

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512895
(P2025-512895A)

(43)公表日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/14 (2006.01)	C 1 2 N	9/14	Z N A	2 G 0 4 3
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55		2 G 0 6 0
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 B 0 2 9
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 B 0 6 3
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 B 0 6 4
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全162頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-558073(P2024-558073)			(71)出願人	511252899
(86)(22)出願日	令和5年4月14日(2023.4.14)				オックスフォード ナノポール テクノロ
(85)翻訳文提出日	令和6年9月30日(2024.9.30)				ジーズ ピーエルシー
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/059821				イギリス国 オックスフォード オーエッ
(87)国際公開番号	WO2023/198911				クス4 4ディーキュー オックスフォー
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)				ド サイエンス パーク エドモンド ハレ
(31)優先権主張番号	2205617.0				ー ロード ゴズリング ビルディング
(32)優先日	令和4年4月14日(2022.4.14)			(74)代理人	100108453
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)				弁理士 村山 靖彦
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100188558
	最終頁に続く				弁理士 飯田 雅人
				(74)代理人	100110364
					弁理士 実広 信哉
				(72)発明者	レベッカ・ヴィクトリア・ボウエン
					イギリス・OX4・4DQ・オックスフ
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規の修飾タンパク質細孔及び酵素

(57)【要約】

本発明は、ポリヌクレオチドなどの分析物の移動を制御するために使用することができる修飾D d aヘリカーゼに関する。修飾D d aヘリカーゼは、分析物の検出及び特徴評価に使用される。本発明はまた、新規のタンパク質細孔、並びに分析物の検出及び特徴評価におけるそれらの使用に関する。本発明は、特に、C s g G様細孔及び修飾C s g Fペプチド、又はその相同体若しくは変異体によって形成され、それによって、ナノ細孔内に追加のチャンネル狭窄又はリーダーヘッドを組み込む、単離された細孔複合体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修飾 DNA 依存性 ATPase (Dda) ヘリカーゼであって、前記ヘリカーゼが、Dda1993におけるアミノ酸位置55、114、156、177、210、221、350、及び358に対応する位置のうちの1つ以上に修飾又は置換を含む、修飾 DNA 依存性 ATPase (Dda) ヘリカーゼ。

【請求項 2】

(a) 位置55に対応する前記アミノ酸が、D、E、K、N、又はSで置換されており、(b) 位置114に対応する前記アミノ酸が、A、V、I、L、M、F、Y、W、G、P、S、T、N、又はQで置換されており、(c) 位置156に対応する前記アミノ酸が、A、E、F、G、I、L、M、P、S、V、Y、D、K、又はNで置換されており、(d) 位置177に対応する前記アミノ酸が、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、又はYで置換されており、(e) 位置210に対応する前記アミノ酸が、D、E、K、S、N、R、H、又はYで置換されており、(f) 位置221での前記アミノ酸が、D、K、E、Q、R、A、H、L、T、又はYで置換されており、(g) 位置350に対応する前記アミノ酸が、A、D、E、G、K、L、N、Q、R、T、V、H若しくはMで、又はD、E、A、V、I、L、M、F、W、R、H、K、L、S、T、N、若しくはQで置換されており、かつ／あるいは(h) 位置358に対応する前記アミノ酸が、D、E、A、V、I、L、M、F、Y、W、R、H、L、S、T、N、又はQで置換されている、請求項1に記載の修飾 DNA 依存性 ATPase (Dda) ヘリカーゼ。

10

20

【請求項 3】

前記ヘリカーゼが、Dda1993におけるアミノ酸位置40に対応する位置に修飾又は置換を更に含む、請求項1又は2に記載の修飾 Dda ヘリカーゼ。

【請求項 4】

位置40に対応する前記アミノ酸が、A、V、I、L、M、F、Y、又はWで置換されている、請求項3に記載の修飾 DNA 依存性 ATPase (Dda) ヘリカーゼ。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ及び追加のポリヌクレオチド結合部分を含む構築物であって、前記ヘリカーゼが、前記ポリヌクレオチド結合部分に結合しており、前記構築物が、分析物の移動を制御する能力を有する、構築物。

30

【請求項 6】

前記構築物が、請求項1～4のいずれか一項に記載の2つ以上のヘリカーゼを含む、請求項5に記載の構築物。

【請求項 7】

請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物をコードする配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 8】

プロモーターに動作可能に結合された請求項7に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

40

【請求項 9】

請求項8に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 10】

請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物を作製する方法であって、請求項7に記載のポリヌクレオチドを発現させること、細胞を請求項8に記載のベクターでトランスフェクションすること、又は請求項9に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

【請求項 11】

分析物の移動を制御する方法であって、前記分析物を、請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物と接触させ、それによって、前

50

記分析物の前記移動を制御することを含む、方法。

【請求項 1 2】

前記方法が、膜貫通細孔を通る分析物の前記移動を制御するためのものである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

標的分析物を特徴評価する方法であって、

(a) 前記ヘリカーゼ又は構築物が、細孔を通る前記標的分析物の移動を制御するように、前記標的分析物を、膜貫通細孔、及び請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヘリカーゼ、又は請求項 5 若しくは 6 に記載の構築物と接触させることと、

(b) 前記ポリヌクレオチドが前記細孔に対して移動する際に 1 つ以上の測定値を取得することであって、前記測定値が、前記標的分析物の 1 つ以上の特徴を示し、それによって、前記標的分析物を特徴評価する、取得することと、を含む、方法。

10

【請求項 1 4】

前記 1 つ以上の特徴が、(i) 前記標的分析物の長さ、(ii) 前記標的分析物の同一性、(iii) 前記標的分析物の配列、(iv) 前記標的分析物の二次構造、及び(v) 前記標的分析物が修飾されているか否かから選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記標的分析物が、メチル化によって、酸化によって、損傷によって、1 つ以上のタンパク質で、又は 1 つ以上の標識、タグ、若しくはスパーサーで修飾されている、請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

前記標的分析物の前記 1 つ以上の特徴が、電気的測定及び／又は光学的測定によって測定される、請求項 1 3～1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記電気的測定が、電流測定、インピーダンス測定、トンネル効果測定、又は電界効果トランジスタ(FET)測定である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記方法が、

(a) 前記ヘリカーゼ又は前記構築物が、前記細孔を通る前記標的分析物の前記移動を制御するように、前記標的分析物を、膜貫通細孔、及び請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヘリカーゼ、又は請求項 5 若しくは 6 に記載の構築物と接触させることと、

30

(b) 前記ポリヌクレオチドが前記細孔に対して移動する際に前記細孔を通過する前記電流を測定することであって、前記電流が、前記標的分析物の 1 つ以上の特徴を示し、それによって、前記標的分析物を特徴評価する、測定することと、を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記方法が、前記細孔にわたって電圧を印加して、前記細孔と前記ヘリカーゼ又は構築物との間に複合体を形成するステップを更に含む、請求項 1 3～1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部分が、二本鎖である、請求項 1 3～2 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 1】

前記細孔が、膜貫通タンパク質細孔又は固体状態細孔である、請求項 1 3～2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記膜貫通タンパク質細孔が、溶血毒、ロイコシジン、Mycobacterium smegmatis ポーリン A (MspA)、MspB、MspC、MspD、ライセニン(lysenin)、外膜ポーリン F (OmpF)、外膜ポーリン G (OmpG)、外膜ホスホリパーゼ A、Neisseria オートトランスポーターリポタンパク質(Na

50

LP)、及びWZA、CsgG、CsgG/CsgF、ライセニン、ClyA、Sp1、又は溶血性タンパク質フラガセアトキシン(fragaceatoxin)C(Frac)に由来する、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記膜貫通タンパク質が、配列番号3に示される6～10の同一のサブユニット、又は(b)前記サブユニットのうちの1つ以上が配列全体にわたって配列番号3に対して少なくとも40%の同一性を有し、かつ細孔活性を有する、そのバリエーションから形成される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

標的分析物を特徴評価するためのセンサを形成する方法であって、(a)細孔と、(b)請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物との間で複合体を形成し、それによって、前記標的分析物を特徴評価するためのセンサを形成することを含む、方法。

10

【請求項25】

前記複合体が、(a)前記標的分析物の存在下で前記細孔及び前記ヘリカーゼ又は構築物を接触させることと、(a)前記細孔にわたって電位を印加することと、によって形成される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記電位が、電圧電位又は化学電位である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記複合体が、前記細孔を前記ヘリカーゼ又は構築物に共有結合することによって形成される、請求項26に記載の方法。

20

【請求項28】

標的分析物を特徴評価するためのセンサであって、(a)細孔と、(b)請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物との間の複合体を含む、センサ。

【請求項29】

細孔を通る標的分析物の移動を制御するための、請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物の、使用。

【請求項30】

30

標的分析物を特徴評価するためのキットであって、

(a)細孔、及び請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物、あるいは

(b)請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の構築物、及び1つ以上のローディング部分を含む、キット。

【請求項31】

試料中の標的分析物を特徴評価するための装置であって、(a)複数の細孔と、(b)請求項1～4のいずれか一項に記載の複数のヘリカーゼ又は請求項5若しくは6に記載の複数の構築物と、を含む、装置。

【請求項32】

40

請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼを産生する方法であって、

(a)ヘリカーゼを提供することと、

(b)前記ヘリカーゼを修飾して、請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼを産生することと、を含む、方法。

【請求項33】

前記方法が、(c)得られたヘリカーゼが、ポリヌクレオチドの移動を制御することができるか否かを決定することを更に含む、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

請求項5又は6に記載の構築物を産生する方法であって、請求項1～4のいずれか一項に記載のヘリカーゼを追加のポリヌクレオチド結合部分に結合させ、それによって、前記

50

構築物を産生することを含む、方法。

【請求項 35】

前記方法が、得られた構築物が、ポリヌクレオチドの移動を制御することができるかを決定することを更に含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

ポリヌクレオチドに結合した一連の 2 つ以上のヘリカーゼであって、前記 2 つ以上のヘリカーゼのうちの少なくとも 1 つが、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のヘリカーゼである、一連の 2 つ以上のヘリカーゼ。

【請求項 37】

移動が DNA 依存性 ATPase (Dda) ヘリカーゼによって制御される場合に、膜貫通細孔に対する標的分析物の前記移動を改善する方法であって、前記 DNA 依存性 ATPase (Dda) ヘリカーゼが、Dda1993 におけるアミノ酸位置 55、114、156、177、210、221、350、及び 358 に対応する位置、並びに／又は Dda1993 におけるアミノ酸位置 40 に対応する位置のうちの 1 つ以上に置換を含むように修飾され、前記膜貫通細孔に対する前記標的分析物の前記移動を改善する、方法。

【請求項 38】

単離された CsgG 細孔又はその相同体若しくは変異体、あるいは CsgG 細孔又はその相同体若しくは変異体と、修飾 CsgF ペプチド又はその相同体若しくは変異体と、を含む単離された細孔複合体であって、前記 CsgG 細孔が、配列番号 117 における位置 W97、Q100、E101、N102、及び T104 のうちの 1 つ以上に修飾を含む少なくとも 1 個のモノマーを含む、単離された CsgG 細孔又はその相同体若しくは変異体、あるいは単離された細孔複合体。

【請求項 39】

前記修飾 CsgF ペプチド又はその相同体若しくは変異体が、前記 CsgG 細孔又はその相同体若しくは変異体の内腔に挿入されている、請求項 38 に記載の単離された細孔複合体。

【請求項 40】

前記細孔複合体が、CsgG チャネル狭窄及び CsgF チャネル狭窄を含む、2 つ以上のチャネル狭窄を有する、請求項 38 又は 39 に記載の単離された細孔複合体。

【請求項 41】

前記 CsgF チャネル狭窄が、0.5 nm ～ 2.0 nm の範囲の直径を有する、請求項 40 に記載の単離された細孔複合体。

【請求項 42】

請求項 38 ～ 41 のいずれか一項に記載の細孔又は細孔複合体、及び膜の構成要素を含む、単離された膜貫通細孔複合体。

【請求項 43】

請求項 38 ～ 41 のいずれか一項に記載の細孔又は細孔複合体を含む、膜。

【請求項 44】

請求項 43 に記載の複数の膜を含む、アレイ。

【請求項 45】

(a) 請求項 43 に記載の膜、又は請求項 44 に記載のアレイと、(b) 前記膜 (複数可) にわたって電位を印加するための手段と、(c) 前記膜 (複数可) にわたって電気シグナル又は光シグナルを検出するための手段と、を備える、システム。

【請求項 46】

請求項 42 に記載の膜貫通細孔複合体を産生するための方法であって、好適な宿主細胞において、前記 CsgG 細孔又は前記その相同体若しくは変異体、及び前記修飾 CsgF ペプチド又はその相同体若しくは変異体を共発現させ、それによって、インビボでの膜貫通細孔複合体形成を可能にすることを含む、方法。

【請求項 47】

請求項 38 ～ 41 のいずれか一項に記載の単離された細孔複合体を産生するための方法

10

20

30

40

50

であって、前記 C s g G モノマー又は前記その相同体若しくは変異体を、前記修飾 C s g F ペプチド又は前記その相同体若しくは変異体と接触させ、それによって、前記単離された細孔複合体のインビトロ再構成を可能にすることを含む、方法。

【請求項 48】

標的分析物の存在、不在、又は 1 つ以上の特徴を決定するための方法であって、

(a) 前記標的分析物が、前記細孔複合体に対して相対的に、又は前記細孔複合体へと移動するように、前記標的分析物を、請求項 38～41 のいずれか一項に記載の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体と、又は請求項 42 に記載の膜貫通細孔複合体と接触させるステップと、

(b) 前記分析物が前記細孔複合体を通して移動する際に 1 つ以上の測定値を取得し、それによって、前記分析物の前記存在、不在、又は 1 つ以上の特徴を決定するステップと、を含む、方法。

10

【請求項 49】

前記細孔複合体に対する前記標的分析物の移動が、ポリヌクレオチド結合タンパク質、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の D d a ヘリカーゼ、又は請求項 5 若しくは 6 に記載の構築物によって制御される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記分析物が、ポリヌクレオチドである、請求項 48 又は 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記分析物が、(ポリ) ペプチドである、請求項 48 又は 49 に記載の方法。

20

【請求項 52】

前記分析物が、多糖類である、請求項 48 又は 49 に記載の方法。

【請求項 53】

(i) 前記ポリヌクレオチドの長さ、(i i) 前記ポリヌクレオチドの同一性、(i i i) 前記ポリヌクレオチドの配列、(i v) 前記ポリヌクレオチドの二次構造、及び(v) 前記ポリヌクレオチドが修飾されているか否かから選択される 1 つ以上の特徴を決定することを含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 54】

請求項 38～41 のいずれか一項に記載の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体、又は請求項 42 に記載の膜貫通細孔複合体を使用する、ポリヌクレオチド又は(ポリ) ペプチドを特徴評価する、方法。

30

【請求項 55】

前記 C s g G 細孔又はその相同体若しくは変異体が、6～10 個のモノマーを含む、請求項 46～54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

標的分析物の存在、不在、又は 1 つ以上の特徴を決定するための、請求項 38～41 のいずれか一項に記載の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体、又は請求項 42 に記載の膜貫通細孔複合体の、使用。

【請求項 57】

標的分析物が細孔を通過する速度を変更する方法であって、前記標的分析物が、前記細孔複合体に対して相対的に、又は前記細孔複合体へと移動するように、前記標的分析物を、請求項 38～41 のいずれか一項に記載の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体と、又は請求項 42 に記載の膜貫通細孔複合体と接触させることを含む、方法。

40

【請求項 58】

前記細孔複合体に対する前記標的分析物の前記移動が、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の D d a ヘリカーゼ又は請求項 5 若しくは 6 に記載の構築物によって制御される、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

標的分析物を特徴評価するためのキットであって、(a) 請求項 38～41 のいずれか一項に記載の単離された細孔又は単離された細孔複合体と、(b) 膜の構成要素、及び(

50

c) ポリヌクレオチド結合タンパク質の一方又は両方と、を含む、キット。

【請求項60】

標的分析物を特徴評価する方法であって、

(a) 前記ヘリカーゼ又は構築物が、前記細孔又は細孔複合体を通る前記標的分析物の移動を制御するように、前記標的分析物を、請求項38～41のいずれか一項に記載の単離された細孔又は単離された細孔複合体、及び請求項1～4のいずれか一項に記載のDNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼ、又は請求項5若しくは6に記載のヘリカーゼ構築物と接触させることと、

(b) ポリヌクレオチドが前記細孔又は細孔複合体に対して移動する際に1つ以上の測定値を取得することであって、前記測定値が、前記標的分析物の1つ以上の特徴を示し、それによって、前記標的分析物を特徴評価する、取得することと、を含む、方法。

10

【請求項61】

標的分析物を特徴評価するためのキットであって、(a) 請求項1～4のいずれか一項に記載のDNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼ、又は請求項5若しくは6に記載のヘリカーゼ構築物と、(b) 請求項38～41のいずれか一項に記載の単離されたCs g G細孔又は単離された細孔複合体と、を含む、キット。

【請求項62】

インビトロ膜に挿入された、請求項38～41のいずれか一項に記載の膜貫通タンパク質細孔又は細孔複合体を含む、装置。

【請求項63】

方法であって、(i) 請求項38～41のいずれか一項に記載の単離された細孔又は単離された細孔複合体を得ることと、(ii) 前記細孔がインビトロ膜に挿入されるように、前記単離された細孔又は単離された細孔複合体を、前記インビトロ膜と接触させることと、を含む、方法によって製造された、装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリヌクレオチドなどの分析物の移動を制御するために使用することができる修飾Ddaヘリカーゼに関する。修飾Ddaヘリカーゼは、分析物の検出及び特徴評価に使用される。本発明はまた、新規のタンパク質細孔又は細孔複合体、並びに分析物の検出及び特徴評価におけるそれらの使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

ナノ細孔センシングを使用する分析物、特にポリマー特徴評価の重要な構成要素のうちの2つは、(1) 細孔を通るポリマーの移動の制御、及び(2) ポリマーが細孔を通る際の構成ビルディングブロックの識別である。ナノ細孔センシング中、細孔の最も狭い部分は、典型的には、ナノ細孔に対して移動する分析物の関数としての測定シグナルの変化に関して、ナノ細孔の最も識別力のある部分に対応する。Cs g Gは、Escherichia coli (Goyal et al., 2014) からのゲートなしの非選択的タンパク質分泌チャネルとして同定され、分析物を検出及び特徴評価するためのナノ細孔として使用されている。この文脈における細孔の特性を改善する野生型Cs g G細孔への変異もまた開示されている(それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO2016/034591、WO2017/149316、WO2017/149317、WO2017/149318、WO2018/211241、及びWO2019/002893)。それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO2015/055981、WO2015/166276、及びWO2016/055777もまた、本明細書に記載されるCs g G細孔などの膜貫通タンパク質細孔に対する分析物の移動を制御するために使用することができるポリヌクレオチド結合タンパク質、具体的にはDdaヘリカーゼを記載している。

40

【発明の概要】

50

【0003】

本発明者らは、驚くべきことに、細孔を通る分析物の移動を制御する改善された能力を有する特定の D d a 変異体を同定している。細孔を使用してポリヌクレオチドを配列決定する場合、システムは、細孔を通過する塩基／ヌクレオチドの数及び同一性を共同して推定する。移動速度の変動に対するより良好な制御は、統計的ノイズの源のうちの1つを低減し、推定タスクを単純化することができる。細孔内のポリヌクレオチドの連続した短い滞留の実行は、欠失エラーをもたらす基礎となるヌクレオチド／塩基を呼び出すことの失敗を引き起こす可能性がある。異常に長い滞留は、挿入エラーにつながる可能性がある。各ヌクレオチド／塩基が細孔内で十分な時間間隔を過ごすことを確実にすることは、ヌクレオチド／塩基同一性における統計的不確実性をノイズの多いシグナルレベルから解決するのに役立つ。更なる情報は、例えば、モーター酵素との相互作用を介して、ヌクレオチド／塩基同一性に対する滞留時間の依存性から抽出することができる。滞留時間の全体的な変動を低減することは、このチャンネルを通じてより正確な情報を抽出するのに役立つ可能性がある。シグナルレベルが移動に関する限られた情報を提供する領域（例えば、長いホモポリマー領域）の間、マルチヌクレオチド／塩基滞留時間を使用して、細孔を通過する塩基の数を推測することができる。滞留時間の変動を低減することで、これらの推測をより正確にすることができる。

10

【0004】

いくつかの実施形態では、本発明の変異体は、膜貫通細孔を通る分析物の移動を制御する方法において、及び膜貫通細孔を使用して分析物を特徴評価する方法において使用される場合、改善された精度を呈する。分析物の特徴評価（特にポリヌクレオチド）の文脈において、精度は、生の読み取り単純精度を意味すると解釈され、すなわち、単一の分子が膜貫通細孔を通る単一の通過である。精度は、配列決定デバイスのプラットフォーム改善を追跡するための有用な尺度である。精度はまた、コンセンサス精度、又は例えば、ポリヌクレオチド分析物における変異などの特定のものを検出する際の精度を指し得る。追加的又は代替的に、精度は、信頼レベルが事前に較正されている場合に、特定の信頼レベルを上回る塩基のパーセンテージを意味すると解釈される。いくつかの実施形態では、本発明の変異体は、速度の変化を最小限に抑えて、又は全く変化させずに、改善された精度を呈する。いくつかの実施形態では、精度は、10%未満の誤差、5%未満の誤差、4%未満の誤差、3%未満の誤差、2%未満の誤差、1%未満の誤差、0.1%未満の誤差を与えるように改善される。本発明者らによって同定された変異体は、典型的には、変異の組み合わせ、すなわち、膜貫通細孔と相互作用する変異体の部分における1つ以上の修飾を含む。精度はまた、ポリマーが酵素制御下で細孔を転位する速度によって影響され得、速度は、酵素に提供される ATP の濃度を変更することによって変更され得る。本発明者らは、驚くべきことに、酵素が、精度の減少を引き起こす可能性のある同じ条件下での同じ配列決定実行内の連続的なポリマー転位中に速度の変化を示すことができることを認識している。

20

30

【0005】

精度は、ナノ細孔の形状及び組成、酵素、並びに酵素とナノ細孔との間の相互作用などの多くの要因によって影響され得る。精度はまた、ポリマーが酵素制御下で細孔を転位する速度によっても影響され、転位速度は、酵素に提供される ATP の濃度を変更することによって増加又は低下させることができる。本発明者らは、驚くべきことに、速度の変化が、同じ配列決定条件下での同じ配列決定実行内の連続的なポリマー転位中に生じることを認識しており、これは、配列決定精度の減少を引き起こす可能性がある。多くのポリマーについての配列決定速度の変動は、正規化された速度分布を得るために測定され得、本発明者らは、驚くべきことに、いくつかの修飾された酵素が、より低い正規化された速度分布、したがって、配列決定精度の増加を引き起こす可能性があることを認識している。

40

【0006】

本発明は以下を提供する。

—修飾 DNA 依存性 ATPase (D d a) ヘリカーゼであって、ヘリカーゼが、D d a

50

1993におけるアミノ酸位置55、114、156、177、210、221、350、及び358に対応する位置のうちの1つ以上に修飾又は置換を含む、修飾DNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼ、

－本発明のヘリカーゼ及び追加のポリヌクレオチド結合部分を含む構築物であって、ヘリカーゼが、ポリヌクレオチド結合部分に結合しており、構築物が、分析物の移動を制御する能力を有する、構築物、

－本発明のヘリカーゼ又は本発明の構築物をコードする配列を含むポリヌクレオチド、

－プロモーターに動作可能に結合された本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、

－本発明のベクターを含む宿主細胞、

－本発明のヘリカーゼ又は本発明の構築物を作製する方法であって、本発明のポリヌクレオチドを発現させること、細胞を本発明のベクターでトランスフェクションすること、又は本発明の宿主細胞を培養することを含む、方法、

－分析物の移動を制御する方法であって、分析物を、本発明のヘリカーゼ又は本発明の構築物と接触させ、それによって、分析物の移動を制御することを含む、方法、

－標的分析物を特徴評価する方法であって、

(a) ヘリカーゼ又は構築物が、細孔を通る標的分析物の移動を制御するように、標的分析物を、膜貫通細孔、及び本発明のヘリカーゼ又は本発明の構築物と接触させることと、

(b) ポリヌクレオチドが細孔に対して移動する際に1つ以上の測定値を取得することであって、測定値が、標的分析物の1つ以上の特徴を示し、それによって、標的分析物を特徴評価する、取得することと、を含む、方法、

－標的分析物を特徴評価するためのセンサを形成する方法であって、(a) 細孔と、(b) 本発明のヘリカーゼ又は本発明の構築物との間で複合体を形成し、それによって、標的分析物を特徴評価するためのセンサを形成することを含む、方法、

－標的分析物を特徴評価するためのセンサであって、(a) 細孔と、(b) 本発明のヘリカーゼ又は本発明の構築物との間の複合体を含む、センサ、

－細孔を通る標的分析物の移動を制御するための、本発明のヘリカーゼ又は本発明の構築物の使用、

－標的分析物を特徴評価するためのキットであって、

(a) 本発明の細孔及びヘリカーゼ、若しくは本発明の構築物、又は

(b) 本発明のヘリカーゼ若しくは本発明の構築物、及び1つ以上のローディング部分を含む、キット、

－試料中の標的分析物を特徴評価するための装置であって、(a) 複数の細孔と、(b) 本発明の複数のヘリカーゼ又は本発明の複数の構築物と、を含む、装置、

－本発明のヘリカーゼを産生する方法であって、

(a) ヘリカーゼを提供することと、

(b) ヘリカーゼを修飾して、本発明のヘリカーゼを産生することと、を含む、方法、

－本発明の構築物を産生する方法であって、本発明のヘリカーゼを追加のポリヌクレオチド結合部分に結合させ、それによって、構築物を産生することを含む、方法、

－ポリヌクレオチドに結合した一連の2つ以上のヘリカーゼであって、2つ以上のヘリカーゼのうちの少なくとも1つが、本発明のヘリカーゼである、一連の2つ以上のヘリカーゼ、並びに

－移動がDNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼによって制御される場合に、膜貫通細孔に対する標的分析物の移動を改善する方法であって、DNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼが、Dda 1993におけるアミノ酸位置55、114、156、177、210、221、350、及び358に対応する位置、並びに／又はDda 1993におけるアミノ酸位置40に対応する位置のうちの1つ以上に置換を含むように修飾され、膜貫通細孔に対する標的分析物の移動を改善する、方法。

【0007】

本発明者らはまた、驚くべきことに、好ましくは、分析物の移動がポリヌクレオチド結

合タンパク質の制御下にある、分析物が膜貫通細孔を通過する／膜貫通細孔に対して相対的に通過する速度を改善又は変更する新しい膜貫通細孔の変異を同定している。本発明の一実施形態では、膜貫通細孔の変異は、分析物が膜貫通細孔を通過する／膜貫通細孔に対して相対的に通過する速度を増加させる。別の実施形態では、膜貫通細孔の変異は、分析物が膜貫通細孔を通過する／相対的に通過する速度を減少させる。分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度は、本発明の変異を含まない細孔に対して分析物が移動する速度に対して、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%、150%、200%、又は300%以上増加し得る。分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度は、本発明の変異を含まない細孔に対して分析物が移動する速度に対して、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%減少し得る。本発明者らは、驚くべきことに、細孔の修飾によって引き起こされる速度の増加又は減少などの速度のこれらの変更が、精度読み取り値にほとんど又は全く影響を及ぼさないことを見出している。これは、ポリヌクレオチド結合タンパク質が、細孔を通る／細孔に対して相対的な標的分析物の移動を制御するように、分析物を、細孔及び本発明のヘリカーゼなどのポリヌクレオチド結合タンパク質と接触させる、分析物を特徴評価する方法において特に有利である。一実施形態では、変異体細孔は、変異を含まない他の膜貫通細孔とは異なる方法で、ポリヌクレオチド結合タンパク質と相互作用する。細孔変異体は、変異を含まない他の膜貫通細孔と比較した場合、速度の分布がより緊密になり、低減された配列決定誤差につながるように、DNAが細孔を通過して転位する速度の分布を変更し得る。本発明の好ましい実施形態では、本発明の修飾DNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼは、本発明の膜貫通細孔を通るポリヌクレオチドなどの分析物の移動を制御するために使用される。

10

20

30

40

50

【0008】

本発明は、単離されたCsgG細孔又はその相同体若しくは変異体、あるいはCsgG細孔又はその相同体若しくは変異体と、修飾CsgFペプチド又はその相同体若しくは変異体と、を含む単離された細孔複合体であって、CsgG細孔が、配列番号117における位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上に修飾を含む少なくとも1個のモノマーを含む、単離されたCsgG細孔又はその相同体若しくは変異体、あるいは単離された細孔複合体を提供する；

一態様では、CsgFペプチドは、CsgG結合領域及び細孔内に狭窄を形成する領域を含む。一態様では、CsgFペプチドは、CsgFのC末端ヘッドドメインを欠く切り詰め型CsgFペプチドである。別の態様では、CsgFペプチドは、CsgFのC末端ヘッド及びネックドメインの一部分を欠く切り詰め型CsgFペプチドである。別の態様では、CsgFペプチドは、CsgFのC末端ヘッド及びネックドメインを欠く切り詰め型CsgFペプチドである。CsgG／CsgF細孔は、本明細書では細孔複合体及び単離された細孔複合体とも称される。単離された細孔複合体は、CsgG細孔又はその相同体若しくは変異体、及び修飾CsgFペプチド又はその相同体若しくは変異体、特に、切り詰め型CsgF断片又はその相同体若しくは変異体を含む。一実施形態では、該修飾CsgFペプチド又はその相同体若しくは変異体は、CsgG細孔又はその相同体若しくは変異体の内腔に位置している。別の実施形態では、該単離された細孔複合体は、2つ以上のチャネル狭窄を有し、1つは、その狭窄ループによって形成されたCsgG細孔によって位置付けられるか、又は提供され、別の追加のチャネル狭窄又はリーダーヘッドは、修飾CsgFペプチド又はその相同体若しくは変異体によって導入される。一実施形態では、該CsgG細孔又はCsgG様細孔は、野生型細孔ではなく、変異体CsgG細孔であり、特定の実施形態では、変異は、例えば、該チャネル狭窄ループに存在する。他の実施形態では、変異は、代替的又は追加的に、細孔の上部、細孔がポリヌクレオチド結合タンパク質と相互作用する領域に存在する。変異は、ポリヌクレオチド結合タンパク質が細孔とどのように相互作用するか、及び／又は細孔がポリヌクレオチド結合タンパク質とどのように

相互作用するかに影響を及ぼし得る。別の実施形態では、修飾 C s g F ペプチド又はその相同体若しくは変異体を含む単離された細孔複合体は、0.5 nm ~ 2.0 nm の範囲の直径を有する C s g F チャネル狭窄を有する。一実施形態では、細孔複合体は、(i) 第1の開口部、ベータバレルを含む中間切片、第2の開口部、及び第1の開口部から中間切片を通して第2の開口部に延びる内腔を含む C s g G 細孔であって、中間切片の内腔表面が C s g G 狭窄を画定する、C s g G 細孔と、(ii) 各々が C s g F 狭窄領域及び C s g F 結合領域（本明細書では、C s g G 結合ドメイン又は C s g F の領域とも称される）を有する複数の修飾 C s g F ペプチドであって、修飾 C s g F ペプチドが、C s g G 細孔のベータバレル内に C s g F 狭窄を形成し、C s g G 狭窄及び C s g F 狭窄が、C s g G 細孔のベータバレル内で同軸的に間隔を置いて配置されている、複数の修飾 C s g F ペプチドと、を含む。C s g G 細孔の内腔表面は、C s g G 狭窄を画定する C s g G モノマーの1つ以上のループ領域を含み得る。C s g F 狭窄領域及び C s g F 結合領域は、典型的には、C s g F 成熟ペプチドの N 末端部分に対応する。一実施形態では、細孔複合体は、C s g A、C s g B、及び C s g E を除外する。

10

20

30

40

50

【0009】

一実施形態は、C s g G 細孔及び修飾 C s g F ペプチドを含む細孔に関し、修飾 C s g F ペプチドは、C s g G に結合され、細孔内に狭窄を形成し、細孔は、細孔及びポリヌクレオチド結合酵素の相互作用を変更するように変異され、かつ／又は該細孔は、分析物が細孔を通過する速度を改善するように変異される。本発明の一実施形態では、アナイト (anayite) が細孔を通過する速度が増加する。本発明の別の実施形態では、分析物が細孔を通過する速度が減少する。

【0010】

別の実施形態は、修飾 C s g F ペプチド及び C s g G 細孔若しくは該細孔のモノマー、又はその相同体若しくは変異体が共有結合的にカップリングしている単離された細孔複合体に関する。かつ更により具体的には、該カップリングは、システイン残基を介して、又は配列番号 117 若しくは配列番号 3 の 132、133、136、138、140、142、144、145、147、149、151、153、155、183、185、187、189、191、201、203、205、207、若しくは 209 に対応する位置での C s g G モノマー、若しくはその相同体における非変性反応性若しくは光反応性アミノ酸を介して行われる。

【0011】

本発明はまた、単離された膜貫通細孔若しくは細孔複合体、又は本発明の単離された細孔若しくは細孔複合体、及び膜の構成要素を含む膜組成物を提供する。特に、該膜貫通細孔若しくは細孔複合体又は膜組成物は、本発明の単離された細孔又は細孔複合体、及び膜又は絶縁層の構成要素からなる。

【0012】

本発明はまた、以下を提供する。

— 本発明の細孔又は細孔複合体を含む、膜、

— 本発明の複数の膜を含む、アレイ、

— (a) 本発明の膜、又は本発明のアレイと、(b) 膜（複数可）にわたって電位を印加するための手段と、(c) 膜（複数可）にわたって電気シグナル又は光シグナルを検出するための手段と、を備える、システム。

【0013】

本発明はまた、本発明の膜貫通細孔複合体を産生するための方法であって、好適な宿主細胞において、C s g G 細孔又はその相同体若しくは変異体、及び修飾 C s g F ペプチド又はその相同体若しくは変異体を共発現させ、それによって、インビボでの膜貫通細孔複合体形成を可能にすることを含む、方法を提供する。

【0014】

本発明はまた、本発明の単離された細孔複合体を産生するための方法であって、C s g G モノマー又はその相同体若しくは変異体を、修飾 C s g F ペプチド又はその相同体若し

くは変異体と接触させ、それによって、単離された細孔複合体のインビトロ再構成を可能にすることを含む、方法を提供する。修飾 C s g F ペプチドは、アミノ酸配列における好適な位置に酵素切断部位を含み、細孔の形成の前又は後に切断されるペプチドであり得る。

【0015】

特定の実施形態では、該修飾 C s g F ペプチド又はその相同体若しくは変異体は、配列番号 12 若しくは配列番号 14、又はその相同体若しくは変異体を含む。特定の実施形態では、該方法の修飾 C s g F ペプチドは、配列番号 15 若しくは配列番号 16、又はその相同体若しくは変異体を含む。

【0016】

本発明はまた、標的分析物の存在、不在、又は 1 つ以上の特徴を決定するための方法であって、

(i) 標的分析物が細孔チャネルへと移動するように、標的分析物を、本発明の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体、又は本発明の膜貫通細孔複合体と接触させるステップと、

(i i) 分析物が細孔チャネルを通過して移動する際に 1 つ以上の測定値を取得し、それによって、分析物の存在、不在、又は 1 つ以上の特徴を決定するステップと、を含む、方法を提供する。一実施形態では、該分析物は、ポリヌクレオチドである。特に、ポリヌクレオチドを分析物として代替的に使用する該方法は、(i) 分析物又はポリヌクレオチドの長さ、(i i) 分析物又はポリヌクレオチドの同一性、(i i i) 分析物又はポリヌクレオチドの配列、(i v) 分析物又はポリヌクレオチドの二次構造、及び (v) 分析物又はポリヌクレオチドが修飾されているか否かから選択される 1 つ以上の特徴を決定することを含む。

【0017】

別の実施形態では、分析物は、タンパク質、(ポリ) ペプチド、又はペプチドである。更なる実施形態では、該分析物は、例えば、限定されないが、薬理学的に活性な化合物、毒性化合物、及び汚染物質などの、ポリマー、オリゴ糖、多糖類、又は小さな有機若しくは無機化合物である。

【0018】

本発明はまた、本発明の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体、又は本発明の膜貫通細孔複合体を使用して、ポリヌクレオチド又は(ポリ) ペプチドを特徴評価するための方法を提供する。特に、該 C s g G 細孔又はその相同体若しくは変異体は、C s g G 細孔チャネルを形成する 6 ~ 10 個の C s g G モノマーを含む。

【0019】

本発明はまた、標的分析物の存在、不在、又は 1 つ以上の特徴を決定するための、本発明の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体、又は本発明の膜貫通細孔複合体の使用を提供する。更に、本発明はまた、標的分析物を特徴評価するためのキットであって、

(a) 該単離された細孔又は細孔複合体と、(b) 膜の構成要素と、を含む、キットに関する。

【0020】

本発明はまた、以下を提供する。

一標的分析物が細孔を通過する速度を変更する方法であって、標的分析物が、細孔複合体に対して相対的に、又は細孔複合体へと移動するように、標的分析物を、本発明の単離された細孔若しくは単離された細孔複合体と、又は本発明の膜貫通細孔複合体と接触させることを含む、方法、

一標的分析物を特徴評価するためのキットであって、(a) 本発明の単離された細孔又は単離された細孔複合体と、(b) 膜の構成要素、及び(c) ポリヌクレオチド結合タンパク質の一方又は両方と、を含む、キット、

一標的分析物を特徴評価する方法であって、

(a) ヘリカーゼ又は構築物が、細孔又は細孔複合体を通る標的分析物の移動を制御す

10

20

30

40

50

るように、標的分析物を、本発明の単離された細孔又は単離された細孔複合体、及び本発明のDNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼ、又は本発明のヘリカーゼ構築物と接触させることと、

(b) ポリヌクレオチドが細孔又は細孔複合体に対して移動する際に1つ以上の測定値を取得することであって、測定値が、標的分析物の1つ以上の特徴を示し、それによって、標的分析物を特徴評価する、取得することと、を含む、方法、
ー標的分析物を特徴評価するためのキットであって、(a) 本発明のDNA依存性ATPase (Dda) ヘリカーゼ、又は本発明のヘリカーゼ構築物、(b) 本発明の単離されたCs g G細孔又は単離された細孔複合体を含む、キット、
ーインビトロ膜に挿入された本発明の細孔又は細孔複合体を含む、装置、
ー方法であって、(i) 本発明の単離された細孔又は単離された細孔複合体を得ることと、(ii) 細孔がインビトロ膜に挿入されるように、単離された細孔又は単離された細孔複合体を、インビトロ膜と接触させることと、を含む、方法によって製造された、装置。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0021】

本明細書で引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は、上記又は下記にかかわらず、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個々の刊行物、特許、又は特許出願が、具体的かつ個別に、参照により組み込まれることが示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる刊行物及び特許又は特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する程度まで、本明細書は、かかる任意の矛盾する資料に取って代わる及び／又はかかる矛盾する資料に優先することを意図している。

【0022】

本発明は、特定の実施形態に関して、かつある特定の図面を参照して記載されるが、本発明はそれらに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。特許請求の範囲内のいずれの参照符号も、その範囲を限定するものと解釈されるべきではない。言うまでもなく、必ずしも全ての態様又は利点が本発明の任意の特定の実施形態に従って達成され得るわけではないことを理解されたい。したがって、例えば、当業者であれば、本明細書で教示又は示唆され得る他の態様又は利点を必ずしも達成することなく、本明細書で教示される1つの利点又は利点の群を達成又は最適化する様式で本発明が具体化又は実行され得ることを認識するであろう。

【0023】

本発明は、編成及び操作の方法の両方に関して、その特性及び利点と一緒に、添付の図面と併せて読まれたときに以下の発明を実施するための形態を参照することにより最も良好に理解され得る。本発明の態様及び利点は、以下に記載される実施形態（複数可）を参照して明らかになり、説明されるであろう。本明細書を通して「一実施形態」又は「ある実施形態」への言及は、その実施形態に関連して記載される特定の特性、構造、又は特徴が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通して様々な場所での「一実施形態では」又は「ある実施形態では」という語句の出現は、必ずしも全て同じ実施形態を指すわけではないが、そうである場合もある。同様に、本発明の例示的な実施形態の説明では、本開示を合理化し、かつ様々な発明態様のうちの1つ以上の理解を支援することを目的に、本発明の様々な特性が、単一の実施形態、又はそれらの説明にまとめられることもあることを理解されるべきである。しかしながら、本開示の方法は、特許請求される発明が各特許請求項に明示的に列挙されているよりも多くの特性を必要とするという意図を反映するものと解釈されるべきではない。むしろ、以下の特許請求の範囲が反映するように、発明態様は、単一の前述の開示される実施形態の全ての特性よりも少ない。

【0024】

加えて、本明細書及び添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、単数形の「a」、「an」及び「the」は、文脈から明らかにそうではない限り、複数の参照物を含む。した

がって、例えば、「ポリヌクレオチド」への言及は2つ以上のポリヌクレオチドを含み、「ポリヌクレオチド結合タンパク質」への言及は2つ以上のかかるタンパク質を含み、「ヘリカーゼ」への言及は2つ以上のヘリカーゼを含み、「モノマー」への言及は2個以上のモノマーを指し、「細孔」への言及は2つ以上の細孔などを含む。

【0025】

本明細書中の全ての考察において、アミノ酸の標準的な1文字のコードが使用される。それらは以下の通りである：アラニン（A）、アルギニン（R）、アスパラギン（N）、アスパラギン酸（D）、システイン（C）、グルタミン酸（E）、グルタミン（Q）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、リジン（K）、メチオニン（M）、フェニルアラニン（F）、プロリン（P）、セリン（S）、スレオニン（T）、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びバリン（V）。標準的な置換記法も使用され、すなわち、Q42Rは、42位におけるQがRで置換されていることを意味する。

10

【0026】

特定の位置における異なるアミノ酸が／記号によって分けられている本明細書の段落において、／記号は、「又は」を意味する。例えば、Q87R／Kは、Q87R又はQ87Kを意味する。異なる位置が／記号によって分けられている場合、／記号は、「及び」を意味し、Y51／N55は、Y51及びN55である。

【0027】

定義

20

以下の用語又は定義は、本発明の理解を助けるためのみに提供される。本明細書で具体的に定義されない限り、本明細書で使用される全ての用語は、それらが本発明の当業者にとってそうであるのと同じ意味を有する。熟練者は、定義及び技術用語について、特に、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York (2012)、及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 114), John Wiley & Sons, New York (2016)を指示される。本明細書で提供される定義は、当業者によって理解されるよりも範囲が狭いと解釈されるべきではない。

30

【0028】

例えば、量、時間的持続時間などの測定可能な値を指すときに本明細書で使用される「約」は、指定された値から±20%又は±10%、より好ましくは±5%、更により好ましくは±1%、及びなおより好ましくは±0.1%の変動を包含することを意味し、かかる変動は開示される方法を行うのに適切である。

【0029】

本明細書で使用される「ヌクレオチド配列」、「DNA配列」、又は「核酸分子（複数可）」は、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。この用語は、分子の一次構造のみを指す。したがって、この用語には、二本鎖及び一本鎖DNA及びRNAが含まれる。本明細書で使用される「核酸」という用語は、各ヌクレオチドの3'末端及び5'末端がホスホジエステル結合によって連結されている、一本鎖又は二本鎖の共有結合したヌクレオチド配列である。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド塩基又はリボヌクレオチド塩基で構成され得る。核酸は、インビトロで合成的に製造され得るか、又は天然源から単離され得る。核酸には、修飾DNA若しくはRNA、例えば、メチル化されているDNA若しくはRNA、又は翻訳後修飾、例えば、7-メチルグアノシンでの5'-キャッピング、切断及びポリアデニル化などの3'-プロセッシング、並びにスプライシングに供されているRNAが更に含まれ得る。核酸には、ヘキシトール核酸（HNA）、シクロヘキセン核酸（CeNA）、トレオース核酸（TNA）、グリセロール核酸（GNA）、ロックド核酸（LNA）、及びペプチド核酸（PNA）などの合成核酸（XNA）も含まれ得る。本明細書で「ポ

40

50

リヌクレオチド」とも称される核酸のサイズは、典型的には、二本鎖ポリヌクレオチドについては塩基対 (bp) の数として、又は一本鎖ポリヌクレオチドの場合にはヌクレオチド (nt) の数として表される。1000bp又はntは、キロベース (kb) に等しい。約40ヌクレオチド長未満のポリヌクレオチドは、典型的には「オリゴヌクレオチド」と呼ばれ、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を介するなどのDNAの操作に使用するためのプライマーを含み得る。

【0030】

本明細書で使用される「遺伝子」は、遺伝子のプロモーター領域及びコード配列の両方を含む。これは、ゲノム配列 (可能なイントロンを含む) と、プロモーター配列に動作可能に結合された、スプライシングされたメッセンジャーに由来するcDNAとの両方を指す。

10

【0031】

「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれると、mRNAに転写され、及び/又はポリペプチドに翻訳されるヌクレオチド配列である。コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドン及び3'末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列は、mRNA、cDNA、組換えヌクレオチド配列、又はゲノムDNAが含み得るが、これらに限定されず、特定の状況下ではイントロンも存在し得る。

【0032】

本開示の文脈における「アミノ酸」という用語は、その最も広い意味で使用され、各アミノ酸に特異的な側鎖 (例えば、R基) とともに、アミン (NH₂) 及びカルボキシル (COOH) 官能基を含有する有機化合物を含むよう意図されている。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然に存在するL-α-アミノ酸又は残基を指す。天然に存在するアミノ酸について一般に使用される1文字及び3文字の略語が、本明細書で使用される: A=Ala、C=Cys、D=Asp、E=Glu、F=Phe、G=Gly、H=His、I=Ile、K=Lys、L=Leu、M=Met、N=Asn、P=Pro、Q=Gln、R=Arg、S=Ser、T=Thr、V=Val、W=Trp、及びY=Tyr (Lehninger, A. L., (1975) Biochemistry, 2d ed., pp. 71-92, Worth Publishers, New York)。「アミノ酸」という一般用語は、D-アミノ酸、レトロインベルソアミノ酸、並びにアミノ酸類似体などの化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンなどのタンパク質に通常組み込まれない天然に存在するアミノ酸、及びβ-アミノ酸などのアミノ酸の特徴であることが当該技術分野で既知の特性を有する化学的に合成された化合物を更に含む。例えば、天然Phe又はProと同じペプチド化合物の立体構造上の制限を可能にするフェニルアラニン又はプロリンの類似体又は模倣物は、アミノ酸の定義内に含まれる。かかる類似体及び模倣物は、本明細書でそれぞれのアミノ酸の「機能的等価物」と称される。アミノ酸の他の例は、参照により本明細書に組み込まれる、Roberts and Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Gross and Meierhofer, eds., Vol. 5 p. 341, Academic Press, Inc., N. Y. 1983によってリストされている。

20

30

【0033】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、アミノ酸残基のポリマー、並びにそのバリエーション及び合成類似体を指すために、本明細書で更に交換可能に使用される。したがって、これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の化学類似体などの天然に存在しない合成アミノ酸であるアミノ酸ポリマー、並びに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、グリコシル化、タンパク質分解的切断、脂質化、シグナルペプチド切断、プロペプチド切断、リン酸化などを含み得るが、これらに限定されない、成熟又は翻訳後修飾プロセスも受け得る。「組換えポリペプチド」とは、例えば、組換え又は合成ポリヌクレオチドの発現を介して、組換え技法を使用して作製されたポリペプチドを意味する。キメラポリペプチド又はその生物学的に活性な部分が組換えにより産生される場合、それはまた、好ましくは実質

40

50

的に培養培地を含まず、例えば、培養培地は、タンパク質調整物の量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満を表す。「単離された」とは、通常その非変性状態でそれに付随する構成要素を実質的又は本質的に含まない材料を意味する。例えば、本明細書で使用される「単離されたポリペプチド」は、天然に存在する状態でそれに隣接する分子、例えば、該ポリペプチドに隣接する産生宿主中に存在する分子から除去されたタンパク質複合体又はCs g Fペプチドから精製されたポリペプチドを指す。単離されたCs g Fペプチド（任意選択的に、切り詰め型Cs g Fペプチド）は、アミノ酸化学合成によって生成され得るか、又は組換え産生によって生成され得る。単離された複合体は、複合体の構成要素、例えば、Cs g G細孔及びCs g Fペプチド（複数可）の精製後のインビトロ再構成によって生成され得るか、又は組換え共発現によって生成され得る。

10

【0034】

「オルソログ」及び「パラログ」は、遺伝子の祖先の関係を説明するために使用される進化の概念を包含する。パラログは、祖先遺伝子の重複によって生じた同じ種内の遺伝子であり、オルソログは、種分化によって生じた異なる生物に由来する遺伝子であり、共通の祖先遺伝子にも由来する。

【0035】

タンパク質の「相同体（Homologue）」、「相同体（Homologues）」は、問題となっている未修飾又は野生型タンパク質と比較してアミノ酸置換、欠失、及び／又は挿入を有し、かつそれらが由来する未修飾タンパク質と類似の生物学的及び機能的活性を有する、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、及び酵素を包含する。本明細書で使用される「アミノ酸同一性」という用語は、配列が比較のウィンドウにわたってアミノ酸ごとに同一である程度を指す。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較のウィンドウにわたって2つの最適にアラインメントされた配列を比較し、同一のアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、及びMet）が両方の配列に生じる位置の数を決定して、一致した位置の数を得、一致した位置の数を比較のウィンドウ内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で割り、その結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

20

30

【0036】

「Cs g G細孔」という用語は、複数のCs g Gモノマーを含む細孔を定義する。各Cs g Gモノマーは、E. coliからの野生型モノマー（配列番号3）、例えば、配列番号68～88に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを有するモノマーなどのE. coli Cs g Gの野生型相同体、又はそれらのいずれかのバリエーション（例えば、配列番号3、117、及び68～88のうちのいずれか1つのバリエーション）であり得る。バリエーションCs g Gモノマーはまた、修飾Cs g Gモノマー又は変異体Cs g Gモノマーと称されることもある。バリエーションにおける修飾又は変異には、本明細書に開示される修飾のうちのいずれか1つ以上、又は該修飾の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0037】

本発明の全ての態様及び実施形態について、Cs g G相同体は、配列番号117又は配列番号3に示される野生型E. coli Cs g Gに対して少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、又は99%の完全な配列同一性を有するポリペプチドと称される。Cs g G相同体はまた、Cs g G様タンパク質に特徴的なPFAMドメインPF03783を含むポリペプチドとも称される。現在知られているCs g G相同体及びCs g Gアーキテクチャのリストは、<http://pfam.xfam.org/family/PF03783>において見出され得る。同様に、Cs g G相同ポリヌクレオチドは、配列番号1に示される野生型E. coli Cs g Gに対して少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は99%の完

50

全な配列同一性を有するポリヌクレオチドを含み得る。配列番号 3 に示される C s g G の相同体の例は、配列番号 68 ~ 88 に示される配列を有する。

【0038】

「修飾 C s g F ペプチド」又は「C s g F ペプチド」という用語は、その C 末端（例えば、N 末端断片である）から切り詰められている、及び／又は切断部位を含むように修飾される C s g F ペプチドを定義する。C s g F ペプチドは、野生型 E . c o l i C s g F（配列番号 5 若しくは配列番号 6）の断片、又は E . c o l i C s g F の野生型相同体、例えば、配列番号 17 ~ 36 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ、又はそれらのいずれかのバリエーション（例えば、切断部位を含むように修飾されたもの）を含むペプチドなどであり得る。

10

【0039】

本発明の全ての態様及び実施形態について、C s g F 相同体は、配列番号 6 に示される野生型 E . c o l i C s g F に対して少なくとも 40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、又は 99 % の完全な配列同一性を有するポリペプチドと称される。いくつかの実施形態では、C s g F 相同体は、C s g F 様タンパク質に特徴的な P F A M ドメイン P F 10614 を含むポリペプチドとも称される。現在知られている C s g F 相同体及び C s g F アーキテクチャのリストは、<http://pfam.xfam.org/family/PF10614> において見出され得る。同様に、C s g F 相同ポリヌクレオチドは、配列番号 4 に示される野生型 E . c o l i C s g F に対して少なくとも 40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、又は 99 % の完全な配列同一性を有するポリヌクレオチドを含み得る。配列番号 6 に示される C s g F の相同体の切り詰められた領域の例は、配列番号 17 ~ 36 に示される配列を有する。

20

【0040】

「C s g F 成熟ペプチドの N 末端部分」という用語は、C s g F 成熟ペプチド（シグナル配列なし）の N 末端から始まる最初の 60、50、又は 40 アミノ酸残基に対応するアミノ酸配列を有するペプチドを指す。C s g F 成熟ペプチドは、野生型又は変異体（例えば、1 つ以上の変異を伴う）であり得る。

【0041】

配列同一性は、完全長ポリヌクレオチド又はポリペプチドの断片又は部分に対するものである場合もある。したがって、配列は、完全長参照配列と全体的に 50 % のみの配列同一性を有し得るが、特定の領域、ドメイン、又はサブユニットの配列は、参照配列と 80 %、90 %、又は 99 % もの配列同一性を共有し得る。それぞれ、C s g G 相同体の配列番号 1 又は C s g F 相同体の配列番号 4 の核酸配列への相同性は、単に配列同一性に限定されない。明らかに低い配列同一性を有するにもかかわらず、多くの核酸配列は、互いに対して生物学的に著しい相同性を示し得る。相同核酸配列は、低ストリンジェンシーの条件下で互いにハイブリダイズするものとみなされる（M . R . Green, J . Sambrook, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）。

30

40

【0042】

「野生型」という用語は、天然に存在する源から単離された遺伝子又は遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団において最も頻繁に観察される遺伝子であり、したがって、遺伝子の任意に設計された「正常」又は「野生型」形態である。対照的に、「修飾された」、「変異体」、又は「バリエーション」という用語は、野生型遺伝子又は遺伝子産物と比較した場合、配列における修飾（例えば、置換、切り詰め、若しくは挿入）、翻訳後修飾、及び／又は機能的特性（例えば、変更された特徴）を呈する遺伝子又は遺伝子産物を指す。天然に存在する変異体を単離することができることに留意されたく、これらは、野生型遺伝子又は遺伝子産物と比較した場合、変更された特徴を有するという事実によって同定される。天然に存在するアミノ酸を導入又は置換するための方法が当該技術分野で周知であ

50

る。例えば、メチオニン（M）は、変異体モノマーをコードするポリヌクレオチド中の関連する位置でメチオニンについてのコドン（A T G）をアルギニンについてのコドン（C G T）で置き換えることにより、アルギニン（R）で置換され得る。天然に存在しないアミノ酸を導入又は置換するための方法も当該技術分野で周知である。例えば、天然に存在しないアミノ酸は、変異体モノマーを発現させるために使用されるI V T T系中に合成アミノアシル- t R N Aを含めることによって導入され得る。代替的に、それらは、特定のアミノ酸の合成（すなわち、天然に存在しない）類似体の存在下で、それらの特定のアミノ酸に対して栄養要求性であるE. coli 中で変異体モノマーを発現させることによって導入され得る。それらは、変異体モノマーが部分的ペプチド合成を使用して産生される場合、裸のライゲーションによって産生される場合もある。保存的置換は、アミノ酸を、類似の化学構造、類似の化学的特性、又は類似の側鎖体積の他のアミノ酸で置き換える。導入されるアミノ酸は、それらが置き換えるアミノ酸と類似の極性、親水性、疎水性、塩基性、酸性、中性、又は荷電性を有し得る。代替的に、保存的置換は、既存の芳香族又は脂肪族アミノ酸の代わりに芳香族又は脂肪族である別のアミノ酸を導入し得る。保存的アミノ酸変化は、当該技術分野で周知であり、以下の表1に定義される20個の主なアミノ酸の特性に従って選択され得る。アミノ酸が類似の極性を有する場合、これはまた、表2におけるアミノ酸側鎖についての疎水性スケールを参照して決定され得る。

表1 - アミノ酸の化学的特性

【表1】

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

表2 - 疎水性スケール

10

20

30

40

50

【表 2】

側鎖	疎水性
Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

10

20

【0043】

変異体又は修飾タンパク質、モノマー、又はペプチドはまた、任意の方法及び任意の部位で化学修飾され得る。変異体又は修飾モノマー又はペプチドは、好ましくは、1つ以上のシステインへの分子の結合（システイン連結）、1つ以上のリジンへの分子の結合、1つ以上の非天然アミノ酸への分子の結合、エピトープの酵素修飾、又は末端の修飾によって化学修飾される。かかる修飾を実行するための好適な方法は、当該技術分野で周知である。修飾タンパク質、モノマー、又はペプチドの変異体は、任意の分子の結合によって化学修飾され得る。例えば、修飾タンパク質、モノマー、又はペプチドの変異体は、色素又はフルオロフォアの結合によって化学修飾され得る。いくつかの実施形態では、変異体又は修飾モノマー又はペプチドは、モノマー又はペプチドを含む細孔と、標的ヌクレオチド又は標的ポリヌクレオチド配列との間の相互作用を容易にする分子アダプタで化学修飾される。分子アダプタは、好ましくは、環状分子、シクロデキストリン、ハイブリダイゼーションすることができる種、DNA結合剤若しくはインターキレート剤、ペプチド若しくはペプチド類似体、合成ポリマー、芳香族平面分子、小さい正に荷電した分子、又は水素結合することができる小分子である。

30

【0044】

アダプタの存在は、細孔及びヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列の宿主－ゲスト化学を改善し、それによって、変異体モノマーから形成された細孔の配列決定能力を改善する。宿主－ゲスト化学の原理は、当該技術分野で周知である。アダプタは、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列とのその相互作用を改善する、細孔の物理的又は化学的特性に影響を及ぼす。アダプタは、細孔のバレル若しくはチャンネルの電荷を変更し得るか、又はヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド配列と特異的に相互作用し得るか若しくは結合し得、それによって、細孔とのその相互作用を促進する。したがって、本開示に提供される修飾C s g Fペプチドは、タンパク質又は酵素の細孔へのより良好な近接性を提供する該酵素又はタンパク質にカップリングされ得、これは、修飾C s g Fペプチドを含む細孔複合体の特定の用途を容易にし得る。

40

50

【0045】

本文脈において、タンパク質はまた、例えば、組換えDNA技術によって作製された遺伝子融合を特に指す融合タンパク質であり得る。タンパク質はまた、本明細書で使用されるように、コンジュゲート、又は「にコンジュゲート」することができ、これは、特に、安定した共有結合をもたらす化学的及び／又は酵素的コンジュゲーションを指す。

【0046】

いくつかのポリペプチド又はタンパク質モノマーが互いに結合又は相互作用する場合、タンパク質は、タンパク質複合体を形成する可能性がある。「結合する」とは、直接的又は間接的を問わず、あらゆる相互作用を意味する。直接的な相互作用は、例えば、共有結合又はカップリングを介した結合パートナー間の接触を暗示する。間接的な相互作用は、相互作用パートナーが3つ以上の化合物の複合体で相互作用する、任意の相互作用を意味する。相互作用は、1つ以上の架橋分子の助けを得て完全に間接的であり得るか、又は部分的に間接的であり得、1つ以上の化合物の追加の相互作用によって安定化される直接接触が、依然としてパートナー間に存在する。本開示で言及される「複合体」は、異なる機能を有する可能性がある2つ以上の関連タンパク質の群として定義される。タンパク質複合体の異なるポリペプチド間の会合は、疎水性若しくはイオン力などの非共有相互作用を介する場合があるか、又はジスルフィド架橋若しくはペプチド結合などの共有結合若しくはカップリングである場合がある。共有「結合」又は「カップリング」は、本明細書では交換可能に使用され、「システインカップリング」又は「反応性若しくは光反応性アミノ酸カップリング」も伴う可能性があり、それぞれ、安定した複合体を形成するための化学共有結合である、システイン間又は（光）反応性アミノ酸間のバイオコンジュゲーションを指す。光反応性アミノ酸の例には、アジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアレルグリシン、p-アセチル-Phe、p-アジド-Phe、p-プロパルギルオキシ-Phe、及びp-ベンゾイル-Pheが含まれる(Wang et al. 2012, in Protein Engineering, DOI: 10.5772/28719, Chin et al. 2002, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99(17); 11020-24)。

【0047】

「生物学的細孔」は、膜の一方の側から他方の側への分子及びイオンの転位を可能にするチャンネル又は穴を定義する膜貫通タンパク質構造である。細孔を通るイオン種の転位は、細孔のいずれかの側に印加される電位差によって駆動され得る。「ナノ細孔」は、分子又はイオンが通過するチャンネルの最小直径が、ナノメートルのオーダー（10～9ナノメートル）である、生物学的細孔である。いくつかの実施形態では、生物学的細孔は、膜貫通タンパク質細孔であり得る。生物学的細孔の膜貫通タンパク質構造は、本質的にモノマー又はオリゴマーであり得る。典型的には、細孔は、中心軸の周りに配置された複数のポリペプチドサブユニットを含み、それによってナノ細孔が存在する膜に実質的に垂直に延在するタンパク質で裏打ちされたチャンネルを形成する。ポリペプチドサブユニットの数は、制限されていない。典型的には、サブユニットの数は、5～30までであり、好適にはサブユニットの数は、6～10である。代替的に、サブユニットの数は、パーフリンゴリジン又は関連する大きい膜細孔の場合のように定義されていない。タンパク質で裏打ちされたチャンネルを形成するナノ細孔内のタンパク質サブユニットの部分は、典型的には、1つ以上の膜貫通β-バレル、及び／又はα-ヘリックス切片を含み得る二次構造モチーフを含む。

【0048】

「細孔」、「細孔複合体」、又は「複合体細孔」という用語は、本明細書で交換可能に使用される場合、オリゴマー細孔を指し、例えば、少なくともCsGGモノマー（例えば、2個以上のCsGGモノマー、3個以上のCsGGモノマーなどの1個以上のCsGGモノマーを含む）又はCsGG細孔（CsGGモノマーで構成される）、及びCsGFペプチド（例えば、修飾又は切り詰め型CsGFペプチド）が、複合体において会合し、一緒に細孔又はナノ細孔を形成する。本開示の細孔複合体は、生物学的細孔の特性を有し、

すなわち、それは典型的な膜貫通タンパク質構造を有する。膜構成要素、膜、細胞、又は絶縁層を有する環境で細孔複合体が提供される場合、細孔複合体は、膜又は絶縁層に挿入され、「膜貫通細孔複合体」を形成する。

【0049】

本開示の細孔、細孔複合体、膜貫通細孔、又は膜貫通細孔複合体は、分析物の特徴評価に適している。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細孔、細孔複合体、膜貫通細孔、又は膜貫通細孔複合体は、例えば、それが高い程度の感度で異なるヌクレオチド間を識別することができるため、ポリヌクレオチド配列を配列決定するために使用され得る。細孔又は細孔複合体は、単離、実質的に単離、精製、又は実質的に精製され得る。細孔又は細孔複合体は、脂質若しくは他の細孔などの任意の他の構成要素、又はそれが通常その非変性状態で会合する他のタンパク質、例えば、C s g E、C s g A C s g Bを完全に含まない場合、あるいは膜コンパートメントから十分に濃縮されている場合、「単離されている」か又は精製されている。細孔又は細孔複合体は、それが、その意図される使用に干渉しない担体又は希釈剤と混合されている場合、実質的に単離されている。例えば、細孔又は細孔複合体は、それが、10%未満、5%未満、2%未満、又は1%未満の他の構成要素、例えばトリブロックコポリマー、脂質、又は他の細孔を含む形態で存在する場合、実質的に単離されているか、又は実質的に精製されている。代替的に、本開示の細孔複合体は、膜内に存在する場合、膜貫通細孔又は膜貫通細孔複合体であり得る。本開示は、その相同体としてのC s g Gモノマーの変異体形態も含有し得る、同一の変異体モノマーを含むC s g Gに由来するホモオリゴマー細孔を含む、単離された細孔及び単離された細孔複合体を提供する。代替的に、ヘテロオリゴマーC s g G細孔を含む、単離された細孔又は単離された細孔複合体が提供され、これは、変異体及び野生型C s g Gモノマー、又は異なる形態のC s g Gバリエーション、変異体若しくは相同体からなるC s g G細孔であり得る。単離された細孔複合体は、典型的には、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は少なくとも10個のC s g Gモノマー、及び1個以上の（修飾）C s g Fペプチド、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個のC s g Fペプチドを含む。細孔複合体は、C s Gモノマー：C s g Fペプチドの任意の比を含み得る。一実施形態では、C s Gモノマー：C s g Fペプチドの比は、1：1である。

【0050】

本明細書で交換可能に使用される「狭窄」、「開口部」、「狭窄領域」、「チャンネル狭窄」、又は「狭窄部位」は、細孔又は細孔複合体の内腔表面によって画定される開口を指し、これは、イオン及び標的分子（例えば、ポリヌクレオチド若しくは個々のヌクレオチドに限定されない）の通過を可能にするように作用するが、細孔又は細孔複合体チャンネルを通る他の非標的分子は通過させない。いくつかの実施形態では、狭窄（複数可）は、細孔又は細孔複体内の最も狭い開口（複数可）である。この実施形態では、狭窄（複数可）は、細孔を通る分子の通過を限定するのに役立つ可能性がある。狭窄のサイズは、典型的には、核酸配列決定アプリケーションに対するナノ細孔の適合性を決定する際の重要な要素である。狭窄が小さすぎる場合、配列決定される分子が通過することができなくなる。しかしながら、チャンネルを通るイオン流に対して最大の効果を達成するには、狭窄が大きすぎないようにする必要がある。例えば、狭窄は、標的分析物の溶媒にアクセス可能な横方向の直径よりも広くないようにする必要がある。理想的には、任意の狭窄は、通過する分析物の横方向の直径にできるだけ近い必要がある。核酸及び核酸塩基の配列決定のために、好適な狭窄直径は、ナノメートルの範囲（10～9メートルの範囲）である。好適には、直径は、0.5～2.0 nmの領域にあるべきであり、典型的には、直径は、0.7～1.2 nmの領域内である。野生型E. coli C s g Gにおける狭窄は、およそ9 Å（0.9 nm）の直径を有する。C s g G様細孔及び修飾C s g Fペプチド、又はその相同体若しくは変異体を含む細孔複合体において形成されるC s g F狭窄は、0.5～2 nmの範囲、又は0.7～1.2 nmの範囲の直径を有し、したがって、核酸配列決定に好適である。

【0051】

2つ以上の狭窄が存在し、間隔を置いて配置されている場合、各狭窄は、同時に核酸鎖内の別々のヌクレオチドと相互作用するか、又はそれらを「読み取る」ことができる。この状況では、チャンネルを通るイオン流の低減は、ヌクレオチドを含む全ての狭窄の流れの制限が組み合わさった結果になる。したがって、場合によっては、二重の狭窄が複合電流シグナルにつながる可能性がある。特定の状況では、1つの狭窄、又は「リーディングヘッド」の電流読み取り値は、かかるリーディングヘッドが2つ存在する場合、個々に決定することができない場合がある。野生型 E. coli CsgG (配列番号3) の狭窄は、隣接するタンパク質モノマーにおける位置 51 (Tyr 51) でのチロシン残基の並置によって形成される2つの環状リング、並びにそれぞれ位置 56 及び 55 でのフェニルアラニン及びアスパラギン残基 (Phe 56 及び Asn 55) で構成される。CsgG の野生型細孔構造は、ほとんどの場合、組換え遺伝子技法を介して再操作され、CsgG 狭窄 (本明細書では「CsgG チャンネル狭窄」と呼ばれる) を構成する2つの環状リングのうちの1つを拡大、変更、又は除去して、明確に定義された単一のリーディングヘッドを残す。CsgG オリゴマー細孔の狭窄モチーフは、配列番号3に示される、野生型モノマー E. coli CsgG ポリペプチドの38~63位のアミノ酸残基に位置している。この領域を考慮すると、アミノ酸残基の50~53位、54~56位、及び58~59位のうちのいずれかでの変異、並びに野生型 CsgG 構造のチャンネル内での Tyr 51、Asn 55、及び Phe 56 の側鎖の位置付けの鍵は、リーディングヘッドの特徴を修飾又は変更するために有利であることが示された。CsgG 細孔及び修飾された CsgF ペプチド、又はその相同体若しくは変異体を含む細孔複合体に関する本開示は、驚くべきことに、CsgG 含有細孔複合体に別の狭窄 (本明細書では「CsgF チャンネル狭窄」と呼ぶ) を添加し、細孔内の好適な追加の第2のリーダーヘッドを、修飾された CsgF ペプチドとの複合体形成を介して形成した。該追加の CsgF チャンネル狭窄又はリーダーヘッドは、CsgG 細孔又は変異した GcsG 細孔の狭窄ループに隣接して位置付けられる。該追加の CsgF チャンネル狭窄又はリーダーヘッドは、CsgG 細孔又は変異した GcsG 細孔の狭窄ループからおおよそ 10 nm 以下、例えば 5 nm 以下、例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9 nm に位置付けられる。本開示の細孔複合体又は膜貫通細孔複合体は、2つのリーダーヘッドを有する細孔複合体、すなわち、他の狭窄チャンネルリーダーヘッドの精度を妨げることなく好適な別個のリーダーヘッドを提供するように位置付けられたチャンネル狭窄を含む。したがって、該細孔複合体は、CsgG 変異体細孔 WO 2016/034591、WO 2017/149316、WO 2017/149317、WO 2019/002893、WO 2017/149318、WO 2018/211241、WO 2019/002893 (本明細書において全て、それらの全体が参照により組み込まれる) これらの各々は細孔の特性を改善する野生型 CsgG 細孔への変異をリストする)、並びに修飾 CsgF ペプチド、又はその相同体若しくは変異体と一緒に野生型 CsgG 細孔、又はその相同体を含み得、該 CsgF ペプチドは、リーダーヘッドを形成する別の狭窄チャンネルを有する。

【0052】

細孔及び細孔複合体

本発明は、単離された CsgG 細孔又はその相同体若しくは変異体、あるいは CsgG 細孔又はその相同体若しくは変異体と、修飾 CsgF ペプチド又はその相同体若しくは変異体と、を含む単離された細孔複合体であって、CsgG 細孔が、配列番号117における位置 W97、Q100、E101、N102、及び T104 のうちの1つ以上に修飾を含む少なくとも1個の変異体 CsgG モノマーを含む、単離された CsgG 細孔又はその相同体若しくは変異体、あるいは単離された細孔複合体を提供する。CsgG 細孔は、配列番号3若しくは117の細孔、又はその相同体若しくは変異体であり得る。少なくとも1個の変異体モノマーは、好ましくは、位置 W97、Q100、E101、N102、及び T104 のうちの1つ以上に修飾を含む、配列番号117のバリエーションを含む。

【0053】

本発明は、単離された CsgG 細孔、又はその相同体若しくは変異体であって、Csg

G細孔が、配列番号117における位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上に修飾を含む少なくとも1個の変異体Cs g Gモノマーを含む、単離されたCs g G細孔、又はその相同体若しくは変異体を提供する。Cs g G細孔は、配列番号3若しくは117の細孔、又はその相同体若しくは変異体であり得る。少なくとも1個の変異体モノマーは、好ましくは、位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上に修飾を含む、配列番号117のバリエーションを含む。

【0054】

本発明は、Cs g G細孔又はその相同体若しくは変異体と、修飾Cs g Fペプチド又はその相同体若しくは変異体と、を含む単離された細孔複合体であって、Cs g G細孔が、配列番号117における位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上に修飾を含む少なくとも1個の変異体Cs g Gモノマーを含む、単離された細孔複合体を提供する。Cs g G細孔は、配列番号3若しくは117の細孔、又はその相同体若しくは変異体であり得る。少なくとも1個の変異体モノマーは、好ましくは、位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上に修飾を含む、配列番号117のバリエーションを含む。

10

【0055】

少なくとも1個の変異体モノマー又はバリエーションは、配列番号117における位置(a) W97、(b) Q100、(c) E101、(d) N102、及び(e) T104のうちの1つ以上に修飾の任意の数及び組み合わせを含み得る。例えば、少なくとも1個の変異体モノマーは、(a)；(b)；(c)；(d)；(e)；(a)及び(b)；(a)及び(c)；(a)及び(d)；(a)及び(e)；(b)及び(c)；(b)及び(d)；(b)及び(e)；(c)及び(d)；(c)及び(e)；(d)及び(e)；(a)、(b)及び(c)；(a)、(b)及び(d)；(a)、(b)及び(e)；(a)、(c)及び(d)；(a)、(c)及び(e)；(a)、(d)及び(e)；(b)、(c)及び(d)；(b)、(c)及び(e)；(b)、(d)及び(e)；(c)、(d)及び(e)；(a)、(b)、(c)及び(d)；(a)、(b)、(c)及び(e)；(a)、(b)、(d)及び(e)；(a)、(c)、(d)及び(e)；(b)、(c)、(d)及び(e)；並びに(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)での修飾を含み得る。少なくとも1個の変異体モノマー又はバリエーションは、好ましくは、上記で並べる(a)～(d)の全ての組み合わせを含む、配列番号117における1つ以上の位置(a) W97、(b) Q100、(c) E101、及び(d) N102に修飾を含む。

20

30

【0056】

配列番号117における位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上での修飾は、以下でより詳細に考察される修飾のいずれかであり得る。修飾は、E101の欠失などの欠失であり得る。E101の欠失は、細孔を通る移動速度を増加させる(実施例1)。修飾は、好ましくは置換である。

【0057】

位置97でのWは、好ましくは、R、H、K、A、V、I、L、M、F、Y、S、T、Q、D、E、N、C、P、又はGで置換されている。位置97でのWは、より好ましくは、D、G、N、R、又はSで置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させる(実施例1)。位置97でのWは、より好ましくは、D又はRで置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を増加させる(実施例1)。位置97でのWは、より好ましくは、G、N、又はSで置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を減少させる(実施例1)。

40

【0058】

位置100でのQは、好ましくは、R、H、K、W、A、V、I、L、M、F、Y、T、N、又はSで置換されている。位置100でのQは、より好ましくは、A、K、又はSで置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通

50

過する速度を増加させる（実施例 1）。位置 100 での Q は、より好ましくは、K（Q100K）で置換されている。この置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を増加させる（実施例 1）。位置 100 での Q は、より好ましくは、A 又は S（Q100A 又は Q100S）で置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を減少させる（実施例 1）。位置 100 での Q は、最も好ましくは、A（Q100A）で置換されている。この置換はまた、本発明の修飾 Dda ヘリカーゼとともに使用される場合、実施例 4 に示される効果を有する。

【0059】

位置 101 での E は、好ましくは、A、V、I、L、M、F、Y、又は W で置換されている。位置 101 での E は、より好ましくは、A（E101A）で置換されている。この置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を減少させ、正規化された速度分布を減少させる（実施例 1）。

【0060】

位置 101 での E は、好ましくは、S、T、N、Q、C、G、又は P で置換されている。位置 101 での E は、より好ましくは、G 又は S で置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させる（実施例 1）。位置 101 での E は、より好ましくは、G（E101G）で置換されている。この置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を減少させる（実施例 1）。位置 101 での E は、より好ましくは、S（E101S）で置換されている。この置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を増加させる（実施例 1）。

【0061】

位置 102 での N は、好ましくは、D、E、R、H、K、S、T、Q、V、I、L、M、F、Y、W、又は A で置換されている。位置 102 での N は、より好ましくは、A、D、R、S、又は W で置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させる（実施例 1）。位置 102 での N は、好ましくは、A、R、又は S で置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を減少させる（実施例 1）。位置 102 での N は、好ましくは、D 又は W（N102D 又は N102W）で置換されている。これらの置換は、分析物が細孔を通過する／細孔に対して相対的に通過する速度を増加させ、正規化された速度分布を増加させる（実施例 1）。位置 102 での N は、最も好ましくは、A 又は S（N102A 又は N102S）で置換されている。これらの置換はまた、本発明の修飾 Dda ヘリカーゼとともに使用される場合、実施例 4 に示される効果を有する。

【0062】

位置 104 での T は、好ましくは、R、H、又は K で置換されている。

【0063】

以下でより詳細に説明されるように、細孔は、好ましくは、6～10 個のモノマーを含む。これらのうちの任意の数、例えば、6、7、8、9、又は 10 は、配列番号 117 における位置 W97、Q100、E101、N102、及び T104 のうちの 1 つ以上に修飾を含む変異体モノマーであり得るか、又は位置 W97、Q100、E101、N102、及び T104 のうちの 1 つ以上に修飾を含む配列番号 117 のバリエーションを含み得る。6～10 個のモノマーは全て、配列番号 117 における位置 W97、Q100、E101、N102、及び T104 のうちの 1 つ以上に修飾を含み得るか、又は位置 W97、Q100、E101、N102、及び T104 のうちの 1 つ以上に修飾を含む配列番号 117 のバリエーションを含み得る。

【0064】

変異体 CsgG モノマーは、その配列が野生型 CsgG モノマーのものとは異なり、細孔を形成する能力を保持するモノマーである。変異体モノマーは、本明細書ではバリエー

トとも称され得る。変異体モノマーが細孔を形成する能力を確認するための方法は、当該技術分野で周知であり、以下でより詳細に考察される。少なくとも1個の変異体モノマー又はバリエーションは、以下に並べる配列番号117又は配列番号3に対する相同性／配列同一性の%のいずれかを有し得る。少なくとも1個の変異体モノマーは、本発明のDdaヘリカーゼに関して記載される修飾及び置換の種類を含む、以下に記載される追加の修飾、変異、又は置換のいずれかを含有し得る。少なくとも1個の変異体モノマーは、WO2016/034591、WO2017/149316、WO2017/149317、及びWO2017/149318、WO2018/211241、及びWO2019/002893（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される追加の修飾、変異、又は置換のいずれかを含有し得る。

10

【0065】

本発明は、驚くべきことに、細孔複合体に追加のチャンネル狭窄又はリーダーヘッドを導入する、任意選択的に、細胞外に位置したCsGFペプチドと複合体化されたCsGG細孔に関する。更に、本開示は、細孔複体内のCsGFペプチドによって行われる狭窄のための位置情報を提供し、ペプチドは、CsGG細孔の内腔に挿入され、狭窄部位は、CsGFタンパク質のN末端部分にある。更に、本開示の修飾又は切り詰め型CsGFペプチドは、細孔複合体形成に十分であることが示され、バイオセンシング用途のための手段及び方法を提供する。本開示は、任意選択的に、修飾又は切り詰め型CsGFペプチド及びその変異体又は相同体と組み合わせた、野生型及び変異体CsGG細孔（例えば、WO2016/034591、WO2017/149316、WO2017/149317、WO2017/149318、及び国際特許出願第PCT/GB2018/051191号に開示される）、又はその相同体若しくは変異体を含み、これら全てと一緒に、CsGG細孔又はCsGG様細孔複合体がポリヌクレオチドなどの分析物と相互作用する能力を改善する。（修飾又は切り詰め型）CsGFペプチドとの複合体形成によってCsGG様ナノ細孔チャンネルに導入された追加の狭窄は、通過する分析物との接触表面を拡大し、分析物の検出及び特徴評価のための第2のリーダーヘッドとして作用し得る。新規の変異体又は修飾形態のCsGFを組み合わせた変異体CsGGモノマーを含む細孔は、ポリヌクレオチドなどの分析物の特徴評価を改善することができ、ポリヌクレオチドが細孔を通過して移動する際に観察される電流間のより識別力のある直接関係を提供する。特に、定義された距離で間隔を置いて配置された2つの積み重ねられたリーダーヘッドを有することにより、CsGG：CsGF細孔複合体は、少なくとも1つのホモポリマーストレッチ、例えば、そうでなければ単一のCsGリーダーヘッドの相互作用長を超える同じヌクレオチドのいくつかの連続したコピーを含有するポリヌクレオチドの特徴評価を容易にし得る。追加的に、定義された距離に2つの積み重ねられた狭窄を有することによって、CsGG：CsGF複合体細孔を通過する有機又は無機の薬物及び汚染物質を含む小分子分析物は、2つの独立したリーダーヘッドを連続して通過する。いずれかのリーダーヘッドの化学的性質を独立して修飾することができ、各々が分析物との固有の相互作用特性を与えるため、分析物の検出中に追加の識別力を提供する。

20

30

【0066】

本発明は、CsGG細孔、又はその相同体若しくは変異体、あるいはCsGG様細孔及び修飾CsGFペプチド、又はその相同体若しくは変異体を含む単離された細孔複合体に関する。実際、本開示は、その切り詰め型、変異体、及び／又はバリエーションであり得る修飾CsGFペプチドを含む修飾CsGG生物学的細孔に関する。一実施形態では、該修飾CsGFペプチド又はその相同体若しくは変異体の間の相互作用領域は、CsGG細孔又はその相同体若しくは変異体の内腔に位置している。別の実施形態では、細孔複合体は、CsGG細孔の少なくとも1つの狭窄によって、及びCsGFペプチドによって導入され、CsGG細孔と複合体を形成する少なくとも1つによって提供される、2つ以上の狭窄部位又はリーダーヘッドを有する。配列番号5のアミノ酸残基39～64、又はより具体的には配列番号5のアミノ酸残基49～64の範囲の位置を含むN末端CsGF位置は、検出可能な量の安定なCsGG：CsGF複合体を可能にすることが示された。一実施形

40

50

態では、修飾 C s g F ペプチド（例えば、本明細書に記載されるもの）によって產生された C s g F 狭窄は、細孔複合体の C s g G 細孔内の第 1 の狭窄に隣接するか、又は対向する。C s g G 又は C s g G 様タンパク質細孔について、狭窄部位は、ベータ鎖のループ領域によって形成されることが決定されている。

【0067】

一実施形態では、修飾された C s g F ペプチドは、該修飾が、特に狭窄領域を含み、C s g G モノマー、又はその相同体若しくは変異体に結合するという制限によって定義される N 末端 C s g F ペプチド断片を含む、切り詰め型 C s g F タンパク質又は断片を指すペプチドである。該修飾された C s g F ペプチドは、追加的に、細孔複合体の特定の特性を促進し得る変異又は相同配列を含み得る。特定の実施形態では、修飾された C s g F ペプチドは、野生型プレタンパク質（配列番号 5）若しくは成熟タンパク質（配列番号 6）配列、又はそれらの相同体と比較して、C s g F タンパク質の切り詰めを含む。これらの修飾ペプチドは、C s g G 及び修飾された又は切り詰め型 C s g F ペプチドによって形成された C s g G 様細孔内に、追加の狭窄部位又はリーダーヘッドを導入する細孔複合体構成要素として機能することを意図する。切り詰め型修飾ペプチドの例を以下に記載する。

【0068】

修飾 C s g F ペプチドの相同体の例は、W O 2 0 1 9 / 0 0 2 8 9 3（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示され、異なる細菌株における相同又は類似の狭窄領域を含む C s g F 様タンパク質又は C s g F ペプチドが明らかにされ、これは類似の細孔複合体の使用に有用であり得る。様々な C s g F 相同体に由来する C s g F ペプチドにおける構造特性及び C s g G 結合要素は、C s g F ペプチドが異なる野生型又は変異体 C s g G 細孔と組み合わせて使用され得るように保存される。これには、非同族の C s g F との C s g G 細孔の複合体が含まれ、これは、C s g F が由来する C s g G 細孔及び親 C s g F 相同体が、同じオペロン、細菌種、又は株に起源を持つ必要がないことを意味する。

【0069】

代替の実施形態では、細孔複体内の C s g G 細孔は、野生型細孔ではないが、細孔特性を増加させるための変異又は修飾も含む。C s g G 細孔又はその相同体、及び修飾 C s g F ペプチド又はその相同体によって形成される本開示の単離された細孔複合体は、C s g G 細孔の野生型形態によって形成され得るか、又は細孔複体内で使用するための C s g G 細孔の所望の特性を更に増強するために、特定のアミノ酸残基の指向性変異誘発などによって C s g G 細孔内で更に修飾され得る。例えば、本発明の実施形態では、変異は、チャンネル内の狭窄の数、サイズ、形状、配置、又は配向を変更することが企図される。修飾された変異体 C s g G 細孔を含む細孔複合体は、ポリペプチド配列における特定の標的化アミノ酸残基の挿入、置換、及び／又は欠失をもたらす既知の遺伝子工学技法によって調製され得る。オリゴマー C s g G 細孔の場合、変異は、各モノマーポリペプチドサブユニット、又はモノマーのうちのいずれか 1 つ、又はモノマーの全てで行われ得る。好適には、本発明の一実施形態では、記載された変異は、オリゴマータンパク質構造内の全てのモノマーポリペプチドに対して行われる。変異体 C s g G モノマーは、その配列が野生型 C s g G モノマーのものとは異なり、細孔を形成する能力を保持するモノマーである。変異体モノマーが細孔を形成する能力を確認するための方法は、当該技術分野で周知である。本開示は、修飾又は切り詰め型 C s g F ペプチド及びそれらの変異体又は相同体と組み合わせた、野生型及び変異体 C s g G 細孔（例えば、W O 2 0 1 6 / 0 3 4 5 9 1、W O 2 0 1 7 / 1 4 9 3 1 6、W O 2 0 1 7 / 1 4 9 3 1 7、W O 2 0 1 7 / 1 4 9 3 1 8、及び国際特許出願第 P C T / G B 2 0 1 8 / 0 5 1 1 9 1 号に開示される）、又はその相同体を含み、これら全てが一緒に、C s g G 様細孔複合体がポリヌクレオチドなどの分析物と相互作用する能力を改善する。変異体 C s g G 細孔は、1 個以上の変異体モノマーを含み得る。C s g G 細孔は、同一のモノマーを含むホモポリマー、又は 2 個以上の異なるモノマーを含むヘテロポリマーであり得る。モノマーは、任意の組み合わせで以下に記載される変異のうちの 1 つ以上を有し得る。

【0070】

特定の実施形態では、修飾 C s g F ペプチドが、野生型 C s g F タンパク質の N 末端断片又は切り詰めのみを含むため、修飾 C s g F ペプチドを含むナノ細孔複合体は、配列番号 6 に示される野生型 C s g F タンパク質と比較して異なる。しかしながら、修飾 C s g F ペプチドは、アミノ酸置換としての変異が、C s g G 細孔及び修飾 C s g F ペプチドを含む複合体によって形成された細孔内のより良好な第 2 の狭窄部位を可能にするように行われるという意味で、追加的又は代替的に変異した C s g F ペプチドであり得る。このように、変異体モノマーは、該複合体がヌクレオチド配列決定において使用される場合、改善されたポリヌクレオチド読み取り特性を有し、すなわち、2つのリーダーヘッドを含む複合体の改善された特徴に加えて、改善されたポリヌクレオチド捕捉及びヌクレオチド識別を呈する可能性がある。特に、変異体ペプチドから構築された細孔は、野生型よりも容易にヌクレオチド及びポリヌクレオチドを捕捉する。加えて、変異体ペプチドから構築された細孔は、異なるヌクレオチド間の識別をより容易にする電流範囲の増加、シグナル対ノイズ比を増加させる状態の変動の低減を呈し得る。加えて、ポリヌクレオチドが変異体から構築された細孔を通して移動する際に、電流に寄与するヌクレオチドの数は減少し得る。これは、ポリヌクレオチドが細孔を通して移動するにつれて観察された電流と、ポリヌクレオチド配列との間の直接的な関係性を同定することを容易にする。加えて、変異体ペプチドから構築された細孔は、増加したスループットを呈し得、例えば、ポリヌクレオチドなどの分析物と相互作用する可能性がより高い。これは、細孔を使用して分析物を特徴評価することをより容易にする。変異体ペプチドから構築された細孔は、膜により容易に挿入され得るか、又は細孔複合体のごく近傍に追加のタンパク質を保持するためのより容易な方法を提供し得る。

10

20

【0071】

代替の実施形態では、本発明の細孔複合体に提供される C s g F 狭窄部位は、0.5 nm ~ 2.0 nm の範囲の直径を有し、それによって、上記のように核酸配列決定に好適な細孔複合体を提供する。

【0072】

細孔は、C s g F ペプチドの C s g G 細孔への共有結合によって安定化され得る。共有結合は、例えば、ジスルフィド結合、又はクリックケミストリーであり得る。C s g F ペプチド及び C s g G 細孔は、例えば、それぞれ配列番号 6 及び配列番号 3 又は配列番号 1 1 7 の以下の位置の対：1 及び 1 5 3、4 及び 1 3 3、5 及び 1 3 6、8 及び 1 8 7、8 及び 2 0 3、9 及び 2 0 3、1 1 及び 1 4 2、1 1 及び 2 0 1、1 2 及び 1 4 9、1 2 及び 2 0 3、2 6 及び 1 9 1、並びに 2 9 及び 1 4 4 のうちの 1 つ以上に対応する位置での残基を介して共有結合され得る。

30

【0073】

細孔において、C s g F ペプチドと C s g G 細孔との間の相互作用は、例えば、それぞれ配列番号 6 及び配列番号 3 又は配列番号 1 1 7 の以下の位置の対：1 及び 1 5 3、4 及び 1 3 3、5 及び 1 3 6、8 及び 1 8 7、8 及び 2 0 3、9 及び 2 0 3、1 1 及び 1 4 2、1 1 及び 2 0 1、1 2 及び 1 4 9、1 2 及び 2 0 3、2 6 及び 1 9 1、並びに 2 9 及び 1 4 4 のうちの 1 つ以上に対応する位置での疎水性相互作用又は静電的相互作用によって安定化され得る。

40

【0074】

上にリストされている位置のうちの 1 つ以上での C s g F 及び／又は C s g G の残基は、細孔における C s g G と C s g F との間の相互作用を増強するために修飾され得る。

【0075】

一実施形態では、本発明の細孔は、単離、実質的に単離、精製、又は実質的に精製され得る。本発明の細孔は、それが脂質又は他の細孔などの任意の他の構成要素を一切含まない場合、単離又は精製されている。細孔は、それが、その意図される使用に干渉しない担体又は希釈剤と混合されている場合、実質的に単離されている。例えば、細孔は、それが、10%未満、5%未満、2%未満、又は1%未満の他の構成要素、例えばトリブロック

50

コポリマー、脂質、又は他の細孔を含む形態で存在する場合、実質的に単離されているか、又は実質的に精製されている。代替的に、本発明の細孔は、膜に存在し得る。好適な膜は、以下に考察される。

【0076】

本発明の細孔は、個々の又は単一の細孔として存在し得る。代替的に、本発明の細孔は、2つ以上の細孔の相同又は異種の集団に存在し得る。

【0077】

C s g F ペプチド

本発明の単離された細孔複合体は、修飾 C s g F モノマー（ペプチド）若しくは切り詰め型 C s g F タンパク質、又は C s g F 相同体若しくは変異体の修飾若しくは切り詰め型ペプチドを含む。これらの新規の修飾 C s g F ペプチドは、第2のリーダーヘッド又は追加のリーダーヘッドを統合するために細孔複合体に使用され得る。該修飾又は切り詰めは、好ましくは、野生型 C s g F、又は変異体若しくは相同体 C s g F タンパク質の断片、より好ましくは N 末端断片をもたらす。配列番号5の修飾 C s g F ペプチド、又はその相同体若しくは変異体は、WO2016/034591、WO2017/149316、WO2017/149317、WO2017/149318、WO2018/211241、及びWO2019/002893（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるもののいずれかであり得る。

【0078】

本発明の一部を形成する C s g F ペプチドは、C 末端ヘッドを欠いているか、C s g F の C 末端ヘッド及びネックドメインの一部を欠いている（例えば、切り詰め型 C s g F ペプチドは、C s g F のネックドメインの一部分のみを含み得る）か、又は C s g F の C 末端ヘッド及びネックドメインを欠いている、切り詰め型 C s g F ペプチドである。C s g F ペプチドは、C s g F ネックドメインの一部を欠いている可能性があり、例えば C s g F ペプチドは、例えば、ネックドメインの N 末端におけるアミノ酸残基36からのネックドメインの一部を含み得る（配列番号6を参照）（例えば、配列番号6の残基36～40、36～41、36～42、36～43、36～45、36～46、残基36～50、又は36～60まで）。C s g F ペプチドは、好ましくは、C s g G 結合領域及び細孔内に狭窄を形成する領域を含む。C s g G 結合領域は、典型的には、C s g F タンパク質（配列番号6若しくは別の種からの相同体）の残基1～8及び／又は29～32を含み、1つ以上の修飾を含み得る。細孔内に狭窄を形成する領域は、典型的には、C s g F タンパク質の残基9～28（配列番号6又は別の種からの相同体）を含み、1つ以上の修飾を含み得る。残基9～17は、保存されたモチーフ N 9 P X F G G X X X 17 を含み、ターン領域を形成する。残基9～28は、アルファヘリックスを形成する。X 17（配列番号6における N 17）は、細孔内の C s g F 狭窄の最も狭い部分に対応する狭窄領域の頂点を形成する。C s g F 狭窄領域はまた、主に配列番号6の残基9、11、12、18、21、及び22で、C s g G ベーターバレルとの安定化接触を行う。

【0079】

C s g F ペプチドは、典型的には、28～50アミノ酸、例えば29～49、30～45、又は32～40アミノ酸の長さを有する。好ましくは、C s g F ペプチドは、29～35アミノ酸、又は29～45アミノ酸を含む。C s g F ペプチドは、配列番号6の残基1～35に対応する F C P の全て又は一部を含む。C s g F ペプチドが F C P よりも短い場合、切り詰めは、好ましくは C 末端で行われる。

【0080】

配列番号6又はその相同体若しくは変異体の C s g F 断片は、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、又は55アミノ酸の長さを有し得る。

【0081】

C s g F ペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列を残基1から残基25～60のうちの

いずれか1つまで、例えば27～50、例えば、配列番号6の28～45、又は配列番号6の相同体からの対応する残基若しくはそのいずれかのバリエーションを含み得る。より具体的には、Cs g Fペプチドは、配列番号39（配列番号6の残基1～29）、又はその相同体若しくはバリエーションを含み得る。

【0082】

かかるCs g Fペプチドの例は、配列番号15（配列番号6の残基1～34）、配列番号54（配列番号6の残基1～30）、配列番号40（配列番号6の残基1～45）、又は配列番号55（配列番号6の残基1～35）、及びそれらのいずれかの相同体又はバリエーションを含む、それらから本質的になる、又はそれらからなる。Cs g Fペプチドの他の例は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号16を含む、それらから本質的になる、又はそれらからなる。

10

【0083】

Cs g Fペプチドでは、例えば、配列番号15、配列番号39、配列番号40、配列番号54、又は配列番号55における1つ以上の残基が修飾され得る。

【0084】

例えば、Cs g Fペプチドは、配列番号6における以下の位置のうちの1つ以上に対応する位置に修飾を含み得る。G1、T4、F5、R8、N9、N11、F12、A26、及びQ29。

【0085】

Cs g Fペプチドは、例えば、配列番号6における以下の位置のうちの1つ以上に対応する位置に、システイン、疎水性アミノ酸、荷電アミノ酸、非変性反応性アミノ酸、又は光反応性アミノ酸を導入するように修飾され得る。G1、T4、F5、R8、N9、N11、F12、A26、及びQ29。

20

【0086】

例えば、Cs g Fペプチドは、配列番号6における以下の位置のうちの1つ以上に対応する位置に修飾を含み得る。N15、N17、A20、N24、及びA28。Cs g Fペプチドは、Cs g G-Cs g F複合体を安定化するために、D34に対応する位置に修飾を含み得る。特定の実施形態では、Cs g Fペプチドは、以下の置換のうちの1つ以上を含む。N15S/A/T/Q/G/L/V/I/F/Y/W/R/K/D/C、N17S/A/T/Q/G/L/V/I/F/Y/W/R/K/D/C、A20S/T/Q/N/G/L/V/I/F/Y/W/R/K/D/C、N24S/T/Q/A/G/L/V/I/F/Y/W/R/K/D/C、A28S/T/Q/N/G/L/V/I/F/Y/W/R/K/D/C、及びD34F/Y/W/R/K/N/Q/C。Cs g Fペプチドは、例えば、以下の置換のうちの1つ以上を含み得る。G1C、T4C、N17S、及びD34Y又はD34N。

30

【0087】

Cs g Fペプチドは、酵素を使用して、完全長Cs g Fなどのより長いタンパク質を切断することによって産生され得る。特定の部位での切断は、完全長Cs g Fなどのより長いタンパク質を修飾して、適切な位置に酵素切断部位を含むことによって指向され得る。かかる酵素切断部位を含むように修飾されているCs g Fアミノ酸配列の例は、配列番号56～67に示される。切断後、付加した酵素切断部位の全て又は一部は、Cs g Gと会合して細孔を形成するCs g Fペプチドに存在し得る。したがって、Cs g Fペプチドは、そのC末端に酵素切断部位の全て又は一部を更に含み得る。

40

【0088】

好適なCs g Fペプチドのいくつかの例が以下の表3に示される。

表3：Cs g Fペプチド

【表 3】

技術的な説明	タンパク質配列	配列番号
CsgF-(1-45)	GTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQNSYKDPSY NDDFGIET	40
CsgF-(1-29)	GTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQ	39
CsgF-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQNSYKDP	55
CsgF-G1C-(1-45)	CTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQNSYKDPSY ND DFGIET	89
CsgF-G1C-(1-30)	CTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQ	90
CsgF-G1C-(1-35)	CTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQNSYKDP	91
CsgF-N17S-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKDP	92
CsgF-G1C/D34Y-(1-35)	CTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQNSYKYP	93
CsgF-N17S-(1-45)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKDPSYN D DFGIET	94
CsgF-G1C/N17S/D34Y-(1-35)	CTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKYP	95
CsgF-G1C-(1-30)-H10	CTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQH H H H H H H H H H H	96
CsgF-G1C-(1-35)-H10	CTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLNSAQAQNSYKD P H H H H H H H H H H	97
CsgF-N17S/D34Y-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKYP	98
CsgF-N17S/D34N-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKNP	99
CsgF-T4C/N17S-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKDP	100
CsgF-T4C/N17S/D34Y-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKYP	101
CsgF-T4C/N17S/D34N-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKNP	102
CsgF-G1C/T4C/N17S-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKDP	103
CsgF-G1C/T4C/N17S/D34N- (1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKNP	104
CsgF-G1C/T4C/N17S/D34Y- (1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQNSYKYP	105
CsgF-N17V-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPVNGAFLNSAQAQNSYKDP	106
CsgF-N17A-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPANGAFLNSAQAQNSYKDP	107
CsgF-N17F-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPFNGAFLNSAQAQNSYKDP	108
CsgF-N17S-(1-30)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGAFLNSAQAQ	109
CsgF-N17V-(1-30)	GTMTFQFRNP NFGGNPVNGAFLNSAQAQ	110
CsgF-N17A-(1-30)	GTMTFQFRNP NFGGNPANGAFLNSAQAQ	111
CsgF-N17F-(1-30)	GTMTFQFRNP NFGGNPFNGAFLNSAQAQ	112
CsgF-N17V/D34Y-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPVNGAFLNSAQAQNSYKYP	113
CsgF-N17A/D34Y-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPANGAFLNSAQAQNSYKYP	114
CsgF-N17F/D34Y-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPFNGAFLNSAQAQNSYKYP	115
CsgF-N17S/A20Q-(1-35)	GTMTFQFRNP NFGGNPSNGQFLNSAQAQNSYKDP	116

【0089】

特定の実施形態では、該 C s g F 断片は、アミノ酸配列の配列番号 39、又はその変異体若しくは相同体を含む。特に、配列番号 39 は、成熟 C s g F ペプチド（配列番号 6）の最初の 29 個のアミノ酸を含む。別の実施形態では、本発明の修飾 C s g F ペプチドは、配列番号 40 を含む切り詰め型ペプチドである。特に、配列番号 40 は、成熟 C s g F ペプチド（配列番号 6）の最初の 45 個のアミノ酸を含む。特に、C s g F 狭窄部位及び C s g G への結合部位は、N 末端 C s g F ペプチド領域内に位置しており、配列番号 5 のアミノ酸 39～64（配列番号 39 及び配列番号 40 に存在する）、又は特に配列番号 5 のアミノ酸 49～64（配列番号 40 に存在するが、配列番号 39 には存在せず、配列番

号39によってコードされる後者の断片は、C s g Gとのより弱い相互作用を示す（実施例を参照のこと）は、複合体により高い安定性を付与することを更に特徴とする。したがって、本開示は、インビボでC s g G細孔又はその相同体若しくは変異体と複合体形成を可能にするために、タンパク質を該N末端断片又は狭窄部位領域を含む該ペプチド又はペプチドに切り詰めることによって、C s g Fタンパク質の修飾を提供する。配列番号37又は配列番号38を含む修飾C s g Fペプチドに関する一実施形態では、更なる限定が提供される。最後に、特に狭窄領域（F C Pペプチド）内でアラインメントされたC s g F相同ペプチドの同定は、該単離された複合体の一部を形成し得る修飾C s g Fペプチド相同体も提供する。

【0090】

更なる実施形態は、配列番号15を含む修飾又は切り詰め型C s g Fペプチドに関し、該配列番号15は、C s g Fチャネル狭窄を含む単離された細孔複合体をもたらすための、C s g G又はその相同体、及び修飾C s g Fペプチドを含む複合体細孔のインビトロ再構成に十分な、C s g G結合部位及び／又は狭窄部位の領域からのいくつかの残基を含むC s g Fタンパク質の領域を含有する。別の実施形態は、C s g Fタンパク質のN末端断片を含有する配列番号16、及び（合成）ペプチドの溶解性及び安定性を増加させる2つの追加のアミノ酸（K D）を含む、該修飾C s g Fペプチドを記載し、同様に、該複合体細孔のインビトロ再構成を可能にする。該修飾C s g Fペプチドが、配列番号15、配列番号16、又はその相同体若しくは変異体を含み、該修飾C s g Fペプチドが、更に変異されるが、該配列番号15又は16に対応する修飾C s g Fペプチドの領域内で、それぞれ配列番号15又は配列番号16に対して最小限の35%のアミノ酸同一性、例えば、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%のアミノ酸同一性を依然として保持する、更なる実施形態が提供される。該修飾C s g Fペプチドが、配列番号15、配列番号16、又はその相同体若しくは変異体を含み、該修飾C s g Fペプチドが、更に変異されるが、該配列番号15又は16に対応する修飾C s g Fペプチドの領域内で、それぞれ配列番号15又は配列番号16に対して最小限の40%、45%、50%、60%、70%、80%、85%、又は90%のアミノ酸同一性を依然として保持する、更なる実施形態が提供される。これらの変異した領域は、上で考察されるように、C s g F狭窄部位の特徴を変更及び／又は改善することを意図しているため、例えば、より正確な標的分析を得ることができる。別の実施形態は、修飾C s g Fペプチドを開示し、配列番号39、配列番号40、配列番号54、又は配列番号55を含む領域内の1つ以上の位置が、修飾され、該変異（複数可）が、配列番号39、配列番号40、配列番号54、又は配列番号55を含む領域に対応するペプチド断片における配列番号39、配列番号40、配列番号54、又は配列番号55に対して最小限の35%のアミノ酸同一性、又は40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%のアミノ酸同一性を保持する。

【0091】

追加の実施形態は、単離された細孔複合体に関し、少なくとも1個のモノマーを介する該C s g G細孔、及び修飾C s g Fペプチドは、共有結合を介してカップリングされる。該共有結合又は結合は、1つの例では、システイン連結を介して可能であり、システインのスルフヒドリル側基は、別のアミノ酸残基又は部分と共有結合する。第2の可能性では、共有結合は、非変性（光）反応性アミノ酸間の相互作用を介して得られる。（光）反応性アミノ酸は、タンパク質複合体の架橋に使用できる天然アミノ酸の人工類似体を指し、インビボ又はインビトロでタンパク質及びペプチドに組み込むことができる。一般的に使用されている光反応性アミノ酸類似体は、ロイシン及びメチオニンに対する光反応性ジアジリン類似体、並びにパラベンゾイル-フェニル-アラニン、並びにアジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアレルグリシン、p-アセチル-Phe、p-アジド-Phe、p-プロパルギルオキシ-Phe、及びp-ベンゾイル-Pheである（Wang et al., 2012, Chin et al., 2002）。紫外線に曝されると、それらは活性化され、光反応性アミノ酸類似体の数オングストローム以内にある相互作用するタンパク質に共有結合する。しかしながら、該共有結合が生じ得るC s g Gモノ

マーにおける位置は、修飾 C s g F ペプチドへの曝露に依存する。いくつかのアミノ酸は、共有結合を提供するための位置、すなわち、配列番号 3 若しくは配列番号 1 1 7 の位置 1 3 2、1 3 3、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、1 4 4、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 8 3、1 8 5、1 8 7、1 8 9、1 9 1、2 0 1、2 0 3、2 0 5、2 0 7、若しくは 2 0 9、又はその相同体における。

【0092】

本発明の別の態様は、該修飾 C s g F ペプチドを含む構築物に関し、該ペプチドは共有結合している。「構築物」は、修飾 C s g F 及び／又は C s g G に由来する 2 個以上の共有結合したモノマー、又はその相同体を含む。言い換えれば、構築物は、1 個より多いモノマーを含有し得る。別の態様では、本発明はまた、本発明の少なくとも 1 つの構築物を 10 含む細孔複合体も提供する。細孔複合体は、細孔を形成するのに十分な構築物、及び必要に応じてモノマーを含有する。例えば、八量体細孔は、(a) 各々が 2 個のモノマーを含む 4 個の構築物、(b) 各々が 4 個のモノマーを含む 2 個の構築物、(c) 2 個のモノマー及び構築物の一部を形成しない 6 個のモノマーを含む 1 個の構築物、又は (d) 1 個の構築物中の 1 個若しくは 2 個の C s g F モノマー、及び 6 ~ 7 個の C s g G モノマーを有する 1 個の構築物、又は更に (e) C s g G モノマーを単独で含む別の構築物に加えて、C s g F 及び C s g G モノマーを有する構築物を含み得る。例えば、九量体細孔には、同じ及び追加の可能性が提供される。構築物及びモノマーの他の組み合わせは、当業者によって想定され得る。本発明の 1 つ以上の構築物は、配列決定などの、ポリヌクレオチドを 20 特徴評価するための細孔複合体を形成するために使用され得る。構築物は、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、又は少なくとも 1 0 個のモノマーを含み得る。構築物は、好ましくは、2 個のモノマーを含む。2 個以上のモノマーは、同じであってもよい、又は異なってもよく、C s g F、C s g G、C s g G / C s g F 融合モノマー若しくはそれらの相同体、又はそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【0093】

別の実施形態は、本発明の該細孔若しくは細孔複合体をコードするポリヌクレオチド若しくは核酸分子、又はその相同体若しくは変異体、又は上記の構築物をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0094】

特定の実施形態は、本発明の単離された細孔複合体又は単離された細孔複合体、及び膜の構成要素を含む単離された膜貫通細孔複合体に関する。該単離された膜貫通細孔複合体は、核酸配列決定などの分子センシングにおける使用のために直接適用可能である。代替的に、本発明の単離された細孔複合体による、本明細書に記載の修飾 C s g G / C s g F 生物学的細孔、及び膜、膜構成要素、又は絶縁層を含む、膜組成物が提供される。一実施形態は、本発明による単離された細孔複合体、及び膜の構成要素からなる単離された膜貫通細孔複合体に関する。

【0095】

C s g G : C s g F 複合体は非常に安定であるが、C s g F が切り詰められる場合、完全長 C s g F を含む複合体と比較して、C s g G : C s g F 複合体の安定性が減少する。したがって、複合体をより安定にするために、例えば、本明細書で同定される位置にシステイン残基を導入した後に、C s g G と C s g F との間でジスルフィド結合を作製することができる。細孔複合体は、前述した方法のいずれかで作製することができ、ジスルフィド結合の形成は、酸化剤（例えば、銅-オルトフェナントロリン）を使用することによって誘導することができる。システイン相互作用の代わりに、他の相互作用（例えば、疎水性相互作用、電荷-電荷相互作用／静電的相互作用）もまた、それらの位置で使うことができる。

【0096】

別の実施形態では、非天然アミノ酸もこれらの位置に組み込むことができる。この実施形態では、共有結合は、クリックケミストリーを介してによって作製される。例えば

、アジド若しくはアルキンを有するか、又はジベンゾシクロオクチン（D B C O）基及び／又はピシクロ〔6．1．0〕ノニン（B C N）基を有する非天然アミノ酸を、これらの位置のうちの1つ以上に導入することができる。

【0097】

かかる安定化変異は、C s g G及び／又はC s g Fに対する任意の他の修飾、例えば、本明細書に開示される修飾と組み合わせることができる。

【0098】

C s g G細孔は、C s g Fペプチドへの結合を容易にするように修飾されている少なくとも1個、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは10個のC s g Gモノマーを含み得る。例えば、システイン残基は、配列番号3又は配列番号117の位置132、133、136、138、140、142、144、145、147、149、151、153、155、183、185、187、189、191、201、203、205、207、及び209に対応する位置のうちの1つ以上に導入され、C s g Gへの共有結合を容易にし得る。システイン残基を介した共有結合の代替又は追加として、細孔は、疎水性相互作用又は静電的相互作用によって安定化され得る。かかる相互作用を容易にするために、配列番号3又は配列番号117の位置132、133、136、138、140、142、144、145、147、149、151、153、155、183、185、187、189、191、201、203、205、207、及び209のうちの1つ以上に対応する位置での非変性反応性又は光反応性アミノ酸。

【0099】

C s g Fペプチドは、C s g G細孔への結合を容易にするように修飾され得る。例えば、システイン残基は、配列番号6の位置1、4、5、8、9、11、12、26、又は29に対応する位置のうちの1つ以上に導入され、C s g Gへの共有結合を容易にし得る。システイン残基を介した共有結合の代替又は追加として、細孔は、疎水性相互作用又は静電的相互作用によって安定化され得る。かかる相互作用を容易にするために、配列番号6の位置1、4、5、8、9、11、12、26、又は29のうちの1つ以上に対応する位置における非変性反応性又は光反応性アミノ酸。

【0100】

好ましい例示的なC s g Fペプチドは、配列番号6に対して以下の変異を含む含む。N 15 X 1／N 17 X 2／A 20 X 3／N 24 X 4／A 28 X 5／D 34 X 6、ここで、X 1は、N／S／A／T／Q／G／L／V／I／F／Y／W／R／K／D／Cであり、X 2は、N／S／A／T／Q／G／L／V／I／F／Y／W／R／K／D／Cであり、X 3は、A／S／T／Q／N／G／L／V／I／F／Y／W／R／K／D／Cであり、X 4は、N／S／T／Q／A／G／L／V／I／F／Y／W／R／K／D／Cであり、X 5は、A／S／T／Q／N／G／L／V／I／F／Y／W／R／K／D／Cであり、X 5は、D／F／Y／W／R／K／N／Q／Cである。位置N 15、N 17、A 20、N 24、及びA 28での変異は、狭窄変異であり、位置34での変異は、相互作用を安定化させるために、C s g G細孔の底部との相互作用p f C s g Fに影響を与える。

【0101】

C s g G細孔

C s g G細孔は、本発明の同一の変異体モノマーを含むホモオリゴマー細孔であり得る。C s g G細孔は、例えば、本明細書に開示される少なくとも1個の変異体モノマーを含む、C s g Gに由来するヘテロオリゴマー細孔であり得る。

【0102】

C s g G細孔は、任意の数の変異体モノマーを含有し得る。細孔は、典型的には、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個の同一の変異体モノマー、例えば、7、8、9、又は10個の変異体モノマーを含む。C s g G細孔は、好ましくは、8又は9個の同一の変異体モノマーを含む。

【0103】

好ましい実施形態では、ヘテロオリゴマーC s g G細孔内のモノマーの全て（例えば、

モノマーの10、9、8、又は7個)は、本明細書に開示される変異体モノマーであり、それらのうちの少なくとも1個は他のモノマーとは異なる。それらは、全て互いに異なっているともよい。

【0104】

C s g G細孔内の変異体モノマーは、好ましくは、全て、およそ同じ長さであるか、又は同じ長さである。細孔内の本発明の変異体モノマーのパレルは、好ましくは、およそ同じ長さであるか、又は同じ長さである。長さは、アミノ酸の数及び／又は長さの単位で測定され得る。

【0105】

変異体モノマーは、位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上に修飾を含む、配列番号3又は配列番号117のバリエーションであり得る。配列番号3又は配列番号117のアミノ酸配列の全長にわたって、バリエーションは、好ましくは、アミノ酸同一性に基づき、その配列と少なくとも40%相同である。より好ましくは、バリエーションは、配列全体にわたって配列番号3又は配列番号117のアミノ酸配列に対するアミノ酸同一性に基づき、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、97%、又は99%相同であり得る。配列番号3又は配列番号117のアミノ酸配列の全長にわたって、バリエーションは、好ましくは、その配列と少なくとも40%同一である。より好ましくは、バリエーションは、配列全体にわたって配列番号3又は配列番号117と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、97%、又は99%同一であり得る。100以上、例えば、125、150、175、又は200以上の連続アミノ酸のストレッチにわたって、少なくとも80%、例えば、少なくとも85%、90%、又は95%のアミノ酸同一性(「ハードホモロジー」)が存在し得る。

【0106】

C s g Gモノマーは高度に保存されている(WO2017/149317の図45~47から容易に理解することができる)。更に、配列番号3又は配列番号117に関連する変異の知識から、配列番号3又は配列番号117のもの以外のC s g Gモノマーの変異についての同等位置を決定することが可能である。

【0107】

したがって、特許請求の範囲及び明細書の他の箇所に記載されているように、配列番号3又は配列番号117に示される配列のバリエーション及びその特異的アミノ酸変異を含む変異体C s g Gモノマーへの言及は、配列番号68~88に示される配列のバリエーション及びその対応するアミノ酸変異を含む変異体C s g Gモノマーも包含する。同様に、特許請求の範囲及び明細書の他の箇所に記載されているように、配列番号3又は配列番号117に示される配列のバリエーション及びその特異的アミノ酸変異を含む変異体C s g Gモノマーに関連する細孔の使用を伴う構築物、細孔、又は方法への言及は、上に開示される配列番号に従う配列のバリエーション及びその対応するアミノ酸変異を含む変異体C s g Gモノマーに関連する構築物、細孔、又は方法も包含する。本発明が、高度に保存された領域を示す本明細書で明示的に特定されていない他のバリエーションC s g Gモノマーにも及ぶことが更に理解されるであろう。

【0108】

相同性を決定するために、当該技術分野における標準的な方法が使用され得る。例えば、UWGC G Packageは、例えばそのデフォルト設定で使用されて、相同性を計算するために使用され得るBESTFITプログラムを提供する(Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。例えば、Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300、Altschul, S. F et al (1990) J Mol

B i o l 2 1 5 : 4 0 3 - 1 0 に記載されるように、P I L E U P 及び B L A S T アルゴリズムを使用して、相同性を計算するか、又は配列を並べる（同等の残基又は対応する配列を同定する（典型的には、それらのデフォルト設定において））ことができる。B L A S T 分析を行うためのソフトウェアは、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を通じて公的に利用可能である。

【0109】

配列番号3は、E s c h e r i c h i a c o l i 株 K - 1 2 亜株 M C 4 1 0 0 からの野生型 C s g G モノマーである。配列番号3又は配列番号117のバリエーションは、別の C s g G 相同体に存在する置換のいずれかを含み得る。好ましい C s g G 相同体は、配列番号68～88に示される。バリエーションは、配列番号3又は配列番号117と比較して、配列番号68～88に存在する置換のうちの1つ以上の組み合わせを含み得る。例えば、配列番号3又は配列番号117と配列番号68～88のうちのいずれか1つとの間で異なる、配列番号3又は配列番号117における位置のうちのいずれか1つ以上で変異が行われ得る。かかる変異は、配列番号3又は配列番号117におけるアミノ酸の、配列番号68～88のうちのいずれか1つの対応する位置からのアミノ酸による置換であり得る。代替的に、これらの位置のうちのいずれか1つにおける変異は、任意のアミノ酸による置換であり得るか、又は2～8個若しくは3～6個のアミノ酸などの1～10個のアミノ酸の欠失若しくは挿入などの欠失若しくは挿入変異であり得る。本明細書に開示される変異以外に、配列番号3又は配列番号117と配列番号66～88の全てとの間で保存されるアミノ酸は、好ましくは、本発明のバリエーションに存在する。しかしながら、保存的変異は、配列番号3又は配列番号117と配列番号66～88の全てとの間で保存されるこれらの位置のうちのいずれか1つ以上で行われ得る。

【0110】

本発明は、配列番号3又は配列番号117における特定の位置に対応する C s g G モノマーの構造中の位置において、配列番号3又は配列番号117の特定の位置に置換されるように本明細書に記載されるアミノ酸のうちのいずれか1つ以上を含む細孔形成 C s g G 変異体モノマーを提供する。対応する位置は、当該技術分野で標準的な技法によって決定され得る。例えば、上述の P I L E U P 及び B L A S T アルゴリズムを使用して、C s g G モノマーの配列を配列番号3又は配列番号117とアラインメントし、したがって、対応する残基を同定することができる。

【0111】

細孔形成変異体モノマーは、典型的には、配列番号3又は配列番号117の配列を有する C s g G モノマーと同じ3D構造などの、野生型 C s g G モノマーと同じ3D構造を形成する能力を保持する。C s g G の3D構造は、当該技術分野で既知であり、例えば、G o y a l e t a l (2 0 1 4) N a t u r e 5 1 6 (7 5 3 0) : 2 5 0 - 3 に開示されている。C s g G 変異体モノマーが、本発明の変異によって付与される改善された特性を保持することを条件として、本明細書に記載される変異に加えて、任意の数の変異が野生型 C s g G 配列において行われ得る。

【0112】

典型的には、C s g G モノマーは、3つのアルファヘリックス及び5つのベータシートを含む構造を形成する能力を保持する。変異は、少なくとも、第1のアルファヘリックスに対してN末端である C s g G の領域（配列番号3におけるS63で開始する）において、第2のアルファヘリックス（配列番号3又は配列番号117のG85～A99）において、第2のアルファヘリックスと第1のベータシートとの間のループ（配列番号3又は配列番号117のQ100～N120）において、第4及び第5のベータシート（それぞれ配列番号3又は配列番号117のS173～R192及びR198～T107）において、並びに第4ベータシートと第5のベータシートとの間のループ（配列番号3又は配列番号117のF193～Q197）において、膜貫通細孔を形成する C s g G モノマーの能力に影響を与えることなく行われ得、膜貫通細孔は、ポリペプチドを転位させること

ができる。したがって、更なる変異が、任意の C s g G モノマーにおけるこれらの領域のいずれかにおいて、ポリヌクレオチドを転位させることができる細孔を形成するモノマーの能力に影響を与えることなく行われ得ることが想定される。また、変異は、他の領域において、例えば、アルファヘリックス（配列番号 3 若しくは配列番号 117 の S 63 ~ R 76、G 85 ~ A 99、若しくは V 211 ~ L 236）のいずれかにおいて、又はベータシート（配列番号 3 若しくは配列番号 117 の I 121 ~ N 133、K 135 ~ R 142、I 146 ~ R 162、S 173 ~ R 192、若しくは R 198 ~ T 107）のいずれかにおいて、ポリヌクレオチドを転位させることができる細孔を形成するモノマーの能力に影響を与えることなく行われ得ることが予想される。また、1つ以上のアミノ酸の欠失は、アルファヘリックス及びベータシートを連結するループ領域のいずれかにおいて、並びに／又は C s g G モノマーの N 末端及び／若しくは C 末端領域において、ポリヌクレオチドを転位させることができる細孔を形成するモノマーの能力に影響を与えることなく行われ得ることが予想される。

10

【0113】

アミノ酸置換は、上で考察されるものに加えて、配列番号 3 又は配列番号 117 のアミノ酸配列、例えば、最大 1、2、3、4、5、10、20、又は 30 個の置換に対して行われ得る。保存的置換は、アミノ酸を、類似の化学構造、類似の化学的特性、又は類似の側鎖体積の他のアミノ酸で置き換える。導入されるアミノ酸は、それらが置き換えるアミノ酸と類似の極性、親水性、疎水性、塩基性、酸性、中性、又は荷電性を有し得る。代替的に、保存的置換は、既存の芳香族又は脂肪族アミノ酸の代わりに芳香族又は脂肪族である別のアミノ酸を導入し得る。保存的アミノ酸変化は、当該技術分野で周知であり、上の表 1 に定義される 20 個の主要なアミノ酸の特性に従って選択され得る。アミノ酸が類似の極性を有する場合、これはまた、表 2 におけるアミノ酸側鎖についての疎水性スケールを参照して決定され得る。

20

【0114】

配列番号 3 又は配列番号 117 のアミノ酸配列の 1つ以上のアミノ酸残基は、追加的に、上に記載されるポリペプチドから欠失され得る。最大 1、2、3、4、5、10、20、又は 30 個以上の残基が欠失され得る。

【0115】

バリエーションは、配列番号 3 又は配列番号 117 の断片を含み得る。そのような断片は、細孔形成活性を保持する。断片は、少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 150、少なくとも 200、又は少なくとも 250 アミノ酸長であり得る。かかる断片を使用して、細孔を産生し得る。断片は、好ましくは、配列番号 3 又は配列番号 117 の膜にまたがるドメイン、すなわち、K 135 ~ Q 153 及び S 183 ~ S 208 を含む。

30

【0116】

1つ以上のアミノ酸は、代替的又は追加的に、上述のポリペプチドに付加され得る。伸長部は、配列番号 3 若しくは配列番号 117 のアミノ酸配列のアミノ末端若しくはカルボキシ末端、又はそのポリペプチドバリエーション若しくは断片に提供され得る。伸長部は、非常に短くてもよく、例えば、1 ~ 10 アミノ酸長であってもよい。代替的に、伸長部は、より長くてもよく、例えば、最大 50 個又は 100 個のアミノ酸であり得る。キャリアタンパク質は、本発明によるアミノ酸配列に融合され得る。他の融合タンパク質は、以下でより詳細に考察される。

40

【0117】

本明細書に記載の C s g G 細孔は、野生型 C s g G 細孔、又はその相同体若しくは変異体／バリエーションを含む。バリエーションは、配列番号 3 又は配列番号 117 のものとは異なるアミノ酸配列を有し、細孔を形成するその能力を保持するポリペプチドである。バリエーションは、典型的には、細孔形成に参与する配列番号 3 又は配列番号 117 の領域を含有する。β-バレルを含有する C s g G の細孔形成能力は、各サブユニットにおける β-シートによって提供される。配列番号 3 又は配列番号 117 のバリエーションは、典型的には、β-シートを形成する配列番号 3 又は配列番号 117 における領域、すなわち、K 134 ~ Q

50

154及びS183～S208を含む。1つ以上の修飾は、得られたバリエーションが細孔を形成するその能力を保持する限り、 β -シートを形成する配列番号3又は配列番号117の領域に対して行うことができる。配列番号3又は配列番号117のバリエーションは、好ましくは、その α -ヘリックス領域及び／又はループ領域内に、置換、付加、又は欠失などの1つ以上の修飾を含む。

【0118】

変異体CsGGモノマーは、その配列が野生型CsGGモノマーのものとは異なり、細孔を形成する能力を保持するモノマーである、変異体CsGGモノマーであり得る。変異体モノマーは、本明細書ではバリエーションとも称され得る。変異体モノマーが細孔を形成する能力を確認するための方法は、当該技術分野で周知であり、以下でより詳細に考察される。

10

【0119】

本発明のCsGG細孔又は細孔複合体における少なくとも1個のモノマー、又は6～10個のモノマーのいずれか若しくは全ては、WO2016/034591、WO2017/149316、WO2017/149317、WO2017/149318、WO2018/211241、及びWO2019/002893（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示される特定の修飾又は置換のいずれかを有し得る。

【0120】

本発明の細孔又は細孔複合体における配列番号117の少なくとも1個のモノマー／バリエーションにおける好ましい追加の修飾には、以下のうちの1個以上、例えば、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、又は全てが含まれるが、これらに限定されない。

20

- (a) 位置Y51、例えば、Y51A、Y51I、Y51L、又はY51Tでの置換、
- (b) 位置N55、例えば、N55V、N55Q、N55S、又はN55Aでの置換、
- (c) 位置F56、例えば、F56Q、F56A、又はF56Nでの置換、
- (d) 位置L90、例えば、L90N、L90R、又はL90Kでの置換、
- (e) 位置N91、例えば、N91N、N91R、又はN91Kでの置換、
- (f) 位置K94、例えば、K94Q、K94R、K94F、K94Y、K94W、K94L、K94S、又はK94Nでの置換、
- (g) 位置R192、例えば、R192D、R192Q、R192F、R192S、又はR192Tでの置換、
- (h) 位置Q153、例えば、Q153Cでの置換、及び
- (i) 位置C215、例えば、C215Tでの置換。

30

【0121】

配列番号117の少なくとも1個のモノマー／バリエーションは、1つ以上の位置の欠失、例えば、V105～I107の欠失、F193～L199の欠失、又はF195～L199の欠失を更に含み得る。

【0122】

細孔又は細孔複合体における任意の数のモノマー、例えば、6、7、8、9、又は10は、配列番号117における位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上での修飾に加えて、これらの追加の修飾のうちの1つ以上を更に含む、配列番号117の変異体モノマー／バリエーションであり得る。細孔又は細孔複合体における6～10個のモノマーは全て、配列番号117における位置W97、Q100、E101、N102、及びT104のうちの1つ以上での修飾に加えて、これらの追加の置換のうちの1つ以上を更に含む、配列番号117の変異体モノマー／バリエーションであり得る。

40

【0123】

二重細孔複合体

本発明の細孔又は細孔複合体は、第1の細孔又は複合体、及び第2の細孔又は複合体を含む二重細孔複合体であり得る。二重細孔複合体は、細孔-細孔、細孔-細孔複合体、又は細孔複合体-細孔複合体を含み得る。細孔又は複合体のうちのいずれかは、本発明の細

50

孔又は複合体であり得る。一実施形態では、第1の細孔複合体及び第2の細孔複合体の両方は、本発明のCs g G / Cs g F細孔複合体である。別の実施形態では、第1の細孔及び第2の細孔の両方は、本発明のCs g G細孔である。第1及び第2の細孔又は複合体は、同じであってもよい、又は異なってもよい。本明細書に開示される変異のいずれかに加えて、二重細孔では、少なくとも1個のCs g Gモノマーは、WO 2016 / 034591、WO 2017 / 149316、WO 2017 / 149317、及びWO 2017 / 149318、WO 2018 / 211241、及びWO 2019 / 002893（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される追加の変異のうちの1つ以上を含み得る。少なくとも1個のCs g Gモノマーは、好ましくは、上記に開示される追加の置換のいずれかを含む。

10

【0124】

修飾タンパク質を作製するための方法

天然に存在しないアミノ酸を導入又は置換するための方法も当該技術分野で周知である。例えば、天然に存在しないアミノ酸は、変異体モノマーを発現させるために使用されるI V T T系中に合成アミノアシル-tRNAを含めることによって導入され得る。代替的に、それらは、特定のアミノ酸の合成（すなわち、天然に存在しない）類似体の存在下で、それらの特定のアミノ酸に対して栄養要求性であるE. coli中で変異体モノマーを発現させることによって導入され得る。それらは、変異体モノマーが部分的ペプチド合成を使用して産生される場合、裸のライゲーションによって産生される場合もある。

【0125】

20

Cs g Gに由来するモノマーは、例えば、ストレプトアビジンタグの付加によって、又はモノマーがかかる配列を天然に含有しない細胞からのそれらの分泌を促進するためのシグナル配列の付加によって、それらの同定又は精製を補助するように修飾され得る。他の好適なタグは、以下でより詳細に考察される。モノマーは、顕示標識（revealing label）で標識され得る。顕示標識は、モノマーが検出されることを可能にする任意の好適な標識であり得る。好適な標識を以下に記載する。

【0126】

Cs g Gに由来するモノマーはまた、D-アミノ酸を使用して産生され得る。例えば、Cs g Gに由来するモノマーは、L-アミノ酸及びD-アミノ酸の混合物を含み得る。これは、そのようなタンパク質又はペプチドを産生するための当該技術分野における従来法である。

30

【0127】

Cs g Gに由来するモノマーは、ヌクレオチド識別を容易にするための1つ以上の特異的修飾を含有する。Cs g Gに由来するモノマーはまた、それらが細孔形成を妨害しない限り、他の非特異的修飾を含有し得る。多くの非特異的側鎖修飾が当該技術分野で既知であり、Cs g Gに由来するモノマーの側鎖に対して行われ得る。かかる修飾には、例えば、アルデヒドとの反応に続くNaBH₄での還元によるアミノ酸の還元アルキル化、メチルアセトイミデートによるアミジン化、又は無水酢酸でのアシル化が含まれる。

【0128】

Cs g Gに由来するモノマーは、当該技術分野で既知の標準的な方法を使用して産生することができる。Cs g Gに由来するモノマーは、合成的に又は組換え手段によって作製され得る。例えば、モノマーは、インビトロ翻訳及び転写（I V T T）によって合成され得る。細孔及びモノマーを産生するための好適な方法は、国際出願第2010 / 004273号、同第2010 / 004265号、又は同第2010 / 086603号（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）において考察されている。細孔を膜内に挿入するための方法が知られている。

40

【0129】

細孔中の2個以上のCs g Gモノマーは、互いに共有結合され得る。例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個のモノマーは、共有結

50

合され得る。共有結合したモノマーは、同じであってもよい、又は異なってもよい。

【0130】

モノマーは、任意選択的にリンカーを介して遺伝的に融合され得るか、又は例えば化学架橋剤を介して化学的に融合され得る。モノマーを共有結合するための方法は、WO 2017/149316、WO 2017/149317、及びWO 2017/149318（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0131】

いくつかの実施形態では、変異体モノマーは、化学修飾されている。変異体モノマーは、任意の方式及び任意の部位で化学修飾され得る。変異体モノマーは、好ましくは、1つ以上のシステインへの分子の結合（システイン連結）、1つ以上のリジンへの分子の結合、1つ以上の非天然アミノ酸への分子の結合、エピトープの酵素修飾、又は末端の修飾によって化学修飾される。かかる修飾を実行するための好適な方法は、当該技術分野で周知である。変異体モノマーは、任意の分子の結合によって化学修飾され得る。例えば、変異体モノマーは、色素又はフルオロフォアの結合によって化学修飾され得る。

【0132】

いくつかの実施形態では、変異体モノマーは、モノマーを含む細孔と、標的ヌクレオチド又は標的ポリヌクレオチド配列との間の相互作用を容易にする分子アダプタで化学修飾される。アダプタの存在は、細孔及びヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列の宿主-ゲスト化学を改善し、それによって、変異体モノマーから形成された細孔の配列決定能力を改善する。宿主-ゲスト化学の原理は、当該技術分野で周知である。アダプタは、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列とのその相互作用を改善する、細孔の物理的又は化学的特性に影響を及ぼす。アダプタは、細孔のバレル若しくはチャンネルの電荷を変更し得るか、又はヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド配列と特異的に相互作用し得るか若しくは結合し得、それによって、細孔とのその相互作用を促進する。

【0133】

分子アダプタは、好ましくは、環状分子、シクロデキストリン、ハイブリダイゼーションすることができる種、DNA結合剤若しくはインターキレート剤、ペプチド若しくはペプチド類似体、合成ポリマー、芳香族平面分子、小さい正に荷電した分子、又は水素結合することができる小分子である。

【0134】

アダプタは、環状であり得る。環状アダプタは、好ましくは、細孔と同じ対称性を有する。CsGが、典型的には、中心軸の周りに8又は9個のサブユニットを有するため、アダプタは、好ましくは、8回対称性又は9回対称性を有する。これは、以下でより詳細に考察される。

【0135】

アダプタは、典型的には、宿主-ゲスト化学を介してヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相互作用する。アダプタは、典型的には、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相互作用することができる。アダプタは、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相互作用することができる1つ以上の化学基を含む。1つ以上の化学基は、好ましくは、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、 π -カチオン相互作用、及び／又は静電気力などの非共有相互作用によって、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相互作用する。ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相互作用することができる1つ以上の化学基は、好ましくは正に荷電している。ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相互作用することができる1つ以上の化学基は、より好ましくは、アミノ基を含む。アミノ基は、一級、二級、又は三級炭素原子に結合し得る。アダプタは、更により好ましくは、6、7又は8個のアミノ基の環などの、アミノ基の環を含む。アダプタは、最も好ましくは、8個のアミノ基の環を含む。プロトン化されたアミノ基の環は、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列中の負に荷電したリン酸基と相互作用し得る。

【0136】

細孔内でのアダプタの正しい位置決めは、アダプタと、変異体モノマーを含む細孔との間の宿主－ゲスト化学によって容易にすることができる。アダプタは、好ましくは、細孔中の1つ以上のアミノ酸と相互作用することができる1つ以上の化学基を含む。アダプタは、より好ましくは、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、 π -カチオン相互作用、及び／又は静電気力などの非共有相互作用を介して、細孔内の1つ以上のアミノ酸と相互作用することが可能である1つ以上の化学基を含む。細孔内の1つ以上のアミノ酸と相互作用することができる化学基は、典型的には、ヒドロキシル又はアミンである。ヒドロキシル基は、一級、二級、又は三級炭素原子に結合し得る。ヒドロキシル基は、細孔の非荷電アミノ酸と水素結合を形成し得る。細孔と、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列との間の相互作用を容易にする任意のアダプタを使用することができる。

10

【0137】

好適なアダプタとしては、シクロデキストリン、環状ペプチド、及びククルビツリルが挙げられるが、これらに限定されない。アダプタは、好ましくは、シクロデキストリン又はその誘導体である。シクロデキストリン又はその誘導体は、E l i s e e v , A . V . , and S c h n e i d e r , H - J . (1 9 9 4) J . A m . C h e m . S o c . 1 1 6 , 6 0 8 1 - 6 0 8 8 に開示されるもののいずれかであり得る。アダプタは、より好ましくは、ヘプタキス-6-アミノ- β -シクロデキストリン (a m 7 - β C D) 、 6 - モノデオキシ-6-モノアミノ- β -シクロデキストリン (a m 1 - β C D) 、 又はヘプタキス- (6 - デオキシ-6 - グアニジノ) - シクロデキストリン (g u 7 - β C D) である。g u 7 - β C D のグアニジノ基は、a m 7 - β C D の一級アミンよりもはるかに高い p K a を有するので、より正に荷電している。この g u 7 - β C D アダプタは、細孔内のヌクレオチドの滞留時間を増加させ、測定された残留電流の精度を増加させ、高温又は低データ取得速度での塩基検出速度を増加させるために使用され得る。

20

【0138】

スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (S P D P) 架橋剤を以下でより詳細に考察されるように使用する場合、アダプタは、好ましくは、ヘプタキス (6 - デオキシ-6 - アミノ) - 6 - N - モノ (2 - ピリジル) ジチオプロパノイル- β -シクロデキストリン (a m 6 a m P D P 1 - β C D) である。

【0139】

より好適なアダプタには、9個の糖単位を含む(したがって、9回対称性を有する)、 γ -シクロデキストリンが含まれる。 γ -シクロデキストリンは、リンカー分子を含有してもよいが、又は上で考察された β -シクロデキストリンの例で使用される修飾糖単位の全て又は多くを含むように修飾されてもよい。

30

【0140】

分子アダプタは、変異体モノマーに共有結合され得る。アダプタは、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して細孔に共有結合され得る。アダプタは、典型的には、化学結合を介して結合される。分子アダプタがシステイン結合を介して結合している場合、1つ以上のシステインが、好ましくは、置換によって変異体に(例えば、バレル内に)導入されている。変異体モノマーは、変異体モノマーにおける1つ以上のシステインへの分子アダプタの結合によって化学修飾され得る。1つ以上のシステインは、天然に存在し得る、すなわち、配列番号3又は配列番号117における位置1及び／又は215にあり得る。代替的に、変異体モノマーは、他の位置に導入された1つ以上のシステインへの分子の結合によって化学修飾され得る。位置215でのシステインは、分子アダプタが、位置1でのシステイン又は別の位置に導入されたシステインではなく、その位置に結合しないことを確実にするために、例えば、置換によって除去され得る。

40

【0141】

システイン残基の反応性は、隣接する残基の修飾によって強化され得る。例えば、隣接するアルギニン、ヒスチジン、又はリジン残基の塩基性基は、システインチオール基の p K a を、より反応性の高いS-基の p K a に変化させる。システイン残基の反応性は、d T N B などのチオール保護基によって保護され得る。これらは、リンカーが結合される前

50

に、変異体モノマーの1つ以上のシステイン残基と反応され得る。

【0142】

分子は、変異体モノマーに直接結合してもよい。分子は、好ましくは、化学架橋剤又はペプチドリンカーなどのリンカーを使用して、変異体モノマーに結合する。

【0143】

好適な化学架橋剤は、当該技術分野で周知である。好ましい架橋剤としては、2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロパノエート、2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル4-(ピリジン-2-イルジスルファニル)ブタノエート、及び2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル8-(ピリジン-2-イルジスルファニル)オクタノエート(octananoate)が挙げられる。最も好ましい架橋剤は、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)である。典型的には、分子は、分子/架橋剤複合体が変異体モノマーと共有結合する前に二官能性架橋剤と共有結合しているが、二官能性架橋剤/モノマー複合体が分子に結合する前に二官能性架橋剤をモノマーと共有結合させることも可能である。

【0144】

リンカーは、好ましくは、ジチオトレイトール(DTT)に耐性である。好適なリンカーには、ヨードアセトアミド系及びマレイミド系リンカーが含まれるが、これらに限定されない。

【0145】

他の実施形態では、モノマーは、ポリヌクレオチド結合タンパク質に結合され得る。これは、本発明の配列決定の方法に使用され得るモジュラー配列決定システムを形成する。ポリヌクレオチド結合タンパク質は、以下に考察される。

【0146】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、好ましくは、変異体モノマーに共有結合される。タンパク質は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用してモノマーに共有結合され得る。モノマー及びタンパク質は、化学的に融合され得るか、又は遺伝子的に融合され得る。構築物全体が単一のポリヌクレオチド配列から発現される場合、モノマー及びタンパク質は、遺伝子的に融合される。モノマーのポリヌクレオチド結合タンパク質への遺伝子融合は、WO2010/004265(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)において考察されている。

【0147】

ポリヌクレオチド結合タンパク質がシステイン結合を介して結合している場合、1つ以上のシステインが、好ましくは、置換によって変異体に導入されている。1つ以上のシステインは、好ましくは、変異又は挿入が許容され得ることを示す相同体の中で低い保存性を有するループ領域に導入される。したがって、それらは、ポリヌクレオチド結合タンパク質を結合するのに好適である。かかる実施形態では、位置251での天然に存在するシステインが除去され得る。システイン残基の反応性は、上述の修飾によって強化され得る。

【0148】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、変異体モノマーに直接又は1つ以上のリンカーを介して結合され得る。分子は、WO2010/086602(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)として記載されているハイブリダイゼーションリンカーを使用して、変異体モノマーに結合され得る。代替的に、ペプチドリンカーが使用され得る。ペプチドリンカーはアミノ酸配列である。ペプチドリンカーの長さ、可動性、及び親水性は、典型的には、それがモノマー及び分子の機能を妨げないように設計される。好ましい可動性ペプチドリンカーは、2~20個、例えば、4、6、8、10、又は16個のセリン、及び/又はグリシンアミノ酸のストレッチである。より好ましい可動性リンカーは、(SG)1、(SG)2、(SG)3、(SG)4、(SG)5、及び(SG)8を含み、Sはセリンであり、Gはグリシンである。好ましい剛性リンカーは、2~30個、例えば4、6、8、16、又は24個のプロリンアミノ酸のストレッチである。より好ましい剛性リ

ンカーは、(P) 12を含み、Pはプロリンである。

【0149】

化学修飾

変異体Cs g Gモノマー又はCs g Fペプチドは、分子アダプタ及びポリヌクレオチド結合タンパク質で化学修飾され得る。

【0150】

(モノマー又はペプチドが化学修飾されている)分子は、WO2010/004273、WO2010/004265、又はWO2010/086603(それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているように、モノマー若しくはペプチドに直接結合され得るか、又はリンカーを介して結合され得る。

10

【0151】

Cs g Gモノマー及び／又はCs g Fペプチドなどの本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかは、例えば、ヒスチジン残基(h i s タグ)、アスパラギン酸残基(a s p タグ)、ストレプトアビジンタグ、フラッグタグ、SUMOタグ、GSTタグ、若しくはMBPタグの付加によって、又はポリペプチドがかかる配列を天然に含有しない細胞からのそれらの分泌を促進するためのシグナル配列の付加によって、修飾してそれらの同定又は精製を補助することができる。遺伝的タグを導入することの代替法は、タンパク質上の天然の又は操作された位置上にタグを化学反応させることである。これの一例は、ゲルシフト試薬を、タンパク質の外側に操作されたシステインに反応させることであろう。これは、溶血毒ヘテロオリゴマーを分離するための方法として示されている(C h e m B i o l . 1997 J u l ; 4 (7) : 497-505)。

20

【0152】

Cs g Gモノマー及び／又はCs g Fペプチドなどの本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかは、顕示標識で標識され得る。顕示標識は、タンパク質が検出されることを可能にする任意の好適な標識であり得る。好適な標識には、蛍光分子、放射性同位体、例えば125I、35S、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチド、及びビオチンなどのリガンドが含まれるが、これらに限定されない。

【0153】

Cs g Gモノマー及び／又はCs g Fペプチドなどの本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかは、合成的に又は組換え手段によって作製され得る。例えば、タンパク質は、インビトロ翻訳及び転写(I V T T)によって合成され得る。タンパク質のアミノ酸配列は、天然に存在しないアミノ酸を含むように、又はタンパク質の安定性を増加させるように修飾され得る。タンパク質が合成手段によって産生される場合、そのようなアミノ酸は産生中に導入されてもよい。タンパク質はまた、合成又は組換え産生のいずれかに続いて変更され得る。

30

【0154】

タンパク質はまた、D-アミノ酸を使用して産生され得る。例えば、タンパク質は、L-アミノ酸及びD-アミノ酸の混合物を含み得る。これは、そのようなタンパク質又はペプチドを産生するための当該技術分野における従来法である。

【0155】

タンパク質はまた、それらがタンパク質の機能を妨害しない限り、他の非特異的修飾を含有し得る。多くの非特異的側鎖修飾が当該技術分野で既知であり、タンパク質(複数可)の側鎖に対して行われ得る。かかる修飾には、例えば、アルデヒドとの反応に続くN a B H 4での還元によるアミノ酸の還元アルキル化、メチルアセトイミデートによるアミジン化、又は無水酢酸でのアシル化が含まれる。

40

【0156】

Cs g Gモノマー及び／又はCs g Fペプチドなどの本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかは、当該技術分野で既知の標準的な方法を使用して産生することができる。タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、当該技術分野における標準的な方法を使用して得られ、複製され得る。タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、

50

当該技術分野における標準的な方法を使用して細菌宿主細胞において発現され得る。タンパク質は、組換え発現ベクターからポリペプチドを系内で発現することによって細胞内で産生され得る。発現ベクターは、任意選択的に、ポリペプチドの発現を制御するために誘導性プロモーターを担持する。これらの方法は、Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Yに記載されている。

【0157】

タンパク質は、タンパク質産生有機体から、任意のタンパク質液体クロマトグラフィーシステムによる精製に続いて、又は組換え発現の後に大規模に産生され得る。典型的なタンパク質液体クロマトグラフィーシステムには、FPLC、AKTAシステム、BioCadシステム、Bio-Rad BioLogicシステム、及びGilson HPLCシステムが含まれる。

【0158】

細孔を産生する方法

本発明は、インビボ及びインビトロで、2つ以上の狭窄部位を保持するCs g G：修飾Cs g F細孔複合体を産生する方法を提供する。一実施形態は、Cs g G細孔又はその相同体若しくは変異体形態、及び修飾Cs g Fペプチド又はその相同体若しくは変異体を含む膜貫通細孔複合体を、共発現を介して産生するための方法を提供する。該方法であって、両方とも好適な宿主細胞において、Cs g Gモノマー（配列番号2に提供されるプレタンパク質、又はその相同体若しくは変異体として発現される）を発現させるステップと、修飾又は切り詰め型Cs g Fモノマーを発現させるステップと、を含み、インビボでの複合体細孔形成を可能にする、該方法。該複合体は、細孔に追加のリーダーヘッドを提供するために、Cs g G細孔との複合体において修飾Cs g Fペプチドを含む。修飾Cs g Fペプチドを使用して該方法によって産生された得られた細孔複合体は、分析物、特にポリヌクレオチド鎖の通過を可能にするため、核酸配列決定などの標的分析物の特徴評価における細孔複合体の使用に十分である構造を提供し、該アプリケーションのための適切な設定で使用される場合、該ポリヌクレオチド配列の読み取りを改善するための2つ以上のリーダーヘッドを含む。本発明の細孔及び複合体を作製するための方法、並びにそれらをタグ付けする方法は、WO2016/034591、WO2017/149316、WO2017/149317、及びWO2017/149318、WO2018/211241、及びWO2019/002893（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0159】

分析物を特徴評価する方法

本発明は、標的分析物の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定する方法を提供する。本方法は、標的分析物が細孔チャネルに対して、例えば、細孔チャネルへと又は細孔チャネルを通過して移動するように、標的分析物を、本発明の細孔などの単離された細孔複合体、又は膜貫通細孔と接触させることと、分析物が細孔に対して移動する際に1つ以上の測定値を取得し、それによって、分析物の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定することと、を伴う。標的分析物は、鑄型分析物又は目的的分析物とも呼ばれ得る。単離された細孔複合体は、典型的には、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個のモノマー、例えば、7、8、9、又は10個のCs g Gモノマーを含む。単離された細孔複合体は、好ましくは、8又は9個の同一のCs g Gモノマーを含む。Cs g Gモノマーのうちの1個以上、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは10個が、好ましくは、化学修飾されているか、又はCs g Fペプチドが、化学修飾されている。Cs g Gモノマー又はその相同体若しくは変異体、及び修飾Cs g Fモノマー又はその相同体若しくは変異体などの単離された細孔複合体モノマーは、任意の生物に由来し得る。分析物は、Cs g G狭窄、続いてCs g F狭窄を通過することができる。代替の

実施形態では、分析物は、膜内のC s g G / C s g F複合体の配向に応じて、C s g F狭窄、続いてC s g G狭窄を通過することができる。

【0160】

本方法は、標的分析物の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定するためのものである。本方法は、少なくとも1つの分析物の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定するためのものであってもよい。本方法は、2つ以上の分析物の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定することに関してもよい。本方法は、任意の数の分析物、例えば2、5、10、15、20、30、40、50、100個以上の分析物の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定することを含んでもよい。1つ以上の分析物の任意の数の特徴、例えば1、2、3、4、5、10個以上の特徴が決定され得る。

10

【0161】

細孔複合体のチャンネル内、又はチャンネルのいずれかの開口部の近くでの分子の結合は、細孔を通るオープンチャンネルイオン流に影響を及ぼし、これは細孔チャンネルの「分子センシング」の本質である。核酸配列決定アプリケーションと同様の様式で、オープンチャンネルイオン流の変動は、電流の変化による好適な測定技法を使用して測定することができる（例えば、WO2000/28312及びD. Stoddart et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2010, 106, 7702-7又はWO2009/077734；全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。電流の低減によって測定されるイオン流の低減の程度は、細孔内又は細孔の近くの障害物のサイズに関連している。したがって、細孔内又は細孔の近くでの「分析物」とも称される目的の分子の結合は、検出可能かつ測定可能な事象を提供し、それによって「生物学的センサ」の基礎を形成する。ナノ細孔センシングに好適な分子には、核酸、タンパク質、ペプチド、多糖類、及び小分子（ここでは、低分子量（例えば、<900 Da又は<500 Da）の有機又は無機化合物を指す）、例えば医薬品、毒素、サイトカイン、及び汚染物質が含まれる。生体分子の存在を検出することにより、個別化された薬物開発、医学、診断、ライフサイエンス研究、環境モニタリング、並びに警備及び／又は防衛産業での用途が見出される。

20

【0162】

別の態様では、複合体内の細孔にチャンネル狭窄を提供する、野生型若しくは修飾E. coli C s g Gナノ細孔又はその相同体若しくは変異体、及び修飾C s g Fペプチドを含有する単離された細孔複合体又は膜貫通細孔複合体は、分子又は生物学的センサとして機能し得る。いくつかの実施形態では、C s g Gナノ細孔は、細菌タンパク質（例えば、E. coli、Salmonella typhi）から誘導又は単離することができる。いくつかの実施形態では、C s g Gナノ細孔は、組換えにより產生することができる。分析物検出のための手順は、Howorka et al. Nature Biotechnology (2012) Jun 7; 30(6): 506-7に記載されている。検出される分析物分子は、チャンネルの面に、又はチャンネル自体の内腔内のいずれかに結合し得る。結合の位置は、感知される分子のサイズによって決定され得る。

30

【0163】

標的分析物は、好ましくは、金属イオン、無機塩、ポリマー、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、多糖類、色素、漂白剤、医薬品、診断薬、レクリエーションドラッグ、爆発物、毒性化合物、又は環境汚染物質である。本方法は、2つ以上の同じタイプの分析物、例えば2つ以上のタンパク質、2つ以上のヌクレオチド、又は2つ以上の医薬品の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定することに関してもよい。代替的に、本方法は、2つ以上の異なるタイプの分析物、例えば1つ以上のタンパク質、1つ以上のヌクレオチド、及び1つ以上の医薬品の存在、不在、又は1つ以上の特徴を決定することに関してもよい。

40

【0164】

標的分析物は、細胞から分泌され得る。代替的に、標的分析物は、細胞の内部に存在する分析物であり得、そのため、方法が実行され得る前に分析物が細胞から抽出されなけれ

50

ばならない。

【0165】

野生型細孔は、センサとして作用し得るが、多くの場合、結合の強度、結合の位置、又は感知される分子の結合の特異性を増加させるために、組換え又は化学方法を介して修飾されている。典型的な修飾には、感知される分子の構造に対して相補的な特異的結合部分の付加が含まれる。分析物分子が核酸を含む場合、この結合部分は、シクロデキストリン又はオリゴヌクレオチドを含み得る。小分子について、これは、既知の相補的な結合領域、例えば、T細胞受容体(TCR)からの一本鎖可変断片(scFv)領域若しくは抗原認識ドメインを含む、抗体若しくは非抗体分子の抗原結合部分であり得るか、又はタンパク質について、それは、標的タンパク質の既知のリガンドであり得る。このようにして、野生型又は修飾E.coli CsgGナノ細孔又はその相同体は、受容体、固形腫瘍又は血液がん細胞(例えば、リンパ腫又は白血病)のマーカーを含む細胞表面抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原、アレルゲン、アレルギー関連分子、アルブミン(例えば、ヒト、げっ歯類、又はウシ)、蛍光分子(フルオレセインを含む)、血液型抗原、小分子、薬物、酵素、酵素の触媒部位又は酵素基質、及び酵素基質の遷移状態類似体を含み得る、好適な抗原(エピトープを含む)の試料中の存在を検出するための分子センサとして作用する能力を与えることができる。上記のように、修飾は、既知の遺伝子工学及び組換えDNA技法を使用して達成され得る。任意の適合の位置付けは、感知される分子の性質、例えば、サイズ、三次元構造、及びその生化学的性質に依存するであろう。適合された構造の選択は、計算的構造設計を利用し得る。タンパク質-タンパク質相互作用又はタンパク質-小分子相互作用の決定及び最適化は、表面プラズモン共鳴を使用して分子相互作用を検出するBIAcore(登録商標)などの技術を使用して調査することができる(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ; www.biacore.comも参照のこと)。

10

20

【0166】

一実施形態では、分析物は、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質である。アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質は、天然型であっても非天然型であってもよい。ポリペプチド又はタンパク質は、それらの中に合成又は修飾アミノ酸を含み得る。アミノ酸へのいくつかの異なるタイプの修飾が、当該技術分野で既知である。好適なアミノ酸及びその修飾は、上記である。標的分析物は、当該技術分野で利用可能な任意の方法によって修飾され得ることを理解されたい。

30

【0167】

別の実施形態では、分析物は、2つ以上のヌクレオチドを含む巨大分子と定義される核酸などのポリヌクレオチドである。核酸は、ナノ細孔配列決定に特に好適である。DNA及びRNA中の天然に存在する核酸塩基は、それらの物理的サイズによって区別され得る。核酸分子又は個々の塩基がナノ細孔のチャンネルを通過すると、塩基間のサイズの違いにより、チャンネルを通るイオン流が直接相関して低減する。イオン流の変動を記録することができる。イオン流の変動を記録するための好適な電氣的測定技法は、上で考察されている。好適な較正により、イオン流の特徴的な低減を使用して、チャンネルを通過する特定のヌクレオチド及び関連する塩基をリアルタイムで同定することができる。典型的なナノ細孔核酸配列決定では、ヌクレオチドによるチャンネルの部分的遮断のために、目的の核の配列の個々のヌクレオチドがナノ細孔のチャンネルを連続的に通過するにつれて、オープンチャンネルイオン流が低減する。上記の好適な記録技法を使用して測定されるのは、このイオン流の低減である。イオン流の低減は、どのヌクレオチドがチャンネルを通過するかを決定するための手段をもたらすチャンネルを通る既知のヌクレオチドについて測定されたイオン流の低減に合わせて較正することができ、したがって、順次行われる場合、ナノ細孔を通過する核酸のヌクレオチド配列を決定する方式が得られる。個々のヌクレオチドを正確に決定するために、典型的には、チャンネルを通るイオン流の低減が、狭窄(又は「リーディングヘッド」)を通過する個々のヌクレオチドのサイズに直接相関することが必要である。配列決定は、例えば、関連するポリメラーゼの作用を介して細孔を通して「挿通される

40

50

」無傷の核酸ポリマーに対して行われ得ることが理解されるであろう。代替的に、配列は、細孔に近接する標的核酸から連続的に除去されているヌクレオチド三リン酸塩基の通過によって決定され得る（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 2014/187924を参照のこと）。

【0168】

ポリヌクレオチド又は核酸は、任意のヌクレオチドの任意の組み合わせを含み得る。ヌクレオチドは、天然に存在しても人工であってもよい。ポリヌクレオチド中の1つ以上のヌクレオチドは、酸化されてもメチル化されてもよい。ポリヌクレオチド中の1つ以上のヌクレオチドは、損傷している場合がある。例えば、ポリヌクレオチドは、ピリミジンダイマーを含み得る。かかるダイマーは、典型的には、紫外線による損傷と関連しており、皮膚メラノーマの主な原因である。ポリヌクレオチド中の1つ以上のヌクレオチドは、例えば標識又はタグによって修飾され得、その好適な例は当業者に知られている。ポリヌクレオチドは、1つ以上のスペーサーを含み得る。ヌクレオチドは、典型的には、核酸塩基、糖、及び少なくとも1つのリン酸基を含有する。核酸塩基及び糖はヌクレオチドを形成する。核酸塩基は、典型的には、複素環式である。核酸塩基には、プリン及びピリミジン、並びにより具体的には、アデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）、ウラシル（U）、及びシトシン（C）が含まれるが、これらに限定されない。糖は、典型的には、ペントース糖である。ヌクレオチド糖には、リボース及びデオキシリボースが含まれるが、これらに限定されない。糖は、好ましくは、デオキシリボースである。ポリヌクレオチドは、好ましくは、以下のヌクレオチド：デオキシアデノシン（dA）、デオキシウリジン（dU）及び／又はチミジン（dT）、デオキシグアノシン（dG）、並びにデオキシシチジン（dC）を含む。ヌクレオチドは、典型的には、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドは、典型的には、一リン酸、二リン酸、又は三リン酸を含む。ヌクレオチドは、4個以上のリン酸、例えば、4又は5個のリン酸を含み得る。リン酸は、ヌクレオチドの5'又は3'側に結合され得る。ポリヌクレオチド中のヌクレオチドは、任意の様式で互いに結合され得る。ヌクレオチドは、典型的には、核酸と同様に、それらの糖及びリン酸基によって結合される。ヌクレオチドは、ピリミジンダイマーと同様に、それらの核酸塩基を介して接続され得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、好ましくは、二本鎖である。ポリヌクレオチドは、最も好ましくは、リボ核酸（RNA）又はデオキシリボ核酸（DNA）である。特に、ポリヌクレオチドを分析物として代替的に使用する該方法は、（i）ポリヌクレオチドの長さ、（ii）ポリヌクレオチドの同一性、（iii）ポリヌクレオチドの配列、（iv）ポリヌクレオチドの二次構造、及び（v）ポリヌクレオチドが修飾されているか否かから選択される1つ以上の特徴を決定することを含む。

【0169】

ポリヌクレオチドは、任意の長さ（i）であり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも400、又は少なくとも500ヌクレオチド又はヌクレオチド対の長さであり得る。ポリヌクレオチドは、1000ヌクレオチド長若しくはヌクレオチド対長以上、5000ヌクレオチド長若しくはヌクレオチド対長以上、又は10000ヌクレオチド長若しくはヌクレオチド対長以上であり得る。任意の数のポリヌクレオチドを調査することができる。例えば、本方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、100個以上のポリヌクレオチドの特徴評価に関し得る。2個以上のポリヌクレオチドが特徴評価される場合、それらは、異なるポリヌクレオチドであるか、又は同じポリヌクレオチドの2つの事例であり得る。ポリヌクレオチドは、天然に存在しても人工であってもよい。例えば、本方法を使用して、製造されたオリゴヌクレオチドの配列を検証することができる。本方法は、典型的には、インビトロで実行される。

【0170】

ヌクレオチドは任意の同一性（ii）を有し得、アデノシンーリン酸塩（AMP）、グ

アノシナーリン酸塩（GMP）、チミジナーリン酸塩（TMP）、ウリジナーリン酸塩（UMP）、5-メチルシチジナーリン酸塩、5-ヒドロキシメチルシチジナーリン酸塩、シチジナーリン酸塩（CMP）、環状アデノシナーリン酸塩（cAMP）、環状グアノシナーリン酸塩（cGMP）、デオキシアデノシナーリン酸塩（dAMP）、デオキシグアノシナーリン酸塩（dGMP）、デオキシチミジナーリン酸塩（dTMP）、デオキシウリジナーリン酸塩（dUMP）、デオキシシチジナーリン酸塩（dCMP）、及びデオキシメチルシチジナーリン酸塩が含まれ得るが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、好ましくは、AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP、dCMP、及びdUMPから選択される。ヌクレオチドは、脱塩基であり得る（すなわち、核酸塩基を欠く）。ヌクレオチドは、核酸塩基及び糖も欠き得る（すなわち、C3スパーサーである）。ヌクレオチドの配列（iii）は、ポリヌクレオチド株全体で、鎖の5'から3'方向に互いに結合した以下のヌクレオチドの連続的な同一性によって決定される。

10

【0171】

CsgG細孔及びCsgFペプチドを含む細孔は、ホモポリマーの分析に特に有用である。例えば、細孔を使用して、同一である2つ以上、例えば少なくとも3、4、5、6、7、8、9、又は10個の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドの配列を決定することができる。例えば、細孔を使用して、ポリA、ポリT、ポリG、及び／又はポリC領域を含むポリヌクレオチドを配列決定することができる。

【0172】

CsgG細孔狭窄は、配列番号3又は配列番号117の51、55、及び56位での残基からなる。CsgGのリーダーヘッド及びその狭窄変異体は、一般に鋭い。DNAが狭窄を通過しているとき、任意の時点でのDNAのおよそ5塩基と細孔のリーダーヘッドとの相互作用が電流シグナルを支配する。これらのより鋭いリーダーヘッドは、DNAの混合配列領域（A、T、G、及びCが混合されている場合）の読み取りに非常に良好であるが、DNA内にホモポリマー領域がある場合（例えば、ポリT、ポリG、ポリA、ポリC）、シグナルはフラットになり、情報を欠く。5個の塩基がCsgG及びその狭窄変異体のシグナルを支配するため、追加の滞留時間情報を使用せずに5より長い感光性ポリマーを識別することは困難である。しかしながら、DNAが第2のリーダーヘッドを通過している場合、より多くのDNA塩基が組み合わせられたリーダーヘッドと相互作用し、識別することができるホモポリマーの長さを増加させる。

20

30

【0173】

修飾Ddaヘリカーゼ

本発明は、修飾Ddaヘリカーゼを提供する。1つ以上の特異的修飾は、以下でより詳細に考察される。本発明による修飾は、以下に考察されるような1つ以上の置換を含む。

【0174】

Dda1993の位置55、114、156、177、210、221、350、及び358のうちの1つ以上

本発明は、Dda1993におけるアミノ酸位置55、114、156、177、210、221、350、及び358に対応する位置のうちの1つ以上が修飾又は置換されている、修飾DNA依存性ATPase（Dda）ヘリカーゼを提供する。Ddaヘリカーゼ、並びにDda1993における位置55、114、156、177、210、221、350、及び358に対応する位置は、以下でより詳細に考察される。位置55、114、156、及び177は、Dda1993の1Aドメインにおける。位置210及び221は、Dda1993の2Aドメインにおける。位置350及び358は、Dda1993のタワードメインにおける。本発明の修飾Ddaヘリカーゼは、（a）；（b）；（c）；（d）；（e）；（f）；（g）；（h）；（a）及び（b）；（a）及び（c）；（a）及び（d）；（a）及び（e）；（a）及び（f）；（a）及び（g）；（a）及び（h）；（b）及び（c）；（b）及び（d）；（b）及び（e）；（b）及び（f）；（b）及び（g）；（b）及び（h）；（c）及び（d）；（c）及び（e）；（c

40

50

[illegible]

(e)、(f)、及び(g) ; (c)、(e)、(f)、及び(h) ; (c)、(e)、
 (g)、及び(h) ; (c)、(f)、(g)、及び(h) ; (d)、(e)、(f)、
 及び(g) ; (d)、(e)、(f)、及び(h) ; (d)、(e)、(g)、及び(h)
) ; (d)、(f)、(g)、及び(h) ; (e)、(f)、(g)、及び(h) ; (a
)、(b)、(c)、(d)、及び(e) ; (a)、(b)、(c)、(d)、及び(f
) ; (a)、(b)、(c)、(d)、及び(g) ; (a)、(b)、(c)、(d)、
 及び(h) ; (a)、(b)、(c)、(e)、及び(f) ; (a)、(b)、(c)、
 (e)、及び(g) ; (a)、(b)、(c)、(e)、及び(h) ; (a)、(b)、
 (c)、(f)、及び(g) ; (a)、(b)、(c)、(f)、及び(h) ; (a)、
 (b)、(c)、(g)、及び(h) ; (a)、(b)、(d)、(e)、及び(f) ;
 (a)、(b)、(d)、(e)、及び(g) ; (a)、(b)、(d)、(e)、及び
 (h) ; (a)、(b)、(d)、(f)、及び(g) ; (a)、(b)、(d)、(f
)、及び(h) ; (a)、(b)、(d)、(g)、及び(h) ; (a)、(b)、(e
)、(f)、及び(g) ; (a)、(b)、(e)、(f)、及び(h) ; (a)、(b
)、(e)、(g)、及び(h) ; (a)、(b)、(f)、(g)、及び(h) ; (a
)、(c)、(d)、(e)、及び(f) ; (a)、(c)、(d)、(e)、及び(g
) ; (a)、(c)、(d)、(e)、及び(h) ; (a)、(c)、(d)、(f)、
 及び(g) ; (a)、(c)、(d)、(f)、及び(h) ; (a)、(c)、(d)、
 (g)、及び(h) ; (a)、(c)、(e)、(f)、及び(g) ; (a)、(c)、
 (e)、(f)、及び(h) ; (a)、(c)、(e)、(g)、及び(h) ; (a)、
 (c)、(f)、(g)、及び(h) ; (a)、(d)、(e)、(f)、及び(g) ;
 (a)、(d)、(e)、(f)、及び(h) ; (a)、(d)、(e)、(g)、及び
 (h) ; (a)、(d)、(f)、(g)、及び(h) ; (a)、(e)、(f)、(g
)、及び(h) ; (b)、(c)、(d)、(e)、及び(f) ; (b)、(c)、(d
)、(e)、及び(g) ; (b)、(c)、(d)、(e)、及び(h) ; (b)、(c
)、(d)、(f)、及び(g) ; (b)、(c)、(d)、(f)、及び(h) ; (b
)、(c)、(d)、(g)、及び(h) ; (b)、(c)、(e)、(f)、及び(g
) ; (b)、(c)、(e)、(f)、及び(h) ; (b)、(c)、(e)、(g)、
 及び(h) ; (b)、(c)、(f)、(g)、及び(h) ; (b)、(d)、(e)、
 (f)、及び(g) ; (b)、(d)、(e)、(f)、及び(h) ; (b)、(d)、
 (e)、(g)、及び(h) ; (b)、(d)、(f)、(g)、及び(h) ; (b)、
 (e)、(f)、(g)、及び(h) ; (c)、(d)、(e)、(f)、及び(g) ;
 (c)、(d)、(e)、(f)、及び(h) ; (c)、(d)、(e)、(g)、及び
 (h) ; (c)、(d)、(f)、(g)、及び(h) ; (c)、(e)、(f)、(g
)、及び(h) ; (d)、(e)、(f)、(g)、及び(h) ; (a)、(b)、(c
)、(d)、(e)、及び(f) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、及び(g
) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、及び(h) ; (a)、(b)、(c)、
 (d)、(f)、及び(g) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(f)、及び(h) ;
 (a)、(b)、(c)、(d)、(g)、及び(h) ; (a)、(b)、(c)、(e
)、(f)、及び(g) ; (a)、(b)、(c)、(e)、(f)、及び(h) ; (a
)、(b)、(c)、(e)、(g)、及び(h) ; (a)、(b)、(c)、(f)、
 (g)、及び(h) ; (a)、(b)、(d)、(e)、(f)、及び(g) ; (a)、
 (b)、(d)、(e)、(f)、及び(h) ; (a)、(b)、(d)、(e)、(g
)、及び(h) ; (a)、(b)、(d)、(f)、(g)、及び(h) ; (a)、(b
)、(e)、(f)、(g)、及び(h) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、
 及び(g) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、及び(h) ; (a)、(c)、
 (d)、(e)、(g)、及び(h) ; (a)、(c)、(d)、(f)、(g)、及び
 (h) ; (a)、(c)、(e)、(f)、(g)、及び(h) ; (a)、(d)、(e
)、(f)、(g)、及び(h) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、及び(g
) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、及び(h) ; (b)、(c)、(d)、

10

20

30

40

50

(e)、(g)、及び(h)；(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、及び(h)；
(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、及び(h)；(b)、(d)、(e)、(f)、
(g)、及び(h)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、及び(h)；(a)、
(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、及び(g)；(a)、(b)、(c)、
(d)、(e)、(f)、及び(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、
(f)、及び(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、及び(h)；(a)、
(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、及び(h)；(a)、(b)、(d)、
(e)、(f)、(g)、及び(h)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、
(f)、及び(h)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、及び(h)；又は
(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、及び(h)を含む、アミノ
酸位置(a) 55、(b) 114、(c) 156、(d) 177、(e) 210、(f)
221、(g) 350、及び(h) 358に対応する位置の任意の数及び組み合わせでの
修飾又は置換を含み得る。

10

【0175】

本発明は、Dda1993におけるアミノ酸位置114、177、350、及び358
に対応する位置のうちの1つ以上が修飾又は置換されている、修飾DNA依存性ATPase
(Dda)ヘリカーゼを提供する。Ddaヘリカーゼ、並びにDda1993における
位置114、177、350、及び358に対応する位置は、以下でより詳細に考察され
る。位置114及び177は、Dda1993の1Aドメインにおける。位置Y350
及びK358は、Dda1993のタワードメインにおける。本発明の修飾Ddaヘリカ
ーゼは、(a)；(b)；(c)；(d)；(a)及び(b)；(a)及び(c)；(a)
及び(d)；(b)及び(c)；(b)及び(d)；(c)及び(d)；(a)、(b)
(c)、及び(d)；又は(a)、(b)、(c)、及び(d)を含む、Dda1993
におけるアミノ酸位置(a) 114、(b) 177、(c) 350、及び(d) 358に
対応する位置の任意の数及び組み合わせでの修飾又は置換を含み得る。

20

【0176】

Dda1993におけるアミノ酸位置55に対応する位置は、好ましくは、D、E、K
、N、又はSで置換されている。Dda1993におけるアミノ酸位置114に対応する
位置は、好ましくは、K(T55K)で置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオ
チド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させ、精度を増加させる（
実施例5）。これらの置換はまた、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用さ
れる場合、正規化された速度分布を減少させる（実施例5）。

30

【0177】

Dda1993におけるアミノ酸位置114に対応する位置は、好ましくは、A、V、
I、L、M、F、Y、W、G、P、S、T、N、又はQで置換されている。Dda1993
におけるアミノ酸位置114に対応する位置は、好ましくは、A、G、I、L、M、P
、S、T、又はVで置換されている。Dda1993におけるアミノ酸位置114に対応
する位置は、好ましくは、G、L、S、又はTで置換されている。これらの置換は、ポリ
ヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少させる（実施例2）
。Dda1993におけるアミノ酸位置114に対応する位置は、好ましくは、A、I
、M、P、又はVで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評
価するために使用される場合、速度を増加させる（実施例2）。Dda1993における
アミノ酸位置114に対応する位置は、好ましくは、G(C11G)で置換されている。
この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少
させ、精度を増加させる（実施例2）。Dda1993におけるアミノ酸位置114に対
応する位置は、好ましくは、I又はPで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオ
チド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させ、精度を減少させる（
実施例2）。Dda1993におけるアミノ酸位置114に対応する位置は、好ましくは
、G、I、又はPで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評

40

50

価するために使用される場合、正規化された速度分布を減少させる（実施例 2）。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 1 4 に対応する位置は、最も好ましくは、I（C 1 1 4 I）で置換されている。

【0178】

D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 5 6 に対応する位置は、好ましくは、A、E、F、G、I、L、M、P、S、V、Y、D、K、又は N で置換されている。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 5 6 に対応する位置は、好ましくは、F（T 1 5 6 F）で置換されている。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させ、精度を増加させる（実施例 5）。この置換はまた、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、正規化された速度分布を減少させる（実施例 5）。

10

【0179】

D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 7 7 に対応する位置は、好ましくは、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、又は Y で置換されている。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 7 7 に対応する位置は、好ましくは、F、G、S、V、W、又は Y で置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少させる（実施例 2）。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 7 7 に対応する位置は、好ましくは、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、R、又は T で置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させる（実施例 2）。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 7 7 に対応する位置は、好ましくは、F、H、I、L、M、N、又は W で置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、精度及び正規化された速度分布を減少させる（実施例 2）。それらは、速度に対して異なる効果を有する（実施例 2）。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 7 7 に対応する位置は、好ましくは、N（K 1 7 7 N）で置換されている。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、精度を減少させ、正規化された速度分布を増加させる（実施例 2）。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 7 7 に対応する位置は、最も好ましくは、M（K 1 7 7 M）で置換されている。

20

【0180】

D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 2 1 0 に対応する位置は、好ましくは、D、E、K、S、N、R、H、又は Y で置換されている。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 2 1 0 に対応する位置は、好ましくは、R（T 2 1 0 R）、H（T 2 1 0 H）、又は K（T 2 1 0 K）で置換されている。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 2 1 0 に対応する位置は、好ましくは、K（T 2 1 0 K）で置換されている。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させ、精度を増加させる（実施例 5）。この置換はまた、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、正規化された速度分布を減少させる（実施例 5）。

30

【0181】

D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 2 2 1 に対応する位置は、好ましくは、D、K、E、Q、R、A、H、L、T、又は Y で置換されている。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 2 2 1 に対応する位置は、好ましくは、D（N 2 2 1 D）又は E（N 2 2 1 E）で置換されている。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 2 2 1 に対応する位置は、好ましくは、E（N 2 2 1 E）で置換されている。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させ、精度を増加させる（実施例 5）。この置換はまた、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、正規化された速度分布を減少させる（実施例 5）。

40

【0182】

D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 3 5 0 に対応する位置は、好ましくは、D、E、A、V、I、L、M、F、W、R、H、K、L、S、T、N、又は Q で置換されている。D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 3 5 0 に対応する位置は、好ましくは、I、F、W

50

、又はSで置換されている。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置350に対応する位置は、好ましくは、I又はS（Y350I又はY350S）で置換されている。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置350に対応する位置は、好ましくは、I（Y350I）で置換されている。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させ、精度及び正規化された速度分布を減少させる（実施例3）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置350に対応する位置は、好ましくは、I又はS（Y350I又はY350S）で置換されている。これらの置換は、本発明の細孔複合体とともに使用される場合、実施例4に示される効果を有する。

【0183】

D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置350に対応する位置は、好ましくは、A、D、E、G、K、L、N、Q、R、T、V、H、又はMで置換されている。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置350に対応する位置は、好ましくは、D（Y350D）又はE（Y350E）で置換されている。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置350に対応する位置は、好ましくは、E（Y350E）で置換されている。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させ、精度を増加させる（実施例5）。この置換はまた、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、正規化された速度分布を減少させる（実施例5）。

10

【0184】

D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、D、E、A、V、I、L、M、F、Y、W、R、H、L、S、T、N、又はQで置換されている。

20

【0185】

D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、E、I、L、又はMで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少させる（実施例2）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、I又はMで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少させ、精度を増加させる（実施例2）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、置換されたM（K358M）である。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少させ、精度及び正規化された速度分布を増加させる（実施例2）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、I（K358I）で置換されている。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度及び正規化された速度分布を減少させ、精度を増加させる（実施例2）。実施例2は、C s g Fペプチドを含まないC s g G細孔を使用する。

30

【0186】

D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、A、E、F、I、M、又はSで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、精度を増加させる（実施例3）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、A、E、F、I、又はMで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少させる（実施例3）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、置換されたS（K358S）である。この置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を増加させる（実施例3）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、A、E、I、M、又はSで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、正規化された速度分布を減少させる（実施例3）。D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、（K358F）で置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、正規化された速度分布を増加させる（実施例3）。実施例3は、C s g Fペプチドを含有するC s g G細孔複合体を使用する。

40

50

【0187】

D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、好ましくは、I、L、又はQで置換されている。これらの置換は、ポリヌクレオチド分析物を特徴評価するために使用される場合、速度を減少させ、精度及び正規化された速度分布を増加させる（実施例4）。実施例4は、本発明の細孔複合体を使用する。

【0188】

D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置358に対応する位置は、最も好ましくは、I（K358I）で置換されている。

【0189】

本発明の修飾ヘリカーゼは、以下に考察される修飾、変異、又は置換のいずれかを更に含み得る。

【0190】

本発明に従って修飾されているD d aヘリカーゼは、配列番号118～133のいずれかであり得る。配列番号118は、D d a 1 9 9 3である。修飾ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号118～133のいずれかのバリエーションを含む。バリエーションは、以下に並べる配列番号118～113のいずれかに対する配列相同性／同一性の任意の%を有し得る。

以下の表4は、本発明に従って修飾され得る好ましいD d aヘリカーゼを要約する。

10

20

30

40

50

【表 4】

Dda 相同体 (配列番号)		生息地	Uniprot	長さ	1993 に対 する配列 同一性/%	D/E 対 K/R ア ミノ酸 の数	#C
Rma-DSM (配列番号 119)	Rhodothermus marinus	穏やかな好塩菌、 中程度の好熱菌 >65℃	D0MKQ2	678	21	-84/+85	2
Csp (配列番号 120)	Cyanothece sp. (株 ATCC 51142)	海洋細菌	B1X365	496	24	-76/+76	5
Sru (配列番号 121)	Salinibacter ruber	非常に好塩性、 35~45℃	Q2S429	421	26	-78/+54	3
Sgo (配列番号 122)	Sulfurimonas gotlandica GD1	生息地:熱水噴出 孔、沿岸堆積物	B6BJ43	500	27	-72/+64	2
Vph12B8 (配列番号 123)	Vibrio ファージヘンリ エット (henriette)12B8	塩水、胃腸炎 (stomach bug)中に 見出される宿主	M4MBC3	450	27	-62/+47	6
Vph (配列番号 124)	Vibrio ファージ phi-pp2	塩水、胃腸炎中に 見出される宿主	I6XGX8	421	39	-55/+45	5
Aph65 (配列番号 125)	Aeromonas ファージ 65	新鮮汽水、胃腸炎 中に見出される 宿主	E5DRP6	434	40	-57/+48	4
AphCC2 (配列番号 126)	Aeromonas ファージ CC2	新鮮汽水、胃腸炎 中に見出される 宿主	I6XH64	420	41	-53/+44	4
Cph (配列番号 127)	Cronobacter ファージ vB CsaM GAP161	腸内細菌科の宿主 メンバー	K4FBD0	443	42	-59/+57	4
Kph (配列番号 128)	Klebsiella ファージ KP15	腸内細菌科の宿主 メンバー	D5JF67	442	44	-59/+58	5
SphIME13 (配列番号 129)	Stenotrophomonas ファージ IME13	土壌中に見出され る宿主	J7HXT5	438	51	-58/+59	7
AphAc42 (配列番号 130)	Acinetobacter ファージ Ac42	土壌中に見出され る宿主	E5EYE6	442	59	-53/+49	9
SphSP18 (配列番号 131)	Shigella ファージ SP18	腸内細菌科の宿主 メンバー	E3SFA5	442	59	-55/+55	9
Yph (配列番号 132)	Yersinia ファージ phiR1-RT	腸内細菌科の宿主 メンバー	I7J3V8	439	64	-52/+52	7
SphS16 (配列番号 133)	Salmonella ファージ S16	腸内細菌科の宿主 メンバー	M1EA88	441	72	-56/+55	5
1993 (配列番号 118)	Enterobacteria ファージ T4	腸内細菌科の宿主 メンバー	P32270	439	100	-57/+58	5

【0191】

表 5 は、配列番号 118 における位置 40、55、114、156、177、210、221、350、及び 358 に対応する配列番号 119～133 におけるアミノ酸を示す。

10

20

30

40

【表 5】

配列 番号									
118	T40	T55	C114	T156	K177	T210	N221	Y350	K358
119	L40	I54	V124 又 は D125	P187	Y211	A255	Q266	L378	L386
120	F98	Y112	I180 又は D171	I223	Q238	I274	Q285	E407	E415
121	Y43	C57	V119 又 は D120	P160	H173	A207	S218	R334 又 は R343	A340
122	F56	F80	V147 又 は D148	E191	V205	T245	D256	A367	S375
123	T46	K59	I125 又は D126	E165	V194	I234	S245	E354 又 は E256	A362
124	F33	K47	V107 又 は E108	P147	V166	L200	T211	E332	V340
125	F38	L51	V110 又 は E111	Q150	M171	Y205	S216	L339	E347
126	F25	L38	I97 又は E98	P137	M158	Y192	S203	A326 又 は A337	E334 又 は E345
127	T42	S57	V119 又 は E120	R160	M181	F213	Q224	D351 又 は D326	Y359 又 は Y334
128	T42	S57	V119 又 は E120	I160	M181 又 は M182	M213	R224	E350	Y358
129	T40	Q55	C114 又 は D115	T155	K176	-	K218	Y349 又 は Y347	I357 又は I355
130	T46	R61	C120 又 は D121	E162	M183	T216	K227	N355 又 は N353	K363 又 は K361
131	T42	M57	C116 又 は D117	Q158	M179	T212	N223	P352 又は P355	K360 又 は K363
132	T41	T56	C115 又 は D116	E157	K178	N211	R222	T352 又 は T350	K360 又 は K358
133	T41	T56	C115 又 は D116	E157	M178	T211	Q222	N351	K359

10

20

30

40

【0192】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、以下のような（a）～（h）のうちの1つ以上を含む配列番号118のバリエーションを含む。

（a）

T55D、T55E、T55K、T55N、又はT55S、又は
T55K。

（b）

C114A、C114V、C114I、C114L、C114M、C114F、C114Y、
C114W、C114G、C114P、C114S、C114T、C114N、又は
C114Q、

50

C 1 1 4 A、C 1 1 4 G、C 1 1 4 I、C 1 1 4 L、C 1 1 4 M、C 1 1 4 P、C 1 1 4 S、C 1 1 4 T、又はC 1 1 4 V、

C 1 1 4 G、C 1 1 4 L、C 1 1 4 S、又はC 1 1 4 T、

C 1 1 4 A、C 1 1 4 I、C 1 1 4 M、C 1 1 4 P、又はC 1 1 4 V

C 1 1 G、

C 1 1 4 I又はC 1 1 4 P

C 1 1 4 G、C 1 1 4 I、又はC 1 1 4 P、又は

C 1 1 4 I、

(c)

T 1 5 6 A、T 1 5 6 E、T 1 5 6 F、T 1 5 6 G、T 1 5 6 I、T 1 5 6 L、T 1 5 6 M、T 1 5 6 P、T 1 5 6 S、T 1 5 6 V、T 1 5 6 Y、T 1 5 6 D、T 1 5 6 K、又は
T 1 5 6 N、又は

T 1 5 6 F、

(d)

K 1 7 7 D、K 1 7 7 E、K 1 7 7 F、K 1 7 7 G、K 1 7 7 H、K 1 7 7 I、K 1 7 7 L、K 1 7 7 M、K 1 7 7 N、K 1 7 7 Q、K 1 7 7 R、K 1 7 7 S、K 1 7 7 T、K 1 7 7 V、K 1 7 7 W、又はK 1 7 7 Y、

K 1 7 7 F、K 1 7 7 G、K 1 7 7 S、K 1 7 7 V、K 1 7 7 W、又はK 1 7 7 Y、

K 1 7 7 D、K 1 7 7 E、K 1 7 7 G、K 1 7 7 H、K 1 7 7 I、K 1 7 7 L、K 1 7 7 M、K 1 7 7 N、K 1 7 7 Q、K 1 7 7 R、又はK 1 7 7 T、

K 1 7 7 F、K 1 7 7 H、K 1 7 7 I、K 1 7 7 L、K 1 7 7 M、K 1 7 7 N、又はK 1 7 7 W、

K 1 7 7 N、又は

K 1 7 7 M、

(e)

T 2 1 0 D、T 2 1 0 E、T 2 1 0 K、T 2 1 0 S、T 2 1 0 N、T 2 1 0 R、T 2 1 0 H、又はT 2 1 0 Y、

T 2 1 0 R、T 2 1 0 H、又はT 2 1 0 Y、又は

T 2 1 0 K、

(f)

N 2 2 1 D、N 2 2 1 K、N 2 2 1 E、N 2 2 1 Q、N 2 2 1 R、N 2 2 1 A、N 2 2 1 H、N 2 2 1 L、N 2 2 1 T、又はN 2 2 1 Y、

N 2 2 1 D又はN 2 2 1 E、又は

N 2 2 1 E、

(g)

Y 3 5 0 D、Y 3 5 0 E、Y 3 5 0 A、Y 3 5 0 V、Y 3 5 0 I、Y 3 5 0 L、Y 3 5 0 M、Y 3 5 0 F、Y 3 5 0 W、Y 3 5 0 R、Y 3 5 0 H、Y 3 5 0 K、Y 3 5 0 L、Y 3 5 0 S、Y 3 5 0 T、Y 3 5 0 N、又はY 3 5 0 Q、

Y 3 5 0 I又はY 3 5 0 S、

Y 3 5 0 I、

Y 3 5 0 S、

Y 3 5 0 I、Y 3 5 0 F、Y 3 5 0 W、又はY 3 5 0 S、

Y 3 5 0 A、Y 3 5 0 D、Y 3 5 0 E、Y 3 5 0 G、Y 3 5 0 K、Y 3 5 0 L、Y 3 5 0 N、Y 3 5 0 Q、Y 3 5 0 R、Y 3 5 0 T、Y 3 5 0 V、Y 3 5 0 H、又はY 3 5 0 M、

Y 3 5 0 D又はY 3 5 0 E、又は

Y 3 5 0 E、及び

(h)

K 3 5 8 D、K 3 5 8 E、K 3 5 8 A、K 3 5 8 V、K 3 5 8 I、K 3 5 8 L、K 3 5 8 M、K 3 5 8 F、K 3 5 8 Y、K 3 5 8 W、K 3 5 8 R、K 3 5 8 H、K 3 5 8 L、K 3 5 8 S、K 3 5 8 T、K 3 5 8 N、又はK 3 5 8 Q、

K 3 5 8 E、K 3 5 8 I、K 3 5 8 L、又は K 3 5 8 M、
K 3 5 8 I 又は K 3 5 8 M、
K 3 5 8 M、
K 3 5 8 I、
K 3 5 8 A、K 3 5 8 E、K 3 5 8 F、K 3 5 8 I、K 3 5 8 M、又は K 3 5 8 S、
K 3 5 8 A、K 3 5 8 E、K 3 5 8 F、K 3 5 8 I、又は K 3 5 8 M、
K 3 5 8 S、
K 3 5 8 A、K 3 5 8 E、K 3 5 8 I、K 3 5 8 M、又は K 3 5 8 S、
K 3 5 8 F、
K 3 5 8 I、K 3 5 8 L、又は K 3 5 8 Q、又は
K 3 5 8 I。

10

バリエントは、上記に並べられるような (a) ~ (h) の任意の組み合わせ及び順列を含み得る。

【0193】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、以下のような (a)、(b)、(c)、及び (d) のうちの1つ以上を含む配列番号118のバリエントを含む。

(a)

C 1 1 4 A、C 1 1 4 V、C 1 1 4 I、C 1 1 4 L、C 1 1 4 M、C 1 1 4 F、C 1 1 4 Y、C 1 1 4 W、C 1 1 4 G、C 1 1 4 P、C 1 1 4 S、C 1 1 4 T、C 1 1 4 N、又は C 1 1 4 Q、
C 1 1 4 A、C 1 1 4 G、C 1 1 4 I、C 1 1 4 L、C 1 1 4 M、C 1 1 4 P、C 1 1 4 S、C 1 1 4 T、又は C 1 1 4 V、
C 1 1 4 G、C 1 1 4 L、C 1 1 4 S、又は C 1 1 4 T、
C 1 1 4 A、C 1 1 4 I、C 1 1 4 M、C 1 1 4 P、又は C 1 1 4 V
C 1 1 G、
C 1 1 4 I 又は C 1 1 4 P
C 1 1 4 G、C 1 1 4 I、又は C 1 1 4 P、又は
C 1 1 4 I、

20

(b)

K 1 7 7 D、K 1 7 7 E、K 1 7 7 F、K 1 7 7 G、K 1 7 7 H、K 1 7 7 I、K 1 7 7 L、K 1 7 7 M、K 1 7 7 N、K 1 7 7 Q、K 1 7 7 R、K 1 7 7 S、K 1 7 7 T、K 1 7 7 V、K 1 7 7 W、又は K 1 7 7 Y、
K 1 7 7 F、K 1 7 7 G、K 1 7 7 S、K 1 7 7 V、K 1 7 7 W、又は K 1 7 7 Y、
K 1 7 7 D、K 1 7 7 E、K 1 7 7 G、K 1 7 7 H、K 1 7 7 I、K 1 7 7 L、K 1 7 7 M、K 1 7 7 N、K 1 7 7 Q、K 1 7 7 R、又は K 1 7 7 T、
K 1 7 7 F、K 1 7 7 H、K 1 7 7 I、K 1 7 7 L、K 1 7 7 M、K 1 7 7 N、又は K 1 7 7 W、
K 1 7 7 N、又は
K 1 7 7 M、

30

(c)

Y 3 5 0 D、Y 3 5 0 E、Y 3 5 0 A、Y 3 5 0 V、Y 3 5 0 I、Y 3 5 0 L、Y 3 5 0 M、Y 3 5 0 F、Y 3 5 0 W、Y 3 5 0 R、Y 3 5 0 H、Y 3 5 0 K、Y 3 5 0 L、Y 3 5 0 S、Y 3 5 0 T、Y 3 5 0 N、又は Y 3 5 0 Q、
Y 3 5 0 I 又は Y 3 5 0 S、
Y 3 5 0 I、又は
Y 3 5 0 S、及び

40

(d)

K 3 5 8 D、K 3 5 8 E、K 3 5 8 A、K 3 5 8 V、K 3 5 8 I、K 3 5 8 L、K 3 5 8 M、K 3 5 8 F、K 3 5 8 Y、K 3 5 8 W、K 3 5 8 R、K 3 5 8 H、K 3 5 8 L、K 3 5 8 S、K 3 5 8 T、K 3 5 8 N、又は K 3 5 8 Q、

50

K 3 5 8 E、K 3 5 8 I、K 3 5 8 L、又はK 3 5 8 M、
K 3 5 8 I又はK 3 5 8 M、
K 3 5 8 M、
K 3 5 8 I、
K 3 5 8 A、K 3 5 8 E、K 3 5 8 F、K 3 5 8 I、K 3 5 8 M、又はK 3 5 8 S、
K 3 5 8 A、K 3 5 8 E、K 3 5 8 F、K 3 5 8 I、又はK 3 5 8 M、
K 3 5 8 S、
K 3 5 8 A、K 3 5 8 E、K 3 5 8 I、K 3 5 8 M、又はK 3 5 8 S、
K 3 5 8 F、
K 3 5 8 I、K 3 5 8 L、又はK 3 5 8 Q、又は
K 3 5 8 I。

10

【0194】

バリエーションは、(a) ; (b) ; (c) ; (d) ; (a) 及び (b) ; (a) 及び (c) ; (a) 及び (d) ; (b) 及び (c) ; (b) 及び (d) ; (c) 及び (d) ; (a) 、 (b) 、 及び (c) ; (a) 、 (b) 、 及び (d) ; (a) 、 (c) 、 及び (d) ; (b) 、 (c) 、 及び (d) ; 又は (a) 、 (b) 、 (c) 、 及び (d) を含み得る。

【0195】

配列番号118の好ましいバリエーションは、以下を含む。C 1 1 4 I ; K 1 7 7 M ; Y 3 5 0 I ; K 3 5 8 I ; C 1 1 4 I 及び K 1 7 7 M ; C 1 1 4 I 及び Y 3 5 0 I ; C 1 1 4 I 及び K 3 5 8 I ; K 1 7 7 M 及び Y 3 5 0 I ; K 1 7 7 M 及び K 3 5 8 I ; Y 3 5 0 I 及び K 3 5 8 I ; C 1 1 4 I 、 K 1 7 7 M 、 及び Y 3 5 0 I ; C 1 1 4 I 、 K 1 7 7 M 、 及び K 3 5 8 I ; C 1 1 4 I 、 Y 3 5 0 I 、 及び K 3 5 8 I ; K 1 7 7 M 、 Y 3 5 0 I 、 及び K 3 5 8 I ; 又は C 1 1 4 I 、 K 1 7 7 M 、 Y 3 5 0 I 、 及び K 3 5 8 I 。

20

【0196】

ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションを含み、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置55、114、156、177、210、221、350、及び358に対応する位置のうちの1つ以上は、上記で定義されるように修飾又は置換されている(特定の置換を含む)。D d a 1 9 9 3における位置55、114、156、177、210、221、350、及び358のうちの1つ以上の様々な組み合わせ及び順列は、(a) ~ (h) を参照して上記に定義される。

30

【0197】

ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションを含み、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置114、177、350、及び358に対応する位置のうちの1つ以上は、上記で定義されるように修飾又は置換されている(特定の置換を含む)。D d a 1 9 9 3における位置114、177、350、及び358のうちの1つ以上の様々な組み合わせ及び順列は、(a) ~ (d) を参照して上記に定義される。

40

【0198】

ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションを含み、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置114、177、及び358に対応する位置のうちの1つ以上は、上記で定義されるように修飾又は置換されている(特定の置換を含む)。

【0199】

D d a 1 9 9 3における位置40

本発明の修飾ヘリカーゼのうちのいずれかは、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置40に対応する位置に修飾又は置換を更に含み得る。位置40又は対応する位置は、A、V、I、L、M、F、Y、又はWとして置換され得る。D d a 1 9 9 3における位置T 4 0

50

に対応する位置は、上記の表 5 に示される。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、上記に並べる修飾／置換に加えて、T 4 0、例えば、T 4 0 A、T 4 0 V、T 4 0 I、T 4 0 L、T 4 0 M、T 4 0 F、T 4 0 Y、又は T 4 0 W での置換を更に含む、配列番号 1 1 8 のバリエーションを含む。置換は、好ましくは、T 4 0 Y である。

【0200】

本発明は、D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 4 0 に対応する位置が修飾又は置換されている、修飾 DNA 依存性 A T P a s e (D d a) ヘリカーゼを提供する。位置 T 4 0 は、D d a 1 9 9 3 のタワードメインにおける。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、T 4 0、例えば、T 4 0 A、T 4 0 V、T 4 0 I、T 4 0 L、T 4 0 M、T 4 0 F、T 4 0 Y、又は T 4 0 W に置換を含む、配列番号 1 1 8 のバリエーションを含む。置換は、好ましくは、T 4 0 Y である。本発明の修飾 D d a ヘリカーゼは、アミノ酸位置 (a) 5 5、(b) 1 1 4、(c) 1 5 6、(d) 1 7 7、(e) 2 1 0、(f) 2 2 1、(g) 3 5 0、及び (h) 3 5 8 に対応する位置のうちの 1 つ以上に修飾又は置換を更に含み得、上記に並べる (a) ~ (h) の組み合わせ及び順列のいずれかを含む。本発明の修飾 D d a ヘリカーゼは、(a) ; (b) ; (c) ; (d) ; (a) 及び (b) ; (a) 及び (c) ; (a) 及び (d) ; (b) 及び (c) ; (b) 及び (d) ; (c) 及び (d) ; (a)、(b)、及び (c) ; (a)、(b)、及び (d) ; (a)、(c)、及び (d) ; (b)、(c)、及び (d) ; 又は (a)、(b)、(c)、及び (d) を含む、D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 (a) 1 1 4、(b) 1 7 7、(c) 3 5 0、及び (d) 3 5 8 に対応する位置のうちの 1 つ以上に修飾又は置換を更に含み得る。ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号 1 1 9、1 2 0、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、又は 1 3 3 のバリエーションを含み、D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 4 0 に対応する位置は、上記で定義されるように修飾又は置換されている (特定の置換を含む)。

【0201】

本発明の修飾ヘリカーゼは、以下に考察される修飾、置換、修飾の組み合わせ、又は置換の組み合わせのいずれかを更に含み得る。

【0202】

本発明の他のヘリカーゼ

本発明はまた、単独で、以下に考察される修飾、置換、修飾の組み合わせ、又は置換の組み合わせのいずれかを有する修飾 DNA 依存性 A T P a s e (D d a) ヘリカーゼも提供する。言い換えれば、本発明のこれらのヘリカーゼは、必ずしも、D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 4 0、5 5、1 1 4、1 5 6、1 7 7、2 1 0、2 2 1、3 5 0、及び 3 5 8 のいずれか、又は D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 4 0、1 1 4、3 5 0、1 7 7、及び K 3 5 8 のいずれかに対応する位置に置換を有するわけではない。本発明のかかる修飾ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号 1 1 8 ~ 1 3 3 のいずれかのバリエーションである。バリエーションは、以下に並べる配列番号 1 1 8 ~ 1 3 3 のいずれかに対する配列同一性／同一性の任意の % を有し得る。

【0203】

分析物の特徴評価における D d a ヘリカーゼの使用は、W O 2 0 1 5 / 0 5 5 9 8 1、W O 2 0 1 5 / 1 6 6 2 7 6、及び W O 2 0 1 6 / 0 5 5 7 7 7 (全て、参照により組み込まれる) に記載されている。

【0204】

本発明の修飾ヘリカーゼは、膜貫通細孔に対する、例えば、膜貫通細孔を通る標的分析物のより一貫した移動を提供し、これは精度の向上につながる。ヘリカーゼは、好ましくは、ポリヌクレオチドなどの標的分析物が、細孔に対して、例えば、細孔を通して移動する際に、1 つの k - m e r から別の k - m e r へ、又は k - m e r から k - m e r へのより一貫した移動を提供する。ヘリカーゼは、標的ポリヌクレオチドなどの標的分析物が、よりスムーズに膜貫通細孔に対して、例えば、膜貫通細孔を通して移動することを可能にする。ヘリカーゼは、好ましくは、膜貫通細孔に対する、例えば、膜貫通細孔を通る標的

ポリヌクレオチドなどの標的分析物のより規則的な、又は不規則性の少ない移動を提供する。

【0205】

修飾（複数可）は、典型的には、修飾のないヘリカーゼと比較して、精度を、少なくとも0.1%、少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%増加させる。

【0206】

ポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼの能力は、実施例に記載されるように決定することができる。

【0207】

修飾ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する。ポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼの能力は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用してアッセイすることができる。例えば、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドと接触され得、ポリヌクレオチドの位置は、標準的な方法を使用して決定され得る。ポリヌクレオチドの移動を制御する修飾ヘリカーゼの能力は、典型的には、以下に記載されるものなどのナノ細孔システムで、特に実施例に記載されるようにアッセイされる。

【0208】

本発明の修飾ヘリカーゼは、単離、実質的に単離、精製、又は実質的に精製され得る。ヘリカーゼは、それが脂質、ポリヌクレオチド、細孔モノマー、又は他のタンパク質などの任意の他の構成要素を完全に含まない場合、単離又は精製されている。ヘリカーゼは、それが、その意図される使用に干渉しない担体又は希釈剤と混合されている場合、実質的に単離されている。例えば、ヘリカーゼは、それが、10%未満、5%未満、2%未満、又は1%未満の他の構成要素、例えば、脂質、ポリヌクレオチド、細孔モノマー、又は他のタンパク質を含む形態で存在する場合、実質的に単離されているか、又は実質的に精製されている。

【0209】

Ddaヘリカーゼ

本発明に従い、任意のDdaヘリカーゼが修飾され得る。好ましいDdaヘリカーゼは、以下に考察され、WO2015/055981、WO2015/166276、及びWO2016/055777（全て、参照により組み込まれる）に記載されている。

【0210】

Ddaヘリカーゼは、典型的には、以下の5個のドメインを含む：1A（RecA様モーター）ドメイン、2A（RecA様モーター）ドメイン、タワードメイン、ピンドメイン、及びフックドメイン（Xiaoping He et al., 2012, Structure; 20:1189-1200）。ドメインは、タンパク質モデリング、結晶状態におけるタンパク質のX線回折測定（Rupp B (2009). Biomolecular Crystallography: Principles, Practice and Application to Structural Biology. New York: Garland Science.）、溶液中のタンパク質の核磁気共鳴（NMR）分光法（Mark Rance; Cavanagh, John; Wayne J. Fairbrother; Arthur W. Hunt III; Skelton, N Nicholas J. (2007). Protein NMR spectroscopy: principles and practice (2nd ed.). Boston: Academic Press.）、又は凍結水和状態におけるタンパク質の極低温電子顕微鏡検査（van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova EV, Finn R, Pape T, Cohen D, Stark H, Schmidt R, Schatz M, Patwardhan A (2000). "Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution." Q Rev Biophys

10

20

30

40

50

． 3 3 : 3 0 7 - 6 9) を使用して同定され得る。上述した方法によって決定されたタンパク質の構造情報は、タンパク質バンク (P D B) データベースから公に入手可能である。

【 0 2 1 1 】

D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 5 5 、 1 1 4 、 1 5 6 、 1 7 7 、 2 1 0 、 2 2 1 、 3 5 0 、 及び 3 5 8 に対応する 1 つ以上の位置での修飾若しくは置換、 D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 1 4 、 1 7 7 、 3 5 0 、 及び 3 5 8 に対応する 1 つ以上の位置での修飾若しくは置換、 D d a 1 9 9 3 におけるアミノ酸位置 1 1 4 、 1 7 7 、 及び 3 5 0 に対応する 1 つ以上の位置での修飾若しくは置換、並びに／又は D d a 1 9 9 3 における位置 4 0 に対応する位置での修飾若しくは置換に加えて、本発明の修飾ヘリカーゼは、好ましくは、以下の追加の修飾、置換、修飾の組み合わせ、又は置換の組み合わせのいずれかを含む。上で説明したように、本発明はまた、単独で (すなわち、必ずしも、 D d a 1 9 9 3 の位置 4 0 、 5 5 、 1 1 4 、 1 5 6 、 1 7 7 、 2 1 0 、 2 2 1 、 3 5 0 、 及び 3 5 8 のいずれか、又は D d a 1 9 9 3 の位置 4 0 、 1 1 4 、 1 7 7 、 3 5 0 、 及び 3 5 8 のいずれかに置換を有するわけではない) 、 以下に並べる修飾、置換、修飾の組み合わせ、又は置換の組み合わせのいずれかを有する修飾ヘリカーゼも提供する。

10

【 0 2 1 2 】

本発明の修飾

本発明のヘリカーゼは、膜貫通細孔と相互作用する少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されているヘリカーゼであり得る。任意の数のアミノ酸、例えば、 1 個以上、 2 個以上、 3 個以上、 4 個以上、 5 個以上、又は 6 個以上のアミノ酸が置換され得る。 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 個以上のアミノ酸が置換され得る。膜貫通細孔と相互作用するアミノ酸は、上で考察されるように、タンパク質モデリングを使用して同定することができる。

20

【 0 2 1 3 】

塩基及び／又は糖の相互作用

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、一本鎖 DNA (s s DNA) 中の 1 つ以上のヌクレオチドの糖及び／又は塩基と相互作用する少なくとも 1 つのアミノ酸が、より大きな側鎖 (R 基) を含むアミノ酸で置換されているヘリカーゼである。任意の数のアミノ酸、例えば、 1 個以上、 2 個以上、 3 個以上、 4 個以上、 5 個以上、又は 6 個以上のアミノ酸が置換され得る。各アミノ酸は、塩基、糖、又は塩基、及び糖と相互作用し得る。一本鎖 DNA 中の 1 つ以上のヌクレオチドの糖及び／又は塩基と相互作用するアミノ酸は、上で考察されるように、タンパク質モデリングを使用して同定することができる。

30

【 0 2 1 4 】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号 1 1 8 のバリエーションを含み、 s s DNA 中の 1 つ以上のヌクレオチドの糖及び／又は塩基と相互作用する少なくとも 1 つのアミノ酸は、 H 8 2 、 N 8 8 、 P 8 9 、 F 9 8 、 D 1 2 1 、 V 1 5 0 、 P 1 5 2 、 F 2 4 0 、 F 2 7 6 、 S 2 8 7 、 H 3 9 6 、 及び Y 4 1 5 のうちの少なくとも 1 つである。これらの番号は、配列番号 1 1 8 における関連する位置に対応し、配列番号 1 1 8 と比較して、 1 つ以上のアミノ酸が挿入又は欠失しているバリエーションの場合に、変更される必要があり得る。当業者は、上で考察されるように、バリエーションにおける対応する位置を決定することができる。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号 1 1 8 のバリエーションを含み、 s s DNA 中の 1 つ以上のヌクレオチドの糖及び／又は塩基と相互作用する少なくとも 1 つのアミノ酸は、 F 9 8 であり、 1 つ以上の H 8 2 、 N 8 8 、 P 8 9 、 D 1 2 1 、 V 1 5 0 、 P 1 5 2 、 F 2 4 0 、 F 2 7 6 、 S 2 8 7 、 H 3 9 6 、 及び Y 4 1 5 、 例えば、 F 9 8 / H 8 2 、 F 9 8 / N 8 8 、 F 9 8 / P 8 9 、 F 9 8 / D 1 2 1 、 F 9 8 / V 1 5 0 、 F 9 8 / P 1 5 2 、 F 9 8 / F 2 4 0 、 F 9 8 / F 2 7 6 、 F 9 8 / S 2 8 7 、 又は F 9 8 / H 3 9 6 である。

40

【 0 2 1 5 】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号 1 1 9 、 1 2 0 、 1 2 1 、 1 2 2 、 1 2

50

3、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションであり、ssDNA中の1つ以上のヌクレオチドの糖及び／又は塩基と相互作用する少なくとも1つのアミノ酸は、配列番号118におけるH82、N88、P89、F98、D121、V150、P152、F240、F276、S287、H396、及びY415に対応するアミノ酸のうちの少なくとも1つである。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションを含み、ssDNA中の1つ以上のヌクレオチドの糖及び／又は塩基と相互作用する少なくとも1つのアミノ酸は、配列番号118におけるF98に対応するアミノ酸であり、配列番号118におけるH82、N88、P89、D121、V150、P152、F240、F276、S287、H396、及びY415に対応するアミノ酸のうちの1つ以上、例えば、F98／H82、F98／N88、F98／P89、F98／D121、F98／V150、F98／P152、F98／F240、F98／F276、F98／S287、又はF98／H396に対応するアミノ酸である。

表6は、配列番号118におけるH82、N88、P89、F98、D121、V150、P152、F240、F276、S287、H396、及びY415に対応する、配列番号119～133におけるアミノ酸を示す。

【表6】

配列番号												
118	H82	N88	P89	F98	D121	V150	P152	F240	F276	S287	H396	Y415
119	H81	F87	D88	S105	S131	V181	Q183	R274	H313	G314	H428	H447
120	A144	Q150	P151	G158	N187	V217	K218	W307	F344	K355	H455	H473
121	H87	R93	L94	G100	G126	V154	N155	Y240	Y277	G280	H377	R395
122	H112	K118	P119	E128	G154	I185	N187	Y273	F309	K310	H414	H433
123	H93	V99	M100	D106	N132	I159	Q160	Y267	M302	G303	H400	K419
124	H74	H80	P81	F90	D114	V143	H145	Y230	M266	P273	H378	Y397
125	H78	H84	P85	F94	S117	E147	A149	Y235	M271	I279	H387	Y406
126	H65	H71	P72	F81	S104	V133	H135	F222	M258	I266	H373	Y392
127	H84	S90	P91	F100	D126	V155	A157	Y243	V279	T290	H399	A418
128	H84	S90	P91	F100	D126	V155	T157	Y243	V279	V290	H398	A417
129	Q82	N88	P89	F98	T121	V150	E152	Y237	M274	K285	H393	Q412
130	H88	N94	P95	F104	D127	V156	P158	F246	I282	S293	H399	K418
131	H84	N90	P91	F100	D123	V152	P154	Y242	M278	S289	H399	M418
132	H83	N89	P90	F99	D122	V151	P153	Y241	M277	H288	H396	M415
133	H83	N89	P90	F99	D122	V151	P153	F241	M277	H288	H397	M416

【0216】

ssDNA中の1つ以上のヌクレオチドの糖及び／又は塩基と相互作用する少なくとも1つのアミノ酸は、好ましくは、ssDNA中のヌクレオチド間にインターカレートする

少なくとも1つのアミノ酸である。ssDNA中のヌクレオチド間にインターカレートするアミノ酸は、上で考察されるようにモデリングすることができる。ssDNA中のヌクレオチド間にインターカレートする少なくとも1つのアミノ酸は、好ましくは、配列番号118におけるP89、F98、及びV150のうちの少なくとも1つ、例えば、P89、F98、V150、P89/F98、P89/V150、F98/V150、又はP89/F98/V150である。

【0217】

配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133におけるssDNA中のヌクレオチド間にインターカレートする少なくとも1つのアミノ酸は、好ましくは、配列番号118におけるP89、F98、及びV150に対応するアミノ酸のうちの少なくとも1つ、例えば、P89、F98、V150、P89/F98、P89/V150、F98/V150、又はP89/F98/V150である。対応するアミノ酸が上記の表6に示される。

10

【0218】

より大きなR基

より大きな側鎖（R基）は、好ましくは、（a）増加した数の炭素原子を含有し、（b）増加した長さを有し、（c）増加した分子体積を有し、かつ／又は（d）増加したファンデルワールス体積を有する。より大きな側鎖（R基）、好ましくは、（a）；（b）；（c）；（d）；（a）及び（b）；（a）及び（c）；（a）及び（d）；（b）及び（c）；（b）及び（d）；（c）及び（d）；（a）、（b）、及び（c）；（a）、（b）、及び（d）；（a）、（c）、及び（d）；（b）、（c）、及び（d）；又は（a）、（b）、（c）、及び（d）。（a）～（d）の各々は、当該技術分野における標準的な方法を使用して測定され得る。

20

【0219】

より大きな側鎖（R基）は、好ましくは、ssDNA中の少なくとも1つのアミノ酸と1つ以上のヌクレオチドとの間の（i）静電的相互作用、（ii）（ii）水素結合、及び／又は（iii）カチオン-パイ（カチオン- π ）相互作用を増加させる、例えば、（i）；（ii）；（iii）；（i）及び（ii）；（i）及び（iii）；（ii）及び（iii）；並びに（i）、（ii）、及び（iii）を増加させる。当業者は、R基がこれらの相互作用のいずれかを増加させるかどうかを決定することができる。例えば、（i）において、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）、及びリジン（K）などの正に荷電したアミノ酸は、静電的相互作用を増加させるR基を有する。例えば、（ii）において、アスパラギン（N）、セリン（S）、グルタミン（Q）、スレオニン（T）、及びヒスチジン（H）などのアミノ酸は、水素結合を増加させるR基を有する。例えば、（iii）において、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、又はヒスチジン（H）などの芳香族アミノ酸は、カチオン-パイ（カチオン- π ）相互作用を増加させるR基を有する。以下の特定の置換は、これらの変化を反映するために（i）～（iii）と標識される。他の可能な置換は、（iv）と標識される。これらの（iv）置換は、典型的には、側鎖（R基）の長さを増加させる。

30

40

【0220】

より大きな側鎖（R）を含むアミノ酸は、非天然アミノ酸であり得る。非天然アミノ酸は、以下に考察されるもののいずれかであり得る。

【0221】

より大きな側鎖（R基）を含むアミノ酸は、好ましくは、アラニン（A）、システイン（C）、グリシン（G）、セレノシステイン（U）、メチオニン（M）、アスパラギン酸（D）、又はグルタミン酸（E）ではない。

【0222】

ヒスチジン（H）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）若しくはリジン（K）、（ii）グルタミン（Q）若しくはアスパラギン（N）、又は（iii）フェニルアラニン

50

(F)、チロシン(Y)、若しくはトリプトファン(W)で置換されている。ヒスチジン(H)は、より好ましくは、(a) N、Q、若しくはW、又は(b) Y、F、Q、若しくはKで置換されている。

【0223】

アスパラギン(N)は、好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) グルタミン(Q)若しくはヒスチジン(H)、又は(iii) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、若しくはトリプトファン(W)で置換されている。アスパラギン(N)は、より好ましくは、R、H、W、又はYで置換されている。

【0224】

プロリン(P)は、好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、スレオニン(T)、若しくはヒスチジン(H)、(iii) チロシン(Y)、フェニルアラニン(F)、若しくはトリプトファン(W)、又は(iv) ロイシン(L)、バリン(V)、若しくはイソロイシン(I)で置換されている。プロリン(P)は、より好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、スレオニン(T)、若しくはヒスチジン(H)、(iii) フェニルアラニン(F)若しくはトリプトファン(W)、又は(iv) ロイシン(L)、バリン(V)、若しくはイソロイシン(I)で置換されている。プロリン(P)は、より好ましくは、(a) F、(b) L、V、I、T、若しくはF、又は(c) W、F、Y、H、I、L、若しくはVで置換されている。

【0225】

バリン(V)は、好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、若しくはヒスチジン(H)、(iii) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、若しくはトリプトファン(W)、又は(iv) イソロイシン(I)若しくはロイシン(L)で置換されている。バリン(V)は、より好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、若しくはヒスチジン(H)、(iii) チロシン(Y)若しくはトリプトファン(W)、又は(iv) イソロイシン(I)若しくはロイシン(L)で置換されている。バリン(V)は、より好ましくは、I若しくはH、又はI、L、N、W、若しくはHで置換されている。

【0226】

フェニルアラニン(F)は、好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) ヒスチジン(H)、又は(iii) チロシン(Y)若しくはトリプトファン(W)で置換されている。フェニルアラニン(F)は、より好ましくは、(a) W、(b) W、Y、若しくはH、(c) W、R、若しくはK、又は(d) K、H、W、若しくはRで置換されている。

【0227】

グルタミン(Q)は、好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、又は(iii) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、若しくはトリプトファン(W)で置換されている。

【0228】

アラニン(A)は、好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、若しくはヒスチジン(H)、(iii) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、若しくはトリプトファン(W)、又は(iv) イソロイシン(I)若しくはロイシン(L)で置換されている。

【0229】

セリン(S)は、好ましくは、(i) アルギニン(R)若しくはリジン(K)、(ii) グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、若しくはヒスチジン(H)、(iii) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、若しくはトリプトファン(W)、又は(iv) イソロイシン(I)若しくはロイシン(L)で置換されている。セリン(S)は、好ましくは、K、R、W、又はFで置換されている。

【0230】

リジン（K）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）、又は（i i i）チロシン（Y）若しくはトリプトファン（W）で置換されている。

【0231】

アルギニン（R）は、好ましくは、（i i i）チロシン（Y）又はトリプトファン（W）で置換されている。

【0232】

メチオニン（M）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）若しくはリジン（K）、（i i）グルタミン（Q）、アスパラギン（N）、若しくはヒスチジン（H）、又は（i i i）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、若しくはトリプトファン（W）で置換されている。

10

【0233】

ロイシン（L）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）若しくはリジン（K）、（i i）グルタミン（Q）若しくはアスパラギン（N）、又は（i i i）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、若しくはトリプトファン（W）で置換されている。

【0234】

アスパラギン酸（D）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）若しくはリジン（K）、（i i）グルタミン（Q）、アスパラギン（N）、若しくはヒスチジン（H）、又は（i i i）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、若しくはトリプトファン（W）で置換されている。アスパラギン酸（D）は、より好ましくは、H、Y、又はKで置換されている。

20

【0235】

グルタミン酸（E）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）若しくはリジン（K）、（i i）グルタミン（Q）、アスパラギン（N）、若しくはヒスチジン（H）、又は（i i i）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、若しくはトリプトファン（W）で置換されている。

【0236】

イソロイシン（I）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）若しくはリジン（K）、（i i）グルタミン（Q）、アスパラギン（N）、若しくはヒスチジン（H）、（i i i）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、若しくはトリプトファン（W）、又は（i v）ロイシン（L）で置換されている。

30

【0237】

チロシン（Y）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）若しくはリジン（K）、又は（i i i）トリプトファン（W）で置換されている。チロシン（Y）は、より好ましくは、W又はRで置換されている。

【0238】

ヘリカーゼは、より好ましくは、配列番号118のバリエントを含み、（a）P89F、（b）F98W、（c）V150I、（d）V150H、（e）P89F及びF98W、（f）P89F及びV150I、（g）P89F及びV150H、（h）F98W及びV150I、（i）F98W及びV150H（j）P89F、F98W、及びV150I、又は（k）P89F、F98W、及びV150Hを含む。

40

【0239】

ヘリカーゼは、より好ましくは、配列番号118のバリエントを含み、H82N、H82Q、H82W、N88R、N88H、N88W、N88Y、P89L、P89V、P89I、P89E、P89T、P89F、D121H、D121Y、D121K、V150I、V150L、V150N、V150W、V150H、P152W、P152F、P152Y、P152H、P152I、P152L、P152V、F240W、F240Y、F240H、F276W、F276R、F276K、F276H、S287K、S287R、S287W、S287F、H396Y、H396F、H396Q、H396K、Y415W、Y415R、F98W/H82N、F98W/H82Q、F98W/H82W、

50

F 9 8 W / N 8 8 R、F 9 8 W / N 8 8 H、F 9 8 W / N 8 8 W、F 9 8 W / N 8 8 Y、
F 9 8 W / P 8 9 L、F 9 8 W / P 8 9 V、F 9 8 W / P 8 9 I、F 9 8 W / P 8 9 T、
F 9 8 W / P 8 9 F、F 9 8 W / D 1 2 1 H、F 9 8 W / D 1 2 1 Y、F 9 8 W / D 1 2
1 K、F 9 8 W / V 1 5 0 I、F 9 8 W / V 1 5 0 L、F 9 8 W / V 1 5 0 N、F 9 8 W
/ V 1 5 0 W、F 9 8 W / V 1 5 0 H、F 9 8 W / P 1 5 2 W、F 9 8 W / P 1 5 2 F、
F 9 8 W / P 1 5 2 Y、F 9 8 W / P 1 5 2 H、F 9 8 W / P 1 5 2 I、F 9 8 W / P 1
5 2 L、F 9 8 W / P 1 5 2 V、F 9 8 W / F 2 4 0 W、F 9 8 W / F 2 4 0 Y、F 9 8
W / F 2 4 0 H、F 9 8 W / F 2 7 6 W、F 9 8 W / F 2 7 6 R、F 9 8 W / F 2 7 6 K
、F 9 8 W / F 2 7 6 H、F 9 8 W / S 2 8 7 K、F 9 8 W / S 2 8 7 R、F 9 8 W / S
2 8 7 W、F 9 8 W / S 2 8 7 F、F 9 8 W / H 3 9 6 Y、F 9 8 W / H 3 9 6 F、F 9
8 W / H 3 9 6 Q、F 9 8 W / Y 4 1 5 W、又は F 9 8 W / Y 4 1 5 R を含む。

10

【0240】

リン酸相互作用

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、ssDNA中の1つ以上のヌクレオチド中の1つ以上のリン酸基と相互作用する少なくとも1つのアミノ酸が置換されているヘリカーゼである。任意の数のアミノ酸、例えば、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、又は6個以上のアミノ酸が置換され得る。ssDNA中のヌクレオチドは、各々、3個のリン酸基を含む。置換されている各アミノは、一度に任意の数のリン酸基、例えば、一度に1、2、又は3個のリン酸基と相互作用し得る。1つ以上のリン酸基と相互作用するアミノ酸は、上で考察されるように、タンパク質モデリングを使用して同定することができる。

20

【0241】

置換は、好ましくは、ssDNA中の少なくとも1つのアミノ酸と1つ以上のリン酸基との間の(i)静電的相互作用、(ii)水素結合、及び/又は(iii)カチオン-パイ(カチオン- π)相互作用を増加させる。(i)、(ii)、及び(iii)を増加させる好ましい置換は、標識(i)、(ii)、及び(iii)を使用して以下に考察される。

【0242】

置換は、好ましくは、位置の正味の正電荷を増加させる。任意の位置での正味電荷は、当該技術分野で既知の方法を使用して測定することができる。例えば、等電点を使用して、アミノ酸の正味電荷を定義することができる。正味電荷は、典型的には、約7.5で測定される。置換は、好ましくは、負に荷電したアミノ酸の、正に荷電した、非荷電、非極性、又は芳香族アミノ酸との置換である。負に荷電したアミノ酸は、正味の負電荷を有するアミノ酸である。負に荷電したアミノ酸には、アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)が含まれるが、これらに限定されない。正に荷電したアミノ酸は、正味の正電荷を有するアミノ酸である。正に荷電したアミノ酸は、天然に存在してもよい、又は天然に存在しなくてもよい。正に荷電したアミノ酸は、合成であってもよい、又は修飾されてもよい。例えば、正味の正電荷を有する修飾アミノ酸は、本発明に使用するために特異的に設計され得る。アミノ酸への多くの異なる種類の修飾は、当該技術分野で周知である。好ましい天然に存在する正に荷電したアミノ酸には、ヒスチジン(H)、リジン(K)、及びアルギニン(R)が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0243】

非荷電アミノ酸、非極性アミノ酸、又は芳香族アミノ酸は、天然に存在してもよい、又は天然に存在しなくてもよい。それは、合成であってもよい、又は修飾されてもよい。非荷電アミノ酸は、正味電荷を有しない。好適な非荷電アミノ酸には、システイン(C)、セリン(S)、スレオニン(T)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、及びグルタミン(Q)が含まれるが、これらに限定されない。非極性アミノ酸は、非極性側鎖を有する。好適な非極性アミノ酸には、グリシン(G)、アラニン(A)、プロリン(P)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、及びバリン(V)が含まれるが、これらに限定されない。芳香族アミノ酸は、芳香族側鎖を有する。好適な芳香族アミノ酸には、ヒスチ

50

ジン（H）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、及びチロシン（Y）が含まれるが、これらに限定されない。

【0244】

ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号118のバリエーションを含み、ssDNA中の1つ以上のヌクレオチド中の1つ以上のリン酸と相互作用する少なくとも1つのアミノ酸は、H64、T80、S83、N242、K243、N293、T394、及びK397のうちの少なくとも1つである。これらの番号は、配列番号89における関連する位置に対応し、配列番号118と比較して、1つ以上のアミノ酸が挿入又は欠失しているバリエーションの場合に、変更される必要があり得る。当業者は、上で考察されるように、バリエーションにおける対応する位置を決定することができる。

10

【0245】

ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションを含み、ssDNA中の1つ以上のヌクレオチド中の1つ以上のリン酸と相互作用する少なくとも1つのアミノ酸は、配列番号118におけるH64、T80、S83、N242、K243、N293、T394、及びK397に対応するアミノ酸のうちの少なくとも1つである。

表7は、配列番号118におけるH64、T80、S83、N242、K243、N293、T394、及びK397に対応する配列番号119～133におけるアミノ酸を示す。

20

30

40

50

【表 7】

配列番号								
118	H64	T80	S83	N242	K243	N293	T394	K397
119	G63	T79	S82	N276	A277	N317	T426	K429
120	N121	T142	K145	N309	K310	N361	T453	K456
121	H66	T85	S88	N242	K243	N286	T375	R378
122	H89	T110	S113	N275	K276	V315	T412	K415
123	H68	T91	S94	N269	A270	N308	T398	K401
124	H56	T72	S75	N232	D233	N279	T376	K379
125	H60	T76	S79	N237	K238	N285	T385	K388
126	H47	T63	S66	N224	K225	N272	T371	K374
127	H66	T82	S85	N245	D246	N296	T397	K400
128	H66	T82	S85	N245	A246	N296	T396	K399
129	H64	T80	S83	N239	N240	N291	T391	K394
130	H70	T86	S89	N248	K249	N299	T397	K400
131	H66	T82	S85	N244	K245	N295	T397	K400
132	H65	T81	S84	N243	K244	N294	T394	K397
133	H65	T81	K84	N243	K244	N294	T395	K398

10

20

30

【0246】

ヒスチジン（H）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）又はリジン（K）、（ii）アスパラギン（N）、セリン（S）、グルタミン（Q）、又はスレオニン（T）、（iii）フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、又はチロシン（Y）で置換されている。ヒスチジン（H）は、好ましくは、（a）N、Q、K、若しくはF、又は（b）N、Q、若しくはWで置換されている。

【0247】

スレオニン（T）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）、ヒスチジン（H）、若しくはリジン（K）、（ii）アスパラギン（N）、セリン（S）、グルタミン（Q）、若しくはヒスチジン（H）、又は（iii）フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、若しくはヒスチジン（H）で置換されている。スレオニン（T）は、より好ましくは、（a）K、Q、若しくはN、又は（b）K、H、若しくはNで置換されている。

40

【0248】

セリン（s）は、好ましくは、（i）アルギニン（R）、ヒスチジン（H）、若しくはリジン（K）、（ii）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、スレオニン（T）、若しくはヒスチジン（H）、又は（iii）フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W

50

)、チロシン (Y)、若しくはヒスチジン (H) で置換されている。セリン (S) は、より好ましくは、H、N、K、T、R、又はQで置換されている。

【0249】

アスパラギン (N) は、好ましくは、(i) アルギニン (R)、ヒスチジン (H)、若しくはリジン (K)、(i i) セリン (S)、グルタミン (Q)、スレオニン (T)、若しくはヒスチジン (H)、又は (i i i) フェニルアラニン (F)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、若しくはヒスチジン (H) で置換されている。アスパラギン (N) は、より好ましくは、(a) H若しくはQ、又は (b) Q、K、若しくはHで置換されている。

【0250】

リジン (K) は、好ましくは、(i) アルギニン (R) 若しくはヒスチジン (H)、(i i) アスパラギン (N)、セリン (S)、グルタミン (Q)、スレオニン (T)、若しくはヒスチジン (H)、又は (i i i) フェニルアラニン (F)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、若しくはヒスチジン (H) で置換されている。リジン (K) は、より好ましくは、(a) Q若しくはH、又は (b) R、H、若しくはYで置換されている。

【0251】

ヘリカーゼは、より好ましくは、配列番号118のバリエーションを含み、(a) H64N、H64Q、H64K、若しくはH64F、(b) T80K、T80Q、若しくはT80N、(c) S83H、S83N、S83K、S83T、S83R、若しくはS83Q (d) N242H若しくはN242Q、(e) K243Q若しくはK243H、(f) N293Q、N293K、若しくはN293H、(g) T394K、T394H、若しくはT394N、又は (h) K397R、K397H、若しくはK397Yのうちの1つ以上、例えば、それらの全てを含む。

【0252】

組み合わせ

ヘリカーゼは、好ましくは、以下での置換を含む配列番号118のバリエーションである。

－F98/H64、例えば、F98W/H64N、F98W/H64Q、F98W/H64K、若しくはF98W/H64F、

－F98/T80、例えば、F98W/T80K、F98W/T80Q、F98W/T80N、

－F98/H82、例えば、F98W/H82N、F98W/H82Q、若しくはF98W/H82W、

－F98/S83、例えば、F98W/S83H、F98W/S83N、F98W/S83K、F98W/S83T、F98W/S83R、若しくはF98W/S83Q、

－F98/N242、例えば、F98W/N242H、F98W/N242Q、F98W/K243Q、若しくはF98W/K243H、

－F98/N293、例えば、F98W/N293Q、F98W/N293K、F98W/N293H、F98W/T394K、F98W/T394H、F98W/T394N、F98W/H396Y、F98W/H396F、F98W/H396Q、若しくはF98W/H396K、又は

－F98/K397、例えば、F98W/K397R、F98W/K397H、若しくはF98W/K397Y。

【0253】

配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133における好ましい組み合わせは、上にリストされている配列番号118における組み合わせに対応するアミノ酸の組み合わせを含む。

【0254】

細孔相互作用

本発明のヘリカーゼは、膜貫通細孔と相互作用するヘリカーゼの部分が1つ以上の修飾

10

20

30

40

50

、好ましくは1つ以上の置換を含む、更なるヘリカーゼである。膜貫通細孔と相互作用するヘリカーゼの部分は、典型的には、例えば、以下でより詳細に考察されるように、ヘリカーゼが細孔を通るポリヌクレオチドの移動を制御するために使用される場合、膜貫通細孔と相互作用するヘリカーゼの部分である。この部分は、典型的には、例えば、以下により詳細に考察されるように、ヘリカーゼが細孔を通るポリヌクレオチドの移動を制御するために使用される場合、細孔と相互作用するか、又は細孔に接触するアミノ酸を含む。この部分は、典型的には、ヘリカーゼが、印加電位の下で細孔を通して移動しているポリヌクレオチドなどの分析物に結合 (bound) 又は結合 (attached) している場合、細孔と相互作用するか、又は細孔に接触するアミノ酸を含む。

【0255】

配列番号118では、膜貫通細孔と相互作用する部分は、典型的には、位置1、2、3、4、5、6、51、176、177、178、179、180、181、185、189、191、193、194、195、197、198、199、200、201、202、203、204、207、208、209、210、211、212、213、216、219、220、221、223、224、226、227、228、229、247、254、255、256、257、258、259、260、261、298、300、304、308、318、319、321、337、347、350、351、405、415、422、434、437、438にアミノ酸を含む。これらの番号は、配列番号118における関連する位置に対応し、配列番号118と比較して、1つ以上のアミノ酸が挿入又は欠失しているバリエーションの場合に、変更される必要があり得る。当業者は、上で考察されるように、バリエーションにおける対応する位置を決定することができる。膜貫通細孔と相互作用する部分は、好ましくは、

(a) 配列番号118における位置1、2、4、51、177、178、179、180、185、193、195、197、198、199、200、202、203、204、207、208、209、210、211、212、216、221、223、224、226、227、228、229、254、255、256、257、258、260、304、318、321、347、350、351、405、415、422、434、437、及び438、又は

(b) 配列番号118における位置1、2、178、179、180、185、195、197、198、199、200、202、203、207、209、210、212、216、221、223、226、227、255、258、260、304、350、及び438にアミノ酸を含む。

【0256】

膜貫通細孔と相互作用する部分は、好ましくは、配列番号118における位置K194、W195、K198、K199、及びE258でのアミノ酸のうちの2、3、4、又は5個などの1個以上を含む。配列番号118のバリエーションは、好ましくは、(a)、K194、(b) W195、(c) D198、(d) K199、及び(e) E258のうちの1つ以上に修飾を含む。配列番号118のバリエーションは、好ましくは、(a) K194LなどのK194、(b) W195AなどのW195、(c) D198VなどのD198、(d) K199LなどのK199、及び(e) E258LなどのE258のうちの1つ以上に置換を含む。バリエーションは、{a}、{b}、{c}、{d}、{e}、{a、b}、{a、c}、{a、d}、{a、e}、{b、c}、{b、d}、{b、e}、{c、d}、{c、e}、{d、e}、{a、b、c}、{a、b、d}、{a、b、e}、{a、c、d}、{a、c、e}、{a、d、e}、{b、c、d}、{b、c、e}、{b、d、e}、{c、d、e}、{a、b、c、d}、{a、b、c、e}、{a、b、d、e}、{a、c、d、e}、{b、c、d、e}、又は{a、b、c、d、e}を含み得る。この段落に並べられている修飾又は置換は、修飾されたポリヌクレオチド結合タンパク質が、MspA、特に以下に考察される修飾された細孔のいずれかに由来する細孔と相互作用する場合に好ましい。

【0257】

膜貫通細孔と相互作用するポリヌクレオチド結合タンパク質の部分は、好ましくは、配列番号 118 の位置 194 又は 199 にアミノ酸を含む。バリエーションは、好ましくは、K194A、K194V、K194F、K194D、K194S、K194W、若しくは K194L、及び／又は K199A、K199V、K199F、K199D、K199S、K199W、若しくは K199L を含む。配列番号 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は 133 では、膜貫通細孔と相互作用する部分は、典型的には、上にリストされている配列番号 118 におけるものに対応する位置にアミノ酸を含む。配列番号 118 におけるこれらの位置に対応する配列番号 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、及び 133 におけるアミノ酸は、以下の表 8 のアラインメントを使用して同定することができる。

10

【表 8】

配列番号 118	K194	W195	D198	K199	E258
配列番号 119	L230	E231	H234	Y235	R293
配列番号 120	W259	N260	T263	Y264	E326
配列番号 121	A192	D193	F196	G197	A259
配列番号 122	I224	K225	D228	F229	Q292
配列番号 123	Q213	D214	Y217	A218	A286
配列番号 124	Q185	W186	T189	N190	N248
配列番号 125	G190	W191	P194	N195	K253
配列番号 126	G177	W178	Q181	N182	K240
配列番号 127	K200	M201	P204	M205	K261
配列番号 128	K200	P201	P204	L205	K261
配列番号 129	K193	W194	E197	K198	A256
配列番号 130	N200	W201	E204	N205	N264
配列番号 131	G196	W197	D200	C201	E260
配列番号 132	G195	W196	E199	N200	E259
配列番号 133	S195	W196	E199	K200	Q259

20

30

40

【0258】

好ましい組み合わせ

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、F98、例えば、F98R、F98K、F98Q、F98N、F98H、F98Y、F98F、又は F98W での置換、並びに K194、例えば、K194A、K194V、K194F、K194D、K194S、K194W、

50

若しくはK194L、及び／又はK199、例えば、K199A、K199V、K199F、K199D、K199S、K199W、若しくはK199Lでの置換を含む、配列番号118のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションを含み、これは、配列番号118におけるF98に対応する位置での置換、並びに配列番号118におけるK194及び／又はK199に対応する位置（複数可）での置換を含む。これらの対応する位置は、配列番号118におけるF98、K194、及びK119について上にリストされているアミノ酸のうちのいずれかで置き換えられ得る。

【0259】

ヘリカーゼは、好ましくは、以下での置換を含む配列番号118のバリエーションである。

－F98／K194／H64、例えば、F98W／K194L／H64N、F98W／K194L／H64Q、F98W／K194L／H64K、若しくはF98W／K194L／H64F、

－F98／K194／T80、例えば、F98W／K194L／T80K、F98W／K194L／T80Q、若しくはF98W／K194L／T80N、

－F98／K194／H82、例えば、F98W／K194L／H82N、F98W／K194L／H82Q、若しくはF98W／K194L／H82W、

－F98／S83／K194、例えば、F98W／S83H／K194L、F98W／S83T／K194L、F98W／S83R／K194L、F98W／S83Q／K194L、F98W／S83N／K194L、F98W／S83K／K194L、F98W／N88R／K194L、F98W／N88H／K194L、F98W／N88W／K194L、若しくはF98W／N88Y／K194L、

－F98／S83／K194／F276、例えば、F98W／S83H／K194L／F276K、

－F98／P89／K194、例えば、F98W／P89L／K194L、F98W／P89V／K194L、F98W／P89I／K194L、若しくはF98W／P89T／K194L、

－F98／D121／K194、例えば、F98W／D121H／K194L、F98W／D121Y／K194L、若しくはF98W／D121K／K194L、

－F98／V150／K194、例えば、F98W／V150I／K194L、F98W／V150L／K194L、F98W／V150N／K194L、F98W／V150W／K194L、若しくはF98W／V150H／K194L、

－F98／P152／K194、例えば、F98W／P152W／K194L、F98W／P152F／K194L、F98W／P152Y／K194L、F98W／P152H／K194L、F98W／P152I／K194L、F98W／P152L／K194L、若しくはF98W／P152V／K194L、

－F98／F240／K194、例えば、F98W／F240W／K194L、F98W／F240Y／K194L、若しくはF98W／F240H／K194L、

－F98／N242／K194、例えば、F98W／N242H／K194L、若しくはF98W／N242Q／K194L、

－F98／K194／F276、例えば、F98W／K194L／F276K、F98W／K194L／F276H、F98W／K194L／F276W、若しくはF98W／K194L／F276R、

－F98／K194／S287、例えば、F98W／K194L／S287K、F98W／K194L／S287R、F98W／K194L／S287W、若しくはF98W／K194L／S287F、

－F98／N293／K194、例えば、F98W／N293Q／K194L、F98W／N293K／K194L、若しくはF98W／N293H／K194L、

－F98／T394／K194、例えば、F98W／T394K／K194L、F98

10

20

30

40

50

W／T 3 9 4 H／K 1 9 4 L、若しくはF 9 8 W／T 3 9 4 N／K 1 9 4 L、
－F 9 8／H 3 9 6／K 1 9 4、例えば、F 9 8 W／H 3 9 6 Y／K 1 9 4 L、F 9 8
W／H 3 9 6 F／K 1 9 4 L、F 9 8 W／H 3 9 6 Q／K 1 9 4 L、若しくはF 9 8 W／
H 3 9 6 K／K 1 9 4 L、
－F 9 8／K 3 9 7／K 1 9 4、例えば、F 9 8 W／K 3 9 7 R／K 1 9 4 L、F 9 8
W／K 3 9 7 H／K 1 9 4 L、若しくはF 9 8 W／K 3 9 7 Y／K 1 9 4 L、又は
－F 9 8／Y 4 1 5／K 1 9 4、例えば、F 9 8 W／Y 4 1 5 W／K 1 9 4 L、若しく
はF 9 8 W／Y 4 1 5 R／K 1 9 4 L。

【0260】

上記の組み合わせのいずれにおいても、K 1 9 4は、W 1 9 5、D 1 9 8、K 1 9 9、
及びE 2 5 8のうちのいずれかで置き換えられ得る。

【0261】

修飾ヘリカーゼは、好ましくは、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置98及び／又は
194に対応する位置（複数可）に修飾又は置換を含む。これは、好ましくは、D d a 1
993におけるアミノ酸位置55、114、156、177、210、221、350、
及び358に対応する位置のうちの1つ以上での修飾若しくは置換、D d a 1 9 9 3にお
けるアミノ酸位置114、177、350、及び358に対応する1つ以上の位置での修飾
若しくは置換、並びに／又はD d a 1 9 9 3における位置40に対応する位置での修飾
若しくは置換に加えられる。位置98又は対応する位置は、R、H、K、S、T、N、Q
、A、V、I、L、M、Y、又はWで置換され得る。位置98又は対応する位置は、好ま
しくは、R、K、Q、N、H、Y、又はWで置換されている。位置194又は対応する位
置は、A、V、I、L、M、F、Y、W、D、E、S、T、N、又はQで置換され得る。
位置194又は対応する位置は、好ましくは、A、V、F、D、S、W、又はLで置換さ
れている。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、F 9 8、例えば、F 9 8 R、F 9 8 K、
F 9 8 Q、F 9 8 N、F 9 8 H、F 9 8 Y、若しくはF 9 8 Wでの置換、及び／又はK 1
94、例えば、K 1 9 4 A、K 1 9 4 V、K 1 9 4 F、K 1 9 4 D、K 1 9 4 S、K 1 9
4 W、若しくはK 1 9 4 Lでの置換を含む、配列番号118のバリエーションを含む。本発明
のヘリカーゼは、好ましくは、F 9 8 W及びK 1 9 4 Lを含む配列番号118のバリエ
ーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、12
2、123、124、125、126、127、128、129、130、131、13
2、又は133のバリエーションを含み、これは、配列番号118におけるF 9 8に対応する
位置での置換、及び／又は配列番号118におけるK 1 9 4に対応する位置での置換を含
む。

【0262】

上記の組み合わせのいずれにおいても、K 1 9 4は、W 1 9 5、D 1 9 8、K 1 9 9、
及びE 2 5 8のうちのいずれかで置き換えられ得る。

【0263】

タワードメイン及び／又はピンドメイン及び／又は1 Aドメインにおける修飾

修飾ヘリカーゼは、好ましくは、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置360に対応す
る位置に修飾又は置換を含む。これは、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置55、11
4、156、177、210、221、350、及び358に対応する1つ以上の位置で
の修飾若しくは置換、D d a 1 9 9 3におけるアミノ酸位置114、177、350、及
び358に対応する1つ以上の位置での修飾若しくは置換、並びに／又はD d a 1 9 9 3
における位置40に対応する位置での修飾若しくは置換に加えられる。A 3 6 0は、Y
350及びK 358のように、D d a 1 9 9 3のタワードメインにおける。位置360又
は対応する位置は、C、G、P、A、V、I、L、M、F、Y、又はWで置換され得る。
位置360又は対応する位置は、好ましくは、C又はYで置換されている。本発明のヘリ
カーゼは、好ましくは、A 3 6 0、例えば、A 3 6 0 C又はA 3 6 0 Yでの置換を含む配
列番号118のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、K 358 I及び
A 3 6 0 Cを含む配列番号118のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましく

は、配列番号 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は 133 のバリエーションを含み、これは、配列番号 118 における A360 に対応する位置に置換を含む。

【0264】

修飾ヘリカーゼは、好ましくは、Dda1993 におけるアミノ酸位置 94、98、及び 109、例えば、位置（複数可）94、98、109、94、及び 98、94 及び 109、98 及び 109、並びに 94、98、及び 109 に対応する位置のうちの 1 つ以上に修飾又は置換を含む。これは、Dda1993 におけるアミノ酸位置 55、114、156、177、210、221、350、及び 358 に対応する 1 つ以上の位置での修飾若しくは置換、Dda1993 におけるアミノ酸位置 114、177、350、及び 358 に対応する 1 つ以上の位置での修飾若しくは置換、並びに／又は Dda1993 における位置 40 に対応する位置での修飾若しくは置換に加えられ得る。これらの位置は全て、ピンドメインにおける。位置 94 又は対応する位置は、C、G、P、A、V、I、L、M、F、Y、又は W で置換され得る。位置 94 又は対応する位置は、好ましくは、C 又は Y で置換されている。位置 98 又は対応する位置は、R、H、K、S、T、N、Q、A、V、I、L、M、Y、又は W で置換され得る。位置 98 又は対応する位置は、好ましくは、R、K、Q、N、H、Y、又は W で置換されている。位置 109 又は対応する位置は、A、V、I、L、M、F、Y、又は W で置換され得る。位置 109 又は対応する位置は、好ましくは、A 又は V で置換されている。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、E94、F98、及び C109（上記に並べる全ての組み合わせを含む）のうちの 1 つ以上に置換を含む、配列番号 118 のバリエーションを含む。好ましいバリエーションは、以下での置換を含む。

- － E94 及び F98、例えば、E94C 若しくは E94Y、及び F98R、F98K、F98Q、F98N、F98H、F98Y、F98F、若しくは F98W、
- － E94 及び C109、例えば、E94C 若しくは E94Y、及び C109A 若しくは C109V、
- － F98 及び C109、例えば、F98R、F98K、F98Q、F98N、F98H、F98Y、F98F、若しくは F98W、及び C109A 若しくは C109V、又は
- － E94、F98、及び C109、例えば、E94C 若しくは E94Y、及び F98R、F98K、F98Q、F98N、F98H、F98Y、F98F、若しくは F98W、及び C109A 若しくは C109V。

【0265】

より好ましいバリエーションは、以下を含む。E94C 及び F98W、E94C 及び C109A、F98W 及び C109A、又は E94C、F98W、及び C109A。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は 133 のバリエーションを含み、これは、配列番号 118 における E94、F98、及び C109 のうちの 1 つ以上に置換を含む。

表 9 は、E94、C109、C136、及び A360 に関する情報を含む（上記及び以下に開示される修飾ヘリカーゼを参照のこと）。

10

20

30

40

50

【表 9】

配列番号 118	E94	C109	C136	A360
配列番号 119	E95	V124	T167	I388
配列番号 120	D156	I180	S204	A417
配列番号 121	E101	V119	V140	E342
配列番号 122	E128	V147	V172	A377
配列番号 123	E107	I125	S145	A364
配列番号 124	D86	V107	C129	A342
配列番号 125	D90	V110	C132	A349
配列番号 126	D77	I89	C119	A347
配列番号 127	E96	V119	A141	A336
配列番号 128	E96	V119	A141	A360
配列番号 129	E94	C114	C136	A357
配列番号 130	D100	C120	C142	A363
配列番号 131	D96	C116	C138	A365
配列番号 132	E95	C115	C137	A360
配列番号 133	E95	C115	C137	A361

10

20

【0266】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基（すなわち、1つ以上のシステイン残基）、及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸（すなわち、1つ以上の非天然アミノ酸）が、（i）タワードメイン、及び／又は（ii）ピンドメイン、及び／又は（iii）1A（RecA様モーター）ドメインに導入されているヘリカーゼであり、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する。これらの種類の修飾は、WO2015/055981（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、タワードメイン、ピンドメイン、1Aドメイン、タワードメイン及びピンドメイン、タワードメイン及び1Aドメイン、又はタワードメイン、ピンドメイン、及び1Aドメインに導入され得る。

30

【0267】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、（i）タワードメイン、並びに（ii）ピンドメイン及び／又は1A（RecA様モーター）ドメインの各々に、すなわち、タワードメイン及びピンドメイン、タワードメイン及び1Aドメイン又はタワードメイン、ピンドメイン及び1Aドメインに導入されているヘリカーゼである。

【0268】

任意の数のシステイン残基及び／又は非天然アミノ酸が、各ドメインに導入され得る。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のシステイン残基が導入され得、かつ／又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の非天然アミノ酸が導入され得る。1つ以上のシステイン残基のみが導入され得る。1つ以上の非天然アミノ酸のみが導入され得る。1つ以上のシステイン残基及び1つ以上の非天然アミノ酸の組み合わせが導入され得る。

40

【0269】

少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、置換によって導入される。これを行うための方法は、当該技術分野で既知である。

【0270】

50

これらの修飾は、ヘリカーゼがポリヌクレオチドに結合することを妨げない。これらの修飾は、ポリヌクレオチドがヘリカーゼから結合解除又は脱会合する能力を減少させる。言い換えれば、1つ以上の修飾は、ポリヌクレオチド鎖からの解離を防ぐことによって、ヘリカーゼのプロセス性を増加させる。酵素の熱安定性は、典型的には、1つ以上の修飾によっても増加し、鎖配列決定に有益である構造安定性が改善される。

【0271】

非天然アミノ酸は、天然ではヘリカーゼに見出されないアミノである。非天然アミノ酸は、好ましくは、ヒスチジン、アラニン、イソロイシン、アルギニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、セリン、又はチロシンではない。非天然アミノ酸は、より好ましくは、前の文の20個のアミノ酸又はセレノシステインのいずれでもない。

【0272】

本発明に使用するための好ましい非天然アミノ酸には、4-アジド-L-フェニルアラニン (Faz)、4-アセチル-L-フェニルアラニン、3-アセチル-L-フェニルアラニン、4-アセトアセチル-L-フェニルアラニン、O-アリル-L-チロシン、3-(フェニルセラニル)-L-アラニン、O-2-プロピン-1-イル-L-チロシン、4-(ジヒドロキシボリル)-L-フェニルアラニン、4-[(エチルスルファニル)カルボニル]-L-フェニルアラニン、(2S)-2-アミノ-3-4-[(プロパン-2-イルスルファニル)カルボニル]フェニル；プロパン酸、(2S)-2-アミノ-3-4-[(2-アミノ-3-スルファニルプロパノイル)アミノ]フェニル；プロパン酸、O-メチル-L-チロシン、4-アミノ-L-フェニルアラニン、4-シアノ-L-フェニルアラニン、3-シアノ-L-フェニルアラニン、4-フルオロ-L-フェニルアラニン、4-ヨード-L-フェニルアラニン、4-ブromo-L-フェニルアラニン、O-(トリフルオロメチル)チロシン、4-ニトロ-L-フェニルアラニン、3-ヒドロキシ-L-チロシン、3-アミノ-L-チロシン、3-ヨード-L-チロシン、4-イソプロピル-L-フェニルアラニン、3-(2-ナフチル)-L-アラニン、4-フェニル-L-フェニルアラニン、(2S)-2-アミノ-3-(ナフタレン-2-イルアミノ)プロパン酸、6-(メチルスルファニル)ノルロイシン、6-オキソ-L-リジン、D-チロシン、(2R)-2-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸、(2R)-2-アンモニオオクタノエート3-(2,2'-ビピリジン-5-イル)-D-アラニン、2-アミノ-3-(8-ヒドロキシ-3-キノリル)プロパン酸、4-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、S-(2-ニトロベンジル)システイン、(2R)-2-アミノ-3-[(2-ニトロベンジル)スルファニル]プロパン酸、(2S)-2-アミノ-3-[(2-ニトロベンジル)オキシ]プロパン酸、O-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル)-L-セリン、(2S)-2-アミノ-6-[(2-ニトロベンジル)オキシ]カルボニル；アミノ)ヘキサン酸、O-(2-ニトロベンジル)-L-チロシン、2-ニトロフェニルアラニン、4-[(E)-フェニルジアゼニル]-L-フェニルアラニン、4-[3-(トリフルオロメチル)-3H-ジアジレン-3-イル]-D-フェニルアラニン、2-アミノ-3-[[5-(ジメチルアミノ)-1-ナフチル]スルホニルアミノ]プロパン酸、(2S)-2-アミノ-4-(7-ヒドロキシ-2-オキソ-2H-クロメン-4-イル)ブタン酸、(2S)-3-[(6-アセチルナフタレン-2-イル)アミノ]-2-アミノプロパン酸、4-(カルボキシメチル)フェニルアラニン、3-ニトロ-L-チロシン、O-スルホ-L-チロシン、(2R)-6-アセトアミド-2-アンモニオヘキサノエート、1-メチルヒスチジン、2-アミノノナン酸、2-アミノデカン酸、L-ホモシステイン、5-スルファニルノルバリン、6-スルファニル-L-ノルロイシン、5-(メチルスルファニル)-L-ノルバリン、N⁶-[(2R,3R)-3-メチル-3,4-ジヒドロ-2H-ピロール-2-イル]カルボニル；-L-リジン、N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]リジン、(2S)-2-アミノ-6-[(シクロペンチルカルボニル)アミノ]ヘキサン酸、N⁶-[(シクロペンチルオキシ)カルボ

10

20

30

40

50

ニル] - L - リジン、(2S) - 2 - アミノ - 6 - [(2R) - テトラヒドロフラン - 2 - イルカルボニル] アミノ; ヘキサン酸、(2S) - 2 - アミノ - 8 - [(2R, 3S) - 3 - エチニルテトラヒドロフラン - 2 - イル] - 8 - オキソオクタン酸、N⁶ - (tert - ブトキシカルボニル - L - リジン、(2S) - 2 - ヒドロキシ - 6 - ([(2 - メチル - 2 - プロパニル) オキシ] カルボニル; アミノ) ヘキサン酸、N⁶ - [(アリルオキシ) カルボニル] リジン、(2S) - 2 - アミノ - 6 - ([(2 - アジドベンジル) オキシ] カルボニル; アミノ) ヘキサン酸、N⁶ - L - プロリル - L - リジン、(2S) - 2 - アミノ - 6 - [(プロプ - 2 - イン - 1 - イルオキシ) カルボニル] アミノ; ヘキサン酸、及び N⁶ - [(2 - アジドエトキシ) カルボニル] - L - リジンが含まれるが、これらに限定されない。最も好ましい非天然アミノ酸は、4 - アジド - L - フェニルアラニン (Faz) である。

10

以下の表 10 (2つの部分に分離されている) は、各 Dda 相同体における各ドメインを構成する残基を同定する (配列番号 118 ~ 133)。

【表 10 - 1】

相同体	配列番号	1A	2A
Dda-Rma-DSM	119	M1-I84 + R113-Y211	R212-E294 + G422-S678
Dda-Csp	120	M1-L147 + S166-V240	R241-N327 + A449-G496
Dda-Sru	121	M1-L90 + E108-H173	R174-D260 + A371-V421
Dda-Sgo	122	M1-L115 + N136-V205	R206-K293 + I408-L500
Dda-Vph12B8	123	M1-L96 + F114-V194	R195-D287 + V394-Q450
Dda-Vph	124	M1-L77 + V96-V166	R167-T249 + L372-N421
Dda-Aph65	125	M1-M81 + L99-M171	R172-T254 + L381-K434
Dda-AphCC2	126	M1-M68 + M86-M158	R159-T241 + L367-K420
Dda-Cph	127	M1-L87 + A108-M181	R182-T262 + L393-V443
Dda-Kph	128	M1-L87 + A108-M181	R182-T262 + L392-V442
Dda-SphIME13	129	M1-L85 + T103-K176	R177-N257 + L387-V438
Dda-AphAc42	130	M1-L91 + V109-M183	R184-T265 + L393-I442
Dda-SphSP18	131	M1-L87 + M105-M179	R180-T261 + L393-V442
Dda-Yph	132	M1-L86 + V104-K178	R179-T260 + L390-I439
Dda-SphS16	133	M1-L86 + V104-M178	R179-T260 + L391-V441
Dda-1993	118	M1-L85 + V103-K177	R178-T259 + L390-V439

20

30

【表 10 - 2】

相同体	配列番号	タワー	ピン	フック
Dda-Rma-DSM	119	G295-N309 + F316-Y421	Y85-L112	A310-L315
Dda-Csp	120	V328-P342 + N360-Y448	K148-N165	V343-L359
Dda-Sru	121	A261-T275 + T285-Y370	G91-E107	W276-L284
Dda-Sgo	122	G294-I307 + T314-Y407	G116-T135	R308-Y313
Dda-Vph12B8	123	V288-E301 + N307-N393	G97-P113	M302-W306
Dda-Vph	124	S250-P264 + E278-S371	K78-E95	V265-I277
Dda-Aph65	125	K255-P269 + T284-S380	K82-K98	V270-F283
Dda-AphCC2	126	D242-P256 + T271-S366	K69-K85	V257-F270
Dda-Cph	127	T263-P277 + N295-P392	K88-K107	L278-Y294
Dda-Kph	128	D263-P277 + N295-A391	K88-K107	L278-Y294
Dda-SphIME13	129	A258-P272 + N290-P386	K86-G102	L273-F289
Dda-AphAc42	130	L266-P280 + N298-A392	K92-D108	L281-F297
Dda-SphSP18	131	D262-P276 + N294-A392	K88-E104	H277-F293
Dda-Yph	132	D261-P275 + N293-A389	K87-E103	L276-F292
Dda-SphS16	133	E261-P275 + T293-A390	K87-E103	L276-F292
Dda-1993	118	D260-P274 + N292-A389	K86-E102	L275-F291

40

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン(残基D 2 6 0～P 2 7 4及びN 2 9 2～A 3 8 9)、並びに／又は(ii) ピンドメイン(残基K 8 6～E 1 0 2)、並びに／又は(iii) 1 Aドメイン(残基M 1～L 8 5及びV 1 0 3～K 1 7 7)に導入されている、配列番号1 1 8のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基N 2 9 2～A 3 8 9に導入される。

【0 2 7 4】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン(残基G 2 9 5～N 3 0 9及びF 3 1 6～Y 4 2 1)、並びに／又は(ii) ピンドメイン(残基Y 8 5～L 1 1 2)、並びに／又は(iii) 1 Aドメイン(残基M 1～I 8 4及びR 1 1 3～Y 2 1 1)に導入されている、配列番号1 1 9のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基F 3 1 6～Y 4 2 1に導入される。

10

【0 2 7 5】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン(残基V 3 2 8～P 3 4 2及びN 3 6 0～Y 4 4 8)、並びに／又は(ii) ピンドメイン(残基K 1 4 8～N 1 6 5)、並びに／又は(iii) 1 Aドメイン(残基M 1～L 1 4 7及びS 1 6 6～V 2 4 0)に導入されている、配列番号1 2 0のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基N 3 6 0～Y 4 4 8に導入される。

20

【0 2 7 6】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン(残基A 2 6 1～T 2 7 5及びT 2 8 5～Y 3 7 0)、並びに／又は(ii) ピンドメイン(残基G 9 1～E 1 0 7)、並びに／又は(iii) 1 Aドメイン(残基M 1～L 9 0及びE 1 0 8～H 1 7 3)に導入されている、配列番号1 2 1のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基T 2 8 5～Y 3 7 0に導入される。

30

【0 2 7 7】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン(残基G 2 9 4～I 3 0 7及びT 3 1 4～Y 4 0 7)、並びに／又は(ii) ピンドメイン(残基G 1 1 6～T 1 3 5)、並びに／又は(iii) 1 Aドメイン(残基M 1～L 1 1 5及びN 1 3 6～V 2 0 5)に導入されている、配列番号1 2 2のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基T 3 1 4～Y 4 0 7に導入される。

【0 2 7 8】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン(残基V 2 8 8～E 3 0 1及びN 3 0 7～N 3 9 3)、並びに／又は(ii) ピンドメイン(残基G 9 7～P 1 1 3)、並びに／又は(iii) 1 Aドメイン(残基M 1～L 9 6及びF 1 1 4～V 1 9 4)に導入されている、配列番号1 2 3のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基N 3 0 7～N 3 9 3に導入される。

40

【0 2 7 9】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン(残基S 2 5 0～P 2 6 4及びE

50

278～S371)、並びに／又は(i i)ピンドメイン(残基K78～E95)、並びに／又は(i i i)1Aドメイン(残基M1～L77及びV96～V166)に導入されている、配列番号124のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基E278～S371に導入される。

【0280】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i)タワードメイン(残基K255～P269及びT284～S380)、並びに／又は(i i)ピンドメイン(残基K82～K98)、並びに／又は(i i i)1Aドメイン(残基M1～M81及びL99～M171)に導入されている、配列番号125のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基T284～S380に導入される。

10

【0281】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i)タワードメイン(残基D242～P256及びT271～S366)、並びに／又は(i i)ピンドメイン(残基K69～K85)、並びに／又は(i i i)1Aドメイン(残基M1～M68及びM86～M158)に導入されている、配列番号126のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基T271～S366に導入される。

20

【0282】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i)タワードメイン(残基T263～P277及びN295～P392)、並びに／又は(i i)ピンドメイン(残基K88～K107)、並びに／又は(i i i)1Aドメイン(残基M1～L87及びA108～M181)に導入されている、配列番号127のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基N295～P392に導入される。

【0283】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i)タワードメイン(残基D263～P277及びN295～A391)、並びに／又は(i i)ピンドメイン(残基K88～K107)、並びに／又は(i i i)1Aドメイン(残基M1～L87及びA108～M181)に導入されている、配列番号128のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基N295～A391に導入される。

30

【0284】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i)タワードメイン(残基A258～P272及びN290～P386)、並びに／又は(i i)ピンドメイン(残基K86～G102)、並びに／又は(i i i)1Aドメイン(残基M1～L85及びT103～K176)に導入されている、配列番号129のバリエーションを含む。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基N290～P386に導入される。

40

【0285】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、(i)タワードメイン(残基L266～P280及びN298～A392)、並びに／又は(i i)ピンドメイン(残基K92～D108)、並びに／又は(i i i)1Aドメイン(残基M1～L91及びV109～M183)に導入

50

されている、配列番号 130 のバリエーションを含む。少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基 N298 ～ A392 に導入される。

【0286】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン（残基 D262 ～ P276 及び N294 ～ A392）、並びに／又は(ii) ピンドメイン（残基 K88 ～ E104）、並びに／又は(iii) 1Aドメイン（残基 M1 ～ L87 及び M105 ～ M179）に導入されている、配列番号 131 のバリエーションを含む。少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基 N294 ～ A392 に導入される。

10

【0287】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン（残基 D261 ～ P275 及び N293 ～ A389）、並びに／又は(ii) ピンドメイン（残基 K87 ～ E103）、並びに／又は(iii) 1Aドメイン（残基 M1 ～ L86 及び V104 ～ K178）に導入されている、配列番号 132 のバリエーションを含む。少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基 N293 ～ A389 に導入される。

20

【0288】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン（残基 E261 ～ P275 及び T293 ～ A390）、並びに／又は(ii) ピンドメイン（残基 K87 ～ E103）、並びに／又は(iii) 1Aドメイン（残基 M1 ～ L86 及び V104 ～ M178）に導入されている、配列番号 133 のバリエーションを含む。少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸は、好ましくは、タワードメインの残基 T293 ～ A390 に導入される。

30

【0289】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン、並びに(ii) ピンドメイン及び／又は 1Aドメインの各々に導入されている、配列番号 118 ～ 133 のうちのいずれか 1 つのバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、より好ましくは、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つの非天然アミノ酸が、(i) タワードメイン、(ii) ピンドメイン、及び(iii) 1Aドメインの各々に導入されている、配列番号 118 ～ 133 のうちのいずれか 1 つのバリエーションを含む。システイン残基及び非天然アミノ酸の任意の数及び組み合わせは、上で考察されるように導入され得る。

【0290】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(i) E94C 及び／若しくは A360C、(ii) E93C 及び／若しくは K358C、(iii) E93C 及び／若しくは A360C、(iv) E93C 及び／若しくは E361C、(v) E93C 及び／若しくは K364C、(vi) E94C 及び／若しくは L354C、(vii) E94C 及び／若しくは K358C、(viii) E93C 及び／若しくは L354C、(ix) E94C 及び／若しくは E361C、(x) E94C 及び／若しくは K364C、(xi) L97C 及び／若しくは L354C、(xii) L97C 及び／若しくは K358C、(xiii) L97C 及び／若しくは A360C、(xiv) L97C 及び／若しくは E361C、(xv) L97C 及び／若しくは K364C、(xvi) K123C 及び／若しくは L354C、(xvii) K123C 及び／若しくは K358C、(xviii) K123C 及び／若しくは A360C、(xix) K123C 及び／若しくは E361C、(xx) K123C 及び／若しくは K364C、(xxi) N155C 及び／若しくは L354C、(xxii) N155C 及び／若しくは K358C、(xxiii) N155C 及び／若しくは

40

50

はA360C、(xxiv)N155C及び／若しくはE361C、(xxv)N155C及び／若しくはK364C、(xxvi)(i)～(xxv)のいずれか、及びG357C、(xxvii)(i)～(xxv)のいずれか、及びQ100C、(xxviii)(i)～(xxv)のいずれか、及びI127C、(xxix)(i)～(xxv)のいずれか、並びにQ100C及びI127C、(xxx)E94C及び／若しくはF377C、(xxxi)N95C、(xxxii)T91C、(xxxiii)Y92L、E94Y、Y350N、A360C、及びY363N、(xxxiv)E94Y及びA360C、(xxxv)A360C、(xxxvi)Y92L、E94C、Y350N、A360Y、及びY363N、(xxxvii)Y92L、E94C、及びA360Y、(xxxviii)E94C及び／若しくはA360C及びF276A、(xxxix)E94C及び／若しくはL356C、(xl)E93C及び／若しくはE356C、(xli)E93C及び／若しくはG357C、(xlii)E93C及び／若しくはA360C、(xliii)N95C及び／若しくはW378C、(xliv)T91C及び／若しくはS382C、(xlv)T91C及び／若しくはW378C、(xlvi)E93C及び／若しくはN353C、(xlvii)E93C及び／若しくはS382C、(xlviii)E93C及び／若しくはK381C、(xlix)E93C及び／若しくはD379C、(li)E93C及び／若しくはS375C、(lii)E93C及び／若しくはW378C、(lii)E93C及び／若しくはW374C、(liii)E94C及び／若しくはN353C、(liv)E94C及び／若しくはS382C、(lv)E94C及び／若しくはK381C、(lvi)E94C及び／若しくはD379C、(lvi)E94C及び／若しくはS375C、(lviii)E94C及び／若しくはW378C、(lix)E94C及び／若しくはW374C、(lx)E94C及びA360Y、(lxi)E94C、G357C、及びA360C、又は(lxii)T2C、E94C、及びA360Cを含む、配列番号118のバリエーションを含む。(i)～(lxii)のうちのいずれか1つでは、及び／又はは、好ましくは、及びである。

10

20

30

40

50

【0291】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(i)～(lxii)のいずれかに定義される配列番号118におけるものに対応する位置にシステイン残基を含む、配列番号119～133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。配列番号118におけるものに対応する配列番号119～133のうちのいずれか1つにおける位置は、以下の配列番号118～133のアラインメントを使用して同定することができる。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(a)D99C及び／若しくはL341C、(b)Q98C及び／若しくはL341C、又は(d)Q98C及び／若しくはA340Cを含む、配列番号92のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、D90C及び／又はA349Cを含む配列番号96のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、D96C及び／又はA362Cを含む配列番号102のバリエーションを含む。

【0292】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、Fazが、システインの代わりに特定の位置のうちの1つ以上に導入される、(i)～(lxii)のうちのいずれか1つに定義される配列番号118～133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。Fazは、システインの代わりに各特定の位置に導入され得る。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(i)E94Faz及び／又はA360C、(ii)E94C及び／又はA360Faz、(iii)E94Faz及び／又はA360Faz、(iv)Y92L、E94Y、Y350N、A360Faz、及びY363N、(v)A360Faz、(vi)E94Y及びA360Faz、(vii)Y92L、E94Faz、Y350N、A360Y、及びY363N、(viii)Y92L、E94Faz、及びA360Y、(ix)E94Faz及びA360Y、並びに(x)E94C、G357Faz、及びA360Cを含む、配列番号118のバリエーションを含む。

【0293】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、ピンドメインからの1つ以上の単一のアミノ酸欠

失を更に含む。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上などの任意の数の単一のアミノ酸欠失が行われ得る。ヘリカーゼは、より好ましくは、E93の欠失、E95の欠失、又はE93及びE95の欠失を含む、配列番号118のバリエーションを含む。ヘリカーゼは、より好ましくは、(a) E94C、N95の欠失、及びA360C、(b) E93の欠失、E94の欠失、N95の欠失、及びA360C、(c) E93の欠失、E94C、N95の欠失、及びA360C、又は(d) E93C、N95の欠失、及びA360Cを含む、配列番号118のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号118におけるE93に対応する位置の欠失、配列番号118におけるE95に対応する位置の欠失、又は配列番号118におけるE93及びE95に対応する位置の欠失を含む、配列番号119～133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。

10

【0294】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、フックドメインからの1つ以上の単一のアミノ酸欠失を更に含む。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上などの任意の数の単一のアミノ酸欠失が行われ得る。ヘリカーゼは、より好ましくは、任意の数の位置T278～S287の欠失を含む配列番号118のバリエーションを含む。ヘリカーゼは、より好ましくは、(a) E94C、Y279～K284の欠失、及びA360C、(b) E94C、T278、Y279、V286、及びS287の欠失、並びにA360C、(c) E94C、I281及びK284の欠失、並びに単一のGでの置き換え、並びにA360C、(d) E94C、K280及びP2845の欠失、並びに単一のGでの置き換え、並びにA360C、又は(e) Y279～K284の欠失、E94C、F276A、及びA230Cを含む、配列番号118のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号118における278～287に対応する任意の数の位置の欠失を含む、配列番号119～133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。

20

【0295】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、ピンドメインからの1つ以上の単一のアミノ酸欠失及びフックドメインからの1つ以上の単一のアミノ酸欠失を更に含む。

【0296】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン及び／又は2A(RecA様)ドメインに更に導入されているヘリカーゼである。システイン残基及び非天然アミノ酸の任意の数及び組み合わせは、タワー、ピン、及び1Aドメインについて上で考察されるように導入され得る。

30

【0297】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基L275～F291)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R178～T259及びL390～V439)に更に導入されている、配列番号118のバリエーションを含む。

【0298】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基A310～L315)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R212～E294及びG422～S678)に更に導入されている、配列番号119のバリエーションを含む。

40

【0299】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基V343～L359)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R241～N327及びA449～G496)に更に導入されている、配列番号120のバリエーションを含む。

【0300】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基W276～L284)、並びに／

50

又は2A(RecA様)ドメイン(残基R174~D260及びA371~V421)に更に導入されている、配列番号121のバリエントを含む。

【0301】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基R308~Y313)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R206~K293及びI408~L500)に更に導入されている、配列番号122のバリエントを含む。

【0302】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基M302~W306)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R195~D287及びV394~Q450)に更に導入されている、配列番号123のバリエントを含む。

【0303】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基V265~I277)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R167~T249及びL372~N421)に更に導入されている、配列番号124のバリエントを含む。

【0304】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基V270~F283)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R172~T254及びL381~K434)に更に導入されている、配列番号125のバリエントを含む。

【0305】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基V257~F270)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R159~T241及びL367~K420)に更に導入されている、配列番号126のバリエントを含む。

【0306】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基L278~Y294)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R182~T262及びL393~V443)に更に導入されている、配列番号127のバリエントを含む。

【0307】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基L278~Y294)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R182~T262及びL392~V442)に更に導入されている、配列番号128のバリエントを含む。

【0308】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基L273~F289)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R177~N257及びL387~V438)に更に導入されている、配列番号129のバリエントを含む。

【0309】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基L281~F297)、並びに／又は2A(RecA様)ドメイン(残基R184~T265及びL393~I442)に更に導入されている、配列番号130のバリエントを含む。

【0310】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン(残基H277~F293)、並びに／

10

20

30

40

50

又は2A (RecA様) ドメイン (残基R180~T261及びL393~V442) に更に導入されている、配列番号131のバリエーションを含む。

【0311】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン (残基L276~F292)、並びに／又は2A (RecA様) ドメイン (残基R179~T260及びL390~I439) に更に導入されている、配列番号132のバリエーションを含む。

【0312】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン (残基L276~F292)、並びに／又は2A (RecA様) ドメイン (残基R179~T260及びL391~V441) に更に導入されている、配列番号133のバリエーションを含む。

【0313】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(i) I181C、(ii) Y279C、(iii) I281C、及び(iv) E288Cのうちの1つ以上を含む、配列番号118のバリエーションを含む。ヘリカーゼは、(i)~(iv)、例えば、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(i)及び(ii)、(i)及び(iii)、(i)及び(iv)、(ii)及び(iii)、(ii)及び(iv)、(iii)及び(iv)、又は(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の任意の組み合わせを含み得る。ヘリカーゼは、より好ましくは、(a) E94C、I281C、及びA360C、又は(b) E94C、I281C、G357C、及びA360Cを含む、配列番号118のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(i)~(iv)、(a)及び(b)に定義される配列番号118におけるものに対応する位置のうちの1つ以上にシステイン残基を含む、配列番号119~133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。ヘリカーゼは、Fazが、システインの代わりに特定の位置 (又は各特定の位置) のうちの1つ以上に導入されるこれらのバリエーションのいずれかを含み得る。

【0314】

本発明のヘリカーゼは、その表面負電荷を低減するように更に修飾されている。表面残基は、上記に開示されるDdドメインと同じ方法で同定することができる。表面負電荷は、典型的には、アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)などの表面の負に荷電したアミノ酸である。

【0315】

ヘリカーゼは、好ましくは、1つ以上の負に荷電したアミノ酸を、1つ以上の正に荷電したアミノ酸、非荷電アミノ酸、非極性アミノ酸、及び／若しくは芳香族アミノ酸で置換することによって、又は好ましくは、1つ以上の負に荷電したアミノ酸に隣接する1つ以上の正に荷電したアミノ酸を導入することによって、1つ以上の表面負電荷を中和するように修飾されている。好適な正に荷電したアミノ酸には、ヒスチジン(H)、リジン(K)、及びアルギニン(R)が含まれるが、これらに限定されない。非荷電アミノ酸は、正味電荷を有しない。好適な非荷電アミノ酸には、システイン(C)、セリン(S)、スレオニン(T)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、及びグルタミン(Q)が含まれるが、これらに限定されない。非極性アミノ酸は、非極性側鎖を有する。好適な非極性アミノ酸には、グリシン(G)、アラニン(A)、プロリン(P)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、及びバリン(V)が含まれるが、これらに限定されない。芳香族アミノ酸は、芳香族側鎖を有する。好適な芳香族アミノ酸には、ヒスチジン(H)、フェニルアラニン(F)、トリプトファン(W)、及びチロシン(Y)が含まれるが、これらに限定されない。

【0316】

好ましい置換には、RでのEの置換、KでのEの置換、NでのEの置換、KでのDの置換、及びRでのDの置換が含まれるが、これらに限定されない。

【0317】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号118のバリエーションを含み、1つ以上の負に荷電したアミノ酸は、D5、E8、E23、E47、D167、E172、D202、D212、及びE273のうちの1つ以上である。任意の数のこれらのアミノ酸、例えば、アミノ酸の1、2、3、4、5、6、7、又は8個が中和され得る。任意の組み合わせが中和され得る。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119～133のうちのいずれか1つのバリエーションを含み、1つ以上の負に荷電したアミノ酸は、配列番号118におけるD5、E8、E23、E47、D167、E172、D202、D212、及びE273のうちの1つ以上に対応する。配列番号118におけるD5、E8、E23、E47、D167、E172、D202、D212、及びE273に対応する配列番号119～133におけるアミノ酸は、WO2015/055981のアラインメントを使用して決定することができる。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(a) E94C、E273G、及びA360C、又は(b) E94C、E273G、N292G、及びA360Cを含む、配列番号118のバリエーションを含む。

10

【0318】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、1つ以上の天然システイン残基の除去によって更に修飾されている。任意の数の天然システイン残基が除去され得る。1つ以上のシステイン残基は、好ましくは、置換によって除去されている。1つ以上のシステイン残基は、好ましくは、アラニン(A)、セリン(S)、又はバリン(V)で置換されている。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号118のバリエーションを含み、1つ以上の天然システイン残基は、C109、C114、C136、C171、及びC412のうちの1つ以上である。これらのシステイン残基の任意の数及び組み合わせが除去され得る。例えば、配列番号118のバリエーションは、C109；C114；C136；C171；C412；C109及びC114；C109及びC136；C109及びC171；C109及びC412；C114及びC136；C114及びC171；C114及びC412；C136及びC171；C136及びC412；C171及びC412；C109、C114、及びC136；C109、C114、及びC171；C109、C114、及びC412；C109、C136、及びC171；C109、C136、及びC412；C109、C171、及びC412；C114、C136、及びC171；C114、C136、及びC412；C114、C171、及びC412；C136、C171、及びC412；C109、C114、C136、及びC171；C109、C114、C136、及びC412；C109、C114、C171、及びC412；C109、C136、C171、及びC412；又はC109、C114、C136、C171、及びC412を含む得る。

20

30

【0319】

修飾ヘリカーゼは、好ましくは、Dda1993におけるアミノ酸位置(複数可)109及び／又は136に対応する位置(複数可)での修飾又は置換を含む。これは、1つ又は2つのシステイン残基を除去する。これは、Dda1993におけるアミノ酸位置55、114、156、177、210、221、350、及び358に対応する1つ以上の位置での修飾若しくは置換、Dda1993におけるアミノ酸位置114、177、350、及び358に対応する1つ以上の位置での修飾若しくは置換、並びに／又はDda1993における位置40に対応する位置での修飾若しくは置換に加えられる得る。位置109又は対応する位置は、A、V、I、L、M、F、Y、又はWで置換され得る。位置109又は対応する位置は、好ましくは、A又はVで置換されている。位置136又は対応する位置は、A、V、I、L、M、F、Y、又はWで置換され得る。位置136又は対応する位置は、好ましくは、A又はVで置換されている。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、C109、例えば、C109A、C109V、C109I、C109L、C109M、C109F、C109Y、若しくはC109W、及び／又はC136、例えば、C136A、C136V、C136I、C136L、C136M、C136F、C136Y、若しくはC136Wでの置換を含む、配列番号118のバリエーションを含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、C109A及び／又はC136Aを含む配列番号118のバリエーション

40

50

を含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、配列番号119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、又は133のバリエーションを含み、これは、配列番号118におけるC109及び／又はC136に対応する位置（複数可）に置換を含む。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、少なくとも1つのシステイン残基（すなわち、1つ以上のシステイン残基）、及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸（すなわち、1つ以上の非天然アミノ酸）が、タワードメインのみに導入されているヘリカーゼである。好適な修飾は上で考察されている。

【0320】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、以下の変異を含む配列番号118のバリエーションを含む。E93C及びK364C；E94C及びK364C；E94C及びA360C；L97C及びE361C；L97C及びE361C及びC412A；K123C及びE361C；K123C、E361C、及びC412A；N155C及びK358C；N155C、K358C、及びC412A；N155C及びL354C；N155C、L354C、及びC412A；delta E93、E94C、delta N95、及びA360C；E94C、delta N95、及びA360C；E94C、Q100C、I127C、及びA360C；L354C；G357C；E94C、G357C、及びA360C；E94C、Y279C、及びA360C；E94C、I281C、及びA360C；E94C、Y279Faz、及びA360C；Y279C及びG357C；I281C及びG357C；E94C、Y279C、G357C、及びA360C；E94C、I281C、G357C、及びA360C；E8R、E47K、E94C、D202K、及びA360C；D5K、E23N、E94C、D167K、E172R、D212R、及びA360C；D5K、E8R、E23N、E47K、E94C、D167K、E172R、D202K、D212R、及びA360C；E94C、C114A、C171A、A360C、及びC412D；E94C、C114A、C171A、A360C、及びC412S；E94C、C109A、C136A、及びA360C；E94C、C109A、C114A、C136A、C171A、A360C、及びC412S；E94C、C109V、C114V、C171A、A360C、及びC412S；C109A、C114A、C136A、G153C、C171A、E361C、及びC412A；C109A、C114A、C136A、G153C、C171A、E361C、及びC412D；C109A、C114A、C136A、G153C、C171A、E361C、及びC412S；C109A、C114A、C136A、G153C、C171A、K358C、及びC412A；C109A、C114A、C136A、G153C、C171A、K358C、及びC412D；C109A、C114A、C136A、N155C、C171A、K358C、及びC412A；C109A、C114A、C136A、N155C、C171A、K358C、及びC412D；C109A、C114A、C136A、N155C、C171A、K358C、及びC412S；C109A、C114A、C136A、N155C、C171A、L354C、及びC412A；C109A、C114A、C136A、N155C、C171A、L354C、及びC412D；C109A、C114A、C136A、N155C、C171A、L354C、及びC412S；C109A、C114A、K123C、C136A、C171A、E361C、及びC412A；C109A、C114A、K123C、C136A、C171A、E361C、及びC412D；C109A、C114A、K123C、C136A、C171A、E361C、及びC412S；C109A、C114A、K123C、C136A、C171A、K358C、及びC412A；C109A、C114A、K123C、C136A、C171A、K358C、及びC412D；C109A、C114A、K123C、C136A、C171A、K358C、及びC412S；C109A、C114A、C136A、G153C、C171A、E361C、及びC412A；E94C、C109A、C114A、C136A、C171A、A360C、及びC412D；E94C、C109A、C114V、C136A、C171A、A360C、及びC412D；E94C、C109V、C114

10

20

30

40

50

A、C136A、C171A、A360C、及びC412D；L97C、C109A、C114A、C136A、C171A、E361C、及びC412A；L97C、C109A、C114A、C136A、C171A、E361C、及びC412D；又はL97C、C109A、C114A、C136A、C171A、E361C、及びC412S。

【0321】

フックドメイン及び／又は2Aドメインにおける修飾

一実施形態では、本発明のヘリカーゼは、少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸が、フックドメイン及び／又は2A（RecA様モーター）ドメインに導入されているヘリカーゼであり、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する。少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、フックドメイン及び2A（RecA様モーター）ドメインに導入される。

10

【0322】

任意の数のシステイン残基及び／又は非天然アミノ酸が、各ドメインに導入され得る。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のシステイン残基が導入され得、かつ／又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の非天然アミノ酸が導入され得る。1つ以上のシステイン残基のみが導入され得る。1つ以上の非天然アミノ酸のみが導入され得る。1つ以上のシステイン残基及び1つ以上の非天然アミノ酸の組み合わせが導入され得る。

【0323】

少なくとも1つのシステイン残基及び／又は少なくとも1つの非天然アミノ酸は、好ましくは、置換によって導入される。これを行うための方法は、当該技術分野で既知である。フックドメイン及び／又は2A（RecA様モーター）ドメインの好適な修飾は、上で考察されている。

20

【0324】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、（a）Y279C、I181C、E288C、Y279C、及びI181C、（b）Y279C及びE288C、（c）I181C及びE288C、又は（d）Y279C、I181C、及びE288Cを含む、配列番号118のバリエーションである。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、（a）～（d）に定義される配列番号118におけるものに対応する位置のうちの1つ以上に変異を含む、配列番号199～133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。

30

【0325】

表面修飾

一実施形態では、ヘリカーゼは、その表面負電荷を低減するように修飾されており、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する。好適な修飾は上で考察されている。任意の数の表面負電荷が中和され得る。

【0326】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、以下の変異を含む配列番号118のバリエーションを含む。E273G；E8R、E47K、及びD202K；D5K、E23N、D167K、E172R、及びD212R；又はD5K、E8R、E23N、E47K、D167K、E172R、D202K、及びD212R。

40

【0327】

他の修飾ヘリカーゼ

一実施形態では、本発明のヘリカーゼは、以下を含む配列番号118のバリエーションを含む。A360K；Y92L及び／若しくはA360Y；Y92L、Y350N、及びY363N；Y92L及び／若しくはY363N；又はY92L。

【0328】

他の修飾

上記に開示される特異的変異に加えて、配列番号118のバリエーションは、以下の変異のうちの1つ以上を含み得る。K38A、T91F、T91N、T91Q、T91W、V9

50

6 E、V 9 6 F、V 9 6 L、V 9 6 Q、V 9 6 R、V 9 6 W、V 9 6 Y、P 2 7 4 G、V 2 8 6 F、V 2 8 6 W、V 2 8 6 Y、F 2 9 1 G、N 2 9 2 F、N 2 9 2 G、N 2 9 2 P、N 2 9 2 Y、G 2 9 4 Y、G 2 9 4 F、K 3 6 4 A、及び W 3 7 8 A。

【0329】

上記に開示される特異的変異に加えて、配列番号118のバリエーションは、以下を含み得る。K 3 8 A、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；H 6 4 K；E 9 4 C 及び A 3 6 0 C；H 6 4 N；E 9 4 C 及び A 3 6 0 C；H 6 4 Q；E 9 4 C 及び A 3 6 0 C；H 6 4 S；E 9 4 C 及び A 3 6 0 C；H 6 4 W、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；T 8 0 K、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；T 8 0 K、S 8 3 K、E 9 4 C、N 2 4 2 K、N 2 9 3 K、及び A 3 6 0 C；T 8 0 K、S 8 3 K、E 9 4 C、N 2 4 2 K、N 2 9 3 K、A 3 6 0 C、及び T 3 9 4 K；T 8 0 K、S 8 3 K、E 9 4 C、N 2 9 3 K、及び A 3 6 0 C；T 8 0 K、S 8 3 K、E 9 4 C、A 3 6 0 C、及び T 3 9 4 K；T 8 0 K、S 8 3 K、E 9 4 C、A 3 6 0 C、及び T 3 9 4 N；T 8 0 K、E 9 4 C、N 2 4 2 K、及び A 3 6 0 C；T 8 0 K、E 9 4 C、N 2 4 2 K、N 2 9 3 K、及び A 3 6 0 C；T 8 0 K、E 9 4 C、N 2 9 3 K、及び A 3 6 0 C；T 8 0 N、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；H 8 2 A、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；H 8 2 A、P 8 9 A、E 9 4 C、F 9 8 A、及び A 3 6 0 C；H 8 2 F、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；H 8 2 Q、E 9 4 C、A 3 6 0 C；H 8 2 R、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；H 8 2 W、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；H 8 2 W、P 8 9 W、E 9 4 C、F 9 8 W、及び A 3 6 0 C；H 8 2 Y、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；S 8 3 K、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；S 8 3 K、T 8 0 K、E 9 4 C、A 3 6 0 C、及び T 3 9 4 K；S 8 3 N、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；S 8 3 T、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；N 8 8 H、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；N 8 8 Q、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；P 8 9 A、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；P 8 9 A、F 9 8 W、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；P 8 9 A、E 9 4 C、F 9 8 Y、及び A 3 6 0 C；P 8 9 A、E 9 4 C、F 9 8 A、及び A 3 6 0 C；P 8 9 F、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；P 8 9 S、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；P 8 9 T、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；P 8 9 W、E 9 4 C、F 9 8 W、及び A 3 6 0 C；P 8 9 Y、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；T 9 1 F、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；T 9 1 N、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；T 9 1 Q、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；T 9 1 W、E 9 4 C、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 9 6 E、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 9 6 F、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 9 6 L、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 9 6 Q、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 9 6 R、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 9 6 W、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 9 6 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 9 8 A、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 9 8 L、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 9 8 V、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 9 8 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 9 8 W 及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 A、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 F、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 I、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 K、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 L、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 S、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 T、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 W、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 1 5 0 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 4 0 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 4 0 W、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 4 2 K、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 4 2 K、N 2 9 3 K、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、P 2 7 4 G、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、L 2 7 5 G、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 7 6 A、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 7 6 I、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 7 6 M、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 7 6 V、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 7 6 W、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 7 6 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 2 8 6 F、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 2 8 6 W、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、V 2 8 6 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、S 2 8 7 F、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、S 2 8 7 W、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、S 2 8 7 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、F 2 9 1 G、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 9 2 F、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 9 2 G、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 9 2 P、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 9 2 Y、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 9 3 F、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 9 3 K、及び A 3 6 0 C；E 9 4 C、N 2 9 3 Q、及び A 3

10

20

30

40

50

60C; E94C、N293Y、及びA360C; E94C、G294F、及びA360C; E94C、G294Y、及びA360C; E94C、A36C、及びK364A; E94C、A360C、W378A; E94C、A360C、及びT394K; E94C、A360C、及びH396Q; E94C、A360C、及びH396S; E94C、A360C、及びH396W; E94C、A360C、及びY415F; E94C、A360C、及びY415K; E94C、A360C、及びY415M; 又はE94C、A360C、及びY415W。

【0330】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(a) E94C/A360C/W378A、又は(b) E94C/A360C/C109A/C136A/W378A、又は(d) E94C/A360C/C109A/C136A/W378A、次いで(ΔM1)G1G2(すなわち、M1の欠失、次いでG1及びG2の付加)を含む、配列番号118のバリエーションを含む。

10

【0331】

配列番号118~133のうちのいずれか1つの好ましいバリエーションは、(本発明の修飾に加えて)1つのグリシン残基(G)で置き換えられたN末端メチオニン(M)を有する。実施例では、これは、(ΔM1)G1として示されている。これはM1Gとも称され得る。上で考察されるバリエーションのいずれかは、M1Gを更に含み得る。

【0332】

本発明の最も好ましいヘリカーゼは、(a) E94C/F98W/A360C/C109A/C136A/K194L、(b) M1G/E94C/F98W/A360C/C109A/C136A/K194L、(c) E94C/F98W/A360C/C109A/C136A/K199L、又は(d) M1G/E94C/F98W/A360C/C109A/C136A/K199Lを含む、配列番号118のバリエーションを含む。

20

【0333】

他の好ましいヘリカーゼ

本発明の他の好ましいヘリカーゼは、以下での置換を含む配列番号118のバリエーションを含む。

T40/E94/F98、例えば、T40Y/E94C/F98W、

T40/E94/F98/C114、例えば、T40Y/E94C/F98W/C114I、

30

T40/E94/F98/K177、例えば、T40Y/E94C/F98W/K177M、

T40/E94/F98/Y350、例えば、T40Y/E94C/F98W/Y350I、若しくはT40Y/E94C/F98W/Y350E、

T40/E94/F98/K358、例えば、T40Y/E94C/F98W/K358I、

E94/F98/C114、例えば、E94C/F98W/C114I、

E94/F98/K177、例えば、E94C/F98W/K177M、

40

E94/F98/Y350、例えば、E94C/F98W/Y350I、若しくはE94C/F98W/Y350E、

E94/F98/K358、例えば、E94C/F98W/K358I、

T40/E94/F98/C114/K177、例えば、T40Y/E94C/F98W/C114I/K177M、

T40/E94/F98/C114/Y350、例えば、T40Y/E94C/F98W/C114I/Y350I、若しくはT40Y/E94C/F98W/C114I/Y350E、

T40/E94/F98/C114/K358、例えば、T40Y/E94C/F98W/C114I/K358I、

50

T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W
 / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I、若しくはT 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / Y 3
 5 0 E、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W
 / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W
 / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはT 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / Y 3 5 0 E / K 3
 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1
 7 7 M、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / Y 3
 5 0 I、若しくはE 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 3
 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / Y 3
 5 0 I、若しくはE 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E、
 E 9 4 / F 9 8 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / K 3
 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / Y 3 5 0 I / K 3
 5 8 I、若しくはE 9 4 C / F 9 8 W / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I、若しくはT 4 0 Y / E 9 4 C / F 9
 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはT 4 0 Y / E 9 4 C / F 9
 8 W / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはT 4 0 Y / E 9 4 C / F 9
 8 W / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1
 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I、若しくはE 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M
 / Y 3 5 0 E、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1
 4 I / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1
 4 I / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはE 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E
 / K 3 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7
 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはE 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E
 / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y
 / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはT
 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはE 9 4 C / F 9 8 W /
 C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / F 9 8 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9 4 L、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1

10

20

30

40

50

4 I K 1 9 4 L、
 T 4 0 / F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7
 7 M K 1 9 4 L、
 T 4 0 / F 9 8 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9
 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E、
 T 4 0 / F 9 8 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9
 4 L / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L、
 F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L、
 F 9 8 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、 10
 若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E、
 F 9 8 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C
 1 1 4 I / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 20
 W / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K
 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E、
 T 4 0 / F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8
 W / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / F 9 8 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8
 W / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / K
 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K
 1 7 7 M / K 1 9 4 L、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 30
 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L / Y 3 5
 0 E、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K
 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / K
 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5
 0 E、
 F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / K
 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9 4 L / Y 40
 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5
 8 I、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4
 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y /
 E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4
 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4
 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y /
 E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、 50

T 4 0 / F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4
 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y /
 E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1
 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4
 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1
 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1
 1 4 I / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4
 I / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / K 1
 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / K 1 7 7
 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0
 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8
 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y
 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 F 9 8 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9
 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは E 9 4
 C / F 9 8 W / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / C 1 1 4 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / C 1 1 4 I / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / K 1 7 7 M / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは T
 4 0 Y / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 C 1 1 4 / A 3 6 0、例えば、C 1 1 4 I / A 3 6 0 C、
 K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、K 1 7 7 M / A 3 6 0 C、
 Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは Y 3 5 0 E / A 3 6 0
 C、
 K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M /
 A 3 6 0 C、
 T 4 0 / C 1 1 4 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 I /
 A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / C 1 1 4 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / C 1 1 4 I / K 3 5 8 I /
 A 3 6 0 C、
 T 4 0 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I /
 A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / K 1 7 7 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I /
 A 3 6 0 C、
 T 4 0 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I /
 A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 C 1 1 4 / K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / A 3 6 0 C、
 C 1 1 4 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、C 1 1 4 I / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しく
 は C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 C 1 1 4 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、C 1 1 4 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 K 1 7 7 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しく
 は K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、

K177/K358/A360、例えば、K177M/K358I/A360C、
 Y350/K358/A360、例えば、Y350I/K358I/A360C、若しくは
 Y350E/K358I/A360C、
 T40/C114/K177/Y350/A360、例えば、T40Y/C114I/K
 177M/Y350I/A360C、若しくはT40Y/C114I/K177M/Y3
 50E/A360C、
 T40/C114/K177/K358/A360、例えば、T40Y/C114I/K
 177M/K358I/A360C、
 T40/C114/Y350/K358/A360、例えば、T40Y/C114I/Y
 350I/K358I/A360C、若しくはT40Y/C114I/Y350E/K3 10
 58I/A360C、
 T40/K177/Y350/K358/A360、例えば、T40Y/K177M/Y
 350I/K358I/A360C、若しくはT40Y/K177M/Y350E/K3
 58I/A360C、
 C114/K177/Y350/A360、例えば、C114I/K177M/Y350
 I/A360C、若しくはC114I/K177M/Y350E/A360C、
 C114/K177/K358/A360、例えば、C114I/K177M/K358
 I/A360C、
 C114/Y350/K358/A360、例えば、C114I/Y350I/K358
 I/A360C、若しくはC114I/Y350E/K358I/A360C、 20
 K177/Y350/K358/A360、例えば、K177M/Y350I/K358
 I/A360C、若しくはK177M/Y350E/K358I/A360C、
 T40/C114/K177/Y350/K358/A360、例えば、T40Y/C1
 14I/K177M/Y350I/K358I/A360C、若しくはK177M/Y3
 50E/K358I/A360C、
 C114/K177/Y350/K358/A360、例えば、C114I/K177M
 /Y350I/K358I/A360C、若しくはC114I/K177M/Y350E
 /K358I/A360C、
 T40/E94/F98/C109、例えば、T40Y/E94C/F98W/C109
 A、 30
 T40/E94/F98/C109/C114、例えば、T40Y/E94C/F98W
 /C109A/C114I、
 T40/E94/F98/C109/K177、例えば、T40Y/E94C/F98W
 /C109A/K177M、
 T40/E94/F98/C109/Y350、例えば、T40Y/E94C/F98W
 /C109A/Y350I、若しくはT40Y/E94C/F98W/C109A/Y3
 50E、
 T40/E94/F98/C109/K358、例えば、T40Y/E94C/F98W
 /C109A/K358I、
 E94/F98/C109/C114、例えば、E94C/F98W/C109A/C1 40
 14I、
 E94/F98/C109/K177、例えば、E94C/F98W/C109A/K1
 77M、
 E94/F98/C109/Y350、例えば、E94C/F98W/C109A/Y3
 50I、若しくはE94C/F98W/C109A/Y350E、
 E94/F98/C109/K358、例えば、E94C/F98W/C109A/K3
 58I、
 T40/E94/F98/C109/C114/K177、例えば、T40Y/E94C
 /F98W/C109A/C114I/K177M、
 T40/E94/F98/C109/C114/Y350、例えば、T40Y/E94C 50

／F98W／C109A／C114I／Y350I、若しくはT40Y／E94C／F98W／C109A／C114I／Y350E、
T40／E94／F98／C109／C114／K358、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／C114I／K358I、
T40／E94／F98／C109／K177／Y350、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／K177M／Y350I o e T40Y／E94C／F98W／C109A／K177M／Y350E、
T40／E94／F98／C109／K177／K358、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／K177M／K358I、
T40／E94／F98／C109／Y350／K358、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／Y350I／K358I、若しくはT40Y／E94C／F98W／C109A／Y350E／K358I、
E94／F98／C109／C114／K177、例えば、E94C／F98W／C109A／C114I／K177M、
E94／F98／C109／C114／Y350、例えば、E94C／F98W／C109A／C114I／Y350I、若しくはE94C／F98W／C109A／C114I／Y350E、
E94／F98／C109／C114／K358、例えば、E94C／F98W／C109A／C114I／K358I、
E94／F98／C109／K177／Y350、例えば、E94C／F98W／C109A／K177M／Y350I、若しくはE94C／F98W／C109A／K177M／Y350E、
E94／F98／C109／K177／K358、例えば、E94C／F98W／C109A／K177M／K358I、
E94／F98／C109／Y350／K358、例えば、E94C／F98W／C109A／Y350I／K358I、若しくはE94C／F98W／C109A／Y350E／K358I、
T40／E94／F98／C109／C114／K177／Y350、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／C114I／K177M／Y350I、若しくはT40Y／E94C／F98W／C109A／C114I／K177M／Y350E、
T40／E94／F98／C109／C114／K177／K358、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／C114I／K177M／K358I、
T40／E94／F98／C109／C114／Y350／K358、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／C114I／Y350I／K358I、若しくはT40Y／E94C／F98W／C109A／C114I／Y350E／K358I、
T40／E94／F98／C109／K177／Y350／K358、例えば、T40Y／E94C／F98W／C109A／K177M／Y350I／K358I、若しくはT40Y／E94C／F98W／C109A／K177M／Y350E／K358I、
E94／F98／C109／C114／K177／Y350、例えば、E94C／F98W／C109A／C114I／K177M／Y350I、若しくはE94C／F98W／C109A／C114I／K177M／Y350E、
E94／F98／C109／C114／K177／K358、例えば、E94C／F98W／C109A／C114I／K177M／K358I、
E94／F98／C109／C114／Y350／K358、例えば、E94C／F98W／C109A／C114I／Y350I／K358I、若しくはE94C／F98W／C109A／C114I／Y350E／K358I、
E94／F98／C109／K177／Y350／K358、例えば、E94C／F98W／C109A／K177M／Y350I／K358I、若しくはE94C／F98W／C109A／K177M／Y350E／K358I、
T40／E94／F98／C109／C114／K177／Y350／K358、例えば

10

20

30

40

50

、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I /
K 3 5 8 I、若しくはT 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7
7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4
C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しく
はE 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I
、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I /
C 1 3 6 A、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A /
K 1 7 7 M、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A /
Y 3 5 0 I、若しくはT 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A /
K 3 5 8 I、
C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / C 1 1 4 I、
C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M、
C 1 0 9 / C 1 3 6 / Y 3 5 0、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 I、若しく
はC 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E、
C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 3 5 8 I、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C
1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C
1 1 4 I / C 1 3 6 A / Y 3 5 0、若しくはT 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3
6 A / Y 3 5 0 I、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C
1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 3 5 8 I、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C
1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E、若しくはT 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1
7 7 M / Y 3 5 0 I、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C
1 3 6 A / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C
1 3 6 A / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくはT 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3
5 0 E / K 3 5 8 I、
C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6
A / K 1 7 7 M、
C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / Y 3 5 0、例えば、C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6
A / Y 3 5 0 I、若しくはC 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E、
C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6
A / K 3 5 8 I、
C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7
M / Y 3 5 0 I、若しくはC 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E、
C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7
M / K 3 5 8 I、
C 1 0 9 / C 1 3 6 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0
I / K 3 5 8 I、若しくはC 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / C 1
0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I、若しくはT 4 0 Y / C 1 0

10

20

30

40

50

9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E、
 T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / C 1
 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / C 1
 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y / C 1 0 9
 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / C 1
 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y / C 1 0
 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、C 1 0 9 A / C 1 1 4 I 10
 / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I、若しくは C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A
 / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E、
 C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A / C 1 1 4 I
 / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I、
 C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A / C 1 1 4 I
 / C 1 3 6 A Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A Y
 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A / C 1 3 6 A
 / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M
 / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、 20
 T 4 0 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4
 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若
 しくは T 4 0 Y / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3
 5 8 I、
 C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、C 1 0 9 A /
 C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I C 1 0 9 A / C 1 1 4
 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W
 / C 1 0 9 A / K 1 9 4 L、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C 30
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9
 8 W / C 1 0 9 A / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 9 4、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L、 40
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / K 1 9 4、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 9 4 L
 / Y 3 5 0 E、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 9 4 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / K 1 9 4 L / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4、例えば、T 4 0 Y
 / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L / K 1 7 7 M、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 9 4 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y 50

／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I、若しくは T
4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 9 4／K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y
／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／K 3 5 8 I、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／K 1 7 7／K 1 9 4／Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y
／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I、若しくは T
4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／K 1 7 7／K 1 9 4／K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y
／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／K 3 5 8 I、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／K 1 9 4／Y 3 5 0／K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y 10
／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I／K 3 5 8 I、若しくは T
4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E／K 3 5 8 I、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 7 7／K 1 9 4、例えば、E 9 4 C／F 9 8
W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／K 1 7 7 M、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 9 4／Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C／F 9 8
W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I、若しくは E 9 4 C／F 9 8 W／
C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 9 4／K 3 5 8、例えば、E 9 4 C／F 9 8
W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／K 3 5 8 I、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／K 1 7 7／K 1 9 4／Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C／F 9 8 20
W／C 1 0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I o E 9 4 C／F 9 8 W／C 1
0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／K 1 7 7／K 1 9 4／K 3 5 8、例えば、E 9 4 C／F 9 8
W／C 1 0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／K 3 5 8 I、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／K 1 9 4／Y 3 5 0／K 3 5 8、例えば、E 9 4 C／F 9 8
W／C 1 0 9 A／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I／K 3 5 8 I、若しくは E 9 4 C／F 9 8 W／
C 1 0 9 A／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E／K 3 5 8 I、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 7 7／K 1 9 4／Y 3 5 0、例えば
、T 4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／
Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 7 30
7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 7 7／K 1 9 4／K 3 5 8、例えば
、T 4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／
K 3 5 8 I、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 9 4／Y 3 5 0／K 3 5 8、例えば
、T 4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I／
K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9
4 L／Y 3 5 0 E／K 3 5 8 I、
T 4 0／E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／K 1 7 7／K 1 9 4／Y 3 5 0／K 3 5 8、例えば
、T 4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I／ 40
K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y／E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／K 1 7 7 M／K 1 9
4 L／Y 3 5 0 E／K 3 5 8 I、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 7 7／K 1 9 4／Y 3 5 0、例えば、E 9 4
C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I、若しく
は E 9 4 C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 E
、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 7 7／K 1 9 4／K 3 5 8、例えば、E 9 4
C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 7 7 M／K 1 9 4 L／K 3 5 8 I、
E 9 4／F 9 8／C 1 0 9／C 1 1 4／K 1 9 4／Y 3 5 0／K 3 5 8、例えば、E 9 4
C／F 9 8 W／C 1 0 9 A／C 1 1 4 I／K 1 9 4 L／Y 3 5 0 I／K 3 5 8 I、若しく 50

は E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I
、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、E 9 4
C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しく
は E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I
、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5
8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K
1 9 4 L / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9
A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 1 9 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例え
ば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 1 9 4 L / Y 3 5 0
I / K 3 5 8 I、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M /
K 1 9 4 L / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W
/ C 1 0 9 A / C 1 3 6 A、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
/ F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
/ F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
/ F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9
8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
/ F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 3 5 8 I、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / Y 3 5 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 I、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A /
C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 3 5 8、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
9 A / C 1 3 6 A / K 3 5 8 I、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、T 4 0 Y
/ E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y
/ E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 I、若しくは T
4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y
/ E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / C 1 3 6 A / K 3 5 8 I、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / Y 3 5 0、例えば、T 4 0 Y
/ E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I、若しくは T 4
0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / K 1 7 7 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y
/ E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I、
T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 3 6 / Y 3 5 0 / K 3 5 8、例えば、T 4 0 Y
/ E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I、若しくは T 4
0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / C 1 3 6 / K 1 7 7、例えば、E 9 4 C / F 9 8

10

20

30

40

50

W/C109A/C114I/C136A/K177M、
 E94/F98/C109/C114/C136/Y350、例えば、E94C/F98
 W/C109A/C114I/C136A/Y350I、若しくはE94C/F98W/
 C109A/C114I/C136A/Y350E、
 E94/F98/C109/C114/C136/K358、例えば、E94C/F98
 W/C109A/C114I/C136A/K358I、
 E94/F98/C109/C136/K177/Y350、例えば、E94C/F98
 W/C109A/C136AK177M/Y350I、若しくはE94C/F98W/C
 109A/C136AK177M/Y350E、
 E94/F98/C109/C136/K177/K358、例えば、E94C/F98
 W/C109A/C136AK177M/K358I、
 E94/F98/C109/C136/Y350/K358、例えば、E94C/F98
 W/C109A/C136AY350I/K358I、若しくはE94C/F98W/C
 109A/C136AY350E/K358I、
 T40/E94/F98/C109/C114/C136/K177/Y350、例えば
 、T40Y/E94C/F98W/C109A/C114I/C136A/K177M/
 Y350I、若しくはT40Y/E94C/F98W/C109A/C114I/C13
 6A/K177M/Y350E、
 T40/E94/F98/C109/C114/C136/K177/K358、例えば
 、T40Y/E94C/F98W/C109A/C114I/C136A/K177M/
 K358I、
 T40/E94/F98/C109/C114/C136/Y350/K358、例えば
 、T40Y/E94C/F98W/C109A/C114I/C136A/Y350I/
 K358I、若しくはT40Y/E94C/F98W/C109A/C114I/C13
 6A/Y350E/K358I、
 T40/E94/F98/C109/C136/K177/Y350/K358、例えば
 、T40Y/E94C/F98W/C109A/C136A/K177M/Y350I/
 K358I、若しくはT40Y/E94C/F98W/C109A/C136A/K17
 7M/Y350E/K358I、
 E94/F98/C109/C114/C136/K177/Y350、例えば、E94
 C/F98W/C109A/C114I/C136A/K177M/Y350I、若しく
 はE94C/F98W/C109A/C114I/C136A/K177M/Y350E
 、
 E94/F98/C109/C114/C136/K177/K358、例えば、E94
 C/F98W/C109A/C114I/C136A/K177M/K358I、
 E94/F98/C109/C114/C136/Y350/K358、例えば、E94
 C/F98W/C109A/C114I/C136A/Y350I/K358I、若しく
 はE94C/F98W/C109A/C114I/C136A/Y350E/K358I
 、
 E94/F98/C109/C136/K177/Y350/K358、例えば、E94
 C/F98W/C109A/C136A/K177M/Y350I/K358I、若しく
 はE94C/F98W/C109A/C136A/K177M/Y350E/K358I
 、
 T40/E94/F98/C109/C114/C136/K177/Y350/K35
 8、例えば、T40Y/E94C/F98W/C109A/C114I/C136A/K
 177M/Y350I/K358I、若しくはT40Y/E94C/F98W/C109
 A/C114I/C136A/K177M/Y350E/K358I、
 E94/F98/C109/C114/C136/K177/Y350/K358、例え
 ば、E94C/F98W/C109A/C114I/C136A/K177M/Y350
 I/K358I、若しくはE94C/F98W/C109A/C114I/C136A/

K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W
 / C 1 0 9 A / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9
 8 W / C 1 0 9 A / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C
 / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / C 1 1 4 I / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / K 1 7 7 M / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / Y 3 5 0 E
 / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0
 9 A / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y
 / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y
 / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは T
 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y
 / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y
 / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは T
 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 / A 3 6 0 C
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、T 4 0 Y
 / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、若しくは T
 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W /
 C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W /
 C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 C / F 9 8
 W / C 1 0 9 A / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W /
 C 1 0 9 A / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば
 、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I /

10

20

30

40

50

A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7
 7 M / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば
 、 T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I /
 A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば
 、 T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I /
 A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5
 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば 10
 、 T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I /
 A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5
 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / A 3 6 0、例えば、E 9 4
 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / A 3 6 0 C、若しく
 は E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / A 3 6 0 C
 、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、E 9 4
 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、E 9 4 20
 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、若しく
 は E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C
 、
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例えば、E 9 4
 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、若しく
 は E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C
 、
 T 4 0 / E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6
 0、例えば、T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y
 3 5 0 I / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、若しくは T 4 0 Y / E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 30
 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C、又は
 E 9 4 / F 9 8 / C 1 0 9 / C 1 1 4 / K 1 7 7 / Y 3 5 0 / K 3 5 8 / A 3 6 0、例え
 ば、E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M / Y 3 5 0 I / K 3 5 8
 I / A 3 6 0 C、若しくは E 9 4 C / F 9 8 W / C 1 0 9 A / C 1 1 4 I / K 1 7 7 M /
 Y 3 5 0 E / K 3 5 8 I / A 3 6 0 C。

【0334】

配列番号 118 のこれらのバリエーションのいずれかは、(a) ; (b) ; (c) ; (d)
 ; (a) 及び (b) ; (a) 及び (c) ; (a) 及び (d) ; (b) 及び (c) ; (b)
 及び (d) ; (c) 及び (d) ; (a)、(b) 及び (c) ; (a)、(b) 及び (d)
 ; (a)、(c) 及び (d) ; (b)、(c) 及び (d) ; 又は (a)、(b)、(c) 40
 及び (d) を含む、位置 (a) 55、(b) 156、(c) 210、及び (d) 221 の
 任意の数及び組み合わせでの修飾又は置換を更に含み得る。配列番号 118 のこれらのバ
 リエーションのいずれかは、(a) ; (b) ; (c) ; (d) ; (a) 及び (b) ; (a) 及
 び (c) ; (a) 及び (d) ; (b) 及び (c) ; (b) 及び (d) ; (c) 及び (d)
 ; (a)、(b) 及び (c) ; (a)、(b) 及び (d) ; (a)、(c) 及び (d) ;
 (b)、(c) 及び (d) ; 又は (a)、(b)、(c) 及び (d) を含む、(a) T 5
 5 K、(b) T 156 F、(c) T 210 K、及び (d) N 221 E の任意の数及び組み
 合わせを更に含み得る。

【0335】

追加の修飾 / 置換

10

20

30

40

50

本発明はまた、D d a 1 9 9 3における以下のアミノ酸位置に対応する位置のうちの1つ以上が修飾又は置換されている、修飾DNA依存性ATPase (D d a) ヘリカーゼも提供する。8 6、9 0、9 2、9 7、1 0 1、1 0 2、2 7 3、2 9 3、3 0 0、3 0 1、3 0 3、3 0 5、3 0 8、3 1 0、3 1 2、3 1 7、3 2 3、3 2 8、3 3 2、3 3 4、3 3 5、3 3 6、3 3 7、3 3 9、3 5 1、3 5 4、3 5 9、3 6 1、3 6 4、3 6 6、3 6 8、3 7 1、3 7 4、3 7 6、3 7 7、3 7 9、及び3 8 8。本発明はまた、D d a 1 9 9 3における以下のアミノ酸位置に対応する位置のうちの1つ以上が修飾又は置換されている、修飾DNA依存性ATPase (D d a) ヘリカーゼも提供する。3 5 1、3 5 4、及び3 6 1。3 5 1、3 5 4、3 6 1、3 5 1、及び3 5 4、3 5 1及び3 6 1、3 5 4及び3 6 1、又は3 5 1、3 5 4、及び3 6 1を含む、これらの修飾／置換の任意の数及び組み合わせが行われ得る。これらの位置は、単独で、又は上記の本発明の修飾若しくは置換のうちのいずれかと組み合わせて修飾又は置換され得る。

10

【0 3 3 6】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、以下の置換のうちの1つ以上を含む配列番号1 1 8のバリエーションを含む。K 8 6 A、V 9 0 T、Y 9 2 A、Y 9 2 D、Y 9 2 F、Y 9 2 G、Y 9 2 H、Y 9 2 N、Y 9 2 Q、Y 9 2 S、Y 9 2 T、Y 9 2 V、Y 9 2 W、L 9 7 H、K 1 0 1 A、E 1 0 2 G、E 2 7 3 A、N 2 9 3 H、I 2 0 0 A、I 3 0 0 F、E 3 0 1 I、E 3 0 3 I、Y 3 0 5 L、F 3 0 8 I、F 3 0 8 L、K 3 1 0 A、K 3 1 0 I、K 3 1 0 L、R 3 1 2 I、R 3 1 2 L、R 3 1 2 M、E 3 1 7 I、E 3 1 7 Y、W 3 2 3 H、E 3 2 8 I、D 3 3 2 A、D 3 3 2 L、E 3 3 4 A、E 3 3 4 I、E 3 3 4 Y、Y 3 3 5 A、Y 3 3 5 I、Y 3 3 5 L、Y 3 3 6 L、R 3 3 7 I、R 3 3 7 L、R 3 3 7 M、K 3 3 9 A、K 3 3 9 I、K 3 3 9 L、K 3 5 1 I、K 3 5 1 Q、L 3 5 4 Q、L 3 5 4 A、T 3 5 9 L、E 3 6 1 T、E 3 6 1 I、E 3 6 1 Q、K 3 6 4 A、K 3 6 4 R、W 3 6 6 L、K 3 6 8 A、K 3 6 8 I、K 3 6 8 L、K 3 7 1 I、K 3 7 1 L、K 3 7 1 M、W 3 7 4 A、W 3 7 4 L、W 3 7 4 L、D 3 7 6 S、F 3 7 7 A、D 3 7 9 A、D 3 7 9 L、又はK 3 8 8 R。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、以下の置換のうちの1つ以上を含む配列番号1 1 8のバリエーションを含む。(a) K 3 5 1 I又はK 3 5 1 Q、(b) L 3 5 4 A又はL 3 5 4 Q、及び(c) E 3 6 1 I又はE 3 6 1 Q。バリエーションは、(a)、(b)、(c)、(a)及び(b)、(a)及び(c)、(b)及び(c)、又は(a)、(b)、及び(c)を含み得る。これらの置換は、単独で、又は上記の本発明の修飾又は置換のうちのいずれかと組み合わせて行われ得る。

20

30

【0 3 3 7】

バリエーション

ヘリカーゼのバリエーションは、野生型ヘリカーゼのものとは異なるアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を有する酵素である。特に、配列番号1 1 8～1 3 3のうちのいずれか1つのバリエーションは、配列番号1 1 8～1 3 3のうちのいずれか1つのものとは異なるアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を有する酵素である。ポリヌクレオチド結合活性は、当該技術分野で既知の方法を使用して測定することができる。好適な方法には、蛍光異方性、トリプトファン蛍光、及び電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)が含まれるが、これらに限定されない。例えば、一本鎖ポリヌクレオチドに結合するバリエーションの能力は、実施例に記載されるように決定することができる。

40

【0 3 3 8】

バリエーションは、ヘリカーゼ活性を有する。これは、様々な方法で測定することができる。例えば、ポリヌクレオチドに沿って転位させるバリエーションの能力は、電気生理学、蛍光アッセイ、又はATP加水分解を使用して測定することができる。

【0 3 3 9】

バリエーションは、ヘリカーゼをコードするポリヌクレオチドのハンドリングを促進並びに／又はその活性を高い塩濃度及び／若しくは室温で促進する修飾を含み得る。

【0 3 4 0】

配列番号1 1 8～1 3 3のうちのいずれか1つのアミノ酸配列の全長にわたって、バリ

50

アントは、好ましくは、アミノ酸類似性又は同一性に基づき、その配列と少なくとも20%相同である。より好ましくは、バリエーションポリペプチドは、配列全体にわたって配列番号118~133のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に対するアミノ酸同一性に基づき、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、97%、又は99%相同であり得る。より好ましくは、バリエーションポリペプチドは、配列全体にわたって配列番号118~133のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、97%、又は99%同一であり得る。100以上、例えば、150、200、300、400、又は500以上の連続アミノ酸のストレッチにわたって、少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%のアミノ酸同一性（「ハードホモロジー」）が存在し得る。相同性は、以下に記載されるように決定される。特に、上で考察される特異的修飾に加えて、配列番号118~133のうちのいずれか1つのバリエーションは、以下に考察されるような1つ以上の置換、1つ以上の欠失、及び／又は1つ以上の付加を含み得る。

10

【0341】

配列番号118~133のうちのいずれか1つの好ましいバリエーションは、アミノ（N）末端及び／又はカルボキシ（C）末端にFazなどの非天然アミノ酸を有する。配列番号118~133のうちのいずれか1つの好ましいバリエーションは、アミノ（N）末端及び／又はカルボキシ（C）末端にシステイン残基を有する。配列番号118~133のうちのいずれか1つの好ましいバリエーションは、アミノ（N）末端にシステイン残基、及びカルボキシ（C）末端にFazなどの非天然アミノ酸、又はその逆を有する。

20

【0342】

配列番号118の好ましいバリエーションは、以下の修飾E54G、D151E、I196N、及びG357Aのうちの1つ以上、例えば、それらの全てを含有する。

【0343】

接続なし

1つの好ましい実施形態では、本発明の修飾ヘリカーゼ中の導入されたシステイン及び／又は非天然アミノ酸のいずれも互いに接続されていない。

30

【0344】

導入されたシステイン及び／又は非天然アミノ酸の更に2つを接続する

別の好ましい実施形態では、本発明の修飾ヘリカーゼ中の導入されたシステイン及び／又は非天然アミノ酸の更に2つが互いに接続されている。これは、典型的には、ポリヌクレオチドから結合解除する本発明のヘリカーゼの能力を低減させる。

【0345】

導入されたシステイン及び／又は非天然アミノ酸の更に2つの任意の数及び組み合わせは、互いに接続され得る。例えば、3、4、5、6、7、8個以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、互いに接続され得る。1つ以上のシステインは、1つ以上のシステインに接続され得る。1つ以上のシステインは、Fazなどの1つ以上の非天然アミノ酸に接続され得る。Fazなどの1つ以上の非天然アミノ酸は、Fazなどの1つ以上の非天然アミノ酸に接続され得る。

40

【0346】

2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、任意の方法で接続され得る。接続は、一時的であってもよく、例えば、非共有結合であってもよい。一時的な接続であっても、ヘリカーゼからのポリヌクレオチドの結合解除を低減させる。

【0347】

2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、好ましくは、親和性分子によって

50

接続されている。好適な親和性分子は、当該技術分野で既知である。親和性分子は、好ましくは、(a) 相補的ポリヌクレオチドであるか(その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2010/086602)、(b) 抗体若しくはその断片、及び相補的エプトープであるか(Biochemistry 6th Ed, W. H. Freeman and co (2007) pp953-954)、(c) ペプチドジッパーであるか(O'Shea et al., Science 254 (5031): 539-544)、(d) β -シート増大によって相互作用することができるか(Remaut and Waksman Trends Biochem. Sci. (2006) 31 436-444)、(e) 水素結合、パイ-積層、若しくは塩橋を形成することができるか、(f) ロタキサンであるか(Xiang Ma and He Tian Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 70-80)、(g) アプタマー及び相補的タンパク質であるか(James, W. in Encyclopedia of Analytical Chemistry, R. A. Meyers (Ed.) pp. 4848-4871 John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000)、又は(h) ハーフケレーター(half-chelator)である(Hammerstein et al. J Biol Chem. 2011 April 22; 286 (16): 14324-14334)。(e) について、水素結合は、電気陰性原子に結合したプロトンと別の電気陰性原子との間に生じる。パイ-積層は、環の平面が平行である場合に一緒に積層することができる2つの芳香族環を必要とする。塩橋は、それらの電子をいくつかの原子上で非局在化することができる基の間、例えば、アスパラギン酸とアルギニンとの間にある。

10

20

【0348】

2つ以上の部分は、ヘキサヒスタグ又はNi-NTAによって一時的に接続され得る。

【0349】

2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、好ましくは、永続的に接続されている。本発明の文脈において、ヘリカーゼが使用されている間に破壊されない場合、又は還元を使用して-S-S-結合を開くなどの、使用者の部分への介入なしに破壊され得ない場合、接続は永続的である。

【0350】

2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、好ましくは、共有結合している。2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して共有結合され得る。

30

【0351】

2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、システイン、スレオニン、セリン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、及びグルタミンなどの、それらの天然に存在するアミノ酸を介して共有結合され得る。天然に存在するアミノ酸は、結合を容易にするために修飾され得る。例えば、天然に存在するアミノ酸は、アシル化、リン酸化、グリコシル化、又はファルネシル化によって修飾され得る。他の好適な修飾は、当該技術分野で既知である。天然に存在するアミノ酸への修飾は、翻訳後修飾であり得る。2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、それらの配列に導入されているアミノ酸を介して結合され得る。かかるアミノ酸は、好ましくは、置換によって導入される。導入されたアミノ酸は、システイン又は結合を容易にする非天然アミノ酸であり得る。好適な非天然アミノ酸には、4-アジド-L-フェニルアラニン(Faz)、Liu C. C. and Schultz P. G., Annu. Rev. Biochem., 2010, 79, 413-444の図1に含まれる1~71が付番されたアミノ酸のうちのいずれか1つ、又は以下にリストされているアミノ酸のうちのいずれか1つが含まれるが、これらに限定されない。導入されたアミノ酸は、上で考察されるように修飾され得る。

40

【0352】

好ましい実施形態では、2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、リンカー

50

を使用して接続されている。リンカー分子は、以下により詳細に考察される。1つの好適な接続の方法は、システイン連結である。これは、以下でより詳細に考察される。2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、好ましくは、1つ以上、例えば、2つ又は3つのリンカーを使用して接続されている。1つ以上のリンカーは、上で考察されるように開口部のサイズを低減させるか、又は開口部を閉じるように設計され得る。1つ以上のリンカーが上で考察されるように開口部を閉じるために使用されている場合、1つ以上のリンカーの少なくとも一部は、好ましくは、それが、ヘリカーゼによって結合される際にポリヌクレオチドに平行ではないように配向される。より好ましくは、リンカーの全ては、この様式で配向される。1つ以上のリンカーが上で考察されるように開口部を閉じるために使用されている場合、1つ以上のリンカーの少なくとも一部は、好ましくは、ヘリカーゼによって結合された際にポリヌクレオチドに平行ではない配向で開口部を横断する。より好ましくは、リンカーの全ては、この様式で開口部を横断する。これらの実施形態では、1つ以上のリンカーの少なくとも一部は、ポリヌクレオチドに垂直であり得る。かかる配向は、ポリヌクレオチドが開口部を通してヘリカーゼから結合解除することができないように、開口部を効果的に閉じる。

10

【0353】

各リンカーは、2つ以上の機能的末端、例えば、2つ、3つ、又は4つの機能的末端を有し得る。リンカー内の末端の好適な構成は、当該技術分野で周知である。

【0354】

1つ以上のリンカーの1つ以上の末端は、好ましくは、ヘリカーゼに共有結合している。一方の末端が共有結合している場合、1つ以上のリンカーは、上で考察されるように、2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸を一時的に接続し得る。両方又は全ての末端が共有結合している場合、1つ以上のリンカーは、2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸を永続的に接続する。

20

【0355】

1つ以上のリンカーは、好ましくは、アミノ酸配列及び／又は化学架橋剤である。

【0356】

ペプチドリリンカーなどの好適なアミノ酸リンカーは、当該技術分野で既知である。アミノ酸又はペプチドリリンカーの長さ、可動性、及び親水性は、典型的には、それが開口部のサイズを低減させるが、ヘリカーゼの機能を妨げないように設計される。好ましい可動性ペプチドリリンカーは、2～20個、例えば、4、6、8、10、又は16個のセリン、及び／又はグリシンアミノ酸のストレッチである。より好ましい可動性リンカーは、(SG)₁、(SG)₂、(SG)₃、(SG)₄、(SG)₅、(SG)₈、(SG)₁₀、(SG)₁₅、又は(SG)₂₀を含み、Sはセリンであり、Gはグリシンである。好ましい剛性リンカーは、2～30個、例えば4、6、8、16、又は24個のプロリンアミノ酸のストレッチである。より好ましい剛性リンカーは、(P)₁₂を含み、Pはプロリンである。リンカーのアミノ酸配列は、好ましくは、ポリヌクレオチド結合部分を含む。かかる部分及びそれらの使用に関連する利点は、以下に考察される。

30

【0357】

好適な化学架橋剤は、当該技術分野で周知である。好適な化学架橋剤には、以下の官能基：マレイミド、活性エステル、スクシンイミド、アジド、アルキン（ジベンゾシクロオクチノール（DIBO又はDBCO）、ジフルオロシクロアルキン、及び直鎖アルキンなど）、ホスフィン（トレースレス（traceless）及び非トレースレス（non-traceless）Staufferライゲーションに使用されるものなど）、ハロアセチル（ヨードアセトアミドなど）、ホスゲン型試薬、スルホニルクロリド試薬、イソチオシアネート、ハロゲン化アシル、ヒドラジン、ジスルフィド、ビニルスルホン、アジリジン、並びに光反応性試薬（アリールアジド、ジアジリジンなど）を含むものが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0358】

アミノ酸と官能基との間の反応は、システイン／マレイミドなどの自発的であり得るか

50

、又はアジド及び直鎖アルキンを連結するためのCu(I)などの外部試薬を必要とし得る。

【0359】

リンカーは、必要な距離にわたって伸びる任意の分子を含み得る。リンカーは、1つの炭素（ホスゲン型リンカー）から多くのオングストロームまでの長さで変動し得る。直鎖分子の例には、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリペプチド、多糖類、デオキシリボ核酸（DNA）、ペプチド核酸（PNA）、トレオース核酸（TNA）、グリセロール核酸（GNA）、飽和及び不飽和炭化水素、ポリアミドが含まれるが、これらに限定されない。これらのリンカーは、不活性であっても反応性であってもよく、特に、それらは、定義された位置で化学的に切断可能であってもよく、又はそれ自体がフルオロフォア若しくはリガンドで修飾されていてもよい。リンカーは、好ましくは、ジチオトレイトール（DTT）に耐性である。

10

【0360】

好ましい架橋剤には、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル3-（ピリジン-2-イル）ジスルファニル）プロパノエート、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル4-（ピリジン-2-イル）ジスルファニル）ブタノエート、及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル8-（ピリジン-2-イル）ジスルファニル）オクタノエート、ジマレイミドPEG 1k、ジマレイミドPEG 3.4k、ジマレイミドPEG 5k、ジマレイミドPEG 10k、ビス（マレイミド）エタン（BMOE）、ビスマレイミドヘキサン（BMH）、1,4-ビスマレイミドブタン（BMB）、1,4-ビスマレイミジル-2,3-ジヒドロキシブタン（BMDDB）、BM[PEO]2（1,8-ビスマレイミドジエチレングリコール）、BM[PEO]3（1,11-ビスマレイミドトリエチレングリコール）、トリス[2-マレイミドエチル]アミン（TMEA）、DTMEジチオビスマレイミドエタン、ビスマレイミドPEG3、ビスマレイミドPEG11、DBC O-マレイミド、DBC O-PEG4-マレイミド、DBC O-PEG4-NH2、DBC O-PEG4-NHS、DBC O-NHS、DBC O-PEG-DBC O 2.8 kDa、DBC O-PEG-DBC O 4.0 kDa、DBC O-15原子-DBC O、DBC O-26原子-DBC O、DBC O-35原子-DBC O、DBC O-PEG4-S-S-PEG3-ビオチン、DBC O-S-S-PEG3-ビオチン、DBC O-S-S-PEG11-ビオチン、（スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオン酸（SPDP）、及びマレイミド-PEG（2kDa）-マレイミド（アルファ、オメガ-ビスマレイミドポリ（エチレングリコール））が含まれる。最も好ましい架橋剤は、マレイミド-プロピル-SRDFWRS-（1,2-ジアミノエタン）-プロピルマレイミドである。

20

30

【0361】

1つ以上のリンカーは、切断可能であり得る。これは、以下でより詳細に考察される。

【0362】

2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、互いに特異的である2つの異なるリンカーを使用して接続され得る。リンカーの一方は、一方の部分に結合し、他方は、別の部分に結合している。リンカーは、本発明の修飾ヘリカーゼを形成するように反応すべきである。2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、WO2010/086602（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるハイブリダイゼーションリンカーを使用して接続され得る。特に、2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、各々がハイブリダイゼーション可能領域及び共有結合を形成することができる基を含む2つ以上のリンカーを使用して接続され得る。リンカー内のハイブリダイゼーション可能領域は、2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸をハイブリダイズし、連結する。次いで、連結したシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、基間の共有結合の形成を介してカップリングされる。WO2010/086602（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示される特異的リンカーのいずれかは、本発明に従って使用され得る。

40

50

【0363】

2つ以上のシステイン及び／又は非天然アミノ酸は、修飾され、次いで、2つの修飾に特異的である化学架橋剤を使用して結合され得る。上で考察される架橋剤のいずれかが使用され得る。

【0364】

リンカーは、標識され得る。好適な標識には、蛍光分子（Cy3又はAlexaFluor（登録商標）555など）、放射性同位体、例えば、 ^{125}I 、 ^{35}S 、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチド、及びビオチンなどのリガンドが含まれるが、これらに限定されない。かかる標識は、リンカーの量を定量することを可能にする。標識はまた、ビオチンなどの切断可能な精製タグ、又はタンパク質自体に存在しないが、トリプシン消化によって放出されるペプチドなどの同定方法において現れる特定の配列であり得る。

10

【0365】

2つ以上のシステインを接続する好ましい方法は、システイン連結を介するものである。これは、二官能性化学架橋剤によって、又は末端に提示されたシステイン残基を有するアミノ酸リンカーによって媒介され得る。

【0366】

任意の二官能性リンカーの長さ、反応性、特異性、剛性、及び溶解性は、開口部のサイズが十分に低減され、ヘリカーゼの機能が保持されることを確実にするように設計され得る。好適なリンカーには、1, 4-ビス（マレイミド）ブタン（BMB）又はビス（マレイミド）ヘキサンなどのビスマレイミド架橋剤が含まれる。二官能性リンカーの1つの欠点は、特定の部位での結合が好ましい場合に、表面アクセス可能なシステイン残基への二官能性リンカーの結合は制御することが困難である可能性があり、基質の結合又は活性に影響を与える可能性があるため、更なる表面アクセス可能なシステイン残基を含有しないヘリカーゼを要求することである。ヘリカーゼがいくつかのアクセス可能なシステイン残基を含有する場合、修飾がヘリカーゼの折り畳み又は活性に影響を与えないことを確実にしながら、それらを除くためにヘリカーゼの修飾が必要とされ得る。これは、WO2010/086603（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に考察されている。システイン残基の反応性は、隣接する残基の、例えば、ペプチドリinker上の修飾によって増強され得る。例えば、隣接するアルギニン、ヒスチジン、又はリジン残基の塩基性基は、システインチオール基の pK_a を、より反応性の高い S^- 基の pK_a に変化させる。システイン残基の反応性は、5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）（dTNB）などのチオール保護基によって保護され得る。これらは、リンカーが結合される前に、ヘリカーゼの1つ以上のシステイン残基と反応され得る。表面アクセス可能なシステインの選択的脱保護は、ビーズ上に固定化された還元試薬（例えば、固定化トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン、TCEP）を使用して可能であり得る。システイン連結は、以下でより詳細に考察される。

20

30

【0367】

Faz連結を介する結合の別の好ましい方法。これは、二官能性化学リンカーによって、又は末端に提示されたFaz残基を有するポリペプチドリinkerによって媒介され得る。

40

【0368】

他の修飾

本発明のヘリカーゼはまた、（i）タワードメインと、（ii）ピンドメイン及び／又は1Aドメインとの間の誘引を増加させるように修飾され得る。本発明に従い、任意の既知の化学修飾を行うことができる。これらの種類の修飾は、WO2015/055981（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0369】

特に、本発明は、少なくとも1つの荷電アミノ酸が、（i）タワードメイン、及び／又は（ii）ピンドメイン、及び／又は（iii）1A（RecA様モーター）ドメインに導入されている本発明のヘリカーゼを提供し、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドの移動を

50

制御する能力を有する。ポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼの能力は、上で考察されるように測定され得る。本発明は、好ましくは、少なくとも1つの荷電アミノ酸が、(i) タワードメイン、並びに(ii) ピンドメイン及び／又は1 Aドメインに導入されている、本発明のヘリカーゼを提供する。

【0370】

少なくとも1つの荷電アミノ酸は、負に荷電されてもよく、正に荷電されてもよい。少なくとも1つの荷電アミノ酸は、好ましくは、ヘリカーゼ中で相互作用する任意のアミノ酸(複数可)に対して反対に荷電される。例えば、少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸は、ピンドメイン内の負に荷電したアミノ酸と相互作用する位置でタワードメインに導入され得る。少なくとも1つの荷電アミノ酸は、典型的には、野生型(すなわち、非修飾)ヘリカーゼ中の荷電されていない位置に導入される。少なくとも1つの荷電アミノ酸を使用して、ヘリカーゼ中の少なくとも1つの反対に荷電したアミノ酸を置き換えてもよい。例えば、正に荷電したアミノ酸を使用して、負に荷電したアミノ酸を置き換えてもよい。

10

【0371】

好適な荷電アミノ酸は、上で考察されている。少なくとも1つの荷電アミノ酸は、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)、リジン(K)、アスパラギン酸(D)、又はグルタミン酸(D)などの天然であり得る。代替的に、少なくとも1つの荷電アミノ酸は、人工的又は非天然であり得る。任意の数の荷電アミノ酸が、各ドメインに導入され得る。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の荷電アミノ酸が、各ドメインに導入され得る。

20

【0372】

ヘリカーゼは、好ましくは、以下の位置のうちの1つ以上に正に荷電したアミノ酸を含む配列番号118のバリエーションを含む。(i) 93、(ii) 354、(iii) 360、(iv) 361、(v) 94、(vi) 97、(vii) 155、(viii) 357、(ix) 100、及び(x) 127。ヘリカーゼは、好ましくは、以下の位置のうちの1つ以上に負に荷電したアミノ酸を含む配列番号118のバリエーションを含む。(i) 354、(ii) 358、(iii) 360、(iv) 364、(v) 97、(vi) 123、(vii) 155、(viii) 357、(ix) 100、及び(x) 127。ヘリカーゼは、好ましくは、(i) ~ (x) のいずれかに定義される配列番号118におけるものに対応する位置に正に荷電したアミノ酸又は負に荷電したアミノ酸を含む、配列番号119~133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。配列番号118におけるものに対応する配列番号119~133のうちのいずれか1つにおける位置は、以下の配列番号118~133のアラインメントを使用して同定することができる。

30

【0373】

ヘリカーゼは、好ましくは、以下の位置に反対に荷電したアミノ酸を含むように、少なくとも1つの荷電アミノ酸の導入によって修飾されている、配列番号118のバリエーションを含む。(i) 93及び354、(ii) 93及び358、(iii) 93及び360、(iv) 93及び361、(v) 93及び364、(vi) 94及び354、(vii) 94及び358、(viii) 94及び360、(ix) 94及び361、(x) 94及び364、(xi) 97及び354、(xii) 97及び358、(xiii) 97及び360、(xiv) 97及び361、(xv) 97及び364、(xvi) 123及び354、(xvii) 123及び358、(xviii) 123及び360、(xix) 123及び361、(xx) 123及び364、(xxi) 155及び354、(xxii) 155及び358、(xxiii) 155及び360、(xxiv) 155及び361、(xxv) 155及び364。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(i) ~ (xxv) のいずれかに定義される配列番号118におけるものに対応する位置に反対に荷電したアミノ酸を含む、配列番号119~133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。

40

【0374】

本発明はまた、(i) 少なくとも1つの荷電アミノ酸がタワードメインに導入されてお

50

り、(i i) 少なくとも1つの反対に荷電したアミノ酸がピンドメイン及び／又は1 A (Rec A様モーター) ドメインに導入されているヘリカーゼを提供し、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する。少なくとも1つの荷電アミノ酸は、負に荷電され得、少なくとも1つの反対に荷電したアミノ酸は、正に荷電され得るか、又はその逆であり得る。好適な荷電アミノ酸は、上で考察されている。任意の数の荷電アミノ酸及び任意の数の反対に荷電したアミノ酸が導入され得る。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の荷電アミノ酸が導入され得、かつ／又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の反対に荷電したアミノ酸が導入され得る。

【0375】

荷電アミノ酸は、典型的には、野生型ヘリカーゼ中の荷電されていない位置に導入される。荷電アミノ酸の一方又は両方を使用して、ヘリカーゼ中の荷電アミノ酸を置き換えてもよい。例えば、正に荷電したアミノ酸を使用して、負に荷電したアミノ酸を置き換えてもよい。荷電アミノ酸は、上で考察される(i) タワードメイン、並びに(i i) ピンドメイン及び／又は1 Aドメイン内の位置のうちのいずれかに導入され得る。反対に荷電したアミノ酸は、典型的には、それらが得られたヘリカーゼ中で相互作用するように導入される。ヘリカーゼは、好ましくは、反対に荷電したアミノ酸が以下の位置に導入されている配列番号118のバリエーションを含む。(i) 97及び354、(i i) 97及び360、(i i i) 155及び354、又は(i v) 155及び360。本発明のヘリカーゼは、好ましくは、(i) ~ (i v) のいずれかに定義される配列番号118におけるものに対応する位置に反対に荷電したアミノ酸を含む、配列番号119~133のうちのいずれか1つのバリエーションを含む。

【0376】

構築物

本発明はまた、本発明の修飾ヘリカーゼ及び追加のポリヌクレオチド結合部分を含む構築物を提供し、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチド結合部分に結合しており、構築物は、ポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する。構築物は、人工又は非天然である。

【0377】

本発明の構築物は、鎖配列決定中のポリヌクレオチドの移動を制御するための有用なツールである。本発明の構築物は、本発明の修飾ヘリカーゼよりも、配列決定されるポリヌクレオチドから脱会合する可能性が更に低い。構築物は、それがナノ細孔を通るポリヌクレオチドの転位を制御するため、ポリヌクレオチドの更に大きな読み取り長さを提供することができる。

【0378】

特定のポリヌクレオチド配列に結合する標的化構築物を設計することもできる。以下により詳細に考察されるように、ポリヌクレオチド結合部分は、特定のポリヌクレオチド配列に結合し得、それによって、構築物のヘリカーゼ部分を特定の配列に標的化し得る。

【0379】

構築物は、ポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する。これは、上で考察されるように決定することができる。

【0380】

本発明の構築物は、単離、実質的に単離、精製、又は実質的に精製され得る。構築物は、それが脂質、ポリヌクレオチド、又は細孔モノマーなどの任意の他の構成要素を完全に含まない場合、単離又は精製されている。構築物は、それが、その意図される使用に干渉しない担体又は希釈剤と混合されている場合、実質的に単離されている。例えば、構築物は、それが、10%未満、5%未満、2%未満、又は1%未満の他の構成要素、例えば、脂質、ポリヌクレオチド、又は細孔モノマーを含む形態で存在する場合、実質的に単離されているか、又は実質的に精製されている。

【0381】

ヘリカーゼは、上で考察される本発明のヘリカーゼのいずれかであり得る。

【0382】

ヘリカーゼは、好ましくは、追加のポリヌクレオチド結合部分に共有結合している。ヘリカーゼは、2つ以上、例えば、2つ又は3つの点で部分に結合され得る。

【0383】

ヘリカーゼは、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して部分に共有結合され得る。2つ以上の部分を接続することに関して、好適な方法が上で考察されている。

【0384】

ヘリカーゼ及び部分は、別々に産生され、次いで、一緒に結合され得る。2つの構成要素は、任意の構成で結合され得る。例えば、それらは、それらの末端（すなわち、アミノ又はカルボキシ末端）アミノ酸を介して結合され得る。好適な構成には、ヘリカーゼのカルボキシ末端に結合している部分のアミノ末端、及びその逆が含まれるが、これらに限定されない。代替的に、2つの構成要素は、それらの配列内のアミノ酸を介して結合され得る。例えば、部分は、ヘリカーゼのループ領域内の1つ以上のアミノ酸に結合され得る。好ましい実施形態では、部分の末端アミノ酸は、ヘリカーゼのループ領域内の1つ以上のアミノ酸に結合している。

10

【0385】

好ましい実施形態では、ヘリカーゼは、例えば、上で考察されるように1つ以上のリンカー分子を介して、部分に化学結合している。別の好ましい実施形態では、ヘリカーゼは、部分に遺伝子的に融合される。構築物全体が単一のポリヌクレオチド配列から発現される場合、ヘリカーゼは、部分に遺伝子的に融合される。ヘリカーゼ及び部分のコード配列を、任意の方式で組み合わせ、構築物をコードする単一のポリヌクレオチド配列を形成することができる。細孔の核酸結合タンパク質への遺伝子融合は、WO2010/004265（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）において考察されている。

20

【0386】

ヘリカーゼ及び部分は、任意の構成で遺伝子的に融合され得る。ヘリカーゼ及び部分は、それらの末端アミノ酸を介して融合され得る。例えば、部分のアミノ末端は、ヘリカーゼのカルボキシ末端に融合され得、逆もまた同様である。部分のアミノ酸配列は、好ましくは、ヘリカーゼのアミノ酸配列にインフレームで付加される。言い換えれば、部分は、好ましくは、ヘリカーゼの配列内に挿入されている。かかる実施形態では、ヘリカーゼ及び部分は、典型的には、2つの点で、すなわち、部分のアミノ及びカルボキシ末端アミノ酸を介して結合している。部分がヘリカーゼの配列内に挿入されている場合、部分のアミノ及びカルボキシ末端アミノ酸は近接しており、各々がヘリカーゼ又はそのバリエーションの配列内の隣接するアミノ酸に結合していることが好ましい。好ましい実施形態では、部分は、ヘリカーゼのループ領域に挿入されている。

30

【0387】

ヘリカーゼは、部分に直接結合され得る。ヘリカーゼは、好ましくは、上で考察されるように、1つ以上、例えば、2つ又は3つのリンカーを使用して部分に結合している。1つ以上リンカーは、部分の移動度を制限するように設計され得る。ヘリカーゼ及び／又は部分は、上で考察されるように、1つ以上のリンカーの結合を容易にするように修飾され得る。

【0388】

切断可能なリンカーは、非結合構成要素からの構築物の分離への補助として使用することができ、合成反応を更に制御するために使用することができる。例えば、ヘテロ二官能性リンカーは、部分ではなく、ヘリカーゼと反応し得る。リンカーの自由末端を使用してヘリカーゼタンパク質を表面に結合することができる場合、第1の反応からの未反応のヘリカーゼを混合物から除去することができる。続いて、リンカーを切断して、部分と反応する基を露出させることができる。加えて、この連結反応の配列に続いて、条件は、最初にヘリカーゼへの反応のために、次いでリンカーの切断後の部分への反応のために最適化され得る。第2の反応はまた、リンカーが既に結合している領域に限定されるため、部分との正確な反応部位に向けてより一層指向される。

40

【0389】

50

ヘリカーゼは、ヘリカーゼ／架橋剤複合体が部分に共有結合される前に二官能性架橋剤に共有結合され得る。代替的に、部分は、二官能性架橋剤／部分複合体がヘリカーゼに結合される前に二官能性架橋剤に共有結合され得る。ヘリカーゼ及び部分は、同時に化学架橋剤に共有結合され得る。

【0390】

ヘリカーゼを部位に結合する好ましい方法は、上記のシステイン連結及びF a z連結である。好ましい実施形態では、反応性システインは、部分に遺伝子的に結合しているペプチドリンカー上に提示される。これは、他のアクセス可能なシステイン残基を部分から除去するために追加の修飾が必ずしも必要ではないことを意味する。

【0391】

ヘリカーゼ又は部分のそれ自体への架橋は、リンカーの濃度を膨大な量のヘリカーゼ及び／又は部分に保つことによって防止され得る。代替的に、2つのリンカーが使用される「鍵と鍵穴」配置が使用され得る。各リンカーの一方の末端のみが一緒に反応してより長いリンカーを形成してもよく、リンカーの他方の末端は、構築物の異なる部分（すなわち、ヘリカーゼ又は部分）と各々反応する。これは、以下でより詳細に考察される。

【0392】

結合の部位は、構築物がポリヌクレオチドと接触すると、ヘリカーゼ及び部分の両方がポリヌクレオチドに結合し、その移動を制御することができるように選択される。

【0393】

本発明の修飾ヘリカーゼ及び構造体を伴う実施形態

本発明は、ポリヌクレオチド、ベクター、及び宿主細胞を提供する。これらは、上で考察されている。

【0394】

本発明は、特に分析物の移動を制御し、標的分析物を特徴評価するために、本発明のD d aヘリカーゼを使用する様々な方法を提供する。かかる方法は、上記及びWO 2016 / 034591、WO 2017 / 149316、WO 2017 / 149317、WO 2017 / 149318、WO 2018 / 211241、WO 2019 / 002893、WO 2015 / 055981、WO 2015 / 166276、及びWO 2016 / 055777（全て、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0395】

本発明の修飾D d aヘリカーゼ及び構築物は、標的分析物を特徴評価するためのセンサを形成するために使用され得る。これらのセンサは、標的分析物の存在下で細孔及びヘリカーゼ又は構築物を接触させ、細孔にわたって電位を印加することによって形成され得る。ヘリカーゼ又は構築物は、例えば、上記のように細孔に共有結合され得る。

【0396】

これらの方法及びセンサでは、本発明の修飾D d aヘリカーゼ及び構築物は、本発明の細孔と組み合わせられ得る／本発明の細孔とともに使用され得る。代替的に、それらは、溶血毒、ロイコシジン、M y c o b a c t e r i u m s m e g m a t i s ポーリンA（M s p A）、M s p B、M s p C、M s p D、ライセニン（l y s e n i n）、外膜ポーリンF（O m p F）、外膜ポーリンG（O m p G）、外膜ホスホリパーゼA、N e i s s e r i a オートトランスポーターリポタンパク質（N a l P）、及びW Z A、C s g G、C s g G / C s g F、ライセニン、C l y A、S p 1、又は溶血性タンパク質フラガセアトキシン（f r a g a c e a t o x i n）C（F r a C）に由来する、固体状態細孔又は膜貫通タンパク質細孔とともに使用され得る。細孔及びヘリカーゼの好ましい組み合わせは、以下でより詳細に考察される。

【0397】

キット

本発明はまた、標的分析物を特徴評価するためのキットであって、（a）本発明の細孔及びヘリカーゼ若しくは構築物、又は（b）本発明のヘリカーゼ若しくは構築物及び1つ以上のローディング部分を含む、キットも提供する。細孔は、本発明の細孔を含む、上で

10

20

30

40

50

考察されるもののいずれかであり得る。細孔及びヘリカーゼの好ましい組み合わせは、以下でより詳細に考察される。

【0398】

本発明はまた、標的分析物、好ましくは、標的ポリヌクレオチドを特徴評価するためのキットであって、(a)本発明のヘリカーゼ又は構築物と、(b)本発明の単離されたCsgG細孔又は単離された細孔複合体と、を含む、キットも提供する。細孔及びヘリカーゼの好ましい組み合わせは、以下でより詳細に考察される。

【0399】

キットは、好ましくは、膜の構成要素を更に含む。キットは、任意のタイプの膜、例えば両親媒性層又はトリブロックコポリマー膜の構成要素を含み得る。キットは、標的分析物を膜にカップリングするための、コレステロールなどの1つ以上のアンカーを更に含み得る。キットは、ポリヌクレオチドの特徴評価を容易にするために標的ポリヌクレオチドに結合することができる、1つ以上のポリヌクレオチドアダプタを更に含み得る。一実施形態では、コレステロールなどのアンカーは、ポリヌクレオチドアダプタに結合している。

10

【0400】

本発明は、標的分析物を特徴評価するためのキットであって、(a)本発明の単離された細孔又は単離された細孔複合体と、(b)膜の構成要素、及び(c)ポリヌクレオチド結合タンパク質の一方又は両方と、を含む、キットを提供する。

【0401】

好ましいポリヌクレオチド結合タンパク質は、ポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼ、ヘリカーゼ、及びトポイソメラーゼ、例えば、ジャイレースである。好適な酵素は、E.coliからのエキソヌクレアーゼI、E.coliからのエキソヌクレアーゼIII酵素、T.thermophilusからのRecJ及びバクテリオファージラムダエキソヌクレアーゼ、TatDエキソヌクレアーゼ、並びにそれらのバリエーションを含むが、これらに限定されない。T.thermophilusからのRecJ配列又はそのバリエーションを含む3つのサブユニットが相互作用して、三量体エキソヌクレアーゼを形成する。ポリメラーゼは、PyroPhage(登録商標)3173 DNAポリメラーゼ(Lucigen(登録商標)Corporationから市販されている)、SDポリメラーゼ(Bioron(登録商標)から市販されている)、又はそれらのバリエーションであり得る。酵素は、Phi29 DNAポリメラーゼ(配列番号7)又はそのバリエーションであり得る。トポイソメラーゼは、好ましくは、部分分類(EC)群5.99.1.2及び5.99.1.3のいずれかのメンバーである。

20

30

【0402】

酵素は、最も好ましくは、Hel308 Mbu、Hel308 Csy、Hel308 Tga、Hel308 Mhu、TraI Eco、XPD Mbu、又はそれらのバリエーションなどのヘリカーゼに由来する。本発明において、任意のヘリカーゼを使用することができる。ヘリカーゼは、Hel308ヘリカーゼ、RecDヘリカーゼ、例えばTraIヘリカーゼ又はTrwCヘリカーゼ、XPDヘリカーゼ、又はDdaヘリカーゼであり得るか、又はそれらに由来する。ヘリカーゼは、WO2013/057495、WO2013/098562、WO2013/098561、WO2014/013260、WO2014/013259、WO2014/013262、及びWO2015/055981に開示されるヘリカーゼ、修飾ヘリカーゼ、又はヘリカーゼ構築物のいずれであり得る。これらの全ては、それらの全体が参照により組み込まれる。

40

【0403】

キットは、上記の実施形態のいずれかを実施することを可能にする1つ以上の他の試薬又は器具を追加的に含み得る。かかる試薬又は器具には、以下の好適な緩衝液(複数可)(水溶液)、対象から試料を得るための手段(容器又は針を含む器具など)、ポリヌクレオチドを増幅及び/若しくは発現させるための手段、又は電圧若しくはパッチクランプ装置のうちの1つ以上が含まれる。試薬は、流体試料が試薬を再懸濁するように、乾燥状態

50

でキット内に存在してもよい。キットはまた、任意選択的に、キットが本発明の方法で使用されることを可能にするための使用説明書、又は本方法が使用され得る生物に関する詳細を含んでもよい。最後に、キットはまた、分析物の特徴評価に有用な追加の構成要素も含み得る。

【0404】

装置

本発明はまた、試料中の標的分析物を特徴評価するための装置であって、(a)複数の細孔と、(b)本発明の複数のヘリカーゼ又は複数の構築物と、を含む、装置も提供する。複数の細孔は、本発明の細孔を含む、上で考察されるもののいずれかであり得る。細孔及びヘリカーゼの好ましい組み合わせは、以下でより詳細に考察される。

10

【0405】

本発明はまた、インビトロ膜に挿入された本発明の膜貫通タンパク質細孔又は細孔複合体を含む、装置も提供する。

【0406】

本発明はまた、方法であって、(i)本発明の単離された細孔又は単離された細孔複合体を得ることと、(ii)細孔がインビトロ膜に挿入されるように、単離された細孔又は単離された細孔複合体を、インビトロ膜と接触させることと、を含む、方法によって製造された、装置も提供する。

【0407】

特に本発明の細孔、細孔複合体、ヘリカーゼ、及び構築物に関連して、上で考察される特定の実施形態のうちのいずれかは、本発明の装置に等しく適用可能である。

20

【0408】

本発明の膜

本発明はまた、本発明の細孔又は細孔複合体を含む、膜も提供する。細孔は、好ましくは膜中に存在し、一緒になって膜貫通細孔を形成する。膜は、任意のタイプの膜、例えば両親媒性層又はトリブロックコポリマー膜の構成要素を含み得る。膜は、細孔に結合したポリヌクレオチド結合タンパク質又はポリペプチドハンドリング酵素を更に含み得る。膜は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドを膜にカップリングするための1つ以上のアンカーを更に含み得る。細孔は、上で考察されるもののいずれかであり得る。

【0409】

アレイ

本発明はまた、本発明の複数の膜を備えるアレイも提供する。本発明の膜に関して上で考察された実施形態のうちのいずれかは、本発明のアレイに等しく適用される。アレイは、以下に説明される方法のうちのいずれかを実行するように設定され得る。

30

【0410】

好ましい実施形態では、アレイ内の各膜は、1つの細孔を含む。アレイが形成される様式に起因して、例えば、アレイは、細孔を含まない1つ以上の膜、及び／又は2つ以上の細孔を含む1つ以上の膜を含み得る。アレイは、約2～約1000、例えば、約10～約800、約20～約600、又は約30～約500の膜を含み得る。

【0411】

システム

本発明は、(a)本発明の膜、又は本発明のアレイと、(b)膜(複数可)にわたって電位を印加するための手段と、(c)膜(複数可)にわたって電気シグナル又は光シグナルを検出するための手段と、を備える、システムを提供する。

40

【0412】

細孔及び膜は、上記及び以下に記載のいずれかであり得る。

【0413】

一実施形態では、システムは、第1のチャンバ及び第2のチャンバを更に含み、第1及び第2のチャンバは、膜(複数可)によって分離されている。標的分析物を特徴評価するために使用される場合、システムは、標的分析物を更に含んでもよく、標的分析物は、連

50

続チャンネル内に一時的に位置し、標的分析物の一端は、第1のチャンバに位置し、標的分析物の一端は、第2のチャンバに位置する。標的分析物は、好ましくは、標的ポリペプチド又は標的ポリヌクレオチドである。

【0414】

一実施形態では、システムは、細孔（複数可）と接触する導電性溶液、膜（複数可）を横切る電位を提供する電極、及び細孔（複数可）を通る電流を測定するための測定システムを更に含む。一実施形態では、膜及び細孔に加えられる電圧は、+5 V～-5 V、例えば-600 mV～+600 mV又は-400 mV～+400 mVである。使用される電圧は、好ましくは、100 mV～240 mVの範囲内、より好ましくは120 mV～220 mVの範囲内にある。増加した印加電位を使用することによって、細孔による異なるアミノ酸間又はヌクレオチド間の識別を増加させることが可能である。任意の好適な導電性溶液を使用することができる。例えば、溶液は、金属塩、例えばアルカリ金属塩、ハロゲン化物塩、例えば塩化物塩、例えばアルカリ金属塩化物塩などの電荷担体を含み得る。電荷担体としては、イオン性液体又は有機塩、例えば、テトラメチルアンモニウムクロリド、トリメチルフェニルアンモニウムクロリド、フェニルトリメチルアンモニウムクロリド、又は1-エチル-3-メチルイミダゾリウムクロリドを挙げることができる。例示的なシステムでは、塩は、チャンバ内の水溶液中に存在する。塩化カリウム（KCl）、塩化ナトリウム（NaCl）、塩化セシウム（CsCl）、又はフェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリウムとの混合物が典型的に使用される。KCl、NaCl、及びフェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリウムとの混合物が好ましい。電荷担体は、膜を横切って非対称であり得る。例えば、電荷担体のタイプ及び／又は濃度は、膜の各側で、例えば各チャンバ内で異なってもよい。

【0415】

塩濃度は、飽和であり得る。塩濃度は、3 M以下であってもよく、典型的には、0.1～2.5 M、0.3～1.9 M、0.5～1.8 M、0.7～1.7 M、0.9～1.6 M、又は1 M～1.4 Mである。塩濃度は、好ましくは、150 mM～1 Mである。本方法は、好ましくは、少なくとも0.3 M、例えば、少なくとも0.4 M、少なくとも0.5 M、少なくとも0.6 M、少なくとも0.8 M、少なくとも1.0 M、少なくとも1.5 M、少なくとも2.0 M、少なくとも2.5 M、又は少なくとも3.0 Mの塩濃度を使用して実施される。高い塩濃度は、高いシグナル対ノイズ比を提供し、正常な電流変動のバックグラウンドに対する、アミノ酸又はヌクレオチドの存在を示す電流の特定を可能にする。

【0416】

導電性溶液中に緩衝液が存在し得る。典型的には、緩衝液は、リン酸緩衝液である。他の好適な緩衝液は、HEPES及びTris-HCl緩衝液である。導電性溶液のpHは、4.0～12.0、4.5～10.0、5.0～9.0、5.5～8.8、6.0～8.7、又は7.0～8.8、又は7.5～8.5であり得る。使用されるpHは、好ましくは、約7.5である。

【0417】

システムは、装置に含まれ得る。装置は、分析物分析のための任意の従来の装置、例えばアレイ又はチップであり得る。装置は、好ましくは、開示される方法を実施するように設定される。例えば、装置は、水溶液を含むチャンバと、チャンバを2つのセクションに分離する障壁とを備え得る。障壁は、典型的には、細孔（複数可）を含有する膜（複数可）が形成される開口部を有する。代替的に、障壁は、細孔が存在する膜を形成する。

【0418】

装置はまた、電位を印加し、膜及び細孔を横切る電気シグナルを測定することができる電気回路を備え得る。

【0419】

装置は、WO2008/102120、WO2009/077734、WO2010/122293、WO2011/067559、又はWO00/28312（全て、それら

10

20

30

40

50

の全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているもののいずれかであり得る。

【0420】

膜

任意の好適な膜をシステムで 사용할 수 있는。膜は、好ましくは、両親媒性層である。両親媒性層は、親水性特性及び親油性特性の両方を有するリン脂質などの両親媒性分子から形成された層である。両親媒性分子は、合成又は天然に存在するものであり得る。天然に存在しない両親媒性物質及び単層を形成する両親媒性物質は、当該技術分野で既知であり、例えば、ブロックコポリマー (Gonzalez-Perez et al., Langmuir, 2009, 25, 10447-10450) が含まれる。ブロックコポリマーは、2つ以上のモノマーサブユニットと一緒に重合されて単一のポリマー鎖を作製するポリマー材料である。ブロックコポリマーは、典型的には、各モノマーサブユニットによって寄与される特性を有する。しかしながら、ブロックコポリマーは、個々のサブユニットから形成されたポリマーが有しない固有の特性を有し得る。ブロックコポリマーは、水性媒体中で、モノマーサブユニットのうちの1つが、疎水性(すなわち親油性)であり、他のサブユニット(複数可)が、親水性であるように操作することができる。この場合、ブロックコポリマーは、両親媒性特性を有し得、生物学的膜を模倣する構造を形成し得る。ブロックコポリマーは、ジブロック(2つのモノマーサブユニットからなる)であり得るが、また、2つより多くのモノマーサブユニットから構築されて、両親媒性物質として挙動する、より複雑な配置を形成することができる。コポリマーは、トリブロック、テトラブロック、又はペンタブロックコポリマーであり得る。膜は、好ましくは、トリブロックコポリマー膜である。

10

20

【0421】

膜は、最も好ましくは、国際出願第2014/064443号又は同第2014/064444号に開示されている膜のうちの1つである。

【0422】

両親媒性分子は、ポリヌクレオチドのカップリングを容易にするように化学修飾又は官能化され得る。両親媒性層は、単層又は二重層であり得る。両親媒性層は、典型的には、平面である。両親媒性層は、湾曲していてもよい。両親媒性層は、支持されていてもよい。

30

【0423】

両親媒性膜は、典型的には天然には移動性であり、およそ $10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$ の脂質拡散速度を有する二次元流体として本質的に作用する。これは、細孔及びカップリングされたポリヌクレオチドが典型的には両親媒性膜内で移動することができることを意味する。

【0424】

膜は、脂質二重層であり得る。脂質二重層は、細胞膜のモデルであり、幅広い実験研究のための優れたプラットフォームとして機能する。例えば、脂質二重層は、単一チャネル記録による膜タンパク質のインビトロ調査のために使用することができる。代替的に、脂質二重層は、幅広い物質の存在を検出するためのバイオセンサとして使用することができる。脂質二重層は、任意の脂質二重層であり得る。好適な脂質二重層としては、平面脂質二重層、支持二重層又はリポソームが挙げられるが、これらに限定されない。脂質二重層は、好ましくは、平面脂質二重層である。好適な脂質二重層は、WO2008/102121、WO2009/077734、及びWO2006/100484(全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。

40

【0425】

別の好ましい実施形態では、膜は、固体状態層を含む。固体状態層は、マイクロ電子材料、絶縁材料、例えば、 Si_3N_4 、 Al_2O_3 、及び SiO_2 、有機及び無機ポリマー、例えば、ポリアミド、プラスチック、例えば、Teflon(登録商標)、又はエラストマー、例えば、二成分付加硬化シリコーンゴム、及びガラスを含むが、これらに限定され

50

ない、有機材料及び無機材料の両方から形成することができる。固体状態層は、グラフェンから形成されてもよい。好適なグラフェン層は、WO2009/035647（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。膜が固体状態層を含む場合、細孔は、典型的には、固体状態層内に含有される両親媒性膜又は層に、例えば、固体状態層内の穴、ウェル、ギャップ、チャネル、トレンチ、又はスリット内に存在する。当業者であれば、好適な固体状態／両親媒性ハイブリッドシステムを調製することができる。好適なシステムは、WO2009/020682及びWO2012/005857（両方とも、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。上で考察される両親媒性膜又は層のいずれかが使用され得る。

【0426】

10

本方法は、典型的には、（i）細孔を含む人工両親媒性層、（ii）細孔を含む単離された天然に存在する脂質二重層、又は（iii）細孔が内部に挿入された細胞を使用して実施される。この方法は、典型的には、人工トリブロックコポリマー層などの人工両親媒性層を使用して実施される。層は、細孔に加えて、他の膜貫通タンパク質及び／又は膜内タンパク質、並びに他の分子を含み得る。好適な装置及び条件は、以下で考察される。本発明の方法は、典型的には、インビトロで実施される。

【0427】

細孔及びヘリカーゼの好ましい組み合わせ

上記のいくつかの実施形態では、本発明の修飾ヘリカーゼは、細孔又は膜貫通細孔とともに使用され得る。本発明のいくつかの実施形態では、本発明の単離された細孔又は本発明の単離された細孔複合体は、本発明の修飾ヘリカーゼと組み合わせて使用され得る。以下の組み合わせが、本発明において好ましい。

20

【0428】

本発明の修飾ヘリカーゼは、WO2016/034591、WO2017/149316、WO2017/149317、及びWO2017/149318、WO2018/211241、及びWO2019/002893（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される細孔のうちのいずれかと組み合わせて使用され得る。本発明の修飾ヘリカーゼは、好ましくは、実施例2と同様にWO2016/034591（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のCs g G細孔、又はWO2019/002893（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のCs g G：Cs g F細孔複合体とともに使用される。

30

【0429】

本発明の単離された細孔又は本発明の単離された細孔複合体は、WO2015/055981、WO2015/166276、及びWO2016/055777（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるヘリカーゼのうちのいずれかと組み合わせて使用され得る。

【0430】

本発明のヘリカーゼは、好ましくは、実施例4と同様に、本発明のCs g G細孔又はCs g G：Cs g F細孔複合体とともに使用され、逆もまた同様である。本発明のCs g G細孔又はCs g G：Cs g F細孔複合体は、好ましくは、Q100A及び／又はN102A若しくはN102Sを含み、ヘリカーゼは、好ましくは、実施例4の置換のいずれか、好ましくはY350I及び／又はK358Iを含む。

40

【0431】

特定の実施形態、特定の構成、並びに材料及び／又は分子が、本発明による操作された細胞及び方法について本明細書で考察されてきたが、形態及び詳細における様々な変更又は修正は、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく行われ得ることが理解されるべきである。以下の実施例は、特定の実施形態をより良好に例示するために提供されており、それらは、本出願を制限するものとみなされるべきではない。本出願は、特許請求の範囲のみによって制限される。

【0432】

50

配列

- 配列番号 1 は、シグナル配列を含む、株 K 1 2 からの野生型 *E. coli* C s g G のポリヌクレオチド配列を示す（遺伝子 ID : 9 4 5 6 1 9）。
- 配列番号 2 は、シグナル配列を含む、野生型 *E. coli* C s g G のアミノ酸配列を示す（UniProt 受託番号 P 0 A E A 2）。
- 配列番号 3 は、成熟タンパク質としての野生型 *E. coli* C s g G のアミノ酸配列を示す（UniProt 受託番号 P 0 A E A 2）。
- 配列番号 4 は、シグナル配列を含む、株 K 1 2 からの野生型 *E. coli* C s g F のポリヌクレオチド配列を示す（遺伝子 ID : 9 4 5 6 2 2）。
- 配列番号 5 は、シグナル配列を含む、野生型 *E. coli* C s g F のアミノ酸配列を示す（UniProt 受託番号 P 0 A E 9 8）。
- 配列番号 6 は、成熟タンパク質としての野生型 *E. coli* C s g F のアミノ酸配列を示す（UniProt 受託番号 P 0 A E 9 8）。
- 配列番号 7 は、アミノ酸 1 ~ 2 7 及び C 末端 6 H i s タグをコードする、野生型 *E. coli* C s g F の断片のポリヌクレオチド配列を示す。
- 配列番号 8 は、アミノ酸 1 ~ 2 7 及び C 末端 6 H i s タグを包含する、野生型 *E. coli* C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 9 は、アミノ酸 1 ~ 3 8 及び C 末端 6 H i s タグをコードする、野生型 *E. coli* C s g F の断片のポリヌクレオチド配列を示す。
- 配列番号 1 0 は、アミノ酸 1 ~ 3 8 及び C 末端 6 H i s タグを包含する、野生型 *E. coli* C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 1 1 は、アミノ酸 1 ~ 4 8 及び C 末端 6 H i s タグをコードする、野生型 *E. coli* C s g F の断片のポリヌクレオチド配列を示す。
- 配列番号 1 2 は、アミノ酸 1 ~ 4 8 及び C 末端 6 H i s タグを包含する、野生型 *E. coli* C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 1 3 は、アミノ酸 1 ~ 6 4 及び C 末端 6 H i s タグをコードする、野生型 *E. coli* C s g F の断片のポリヌクレオチド配列を示す。
- 配列番号 1 4 は、アミノ酸 1 ~ 6 4 及び C 末端 6 H i s タグを包含する、野生型 *E. coli* C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 1 5 は、*E. coli* C s g F の残基 2 0 ~ 5 3 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 1 6 は、C 末端に K D を含む、*E. coli* C s g F の残基 2 0 ~ 4 2 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 1 7 は、C s g F 相同体 Q 8 8 H 8 8 の残基 2 3 ~ 5 5 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 1 8 は、C s g F 相同体 A 0 A 1 4 3 H J A 0 の残基 2 5 ~ 5 7 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 1 9 は、C s g F 相同体 Q 5 E 2 4 5 の残基 2 1 ~ 5 3 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 2 0 は、C s g F 相同体 Q 0 8 4 E 5 の残基 1 9 ~ 5 1 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 2 1 は、C s g F 相同体 F 0 L Z U 2 の残基 1 5 ~ 4 7 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 2 2 は、C s g F 相同体 A 0 A 1 3 6 H Q R 0 の残基 2 6 ~ 5 8 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 2 3 は、C s g F 相同体 A 0 A 0 W 1 S R L 3 の残基 2 1 ~ 5 3 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 2 4 は、C s g F 相同体 B 0 U H 0 1 の残基 2 6 ~ 5 9 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す
- 配列番号 2 5 は、C s g F 相同体 Q 6 N A U 5 の残基 2 2 ~ 5 3 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

ミノ酸配列を示す

配列番号 26 は、C s g F 相同体 G 8 P U Y 5 の残基 7 ～ 3 8 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 27 は、C s g F 相同体 A 0 A 0 S 2 E T P 7 の残基 2 5 ～ 5 7 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 28 は、C s g F 相同体 E 3 I 1 Z 1 の残基 1 9 ～ 5 1 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 29 は、C s g F 相同体 F 3 Z 0 9 4 の残基 2 4 ～ 5 5 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 30 は、C s g F 相同体 A 0 A 1 7 6 T 7 M 2 の残基 2 1 ～ 5 3 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 31 は、C s g F 相同体 D 2 Q P P 8 の残基 1 4 ～ 4 5 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 32 は、C s g F 相同体 N 2 I Y T 1 の残基 2 8 ～ 5 8 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 33 は、C s g F 相同体 W 7 Q H V 5 の残基 2 6 ～ 5 8 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 34 は、C s g F 相同体 D 4 Z L W 2 の残基 2 3 ～ 5 5 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 35 は、C s g F 相同体 D 2 Q T 9 2 の残基 2 1 ～ 5 3 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 36 は、C s g F 相同体 A 0 A 1 6 7 U J A 2 の残基 2 0 ～ 5 1 に対応するペプチドのアミノ酸配列を示す

配列番号 37 は、アミノ酸 20 ～ 27 を包含する野生型 E . c o l i C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。

配列番号 38 は、アミノ酸 20 ～ 38 を包含する野生型 E . c o l i C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。

配列番号 39 は、アミノ酸 20 ～ 48 を包含する野生型 E . c o l i C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。

配列番号 40 は、アミノ酸 20 ～ 64 を包含する野生型 E . c o l i C s g F の断片のアミノ酸配列を示す。

配列番号 41 は、プライマー C s g F _ d 2 7 _ e n d のヌクレオチド配列を示す

配列番号 42 は、プライマー C s g F _ d 3 8 _ e n d のヌクレオチド配列を示す

配列番号 43 は、プライマー C s g F _ d 4 8 _ e n d のヌクレオチド配列を示す

配列番号 44 は、プライマー C s g F _ d 6 4 _ e n d のヌクレオチド配列を示す

配列番号 45 は、プライマー p N a 6 2 _ C s g F _ h i s t a g _ F w のヌクレオチド配列を示す

配列番号 46 は、プライマー C s g F - H i s _ p E T 2 2 b _ F W のヌクレオチド配列を示す

配列番号 47 は、プライマー C s g F - H i s _ p E T 2 2 b _ R e v のヌクレオチド配列を示す

配列番号 48 は、プライマー c s g E F G _ p D O N R 2 2 1 _ F W のヌクレオチド配列を示す

配列番号 49 は、プライマー c s g E F G _ p D O N R 2 2 1 _ R e v のヌクレオチド配列を示す

配列番号 50 は、プライマー M u t _ c s g F _ H i s _ F W のヌクレオチド配列を示す

配列番号 51 は、プライマー M u t _ c s g F _ H i s _ R e v のヌクレオチド配列を示す

配列番号 52 は、プライマー D e l C s g E _ R e v のヌクレオチド配列を示す

配列番号 53 は、プライマー D e l C s g E _ F W のヌクレオチド配列を示す

10

20

30

40

50

配列番号 54 は、成熟 *E. coli* CsgF の残基 1～30 のアミノ酸配列を示す

配列番号 55 は、成熟 *E. coli* CsgF の残基 1～35 のアミノ酸配列を示す

配列番号 56 は、シグナル配列を有する変異 (T4C / N17S) CsgF 配列のアミノ酸配列、及び成熟タンパク質の配列の残基 35 と 36 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS) を示す。

配列番号 57 は、シグナル配列を有する変異 (N17S - Del) CsgF 配列のアミノ酸配列、及び成熟タンパク質の配列の残基 35 と 36 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS) を示す。

配列番号 58 は、シグナル配列を有する変異 (G1C / N17S) CsgF 配列のアミノ酸配列、及び成熟タンパク質の配列の残基 35 と 36 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS) を示す。

配列番号 59 は、シグナル配列を有する変異 (G1C) CsgF 配列のアミノ酸配列、及び成熟タンパク質の配列の残基 35 と 36 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS) を示す。

配列番号 60 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 45 と 46 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 61 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 35 と 36 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 62 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 30 と 31 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 63 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 45 と 51 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 64 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 30 と 37 との間に挿入された TEV プロテアーゼ切断部位 (ENLYFQS)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 65 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 34 と 36 との間に挿入された HCV C3 プロテアーゼ切断部位 (LEVLFGGP)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 66 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 42 と 43 との間に挿入された HCV C3 プロテアーゼ切断部位 (LEVLFGGP)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 67 は、シグナル配列を有する CsgF 配列のアミノ酸配列、成熟タンパク質の配列の残基 38 と 47 との間に挿入された HCV C3 プロテアーゼ切断部位 (LEVLFGGP)、及び C 末端における His₁₀ タグを示す。

配列番号 68 は、配列番号 3 と 99% 同一である、仮想タンパク質 CKO__02032 [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] の YP__001453594.1 : 1-248 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 69 は、配列番号 3 と 98% である、curl 産生集合体 (production assembly) / 輸送構成要素 CsgG、部分 [*Salmonella enterica*] の WP__001787128.1 : 16-238 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 70 は、配列番号 3 と 98% 同一である、curl 産生集合体 / 輸送タンパク質 CsgG [*Citrobacter amalonaticus*] の KEY44978.1 : 16-277 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 71 は、配列番号 3 と 97% 同一である、curl 産生集合体 / 輸送構成要素 [*Citrobacter rodentium* ICC168] の YP__003364699.1 : 16-277 のアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

50

配列番号 72 は、配列番号 3 と 94 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送構成要素 CsgG [*Enterobacter asburiae* LF7a] の YP__004828099.1:16-277 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 73 は、配列番号 3 と 91 % 同一である、輸送体 [*Yokenella regensburgei*] の WP__006819418.1:19-280 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 74 は、配列番号 3 と 89 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送タンパク質 CsgG [*Cronobacter pulveris*] の WP__024556654.1:16-277 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 75 は、配列番号 3 と 84 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送タンパク質 CsgG [*Rahnella aquatilis* HX2] の YP__005400916.1:16-277 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 76 は、配列番号 3 と 82 % 同一である、CsgG ファミリー *curli* 産生集合体／輸送構成要素 [*Kluyvera ascorbata* ATCC 33433] の KFC99297.1:20-278 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 77 は、配列番号 3 と 81 % 同一である、CsgG ファミリー *curli* 産生集合体／輸送構成要素 [*Hafnia alvei* ATCC13337] の KFC86716.1:16-274 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 78 は、配列番号 3 と 76 % 同一である、*curli* ポリマー [*Enterobacteriaceae* 細菌株 FGI57] の形成に關与する特徴付けられていないタンパク質の YP__007340845.1:16-270 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 79 は、配列番号 3 と 70 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送タンパク質 CsgG [*Plesiomonas shigelloides*] の WP__010861740.1:17-274 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 80 は、配列番号 3 と 60 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送外膜リポタンパク質構成要素 CsgG [*Vibrio fischeri* ES114] の YP__205788.1:23-270 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 81 は、配列番号 3 と 59 % 同一である、*curli* 産生集合体タンパク質 CsgG [*Aliivibrio logei*] の WP__017023479.1:23-270 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 82 は、配列番号 3 と 57 % 同一である、*Curli* 産生集合体／輸送構成要素 CsgG [*Photobacterium* sp. AK15] の WP__007470398.1:22-275 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 83 は、配列番号 3 と 56 % 同一である、*curli* 産生集合体タンパク質 CsgG [*Aeromonas veroni*] の WP__021231638.1:17-277 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 84 は、配列番号 3 と 56 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送タンパク質 CsgG [*Shewanella* sp. ECSMB14101] の WP__033538267.1:27-265 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 85 は、配列番号 3 と 54 % 同一である、*curli* 産生集合体タンパク質 CsgG [*Pseudomonas putida*] の WP__003247972.1:30-262 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 86 は、配列番号 3 と 53 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送構成要素 CsgG [*Shewanella violacea* DSS12] の YP__003557438.1:1-234 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 87 は、配列番号 3 と 53 % 同一である、*curli* 産生集合体／輸送タンパク質 CsgG [*Marinobacterium jannaschii*] の WP__027859066.1:36-280 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 88 は、配列番号 3 と 50 % 同一である、*Curli* 産生集合体／輸送構成要素 CsgG [*Chryseobacterium oranimense* G311] の C

10

20

30

40

50

E J 7 0 2 2 2 . 1 : 2 9 - 2 6 2 のアミノ酸配列を示す。

【 0 4 3 3 】

配列番号 8 9 ~ 1 0 4 は、表 4 の配列を示す。

配列番号 1 (> P 0 A E A 2、E. coli K 1 2 由来の W T C s g G のコード配列)

```
ATGCAGCGCTTATTTCTTTTGGTTTGCCGTCATGTTACTGA
GCGGATGCTTAACCGGCCCGCCTAAAGAAGCCGCCAGACC
GACATTAAATGCCTCGTGCTCAGAGCTACAAAGATTTGACC
CATCTGCCAGCGCCGACGGGTAAAAATCTTTGTTTCGGTAT
ACAAACATTCAGGACGA AACCGGGCAATTTAAACCCCTACCC
GGCAAAGTAACCTTCTCCACTGCTGTTCCGCAAAGCGCCACG
GCAATGCTGGTCAACGGCACTGAAAGATTCTCGCTGGTTTAA
TACCGCTGGAGCGCCAGGGCTTACAAAACCTGCTTAAACGA
GCGCAAAGATTATTCGTGCGGCACAAAGAAAACGGGCACGGTT
GCCATTAAATAACCGGAATCCCGCTGCAATCTTTAAACGGCGG
CAAATATCATG GTTGAAGGTTTCGATTATCGGTTTATGAAAG
CAACGTCAAATCTGGCGGGGGTTGGGGCAAGATATTTTGGC
ATCGGTGCCGACACGCAATACCAGCTCGATCAGATTGCCG
TGAAACCTGCGCGTCGTCAATGTGAGTACC GGCGAGATCCT
TTCTTTCGGTGAACACCCAGTAAGACGATACTTTCTCTATGAA
GTTTCAGGCCCGGGGGTTTTTCGCTTTTATTGACTACCAGCGCT
TGCTTGAAGGGGAAGTG GGTTACACCTCGAACGAACCTGT
TATGCTGTGCCTGATGTCGGCTATCGAAACAGGGGTCAATT
TTCCTGATTAAATGATGGTATCGACCGGTGGTCTGTGGGATT
TGCAAAATAAAGCAGAACGGGCAGAAATGACATTCTGGTGAA
ATACCGCCATATGTCGGTTTCCACCGGAATCCTGA
```

10

20

30

40

50

配列番号 2 (> P 0 A E A 2 (1 : 2 7 7)、E. coli K 1 2 由来の W T プレプロ C s g G)

```
MQRLLFLLVAVMLLSGCLTAPPKEAARPTLMPRAQSYKDLT
HLPAPTGKIFVSVYNIQDETGGQFKPYPASNFSTAVPQSAT
AMLVTALKDSRWFIPLERQGLQNL LNERKIIIRAAQENGTV
AINNRIP LQSLTAANIMVEGSIIGYESNVKSGGVGARYFG
IGADTQYQLDQIAVNLRVVNVSTGEILSSVNTSKTILSYE
VQAGVFRFIDYQRLLEGEVGYTSNEPVM LCLMSA IETGVIF
FLINDGIDRGLWDLQNK AERQNDILVKYRHMSVPPES
```

配列番号 3 (> P 0 A E A 2 (1 6 : 2 7 7)、E. coli K 1 2 由来の成熟 C s g G)

```
CLTAPPKEAARPTLMPRAQSYKDLTHLPAPTGKIFVSVYN
IQDETGGQFKPYPASNFSTAVPQSATAMLVTALKDSRWFIP
LERQGLQNL LNERKIIIRAAQENGTVAINNRIP LQSLTAAN
IMVEGSIIGYESNVKSGGVGARYFGIGADTQYQLDQIAVN
LRVVNVSTGEILSSVNTSKTILSYEVQAGVFRFIDYQRLLE
GEVGYTSNEPVM LCLMSA IETGVIFLINDGIDRGLWDLQ
NKAERQNDILVKYRHMSVPPES
```

配列番号 4 (> P 0 A E 9 8、E. coli K 1 2 由来の W T C s g F のコード配列)

```
ATGCGTGTCAAACATGCAGTAGTTCTACTCATGCTTATTT
CGCCATTAAAGTTGGGCTGGAACCATGACTTTCCAGTTCCG
TAATCCAAACTTTGGTGGTAACCCAAATAATGGCGCTTTT
TTATTAAATAGCGCTCAGGCCCAA AACTCTTATAAAGATC
CGAGCTATAACGATGACTTTGGTATTGAAACACCCCTCAGC
GTTAGATAACTTTACTCAGGCCATCCAGTCACAAATTTTA
```

GGTGGGCTACTGTCTGAATATTAAATACCGGTAAACCGGGCC
GCATGGTGACCAACGATTATATTGTCTGATATTGCCAACCG
CGATGGTCAATTGTCAGTTGAACGTGACAGATCGTAAAACC
GGACAAACCTCGACCATCCAGGTTTTCGGGGTTTACAAAATA
ACTCAACCGATTTT

配列番号5 (>P0AE98 (1:138)、E. coli K12由来のWT pre
CsgF)

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNP NFGGNPNNGAF
LLNSAQ AQNSYKDP SYND DFGIETPSALDNFTQAIQSQIL
GGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTD RKT
GQTSTIQVSG LQNNSTDF

10

配列番号6 (>P0AE98 (20:138)、E. coli K12由来のWT成熟C
sgF)

GTMTFQFRNP NFGGNPNNGAFLLNSAQ AQNSYKDP SYND D
FGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTND
YIVDIANRDGQLQLNVTD RKTGQTSTIQVSG LQNNSTDF

配列番号7 (>P0AE98、CsgF 1:27__6Hisのコード配列)

ATGCGTGTCAAACATGTCAGTAGTTTCTACTCATGCTTATTT
CGCCATTAAAGTTGGGCTGGAACCATGACTTTTCCAGTTCCG
TCATCACCATCACCATCACTAAGCCC

20

配列番号8 (>P0AE98 (1:28)、CsgF 20:27__6Hisのプレタ
ンパク質)

MRVKHAVVLLMLISPLSWA GTMTFQFR HHHHHH

配列番号9 (>P0AE98、CsgF 1:38__6Hisのコード配列)

ATGCGTGTCAAACATGTCAGTAGTTTCTACTCATGCTTATTT
CGCCATTAAAGTTGGGCTGGAACCATGACTTTTCCAGTTCCG
TAATCCAAACTTTTGGTGGTAACCCCAAATAATGGCCATCAC
CATCACCATCACTAAGCCC

配列番号10 (>P0AE98 (1:39)、CsgF 20:38__6Hisのプレ
タンパク質)

30

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNP NFGGNPNNG H
HHHHH

配列番号11 (>P0AE98、CsgF 1:48__6Hisのコード配列)

ATGCGTGTCAAACATGTCAGTAGTTTCTACTCATGCTTATTT
CGCCATTAAAGTTGGGCTGGAACCATGACTTTTCCAGTTCCG
TAATCCAAACTTTTGGTGGTAACCCCAAATAATGGCGCTTTT
TTATTAAATAGCGCTCAGGCCCAACATCACCATCACCATC
ACTAAGCCC

配列番号12 (>P0AE98 (1:49)、CsgF 20:48__6Hisのプレ
タンパク質)

40

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNP NFGGNPNNGAF
LLNSAQ AQ HHHHHH

配列番号13 (>P0AE98、CsgF 1:64__6Hisのコード配列)

ATGCGTGTCAAACATGTCAGTAGTTTCTACTCATGCTTATTT
CGCCATTAAAGTTGGGCTGGAACCATGACTTTTCCAGTTCCG
TAATCCAAACTTTTGGTGGTAACCCCAAATAATGGCGCTTTT
TTATTAAATAGCGCTCAGGCCCAAAACTCTTATAAAGATC
CGAGCTATAACGATGACTTTTGGTATTGAAACA CATCACCC
ATCACCATCACTAAGCCC

配列番号14 (>P0AE98 (1:65)、CsgF 20:64__6Hisのプレ
タンパク質)

50

ンパク質)

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNPNFGGNPNNGAF
LLNSAQAQNSYKDPSSYNDDFGIETHHHHHH

配列番号15(>P0AE98(20:53)、Cs g F 20:53の成熟ペプチド)

GTMTFQFRNPNFGGNPNNGAFLLLNSAQAQNSYKD

配列番号16(>P0AE98(20:42)、Cs g F 20:42+KDの成熟ペ
チド)

GTMTFQFRNPNFGGNPNNGAFLLLKD

配列番号17(>Q88H88__PSEPK(23:55))

TELVYTPVNPAPFGGNPLNGTWLLNNAQAQNDY

配列番号18(>A0A143HJA0__9GAMM(25:57))

TELIYEYPVNPNFGGNPLNGSYLLNNAQAQDRH

配列番号19(>Q5E245__VIBF1(21:53))

SELVYTPVNPNFGGNPLNTSHLFGGANAINDY

配列番号20(>Q084E5__SHEFN(19:51))

TQLVYTPVNPAPFGGSYLNNGSYLLANASQAQNEH

配列番号21(>F0LZU2__VIBFN(15:47))

SSLVYEYPVNPTFGGNPLNTTHLFSRAEAINDY

配列番号22(>A0A136HQR0__9ALTE(26:58))

TELVYEPIINPSFGGNPLNGSFLLSKANSSQNAH

配列番号23(>A0A0W1SRL3__9GAMM(21:53))

TEIVYQPIINPSFGGNPMNGSFLQLKAQSQNAH

配列番号24(>B0UH01__METS4(26:59))

SSLVYQPVNPAPFGGPQLNGSWLQAEANAQNI PQ

配列番号25(>Q6NAU5__RHOPA(22:53))

GSLVYTPTNPAFGGSPLNGSWQMQQATAGNH

配列番号26(>G8PUY5__PSEUV(7:38))

QQLIYQPTNPSFGGYAANTTHL FATANAQKTA

配列番号27(>A0A0S2ETP7__9RHZ(25:57))

GDLVYTPVNPSFGGSP LNSAHL LSIAGA QKNA

配列番号28(>E3I1Z1__RHOVT(19:51))

AELGYTPVNPSFGGSP LNSTLLSEASAQKPN

配列番号29(>F3Z094__DESAF(24:55))

TELVFSFTNPSFGGDPMIGNFL LNKADSQKR

配列番号30(>A0A176T7M2__9FLAO(21:53))

QQLVYKSIINPFFGGGDSFAYQQL LASANAQND

配列番号31(>D2QPP8__SPILD(14:45))

QALVYHPNNPAPFGGN T FN YQWMLSSAQAQDR

配列番号32(>N2IYT1__9PSED(26:58))

TELVYTPKNPAPFGGSPLNGSYLLGNAQAQNDY

配列番号33(>W7QHV5__9GAMM(26:58))

GQLIYQPIINPSFGGDPLLGNHLLNKAAQAQDTK

配列番号34(>D4ZLW2__SHEVD(23:55))

TQLIYTTPVNPNFGGSYLNNGSYLLANASVQNDH

配列番号35(>D2QT92__SPILD(21:53))

QAFVYHPNNPNFGGNTFNYSWMLSSAQAQDRT

配列番号36(>A0A167UJA2__9FLAO(20:51))

QGLIYKPKNPAPFGGDTFN YQWLASSAESQNK

配列番号37(>P0AE98(20:28)、Cs g F 20:27の成熟ペプチド)

GTMTFQFR

10

20

30

40

50

配列番号 38 (>P0AE98 (20:39)、CsgF 20:38 の成熟ペプチド)

G T M T F Q F R N P N F G G N P N N G

配列番号 39 (>P0AE98 (20:49)、CsgF 20:48 の成熟ペプチド)

G T M T F Q F R N P N F G G N P N N G A F L L N S A Q A Q

配列番号 40 (>P0AE98 (20:65)、CsgF 20:64 の成熟ペプチド)

G T M T F Q F R N P N F G G N P N N G A F L L N S A Q A Q N S Y K D P S Y N D D
F G I E T

配列番号 41 (CsgF__d27__end)

A C G G A A C T G G A A A G T C A T G G T T C C

配列番号 42 (CsgF__d38__end)

G C C A T T A T T T G G G T T A C C A C C A A A G T T T G G

配列番号 43 (CsgF__d48__end)

T T G G G C C T G A G C G C T A T T T A A T A A A A A A G C

配列番号 44 (CsgF__d64__end)

T G T T T C A A T A C C A A A G T C A T C G T T A T A G C T C G G

配列番号 45 (pNa62__CsgF__histag__Fw)

C A T C A C C A T C A C C A T C A C T A A G C C C

配列番号 46 (CsgF-His__pET22b__FW)

c c c c c a t a t g G G A A C C A T G A C T T T C C A G T T C C

配列番号 47: (CsgF-His__pET22b__Rev)

c c c c G A A T T C C T A a t g g t g a t g g t g a t g g t g G T A A A A A T C
G G T T G A G T T A T T T T G

配列番号 48: (csgEFG__pDONR221__FW)

G G G G A C A A G T T T G T A C A A A A A A G C A G G C T A C C T C A G G C G A
T A A A G C C A T G A A A C G T T A

配列番号 49: (csgEFG__pDONR221__Rev) G G G G A C C A C T T T

G T A C A A G A A A G C T G G G T G T T T A A A C T C A T T T T T C G A A C T G
C G G G T G G C T C C A A G C G C T G G

配列番号 50: (Mut__csgF__His__FW) C A A A A T A A C T C A A C C G

A T T T T c a t c a c c a t c a c c a t c a c T A A G C C C C A G C T T C A T A
A G G

配列番号 51: (Mut__csgF__His__Rev) C C T T A T G A A G C T G G G

G C T T A g t g a t g g t g a t g g t g a t g A A A A T C G G T T G A G T T A T
T T T G

配列番号 52: (DelCsgE__Rev)

A G C C T G C T T T T T T G T A C A A A C

配列番号 53: (DelCsgE__FW)

A T A A A A A A T T G T T C G G A G G C T G C

配列番号 54 (>P0AE98 (20:50)、CsgF 1:30 の成熟ペプチド)

G T M T F Q F R N P N F G G N P N N G A F L L N S A Q A Q N

配列番号 55 (>P0AE98 (20:54)、CsgF 1:35 の成熟ペプチド)

G T M T F Q F R N P N F G G N P N N G A F L L N S A Q A Q N S Y K D P

プロテアーゼ切断部位がタンパク質化されたCsgF配列の例。シグナルペプチドは、太字及び下線で太字のTEVプロテアーゼ切断部位に示され、下線でHCV C3プロテアーゼ切断部位に示される。StreptIIは、C末端のStreptタグを示し、H10は、C末端10xヒスチジンタグを示し、**は、終止コドンを示す。

配列番号 56 Pro-CsgF-Eco-(WT-T4C/N17S/P35-TEV-S36)-StreptII

10

20

30

40

50

【表 1 1】

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMCFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQANQSYKDP**ENLYFOSS**SYND
 DFGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
 SGLQNNSTDFSAWSHPQFEK**

配列番号 57 Pro-CsgF-Eco-(WT-N17S-Del(P35-[TEV]-S36)-StreptII

【表 1 2】

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQANQSYKDP**ENLYFOSS**SYND
 DFGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
 SGLQNNSTDFSAWSHPQFEK**

10

配列番号 58 Pro-CsgF-Eco-(WT-G1C/N17S/P35-[TEV]-S36)-StreptII

【表 1 3】

MRVKHAVVLLMLISPLSWACTMTFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQANQSYKDP**ENLYFOSS**SYND
 DFGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
 SGLQNNSTDFSAWSHPQFEK**

配列番号 59 Pro-CsgF-Eco-(WT-G1C/P35-[TEV]-S36)-StreptII

20

【表 1 4】

MRVKHAVVLLMLISPLSWACTMTFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQANQSYKDP**ENLYFOSS**SYND
 DFGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
 SGLQNNSTDFSAWSHPQFEK**

配列番号 60 Pro-CsgF-Eco-(WT-T45-TEV-P46)-H10

【表 1 5】

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQANQSYKDPSYNDDFGIET**ENLYFOSS**PSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
 VSGLQNNSTDFHHHHHHHHHH**

30

配列番号 61 Pro-CsgF-Eco-(WT-P35-TEV-S36)-H10

【表 1 6】

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQANQSYKDP**ENLYFOSS**SYND
 DFGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
 SGLQNNSTDFHHHHHHHHHH**

配列番号 62 Pro-CsgF-Eco-(WT-N30-TEV-S31)-H10

【表 1 7】

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQAN**ENLYFOSS**SYKDPSYND
 DFGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
 SGLQNNSTDFHHHHHHHHHH**

40

配列番号 63 Pro-CsgF-Eco-(WT-T45-TEV-F51)-H10

【表 1 8】

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTMTFQFRNPNGGPNPSNGAFLNLSAQANQSYKDPSYNDDFGIET**ENLYFOSS**FTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQVSGLQ
 NNSTDFHHHHHHHHHH**

50

配列番号 64 Pro-CsgF-Eco-(WT-N30-TEV-Y37)-H10
【表 19】

MRVKHAVVLLMLISPLSWAGTM^TF^QFRNP^NFGGNP^NNGAFL^LNSAQAQ^N**ENLYFOS**YNDDFGIET
PSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQVSGLQN
NSTDFHHHHHHHHHHH**

配列番号 65 Pro-CsgF-Eco-(WT-D34-[C3]-S36)
【表 20】

MRVKHAVVLLMLISPLSWACTM^TF^QFRNP^NFGGNP^NNGAFL^LNSAQAQ^NSYKDLEVLFQGPSYND
DFGIETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQV
SGLQNNSTDFSAWSHPQFEK**

10

配列番号 66 Pro-CsgF-Eco-(WT-I42-[C3]-E43)
【表 21】

MRVKHAVVLLMLISPLSWACTM^TF^QFRNP^NFGGNP^NNGAFL^LNSAQAQ^NSYKDP^SYNDDFGILEVL
FQGPETPSALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQ
VSGLQNNSTDFSAWSHPQFEK**

配列番号 67 Pro-CsgF-Eco-(WT-N38-[C3]-S47)
【表 22】

MRVKHAVVLLMLISPLSWACTM^TF^QFRNP^NFGGNP^NNGAFL^LNSAQAQ^NSYKDP^SYNLEVLFQGPS
ALDNFTQAIQSQILGGLLSNINTGKPGRMVTNDYIVDIANRDGQLQLNVTDRKTGQTSTIQVSGLQNN
TDFSAWSHPQFEK**

20

配列番号 68

M P R A Q S Y K D L T H L P M P T G K I F V S V Y N I Q D E T G Q F K P Y P A S
N F S T A V P Q S A T A M L V T A L K D S R W F I P L E R Q G L Q N L L N E R K
I I R A A Q E N G T V A I N N R I P L Q S L T A A N I M V E G S I I G Y E S N V
K S G G V G A R Y F G I G A D T Q Y Q L D Q I A V N L R V V N V S T G E I L S S
V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L E G E I G Y T S N E P V M L
C L M S A I E T G V I F L I N D G I D R G L W D L Q N K A E R Q N D I L V K Y R
H M S V P P E S

30

配列番号 69

C L T A P P K Q A A K P T L M P R A Q S Y K D L T H L P A P T G K I F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T A M L V T A L K D S R W F I P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T V A M N N R I P L Q S L T A A N
I M V E G S I I G Y E S N V K S G G V G A R Y F G I G A D T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E I L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L
E G E I G Y T S N E P V M L C L M S A I E T G

配列番号 70

C L T A P P K E A A K P T L M P R A Q S Y K D L T H L P I P T G K I F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T A M L V T A L K D S R W F V P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T V A I N N R I P L Q S L T A A N
I M V E G S I I G Y E S N V K S G G V G A R Y F G I G A D T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E I L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L
E G E I G Y T S N E P V M L C L M S A I E T G V I F L I N D G I D R G L W D L Q
N K A D R Q N D I L V K Y R H M S V P P E S

40

配列番号 71

C L T T P P K E A A K P T L M P R A Q S Y K D L T H L P V P T G K I F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T A M L V T A L K D S R W F I P

50

L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T V A I N N R I P L P S L T A A N
I M V E G S I I G Y E S N V K S G G A G A R Y F G I G A D T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E I L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L
E G E I G Y T S N E P V M L C L M S A I E T G V I F L I N D G I D R G L W D L Q
N K A D R Q N D I L V K Y R Q M S V P P E S

配列番号 7 2

C L T A P P K E A A K P T L M P R A Q S Y R D L T H L P A P T G K I F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T A M L V T A L K D S H W F I P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T V A N N N R M P L Q S L A A A N
V M I E G S I I G Y E S N V K S G G V G A R Y F G I G A D T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E V L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L
E G E I G Y T S N E P V M M C L M S A I E T G V I F L I N D G I D R G L W D L Q
N K A D A Q N P V L V K Y R D M S V P P E S

10

配列番号 7 3

C L T A P P K E A A K P T L M P R A Q S Y R D L T H L P L P S G K V F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T A M L V T A L K D S R W F V P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T V A D N N R I P L Q S L T A A N
V M I E G S I I G Y E S N V K S G G V G A R Y F G I G A D T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E V L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F V D Y Q R L L
E G E I G Y T S N E P V M L C L M S A I E T G V I Y L I N D G I E R G L W D L Q
Q K A D V D N P I L A R Y R N M S A P P E S

20

配列番号 7 4

C L T A P P K E A A K P T L M P R A Q S Y R D L T N L P D P K G K L F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T S M L V T A L K D S R W F I P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T V A E N N R M P L Q S L V A A N
V M I E G S I I G Y E S N V K S G G V G A R Y F G I G G D T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E V L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L
E G E I G Y T A N E P V M L C L M S A I E T G V I H L I N D G I N R G L W E L K
N K G D A K N T I L A K Y R S M A V P P E S

配列番号 7 5

C L T A A P K E A A R P T L L P R A P S Y T D L T H L P S P Q G R I F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A C N F S T A V P Q S A T A M L V S A L K D S K W F I P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G S V A I N N Q R P L S S L V A A N
I L I E G S I I G Y E S N V K S G G V G A R Y F G I G A S T Q Y Q L D Q I A V N
L R A V D V N T G E V L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L
E G E L G Y T T N E P V M L C L M S A I E S G V I Y L V N D G I E R N L W Q L Q
N P S E I N S P I L Q R Y K N N I V P A E S

30

配列番号 7 6

C I T S P P K Q A A K P T L L P R S Q S Y Q D L T H L P E P Q G R L F V S V Y N
I S D E T G Q F K P Y P A S N F S T S V P Q S A T A M L V S A L K D S N W F I P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T V A V N N R T Q L P S L V A A N
I L I E G S I I G Y E S N V K S G G A G A R Y F G I G A S T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E V L S S V N T S K T I L S Y E F Q A G V F R Y I D Y Q R L L
E G E V G Y T V N E P V M L C L M S A I E T G V I Y L V N D G I S R N L W Q L K
N A S D I N S P V L E K Y K S I I V P

40

配列番号 7 7

C L T A P P K Q A A K P T L M P R A Q S Y Q D L T H L P E P A G K L F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T A M L V S A L K D S G W F I P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I R A A Q E N G T A A V N N Q H Q L S S L V A A N
V L V E G S I I G Y E S N V K S G G A G A R F F G I G A S T Q Y Q L D Q I A V N

50

LRVVDVNTGQVLSSVNTSKTILSYEVQAGVFRYIDYQRLLE
EGEIGYTTNEPVMLCVMSAIEETGVIYLVNDGINRNLWTLK
NPQDAKSSVLERYKSTIVP

配列番号 7 8

CITTPPQEA AKPTLLPRDATYKDLVSLPQPRGKIYVAVYN
IQDETGGQFPYPASNFSSTSVPPQSATAMLVSSSLKDSRWFVP
LERQGLNNLLNERKIIIRAAQQNGTVGDNNASPLPSLYSAN
VIVEGSIIGYASN VKTGGFGARYFGIGGSTQYQLDQVAVN
LRIVNVHTGEVLSSVNTSKTILSYEIQAGVFRFIDYQRLLE
EGEAGFTTNEPVMTCLMSAIEEGV IHLINDGINKKLWALS
NAADINSEVLTRYRK

10

配列番号 7 9

ITEVPKEAAKPTLMPRASTYKDLVALPKPNGKIIIVSVYSV
QDETGGQFKPLPASNFSTAVPPQSGNAMLTSA LKDSGW FVPL
EREG LQNL LNERKIIIRAAQENGTVAA NNQQPLPSLLSANV
VIEGAIIGYDSDIKTGGAGARYFGIGADGKYRVDQVAVNL
RAVDVRTGEVLLSVNTSKTILSSEL SAGVFRFIEYQRLLE
LEAGYTTNEPVMMCMMSALEAGVAHLIVEGIRQNLWSLQN
PSDINNPIIQRYMKEDVP

配列番号 8 0

PETSESPTLMQRGANYIDLISLPKPQGKIFVSVYDFRDQT
GQYKPQPNSNFSTAVPPQGGTALLTMALLDSEWFYPLERQG
LQNL LTERKIIIRAAQKKQESISNHGSTLP SLLSANVMIEG
GIVAYDSNIKTGGAGARYLGIGGSGQYRADQVTVNIRAVD
VRSGKILTSVTTSKTILSYEVSAGAFRFVDYKELLEVELG
YTNNEPVNIALMSAIDS AVIHLIVKGVQQGLWRPANLDTR
NNPIFKKY

20

配列番号 8 1

PDASESPTLMQRGATYLDLISLPKPQGKIYVSVYDFRDQT
GQYKPQPNSNFSTAVPPQGGTALLTMALLDSEWFYPLERQG
LQNL LTERKIIIRAAQKKQESISNHGSTLP SLLSANVMIEG
GIVAYDSNIKTGGAGARYLGIGGSGQYRADQVTVNIRAVD
VRSGKILTSVTTSKTILSYEL SAGAFRFVDYKELLEVELG
YTNNEPVNIALMSAIDS AVIHLIVKGIEEGLWRPENQNGK
ENPIFRKY

30

配列番号 8 2

PETSKEPTLMARGTAYQDLVSLPLPKGKVYVSVYDFRDQT
GQYKPQPNSNFSTAVPPQGG AALLTTALLDSRWFMP LEREG
LQNL LTERKIIIRAAQKKDEIPTNHGVHLP SLASANIMVEG
GIVAYDTNIQTGGAGARYLGVGASGQYRTDQVTVNIRAVD
VRTGRILLSVTTSKTILSKE LQTGVFKFVDYKDLL EAELG
YTTNEPVNLA VM SAIDA AVVHVIVDGIKTGLWEPLRGEDL
QHPIIQEYMNRSKP

40

配列番号 8 3

CATHIGSPVADEKATLMPRSVSYKELISLPKP KGKIVAAV
YDFRDQTGQYLPAPASNFSSTAVTQGGVAMLSTALWDSQWF
VPLEREG LQNL LTERKIVRAAQNKPNVP GN NANQLPSLVA
ANILIEGGIVAYDSNVRTGGAGAKYFGIGASGEYRVDQVT
VNLRAVDIRSGRILNSVTTSKTVMSSQQVQAGVFRFVEYKR
LLEAEAGFSTNEPVQMCVMSAIESGVIRLIANGVRDNLWQ

50

L A D Q R D I D N P I L Q E Y L Q D N A P

配列番号 8 4

A S S S L M P K G E S Y Y D L I N L P A P Q G V M L A A V Y D F R D Q T G Q Y K
P I P S S N F S T A V P Q S G T A F L A Q A L N D S S W F I P V E R E G L Q N L
L T E R K I V R A G L K G D A N K L P Q L N S A Q I L M E G G I V A Y D T N V R
T G G A G A R Y L G I G A A T Q F R V D T V T V N L R A V D I R T G R L L S S V
T T T K S I L S K E I T A G V F K F I D A Q E L L E S E L G Y T S N E P V S L C
V A S A I E S A V V H M I A D G I W K G A W N L A D Q A S G L R S P V L Q K Y

配列番号 8 5

Q D S E T P T L T P R A S T Y Y D L I N M P R P K G R L M A V V Y G F R D Q T G
Q Y K P T P A S S F S T S V T Q G A A S M L M D A L S A S G W F V V L E R E G L
Q N L L T E R K I I R A S Q K K P D V A E N I M G E L P P L Q A A N L M L E G G
I I A Y D T N V R S G G E G A R Y L G I D I S R E Y R V D Q V T V N L R A V D V
R T G Q V L A N V M T S K T I Y S V G R S A G V F K F I E F K K L L E A E V G Y
T T N E P A Q L C V L S A I E S A V G H L L A Q G I E Q R L W Q V

配列番号 8 6

M P K S D T Y Y D L I G L P H P Q G S M L A A V Y D F R D Q T G Q Y K A I P S S
N F S T A V P Q S G T A F L A Q A L N D S S W F V P V E R E G L Q N L L T E R K
I V R A G L K G E A N Q L P Q L S S A Q I L M E G G I V A Y D T N I K T G G A G
A R Y L G I G V N S K F R V D T V T V N L R A V D I R T G R L L S S V T T T K S
I L S K E V S A G V F K F I D A Q D L L E S E L G Y T S N E P V S L C V A Q A I
E S A V V H M I A D G I W K R A W N L A D T A S G L N N P V L Q K Y

配列番号 8 7

L T R R M S T Y Q D L I D M P A P R G K I V T A V Y S F R D Q S G Q Y K P A P S
S S F S T A V T Q G A A A M L V N V L N D S G W F I P L E R E G L Q N I L T E R
K I I R A A L K K D N V P V N N S A G L P S L L A A N I M L E G G I V G Y D S N
I H T G G A G A R Y F G I G A S E K Y R V D E V T V N L R A I D I R T G R I L H
S V L T S K K I L S R E I R S D V Y R F I E F K H L L E M E A G I T T N D P A Q
L C V L S A I E S A V A H L I V D G V I K K S W S L A D P N E L N S P V I Q A Y
Q Q Q R I

配列番号 8 8

P S D P E R S T M G E L T P S T A E L R N L P L P N E K I V I G V Y K F R D Q T
G Q Y K P S E N G N N W S T A V P Q G T T T I L I K A L E D S R W F I P I E R E
N I A N L L N E R Q I I R S T R Q E Y M K D A D K N S Q S L P P L L Y A G I L L
E G G V I S Y D S N T M T G G F G A R Y F G I G A S T Q Y R Q D R I T I Y L R A
V S T L N G E I L K T V Y T S K T I L S T S V N G S F F R Y I D T E R L L E A E
V G L T Q N E P V Q L A V T E A I E K A V R S L I I E G T R D K I W

【 0 4 3 4 】

配列番号 8 9 ~ 1 1 6 は、表 3 に示される C s g F ペプチドである。

配列番号 1 1 7 は、位置 9 7 に W を有する配列番号 3 である。

C L T A P P K E A A R P T L M P R A Q S Y K D L T H L P A P T G K I F V S V Y N
I Q D E T G Q F K P Y P A S N F S T A V P Q S A T A M L V T A L K D S R W F I P
L E R Q G L Q N L L N E R K I I W A A Q E N G T V A I N N R I P L Q S L T A A N
I M V E G S I I G Y E S N V K S G G V G A R Y F G I G A D T Q Y Q L D Q I A V N
L R V V N V S T G E I L S S V N T S K T I L S Y E V Q A G V F R F I D Y Q R L L
E G E V G Y T S N E P V M L C L M S A I E T G V I F L I N D G I D R G L W D L Q
N K A E R Q N D I L V K Y R H M S V P P E S

配列番号 1 1 8 (> P 3 2 2 7 0、Enterobacteria フェージ T 4)

M T F D D L T E G Q K N A F N I V M K A I K E K K H H V T I N G P A G T G K T T
L T K F I I E A L I S T G G T G I I L A

10

20

30

40

50

APTHAAKKILSKLSGKEASTIHSILKINPVITYEENVLF EQ
KEVPDLAKCRVLICDEVSMY
DRKLFKILLSTIPPWCTIIGIGDNKQIRPVEPGENTAYIS
PFFTHKDFYQCELTEVKRSN
APIIDVATDVRNGKWNVDKVV DGHGVRGFTGDTALRDFMV
NYFSIVKSLDDLFENRVMAF
TNKSVDKLN SIIIRKKIFETDKDFIVGEIIVMQEPLFKTYK
IDGKPVSEIIFNNGQLVRII
EAEYTSTFVKARGVPGEYLIRHWDLTVETYGDD EYYREKI
KIISSDEELYKFNLFLAKTA
ETYKNWNKGGKAPWSDFWDAKSQFSKV KALPASTFHKAQG
MSVDRAFIYTPCIHYADVEL
AQQLLYVGVTRGRYDV FYV

10

配列番号119 (>D0MKQ2、*Rhodothermus marinus*)

MEEL SNEQQRVL DHVLAWLERNDAPPIFILTG SAGTGKTL
LIRHLVRALQDRRIHYALAA
PTGRAARILSERTGDHARTLHSLIYIFDRYQLVEEADRQT
DEPLSLQLHFALRSAEH DAR
LIIVDEASMVS DTAGEEELYRFGSGRLLNDLLTFARLIPK
RDRPPTTRL L FVGDP AQLPP
VGQSVSPALSAQYLRDTFGLSAETAHLRSVYRQRKGHPIL
ETATALRNALEKGHYHTFRL
PEQPPDLRPVGL EEA IETTATDFRRQNPSVLLCRTNALAR
KLNAAVRARLWGREGLPPQP
GDL LLVNRNAPLHGLFNGDLVLVETVGP LEHRRVGRGRP
PVDLYFRDVELLYPHEKPRN
RIRCKLLENLLESPDGQLSPDI IQALLIDFYRRHPSLKHG
SSEFRLMLANDAYFNALHVR
YGYAMTVHKAQGGGEWK RATVVFNDWRHFRHAEFFRWAYTA
ITRAREELLTIGAPSFEALS
DMRWQPAPSVPAPEQA AENATRFPLKALETYHQRLSEALT
AAGIETTGVELLQYAVRYHL
ARADRTTRI QYYYRGDGQISRIVTLGGADDPELTQQAYAL
FERILSEPPADSGELPENPL
LREFLERAHLRLEGSGIRIVHWKEMPYALRLYFSADGENV
TIDFYYNRRGVWTHAQEVGR
SSSGALFARIQSLLQADS

20

30

配列番号120 (>B1X365、*Cyanotherce* ATCC51142)

MSQSVVVPDELGEIITAVIEFYQDAVDKIEPKIVFLELRK
NVVDWVSRTQLKIEEKEIQ A
TGLTRQQQTAYKEMINFIENSSEQYFRLSGYAGTGKSFLM
AKVIEWLKQEDYKYSVAAPT
NKA AKNLTQIARSQG IKIEATTVAKLLKLQPTIDVD TGQQ
SFEFNSEKELELKD YDVIII
DEYSMLNKNDFRDLQQAVKGGESKFIFVGDSSQLPPVKEK
EPIVANHPDIRKSANLTQIV
RYDGEIVKVAESIRRNPRWNHQTYPFETVADGTIIKLNTE
DWLQQALSHFEKEDWLSNP D
YVRMITWRNKTADKYNQAIREALYGENVEQLVVGDRLIAK
KPVFRSLPGGKKKEKKIILN

40

50

N S E E C K V I E T P K I N Y N E K Y K W E F Y Q V K V R T D E G G M I E L R I
L T S E S E E K R Q K K L K E L A K R A
R E E E N Y S E K K K Q W A I Y Y E L D E L F D N M A Y A Y A L T C H K A Q G S
S I D N V F L L V S D M H Y C R D K T K
M I Y T G L T R A K K C C Y V G

配列番号121 (>Q2S429、*Salinibacter ruber*)

M S T F A D A P F T E D Q E E A Y D H V Y D R L A Q G E R F T G L R G Y A G T G
K T Y L V S R L V E Q L L D E D C T V T
V C A P T H K A V Q V L S D E L G D A P V Q M Q T L H S F L G L R L Q P K Q D G
E Y E L V A E E E R N F A E G V V I V D
E A S M I G R E E W S H I Q D A P F W V Q W L F V G D P A Q L P P V N E D P S P
A L D V P G P T L E T I H R Q A A D N P
I L E L A T K I R T G A D G R F G S T F E D G K G V A V T R N R E E F L D S I L
R A F D A D A F A E D A T H A R V L A Y
R N K T V R R Y N R E I R A E R Y G A D A D R F V E G E W L V G T E T W Y Y D G
V Q R L T N S E E V R V K K A Q V E T F
E A D D Q S E W T V W E L K I R T P G R G L T R T I H V L H E E E R E R Y E N A
L E R R R G K A E D D P S K W D R F F E
L R E R F A R V D Y A Y A T T V H R A Q G S T Y D T V F V D H R D L R V C R G E
E R G A L L Y V A V T R P S R R L A L L V

10

20

配列番号122 (>B6BJ43 (UPI000183B2F5)、*Sulfurimonas gotlandica* GD1)

M K I L N K E T Y K L S L H Q E E V F T Q I V S Q L D T K V S S I L K S T N I E
D Y L L S L T G P A G T G K T F L T T Q
I A K Y L V E K R K E S E Y P M S S D F D F T I T A P T H K A V G V L S K L L R
E N N I Q S S C K T I H S F L G I K P F
I D Y T T G E E K F V V D K T N K R K D R T S I L I V D E S S M I G N T L Y E Y
I L E A I E D K R V N V V L F I G D P Y
Q L L P I E N S K N E I Y D L P N R F F L S E V V R Q A E N S Y I I R V A T K L
R E R I K N Q D F I S L Q Q F F Q E N M
E D E I T F F H N K E A F L E D F Y K E E E W Y K E N K I L A T Y K N K D V D A
F N K I I R N K F W E Q K G N T T P S T
L L A G D M I R F K D A Y T V G D I T I Y H N G Q E L Q L G S T E V K Y H D S L
H I E Y W E C K S I Y A L E Q Q V F R V
V N P D S E A V F N Q K L Q S L A T K A K Q A K F P D N K K L W K L Y Y E T R N
M F A N V Q Y I H A S T I H K L Q G S T
Y D V S Y I D I F S L V H N H Y M S D E E K Y R L L Y V A I T R A S K D I K I F
M S A F D R T S D E K V I I N N Q N S E
T M N T L K Q L H D I D I I L K D L D L

30

配列番号123 (>M4MBC3、*Vibrio* ファージヘンリエット12B8)

M A D F E L T L G Q K T V L G E V I S T I L K P V N L N D T S R F H T M H G P A
G S G K T T V L Q R I I S Q I P A Y K T
I G F C S P T H K S V K V I R R M A R E A G I S H R V D I R T I H S A L G L V M
K P V R G D E V L V K E P F A E E R I Y
D V L I I D E A G M L N D E L I M Y I L E S Q S S K V I F V G D M C Q I G P I Q
S N L P E E D G Y T P T S T D D V S K V
F T E V E M M S A L T E V V R Q A E G S P I I Q L A T E F R L A Q D D I Y A D L
P R I V T N T T P D G N G I I T M P N G
N W V D S A V A R F Q S D Q F K E D P D H C R I V C Y T N A M V D L C N D L V R
K R L F G A D V P E W L E D E I L V A Q

40

50

EMGSTWNNADELRIVSIDDHFDQQYEVP CWRMQLESVEDH
KLHNALVVKGDYIEDFKFRL
NAIAERANTDKNMSGMHWKEFWGMRKKFNTFKNVYAGTAH
KSQGSTFDYTYVFTPDFYKF
GATMTIKRLLYTAITRSRYTTYFAMNTGAQ
配列番号124 (>I6XGX8、Vibrioファージphi-pp2)
MGLTNCQQGAMDAFLES DGHMTISGPAGSGKTFLMKSI LE
ALESKGNVTMVTPTHQAKN
VLHKATGQEVSTIHSLLKIH P DTYEDQKHFTQSGEVEGLD
EIDVLVVEEAS MVDEELFQI
TGRTMPRKCRI LAVGDKYQLQP VKHDPGVISPFFTKFTTF
EMNEVVRQAKDNPLIQVATE
VRNGQWLRTNWSKERRQGV LHVPNVNKMLD TYLSKVNSPE
DLLDYRILAYTND CVDTFNG
IIREHVYNTSEPFIPGEYLVTQMPVMVSNGKYPVCVIENG
EVVKILDVRQKTIDGMLPKV
DNEAFDVAVL TVEKEDGNVYEFTVLWDDLQKERFARYLSV
AAGTYKSMRGNTKRYWRAFW
GLKEQMIETKSLGASTVHKSSQGTTVKGVCLYTQDMGYAEP
EILQQLVYVGLTRPTDWALY
N

10

20

配列番号125 (>E5DRP6、Aeromonasファージ65)
MSESEITLTPSQNMAVNEVKNGTGHITISGPPGSGKTFLV
KYLIKMLGDELGTVLAAPTH
QAKIVLTEM S GIEACTIHS LMKIH PETLEDIQIFDQSKLP
DLSNIRYLIVEEAS MHSKTL
FKITMKSIPPTCRIIAIGDKDQIQPEEHAQGELSPYFTDP
RFSQIRLTDIMRQS L DNPII
QVATKIREGGWIEPNWNRD TKTGVYKVSGITDLVNSYLRA
VKTPEDLT KYRFLAYTNKV V
NKVNSIVREHVYKTKLPFIEGEKIVLQEPVMVEHEDDTIE
TIFTNGEVVTINEIEVFDR T
IRIDGSPEFKVNAAKLSVSSDYS GIEHDFCVLYGSESRLE
FEYQLSESAGNIKQMKGKGN
QRS AWKSFWA AKKMF IETKSLGASTIHKSSQGSTVKGVWLA
LHDIHYADEELKQQLVYVGV
TRPTDFCLYFDG TK

30

配列番号126 (>I6XH64、AeromonasファージCC2)
MAVDAVQSGTGHITISGPPGSGKTFLVKYIIKMLGDELGT
VLAAPTHQAKIVLTEM S GIE
ACTIHS LMKIH PETLEDIQIFDQSKMPDLSTVRYLIIEEA
SMHSKALFNITMKSIPPTCR
IIAIGDKDQIQPVDHAPGELSPYFTDSRFTQIRMTDIMRQ
SLDNPIIIQVATTIREGGWIY
QNWNKEKKSGVYKVKSITDLINSYLRVVKTPEDLTKYRFL
AFTNKVVVDKVNSIVRKHVYK
TDLPFIEGEKLV LQEPVMVEYDDDTIETIFTNGEVVTVDE
IEVSDMNIRIDGSPA F S ISV
AKLKVTSD FSGVTHDIMS VYGEDSKAEFNYQLSEAAAVIK
QMQRGQTKAAWASFWDAKKT

40

50

FTETKSLGACTIHKSQGSTVKGVWLGLHDISYADTDLQQQ
LVYVGVT RPTDFCLYFDGSK

配列番号127 (>K4FBD0、CronobacterファージvB CsaM GAP161)

MSELT FDDL SDDQKSAHDRV IHN IQNAIHTTTITGGPGVGK
TTLVKFVFNTLKG LGISGIW
LTAPTHQAKNV LAAATGMDATTIHSALKISPVTNEELRVF
EQQKGKKAPDLSTCRV FVVE
EVSMVDMDL FRIIRRSIPSN AVILGLGDKDQIRPVNADGR
VELSPFFDEE IFDVIRMDKI
MRQAE GNPIIQVSRAVRD GKMLKPM SVGDLGVFQHANA VD
FLRQYFRRVKTPDD LIENRM
FAYTNDNV DKL NATIRKHL YKTTEPFILDEVIVMQEPLVQ
EMRLNGQIFTEIVYNNNEKI
RVLEIIPRREVIKAEK CDEKIEIEFYLLKTVSLEEETE AQ
IQVVVD PVMKDR LGNYLAYV
ASTYKRIKQQTGYKAPWHSFWAIKNKFQDVKPLPVCTYHK
SQGSTYDHAYMYTRDAYAFA
DYDLCKQLIYVGVT RARYTVDYV

10

配列番号128 (>D5JF67、KlebsiellaファージKP15)

20

MSELT FDDL SEDQKNAHDRV IKNIRNKIHTTTITGGPGVGK
TTLVKFVFETLKKL LGISGIW
LTAPTHQAKNV LSEAVGMDATTIHSALKISPVTNEELRVF
EQQKGKKAAADLSECRV FVVE
EVSMVDKEL FRIIKRTIPSCAVILGLGDKDQIRPVNTEGI
TELSPFFDEE IFDVIRMDKI
MRQAE GNPIIQVSRAIRD GKPLMPLMNGELGV MKHENASD
FLRRYF SRVKTPDD LNNRM
FAYTNANVDKL NAVIRKHL YKTDQPFIVGEVVVMQEPLVT
EGRVNGVS FVEVIYNNNEQI
KILEIIPRSDTIKADRCDPVQIDYFLMKTESMFEDTKADI
QVIADPVMQERLGDY LNYVA
FQYKKMKQETGYKAPWYSFWQIKNKFQTVKALPVCTYHKG
QGSTYDHSYMYTRDAYAYAD
YELCKQLLYVGTTRARFTVDYV

30

配列番号129 (>J7HXT5、StenotrophomonasファージIME13)

MVTYDDLTVGQKDAIEKALQAMRTKRHITIRGPAGSGKTT
MTRFLLERL FQTGQQGIVLT
APTHQAKKELSKHALRKS YTIQSVLKINPSTLEENQIFEQ
KGTPDFS KTRVLI CDEV SFY
TRKLF DILMRNVPSHC VVIGIGDKAQIRGVSEDDTHELSP
FFTDNRFEQVELTEVKRHQG
PIIEVATDIRNGKWIYEK LDDSGNGVKQFHTVKDFLSKYF
ERTKTPNDLLENRIMAYTNN
SVDKLNSVIRKQLYGAN AAPFLPDEILVMQEPLMFDIDIG
GQTLKEVIFNNGQNVRVIN V
KPSRKTLKAKGVGEIEVECTMLECESYEEDDDYRRAWFT
VVHDQNTQYAIN EFLSIIAE
KYRSREVFPNWKDFWAI RNTFVKVRPLGAMTFHKSQGSTF

40

50

D N A Y L F T P C L H Q Y C R D P D V A
Q E L I Y V G N T R A R K N V C F V

配列番号130 (>E5EYE6、AcinetobacterファージAc42)

M N F E D L T E G Q K N A Y T A A I K A I E T V P S S S A E K R H L T I N G P A
G T G K T T L T K F L I A E L I R R G E
R G V Y L A A P T H Q A K K V L S Q H A G M E A S T I H S L L K I N P T T Y E D
S T T F E Q K D V P D M S E C R V L I C
D E A S M Y D L K L F Q I L M S S I P L C C T V I A L G D I A Q I R P V E P G A
F E G Q V S P F F T Y E K F E Q V S L T
E V M R S N A P I I D V A T S I R T G N W I Y E N V I D G A G V H N L T S E R S
V K S F M E K Y F S I V K T P E D L F E
N R L L A F T N K S V D D L N K I V R K K I Y N T L E P F I D G E V L V M Q E P
L I K S Y T Y E G K K V S E I V F N N G
E M V K V L C C S Q T S D E I S V R G C S T K Y M V R Y W Q L D L Q S L D D P D
L T G S I N V I V D E A E I N K L N L V
L G K S A E Q F K S G A V K A A W A D W W K L K R N F H K V K A L P C S T I H K
S Q G T S V D N V F L Y T P C I H K A D
S Q L A Q Q L L Y V G A T R A R H N V Y Y I

配列番号131 (>E3SFA5、ShigellaファージSP18)

M I K F E D L N T G Q K E A F D Y I T E A I Q R R S G E C I T L N G P A G T G K
T T L T K F V I D H L V R N G V M G I V
L A A P T H Q A K K V L S K L S G Q T A N T I H S I L K I N P T T Y E D Q N I F
E Q R E M P D M S K C N V L V C D E A S
M Y D G S L F K I I C N S V P E W C T I L G I G D M H Q L Q P V D P G S T Q Q K
I S P F F T H P K F K Q I H L T E V M R
S N A P I I E V A T E I R N G G W F R D C M Y D G H G V Q G F T S Q T A L K D F
M V N Y F G I V K D A D M L M E N R M Y
A Y T N K S V E K L N N I I R R K L Y E T D K A F L P Y E V L V M Q E P H M K E
L E F E G K K F S E T I F N N G Q L V R
I K D C K Y T S T I L R C K G E S H Q L V I N Y W D L E V E S I D E D E E Y Q V
D R I K V L P E D Q Q P K F Q A Y L A K
V A D T Y K Q M K A A G K R P E W K D F W K A R R T F L K V R A L P V S T I H K
A Q G V S V D K A F I Y T P C I H M A E
A S L A S Q L A Y V G I T R A R Y D A Y Y V

配列番号132 (>I7J3V8、YersiniaファージphiR1-RT)

M I T Y D D L T D G Q K S A F D N T M E A I K N K K G H I T I N G P A G T G K T
T L T K F I I D H L I K T G E A G I I L
C A P T H Q A K K V L S K L S G M D A S T I H S V L K I N P T T Y E E N Q I F E
Q R E V P D L A A C R V L I C D E A S F
Y D R K L F G I I L A T V P S W C T V I A L G D K D Q L R P V T P G E S E Q Q L
S P F F S H A K F K Q V H L T E I K R S
N G P I I Q V A T D I R N G G W L S E N I V D G E G V H A F N S N T A L K D F M
I R Y F D V V K T A D D L I E S R M L A
Y T N K S V D K L N G I I R R K L Y E T D K P F I N G E V L V M Q E P L M K E L
E F D G K K F H E I V F N N G Q L V K I
L Y A S E T S T F I S A R N V P G E Y M I R Y W N L E V E T A D S D D D Y A T S
Q I Q V I C D P A E M T K F Q M F L A K
T A D T Y K N S G V K A Y W K D F W S V K N K F K K V K A L P V S T I H K S Q G
C T V N N T F L Y T P C I H M A D A Q L
A K Q L L Y V G A T R A R T N L Y Y I

10

20

30

40

50

配列番号133 (>M1EA88、SalmonellaファージS16)

MITFEQLTSGQKLA FDETIRAIKEKKNHVTINGPAGTGKT
TLTKFIMEHLVSTGETGIIL
TAPTHAAKKVLT KLSGMEANTIHKILKINPTTTYEESMLFE
QKEVPDLASCRVLI CDEASM
WDRKLFKILMASIPKWCTIVAIGDVAQIRPVDPGETE AHI
SPFFIHKDFKQLNLT EVMRS
NAPIIDVATDIRNGSWIYEKTV DGHGVHGF TSTTALKDFM
MQYFSIVKSPEDL FENRMLA
FTNKSVDKLN SII RRRRLYQT EEA FVVGEVIVMQEPLMREL
VFEGKKFHETLFTNGQYVRI
LSADYTSSFLGAKGVSGEHLIRHWVLDVET YDDEEYAREK
INVISDEQEMNKFQFFLAKT
ADTYKNWNKGGKAPWSE FWD AKRK FHKVKALPCSTFHKAQ
GISVDSSFIYTPCIHVSSDN
KFKLELLYVGATRGRHDVFFV

10

【0435】

以下の実施例は、本発明を例示する。

【実施例】

【0436】

20

変異体CsG細孔及び変異体Cs g G / Cs G F複合体を作製及び試験するための詳細な方法は、WO2016 / 034591、WO2017 / 149316、WO2017 / 149317、WO2017 / 149318、WO2018 / 211241、及びWO2019 / 002893（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。修飾Ddaヘリカーゼを作製するための詳細な方法は、WO2015 / 055981、WO2015 / 166276、及びWO2016 / 055777（全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0437】

実施例1

この実施例は、ポリヌクレオチドの移動を制御するポリヌクレオチド結合タンパク質を使用して、バリエーションナノ細孔の速度特性を対照バリエーションナノ細孔に対して比較する方法を記載する。

30

【0438】

3.6 kbの分析物調製

3.6 kbの二本鎖DNA分析物を、特異的プライマー及びPCRを使用して調製した。PCR産物を、NEBNext末端修復及びNEBNext dA-テリングモジュール（New England Biolabs（NEB））に供し、3' dAオーバーハングを生成した。

【0439】

バリエーション及び対照ナノ細孔調製

40

WO2019 / 002893（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、バリエーションナノ細孔又は対照ナノ細孔をコードする組換え発現ベクターを、化学的に能力のあるE. coli細胞に形質転換した。構築物は、C末端Strept親和性タグを含んだ。細胞を、選択のための適切な抗生物質を含有するLB寒天プレート上にプレーティングした。寒天プレートからのコロニーを、抗生物質を有するLB培地中に接種し、一晚成長させた後、自己誘導培地中に希釈し、18℃で68時間インキュベートした。細胞を遠心分離によって採取した後、溶解し、バグバスター（bugbuster）（Merck 70921）及び0.1%DDM中で抽出した。上清を、親和性クロマトグラフィー、60℃で30分間の熱処理、及びSDS-PAGEによって判定したオリゴマーナノ細孔を選択するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製した。

50

【0440】

C s g G - C s g F 複合体を、上記のように精製されたナノ細孔及び化学的に合成されたC s g F ペプチドから調製した。ナノ細孔を、50mMのT r i s、150mMのN a C l、2mMのE D T A、0.1% S D S、0.1% B r i j 5 8、p H 7.0を含む緩衝液に緩衝液交換し、次いで、C s g G モノマーに対して4倍モル過剰のペプチド中で25℃で1時間インキュベートした。60℃で15分間加熱して反応を停止させ、続いて遠心分離して任意の沈殿物を除去した。

【0441】

配列決定アダプタ調製

N末端親和性及び溶解性タグを有する、W O 2 0 1 6 / 0 5 5 7 7 7 に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエーションをコードする組換え発現ベクターを、化学的に能力のあるE . c o l i 細胞に形質転換した。細胞を、抗生物質を含有するL B 寒天プレート上にプレーティングした。寒天プレートからのコロニーをL B 成長培地中に接種し、O D 0.400~0.800に成長させて誘導し、次いで、18℃で更に16時間成長させた。ベンゾナーゼ及びプロテアーゼ阻害剤の存在下での超音波処理によって細胞を溶解した。上清を、親和性クロマトグラフィーを使用して更に精製した。精製した対照ポリヌクレオチド結合タンパク質を、50mMのH e p e s p H 8.0、100mMの酢酸カリウム、1mMのE D T A 中で、W O 2 0 1 5 / 1 1 0 8 1 3 A 1 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される配列決定Yアダプタに、周囲温度で10分間結合させた。T M A D (S I G M A)を最終濃度の100μMまで添加し、34℃で1時間インキュベートした。10mMのA T P、10mMのM g C l 2、及び0.5MのN a C lを添加し、周囲温度で10分間インキュベートした。ポリヌクレオチド結合タンパク質に結合した配列決定アダプタを、アニオン交換によって精製した。

【0442】

ライブラリ調製

配列決定アダプタを、3.6kbの分析物にライゲーションした。ライブラリを配列決定のために調製し、製造元のガイドライン(Oxford Nanopore Technologies)に従ってMinIONフローセル上で実行した。

【0443】

電気的測定値

MinIONフローセルに挿入したナノ細孔から電気的測定値を取得した。単一の細孔を各チャンネル内のブロックコポリマー膜に挿入した後、25mMのリン酸カリウム、150mMのフェロシアン化カリウム(II)、150mMのフェリシアン化カリウム(III)、pH8.0を含む1mLの緩衝液を、システムに通して流して任意の過剰なタンパク質ナノ細孔を除去した。

【0444】

標準的な配列決定スクリプトを実行し、生データを、MinKNOWソフトウェア(Oxford Nanopore Technologies)を使用してバルクFAST5ファイルに収集した。

【0445】

データ分析

DNAライブラリは、Guppy(Oxford Nanopore Technologies)からの標準的なベースコーリングアルゴリズムを使用して配列決定した。各ナノ細孔バリエーションについて145以上の読み取りを3.6kbの分析物参照配列にマッピングした。

【0446】

細孔を通して転位する際の個々のDNA鎖の速度は、参照にマッピングされた塩基の数を読み取りの持続時間で割ることによって計算した(1秒当たりの塩基で測定した)。速度の中央値(1秒当たりの塩基)は、細孔を通して転位する際の複数の個々のDNA鎖の速度の中央値であった。対照ナノ細孔フローセルの速度の中央値は、バリエーションナノ細孔

フローセルの速度の中央値から減算した。これは速度デルタであった。したがって、正の速度デルタは、DNAが対照ナノ細孔よりもバリエーションナノ細孔を通してより迅速に転位したことを示した。

【0447】

細孔を通して転位する際の複数の個々のDNA鎖の速度の変動は、四分位範囲を計算することによって測定した。したがって、小さな四分位範囲は速度の狭い分布を暗示し、大きな四分位範囲は速度の広い分布を暗示した。正規化された速度分布は、速度の四分位範囲を速度の中央値で割り、100を掛けることによって計算した。対照ナノ細孔フローセルの正規化された速度分布は、バリエーションナノ細孔フローセルの正規化された速度分布から減算した。これは、正規化された速度分布デルタであった。したがって、負の正規化された速度分布デルタは、バリエーションナノ細孔が対照ナノ細孔よりも速度の狭い分布を有することを示した。

【表23】

バリエーション位置	バリエーション AA	速度 Δ
97	D	58.23
97	G	28.47
97	N	23.22
97	R	44.64
97	S	64.24
100	A	77.22
100	K	76.49
100	S	33.38
101	A	-3.93
101	欠失	43.00
101	G	58.77
101	S	44.82
102	A	33.83
102	D	21.27
102	R	35.98
102	S	14.59
102	W	44.70

表11. 速度 Δ は、バリエーションナノ細孔フローセルと対照ナノ細孔フローセルとの間の速度の中央値 (bps) の差である。

【表 2 4】

バリエント位置	バリエント AA	正規化された速度分布 Δ
97	D	3.72
97	G	-0.06
97	N	-0.33
97	R	0.56
97	S	-3.18
100	A	-1.04
100	K	0.03
100	S	-0.66
101	A	-0.44
101	欠失	3.99
101	G	-0.13
101	S	1.13
102	A	-0.64
102	D	11.75
102	R	-1.37
102	S	-2.37
102	W	27.66

10

20

表 1 2 . 正規化された速度分布 Δ は、バリエントナノ細孔フローセルと対照ナノ細孔フローセルとの間の正規化された速度分布の差である。

【0 4 4 8】

実施例 2

この実施例は、WO 2 0 1 7 / 1 4 9 3 1 6 に記載されるナノ細孔を使用して、ポリヌクレオチドの移動を制御する対照バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質に対して、ポリヌクレオチドの移動を制御するバリエントポリヌクレオチド結合タンパク質の速度及び精度特性を比較する方法を記載する。

30

【0 4 4 9】

バーコード化された 3 . 6 k b の分析物の調製

3 . 6 k b の二本鎖 DNA 分析物を、特異的プライマー及び PCR を使用して調製した。PCR 産物を、NEB Next 末端修復及び NEB Next d A -テーリングモジュール (New England Biolabs (NEB)) に供し、3' d A オーバーハングを生成した。製造元のガイドラインに従って、EXP-PBC001 (Oxford Nanopore Technologies) を使用して分析物にバーコードを導入した。

40

【0 4 5 0】

バリエント配列決定アダプタ調製

N 末端親和性及び溶解性タグを有する、WO 2 0 1 6 / 0 5 5 7 7 7 に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエントをコードする組換え発現ベクターを、化学的に能力のある E . c o l i 細胞に形質転換した。細胞を、抗生物質を含有する LB 寒天プレート上にプレーティングした。寒天プレートからのコロニーを LB 成長培地中に接種し、OD 0 . 4 0 0 ~ 0 . 8 0 0 に成長させて誘導し、次いで、18℃で更に 16 時間成長させた。細胞を、リゾチーム、ベンゾナーゼ、及びプロテアーゼ阻害剤の存在下でバグバスター抽出試薬 (Merck 70921) で溶解するか、又はベンゾナーゼ及びプロテ

50

アーゼ阻害剤の存在下での超音波処理によって溶解した。上清を、親和性クロマトグラフィーを使用して更に精製した。モル過剰の精製したバリエーションポリヌクレオチド結合タンパク質を、50mMのHepes pH8.0、100mMの酢酸カリウム、1mMのEDTA中で、WO2015/110813A1（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される配列決定アダプタに、周囲温度で10分間結合させた。TMAD（SIGMA）を最終濃度の100μMまで添加し、34℃で1時間インキュベートした。10mMのATP、10mMのMgCl₂、及び0.5MのNaClを添加し、周囲温度で10分間インキュベートした。バリエーションポリヌクレオチド結合タンパク質に結合した配列決定アダプタを、Sera-Mag SpeedBeads（Thermo Scientific）を使用して精製した。これらは、バリエーション配列決定アダプタであった。

10

【0451】

対照配列決定アダプタ調製

WO2016/055777に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエーションを、バリエーション位置の各々についての対照として使用した。上記のように、対照ポリヌクレオチド結合タンパク質を精製し、配列決定アダプタにロードした。対照ポリヌクレオチド結合タンパク質に結合した配列決定アダプタを、アニオン交換カラム上で、又はSera-Mag SpeedBeads（Thermo Scientific）を使用して精製した。これらは、対照配列決定アダプタであった。

20

【0452】

ライブラリ調製

バリエーション配列決定アダプタ及び対照配列決定アダプタを、バーコード化された3.6kbの分析物にライゲーションし、各バリエーションを異なるバーコードにライゲーションし、各対照を異なるバーコードにライゲーションした。バリエーションライブラリ及び対照ライブラリをプールした。プールされたライブラリを配列決定のために調製し、製造元のガイドライン（Oxford Nanopore Technologies）に従ってMinIONフローセル上で実行した。最大6個のバリエーションを、それらの対照を用いて単一のMinIONフローセル上で実行し、この対照は、内部フローセル対照であった。

30

【0453】

電氣的測定値

FLO-MIN106 MinIONフローセル及びGridION（Oxford Nanopore Technologies）で電氣的測定値を取得した。標準的な配列決定スクリプトを実行し、生データを、MinKNOWソフトウェア（Oxford Nanopore Technologies）を使用してバルクFAST5ファイルに収集した。

40

【0454】

データ分析

DNAライブラリは、Guppy（Oxford Nanopore Technologies）からの標準的なベースコーリングアルゴリズムを使用して配列決定した。配列決定された読み取りを、Guppy（Oxford Nanopore Technologies）を使用して脱多重化した。各バリエーション及び対照について500以上の読み取りを3.6kbの分析物参照配列にマッピングした。速度及び正規化された速度分布デルタは、実施例1に記載したように計算した。

50

【表 2 5】

バリエーション位置	バリエーション AA	速度 Δ
177	D	3.07
177	E	58.70
177	F	-33.41
177	G	-27.62
177	H	10.64
177	I	42.98
177	L	51.39
177	M	48.31
177	N	2.40
177	Q	59.68
177	R	21.69
177	S	-31.10
177	T	22.62
177	V	-16.00
177	W	-23.42
177	Y	-43.93

10

20

表 1 3 . 速度 Δ は、位置 1 7 7 でのバリエーションと内部フローセル対照との間の速度の中央値 (b p s) の差である。

【表 2 6】

バリエーション位置	バリエーション AA	速度 Δ
114	A	13.80
114	G	-11.30
114	I	93.69
114	L	-42.01
114	M	81.76
114	P	84.49
114	S	-7.28
114	T	-35.67
114	V	26.04

30

表 1 4 . 速度 Δ は、位置 1 1 4 でのバリエーションと内部フローセル対照との間の速度の中央値 (b p s) の差である。

【表 2 7】

バリエーション位置	バリエーション AA	速度 Δ
358	E	-53.89
358	I	-40.19
358	L	-42.66
358	M	-48.58

40

表 1 5 . 速度 Δ は、位置 3 5 8 でのバリエーションと内部フローセル対照との間の速度の中央値 (b p s) の差である。

50

【表 2 8】

バリエント位置	バリエント AA	精度 Δ
177	F	-0.08
177	H	-0.2
177	I	-0.14
177	L	-0.08
177	M	-0.09
177	N	-0.66
177	W	-0.46

10

表 1 6 . 精度 Δ は、1 7 7 位でのバリエントと内部フローセル対照との間の精度の中央値（％）の差である。

【表 2 9】

バリエント位置	バリエント AA	精度 Δ
114	G	0.13
114	I	-0.76
114	P	-0.70

20

表 1 7 . 精度 Δ は、1 1 4 位でのバリエントと内部フローセル対照との間の精度の中央値（％）の差である。

【表 3 0】

バリエント位置	バリエント AA	精度 Δ
358	I	0.96
358	M	0.94

表 1 8 . 精度 Δ は、3 5 8 位でのバリエントと内部フローセル対照との間の精度の中央値（％）の差である。

30

【表 3 1】

バリエント位置	バリエント AA	正規化された 速度分布 Δ
177	F	-8.19
177	H	-5.38
177	I	-4.87
177	L	-4.44
177	M	-1.06
177	N	0.85
177	W	-4.42

40

表 1 9 . 正規化された速度分布 Δ は、1 7 7 位でのバリエントと内部フローセル対照との間の正規化された速度分布の差である。

50

【表 3 2】

バリエント位置	バリエント AA	正規化された速度分布 Δ
114	G	-4.99
114	I	-8.23
114	P	-7.45

表 2 0 . 正規化された速度分布 Δ は、1 1 4 位でのバリエントと内部フローセル対照との間の正規化された速度分布の差である。

10

【表 3 3】

バリエント位置	バリエント AA	正規化された速度分布 Δ
358	I	-0.86
358	M	0.45

表 2 1 . 正規化された速度分布 Δ は、3 5 8 位でのバリエントと内部フローセル対照との間の正規化された速度分布の差である。

20

【0 4 5 5】

実施例 3

この実施例は、WO 2 0 1 9 / 0 0 2 8 9 3 に記載されるナノ細孔を使用して、ポリヌクレオチドの移動を制御する対照バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質に対して、ポリヌクレオチドの移動を制御するバリエントポリヌクレオチド結合タンパク質の速度及び精度特性を比較する方法を記載する。

【0 4 5 6】

バーコード化された 3 . 6 k b の分析物調製

3 . 6 k b の二本鎖 DNA 分析物を、特異的プライマー及び PCR を使用して調製した。PCR 産物を、NEB Next 末端修復及び NEB Next d A -テーリングモジュール (New England Biolabs (NEB)) に供し、3 ' d A オーバーハングを生成した。製造元のガイドラインに従って、EXP-PBC001 (Oxford Nanopore Technologies) を使用して分析物にバーコードを導入した。

30

【0 4 5 7】

バリエント配列決定アダプタ調製

N 末端親和性及び溶解性タグを有する、WO 2 0 1 6 / 0 5 5 7 7 7 に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエントをコードする組換え発現ベクターを、化学的に能力のある E . coli 細胞に形質転換した。細胞を、抗生物質を含有する LB 寒天プレート上にプレーティングした。寒天プレートからのコロニーを LB 成長培地中に接種し、OD 0 . 4 0 0 ~ 0 . 8 0 0 に成長させて誘導し、次いで、1 8 °C で更に 1 6 時間成長させた。細胞を、リゾチーム、ベンゾナーゼ、及びプロテアーゼ阻害剤の存在下でバグバスター抽出試薬 (Merck 7 0 9 2 1) で溶解するか、又はベンゾナーゼ及びプロテアーゼ阻害剤の存在下での超音波処理によって溶解した。上清を、親和性クロマトグラフィーを使用して更に精製した。モル過剰の精製したバリエントポリヌクレオチド結合タンパク質を、5 0 mM の H e p e s pH 8 . 0、1 0 0 mM の酢酸カリウム、1 mM の E D T A 中で、WO 2 0 1 5 / 1 1 0 8 1 3 A 1 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載される配列決定 Y アダプタに、周囲温度で 1 0 分間結合させた。T M A D (S I G M A) を最終濃度の 1 0 0 μ M まで添加し、3 4 °C で 1 時間インキュベートした。1 0 mM の A T P、1 0 mM の M g C l ₂、及び 0 . 5 M の N a C l を添加し、周囲温度で 1 0 分間インキュベートした。バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質に結合し

40

50

た配列決定アダプタを、Sera-Mag SpeedBeads (Thermo Scientific) を使用して精製した。これらは、バリエント配列決定アダプタであった。

【0458】

対照配列決定アダプタ調製

WO2016/055777に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエントを、バリエント位置の各々についての対照として使用した。上記のように、対照ポリヌクレオチド結合タンパク質を精製し、配列決定アダプタにロードした。これらは、対照配列決定アダプタであった。

【0459】

ライブラリ調製

バリエント配列決定アダプタ及び対照配列決定アダプタを、バーコード化された3.6 kbの分析物にライゲーションし、各バリエントを異なるバーコードにライゲーションし、各対照を異なるバーコードにライゲーションした。バリエントライブラリ及び対照ライブラリをプールした。プールされたライブラリを配列決定のために調製し、製造元のガイドライン (Oxford Nanopore Technologies) に従ってMinIONフローセル上で実行した。最大6個のバリエントを、それらの対照を用いて単一のMinIONフローセル上で実行し、この対照は、内部フローセル対照であった。

【0460】

電氣的測定値

FLO-MIN112 MinIONフローセル及びGridION (Oxford Nanopore Technologies) で電氣的測定値を取得した。標準的な配列決定スクリプトを実行し、生データを、MinKNOWソフトウェア (Oxford Nanopore Technologies) を使用してバルクFAST5ファイルに収集した。

【0461】

データ分析

DNAライブラリは、Guppy (Oxford Nanopore Technologies) からの標準的なベースコーリングアルゴリズムを使用して配列決定した。配列決定された読み取りを、Guppy (Oxford Nanopore Technologies) を使用して脱多重化した。各バリエント及び対照について500以上の読み取りを3.6 kbの分析物参照配列にマッピングした。速度及び正規化された速度分布デルタは、実施例1に記載したように計算した。

10

20

30

40

50

【表 3 4】

バリエーション位置	バリエーション AA	速度 Δ
350	I	2.22
351	I	-9.76
351	Q	-5.61
354	A	11.26
354	Q	0.09
358	A	-0.99
358	E	-7.28
358	F	-10.93
358	I	-5.51
358	M	-11.75
358	S	1.60
361	I	21.60
361	Q	13.79

10

表 2 2 . 速度 Δ は、バリエーション位置と内部フローセル対照との間の速度の中央値 (b p s) の差である。

20

【表 3 5】

バリエーション位置	バリエーション AA	精度 Δ
350	I	-0.50
351	I	-3.36
351	Q	-0.89
354	A	-1.96
354	Q	-1.43
358	A	1.07
358	E	0.84
358	F	1.36
358	I	1.05
358	M	0.81
358	S	0.86
361	I	-4.62
361	Q	-1.81

30

表 2 3 . 精度 Δ は、バリエーション位置と内部フローセル対照との間の精度の中央値 (%) の差である。

40

50

【表 3 6】

バリエーション位置	バリエーション AA	正規化された速度分布 Δ
350	I	-0.52
351	I	2.25
351	Q	0.54
354	A	-0.44
354	Q	-0.53
358	A	-29.70
358	E	-26.60
358	F	0.73
358	I	-5.31
358	M	-0.56
358	S	-1.56
361	I	0.51
361	Q	0.07

10

表 2 4 . 正規化された速度分布 Δ は、バリエーション位置と内部フローセル対照との間の正規化された速度分布の差である。

20

【0 4 6 2】

実施例 4

この実施例は、バリエーションナノ細孔を使用して、ポリヌクレオチドの移動を制御する対照バリエーションポリヌクレオチド結合タンパク質に対して、ポリヌクレオチドの移動を制御するバリエーションポリヌクレオチド結合タンパク質の速度及び精度特性を比較する方法を記載する。

【0 4 6 3】

バーコード化された 3 . 6 k b の分析物調製

3 . 6 k b の二本鎖 DNA 分析物を、特異的プライマー及び PCR を使用して調製した。PCR 産物を、NEBNext 末端修復及び NEBNext dA-テリングモジュール (New England Biolabs (NEB)) に供し、3' dA オーバーハングを生成した。製造元のガイドラインに従って、EXP-PBC001 (Oxford Nanopore Technologies) を使用して分析物にバーコードを導入した。

30

【0 4 6 4】

バリエーションナノ細孔調製

WO2019002893 に記載されるように、バリエーションナノ細孔又は対照ナノ細孔をコードする組換え発現ベクターを、化学的に能力のある E. coli 細胞に形質転換した。構築物は、C 末端 Strep 親和性タグを含んだ。細胞を、選択のための適切な抗生物質を含有する LB 寒天プレート上にプレーティングした。寒天プレートからのコロニーを、抗生物質を有する LB 培地中に接種し、一晚成長させた後、自己誘導培地中に希釈し、18℃で 68 時間インキュベートした。細胞を遠心分離によって採取した後、溶解し、バグバスター (Merck 70921) 及び 0 . 1 % DDM 中で抽出した。上清を、親和性クロマトグラフィー、60℃で 30 分間の熱処理、及び SDS-PAGE によって判定したオリゴマーナノ細孔を選択するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製した。

40

【0 4 6 5】

CsgG-CsgF 複合体を、上記のように精製されたナノ細孔及び化学的に合成された CsgF ペプチドから調製した。ナノ細孔を、50mM の Tris、150mM の NaCl、2mM の EDTA、0 . 1 % SDS、0 . 1 % Brij 58、pH 7 . 0 を含む緩

50

衝液に緩衝液交換し、次いで、C s g Gモノマーに対して4倍モル過剰のペプチド中で25℃で1時間インキュベートした。60℃で15分間加熱して反応を停止させ、続いて遠心分離して任意の沈殿物を除去した。

【0466】

バリエーション配列決定アダプタ調製

N末端親和性及び溶解性タグを有する、WO2016/055777に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエーションをコードする組換え発現ベクターを、化学的に能力のあるE. coli細胞に形質転換した。細胞を、抗生物質を含有するLB寒天プレート上にプレATINGした。寒天プレートからのコロニーをLB成長培地中に接種し、OD 0.400~0.800に成長させて誘導し、次いで、18℃で更に16時間成長させた。細胞を、リゾチーム、ベンゾナーゼ、及びプロテアーゼ阻害剤の存在下でバグバスター抽出試薬(Merck 70921)で溶解するか、又はベンゾナーゼ及びプロテアーゼ阻害剤の存在下での超音波処理によって溶解した。上清を、親和性クロマトグラフィーを使用して更に精製した。モル過剰の精製したバリエーションポリヌクレオチド結合タンパク質を、50mMのHepes pH8.0、100mMの酢酸カリウム、1mMのEDTA中で、WO2015/110813(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示される配列決定Yアダプタに、周囲温度で10分間結合させた。TMAD(SIGMA)を最終濃度の100μMまで添加し、34℃で1時間インキュベートした。10mMのATP、10mMのMgCl₂、及び0.5MのNaClを添加し、周囲温度で10分間インキュベートした。バリエーションポリヌクレオチド結合タンパク質に結合した配列決定アダプタを、Sera-Mag SpeedBeads(Thermo Scientific)を使用して精製した。これらは、バリエーション配列決定アダプタであった。

【0467】

対照配列決定アダプタ調製

WO2016/055777に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエーションを、バリエーション位置の各々についての対照として使用した。上記のように、対照ポリヌクレオチド結合タンパク質を精製し、配列決定アダプタにロードした。対照ポリヌクレオチド結合タンパク質に結合した配列決定アダプタを、アニオン交換カラム上で、又はSera-Mag SpeedBeads(Thermo Scientific)を使用して精製した。これらは、対照配列決定アダプタであった。

【0468】

ライブラリ調製

バリエーション配列決定アダプタ及び対照配列決定アダプタを、バーコード化された3.6kbの分析物にライゲーションし、各バリエーションを異なるバーコードにライゲーションし、各対照を異なるバーコードにライゲーションした。バリエーションライブラリ及び対照ライブラリをプールした。プールされたライブラリを配列決定のために調製し、製造元のガイドライン(Oxford Nanopore Technologies)に従ってMinIONフローセル上で実行した。最大6個のバリエーションを、それらの対照を用いて単一のMinIONフローセル上で実行し、この対照は、内部フローセル対照であった。

【0469】

電氣的測定値

MinIONフローセルに挿入したナノ細孔から電氣的測定値を取得した。単一の細孔を各チャンネル内のブロックコポリマー膜に挿入した後、25mMのリン酸カリウム、150mMのフェロシアン化カリウム(II)、150mMのフェリシアン化カリウム(III)、pH8.0を含む1mLの緩衝液を、システムに通して流して任意の過剰なタンパク質ナノ細孔を除去した。

【0470】

標準的な配列決定スクリプトを実行し、生データを、MinKNOWソフトウェア(Oxford Nanopore Technologies)を使用してバルクFAST5ファイルに収集した。

【 0 4 7 1 】

データ分析

DNAライブラリは、Guppy (Oxford Nanopore Technologies) からの標準的なベースコーリングアルゴリズムを使用して配列決定した。各ナノ細孔バリエントについて145以上の読み取りを3.6 kbの分析物参照配列にマッピングした。速度及び正規化された速度分布デルタは、実施例1に記載したように計算した。

【表 3 7】

ナノ細孔バリエント位置	ナノ細孔バリエントAA	バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質位置	バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質バリエントAA	速度 Δ
100	A	350	I	-0.75
100	A	351	I	-11.90
100	A	351	Q	-3.05
100	A	354	A	-3.11
100	A	354	Q	-4.27
100	A	358	I	-9.09
100	A	361	I	8.41
100	A	361	Q	1.36
102	A	350	I	-7.29
102	A	350	S	1.75
102	A	351	I	-12.19
102	A	351	Q	-8.71
102	A	354	A	7.82
102	A	354	Q	1.54
102	A	358	I	-8.99
102	A	358	L	-5.86
102	A	358	Q	-1.89
102	A	361	I	14.99
102	A	361	Q	8.76
102	S	350	I	4.49
102	S	351	I	-9.90
102	S	351	Q	-6.19
102	S	354	A	7.74
102	S	354	Q	3.20
102	S	358	I	-12.91
102	S	361	I	13.93
102	S	361	Q	7.43

表 2 5 . 速度 Δ は、バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質とバリエントナノ細孔上の内部フローセル対照との間の速度の中央値 (bps) の差である。

10

20

30

40

50

【表 3 8】

ナノ細孔 バリエント 位置	ナノ細孔 バリエント AA	バリエント ポリヌクレオチド 結合タンパク質 位置	バリエント ポリヌクレオチド 結合タンパク質 バリエント AA	精度 Δ
100	A	350	I	-0.03
100	A	351	I	-2.65
100	A	351	Q	-1.32
100	A	354	A	-1.06
100	A	354	Q	-1.24
100	A	358	I	0.89
100	A	361	I	-2.99
100	A	361	Q	-1.73
102	A	350	I	-0.81
102	A	350	S	-0.34
102	A	351	I	-4.42
102	A	351	Q	-1.60
102	A	354	A	-3.22
102	A	354	Q	-1.59
102	A	358	I	1.00
102	A	358	L	0.97
102	A	358	Q	0.94
102	A	361	I	-4.12
102	A	361	Q	-2.47
102	S	350	I	-0.36
102	S	351	I	-4.40
102	S	351	Q	-1.24
102	S	354	A	-2.33
102	S	354	Q	-1.43
102	S	358	I	1.17
102	S	361	I	-4.00
102	S	361	Q	-1.93

表 2 6 . 精度 Δ は、バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質とバリエントナノ細孔上の内部フローセル対照との間の精度の中央値（％）の差である。

10

20

30

40

50

【表 3 9】

ナノ細孔 バリエント 位置	ナノ細孔 バリエント AA	バリエント ポリヌクレオチド 結合タンパク質 位置	バリエント ポリヌクレオチド 結合タンパク質 バリエント AA	正規化 された 速度分布 Δ
100	A	350	I	0.27
100	A	351	I	1.96
100	A	351	Q	0.57
100	A	354	A	0.54
100	A	354	Q	0.75
100	A	358	I	0.30
100	A	361	I	0.32
100	A	361	Q	0.35
102	A	350	I	3.65
102	A	350	S	1.25
102	A	351	I	2.25
102	A	351	Q	1.29
102	A	354	A	0.17
102	A	354	Q	-0.04
102	A	358	I	0.67
102	A	358	L	0.82
102	A	358	Q	1.35
102	A	361	I	1.04
102	A	361	Q	0.75
102	S	350	I	-0.05
102	S	351	I	2.78
102	S	351	Q	1.41
102	S	354	A	-0.11
102	S	354	Q	0.04
102	S	358	I	-0.55
102	S	361	I	1.05
102	S	361	Q	0.96

10

20

30

表 2 7 . 正規化された速度分布 Δ は、バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質とバリエントナノ細孔上の内部フローセル対照との間の正規化された速度分布の差である。

【 0 4 7 2 】

実施例 5

この実施例は、ナノ細孔を使用して、ポリヌクレオチドの移動を制御する対照バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質に対して、ポリヌクレオチドの移動を制御するバリエントポリヌクレオチド結合タンパク質の速度及び精度特性を比較する方法を記載する。

40

【 0 4 7 3 】

バーコード化された 3 . 6 k b の分析物調製

3 . 6 k b の二本鎖 DNA 分析物を、特異的プライマー及び PCR を使用して調製した。PCR 産物を、NEBNext 末端修復及び NEBNext dA-テレーリングモジュール (New England Biolabs (NEB)) に供し、3' dA オーバーハングを生成した。製造元のガイドラインに従って、EXP-PBC001 (Oxford Nanopore Technologies) を使用して分析物にバーコードを導入した。

50

【0474】

ナノ細孔調製

ナノ細孔を、実施例4に記載したように調製した。

【0475】

バリエント配列決定アダプタ調製

N末端親和性及び溶解性タグを有する、WO2016/055777に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエントをコードする組換え発現ベクターを、化学的に能力のあるE. coli細胞に形質転換した。細胞を、抗生物質を含有するLB寒天プレート上にプレATINGした。寒天プレートからのコロニーをLB成長培地中に接種し、OD 0.400~0.800に成長させて誘導し、次いで、18℃で更に16時間成長させた。細胞を、リゾチーム、ベンゾナーゼ、及びプロテアーゼ阻害剤の存在下でバグバスター抽出試薬(Merck 70921)で溶解した。上清を、親和性クロマトグラフィーを使用して更に精製した。バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質を、1×Buffer BXT(IBM Lifesciences GmbH)中で、WO2015/110813A1(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される配列決定Yアダプタに、周囲温度で10分間結合させた。TMAD(SIGMA)を最終濃度の100µMまで添加し、34℃で1時間インキュベートした。10mMのATP、10mMのMgCl₂、及び0.5MのNaClを添加し、周囲温度で10分間インキュベートした。バリエントポリヌクレオチド結合タンパク質に結合した配列決定アダプタを、Sera-Mag SpeedBeads(Thermo Scientific)を使用して精製した。これらは、バリエント配列決定アダプタであった。

【0476】

対照配列決定アダプタ調製

WO2016/055777に記載されるポリヌクレオチド結合タンパク質のバリエントを、バリエント位置の各々についての対照として使用した。上記のように、対照ポリヌクレオチド結合タンパク質を精製し、配列決定アダプタにロードした。これらは、対照配列決定アダプタであった

【0477】

ライブラリ調製

バリエント配列決定アダプタ及び対照配列決定アダプタを、バーコード化された3.6kbの分析物にライゲーションし、各バリエントを異なるバーコードにライゲーションし、各対照を異なるバーコードにライゲーションした。バリエントライブラリ及び対照ライブラリをプールした。プールされたライブラリを配列決定のために調製し、製造元のガイドライン(Oxford Nanopore Technologies)に従ってMinIONフローセル上で実行した。最大46個のバリエントを、それらの対照を用いて単一のPromethIONフローセル上で実行し、この対照は、内部フローセル対照であった。ライブラリ当たり少なくとも2つのフローセルを実行した。

【0478】

電氣的測定値

PromethIONフローセルに挿入したナノ細孔から電氣的測定値を取得した。単一の細孔を各チャンネル内のブロックコポリマー膜に挿入した後、25mMのリン酸カリウム、150mMのフェロシアン化カリウム(II)、150mMのフェリシアン化カリウム(III)、pH8.0を含む1mLの緩衝液を、システムに通して流して任意の過剰なタンパク質ナノ細孔を除去した。

【0479】

標準的な配列決定スクリプトを実行し、生データを、MinKNOWソフトウェア(Oxford Nanopore Technologies)を使用してバルクFAST5ファイルに収集した。

【0480】

データ分析

DNAライブラリは、Guppy (Oxford Nanopore Technologies) からの標準的なベースコーリングアルゴリズムを使用して配列決定した。配列決定された読み取りを、Guppy (Oxford Nanopore Technologies) を使用して脱多重化した。各バリエント及び対照について20,000以上の読み取りを3.6 kbの分析物参照配列にマッピングした。速度及び正規化された速度分布デルタは、実施例1に記載したように計算した。

【表40】

バリエント位置	バリエント AA	速度 Δ
55	K	8.29
156	F	13.84
210	K	0.52
221	E	4.37
350	E	6.06

10

20

表28．速度 Δ は、バリエント位置と内部フローセル対照との間の速度の中央値 (bps) の差である。

【表41】

バリエント位置	バリエント AA	精度 Δ
55	K	0.15
156	F	0.26
210	K	0.45
221	E	0.23
350	E	0.48

30

表29．精度 Δ は、バリエント位置と内部フローセル対照との間の精度の中央値 (%) の差である。

40

50

【表 4 2】

バリエント 位置	バリエント AA	正規化された 速度分布 Δ
55	K	-0.20
156	F	-0.67
210	K	-0.85
221	E	-0.94
350	E	-1.02

10

表 3 0 . 正規化された速度分布 Δ は、バリエント位置と内部フローセル対照との間の正規化された速度分布の差である。

【配列表】

2025512895000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059821

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **C12N9/14 C07K14/35 C12Q1/6869 G01N33/487 C07K14/245**
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C12R C07K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/055981 A2 (OXFORD NANOPORE TECH LTD [GB]) 23 April 2015 (2015-04-23) SEQ ID NOs: 8 and 14; Tables 1 and 2; pg.2,ln.7 to pg.3,ln.23; pg. 26,ln.29 to pg.27,ln.15; pg.27,ln.29-33; pg.32,ln.19 to pn.34,ln.9; pg.67,ln.17-18; pg.73,ln.17-25; pg.74;ln.18-20; pg.89,ln.9-13; pg.89,ln.33 to pg.90,ln.2; pg.90,ln.6-10 and ln.20-27; pg.91,ln.11-12; Example 4; claims 3, and 32-69 ----- -/--	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 2024

Date of mailing of the international search report

26/02/2024

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benzerari, Maëlis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059821

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/203267 A1 (OXFORD NANOPORE TECH LTD [GB]) 30 November 2017 (2017-11-30)	1-38, 49, 50, 53, 55, 58, 60, 61
Y	SEQ ID NOs: 97 to 112 and 114; pg.5, ln.27-29; pg.47, ln.1 to pg.50, ln.31; pg.55, ln.18-30; pg.56, ln.26 to pg.58, ln.33; pg.59, ln.25-30; pg.68, ln.32 to pg.69, ln.7; pg.69, ln.17-31; pg.73, ln.3-11; pg.81, ln.24-31; pg.82, ln.17-23 and ln.24-29; pg.82, ln.32 to pg.83, ln.6; pg.83, ln.7-31; pg.85, ln.6-26; claims 21-24 -----	51, 52
X	WO 2016/055777 A2 (OXFORD NANOPORE TECH LTD [GB]) 14 April 2016 (2016-04-14)	1-38, 49, 50, 53, 55, 58, 60, 61
Y	SEQ ID NO: 8; pg.2, ln.8 to pg.3, ln.9; pg.32, ln.31 to pg.33, ln.17; pg.38, ln.18 to pg.40, ln.8; pg.52-56; pg.71-79; pg.89, ln.19-20; pg.93-105; pg.100-101; pg.104-105; Example 1; claims 25 to 56 -----	51, 52
X	WO 2016/034591 A2 (VIB VZW [BE]; UNIV BRUXELLES [BE] ET AL.) 10 March 2016 (2016-03-10)	1-38, 49, 50, 53, 55, 58, 60, 61
Y	SEQ ID NO: 390; pg.5, ln.19-29 -----	51, 52
A	KAROUIA FATHI ET AL: "Toward biotechnology in space: High-throughput instruments forin situbiological research beyond Earth", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 35, no. 7, 19 April 2017 (2017-04-19), pages 905-932, XP085194794, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2017.04.003 section "4.1.3 MinION DNA sequencer" starting on page 915 until page 916 -----	1-63
X	WO 2019/002893 A1 (VIB VZW [BE]; UNIV BRUSSEL VRIJE [BE]; OXFORD NANOPORE TECH LTD [GB]) 3 January 2019 (2019-01-03) pg.22, ln.22 to pg.25, ln.29; pg.32, ln.20 to pg.51, ln.7; pg.60, ln.30 to pg.63, ln.12; pg.63, ln.13 to pg.67, ln.29; pg.67, ln.31 to pg.68, ln.16; claims 1-61 ----- -/--	38-57, 59, 61-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059821

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/211241 A1 (OXFORD NANOPORE TECH LTD [GB]; VIB VZW [BE]; UNIV BRUSSEL VRIJE [BE]) 22 November 2018 (2018-11-22) pg.3,ln.1-17; pg.3,ln.29 to pg.4,ln.10; pg.16,ln.29 to pg.28,ln.18; pg.42,ln.15 to pg.46,ln.18; pg.67,ln.10 to pg.72,ln.8; pg.95,ln.28 to pg.97,ln.22; claims 1-56; pg.46,ln.20 to pg.49,ln.21, pg.52,ln.19 to pg.63,ln.8 -----	38, 42-45, 48-50, 53-63
X	WO 2017/149316 A1 (OXFORD NANOPORE TECH LTD [GB]) 8 September 2017 (2017-09-08) claims 1 to 47; pg.13,ln.26 to pg.50,ln.17; pg.63,ln.33 to pg.68,ln.32; pg.80,ln.4 to pg.92,ln.3; pg.114,ln.1 to pg.116,ln.9; Examples 1-11 -----	38, 42-45, 48-50, 53-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/059821

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/059821**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2023/059821

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-37(completely); 49-53, 55, 58, 60, 61(partially)

a modified DNA dependent ATPase (Dda) helicase, wherein the helicase comprises a modification or substitution at one or more of the positions corresponding to amino acid positions 55, 114, 156, 177, 210, 221, 350, and 358 in Dda 1993.

2. claims: 38-48, 54, 56, 57, 59, 62, 63(completely); 49-53, 55, 58, 60, 61(partially)

an isolated CsgG pore or a homologue or mutant thereof, or an isolated pore complex comprising a CsgG pore, or a homologue or mutant thereof, and a modified CsgF peptide, or a homologue or mutant thereof, wherein the CsgG pore comprises at least one monomer comprising a modification at one or more of positions W97, Q100, E101, N102, and T104 in SEQ ID NO: 117.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/059821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015055981 A2	23-04-2015	AU 2014335915 A1	12-05-2016
		CA 2927726 A1	23-04-2015
		CN 105899678 A	24-08-2016
		CN 117264925 A	22-12-2023
		EP 3058088 A2	24-08-2016
		EP 3575410 A2	04-12-2019
		JP 6677640 B2	08-04-2020
		JP 2016538835 A	15-12-2016
		US 2016257942 A1	08-09-2016
		US 2021009971 A1	14-01-2021
		US 2023212535 A1	06-07-2023
		WO 2015055981 A2	23-04-2015
WO 2017203267 A1	30-11-2017	CN 109219665 A	15-01-2019
		EP 3464615 A1	10-04-2019
		US 2019194722 A1	27-06-2019
		US 2023374567 A1	23-11-2023
		WO 2017203267 A1	30-11-2017
WO 2016055777 A2	14-04-2016	CN 107109380 A	29-08-2017
		CN 116622671 A	22-08-2023
		CN 117089536 A	21-11-2023
		EP 3204406 A2	16-08-2017
		EP 4108679 A1	28-12-2022
		JP 6843042 B2	17-03-2021
		JP 2017535256 A	30-11-2017
		KR 20170063889 A	08-06-2017
		US 2018179500 A1	28-06-2018
		US 2022135956 A1	05-05-2022
		WO 2016055777 A2	14-04-2016
WO 2016034591 A2	10-03-2016	AU 2015310913 A1	16-03-2017
		CA 2959220 A1	10-03-2016
		CN 107207570 A	26-09-2017
		CN 114605507 A	10-06-2022
		CN 117164682 A	05-12-2023
		CN 117164683 A	05-12-2023
		CN 117164684 A	05-12-2023
		EP 3224274 A2	04-10-2017
		EP 4053150 A1	07-09-2022
		JP 7161291 B2	26-10-2022
		JP 2017527284 A	21-09-2017
		JP 2021078500 A	27-05-2021
		JP 2022177005 A	30-11-2022
		KR 20170042794 A	19-04-2017
		KR 20230125853 A	29-08-2023
		US 2017283470 A1	05-10-2017
		US 2020017556 A1	16-01-2020
		US 2021292376 A1	23-09-2021
		WO 2016034591 A2	10-03-2016
WO 2019002893 A1	03-01-2019	AU 2018294660 A1	16-01-2020
		CA 3066715 A1	03-01-2019
		CN 110914290 A	24-03-2020
		CN 117106037 A	24-11-2023
		CN 117106038 A	24-11-2023
		EP 3645552 A1	06-05-2020
		EP 4273156 A2	08-11-2023

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/059821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 7282697 B2	29-05-2023
		JP 2020530276 A	22-10-2020
		JP 2023113692 A	16-08-2023
		KR 20200030070 A	19-03-2020
		SG 11201913174P A	30-01-2020
		US 2021147486 A1	20-05-2021
		US 2021284696 A1	16-09-2021
		US 2023079731 A1	16-03-2023
		WO 2019002893 A1	03-01-2019

WO 2018211241 A1	22-11-2018	AU 2018270075 A1	21-11-2019
		CA 3062111 A1	22-11-2018
		CN 110621692 A	27-12-2019
		EP 3619224 A1	11-03-2020
		EP 3892627 A1	13-10-2021
		US 2021147490 A1	20-05-2021
		WO 2018211241 A1	22-11-2018

WO 2017149316 A1	08-09-2017	AU 2017225374 A1	06-09-2018
		AU 2017225375 A1	06-09-2018
		AU 2017225376 A1	13-09-2018
		CA 3016240 A1	08-09-2017
		CA 3016243 A1	08-09-2017
		CA 3016245 A1	08-09-2017
		CN 108699138 A	23-10-2018
		CN 108779170 A	09-11-2018
		CN 108884150 A	23-11-2018
		CN 115976176 A	18-04-2023
		CN 116200476 A	02-06-2023
		CN 116356000 A	30-06-2023
		CN 116496364 A	28-07-2023
		EP 3423485 A1	09-01-2019
		EP 3423486 A1	09-01-2019
		EP 3423487 A1	09-01-2019
		EP 4015531 A2	22-06-2022
		EP 4019542 A1	29-06-2022
		EP 4019543 A1	29-06-2022
		JP 6776366 B2	28-10-2020
		JP 6799072 B2	09-12-2020
		JP 6874017 B2	19-05-2021
		JP 2019511217 A	25-04-2019
		JP 2019516344 A	20-06-2019
		JP 2019516346 A	20-06-2019
		KR 20180104746 A	21-09-2018
		KR 20180104747 A	21-09-2018
		KR 20180104752 A	21-09-2018
		US 2019071721 A1	07-03-2019
		US 2019300582 A1	03-10-2019
		US 2019330282 A1	31-10-2019
		US 2021269872 A1	02-09-2021
		US 2021317520 A1	14-10-2021
		US 2022119879 A1	21-04-2022
		US 2023295715 A1	21-09-2023
		WO 2017149316 A1	08-09-2017
		WO 2017149317 A1	08-09-2017
		WO 2017149318 A1	08-09-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/00 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/6869(2018.01)
 C 1 2 M 1/34 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)
 G 0 1 N 21/64 (2006.01)
 G 0 1 N 27/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/00 C
 C 1 2 Q 1/6869 Z
 C 1 2 M 1/34 E
 C 1 2 M 1/34 Z
 C 1 2 M 1/00 A
 G 0 1 N 21/64 F
 G 0 1 N 27/00 Z

4 B 0 6 5

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
 ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
 O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
 R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW
 ,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL
 ,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B R I J

オード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォード・サイエンス・パーク・ゴスリング・
 ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ・ピーエルシー

(72)発明者

マーク・ジョン・ブルース

イギリス・OX 4・4 D Q・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォ
 ード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジ
 ーズ・ピーエルシー

(72)発明者

エリザベス・ジェイン・ウォーレス

イギリス・OX 4・4 D Q・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォ
 ード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジ
 ーズ・ピーエルシー

(72)発明者

ポール・リチャード・ムーディ

イギリス・OX 4・4 D Q・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォ
 ード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジ
 ーズ・ピーエルシー

(72)発明者

フランシス・ブルサ

イギリス・OX 4・4 D Q・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォ
 ード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジ
 ーズ・ピーエルシー

(72)発明者

デイヴィッド・クリストファー・ページ

イギリス・OX 4・4 D Q・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォ
 ード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジ
 ーズ・ピーエルシー

(72)発明者

マジド・モサエビ

イギリス・OX 4・4 D Q・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォ
 ード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジ
 ーズ・ピーエルシー

(72)発明者

アンドリュー・ジョン・ヘロン

イギリス・OX 4・4 D Q・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォ
 ード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジ
 ーズ・ピーエルシー

(72)発明者

アルベルト・リエラ

イギリス・OX4・4DQ・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ・ピーエルシー

(72)発明者 クリストファー・ピーター・ユード

イギリス・OX4・4DQ・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ・ピーエルシー

(72)発明者 リチャード・チャールズ・フォスター

イギリス・OX4・4DQ・オックスフォード・エドモンド・ハーレイ・ロード・オックスフォード・サイエンス・パーク・ゴスリング・ビルディング・オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ・ピーエルシー

F ターム (参考)

2G043 AA04 BA16 DA02 EA01

2G060 AA15 AD06 AF06 AF20

4B029 AA07 AA08 BB16 BB20 FA09 FA15 GA08 GB09 GB10

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QQ67 QQ79 QR10 QS39 QS40

QX02 QX04 QX10

4B064 AG01 CA19 CC24 CE10 CE12 DA13 DA20

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA31 CA46 CA60