

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6259775号
(P6259775)

(45) 発行日 平成30年1月10日(2018.1.10)

(24) 登録日 平成29年12月15日(2017.12.15)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 Z

請求項の数 23 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2014-557124 (P2014-557124)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月18日(2013.2.18)
 (65) 公表番号 特表2015-507927 (P2015-507927A)
 (43) 公表日 平成27年3月16日(2015.3.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2013/050387
 (87) 国際公開番号 W02013/121228
 (87) 国際公開日 平成25年8月22日(2013.8.22)
 審査請求日 平成28年1月26日(2016.1.26)
 (31) 優先権主張番号 1202768.6
 (32) 優先日 平成24年2月17日(2012.2.17)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 1216029.7
 (32) 優先日 平成24年9月7日(2012.9.7)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 514205137
 バイオテック ファーマコン エイエスエ
 イ
 ノルウェー エヌー9294 トロムソ,
 シケフスヴェイエ 23
 (74) 代理人 110001070
 特許業務法人 S S I N P A T
 (72) 発明者 ラネス, オラヴ
 ノルウェー エヌー9007 トロムソ,
 クヴェルドロヴェゲン 12
 (72) 発明者 ハヴダレン, リンダ
 ノルウェー エヌー9008 トロムソ,
 スキッパーガータ 21ビー

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドヌクレアーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片であって、前記エンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片が配列番号 4 又はそれと少なくとも 90% 同一である配列を有し、前記エンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片が F Y C G C ペンタペプチドモチーフを含み、前記 F Y C G C ペンタペプチドモチーフの直近 N 末端であるアミノ酸残基が負に荷電している残基によって置換されているエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片。

【請求項 2】

前記負に荷電している残基が、グルタミン酸、アスパラギン酸、4 - フルオロ - D L - グルタミン酸、 - カルボキシ - D L - グルタミン酸、及び D - 2 - アミノアジピン酸から成る群から選択される請求項 1 のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片。

【請求項 3】

前記負に荷電している残基がグルタミン酸である請求項 2 のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片であって、前記エンドヌクレアーゼ I が *Vibrio salmonicida* に由来する、エンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片。

10

20

【請求項 5】

0.5 mM の T C E P の存在下で 50 にて 30 分間インキュベートすると実質的に不活化され、0.5 mM の T C E P の存在下で残留活性が評価される請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片。

【請求項 6】

0.5 M の塩化ナトリウムの濃度にて、最適塩濃度で前記エンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片が示す触媒活性の 60 % 以上である触媒活性を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片。

【請求項 7】

試料から混入しているポリヌクレオチドを取り除く方法であって、前記方法が請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片に試料を接触させることを含む方法。

10

【請求項 8】

その中でポリヌクレオチドの消化を可能にする条件下でエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片に試料を接触させ、次いで、エンドヌクレアーゼを不活化するのに十分な温度と時間にて、前記試料と前記エンドヌクレアーゼの混合物を不活化添加剤に接触させる請求項 7 の方法。

【請求項 9】

前記試料が、組換えで作出した関心のあるタンパク質を含有する調製物である請求項 7 又は 8 の方法。

20

【請求項 10】

前記関心のあるタンパク質が酵素である請求項 9 の方法。

【請求項 11】

前記試料が、検体である関心のあるタンパク質を含有する請求項 7 又は 8 の方法。

【請求項 12】

前記試料が、細胞溶解物、組織試料又は体液に由来する請求項 11 の方法。

【請求項 13】

前記試料が抗体又は抗体断片を含む請求項 7 又は 8 の方法。

【請求項 14】

前記試料が、DNA 結合タンパク質又は溶液にて核酸と会合するタンパク質を含む請求項 7 又は 8 の方法。

30

【請求項 15】

前記試料が、ポリヌクレオチドの解析法にて使用され得る試薬溶液である請求項 7 又は 8 の方法。

【請求項 16】

前記ポリヌクレオチドの解析法が P C R 又は D N A / R N A 配列決定である請求項 15 の方法。

【請求項 17】

前記不活化添加剤が、金属イオンキレート剤又はジスルフィド結合還元剤である請求項 8 ~ 16 のいずれか 1 項の方法。

40

【請求項 18】

前記剤が、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、ジチオスレイトール (D T T)、2 - メルカプトエタノール、2 - メルカプトエチルアミン - H C l、T C E P (トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン及び N - エチルマレイミドから成る群から選択される請求項 17 の方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のエンドヌクレアーゼ I 若しくは酵素的に活性があるその断片をコードする、又は前記エンドヌクレアーゼ I 若しくは酵素的に活性があるその断片を含むタンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 20】

50

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片を単離する及び精製する方法であって、前記方法が、好適な宿主細胞にて前記エンドヌクレアーゼ又はその断片を発現させ、その後、前記宿主細胞及び / 又は前記細胞が培養された培地からエンドヌクレアーゼを分離することを含む方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項のエンドヌクレアーゼ I 又は酵素的に活性があるその断片と第 2 のエンドヌクレアーゼ I を含む組成物。

【請求項 2 2】

前記第 2 のエンドヌクレアーゼ I が、配列番号 5 の配列を有する請求項 2 1 の組成物。

【請求項 2 3】

前記第 2 のエンドヌクレアーゼ I が、*Vibrio cholerae* に由来する請求項 2 2 の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に熱不安定性特性を示す、穏やかな処理条件によって不活化されるエンドヌクレアーゼに関する。本発明はまた、そのようなエンドヌクレアーゼを介した生物調製物からの混入しているポリヌクレオチドの除去も含む。本発明はまた、エンドヌクレアーゼの使用を介した核酸の増幅反応、特にポリメラーゼ鎖反応 (PCR) のセットアップに
20

【背景技術】

【0002】

核酸及び特にゲノム DNA は、試料にて粘性を作り出し、精製、下流の解析及び応用を妨害するので細胞培養、細胞溶解物及びタンパク質にて問題を引き起こすことが多い。DNA 及び核酸の除去は物理的に、化学的に又は酵素的に行うことができる。DNA 又は RNA の酵素的除去はヌクレアーゼを添加することによって達成することができる。しかしながら、DNA はタンパク質又は酵素分解からそれを保護する他の分子に結合するので、ヌクレアーゼは複雑な生物試料では DNA を分解するのに失敗することが多い。タンパク質 / DNA の相互作用を制限するので、下流のタンパク質精製を円滑にするために塩化ナトリウムを典型的な細胞溶解物に加えることが多い。残念ながら、ほとんどのヌクレアーゼは適度な塩濃度で高度に阻害されるようになり、又は不活性になり、酵素的除去が不十分になることが多い。従って、タンパク質、試薬又は生物試料から微量の DNA をすべて除去することは厄介であることが多い。

【0003】

細胞溶解物、タンパク質精製にて及び解析工程の前に核酸を酵素的に取り除くために、たとえば、ベンゾナーゼ (*Serratia marcescens* のヌクレアーゼ)、*Omnicleave* (*Episentre*) 又は DNA 分解酵素 I のような幾つかの市販の代替品が存在する。しかしながら、適度な熱処理によって不活化することができる選択肢はない。使用後、上記酵素を取り除くために、種々の樹脂、阻害剤又はカラム精製工程が通常必要とされる。使用後、ヌクレアーゼを除去するのに追加の試薬又は精製工程を必要とするので、これによって酵素法は使用するのにさらに厄介になる。これはさらに時間がかかり、当該タンパク質のさらに低い収率をもたらす得る。

【0004】

タンパク質精製にて又は試薬から微量の DNA を取り除く問題は、市販のポリメラーゼ及びマスターミックスにて見られることが多い外因性 DNA において明らかである。さらに、分子生物学の応用 (たとえば、PCR 及び配列決定) 及び分子診断のための試薬は、混入する DNA 及びヌクレアーゼ双方が含まれてはならない。使用後、上記で記載されたヌクレアーゼを除去することに関連する困難さによって、DNA 技術において使用される試薬を処分するのにヌクレアーゼはあまり好適でなくなっている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

PCRのような核酸増幅法は、バイオテクノロジーで利用できる最も強力なツールの1つであり、少量の核酸しか含有しない試料から大量のコピー数の標的配列を調製するのを可能にする。PCRの場合、標的配列と遊離のヌクレオチドを含有する反応混合物に、二本鎖標的配列の各鎖に対して相補性のオリゴヌクレオチドプライマーを添加する。DNAポリメラーゼの存在下での熱サイクルは、プライマー間の配列の増幅を生じる。その後のPCRサイクルで鋳型として作用するPCR工程によって創られた増幅断片の能力は、相当な量に標的配列の迅速な生産を生じる。

【 0 0 0 6 】

核酸の混入の有害な効果に対する特定の感度の増幅反応は、これらが反応にて20コピー未満のDNA配列を定量する力を有するので、定量的PCR(qPCR)法である。従って、最少レベルの核酸混入でさえ、qPCR法にて間違った結果を与え得る。加えて、これらの方法は、不可避の背景シグナルを上回る増幅した標的核酸からのシグナルの検出を必要とする。混入している核酸はこの背景シグナルに寄与することができるので、技法の感度を低下させる。そのようなものとして、混入する核酸を最少化することは、定量的PCR実験の感度を最大化する。少数コピーの標的核酸が検出される実験、たとえば、定量的PCRに基づく病原体診断及び病原体負荷の定量では、定量的PCRの感度が最大化され、疑陽性が最少化されることが最重要である。高度に保存された細菌DNAの断片がqPCR法によって標的とされる(たとえば、16S rRNA又は23S rRNA)細菌同定及び診断の分野では、DNAポリメラーゼ調製物(通常、細菌及び細菌発現系から得られる)から生じる核酸の混入は主要な問題である。従って、DNAポリメラーゼ調製物から細菌の核酸混入物を効率的に取り除く方法が必要とされる。特に求められるのは、下流の増幅反応に有害な影響を有することなく及びポリメラーゼを損傷することなく、これを達成することができる方法である。

【 0 0 0 7 】

標的配列に対して内部を切断するので混入しているDNAの増幅を妨げるエンドヌクレアーゼを用いて、標的DNA及びTaq DNAポリメラーゼを添加する前に、個々のPCR反応混合物を処理することができることが提案されている(Furrer et al. Nature. Vol. 346 page 324, 1990)。この方法は、反応混合物が煮沸される除染の後、エンドヌクレアーゼを不活化するために30分間の除染時間を必要とする。この煮沸工程のために、除染の後にDNAポリメラーゼを加えることが必要である。当然、これは増幅前の混合物に持ち越し汚染を導入するさらなるリスクを表し、DNAポリメラーゼ自体の除染は除外される。

【 0 0 0 8 】

DNAを特異的に切断する熱不安定性のエンドヌクレアーゼ(DNA分解酵素)が記載されている。WO99/007887は94で2分間の後、実質的に不可逆的に不活化される、*Pandanus borealis*から単離されたDNA分解酵素を開示している。この同じ酵素はまた65で15分間の後も、実質的に不可逆的に不活化される。しかしながら、これらの温度は特定の応用には高すぎ、混入するRNA及び一本鎖DNA(ssDNA)を取り除く要求もある。

【 0 0 0 9 】

エンドヌクレアーゼIは、配列とは無関係な方式でRNA及びDNA双方を切断することが知られる約25kDaの細胞周辺質又は細胞外の単量体酵素である。それは多数の異なる*Proteobacteria*及び*Fibrobacter*にて見いだされる。構造は、9つの鎖、5つの短い螺旋及び5つの長い螺旋を含有する混合/トポロジーを有する。それはプラスミド及びssDNAを切断することができる。それはホスホジエステル結合の3'側で切断する。

【 0 0 1 0 】

熱不安定性であるエンドヌクレアーゼはAltermannら(FEBS Journal; 2007, 274: 252 to 263)によって当該技術で記載されている。彼らは、低温細菌*Vibrio*

10

20

30

40

50

*salmonicida*から単離したエンドヌクレアーゼI (VsEndA、配列番号1)を記載している。この酵素は、中温細菌*Vibrio cholerae* (VcEndA、配列番号3)から単離されたエンドヌクレアーゼIで見られる同一条件下でのほぼ100%活性に比べて50%の温度で20%未満の活性(この酵素の最適な活性に比べて)の酵素活性を有することが分かった。さらに、70%での不可逆的に折り畳み構造がほどける比率はVcEndAについてよりもVsEndAについての方が高かった。

【0011】

細菌*V. salmonicida*及び*V. cholerae*の穏やかな塩性特性のために上述のVsEndA及びVcEndAは高い塩分濃度の溶液にて酵素的にさらに活性があることが報告されている。Niiranenら(FEBS Journal; 2008, 275: 1593 to 1605)は、触媒定数(K_{cat})はVcEndA及びVsEndA酵素についてそれぞれ0.25 M及び0.5 Mの塩濃度でピークとなることを示している。

【0012】

温和な温度で不活化することができ、調製物におけるタンパク質又は他の当該分子の活性に有害に影響しないエンドヌクレアーゼは生物調製物から混入しているポリヌクレオチドを取り除く高度に効果的で効率的な方法を提供する。理想的には、エンドヌクレアーゼの添加の後、DNA/タンパク質の相互作用を制限し、純粋なタンパク質試料を作出するために、塩化ナトリウムを調製物に添加することが多いので、このエンドヌクレアーゼは高レベルの塩分濃度を含有する調製物を認容することもできる。しかしながら、これらの特性を持つ現在利用可能なエンドヌクレアーゼはない。

【0013】

温度の変化によって反転されないヌクレアーゼの不活化は、室温で実施され得る又は室温成分を伴うサイクルを含むさらなる方法で使用されるべきである調製物にとって特に重要である。単純な熱不安定性、すなわち、既存の酵素よりも低い温度で折り畳み構造がほどけることは不十分である。温和な条件下、たとえば低温のもとでの不活化は、有用な酵素を提供するために、当初の合成にて正しく折り畳まれたタンパク質の理に適った収率と組み合わせる必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

驚くべきことに本発明者らは、VsEndA酵素のアミノ酸配列における単一の点突然変異が、高い塩分濃度の調製物においてさえ酵素的に活性を保ったままで、さらに、温和な条件下で不活化することができる酵素を生じることを見いだした。その置換が驚くべき且つ有利な特性を持つ酵素を生じる残基は44位で見られるセリン残基である。このセリン残基は、高度に保存されたペントペプチドモチーフ(フェニルアラニン-チロシン-システイン-グリシン-システイン又はPhe-Tyr-Cys-Gly-Cys又はFYCGC)の直近N末端に存在する。野生型(wt)のVsEndAの配列を配列番号1によって表し、図1に示す。番号付け(44)は細胞質から細胞周辺質への移動の間に切断されるN末端シグナルペプチドを含む。シグナル配列は図3及び図4では示されず、その結果、これらの図における番号付けは調整されている。

【0015】

Altérmarkら(Biological Crystallography; 2006, D62, 1387 to 1391)の知見から、このセリン残基は埋められた塩化物イオンとの錯体の一部を形成することが見つけ出されている。このセリン残基は、エンドヌクレアーゼI酵素が由来する細菌の種に応じて様々な位置で見いだすことができる(たとえば、VcEndAにおける同等のセリン残基は42位に見いだされ、*V. vulnificus*に由来するエンドヌクレアーゼIの同等のセリン残基は41位に見いだされる)。Vibrio属の種々の細菌に由来するエンドヌクレアーゼの配列の検討から、配列の40~50位で塩化物イオンと相互作用するアミノ酸は必ずしもセリンとは限らないことが分かった。V. furnissiiに由来するエンドヌクレアーゼでは、たとえば、同等のアミノ酸はスレオニンである。

【 0 0 1 6 】

本発明者らは、負に荷電した残基又は別の極性残基によるこのセリン残基の置換が上記特性を有する酵素をもたらすことを見いだした。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 7 】

従って、本発明によれば、エンドヌクレアーゼⅠ又は酵素的に活性があるその断片が提供され、前記エンドヌクレアーゼⅠは、配列番号1の配列又はそれと少なくとも60%同一である配列を有するが、F Y C G Cペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基が負に荷電した又は極性である残基によって置換されており、前記エンドヌクレアーゼⅠ又は酵素的に活性があるその断片が、10mMのジチオスレイトール(DTT)の存在下にて30で15分間インキュベートすると実質的に(不可逆的に)不活化される。

10

【 0 0 1 8 】

或は、本発明は、エンドヌクレアーゼⅠ又は酵素的に活性があるその断片を提供し、前記エンドヌクレアーゼⅠは、配列番号1の配列又はそれと少なくとも60%同一である配列を有するが、F Y C G Cペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基が負に荷電した又は極性である残基によって置換されており、前記エンドヌクレアーゼⅠ又は酵素的に活性があるその断片が、10mMのDTT又は10mMのトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)のいずれかの存在下にて4で6時間インキュベートすると実質的に(不可逆的に)不活化される。適当な不活化の条件は、温度の反映、インキュベートの時間及び添加される化学不安定化剤の濃度であることが十分に理解される。上記条件は、本発明の酵素及び条件のさらなるセットを定義する試験を提供し、完全なアッセイプロトコールは実施例にて記載される。

20

【 0 0 1 9 】

代わりに検討すると、本発明は、10mMのDTTの存在下にて30で15分間インキュベートすると、又は10mMのTCEPの存在下にて4で6時間インキュベートすると実質的に(不可逆的に)不活化されるエンドヌクレアーゼⅠ又は酵素的に活性があるその断片を初めて提供する。

【 0 0 2 0 】

従って、不活化を提供する条件は変化し得る一方で、好ましい置換の性質は同一なので、代わりに検討すると、本発明は、エンドヌクレアーゼⅠ、又は配列番号1若しくは4に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、90%、95%若しくは98%同一である酵素的に活性があるその断片を提供するが、F Y C G Cペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基が負に荷電した又は極性である残基によって置換されている。

30

【 0 0 2 1 】

負に荷電した残基又は極性の残基は遺伝的にコードされてもよいし、遺伝的にコードされなくてもよい。好ましくは、導入されるアミノ酸は負に荷電する。アミノ酸及び特にその側鎖官能基の文脈における極性及び荷電は当該技術でよく理解されており、通常、正常な生理的条件下で評価される。

40

【 0 0 2 2 】

F Y C G Cペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基の「置換」によって、この残基が異なるアミノ酸、通常遺伝的にコードされるが、遺伝的にコードされないことも考えられるアミノ酸又はアミノ酸誘導体によって置き換えられることを意味する。好ましくは、通常セリンである残基が、負に荷電したアミノ酸、たとえば、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸、又は別の極性のアミノ酸、たとえば、スレオニン、アスパラギン若しくはグルタミンによって置き換えられる。或は、前記アミノ酸残基は、負に荷電した又は極性である非遺伝的なアミノ酸によって置き換えられる。好ましい遺伝的にコードされないアミノ酸は、たとえば、4-フルオロ-DL-グルタミン酸、-カルボキシ-DL-グルタミン酸、及びD-2-アミノアジピン酸のようなグルタミン酸誘導体である

50

。最も好ましい実施形態では、F Y C G C ペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基はグルタミン酸によって置き換えられる。

【0023】

好ましい実施形態では、本発明のエンドヌクレアーゼI又は酵素的に活性がある断片は、0.5 mMのTCPEの存在下にて50 で30分間インキュベートすると実質的に不活化され、残留活性は0.5 mMのTCPEの存在下で評価され、好ましくはエンドヌクレアーゼI又は酵素的に活性があるその断片は、これらの条件下で不可逆的に不活化される。

【0024】

さらなる態様では、本発明は、上述のエンドヌクレアーゼの使用を含む、試料から混入しているポリヌクレオチドを取り除く方法を含む。方法は通常、上記で定義したようなエンドヌクレアーゼに試料を接触させることを含む。

10

【0025】

好ましい実施形態では、試料は、当該タンパク質、たとえば、組換えで作出した当該タンパク質、たとえば、酵素を含有する調製物である。或は、当該タンパク質は出発物質から精製することが望まれる検体又は他のタンパク質であり得る。調製物は、細胞溶解物又は組織試料又は体液であってもよく、又はそれに由来してもよい。

【0026】

当該タンパク質は抗体又は抗体断片であり得る。タンパク質（たとえば、抗体）は診断法又は治療法に有用であってもよい。従って、上述の方法は、診断用又は治療用のタンパク質が混入するポリヌクレオチドを含まないので、投与に安全であり得ることを保証するために使用され得る。

20

【0027】

当該タンパク質は、DNA結合タンパク質又は溶液中で核酸と会合する他のタンパク質であり得る。特に、核酸から当該タンパク質を分離するのに塩が好都合に使用され得るそのようなタンパク質は、塩の存在下で機能する本発明のエンドヌクレアーゼの観察された能力を与えられる。

【0028】

本発明のエンドヌクレアーゼは、50 mM ~ 1 M、好ましくは約500 mMの塩（たとえば、塩化ナトリウム又は塩化カリウム）濃度にて特に効果的であり得る。多数のヌクレアーゼは細胞溶解物及び精製緩衝液に通常添加される高い塩化ナトリウム濃度で阻害され、本発明のエンドヌクレアーゼの塩認容性は特別な利点である。好ましくは、本発明のエンドヌクレアーゼは、0.5 Mの塩化ナトリウム又は塩化カリウムにて最適な触媒活性（本明細書で評価される）を有し、又はこの塩濃度にて最適な塩濃度で示されるものの60 %未満、好ましくは75 %未満である活性を有する。「最適な塩濃度」は、酵素が最高の触媒活性を有する塩化ナトリウムの濃度である。代わりに検討すると、本発明のエンドヌクレアーゼは、塩化ナトリウムの濃度が0.35 ~ 0.65 M、好ましくは0.45 ~ 0.55 M、さらに好ましくは約0.5 Mである場合、最適な触媒活性を有する。

30

【0029】

別の実施形態では、生物調製物は、たとえば、ポリヌクレオチド解析法、たとえば、PCR、DNA/RNAの配列決定又はマイクロアレイにて使用される試薬溶液である。試薬溶液は、非タンパク質の成分又は混合物、たとえば、PCRのマスターミックス又は緩衝液を含んでもよく又はそれから成ってもよい。上述のエンドヌクレアーゼを使用して試薬からポリヌクレオチド混入物を取り除き、失活させ、次いで当該ポリヌクレオチドを含有する試料に前記試薬を添加するので、前記試薬の添加を介して試料に導入される混入物の可能性を低減し得る。

40

【0030】

本発明は、ポリヌクレオチドによる混入を防ぐこと及び制限すること、特に増幅試薬及び酵素における外来ポリヌクレオチドによる疑陽性の結果を減らし、バックグラウンド（陽性の非鋳型対照）を減らすことにて有用性を有する。

50

【 0 0 3 1 】

本発明のエンドヌクレアーゼは、増幅反応における内在性DNAの排除又は低減に使用するのに好適である。これは、エンドヌクレアーゼの不活化温度が低ければ低いほど、増幅工程の間にそれを不活化するのが容易であり、不活化工程で使用される所与の温度で達成することができる不活化の程度が大きいからである。

【 0 0 3 2 】

従って、本発明のエンドヌクレアーゼを使用して、増幅反応混合物又はその個々の成分に存在する非標的のポリヌクレオチド、たとえば、ポリメラーゼを分解する。それによって非特異的な増幅を減らし得る又は回避し得る。

【 0 0 3 3 】

本発明のエンドヌクレアーゼは低温で不活化することができるので、好ましい一実施形態では、エンドヌクレアーゼを使用して当該タンパク質又は当該試薬を含有する溶液から混入しているポリヌクレオチドを取り除くが、その際、前記タンパク質又は試薬はそれ自体、約37の温度（エンドヌクレアーゼが酵素的に活性である）で熱不安定性である。

【 0 0 3 4 】

本発明のエンドヌクレアーゼの不活化は通常、不活化添加剤とのエンドヌクレアーゼのインキュベートを含むであろう。不活化添加剤はエンドヌクレアーゼを不安定化する、すなわち、所与の温度で折り畳み構造がほどけることに対してそれをさらに感受性にする。エンドヌクレアーゼIは配位した Mg^{2+} 及び複数のジスルフィド結合を含有し、熟練者は、酵素のこれらの又は他の特性を標的として酵素を不安定化することができる試薬に気付くであろう。

【 0 0 3 5 】

エンドヌクレアーゼ内部の配位した Mg^{2+} イオンのために、 Mg^{2+} イオンの濃度はエンドヌクレアーゼの活性に重要である。この理由で、1 ~ 20 mMの間、好ましくは5 ~ 10 mMの間の Mg^{2+} 又は Mn^{2+} のイオン濃度が本発明の方法では使用され得る。PCR又はタンパク質精製の緩衝液は通常、塩化マグネシウムの形態で5 mMの濃度の Mg^{2+} イオンを有する。

【 0 0 3 6 】

不活化添加剤は、たとえば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）のような金属イオンのキレート剤であってもよい。不活化添加剤は、ジスルフィド結合還元剤（すなわち、タンパク質における2以上のシステイン残基間のジスルフィド結合を阻害する及び/又は壊す剤）。であってもよい。そのような剤の例には、DTT、2-メルカプトエタノール（2-メルカプトエタノールとしても知られる）、2-メルカプトエチルアミン・HCl、TCEP（トリス（2-カルボキシ）ホスフィン）及びN-エチルマレイミドが挙げられるが、これらに限定されない。TCEP及びDTTが好ましい。TCEPは特に好ましい。熟練者は、不活化を改善するが、その下流の反応に有害ではないその必要性にとって適当なジスルフィド結合還元剤の濃度を決定することができる。たとえば、0.05 ~ 50 mMの間の濃度でDTTを不活化工程に好都合に組み入れることができる。

【 0 0 3 7 】

好ましくは、本発明の方法におけるエンドヌクレアーゼの不活化は、0.5 ~ 50 mMの間、さらに好ましくは1 ~ 20 mMの間、たとえば、5 ~ 20 mMの間での不活化添加剤（たとえば、DTT）の濃度で生じる。

【 0 0 3 8 】

従って、好ましくは、不活化添加剤は少なくとも1 mMの濃度で存在する。

【 0 0 3 9 】

実施例にて示すように、不活化に必要とされる条件は、インキュベートの温度及び時間及び不活化添加剤の濃度の自由自在な組み合わせに相当する。従って、不活化は、40にて1 mMのTCEPと共に5 ~ 10分間のインキュベート後、又は30にて10 mMのDTTと共に15分間で達成され得る。処理される生物調製物の性質に応じて及びその後のその使用に応じて、条件のどの組み合わせが適当であるかは熟練者には明らかである

10

20

30

40

50

う。本発明のエンドヌクレアーゼは熱不安定性であるが、それを不活化するために必ずしも酵素を加熱しなくてもよいことが前述から十分に理解されるべきである。

【0040】

従って、さらなる態様では、本発明は、その中でポリヌクレオチドの消化を可能にする条件下で本発明のエンドヌクレアーゼに試料を接触させることと、次いで前記エンドヌクレアーゼを不活化するのに十分な温度で十分な時間、前記試料とエンドヌクレアーゼの混合物を不活化添加剤と接触させることとを含む、試料から核酸（混入物）を取り除く方法を提供する。

【0041】

2つの接触工程は通常インキュベートであり、本明細書で、特に実施例で記載される。試料にて核酸の消化を達成するのに好適なインキュベート条件は当該技術で既知であり、10～50℃、たとえば、35～37℃前後で5～30分間、たとえば、10～20分間、好ましくは約15分のインキュベートを好都合に含み得る。

【0042】

本明細書の他に記載されるように、不活化のためのインキュベート条件は相当に変化することができ、10℃未満の温度でのインキュベートは1～24時間であってもよく、10～30℃の温度でのインキュベートは10分間～2時間であってもよく、30℃を上回る（たとえば、30～70℃、さらに好ましくは40℃）の温度でのインキュベートは通常5～30分間であろう。本明細書の実施例で示すように、不活化添加剤の濃度及び選択もインキュベートの時間／温度に影響するであろう。不活化添加剤は好ましくは前述の低いインキュベート温度にて使用されるであろう。

【0043】

代わりに検討すると、本発明のこの態様は、増幅反応混合物又は試薬から核酸混入物を取り除くことにおける本発明のエンドヌクレアーゼの使用を提供する。

【0044】

さらなる態様では、本発明は、核酸増幅反応における持ち越し汚染による疑陽性の結果を防ぐ又は減らす方法を提供し、前記方法は、本発明のエンドヌクレアーゼを用いて増幅反応混合物に存在する持ち越し汚染した非標的のポリヌクレオチド、又はその個々の成分を分解することを含む。

【0045】

本発明のエンドヌクレアーゼを用いてDNAポリメラーゼ調製物から核酸混入物を取り除くことができると共に、それを用いてDNAポリメラーゼを含む増幅反応混合物から核酸混入物を取り除くことができる。本発明のエンドヌクレアーゼの低い不活化温度は、除染の後のエンドヌクレアーゼの不活化がポリメラーゼに対する有害な影響なしで達成することができることを意味する。

【発明を実施するための形態】

【0046】

用語「核酸増幅反応」は、核酸の標的配列のコピー数を増やす試験管内の手段を指す。好ましくは、方法には「熱サイクル」、すなわち、高温のサイクルが関与するだろう。増幅方法には、PCR及びその改変、3SR、SDA、LAR又はLCR及びLAMP及びそれらの改変が挙げられるが、これらに限定されない。PCR、LAMP及びLCR及びそれらの改変は熱サイクル法である。方法は、標的配列のコピー数の線形の又は指数関数的な増加を生じる得る。「改変」には、リアルタイム増幅、定量的な及び半定量的な増幅、競合増幅等が包含されるが、これらに限定されない。

【0047】

標的の核酸は、選択される増幅方法に応じてDNA又はRNAであってもよい。たとえば、逆転写工程と組み合わせると、標的はRNA配列である見なすことができるけれども、PCRでは標的はDNAである。3SRはRNA標的配列を直接増幅する。

【0048】

用語「増幅反応混合物」は、標的核酸を増幅するのに使用される種々の試薬を含む、一

10

20

30

40

50

般に水性である溶液を指す。これらには、酵素、水性緩衝液、塩及びヌクレオシド三リン酸が含まれる。その用語は、増幅反応を上手く実施するのに必要な成分をすべて含有する混合物及び不完全であるので必要とされる成分の一部（たとえば、少なくとも2、3又は4）しか含有しない混合物を指す。用語「完全な」によって前置きされるのであれば、反応混合物は増幅に必要な成分をすべて含有する。

【0049】

用語「持ち越し汚染」は、反応混合物に偶然又は気付かずに導入される核酸、特に前の増幅反応から持ち越された標的配列を記載するのに使用される。

【0050】

用語「疑陽性の結果」は、検討中の核酸試料が標的配列を含有するが、増幅産物が持ち越し汚染に由来することを示すと思われる結果を指す。明らかに、本発明が提供する混入するDNAの減少は法医学及び診断の分野で特に有利である。本発明の方法は、核酸増幅の特異性及び感度を高めることを可能にする。

【0051】

用語「エンドヌクレアーゼ」は、ポリヌクレオチド骨格におけるホスホジエステル結合を加水分解し、ヌクレオチド配列に特異的ではない酵素を指す。本発明の「エンドヌクレアーゼI」はds及びssのポリヌクレオチド、DNA及びRNAを切断することができる。

【0052】

用語「ポリヌクレオチド」はヌクレオチドの任意の鎖を指す。これらのポリヌクレオチドはRNA又はDNAであることができ、二本鎖又は一本鎖のいずれかであることができる。鎖は線形又は超らせんでもあり得る。

【0053】

用語「塩」は、酸及び塩基の中和反応から生じるイオン性化合物を指す。関心のある塩は、DNA/タンパク質の相互作用を制限し、エンドヌクレアーゼの添加後、さらに純粋なタンパク質試料を作出するために一般に使用されるものであり、当業者はこれらの塩を知っているであろう。塩又は特定の重要性は塩化ナトリウム及び塩化カリウムである。

【0054】

「実質的に不活化される」によって、酵素が少なくとも95%不活化され、好ましくは98%不活化され、さらに好ましくは酵素が100%不活化されることを意味する。不活化の比率は、好適な緩衝液（たとえば、トリス、HEPES、PBS）において不活化されたエンドヌクレアーゼ又は不活化されないエンドヌクレアーゼのいずれかと共にDNA試料（たとえば、500bpのPCR産物）を37℃で3時間インキュベートし、電気泳動によって臭化エチジウムのアガロースゲル上で反応生成物を分離し、関連するDNAバンドの蛍光の相対強度をUV光のもとで測定することによって好都合に測定することができる。不活化されたエンドヌクレアーゼ又は不活化されないエンドヌクレアーゼの相対活性を測定するために代わりの方法が熟練者によって考案され得る。たとえば、DNA試料を含有するSYBR緑色の蛍光における相対的な変化が使用され得る。さらなる方法は、Kunitzのアッセイ（Kunitz, M; 1950, S. Gen. Physiol., 33: 363及びWO 2011/010094）及びYamamotoによって考案された改変されたKunitzのアッセイ（Yamamoto, M; 1971, Biochem. Biophys. Acta, 228: 95及びWO 2011/010094）である。好適な方法は本明細書の実施例にて記載される。

【0055】

「不可逆的な不活化」の恩恵は、エンドヌクレアーゼの触媒機能を温度の変化によって取り戻すことはできないので依然として不活化されたエンドヌクレアーゼを含有し得る処理された試料を、当該核酸を消化することなくその核酸と接触することが関与するさらなる処理又は応用で使うことができることである。従って、エンドヌクレアーゼがその活性を取り戻すことはなく、実質的に残留活性はなく、具体的には5%未満、好ましくは2%未満が残り、最も好ましくは検出可能なエンドヌクレアーゼ活性は残らない。本発明

10

20

30

40

50

の酵素はそのような「不可逆的な」不活化が可能である（そのような不活化を提供する条件は本明細書で記載される）ので、不活化は好ましくは不可逆的な不活化である。それが不活化添加剤、たとえば、金属イオンキレート剤又は還元剤の継続する存在に依存するとしても不活化は不可逆的であると見なすことができる。

【0056】

熱変化耐性の（「不可逆的な」）不活化を含む不活化は、上記で定義されたように不活化添加剤に依然として接触するエンドヌクレアーゼを必要とし得る。文脈から明瞭ではない限り、本明細書で記載される残留活性は、不活化添加剤、たとえば、0.1、好ましくは少なくとも0.2 Mの添加剤、たとえば、TCEPの継続する存在を前提とし；さらに弱い還元剤（たとえば、DTT）はさらに高い濃度、たとえば、少なくとも0.5又は1 mMを必要とし得る。通常、10 mM以下、好ましくは5 mM以下が必要とされる又は存在する。

10

【0057】

特定の応用については、不活化添加剤が存在しない又は本質的に存在しない場合でさえ不活性であるエンドヌクレアーゼIを有することが望ましくてもよい。不活化剤を除去する方法は当該技術で既知であり、それには透析及び脱塩カラム又は緩衝液交換カラムの使用が含まれる。本発明の酵素は適切に処理されれば、この程度に不活化することができる。好適な条件は実施例8に記載されている。適切な条件は、（i）使用される不活化添加剤の選択、（ii）エンドヌクレアーゼに添加される不活化添加剤の濃度、（iii）エンドヌクレアーゼが加熱される不活化温度（不活化添加剤の存在下で）、（iv）不活化温度でエンドヌクレアーゼがインキュベートされる時間、（v）不活化温度から冷却された後、エンドヌクレアーゼが保存される温度（不活化添加剤の存在下で）、及び（vi）エンドヌクレアーゼが保存温度でインキュベートされる時間に左右されるであろう。

20

【0058】

たとえば、不活化添加剤の濃度の上昇のような不活化に好都合なパラメータの一部に対する変更は、不可逆的な不活化が生じるためには、たとえば、不活化添加剤の存在下でエンドヌクレアーゼが保存温度で保存される必要がある時間のような他のパラメータに影響を及ぼし得ることを熟練者は十分に理解するであろう。

【0059】

例として、本発明者らは、10 mMのTCEPを加え、エンドヌクレアーゼを50 で60分間加熱し、その後2日間室温で保存（そのときTCEPを取り除く）すれば、不活化剤の非存在下でさえ、VsEndA__S44Eを不活性にし得ることを見いだした。

30

【0060】

或は、1 mMのTCEPをエンドヌクレアーゼに加え、エンドヌクレアーゼを再び50 で60分間加熱するが、保存温度を37 に高めると、不可逆的な不活化に必要な保存時間が1日に減る。

【0061】

最初に温度を高めることなくそのような不活化を達成することは可能である。たとえば、VsEndA__S44Eについては、10 mMのTCEPと共に37 で1日又は室温で4日間保存することによって不活化が達成され得る。これらの場合、本発明者らは、TCEPを透析によって取り除いた場合でさえ、酵素は不活性のままであることを見いだした。

40

【0062】

上述の不活化条件の変動は本発明のエンドヌクレアーゼが提供する自由度を示す。当該試料が不活化添加剤によって影響を受けないことが知られていれば、当業者は不活化の時間を減らし及び温度を下げるために試料中に添加剤を保持することを選択し得る。他方、当業者が不活化添加剤を取り除くことを望むのであれば、彼又は彼女は試料を不活化添加剤と共にさらに長い時間インキュベートし得る又はさらに高い不活化温度を適用し得る。

【0063】

実質的な不活化は、不活化添加剤の存在下で30 又は約30 、たとえば、28～3

50

2 の温度での15分以内のインキュベートで生じる。本発明のエンドヌクレアーゼは低い温度で又は短い時間で実質的に不活化し得るが、本発明によれば、D T Tの存在下に於て約30℃での約15分間の加熱が好ましくは酵素を実質的に不活化するのに十分である。これら2つのパラメータの一方の調整が他方を調整することによることに対して相殺できることは熟練者に容易に明らかであろう。たとえば、不活化温度を高めることはインキュベートの持続時間を減らすのを可能にし得る。逆にインキュベートの持続時間を増やすことは使用されるさらに低い不活化温度を可能にし得る。当然、当業者に容易に明らかでもあり、実施例にて示されるように、本発明のエンドヌクレアーゼが本発明の方法で使用される場合、15分より長いインキュベートの持続時間を使用してもよく、約30℃より高い不活化温度を使用してもよい。

10

【0064】

エンドヌクレアーゼの不活化の温度及び時間は、典型的なPCR又はタンパク質精製の緩衝液（たとえば、25 mMのトリス/HCl、pH 8.5、5 mMのMgCl₂）を模倣する溶液にてエンドヌクレアーゼをインキュベートすることによって評価されるべきである。エンドヌクレアーゼは、およそ0.1 U/μL ~ 100 U/μLの間、好ましくは1 ~ 50 U/μL、たとえば、25 ~ 30 U/μLの間で存在すべきである。好適なプロトコールは実質的に記載されている。

【0065】

反応混合物は好ましくは、当該試料又は当該タンパク質が安定であるpHである。7.0 ~ 9.5の間、好ましくは約8.5のpHが本発明のエンドヌクレアーゼの酵素活性に関して特に好適である。8.5のpHは典型的なPCR又はタンパク質精製の緩衝液にも適合する。

20

【0066】

有利なことに、本発明の熱不安定性エンドヌクレアーゼは、完全な増幅反応混合物にて完全に機能的であり、標準の試験管内の増幅の反応物質及び条件に適合する。酵素はまた、普通fg又はpgレベルの、しかし、好ましくは1 ngまでの好適な量の混入しているポリヌクレオチド又は持ち越し汚染を反応混合物から取り除くことが可能であるべきである。好ましくは、エンドヌクレアーゼは、37℃にて60分以内に、さらに好ましくは30分以内に、最も好ましくは15分以内に持ち越し汚染をすべて分解することができる。

【0067】

本発明の範囲に含まれるのはまた、本発明のエンドヌクレアーゼの酵素的に活性のある断片であり、触媒活性は切り詰め変異体及び他の変異体にて保持することができることが十分に理解される。実施例はエンドヌクレアーゼ活性の好適なアッセイを提供する。

30

【0068】

本発明は、VsEndAに対する好ましいS44E突然変異によって例示され、さらに一般的には、VsEndAの修飾型が本発明のエンドヌクレアーゼの好ましい実施形態である。セリンは、Glu(E)以外の残基、特にGluの遺伝的にコードされないホモログ又はスレオニン、アスパラギン又はグルタミンによって置き換えられてもよい。他のエンドヌクレアーゼI配列におけるセリン44と同等な残基が置換されてもよい。VsEndAにおけるセリン44と同等な残基は、図3及び図4の配列の配列比較にて他の種について示される。以下の表は、種々のVibrio種の配列同一性の比率（表1）及び配列番号1（VsEndA）による他の細菌の選択（表2）を示す。これらの表及び相当する図におけるエンドヌクレアーゼは本発明の教示に従って修飾するのに好ましいエンドヌクレアーゼであり、得られる酵素は本発明の好ましいエンドヌクレアーゼである。

40

【0069】

【表 1】

配列 1	配列 2	% 同一性
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. fischeri</i>	91
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. wodanis</i>	91
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. splendidus</i>	78
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	71
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. harveyi</i>	77
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. rotiferianus</i>	77
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. tubiashii</i>	73
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. sinaloensis</i>	74
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. vulnificus</i>	74
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. furnissii</i>	70
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. anguillarum</i>	71

10

【表 2】

配列1	配列 2	% 同一性
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	71
<i>V. salmonicida</i>	<i>Oceanimonas sp.</i>	64
<i>V. salmonicida</i>	<i>Salmonella sp.</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Yokenella sp.</i>	66
<i>V. salmonicida</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Escherichia coli</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Shigella sp.</i>	64
<i>V. salmonicida</i>	<i>Citrobacter sp.</i>	66
<i>V. salmonicida</i>	<i>Cronobacter sp.</i>	68
<i>V. salmonicida</i>	<i>Rahnella sp.</i>	63
<i>V. salmonicida</i>	<i>Erwinia sp.</i>	62
<i>V. salmonicida</i>	<i>Yersinia sp.</i>	63
<i>V. salmonicida</i>	<i>Serratia sp.</i>	62
<i>V. salmonicida</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	51

20

30

【0070】

好ましくは、本発明のエンドヌクレアーゼは *V i b r i o* のエンドヌクレアーゼ又はそれに由来する。さらに特に好ましい、本発明に従って修飾されたエンドヌクレアーゼは、*V i b r i o c h o l e r a e* (*V c E n d A*) に由来し、ペンタペプチドモチーフに隣接するセリンがグルタミン酸によって置き換えられる。

40

【0071】

好ましいエンドヌクレアーゼは、N末端のシグナルペプチドを欠くものであり、すなわち、配列番号4によって表され、又は配列番号4と少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%同一である配列によって表される。本発明の成熟エンドヌクレアーゼはシグナルペプチドを欠くので、文脈で明らかではない限り、配列番号1に対する本明細書での参照は、配列番号4に対する参照とも見なすことができる。配列番号4は図3及び図4の双方にて言及される最初の配列である。

【0072】

本発明の好ましいエンドヌクレアーゼは、配列番号1、3、4又は5の配列を有するが

50

、F Y C G C ペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基が負に荷電した又は極性の残基、好ましくは負に荷電した残基で置換されている。44位のセリンがグルタミン酸によって置き換えられている配列番号1又は4のエンドヌクレアーゼが最も好ましい。

【0073】

本発明のさらに好ましいエンドヌクレアーゼは、V i b r i o 種から入手可能なエンドヌクレアーゼIの配列を有するが、F Y C G C ペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基が負に荷電した又は極性の残基、好ましくは負に荷電した残基で置換されている。

【0074】

本明細書で議論されるように、同定されたペンタペプチドモチーフの残基N末端を置き換えるアミノ酸は疎水性であるべきではない。修飾された酵素、V s E n d A _ S 4 4 A (アラニン)を調製したが、収率はS 4 4 Eで達成されたものの約5%に過ぎず、それは非常に不安定で直ちに触媒活性すべてを喪失した。

【0075】

本発明に係る配列同一性比率は、初期設定のパラメータ(DNAギャップ開放ペナルティ=15.0; DNAギャップ伸長ペナルティ=6.66; DNAマトリクス=同一性; タンパク質ギャップ開放ペナルティ=10.0; タンパク質ギャップ伸長ペナルティ=0.2; タンパク質マトリクス=G o n n e t; タンパク質/DNAエンドギャップ=-1; タンパク質/DNAギャップD I S T=4)を用いた広く利用可能なアルゴリズム(たとえば、C l u s t a l W 2 多重配列比較プログラム(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2>)を用いた)を用いて算出することができる。

【0076】

エンドヌクレアーゼにおけるF Y C G C ペンタペプチドモチーフの直近N末端であるアミノ酸残基(すなわち、塩化物イオンとの錯体の一部を形成する極性残基)の正確な位置は、たとえば、図3及び図4で表されるもののような配列比較を生じるC l u s t a l W 2 のような標準の配列比較法を用いて容易に特定することができる。配列が完全に保存されたF Y C G C モチーフを欠くのであれば、配列比較のこれらの技法を用いて配列番号1におけるセリン44と同等の残基を特定するのはまだ可能である。

【0077】

本発明のエンドヌクレアーゼ及びその断片をコードする核酸分子は本発明のさらなる態様を構成し、配列番号2及びそれと少なくとも80又は90%同一の配列が好ましい。

【0078】

本発明はまた、核酸を増幅する方法における除染剤としての上述された特定のエンドヌクレアーゼの使用も提供する。本明細書で記載される除染方法での上述された特定のエンドヌクレアーゼの使用は本発明の特に好ましい実施形態を表す。

【0079】

上述されたようなエンドヌクレアーゼ又は酵素的に活性があるその断片を単離する及び精製する方法は本発明のさらなる態様を表す。従って、この態様では、本発明はそのような方法を提供し、前記方法は、好適な宿主細胞(たとえば、P i c h i a p a s t o r i s ; E s c h e r i c h i a c o l i ; S . c e r e v i c i a e、バキュロウイルスを感染させた昆虫細胞)にて前記エンドヌクレアーゼ又はその断片を発現させ、その後、前記宿主細胞及び/又は前記細胞が培養された培地からエンドヌクレアーゼを分離することを含む。前記エンドヌクレアーゼ又はその断片の発現は、前記エンドヌクレアーゼ又はその断片をコードする発現ベクターを好適な宿主細胞の中に組み入れることによって達成することができる。これらの発現力セット及び核酸分子を含む宿主細胞は本発明によって包含される。

【0080】

当該技術で既知の及び文献にて広く記載されたタンパク質の精製法のいずれか又はその

10

20

30

40

50

任意の組み合わせを用いて、エンドヌクレアーゼ酵素を宿主細胞／培養培地から分離してもよく又は単離してもよい。そのような技法には、たとえば、沈殿、限外濾過、透析、種々のクロマトグラフィ法、たとえば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、電気泳動、遠心等が挙げられ得る。

【0081】

同様に、当該技術で周知の技法、たとえば、均質化、凍結融解等を用いて宿主細胞の抽出物を調製してもよく、この抽出物から本発明のエンドヌクレアーゼを精製することができる。

【0082】

イオン交換クロマトグラフィ及びアフィニティクロマトグラフィの組み合わせに基づく、たとえば、セファロースカラム、たとえば、Redセファロース（スウェーデンのPharmacia Biotech）又はBlueセファロース（GE Healthcare）のカラムに基づく精製プロトコルを容易に用いて酵素を単離し得ることが分かっている。

10

【0083】

さらに詳しくは、抽出物をイオン交換クロマトグラフィに供してNaCl勾配によってタンパク質を溶出し得る。エンドヌクレアーゼ活性を含有する分画を透析し、NaClによる最終溶出の前にアフィニティクロマトグラフィにかけてもよい。

【0084】

本発明のエンドヌクレアーゼの収率は非常に良好なので、代わりに検討すると、本発明は、ペントペプチドモチーフFYCGCの直近N末端の残基を負に荷電した残基又は極性の残基によって置換することを含む組換えで発現させたエンドヌクレアーゼIの収率を高める方法を提供する。このように修飾され得る好適なエンドヌクレアーゼは本明細書で記載され、たとえば、図3及び図4にて例示される。好適な発現方法は上記で記載されている。

20

【0085】

本発明はまた、本発明に係る少なくともエンドヌクレアーゼを含むキットも提供する。キットはまた核酸増幅反応を実施するために必要な試薬、緩衝液、酵素等の一部又はすべても含有し得る。さらに詳しくは、キットは、ヌクレオチド三リン酸（鎖置換増幅のためのチオール基を含有するATP（dATP S）を含む）、オリゴヌクレオチドプライマー、好ましくは約30で機能することが可能であるもの、DNAポリメラーゼ、好ましくは熱不安定性ポリメラーゼ、たとえば、Taqポリメラーゼ又はBstポリメラーゼ（及びそのホットスタート型）又は、LARの場合、DNAリガーゼ（好ましくは、熱不安定性リガーゼ、たとえば、Ampligase（登録商標）、又はPyrococcus furiosusから単離される米国特許第6,280,998号にて開示されたもの、及び制限酵素（好ましくはBsoB1のような熱不安定性の制限酵素）を含有し得る。エンドヌクレアーゼは、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、鎖置換ポリメラーゼ、又はLCRリガーゼと一緒に1つの区画にて提供され得る。

30

【0086】

キットは、本発明に関連する手順を実施する方法に関する指針としての資料を含有し得る。特に不活化条件に関する指針が提供される。好適な条件は本明細書の他で記載されるが、キット又は酵素と共に提供され得るさらなる一般例として、表3は、Vibriosalmonicidaに由来し、Ser44Gluの突然変異伴ったエンドヌクレアーゼ（VsEnd_S44E）の不活化に好適である不活化添加剤の存在下で提案されたインキュベーション条件を提供する。

40

【0087】

【表 3】

温度 (°C)	ジチオスレイトールの濃度 (DTT) /時間	トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) の濃度 /時間
25	20mM/60分	15mM/60分
40	10mM/30分	5mM/30分
50	1mM/30分又は 10mM/15分	0.5mM/30分
60	1mM/30分	0.5mM/30分又は 10mM/15分
65	1mM/30分	1mM/30分
70	1mM/30分	1mM/30分

10

【0088】

本発明はまた、本発明のエンドヌクレアーゼと核酸増幅及び方法を実施するのに必要な1以上の試薬、たとえば、上述の成分を含む組成物も提供する。通常、そのような組成物は水性であり、トリス、H E P E S等のような標準の緩衝液によって緩衝化されるであろう。

20

【0089】

さらなる態様では、本発明は、第2のエンドヌクレアーゼI又は酵素的に活性があるその断片と一緒に本明細書で定義されるようなエンドヌクレアーゼI又は活性がある断片を含む組成物を提供する。好ましくは、第2のエンドヌクレアーゼI又は酵素的に活性があるその断片は配列番号5の配列又はそれと少なくとも80%同一である配列を有する。第2の酵素は、それをさらに容易に不活化する突然変異を、たとえば、ネイティブの*V i b r i o c h o l e r a e*の配列に組み入れ得る。そのような組み合わせは、組成物が全体としてさらに大きな範囲のpH及び/又は塩濃度及び/又は温度で有効なエンドヌクレアーゼ活性を提供するのを可能にする。

【図面の簡単な説明】

30

【0090】

本発明は今や、以下の図面を参照して非限定の実施例によって説明されるであろう。

【図1】*V i b r i o s a l m o n i c i d a* (V s E n d A) 及び*V . c h o l e r a e* E n d A (V c E n d A) に由来するエンドヌクレアーゼのアミノ酸配列 (シグナルペプチドを含む)、それぞれ配列番号1及び配列番号3の配列比較を示す図である。

【図2】S e r 4 4 G l uの変異を伴うV s E n d A (V s E n d A _ S 4 4 E) の核酸配列及びアミノ酸配列 (シグナルペプチドを含む)、それぞれ配列番号2及び配列番号6を示す図である。

【図3】様々な属の種からの細菌に由来する野生型エンドヌクレアーゼのアミノ酸配列 (シグナルペプチドを除く) の配列比較データを示す図である。

40

【図4】*V i b r i o* 属の種々の細菌に由来する野生型エンドヌクレアーゼのアミノ酸配列 (シグナルペプチドを除く) の配列比較データを示す図である。

【図5】それぞれp P I C 9 K - V s E n d A _ S 4 4 E 及び野生型の発現カセットを含有する*P i c h i a p a s t o r i s* 宿主細胞におけるV s E n d A _ S 4 4 E 変異体 (S e r 4 4 G l uの変異を伴うV s E n d A エンドヌクレアーゼ) 及び野生型V s E n d A 酵素 (配列番号1) の発現レベルを示す図である。

【図6】1 mMのD T Tの存在下及び非存在下における40 (6 a) 及び50 (6 b) でのV s E n d A 及びV s E n d A _ S 4 4 E の不活化の速度を示す図である。

【図7】1 mMの以下の不活化添加剤: D T T、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 及び2 - メルカプトエタノールの1つの存在下における40 でのV s

50

End A__S 4 4 E の不活化の速度を示す図である。

【図 8】5 0 (図 8 a)、4 0 (図 8 b)、3 0 (図 8 c) 又は 2 5 (図 8 d) の温度にて 1 5、3 0 又は 6 0 分間、1 m M、1 0 m M 又は 2 0 m M の濃度での D T T の存在下で不活化されている V s E n d A__S 4 4 E 及び野生型 V s E n d A のエンドヌクレアーゼの活性を示すアガロースゲルの写真である。結果を酵素なし(陰性対照)又は 6 U の野生型 V s E n d A (陽性対照)のいずれかに対して比較した。

【図 9】1 m M、1 0 m M 又は 2 0 m M の濃度での D T T (図 9 a) 又は T C E P (図 9 b) の存在下で 4 にて 6 又は 1 8 時間インキュベートした V s E n d A__S 4 4 E 及び野生型 V s E n d A のエンドヌクレアーゼの活性を示すアガロースゲルの写真である。結果を酵素なし(陰性対照)又は 6 U の野生型 V s E n d A (陽性対照)のいずれかに対して比較した。

10

【図 1 0】V s E n d A__S 4 4 E 変異体を用いた市販の A c c u S t a r t (商標) T a q DNA ポリメラーゼ(図 9 a) 又は G o T a q (登録商標) ホットスタートポリメラーゼ(図 9 b) からの添加された DNA の除去の程度を示す図である。

【図 1 1】V s E n d A__S 4 4 E 変異体を用いた市販の M a x i m a q P C R マスターミックスからの添加された DNA の除去の程度を示す図である。

【図 1 2】0 . 5 M の塩化ナトリウム(図 1 1 a) 又は 1 M の塩化ナトリウム(図 1 1 b) を含有する溶液にて V s E n d A__S 4 4 E 変異体を用いた市販の T E M P a s e D N A ポリメラーゼからの添加した細菌のゲノム DNA の除去の程度を示す図である。

【図 1 3】種々の塩化ナトリウム溶液(0 M、0 . 2 5 M、0 . 5 M、0 . 7 5 M、及び 1 . 0 M) にて V s E n d A__S 4 4 E 変異体を用いた組換えで発現させたタンパク質を含有する大腸菌の細胞溶解物溶液からの添加した細菌のゲノム DNA の除去の程度を示す図である。

20

【図 1 4】高い塩分濃度の溶液における V s E n d A__S 4 4 E 変異体の最適な活性を示す図である。活性は、様々な濃度の塩化ナトリウム及び塩化カリウムを伴った 2 5 m M のトリス / H C l 緩衝液、p H 8 . 5、5 m M の塩化マグネシウム中で調べた。得られた最大活性を 1 0 0 % に設定した。

【図 1 5】種々の温度での V s E n d A__S 4 4 E 変異体の活性を示す図である。活性は、5 m M の塩化マグネシウム及び 0 . 5 M の塩化ナトリウムを含有する 2 5 m M のトリス / H C l 緩衝液、p H 8 . 5 中で調べた。

30

【図 1 6】市販のベンゾナーゼ(*S e r r a t i a m a r c e s c e n s*)ヌクレアーゼと比較したときの、p H 及び塩化ナトリウムの様々なレベルでの DNA を分解する V s E n d A__S 4 4 E 変異体の能力を示す図である。反応は、7 . 5、8 . 0 又は 8 . 5 の p H 及び 0 . 2 5 M 若しくは 0 . 5 M (図 1 6 a) 又は 0 . 7 5 M 若しくは 1 . 0 M (図 1 6 b) の塩化ナトリウム濃度にて実施した。反応混合物は、5 m M の塩化マグネシウムを伴った 1 0 0 μ L のトリス / H C l 緩衝液、5 0 μ g のウシ胸腺 DNA 及び 3 0 0 U の V s E n d A__S 4 4 又はベンゾナーゼを含有した。反応混合物を 3 7 で 3 0 分間インキュベートした。E D T A を含有する負荷緩衝液を用いて反応を止め、1 % アガロースゲル上で流した。

【図 1 7】DNA 結合タンパク質を含有する大腸菌細胞溶解物における DNA を分解する V s E n d A__S 4 4 E 変異体の能力を示す図である。様々な塩化ナトリウム濃度にて V s E n d A__S 4 4 E を大腸菌細胞溶解物に加え、3 7 で 3 0 分間インキュベートした。対照は塩化ナトリウムを含有しない。

40

【0 0 9 1】

その中で

配列番号 1 は、シグナルペプチドを含む、野生型の *V i b r i o s a l m o n i c i d a* のエンドヌクレアーゼ I の c D N A ヌクレオチド配列の翻訳された部分のアミノ酸配列である。

配列番号 2 は、シグナルペプチドを含む、*V i b r i o s a l m o n i c i d a* のエンドヌクレアーゼ I (T C C から G A G への変異を伴った V s E n d A) の c D N A ヌクレ

50

オチド配列である。

配列番号3は、シグナルペプチドを含む、野生型 *Vibrio cholera* のエンドヌクレアーゼIのcDNAヌクレオチド配列の翻訳された部分のアミノ酸配列である。

配列番号4は、シグナルペプチドを含まない、野生型の *Vibrio salmonicida* のエンドヌクレアーゼIのcDNAヌクレオチド配列の翻訳された部分のアミノ酸配列である。

配列番号5は、シグナルペプチドを含まない、野生型 *Vibrio cholera* のエンドヌクレアーゼIのcDNAヌクレオチド配列の翻訳された部分のアミノ酸配列である。

配列番号6は、シグナル配列を含む、変異体 *Vibrio salmonicida* のエンドヌクレアーゼI(44位にてセリン残基がグルタミン酸残基で置換されたVsEndA)のアミノ酸配列である。

配列番号7～配列番号20は、表2及び図3に記載されたような様々な属の種からの細菌に由来する、シグナルペプチドを含まないエンドヌクレアーゼIのアミノ酸配列である。

配列番号21～配列番号30は、表1及び図4に記載されたような *Vibrio* 属の種々の細菌に由来する、シグナルペプチドを含まないエンドヌクレアーゼIのアミノ酸配列である。

【実施例】

【0092】

実施例1：クローニング及び変異誘発

Vibrio salmonicida のエンドヌクレアーゼIの遺伝子を、その遺伝子を含むベクターからPCRで増幅し、*Pichia pastoris* 用のpPIC9K発現ベクターにクローニングした。*Vibrio salmonicida* のエンドヌクレアーゼIのネイティブなシグナル配列を除外したので、発現プラスミドによってコードされた接合因子に続く *Vibrio salmonicida* のエンドヌクレアーゼIのアミノ酸配列はAPPSSFだった。

【0093】

AgilentのQuickChange(商標)変異誘発キットを用い、製造元の指示書に従って残基44にてセリン(Ser)からグルタミン酸(Glu)へと *V. salmonicida* のエンドヌクレアーゼI(VsEndA)を変異させた。切り詰めたVsEndA配列を含むpPIC9Kベクターを鋳型として用いた。変異誘発反応の後の正しい配列はDNA配列決定によって検証した。

実施例2：発現及び精製

【0094】

SacIを用いてpPIC9K-VsEndA__S44Eベクターを線形化し、*Pichia pastoris* 発現キット(Life Technologies)のマニュアルに記載されたように *Pichia pastoris* GS115にて形質転換した。*Pichia* 発現キットに記載されたように、*V. salmonicida* S44EのエンドヌクレアーゼI(VsEndA__S44E)を振盪フラスコにて本質的に発現させた。BMGY培地にてVsEndA__S44Eを含むGS115株の前培養物50mLを30で一晩培養した。細胞を遠心し、250mLのBMMYに再浮遊させ、20にて72時間発現を行った。0.5%の最終濃度でメタノールを24時間ごとに加えた。遠心によって細胞を取り除き、上清を精製のための出発材料として用いた。カチオン交換クロマトグラフィーを用いてVsEndA__S44Eを精製した。25mMのトリス/HCl、pH8.3、5mMのMgCl₂にて平衡化したSP-セファロースFF(1.6/3)カラムに5cm/分の流量を用いて上清(250mL)を適用した。上記緩衝液中250mLの0.4MのNaClでカラムを洗浄した。25mMのトリス/HCl、pH8.3、5mMのMgCl₂+1MのNaClを用いてVsEndA__S44Eの溶出を行った。VsEndA__S44E活性を含む分画をプールし、最終的に濃縮した。

実施例3：ヌクレアーゼ活性の測定

【0095】

ヌクレアーゼ活性は、K u n i t z (Kunitz, M., 1950, Crystalline Deoxyribonuclease, II, Digestion of Thymus Nucleic Acid. The Kinetics of Reaction. J. Gen. Physiol., 33, 363-377) の手順に従ってアッセイしてもよい。これの改変された組成を用いてヌクレアーゼ活性を測定している。最終容量 1 mL の 25 mM のトリス / HCl、pH 8.5、0.5 M の NaCl、5 mM の MgCl₂ 中 5 μg のウシ胸腺 DNA に 10 μL の酵素調製物を加える。混合物を 37 でインキュベートし、吸収の上昇を 260 nm にて測定する。1 U = 1 分当たりの 0.01 OD₂₆₀ の上昇。

【0096】

試験を行い、それによって V s E n d A _ S 4 4 E 変異体の活性を種々の温度で（還元剤の非存在で）評価した。図 15 は、V s E n d A _ S 4 4 E が約 35 で最適な活性を有するが、広い温度範囲（10 及び 50 にて 20 % の活性）にわたって機能することを示す。

実施例 4：野生型（V s E n d A）に対する V s E n d A _ S 4 4 E の発現レベルの比較

【0097】

p P I C 9 K - V s E n d A _ S 4 4 E の発現カセットを含有する G S 1 1 5 株の 50 mL の前培養物を、野生型の発現カセットを含有する株と比較した。B G M Y 培地にて 30 で 2 つの株を一晩培養した。細胞を遠心し、250 mL の B M M Y に再浮遊させ、20 にて 72 時間発現を行った。0.5 % の最終濃度でメタノールを 24 時間ごとに加え、記載されたようにヌクレアーゼ活性を測定した。

【0098】

図 5 は、細胞上清にて U / mL で測定した活性のある発現された酵素という点で、V s E n d A _ S 4 4 E 変異体は P i c h i a p a s t o r i s にて野生型 V s E n d A 酵素よりも高い発現レベルを提供することを示す。図の説明では、V s E n d A _ S 4 4 E 変異体は「S 4 4 E」に短縮され、野生型 V s E n d A は「w t」に短縮されている。

【0099】

上記（実施例 2 にて）記載されたように精製した後、表 4 に示すように V s E n d A _ S 4 4 E の比活性は V s E n d A よりも約 20 % 高いことが確定する。

【表 4】

エンドヌクレアーゼ	活性 (U/mL)	タンパク質濃度 (mg/mL)	比活性 (U/mg)
VsEndA_S44E	1.69×10^7	0.69	2.4×10^7
VsEndA	1.12×10^7	0.56	2.0×10^7

実施例 5：V s E n d A と比べた V s E n d A _ S 4 4 E の温度安定性

【0100】

野生型（V s E n d A）酵素の半減期は 70 でおよそ 2 時間及び 60 で 5 時間である（データは示さず）。

【0101】

25 mM のトリス / HCl、pH 8、5 mM の MgCl₂、150 mM の NaCl、0.01 % の T r i t o n X - 1 0 0 及び ± 1 mM のジチオスレイトール（D T T）を含有する緩衝液にて酵素、V s E n d A _ S 4 4 E 及び V s E n d A を 200, 000 U / mL の濃度に希釈した。6 × 100 μL の容量を異なるエッペンドルフチューブに移した。試料を 40 又は 50 で 0 ~ 40 分間インキュベートし、その後、順次氷上に置いた。実施例 3 に記載されたような改変 K u n i t z アッセイを用いて残っている活性を測定した。図 6 に示すデータから、V s E n d A _ S 4 4 E 及び V s E n d A の双方について、D T T の添加が熱不活化に必要とされることは明らかである。D T T の添加の際、酵素はさらに速い速度で不活化する。図の説明では、V s E n d A _ S 4 4 E 変異体は「S 4 4 E」に短縮され、野生型 V s E n d A は「w t」に短縮されている。

実施例 6：様々な還元剤を用いた温度不活化

【0102】

D T T、トリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィン（T C E P）及び2 - メルカプトエタノールを含むある範囲の不活化添加剤を用いて不活化されるV s E n d A __ S 4 4 E の能力を40℃の温度で調べた。

【0103】

図7に示すデータを図6aのものと比べると、不活化添加剤はすべて不活化を促進すると判定することができる。D T T及びT C E Pは、2 - メルカプトエタノールに比べて不活化添加剤としてさらに有効であることが分かった。図の説明では、V s E n d A __ S 4 4 E 変異体は「S 4 4 E」に短縮され、野生型V s E n d Aは「w t」に短縮されている。

10

実施例 7：熱不活化実験

【0104】

温度安定性を調べ、熱を用いてV s E n d A __ S 4 4 E を完全に不活化することが可能であるかどうかを判定するために、熱不活化酵素の存在下で精製したP C R産物の完全性を評価した。それは温度の低下の際、不活化が可逆的であるか、又は不可逆的であるかどうかを調べることができるので、実施例3に記載された改変K u n i t zアッセイに比べて、これはさらに感度のよいアッセイを提供する。

【0105】

25 mMのトリス / H C l、p H 8 . 5、0 . 5 MのN a C l、5 mMのM g C l₂緩衝液における酵素（V s E n d A __ S 4 4 E又は野生型、V s E n d A、130 U / μ L）を総容量50 μ Lでエッペンドルフチューブに移した。新しく作製したジチオスレイトール（D T T）を1、10又は20 mMの最終濃度で加えた。種々の温度にて15、30又は60分間試料を熱不活化した。不活化工程の後、チューブを氷上に置いた。

20

【0106】

25 mMのトリス / H C l、p H 8 . 5、5 mMのM g C l₂、及び0 . 5 MのN a C lから成る緩衝液における500 ngの500 bpのP C R産物に5 μ Lの熱不活化酵素を添加することによって残留活性の測定のためのアッセイを実施した。試料を37℃で3時間インキュベートした。不活化のために酵素調製物にD T Tを加えた場合、それは残留活性のアッセイにおいても存在した。

30

【0107】

最終的に、P C R産物の分解を測定するには、試料を1%アガロースゲル上で解析した。陰性対照（酵素なし）及び陽性対照（6 Uのw t酵素を含有する）を上記反応と同じ方法で処理した。

【0108】

図8は、50℃、40℃、30℃及び25℃にて野生型、V s E n d A酵素と比べたV s E n d A __ S 4 4 E 変異体の熱不活化実験を要約する。陰性対照は無傷のP C R産物を示すのに対して陽性対照は約1%の残留酵素の影響を説明する。50℃では、V s E n d A __ S 4 4 E 変異体酵素は1 mMのD T Tの存在下にて15分後完全に不活化されることが見いだされた一方で、野生型は部分的にしか不活化されなかった。40℃では、V s E n d A酵素を部分的に不活化するのに必要とされる10 mMに比べて、1 mMのD T Tは15分後V s E n d A __ S 4 4 E 変異体を部分的に不活化することができた。25℃では、20 mM以下の濃度でのD T Tは60分後、V s E n d A酵素を完全には不活化できなかった一方で、10 mMのD T Tが60分後、V s E n d A __ S 4 4 E 変異体を完全に不活化できたということは、置換の効果を実証している。V s E n d A __ S 4 4 E 変異体酵素を30℃で完全に不活化するには少なくとも10 mMのD T Tの添加が必要である。図の説明では、V s E n d A __ S 4 4 E 変異体は「S 4 4 E」に短縮され、野生型V s E n d Aは「w t」に短縮されている。

40

【0109】

さらなる熱不活化の実験では、上述と同じ対照を用いて、1 mM、10 mM又は20 mM

50

Mのいずれかの濃度にてD T T又はT C E Pのいずれかの存在下で4 においてV s E n d A __ S 4 4 E変異体を野生型V s E n d A酵素と比較した。図9に示すように、この低温においてさえ、10 mMのD T T又はT C E Pの存在は6時間後、V s E n d A __ S 4 4 E変異体を完全に不活化することができた。比較して、20 mMのD T Tでさえ18時間のインキュベート後、野生型V s E n d A酵素を不活化することができなかった。T C E Pは、この温度にて10 mMの濃度で18時間のインキュベート後、又は20 mMの濃度で6時間のインキュベート後、V s E n d A酵素を完全に不活化することが示された。

実施例8：熱不活化実験 - T C E Pの非存在下での残留活性

【0110】

本実施例では、我々は、不活化添加剤が取り除かれた後、V s E n d A __ S 4 4 Eの不活化が依然として観察される条件を決定した。

【0111】

本実施例は、不活化添加剤、T C E Pを検討し、不活化が生じた後、P u r - A - L y z e r透析チューブ(S i g m a)を用いてT C E Pを取り除くことを除いて実施例7と同様に行った。2日間の透析の間に緩衝液を1回交換した。実施例7に記載したように1%アガロースゲルを用いて残留活性の測定を行った。

【0112】

この試験で決定された最適な不活化パラメータの選択を表5に提示する。

【表5】

パラメータ				
(i) (mM)	(ii) (°C)	(iii) (分)	(iv) (°C)	(v) (日)
10	50	60	RT	2
10	N/A	N/A	37	1
10	N/A	N/A	RT	4
1	50	60	37	1

表5 - V s E n d A __ S 4 4 Eの不活化を達成するのに必要とされるパラメータ。パラメータ(i)：エンドヌクレアーゼに添加された不活化添加剤T C E Pの濃度(mM)、パラメータ(ii)：(不活化添加剤の存在下で)エンドヌクレアーゼが加熱される不活化温度(°C)、パラメータ(iii)：不活化温度でエンドヌクレアーゼが加熱される時間(分)、パラメータ(iv)：不活化温度から冷却された後、(不活化添加剤の存在下で)エンドヌクレアーゼが保存される温度(°C、又は室温についての「RT」)、及びパラメータ(v)：保存温度でエンドヌクレアーゼがインキュベートされる時間(日)。パラメータ(ii)及び(iii)についての「NA」は、V s E n d A __ S 4 4 Eが不活化温度に加熱されない場合に適用される。

実施例9：DNAポリメラーゼ調製物からの混入しているDNAの除去

【0113】

典型的なポリメラーゼ緩衝液における市販のDNAポリメラーゼから混入している細菌のゲノムDNAを取り除くV s E n d A __ S 4 4 Eの能力を調べた。10 mMのトリス/HCl、111 mMのKCl、5.6 mMのMgCl₂から成る緩衝液にて37 °Cで15分間、0.14 U/μLのAccustart(Quanta Biosciences)、Tempase(VWR)又はGoTaq(Promega)を28 U/μLのV s E n d A __ S 4 4 Eで処理した。37 °Cでの15分間のインキュベートの後、D T Tを10 mMの最終濃度で加え、V s E n d A __ S 4 4 E変異体を不活化するために40 °Cで30分間試料をインキュベートした。最終的にプライマー、プローブ及びd N T Pを加え、ポリメラーゼ反応混合物における成分の最終濃度は、10 mMのトリス/HCl、20 mMのKCl、5 mMのMgCl₂から構成される緩衝液にて25 mU/μLのDNAポリメラーゼ、300 nMの各プライマー、200 nMのプローブ、100 μMのd A T P、d C T P、d G T P及び200 μMのd U T Pだった。

【0114】

以下の対照：(a) V s E n d A __ S 4 4 E の代わりに緩衝液を含有する試料、(b) 緩衝液と大腸菌のゲノムDNAを含有する試料、(c) V s E n d A __ S 4 4 E の不活化の前に大腸菌のゲノムDNAが加えられた試料、及び(d) V s E n d A __ S 4 4 E の不活化の後に大腸菌のゲノムDNAが加えられた試料が含まれた。S t r a t a g e n e M x 3 5 0 0 P (A g i l e n t t e c h n o l o g i e s) における20 μ L の反応物中でq P C Rを行ったが、熱サイクル条件はDNAポリメラーゼの製造によって推奨されたとおりであった。

【0115】

V s E n d A __ S 4 4 E は、調べてポリメラーゼすべてから混入している細菌のゲノムDNAを取り除くことができた。図10は、A c c u s t a r t ポリメラーゼ及びG o T a q ポリメラーゼのV s E n d A __ S 4 4 E 処理の効果を説明する。図の説明では、V s E n d A __ S 4 4 E 変異体は「S 4 4 E」に短縮されている。混入している細菌のDNAのレベルは低下し、添加された大腸菌のゲノムDNAは取り除かれた。V s E n d A __ S 4 4 E 処理の後、ポリメラーゼ機能の損傷はない又は最小限に抑えられる。

実施例10：P C R マスターミックスからの混入しているDNAの除去

【0116】

市販の定量P C R (q P C R) のマスターミックスは、微量の混入している細菌のゲノムDNAを含有することが示されている。本実施例では、市販のq P C R のマスターミックスから細菌のゲノムDNA混入物を取り除くV s E n d A __ S 4 4 E の能力を調べた。M a x i m a q P C R のマスターミックス(F e r m e n t a s) 又はE x p r e s s q P C R スーパーミックスユニバーサル(I n v i t r o g e n) を25 U / μ L のV s E n d A __ S 4 4 E で37 °Cにて15分間処理した。S 4 4 E __ E n d I は10 mM のD T T (1 - 4 ジチオスレイトール) を加え、40 °Cで30分間インキュベートすることによって不活化した。ポリメラーゼからの混入しているDNAの除去に対するV s E n d A __ S 4 4 E 処理の効果を調べるために、以下の対照：(a) V s E n d A __ S 4 4 E の代わりに緩衝液を含有する試料、(b) 緩衝液の前に大腸菌のゲノムDNAを加えた試料、(c) 緩衝液の後に大腸菌のゲノムDNAを加えた試料、(d) V s E n d A __ S 4 4 E の不活化の前に大腸菌のゲノムDNAを加えた試料、及び(e) V s E n d A __ S 4 4 E の不活化の後に大腸菌のゲノムDNAを加えた試料と一緒にS 4 4 E __ E n d I で処理した試料の1つを解析した。最終的にプライマー及びプローブをそれぞれ300 nM及び200 nMの最終濃度で加えた。プライマー及びプローブは、C o r l e s s ら(J Clin. Microbiol. 2000, 38(5):1747-52)によって記載されたように大腸菌の16 S r R N A 遺伝子を標的とした。熱サイクル条件は以下のとおりである：50 °Cで2分間、95 °Cで10分間、その後、95 °Cで30秒間と60 °Cで30秒間と72 °Cで30秒間を45サイクル。S t r a t a g e n e M x 3 5 0 0 P (A g i l e n t t e c h n o l o g i e s) にて20 μ L の反応物でq P C Rを実施した。

【0117】

図11で説明するように、V s E n d A __ S 4 4 E はM a x i m a q P C R マスターミックスにおける混入している細菌のゲノムDNAのレベルを下げるができる。図の説明では、V s E n d A __ S 4 4 E 変異体は「S 4 4 E」に短縮されている。さらに、大腸菌DNAが添加されたマスターにV s E n d A __ S 4 4 E を加えることは、V s E n d A __ S 4 4 E 処理した(非添加の)マスターミックスと同じQ C 値を生じる。S 4 4 E __ E n d I はマスターミックスに含有された細菌DNAの混入物の一部を取り除くこともできる。ポリメラーゼ反応はV s E n d A __ S 4 4 E の処理によって影響されない。従って、V s E n d A __ S 4 4 E は混入しているDNAを取り除くことができ、完全に不活化されることができ、不活化されたV s E n d A __ S 4 4 E はポリメラーゼの性能を損傷しない。同様の結果はE x p r e s s q P C R スーパーミックスユニバーサル(L i f e T e c h n o l o g i e s) でも得られた(データは示さず)。

実施例11：高い塩分濃度のポリメラーゼ溶液からの細菌のゲノムDNAの除去

【0118】

V s E n d A _ S 4 4 E の不活化を容易に達成することができるので、ヌクレアーゼ活性が混じってはならないタンパク質の精製に V s E n d A _ S 4 4 E 処理は特に有用である。さらに、DNA 結合タンパク質の精製では、タンパク質調製物に塩を加えて DNA / タンパク質の相互作用を制限することができるので、塩によって活性があるヌクレアーゼの使用は好都合である。本実施例では、我々は、0.5 M 及び 1.0 M の塩化ナトリウムの溶液にて DNA ポリメラーゼから DNA の混入物を取り除く V s E n d A _ S 4 4 E の能力を調べた。

【0119】

25 mM のトリス - H C l、5 mM の M g C l₂ 及び 0.5 M 又は 1.0 M の N a C l における T E M P アーゼ ホットスタート ポリメラーゼ (V W R) を 25 U / μ L の V s E n d A _ S 4 4 E で 37 °C にて 15 分間処理した。以下の対照: (a) V s E n d A _ S 4 4 E の代わりに緩衝液を含有する試料、(b) 緩衝液の前に 20 p g の大腸菌のゲノム DNA を加えた試料、及び (c) V s E n d A _ S 4 4 E の不活化の前に 20 p g の大腸菌のゲノム DNA を加えた試料を上記試料と一緒に解析した。10 mM の D T T を加え、40 °C で 30 分間インキュベートすることによって V s E n d A _ S 4 4 E を不活化した。不活化工程の後、製造元の指示書に従って、7 K のカットオフの Z e b a (商標) S p i n D e s a l t i n g カラム (T h e r m o S c i e n t i f i c) を用いて試料の緩衝液をポリメラーゼ緩衝液に変えた。最終的にプライマーとプローブを加え、ポリメラーゼ緩衝液の構成成分は以下のとおりである: 10 mM のトリス - H C l、20 mM の K C l、5 mM の M g C l₂、100 μ M の d A T P、d C T P、d G T P 及び 200 μ M の d U T P、300 n M の各プライマー及び 200 n M の各プローブ。熱サイクル条件は以下のとおりである: 95 °C で 15 分間、その後、95 °C で 30 秒間と 60 °C で 30 秒間を 45 サイクル。S t r a t a g e n e M x 3 5 0 0 P (A g i l e n t t e c h n o l o g i e s) にて 20 μ L の反応物で q P C R を実施した。

【0120】

図 12 は、0.5 M 及び 1.0 M の塩化ナトリウムを含有するポリメラーゼ溶液における V s E n d A _ S 4 4 E の処理を説明する。図の説明では、V s E n d A _ S 4 4 E 変異体は「S 4 4 E」に短縮されている。これらの図は、ポリメラーゼ溶液から添加された大腸菌 DNA を取り除く V s E n d A _ S 4 4 E 変異体の能力が高い塩分濃度に影響されなかったことを示している。

【0121】

別の試験では、様々な塩化ナトリウム及び塩化カリウムの濃度の範囲にわたって V s E n d A _ S 4 4 E 変異体の能力を評価した。図 14 は、V s E n d A _ S 4 4 E が約 0.5 M の塩化ナトリウムで最適な活性を有するが、広い範囲の塩化ナトリウム及び塩化カリウムの濃度で効果があることを説明する。

【0122】

さらなる試験では、様々な塩化ナトリウム濃度及び pH レベルの範囲でのウシ胸腺 DNA を分解することにおける V s E n d A _ S 4 4 E 変異体の酵素活性を市販のベンゾナーゼ (S e r r a t i a m a r c e s c e n s) ヌクレアーゼの活性と比較した。図 16 は、V s E n d A _ S 4 4 E がベンゾナーゼに比べて広い範囲の pH レベル及び塩化カリウムで DNA を分解することを説明する。

【0123】

さらなる試験では、様々な塩化ナトリウム濃度の範囲で大腸菌細胞溶解物からの DNA を分解する V s E n d A _ S 4 4 E 変異体の酵素活性を評価した。図 17 は、0.25 M ~ 1.0 M の塩化ナトリウム濃度にて V s E n d A _ S 4 4 E 変異体は活性があることを説明する。

実施例 12: タンパク質精製調製物から DNA を取り除くための S 4 4 E E n d A の使用

【0124】

V s E n d A __ S 4 4 E は、タンパク質精製スキームにて、特にヌクレアーゼ活性及び混入するDNAが混じってはならないDNA結合タンパク質の精製にて有用であり得たので、我々は、組換えで発現させたDNA結合タンパク質を含有する大腸菌抽出物からゲノムDNAを取り除くV s E n d A __ S 4 4 Eの能力を調べた。

【0125】

本実施例における組換えで発現させたタンパク質は、ウラシル含有DNAからのウラシルの除去を触媒するタラ由来のウラシル - DNAグリコシラーゼ(タラUNG)だった。タラUNGを含有する大腸菌細胞を回収し、洗浄し、リゾチームを含有するトリス/HCl緩衝液(25mMのトリス/HCl、pH8.0、10mMのNaCl、1mMのEDTA、1%グリセロール)にて超音波処理によって溶解した。細胞抽出物を遠心し、上清を回収した。上清のpHを8.5に調整した後、以下の濃度: 0M、0.25M、0.5M、0.75M又は1.0MのNaClを加えた。10mMでMgCl₂を加えた後、50U/μLのV s E n d A __ S 4 4 Eによって37℃で30分間処理した。次いで10mMのDTTを加え、40℃で30分間インキュベートすることによってV s E n d A __ S 4 4 Eを不活化した。未処理の対照も含めた。TEMPアーゼホットスタートDNAポリメラーゼ(VWR)を含有し、実施例10にて前述したのと同じPCR緩衝液組成及び熱サイクル条件による50μLのPCR反応物にV s E n d A __ S 4 4 E処理した上清(1μL)を加えた。

【0126】

図13に示すように、有意な量のDNAが依然として溶解物に残っているが、V s E n d A __ S 4 4 Eは0.5M以上のNaClを含有する試料では大腸菌ゲノムDNAのほとんど(>99.5%)を取り除くことができた。相対的に低い塩分濃度(0M及び0.25M)の試料では、Cq値は、未処理の試料及びV s E n d A __ S 4 4 E処理の試料の双方について同じであることが分かる。このことは、試料内のDNAがタンパク質と相互作用し、V s E n d A __ S 4 4 E酵素及びポリメラーゼの双方に利用できなくしていることを示唆している。比較して、高いNaCl濃度(0.5M、0.75M及び1.0M)では、未処理の試料とV s E n d A __ S 4 4 E変異体を含有する試料との間にはDNAレベルの明瞭な差異が見られるということは、NaClがDNAをV s E n d A __ S 4 4 E及びポリメラーゼの双方に利用可能にすることを示唆している。本実施例はV s E n d A __ S 4 4 Eが、組換えで発現させたDNA結合タンパク質を含有する細胞抽出物からDNAを除去するのに理想的であることを実証している。塩の添加は、タンパク質/DNAの相互作用を低減し、塩によって活性があるV s E n d A __ S 4 4 EにとってDNAを利用可能にさせる。さらに、V s E n d A __ S 4 4 Eは容易に不可逆的に不活化することができ、それは、ヌクレアーゼ活性を含まないことを一般に必要とするDNA結合タンパク質の調製物として重要である特徴である。

実施例13: PCRの品質に対する不活化添加剤TCEPの効果

【0127】

本実施例では、我々は、TEMPアーゼポリメラーゼ及びTEMPアーゼキ緩衝液のPCR効率に対する効果を示す。

【0128】

種々の濃度のTCEPをPCRストリップに加え、その後、PCR成分の残りを加えた。23Sのプライマー/プローブのセットについての鋳型として大腸菌のgDNA(100fg)を用いた。試料はすべて2つ組で実行し、qPCR反応物はすべて2μLの総容量を有した。TEMPアーゼキ緩衝液及び「Arctic緩衝液」(最終濃度: 10mMのトリス/HCl、pH8.3, 10mMのKCl及び5mMのMgCl₂)中のTEMPアーゼポリメラーゼ(VWR)を、Agilent Brilliant III Master Mix(Agilent Technologies)と同様に調べた。

【0129】

本試験の結果は、2.5mM以下のTCEP濃度はPCRの効率に顕著な効果を有さないことを示している(データは示さず)。

実施例 14 : T a q ポリメラーゼの浄化における V s E n d A _ S 4 4 E 不活化の安定性 【 0 1 3 0 】

T C E P の存在は、不活化手順を実施した後、V s E n d A _ S 4 4 E を不活性に保つために必要であり得る。この理由で、我々は V s E n d A _ S 4 4 E の不活化を維持する T C E P の長期の能力を評価した。

【 0 1 3 1 】

2 μ L の T E M P アーゼキ緩衝液、0 . 8 μ L の d N T P / d U T P (2 . 5 / 5 m M)、0 . 2 μ L の T E M P アーゼ (5 U / μ L)、1 μ L の V s E n d A _ S 4 4 E 保存緩衝液 / V s E n d A _ S 4 4 E (1 0 U / μ L) 及び 1 μ L の水を含む緩衝液を 1 7 . 5 \times 容積で混合し、3 7 $^{\circ}$ C で 2 5 分間インキュベートした。DNA の除染工程の後、1 \times r x 当たり 1 μ L の 5 0 m M の T C E P を加え、3 7 $^{\circ}$ C で 2 5 分間インキュベートすることによって V s E n d A _ S 4 4 E を不活化した。不活化の後、ミックスを 4 $^{\circ}$ C で 1 4 日間保存した (8 . 3 m M の T C E P の有効濃度)。その後、処理したミックスを q P C R ストリップにて分散し、1 4 μ L に溶解した大腸菌の 2 3 S プライマー / プロープ及び鋳型 (2 0 0 f g の大腸菌 DNA 又は鋳型なし) に加えた。各 P C R ミックスの総容量は 2 0 μ L だった。この希釈によって T C E P の濃度を確実に 2 . 5 m M に低下させ、それは実施例 3 の結果から P C R の効率に影響しないことが分かった。q P C R を実行する前に、再活性化された V s E n d A _ S 4 4 E が原因で生じる鋳型の喪失を検出するためにストリップを 4 $^{\circ}$ C にて 4 時間保存した。S t r a t a g e n e M x 3 5 0 0 P (A g i l e n t t e c h n o l o g i e s) にて q P C R を実施し、熱サイクル条件は以下のとおりだった : 5 0 $^{\circ}$ C で 2 分間、9 5 $^{\circ}$ C で 1 0 分間、その後、9 5 $^{\circ}$ C 、6 0 $^{\circ}$ C で 3 0 秒間と 7 2 $^{\circ}$ C で 3 0 秒間を 4 5 サイクル。

【 0 1 3 2 】

結果は、8 . 3 m M の濃度にて不活化添加剤 T C E P の存在下で保存した場合、4 $^{\circ}$ C で少なくとも 2 週間の期間にわたって V s E n d A _ S 4 4 E の有意な再活性化はないことを示している (データは示さず)。

実施例 15 : 種々の塩化ナトリウム濃度及び p H を伴った緩衝液中の V s E n d A _ S 4 4 E と V c E n d A (野生型) の混合物の性能 【 0 1 3 3 】

V s E n d A _ S 4 4 E は 8 . 5 の最適 p H 及び 4 2 5 m M の最適塩化ナトリウム濃度を有する。V i b r i o c h o l e r a e から得られ、ここでは V c E n d A と呼ばれる、野生型 V i b r i o s a l m o n i c i d a - 由来のエンドヌクレアーゼ (V s E n d A) のホモログは、7 . 5 の最適 p H 及び 1 7 5 m M の最適塩化ナトリウム濃度を伴った広い p H 範囲を有する。従って、我々は、それが、好都合な不活化特性と一緒に広い p H 及び塩化ナトリウム濃度の機能範囲を持つヌクレアーゼ産物を生じるかどうかを判定するために V s E n d A _ S 4 4 E と V c E n d A を組み合わせた。ここで我々は、市場にある第 1 級の特異的なヌクレアーゼであるベンゾナーゼの性能に対して、種々の p H 及び塩化ナトリウム濃度のトリス緩衝液中でのこの酵素組成物の性能を調べた。

【 0 1 3 4 】

表 6 に示すマトリクスで描いたように様々な p H 及び塩化ナトリウム濃度の組み合わせと共に合計 2 0 の 5 m M の M g C l ₂ を含有する 2 5 m M のトリス緩衝液を作った。

【 表 6 】

	0 M NaCl	0.25 M NaCl	0.5 M NaCl	0.75 M NaCl	1.0 M NaCl
pH 7	1	2	3	4	5
pH 7.5	6	7	8	9	10
pH 8.0	11	12	13	14	15
pH 8.5	16	17	18	19	20

【 0 1 3 5 】

酵素を 1 : 1 (w / w) で混合することによって V s E n d A _ S 4 4 E と V c E n d A の混合物を作り、 2 5 0 m M の塩化ナトリウムを含有する 2 5 m M のトリス / H C l 緩衝液 p H 8 にて活性を測定した。 5 0 μ g のウシ胸腺 D N A を含有する 1 0 0 μ L の緩衝液に 3 0 0 U の酵素を加え、反応物を 3 7 ° C で 3 0 分間インキュベートした。 E D T A を含有する負荷色素を加えることによって反応を止め、試料を 1 % アガロースゲルに負荷した。

【 0 1 3 6 】

結果は、 0 M ~ 1 M の間の塩化ナトリウム濃度の範囲で V s E n d A _ S 4 4 E / V c E n d A 組成物の活性の有意な低下はないことを示した。比較して、ベンゾナーゼは 0 . 2 5 M にて及び上記で活性に若干の損失を示した (データは示さず) 。加えて、 V s E n d A _ S 4 4 E と V c E n d A を含む組成物は、 2 0 m M の D T T 又は T C E P と共に 4 8 時間で 6 時間保存した後、完全な不活化を示したが、野生型の V s E n d A と V c E n d A を含む組成物はこれらの条件下で類似の不活化特性を示さなかった (データは示さず) 。

10

【 図 1 】

```
VsEndA      MKLIRLVISLIAVSFTVNVMAAPPSSFSKAKKEAVKIYLDYPTSFYCGCDITWNNKKGI 60
VcEndA      MMIFRFVTT-LAASLLLTFAAP-ISFSHAKNEAVKIYRDHPVSFYCGCEIRWQCKK-GI 57
* * * * *

VsEndA      PELESCGYQVRKQKQKASRIEWEHVVPAMQFQHQRCQWQKGGKKNCTRNDRKQKSMEDL 120
VcEndA      PDLESCGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAMQFQHQRCQWQGGKKNCTRTSPEFNQMEADL 117
* * * * *

VsEndA      HNLVPAIGEVNGDRSNRFSQWNGSKGAFYGCQAFKVDKGRVABEPQAQSGAIARIYLY 180
VcEndA      HNLTPAIGEVNGDRSNRFSQWNGLDGVITYGQCEMQVNFKERTAMPFERARGAIARIYLY 177
* * * * *

VsEndA      MNNEYKFNLSKAQRQLMEAWNQYFVSTWECTRDRIAKIQGNHNQFVYKACTK 234
VcEndA      MSEQYGLRLSKAQNQLMAWNNQYFVSEWECYRDQKIEKVQGNNSNRFVREQCPN 231
* * * * *
```

【 図 2 】

```
1  ATG AAA TTA ATT CGC TTA GTT ATC AGT CTT ATT GCT GTC AGT TTC 45
1  M  K  L  I  R  L  V  I  S  L  I  A  V  S  F  15

46  ACT GTT AAC GTA ATG GCA GCA CCT CCT TCT TCT TTC TCA AAA GCA 90
16  T  V  N  V  M  A  A  P  P  S  S  F  S  K  A  30

91  AAA AAA GAA GCC GTC AAA ATC TAT CTT GAT TAC CCA ACC GAG TTT 135
31  K  K  E  A  V  K  I  Y  L  D  Y  P  T  E  F  45

136  TAT TGT GGC TGT GAC ATT ACG TGG AAA AAT AAA AAG AAA GGG ATC 180
46  Y  C  G  C  D  I  T  W  K  N  K  K  K  G  I  60

181  CCT GAA TTA GAA AGC TGC GGA TAC CAA GTC CGT AAA CAA GAA AAA 225
61  P  E  L  E  S  C  G  Y  Q  V  R  K  K  Q  E  K  75

226  CGA GCC AGT CGT ATT GAA TGG GAG CAT GTT GTT CCA GCA TGG CAA 270
76  R  A  S  R  I  E  W  E  H  V  V  P  A  W  Q  90

271  TTT GGT CAT CAA CGT CAA TGT TGG CAA AAA GGT GGG CGT AAA AAT 315
91  F  G  H  Q  R  Q  C  W  Q  K  G  G  R  K  N  105

316  TGC ACT AGA AAC GAC AAG CAA TTC AAA TCA ATG GAA GCC GAC TTA 360
106  C  T  R  N  D  K  Q  F  K  S  M  E  A  D  L  120

361  CAT AAT CTA GTG CCT GCG ATT GGT GAA GTA AAC GGG GAC AGA TCC 405
121  H  N  L  V  P  A  I  G  E  V  N  G  D  R  S  135

406  AAC TTC CGA TTC TCA CAA TGG AAT GGA AGC AAA GGC GCT TTC TAT 450
136  N  F  R  F  S  Q  W  N  G  S  K  G  A  F  Y  150

451  GGC CAA TGT GCT TTT AAA GTC GAC TTC AAA GGC CGT GTT GCC GAG 495
151  G  Q  C  A  F  K  V  D  F  K  G  R  V  A  E  165

496  CCA CCA GCA CAA TCT CGT GGT GCC ATT GCC CGA ACG TAT CTT TAT 540
166  P  P  A  Q  S  R  G  A  I  A  R  T  Y  L  Y  180

541  ATG AAC AAC GAA TAT AAA TTT AAC TTA TCA AAA GCA CAG CGA CAA 585
181  M  N  N  E  Y  K  F  N  L  S  K  A  Q  R  Q  195

586  CTT ATG GAA GCA TGG AAC AAA CAG TAT CCA GTA TCA ACT TGG GAA 630
196  L  M  E  A  W  N  K  Q  Y  P  V  S  T  W  E  210

631  TGT ACT CGT GAT GAA CGT ATA GCA AAA ATC CAA GGC AAT CAT AAT 675
211  C  T  R  D  E  R  I  A  K  I  Q  G  N  H  N  225

676  CAA TTT GTT TAT AAA GCA TGC ACT AAA TAA 705
226  Q  F  V  Y  K  A  C  T  K  *  705
```

【図 3 - 1】

↓

<i>V. salmonicida</i>	-----AF--PSSFSKAKKEAVKIYLDYPT--	S FYCGCDITWKKKKGIP 40
<i>V. cholerae</i>	-----A--PISSFHAKKEAVKIYRDHPV--	S FYCGCEIRWQKK--GIP 38
<i>Oceanimonas</i> sp.	-----GE--AMSFQAQKAVKIHADAPG--	T FYCGCNDIDWQKK--LVP 39
<i>Salmonella</i> sp.	-----DG--INNFQAQKAAGVKVNADAPG--	S FYCGCQIRWQKK--GVV 39
<i>Enterobacter</i> sp.	-----DC--INFSQAQKAAGVKVNADVP--	D FYCGCKINWQKK--GIV 39
<i>Yokenella</i> sp.	-----EG--INFSQAQKAAGVKVNADVAG--	D FYCGCKINWQKK--GVV 39
<i>Klebsiella</i> sp.	-----AG--INFSQAQKAAGVKVNADVP--	D FYCGCKIDWQKK--GVI 39
<i>E. coli</i>	-----EG--INFSQAQKAAGVKIHADAPG--	T FYCGCKIDWQKK--GVV 39
<i>Shigella</i> sp.	-----EG--INFSQAQKAAGVKVNADAPG--	T FYCGCKINWQKK--GVV 39
<i>Citrobacter</i> sp.	-----EG--INFSQAQKAAGVKVNADAPG--	D FYCGCKINWQKK--GVV 39
<i>Cronobacter</i> sp.	-----ASG--IHFSQAQKAAGVKINADAPG--	D FYCGCPIWQKK--GIP 40
<i>Rahnella</i> sp.	IGALVPLSAFSQSGNTINNFQAQKAAGVKINQAGP--	T FYCGCKINWQKK--GIP 52
<i>Erwinia</i> sp.	YPPPLA ⁺ CHALSQGN ⁺ YQGN ⁺ INFSQAQKAAGVKIHADAPG--	T FYCGCKIDWQKK--GVV 52
<i>Yersinia</i> sp.	-----HG--INNFQAQKAAGVKIHQDAPG--	S FYCGCQIDWQKK--GIP 39
<i>Serratia</i> sp.	-----HG--INNFQAQKAAGVKIHQDAPG--	S FYCGCKINWQKK--GLP 39
<i>Pseudomonas</i> sp.	-----AQAQAPRTFSEAKKVAWGLYAPQST--	E FYCGCKY--TGKK--V 38

* * * * *

<i>V. salmonicida</i>	ELESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH 100
<i>V. cholerae</i>	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQDQWQGGGRKNCIRISFEFNQMEADLH 98
<i>Oceanimonas</i> sp.	DLAGCCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 99
<i>Salmonella</i> sp.	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Enterobacter</i> sp.	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Yokenella</i> sp.	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Klebsiella</i> sp.	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>E. coli</i>	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Shigella</i> sp.	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Citrobacter</i> sp.	DLESCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Cronobacter</i> sp.	DLKACCYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 99
<i>Rahnella</i> sp.	DLQSCGYAVRKSELASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 111
<i>Erwinia</i> sp.	DLTSCGYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 111
<i>Yersinia</i> sp.	DLNACCYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Serratia</i> sp.	DLNACCYQVRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98
<i>Pseudomonas</i> sp.	DLAGCCGYVPRKNEKASRIEWEHVVP	AWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRKDELFQMEADLH 98

* * * * *

<i>V. salmonicida</i>	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 160
<i>V. cholerae</i>	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 158
<i>Oceanimonas</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 158
<i>Salmonella</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Enterobacter</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Yokenella</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Klebsiella</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>E. coli</i>	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Shigella</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Citrobacter</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Cronobacter</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 158
<i>Rahnella</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 170
<i>Erwinia</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 170
<i>Yersinia</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Serratia</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157
<i>Pseudomonas</i> sp.	NLVPAGEVNGDRNFSFYSGWNGSGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLM 157

* * * * *

【図 4】

↓

<i>V. salmonicida</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDYPT--	S FYCGCDITWKKKKGIP 60
<i>V. fischeri</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDYPT--	S FYCGCDITWKKKKGIP 60
<i>V. wadonis</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDYPT--	S FYCGCDITWKKKKGIP 60
<i>V. splendidus</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDYPT--	S FYCGCDITWKKKKGIP 60
<i>V. cholerae</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDYPT--	S FYCGCEIRWQKK--GIP 58
<i>V. harveyi</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHP--	S FYCGCDIKWQKK--GIP 59
<i>V. rotiferianus</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHP--	S FYCGCDIKWQKK--GIP 59
<i>V. tubiashii</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHP--	S FYCGCDIKWQKK--GIP 59
<i>V. sinaloensis</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHP--	S FYCGCDIKWQKK--GIP 59
<i>V. vulnificus</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHP--	S FYCGCDIKWQKK--GIP 59
<i>V. furnissii</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHP--	S FYCGCDIKWQKK--GIP 58
<i>V. anguillarum</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHP--	S FYCGCDIKWQKK--GIP 59

* * * * *

<i>V. salmonicida</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 120
<i>V. fischeri</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 120
<i>V. wadonis</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 120
<i>V. splendidus</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 120
<i>V. cholerae</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 118
<i>V. harveyi</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 119
<i>V. rotiferianus</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 119
<i>V. tubiashii</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 119
<i>V. sinaloensis</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 119
<i>V. vulnificus</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 118
<i>V. furnissii</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 118
<i>V. anguillarum</i>	WEHVFAWQFGHQPCQWQGGGRKNCIRNDQPKFSMEADLH	NLVPAGEVNGDRNFSFYSG 119

* * * * *

<i>V. salmonicida</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 180
<i>V. fischeri</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 180
<i>V. wadonis</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 180
<i>V. splendidus</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 180
<i>V. cholerae</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 178
<i>V. harveyi</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 179
<i>V. rotiferianus</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 179
<i>V. tubiashii</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 179
<i>V. sinaloensis</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 179
<i>V. vulnificus</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 178
<i>V. furnissii</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 178
<i>V. anguillarum</i>	WNGSKGAFYGCQCAFVDFKGRVAEP	PAQSRGALARTYLYMNEYKFNLSKAQRLMEAWN 179

* * * * *

<i>V. salmonicida</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 213
<i>V. fischeri</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 213
<i>V. wadonis</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 213
<i>V. splendidus</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 212
<i>V. cholerae</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 211
<i>V. harveyi</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 212
<i>V. rotiferianus</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 212
<i>V. tubiashii</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 212
<i>V. sinaloensis</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 204
<i>V. vulnificus</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 213
<i>V. furnissii</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 211
<i>V. anguillarum</i>	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK-- 212

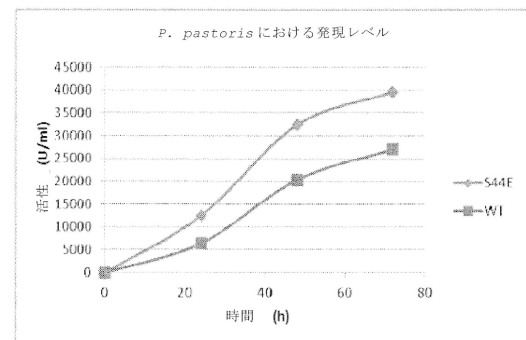
* * * * *

【図 3 - 2】

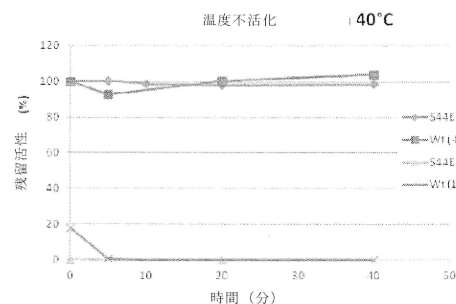
<i>V. salmonicida</i>	NNEYKFNLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>V. cholerae</i>	SEQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 211
<i>Oceanimonas</i> sp.	QQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 218
<i>Salmonella</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>Enterobacter</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>Yokenella</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>Klebsiella</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>E. coli</i>	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>Shigella</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>Citrobacter</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>Cronobacter</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 214
<i>Rahnella</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 226
<i>Yersinia</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 223
<i>Serratia</i> sp.	RDQYQLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213
<i>Pseudomonas</i> sp.	SKQYNLRLSKAQRLMEAWN	KQYVPSTWECTRDERIAKIQGNHNP	QVYKACTK----- 213

* * * * *

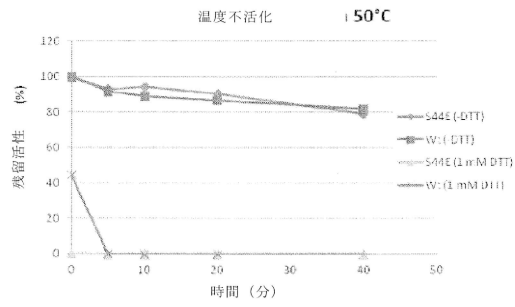
【図 5】



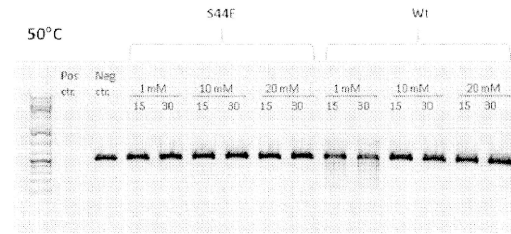
【図 6 a】



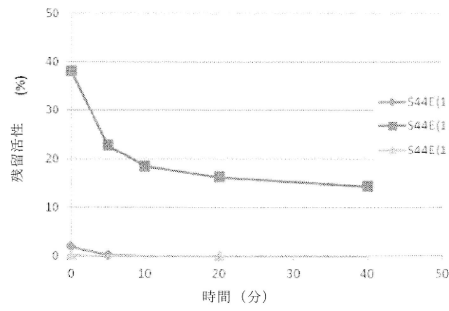
【図 6 b】



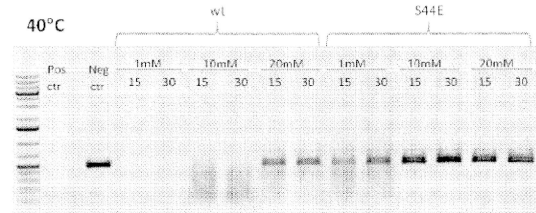
【図 8 a】



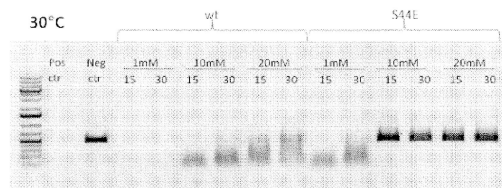
【図 7】



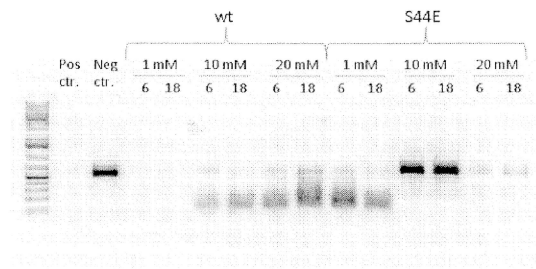
【図 8 b】



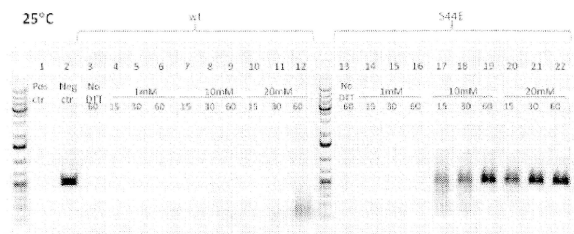
【図 8 c】



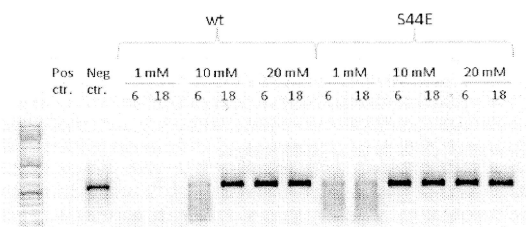
【図 9 a】



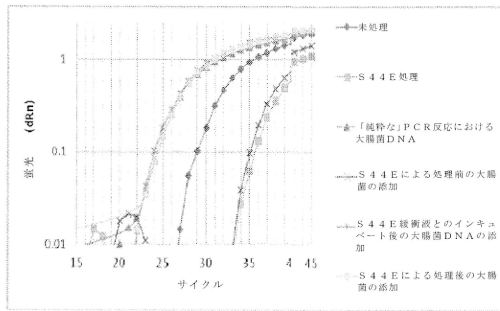
【図 8 d】



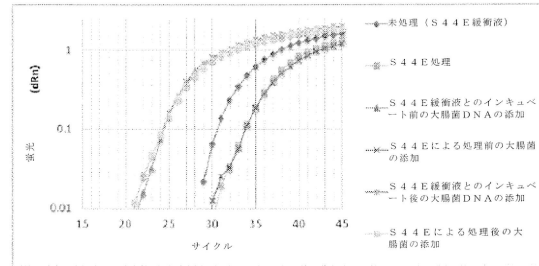
【図 9 b】



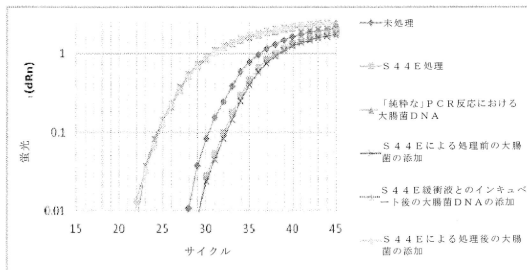
【図10a】



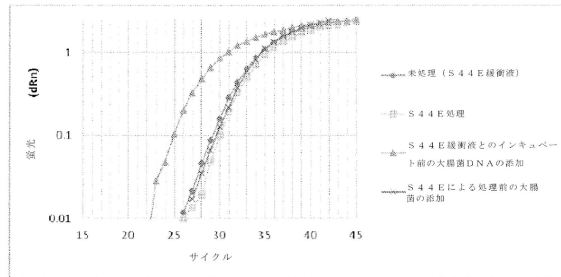
【図11】



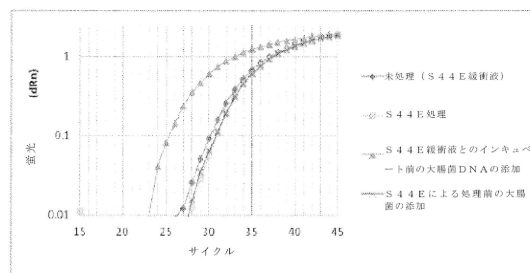
【図10b】



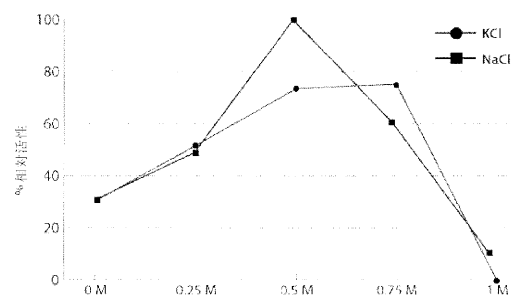
【図12a】



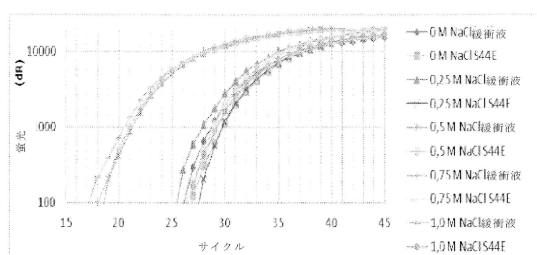
【図12b】



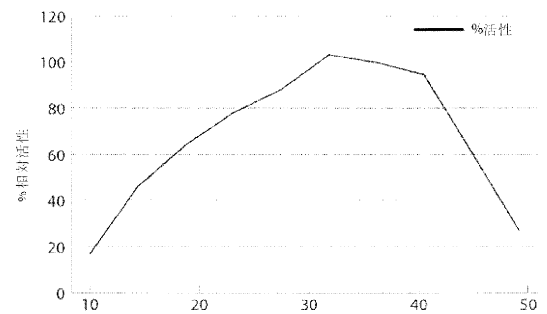
【図14】



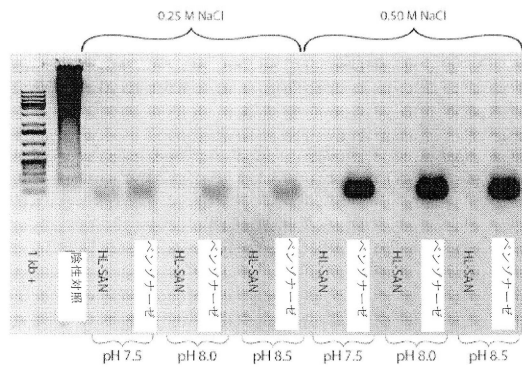
【図13】



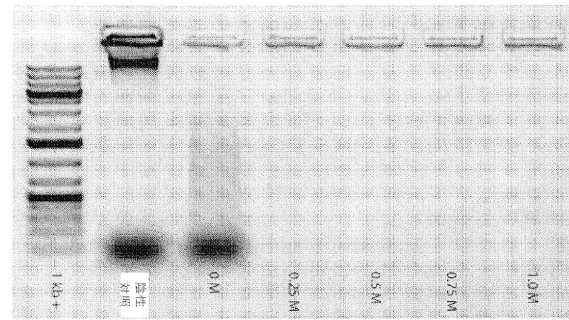
【図15】



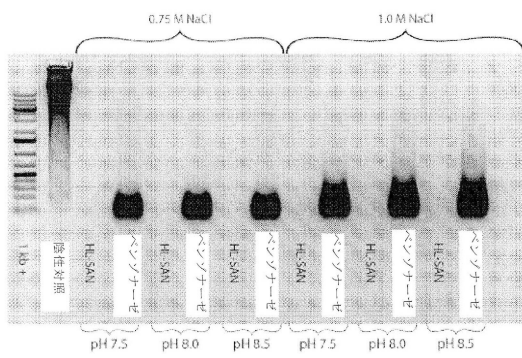
【図 16 a】



【図 17】



【図 16 b】



【配列表】

0006259775000001.app

 フロントページの続き

- (72)発明者 ソルスタッド, テレセ
ノルウェー エヌ - 9 1 0 0 クヴァロイスレッタ, リングセルヴェイエン 1 0
- (72)発明者 ロレンツェン, マリト
ノルウェー エヌ - 9 0 2 2 クロケルヴダレン, スカイッタースチエン 3 ビー
- (72)発明者 アルターマーク, ブジョン
ノルウェー エヌ - 9 0 1 4 トロムソ, ウィンストン チャーチルズ ヴェグ 8 5
- (72)発明者 レイロス, インガー
ノルウェー エヌ - 9 0 1 7 トロムソ, ジャーステイネン 1 5 ビー
- (72)発明者 ヘランド, ローニー
ノルウェー エヌ - 9 0 2 0 トロンスダレン, ホルメスレットヴェイエン 1 4

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 DATABASE Uniprot [Online] A7MJQ9_CROS8 Putative uncharacterized protein, 2 0 1 2 年
1 月 2 5 日, U R L, <http://www.uniprot.org/uniprot/A7MJQ9.txt?version=18>
DATABASE Uniprot [Online] C9XZV4_CROTZ Endonuclease-1; EC=3.1.21.1, 2 0 1 1 年 1 2 月 1
4 日, U R L, <http://www.uniprot.org/uniprot/C9XZV4.txt?version=15>
Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 2 0 0 8 年, vol.64, no.4, pp.368-376
FEBS J., 2 0 0 7 年, vol.274, no.1, pp.252-263

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 9 / 1 6
U n i P r o t / G e n e S e q
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S /
W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d