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＫ０１４、Ｑ０６９、Ｅ０９９、Ｒ１０５、Ｒ１１７、Ｇ１３５及びＹ０３５から構成される群から選択される前記組成物。
（ｏ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１５を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＮ１０６、Ｑ１６９、Ｅ３１４及びＲ１２６から構成される群から選択される前記組成物。

（ｐ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１６を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＴ２０、Ｐ５２、Ｙ６７、Ｋ６８、Ｒ７５、Ｅ８６、Ｑ９０、Ｓ９１、Ｑ９３、Ｈ１２１及びＧ１７２から構成される群から選択される前記組成物。
（ｑ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１７を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＥ０５９、Ｐ０６５、Ｓ１０８、Ｎ１７２、Ｋ１７４、Ｑ１７９、Ｇ１８２及びＹ０５５から構成される群から選択される前記組成物。
（ｒ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号１８を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置Ｎ２１２及びＬ２１３がから構成される群から選択される前記組成物。
（ｓ）Ｎ６５位に変更を有する配列番号１９を含む酵素を含む組成物。
（ｔ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２０を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＥ００７、Ｄ０１１、Ｅ０４９、Ｒ０７３、Ｒ１１４、Ｇ１３７、Ｓ２１０及びＲ２１３から構成される群から選択される前記組成物。
（ｕ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２１を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＰ０７９、Ｅ０８６、Ｈ０９６及びＥ２１８から構成される群から選択される前記組成物。
（ｖ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２２を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＥ３２、Ｓ０８１、Ｇ１３２、Ｆ６０及びＳ６１から構成される群から選択される前記組成物。
（ｗ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２３を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＧ０１３、Ｇ０１６、Ｋ０１８、Ｐ０５２、Ｒ０５３、Ｋ０７０、Ｅ０７１、Ｄ０７２、Ｇ０７３、Ｓ８４、Ｅ０８６、Ｒ０９０、Ｋ０９４、Ｒ０９５、Ｐ０９９、Ｐ１０３、Ｋ１１３、Ｎ１３５、Ｓ１５１、Ｐ１５７、Ｇ１７３、Ｔ２０４、Ｓ２０６、Ｋ２０７、Ｅ２３３、Ｎ２３５、Ｅ２３７、Ｓ２３８、Ｄ２４１、Ｋ２９５、Ｓ３０１及びＳ３０２から構成される群から選択される前記組成物。
（ｘ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２４を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＳ６４、Ｓ８０、Ｓ１６２、Ｔ７７／Ｔ９６及びＮ１７８から構成される群から選択される前記組成物。
（ｙ）Ｒ２３２位を変異させた配列番号２５を含む酵素を含む組成物。
（ｚ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２６を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＳ５０、Ｙ８１、Ｎ９３及びＷ２０７から構成される群から選択される前記組成物。
（ａａ）Ｇ２６位に変更を有する配列番号２７を含む酵素を含む組成物。
（ｂｂ）Ｅ１１２／Ｒ１３２位に変更を有する配列番号２８を含む酵素を含む組成物。
（ｃｃ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号２９を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＮ０１６、Ｓ３３、Ｐ３６、Ｈ７６、Ｐ８７、Ｎ８９、Ｒ９０、Ｔ１３８、Ｋ１４１、Ｋ１４３、Ｑ２２１、Ｑ２２４、Ｎ２５３、Ｑ２９２、Ｒ２９６、Ｔ１５２、Ｇ３２６及びＴ３２４から構成される群から選択される前記組成物。
（ｄｄ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号３０を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＫ０２４、Ｐ２１４、Ｅ１４６、Ｎ２５１及びＹ０９５から構成される群から選択される前記組成物。
（ｅｅ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号３１を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＧ０７５、Ｑ０９９、Ｇ１５５、Ｐ０２２及びＲ９０から構成される群から選択される前記組成物。
（ｆｆ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号３２を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＳ０９７及びＥ１２５から構成される群から選択される前記組成物。
（ｇｇ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号３３を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＫ０２１、Ｉ０３１及びＴ１２０から構成される群から選択される前記組成物。

（ｈｈ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号３４を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＫ７、Ｔ１０、Ｎ１１、Ｎ１４、Ｑ２３２及びＴ１９９から構成される群から選択される前記組成物。
（ｉｉ）１カ所以上のアミノ酸を変異させた配列番号３５を含む酵素を含む組成物であって、１カ所以上の変異の位置がＰ９２、Ｐ１４４、Ｇ１９７及びＭ１９８から構成される群から選択される前記組成物。
【０００９】
上記組成物のいずれも、変異酵素が所定緩衝液中において前記所定緩衝液中における非変異酵素よりも高いＦＩをもつことを更に特徴とすることができる。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１Ａ】図１Ａ及び１ＢはＰｖｕＩ－ＨＦとＰｖｕＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図１Ａ中、星（＊）印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン２）を示す。番号（＃）記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン８）を示す。ＰｖｕＩ－ＷＴの出発濃度を計算した処、７７単位であった。図１Ｂでは、レーン１５まで完全消化が認められ、その後、スター活性が認められた。完全消化を可能にする希釈窓（ｗｉｎｄｏｗ　ｏｆ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ）は希釈系列で６倍希釈から１５倍希釈まで拡大した。ＰｖｕＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、少なくとも９６００単位であった。
【図１Ｂ】図１Ａ及び１ＢはＰｖｕＩ－ＨＦとＰｖｕＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図１Ａ中、星（＊）印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン２）を示す。番号（＃）記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン８）を示す。ＰｖｕＩ－ＷＴの出発濃度を計算した処、７７単位であった。図１Ｂでは、レーン１５まで完全消化が認められ、その後、スター活性が認められた。完全消化を可能にする希釈窓（ｗｉｎｄｏｗ　ｏｆ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ）は希釈系列で６倍希釈から１５倍希釈まで拡大した。ＰｖｕＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、少なくとも９６００単位であった。
【図２Ａ】図２Ａ及び２ＢはＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦとＨｉｎｄＩＩＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図２Ａ中、星（＊）印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン９）を示す。番号（＃）記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン１５）を示す。ＨｉｎｄＩＩＩ－ＷＴの出発濃度を計算した処、９，６００単位であった。図２Ｂでは、レーン１３まで完全消化が認められ、その後、スター活性が認められる。完全消化を可能にする希釈窓は希釈系列で６倍希釈から１３倍希釈まで拡大した。ＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、少なくとも２，４００単位であった。
【図２Ｂ】図２Ａ及び２ＢはＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦとＨｉｎｄＩＩＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図２Ａ中、星（＊）印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン９）を示す。番号（＃）記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン１５）を示す。ＨｉｎｄＩＩＩ－ＷＴの出発濃度を計算した処、９，６００単位であった。図２Ｂでは、レーン１３まで完全消化が認められ、その後、スター活性が認められる。完全消化を可能にする希釈窓は希釈系列で６倍希釈から１３倍希釈まで拡大した。ＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、少なくとも２，４００単位であった。
【図３Ａ】図３Ａ及び３ＢはＤｒａＩＩＩ－ＨＦとＤｒａＩＩＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図３Ａ中、星（＊）印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン１２）を示す。番号（＃）記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン１２）を示す。スター活性も部分消化ＤＮＡも認められなかった。ＤｒａＩＩＩ－ＷＴの出発濃度を計算した処、１，２００単位であった。図３Ｂでは、レーン１２まで完全消化が認められ、その後、スター活性が認められる。ＤｒａＩＩＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、少なくとも１，２００単位であった。
【図３Ｂ】図３Ａ及び３ＢはＤｒａＩＩＩ－ＨＦとＤｒａＩＩＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図３Ａ中、星（＊）印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン１２）を示す。番号（＃）記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン１２）を示す。スター活性も部分消化ＤＮＡも認められなかった。ＤｒａＩＩＩ－ＷＴの出発濃度を計

算した処、１，２００単位であった。図３Ｂでは、レーン１２まで完全消化が認められ、その後、スター活性が認められる。ＤｒａＩＩＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、少なくとも１，２００単位であった。

【図４Ａ】図４Ａ及び４ＢはＫｐｎＩ－ＨＦとＫｐｎＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図４Ａ中、＊印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン９）を示す。＃記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン１３）を示す。図１Ａ中、ＫｐｎＩ－ＷＴの出発濃度を計算した処、２，０００単位であった。図４Ｂでは、全体に完全消化が認められ、スター活性又は部分消化は認められなかった。ＫｐｎＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、１２，０００単位を上回った。

【図４Ｂ】図４Ａ及び４ＢはＫｐｎＩ－ＨＦとＫｐｎＩ－ＷＴの活性の比較を示す。図４Ａ中、＊印はその左側でスター活性が検出されなくなるレーン（レーン９）を示す。＃記号はその右側で部分消化が生じるレーン（レーン１３）を示す。図１Ａ中、ＫｐｎＩ－ＷＴの出発濃度を計算した処、２，０００単位であった。図４Ｂでは、全体に完全消化が認められ、スター活性又は部分消化は認められなかった。ＫｐｎＩ－ＨＦの出発濃度を計算した処、１２，０００単位を上回った。

【図５Ａ】図５Ａ～５ＢはＳｔｙＩ－ＨＦとＳｔｙＩ－ＷＴの比較を示す。図５Ａ中、＊印はその左側（レーン６）でスター活性が開始することを示し、＃記号はその右側（レーン１２）で部分活性が開始することを示す。Ｓｔｙ－ＷＴの出発量を計算した処、１，０００単位であった。図５Ｂでは、最初から２レーンでスター活性が認められ、レーン１４又は１５から部分消化が認められた。ＳｔｙＩ－ＨＦの出発量を計算した処、４，０００単位であった。

【図５Ｂ】図５Ａ～５ＢはＳｔｙＩ－ＨＦとＳｔｙＩ－ＷＴの比較を示す。図５Ａ中、＊印はその左側（レーン６）でスター活性が開始することを示し、＃記号はその右側（レーン１２）で部分活性が開始することを示す。Ｓｔｙ－ＷＴの出発量を計算した処、１，０００単位であった。図５Ｂでは、最初から２レーンでスター活性が認められ、レーン１４又は１５から部分消化が認められた。ＳｔｙＩ－ＨＦの出発量を計算した処、４，０００単位であった。

【図６】ｐＸｂａを基質としてＢｇｌＩ－ＨＦとＢｇｌＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｇｌＩ－ＨＦはＦＩが少なくとも８，０００であり、ＢｇｌＩ－ＷＴはＦＩが３２であり、少なくとも２５０倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。

【図７】ｐＢＲ３２２を基質としてＢｓｒＤＩ－ＨＦとＢｓｒＤＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｓｒＤＩ－ＨＦはＮＥＢ４中のＦＩが少なくとも１，０００であり、ＢｓｒＤＩ－ＷＴはＦＩが１／２であり、少なくとも２，０００倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。

【図８】λ（ｄａｍ⁻）を基質としてＮＥＢ４中のＢｃｌＩ－ＨＦとＢｃｌＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｃｌＩ－ＨＦはＦＩが少なくとも２，０００であり、ＢｃｌＩ－ＷＴはＦＩが３２であり、少なくとも６４倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。

【図９】ｐＸｂａを基質としてＢｇｌＩＩ－ＨＦとＢｇｌＩＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｇｌＩＩ－ＨＦはＦＩが少なくとも３２，０００であり、ＢｇｌＩＩ－ＷＴはＦＩが１６であり、少なくとも２，０００倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。

【図１０】λＤＮＡを基質としてＢｓｔＥＩＩ－ＨＦとＢｓｔＥＩＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｓｔＥＩＩ－ＨＦはＦＩが少なくとも２，０００であり、ＢｓｔＥＩＩ－ＷＴはＦＩが４であり、少なくとも５００倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。

【図１１】ｐＢＣ４を基質としてＳｆｉＩ－ＨＦとＳｆｉＩ－ＷＴの比較を示す。ＳｆｉＩ－ＨＦはＮＥＢ４中のＦＩが少なくとも８，０００であり、ＳｆｉＩ－ＷＴはＦＩが６４であり、少なくとも１２０倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。

【図１２】ｐＸｂａを基質としてＳｍａＩ－ＨＦとＳｍａＩ－ＷＴの比較を示す。ＳｍａＩ－ＨＦはＦＩが少なくとも２５６，０００であり、ＳｍａＩ－ＷＴはＦＩが６４であり、少なくとも４，０００倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。
【図１３】λＤＮＡを基質としてＢｓｍＢＩ－ＨＦとＢｓｍＢＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｓｍＢＩ－ＨＦはＮＥＢ４中のＦＩが２５０であり、ＢｓｍＢＩ－ＷＴはＦＩが４であり、少なくとも６４倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。
【図１４】ｐＢＲ３２２を基質としてＢｓｔＮＩ－ＨＦとＢｓｔＮＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｓｔＮＩ－ＨＦはＮＥＢ４中のＦＩが５００であり、ＢｓｔＮＩ－ＷＴはＦＩが４であり、少なくとも１２０倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。
【図１５】λＤＮＡを基質としてＭｌｕＩ－ＨＦとＭｌｕＩ－ＷＴの比較を示す。ＭｌｕＩ－ＨＦはＮＥＢ４中のＦＩが少なくとも３２，０００であり、ＭｌｕＩ－ＷＴはＦＩが３２であり、少なくとも１，０００倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。
【図１６】ｐＵＣ１９を基質としてＮｓｐＩ－ＨＦとＮｓｐＩ－ＷＴの比較を示す。ＮｓｐＩ－ＨＦはＮＥＢ４中のＦＩが５００であり、ＮｓｐＩ－ＷＴはＦＩが３２であり、少なくとも１６倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。
【図１７】ｐＢＲ３２２を基質としてＢｓｒＦＩ－ＨＦとＢｓｒＦＩ－ＷＴの比較を示す。ＢｓｒＦＩ－ＨＦはＮＥＢ４中でＦＩが少なくとも５００であり、ＢｓｒＦＩ－ＷＴはＦＩが１６であり、少なくとも３２倍の改善倍率が得られる。右側のパネルは理論消化パターンである。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
単一配列に対する特異性を改善した制限エンドヌクレアーゼの変異体を作製するの容易なことではない。多くの問題にぶつかった。これらの問題を挙げると、変異酵素は活性が低下又は失われたり、スター活性が低下しなかったり、実際にスター活性が増加するという問題があった。あるいは、変異酵素をクローニングできないため、解析できないという問題もあった。
【００１２】
変異体を作製できないのは、考えられる種々の原因のいずれかに起因し、以下のいずれかが挙げられる。逆ＰＣＲ法の失敗が原因に考えられる。宿主細胞は通常通りに非変異制限エンドヌクレアーゼの発現に防御的な条件下では対を成すメチラーゼを発現したとしても、新規特異活性を生じた変異が宿主細胞に毒性になった可能性もある。これらの状況では、生存可能な変異体クローンは得られないであろう。あるいは、変異体が特定緩衝液に選択的であるため、別の緩衝液中で試験した場合には活性が検出されなかった可能性もある。別の問題として、一般には各変異の粗溶解液を試験しているが、場合により、溶解液中で活性が検出されず、アッセイのスコアが負になった場合には、活性を検出するために酵素を精製する必要があった。
【００１３】
意外にも、プロリンをアラニンに置換した結果、少なくとも２５０を上回る望ましいＦＩをもち、少なくとも２倍の改善倍率をもたらす変異体が得られることが数例で認められた。この例はＰｖｕＩ、ＢａｍＨＩ、ＮｒｕＩ及びＳｐｅＩの変異体であった。
【００１４】
高忠実度変異体を作製する際の他の課題として、所定の制限エンドヌクレアーゼをコードするＤＮＡの寸法も挙げられる。このＤＮＡは鋳型の寸法が大きいため、ＰＣＲにより増幅することが困難な場合がある。更に、状況により、ＰＣＲ産物は新規宿主に容易に形質転換しなかった。宿主細胞形質転換に成功したとしても、形質転換細胞は必ずしもコロニーを形成しないため、容易に検出することができなかった。場合により、形質転換からコロニーが得られたとしても、どのような条件でも培養することができなかった。

【００１５】
変異体の特異活性の低下の理由としては、変異が蛋白質の折り畳みに支障を生じ、発現レベルが著しく低下したか、又は変異が特異的酵素活性に悪影響を与えるためであると考えられる。
【００１６】
例えば、これはＳｔｙＩ変異体Ｎ３４Ａ、Ｆ３５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｆ６５Ａ、Ｋ６６Ａ、Ｋ６７Ａ、Ｆ１００Ａ、Ｎ１４８Ａ、Ｅ２１３Ａ、Ｆ２５０Ａ、Ｔ２５１Ａ、Ｄ２５８Ａ、Ｄ２６２Ａ、Ｎ２８３Ａ、Ｒ２９３Ａ、Ｆ２９４Ａ、Ｒ２９５Ａ、Ｒ２９６Ａ、Ｄ２９８Ａ、Ｄ２９９Ａ、Ｍ３０４Ａ、Ｍ３１０Ａ、Ｄ３１８Ａ、Ｓ３３７Ａ、Ｓ３４６Ａ及びＦ３７１Ａで認められた。
【００１７】
酵素活性の低下の理由としては、変異が触媒に重要な残基を欠失させたか、又は変異が折り畳みに重要な残基を置換し、誤って折り畳まれた変異体蛋白質が不活性になるためであると考えられる。
【００１８】
例えば、これはＳｔｙＩ変異体Ｍ３３Ａ、Ｄ３７Ａ、Ｆ４１Ａ、Ｄ５５Ａ、Ｄ７１Ａ、Ｎ７７Ａ、Ｒ７９Ａ、Ｅ８０Ａ、Ｆ８１Ａ、Ｔ８２Ａ、Ｅ８３Ａ、Ｆ９７Ａ、Ｆ１０１Ａ、Ｅ１３６Ａ、Ｗ１３７Ａ、Ｍ１３８Ａ、Ｍ１４０Ａ、Ｋ１４４Ａ、Ｑ１４５Ａ、Ｒ１５１Ａ、Ｒ２５５Ａ、Ｒ２５９Ａ、Ｓ２６１Ａ、Ｔ２６４Ａ、Ｆ２７８Ａ、Ｒ２８１Ａ、Ｔ２８４Ａ、Ｍ２９７Ａ、Ｈ３０５Ａ、Ｎ３０６Ａ、Ｄ３１４Ａ、Ｄ３３８Ａ及びＥ３８２Ａで認められた。
【００１９】
高忠実度変異体を作製するには骨の折れる作業が必要である。複数の変異体を選択及び試験し、高忠実度を示すのは比較的少数のみである。どの変異体が改善された特性を示す可能性が高いかを外挿法により予測することはできなかった。
【００２０】
制限エンドヌクレアーゼの高忠実度変異体を同定するために実施したアッセイの例を図１～１７に示す。これらの図は野生型と高忠実度変異体の双方について単一緩衝液中の結果を示す。全図は三角形の方向に酵素濃度を低下させ、ゲル上で左から右に向かって２倍系列希釈後のＤＮＡの切断の量と型を示す。表１は例証した３３種の酵素の結果を詳細に示す。実施例で使用した制限エンドヌクレアーゼ反応バッファー（バッファー１～４）は例えばＮＥＢカタログ（２００９／１０）に記載されている。使用者の好みに従い、他の緩衝液を選択してもよい。
【００２１】
アッセイは、スター活性に結び付けられるバンドの存在により判定した場合に明白なスター活性を示さないための最高制限酵素濃度と、標準ＮＥＢバッファー中で指定温度にて１時間５０μｌ反応容量で標準ＤＮＡ基質１μｇを完全に消化する制限酵素濃度の比であるＦＩを求める。図６～１７では、スター活性バンドを示すために図面中に囲み枠を記入する。本発明の１実施形態において、ＦＩは例えば、好ましくは少なくとも２５０、例えば＞５００、例えば＞１０００、例えば＞５０００である。
【００２２】
変異体のＦＩを非変異体酵素のＦＩで割った比として忠実度改善値を計算する。本発明の１実施形態において、改善値は例えば好ましくは少なくとも２、例えば少なくとも４、例えば少なくとも８、例えば少なくとも１６である。
【００２３】
１実施形態において、ＦＩは明白なスター活性を示さないための最高制限酵素量と、標準ＮＥＢバッファー中で特定温度にて１時間５０μｌ反応容量で標準ＤＮＡ基質１μｇを完全に消化する量の比を意味する。
【００２４】

【表１】

表１：ＨＦ酵素の性質の一覧

酵素	基質	FI1′	FI2′	FI3′	FI4′	実施例	配列番号
PvuI-HF	pXba	≥2000(1/8)	≥16000(1)	≥4000(¼)	≥ 16000(1)	1	1
HindIII-HF	λ	≥260000(½)	≥260000(½)	≥250(1/2000)	≥520000(1)	2	2
DraIII-HF	λ	≥120(1/16)	≥1000(½)	≥32(1/64)	≥2000(1)	3	3
KpnI-HF	pXba	≥1000000(1)	≥1000000(1)	≥30000(1/500)	≥1000000(1)	4	4
StyI-HF	λ	≥4000(½)	2000(1)	≥16(1/250)	4000(½)	5	5
BsaJI-HF	pBR322	≥1000(¼)	≥4000(1)	≥4000(1)	≥4000(1)	6	6
BsaWI-HF	pXba	8(1/64)	120(1)	≥120(1))	≥4000(1)	7	7
BglI-HF	λ	≥4000(½)	≥8000(1)	≥500(1/16)	≥8000(1)	8	8
BsrDI-HF	pBR322	≥120(1/8)	≥500(1)	≥64(1/16)	≥1000(1)	9	9
NsiI-HF	pXba	≥250(1/32)	≥1000(1/8)	≥500(1/16)	≥8000(1)	10	10
DpnII-HF	λ(−)	4000(¼)	2000(1/8)	64(1/128)	8000(1)	11	11
BclI-HF	λ(−)	≥250(1/32)	≥500(¼)	≥32(1/64)	≥2000(1)	12	12
BglII-HF	pXba	≥8000(1/8)	≥128000(1)	2000(½)	≥32000(¼)	13	13
BstEII-HF	λ	≥64(1/32)	≥1000(½)	≥32(1/64)	≥2000(1)	14	14
BanII-HF	λ(−)	≥4000(1)	≥2000(½)	≥500(1/8)	≥2000(½)	15	15
PspGI-HF	pBC4	≥1000(¼)	≥4000(1)	≥4000(1)	≥4000(1)	16	16
SpeI-HF	T7	≥4000(½)	≥250(1/8)	≥120(½)	≥1000(1)	17	17
BsmAI-HF	FX174	≥4000(1)	≥2000(½)	≥500(1/8)	≥4000(1)	18	18

BstXI-HF	λ	≥500(½)	≥1000(1)	≥500(1/2)	≥1000(1)	19	19
SfiI-HF	pBC4	250(½)	≥1000(1/8)	≥32(1/250)	≥8000(1)	20	20
PmeI-HF	pXba	≥2000(1/8)	≥500(1/16)	≥32(1/250)	≥8000(1)	21	21
SmaI-HF	pXba	≥2000(1/500)	≥32000(1/32)	≥32(1/32000)	≥256000(1)	22	22
AatII-HF	pXba	NC	NC	NC	≥1000(1)	23	23
ApoI-HF	pXba	≥2000(½)	≥4000(1)	≥1000(¼)	≥2000(½)	24	24
BsmBI-HF	λ	32(½)	120(½)	≥120(½)	250(1)	25	25
BmtI-HF	pXba	25600(¼)	25600(¼)	2000(1/500)	1000000(1)	26	26
BstNI-HF	pBR322	≥120(½)	≥500(1)	≥120(¼)	500(1)	27	27
MluI-HF	λ	≥16000(½)	≥32000(1)	≥2000(1/16)	≥32000(1)	28	28
BanI-HF	λ	≥1000(½)	≥250(1/8)	≥250(1/8)	≥2000(1)	29	29
KasI-HF	pBR322	≥8000(½)	≥16000(1)	≥2000(1/8)	≥16000(1)	30	30
NruI-HF	λ	≥64(1/250)	≥1000(1/16)	≥100(1/16)	≥16000(1)	31	31
NspI-HF	pUC19	≥4000(1)	500(1)	≥250(1/8)	500(1)	32	32
BsrFI-HF	pBR322	≥500(1)	≥64(1/8)	>100	≥500(1)	33	33

【００２５】
希釈剤（Ｄｉｌ）Ａ、Ｂ及びＣとバッファー１～４はＮＥＢカタログ２００９／１０、８７頁に記載されている。
【００２６】
本願に引用する全文献と、２０１０年２月５日付け米国仮出願第６１／３０１，６６６号及び２０１０年９月２９日付け米国仮出願第６１／３８７，８００号は本願に援用する。
【実施例】
【００２７】
［実施例１］
高忠実度（ＨＦ）ＰｖｕＩの作製
１．ＰｖｕＩの発現
各々ＰｖｕＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＰｖｕＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＰｖｕＩＭで形質転換した大腸菌でＰｖｕＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。
【００２８】
２．ＰｖｕＩ－ＨＦの変異誘発
７位、８位、１１位、１２位、１６位、１７位、２０位、２１位、２２位、２３位、２

６位、２８位、２９位、３０位、３１位、３４位、３５位、３６位、３８位、４０位、４２位、４４位、４５位、４６位、４８位、４９位、５３位、５５位、５７位、５９位、６１位、６３位、６５位、６６位、６７位、６９位、７０位、７１位、７２位、７３位、７７位、７８位、８０位、８１位、８２位、８７位、８８位、９０位、９２位、９３位、９６位、９７位、１０１位、１０２位、１０４位、１０６位、１０７位、１０８位、１０９位、１１０位、１１１位、１１５位、１１６位、１１９位、１２０位、１２１位、１２２位、１２６位、１２７位、１２９位、１３１位、１３２位、１３５位、１３８位、１３９位、１４４位、１４６位、１４７位、１４８位、１５０位、１５１位、１５２位、１５４位、１５５位、１５７位、１５８位、１６０位、１６１位、１６２位、１６３位、１６７位、１６９位、１７０位、１７２位、１７３位、１７４位、１７８位、１８０位、１８２位、１８３位、１８４位、１８５位、１８６位、１８７位、１８９位、１９２位、１９４位、１９５位、１９６位、２０１位、２０２位、２０３位、２０５位、２０６位、２１０位、２１１位、２１４位、２１５位、２１８位、２１９位、２２０位、２２１位、２２６位、２３０位、２３１位、２３２位、２３３位、２３５位、２３６位、２３８位、２３９位、２４０位、２４１位、２４６位、２４７位、２４８位、２４９位、２５１位、２５３位、２５４位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１８位、５２位、５６位、８４位、９１位、１３０位、１４３位、１６５位、２０４位、２４２位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【００２９】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２６８３に形質転換した。

【００３０】

３．ＰｖｕＩ－ＨＦの選択

ｐＸｂａ ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ（ＮＥＢ））中の活性の比較を使用してＰｖｕＩ－ＨＦの選択を行った。ＰｖｕＩ－ＷＴはＮＥＢ３中のほうが高活性である。ＮＥＢ４中のほうが高活性のものを選択した。Ｓ３６Ａ、Ｋ７７Ａ、Ｐ１５４Ａ、Ｅ１６３Ａ、Ｙ１６５Ｆ及びＫ１８５Ａの６種の変異体はＮＥＢ４中のほうが高活性であることが判明した。Ｐ１５４ＡはＮＥＢ４中でＷＴよりも著しく高活性であった。一般に、ＮＥＢ４中で最高活性のものはスター活性が改善されたものであった。ＰｖｕＩ（Ｐ１５４Ａ）をＰｖｕＩ－ＨＦに指定した。有効な変異がプロリン→アラニン変異であったのはこれが最初である。

【００３１】

４．ＰｖｕＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌを添加したＬＢでＥＲ２６８３細胞（ｐＵＣ１９－ＰｖｕＩ（Ｐ１５４Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＰｖｕＩＭ））２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮し、グリセロール中で－２０℃にて保存した。

【００３２】

５．ＰｖｕＩ－ＨＦとＰｖｕＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ｂを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＰｖｕＩ－ＨＦとＰｖｕＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。比較を図１に示し、結果を（下記）表２にまとめる。

【００３３】

【表２】

表２：ＰｖｕＩ－ＨＦとＰｖｕＩ－ＷＴの比較

バッファー	PvuI-HF		PvuI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	12.5%	≥ 2000	6.3%	32	≥64
NEB2	100%	≥ 16000	25%	32	≥500
NEB3	25%	≥ 4000	100%	32	≥125
NEB4	100%	≥ 16000	12.5%	32	≥500

【００３４】

ＰｖｕＩ－ＨＦはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧１６，０００であり、ＷＴ　ＰｖｕＩはＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは３２であった。従って、総改善倍率は≧１６，０００／３２＝≧５００倍であった。

【００３５】

［実施例２］

ＨＦ　ＨｉｎｄＩＩＩの作製

国際公開第ＷＯ２００９／００９７９７号の実施例２１に記載されているようにＨｉｎｄＩＩＩはＡ／ＡＧＣＴＴで認識・消化する。変異体ＨｉｎｄＩＩＩ（Ｋ１９８Ａ）をＨｉｎｄＩＩＩのＨＦ変異体として選択した。この変異体を更に特性決定した結果、１時間規模でのＨｉｎｄＩＩＩ（Ｋ１９８Ａ）の性能は優れていたが、一晩消化すると良好に機能しないことが判明した。他の変異体について検討すると、ＨｉｎｄＩＩＩ（Ｑ１４８Ａ）も部分的に良好であることが判明した。著しく改善させる別の方法はアラニンを他の全アミノ酸残基に置換する方法であった。そのうち、ＨｉｎｄＩＩＩ（Ｑ１４８Ｉ）は1時間反応と一晩反応のどちらでも優れていることが判明し、ＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦに指定した（図２）。

【００３６】

ＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦをＥＲ３０８１（ｐＵＣ１９－ＨｉｎｄＩＩＩＲ（Ｑ１４８Ｉ）Ｍ）で発現させた。増殖法と精製法はＷＯ／２００９／００９７９７に従って実施した。

【００３７】

下表（表３）はＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦとＨｉｎｄＩＩＩ－ＷＴのＦＩを比較する。

【００３８】

【表３】

表３：ＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦとＨｉｎｄＩＩＩ－ＷＴの比較

	HindIII-HF		HindIII-WT		
バッファー	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 260000	25%	32	≥8000
NEB2	50%	≥ 260000	100%	250	≥1000
NEB3	0.05%	≥ 250	25%	4000	≥1/32
NEB4	100%	≥ 520000	50%	32	≥16000

【００３９】

ＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良活性であり、ＮＥＢ４中のＨｉｎｄＩＩＩ－ＨＦのＦＩは≧５２００００であり、ＷＴ　ＨｉｎｄＩＩＩはＮＥＢ２中で最良活性であった。ＮＥＢ２中のＨｉｎｄＩＩＩ－ＷＴのＦＩは２５０であった。従って、改善倍率は≧２，０００倍であった。

【００４０】

［実施例３］

ＨＦ　ＤｒａＩＩＩの作製

１．ＤｒａＩＩＩの発現

ＤｒａＩＩＩはＣＡＣＮＮＮ／ＧＴＧで認識・消化する。ｐＡＧＲ３－ＤｒａＩＩＩＲ（）とｐＡＣＹＣ－ＤｒａＩＩＩＭ（）を導入した大腸菌ＥＲ３０８１でＤｒａＩＩＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。

【００４１】

２．ＤｒａＩＩＩの変異誘発

ＤｒａＩＩＩ蛋白質の長さは２２７アミノ酸である。先ずＤｒａＩＩＩ蛋白質の合計１３２カ所のアミノ酸位置をＡｌａ（又はＰｈｅ）に変異させるように設計した。Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｙ及びＴｒｐをＡｌａに変異させた。ＴｒｙをＰｈｅに変異させた。これらは７位、９位、１０位、１１位、１２位、１４位、１５位、１６位、１７位、１８位、２０位、２１位、２２位、２３位、２８位、２９位、３１位、３２位、３４位、３５位、３７位、４０位、４２位、４３位、４４位、４５位、４７位、５１位、５４位、５５位、５７位、５８位、５９位、６０位、６４位、６５位、６６位、６７位、６８位、７２位、７３位、７４位、７６位、７７位、８２位、８３位、８４位、８８位、８９位、９０位、９１位、９３位、９４位、９５位、９６位、９９位、１０１位、１０２位、１０４位、１０６位、１０７位、１０８位、１１１位、１１２位、１１３位、１１４位、１１５位、１１７位、１２０位、１２１位、１２３位、１２４位、１２７位、１２８位、１３０位、１３６位、１３７位、１３８位、１３９位、１４０位、１４１位、１４２位、１４４位、１４５位、１４６位、１４７位、１５０位、１５４位、１５５位、１５６位、１５７位、１５８位、１６０位、１６１位、１６５位、１６７位、１６９位、１７０位、１７１位、１７２位、１７３位、１７５位、１７６位、１８０位、１８１位、１８３位、１８４位、１８５位、１８７位、１８９位、１９０位、１９２位、１９３位、１９６位、１９８位、１９９位、２００位、２０１位、２０２位、２０５位、２０７位、２０８位、２０９位、２１

１位、２１２位、２１３位、２１４位、２１６位、２１７位、２１８位、２１９位、２２位及び２２３位であった。

【００４２】

選択した変異の点変異誘発をインバースＰＣＲにより実施した。ＰＣＲ反応は各ＰＣＲプライマー２μｌ、ｐＡＧＲ３－ＤｒａＩＩＩＲ　１μｌ，４００μＭ　ｄＮＴＰ、Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔ（登録商標）ＤＮＡポリメラーゼ（ＮＥＢ）４単位、及び１０Ｘ　Ｔｈｅｒｍｏｐｏｌバッファー１０μｌに水を加えて反応容量１００μｌとした。

【００４３】

ＰＣＲ反応条件は９４℃で５分後、９４℃で３０秒、５５℃で６０秒、７２℃て４秒を２５サイクル繰返した後、７２℃で７分の最終伸長時間とした。ＰＣＲ産物を２０単位のＤｐｎＩで１時間消化した。消化産物を大腸菌ＥＲ３０８１（ｐＡＣＹＣ－ＤｒａＩＩＩＭ）に形質転換した。

【００４４】

３．ＤｒａＩＩＩ－ＨＦの選択

ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで各変異のコロニー４個を３７℃にて一晩増殖させた。ＮＥＢ４バッファー及び１０％グリセロール中でｐＸｂａを基質としてＤｒａＩＩＩの標準コグネイト活性アッセイとスター活性アッセイを実施した。

【００４５】

変異体Ｓ１５Ａ、Ｈ２０Ａ、Ｅ３４Ａ、Ｍ５８Ａ、Ｑ９５Ａ、Ｒ１０６Ａ、Ｋ１０８Ａ、Ｔ１８１Ａ、Ｒ１８７Ａ、Ｒ１９９Ａ、Ｎ２０２Ｄ、Ｔ１８１Ｇ、Ｔ１８１Ｎ、Ｔ１８１Ｑ、Ｔ１８１Ｃ、Ｔ１８１Ｖ、Ｔ１８１Ｌ、Ｔ１８１Ｉ、Ｔ１８１Ｍ、Ｄ５５Ａ、Ｄ５５Ｓ、Ｄ５５Ｃ、Ｄ５５Ｇ、Ｄ５５Ｎ、Ｔ１２Ａ、Ｈ２０Ａ、Ｅ３４Ａ、Ｈ４５Ａ、Ｔ５７Ａ、Ｍ５８Ａ、Ｔ６０Ａ、Ｓ６６Ａ、Ｒ７６Ａ、Ｆ９０Ａ、Ｍ９４Ａ、Ｔ１０１Ａ、Ｃ１１５Ａ、Ｆ１６９Ａ、Ｎ１７２Ａ、Ｒ１７３Ａ、Ｈ１８９Ａ、Ｎ１９３Ａ及びＱ９５Ａ／Ｋ１０４Ａをスクリーニングアッセイで選別した。各種条件及び基質で数ラウンドの比較後、ＤｒａＩＩＩ（Ｔ１８１Ａ）が高切断効率高活性を維持しながらスター活性の実質的低下を示す好ましい変異体であることが判明した。ＤｒａＩＩＩ（Ｔ１８１Ａ）をＤｒａＩＩＩ－ＨＦに指定した。

【００４６】

４．ＤｒａＩＩＩ－ＨＦとＤｒａＩＩＩ－ＷＴの比較

ヘパリン及びＳｏｕｒｃｅ　１５Ｓカラムを使用してＤｒａＩＩＩ－ＷＴ及びＤｒａＩＩＩ－ＨＦ（Ｔ１８１Ａ）蛋白質を精製した。詳細な比較のためのアッセイ条件は、ＮＥＢ４（又はＮＥＢ１、２、３）、３７℃、１時間；２０μｌ反応系で精製蛋白質２μｌ；基質λＤＮＡとした。比較を図３Ａ及び３Ｂに示し、結果を表４にまとめる。

【００４７】

【表４】

表４：ＤｒａＩＩＩ－ＨＦとＤｒａＩＩＩ－ＷＴの比較

基質	DraIII-HF (T181A)		DraIII-WT		改善倍率
	活性	FI	活性	FI	
バッファー1	6.25%	≥120	16%	16	≥8
バッファー2	50%	≥1000	100%	2	≥500
バッファー3	1.56%	≥32	50%	2	≥16
バッファー4	100%	≥64000	50%	0.5	≥128000

【００４８】

ＤｒａＩＩＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最高活性であり、ＦＩは少なくとも６４，０００であり、ＤｒａＩＩＩ－ＷＴはＮＥＢ２中で最高活性であり、ＦＩは２である。ＦＩ総改善倍率は少なくとも３２，０００倍であった。

【００４９】

［実施例４］

ＨＦ　ＫｐｎＩの作製

国際公開第ＷＯ２００９／００９７９７号の実施例２６に記載されているようにＫｐｎＩはＧＧＴＡＣ／Ｃで認識・消化する。三重変異体ＫｐｎＩ（Ｄ１６Ｎ／Ｅ１３２Ａ／Ｄ１４８Ｅ）をＫｐｎＩの高忠実度変異体として選択した。Ｄ１４８ＥとＥ１３２Ａは部位変異誘発法により導入し、Ｄ１６ＮはＰＣＲにより導入した。この三重変異体における変異を更に特性決定した結果、Ｅ１３２Ａを除去すると特に酵素特異活性の面で制限酵素が更に改善されることが判明した。三重変異体ＫｐｎＩ（Ｄ１６Ｎ／Ｅ１３２Ａ／Ｄ１４８Ｅ）は蛋白質１ｍｇ当たり特異活性２００，０００単位であり、ＫｐｎＩ（Ｄ１６Ｎ／Ｄ１４８Ｅ）は蛋白質１ｍｇ当たり特異活性１，８００，０００単位である。二重変異体のほうが当初の三重変異体よりも９倍活性が高いため、二重変異体ＫｐｎＩ（Ｄ１６Ｎ／Ｄ１４８Ｅ）をＫｐｎＩ－ＨＦに指定した。

【００５０】

ＫｐｎＩ－ＨＦをＥＲ２５２３（ｐＡＧＲ３－ＫｐｎＩ（Ｄ１６Ｎ／Ｄ１４８Ｅ），ｐＳＹＸ２０－ＫｐｎＩＭ）で発現させた。増殖法と精製法はＷＯ／２００９／００９７９７に従って実施した。

【００５１】

下表（表５）はＫｐｎＩ－ＨＦとＫｐｎＩ－ＷＴのＦＩを比較する。

【００５２】

【表５】

表５：ＫｐｎＩ－ＨＦとＫｐｎＩ－ＷＴの比較

バッファー	KpnI-HF		KpnI-WT		改善倍率
	相対活性	FI	相対活性	FI	
NEB1	100%	≥1,000,000	100%	16	62,500
NEB2	100%	≥1,000,000	25%	16	62,500
NEB3	0.2%	≥30,000	6%	8	3,750
NEB4	100%	≥1,000,000	50%	4	250,000

【００５３】

ＫｐｎＩ　ＷＴはＮＥＢ１中で最良活性であり、ＮＥＢ１中のＫｐｎＩ－ＷＴのＦＩは１６であり、ＫｐｎＩ－ＨＦはＮＥＢ１、ＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良活性であった。これらの３種類のバッファー中のＫｐｎＩ－ＨＦのＦＩはいずれも≧１，０００，０００で最高であった。総改善倍率は≧６２，５００倍であった。

【００５４】

［実施例５］

ＨＦ　ＳｔｙＩの作製

１．ＳｔｙＩの発現

ＳｔｙＩはＣ／ＣＷＷＧＧで認識・消化する。ｐＡＣＹＣ－ＳｔｙＩＭ及びｐｌａｃｚｚ１－ＳｔｙＩＲを導入した大腸菌（ＥＲ２８３３）でＳｔｙＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。

【００５５】

２．ＳｔｙＩの変異誘発

選択した変異の点変異誘発をインバースＰＣＲにより実施した。ＳｔｙＩに以下のように２３７カ所のアミノ酸変異を作製した。Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＴｒｐをＡｌａに変異させた。ＴｙｒをＰｈｅに変異させた。これらは７位、９位、１０位、１１位、１２位、１４位、１６位、２２位、２３位、２４位、２５位、２６位、２８位、３０位、３１位、３２位、３３位、３４位、３５位、３６位、３７位、３８位、３９位、４０位、４２位、４３位、４９位、５１位、５２位、５３位、５４位、５７位、５８位、５９位、６１位、６２位、６４位、６５位、６６位、６９位、７０位、７３位、７５位、７６位、７８位、７９位、８０位、８１位、８２位、８５位、９１位、９２位、９３位、９５位、９６位、９７位、９８位、９９位、１００位、１０２位、１０３位、１０４位、１０５位、１０６位、１０９位、１１１位、１１２位、１１４位、１１６位、１１８位、１１９位、１２２位、１２３位、１２４位、１２５位、１２６位、１２８位、１２９位、１３０位、１３１位、１３５位、１３６位、１３７位、１３９位、１４０位、１４１位、１４２位、１４３位、１４４位、１４５位、１４６位、１４７位、１５０位、１５１位、１５２位、１５３位、１５５位、１５７位、１５８位、１５９位、１６３位、１６４位、１６５位、１６６位、１６７位、１７０位、１７２位、１７３位、１７５位、１７６位、１７７位、１７８位、１８１位、１８３位、１８７位、１８８位、１９２位、１９３位、１９４位、１９５位、１９６位、２００位、２０３位、２０４位、２０５位、２０７位、２０９位、２１１位、２１２位、２１３位、２１４位、２１６位、２１８位、２１９位、２２０位、２２１位、２

２２位、２２７位、２２９位、２３０位、２３２位、２３４位、２３５位、２３６位、２３７位、２３８位、２３９位、２４１位、２４２位、２４５位、２４７位、２４８位、２４９位、２５０位、２５２位、２５３位、２５４位、２５６位、２５７位、２５８位、２５９位、２６０位、２６１位、２６３位、２６６位、２６７位、２６９位、２７２位、２７４位、２７７位、２８０位、２８２位、２８３位、２８４位、２８６位、２８８位、２８９位、２９１位、２９２位、２９３位、２９４位、２９５位、２９６位、２９７位、２９８位、３０３位、３０４位、３０５位、３０７位、３０８位、３０９位、３１３位、３１７位、３１８位、３１９位、３２０位、３２３位、３２４位、３２６位、３２７位、３２９位、３３１位、３３５位、３３６位、３３７位、３３９位、３４０位、３４３位、３４５位、３４６位、３４７位、３４９位、３５０位、３５１位、３５３位、３５５位、３５６位、３５９位、３６０位、３６１位、３６３位、３６５位、３６６位、３６８位、３６９位、３７０位、３７２位、３７３位、３７６位、３７７位、３７９位、３８１位及び３８２位であった。

【００５６】

プライマー設計及びＰＣＲ法はＰＣＴ出願公開第ＷＯ２００９／００２９３７６号（実施例１）に記載されているように実施することができる。ＰＣＲ産物をＤｐｎＩで消化し、コンピテントＥＲ２８３３（ｐＡＣＹＣ－ＳｔｙＩＭ）に形質転換した。

【００５７】

３．ＳｔｙＩ－ＨＦの選択

ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで各変異のコロニー４個を３７℃にて一晩増殖させた。夫々ＮＥＢ４及びＥｘｏＩバッファー＋２０％グリセロール中でλを使用してＳｔｙＩのコグネイト活性アッセイとスター活性アッセイを実施した。

【００５８】

変異体Ｋ７５Ａ、Ｎ１４６Ａ及びＤ２５６Ａをスクリーニングアッセイで選別した。各種条件及び基質で数ラウンドの比較後、Ｋ７５Ａが高切断効率高活性を維持しながらスター活性の実質的低下を示す好ましい変異体であることが判明した。ＳｔｙＩ（Ｋ７５Ａ）をＳｔｙＩ－ＨＦに指定した。

【００５９】

４．ＳｔｙＩ－ＨＦとＳｔｙＩ－ＷＴの比較

ＮＥＢ４中のＳｔｙＩ－ＨＦとＳｔｙＩ－ＷＴの比較を図５Ａ及び５Ｂに示し、結果を表６にまとめる。

【００６０】

【表６】

表６：ＳｔｙＩ－ＨＦとＳｔｙＩ－ＷＴの比較

バッファー	StyI-HF		StyI-WT		改善倍率
	相対活性	FI	相対活性	FI	
NEB1	50%	≥4000	25%	32	≥125
NEB2	100%	2000	100%	16	125
NEB3	0.4%	≥16	50%	32	≥0.5
NEB4	50%	4000	25%	16	250

【００６１】

ＳｔｙＩ－ＷＴとＳｔｙＩ－ＨＦはＮＥＢ２中で最高活性であった。ＦＩはＳｔｙＩ－ＷＴが１６であり、ＳｔｙＩ－ＨＦが２０００であった。ＦＩ総改善倍率は１２５倍であった。

【００６２】

［実施例６］

ＨＦ　ＢｓａＪＩの作製

１．ＢｓａＪＩの発現

同一プラスミド中にＢｓａＪＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＢｓａＪＩＲ＋Ｍで形質転換した大腸菌でＢｓａＪＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【００６３】

２．ＢｓａＪＩ－ＨＦの変異誘発

９位、１０位、１４位、１７位、１８位、１９位、２０位、２２位、２３位、２４位、２７位、３０位、３２位、３５位、３９位、４２位、４３位、４８位、５０位、５１位、５２位、５３位、５５位、５６位、５７位、６０位、６１位、６５位、６６位、６７位、６８位、７０位、７１位、７２位、７３位、７８位、７９位、８１位、８３位、８４位、８６位、８７位、８８位、９０位、９１位、９２位、９４位、９５位、９９位、１０１位、１０３位、１０４位、１０６位、１１０位、１１１位、１１３位、１１４位、１１７位、１１９位、１２０位、１２１位、１２３位、１２７位、１２９位、１３１位、１３２位、１３４位、１３６位、１３８位、１４０位、１４１位、１４２位、１４７位、１５２位、１５３位、１５７位、１５８位、１５９位、１６２位、１６３位、１６５位、１６６位、１６７位、１６９位、１７０位、１７５位、１７８位、１８１位、１８３位、１８４位、１８５位、１８６位、１８７位、１８８位、１８９位、１９４位、１９６位、１９７位、１９８位、１９９位、２００位、２０２位、２０３位、２０４位、２０６位、２１１位、２１２位、２１３位、２１４位、２１５位、２１６位、２１８位、２２０位、２２２位、２２５位、２２６位、２２７位、２２８位、２２９位、２３０位、２３１位、２３３位、２３８位、２３９位、２４０位、２４１位、２４６位、２４７位、２４９位、２５０位、２５１位、２５２位、２５３位、２５４位、２５５位、２５７位、２６０位、２６２位、２６５位、２６７位、２６８位、２６９位、２７０位、２７１位、２７３位、２７４位、２７６位、２７７位、２８０位、２８１位、２８２位、２８３位、２８５位、２８７位、２８８位、２９０位、２９１位、２９３位、２９４位、２９５位、２９８位及び２９９位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｐｈｅ、ＴｒｐをＡｌａに置換し、２１位、５９位、６２位、７７位、８９位、１０５位、１３０位、１９１位、２０８位、２７２位、２８６位及び２９６位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【００６４】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ３０８１に形質転換した。

【００６５】

３．ＢｓａＪＩ－ＨＦの選択

ｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｓａＪＩ－ＨＦの選択を行った。Ｅ１９８ＡとＤ２００Ａが最高活性である。Ｄ２００ＡはＮＥＢ４中でＷＴよりもスター活性が著しく低い。ＢｓａＪＩ（Ｄ２００Ａ）をＢｓａＪＩ－ＨＦに指定する。

【００６６】

４．ＢｓａＪＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐ、３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍ及び０．５ｍＭ　ＩＰＴＧを添加したＬＢでＥＲ３０８１細胞（ｐＲＲＳ－ＢｓａＪＩＲ（Ｄ２００Ａ）＋Ｍ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、５０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠

心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＡｍｉｃｏｎ（登録商標）Ｕｌｔｒａ　３０ＫＤａ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，米国；現Ｍｅｒｃｋ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｓａＪＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【００６７】

５．ＢｓａＪＩ－ＨＦとＢｓａＪＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＢｓａＪＩ－ＨＦとＷＴ　ＢｓａＪＩのＦＩを別々に測定した。結果を表７にまとめる。

【００６８】

【表７】

表７：ＢｓａＪＩ－ＨＦとＢｓａＪＩ－ＷＴの比較

バッファー	BsaJI-HF		BsaJI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	25%	≥1000	100%	64	≥15
NEB2	100%	≥4000	100%	64	≥60
NEB3	100%	≥4000	25%	16	≥250
NEB4	100%	≥4000	100%	64	≥60

【００６９】

ＢｓａＪＩ－ＨＦはＮＥＢ２、３及び４中で最良性能であり、ＦＩは≧４０００であり、ＷＴ　ＢｓａＪＩはＮＥＢ１、２及び４中で最良性能であり、ＦＩは６４であった。従って、ＮＥＢ４中の改善倍率は≧４０００／６４≧６４倍であった。

【００７０】

［実施例７］

ＨＦ　ＢｓａＷＩの作製

１．ＢｓａＷＩの発現

各々ＢｓａＷＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＬａｃＺＺ１－ＢｓａＷＩＲとｐＡＣＹＣ－ＭｓｐＩＭで形質転換した大腸菌でＢｓａＷＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させ、３０℃にて０．５ｍＭＩＰＴＧで１８時間誘導した。

【００７１】

２．ＢｓａＷＩ－ＨＦの変異誘発

９位、１０位、１３位、１６位、１７位、１８位、２０位、２３位、２４位、２５位、２６位、２８位、２９位、３０位、３１位、３４位、３５位、３６位、３９位、４２位、４３位、４５位、４６位、４８位、５１位、５４位、５８位、６０位、６２位、６３位、６４位、６５位、６６位、６９位、７０位、７１位、７４位、７５位、７８位、８０位、８１位、８２位、８４位、８５位、８６位、８８位、８９位、９２位、９３位、９６位、

９９位、１００位、１０１位、１０２位、１０４位、１０５位、１０７位、１０９位、１１３位、１１４位、１１５位、１１７位、１２１位、１１２位、１２３位、１２４位、１２７位、１２８位、１２９位、１３０位、１３１位、１３３位、１３６位、１３７位、１３８位、１４０位、１４１位、１４２位、１４５位、１４９位、１５１位、１５２位、１５３位、１５４位、１５５位、１５６位、１６０位、１６３位、１６４位、１６５位、１６６位、１６７位、１６９位、１７０位、１７１位、１７３位、１７４位、１７５位、１７６位、１７７位、１７８位、１７９位、１８１位、１８４位、１８９位、１９５位、１９６位、１９７位、２００位、２０２位、２０３位、２０９位、２１０位、２１１位、２１２位、２１３位、２１４位、２１６位、２１８位、２１９位、２２１位、２２２位、２２８位、２２９位、２３０位、２３１位、２３３位、２３４位、２３７位、２３９位、２４１位、２４３位、２４７位、２４８位、２５０位、２５１位、２５４位、２５５位、２５８位、２５９位、２６０位、２６１位、２６４位及び２６６位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１１位、５７位、１０６位、１４７位、１５７位、２１５位、２２４位、２３６位及び２６５位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【００７２】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ３０８１に形質転換した。

【００７３】

３．ＢｓａＷＩ－ＨＦの選択

λＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｓａＷＩ－ＨＦの選択を行った。以下の変異体：Ｋ２２９Ａ、Ｅ０２５Ａ、Ｒ０３４Ａ及びＱ２６１Ａが変化を示した。ＷＴ　ＢｓａＷＩは小規模培養で増殖させた場合にはどちらのバッファー中でも消化を完了することができ、Ｑ２６１Ａは安定な部分パターンを与えるだけであることが分かった。これはこの変異体が小規模培養では増殖不良であったためであると考えられる。大規模培養で増殖させ、精製した場合には、部分パターンがなくなり、基質は完全に消化され、基質ｐＸｂａで試験した場合にも高忠実度変異体であることが結果から判明した。

【００７４】

４．ＢｓａＷＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌを添加したＬＢでＥＲ３０８１細胞（ｐＬａｃＺＺ１－ＢｗａＷＩ（Ｑ２６１Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＭｓｐＩＭ）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。８時間後に、培養液を０．５ｍＭ　ＩＰＴＧで誘導した。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｓａＷＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【００７５】

５．ＢｓａＷＩ－ＨＦとＢｓａＷＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＢｓａＷＩ－ＨＦとＢｓａＷＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表８にまとめる。

【００７６】
【表８】

表８：ＢｓａＷＩ－ＨＦとＢｓａＷＩ－ＷＴの比較

バッファー	BsaWI-HF		BsaWI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	1.6%	8	12.5%	4	2
NEB2	100%	120	50%	8	≥15
NEB3	3.1%	≥ 250	3.1%	64	≥4
NEB4	100%	≥ 4000	100%	16	≥250

【００７７】
ＢｓａＷＩ－ＨＦはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最高活性であり、最良ＦＩ≧４０００であり、ＢｓａＷＩ－ＷＴはＮＥＢ４中で最高活性であり、ＦＩは１６である。総改善倍率は≧４０００／１６＝～２５０倍である。
【００７８】
［実施例８］
高忠実度ＢｇｌＩの作製
１．ＢｇｌＩの発現
各々ＢｇｌＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＢｇｌＩＲとｐＳＹＸ２０－ＢｇｌＩＭで形質転換した大腸菌でＢｇｌＩを発現させた。ＡｍｐとＫａｎを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。
【００７９】
２．ＢｇｌＩ－ＨＦの変異誘発
７位、８位、１２位、１４位、１５位、１６位、１７位、１８位、１９位、２２位、２３位、２４位、２５位、２７位、２８位、２９位、３１位、３４位、３６位、３９位、４０位、４３位、４４位、４５位、４６　４７位、４８位、５０位、５２位、５４位、５位、５７位、６０位、６１位、６５位、６７位、６８位、７０位、７１位、７２位、７３位、７５位、７６位、７７位、７８位、７９位、８１位、８４位、８６位、８７位、８８位、９１位、９２位、９４位、９５位、９６位、９９位、１００位、１０１位、１０２位、１０３位、１０５位、１０７位、１０８位、１１０位、１１２位、１１３位、１１４位、１１５位、１１６位、１１７位、１１８位、１２２位、１２３位、１２４位、１２５位、１２８位、１３０位、１３１位、１３２位、１３４位、１３５位、１３６位、１５２位、１５８位、１５９位、１６０位、１６１位、１６３位、１６４位、１６５位、１６６位、１６７位、１７０位、１７２位、１７３位、１７４位、１７６位、１７７位、１７８位、１７９位、１８０位、１８１位、１８３位、１８４位、１８５位、１８６位、１８７位、１８８位、１８９位、１９３位、１９４位、１９６位、１９７位、２０２位、２０３位、２０４位、２０５位、２０８位、２１１位、２１５位、２１６位、２２１位、２２２位、２２４位、２２５位、２２６位、２２７位、２２８位、２２９位、２３０位、２３１位、２３４位、２３６位、２３９位、２４１位、２４２位、２４３位、２４５位、２４９位、２５０位、２５１位、２５５位、２５６位、２５９位、２６３位、２６４位、２６５位、２６６位、２６７位、２６８位、２６９位、２７０位、２７１位、２７２位、２７５位、２７６位、２７７位、２７９位、２８１位、２８３位、２８６位、２８７位、２８９位、２９０位及び２９１位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓ

ｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１９位、１３位、３３位、５３位、６６位、１１９位、１２７位、１５３位、１９９位、２１８位、２３３位、２５２位及び２５８位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【００８０】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２５６６に形質転換した。

【００８１】

３．ＢｇｌＩ－ＨＦの選択

λＤＮＡを基質としてＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｇｌＩ－ＨＦの選択を行った。ＢｇｌＩ－ＷＴはＮＥＢ４中で低活性であるため、ＮＥＢ４中の活性がＷＴと同等以上の全変異体を選択した後、スター活性レベルの比較のためにグリセロールに対して試験した。ただ１種の変異体Ｋ２２５Ａのみがグリセロール中で試験した場合にスター活性を低下しながらＮＥＢ４中でＷＴと同等の活性を示した。ＢｇｌＩ（Ｋ２２５Ａ）をＢｇｌＩ－ＨＦに指定する。

【００８２】

４．ＢｇｌＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ Ｋａｎを添加したＬＢでＥＲ２５６６細胞（ｐＵＣ１９－ＢｇｌＩ（Ｋ２２５Ａ），ｐＳＹＸ２０－ＢｇｌＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｇｌＩ－Ｈに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【００８３】

５．ＢｇｌＩ－ＨＦとＢｇｌＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ｂを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でλＤＮＡを基質としてＢｇｌＩ－ＨＦとＷＴ ＢｇｌＩのＦＩを別々に測定した。比較を図６に示し、結果を（下記）表９にまとめる。

【００８４】

【表９】

表９：ＢｇｌＩ－ＨＦとＢｇｌＩ－ＷＴの比較

バッファー	BglI-HF		BglI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 4000	25.0%	64	≥62
NEB2	100%	≥ 8000	100%	64	≥125
NEB3	6.3%	≥ 500	100%	250	≥2
NEB4	100%	≥ 8000	50%	32	≥250

【００８５】

ＢｇｌＩ－ＨＦはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最高活性であり、ＦＩは≧８０００であり、ＢｇｌＩ－ＷＴはＮＥＢ３中で最高活性であり、ＦＩは２５０であった。総改善倍率は≧８０００／２５０＝≧３２倍であった。

【００８６】

［実施例９］

ＨＦ　ＢｓｒＤＩの作製

１．ＢｓｒＤＩの発現

ＢｓｒＤＩ酵素はＢｓｒＤＩＡとＢｓｒＤＩＢの２個のサブユニットを含む。

【００８７】

純ＢｓｒＤＩＡサブユニットを得るために、ＩＭＰＡＣＴ（Ｉｎｔｅｉｎ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ａｎ　Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｃｈｉｔｉｎ－Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｔａｇ）システム（ＮＥＢ　ｃａｔ：Ｅ６９０１）をＢｓｒＤＩＡの１段階精製に使用した。要約すると、ＢｓｒＤＩＡ遺伝子をｐＴＸＢ１ベクターにサブクローニング後、ｌａｃオペロン（ＮＥＢ　＃ＥＲ２５６６）の制御下にＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを含むコンピテント株に形質転換した。スクリーニングとシーケンシング後、補正株を選択した。アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を添加したＬＢ培地でOD_{600}が０．５に達するまで細胞を３７℃にて増殖させた。次に、ＢｓｒＤＩＡの誘導のために最終濃度０．４ｍＭとなるようにＩＰＴＧを３時間添加した。次に細胞培養液をペレット化し、氷冷カラムバッファー（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．５，５００ｍＭ　ＮａＣｌ）に再懸濁し、超音波により溶解させた。得られた細胞溶解液を次に遠心し、細胞破片を除去した。次に、平衡化したキチンカラムに上清をロードした。ローディングバッファーで洗浄後、カラムに切断バッファー（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．５，５００ｍＭ　ＮａＣｌ及び５０ｍＭ　ＤＴＴ）を加えて４℃で一晩インキュベートした。最後に、保存バッファー（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４，０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ，１ｍＭ　ＤＴＴ，５０ｍＭ　ＫＣｌ及び５０％グリセロール）で透析しながらＢｔｓＩ．Ａ蛋白質を溶出させた。

【００８８】

各々ＢｓｒＤＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＢｓｒＤＩＢＲとｐＬＧ－ＢｓｒＤＩＭ１Ｍ２で形質転換した大腸菌でＢｓｒＤＩＢサブユニットを発現させた。ＡｍｐとＫａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【００８９】

２．ＢｓｒＤＩ－ＨＦの変異誘発

７位、１１位、１２位、１４位、１５位、１７位、２１位、２２位、２５位、２８位、

２９位、３０位、３３位、３４位、３５位、３７位、４０位、４５位、４６位、４７位、５１位、５２位、５６位、５８位、６２位、６４位、６５位、６７位、６８位、７１位、７２位、７４位、７５位、８１位、８３位、９０位、９１位、９２位、９３位、９９位、１００位、１０１位、１０６位、１０８位、１０９位、１１２位、１１３位、１１５位、１１６位、１２０位、１２２位、１２３位、１２４位、１３２位、１３３位、１３６位、１３７位、１３８位、１３９位、１４２位、１４３位、１４４位、１４５位、１４６位、１５０位、１５５位、１５７位、１５８位、１６１位、１６２位、１６４位、１６８位、１７０位、１７１位、１７３位、１７４位、１７６位、１７７位、１７９位、１８０位、１８２位、１８５位、１８９位、１９０位、１９３位、１９７位、２００位、２０２位、２０３位、２０６位、２１０位、２１３位、２１５位、２１７位、２１８位、２２１位、２２４位、２２５位、２２６位、２２８位、２２９位、２３０位、２３２位、２３７位、２３８位、２４１位、２４２位、２４３位、２４４位、２４５位、２４６位、２４９位、２５３位、２５８位、２５９位、２６１位、２６４位、２６５位、２６８位、２７１位、２７２位、２７３位、２７４位、２７６位、２７８位、２７９位、２８１位、２８５位、２８７位、２８８位、２９２位、２９４位、２９５位、２９９位、３００位、３０１位、３０６位、３０７位、３０８位、３１２位、３１４位、３１５位、３１７位、３１８位、３２０位、３２１位、３２４位、３２５位、３２６位、３２７位、３２８位、３３１位、３３２位、３３５位、３３７位、３４１位、３４３位、３４５位、３４７位、３５２位、３５３位、３５４位、３５５位、３５６位、３６０位、３６１位、３６２位、３６３位、３６４位、３７０位、３７３位、３７４位、３７６位、３８０位、３８１位、３８５位、３８７位、３８９位、３９２位、３９３位、３９５位、３９６位、３９７位、４０５位、４０６位、４０８位、４１１位、４１５位、４１８位、４２０位、４２２位、４２５位、４２６位、４３０位、４３１位、４３２位、４３４位、４３７位、４４５位、４４６位、４４９位、４５０位、４５４位、４５５位、４５６位、４５７位、４５８位、４５９位、４６０位、４６３位、４６５位、４６６位、４６７位、４６９位、４７０位、４７５位、４８１位のＣｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒを含むＢｓｒＤＩＢの全残基をＡｌａに置換し、９位、３８位、６３位、８７位、１１８位、１２９位、１６９位、１７８位、１９８位、２１６位、２５１位、２８６位、２９１位、３０３位、３５７位、３５８位、３６７位、３７１位、４０２位、４４２位、４４３位、４４８位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【００９０】

変異誘発法は変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２５６６に形質転換した。

【００９１】

３．ＢｓｒＤＩ－ＨＦの選択

ｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ４中でＢｓｒＤＩＡと混合したＷＴ　ＢｓｒＤＩＢと、ＢｓｒＤＩＡと混合した変異体ＢｓｒＤＩＢのスター活性の比較を使用してＢｓｒＤＩ－ＨＦの選択を行った。Ｈ１３７Ａ、Ｄ１７７Ａ、Ｋ３６３Ａ、Ｋ４０８Ａ、Ｒ４１１Ａ、Ｑ２１５Ａ、Ｑ２２６Ａ、Ｑ２３０Ａの８種類の変異体がＮＥＢ４中でスター活性が低いことが判明した。

【００９２】

スター活性を更に低下させるために、Ｋ３６３Ａ／Ｑ２３０Ａ、Ｋ３６３Ａ／Ｋ４０８Ａ、Ｑ２３０Ａ／Ｋ４０８Ａの二重変異を生じるように上記変異を組合せた。次に、ＢｓｒＤＩＢにＱ２３０Ａ／Ｋ３６３Ａの変更を有するＢｓｒＤＩをＢｓｒＤＩ－ＨＦに指定する。

【００９３】

４．ＢｓｒＤＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｋａｍを添加したＬＢでＥＲ２５６６細胞（ｐＵＣ１９－ＢｓｒＤＩ（Ｑ２３０Ａ／Ｋ３６３Ａ），ｐＬＧ－ＢｓｒＤＩＭ１Ｍ２）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉ

ｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｓｒＤＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃条件で保存した。

【００９４】

５．ＢｓｒＤＩ－ＨＦとＢｓｒＤＩ－ＷＴの比較

（下記）希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＢｓｒＤＩ－ＨＦとＢｓｒＤＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を図７に示し、表１０にまとめる。

【００９５】

【表１０】

表１０：ＢｓｒＤＩ－ＨＦとＢｓｒＤＩ－ＷＴの比較

バッファー	BsrDI-HF		BsrDI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	12.5%	≥ 120	6%	1	≥ 120
NEB2	100%	≥ 500	100%	4	≥ 120
NEB3	6%	≥ 64	12.5%	4	≥ 16
NEB4	100%	≥ 1000	25%	½	≥ 2000

【００９６】

ＢｓｒＤＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧１０００であり、ＢｓｒＤＩ－ＷＴはＮＥＢ２及びＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは６４であった。従って、総改善倍率は≧１０００／０．５＝≧２０００倍であった。

【００９７】

［実施例１０］

ＨＦ　ＮｓｉＩの作製

１．ＮｓｉＩの発現

各々ＮｓｉＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐｌａｃｚｚ１－ＮｓｉＩＲとｐＡＣＹＣ－ＮｓｉＩＭで形質転換した大腸菌でＮｓｉＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【００９８】

２．ＮｓｉＩ－ＨＦの変異誘発

８位、９位、１０位、１１位、１２位、１３位、１８位、２１位、２２位、２３位、２４位、２６位、２７位、３２位、３４位、３５位、４２位、４４位、４５位、４６位、４７位、４９位、５０位、５２位、５３位、５４位、５５位、５７位、５８位、６０位、６

１位、６９位、７０位、７３位、７４位、７９位、８０位、８４位、８５位、８７位、９０位、９１位、９２位、９３位、９５位、９６位、９７位、９８位、９９位、１００位、１０２位、１０３位、１０５位、１０６位、１０８位、１０９位、１１０位、１１３位、１１４位、１１５位、１１７位、１１８位、１１９位、１２０位、１２１位、１２２位、１２３位、１２４位、１２６位、１３４位、１３５位、１３７位、１３８位、１３９位、１４０位、１４２位、１４４位、１４５位、１４６位、１４９位、１５１位、１５３位、１５４位、１５５位、１５６位、１５９位、１６０位、１６１位、１６２位、１６３位、１６６位、１６７位、１７０位、１７３位、１７４位、１７５位、１７８位、１７９位、１８０位、１８１位、１８２位、１８３位、１８４位、１８６位、１８８位、１８９位、１９０位、１９１位、１９２位、１９５位、１９７位、１９８位、１９９位、２００位、２０１位、２０２位、２０３位、２０６位、２０７位、２０９位、２１０位、２１１位、２１３位、２１５位、２１６位、２１７位、２１９位、２２１位、２２２位、２２５位、２３０位、２３１位、２３２位、２３４位、２３５位、２３６位、２３７位、２３９位、２４２位、２４３位、２４４位、２４５位、２４６位、２４９位、２５０位、２５１位、２５６位、２５７位、２５９位、２６０位、２６１位、２６３位、２６４位、２６８位、２６９位、２７１位、２７２位、２７３位、２７６位、２７７位、２７８位、２７９位、２８１位、２８２位、２８３位、２８５位、２８７位、２８８位、２９０位、２９２位、２９４位、２９５位、２９７位、２９８位、２９９位、３０２位、３０３位、３０６位、３０７位、３０８位、３０９位、３１０位、３１２位、３１５位、３１６位、３１９位、３２０位、３２３位、３２５位、３２７位、３２９位、３３３位、３３４位、３３６位、３３７位、３３８位、３４０位、３４１位、３４４位、３４７位、３４９位、３５０位、３５２位、３５３位、３５４位、３５５位、３５８位、３５９位、３６０位、３６２位、３６３位、３６５位、３６６位、３６７位、３７１位、３７２位、３７３位、３７５位、３７６位及び３７７位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｐｈｅ、ＴｒｐをＡｌａに置換し、３０位、４０位、６２位、６５位、７１位、７６位、８３位、８６位、１４１位、２２６位、２３３位、２５５位、２８９位、３１１位、３２６位、３３５位、３５１位、３５７位、３７８位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【００９９】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ３０８１に形質転換した。

【０１００】

３．ＮｓｉＩ－ＨＦの選択

ｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＮｓｉＩ－ＨＦの選択を行った。ＮｓｉＩ－ＷＴはＮＥＢ３中のほうが高活性であるので、ＮＥＢ４中のほうが高活性のものを選択した。１４８種の変異体がＮＥＢ４中のほうが高活性であることが判明した。Ｆ３７６ＡはＮＥＢ４中でＷＴよりも著しく高活性である。通常では、ＮＥＢ４中で最高活性のものはスター活性が改善されたものである。ＮｓｉＩ（Ｆ３７６Ａ）をＮｓｉＩ－ＨＦに指定する。

【０１０１】

４．ＮｓｉＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐ、３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍ及び０．５ｍＭ　ＩＰＴＧを添加したＬＢでＥＲ３０８１細胞（ｐｌａｃｚｚ１－ＮｓｉＩ（Ｆ３７６Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＮｓｉＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、５０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０

ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　３０ＫＤａ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，米国；現Ｍｅｒｃｋ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＮｓｉＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃条件下で保存した。

【０１０２】

５．ＮｓｉＩ－ＨＦとＮｓｉＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＮｓｉＩ－ＨＦとＷＴ　ＮｓｉＩのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表１１にまとめる。

【０１０３】

【表１１】

表１１：ＮｓｉＩ－ＨＦとＮｓｉＩ－ＷＴの比較

	NsiI-HF		NsiI-WT		
バッファー	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	3%	≥250	6.3%	32	≥8
NEB2	12.5%	≥1000	25%	32	≥30
NEB3	6%	≥500	100%	32	≥15
NEB4	100%	≥8000	12.5%	32	≥250

【０１０４】

ＮｓｉＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧８０００であり、ＷＴ　ＮｓｉＩはＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは３２であった。従って、ＮＥＢ４中の改善倍率は≧８０００／３２＝≧２５０倍であった。

【０１０５】

［実施例１１］

ＨＦ　ＤｐｎＩＩの作製

１．ＤｐｎＩＩの発現

ｐＢＡＤ２４１－ＤｐｎＩＩ　ＲＭで形質転換した大腸菌３０８１でＤｐｎＩＩを発現させた。Ａｍｐを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。

【０１０６】

２．ＤｐｎＩＩの変異誘発

選択した変異の点変異誘発をインバースＰＣＲにより実施した。ＤｐｎＩＩに以下のように１８９カ所のアミノ酸変異を作製した。Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＴｒｐをＡｌａに変異させた。ＴｒｙをＰｈｅに変異させた。これらは７位、８位、９位、１０位、１２位、１３位、１４位、１５位、１６位、１７位、１９位、２０位、２１位、２２位、２３位、２４位、２５位、２６位、２７位、２９位、３１位、３２位、３３位、３５位、３６位、３８位、４０位、４２位、４４位、４５位、４６位、５０位、５１位、５２位、５４位、５５位、５６位、５７位、５９位、６１位、６２位、６３位、６４位、６６位、６９位、７６位、７７位、７８位、８０位、８１位、８２位、８６位、８７位、９０位、９１位、９２位、９３位、９４位、９５位、９６位、９７位、９８位、９９位、１００位、１０１位、１０２位、１０４位、１０５位、１０６位、１０７位、１０８位、１０９位、１１１位、１

１２位、１１３位、１１６位、１１７位、１１８位、１２０位、１２１位、１２２位、１２５位、１２６位、１２９位、１３０位、１３２位、１３５位、１３８位、１３９位、１４０位、１４１位、１４３位、１４４位、１４５位、１４６位、１４７位、１４９位、１５０位、１５１位、１５２位、１５３位、１５６位、１５７位、１５８位、１６０位、１６１位、１６２位、１６４位、１６８位、１６９位、１７１位、１７２位、１７３位、１７５位、１７６位、１７７位、１７８位、１８０位、１８１位、１８３位、１８４位、１８６位、１８８位、１８９位、１９１位、１９２位、１９３位、１９５位、１９６位、１９８位、１９９位、２００位、２０１位、２０２位、２０５位、２０６位、２０７位、２０８位、２１１位、２１４位、２１６位、２１７位、２１８位、２１９位、２２１位、２２３位、２２４位、２２６位、２２７位、２２８位、２２９位、２３０位、２３１位、２３２位、２３３位、２３４位、２３６位、２３７位、２３８位、２３９位、２４０位、２４１位、２４４位、２４６位、２４７位、２４８位、２４９位、２５１位、２５２位、２５４位、２５６位、２５７位、２５８位、２５９位、２６０位、２６１位、２６２位、２６４位、２６５位、２６６位、２６７位、２６８位、２７２位、２７４位、２７５位、２７７位、２７８位、２８０位、２８１位及び２８２位であった。

【０１０７】

プライマー設計及びＰＣＲ法は従来記載されている方法と同様である。ＰＣＲ産物をＤｐｎＩで消化し、コンピテント大腸菌３０８１に形質転換した。

【０１０８】

３．ＤｐｎＩＩ－ＨＦの選択

Ａｍｐを添加したＬＢで各変異のコロニー４個を３７℃で一晩増殖させた。ＮＥＢ４バッファー及び５％グリセロール中でｄａｍ－λ基質を使用してＤｐｎＩＩの標準スクリーニングアッセイを実施した。

【０１０９】

変異体Ｒ７８Ａ、Ｔ１４０Ａ、Ｅ１５２Ａ、Ｒ１９９Ａ及びＦ２１７Ａをスクリーニングアッセイで選別した。各種条件及び基質で数ラウンドの比較後、高いカノニカル酵素活性を維持しながらスター活性の実質的低下を示す候補としてＲ１９９Ａを選択した。Ｒ１９９ＡをＤｐｎＩＩ－ＨＦに指定した。

【０１１０】

４．ＤｐｎＩＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐを添加したＬＢで大腸菌３０８１細胞（ｐＢＡＤ２４１．ＤｐｎＩＩ．ＲＭ（Ｒ１９９Ａ））２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分を更に濃縮した。濃縮したＢｍｔ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃条件下で保存した。

【０１１１】

５．ＤｐｎＩＩ－ＨＦとＤｐｎＩＩ－ＷＴの比較

ＤｐｎＩＩ－ＨＦをＢで２倍系列希釈し、４種類のＮＥＢバッファー中で反応させ、ＤｐｎＩＩ－ＷＴを２倍系列希釈し、４種類のＮＥＢバッファー中で反応させた。結果を表１２にまとめる。

【０１１２】

【表１２】

表１２：ＤｐｎＩＩ－ＨＦとＤｐｎＩＩ－ＷＴの比較

バッファー	DpnII-HF		DpnII-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	4000	25%	1	4000
NEB2	25%	2000	25%	1	2000
NEB3	0.8%	64	100%	32	2
NEB4	100%	8000	25%	1	8000

【０１１３】

ＤｐｎＩＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩ＝８０００であり、ＤｐｎＩＩはＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは３２であった。ＦＩ総改善倍率は８０００／３２＝２５０倍であった。

【０１１４】

［実施例１２］

高忠実度ＢｃｌＩの作製

１．ＢｃｌＩの発現

各々ＢｃｌＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＢｃｌＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＢｃｌＩＭで形質転換した大腸菌でＢｃｌＩを発現させた。Ａｍｐを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０１１５】

２．ＢｃｌＩ－ＨＦの変異誘発

９位、１０位、１１位、１２位、１９位、２２位、２３位、２４位、２６位、２８位、２９位、３０位、３１位、３５位、３７位、３８位、４０位、４２位、４４位、４６位、４７位、４９位、５１位、５３位、５４位、５５位、５８位、５９位、６２位、６５位、６７位、６９位、７２位、７３位、７４位、７５位、７６位、８０位、８２位、８３位、８５位、８６位、８９位、９３位、９４位、９５位、９６位、９７位、９８位、９９位、１０１位、１０３位、１０５位、１０７位、１０８位、１０９位、１１０位、１１１位、１１２位、１１３位、１１４位、１１５位、１２０位、１２４位、１２８位、１２９位、１３０位、１３２位、１３６位、１３７位、位、１３８位、１３９位、１４３位、１４４位、１４５位、１４９位、１５０位、１５１位、１５２位、１５４位、１５６位、１６０位、１６２位、１６３位、１６４位、１６６位、１６７位、１７０位、１７１位、１７２位、１７４位、１７５位、１７８位、１７９位、１８０位、１８２位、１８３位、１８８位、１９０位、１９１位、１９５位、１９６位、１９７位、１９９位、２００位、２０１位、２０４位、２０５位、２０８位、２０９位、２１０位、２１２位、２１３位、２１５位、２１７位、２１８位、２２０位、２２１位、２２２位、２２３位、２２４位、２２５位、２２６位、２２８位、２２９位、２３４位、２３５位、２３７位、２３８位、２４１位、２４３位、２４４位、２４５位、２４９位、２５２位、２５５位、２５７位、２６０位、２６１位、２６５位、２６６位、２６７位、２７０位、２７１位、２７３位、２７４位及び２７７位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１７位、２７位、３６位、６３位、６６位、７７位、８７位、１００位、１１６位、１１８位、１３３位、１４２位、１４７位、１５７位、１９２位、１９３位、１９４位、２０７位、２１２位、２３１位、

２３６位及び２４６位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。
【０１１６】
変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２９８４に形質転換した。
【０１１７】
３．ＢｃｌＩ－ＨＦの選択
ｄａｍ－λＤＮＡを基質としてグリセロール及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｃｌＩ－ＨＦの選択を行った。スター活性の低下が疑われたら、変異体を同一基質で水及びＮＥＢ４中の正常活性とも比較した。ＮＥＢ４中でＷＴと同等活性でありながら、スター活性が低い可能性のある変異体を選択した。Ｇ２６Ａ、Ｐ１０５Ａ、Ｔ１９５Ａ、Ｑ２１０Ａ、Ｙ１４７Ｆ及びＹ１９３Ｆの６種の変異体がこのような特徴をもつことが判明した。数種の変異体（Ｋ１１４Ａ、Ｔ１９７Ａ、Ｓ２４５Ａ、Ｄ２５２Ａ及びＹ０２７Ｆ）は水中での活性の低下を示したが、スター活性の低下も示し、通常では高グリセロール条件下でＷＴよりもコグネイト活性が高かった。１種の変異体Ｙ１９２ＦはＷＴよりも高活性でありながら、スター活性が低かった。ＢｃｌＩ（Ｙ１９２Ｆ）をＢｃｌＩ－ＨＦに指定する。
【０１１８】
４．ＢｃｌＩ－ＨＦの精製
１００μｇ／ｍｌ Ａｍｐを添加したＬＢでＥＲ２９８４細胞（ｐＲＲＳ－ＢｃｌＩ（Ｙ１９２Ｆ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＢｃｌＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｃｌＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。
【０１１９】
５．ＢｃｌＩ－ＨＦとＢｃｌＩ－ＷＴの比較
希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｄａｍ－λＤＮＡを基質としてＢｃｌＩ－ＨＦとＢｃｌＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。比較を図８に示し、結果を（下記）表１３にまとめる。
【０１２０】

【表１３】

表１３：ＢｃｌＩ－ＨＦとＢｃｌＩ－ＷＴの比較

バッファー	BclI-HF		BclI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	12.5%	≥ 250	50%	120	≥2
NEB2	100%	≥ 500	100%	32	≥16
NEB3	25%	≥ 32	50%	64	≥½
NEB4	100%	≥ 2000	100%	32	≥60

【０１２１】

ＢｃｌＩ－ＨＦはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、最良ＦＩは≧２０００であり、ＢｃｌＩ－ＷＴはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは３２であった。総改善倍率は≧２０００／３２＝≧６４倍であった。

【０１２２】

［実施例１３］

ＨＦ　ＢｇｌＩＩの作製

１．ＢｇｌＩＩの発現

各々ＢｇｌＩＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＬａｃＺＺ－ＢｇｌＩＩＲとｐＡＣＹＣ－ＢｇｌＩＩＭで形質転換した大腸菌でＢｇｌＩＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０１２３】

２．ＢｇｌＩＩ－ＨＦの変異誘発

２位、４位、６位、７位、９位、１０位、１２位、１３位、１６位、１８位、２０位、２１位、２２位、２４位、２５位、２６位、２９位、３０位、３３位、３５位、３７位、３８位、３９位、４１位、４２位、４５位、４８位、４９位、５３位、５４位、５５位、５８位、５９位、６０位、６４位、６５位、６６位、６７位、６８位、６９位、７４位、７５位、７６位、７７位、７８位、８１位、８２位、８４位、８５位、８７位、８８位、８９位、９０位、９３位、９５位、９６位、９７位、９８位、１０１位、１０４位、１０５位、１０６位、１０８位、１０９位、１１０位、１１２位、１１３位、１１４位、１１５位、１１６位、１１７位、１１８位、１２０位、１２１位、１２２位、１２４位、１２５位、１３１位、１３２位、１３４位、１３５位、１３６位、１３９位、１４０位、１４１位、１４２位、１４６位、１４７位、１４９位、１５０位、１５１位、１５３位、１５４位、１５７位、１５９位、１６１位、１６２位、１６６位、１７２位、１７３位、１７４位、１７５位、１７６位、１７７位、１７９位、１８２位、１８３位、１８４位、１８７位、１８８位、１８９位、１９１位、１９２位、１９３位、１９５位、１９６位、１９７位、１９８位、１９９位、２０１位、２０３位、２０６位、２０７位、２０８位、２０９位、２１１位、２１２位、２１３位、２１４位、２１５位、２１６位、２１７位、２１９位、２２２位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、８位、５６位、９９位、１４４位、１４５位、１５８位、１８５位及び１９０位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０１２４】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ３０８１に形質転換した。

【０１２５】
３．ＢｇｌＩＩ－ＨＦの選択
ｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｇｌＩＩ－ＨＦの選択を行った。ＢｇｌＩＩ－ＷＴはＮＥＢ３中のほうが高活性であるため、ＮＥＢ４中のほうが高活性の変異体を選択した。次に、高活性の全変異体をグリセロール中でＷＴ活性と比較し、スター活性を試験した。通常では、ＮＥＢ４中で最高活性の変異体はスター活性が改善された変異体である。ＢｇｌＩ－ＷＴでスター活性を促進し得る条件である水中ＥｘｏＩバッファーを使用して最も有望な変異体（Ｈ１０Ａ、Ｎ２０８Ａ、Ｋ４８Ａ、Ｋ７４Ａ、Ｒ７５Ａ、Ｙ５６Ｆ、Ｋ５８Ａ、Ｍ１１７Ａ）を最終的に試験した。１種の変異体Ｎ２０８ＡはＮＥＢ４中のスター活性の低下と総活性の増加を示した。本発明者らは忠実度が変化したことを示す別の指標である部分活性を測定した処、小規模培養において、この変異体は安定な部分活性をもつようである。ＢｇｌＩＩ（Ｎ２０８Ａ）をＢｇｌＩＩ－ＨＦに指定する。
【０１２６】
４．ＢｇｌＩＩ－ＨＦの精製
１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌを添加したＬＢでＥＲ３０８１細胞（ｐＬａｃＺＺ－ＢｇｌＩＩ（Ｎ２０８Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＢｇｌＩＩＭ）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｇｌＩＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。
【０１２７】
５．ＢｇｌＩＩ－ＨＦとＢｇｌＩＩ－ＷＴの比較
希釈剤Ｂを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＢｇｌＩＩ－ＨＦ及びＢｇｌＩＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。比較を図９に示し、結果を（下記）表１４にまとめる。
【０１２８】

【表１４】

表１４：ＢｇｌＩＩ－ＨＦとＢｇｌＩＩ－ＷＴの比較

バッファー	BglII-HF		BglII-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	12.5%	≥ 8000	25%	250	≥32
NEB2	100%	≥ 128000	100%	64	≥2000
NEB3	50%	≥ 2000	100%	120	≥16
NEB4	25%	≥ 32000	6.3%	16	≥2000

【０１２９】

ＢｇｌＩＩ－ＨＦはＮＥＢ２中で最良性能であり、ＦＩは≧１２８０００であり、ＢｇｌＩＩ－ＷＴはＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは１２０であった。総改善倍率は≧１２８０００／１２０＝≧１０００倍であった。

【０１３０】

［実施例１４］

ＨＦ　ＢｓｔＥＩＩの作製

１．ＢｓｔＥＩＩの発現

各々ＢｓｔＥＩＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＢｓｔＥＩＩＲとｐＡＣＹＣ－ＢｓｔＥＩＩＭで形質転換した大腸菌でＢｓｔＥＩＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０１３１】

２．ＢｓｔＥＩＩ－ＨＦの変異誘発

７位、９位、１０位、１４位、１７位、２０位、２１位、２２位、２５位、２６位、２９位、３０位、３２位、３６位、３７位、４０位、４１位、４４位、４７位、４８位、４９位、５０位、５１位、５２位、５４位、５７位、５８位、６０位、６１位、６２位、６３位、６４位、６５位、６７位、６８位、６９位、７２位、７５位、７６位、７９位、８０位、８１位、８２位、８３位、８５位、８８位、８９位、９０位、９１位、９２位、９４位、９５位、９８位、９９位、１０１位、１０２位、１０３位、１０５位、１０６位、１１１位、１１２位、１１３位、１１６位、１１７位、１１８位、１１９位、１２０位、１２１位、１２２位、１２３位、１３０位、１３２位、１３３位、１３４位、１３５位、１３６位、１３７位、１３８位、１４０位、１４２位、１４３位、１４７位、１５０位、１５１位、１５２位、１５４位、１５５位、１５７位、１６０位、１６１位、１６２位、１６３位、１６５位、１６６位、１６７位、１７１位、１７２位、１７５位、１７６位、１７８位、１７９位、１８０位、１８２位、１８４位、１８９位、１９０位、１９１位、１９２位、１９３位、１９４位、１９５位、１９９位、２０２位、２０４位、２０５位、２０６位、２０７位、２０８位、２０９位、２１１位、２１２位、２１３位、２１４位、２１５位、２１６位、２１７位、２１８位、２１９位、２２０位、２２１位、２２２位、２２４位、２２５位、２２７位、２２８位、２３２位、２３３位、２３４位、２３６位、２３８位、２４３位、２４４位、２４５位、２４６位、２４７位、２５１位、２５２位、２５５位、２５６位、２５８位、２６１位、２６２位、２６４位、２６５位、２６６位、２７２位、２７４位、２７７位、２７８位、２７９位、２８１位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、８位、１５位、２４位、２７位、３５位、４３位、７７位、１２９位

、１３１位、１３９位、１５６位、１８８位、２０３位、２２９位、２５７位及び２６３位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０１３２】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２６８３に形質転換した。

【０１３３】

３．ＢｓｔＥＩＩ－ＨＦの選択

λＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｓｔＥＩＩ－ＨＦの選択を行った。ＷＴ　ＢｓｔＥＩＩはＮＥＢ３中のほうが高活性であるため、ＮＥＢ４中のほうが高活性の変異体を選択した。Ｋ０１４Ａ、Ｑ０６９Ａ、Ｅ０９９Ａ、Ｒ１０５Ａ、Ｒ１１７Ａ、Ｇ１３５Ａ及びＹ０３５Ｆの７種の変異体はＮＥＢ４中の活性が改善されていることが判明した。Ｒ１０５ＡはＮＥＢ４及び水中のＷＴに比較して活性差が最大であり、ＷＴでスター活性を示す条件であるグリセロール＋ＥｘｏＩバッファー中で試験した場合にスター活性の低下も示した。ＢｓｔＥＩＩ（Ｒ１０５Ａ）をＢｓｔＥＩＩ－ＨＦに指定する。

【０１３４】

４．ＢｓｔＥＩＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌを添加したＬＢでＥＲ２６８３細胞（ｐＵＣ１９－ＢｓｔＥＩＩ（Ｒ１０５Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＢｓｔＥＩＩＭ）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｓｔＥＩＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０１３５】

５．ＢｓｔＥＩＩ－ＨＦとＷＴ　ＢｓｔＥＩＩの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でλＤＮＡを基質としてＢｓｔＥＩＩ－ＨＦとＷＴ　ＢｓｔＥＩＩのＦＩを別々に測定した。比較を図１０に示し、結果を（下記）表１５にまとめる。

【０１３６】

【表１５】

表１５：ＢｓｔＥＩＩ－ＨＦとＢｓｔＥＩＩ－ＷＴの比較

バッファー	BstEII-HF		BstEII-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	3%	≥ 64	50%	16	≥4
NEB2	50%	≥ 1000	100%	4	≥250
NEB3	1.6%	≥ 32	50%	16	≥2
NEB4	100%	≥ 2000	100%	4	≥500

【０１３７】

ＢｓｔＥＩＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧２０００であり、ＢｓｔＥＩＩ－ＷＴはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは４であった。総改善倍率は≧２０００／４＝≧５００倍である。

【０１３８】

［実施例１５］

ＨＦ　ＢａｎＩＩの作製

１．ＢａｎＩＩの発現

各々ＢａｎＩＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＢａｎＩＩＲとｐＡＣＹＣｌ－ＢａｎＩＩＭで形質転換した大腸菌でＢａｎＩＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０１３９】

２．ＢａｎＩＩ－ＨＦの変異誘発

７位、８位、９位、１０位、１２位、１６位、１７位、２０位、２１位、２３位、２４位、２５位、２６位、２８位、２９位、２４位、３１位、３２位、３５位、３８位、３９位、４３位、４４位、４５位、４７位、４９位、５４位、５９位、６１位、６３位、６４位、６６位、６７位、７１位、７２位、７３位、７４位、７５位、７７位、７８位、８１位、８３位、８４位、８７位、８８位、９２位、９４位、９５位、９６位、９７位、９９位、１００位、１０３位、１０４位、１０５位、１０６位、１０７位、１０８位、１１１位、１１２位、１１３位、１１５位、１１７位、１１８位、１２０位、１２１位、１２２位、１２３位、１２６位、１２７位、１２８位、１２９位、１３０位、１３１位、１３５位、１３９位、１４２位、１４３位、１４５位、１４６位、１４７位、１４８位、１４９位、１５２位、１５３位、１５５位、１５６位、１６３位、１６６位、１６７位、１６８位、１６９位、１７０位、１７１位、１７３位、１７５位、１７６位、１７８位、１７９位、１８０位、１８１位、１８３位、１８４位、１８６位、１９０位、１９１位、１９４位、１９５位、１９６位、１９８位、１９９位、２００位、２０７位、２０８位、２１１位、２１３位、２１４位、２１５位、２１６位、２１９位、２２０位、２２１位、２２２位、２２４位、２２６位、２２９位、２３０位、２３１位、２３２位、２３４位、２３５位、２３６位、２３７位、２３９位、２４０位、２４２位、２４５位、２４６位、２４７位、２４８位、２５２位、２５４位、２５６位、２５７位、２５８位、２５９位、２６１位、２６２位、２６３位、２６４位、２６６位、２６７位、２７０位、２７１位、２７２位、２７４位、２７６位、２７８位、２７９位、２８１　２８４位、２８５位、２８６位、２８７位、２８９位、２９１位、２９２位、２９３位、２９４位、２９５位、２９６位、３００位、３０２位、３０３位、３０５位、３０９位、３１１位、３１２位、３１４位

、３１７位、３１８位、３１９位、３２２位、３２６位、３２７位、３２８位、３３０位、３３１位、３３４位、３３８位、３３９位、３４１位、３４２位、３４４位、３４６位、３４７位、３４８位、３４９位、３５１位、３５２位、３５５位、３５６位及び３５８位のＴｙｒ（及び元々Ａｌａの残基）以外の全残基をＡｌａに置換し、２７位、５０位、８０位、１６０位、１８２位、１９７位、２４４位、２５１位、２６０位、３０７位及び３１３位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０１４０】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２５６６に形質転換した。

【０１４１】

３．ＢａｎＩＩ－ＨＦの選択

λＤＮＡを基質として、ＮＥＢ４＋水中の活性と、グリセロール＋ＥｘｏＩバッファー中のスター活性の比較を使用してＢａｎＩＩ－ＨＦの選択を行った。スター活性の改善を示しながら水及びＮＥＢ４中でＷＴと同等以上の活性を示した変異体を後続試験に選択した。これらの変異体はＮ１０６Ａ、Ｑ１６９Ａ及びＥ３１４Ａを含む。本発明者らは部分パターンも高忠実度の指標としたが、Ｒ１２６Ａは安定した部分パターンを示したため、この変異体も選択した。精製後、Ｒ１２６Ａはスター活性の最良の低下を示した。ＢａｎＩＩ（Ｒ１２６Ａ）をＢａｎＩＩ－ＨＦに指定する。

【０１４２】

４．ＢａｎＩＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌを添加したＬＢでＥＲ２５６６細胞（ｐＵＣ１９－ＢａｎＩＩ（Ｒ１２６Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＢａｎＩＩＭ）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢａｎＩＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０１４３】

５．ＢａｎＩＩ－ＨＦとＢａｎＩＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｄａｍ－λＤＮＡを基質としてＢａｎＩＩ－ＨＦとＢａｎＩＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表１６にまとめる。

【０１４４】

【表１６】

表１６：ＢａｎＩＩ－ＨＦとＢａｎＩＩ－ＷＴの比較

バッファー	BanII-HF		BanII-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	100%	≥ 4000	100%	64	≥64
NEB2	50%	≥ 2000	100%	64	≥32
NEB3	12.5%	≥ 500	12.5%	16	≥32
NEB4	50%	≥ 2000	100%	16	≥125

【０１４５】

ＢａｎＩＩ－ＨＦはＮＥＢ１中で最良性能であり、ＦＩは≧４０００であり、ＢａｎＩＩ－ＷＴはＮＥＢ１、ＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、最良ＦＩは６４であった。従って、ＮＥＢ１中の総改善倍率は≧４０００／６４＝≧６４倍である。

【０１４６】

［実施例１６］

ＨＦ　ＰｓｐＧＩの作製

１．ＰｓｐＧＩの発現

ＰｓｐＧＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＰｓｐＧＩＲＭで形質転換した大腸菌でＰｓｐＧＩをを発現させた。Ａｍｐを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。

【０１４７】

２．ＰｓｐＧＩ－ＨＦの変異誘発

ＰｓｐＧＩ蛋白質の長さは２７２アミノ酸である。先ずＰｓｐＧＩ蛋白質の合計１６６カ所のＡＡ位置をＡｌａ（又はＰｈｅ）に変異させるように設計した。Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＴｒｐをＡｌａに変異させた。ＴｒｙをＰｈｅに変異させた。これらは８位、１０位、１１位、１２位、１３位、１４位、１５位、１６位、１８位、１９位、２０位、２１位、２２位、２５位、２６位、２９位、３０位、３２位、３４位、３５位、３８位、３９位、４２位、４３位、４４位、４５位、４６位、４７位、４８位、５１位、５２位、５３位、５４位、５７位、６０位、６１位、６２位、６５位、６８位、６９位、７１位、７２位、７３位、７５位、７６位、８０位、８２位、８４位、８５位、８６位、８７位、８９位、９０位、９１位、９３位、９４位、９６位、９８位、９９位、１００位、１０１位、１０２位、１０５位、１０９位、１１０位、１１３位、１３４位、１３５位、１３６位、１３７位、１３８位、１４２位、１４３位、１４５位、１４９位、１５０位、１５１位、１５２位、１５３位、１５８位、１６０位、１６１位、１６２位、１６４位及び１６５位であった。変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株２９８４に形質転換した。

【０１４８】

３．ＰｓｐＧＩ－ＨＦの選択

ｐＢＣ４　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ４中の変異体とＷＴの活性の比較を使用してＰｓｐＧＩ－ＨＦの選択を行った。ＰｓｐＧＩの選択アッセイはＮＥＢ４中でｐＢＣ４を基質として実施した（６９℃で２時間消化）。Ｔ２０Ａ、Ｐ５２Ａ、Ｙ６７Ｆ、Ｋ６８Ａ、Ｒ７５Ａ、Ｅ８６Ａ、Ｑ９０Ａ、Ｓ９１Ａ、Ｑ９３Ａ、Ｈ１２１Ａ及びＧ１７２Ａの１１種

の変異体はＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも高いことが判明した。ＰｓｐＧＩ（Ｒ７５Ａ）はＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも著しく高い。通常では、ＮＥＢ４中で最高活性のものはスター活性が改善されたものである。各種条件及び基質で数ラウンドの比較後、ＰｓｐＧＩ（Ｒ７５Ａ）が高切断効率高活性を維持しながらスター活性の実質的低下を示す好ましい変異体であることが判明した。ＰｓｐＧＩ（Ｒ７５Ａ）をＰｓｐＧＩ－ＨＦに指定する。

【０１４９】

４．ＰｓｐＧＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ Ａｍｐを添加したＬＢで大腸菌２９８４細胞（ｐＲＲＳ－ＰｓｐＧＩＲＭ（Ｒ７５Ａ））２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分を更に濃縮した。濃縮したＰｓｐＧＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃条件下で保存した。

【０１５０】

５．ＰｓｐＧ－ＨＦとＰｓｐＧＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＣ４ ＤＮＡを基質としてＰｓｐＧ－ＨＦ及びＰｓｐＧＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表１７にまとめる。

【０１５１】

【表１７】

表１７：ＰｓｐＧ－ＨＦとＰｓｐＧＩ－ＷＴの比較

バッファー	PspGI-HF		PspGI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	25%	≥ 1000	12.5%	1	≥1000
NEB2	100%	≥ 4000	100%	4	≥1000
NEB3	100%	≥ 4000	100%	8	≥500
NEB4	100%	≥ 4000	100%	1	≥4000

【０１５２】

ＰｓｐＧＩ－ＨＦはＮＥＢ２、ＮＥＢ３及びＮＥＢ４中で最良性能であり、好ましいＦＩは≧４０００であり、ＰｓｐＧＩ－ＷＴはＮＥＢ２、ＮＥＢ３及びＮＥＢ４中で最良性能であった。ＮＥＢ３中のＰｓｐＧＩ－ＷＴの好ましいＦＩは８であった。ＦＩ総改善倍率は≧４０００／８＝≧５００倍であった。

【０１５３】

［実施例１７］

ＨＦ ＳｐｅＩの作製

１．ＳｐｅＩの発現
各々ＳｐｅＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＳｐｅＩとｐＡＳＹＸ２０－ＳｐｅＩＭ９で形質転換した大腸菌でＳｐｅＩを発現させた。ＡｍｐとＫａｎを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。
【０１５４】
２．ＳｐｅＩ－ＨＦの変異誘発
７位、９位、１０位、１７位、１８位、２０位、２１位、２２位、２４位、２５位、２６位、２９位、３０位、３１位、３２位、３３位、３４位、３６位、４０位、４３位、４５位、４６位、４９位、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５７位、５８位、５９位、６１位、６５位、６６位、７０位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位、７８位、８０位、８１位、８４位、８６位、８７位、８８位、８９位、９０位、９２位、９６位、９７位、１０１位、１０２位、１０３位、１０５位、１０７位、１０８位、１０９位、１１０位、１１２位、１１３位、１１５位、１１６位、１１８位、１２１位、１２２位、１２５位、１２６位、１２８位、１３０位、１３１位、１３７位、１３８位、１３９位、１４０位、１４２位、１４６位、１４９位、１５１位、１５２位、１５４位、１５７位、１５８位、１５９位、１６０位、１６１位、１６３位、１６６位、１６７位、１６９位、１７０位、１７２位、１７４位、１７５位、１７９位、１８０位及び１８２位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１３位、１９位、２８位、５５位、１０４位、１２０位、１２９位及び１６４位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。
【０１５５】
変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ１０３８に形質転換した。
【０１５６】
３．ＳｐｅＩ－ＨＦの選択
ＳａｃＩ－ＨＦで予め消化したｐＸＢＡ　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ４＋水中の各変異体の活性の比較と共に、ＥｘｏＩ及び正常ｐＸｂａとのグリセロール反応を使用してＳｐｅＩ－ＨＦの選択を行った。ＳａｃＩ－ＨＦで消化したｐＸＢＡを使用することにより、変異体の活性をＷＴと比較試験する場合により明瞭にした。グリセロール反応はスター活性結果を比較するために使用した。数種の変異体Ｅ０５９Ａ、Ｐ０６５Ａ、Ｓ１０８Ａ、Ｎ１７２Ａ、Ｋ１７４Ａ、Ｑ１７９Ａ、Ｇ１８２Ａ及びＹ０５５Ｆは高いコグネイト活性と同時にスター活性の低下を示した。精製サンプルの比較後、ＳｐｅＩ（Ｐ０６５Ａ）をＳｐｅＩ－ＨＦに指定した。
【０１５７】
４．ＳｐｅＩ－ＨＦの精製
１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌを添加したＬＢでＥＲ３０８１細胞（ｐＲＲＳ－ＳｐｅＩＭ７（Ｐ０６５Ａ），ｐＳＹＸ２０－ＳｐｅＩＭ９）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＳｐｅＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０１５８】
５．ＳｐｅＩ－ＨＦとＳｐｅＩ－ＷＴの比較
希釈剤Ｃを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＳｐｅＩ－ＨＦとＳｐｅＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定し、結果を（下記）表１８にまとめる。
【０１５９】
【表１８】

表１８：ＳｐｅＩ－ＨＦとＳｐｅＩ－ＷＴの比較

バッファー	SpeI-HF		SpeI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 4000	100%	1000	≥1000
NEB2	12.5%	≥ 2000	50%	500	≥2
NEB3	12.5%	≥ 2000	12.5%	2000	≥1/8
NEB4	100%	≥ 8000	50%	500	≥2

【０１６０】
ＳｐｅＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最高活性であり、ＦＩは≧８０００であり、ＳｐｅＩ－ＷＴはＮＥＢ１中で最高活性であり、ＦＩは１０００である。従って、総改善倍率は≧８倍である。
【０１６１】
［実施例１８］
ＨＦ　ＢｓｍＡＩの作製
１．　ＢｓｍＡＩの発現
各々ＢｓｍＡＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＢＡＤ２４１－ＢｓｍＡＩＲとｐＡＣＹＣ－ＢｓｍＡＩＭで形質転換した大腸菌でＢｓｍＡＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖後、アラビノースにより４時間誘導した。
【０１６２】
２．ＢｓｍＡＩ－ＨＦの変異誘発
ＢｓａＩ、ＢｓｍＢＩ及びＢｓｍＡＩ間には相同性があり、ＢｓｍＡＩの２１０－２２７領域にＢｓａＩ及びＢｓｍＢＩの高忠実度変異体が検出されたため、この領域のアミノ酸を全てＡｌａに変異させることにした。
【０１６３】
変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ３０８１に形質転換した。
【０１６４】
３．ＢｓｍＡＩ－ＨＦの選択
ＦＸ１７４　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ４中の変異体ＢｓｍＡＩとＷＴ　ＢｓｍＡＩのスター活性の比較を使用してＢｓｍＡＩ－ＨＦの選択を行った。Ｎ２１２Ａ及びＬ２１３Ａの２種の変異体はＷＴ　ＢｓｍＡＩよりもスター活性が低かった。変異体ＢｓｍＡＩ（Ｎ２１２Ａ）をＢｓｍＡＩ－ＨＦに指定する。
【０１６５】
４．ＢｓｍＡＩ－ＨＦの精製
１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２５６６細

胞（ｐＢＡＤ２４１－ＢｓｍＡＩ（Ｎ２１２Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＢｓｍＡＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。次に最終濃度０．２％となるようにアラビノースにより細胞を４時間誘導した。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｓｍＡＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０１６６】

５．ＢｓｍＡＩ－ＨＦとＢｓｍＡＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ｂを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でＦＸ１７４　ＤＮＡを基質としてＢｓｍＡＩ－ＨＦとＢｓｍＡＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表１９にまとめる。

【０１６７】

【表１９】

表１９：ＢｓｍＡＩ－ＨＦとＢｓｍＡＩ－ＷＴの比較

バッファー	BsmAI-HF		BsmAI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	100%	≥ 4000	50%	120	≥32
NEB2	50%	≥ 2000	50%	500	≥4
NEB3	12.5%	≥ 500	50%	500	1
NEB4	100%	≥ 4000	100%	250	≥8

【０１６８】

ＢｓｍＡＩ－ＨＦはＮＥＢ１及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧４０００であり、ＢｓｍＡＩ－ＷＴはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは２５０であった。従って、ＦＩ総改善倍率は≧４０００／２５０＝≧１６倍であった。

【０１６９】

［実施例１９］

ＨＦ　ＢｓｔＸＩの作製

国際公開第ＷＯ２００９／００９７９７号の実施例１９に記載されているようにＢｓｔＸＩはＣＣＡＮＮＮＮＮ／ＮＴＧＧで認識・消化する。変異体ＢｓｔＸＩ（Ｎ６５Ａ）をＢｓｔＸＩの高忠実度変異体として選択した。スター活性の低い良好なＢｓｔＸＩを探し出す別の方法はＮ６５を他の全アミノ酸残基に変異させる方法である。そのうち、ＢｓｔＸＩ（Ｎ６５Ｔ）はスター活性が低いことが判明したので、ＢｓｔＸＩ－ＨＦに指定した。

【０１７０】
ＢｓｔＸＩ－ＨＦをＥＲ２８３３（ｐＢＡＤ２４１－ＢｓｔＸＩ（Ｎ６５Ｔ），ｐＡＣＹＣ－ＢｓｔＸＩＭ）で発現させた。増殖及び精製法はＷＯ／２００９／００９７９７号に従って実施した。
【０１７１】
下表（表２０）はＢｓｔＸＩ－ＨＦとＢｓｔＸＩ　ＷＴのＦＩを比較する。
【０１７２】
【表２０】
表２０：ＢｓｔＸＩ－ＨＦとＢｓｔＸＩ－ＷＴの比較

バッファー	BstXI-HF		BstXI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 500	6%	4	≥125
NEB2	100%	≥ 1000	100%	32	≥32
NEB3	100%	≥ 1000	100%	2	≥500
NEB4	100%	≥1000	100%	32	≥32

【０１７３】
ＢｓｔＸＩ－ＨＦはＮＥＢ２、ＮＥＢ３及びＮＥＢ４中で最良活性であり、ＢｓｔＸＩ－ＨＦの最良ＦＩは≧１０００であり、ＷＴ　ＢｓｔＸＩはＮＥＢ２、ＮＥＢ３及びＮＥＢ４中で最良活性であった。ＮＥＢ２及びＮＥＢ４中のＷＴ　ＢｓｔＸＩのＦＩは３２であった。従って、総改善倍率は≧３２倍であった。
【０１７４】
［実施例２０］
ＨＦ　ＳｆｉＩの作製
１．ＳｆｉＩの発現
各々ＳｆｉＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＳｆｉＩＲとｐＳＸ３３－ＳｆｉＩＭで形質転換した大腸菌でＳｆｉＩを発現させた。ＡｍｐとＫａｎを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。
【０１７５】
２．ＳｆｉＩ－ＨＦの変異誘発
７位、９位、１１位、１２位、１４位、１５位、１７位、１８位、１９位、２０位、２２位、２３位、２６位、２９位、３０位、３２位、３３位、３４位、３６位、３７位、４０位、４１位、４２位、４５位、４６位、４７位、４８位、４９位、５５位、５６位、５８位、５９位、６３位、６６位、６７位、６９位、７１位、７２位、７３位、７６位、７９位、８１位、８２位、８４位、８７位、８８位、８９位、９０位、９１位、９４位、９５位、１００位、１０２位、１０４位、１０５位、１０６位、１０７位、１０８位、１０９位、１１０位、１１１位、１１３位、１１４位、１１５位、１１６位、１１８位、１２０位、１２２位、１２４位、１２５位、１２６位、１２７位、１２８位、１２９位、１３０位、１３３位、１３５位、１３７位、１４０位、１４１位、１４５位、１４６位、１４８位、１４９位、１５０位、１５３位、１５６位、１５７位、１５８位、１６２位、１６６位、１６７位、１６９位、１７０位、１７２位、１７３位、１７４位、１７６位、１７７位、１７９位、１８０位、１８５位、１８７位、１８８位、１９０位、１９２位、１９３位、１９４位、１９６位、１９７位、１９８位、１９９位、２００位、２０１位、２０

２位、２０５位、２０７位、２０８位、２０９位、２１０位、２１１位、２１３位、２１４位、２１５位、２１８位、２２０位、２２４位、２２５位、２２７位、２２８位、２３１位、２３３位、２３５位、２３６位、２３８位、２４０位、２４２位、２４３位、２４４位、２４６位、２４７位、２４８位、２４９位、２５１位、２５２位、２５４位、２５５位、２５７位、２５８位、２５９位、２６１位、２６２位、２６３位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、３１位、６０位、６８位、８０位、１６４位、１６５位、１７５位、１８２位、１９５位、２２２位、２３９位及び２４５位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０１７６】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２１６９に形質転換した。

【０１７７】

３．ＳｆｉＩ－ＨＦの選択

ＥｃｏＲＩ－ＨＦで予め消化したｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ　ＥｘｏＩバッファーとＢＳＡを添加した水中の変異体とＷＴの活性の比較を使用してＳｆｉＩ－ＨＦの選択を行った。指定バッファー中でＷＴに比較してスター活性の変化を示しながら野生型と同等以上の活性を示す変異体を選択した。数種の変異体Ｅ００７Ａ、Ｄ０１１Ａ、Ｅ０４９Ａ、Ｒ０７３Ａ、Ｒ０１１４Ａ、Ｇ１３７Ａ、Ｓ２１０Ａ及びＲ２１３ＡはＮＥＢ４中で高活性であることが判明した。精製後、Ｐ１１４Ａはスター活性が最も顕著に低下していることが判明した。ＳｆｉＩ（Ｒ１１４Ａ）をＳｆｉＩ－ＨＦに指定する。

【０１７８】

変異体Ｎ０７１Ａ、Ｄ０７９Ａ、Ｈ１６２Ａ、Ｒ２２５Ａ、Ｋ２２７Ａ、Ｙ０６８Ｆ及びＹ１８２Ｆではスター活性が増加したことも注目すべきである。Ｙ０６８ＦはＷＴと切断パターンが異なることが従来から認められている。

【０１７９】

４．ＳｆｉＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｋａｎを添加したＬＢでＥＲ２１６９細胞（ｐＲＲＳ－ＳｆｉＩ（Ｒ１１４Ａ），ｐＳＸ３３－ＳｆｉＩＭ）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＳｆｉＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え－２０℃にて保存した。

【０１８０】

５．ＳｆｉＩ－ＨＦとＳｆｉＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ｃを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＣ４　ＤＮＡを基質としてＳｆｉＩ－ＨＦとＳｆｉＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。比較を図１１に示し、結果を（下記）表２１にまとめる。

【０１８１】

【表２１】

表２１：ＳｆｉＩ－ＨＦとＳｆｉＩ－ＨＦの比較

バッファー	SfiI-HF		SfiI-HF		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 250	12.5%	64	≥4
NEB2	12.5%	≥ 1000	100%	250	≥4
NEB3	0.4%	≥ 32	100%	2000	≥1/64
NEB4	100%	≥ 8000	25%	64	≥125

【０１８２】

ＳｆｉＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧８０００であり、ＷＴ　ＳｆｉＩはＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは２０００であった。総改善倍率は≧８０００／２０００＝≧４倍である。

【０１８３】

［実施例２１］

ＨＦ　ＰｍｅＩの作製

１．ＰｍｅＩの発現

各々ＰｍｅＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＰｍｅＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＥｓａＳ９ＩＭで形質転換した大腸菌でＰｍｅＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０１８４】

２．ＰｍｅＩ－ＨＦの変異誘発

７位、８位、１０位、１３位、１４位、１７位、２０位、２１位、２２位、２５位、２８位、２９位、３０位、３２位、３３位、３５位、３７位、３９位、４１位、４２位、４３位、４６位、４７位、４９位、５０位、５１位、５４位、５５位、６０位、６２位、６３位、６４位、６６位、６７位、６８位、６９位、７１位、７２位、７３位、７７位、７９位、８０位、８１位、８２位、８３位、８６位、８７位、９１位、９４位、９５位、９６位、９７位、９８位、１００位、１０４位、１０６位、１０７位、１０８位、１０９位、１１０位、１１２位、１１３位、１１４位、１１５位、１１６位、１１７位、１１８位、１２１位、１２３位、１２４位、１２７位、１３０位、１３１位、１３２位、１３３位、１３４位、１３５位、１３７位、１３８位、１４５位、１４７位、１４８位、１４９位、１５１位、１５２位、１５３位、１５４位、１５５位、１５７位、１６０位、１６２位、１６５位、１６６位、１６７位、１６９位、１７０位、１７１位、１７２位、１７７位、１８０位、１８１位、１８２位、１８３位、１８５位、１８６位、１８８位、１９０位、１９１位、１９２位、１９３位、１９４位、１９９位、２００位、２０１位、２０２位、２０４位、２０７位、２０８位、２０９位、２１０位、２１１位、２１２位、２１５位、２１８位、２１９位、２２１位、２２２位、２２３位、２２５位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１１１位、１２９位、１４６位及び１６１位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０１８５】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２４２６に形質転換した。

【０１８６】
３．ＰｍｅＩ－ＨＦの選択
水＋ＮＥＢ４中でλＤＮＡを基質とした場合と、グリセロール＋ＮＥＢ　Ｔｈｅｒｍｏｐｏｌバッファー中でｐＸｂａを基質とした場合のＷＴと変異体の活性の比較を使用してＰｍｅＩ－ＨＦの選択を行った。λＤＮＡを基質として水中で変異体とＷＴ　ＰｍｅＩを試験することによりコグネイト活性を参照し、ＮＥＢ４中の活性がＷＴと同等以上のものを選択した。次に、活性が許容可能な変異体でも、ＴｈｅｒｍｏｐｏｌバッファーとｐＸｂａを使用するグリセロール条件下で試験した場合にスター活性の変化を示さなかった場合には排除した。数種の変異体Ｐ０７９Ａ、Ｅ０８６Ａ、Ｈ０９６Ａ及びＥ２１８Ａはスター活性が変化することが判明した。ＰｍｅＩ（Ｅ０８６Ａ）をＰｍｅＩ－ＨＦに指定する。

【０１８７】
４．ＰｍｅＩ－ＨＦの精製
１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２４２６細胞（ｐＲＲＳ－ＰｍｅＩ（Ｐ１５４Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＥｓａＳ９ＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＰｍｅＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０１８８】
５．ＰｍｅＩ－ＨＦとＰｍｅＩ－ＷＴの比較
希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＰｍｅＩ－ＨＦとＰｍｅＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表２２にまとめる。

【０１８９】
【表２２】
表２２：ＰｍｅＩ－ＨＦとＰｍｅＩ－ＷＴの比較

バッファー	PmeI-HF		PmeI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	12.5%	≥ 2000	100%	250	≥64
NEB2	6.3%	≥ 500	100%	250	≥500
NEB3	0.4%	≥ 32	50%	120	≥125
NEB4	100%	≥ 8000	25%	64	≥500

【０１９０】
ＰｍｅＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧８０００であり、ＰｍｅＩ－ＷＴはＮＥＢ１及びＮＥＢ２中で最良性能であり、ＦＩは２５０であった。総改善倍率は≧８０００／２５０＝≧１６倍である。
【０１９１】
［実施例２２］
ＨＦ　ＳｍａＩの作製
１．ＳｍａＩの発現
各々ＳｍａＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＳｍａＩＲとｐＳＹＸ２０－ＳｍａＩＭで形質転換した大腸菌でＳｍａＩを発現させた。ＡｍｐとＫａｎを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。
【０１９２】
２．ＳｍａＩ－ＨＦの変異誘発
全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、全てのＴｙｒをＰｈｅに置換した。
【０１９３】
変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２４２８に形質転換した。
【０１９４】
３．ＳｍａＩ－ＨＦの選択
ｐＸｂａ　ＤＮＡを基質として、水＋ＮＥＢ４中と、ＮＥＢ標準Ｔａｑバッファーを加えたスター活性誘導グリセロール条件下における活性の比較を使用してＳｍａＩ－ＨＦの選択を行った。ＷＴと同等以上のコグネイト活性を維持しながら指定バッファー中でスター活性の変化を示した変異体を選択した。数種の変異体Ｅ３２Ｒ、Ｓ０８１Ａ、Ｇ１３２Ａ及び二重変異体Ｆ６０Ｌ／Ｓ６１Ｒが検出された。ＳｍａＩ（Ｆ６０Ｌ／Ｓ６１Ｒ）をＳｍａＩ－ＨＦに指定する。
【０１９５】
４．ＳｍａＩ－ＨＦの精製
１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｋａｎを添加したＬＢでＥＲ２４２８細胞（ｐＲＲＳ－ＳｍａＩ（Ｆ６０Ｌ／Ｓ６１Ｒ），ｐＳＹＸ２０－ＳｍａＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＳｍａＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。
【０１９６】
５．ＳｍａＩ－ＨＦとＳｍａＩ－ＷＴの比較
希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ　ＤＮＡを基質としてＳｍａＩ－ＨＦとＷＴ　ＳｍａＩのＦＩを別々に測定した。比較を図１２に示し、結果を（下記）表２３にまとめる。
【０１９７】

【表２３】

表２３：ＳｍａＩ－ＨＦとＳｍａＩ－ＷＴの比較

バッファー	SmaI-HF		SmaI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	0.2%	≥ 2000	3%	≥ 16	ND
NEB2	3.2%	≥ 32000	12.5%	≥ 64	ND
NEB3	0.0032%	≥ 32	0.8%	≥ 8	ND
NEB4	100%	≥ 256000	100%	64	≥4000

ND:測定不能

【０１９８】

ＳｍａＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧２５６０００であり、ＳｍａＩ－ＷＴはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは６４であった。総改善倍率は≧２５６０００／６４＝≧４０００倍である。

【０１９９】

［実施例２３］

高忠実度ＡａｔＩＩの作製

１．ＡａｔＩＩの発現

各々ＡａｔＩＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＡａｔＩＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＡａｔＩＩＭで形質転換した大腸菌でＡａｔＩＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０２００】

２．ＡａｔＩＩ－ＨＦの変異誘発

８位、９位、１１位、１２位、１３位、１６位、１７位、１８位、２０位、２２位、２６位、２９位、３２位、３３位、３５位、３６位、３７位、３８位、４０位、４３位、４５位、４６位、４９位、５２位、５３位、５４位、５６位、５７位、５８位、６０位、６１位、６２位、６４位、６５位、６９位、７０位、７１位、７２位、７３位、７４位、７５位、７７位、７９位、８０位、８３位、８４位、８６位、８７位、９０位、９２位、９３位、９４位、９５位、９７位、９９位、１００位、１０３位、１０４位、１０６位、１０７位、１１１位、１１３位、１１４位、１１７位、１２１位、１２３位、１２４位、１２５位、１２６位、１２８位、１２９位、１３１位、１３２位、１３３位、１３５位、１３６位、１４０位、１４１位、１４３位、１４４位、１４５位、１４６位、１４８位、１４９位、１５０位、１５１位、１５３位、１５５位、１５６位、１５７位、１６０位、１６４位、１６５位、１６７位、１６９位、１７１位、１７２位、１７３位、１７４位、１７５位、１７６位、１７７位、１７９位、１８１位、１８２位、１８６位、１８９位、１９１位、１９２位、１９３位、１９４位、１９６位、１９８位、２００位、２０１位、２０３位、２０４位、２０５位、２０６位、２０７位、２０８位、２１０位、２１１位、２１３位、２１４位、２１６位、２１７位、２１９位、２２０位、２２１位、２２２位、２２６位、２２８位、２３０位、２３１位、２３３位、２３５位、２３６位、２３７位、２３８位、２４０位、２４１位、２４４位、２４７位、２４８位、２４９位、２５０位、２５１位、２５２位、２５３位、２５６位、２６２位、２６４位、２６５位、２６６位、２６８位、２６９位、２７２位、２７３位、２７５位、２８０位、２８１位、２８２位、２８３位、２８６位、２９８位、２９２位、２９３位、２９５位、２９６位、２９７位、２

９８位、３０１位、３０２位、３０８位、３０９位、３１１位、３１２位、３１３位、３１４位、３１５位、３１７位、３１９位、３２１位、３２５位、３２７位、３２９位、３３０位、３３３位、３３４位、３３５位、３３６位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、８２位、８９位、９８位、１１２位、２３２位、３０５位及び３０６位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０２０１】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２４２６に形質転換した。

【０２０２】

３．ＡａｔＩＩ－ＨＦの選択

ｐＸｂａ　ＤＮＡを基質として水中ＮＥＢ４とグリセロール中ＮＥＢ　ＥｘｏＩバッファーにおける活性の比較を使用してＡａｔＩＩ－ＨＦの選択を行った。水中正常条件下でＷＴと同等以上の活性を維持しながらグリセロール条件下でスター活性の変化を示した変異体を後続試験に選択した。数種の変異体Ｇ０１３Ａ、Ｇ０１６Ａ、Ｋ０１８Ａ、Ｐ０５２Ａ、Ｒ０５３Ａ、Ｋ０７０Ａ、Ｅ０７１Ａ、Ｄ０７２Ａ、Ｇ０７３Ａ、Ｓ８４Ａ、Ｅ０８６Ａ、Ｒ０９０Ａ、Ｋ０９４Ａ、Ｒ０９５Ａ、Ｐ０９９Ａ、Ｐ１０３Ａ、Ｋ１１３Ａ、Ｎ１３５Ａ、Ｓ１５１Ａ、Ｐ１５７Ａ、Ｇ１７３Ａ、Ｔ２０４Ａ、Ｓ２０６Ａ、Ｋ２０７Ａ、Ｅ２３３Ａ、Ｎ２３５Ａ、Ｅ２３７Ａ、Ｓ２３８Ａ、Ｄ２４１Ａ、Ｋ２９５Ａ、Ｓ３０１Ａ及びＳ３０２Ａを初期スクリーニング後の後続試験に選択した。ＡａｔＩＩ（Ｎ２３５Ａ）をＡａｔＩＩ－ＨＦに指定する。

【０２０３】

４．ＡａｔＩＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２４２６細胞（ｐＲＲＳ－ＡａｔＩＩ（Ｎ２３５Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＡａｔＩＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＡａｔＩＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２０４】

５．ＡａｔＩＩ－ＨＦとＡａｔＩＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＡａｔＩＩ－ＨＦとＷＴ　ＡａｔＩＩのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表２４にまとめる。

【０２０５】

【表２４】

表２４：ＡａｔＩＩ－ＨＦとＡａｔＩＩ－ＷＴの比較

バッファー	AatII-HF		AatII-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	NC	NC	3%	32	ND
NEB2	NC	NC	100%	¼	ND
NEB3	NC	NC	NC	NC	ND
NEB4	100%	≥ 1000	50%	16	≥64

NC:実施不能；ND:測定不能

【０２０６】

ＡａｔＩＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧１０００であり、ＷＴ ＡａｔＩＩはＮＥＢ２中で最良性能であり、ＦＩは１／４であった。総改善倍率は≧１０００／１／４＝≧４０００倍である。

【０２０７】

［実施例２４］

ＨＦ ＡｐｏＩの作製

１．ＡｐｏＩの発現

各々ＡｐｏＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＲＲＳ－ＡｐｏＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＡｐｏＩＭで形質転換した大腸菌でＡｐｏＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０２０８】

２．ＡｐｏＩ－ＨＦの変異誘発

８位、９位、１０位、１１位、１３位、１４位、１７位、１８位、１９位、２０位、２１位、２２位、２３位、２４位、２６位、２８位、２９位、３３位、３５位、３６位、３７位、３９位、４１位、４３位、４７位、４８位、４９位、５０位、５１位、５６位、５７位、６０位、６２位、６３位、６４位、６６位、６７位、６９位、７１位、７２位、７３位、７５位、７６位、７７位、８０位、８１位、８２位、８３位、８４位、８７位、９２位、９３位、９４位、９５位、９６位、９７位、１０２位、１０３位、１０５位、１０６位、１０７位、１０８位、１０９位、１１０位、１１１位、１１３位、１１５位、１１６位、１１７位、１１９位、１２０位、１２１位、１２４位、１２５位、１２８位、１２９位、１３１位、１３２位、１３３位、１３６位、１３７位、１４３位、１４４位、１４５位、１４８位、１５３位、１５５位、１５７位、１５９位、１６０位、１６１位、１６２位、１６３位、１６６位、１６７位、１６９位、１７０位、１７５位、１７６位、１７８位、１７９位、１８１位、１８４位、１８５位、１８６位、１８７位、１８８位、１８９位、１９２位、１９３位、１９４位、１９５位、１９９位、２０１位、２０２位、２０４位、２０６位、２０７位、２０９位、２１０位、２１４位、２１６位、２１７位、２１８位、２２１位、２２６位、２２７位、２２９位及び２３０位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ及びＡｒｇをＡｌａに置換した。

【０２０９】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２４２６に形質転換した。

【０２１０】

３．ＡｐｏＩ－ＨＦの選択

λＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＡｐｏＩ－ＨＦの選択を行った。ＮＥＢ４中の活性増加は忠実度改善の指標であるので、ＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも高い変異体を選択した。以下の変異体：Ｓ６４Ａ、Ｓ８０Ａ、Ｓ１６２Ａ、Ｔ７７Ａ／Ｔ９６Ａ及びＮ１７８ＡはＮＥＢ４中で高活性であることが判明した。ＡｐｏＩ（Ｔ７７Ａ／Ｔ９６Ａ）をＡｐｏＩ－ＨＦに指定する。

【０２１１】

４．ＡｐｏＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２４２６細胞（ｐＲＲＳ－ＡｐｏＩ（Ｔ７７Ａ／Ｔ９６Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＡｐｏＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させ、８時間増殖後に０．５ｍＭ ＩＴＰＧで誘導した。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＡｐｏＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２１２】

５．ＡｐｏＩ－ＨＦとＡｐｏＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＸｂａ ＤＮＡを基質としてＡｐｏＩ－ＨＦとＡｐｏＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表２４にまとめる。

【０２１３】

【表２５】

表２４：ＡｐｏＩ－ＨＦとＡｐｏＩ－ＷＴの比較

バッファー	ApoI-HF		ApoI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 2000	25%	120	≥16
NEB2	100%	≥ 4000	100%	32	≥125
NEB3	25%	≥ 1000	100%	64	≥16
NEB4	50%	≥ 2000	50%	32	≥64

【０２１４】

ＡｐｏＩ－ＨＦはＮＥＢ２中で最良性能であり、ＦＩは≧４０００であり、ＷＴ ＡｐｏＩはＮＥＢ２及びＮＥＢ３中で最良性能であり、最良ＦＩは６４であった。総改善倍率は≧４０００／６４＝≧６４倍である。

【０２１５】

［実施例２５］
高忠実度ＢｓｍＢＩの作製
国際公開第ＷＯ２００９／００９７９７号の実施例２３に記載されているようにＢｓｍＢＩはＣＧＴＣＴＣＮ１／Ｎ５で認識・消化する。変異体ＢｓｍＢＩ（Ｒ２３２Ａ）をＢｓｍＢＩの高忠実度変異体として選択した。この変異体を更に特性決定した結果、１時間規模でのＢｓｍＢＩ（Ｒ２３２Ａ）の性能は優れているが、一晩消化すると性能は良好でなくなった。他の変異体を探すと、ＢｓｍＢＩ（Ｗ２３８Ａ）は１時間と一晩のどちらの反応でも優れていることが判明したので、ＢｓｍＢＩ－ＨＦに指定した（図１３）。

【０２１６】
ＢｓｍＢＩ－ＨＦをＥＲ３０８１（ｐＢＡＤ２４１－ＢｓｍＢＩＲ（Ｗ２３８Ａ）／ｐＡＣＹＣ－ＢｓｍＡＩＭ）で発現させた。増殖法と精製法はＷＯ／２００９／００９７９７に従って実施した。

【０２１７】
下表（表２６）はＢｓｍＢＩ－ＨＦとＢｓｍＢＩ－ＷＴのＦＩを比較する。

【０２１８】
【表２６】
表２６：ＢｓｍＢＩ－ＨＦとＢｓｍＢＩ－ＷＴの比較

バッファー	BsmBI-HF		BsmBI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	32	12.5%	1	32
NEB2	50%	120	50%	8	25
NEB3	12.5%	250	100%	120	2
NEB4	100%	250	25%	4	64

【０２１９】
ＢｓｍＢＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良活性であり、ＮＥＢ４中のＢｓｍＢＩ－ＨＦのＦＩは２５０であり、ＢｓｍＢＩ－ＷＴはＮＥＢ３中で最良活性であった。ＮＥＢ２中のＢｓｍＢＩのＦＩは１２０であった。従って、総改善倍率は２倍であった。

【０２２０】
［実施例２６］
ＨＦ　ＢｍｔＩの作製
１．ＢｍｔＩの発現
ｐＡＣＹＣ－ＢｍｔＩＭとｐｌａｃｚｚ１－ＢｍｔＩＲで形質転換した大腸菌でＢｍｔＩを発現させた。ｐＡＣＹＣは低コピー対応プラスミドである。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０２２１】
２．ＢｍｔＩ－ＨＦの変異誘発
選択した変異の点変異誘発をインバースＰＣＲにより実施した。ＢｍｔＩに以下のように１５０カ所のアミノ酸変異を作製した。Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＴｒｐをＡｌａに変異させた。ＴｒｙをＰｈｅに変異させた。これらは５位、９位、１１位、１２位、１６位、１９位、２０位、２３位、２４位、２５位、２６位、２７位、３０位、３２位、３３位、３４位、３５位、３６位、３９位、４５位、４６位、４９位、５０位、５１位、５３位、５６位

、５８位、５９位、６０位、６３位、６５位、６９位、７１位、７２位、７３位、７４位、７５位、７６位、７８位、７９位、８０位、８１位、８３位、８５位、８６位、８８位、８９位、９０位、９２位、９３位、９４位、９５位、９７位、９８位、９９位、１０１位、１０４位、１０５位、１０６位、１０８位、１１０位、１１１位、１１２位、１１３位、１１６位、１１８位、１１９位、１２０位、１２１位、１２２位、１２４位、１２８位、１２９位、１３１位、１３２位、１３３位、１３４位、１３６位、１３８位、１３９位、１４０位、１４１位、１４２位、１４４位、１４５位、１４６位、１４７位、１４８位、１５０位、１５１位、１５２位、１５４位、１５６位、１５７位、１６１位、１６２位、１６３位、１６５位、１６６位、１６７位、１６８位、１６９位、１７１位、１７２位、１７３位、１７５位、１７８位、１７９位、１８０位、１８１位、１８５位、１８６位、１８９位、１９０位、１９１位、１９３位、１９４位、１９５位、１９６位、１９９位、２００位、２０１位、２０２位、２０３位、２０４位、２０５位、２０６位、２０７位、２０８位、２１０位、２１１位、２１３位、２１４位、２１６位、２１７位、２１８位、２１９位、２２０位、２２１位、２２２位、２２６位、２２８位、２２９位、２３０位、２３１位、２３４位、２３６位、２３７位、２３８位、２３９位及び２４１位であった。変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株３０８１に形質転換した。

【０２２２】

３．ＢｍｔＩ－ＨＦの選択

ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで各変異のコロニー４個を３７℃で一晩増殖させた。ＥｘｏＩバッファー及び１０％　ＤＭＳＯ中でｐＢＣ４を使用してＢｍｔＩの標準コグネイトアッセイとスター活性アッセイを実施した。

【０２２３】

変異体Ｓ５０Ａ、Ｙ８１Ｆ、Ｎ９３Ａ及びＷ２０７Ａをスクリーニングアッセイで選別した。各種条件及び基質で数ラウンドの比較後、Ｓ５０Ａは高カノニカル酵素活性を維持しながらスター活性の実質的低下を示す好ましい変異体であることが判明した。ＢｍｔＩ（Ｓ５０Ａ）をＢｍｔＩ－ＨＦに指定した。

【０２２４】

４．ＢｍｔＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢで大腸菌３０８１細胞（ｐｌａｃｚｚ１－ＢｍｔＩＲ（Ｓ５０Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＢｍｔＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分を更に濃縮した。濃縮したＢｍｔＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２２５】

５．ＢｍｔＩ－ＨＦとＢｍｔＩ－ＷＴの比較

ＢｍｔＩ－ＨＦをＡで２倍系列希釈し、ｐＸｂａと反応させた。結果を表２７に示す。

【０２２６】

【表２７】

表２７：ＢｍｔＩ－ＨＦとＢｍｔＩ－ＷＴの比較

バッファー	BmtI-HF		BmtI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	25%	≥256000	50%	32	≥8000
NEB2	25%	≥256000	100%	16	≥16000
NEB3	0.2%	≥ 2000	6.3%	32	≥64
NEB4	100%	≥1000000	100%	16	≥62500

【０２２７】

ＢｍｔＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、好ましいＦＩは≧１０００００００であり、ＢｍｔＩ－ＷＴはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは１６であった。ＦＩ総改善倍率は≧１０００００００／１６＝≧６２５００倍であった。

【０２２８】

［実施例２７］

ＨＦ　ＢｓｔＮＩの作製

１．ＢｓｔＮＩの発現

各々ＢｓｔＮＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＢＡＤ２４１－ＢｓｔＮＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＢｓｔＮＩＭで形質転換した大腸菌でＢｓｔＮＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させ、ＬＢで１０倍に希釈後、アラビノースにより４時間誘導した。

【０２２９】

２．ＢｓｔＮＩ－ＨＦの変異誘発と選択

ＢｓｔＮＩの一連の変異を作製する実験中に、ＢｓｔＮＩ（Ｇ２６Ｎ）はＷＴ　ＢｓｔＮＩよりもスター活性が低いことが判明した。スター活性が更に低く、より良好なＢｓｔＮＩ変異体を探し出すために、Ｇ２６を他の全アミノ酸に変異させた。これらの全変異体のうちで、ＢｓｔＮＩ（Ｇ２６Ｔ）はスター活性が最低であるので、ＢｓｔＮＩ－ＨＦに指定する。

【０２３０】

３．ＢｓｔＮＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２８３３細胞（ｐＢＡＤ２４１－ＢｓｔＮＩ（Ｇ２６Ｔ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＢｓｔＮＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。次に細胞をＬＢで１０倍に希釈後、最終濃度が０．２％となるようにアラビノースにより４時間誘導した。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅ

ｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｓｔＮＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２３１】

４．ＢｓｔＮＩ－ＨＦとＷＴ　ＢｓｔＮＩの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＢｓｔＮＩ－ＨＦとＷＴ　ＢｓｔＮＩのＦＩを別々に測定した。比較を図１４に示し、結果を（下記）表２８にまとめる。

【０２３２】

【表２８】

表２８：ＢｓｔＮＩ－ＨＦとＢｓｔＮＩ－ＷＴの比較

バッファー	BstNI-HF		BstNI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 120	50%	8	≥16
NEB2	100%	≥ 500	100%	64	8
NEB3	25%	≥ 120	100%	250	≥1/8
NEB4	100%	500	50%	4	≥32

【０２３３】

ＢｓｔＮＩ－ＨＦはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、最良ＦＩは≧５００であり、ＢｓｔＮＩ－ＷＴはＮＥＢ２及びＮＥＢ３中で最良性能であり、最良ＦＩは２５０であった。従って、総改善倍率は≧５００／２５０＝≧２倍であった。

【０２３４】

［実施例２８］

ＨＦ　ＭｌｕＩの作製

１．ＭｌｕＩの発現

各々ＭｌｕＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＭｌｕＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＭｌｕＩＭで形質転換した大腸菌でＭｌｕＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。

【０２３５】

２．ＭｌｕＩ－ＨＦの変異誘発

７位、８位、１０位、１１位、１３位、１６位、２１位、２３位、２４位、２６位、２７位、３０位、３１位、３３位、３４位、３５位、３６位、３７位、３９位、４２位、４４位、４８位、５０位、５１位、５４位、５７位、５９位、６０位、６１位、６７位、６８位、７１位、７２位、７４位、７５位、７８位、７９位、８１位、８３位、８４位、８５位、８６位、８９位、９０位、９３位、９４位、９５位、９７位、９９位、１０１位、１０２位、１０４位、１０６位、１０８位、１１１位、１１２位、１１４位、１１６位、１１７位、１１９位、１２０位、１２１位、１２３位、１２５位、１２８位、１３０位、１３１位、１３２位、１３４位、１３６位、１３７位、１３９位、１４０位、１４１位、１４２位、１４４位、１４５位、１４６位、１４８位、１５２位、１５４位、１５５位、１５６位、１５７位、１５９位、１６１位、１６３位、１６５位、１６６位、１７０位、１７２位、１７３位、１７４位、１７６位、１７７位、１７９位、１８０位、１８１位、１８２位、１８３位、１８４位、１８６位、１８９位、１９２位、１９５位、１９６位、１９７位、２００位、２０６位、２０７位、２０８位、２１０位、２１１位、２１４位、２１６位、２１８位、２１９位、２２０位、２２１位、２２３位、２２７位、２２８位、

２３０位、２３２位、２３３位、２３４位、２３６位、２３７位、２３８位、２４０位、２４３位、２４４位、２４７位、２４９位、２５５位、２５６位、２５７位、２５８位、２６１位、２６３位、２６４位、２６５位、２６６位、２６９位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１４位、２８位、４７位、５３位、７７位、１０７位、１７５位、１９８位、２１７位、２３９位及び２４８位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０２３６】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ１５８２に形質転換した。

【０２３７】

３．ＭｌｕＩ－ＨＦの選択

λＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＭｌｕＩ－ＨＦの選択を行った。ＮＥＢ４中の活性増加は忠実度改善の指標であるので、ＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも高い変異体を選択した。この条件を満たすことが判明した唯一の変異体はＥ１１２Ａ／Ｒ１３２Ａであり、ＭｌｕＩ（Ｅ１１２Ａ／Ｒ１３２Ａ）をＭｌｕＩ－ＨＦに指定する。

【０２３８】

４．ＭｌｕＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ１５８２細胞（ｐＵＣ１９－ＭｌｕＩ（Ｅ１１２Ａ／Ｒ１３２Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＭｌｕＩＭ）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＭｌｕＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２３９】

５．ＭｌｕＩ－ＨＦとＭｌｕＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でλＤＮＡを基質としてＭｌｕＩ－ＨＦとＷＴ　ＭｌｕＩのＦＩを別々に測定した。比較を図１５に示し、結果を（下記）表２９にまとめる。

【０２４０】

【表２９】

表２９：ＭｌｕＩ－ＨＦとＭｌｕＩ－ＷＴの比較

バッファー	MluI-HF		MluI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 16000	25%	500	≥32
NEB2	100%	≥ 32000	6.3%	16	≥200
NEB3	6.3%	≥ 2000	100%	2000	≥1
NEB4	100%	≥ 32000	25%	32	≥1000

【０２４１】

ＭｌｕＩ－ＨＦはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧３２０００であり、ＭｌｕＩ－ＷＴはＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは２０００であった。総改善倍率は≧３２０００／２０００＝≧１６倍であった。

【０２４２】

［実施例２９］

ＨＦ　ＢａｎＩの作製

１．ＢａｎＩの発現

各々ＢａｎＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＢａｎＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＢａｎＩＭで形質転換した大腸菌でＢａｎＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０２４３】

２．ＢａｎＩ－ＨＦの変異誘発

７位、８位、９位、１１位、１２位、１４位、１５位、１６位、１９位、２２位、２３位、２７位、２８位、２９位、３０位、３１位、３２位、３３位、３６位、３７位、４０位、４１位、４２位、４３位、４７位、５０位、５２位、５３位、５４位、５５位、５６位、５８位、６１位、６４位、６６位、６７位、６９位、７０位、７１位、７５位、７６位、８１位、８２位、８４位、８５位、８６位、８７位、８９位、９０位、９２位、９３位、９４位、９６位、９７位、１００位、１０３位、１０５位、１０６位、１０７位、１０９位、１１０位、１１１位、１１２位、１１４位、１１５位、１１７位、１２１位、１２２位、１２３位、１２４位、１２６位、１３０位、１３１位、１３３位、１３５位、１３６位、１３８位、１３９位、１４０位、１４１位、１４３位、１４５位、１４６位、１４８位、１５０位、１５１位、１５２位、１５４位、１５６位、１５７位、１６０位、１６１位、１６９位、１７１位、１７４位、１７５位、１７６位、１７８位、１７９位、１８２位、１８３位、１８５位、１８７位、１８８位、１９１位、１９２位、１９３位、１９４位、１９５位、１９７位、１９８位、２０１位、２０２位、２０３位、２０８位、２０９位、２１１位、２１２位、２１３位、２１５位、２１７位、２１８位、２２０位、２２１位、２２４位、２２５位、２２６位、２２９位、２３２位、２３３位、２３４位、２３６位、２３７位、２３８位、２４０位、２４２位、２４３位、２４４位、２４５位、２４６位、２４８位、２４９位、２５１位、２５２位、２５３位、２５４位、２５５位、２５６位、２５７位、２５９位、２６０位、２６２位、２６６位、２６７位、２６８位、２６９位、２７０位、２７１位、２７５位、２７７位、２７９位、２８１位、２８２位、２８３位、２８４位、２８５位、２８７位、２８８位、２８９位、２９１位、２９２位、２９４位、２９６位、２９８位、３０１位、３０２位、３０３位、３０４位、３０５位、３

１２位、３１３位、３１５位、３１６位、３１８位、３１９位、３２０位、３２１位、３２４位、３２５位、３２８位、３２９位、３３０位、３３１位、３３３位、３３７位、３３８位、３３９位、３４０位、３４２位、３４６位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１０４位、１２５位、１２７位、１５６位、１５９位、２０４位、２３９位、２９７位、３０６位及び３３６位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０２４４】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２６８３に形質転換した。

【０２４５】

３．ＢａｎＩ－ＨＦの選択

λＤＮＡを基質として、水＋ＮＥＢ４中と、グリセロール＋ＮＥＢ　ＥｘｏＩバッファー中の活性の比較を使用してＢａｎＩ－ＨＦの選択を行った。ＮＥＢ４中の活性がＷＴと同等以上であると共に、グリセロール条件下で試験した場合にスター活性の変化を示した変異体を選択した。これらの変異体の選択に使用した別の指標として、スター活性の除去によりコグネイト切断に遅延部位が生じるという事実も使用した。多数の変異体：Ｎ０１６Ａ、Ｓ３３Ａ、Ｐ３６Ａ、Ｈ７６Ａ、Ｐ８７Ａ、Ｎ８９Ａ、Ｒ９０Ａ、Ｔ１３８Ａ、Ｋ１４１Ａ、Ｋ１４３Ａ、Ｑ２２１Ａ、Ｑ２２４Ａ、Ｎ２５３Ａ、Ｑ２９２Ａ、Ｒ２９６Ａ、Ｔ１５２Ｉ、Ｇ３２６Ａ及びＴ３２４Ａはスター活性が変化し、その結果として遅延部位が生じることが判明した。ＢａｎＩ（Ｑ２９２Ａ）をＢａｎＩ－ＨＦに指定する。

【０２４６】

４．ＢａｎＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　ＣａｍをＬＢでＥＲ２６８３細胞（ｐＵＣ１９－ＢａｎＩ（Ｐ１５４Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－ＢａｎＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢａｎＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２４７】

５．ＢａｎＩ－ＨＦとＢａｎＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でλＤＮＡを基質としてＢａｎＩ－ＨＦとＷＴ　ＢａｎＩのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表３０にまとめる。

【０２４８】

【表３０】

表３０：ＢａｎＩ－ＨＦとＢａｎＩ－ＷＴの比較

バッファー	BanI-HF		BanI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 1000	25%	4	≥250
NEB2	12.5%	≥ 250	25%	4	≥63
NEB3	0.4%	≥ 8	6.3%	2	≥4
NEB4	100%	≥ 2000	100%	16	≥125

【０２４９】

ＢａｎＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧２０００であり、ＷＴ　ＢａｎＩもＮＥＢ４中で最良性能であったが、ＦＩは１６に過ぎなかった。総改善倍率は≧２０００／１６＝≧１２５倍である。

【０２５０】

［実施例３０］

ＨＦ　ＫａｓＩの作製

１．ＫａｓＩの発現

各々ＫａｓＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐｌａｃＺＺ－ＫａｓＩＲとｐＡＣＹ－ＳｆｏＩＭで形質転換した大腸菌でＫａｓＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３０℃にて一晩増殖させた。

【０２５１】

２．ＫａｓＩ－ＨＦの変異誘発

７位、８位、９位、１１位、１３位、１４位、１７位、１８位、２１位、２４位、２６位、２８位、２９位、３１位、３２位、３３位、３４位、３６位、３７位、３９位、４２位、４３位、４４位、４７位、４８位、５１位、５２位、５４位、５５位、５６位、５８位、６０位、６２位、６３位、６４位、６５位、６６位、６９位、７０位、７３位、７６位、７７位、７８位、７９位、８３位、８５位、８６位、８８位、８９位、９０位、９１位、９２位、９３位、９４位、９８位、１００位、１０１位、１０２位、１０３位、１０４位、１０８位、１１０位、１１１位、１１４位、１１５位、１１６位、１１７位、１１８位、１１９位、１２２位、１２３位、１２４位、１２５位、１２６位、１２８位、１２９位、１３４位、１３７位、１３８位、１３９位、１４０位、１４２位、１４３位、１４４位、１４５位、１４６位、１４９位、１５０位、１５２位、１５３位、１５４位、１５６位、１５８位、１６１位、１６２位、１６３位、１６４位、１６５位、１６７位、１６８位、１７３位、１７７位、１７８位、１８０位、１８１位、１８２位、１８４位、１８５位、１８８位、１８９位、１９０位、１９１位、１９２位、１９５位、１９７位、１９８位、２００位、２０２位、２０３位、２０４位、２１０位、２１１位、２１２位、２１４位、２１５位、２１６位、２１７位、２１８位、２１９位、２２０位、２２１位、２２２位、２２３位、２２５位、２２６位、２２８位、２２９位、２３１位、２３４位、２３７位、２３８位、２４１位、２４３位、２４４位、２４５位、２４６位、２４８位、２５１位、２５３位、２５５位、２５７位、２５８位、２５９位、２６０位、２６１位、２６３位、２６４位、２６５位、２６６位、２６９位、２７０位、２７１位、２７４位、２７５位、２７６位、２７７位及び２７８位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１９位、４１位、７４位、８０位、９５位、２０７位及び２５６位のＴｙｒをＰｈｅに置換し

た。

【０２５２】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２６８３に形質転換した。

【０２５３】

３．ＫａｓＩ－ＨＦの選択

ｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＫａｓＩ－ＨＦの選択を行った。ＮＥＢ４中の活性増加は忠実度改善の指標であるので、ＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも高い変異体を選択した。以下の変異体：Ｋ０２４Ａ、Ｐ２１４Ａ、Ｅ１４６Ａ、Ｎ２５１Ａ及びＹ０９５ＦはＮＥＢ４中の活性が高いことが判明した。ＫａｓＩ（Ｎ２５１Ａ）をＫａｓＩ－ＨＦに指定する。

【０２５４】

４．ＫａｓＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２６８３細胞（ｐＬａｃＺＺ－ＫａｓＩ（Ｍ２５１Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＳｆｏＩＭ）２リットルを３０℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＫａｓＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２５５】

５．ＫａｓＩ－ＨＦとＫａｓＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ｂを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＫａｓＩ－ＨＦ及びＫａｓＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表３１にまとめる。

【０２５６】

【表３１】

表３１：ＫａｓＩ－ＨＦとＫａｓＩ－ＷＴの比較

バッファー	KasI-HF		KasI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	50%	≥ 8000	100%	1	≥8000
NEB2	100%	≥ 16000	100%	8	≥2000
NEB3	12.5%	≥ 2000	100%	8	≥250
NEB4	100%	≥ 16000	100%	4	≥4000

【０２５７】
ＫａｓＩ－ＨＦはＮＥＢ２及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧１６０００であり、ＫａｓＩ－ＷＴは全バッファー中で同一性能であり、最良ＦＩは８である。総改善倍率は≧１６０００／８＝≧２０００倍である。
【０２５８】
［実施例３１］
ＨＦ　ＮｒｕＩの作製
１．ＮｒｕＩの発現
各々ＮｒｕＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＮｒｕＩＲとｐＡＣＹＣ－Ｓｂｏ１３ＩＭで形質転換した大腸菌でＮｒｕＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。
【０２５９】
２．ＮｒｕＩ－ＨＦの変異誘発
８位、１０位、１２位、１３位、１５位、１６位、１９位、２０位、２１位、２２位、２３位、２５位、２６位、３０位、３４位、３６位、３８位、３９位、４４位、４５位、４６位、４７位、４９位、５０位、５３位、５４位、５５位、５６位、５７位、５８位、５９位、６０位、６１位、６２位、６３位、６４位、６８位、７０位、７１位、７２位、７３位、７５位、７７位、７９位、８０位、８２位、８３位、８４位、８５位、８７位、８９位、９０位、９１位、９２位、９３位、９５位、９６位、９７位、９９位、１０１位、１０３位、１０４位、１０６位、１０７位、１１２位、１１３位、１１４位、１１５位、１１７位、１１８位、１１９位、１２４位、１２５位、１２７位、１３２位、１３４位、１３７位、１３８位、１３９位、１４１位、１４６位、１４７位、１４８位、１４９位、１５２位、１５４位、１５５位、１５７位、１５８位、１５９位、１６２位、１６３位、１６５位、１６６位、１６８位、１６９位、１７０位、１７１位、１７４位、１７５位、１７７位、１７８位、１８０位、１８２位、１８４位、１８６位、１８８位、１８９位、１９０位、１９１位、１９３位、１９６位、１９７位、２００位、２０１位、２０２位、２０４位、２０５位、２０６位、２０７位、２０８位、２０９位、２１１位及び２１３位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、１１位、３１位、５２位、６９位、９８位、６４位及び１８７位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。
【０２６０】
変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２６８３に形質転換した。
【０２６１】
３．ＮｒｕＩ－ＨＦの選択
ｄａｍ－λＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＮｒｕＩ－ＨＦの選択を行った。ＮＥＢ４中の活性増加は忠実度改善の指標であるので、ＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも高い変異体を選択した。以下の変異体：Ｇ０７５Ａ、Ｑ０９９Ａ、Ｇ１５５Ａ及びＰ０２２Ａ／Ｒ９０ＡはＮＥＢ４中の活性が高いことが判明した。Ｐ１５４Ａ　ＮｒｕＩ（Ｐ０２２Ａ／Ｒ９０Ａ）をＮｒｕＩ－ＨＦに指定する。
【０２６２】
４．ＮｒｕＩ－ＨＦの精製
１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２６８３細胞（ｐＵＣ１９－ＮｒｕＩ（Ｐ０２２ＡＲ９０Ａ），ｐＡＣＹＣ１８４－Ｓｂｏ１３ＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０

ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＮｒｕＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２６３】

５．ＮｒｕＩ－ＨＦとＮｒｕＩ－ＷＴの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｄａｍ－λＤＮＡを基質としてＮｒｕＩ－ＨＦとＮｒｕＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。結果を（下記）表３２にまとめる。

【０２６４】

【表３２】

表３２：ＮｒｕＩ－ＨＦとＮｒｕＩ－ＷＴの比較

バッファー	NruI-HF		NruI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	0.4%	≥ 64	12.5%	64	≥1
NEB2	6.3%	≥ 1000	50%	250	≥4
NEB3	6.3%	≥ 1000	100%	500	≥2
NEB4	100%	≥ 16000	12.5%	32	≥32

【０２６５】

ＮｒｕＩ－ＨＦはＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧１６０００であり、ＮｒｕＩ－ＷＴはＮＥＢ３中で最良性能であり、ＦＩは５００であった。総改善倍率は≧１６０００／５００＝≧３２倍であった。

【０２６６】

［実施例３２］

高忠実度ＮｓｐＩの作製

１．ＮｓｐＩの発現

各々ＮｓｐＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＵＣ１９－ＮｓｐＩＲとｐＡＣＹＣ－ＦａｔＩＭで形質転換した大腸菌でＮｓｐＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０２６７】

２．ＮｓｐＩ－ＨＦの変異誘発

９位、１０位、１２位、１３位、１４位、１６位、１７位、１８位、１９位、２０位、２１位、２３位、２６位、２９位、３０位、３１位、３２位、３４位、３６位、３７位、３９位、４０位、４１位、４２位、４４位、４５位、４６位、４７位、５０位、５１位、５２位、５３位、５５位、５６位、５８位、５９位、６０位、６１位、６２位、６３位、６４位、６５位、６６位、７０位、７１位、７２位、７３位、７４位、７７位、７８位、８０位、８１位、８２位、８３位、８５位、８６位、８７位、８９位、９０位、９１位、９３位、９４位、９６位、９７位、９９位、１００位、１０２位、１０４位、１０７位、１０８位、１１１位、１１４位、１１６位、１１７位、１２０位、１２１位、１２２位、

１２３位、１２４位、１２５位、１２６位、１２７位、１２８位、１３２位、１３３位、１３４位、１３６位、１３８位、１３９位、１４１位、１４３位、１４４位、１４５位、１４６位、１４７位、１４９位、１５０位、１５２位、１５３位、１５４位、１５５位、１５７位、１５８位、１５９位、１６１位、１６４位、１６５位、１６６位、１６７位、１６８位、１６９位、１７０位、１７１位、１７２位、１７５位、１７６位、１７７位、１７８位、１８０位、１８１位、１８４位、１８５位、１８６位、１８７位、１８８位、１８９位、１９１位、１９３位、１９５位、１９９位、２００位、２０１位、２０２位、２０３位、２０５位、２０６位、２０８位、２０９位、２１０位、２１１位、２１２位、２１３位、２１５位、２１６位、２１７位、２２０位、２２２位、２２５位、２２７位、２３０位、２３１位、２３４位、２３５位、２３６位及び２３８位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換し、４８位、７５位、１１３位、１１５位、１９８位及び２２４位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０２６８】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２５６６に形質転換した。

【０２６９】

３．ＮｓｐＩ－ＨＦの選択

ｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＮｓｐＩ－ＨＦの選択を行った。ＮＥＢ４中の活性増加は忠実度改善の指標であるので、ＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも高い変異体を選択した。以下の変異体：Ｓ０９７Ａ及びＥ１２５ＡはＮＥＢ４中の活性が高いことが判明した。ＮｓｐＩ（Ｓ０９７Ａ）をＮｓｐＩ－ＨＦに指定する。

【０２７０】

４．ＮｓｐＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｃａｍを添加したＬＢでＥＲ２５６６細胞（ｐＵＣ１９－ＮｓｐＩ（Ｓ０９７Ａ），ｐＡＣＹＣ－ＦａｔＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させた。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＮｓｐＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２７１】

５．ＮｓｐＩ－ＨＦとＮｓｐＩ－ＷＴの比較

希釈剤ＡとＢＳＡを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＵＣ１９　ＤＮＡを基質としてＮｓｐＩ－ＨＦとＮｓｐＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。比較を図１６に示し、結果を（下記）表３３にまとめる。

【０２７２】

【表３３】

表３３：ＮｓｐＩ－ＨＦとＮｓｐＩ－ＷＴの比較

バッファー	NspI-HF		NspI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	100%	≥ 4000	100%	250	≥16
NEB2	100%	≥ 500	100%	16	≥32
NEB3	12.5%	≥ 250	25%	120	≥50
NEB4	100%	500	50%	32	≥16

【０２７３】

ＮｓｐＩ－ＨＦはＮＥＢ１及びＮＥＢ４中で最良性能であり、最良ＦＩは≧４０００であり、ＷＴ　ＮｓｐＩはＮＥＢ１及びＮＥＢ２中で最良性能であり、最良ＦＩは２５０であった。総改善倍率は≧４０００／２５０＝≧１６倍である。

【０２７４】

［実施例３３］

ＨＦ　ＢｓｒＦＩの作製

１．ＢｓｒＦＩの発現

各々ＢｓｒＦＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＢＡＤ－ＢｓｒＦＩＲとｐＳＹＸ３３－ＨｐａＩＩＭで形質転換した大腸菌でＢｓｒＦＩを発現させた。ＡｍｐとＫａｎを添加したＬＢでアラビノース誘導下に細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０２７５】

２．ＢｓｒＦＩ－ＨＦの変異誘発

７位、８位、９位、１２位、１３位、１５位、１６位、１７位、１８位、１９位、２０位、２１位、２３位、２５位、２６位、２８位、３２位、３５位、３６位、３７位、３９位、４０位、４１位、４２位、４４位、４５位、４６位、４８位、４９位、５１位、５２位、５６位、５９位、６１位、６２位、６４位、６５位、６６位、６８位、７２位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位、８０位、８６位、８７位、８９位、９１位、９３位、９４位、９５位、９７位、９８位、１０３位、１０５位、１０６位、１０８位、１０９位、１１１位、１１３位、１１４位、１１７位、１１８位、１１９位、１２０位、１２１位、１２２位、１２３位、１２６位、１２８位、１２９位、１３０位、１３３位、１３４位、１３５位、１３６位、１３７位、１３９位、１４２位、１４３位、１４４位、１４５位、１４６位、１５１位、１５２位、１５３位、１５４位、１５７位、１５８位、１５９位、１６１位、１６２位、１６３位、１６５位、１６６位、１６８位、１６９位、１７０位、１７１位、１７３位、１７４位、１７７位、１８０位、１８１位、１８３位、１８４位、１８５位、１８７位、１８９位、１９０位、１９４位、１９６位、１９８位、１９９位、２００位、２０２位、２０３位、２０４位、２０５位、２０６位、２０８位、２１１位、２１２位、２１３位、２１４位、２１７位、２１８位、２２２位、２２４位、２２６位、２２９位、２３０位、２３１位、２３３位、２３５位、２３８位、２４０位、２４１位、２４２位、２４３位、２４５位、２４６位、２４８位、２４９位、２５０位、２５３位、２５４位、２５７位、２５８位、２５９位、２６２位、２６４位、２６５位、２６６位、２６７位、２６８位、２６９位、２７２位、２７３位、２７６位、２７８位、２７９位、２８１位、２８２位、２８４位及び２８５位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置

換し、１４位、３４位、５３位、９０位、９６位、９９位、１２５位、１６０位、２２７位、２３６位、２３７位のＴｙｒをＰｈｅに置換した。

【０２７６】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ２５６６に形質転換した。

【０２７７】

３．ＢｓｒＦＩ－ＨＦの選択

ｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｓｒＦＩ－ＨＦの選択を行った。ＮＥＢ４中の活性増加は忠実度改善の指標であるので、ＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも高い変異体を選択した。以下の変異体：Ｋ０２１Ａ／Ｉ０３１Ｒ及びＴ１２０ＡはＮＥＢ４中の活性が高いことが判明した。ＢｓｒＦＩ（Ｋ０２１Ａ／Ｉ０３１Ｒ）をＢｓｒＦＩ－ＨＦに指定する。

【０２７８】

４．ＢｓｒＦＩ－ＨＦの精製

１００μｇ／ｍｌ　Ａｍｐと３３μｇ／ｍｌ　Ｋａｎを添加したＬＢでＥＲ２５６６細胞（ｐＢＡＤ－ＢｓｒＦＩ（Ｋ０２１Ａ／Ｉ０３１Ｒ），ｐＳＹＸ３３－ＨｐａＩＩＭ）２リットルを３７℃にて一晩増殖させ、８時間後に０．２％アラビノースで誘導した。細胞を回収し、２０ｍｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で超音波処理した。１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心後、同一バッファーで予め平衡化しておいた５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、現Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にシリンジ注入により上清をロードした。次にカラムをシステムに装着し、以下の手順：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ　ＮａＣｌを４８ｍｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５０ｍＭ－１Ｍ　ＮａＣｌ直線勾配を１００ｍｌ、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１Ｍ　ＮａＣｌステップを１０ｍｌの手順で送液した。次に、溶出画分の活性を試験した。最高活性の画分をＶｉｖａｓｐｉｎ（登録商標）１５Ｒ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ，現Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ　ＧｍｂＨ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，ドイツ）により更に濃縮した。濃縮したＢｓｒＦＩ－ＨＦに次に同一容量のグリセロールを加え、－２０℃にて保存した。

【０２７９】

５．ＢｓｒＦＩ－ＨＦとＷＴ　ＢｓｒＦＩの比較

希釈剤Ａを添加した４種類のＮＥＢバッファー中でｐＢＲ３２２　ＤＮＡを基質としてＢｓｒＦＩ－ＨＦとＢｓｒＦＩ－ＷＴのＦＩを別々に測定した。比較を図１７に示し、結果を（下記）表３５にまとめる。

【０２８０】

【表３４】

表３５：ＢｓｒＦＩ－ＨＦとＢｓｒＦＩ－ＷＴの比較

バッファー	BsrFI-HF		BsrFI-WT		
	活性	FI	活性	FI	改善倍率
NEB1	100%	≥ 500	25%	16	≥32
NEB2	12.5%	≥ 64	100%	4	≥500
NEB3	NC	NC	3.1%	8	≥-8
NEB4	100%	≥ 500	50%	16	≥32

【０２８１】

ＢｓｒＦＩ－ＨＦはＮＥＢ１及びＮＥＢ４中で最良性能であり、ＦＩは≧５００であり、ＢｓｒＦＩ－ＷＴはＮＥＢ２中で最良性能であり、ＦＩは４であった。総改善倍率は≧５００／４＝≧１２０倍である。

【０２８２】

［実施例３４］

ＨＦ　ＢｓｐＥＩの作製

１．ＢｓｐＥＩ（配列番号３４）の発現

各々ＢｓｐＥＩエンドヌクレアーゼ及びメチラーゼ遺伝子を含むｐＬａｚｚ１－ＢｓｐＥＩＲとｐＡＣＹＣ１８４－ＢｓｐＥＩＭで形質転換した大腸菌でＢｓｐＥＩを発現させた。ＡｍｐとＣａｍを添加したＬＢで細胞を３７℃にて一晩増殖させた。

【０２８３】

２．ＢｓｐＥＩ－ＨＦの変異誘発

７位、８位、１０位、１１位、１２位、１３位、１４位、１７位、１９位、２０位、２１位、２２位、２３位、２７位、３０位、３１位、３３位、３４位、３５位、３６位、３７位、３９位、４２位、４３位、４４位、４５位、４６位、４８位、４９位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位、５６位、５８位、５９位、６０位、６２位、６３位、６４位、６６位、６７位、６８位、７１位、７２位、７３位、７４位、７５位、７８位、７９位、８１位、８２位、８４位、８５位、８８位、８９位、９１位、９２位、９３位、９４位、９５位、９６位、９８位、１０１位、１０２位、１０３位、１０６位、１０７位、１０８位、１１０位、１１１位、１１３位、１１４位、１１５位、１１７位、１２１位、１２２位、１２４位、１２６位、１２７位、１２８位、１２９位、１３２位、１３３位、１３５位、１３６位、１３７位、１３８位、１４０位、１４１位、１４８位、１４９位、１５１位、１５３位、１５５位、１５６位、１５７位、１６０位、１６２位、１６４位、１６６位、１６７位、１６８位、１６９位、１７２位、１７４位、１７５位、１７６位、１７７位、１７８位、１８２位、１８３位、１８４位、１８５位、１８６位、１８７位、１８９位、１９２位、１９３位、１９５位、１９６位、１９７位、１９８位、１９９位、２００位、２０１位、２０３位、２０４位、２０８位、２０９位、２１２位、２１３位、２１４位、２１６位、２１７位、２１８位、２１９位、２２１位、２２２位、２２８位、２２９位、２３１位、２３２位、２３３位、２３４位、２３５位、２３６位、２３７位、２３８位、２３９位、２４０位、２４２位、２４４位、２４５位、２４６位、２５０位、２５１位、２５３位、２５４位、２５５位、２５６位、２５８位、２６０位、２６１位、２６３位、２６４位、２６６位、２６７位、２６９位、２７０位、２７１位、２７２位、２７３位、２７５位、２７６位、２７７位、２８１位、２８２位、２８３位、２８５位、

２８６位、２８８位、２８９位、２９３位、２９４位の全残基Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、ＴｈｒをＡｌａに置換した。

【０２８４】

変異誘発法はプライマー対を使用してインバースＰＣＲ後にＤｐｎＩ消化する方法とした。処理済み産物を次に大腸菌株ＥＲ３０８１に形質転換した。

【０２８５】

３．ＢｓｐＥＩ－ＨＦの選択

非メチル化λ（λ^{-}）ＤＮＡを基質としてＮＥＢ３及びＮＥＢ４中の活性の比較を使用してＢｓｐＥＩ－ＨＦの選択を行った。ＷＴ　ＢｓｐＥＩはＮＥＢ３中の活性が高いので、ＮＥＢ４中の活性が高いものを選択した。Ｋ７Ａ、Ｔ１０Ａ、Ｎ１１Ａ、Ｎ１４Ａ、Ｑ２３２Ａ及びＴ１９９Ａの６種の変異体はＮＥＢ４中の活性が高いことが判明した。Ｔ１９９ＡはＮＥＢ４中の活性がＷＴよりも著しく高い。ＢｓｐＥＩ（Ｔ１９９Ａ）をＢｓｐＥＩ－ＨＦに指定する。

【０２８６】

［実施例３５］

高忠実度ＢａｍＨＩ（他の変異体）の作製

国際公開第ＷＯ２００９／００９７９７号の実施例１に記載されているようにＢａｍＨＩ（配列番号３５）はＧ／ＧＡＴＣＣで認識・消化する。変異体ＢａｍＨＩ（Ｅ１６３Ａ／Ｅ１６７Ｔ）をＢａｍＨＩの高忠実度変異体として選択した。

【０２８７】

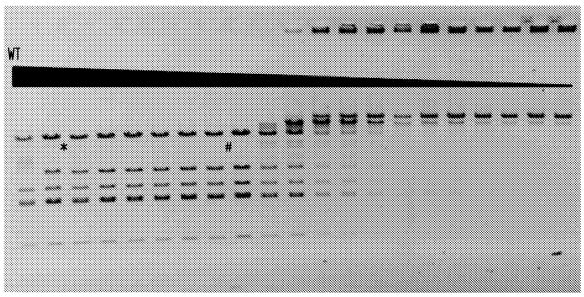
ＢａｍＨＩで完全な範囲の変異を行った。従来の特許及び出願に報告されている残基以外に、３位、７位、８位、１５位、１６位、２１位、２２位、２３位、２４位、２７位、２９位、３１位、３３位、３４位、３５位、３７位、３８位、３９位、４５位、４７位、４８位、４９位、５３位、５４位、５５位、５６位、５７位、５８位、５９位、６０位、６３位、６４位、６７位、６８位、７３位、７４位、７９位、８０位、８２位、８３位、８５位、９０位、９１位、９２位、９３位、９５位、９９位、１００位、１０２位、１０５位、１０８位、１０９位、１１０位、１１２位、１１５位、１１６位、１１７位、１２４位、１２５位、１２７位、１２８位、１２９位、１３０位、１３１位、１３４位、１３６位、１３８位、１４０位、１４１位、１４２位、１４３位、１４４位、１４５位、１４７位、１４８位、１５１位、１５２位、１５６位、１５８位、１５９位、１６２位、１６４位、１６６位、１６８位、１７１位、１７２位、１７３位、１７４位、１７５位、１７６位、１７７位、１７８位、１７９位、１８０位、１８５位、１８７位、１８８位、１８９位、１９０位、１９１位、１９２位、１９４位、１９７位、１９８位、２０３位、２０６位、２１０位及び２１２位の他の残基もＡｌａに変異させた。

【０２８８】

これらの変異体のうち、Ｐ９２Ａ、Ｐ１４４Ａ、Ｇ１９７Ａ及びＭ１９８Ａは野生型ＢａｍＨＩよりも忠実度が高い。Ｐ９２Ａを代替高忠実度ＢａｍＨＩとすることができる。

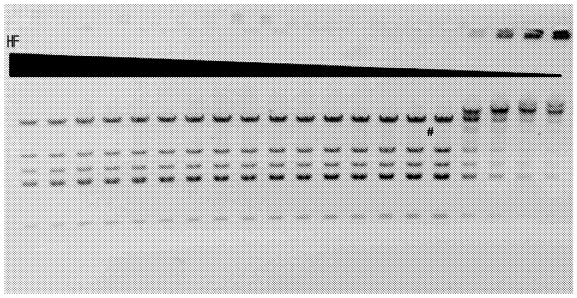
【図１Ａ】

FIG. 1A



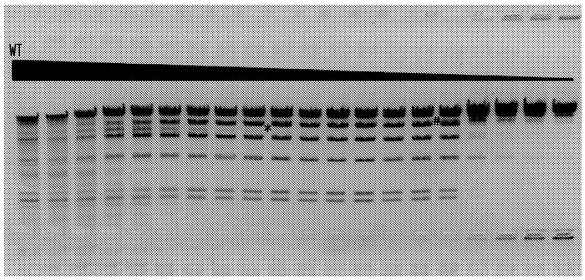
【図１Ｂ】

FIG. 1B



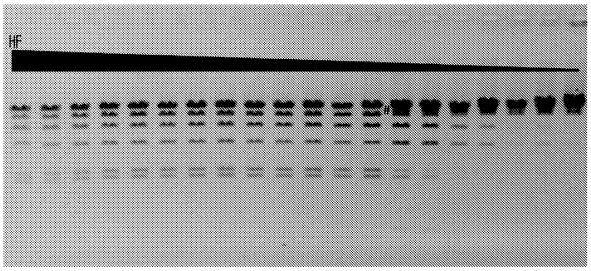
【図２Ａ】

FIG. 2A



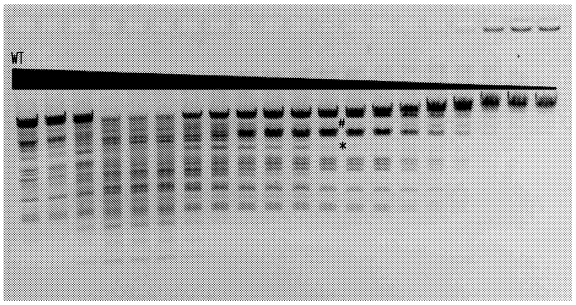
【図２Ｂ】

FIG. 2B



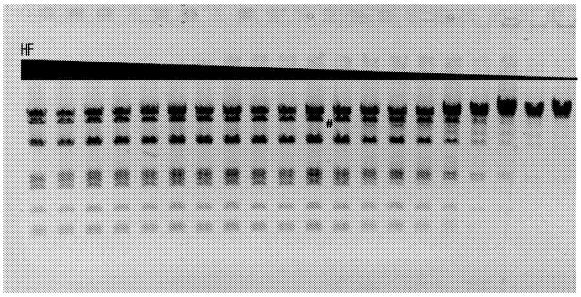
【図３Ａ】

FIG. 3A



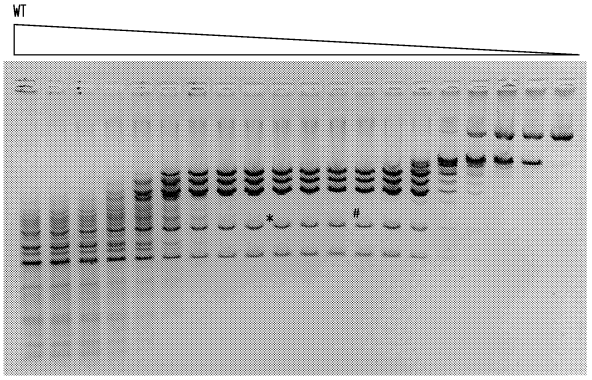
【図３Ｂ】

FIG. 3B



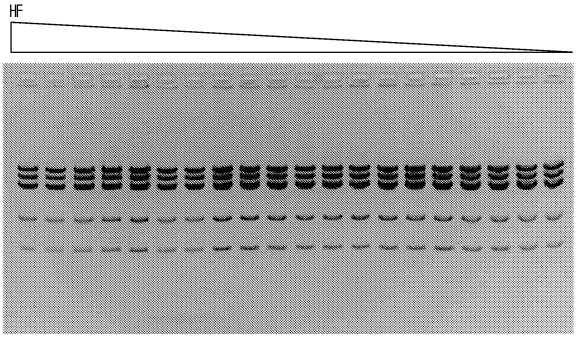
【図４Ａ】

FIG. 4A



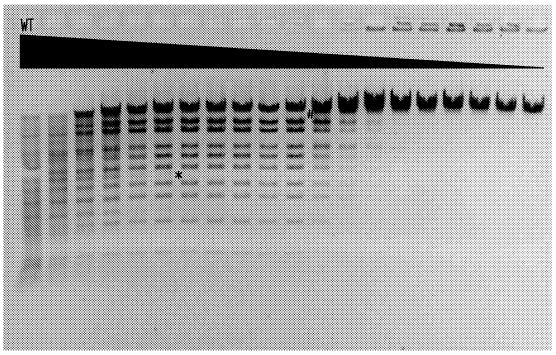
【図４Ｂ】

FIG. 4B



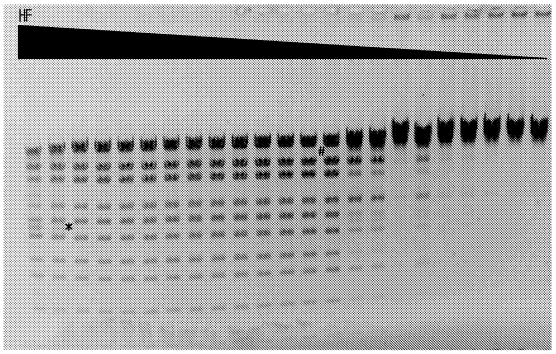
【図５Ａ】

FIG. 5A



【図５Ｂ】

FIG. 5B



【図６】

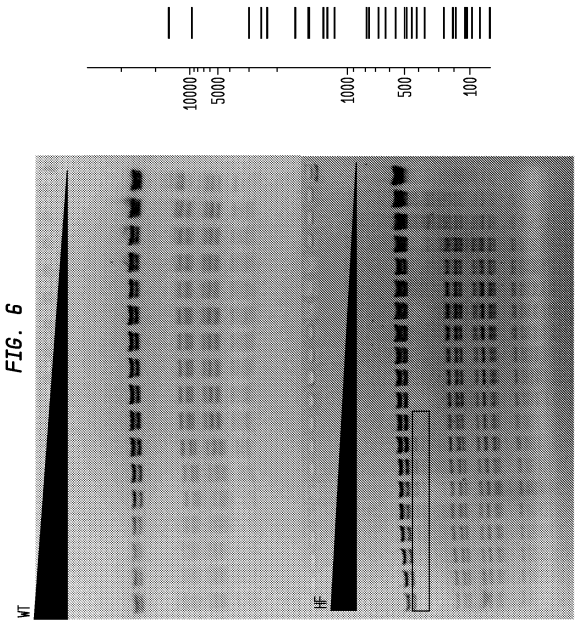


FIG. 6

【図７】

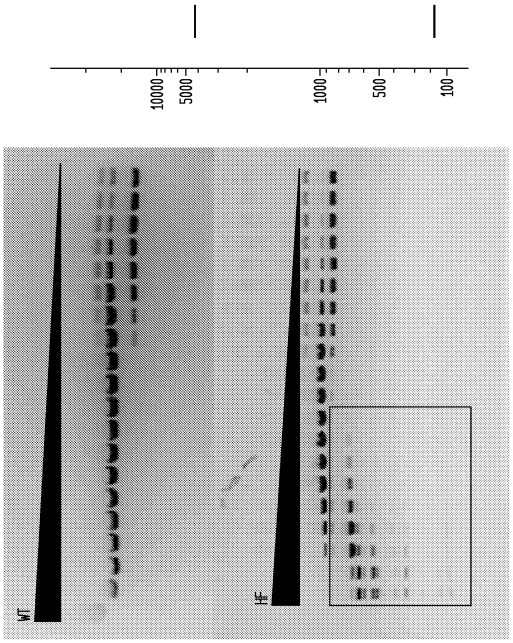


FIG. 7

【図８】

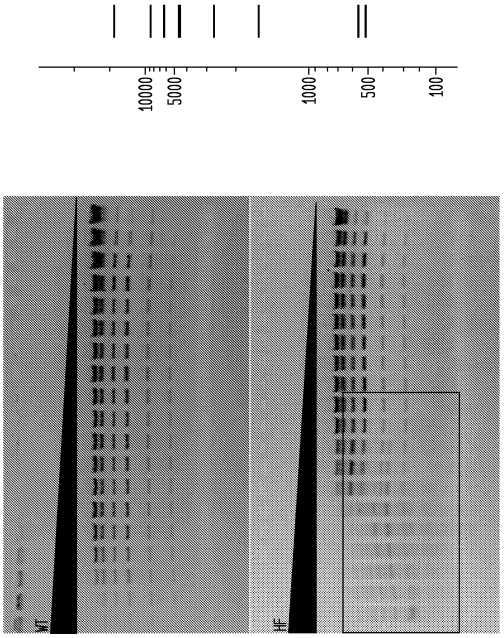


FIG. 8

【図９】

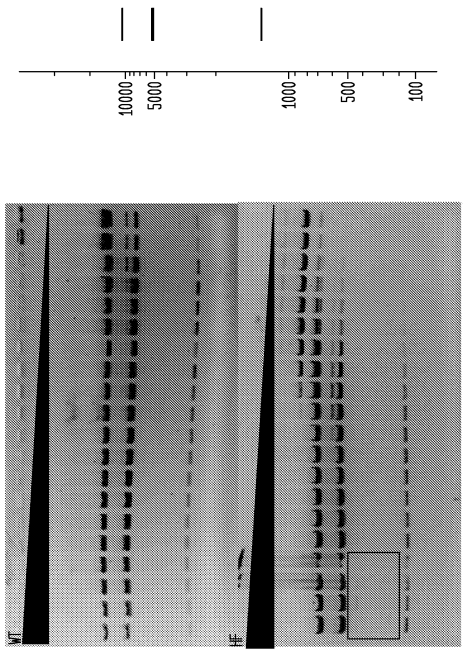


FIG. 9

【図１０】

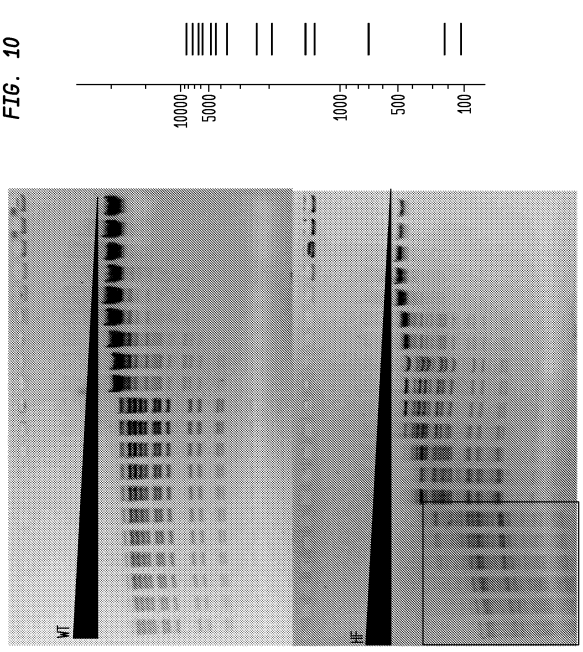


FIG. 10

【図１１】

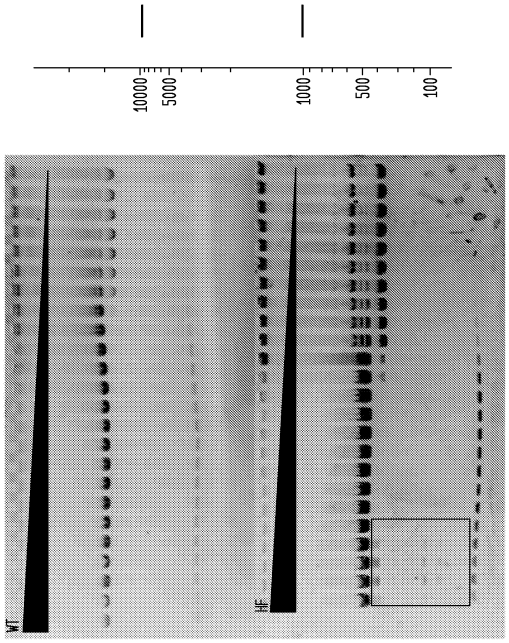


FIG. 11

【図１２】

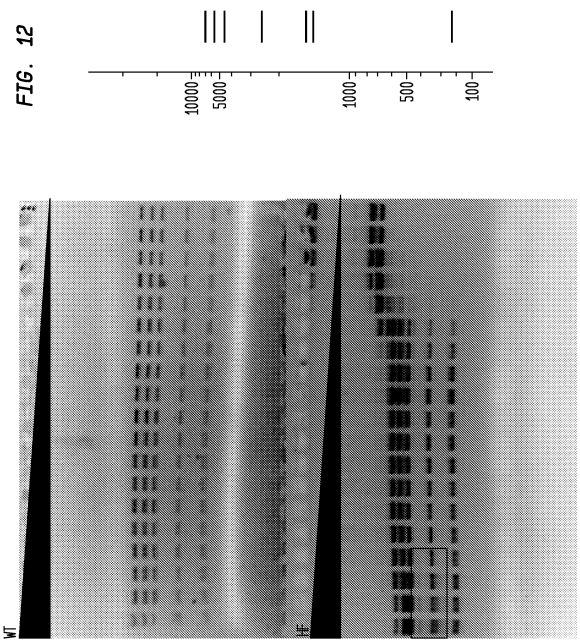
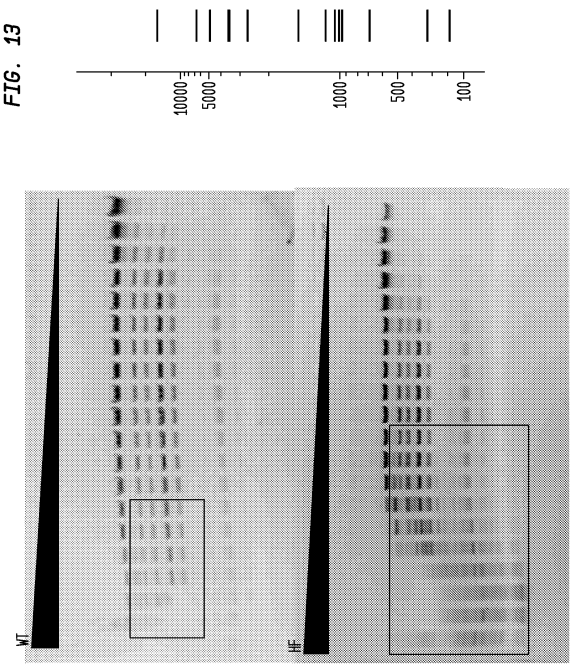


FIG. 12

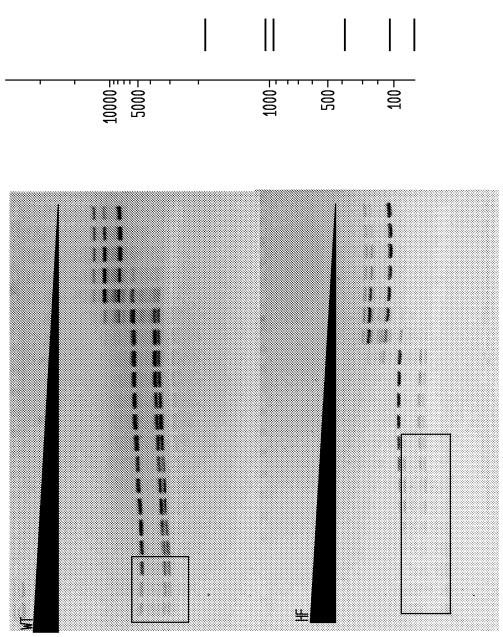
【図１３】

FIG. 13



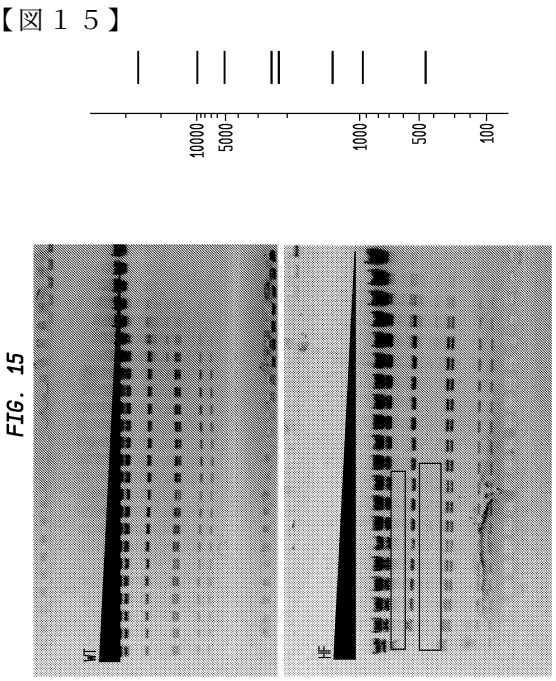
【図１４】

FIG. 14



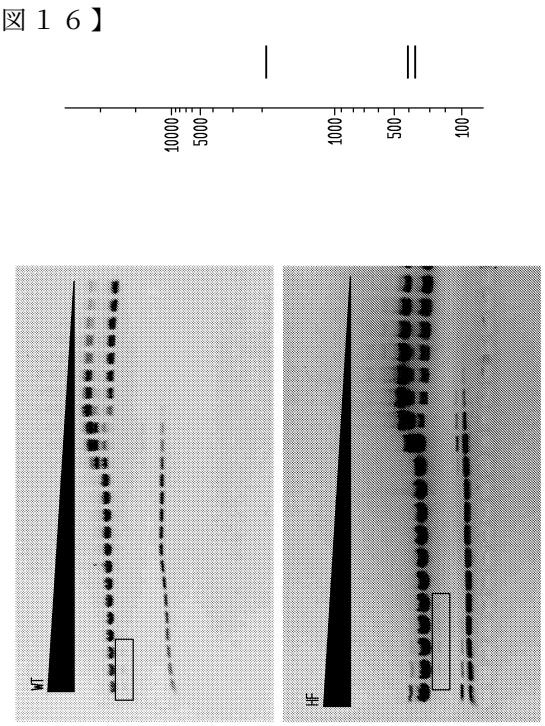
【図１５】

FIG. 15



【図１６】

FIG. 16



【図１７】

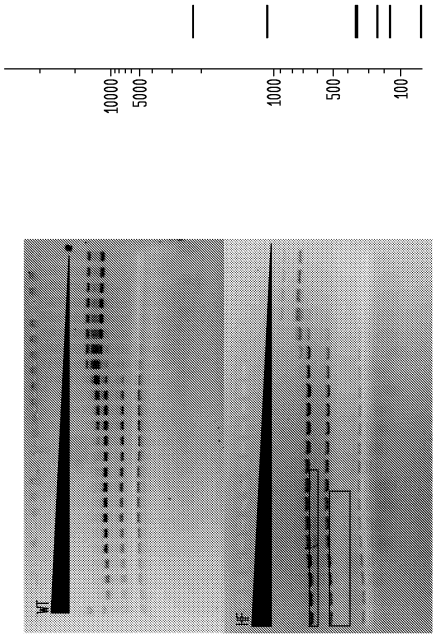


FIG. 17

【配列表】
0006478441000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　クインビー，アイネ
アメリカ合衆国、ニユー・ハンプシヤー・０３８５８、ニユートン、クロスマン・サークル・３
(72)発明者　グワン，シユヨンシイ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２１８０、ストーンハム、ベラ・レイン・７
(72)発明者　スン，ダープオン
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２４７４、アーリントン、キンボール・ロード・７
(72)発明者　ホワン，イーシユウ
中華人民共和国、シヤンハイ、２０１６１５、ライイン・ロード・レイン・１２００、ビルデイング・８８、ルーム・３０１
(72)発明者　ライ，シユイホイ
中華人民共和国、シヤンハイ、２０１２０３、ムダン・ロード・ナンバー・８９、ムダン・ハウジング・エステート、ビルデイング・１３、ルーム・３０２
(72)発明者　チヤン，シユウ－ホン
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１９３８、イプスウイツチ、サガモア・ロード・７
(72)発明者　リー，シエンホイ
中華人民共和国、シヤンハイ、２０１２０４、ホワムウ・ロード、ノン・５００、５２－５０１
(72)発明者　シユイ，シユワン－ヨン
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２４２０、レキシントン、キヤロル・レイン・１５
(72)発明者　ジヤン，チユンホワ
中華人民共和国、ジアンスウ・プロビンス、ジエンジーアン、タウン・オブ・リユチユヨン、タンジーアークン・２５

合議体
審判長　長井　啓子
審判官　山中　隆幸
審判官　高堀　栄二

(56)参考文献　国際公開第０９／０９７９７（WO，Ａ１）
国際公開第０７／９７７７８（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N15/00-15/90