

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4832694号
(P4832694)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月30日(2011.9.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	9/12	(2006.01)	C 12 N	9/12	
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	

請求項の数 10 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-565862 (P2001-565862)
(86) (22) 出願日	平成13年3月1日 (2001.3.1)
(65) 公表番号	特表2003-525627 (P2003-525627A)
(43) 公表日	平成15年9月2日 (2003.9.2)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2001/002327
(87) 國際公開番号	W02001/066705
(87) 國際公開日	平成13年9月13日 (2001.9.13)
審査請求日	平成20年2月22日 (2008.2.22)
(31) 優先権主張番号	00200787.0
(32) 優先日	平成12年3月7日 (2000.3.7)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者	394010986 アクゾ・ノベル・エヌ・ペー オランダ国、6824・ペー・エム・アーネム、フエルペルウエヒ・76
(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(72) 発明者	杉山 明生 福井県敦賀市東洋町 10-24
(72) 発明者	西矢 芳昭 福井県敦賀市金山 77-4-36
(72) 発明者	川上 文清 福井県福井市松本 2-26-25

審査官 神谷 昌男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】増加した熱安定性を有する RNA ポリメラーゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 に記載の野生型配列と比較した場合に変異している T 7 RNA ポリメラーゼであって、該変異は S 4 3 0 P、F 8 4 9 I および F 8 8 0 Y からなる群から選択される変異の少なくとも 1 つを含み、前記 T 7 RNA ポリメラーゼはまた、該 T 7 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列の 6 3 3 位でセリンからプロリンへのアミノ酸変化を有するという点で少なくとも変異している、前記 T 7 RNA ポリメラーゼ。

【請求項 2】

変異が、前記群から選択される 2 個以上の変異を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の T 7 RNA ポリメラーゼ。

10

【請求項 3】

少なくとも S 6 3 3 P 変異、F 8 4 9 I 変異および F 8 8 0 Y 変異を含む、請求項 1 に記載の T 7 RNA ポリメラーゼ。

【請求項 4】

S 4 3 0 P 変異、S 6 3 3 P 変異、F 8 4 9 I 変異および F 8 8 0 Y 変異を含む、請求項 3 に記載の T 7 RNA ポリメラーゼ。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の変異した T 7 RNA ポリメラーゼをコードしている、RNA ポリメラーゼをコードする遺伝子。

【請求項 6】

20

請求項 5 に記載の遺伝子と適当な発現調節配列とを含む発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターで形質転換されており、変異した R N A ポリメラーゼを発現することが可能な、形質転換細胞。

【請求項 8】

等温転写介在核酸增幅反応における、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の R N A ポリメラーゼの使用。

【請求項 9】

等温転写介在增幅反応において使用するための酵素混合物であって、

- 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の R N A ポリメラーゼ、
- 逆転写酵素活性を有する酵素、

を含む、前記酵素混合物。

【請求項 10】

等温転写介在增幅反応において使用するための酵素混合物であって、

- 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の R N A ポリメラーゼ、
- 逆転写酵素活性および R n a s e H 活性を有する酵素、

を含む、前記酵素混合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、例えば高温条件下で安定性が高まるバクテリオファージ由来の変異型 R N A ポリメラーゼに関する。バクテリオファージによりコードされる R N A ポリメラーゼの一例は、T 7 R N A ポリメラーゼである。T 7 は、大腸菌に感染することができるバクテリオファージである。その他の大腸菌感染性 T 7 類似のバクテリオファージの例は、T 3、I、I I、W 3 1、H、Y、A 1、c r o C 2 1、C 2 2、及びC 2 3 である。サルモネラ・チフィムリウム (S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m) 感染性バクテリオファージの一例は、S P 6 である。バクテリオファージの R N A ポリメラーゼは、自己のプロモーター配列に対して高い選択性を有する。T 7 R N A ポリメラーゼは、T 7

R N A ポリメラーゼプロモーター配列とは結合するが、他のバクテリオファージのプロモーター配列とは結合しないであろう。高度のプロモーター特異性によって、バクテリオファージの転写反応は、自己のゲノムにのみ起こり、宿主のゲノムでは起こらないことが確実となる。T 7 バクテリオファージのヌクレオチド配列の完全長が既知であり、ファージ R N A ポリメラーゼは、T 7 遺伝子 1 によりコードされている。T 7 R N A ポリメラーゼと類似しているその他の R N A ポリメラーゼは、バクテリオファージ S P 6 及び T 3 の R N A ポリメラーゼである。T 3 R N A P は、T 7 R N A P との約 8 0 % の相同性を示す。T 7 遺伝子 1 は、クローニングされ、細菌において発現されており、酵素の大量生産が可能となっている (S t u d i e r らの米国特許第 4 9 5 2 4 9 6 号)。T 7 ポリメラーゼは、9 8 . 6 K d a という分子量を有する 8 8 3 アミノ酸の単鎖タンパク質である。T 7 R N A ポリメラーゼは、正確に転写されるため補助因子を必要としない。酵素は、単独で、そのプロモーターを認識し、転写を開始させ、R N A 転写物を伸長させ、転写を終結させることができる。T 7 R N A ポリメラーゼは、自己のプロモーターからの D N A の転写効率が極めて高く、大腸菌 R N A ポリメラーゼと比較して 5 倍の速度で R N A を伸長させる。バクテリオファージ由来のポリメラーゼは、その選択性、活性、及び完全な転写物生成能により、多様な目的に極めて有用である。

【0002】

本発明は、変異している T 7 様バクテリオファージの R N A ポリメラーゼに関する。

【0003】

T 7 様バクテリオファージ R N A ポリメラーゼの特定の変異体が、いくつか記載されている。例えば、W O 9 1 / 0 5 8 6 6 には、オルタナティブ発現系が記載されている。その系は、細菌においてクローニングされた遺伝子を直接転写させるため、バクテリオファージ T 7 プロモーターを使用しようという試みである。その系は、短縮型 T 7 R N A ポリメラーゼを用いており、T 7 ポリメラーゼの転写活性を向上させる目的である。

メラーゼを使用する。その遺伝子は、ヌクレオチド（野生型T7ポリメラーゼ遺伝子の塩基3809及び3877に相当する塩基1個以上）の欠失により変異している。この欠失は、フレームシフトを起こし、その結果、新たな翻訳終止コドンが作られる。米国特許第号5385834号にも、変異T7 RNA Pが記載されている。米国特許第5385834号に記載された変異体は、グルタミン酸(222)をリジンに変換する、T7遺伝子1のヌクレオチド664におけるGからAへの転位である。この変異体は、改変されたプロモーターを認識し、従って、変異体は、通常は不活性であるT7プロモーター点変異から転写を開始させることができる。

【0004】

I k e d a ら (I k e d a , R . A . et al . Biochemistry , 31 : 9 10
073 - 9080 , 1992 及び I k e d a , R . A . et al . Nucl . Acid . Res . , 20 : 2517 - 2524 , 1992) は、変異型 T7 RNA P 遺伝子配列又はプロモーター配列の活性をスクリーニングするために使用されうる 2 つの適合性プラスミドを記載している。第一のプラスミドは、大腸菌 tac プロモーターと連結した T7 遺伝子 1 (T7 RNA ポリメラーゼをコードする遺伝子) を保持しており、第二のプラスミドは、 C A T (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) をコードする遺伝子を保持している。 T7 ポリメラーゼが T7 プロモーターと相互作用し、第二のプラスミドから C A T 遺伝子を転写する場合、これらの 2 つのプラスミドを保持している大腸菌は、 C A M (クロラムフェニコール) 耐性である。 T7 プロモーター又は T7 RNA ポリメラーゼのいずれかが不活性である場合には、 C A T 遺伝子は転写されず、従って大腸菌は c a m 感受性であろう。 I k e d a らは、それらのプラスミドを使用して、いくつかの変異の T7 RNA ポリメラーゼプロモーターの活性に対する効果を調査した。 T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 1 が適当なプロモーターの調節下にある 1 つのプラスミド上にあり、 T7 RNA ポリメラーゼプロモーターが C A T のような耐性遺伝子を調節する第二のプラスミド上にある、 I k e d a らにより記載されたものと同様のプラスミド系を用いて、変異 T7 RNA ポリメラーゼの活性に関してスクリーニングすることも可能である。

【0005】

バクテリオファージによりコードされた RNA ポリメラーゼ (例えば、 T7 RNA ポリメラーゼ、 T3 RNA ポリメラーゼ、及び S P 6 RNA ポリメラーゼ) を利用したインビトロ転写は、分子生物学において広範に適用される手法となっている。インビトロ転写の後に、多量の RNA バクテリオファージを作製する手法としての RNA ポリメラーゼは核酸增幅法の一部である。そのような方法は、例えば N A S B A 、 3 S R 、及び T M A である。インビトロ転写は、 P C R 増幅後の付加的な長さの増幅工程として、 P C R との組み合わせても記載されている。

【0006】

前記の適用全てについて、転写反応の反応速度が改善され、より重要なこととして、より高温で等温增幅法 (N A S B A 、 3 S R 、及び T M A) が実施できるよう、反応温度を上昇させることができれば有利であろう。より高温でのインキュベーションで該等温增幅反応を行うと、構築された RNA がより効率よく增幅できる。このことは、長い RNA 配列が長い場合 (500 ヌクレオチド超) の增幅及び多重反応 (即ち、 1 つの反応混合物における複数の RNA 配列の增幅) の場合に重要となる。

【0007】

本発明は、安定性が向上した T7 様バクテリオファージ由来 RNA ポリメラーゼの変異体に関する。

【0008】

ランダムに変異誘発された T7 RNA ポリメラーゼ変異体の分析より、 T7 RNA ポリメラーゼタンパク質に対して安定効果を有し、通常 (通常は 37 から 41 である) よりも高温で酵素活性を可能にする、可能な変異が多数明らかとなった。バチルス・ステアロサーモフィルス (B a c i l l u s s t e a r o t h e r m o p h i l u s) におい 50

て、I k e d a ら(1 9 9 2)に記載された、2 プラスミド系でランダムに変異誘発されたT 7 RNAポリメラーゼ配列が、スクリーニングすることにより分析された。バチルス・ステアロサーモフィルスを高温(4 5 から 5 0)で培養すると、これらの温度において、変異型T 7 配列がポリメラーゼ活性を示し、より安定なT 7 RNAポリメラーゼをコードする場合にのみ、C A M耐性が得られた。バチルス・ステアロサーモフィルス系において、一方のプラスミドはT 7 プロモーターの調節下にある抗生物質耐性遺伝子(C A T)を含有し、他方のプラスミドはバチルスプロモーターの調節下にあるT 7 RNAポリメラーゼの変異体ライブラリーを含有する。変異によって、T 7 RNAポリメラーゼが高温において機能することが可能になった場合、バチルス・ステアロサーモフィルスはC A M耐性となるであろう。安定性が向上したT 7 ポリメラーゼ変異体は、同時係属中の共有の出願番号P C T / E P 9 9 / 0 9 7 1 6 に既に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。P C T / E P 9 9 / 0 9 7 1 6 に記載された変異のうちの一つは、酵素の6 3 3位におけるセリンからプロリンへの変異であった。本発明により、酵素の安定性を高めるさらなる変異が見出された。本発明に係る変異には、T 7 配列におけるF 8 4 9 I 变異、F 8 8 0 Y 变異、及びS 4 3 0 P 变異が含まれる。好ましいのは、これらの変異のうちの2個以上を、好ましくはS 6 3 3 P 变異と組み合わせて含む変異体である。本発明に係る変異体は、例えば、F 8 4 9 I 变異又はF 8 8 0 Y 变異と組み合わせてS 6 3 3 P 变異を含みうる。本発明に係るもう一つの変異体は、F 8 8 0 Y 变異と組み合わせてF 8 4 I 变異を含む。改良された安定性に関する良好な結果は、S 6 3 3 P 变異及びF 8 4 9 I 变異を含み、さらにF 8 8 0 Y 变異を含む変異体によっても得られた。本発明の最も好ましい実施態様は、S 4 3 0 P 变異とS 6 3 3 P 变異とF 8 4 9 I 变異とF 8 8 0 Y 变異とを含む四重変異体(4 個の変異を含む変異体)である。この変異体は、5 0 において、野生型酵素よりも少なくとも4 4 倍ほど熱安定性が高まる(野生型の1 . 9 分に対し8 4 . 5 分というT 1 / 2 を有する)。さらに、5 0 における四重変異体の比活性は、5 0 における野生型の比活性よりも約1 2 倍大きい(野生型の4 . 8 単位 / μ g に対し、変異体は5 6 . 8 単位 / μ g)。本発明に係る好ましい変異型RNAポリメラーゼは、T 7 又はS P 3 バクテリオファージ由来の変異RNAポリメラーゼである。これらの酵素間では相同性が高いので、T 7 遺伝子1配列での変異は、T 3 バクテリオファージの対応する遺伝子配列においても同一の効果を有する可能性が高い。T 7 RNAポリメラーゼとT 3 RNAポリメラーゼとの相同性は8 0 %であるため、T 7 遺伝子における6 3 3セリン プロリン変異と同一の効果が、T 3 RNAポリメラーゼにおける6 3 4セリン プロリンアミノ酸変異についても予想されうる。

【 0 0 0 9 】

特に、T 7 又はT 3 RNAポリメラーゼをコードしている遺伝子に関する場合は野生型タンパク質と比較するとコードされたRNAポリメラーゼの安定性を高める変異を1個以上含有するRNAポリメラーゼをコードする遺伝子も、本発明の一部である。T 7 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列の6 3 3位におけるセリンからプロリンへのタンパク質内アミノ酸変化は、T 7 RNAポリメラーゼヌクレオチド配列の1 8 9 7 位におけるT C 变異に起因している。バクテリオファージT 7 の完全ゲノム配列の3 1 7 1 番目のヌクレオチドであるT 7 RNAポリメラーゼ遺伝子の最初のヌクレオチドを1番として、D u n n , J . J . 及びS t u d i e r , F . W . [(1 9 8 3) C o m p l e t e n u c l e o t i d e s e q u e n c e o f b a c t e r i o p h a g e T 7 D N A a n d t h e l o c a t i o n s o f T 7 g e n e t i c e l e m e n t s J . M o l . B i o l . 1 6 6 (4) , 4 7 7 - 5 3 5] により発表されたT 7 RNAポリメラーゼ野生型配列(配列番号9)と比較して変異を、評価する。

【 0 0 1 0 】

本発明は、さらに、本発明に係る変異型RNAポリメラーゼの発現のための発現方法に関する。

【 0 0 1 1 】

遺伝子発現には、遺伝子を、該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を可能にする

制御配列の調節下に置く。通常、これは、発現させる遺伝子をそのような制御配列の下流にクローニングして実施される。遺伝子又は遺伝子断片の発現を可能にする制御配列は、例えば、エンハンサー配列と組み合わせてもよいし、又は組み合わせなくてもよいプロモーター配列でありうる。これらの配列は、その天然形態において遺伝子と連結されていることが見出されるプロモーター配列でありうる。又は、それは、異種プロモーターであってもよい。異種プロモーターを使用する利点は、遺伝子の天然プロモーターを認識しない宿主細胞において遺伝子を発現させることができることになる点である。さらに、異種プロモーターは、遺伝子の発現を任意の所望の時点で開始させることができるように、誘導可能プロモーターであってもよい。プロモーター部位は、転写の最初に、RNAポリメラーゼが結合する配列である。プロモーター部位は、それらの起源である細胞の型に応じて、多様な型で存在する。プロモーター配列は、原核生物、真核生物、及びウイルスの起源のプロモーターに関して記載されている。前記の型の組換えDNA分子は、例えば、適当なDNA断片を適当な制限酵素で切断し、制御配列を含有する断片を同酵素で切断し、そして発現させるべき核酸配列がプロモーター配列の調節下に置かれるよう、両断片を連結することにより作成されうる。有用な組換え体を作成するための多くの方法が、Sambrook (Sambrook et al., Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)) に記載されている。一般に、組換え核酸配列は、いわゆるベクター分子にクローニングされよう。次いで、クローニングされた核酸配列を細胞へと運ぶために、適当な宿主細胞において自己複製能を有する組換えベクター分子が使用されうる。これは、組換えベクター分子の複製が起こる細胞であり得る。それは、本発明に係る変異型RNAポリメラーゼが発現されるよう、ベクターの制御配列が認識されるような細胞であってもよい。細菌において使用するためのベクター、例えばpBR322、325、及び328、様々なpUCベクター、即ちpUC8、9、18、19、特異的発現ベクター；pGEM、pGEX、及びBluescript^(R)、バクテリオファージに基づくベクター；ラムダ-gtWes、Charon28、M13由来ファージ、SV40、パピローマウイルス、アデノウイルス、又はポリオーマウイルスに基づくウイルス配列を含有する真核細胞における発現のためのベクターを含む、広範囲のベクターが現在既知である (Rodríguez, R. L. 及び Denhardt, D. T. 編; Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Butterworths (1988), Lenstra et al. Arch. Virol. ; 110: 1-24 (1990))。変異型RNAポリメラーゼの発現を可能にする制御配列の調節下にある核酸配列を含む全ての組換え分子が、本発明の一部と見なされる。

【0012】

さらに、本発明は、変異型RNAポリメラーゼをコードする核酸配列、又は変異型RNAポリメラーゼの発現を可能にする制御配列の調節下にある変異型RNAポリメラーゼをコードする組換え核酸配列を含有する宿主細胞を含む。本発明は、変異型RNAポリメラーゼをコードする核酸配列、又は変異型RNAポリメラーゼの発現を可能にする制御配列の調節下にある変異型RNAポリメラーゼをコードする組換え核酸分子を含有するウイルスベクターを含有する宿主細胞も含む。高頻度に使用される発現系は、細菌、酵母、真菌、昆虫、及び哺乳動物の細胞の発現系である。そのような系は、当分野において周知であり、容易に入手可能であり、例えばClontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, USAより市販されている。宿主細胞は、pBR322のような細菌に基づくベクター、又はpGEMのような細菌発現ベクター、又はバクテリオファージと組み合わされた、細菌起源、例えば大腸菌、バチルス・ズブチリス、及びラクトバチルス属の細胞であり得る。宿主細胞は、真核生物起源の細胞、例えば酵母特異的ベクター分子と組み合わされた酵母細胞、又はベクターもしくは組換えバキュロウイルスと組み合わさ

10

20

30

40

50

れた昆虫細胞 (Luckow et al ; Bio - technology 6 : 47 - 55 (1988)) 、例えば Ti プラスミドに基づくベクターもしくは植物ウイルスベクターと組み合わされた植物細胞 (Barton , K . A . et al ; Cell 32 : 1033 (1983)) 、やはり適切なベクターもしくは組換えウイルスと組み合わされた HeLa 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 、もしくは Crandell 1 ネコ腎細胞のような哺乳動物細胞のような高等真核生物の細胞であってもよい。

【 0013 】

従って、本発明に係る RNA ポリメラーゼをコードする遺伝子と、適當な発現調節配列とを含む発現ベクター、及びそれらで形質転換された宿主細胞も、本発明の一部である。

【 0014 】

本発明に係る変異型 RNA ポリメラーゼは、 RNA ポリメラーゼが通常使用される過程、及び RNA ポリメラーゼが例えれば高温で使用され、従って改良された安定性が向上し有利であろう過程、全てにおいて有用である。本発明に係る変異型 RNA ポリメラーゼは、核酸の増幅のための等温転写介在増幅過程において特に有用であろう。従って、等温転写介在増幅法における RNA ポリメラーゼの使用も、本発明の一部である。

【 0015 】

転写介在増幅技術は、 RNA ポリメラーゼにより認識されるプロモーターを含む鑄型からの複数の RNA コピーの転写を含む。これらの方法によると、複数の RNA コピーが、 RNA ポリメラーゼにより認識される機能的プロモーターを含む DNA 鑄型から転写される。該コピーは、再び標的として使用され、それから、ある量の DNA 鑄型が新たに得られる、等である。そのような方法は、 Gingras らの WO 88 / 10315 及び Burg らの WO 89 / 1050 に記載されている。等温転写介在増幅技術は、 Davey らの EP 323822 (NASBA 法と関連) 、 Gingras らの EP 373960 、及び Kacian らの EP 408295 に記載されている。転写介在増幅反応は、熱安定酵素を用いても実施されうる。転写介在増幅は、通常、およそセ氏 37 から 41 度の温度で実施される。これらの熱安定酵素は、より高温 (41 超) での反応が可能である。そのような熱安定法は、 Toyobo Boseki KK の名称で出願された EP 682121 に記載されている。

【 0016 】

EP 323822 、 EP 373960 、及び EP 408295 に記載された方法は、等温連続法である。この方法は、増幅を達成するために、 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性、 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性、 RNase (H) 活性、及び RNA ポリメラーゼ活性という 4 つの酵素活性が必要とされる。これらの活性のうちのいくつかは、 1 つの酵素で一体化されうるため、通常必要なのは 2 又は 3 個の酵素である。 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素は、 RNA 鑄型から DNA を合成する酵素である。 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼは、 DNA 鑄型から DNA を合成する。転写介在増幅反応においては、 AMV (トリ筋芽細胞腫ウイルス) 又は MMLV (モロニーマウス白血病ウイルス) のような逆転写酵素が、これらの活性のため使用されうる。そのような酵素は、 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性及び DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性を有するが、内因性 RNase H 活性は有しない。さらに、大腸菌 RNase H のような RNase H が、転写介在増幅反応の反応混合物に添加されうる。

【 0017 】

転写介在増幅法において一般に使用される RNA ポリメラーゼは、 T7 RNA ポリメラーゼである。従って、複数の RNA コピーを転写するために使用される鑄型に組み込まれるプロモーターは、 T7 プロモーターであろう。通常、標的配列を含む核酸から、プロモーターを含む鑄型が作出されなければならない。該核酸は、増幅反応のために投入される出発材料中に存在しうる。出発材料中に存在する核酸は、通常、はるかに長い配列の一部に標的配列を含有するであろう。標的配列の 3' 末及び 5' 末の両方に、別の核酸配列が存在していてもよい。増幅反応は、出発材料由来のこの核酸と、前記活性を共同で提供する適切な酵素と、少なくとも 1 個、通常は 2 個のオリゴヌクレオチドとを混合することに

10

20

30

40

50

より開始する。これらのオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1個は、プロモーターの配列を含むべきである。

【0018】

転写介在增幅法は、インプット材料が一本鎖RNAである場合に特に有用であるが、一本鎖又は二本鎖のDNAも、インプット材料として使用されうる。転写介在增幅法が、標的配列の3'末及び5'末の両方に付加的な配列を含む（「プラス」方向の）一本鎖RNAを含む試料に対して実施される場合、先行技術に記載されたような方法により便利に使用されるオリゴヌクレオチド対は、

- 5'末にプロモーター（好ましくは、T7プロモーター）の配列が接着している、標的配列の3'末とハイブリダイズすることができる第一オリゴヌクレオチド（通常、「プロモーター-オリゴヌクレオチド」と呼ばれる）（このオリゴヌクレオチドのハイブリダイズする部分は、インプット材料として使用されるプラスRNAと反対の極性を有する）
、

- 標的配列の3'末を含む第二オリゴヌクレオチド（「プライマー」）（このオリゴヌクレオチドは、プラスRNAと同一の極性を有する）

からなるであろう。そのようなオリゴヌクレオチド対を、適切な活性を有する全ての酵素と、十分な量の必要なリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドと共に1つの反応混合物中に混合し、適切な条件下で（即ち、適切な緩衝条件下で、かつ適切な温度で）で十分な時間、保持した場合に、等温連続増幅反応が起こる。

【0019】

本発明に係るRNAポリメラーゼは、他の核酸増幅法と共に使用されてもよい。ポリメラーゼ連鎖反応では、バクテリオファージRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列、特にT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を組み込んでいるプライマーが使用される場合がある。これによって、PCR反応のDNA産物を生成するためのRNAの転写が可能となる。この場合にも、本発明に係るRNAポリメラーゼが適用されうる。

【0020】

従って、本発明により提供されるようなRNAポリメラーゼと、逆転写酵素活性を有する酵素と、RNaseH活性を有する酵素とを含む、等温転写介在增幅反応において使用するための酵素混合物も、本発明の一部である。

【0021】

以下、実施例により本発明をさらに例示する。

【0022】

実施例1 発現プラスミド上のHissタグ化T7 RNAP遺伝子への（1個以上の）変異の導入

変異の置換は、QuickChange部位特異的変異誘発キット（STRATEGENE）を使用した部位特異的変異誘発により実施した。全ての手順を、キットに同封された製造業者のプロトコルに従い実施した。T7 RNAポリメラーゼのアミノ酸633位におけるセリンからプロリンへの変異の導入に使用したオリゴプライマーは、以下の通りである。

A : 5' - G T G - T G A - C T A - A G C - G T C - C G G - T C A - T G A - C G C
- T G G - 3'

B : 5' - C C A - G C G - T C A - T G A - C C G - G A C - G C T - T A G - T C A
- C A C - 3'

オリゴヌクレオチドBは、オリゴヌクレオチドAと相補的である。下線が施された配列は、T7 RNAポリメラーゼヌクレオチド配列の1897位におけるT-C変異を含むオリゴヌクレオチド配列を含有する変異クローニングのスクリーニングに使用されるMspI制限部位を示す。その他の変異を導入するために使用したプライマーを、以下に示す。

【0023】

S430P(T1288C)置換：

A : 5' - G T T T A C G C T G T C C C A A T G T T C A A C C C G 40

10

20

30

40

50

C A A - 3 '
 B : 5 ' - T T G C G G G T T G A A C A T T G G C A C A G C G T A
 A A C - 3 '

【0024】

F 8 4 9 I (T 2 5 4 5 A) 置換 (新たな S a u 3 A I 部位が出現)

A : 5 ' - T T C T A C G A C C A G A T C G C T G A C C A G T T G
 C A C - 3 '

B : 5 ' - G T G C A A C T G G T C A G C G A T C T G G T C G T A
 G A A - 3 '

【0025】

F 8 8 0 Y (T 2 6 3 9 A) 置換 (新たな M l u I 部位が出現)

A : 5 ' - T C T T A G A G T C G G A C T A C G C G T T C G C G T
 A A C - 3 '

B : 5 ' - G T T A C G C G A A C G C G T A G T C C G A C T C T A
 A G A - 3 '

【0026】

P C R 反応混合物及び条件は、以下の通りであった。

1 0 × P f u 緩衝液	5 μ l
オリゴヌクレオチド A (1 0 0 n g / μ l)	1 . 2 5 μ l
オリゴ B	1 . 2 5 μ l
2 mM d N T P	1 . 2 5 μ l
プラスミド鑄型 *	1 μ l
H 2 O	4 1 μ l
計	5 0 μ l

【0027】

プラスミド鑄型は、後の手順における簡便な精製のためのヒスチジンタグと融合した、データベースに発表されているような完全な T 7 RNA ポリメラーゼ野生型遺伝子配列 (Dunn , J. J. and Studiew , F. W. (1 9 8 3) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T 7 DNA and the locations of T 7 genetic elements J. Mol. Biol. 1 6 6 (4) , 4 7 7 - 5 3 5) を含有している。T 7 DNA (Sigma D 4 9 3 1) を鑄型として使用した P C R により、T 7 RNA ポリメラーゼ遺伝子をクローニングした。次いで、 tag 配列を p U C 1 8 のマルチブルクローニングサイト (M C S) へ挿入することにより予め作成しておいた p U C 1 8 (tag) プラスミドの適切な制限部位へ、 P C R 増幅された T 7 RNA ポリメラーゼ DNA をクローニングした。配列決定により T 7 RNA P 遺伝子の DNA 配列が挿入されたことを確認した後、 Tag - T 7 RNA ポリメラーゼ融合遺伝子を、 p K K 2 2 3 - 3 発現プラスミド (Pharmacia Biotech 2 7 - 4 9 3 5 - 0 1) の適切な部位へとサブクローニングし、 Tag - T 7 RNA P / p K K 2 2 3 - 3 を作成した。以下の温度周期プロトコルにより P C R 反応を実施した。

9 5 3 0 秒

5 5 1 分

6 8 1 4 分 / 1 8 サイクル

P C R 反応の後、 D p n I 制限酵素 1 0 単位を添加し、 3 7 で 1 時間インキュベートした。次いで、 D p n I 処理された DNA 1 μ l を使用して、大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換した。最後に、 M s p I 制限酵素を使用したプラスミド DNA のスクリーニングにより、変異 T 7 RNA ポリメラーゼクローンを単離した。

【0028】

実施例 2

変異を含有する制限断片と、他の（ 1 個以上の）変異を含有する変異遺伝子の同断片との

10

20

30

40

50

置換により、複数個の変異（アミノ酸置換）を含有する（1個以上の）変異T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を構築した。置換のため使用した制限部位は、以下の通りであった。

【0029】

【化1】

-ヌクレオチド番号 695 1675 2445 T7RNAP 遺伝子
 -----BstXI----- (T1288C) -----HpaI--(T1897C)---KpnI----//

2575 2650
 //---(T2545A)----- MunI----- (T2639A)-----(HindIII)

10

【0030】

実施例3：インビトロ転写アッセイ

インビトロ転写アッセイのための反応混合物は以下の通りである。

10×T7 RNA P 緩衝液	5 μl
r NTP (各25mM)	0.8 μl
0.1% BSA	5 μl
RNase阻害剤 (40単位 / μl)	0.5 μl
錆型プラスミド (0.5 μg / μl)	1 μl
T7 RNAP	25単位
H ₂ O /	計 50 μl

20

各温度で60分間インキュベート

前記の反応混合物3 μlを0.7%アガロースゲルにアプライ

結果を、図1に示す。

【0031】

実施例4：W.T. 及び四重変異体 (F880Y + F8491I + S633P + S430P) の比活性の比較

以下のプロトコルを使用して、T7 RNAポリメラーゼの酵素的転写活性を決定する。

【0032】

30

1. 以下の反応混合物を調製する。

【0033】

【表1】

表1

	(1アッセイ用)	(10アッセイ用)
10×転写緩衝液(*2)	5μl	50μl
100mM rNTP 混合物(各25mM rNTP)	0.8μl	8μl
T7 DNA(Sigma D4931)(0.5 μg/μl)	2μl	20μl
BSA(1mg/ml)	2.5μl	25μl
H ₂ O	34.2μl	342μl
[³ H]rUTP(NEN;NET-287)	0.5μl	5μl
計	45μl	450μl

【0034】

2. 前記の反応混合物45 μlを2mlエッペンドルフチューブに分散させる。

50

【0035】

3. 混合物を37で3分間インキュベートする(プレインキュベーション)。

【0036】

4. アッセイする酵素溶液(*1)5μlを添加し、短時間でよく混合する。

【0037】

5. 37で10分間インキュベートする。

【0038】

6. 3.6%PCA溶液(3.6%過塩素酸、0.1M Na₄P₂O₇)1.5mlを添加して反応を停止させ、氷上で10分間インキュベートする。

【0039】

7. 濾過し、標準的な方法に従い[3H]を測定する。

【0040】

このアッセイにおいて、転写活性は、以下の式を使用することにより計算される。

活性(単位/μl) = [cpm(試料) - cpm(ブランク)] × 24 / cpm(全)
(1単位とは、60分間に1nmolの標識ヌクレオチド三リン酸の酸不溶性材料への組み込みを触媒する活性と定義される)

【0041】

(*1) 必要に応じて、酵素溶液は希釈緩衝液で0.5から4単位/μlに希釈する。

希釈緩衝液: 20 mM KPO₄ (pH 7.5)

100 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

50% (V/V) グリセロール

【0042】

(*2) 10×転写緩衝液 400 mM Tris-HCl (pH 8.0)

200 mM MgCl₂

50 mM DTT

結果を表2に示す。

【0043】

【表2】

表2

反応温度	比活性(単位/μgタンパク質)	
	W.T.	Q変異体
37	22.0	29.9
40	26.9	35.9
45	32.2	49.6
50	4.8	56.8
55	1.6	8.8
60	0.0	3.3
65	0.0	0.9

【0044】

実施例5

この実施例では、以下のプロトコルを使用して、異なるT₇ RNAポリメラーゼの半減期T_{1/2}を決定する。

【0045】

10

20

30

40

50

1. 以下の反応混合物を調製する。

(1 アッセイ用)

10 × 転写緩衝液	10 μl
0.5 M KCl	14 μl
BSA (1 mg/ml)	10 μl
H ₂ O	56 μl
計	90 μl

(転写緩衝液: 400 mM Tris-HCl (pH = 8.0)、200 mM MgCl₂、及び 50 mM DTT)

【0046】

10

2. アッセイすべき酵素溶液 10 μl を添加し、よく混合する。

【0047】

3. 適切な温度でインキュベートする。

【0048】

4. 5又は 10 分毎に 5 μl を採取し、直ちに転写活性アッセイの反応混合物（実施例 3 参照）へと移し、（残存）活性を測定する。

【0049】

5. T (インキュベーション時間) に対し $\ln [cpm(t=T) - cpm(\text{プランク})] - [cpm(t=0) - cpm(\text{プランク})]$] をプロットする。

【0050】

20

6. e (= 2.718) / 傾きとして T_{1/2} (分) を導出する。

野生型 T7 RNA ポリメラーゼと変異体との比較の結果

【0051】

【表 3】

表 1 T7 野生型と T7 変異体の T_{1/2} の比較

変異	SA(単位/μg タンパク質)	T _{1/2} (分)			
		50.0°C		48.0°C	
		試験 1	試験 1	試験 2	試験 1
WT	24.9		1.9	2.1	16.6
S430P				6.8	
S633P	38.7		9.3	9.0	58.3
F8491I	39.2		9.8		53.3
F880Y	32.4		8.4		42.7
S633P+F8491	31.7	6.7	46.0		
S633P+F880Y	35.3	4.5	49.3		
F8491I+F880Y	33.8	5.9	37.8		
S633P+F8491+F 880Y	35.0	28.0	58.0		
		84.5			

30

【0052】

実施例 6 : T7 RNA P 酵素の大規模產生系の確立

大量の酵素を得るため、大腸菌の培養及び T7 RNA P 酵素の精製の条件を調査した。最終的に決定された条件は、以下の通りであった。精製条件に関しては、Studier (P.N.A.S., USA, 81, 2035-2039, 1984) による発表を参照のこと。

【0053】

6. 1 : T7 RNA P 発現プラスミドを保有する大腸菌の培養の手順

1. T7 RNA P 発現プラスミドを保有する單一コロニー大腸菌 BL21 を LB 培地 2

40

50

m1へと接種し、30で16時間培養(種種培養)。

【0054】

2. 種培養物1m1をLB培地100m1に接種し、30で16時間培養(種培養)。

【0055】

3. 種培養物100m1をTB培地6Lに接種し、37で10から12時間培養(主培養)。(使用される培地は、全て、1m1当たり50μgのアンピシリンを含有する。)

【0056】

LB培地:トリプトンペプトン(Difco) 10g

イーストエキストラクト(Difco) 5g

NaCl 10g/L

NaOHでpH7.5に調整

TB培地:トリプトンペプトン(Difco) 12g

イーストエキストラクト(Difco) 24g

KH₂PO₄ 2.31g

K₂HPO₄ 12.5g

グリセロール 4m1/L

結果を表2に与える。

【0057】

【表4】

表2

20

培養時間(h)	OD660	pH
0	0.75	6.96
2	2.45	6.81
4	5.75	6.7
6	7.35	6.44
8	12.3	6.83
10	16.6	7.47
12	19.15	8.05
14	19.5	8.35
16	18.75	8.49
18	17.2	8.54
20	16.3	8.57
22	15.05	8.58

30

これらの条件を使用すると、通常12.0gの大腸菌(湿重量)が得られる。

【0058】

6.2 T7 RNA Pの精製の手順

1. 大腸菌100gを緩衝液A 500m1に懸濁させ、フレンチプレスにより破碎した。次いで、この溶解物を遠心分離し、上清(粗抽出物)を得た。

40

【0059】

2. 粗抽出物に、5%ポリエチレンイミン(PEI)溶液16.9m1を添加し、核酸を沈殿させた。遠心分離により上清を得た。

【0060】

3. PEI処理後の上清に、硫酸アンモニウムを最終45%飽和で添加した。混合物を45で30分間攪拌し、沈殿を可能にした。硫酸アンモニウム沈殿物を遠心分離により収集し、緩衝液B(+50mM NaCl) 200m1に溶解させ、次いで同緩衝液に対し透析した。

【0061】

50

4. 酵素溶液を Affi-gel blue (Bio-Rad) の 100 ml カラムに担荷させた。カラムを緩衝液 B (+ 100 mM NaCl) で洗浄し、緩衝液 B (+ 2 mM NaCl) でタンパク質を溶出させた。ピーク画分をプールした。

【0062】

5. 収集したプールに、硫酸アンモニウムを最終 45% 飽和で添加した。次いで、硫酸アンモニウム沈殿物を収集し、緩衝液 B (+ 25 mM NaCl) 200 ml に溶解させ、同緩衝液に対し透析し、DEAE-セルロファイン (cellulofine) カラムの 200 ml カラムに担荷させた。カラムを緩衝液 B (+ 25 mM NaCl) で洗浄し、25 mM NaCl から 150 mM NaCl への勾配 1000 ml でタンパク質を溶出させた。ピーク画分を収集した。

10

【0063】

6. 収集したプールに、硫酸アンモニウムを最終 45% 飽和で添加した。次いで、硫酸アンモニウム沈殿物を収集し、保存緩衝液 30 ml に溶解させ、同緩衝液に対し透析した。得られた酵素は、最後に濾過し、-300 で保存した。

【0064】

【表5】

緩衝液 A:	緩衝液 B:	保存緩衝液
50mM Tris-	KPO ₄ (PH7.7)20mM	KPO ₄ (PH7.7)
HCl(pH8.0)20mM		
1M NaCl	NaCl	100M NaCl
2mM EDTA	1mM EDTA	0.1mM EDTA
1mM DTT	1mM DTT	1mM DTT
	5%グリセロール	50%グリセロール
		0.01%TritonX-100

20

【0065】

結果を表3に示す。

【0066】

【表6】

30

表3 精製の要約:

	工程	容量(ml)	活性(単位/ μ l)	全活性(KU)	タンパク質濃度(mg/ml)	全タンパク質量(mg)	比活性(単位/ μ g)
1	粗抽出物	845	ND	-	24.6	20787	-
2	PEI 後	869	ND	-	23.4	20124	-
3	塩析後	200	805.1	161012	36.5	7300	22.0
4	Affi-gel blue 後	524	312.3	163619	5.2	2724	60.1
5	DEAE セルロース後	220	354.3	77950	3.8	836	93.2
6	塩析及び透析後	37	1865	69025	19.2	710	97.2

40

【0067】

6.3 精製された T7 RNA P の品質管理アッセイ

精製された酵素を、以下の品質管理アッセイ (Quality Control Assays) 及びインビトロ転写アッセイにより試験した。

【0068】

50

エキソヌクレアーゼ活性の機能的欠如：

精製された酵素 120 単位を 3H - 大腸菌 (NET-561) 10 μl と共に 37 度で 4 時間インキュベートした。酸可溶性 DNA の放出は、0.01% / 単位 / 時間である。

【0069】

エンドヌクレアーゼ活性の機能的欠如：

精製された酵素 60 単位を phi X 174 DNA 1 μg と共に 37 度で 4 時間インキュベートする。アガロースゲル電気泳動におけるバンドパターンに可視的变化は検出されない。

【0070】

R n a s e 活性の機能的欠如：

10

精製された酵素 200 単位を 16S & 24S リボソーム RNA (Boeringer) 2 μg と共に 37 度で 4 時間インキュベートする。アガロースゲル電気泳動におけるバンドパターンに可視的变化は検出されない。

【0071】

転写反応の性能

各 30 単位の精製された酵素及び市販の RNAP を、以下の前記インビトロ転写アッセイにおいて使用した。混合物をセ氏 37 度及び 48 度の両方で 1 時間インキュベートした。精製された酵素によりセ氏 48 度で產生された RNA の量は、市販の酵素により 37 度で产生された RNA の量とほぼ同一であった。

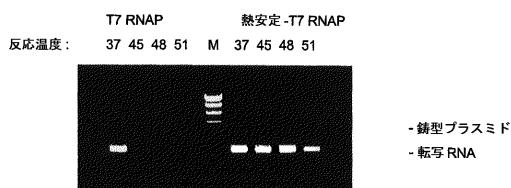
【図面の簡単な説明】

20

【図 1】 様々な温度における、野生型及び四重変異体の転写アッセイの結果を示す図である。

【図 1】

FIGURE 1



【配列表】

0004832694000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1

(56)参考文献 特開2001-054387(JP,A)
特表2002-532095(JP,A)
特開平11-075867(JP,A)
Biochemistry, 1997年, 36, 2908-18

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS(STN)
PubMed