

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6429773号
(P6429773)

(45) 発行日 平成30年11月28日 (2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日 (2018.11.9)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)
 C 1 2 N 9/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)
 C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6869 Z N A Z
 C 1 2 N 9/00
 C 1 2 N 15/09 Z
 C 1 2 M 1/00 A
 C 1 2 M 1/34 Z

請求項の数 15 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-522172 (P2015-522172)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月18日 (2013.7.18)
 (65) 公表番号 特表2015-529451 (P2015-529451A)
 (43) 公表日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2013/051928
 (87) 国際公開番号 W02014/013262
 (87) 国際公開日 平成26年1月23日 (2014.1.23)
 審査請求日 平成28年7月7日 (2016.7.7)
 (31) 優先権主張番号 61/673, 446
 (32) 優先日 平成24年7月19日 (2012.7.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/774, 694
 (32) 優先日 平成25年3月8日 (2013.3.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 511252899
 オックスフォード ナノボール テクノロ
 ジーズ リミテッド
 イギリス国 オックスフォードシャー オ
 ーエックス4 4 ジーエー, オックスフォ
 ード, オックスフォード サイエンス パ
 ーク, ロバート ロビンソン アベニュー
 4, エドマンド カートライト ハウス
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、

(a) 標的ポリヌクレオチドを、膜貫通ポアならびにヘリカーゼおよび追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む構築物と、構築物がポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させるステップであって、ヘリカーゼがポリヌクレオチド結合成分に付着されており、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有するステップ；ならびに

(b) ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときに 1 つまたは複数の測定値を取るステップであって、測定値が標的ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性を示し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップ

を含み、

(i) ポリヌクレオチド結合成分は 1 つまたは複数のヘリカーゼを含み、

(a) 構築物中の 2 つ以上のヘリカーゼが互いに異なっている、および / または

(b) 2 つ以上のヘリカーゼが同じであるもしくは類似している、もしくは 2 つ以上のヘリカーゼが同じであるもしくは類似しており各ヘリカーゼ中の同じアミノ酸残基を使用して付着されている、あるいは、

(i i) ポリヌクレオチド結合成分は

(a) ヘリックス - ヘアピン - ヘリックス (H h H) ドメイン、真核生物 1 本鎖結合タンパク質 (S S B)、細菌性 S S B、古細菌 S S B、ウイルス性 S S B、2 本鎖結合タンバ

ク質、スライディングクランプ、前進性因子、DNA結合ループ、複製開始タンパク質、テロメア結合タンパク質、リプレッサー、亜鉛フィンガーおよび増殖細胞核抗原（PCNA）から独立に選択される1つまたは複数のドメインを含む、および/または、

(b) アミノ酸配列が配列番号116～166のいずれか1つに示されるもの、および、その変種であって、アミノ酸配列が配列番号116～166のいずれか1つと、その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて少なくとも90%相同性を有するものから選択される、および/または、

(c) (1) エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼもしくはトポイソメラーゼに由来する、または(2) Phi29ポリメラーゼ（配列番号62）もしくはその変種であって、その配列全体にわたって配列番号62とアミノ酸同一性に基づいて少なくとも90%相同性を有するものに由来する、方法。

10

【請求項2】

(a) ヘリカーゼとポリヌクレオチド結合成分とが、共有結合的に付着されている、化学的に付着されている、もしくは遺伝子的に融合されている、および/または

(b) ヘリカーゼとポリヌクレオチド結合成分とが、1つもしくは複数のリンカーによって付着されている、もしくはアミノ酸配列である1つもしくは複数のリンカーによって付着されている、

請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(a) 1つもしくは複数のヘリカーゼがスーパーファミリー1～6から独立に選択される、ならびに/または

20

(b) 1つもしくは複数のヘリカーゼが単量体である、ならびに/または

(c) 1つもしくは複数のヘリカーゼが、Hel308ヘリカーゼ、RecDヘリカーゼ、TraIヘリカーゼ、TraIサブグループヘリカーゼ、XPDヘリカーゼおよびその変種から独立に選択される、

請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

(a) Hel308ヘリカーゼがアミノ酸モチーフQ-X1-X2-G-R-A-G-R（配列番号8）（式中、X1はC、MもしくはLであり、X2は任意のアミノ酸残基である）を含み；

30

(b) RecDヘリカーゼが、

- アミノ酸モチーフX1-X2-X3-G-X4-X5-X6-X7（配列番号20）（式中、X1はG、SもしくはAであり、X2は任意のアミノ酸であり、X3はP、A、SもしくはGであり、X4はT、A、V、SもしくはCであり、X5はGもしくはAであり、X6はKもしくはRであり、X7はTもしくはSである）；および/または

- アミノ酸モチーフX1-X2-X3-X4-X5-(X6)₃-Q-X7（配列番号29）（式中、X1はY、WもしくはFであり、X2はA、T、S、M、CもしくはVであり、X3は任意のアミノ酸であり、X4はT、NもしくはSであり、X5はA、T、G、S、VもしくはIであり、X6は任意のアミノ酸であり、X7はGもしくはSである）を含み；

40

(c) TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼが、

- アミノ酸モチーフH-(X1)₂-X2-R-(X3)₅₋₁₂-H-X4-H（配列番号31～38）（式中、X1およびX3は任意のアミノ酸であり、X2およびX4はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択される）；または

- アミノ酸モチーフG-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-H-(X8)₆₋₁₂-H-X9（配列番号39～45）（式中、X1、X2、X3、X5、X6、X7およびX9はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択され、X4はDまたはEであり、X8は任意のアミノ酸である）

を含み；または

(d) XPDヘリカーゼが、

50

- アミノ酸モチーフ X 1 - X 2 - X 3 - G - X 4 - X 5 - X 6 - E - G (配列番号 5 0)
(式中、X 1、X 2、X 5 および X 6 は D、E、K および R を除く任意のアミノ酸から
独立に選択され、X 3 および X 4 は任意のアミノ酸残基であってよい) ; および / または
- アミノ酸モチーフ Q - X a - X b - G - R - X c - X d - R - (X e)₃ - X f - (X g)₇ - D - X h - R (配列番号 5 1) (式中、X a、X e および X g は任意のアミノ
酸残基であってよく、式中、X b、X c および X d は D、E、K および R を除く任意のア
ミノ酸から独立に選択される)

を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

(a) H e l 3 0 8 ヘリカーゼ中の X 2 が A、F、M、C、V、L、I、S、T もしくは P である、ならびに / または

10

(b) H e l 3 0 8 ヘリカーゼが、(i) 配列番号 1 0、1 3、1 6 もしくは 1 9 のいずれ
れか 1 つに示す配列、もしくは (i i) その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基
づいて配列番号 1 0、1 3、1 6 もしくは 1 9 と少なくとも 9 0 % 相同性を有し、かつヘリ
カーゼ活性を保持しているその変種を含む、または

(c) T r a I ヘリカーゼが、(i) 配列番号 4 6、8 7、9 8 もしくは 1 0 2 に示す配
列、もしくは (i i) その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 4 6、
8 7、9 8 もしくは 1 0 2 と少なくとも 9 0 % 相同性を有し、かつヘリカーゼ活性を保持
しているその変種を含む、または

(d) X P D ヘリカーゼ中の X 1、X 2、X 5 および X 6 ならびに / もしくは X b、X c
および X d が G、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、Q、N、S および T から
独立に選択される、もしくは X P D ヘリカーゼが、(i) 配列番号 5 2 に示す配列、も
しくは (i i) その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 5 2 と少な
くとも 9 0 % 相同性を有し、かつヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、

20

請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

1 つもしくは複数のヘリカーゼが付着を促進するために修飾されている、または
1 つもしくは複数のヘリカーゼが、1 つもしくは複数の非天然システイン残基および / も
しくは 1 つもしくは複数の 4 - アジド - L - フェニルアラニン (F a z) 残基の導入によ
って付着を促進するために修飾されている、

30

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

標的ポリヌクレオチドの 1 つもしくは複数の特性が、

(a) 電気的測定および / もしくは光学的測定、または

(b) 電流測定、インピーダンス測定、トンネル測定もしくは電界効果トランジスタ (F
E T) 測定である電気的測定、

によって測定される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

2 つ以上のヘリカーゼを含む構築物であって、(a) 構築物中の 2 つ以上のヘリカーゼ
が互いに異なっており、および / または (b) 2 つ以上のヘリカーゼが同じであるもしく
は類似している、もしくは 2 つ以上のヘリカーゼが同じであるもしくは類似しており各
ヘリカーゼ中の同じアミノ酸残基を使用して付着されており、および
ヘリカーゼが互いに付着しており、構築物が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。

40

【請求項 9】

構築物が請求項 1 に定義されたとおりであり、および / または 2 つ以上のヘリカーゼが
請求項 3 から 6 のいずれか一項に定義されたとおりである、請求項 8 に記載の構築物。

【請求項 10】

(a) ヘリカーゼと、配列番号 9 4 もしくは配列番号 9 4 の配列全体にわたってアミノ酸
同一性に基づいて配列番号 9 4 と少なくとも 9 0 % 相同性を有するその変種を含むアミノ

50

酸配列とを含む構築物であってヘリカーゼがヘリックス - ヘアピン - ヘリックス (HhH)ドメインに付着されている構築物、または

(b) 配列番号 90 もしくは配列番号 90 の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 90 と少なくとも 90 % 相同性を有するその変種を含み、ヘリカーゼがヘリックス - ヘアピン - ヘリックス (HhH)ドメインに付着されている構築物

であって、構築物が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。

【請求項 11】

ポリヌクレオチドの移動を制御する方法であって、ポリヌクレオチドを、請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の構築物に接触させ、それによりポリヌクレオチドの移動を制御するステップを含む方法。

10

【請求項 12】

膜貫通ポアと、請求項 1 から 6 のいずれか一項に定義されている構築物または請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の構築物との間の複合体を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサー。

【請求項 13】

膜貫通ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための、請求項 1 から 6 のいずれか一項に定義されている構築物または請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の構築物の使用。

【請求項 14】

(a) 膜貫通ポアおよび (b) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に定義されている構築物または請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の構築物を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。

20

【請求項 15】

複数の膜貫通ポア、および請求項 1 から 6 のいずれか一項に定義されている複数の構築物または請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の複数の構築物を含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、ヘリカーゼおよび追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む構築物を使用する方法に関する。ヘリカーゼは、ポリヌクレオチド結合成分に付着されており、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、ポリヌクレオチドの移動を制御するために使用でき、ポリヌクレオチドを配列決定するために特に有用である。

【背景技術】

【0002】

迅速で安価なポリヌクレオチド（例えば DNA または RNA）配列決定および同定技術が、幅広い応用にわたって現在必要である。既存の技術は、主にそれらが、大量のポリヌクレオチドを生成するための増幅技術に依存し、シグナル検出のために多量の専門的な蛍光化学物質を必要とするために、遅く高価である。

40

【0003】

膜貫通ポア（ナノポア）は、ポリマーおよび種々の小分子のための直接的、電気的バイオセンサーとして大きな将来性を有する。特に、将来性のある DNA 配列決定技術としてナノポアが近年注目されている。

【0004】

電位がナノポア全体に印加される場合、ヌクレオチドなどの分析物が一定時間バレルに一過的に存在する場合に電流が変化する。ヌクレオチドのナノポア検出は、既知のサインおよび持続時間での電流変化をもたらす。「鎖配列決定」法では、1本のポリヌクレオチド鎖がポアを通り、ヌクレオチドのアイデンティティが得られる。鎖配列決定は、ポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御するためのヌクレオチドハンドリングタンパク質の使

50

用を含み得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、2つ以上のヘリカーゼを互いに付着させるなどヘリカーゼに追加的ポリヌクレオチド結合成分を付着することが、ポリヌクレオチドの移動を制御する改善された能力を有する構築物を生じることを驚くべきことに実証した。具体的には本発明者らは、そのような構築物が400ヌクレオチド以上を含むポリヌクレオチドなどの長いポリヌクレオチドに強く結合し、全てではないが大部分のポリヌクレオチドの移動を離れることなく制御することを驚くべきことに実証した。これは、ポリヌクレオチドの移動の有効な制御を、特に鎖配列決定法の際に可能にする。

10

【0006】

したがって、本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、
(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアならびにヘリカーゼおよび追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む構築物と、構築物がポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させるステップであって、ヘリカーゼがポリヌクレオチド結合成分に付着されており、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有するステップ、ならびに
(b) ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときに1つまたは複数の測定値を取るステップであって、測定値が標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含む方法を提供する。

20

【0007】

本発明は、

- 2つ以上のヘリカーゼを含む構築物であって、ヘリカーゼが互いに付着しており、構築物が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；
 - 本発明の構築物をコードしているポリヌクレオチド配列であって、2つ以上のヘリカーゼが遺伝子的に融合されているポリヌクレオチド配列；
 - ポリヌクレオチドの移動を制御する方法であって、ポリヌクレオチドを本発明の構築物に接触させ、それによりポリヌクレオチドの移動を制御するステップを含む方法；
 - 標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成する方法であって、ポアと、上で定義した構築物との間で複合体を形成し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成するステップを含む方法；
 - ポアと、上で定義した構築物との間の複合体を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサー；
 - ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための、上で定義した構築物の使用；
 - (a) ポア、および(b)上で定義した構築物を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット；
 - 複数のポア、および上で定義した複数の構築物を含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための装置；ならびに
 - 本発明の構築物を産生する方法であって、2つ以上のヘリカーゼを一緒に付着させ、それにより構築物を産生するステップを含む方法
- も提供する。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】いくつかのH e l 3 0 8 M b uヘリカーゼ構築物の単量体および二量体のゲルを示す図である。レーン1および6は適切なタンパク質ラダーを示す。レーン2はH e l 3 0 8 M b u (R 6 8 7 A / A 7 0 0 C) 単量体 (変異 R 6 8 7 A / A 7 0 0 C を有する配列番号10) に対応し、レーン3はH e l 3 0 8 M b u (R 6 8 1 A / R 6 8 7 A / A 7 0 0 C) 単量体 (変異 R 6 8 1 A / R 6 8 7 A / A 7 0 0 C を有する配列番号10) に対

50

応し、レーン4はHe1308Mbu(R687A/A700C)-2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異R687A/A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)に対応し、レーン5はHe1308Mbu(R681A/R687A/A700C)-2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異R681A/R687A/A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)に対応する。Aと標識したバンドは単量体に対応し、Bと標識したバンドは二量体に対応する。

【図2】He1308 Mhu多量体のゲルを示す図である。レーン1は適切なタンパク質ラダーを示し、レーン2はHe1308 Mhu多量体(配列番号19の複数単位)に対応する。

10

【図3】形成および精製の際の種々の段階でのHe1308 Tga(R657A/N674C)-2kDa二量体および単量体のゲルを示す図である(レーン1=タンパク質ラダー、レーン2=He1308 Tga(R657A/N674C)-2kDa二量体、90、10分間での加熱後、レーン3=He1308 Tga(R657A/N674C)-2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異R657A/N674Cを有する配列番号16を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置674を介して他に連結されている)、レーン4=Strept-Tactin Sepharose精製からの溶出ピーク、レーン5=初期反応混合物およびレーン6=He1308 Tga(R657A/N674C)単量体(変異R657A/N674Cを有する配列番号16))。Aと標識したバンドは単量体に対応し、Bと標識したバンドは二量体に対応する。

20

【図4】ヘリカーゼ/DNA結合を検査するための蛍光アッセイを示す図である。通例の蛍光基質が、1本鎖DNAに結合する種々のヘリカーゼの能力をアッセイするために使用された。88nt1本鎖DNA基質(最終1nM、配列番号69、Aと標識)は、その5'末端にカルボキシフルオレセイン(carboxyfluorescein)(FAM)塩基を有する(円、Bと標識)。ヘリカーゼ(Cと標識)が緩衝溶液(400mM NaCl、10mM Hepes、pH8.0、1mM MgCl₂)中のオリゴヌクレオチドに結合することから、蛍光偏光(溶液中のオリゴヌクレオチドの自由回転の速度に関連する特性)は増大する。偏光を増大させるために必要なヘリカーゼの量が少ないほど、DNAとヘリカーゼとの間の結合親和性は強い。酵素が結合していない状態1がより早い回転および低い偏光を有する一方で、酵素が結合している状態2はより遅い回転および高い偏光を有する。Xと標識の黒いバーは、ヘリカーゼ濃度の増加に対応する(バーが厚いほどヘリカーゼ濃度は高い)。

30

【図5】種々のHe1308Mbu構築物の量を増加させてDNAオリゴヌクレオチド(配列番号69、その5'末端にカルボキシフルオレセイン塩基を有する)の偏光における変化を示す図である(y軸標識=偏光(ブランク減算)、x軸標識=タンパク質濃度(nM))。黒四角点でのデータはHe1308Mbu単量体(配列番号10)に対応する。空丸でのデータはHe1308Mbu A700C 2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)に対応する。偏光を増大させるためにより低い濃度のHe1308Mbu A700C 2kDa二量体が必要であることから、二量体は単量体よりもDNAに対する高い結合親和性を有する。

40

【図6】種々のHe1308(Mbu)構築物の量を増加させてDNAオリゴヌクレオチド(配列番号69、その5'末端にカルボキシフルオレセイン塩基を有する)の偏光における変化を示す図である(y軸標識=偏光(ブランク減算)、x軸標識=タンパク質濃度(nM))。黒四角点でのデータはHe1308Mbu単量体(配列番号10)に対応する。空丸でのデータはHe1308Mbu-GTGSGA-(HhH)₂(ここでヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)はリンカー配列GTGSGAによってHhH2ドメイン

50

(配列番号75)に付着されている)に対応し、空三角でのデータはHe1308Mbu-GTGS GA-(HhH)2-(HhH)2(ここでヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)はリンカー配列GTGS GAによって(HhH)2-(HhH)2ドメイン(配列番号76)に付着されている)に対応する。付着している追加的ヘリックス-ヘアピン-ヘリックス結合ドメインを有するHe1308Mbuヘリカーゼは、単量体よりも低い濃度で偏光における増大を示す。これは、追加的結合ドメインを有するHe1308Mbu構築物が単量体よりも強い結合親和性をDNAに対して有することを示唆している。4個のHhHドメインを有するHe1308Mbu-GTGS GA-(HhH)2-(HhH)2が、2個のHhHドメインだけを有するHe1308Mbu-GTGS GA-(HhH)2よりもさらに強くDNAに結合することが観察された。

10

【図7】種々のHe1308(Mbu)構築物の量を増加させてDNAオリゴヌクレオチド(配列番号69、その5'末端にカルボキシフルオレセイン塩基を有する)の偏光における変化を示す図である(y軸標識=偏光(ブランク減算)、x軸標識=タンパク質濃度(nM))。黒四角点のデータはHe1308Mbu単量体(配列番号10)に対応する。空丸でのデータはHe1308Mbu-GTGS GA-UL42HV1-I320Del(ヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)はリンカー配列GTGS GAによってUL42HV1-I320Del(配列番号63)に付着されている)に対応し、上向き空三角でのデータはHe1308Mbu-GTGS GA-gp32RB69CD(ヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)はリンカー配列GTGS GAによってgp32RB69CD(配列番号64)に付着されている)に対応し、下向き空三角でのデータはHe1308Mbu-GTGS GA-gp2.5T7-R211Del(ヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)がリンカー配列GTGS GAによってgp2.5T7-R211Del(配列番号65)に付着されている)に対応する。付着している追加的結合ドメインを有する全てのHe1308Mbuヘリカーゼ(He1308Mbu-GTGS GA-UL42HV1-I320Del、He1308Mbu-GTGS GA-gp32RB69CDおよびHe1308Mbu-GTGS GA-gp2.5T7-R211Del)は、単量体よりも低い濃度で偏光における増大を示す。これは、追加的結合ドメインを有するHe1308Mbu構築物が単量体よりもDNAに対して強い結合親和性を有することを示す。

20

【図8】種々のHe1308(Mbu)構築物の量を増加させてDNAオリゴヌクレオチド(配列番号69、その5'末端にカルボキシフルオレセイン塩基を有する)の偏光における変化を示す図である(y軸標識=偏光(ブランク減算)、x軸標識=タンパク質濃度(nM))。黒四角点のデータはHe1308Mbu単量体に対応する。空丸でのデータは(gp32RB69CD)-He1308Mbu(gp32RB69CD(配列番号64)はリンカー配列GTGS GTによってヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)に付着されている)に対応する。(gp32RB69CD)-He1308Mbuヘリカーゼ構築物は、単量体よりも低い濃度で偏光における増大を示し、DNAに対するより強い結合が単量体と比較して観察されたことを示している。

30

【図9】Graphpad Prismソフトウェアを使用して図5~8に示すデータを二相解離結合曲線にフィットすることを通じて得られた種々のHe1308(Mbu)構築物についての相対平衡解離定数(K_d)(He1308Mbu単量体に関する)を示すグラフである(y軸標識=相対 K_d 、x軸標識=参照番号)。参照番号は次のHe1308(Mbu)構築物に対応する、3614=He1308(Mbu)、3694=(gp32-RB69CD)-He1308Mbu、3733=He1308(Mbu)-A700C 2kDa PEG二量体、4401=He1308(Mbu)-GTGS GA-(HhH)2、4402=He1308(Mbu)-GTGS GA-(HhH)2-(HhH)2、4394=He1308(Mbu)-GTGS GA-gp32RB69CD、4395=He1308(Mbu)-GTGS GA-gp2.5T7-R112Delおよび4396=He1308(Mbu)-GTGS GA-UL42HV1-I320Del。付着している追加的結合ドメインを有する全てのヘリカーゼ構築物はHe1308Mbu単量体単独よりも低い平衡解離定数を示す。

40

50

【図10】膜中のナノポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼ単量体の模式図である。A) 印加された場の下で(印加された場の方向は破線黒矢印によって示されている) *cis* コンパートメント中のDNAはナノポアによって捕捉され、第1のヘリカーゼ(灰色半円)がナノポアの最上部に接触するまでナノポアを通して運ばれる。この時点後、ヘリカーゼはDNAに沿って移動し(dNTPおよび好適な金属イオンの存在下で)ナノポアを通るDNAの移動を制御する(酵素移動の方向は空矢印によって示されている)。示されている実施ではDNA鎖は、ポアによって5'末端で捕捉され、酵素は場とは反対にDNAを引いて3'から5'へ移動する。酵素が解離しない限り、鎖は同様に全て5'末端で終わり、最終的に*cis*側に押し戻される。代替的にナノポアによって3'末端で捕捉された鎖は、DNAに沿って3'から5'へ移動する酵素によってポアに供給され、最終的には*trans*側に出される。5'から3'への極性を示す酵素では、これらのモードは逆になる。B) 酵素単量体について、酵素の1つが解離する場合(矢印1によって示される)DNAは印加された場によって反対方向にポアを通して移行し始め、DNAを*cis*コンパートメントに引く。C) DNAは、第2のヘリカーゼ(黒輪郭半円)がナノポアの最上部に接触するまで印加された場に沿って移動し続ける。

10

【図11】膜中のナノポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼ-ヘリカーゼ二量体の模式図である。A) 印加された場の下で(印加された場の方向は破線黒矢印によって示されている) *cis* コンパートメント中のDNAはナノポアによって捕捉され、ヘリカーゼがナノポアの最上部に接触するまでナノポアを通して運ばれる。この時点後、ヘリカーゼはDNAに沿って移動し(dNTPおよび好適な金属イオンの存在下で)ナノポアを通るDNAの移動を制御する。示される実施ではDNA鎖は、ポアによって5'末端で捕捉され、酵素は場とは反対にDNAを引いて3'から5'へ移動する。酵素が解離しない限り、鎖は同様に全て5'末端で終わり、最終的に*cis*側に押し戻される。代替的にナノポアによって3'末端で捕捉された鎖は、DNAに沿って3'から5'へ移動する酵素によってポアに供給され、最終的には*trans*側に出される。5'から3'での酵素では、これらのモードは逆になる。B) 酵素二量体について、酵素の1つが解離する場合(矢印1によって示される)それは他の酵素に付着したままであり、それによりDNAにあるままである。C) これは、解離した酵素のDNAへの再結合を増強し、それはDNAに沿って移動し続けられる。この増強された再結合は、二量体構築物がDNA上のままであり、最終的にDNAの末端まで移動する可能性を改善し、全体的な前進性を改善する。酵素再結合は、矢印2によって示される。ポアの最上部上の酵素がDNAから解離する場合、C)からA)に戻る遷移が観察される可能性がある。DNAは、付着したトレイル(trailing)酵素に達するまで印加された場によってポアを通して引き戻される。次いで解離した酵素はそれ自体に再付着できる。この工程は、C)からA)へ戻る薄灰色矢印によって強調される。

20

30

【図12】実施例5、6および7において使用したDNA基質設計を示す図である。鎖Aは、配列番号70(400塩基長)に対応し、鎖Bは配列番号71(3'末端にコレステロールタグを有するプライマー(黒丸2個によって示される))に対応する。

【図13】ヘリカーゼ単量体が制御された様式でナノポアを通してDNAを移動させることができ、DNAがナノポアを通して移動するときに電流に段階的变化を生じさせることを示す図である。単量体ヘリカーゼがMS(B1-L88N)8MspAナノポア(配列番号2に示す8単量体単位、変異L88Nを有する)を通してDNAの移行を制御するときに観察された電流トレース例((120mV、1M KCl、10mM Hepes pH8.0、0.15nM 400塩基長DNA、100nM Hel308Mbu単量体(配列番号10)、1mM DTT、1mM ATP、10mM MgCl₂)(トレースAおよびBについて、y軸標識=電流(pA)、x軸標識=時間(分))。A) Hel308Mbu単量体制御400塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル(約260pA)からDNAレベル(約20~60pA)への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動さ

40

50

せるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。B) 特徴的なポリTレベルで終わるヘリカーゼ制御DNA移動の拡大図。

【図14】ヘリカーゼ-ヘリカーゼ二量体が制御された様式でナノポアを通してDNAを移動させることができ、DNAがナノポアを通して移動するときに電流に段階的变化を生じさせることを示す図である。二量体ヘリカーゼがMS(B1-L88N)8MspAナノポア(配列番号2、変異L88Nを有する)を通してDNAの移行を制御するときに観察された電流トレース例(+120mV、1M KCl、10mM Hepes pH8.0、0.15nM 400塩基長DNA、10nM Hel308Mbu A700C 2kDa 二量体(ここで各単量体単位は変異A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)、1mM DTT、1mM ATP、10mM MgCl₂) (トレースAおよびBについて、y軸標識=電流(pA)、x軸標識=時間(分))。A) Hel308Mbu A700C 2kDa二量体制御400塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル(約260pA)からDNAレベル(約20~60pA)への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動させるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。B) 特徴的なポリTレベルで終わるヘリカーゼ制御DNA移動の拡大図。

【図15】ナノポアを通るDNAの移動を制御するために単量体Hel308Mbu(配列番号10)を使用する実験についての鎖移動の全長(状態の数、移動した塩基の数に対応する)を示す図である(+120mV、1M KCl、10mM Hepes pH8.0、0.15nM 400塩基長DNA、100nM Hel308Mbu単量体、1mM DTT、1mM ATP、10mM MgCl₂、MS(B1-L88N)8MspA、y軸標識=状態の数、x軸標識=鎖)。点線は、500に対応する状態の数を強調する。単量体実行について測定されたヘリカーゼ制御DNA移動の37%がDNA鎖の末端のポリTに達した。

【図16】ナノポアを通るDNAの移動を制御するためにHel308Mbu A700C 2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)を使用する実験についての鎖移動の全長(状態の数、移動した塩基の数に対応する)を示す図である(+120mV、1M KCl、10mM Hepes pH8.0、0.15nM 400塩基長DNA、10nM Hel308Mbu A700C 2kDa二量体、1mM DTT、1mM ATP、10mM MgCl₂、MS(B1-L88N)8MspA、y軸標識=状態の数、x軸標識=鎖)。二量体によって制御されるDNA移動は、単量体ヘリカーゼによって制御されるものよりも典型的には長い(点線は、500に対応する状態の数を強調する)。これは、酵素再結合およびしたがって酵素解離の低減を示している。二量体実行について測定されたヘリカーゼ制御DNA移動の47%がDNA鎖の末端のポリTに達し、二量体の解離の低減および前進性の改善を示している。

【図17】状態指数の関数としてのHel308Mbu単量体制御鎖移動に関する状態フィットデータの公知のDNA配列における位置(y軸標識=配列における位置)の6例を示す図である(x軸標識=状態指数)。Hel308Mbu単量体(配列番号10)データは、酵素解離およびトレイル酵素に出会うまで印加された場の下でDNAが逆戻りした結果である配列の先行部分への周期的な後退転位を含む、配列を通じた前進性直線移動を示す。ヘリカーゼ制御DNA移動の多数は、酵素解離のために配列の末端までたどり着けない。

【図18】状態指数の関数としてのHel308Mbu A700C 2kDaホモ二量体(ここで各単量体単位は変異A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単

10

20

30

40

50

位は2 kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位的位置700を介して他に連結されている)制御鎖移動に関する状態フィットデータの公知のDNA配列における位置(y軸標識=位置配列)の6例を示す図である(x軸標識=状態指数)。二量体データは、酵素解離の結果である配列の先行部分への周期的な後退転位を含む、配列を通じた前進性直線移動を示す。しかし単量体データとは異なり、酵素はより長くDNAの移動を制御し続け、解離後に酵素はDNAに再結合する。

【図19】ヘリカーゼ-ヘリカーゼ二量体が制御された様式でナノポアを通してDNAを移動させることができ、DNAがナノポアを通して移動するときに電流に段階的变化を生じさせることを示す図である。二量体ヘリカーゼがMS(B1-L88N)8MspAナノポアを通してDNAの移行を制御するときに観察された電流トレース例(180mV、400mM KCl、10mM Hepes pH8.0、0.15nM 400塩基長DNA、およそ1nM Hel308Mbu Q442C 2kDaリンカーホモ二量体(ここで各単量体単位は変異Q442Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位的位置442を介して他に連結されている)または1nM Hel308Mbu Q442C 3.4kDaリンカーホモ二量体(ここで各単量体単位は変異Q442Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位的位置442を介して他に連結されている)、1mM DTT、1mM ATP、1mM MgCl₂)(トレースAおよびBについて、y軸標識=電流(pA)、x軸標識=時間(分))。A)Hel308Mbu Q442C 2kDaリンカーホモ二量体制御400塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル(約170pA)からDNAレベル(約40~80pA)への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動させるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。B)Hel308Mbu Q442C 3.4kDaリンカーホモ二量体制御400塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル(約170pA)からDNAレベル(約40~80pA)への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動させるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。

【図20】追加的結合ドメインに付着しているヘリカーゼが制御された様式でナノポアを通してDNAを移動させることができ、DNAがナノポアを通して移動するときに電流に段階的变化を生じさせることを示す図である。ヘリカーゼがMS(B1-L88N)8MspAナノポアを通してDNAの移行を制御するときに観察された電流トレース例(140mV、400mM NaCl、10mM Hepes pH8.0、0.6nM 400塩基長DNA、100nM Hel308Mbu + Hel308 H1a第5ドメイン(ヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)はHel308 H1a(配列番号66))の第5ドメインに付着されている、または100nM Hel308Mbu + Hel308 Hvo第5ドメイン(ヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)はHel308 Hvo(配列番号67))の第5ドメインに付着されている)、1mM DTT、1mM ATP、1mM MgCl₂)(トレースAおよびBについて、y軸標識=電流(pA)、x軸標識=時間(分))。A)Hel308Mbu + Hel308 H1a第5ドメイン制御400塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル(約100pA)からDNAレベル(約10~40pA)への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動させるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。B)Hel308Mbu + Hel308 Hvo第5ドメイン制御40

10

20

30

40

50

0塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル（約100 pA）からDNAレベル（約10～40 pA）への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動させるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。

【図21】実施例8において使用されたDNA基質設計を示す図である。鎖Aは配列番号72（900塩基長）に対応し、鎖Bは配列番号73（アンチセンス配列より4塩基対少ないリーダー）に対応する。鎖Cは配列番号74（コレステロールタグを3'末端に有するプライマー（黒丸2個によって示される））に対応する。

【図22】追加的ヘリックス-ヘアピン-ヘリックス結合ドメインに付着しているヘリカーゼが制御された様式でナノポアを通してDNAを移動でき、DNAがポアを通過して移動するときに電流における段階的变化を生じることを示す図である。ヘリカーゼがMS（B1-G75S-G77S-L88N-Q126R）8MspAナノポア（配列番号2に示され、変異G75S/G77S/L88N/Q126Rを有する8単量体単位）を通してDNAの移行を制御するときに観察された電流トレース例（140 mV、400 mM NaCl、100 mM Hepes pH 8.0、0.1 nM 900塩基長DNA、100 nM Hel308MbU-GTGS GA-(HhH)2（ヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はリンカー配列GTGS GAによってHhH2ドメイン（配列番号75）に付着されている）または100 nM Hel308MbU-GTGS GA-(HhH)2-(HhH)2（ヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はリンカー配列GTGS GAによって（HhH）2-（HhH）2ドメイン（配列番号76）に付着されている）、10 mM フェロシアン化カリウム、10 mM フェリシアン化カリウム、1 mM ATP、1 mM MgCl₂）（トレースAおよびBについて、y軸標識=電流（pA）、x軸標識=時間（分））。A）Hel308MbU-GTGS GA-(HhH)2制御900塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル（約110 pA）からDNAレベル（約10～40 pA）への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動させるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。B）Hel308MbU-GTGS GA-(HhH)2-(HhH)2制御900塩基長DNA移動の電流対捕捉時間のセクション。印加された電位の下で結合したヘリカーゼを有するDNAは、ナノポアにより捕捉される。これは、オープンポアレベル（約110 pA）からDNAレベル（約10～40 pA）への電流における遮断を生じる。次いでDNAレベルは、酵素がDNAをポアを通して移動させるときに電流における段階的变化を示す。示すヘリカーゼ制御DNA移動例は、ナノポアを出る前に特徴的な長いポリTレベルで終わる。

【図23】酵素活性を検査するための蛍光アッセイを示す図である。通例の蛍光基質が、ハイブリダイズしたdsDNAを置換するヘリカーゼ/ヘリカーゼ二量体（a）の能力をアッセイするために使用された。1）蛍光基質鎖（50 nM最終、配列番号91および92）は、3'および5'の両方のssDNAオーバーハングおよびハイブリダイズしたdsDNAの4塩基セクションを有する。上部鎖（b）はカルボキシフルオレセイン塩基（c）を5'末端（配列番号91中、5と標識）に有し、ハイブリダイズされた相補物（d）はブラックホールクエンチャー（BHQ-1）塩基（e）を3'末端（配列番号92中、6と標識）に有する。ハイブリダイズされた場合、フルオレセインからの蛍光は局在BHQ-1によって消光され、基質は実質的に非蛍光性である。蛍光基質鎖の下部に部分的に相補的である捕捉鎖（f、配列番号93）1 μMがアッセイに含まれる。2）ATP（1 mM）およびMgCl₂（1 mM）の存在下で、基質に添加されたヘリカーゼ（100 nM）は、蛍光基質の3'尾部に結合し、上部鎖に沿って移動し、示されるとおり相補鎖（d）を置換する。3）BHQ-1を有する相補鎖が完全に置換されると主要な鎖上の

10

20

30

40

50

フルオレセインは蛍光を発する。4)置換された下部鎖(d)は過剰量の捕捉鎖(f)に優先的にアニールし、初期基質の再アニールおよび蛍光の消失を防ぐ。

【図24】TrwC Cba 単量体(Aと標識、配列番号87)およびTrwC Cba - TopoV Mka(Bと標識、TrwC CbaはリンカーAYDVGAによって、配列番号90に示すトポイソメラーゼV Mka全長配列のドメインH-Lに付着されている)についての400mM NaClでの緩衝液溶液(10mM Hepes pH 8.0、1mM ATP、1mM MgCl₂、50nM蛍光基質DNA(配列番号91および92)、1μM捕捉DNA(配列番号93))中の活性の初期速度のグラフ(y軸 = 1000 x dsDNA代謝回転(分子/分/酵素)、x軸 = 酵素)である。

【図25】TrwC Cba Q276C - 3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)およびTrwC Cba Q276C単量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含む)の形成および精製中の種々の段階でのゲルを示す図である。レーンM = タンパク質ラダー、レーン1 = E3 - Q276C単量体出発材料、レーン2および3 = 反応混合物。TrwC Cba Q276C - 3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)に対応するバンドは灰色矢印によって示されている。

【図26】TrwC Cba Q276C - 3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)およびTrwC Cba Q276C単量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含む)の形成および精製中の種々の段階でのゲルを示す図である。レーンM = タンパク質ラダー、レーンX = TrwC Cba Q276C - 3.4kDa二量体についての参照レーン、レーン4 ~ 14はTrwC Cba Q276C - 3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)の溶出物からの精製画分を含有する。TrwC Cba Q276C - 3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)に対応するバンドは灰色矢印によって示されている。

【図27】Hel308Mbu - A577Faz - PEG4リンカー - TrwC Cba Q276C二量体(Hel308Mbu単量体単位(2と標識)は、位置577のアミノ酸が4 - アジド - L - フェニルアラニン(Faz)に変異されている配列番号10を含み、PEG4リンカー(黒点線)によってTrwC Cba単量体単位(1と標識)変異Q276Cを有する配列番号87に付着されており、リンカーはHel308Mbu単量体上の位置577およびTrwC Cba上の位置276で各単量体に付着されている)を形成するために必要である化学反応ステップの模式図である。ステップ1は、TrwC Cbaの表面上の位置276のシステインとPEG4リンカーの一方の端のマレイミド官能基(Xと標識)とが反応する。ステップ2は、Hel308Mbuの表面上の位置577の4 - アジド - L - フェニルアラニン(Faz)アミノ酸とPEG4リンカーの他方の端のDBCO官能基(Yと標識)とがクリック化学を使用して反応する。

【図28】実施例12由来の試料の4 ~ 12%ゲルを示す図である。各レーンの試料は次のとおり - レーンa) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87)、レーンb) Hel308Mbu - A577Faz(ここで各単量体単位は変異A577Fazを有する配列番号10を含む)、レーンc) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Hel308Mbu - A577Faz(ここで各単量体単位は変異A577Fazを有する配列番号10を含む)、レーンd) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) +

10

20

30

40

50

5 kDa PEG、レーンe) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + アジドが付着している5 kDa PEG、レーンf) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Azide Alexa Fluor(登録商標)555(Life Technologies、フルオロフォアとTrwC Cba - Q276C単量体との非特異的相互作用を確認するために使用)、レーンg) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO、レーンh) TrwC Cba - Q276C - PEG4 - DBCO(PEG4 - DBCOリンカーに付着されている変異Q276Cを有する配列番号87) + Hel308MbU(配列番号10)、レーンi) Hel308MbU - A577Faz - PEG4リンカー - TrwC Cba Q276C二量体(Hel308MbU単量体単位は、位置577のアミノ酸が4 - アジド - L - フェニルアラニン(Faz)に変異されている配列番号10を含み、PEG4リンカーによってTrwC Cba単量体単位、変異Q276Cを有する配列番号87に付着されており、リンカーはHel308MbU単量体上の位置577およびTrwC Cba上の位置276で各単量体に付着されている)に加えて未反応TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO + Hel308MbU - A577Faz単量体(ここで各単量体単位は変異A577Fazを有する配列番号10を含む)、レーンj) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO + アジドが付着している5 kDa PEG、レーンk) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO + Azide Alexa Fluor(登録商標)555(Life Technologies、フルオロフォアとTrwC Cba - Q276C単量体との非特異的相互作用を確認するために使用)。所望の二量体産生物(Hel308MbU - A577Faz - PEG4リンカー - TrwC Cba Q276C二量体(Hel308MbU単量体単位は、位置577のアミノ酸が4 - アジド - L - フェニルアラニン(Faz)に変異されている配列番号10を含み、PEG4リンカーによってTrwC Cba単量体単位、変異Q276Cを有する配列番号87に付着されており、リンカーはHel308MbU単量体上の位置577およびTrwC Cba上の位置276で各単量体に付着されている))に対応するバンドは灰色矢印によって示されている。

10

20

30

【発明を実施するための形態】

【0009】

配列表の記載

配列番号1は、MS - B1変異MspA単量体をコードするコドン最適化ポリヌクレチド配列を示す。この変異体は、シグナル配列を欠失しており、次の変異：D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139Kを含む。

【0010】

配列番号2は、MspA単量体のMS - B1変異体の成熟形態のアミノ酸配列を示す。この変異体は、シグナル配列を欠失しており、以下の変異：D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139Kを含む。

40

【0011】

配列番号3は、 α - ヘモリジン - E111N / K147N (α - HL - NN; Stoddartら、PNAS、2009;106(19):7702-7707)の1つの単量体をコードするポリヌクレオチド配列を示す。

【0012】

配列番号4は、 α - HL - NNの1つの単量体のアミノ酸配列を示す。

【0013】

配列番号5から7は、MspB、CおよびDのアミノ酸配列を示す。

【0014】

配列番号8は、Hel308モチーフのアミノ酸配列を示す。

50

【 0 0 1 5 】

配列番号 9 は、拡張 H e l 3 0 8 モチーフのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 1 6 】

配列番号 1 0 は H e l 3 0 8 M b u のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 1 7 】

配列番号 1 1 は H e l 3 0 8 M b u および H e l 3 0 8 M h u の H e l 3 0 8 モチーフを示す。

【 0 0 1 8 】

配列番号 1 2 は H e l 3 0 8 M b u および H e l 3 0 8 M h u の伸長された H e l 3 0 8 モチーフを示す。

10

【 0 0 1 9 】

配列番号 1 3 は H e l 3 0 8 C s y のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 2 0 】

配列番号 1 4 は H e l 3 0 8 C s y の H e l 3 0 8 モチーフを示す。

【 0 0 2 1 】

配列番号 1 5 は H e l 3 0 8 C s y の伸長された H e l 3 0 8 モチーフを示す。

【 0 0 2 2 】

配列番号 1 6 は H e l 3 0 8 T g a のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 2 3 】

配列番号 1 7 は H e l 3 0 8 T g a の H e l 3 0 8 モチーフを示す。

20

【 0 0 2 4 】

配列番号 1 8 は H e l 3 0 8 T g a の伸長された H e l 3 0 8 モチーフを示す。

【 0 0 2 5 】

配列番号 1 9 は H e l 3 0 8 M h u のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 2 6 】

配列番号 2 0 は R e c D 様モチーフ I を示す。

【 0 0 2 7 】

配列番号 2 1、2 2 および 2 3 は伸長された R e c D 様モチーフ I を示す。

【 0 0 2 8 】

配列番号 2 4 は R e c D モチーフ I を示す。

30

【 0 0 2 9 】

配列番号 2 5 は好ましい R e c D モチーフ I、すなわち G - G - P - G - T - G - K - T を示す。

【 0 0 3 0 】

配列番号 2 6、2 7 および 2 8 は伸長された R e c D モチーフ I を示す。

【 0 0 3 1 】

配列番号 2 9 は R e c D 様モチーフ V を示す。

【 0 0 3 2 】

配列番号 3 0 は R e c D モチーフ V を示す。

【 0 0 3 3 】

配列番号 3 1 から 3 8 は M o b F モチーフ I I I を示す。

40

【 0 0 3 4 】

配列番号 3 9 から 4 5 は M o b Q モチーフ I I I を示す。

【 0 0 3 5 】

配列番号 4 6 は T r a I E c o のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 6 】

配列番号 4 7 は T r a I E c o の R e c D 様モチーフ I を示す。

【 0 0 3 7 】

配列番号 4 8 は T r a I E c o の R e c D 様モチーフ V を示す。

【 0 0 3 8 】

50

配列番号 49 は T r a I E c o の M o b F モチーフ I I I を示す。

【 0 0 3 9 】

配列番号 50 は X P D モチーフ V を示す。

【 0 0 4 0 】

配列番号 51 は X P D モチーフ V I を示す。

【 0 0 4 1 】

配列番号 52 は X P D M b u のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 2 】

配列番号 53 は X P D M b u の X P D モチーフ V を示す。

【 0 0 4 3 】

配列番号 54 は X P D M b u の X P D モチーフ V I を示す。

【 0 0 4 4 】

配列番号 55 は好ましい H h H ドメインのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 5 】

配列番号 56 は g p 3 2 遺伝子によってコードされる、バクテリオファージ R B 6 9 由来 S S B のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 6 】

配列番号 57 は g p 2 . 5 遺伝子によってコードされるバクテリオファージ T 7 由来 S S B のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 7 】

配列番号 58 はヘルペスウイルス 1 由来 U L 4 2 前進性因子のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 8 】

配列番号 59 は P C N A のサブユニット 1 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 9 】

配列番号 60 は P C N A のサブユニット 2 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 5 0 】

配列番号 61 は P C N A のサブユニット 3 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 5 1 】

配列番号 62 は P h i 2 9 D N A ポリメラーゼのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 5 2 】

配列番号 63 はヘルペスウイルス 1 由来 U L 4 2 前進性因子のアミノ酸配列 (1 から 3 1 9) を示す。

【 0 0 5 3 】

配列番号 64 はバクテリオファージ R B 6 9 由来 S S B のアミノ酸配列、すなわち C 末端が欠失している (g p 3 2 R B 6 9 C D) 配列番号 56 を示す。

【 0 0 5 4 】

配列番号 65 はバクテリオファージ T 7 (g p 2 . 5 T 7 - R 2 1 1 D e l) 由来の S S B のアミノ酸配列 (1 から 2 1 0) を示す。全長タンパク質は配列番号 57 において示されている。

【 0 0 5 5 】

配列番号 66 は H e l 3 0 8 H l a の第 5 ドメインのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 5 6 】

配列番号 67 は H e l 3 0 8 H v o の第 5 ドメインのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 5 7 】

配列番号 68 はヘリカーゼ二量体産生において使用される D N A 鎖のポリヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 5 8 】

配列番号 69 はヘリカーゼ蛍光アッセイにおいて使用される D N A 鎖のポリヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

配列番号 70 は実施例 5、6 および 7 において使用される ssDNA 鎖のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号 70 の 5' 末端に、ナノポアによる捕捉を補助するために 50 T リーダー配列に付着している 4 個の 2'-O-メチルウラシル塩基がある。

【0060】

配列番号 71 は実施例 5、6 および 7 において使用される ssDNA 鎖のポリヌクレオチド配列を示す。

【0061】

配列番号 72 および 73 は実施例 8 において使用される ssDNA 鎖のポリヌクレオチド配列を示す。

【0062】

配列番号 74 は実施例 8 において使用される ssDNA 鎖のポリヌクレオチド配列を示す。

【0063】

配列番号 75 は (HhH)2 ドメインのアミノ酸配列を示す。

【0064】

配列番号 76 は (HhH)2 - (HhH)2 ドメインのアミノ酸配列を示す。

【0065】

配列番号 77 はヒトミトコンドリア SSB (HsmtSSB) のアミノ酸配列を示す。

【0066】

配列番号 78 は Phi29 DNA ポリメラーゼ由来 p5 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0067】

配列番号 79 は大腸菌 (E. coli) 由来野生型 SSB のアミノ酸配列を示す。

【0068】

配列番号 80 は、gp32 遺伝子によってコードされるバクテリオファージ T4 由来 ssb のアミノ酸配列を示す。

【0069】

配列番号 81 は EcoSSB - CterAla のアミノ酸配列を示す。

【0070】

配列番号 82 は EcoSSB - CterNGGN のアミノ酸配列を示す。

【0071】

配列番号 83 は EcoSSB - Q152del のアミノ酸配列を示す。

【0072】

配列番号 84 は EcoSSB - G117del のアミノ酸配列を示す。

【0073】

配列番号 85 は GTGSGA リンカーを示す。

【0074】

配列番号 86 は GTGSGT リンカーを示す。

【0075】

配列番号 87 はアミノ酸配列 TrwC Cba を示す。

【0076】

配列番号 88 は実施例 9 において使用されるポリヌクレオチド配列の一部を示す。この配列の 5' 末端に付着しているのは 28 個の iSpC3 スペース単位であり、その最後はスペース群の 5' 末端に付着している追加的な 2 個の T を有する。この配列の 3' 末端に付着しているのは 4 つの iSpC3 スペース単位であり、配列番号 104 の 5' 末端に付着している。

【0077】

配列番号 89 はトポイソメラーゼ V Mka (メタノピュルス・カンドレリ (Methanopyrus Kandleri)) のアミノ酸配列を示す。

【0078】

10

20

30

40

50

配列番号 90 は TrwC Cba - TopoV Mka のアミノ酸配列を示し、TrwC Cba はリンカー AYDVGA によってトポイソメラーゼ V Mka のドメイン H-L に付着されている。

【0079】

配列番号 91 ~ 93 は実施例 10 において使用されるポリヌクレオチド配列を示す。

【0080】

配列番号 94 はトポイソメラーゼ V Mka (メタノピュルス・カンドレリ (Methanopyrus Kandleri)) のドメイン H-L のアミノ酸配列を示す。

【0081】

配列番号 95 から 103 は表 2 に示す TraI 配列のいくつかを示す。

10

【0082】

配列番号 104 は実施例 9 において使用されるポリヌクレオチド配列の部分を示す。この配列の 5' 末端に付着しているのは 4 個の iSpC3 スペース単位であり、その最後は配列番号 88 に付着されている。配列番号 88 の 5' 末端に付着しているのは 28 個の iSpC3 スペース単位であり、その最後はスペース群の 5' 末端に付着している追加的な 2 個の T を有する。

【0083】

配列番号 105 は変異体 S (大腸菌 (Escherichia coli)) のアミノ酸配列を示す。

【0084】

配列番号 106 は Sso7d (スルホロブス・ソルファタリカス (Sulfolobus solfataricus)) のアミノ酸配列を示す。

20

【0085】

配列番号 107 は Sso10b1 (スルホロブス・ソルファタリカス (Sulfolobus solfataricus) P2) のアミノ酸配列を示す。

【0086】

配列番号 108 は Sso10b2 (スルホロブス・ソルファタリカス (Sulfolobus solfataricus) P2) のアミノ酸配列を示す。

【0087】

配列番号 109 はトリプトファンリプレッサー (大腸菌 (Escherichia coli)) のアミノ酸配列を示す。

30

【0088】

配列番号 110 はラムダリプレッサー (腸内細菌 (Enterobacteria) ファージラムダ) のアミノ酸配列を示す。

【0089】

配列番号 111 は Cren7 (ヒストン・クレンアーキア (Histone crenarchaea) Cren7 Sso) のアミノ酸配列を示す。

【0090】

配列番号 112 はヒトヒストン (ヒト (Homo sapiens)) のアミノ酸配列を示す。

【0091】

配列番号 113 は dsbA (腸内細菌ファージ T4) のアミノ酸配列を示す。

40

【0092】

配列番号 114 は Rad51 (ヒト (Homo sapiens)) のアミノ酸配列を示す。

【0093】

配列番号 115 は PCNA スライディングクランプ (sliding clamp) (シトロミクロビウム・バチオマリヌム (Citromicrobium bathyomarinum) JL354) のアミノ酸配列を示す。

【0094】

発明の詳細な記載

本開示の生成物および方法のさまざまな応用が当技術分野における具体的な必要性に適合され得ることは理解される。本明細書で用いられる用語は本発明の詳細な実施形態を記

50

載する目的のためのみであり、限定されることを意図しないことも理解される。

【0095】

付加的に、本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が他を明確に記す場合を除いて複数の参照物を含む。したがって例えば、「構築物(a construct)」を参照することは「構築物(constructs)」を含み、「ヘリカーゼ(a helicase)」を参照することは2つ以上のそのようなヘリカーゼを含み、「膜貫通タンパク質ポア(a transmembrane protein pore)」を参照することは2つ以上のそのようなポアを含む、など。

【0096】

本明細書に引用する全ての刊行物、特許および特許出願は(上記または下記に関わらず)それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0097】

本発明における使用のための構築物

本発明は、ポリヌクレオチドの移動を制御するために役立つ構築物を使用する方法を提供する。構築物は、ヘリカーゼおよび追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む。ヘリカーゼは、ポリヌクレオチド結合成分に付着されている。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、人工または非天然である。

【0098】

下により詳細に考察されるとおり構築物は、2つ以上のヘリカーゼを含む場合がある(すなわち追加的ポリヌクレオチド結合成分は1つまたは複数の追加的ヘリカーゼである)。そのような実施形態では構築物中の各ヘリカーゼは、そのままヘリカーゼとして機能できる。構築物それ自体は、二量体ヘリカーゼなどの多量体またはオリゴマーヘリカーゼではない。換言すると、構築物それ自体は、二量体などの多量体またはオリゴマーとして天然に存在するヘリカーゼではない。構築物は二量体などの多量体ヘリカーゼを含んでよいが、それは別のヘリカーゼなどの追加的ポリヌクレオチド結合成分に付着されていなければならない。ヘリカーゼは、好ましくは単量体である。ヘリカーゼは好ましくはヘリカーゼ酵素由来のヘリカーゼドメインではない。これは下でより詳細に考察される。

【0099】

本明細書に記載の構築物は、鎖配列決定法の際にポリヌクレオチドの移動を制御するための有用な手段である。ポリヌクレオチド、特に、500ヌクレオチド以上のものを配列決定することにおいて生じる問題は、ポリヌクレオチドの移行を制御する分子モーターがポリヌクレオチドから離される場合があることである。これは、ポリヌクレオチドが印加された場の方向に急速かつ制御されない様式でポアを通して引かれるようにする。本明細書に記載の構築物は、配列決定されているポリヌクレオチドから離されにくい。構築物は、ナノポアを通るポリヌクレオチドの移行を制御することからポリヌクレオチドの読み取り長さの増大を提供できる。本明細書に記載の構築物の制御下でポリヌクレオチド全体をナノポアを通して移行させる能力は、その配列などのポリヌクレオチドの特性を改善された確度および公知の方法を超える速度で推定できるようにする。鎖長が長くなるにつれてこれはより重要になり、分子モーターは前進性の改善を必要とする。本明細書に記載の構築物は、500ヌクレオチド以上、例えば1000ヌクレオチド、5000、10000、20000、50000、100000またはそれ以上の標的ポリヌクレオチドの移行を制御することにおいて特に有効である。

【0100】

特異的ポリヌクレオチド配列に結合する標的化構築物も設計できる。下により詳細に考察されるとおりポリヌクレオチド結合成分は、特異的ポリヌクレオチド配列に結合でき、それにより構築物のヘリカーゼ部分を特異的配列に標的化できる。

【0101】

本明細書に記載の構築物は、等温ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のための有用な手段でもある。そのような方法においては、2本鎖DNAの鎖は典型的には最初に本明細書に記載の構築物によって分離され、1本鎖DNA(ssDNA)-結合タンパク質によって

10

20

30

40

50

コートされる。第二ステップでは、2個の配列特異的プライマーが、典型的にはDNA鋳型の各辺縁にハイブリダイズする。次いでDNAポリメラーゼは鋳型にアニールしたプライマーを、2本鎖DNAを産生するように伸長するために使用でき、2個の新たに合成されたDNA産生物は、次いで本明細書に記載の構築物によって基質として使用され、次の回の反応に入ることができる。したがって鎖反応が同時に進行し、選択された標的配列の指数関数的増幅が生じる。

【0102】

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。ポリヌクレオチドの移動を制御する構築物の能力は、当技術分野において公知の任意の方法を使用してアッセイできる。例えば構築物は、ポリヌクレオチドに接触されてよく、ポリヌクレオチドの位置は、標準的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構築物の能力は、実施例において記載のとおり典型的にはアッセイされる。

10

【0103】

構築物は、単離、実質的に単離、精製または実質的に精製されていてよい。構築物は、それが脂質、ポリヌクレオチド、またはポア単量体などの任意の他の構成成分を完全に含まない場合に単離または精製されている。構築物は、その目的の使用を妨害しない担体または希釈剤と混合されている場合に実質的に単離されている。例えば構築物は、10%未満、5%未満、2%未満または1%未満の脂質、ポリヌクレオチド、またはポア単量体などの他の構成成分を含む形態で存在する場合に実質的に単離または実質的に精製されている。

20

【0104】

付着

ヘリカーゼは、追加的ポリヌクレオチド結合成分に付着されている。ヘリカーゼは、好ましくは共有結合的に追加的ポリヌクレオチド結合成分に付着している。ヘリカーゼは、2個または3個などの1個以上の点で成分に付着していてよい。

【0105】

ヘリカーゼは、当技術分野において公知の任意の方法を使用して成分に共有結合的に付着できる。ヘリカーゼおよび成分は、別々に産生され、次いで一緒に付着されてよい。2つの構成成分は、任意の立体配置で付着されてよい。例えばそれらは、それらの末端（すなわちアミノまたはカルボキシ末端）アミノ酸を介して付着してよい。好適な立体配置は、これだけに限らないが、成分のアミノ末端がヘリカーゼのカルボキシ末端に付着しているおよびその逆を含む。代替的に2つの構成成分は、それらの配列内のアミノ酸を介して付着され得る。例えば成分は、ヘリカーゼのループ領域中の1つまたは複数のアミノ酸に付着する場合がある。好ましい実施形態では成分の末端アミノ酸は、ヘリカーゼのループ領域中の1つまたは複数のアミノ酸に付着する。末端アミノ酸およびループ領域は、当技術分野において公知の方法（Edman P., Acta Chemica Scandinavia, (1950), 283-293）を使用して同定できる。例えば、ループ領域はタンパク質モデリングを使用して同定できる。これは、相同体においてタンパク質構造がタンパク質配列よりも保存されているという事実を活用する。それにより、タンパク質の原子分解モデルを作成することは、クエリー配列の構造に類似していると考えられる1つまたは複数のタンパク質構造の同定に依存する。タンパク質モデルを構築するための「鋳型」として使用するための好適なタンパク質構造が存在するかどうかを評価するために、タンパク質データベース（PDB）データベースの検索を実施する。タンパク質構造は、クエリー配列と合理的なレベルの配列同一性を共有している場合に好適な鋳型であると考えられる。そのような鋳型が存在する場合、次いで鋳型配列はクエリー配列と「配列比較」される、すなわちクエリー配列中の残基が鋳型残基に位置付けられる。配列の配列比較および鋳型構造は、次いでクエリー配列の構造モデルを作成するために使用される。そのためタンパク質モデルの品質は、配列の配列比較および鋳型構造の品質に依存する。

30

40

【0106】

2つの構成成分は、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

50

、グルタミン酸およ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付着してよい。天然に存在するアミノ酸は、付着を促進するために修飾されてよい。例えば天然に存在するアミノ酸は、アシル化、リン酸化、グリコシル化またはファルネシル化によって修飾されてよい。他の好適な修飾は、当技術分野において公知である。天然に存在するアミノ酸への修飾は、翻訳後修飾であってよい。2つ以上の部分は、それらの配列に導入されるアミノ酸を介して付着してよい。そのようなアミノ酸は、好ましくは置換によって導入される。導入されるアミノ酸は、システインまたは付着を促進する非天然アミノ酸であってよい。好適な非天然アミノ酸は、これだけに限らないが、4 - アジド - L - フェニルアラニン (F a z)、および Liu C. C. and Schultz P. G., Annu. Rev. Biochem., 2010, 79, 413-444の図 1 に含まれている 1 ~ 7 1 と番号付けられたアミノ酸のいずれか 1 つを含む。導入されるアミノ酸は、上に考察したとおり修飾されてよい。

10

【 0 1 0 7 】

好ましい実施形態ではヘリカーゼは、成分に、例えばリンカー分子を介して化学的に付着されている。リンカー分子は、下により詳細に考察される。化学的な付着の1つの好適な方法は、システイン連結である。これは下でより詳細に考察される。

【 0 1 0 8 】

ヘリカーゼは、ヘキサヒスタグまたはNi-NTAによって成分に一過的に繋がれてよい。ヘリカーゼおよび成分は、それらが相互に一過的に付着されるようにも修飾されてよい。

【 0 1 0 9 】

別の好ましい実施形態ではヘリカーゼは、成分に遺伝子的に融合される。構築物全体が1本のポリヌクレオチド配列から発現される場合にヘリカーゼは、遺伝的に成分に融合されている。ヘリカーゼおよび成分のコード配列は、構築物をコードしている1本のポリヌクレオチド配列を形成するために任意の方法で組み合わせられてよい。核酸結合タンパク質へのポアの遺伝子的融合は、国際出願第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)において考察されている。

20

【 0 1 1 0 】

ヘリカーゼおよび成分は、任意の立体配置で遺伝的に融合され得る。ヘリカーゼおよび成分は、それらの末端アミノ酸を介して融合され得る。例えば成分のアミノ末端はヘリカーゼのカルボキシ末端に融合でき、逆も同様である。成分のアミノ酸配列は、ヘリカーゼのアミノ酸配列にインフレームで好ましくは付加される。換言すると成分は、ヘリカーゼの配列内に好ましくは挿入される。そのような実施形態ではヘリカーゼおよび成分は、2つの点で、すなわち成分のアミノおよびカルボキシ末端アミノ酸を介して典型的には付着される。成分がヘリカーゼの配列内に挿入される場合、成分のアミノおよびカルボキシ末端アミノ酸が近接近にあり、ヘリカーゼまたはその変種の配列内の隣接アミノ酸にそれぞれ付着していることは好ましい。好ましい実施形態では成分は、ヘリカーゼのループ領域に挿入される。

30

【 0 1 1 1 】

構築物は、ポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼの能力を保持している。ヘリカーゼのこの能力は、その鎖およびヘリックスによって典型的には提供されるその三次元構造により典型的には提供される。ヘリックスおよび鎖は、ループ領域により典型的には繋がれている。ポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼの能力に影響を与えることを回避するために、成分は好ましくはヘリカーゼのいずれかの末端に遺伝的に融合される、またはヘリカーゼの表面露出ループに挿入される。特異的ヘリカーゼのループ領域は、当技術分野において公知の方法を使用して同定できる。例えば、ループ領域は、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.)、溶液における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 II; Skelton, Nicholas J. (2007). Protein NMR spectroscopy: principles and practi

40

50

ce (2nd ed.). Boston: Academic Press.) または凍結水和状態におけるタンパク質のクリオ電子顕微鏡 (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. 33: 307-69を使用して同定できる。上に述べ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 (PDB) データベースから公開で入手可能である。

【0112】

Hel308ヘリカーゼ (配列番号10、13、16および19) に関して、鎖は2個のRecA様エンジン (RecA-like engine) ドメイン (ドメイン1および2) においてだけ見出すことができる。これらのドメインは、燃料ヌクレオチド (通常はATP) の加水分解と移動との連関に関与する。ポリヌクレオチドに沿って徐々に動かすための重要なドメインは、ドメイン3および4であるが、中でもドメイン4である。興味深いことにドメイン3および4の両方はヘリックスだけを含む。ドメイン4中にラチェットヘリックスと称される重要なヘリックスがある。結果として本発明のHel308実施形態では、成分は好ましくはヘリックスのいずれにも遺伝子的に融合されていない。

10

【0113】

別の実施形態ではヘリカーゼは、インテインタグ配列を使用して成分に付着される。2つのタンパク質は、各タンパク質の末端に適合性の分割インテイン (split intein) タグ配列を遺伝的にコードすることによって連結され得る。インテインは、触媒または酵素を必要とせず、2つのタンパク質を連結する際に自己遊離 (self release) する。連結は、痕跡がなく、1本鎖ペプチドを残す。この方法は、一般的にはタンパク質の末端を連結するためである。

20

【0114】

ヘリカーゼは、成分に直接付着されていてよい。ヘリカーゼは、2つまたは3つなどの1つまたは複数のリンカーを使用して成分に好ましくは付着されている。1つまたは複数のリンカーは、成分の可動性を制限するように設計される場合がある。リンカーは、ヘリカーゼおよび/または成分における1つまたは複数の反応性システイン残基、反応性リシン残基または非天然アミノ酸に付着してよい。非天然アミノ酸は、上に考察した任意のものであってよい。非天然アミノ酸は、好ましくは4-アジド-L-フェニルアラニン (Faz) である。好適なリンカーは、当技術分野において十分公知である。

30

【0115】

ヘリカーゼは、1つもしくは複数の化学的架橋剤または1つもしくは複数のペプチドリリンカーを使用して好ましくは成分に付着される。好適な化学的架橋剤は、当技術分野において十分公知である。好適な化学的架橋剤は、これだけに限らないが、次の官能基: マレイミド、活性エステル、サクシニミド、アジド、アルキン (ジベンゾシクロオクチノール (DIBOまたはDBCO)、ジフルオロシクロアルカンおよび直鎖アルカンなど)、ホスフィン (無痕跡および無痕跡でないシュタウディンガーライゲーションにおいて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、イソチオシアン酸、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、アジリジンおよび光反応性試薬 (アリールアジド、ジアジリジンなど) を含むものを含む。架橋剤は、好ましくはビス (スルホサクシニミジル) スベレート (BS³) ではない。ヘリカーゼおよび成分は、好ましくはホルムアルデヒドを使用して架橋結合されない。

40

【0116】

システイン/マレイミドなど、アミノ酸と官能基との間の反応は自発的であってよく、またはアジドと直鎖状アルキンを連結するためのCu(I) など、他の試薬を必要としてよい。

【0117】

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んでよい。リンカーは、炭素1個 (ホスゲン型リンカー) から多数のオングストロームに長さが変化できる。直鎖状分

50

子の例に含まれるのは、これだけに限らないが、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリペプチド、多糖、デオキシリボ核酸 (D N A)、ペプチド核酸 (P N A)、トレオース核酸 (T N A)、グリセロール核酸 (G N A)、飽和および不飽和炭化水素、ポリアミドである。これらのリンカーは不活性または反応性であってよく、具体的にはそれらは、規定の位置で化学的に切断可能であってよい、またはフルオロフォアもしくはリガンドでそれ自体が修飾されてよい。リンカーは、好ましくはジチオスレイトール (dithiothreitol) (D T T) に抵抗性である。

【 0 1 1 8 】

切断可能なリンカーは、非付着構成成分からの構築物の分離への補助として使用でき、合成反応をさらに制御するために使用できる。例えばヘテロ二機能性リンカーは、ヘリカーゼと反応できるが、成分とはできない。ヘリカーゼタンパク質を表面に結合するためにリンカーの遊離末端が使用できる場合、最初の反応由来の未反応ヘリカーゼは混合物から除去され得る。続いてリンカーは、成分と反応する基を露出させるために切断され得る。付加的に、一連の連結反応に続いて、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成分への反応のために最適化され得る。第二の反応は、リンカーが既に付着している領域に限定されることから、成分との正確な反応部位に向けてさらに方向付けられる。

【 0 1 1 9 】

好ましい架橋剤は、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、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 P E G 1 k、ジ - マレイミド P E G 3, 4 k、ジ - マレイミド P E G 5 k、ジ - マレイミド P E G 10 k、ビス (マレイミド) エタン (B M O E)、ビス - マレイミドヘキサン (B M H)、1, 4 - ビス - マレイミドブタン (B M B)、1, 4 ビス - マレイミジル - 2, 3 - ジヒドロキシブタン (B M D B)、B M [P E O] 2 (1, 8 - ビス - マレイミドジエチレングリコール)、B M [P E O] 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 (T M E A)、D T M E ジチオビスマレイミドエタン、ビスマレイミド P E G 3、ビスマレイミド P E G 11、D B C O - マレイミド、D B C O - P E G 4 - マレイミド、D B C O - P E G 4 - N H 2、D B C O - P E G 4 - N H S、D B C O - N H S、D B C O - P E G - D B C O 2.8 k D a、D B C O - P E G - D B C O 4.0 k D a、D B C O - 15 原子 - D B C O、D B C O - 26 原子 - D B C O、D B C O - 35 原子 - D B C O、D B C O - P E G 4 - S - S - P E G 3 - ビオチン、D B C O - S - S - P E G 3 - ビオチン、D B C O - S - S - P E G 11 - ビオチンを含む。最も好ましい架橋剤は、サクシニジミル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオン酸 (S P D P) およびマレイミド - P E G (2 k D a) - 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)) である。

【 0 1 2 0 】

ヘリカーゼは、ヘリカーゼ / 架橋剤複合体が成分に共有結合的に付着する前に、二機能性架橋剤に共有結合的に付着されてよい。代替的に成分は、二機能性架橋剤 / 成分複合体がヘリカーゼに付着する前に、二機能性架橋剤に共有結合的に付着してよい。ヘリカーゼおよび成分は、化学的架橋剤に同時に共有結合的に付着してよい。

【 0 1 2 1 】

ヘリカーゼは、相互に特異的である 2 つの異なるリンカーを使用して成分に付着される場合がある。リンカーの一方は、ヘリカーゼに付着しており、他方は成分に付着している。一度一緒に混合されると、リンカーは、本明細書に記載の構築物を形成するように反応しなければならない。ヘリカーゼは、国際出願第 P C T / G B 1 0 / 0 0 0 1 3 2 号 (W O 2 0 1 0 / 0 8 6 6 0 2 として公開) に記載のハイブリダイゼーションリンカーを使用して成分に付着されてよい。具体的にはヘリカーゼは、ハイブリダイズ可能な領域および共有結合を形成できる基をそれぞれ含む 2 つ以上のリンカーを使用して成分に付着されて

10

20

30

40

50

よい。リンカーにおけるハイブリダイズ可能な領域は、成分にハイブリダイズし、連結する。連結された成分は、次いで基の間の共有結合の形成を介してカップリングされる。国際出願第PCT/GB10/000132号(WO2010/086602として公開)に開示の任意の特異的リンカーは、本発明により使用できる。

【0122】

ヘリカーゼおよび成分は、修飾される場合があり、次いで2つの修飾に特異的である化学的架橋剤を使用して付着されてよい。上に考察した任意の架橋剤は、使用できる。

【0123】

代替的にリンカーは、アミノ酸配列を好ましくは含む。そのようなリンカーは、ペプチドリンカーである。ペプチドリンカーの長さ、可動性および親水性は、ヘリカーゼおよび成分の機能を妨害しないように典型的には設計される。好ましい可動性ペプチドリンカーは4、6、8、10または16などの2から20のセリンおよび/また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または(SG)₂₀を含み、式中Sはセリンであり、Gはグリシンである。好ましい硬いリンカーは、4、6、8、16または24などの2から30のプロリンアミノ酸のストレッチである。より好ましい硬いリンカーは(P)₁₂を含み、式中Pはプロリンである。

【0124】

リンカーは、標識されてよい。好適な標識は、これだけに限らないが、蛍光分子(Cy3またはAlexaFluor(登録商標)555など)、放射性同位元素、例えば¹²⁵I、³⁵S、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチドおよび、ビオチンなどのリガンドを含む。そのような標識は、リンカーの量を定量できるようにする。標識は、ビオチンなどの切断可能な精製タグ、またはタンパク質自体には存在しないがトリプシン消化によって遊離されるペプチドなどの同定方法において明らかになる特異的配列であってもよい。

【0125】

ヘリカーゼを成分に付着させる好ましい方法は、システイン連結を介する。これは、二機能性化学的リンカーにより、または末端に存在するシステイン残基を有するポリペプチドリンカーにより調節できる。連結は、ヘリカーゼおよび/または成分中の天然システインを介して生じてよい。代替的にシステインは、ヘリカーゼおよび/または成分に導入される場合がある。ヘリカーゼがシステイン連結を介して成分に付着される場合、1つまたは複数のシステインは、置換によってヘリカーゼおよび/または成分に好ましくは導入される。

【0126】

任意の二機能性リンカーの長さ、反応性、特異性、硬さおよび溶解度は、成分がヘリカーゼとの関連で正確に位置付けられ、ヘリカーゼおよび成分の両方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。好適なリンカーは、1,4-ビス(マレイミド)ブタン(BMB)またはビス(マレイミド)ヘキサンのようなビスマレイミド架橋剤を含む。特異的部位での付着が好ましい場合に、表面の利用可能なシステイン残基への二機能性リンカーの結合は制御することが困難である場合があり、基質結合または活性に影響を与える場合があることから、二機能性リンカーを引き戻すものは、さらなる表面の利用可能なシステイン残基を含まないヘリカーゼおよび成分の必要性である。ヘリカーゼおよび/または成分がいくつかの利用可能なシステイン残基を含有する場合は、修飾がヘリカーゼおよび成分のフォールディングまたは活性に影響を与えないことを確実にしながら、それら除去するためにヘリカーゼおよび/または成分の修飾が必要である場合がある。これは、国際出願第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)において考察されている。好ましい実施形態では反応性システインは、成分に遺伝子的に付着されているペプチドリンカー上に存在する。これは、成分から他の利用可能なシステイン残基を除去するために追加的修飾が必ずしも必要ではないことを意味する。システイン残基の反応性は隣接残基の、例えばペプチドリンカー上の修飾によって増強できる。例えば近接するアルギニン、ヒスチジンまたはリシン残基の塩基性基は、システインチ

オール基の pK_a をさらに反応性の S^- 基のものに変化させる。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できる。これらは、リンカーが付着される前に成分またはヘリカーゼの1つまたは複数のシステイン残基と、単量体またはオリゴマーの部分としてのいずれかで反応され得る。表面の利用可能なシステインの選択的脱保護は、ビーズに固定した還元試薬(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る。2つ以上のヘリカーゼのシステイン連結は、下により詳細に考察される。

【0127】

ヘリカーゼを成分に付着させる別の好ましい方法は、4-アジド-L-フェニルアラニン(Faz)連結を介する。これは、二機能性化学的リンカーによってまたは末端に存在するFaz残基を有するポリペプチドリンカーによって調節できる。1つまたは複数のFaz残基は、置換によってヘリカーゼおよび/または成分に好ましくは導入される。2つ以上のヘリカーゼのFaz連結は、下により詳細に考察される。

【0128】

ヘリカーゼまたは成分のそれ自体への交差結合は、リンカーの濃度をヘリカーゼおよび/または成分の大過剰に維持することによって妨げることができる。代替的に「鍵と鍵穴」配置は、2つのリンカーが使用される場合に使用できる。各リンカーの一方の末端だけが長いリンカーを形成するために併せて反応でき、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または成分)とそれぞれ反応する。これは下でより詳細に考察される。

【0129】

付着の部位は、構築物がポリヌクレオチドと接触する場合に、ヘリカーゼおよび成分の両方がポリヌクレオチドに結合でき、その移動を制御できるように選択される。

【0130】

付着は、ヘリカーゼおよび成分のポリヌクレオチド結合活性を使用して促進され得る。例えば相補的ポリヌクレオチドは、ヘリカーゼおよび成分を、それらがハイブリダイズすることから、併せて運ぶために使用できる。ヘリカーゼは一方のポリヌクレオチドに結合でき、成分は相補的ポリヌクレオチドに結合できる。次いで2つのポリヌクレオチドは、相互にハイブリダイズできるようになる。これは、ヘリカーゼを成分と密接に接触するようにして、連結反応をさらに効率的にする。これは、標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための正確な方向で2つ以上のヘリカーゼを付着させるために特に有益である。使用できる相補的ポリヌクレオチドの一例は、下に示されている。

【0131】

【化1】



【0132】

ヘリカーゼ-Phi29構築物に関して、下のDNAは使用され得る。

【0133】

10

20

30

40

【化 2】



【 0 1 3 4 】

構築物の精製を容易にするためにタグが構築物に付加され得る。これらのタグは、次いでそれらの除去が必要である場合に、化学的にまたは酵素的に切断除去され得る。フルオロフォアまたはクロモフォアも含まれる場合があり、これらも切断可能であってよい。

10

【 0 1 3 5 】

構築物を精製するための簡単な方法は、各タンパク質（すなわちヘリカーゼおよび成分）上に、ヘキサ - His - タグおよび Strept - タグ（登録商標）などの異なる精製タグを含むことである。2つのタンパク質が互いに異なる場合、この方法は特に有用である。2つのタグの使用は、両方のタグを含む分子種だけが容易に精製されるようにする。

【 0 1 3 6 】

2つのタンパク質が2つの異なるタグを有さない場合、他の方法が使用できる。例えば遊離表面システインを有するタンパク質または構築物を形成するために反応していない付着リンカーを有するタンパク質は、例えばマレイミドリンカーに対するヨードアセトアミドレジンを使用して除去され得る。

20

【 0 1 3 7 】

構築物は、未反応タンパク質から異なる DNA 前進性特徴に基づいても精製され得る。具体的には構築物は、未反応タンパク質からポリヌクレオチドに対する親和性の増大、既に結合したポリヌクレオチドから離れる可能性の低減および／またはナノポアを通るポリヌクレオチドの移行を制御するときのポリヌクレオチドの読み取り長さの増大に基づいて精製され得る。

【 0 1 3 8 】

ヘリカーゼ

任意のヘリカーゼは、本明細書に記載の構築物に使用してよい。ヘリカーゼは、しばしばトランスロカーゼとして公知であり、2つの用語は互換的に使用できる。好適なヘリカーゼは、当技術分野において十分公知である（M. E. Fairman-Williamsら、Curr. Opin. Struct. Biol., 2010、20 (3)、313-324、T. M. Lohmanら、Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008、9、391-401）。ヘリカーゼは典型的にはスーパーファミリー 1 から 6 の内の1つのメンバーである。ヘリカーゼは、好ましくは成分分類（EC）群 3.6.1. - および 2.7.7. - のいずれかのメンバーである。ヘリカーゼは、好ましくは ATP - 依存性 DNA ヘリカーゼ（EC 群 3.6.4.12）、ATP - 依存性 RNA ヘリカーゼ（EC 群 3.6.4.13）または ATP 非依存性 RNA ヘリカーゼである。

30

【 0 1 3 9 】

ヘリカーゼは、多量体またはオリゴマーヘリカーゼであってよい。換言するとヘリカーゼは、機能するために二量体などの多量体またはオリゴマーを形成する必要がある場合がある。しかし上に考察したとおり構築物それ自体は、多量体またはオリゴマーヘリカーゼであることはできない。多量体またはオリゴマーヘリカーゼは追加的ポリヌクレオチド結合成分に付着されていなければならない。ヘリカーゼは、好ましくは単量体である。換言するとヘリカーゼは、好ましくは機能するために二量体などの多量体またはオリゴマーを形成する必要はない。Hel308、RecD、TraI および XPD ヘリカーゼは、全て単量体ヘリカーゼである。これらは下により詳細に考察される。ヘリカーゼは、好ましくは C 型肝炎ウイルス NS3 ヘリカーゼ（NS3h としても公知）ではない。NS3 ヘリカーゼは、オリゴマーとして作用し、単量体ではない。

40

【 0 1 4 0 】

50

単量体ヘリカーゼは、一緒に付着しているいくつかのドメインを含んでよい。例えば *TraI* ヘリカーゼおよび *TraI* サブグループヘリカーゼは2つの *RecD* ヘリカーゼドメイン、レラクサーゼ (*relaxase*) ドメインおよびC末端ドメインを含有する場合がある。ドメインは、オリゴマーを形成することなく機能できる単量体ヘリカーゼを典型的には形成する。

【0141】

ヘリカーゼは、典型的には完全な *Hel308*、*RecD*、*TraI* または *XPD* ヘリカーゼなどの完全なヘリカーゼである。ヘリカーゼは、好ましくはヘリカーゼ酵素由来のヘリカーゼドメインではない。例えばヘリカーゼは、好ましくはブロムモザイクウイルス (*Brome mosaic virus*) (*BMV*) ウイルス複製タンパク質1a由来の *RecD* ドメインまたはヘリカーゼドメインではない。構築物は、それ自体が、互いに付着している2つの *RecD* ドメインを含む *TraI* ヘリカーゼなどの、互いに付着している2つ以上のヘリカーゼドメインを含むヘリカーゼであることはできない。構築物は、*TraI* ヘリカーゼなどの2つ以上のヘリカーゼドメインを含むヘリカーゼを含む場合があるが、追加的ポリヌクレオチド結合成分に付着されていなければならない。ヘリカーゼは、内部ヌクレオチドで標的ポリヌクレオチドに好ましくは結合できる。内部ヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド中の末端ヌクレオチドではないヌクレオチドである。例えばそれは3'末端ヌクレオチドまたは5'末端ヌクレオチドではない。環状ポリヌクレオチド中の全てのヌクレオチドは内部ヌクレオチドである。

【0142】

一般に内部ヌクレオチドで結合できるヘリカーゼは、末端ヌクレオチドでも結合できるが、いくつかのヘリカーゼについて内部ヌクレオチドで結合する傾向は、他よりも大きい。本発明において使用に好適なヘリカーゼは、ポリヌクレオチドへのその結合の典型的には少なくとも10%が内部ヌクレオチドにである。典型的には、その結合の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%が内部ヌクレオチドにである。末端ヌクレオチドでの結合は、末端ヌクレオチドおよび隣接内部ヌクレオチドの両方へ結合を同時に含み得る。本発明の目的のためにこれは、内部ヌクレオチドでの標的ポリヌクレオチドへの結合ではない。換言すると本発明において使用されるヘリカーゼは、1つまたは複数の隣接内部ヌクレオチドとの組合せで末端ヌクレオチドに結合できるだけではない。ヘリカーゼは、末端ヌクレオチドに同時に結合することなく内部ヌクレオチドに結合できる。

【0143】

内部ヌクレオチドで結合できるヘリカーゼは、1個より多い内部ヌクレオチドに結合できる。典型的にはヘリカーゼは、少なくとも2個の内部ヌクレオチド、例えば少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも10個または少なくとも15個の内部ヌクレオチドに結合する。典型的にはヘリカーゼは、少なくとも2個の隣接する内部ヌクレオチド、例えば少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも10個または少なくとも15個の隣接する内部ヌクレオチドに結合する。少なくとも2個の内部ヌクレオチドは、隣接または非隣接であってよい。

【0144】

内部ヌクレオチドでポリヌクレオチドに結合するヘリカーゼの能力は、競合アッセイを実行することによって決定できる。対照ポリヌクレオチドAに結合するモーターの能力は、同じだが末端ヌクレオチドに付着しているブロッキング基を含むポリヌクレオチド (ポリヌクレオチドB) に結合する能力と比較される。ブロッキング基は、鎖Bの末端ヌクレオチドでのいかなる結合も妨げ、それによりヘリカーゼの内部結合だけを可能にする。

【0145】

内部ヌクレオチドで結合できるヘリカーゼの例は、これだけに限らないが、*Hel308Tga*、*Hel308Mhu* および *Hel308Csy* を含む。したがって分子モーターは、好ましくは (a) *Hel308Tga* (すなわち配列番号16) の配列もしくはその変種または (b) *Hel308Csy* (すなわち配列番号13) の配列もしくはその変

10

20

30

40

50

種または(c) H e l 3 0 8 M h u (すなわち配列番号19)の配列もしくはその変種を含む。これらの配列の変種は、下により詳細に考察される。変種は、上に考察したとおり付着を促進するために1つもしくは複数の置換システイン残基および/または1つもしくは複数の置換 F a z 残基を好ましくは含む。

【0146】

ヘリカーゼは、好ましくは H e l 3 0 8 ヘリカーゼである。H e l 3 0 8 ヘリカーゼは、それらがオリゴマーを形成することなく機能することから単量体である。本発明に従って、任意の H e l 3 0 8 ヘリカーゼを使用し得る。H e l 3 0 8 ヘリカーゼは s k i 2 様ヘリカーゼとしても公知であり、2つの用語は互換的に用いられ得る。好適な H e l 3 0 8 ヘリカーゼは、米国特許出願第61,549,998号の表4および第61/599,244ならびに国際出願第 P C T / G B 2 0 1 2 / 0 5 2 5 7 9 号 (W O 2 0 1 3 / 0 5 7 4 9 5 として公開)に開示されている。

【0147】

H e l 3 0 8 ヘリカーゼは、アミノ酸モチーフ Q - X 1 - X 2 - G - R - A - G - R (本明細書以下で H e l 3 0 8 モチーフと称する; 配列番号8)を典型的には含む。H e l 3 0 8 モチーフは、典型的にはヘリカーゼモチーフ V I の部分である (Tuteja and Tuteja, Eur.J.Biochem.271 1849-1863(2004))。X 1 は、C、MまたはLであってよい。X 1 は、好ましくはCである。X 2 は、任意のアミノ酸残基であってよい。X 2 は、典型的には疎水性または中性残基である。X 2 は、A、F、M、C、V、L、I、S、T、PまたはRであってよい。X 2 は、好ましくはA、F、M、C、V、L、I、S、TまたはPである。X 2 は、より好ましくはA、MまたはLである。X 2 は、最も好ましくはAまたはMである。

【0148】

H e l 3 0 8 ヘリカーゼは、好ましくはモチーフ Q - X 1 - X 2 - G - R - A - G - R - P (本明細書以下で伸張された H e l 3 0 8 モチーフと称される; 配列番号9)を含み、式中X 1 およびX 2 は上に記載のとおり。

【0149】

最も好ましい H e l 3 0 8 モチーフおよび伸張された H e l 3 0 8 モチーフは、下の表1に示される。

【0150】

【表1】

表1-好ましいHel308ヘリカーゼならびにそれらのモチーフ

配列番号	ヘリカーゼ	名称	Hel308Mbuへの%同一性	Hel308モチーフ	伸長されたHel308モチーフ
10	Hel308 Mbu	メタノコッコイデス・ブルトニイ (Methanococcus burtonii)	-	QMAGRAGR (配列番号11)	QMAGRAGRP (配列番号12)
13	Hel308 Csy	ケナルカエウム・シンビオスム (Cenarchaeum symbiosum)	34%	QLCGRAGR (配列番号14)	QLCGRAGRP (配列番号15)
16	Hel308 Tga	サーモコッカス・ガンマトレランス (Thermococcus gammatolerans) EJ3	38%	QMMGRAGR (配列番号17)	QMMGRAGRP (配列番号18)
19	Hel308 Mhu	メタノミクロスピウム・ハンガティ (Methanospirillum hungatei) JF-1	40%	QMAGRAGR (配列番号11)	QMAGRAGRP (配列番号12)

【0151】

最も好ましい H e l 3 0 8 モチーフは、配列番号17に示されている。最も好ましい伸張された H e l 3 0 8 モチーフは、配列番号18に示されている。他の好ましい H e l 3 0 8 モチーフおよび伸張された H e l 3 0 8 モチーフは、米国特許出願第61,549,

998号の表5および第61/599, 244号ならびに国際出願第PCT/GB2012/052579号(WO 2013/057495として公開)に見出すことができる。

【0152】

He1308ヘリカーゼは、He1308Mbu(すなわち配列番号10)の配列またはその変種を好ましくは含む。He1308ヘリカーゼは、より好ましくは(a)He1308Tgaの配列(すなわち、配列番号16)もしくはその変種、(b)He1308Csyの配列(すなわち、配列番号13)もしくはその変種、または(c)He1308Mhuの配列(すなわち配列番号19)もしくはその変種を含む。最も好ましくはHe1308ヘリカーゼは、配列番号16またはその変種に示されている配列を含む。

10

【0153】

He1308ヘリカーゼの変種は、野生型ヘリカーゼの配列から変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。特に、配列番号10、13、16または19の変種は、配列番号10、13、16または19の配列から変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。ポリヌクレオチド結合活性は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して決定できる。好適な方法は、これだけに限らないが、蛍光偏光測定、トリプトファン蛍光および電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)を含む。例えば1本鎖ポリヌクレオチドに結合する変種の能力は、実施例に記載のとおり決定できる。

【0154】

変種はヘリカーゼ活性を保持している。これは、種々の方法において測定できる、例えばポリヌクレオチドに沿って移行させる変種の能力は電気生理化学、蛍光アッセイまたはATP加水分解を使用して測定され得る。

20

【0155】

変種は、ヘリカーゼをコードするポリヌクレオチドの操作を促進するならびに/または高塩濃度および/もしくは室温でのその活性を促進する修飾を含む場合がある。変種は、上で考察したHe1308モチーフまたは伸張されたHe1308モチーフの外の領域において野生型ヘリカーゼとは典型的には異なる。しかし変種は、これらのモチーフ(複数可)内に修飾を含む場合がある。

【0156】

配列番号10、13、16または19のアミノ酸配列全長にわたって、変種は好ましくは、アミノ酸同一性に基づいてその配列に対して少なくとも30%相同である。より好ましくは、変種ポリペプチドは、配列番号10、13、16または19のアミノ酸配列に対して、配列全長にわたるアミノ酸同一性に基づいて、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%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であってよい。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%または少なくとも95%のアミノ酸同一性が150以上のストレッチ、例えば200、300、400、500、600、700、800、900または1000以上の連続するアミノ酸にわたってあり得る(「高い相同性」)。相同性は上に記載のとおり決定される。変種は配列番号2および4を参照して下に考察したいずれの方法においても野生型配列と異なっていてよい。

30

【0157】

配列番号10、13、16または19の変種は、上で表1に示されたとおり、野生型配列のHe1308モチーフまたは伸張されたHe1308モチーフを好ましくは含む。しかし変種は、異なる野生型配列由来のHe1308モチーフまたは伸張されたHe1308モチーフを含む場合がある。例えば配列番号12の変種は、He1308モチーフまたは配列番号13から伸張されたHe1308モチーフ(すなわち配列番号14または15)を含んでもよい。配列番号10、13、16または19の変種は、関連する野生型配列

40

50

の H e l 3 0 8 モチーフまたは伸長された H e l 3 0 8 モチーフ内に修飾を含む場合もある。X 1 および X 2 での好適な修飾は、2つのモチーフを定義する際に上に考察されている。配列番号 1 0、1 3、1 6 または 1 9 の変種は、上に考察したとおり付着を促進するために 1 つもしくは複数の置換システイン残基および / または 1 つもしくは複数の置換 F a z 残基を好ましくは含む。

【 0 1 5 8 】

配列番号 1 0 の変種は、配列番号 1 0 の最初の 1 9 アミノ酸を欠失しているおよび / または配列番号 1 0 の最後の 3 3 アミノ酸を欠失している場合がある。配列番号 1 0 の変種は、配列番号 1 0 のアミノ酸 2 0 から 2 1 1 または 2 0 から 7 2 7 にアミノ酸同一性に基づいて少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 % またはより好ましくは少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 % もしくは少なくとも 9 9 % 相同である配列を好ましくは含む。

【 0 1 5 9 】

配列番号 1 0 (H e l 3 0 8 M b u) は 5 個の天然システイン残基を含有する。しかし、これらの残基の全ては酵素の D N A 結合グロブ (grove) 内または周辺に位置付けられている。D N A 鎖が酵素内に結合されると、これらの天然システイン残基は、外からの修飾に関して利用しにくくなる。これは、上に考察したとおり配列番号 1 0 の特異的システイン変異体の設計を可能にし、システイン連結を使用して成分に付着できるようにする。配列番号 1 0 の好ましい変種は、次の置換 : A 2 9 C、Q 2 2 1 C、Q 4 4 2 C、T 5 6 9 C、A 5 7 7 C、A 7 0 0 C および S 7 0 8 C の 1 つまたは複数を有する。これらの位置の 1 つまたは複数でのシステイン残基の導入は、上に考察したとおりシステイン連結を促進する。配列番号 1 0 の他の好ましい変種は次の置換 : M 2 F a z、R 1 0 F a z、F 1 5 F a z、A 2 9 F a z、R 1 8 5 F a z、A 2 6 8 F a z、E 2 8 4 F a z、Y 3 8 7 F a z、F 4 0 0 F a z、Y 4 5 5 F a z、E 4 6 4 F a z、E 5 7 3 F a z、A 5 7 7 F a z、E 6 4 9 F a z、A 7 0 0 F a z、Y 7 2 0 F a z、Q 4 4 2 F a z および S 7 0 8 F a z の 1 つまたは複数を有する。これらの位置の 1 つまたは複数での F a z 残基の導入は、上に考察したとおり F a z 連結を促進する。

【 0 1 6 0 】

ヘリカーゼは、好ましくは R e c D ヘリカーゼである。R e c D ヘリカーゼは、それらがオリゴマーを形成することなく機能することから単量体である。任意の R e c D ヘリカーゼが本発明により使用できる。R e c D ヘリカーゼの構造は、当技術分野において公知である (FEBS J. 2008 Apr;275(8):1835-51. Epub 2008 Mar 9. ATPase activity of Rec D is essential for growth of the Antarctic Pseudomonas syringae Lz4W at low temperature. Satapathy AK, Pavankumar TL, Bhattacharjya S, Sankaranarayanan R, Ray M K; EMS Microbiol Rev. 2009 May;33(3):657-87. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. Garcillan-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F; J Biol Chem. 2011 Apr 8;286(14):12670-82. Epub 2011 Feb 2. Functional characterization of the multidomain F plasmid Tral relaxase-helicase. Cheng Y, McNamara DE, Miley MJ, Nash RP, Redinbo MR) 。

【 0 1 6 1 】

R e c D ヘリカーゼは、アミノ酸モチーフ X 1 - X 2 - X 3 - G - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 (本明細書以下で R e c D 様モチーフ I と称する ; 配列番号 2 0) を典型的には含み、式中 X 1 は G、S または A であり、X 2 は任意のアミノ酸であり、X 3 は P、A、S または G であり、X 4 は T、A、V、S または C であり、X 5 は G または A であり、X 6 は K または R および X 7 は T または S である。X 1 は好ましくは G である。X 2 は好ましくは G、I、Y または A である。X 2 はより好ましくは G である。X 3 は好ましくは P または A である。X 4 は好ましくは T、A、V または C である。X 4 は好ましくは T、V または C である。X 5 は好ましくは G である。X 6 は好ましくは K である。X 7 は好ましくは T または S である。R e c D ヘリカーゼは、Q - (X 8) _{1 6 - 1 8} - X 1 - X 2 - X 3 - G - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 (本明細書以下で伸長された R e c D 様モチーフ I と称す

10

20

30

40

50

る；配列番号 21、22 および 23) を好ましくは含み、式中 X1 から X7 は上に定義のとおりであり、X8 は任意のアミノ酸である。好ましくは伸長された RecD モチーフ I 中に 16 個の X8 残基がある（すなわち (X8)₁₆）。(X8)₁₆ についての好適な配列は、米国特許出願第 61/581,332 号の配列番号 14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、47 および 50 ならびに国際出願第 PCT/GB2012/053274 号 (WO2012/098562 として公開) の配列番号 18、21、24、25、28、30、32、35、37、39、41、42 および 44 で同定できる。

【0162】

RecD ヘリカーゼは、アミノ酸モチーフ G - G - P - G - Xa - G - K - Xb (本明細書以下で RecD モチーフ I と称する；配列番号 24) を好ましくは含み、式中 Xa は T、V または C であり、Xb は T または S である。Xa は好ましくは T である。Xb は好ましくは T である。RecD ヘリカーゼは、配列 G - G - P - G - T - G - K - T (配列番号 25) を好ましくは含む。RecD ヘリカーゼは、アミノ酸モチーフ Q - (X8)₁₆₋₁₈ - G - G - P - G - Xa - G - K - Xb (本明細書以下で伸長された RecD モチーフ I と称する；配列番号 26、27 および 28) をより好ましくは含み、式中 Xa および Xb は上に定義のとおりであり、X8 は任意のアミノ酸である。伸長された RecD モチーフ I 中に好ましくは 16 個の X8 残基がある（すなわち (X8)₁₆）。(X8)₁₆ についての好適な配列は、米国特許出願第 61/581,332 号の配列番号 14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、47 および 50 ならびに国際出願第 PCT/GB2012/053274 号 (WO2012/098562 として公開) の配列番号 18、21、24、25、28、30、32、35、37、39、41、42 および 44 で同定できる。

【0163】

RecD ヘリカーゼは、アミノ酸モチーフ X1 - X2 - X3 - X4 - X5 - (X6)₃ - Q - X7 (本明細書以下で RecD モチーフ V と称する；配列番号 29) を典型的には含み、式中 X1 は Y、W または F であり、X2 は A、T、S、M、C または V であり、X3 は任意のアミノ酸であり、X4 は T、N または S であり、X5 は A、T、G、S、V または I であり、X6 は任意のアミノ酸であり、X7 は G または S である。X1 は好ましくは Y である。X2 は好ましくは A、M、C または V である。X2 はより好ましくは A である。X3 は好ましくは I、M または L である。X3 はより好ましくは I または L である。X4 は好ましくは T または S である。X4 はより好ましくは T である。X5 は好ましくは A、V または I である。X5 はより好ましくは V または I である。X5 は最も好ましくは V である。(X6)₃ は好ましくは H - K - S、H - M - A、H - G - A または H - R - S である。(X6)₃ はより好ましくは H - K - S である。X7 は好ましくは G である。RecD ヘリカーゼは、アミノ酸モチーフ Xa - Xb - Xc - Xd - Xe - H - K - S - Q - G (本明細書以下で RecD モチーフ V と称する；配列番号 30) を好ましくは含み、式中 Xa は Y、W または F であり、Xb は A、M、C または V であり、Xc は I、M または L であり、Xd は T または S であり、Xe は V または I である。Xa は好ましくは Y である。Xb は好ましくは A である。Xd は好ましくは T である。Xd は好ましくは V である。好ましい RecD モチーフ I は米国特許出願第 61/581,332 号の表 5 および国際出願第 PCT/GB2012/053274 号 (WO2012/098562 として公開) に示されている。好ましい RecD モチーフ I は米国特許出願第 61/581,332 号の表 7 および国際出願第 PCT/GB2012/053274 号 (WO2012/098562 として公開) に示されている。好ましい RecD モチーフ V は米国特許出願第 61/581,332 号の表 5 および 7 ならびに国際出願第 PCT/GB2012/053274 号 (WO2012/098562 として公開) に示されている。

【0164】

RecD ヘリカーゼは、好ましくは米国特許出願第 61/581,332 号の表 4 もしくは 5 および国際出願第 PCT/GB2012/053274 号 (WO2012/098

10

20

30

40

50

562として公開)に示されているヘリカーゼの1つまたはその変種である。変種は米国特許出願第61/581,332号および国際出願第PCT/GB2012/053274号(WO2012/098562として公開)に記載されている。

【0165】

RecDヘリカーゼは、好ましくはTraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼである。TraIヘリカーゼおよびTraIサブグループヘリカーゼは、オリゴマーを形成することなく機能することから単量体である。TraIヘリカーゼおよびTraIサブグループヘリカーゼは、2つのRecDヘリカーゼドメイン、レラクサーゼドメインおよびC末端ドメインを含有する場合がある。TraIサブグループヘリカーゼは、好ましくはTrwCヘリカーゼである。TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼは、好ましくは米国特許出願第61/581,332号の表6および国際出願第PCT/GB2012/053274号(WO2012/098562として公開)に示すヘリカーゼの1つまたはその変種である。変種は、米国特許出願第61/581,332号および国際出願第PCT/GB2012/053274号(WO2012/098562として公開)に記載されている。

【0166】

TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼは、上に定義のRecD様モチーフI(配列番号20)および/または上に定義のRecD様モチーフV(配列番号29)を典型的には含む。TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼは、RecD様モチーフI(配列番号20)およびRecD様モチーフV(配列番号29)の両方を好ましくは含む。TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼは、次の2つのモチーフの1つを典型的にはさらに含む：

- アミノ酸モチーフH-(X1)₂-X2-R-(X3)₅₋₁₂-H-X4-H(本明細書以下でMobFモチーフIIIと称する；配列番号31から38)、式中X1およびX2は任意のアミノ酸であり、X2およびX4はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択される。(X1)₂は当然ながらX1a-X1bである。X1aおよびX1bは、同じまたは異なるアミノ酸であってよい。X1aは、好ましくはDまたはEである。X1bは、好ましくはTまたはDである。(X1)₂は、好ましくはDTまたはEDである。(X1)₂は、最も好ましくはDTである。(X3)₅₋₁₂中の5から12個のアミノ酸は同じまたは異なっていてよい。X2およびX4はG、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、Q、N、SおよびTから独立に選択される。X2およびX4は、好ましくは荷電していない。X2およびX4は、好ましくはHではない。X2は、より好ましくはN、SまたはAである。X2は、最も好ましくはNである。X4は、最も好ましくはFまたはTである。(X3)₅₋₁₂は、好ましくは長さ6または10残基である。(X3)₅₋₁₂の好適な実施形態は、米国特許出願第61/581,332号の表7に示す配列番号58、62、66および70、ならびに国際出願第PCT/GB2012/053274号(WO2012/098562として公開)の配列番号61、65、69、73、74、82、86、90、94、98、102、110、112、113、114、117、121、124、125、129、133、136、140、144、147、151、152、156、160、164および168由来であってよい。

- アミノ酸モチーフG-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-H-(X8)₆₋₁₂-H-X9(本明細書以下でMobQモチーフIIIと称する；配列番号39から45)、式中X1、X2、X3、X5、X6、X7およびX9はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択され、X4はDまたはEであり、X8は任意のアミノ酸である。X1、X2、X3、X5、X6、X7およびX9はG、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、Q、N、SおよびTから独立に選択される。X1、X2、X3、X5、X6、X7およびX9は、好ましくは荷電していない。X1、X2、X3、X5、X6、X7およびX9は、好ましくはHではない。(X8)₆₋₁₂中の6から12個のアミノ酸は、同じまたは異なっていてよい。好ましいMobFモチーフIIIは、米国特許出願第61/581,332号の表7および国際出願第PCT/GB2012/053

10

20

30

40

50

274号(WO2012/098562として公開)に示されている。

【0167】

TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼは、より好ましくは米国特許出願第61/581,332号の表6または7および国際出願第PCT/GB2012/053274号(WO2012/098562として公開)に示すヘリカーゼの1つまたはその変種である。TraIヘリカーゼは、配列番号46に示す配列またはその変種を最も好ましくは含む。配列番号46はTraI Eco(NCBI参照配列:NP_061483.1; Genbank AAQ98619.1; 配列番号46)である。TraI Ecoは、次のモチーフ: RecD様モチーフI(GYAGVGKT; 配列番号47)、RecD様モチーフV(YAITHGAQG; 配列番号48)およびMob FモチーフIII(HDTSRDQEPQLHTH; 配列番号49)を含む。

【0168】

TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼは、下の表2に示すヘリカーゼの1つの配列、すなわち配列番号46、87、98および102の1つまたはその変種をより好ましくは含む。

【0169】

【表2】

表2-より好ましいTraIヘリカーゼおよびTraIサブグループヘリカーゼ

配列番号	名称	株	NCBI参照	TraI Ecoへの%同一性	RecD様モチーフI(配列番号)	RecD様モチーフV(配列番号)	Mob FモチーフIII(配列番号)
46	TraI Eco	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)	NCBI参照配列: NP_061483.1 Genbank AAQ98619.1	-	GYAGVGKT (47)	YAITAHGAQG (48)	HDTSRDQEPQLHTH (49)
87	TrwC Cba	シトロミクロビウム・パチオマリヌム(<i>Citromicrobium bathyomarinum</i>)JL354	NCBI参照配列: ZP_06861556.1	15%	GIAGAGKS (95)	YALNVHMAQG (96)	HDTNRNQEPNLHFH (97)
98	TrwC Hne	ハロチオパチルス・ネアポリタヌス(<i>Halotheobacillus neapolitanus</i>)c2	NCBI参照配列: YP_003262832.1	11.5%	GAAGAGKT (99)	YCITIHR SQG (100)	HEDARTVDDIADPQLHTH (101)
102	TrwC Eli	エリスロバクター・リトラリス(<i>Erythrobacter litoralis</i>)H TCC2594	NCBI参照配列: YP_457045.1	16%	GIAGAGKS (95)	YALNAHMAQG (103)	HDTNRNQEPNLHFH (97)

【0170】

RecDヘリカーゼ、TraIヘリカーゼまたはTraIサブグループヘリカーゼの変種は、野生型ヘリカーゼのものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。これは、上に記載のとおり測定され得る。具体的には配列番号46、87、98または102の変種は、配列番号46、87、98または102のものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。変種は、ヘリカーゼ活性を保持している。変種は、下に考察する2つのモードの少なくとも1つで作動しなければならない。好ましくは、変種は両方のモードで作動する。変種は、ヘリカーゼをコードするポリヌクレオチドの操作を促進するならばに/または高塩濃度および/もしくは室温でのその活性を促進する修飾を含む場合がある。変種は、上で考察したモチーフの外の領域において野生型ヘリカーゼとは典型的には異なる。しかし変種は、これらのモチーフ(複数可)内に修飾を含む場合がある。

【0171】

配列番号46、87、98および102の任意の1つのアミノ酸配列の全長にわたって、変種はアミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも10%相同性である

。より好ましくは変種ポリペプチドは、配列全長にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号46、87、98および102の任意の1つのアミノ酸配列に少なくとも20%、少なくとも25%、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%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同性であってよい。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%または少なくとも95%のアミノ酸同一性が150以上のストレッチ、例えば200、300、400、500、600、700、800、900または1000以上の連続するアミノ酸にわたってあり得る(「高い相同性」)。相同性は上に記載のとおり決定される。変種は配列番号2および4を参照して上に考察したいずれの方法においても野生型配列と異なっていてよい。

10

【0172】

配列番号46、87、98および102の任意の1つの変種は、野生型配列のRecD様モチーフIおよび/またはRecD様モチーフVを好ましくは含む。しかし配列番号46、87、98または102の変種は、野生型配列とは異なるRecD様モチーフIおよび/または伸長されたRecD様モチーフVを含んでよい。例えば変種は、米国特許出願第61/581,332号の表5および7ならびに国際出願第PCT/GB2012/053274号(WO2012/098562として公開)に示す好ましいモチーフの任意の1つを含んでよい。配列番号46、87、98および102の変種は、野生型配列のRecD様モチーフIおよびV内に修飾を含んでよい。配列番号46、87、98または102の変種は、上に考察したとおり付着を促進するために1つもしくは複数の置換システイン残基および/または1つもしくは複数の置換Faz残基を好ましくは含む。

20

【0173】

ヘリカーゼは好ましくはXPDヘリカーゼである。XPDヘリカーゼは、オリゴマーを形成することなく機能することから単量体である。任意のXPDヘリカーゼが本発明により使用できる。XPDヘリカーゼはRad3ヘリカーゼとしても公知であり、2つの用語は互換的に使用できる。

【0174】

XPDヘリカーゼの構造は、当技術分野において公知である(Cell. 2008 May 30;133(5):801-12. Structure of the DNA repair helicase XPD. Liu H, Rudolf J, Johnson KA, McMahon SA, Oke M, Carter L, McRobbie AM, Brown SE, Naismith JH, White MF)。XPDヘリカーゼは、アミノ酸モチーフX1-X2-X3-G-X4-X5-X6-E-G(本明細書以下でXPDモチーフVと称する;配列番号50)を典型的には含む。X1、X2、X5およびX6はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択される。X1、X2、X5およびX6は、G、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、Q、N、SおよびTから独立に選択される。X1、X2、X5およびX6は、好ましくは荷電していない。X1、X2、X5およびX6は、好ましくはHではない。X1は、より好ましくはV、L、I、SまたはYである。X5は、より好ましくはV、L、I、NまたはFである。X6は、より好ましくはSまたはAである。X3およびX4は、任意のアミノ酸残基であってよい。X4は、好ましくはK、RまたはTである。

30

40

【0175】

XPDヘリカーゼは、アミノ酸モチーフQ-Xa-Xb-G-R-Xc-Xd-R-(Xe)₃-Xf-(Xg)₇-D-Xh-R(本明細書以下でXPDモチーフVIと称する;配列番号51)を典型的には含む。Xa、XeおよびXgは任意のアミノ酸残基であってよい。Xb、XcおよびXdはD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択される。Xb、XcおよびXdは、典型的にはG、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、Q、N、SおよびTから独立に選択される。Xb、XcおよびXdは、好ましくは荷電していない。Xb、XcおよびXdは、好ましくはHではない。Xbは、より好ましくはV、A、L、IまたはMである。Xcは、より好ましくはV、A、L、I、

50

MまたはCである。X_dは、より好ましくはI、H、L、F、MまたはVである。X_fは、DまたはEであってよい。(X_g)₇はX_{g1}、X_{g2}、X_{g3}、X_{g4}、X_{g5}、X_{g6}およびX_{g7}である。X_{g2}は、好ましくはG、A、SまたはCである。X_{g5}は、好ましくはF、V、L、I、M、A、WまたはYである。X_{g6}は、好ましくはL、F、Y、M、IまたはVである。X_{g7}は、好ましくはA、C、V、L、I、MまたはSである。

【0176】

XPDヘリカーゼは、XPDモチーフVおよびVIを好ましくは含む。最も好ましいXPDモチーフVおよびVIは、米国特許出願第61/581,340号の表5および国際出願第PCT/GB2012/053273号(WO2012/098561として公開)に示されている。

10

【0177】

XPDヘリカーゼは、硫化鉄(FeS)コアを2つのウォーカーAおよびBモチーフ(モチーフIおよびII)の間に好ましくはさらに含む。FeSコアは、システイン残基のスルフィド基の間に配位した鉄原子を典型的には含む。FeSコアは、典型的には四面体である。

【0178】

XPDヘリカーゼは、好ましくは米国特許出願第61/581,340号の表4または5および国際出願第PCT/GB2012/053273号(WO2012/098561として公開)に示されているヘリカーゼの1つまたはその変種である。XPDヘリカーゼは、配列番号52に示されている配列またはその変種を最も好ましくは含む。配列番号52は、XPD Mbu(メタノコッコイデス・ブルトニイ(Methanococcoides burtoni)); YP_566221.1; GI:91773529)である。XPD Mbuは、YLGWGTLSSEG(モチーフV; 配列番号53)およびQAMGRVVRSPTDYGARILLDGR(モチーフVI; 配列番号54)を含む。

20

【0179】

XPDヘリカーゼの変種は、野生型ヘリカーゼのものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。これは、上に記載のとおり測定され得る。具体的には配列番号52の変種は、配列番号52のものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。変種は、ヘリカーゼ活性を保持している。変種は、下に考察する2つのモードの少なくとも1つで作動しなければならない。好ましくは、変種は両方のモードで作動する。変種は、ヘリカーゼをコードするポリヌクレオチドの操作を促進するならびに/または高塩濃度および/もしくは室温でのその活性を促進する修飾を含む場合がある。変種は、上で考察したXPDモチーフVおよびVIの外の領域において野生型ヘリカーゼとは典型的には異なる。しかし変種は、これらのモチーフの1つまたは両方の内に修飾を含む場合がある。

30

【0180】

配列番号52のアミノ酸配列の全長にわたって、配列番号10などの変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも10%、好ましくは30%相同性である。より好ましくは変種ポリペプチドは、配列番号52のアミノ酸配列に配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて少なくとも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%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同性であってよい。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%または少なくとも95%のアミノ酸同一性が150以上のストレッチ、例えば200、300、400、500、600、700、800、900または1000以上の連続するアミノ酸にわたってあり得る(「高い相同性」)。相同性は上に記載のとおり決定される。変種は配列番号2および4を参照して上に考察したいずれの方法においても野生型配列と異なっていてよい。

40

【0181】

50

配列番号 52 の変種は、野生型配列の X P D モチーフ V および / または X P D モチーフ V I を好ましくは含む。配列番号 52 の変種は、配列番号 52 の X P D モチーフ V および V I の両方をより好ましくは含む。しかし、配列番号 52 の変種は、野生型配列とは異なる X P D モチーフ V および / または V I を含む場合がある。例えば、配列番号 52 の変種は、米国特許出願第 61 / 581, 340 号の表 5 および国際出願第 P C T / G B 2012 / 053273 号 (W O 2012 / 098561 として公開) に示されている好ましいモチーフの任意の 1 つを含む場合がある。配列番号 52 の変種は、野生型配列の X P D モチーフ V および / または X P D モチーフ V I 内に修飾も含む場合がある。これらのモチーフへの好適な修飾は、2 つのモチーフを定義する際に上に考察されている。配列番号 52 の変種は、上に考察したとおり付着を促進するために 1 つもしくは複数の置換システイン残基および / または 1 つもしくは複数の置換 F a z 残基を好ましくは含む。

10

【 0182 】

ヘリカーゼは、米国仮特許出願第 61 / 673, 452 号 (2012 年 7 月 19 日出願)、米国仮特許出願第 61 / 774, 862 号 (2013 年 3 月 8 日出願) および本出願と同時に提出された国際出願に記載および特許請求されているいずれの修飾ヘリカーゼであってもよい (O x f o r d N a n o p o r e R e f : O N T I P 033)。

【 0183 】

ヘリカーゼは、H e l 308 M b u (配列番号 10) 中の D 272、N 273、D 274、G 281、E 284、E 285、E 287、S 288、T 289、G 290、E 291、D 293、T 294、N 300、R 303、K 304、N 314、S 315、N 316、H 317、R 318、K 319、L 320、E 322、R 326、N 328、S 615、K 717、Y 720、N 721 および S 724 に対応する 1 つまたは複数の位置への 1 つもしくは複数のシステイン残基および / または 1 つもしくは複数の非天然アミノ酸が、より好ましくは導入される H e l 308 ヘリカーゼであり、ここで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保持している。

20

【 0184 】

H e l 308 ヘリカーゼは、H e l 308 M b u (配列番号 10) 中の D 272、N 273、D 274、G 281、E 284、E 285、E 287、S 288、T 289、G 290、E 291、D 293、T 294、N 300、R 303、K 304、N 314、S 315、N 316、H 317、R 318、K 319、L 320、E 322、R 326、N 328、S 615、K 717、Y 720、N 721 および S 724 に対応する位置の 1 つまたは複数の 1 つもしくは複数のシステイン残基および / または 1 つもしくは複数の非天然アミノ酸を含む、配列番号 10、13、16 または 19 の 1 つの変種を好ましくは含む。

30

【 0185 】

H e l 308 ヘリカーゼは、H e l 308 M b u (配列番号 10) 中の D 274、E 284、E 285、S 288、S 615、K 717、Y 720、E 287、T 289、G 290、E 291、N 316 および K 319 に対応する位置の 1 つまたは複数の 1 つもしくは複数のシステイン残基および / または 1 つもしくは複数の非天然アミノ酸を含む、配列番号 10、13、16 または 19 の 1 つの変種を好ましくは含む。

【 0186 】

下の表 3 a および 3 b は、H e l 308 M b u (配列番号 10) 中の D 274、E 284、E 285、S 288、S 615、K 717、Y 720、E 287、T 289、G 290、E 291、N 316 および K 319 に対応する、他の H e l 308 ヘリカーゼにおける位置を示す。別の H e l 308 ヘリカーゼにおける対応する位置の欠如は「 - 」と印を付ける。

40

【 0187 】

【表 3 a】

表3a-Hel308Mbu(配列番号10)においてD274、E284、E285、S288、S615、K717およびY720に対応する位置

配列 番号	Hel308 相同体	A	B	C	D	E	F	G
10	Mbu	D274	E284	E285	S288	S615	K717	Y720
13	Csy	D280	K290	I291	S294	P589	T694	N697
16	Tga	L266	S276	L277	Q280	P583	K689	D692
19	Mhu	S269	Q277	E278	R281	S583	G685	R688

【 0 1 8 8 】

10

【表 3 b】

表3b-Hel308Mbu(配列番号10)においてE287、T289、G290、E291、N316およびK319に対応する位置

配列 番号	Hel308 相同体	H	I	J	K	L	M
10	Mbu	E287	T289	G290	E291	N316	K319
13	Csy	S293	G295	G296	E297	D322	S325
16	Tga	S279	L281	E282	D283	V308	T311
19	Mhu	R280	L282	R283	D284	Q309	T312

【 0 1 8 9 】

20

Hel308ヘリカーゼは、Hel308Mbu(配列番号10)中のD274、E284、E285、S288、S615、K717およびY720に対応する位置の1つまたは複数の1つもしくは複数のシステイン残基および/または1つもしくは複数の非天然アミノ酸を含む、配列番号10、13、16または19の1つの変種を好ましくは含む。ヘリカーゼは、表3aの各列にAからGと標識の位置の次の任意の組合せに1つもしくは複数のシステイン残基および/または1つもしくは複数の非天然アミノ酸を含んでよい：

{ A }、{ B }、{ C }、{ D }、{ G }、{ E }、{ F }、{ AおよびB }、{ AおよびC }、{ AおよびD }、{ AおよびG }、{ AおよびE }、{ AおよびF }、{ BおよびC }、{ BおよびD }、{ BおよびG }、{ BおよびE }、{ BおよびF }、{ CおよびD }、{ CおよびG }、{ CおよびE }、{ CおよびF }、{ DおよびG }、{ DおよびE }、{ DおよびF }、{ GおよびE }、{ GおよびF }、{ EおよびF }、{ A、BおよびC }、{ A、BおよびD }、{ A、BおよびG }、{ A、BおよびE }、{ A、BおよびF }、{ A、CおよびD }、{ A、CおよびG }、{ A、CおよびE }、{ A、CおよびF }、{ A、DおよびG }、{ A、DおよびE }、{ A、DおよびF }、{ A、GおよびE }、{ A、GおよびF }、{ A、EおよびF }、{ B、CおよびD }、{ B、CおよびG }、{ B、CおよびE }、{ B、CおよびF }、{ B、DおよびG }、{ B、DおよびE }、{ B、DおよびF }、{ B、GおよびE }、{ B、GおよびF }、{ B、EおよびF }、{ C、DおよびG }、{ C、DおよびE }、{ C、DおよびF }、{ C、GおよびE }、{ C、GおよびF }、{ C、EおよびF }、{ D、GおよびE }、{ D、GおよびF }、{ D、EおよびF }、{ G、EおよびF }、{ A、B、CおよびD }、{ A、B、CおよびG }、{ A、B、CおよびE }、{ A、B、CおよびF }、{ A、B、DおよびG }、{ A、B、DおよびE }、{ A、B、DおよびF }、{ A、B、GおよびE }、{ A、B、GおよびF }、{ A、B、EおよびF }、{ A、C、DおよびG }、{ A、C、DおよびE }、{ A、C、DおよびF }、{ A、C、GおよびE }、{ A、C、GおよびF }、{ A、C、EおよびF }、{ A、D、GおよびE }、{ A、D、GおよびF }、{ A、D、EおよびF }、{ A、G、EおよびF }、{ B、C、DおよびG }、{ B、C、DおよびE }、{ B、C、DおよびF }、{ B、C、GおよびE }、{ B、C、GおよびF }、{ B、C、EおよびF }、{ B、D、GおよびE }、{ B、D、GおよびF }、{ B、D、EおよびF }、{ B、G、EおよびF }、{ C、D、GおよびE }、{ C、D、GおよびF }、{ C、D、EおよびF }、{ C、G、EおよびF }、{ D、G、E

30

40

50

および F }、{ A、B、C、D および G }、{ A、B、C、D および E }、{ A、B、C、D および F }、{ A、B、C、G および E }、{ A、B、C、G および F }、{ A、B、C、E および F }、{ A、B、D、G および E }、{ A、B、D、G および F }、{ A、B、D、E および F }、{ A、B、G、E および F }、{ A、C、D、G および E }、{ A、C、D、G および F }、{ A、C、D、E および F }、{ A、C、G、E および F }、{ A、D、G、E および F }、{ B、C、D、G および E }、{ B、C、D、G および F }、{ B、C、D、E および F }、{ B、C、G、E および F }、{ B、D、G、E および F }、{ C、D、G、E および F }、{ A、B、C、D、G および E }、{ A、B、C、D、G および F }、{ A、B、C、D、E および F }、{ A、B、C、G、E および F }、{ A、B、D、G、E および F }、{ A、C、D、G、E および F }、{ B、C、D、G、E および F }、または { A、B、C、D、G、E および F }。

10

【 0 1 9 0 】

He1308ヘリカーゼは、He1308Mb u (配列番号10)中のD274、E284、E285、S288およびS615に対応する位置の1つまたは複数に1つもしくは複数のシステイン残基および/または1つもしくは複数の非天然アミノ酸を含む配列番号10、13、16または19の1つの変種をより好ましくは含む。

【 0 1 9 1 】**ポリヌクレオチド結合成分**

本明細書に記載の構築物は、追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む。ポリヌクレオチド結合成分は、ポリヌクレオチドに結合できるポリペプチドである。成分は、規定のポリヌクレオチド配列に好ましくは特異的結合できる。換言すると成分は、特異的ポリヌクレオチド配列に好ましくは結合するが、少なくとも10分の1の結合を異なる配列に、またはより好ましくは少なくとも100分の1の結合を異なる配列に、または最も好ましくは少なくとも1000分の1の結合を異なる配列に示す。異なる配列は無作為配列であってよい。いくつかの実施形態では成分は、特異的ポリヌクレオチド配列に結合するが、異なる配列への結合は測定できない。特異的配列に結合する成分は、そのような配列に標的化される構築物を設計するために使用され得る。

20

【 0 1 9 2 】

成分は、典型的にはポリヌクレオチドの少なくとも1つの特徴と相互作用および改変する。成分は、個々のヌクレオチドまたは、ジまたはトリヌクレオチドなどのヌクレオチドの短い鎖を形成するように切断することによってポリヌクレオチドを修飾できる。成分は、ポリヌクレオチドを特異的位置に方向付けるまたは移動させること、すなわちその移動を制御することによってそれを修飾できる。

30

【 0 1 9 3 】

核酸などのポリヌクレオチドは、2個以上のヌクレオチドを含む巨大分子である。ポリヌクレオチドまたは核酸は、任意のヌクレオチドの任意の組合せを含み得る。ヌクレオチドは、天然に存在するものまたは人工的であってよい。標的ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、酸化またはメチル化され得る。標的ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、損傷をうけ得る。例えばポリヌクレオチドは、ピリミジン二量体を含む場合がある。そのような二量体は、紫外光による障害に典型的には関連し、皮膚メラノーマの主原因である。標的ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、例えば標識またはタグで、修飾され得る。好適な標識は、上に記載されている。標的ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のスパーサーを含み得る。

40

【 0 1 9 4 】

ヌクレオチドは、典型的には、核酸塩基、糖および少なくとも1つのリン酸基を含有する。核酸塩基は典型的には複素環である。核酸塩基は、これだけに限らないがプリンおよびピリミジンならびにより具体的にはアデニン、グアニン、チミン、ウラシルおよびシトシンを含む。糖は典型的には五炭糖である。ヌクレオチド糖は、これだけに限らないがリボースおよびデオキシリボースを含む。ヌクレオチドは、典型的にはリボヌクレオチドまた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、二リン酸ま

50

たは三リン酸を含有する。リン酸は、ヌクレオチドの5'または3'側に付着できる。

【0195】

ヌクレオチドは、これだけに限らないがアデノシンーリン酸 (AMP)、グアノシンーリン酸 (GMP)、チミジンーリン酸 (TMP)、ウリジンーリン酸 (UMP)、シチジンーリン酸 (CMP)、環状アデノシンーリン酸 (cAMP)、環状グアノシンーリン酸 (cGMP)、デオキシアデノシンーリン酸 (dAMP)、デオキシグアノシンーリン酸 (dGMP)、デオキシチミジンーリン酸 (dTMP)、デオキシウリジンーリン酸 (dUMP) およびデオキシシチジンーリン酸 (dCMP) を含む。ヌクレオチドは、好ましくは AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP、dCMP および dUMP から選択される。

10

【0196】

ヌクレオチドは、塩基を持たない場合がある (すなわち核酸塩基を欠失している)。ヌクレオチドは、核酸塩基および糖も欠失している場合がある (すなわち C3 スペースである)。

【0197】

ポリヌクレオチド中のヌクレオチドは、任意の様式で相互に付着されてよい。ヌクレオチドは、核酸においてと同様にそれらの糖およびリン酸基により典型的には付着されている。ヌクレオチドは、ピリミジン二量体においてと同様にそれらの核酸塩基を介して繋がれてよい。

【0198】

ポリヌクレオチドは、1本鎖または2本鎖であってよい。ポリヌクレオチドの少なくとも一部は、好ましくは2本鎖である。

20

【0199】

ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) などの核酸であってよい。標的ポリヌクレオチドは、DNAの1本鎖にハイブリダイズしたRNAの1本鎖を含む場合がある。ポリヌクレオチドは、ペプチド核酸 (PNA)、グリセロール核酸 (GNA)、トレオース核酸 (TNA)、ロックド核酸 (LNA) またはヌクレオチド側鎖を有する他の合成ポリマーなどの当技術分野において公知の任意の合成核酸であってよい。

【0200】

成分の三次構造が公知であることは好ましい。成分の三次元構造の知識は、構築物におけるその機能を促進するために成分に修飾を作製できるようにする。

30

【0201】

成分は、任意のサイズであってよく、任意の構造を有してよい。例えば成分は、二量体または三量体などのオリゴマーである場合がある。成分は、好ましくは1つの単量体から形成された小さな球状ポリペプチドである。そのような成分は操作が容易であり、ポリヌクレオチドの移動を制御するヘリカーゼの能力を、特にヘリカーゼの配列に融合または挿入された場合に、干渉しにくい。

【0202】

成分のアミノおよびカルボキシ末端は、好ましくは近接近にある。成分のアミノおよびカルボキシ末端は、成分の同じ面により好ましくは存在する。そのような実施形態は、ヘリカーゼの配列中への成分の挿入を促進する。例えば成分のアミノおよびカルボキシ末端が近接近にある場合、それぞれはヘリカーゼの配列中の隣接アミノ酸への遺伝子的融合によって付着され得る。

40

【0203】

成分の活性部位の位置および機能が公知であることも好ましい。これは、成分の活性を消滅させる活性部位に修飾が作製されることを防ぐ。これは成分がヘリカーゼに付着できるようにし、成分はポリヌクレオチドに結合し、その移動を制御する。成分がポリヌクレオチドに結合および方向付けられる方法の知識は、有効な構築物を設計できるようにする。

50

【0204】

本明細書に記載の構築物は鎖配列決定法において有用である。成分は、鎖配列決定法およびヌクレオチドの識別に適合性である緩衝液バックグラウンドにおいてポリヌクレオチドに好ましくは結合する。成分は、100 mMから2 Mなどの通常の生理学的レベルを大幅に上回る塩濃度において少なくとも残存活性を好ましくは有する。成分は、高塩濃度でのその活性を増大させるためにより好ましくは修飾される。成分は、その前進性、安定性および有効期間を改善するために修飾されてもよい。

【0205】

好適な修飾は、好塩性、中度好塩性細菌、好熱性および中等度好熱性生物などの好極限性細菌 (extremophile)、ならびに中温性または好熱性エキソヌクレアーゼの耐塩性、安定性および温度依存性を変更するための定向進化手法由来のポリヌクレオチド結合成分の特性決定から決定され得る。

【0206】

ポリヌクレオチド結合成分は、ヘリックス - ヘアピン - ヘリックス (helix-hairpin-helix) (HhH) ドメイン、真核生物1本鎖結合タンパク質 (single-stranded binding protein) (SSB)、細菌性SSB、古細菌SSB、ウイルス性SSB、2本鎖結合タンパク質、スライディングクランプ、前進性因子 (processivity factor)、DNA結合ループ、複製開始タンパク質、テロメア結合タンパク質、リプレッサー、亜鉛フィンガーおよび増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen) (PCNA) から独立に選択される1つまたは複数のドメインを好ましくは含む。

【0207】

ヘリックス - ヘアピン - ヘリックス (HhH) ドメインは、DNAに配列非特異的様式で結合するポリペプチドモチーフである。それらは、ポリメラーゼに融合された場合に塩安定性および前進性を付与し、それらの熱安定性を増大させることが示されている。好適なドメインは、メタノピュルス・カンドレリ (Methanopyrus kandleri) 由来のトポイソメラーゼV (配列番号89) 由来のドメインH (残基696 ~ 751) およびドメインHI (残基696 ~ 802) を含む。下の考察のとおり、ポリヌクレオチド結合成分は、配列番号94に示す配列番号89のドメインH ~ Lであってよい。メタノピュルス・カンドレリ (Methanopyrus kandleri) 由来のトポイソメラーゼVは、下に考察の2本鎖結合タンパク質の一例である。

【0208】

HhHドメインは、配列番号55もしくは75もしくは76に示す配列またはその変種を好ましくは含む。このドメインは、本明細書に記載の構築物において使用された場合にヘリカーゼの前進性および耐塩性を増大させる。配列番号55もしくは75もしくは76の変種は、配列番号55または75または76のものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持しているタンパク質である。これは、上に記載のとおり測定され得る。変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列全体にわたって、配列番号55または75または76に少なくとも50%相同性 (またはヘリカーゼと関連して上に考察した任意の%相同性) を典型的には有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している。変種はヘリカーゼと関連して上にまたはボアと関連して下に考察したいずれの方法においても配列番号55または75または76と異なっていてよい。変種は、上に考察したとおりヘリカーゼへの付着を促進するために1つもしくは複数の置換システイン残基および/または1つもしくは複数の置換Faz残基を好ましくは含む。

【0209】

SSBは、高親和性で配列非特異的様式で1本鎖DNAに結合する。それらは、全ての生き物に種々の形態で存在し、単量体または多量体としてDNAに結合する。アミノ酸配列の配列比較およびアルゴリズム (Hidden Markovモデルなど) を使用して、SSBはそれらの配列相同に従って分類され得る。Pfamファミリー、PF00436は、全てが公知のSSBに配列類似性を示すタンパク質を含む。SSBのこの群は、次いでタンパク質の構造分類 (Structural Classification of Proteins) (SCOP) に

10

20

30

40

50

従ってさらに分類され得る。SSBは、次の系列に分けられる：クラス；全てのベータタンパク質、フォールド；OB-フォールド、スーパーファミリー：核酸結合タンパク質、ファミリー；1本鎖DNA結合ドメイン、SSB。このファミリー内でSSBは、各サブファミリー内でしばしば特性決定されるいくつかの型の分子種を含むサブファミリーに分類され得る。

【0210】

SSBは、ヒト、マウス、ラット、真菌、原虫または植物など由来の真核生物由来、細菌および古細菌などの原核生物由来またはウイルス由来であってよい。

【0211】

真核性SSBは、複製タンパク質A(RPA)として公知である。多くの場合それらは、さまざまなサイズの単位から形成されたヘテ三量体である。大きな単位(例えばサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のRPA70)のいくつかは安定であり、単量体形態でssDNAに結合する。

【0212】

細菌性SSBは安定なホモ四量体(例えば大腸菌(*E. coli*)、マイコバクテリウム・スメグマチス(*Mycobacterium smegmatis*)およびヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*))またはホモ二量体(例えばディノコッカス・ラディオデュランス(*Deinococcus radiodurans*)およびサーモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*))としてDNAに結合する。古細菌ゲノム由来のSSBは、真核RPAと関連すると考えられている。クレン古細菌門スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)によってコードされるSSBなどのそのいくつかは、ホモ四量体である。他の大部分の種由来のSSBは、真核生物由来の複製タンパク質に密接に関連しており、RPAと称される。これらの種のいくつかにおいて、それらは単量体であることが示されている(メタノコッカス・ジャンナスキイ(*Methanococcus jannaschii*)およびメタノサーモバクター・サーモオートトロフィカム(*Methanothermobacter thermoautotrophicum*))。さらに、アーケオグロブス・フルギダス(*Archaeoglobus fulgidus*)およびメタノコッコイデス・ブルトニイ(*Methanococcoides burtonii*)を含む古細菌の他の種は、RPAに配列類似性を有する2つのオープンリーディングフレームをそれぞれ含有すると考えられている。タンパク質レベルでの証拠はなく、それらのDNA結合能力またはオリゴマー状態に関する公表されたデータもない。しかし、これらの各遺伝子中の2つのオリゴヌクレオチド/オリゴ糖(oligonucleotide/oligosaccharide)(OB)フォールドの存在(M.ブルトニイ(*M. burtonii*)ORFの1つの場合にはOBフォールド3個)はそれらも1本鎖DNAに結合することを示唆している。

【0213】

ウイルス性SSBは、単量体としてDNAに結合する。このことおよびそれらの比較的小さなサイズは、それらを、例えば可動性ペプチドリinkerを介して他のタンパク質に遺伝子的に融合しやすくする。代替的にSSBは、別々に発現され、化学的方法(例えばシステイン、非天然アミノ酸)によって他のタンパク質に付着される場合がある。これは下でより詳細に考察される。

【0214】

SSBは、好ましくは(i)正味の負電荷を有さないカルボキシ末端(C末端)領域を含むSSB(ii)C末端領域の正味の負電荷を減少させる1つまたは複数の修飾をそのC末端領域に含む修飾SSBのいずれかである。そのようなSSBは、膜貫通ポアを遮断せず、したがって標的ポリヌクレオチドの特性決定を可能にする。

【0215】

正味の負電荷を有さないC末端領域を含むSSBの例は、これだけに限らないが、ヒトミトコンドリアSSB(HsmtSSB；配列番号77、ヒト複製タンパク質A70kDaサブユニット、ヒト複製タンパク質A14kDaサブユニット、オキシトリカ・ノバ(*Oxytricha nova*)由来テロメア末端結合タンパク質アルファサブユニット、オキシトリカ・ノバ(*Oxytricha nova*)由来テロメア末端結合タンパク質ベータサブユニットのコ

10

20

30

40

50

アドメイン、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 由来のテロメアタンパク質 1 (Pot 1) の保護、ヒト Pot 1、マウスまたはラット由来 BRC A 2 の OB - フォールドドメイン、phi 29 由来の p5 タンパク質 (配列番号 78) またはこれらのタンパク質のいずれかの変種を含む。変種は、野生型タンパク質から変化したアミノ酸配列を有し、1 本鎖ポリヌクレオチド結合活性を保持しているタンパク質である。ポリヌクレオチド結合活性は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して決定できる (上に記載のとおり)。例えば、1 本鎖ポリヌクレオチドに結合する変種の能力は、実施例に記載のとおり決定され得る。

【0216】

配列番号 77 または 78 の変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列全体にわたって、配列番号 77 または 78 に少なくとも 50 % 相同性 (またはヘリカーゼと関連して上に考察した任意の % 相同性) を典型的には有し、1 本鎖ポリヌクレオチド結合活性を保持している。変種はヘリカーゼと関連して上に考察したいずれの方法においても配列番号 77 または 78 と異なっていてよい。具体的には変種は、表 8 および 9 に示す 1 つまたは複数の保存的置換を有する場合がある。

【0217】

正味の負電荷を減少させる 1 つまたは複数の修飾をそれらの C 末端領域に必要とする SSB の例は、これだけに限らないが、大腸菌 (*E. coli*) の SSB (EcoSSB; 配列番号 79)、マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) の SSB、ディノコッカス・ラディオデュランス (*Deinococcus radiodurans*) の SSB、サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の SSB、スルホロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) 由来 SSB、ヒト複製タンパク質 A 32 kDa サブユニット (RPA32) 断片、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 CDC13 SSB、大腸菌 (*E. coli*) 由来プライモソーム複製タンパク質 N (Primosomal replication protein N) (PriB)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 PriB、仮説タンパク質 At4g28440、T4 由来 SSB (gp32; 配列番号 80)、RB69 由来 SSB (gp32; 配列番号 56)、T7 由来 SSB (gp2.5; 配列番号 57) またはこれらの任意のタンパク質の変種を含む。したがって本発明の方法において使用される SSB は、これらのタンパク質のいずれかに由来してよい。

【0218】

C 末端領域中の 1 つまたは複数の修飾に加えて、方法において使用される SSB は C 末端領域の外側にあるまたは C 末端領域の正味の負電荷を減少させない追加的修飾を含んでよい。換言すると本発明の方法において使用される SSB は、野生型タンパク質の変種に由来する。変種は、野生型タンパク質のものから変化しているアミノ酸配列を有し、1 本鎖ポリヌクレオチド結合活性を保持しているタンパク質である。ポリヌクレオチド結合活性は、上に考察したとおり決定され得る。

【0219】

本発明において使用される SSB は、配列番号 56、57、79 または 80 の変種に由来してよい。換言すると配列番号 56、57、79 または 80 の変種は、本発明において使用される SSB のための出発点として使用できるが、実際に使用される SSB は、C 末端領域の正味の負電荷を減少させる 1 つまたは複数の修飾をその C 末端領域にさらに含む。配列番号 56、57、79 または 80 の変種は、配列番号 56、57、79 または 80 にアミノ酸同一性に基づいてその配列全体にわたって少なくとも 50 % 相同性 (またはヘリカーゼと関連して上に考察した任意の % 相同性) を典型的には有し、1 本鎖ポリヌクレオチド結合活性を保持している。変種はヘリカーゼと関連して上に考察したいずれの方法においても配列番号 56、57、79 または 80 と異なっていてよい。具体的には変種は、表 8 および 9 に示す 1 つまたは複数の保存的置換を有してよい。

【0220】

通常のタンパク質 N から C への命名法に従って SSB の C 末端領域を同定することは容

10

20

30

40

50

易である。SSBのC末端領域は、SSBのC末端の最後の3分の1などの好ましくはSSBのC末端の最後の約3分の1である。SSBのC末端領域は、より好ましくはSSBのC末端の最後の4分の1、5分の1または8分の1などのSSBのC末端の最後の約4分の1、5分の1または8分の1である。SSBの最後の3分の1、4分の1、5分の1または8分の1は、アミノ酸の数を単位としてまたはSSBタンパク質の一次構造の実際の長さを単位として測定されてよい。NからC方向での種々のアミノ酸の長さは、当技術分野において公知である。

【0221】

C末端領域は、好ましくはSSBのC末端の最後の約10から最後の約60アミノ酸である。C末端領域は、より好ましくはSSBのC末端の最後の約15、最後の約20、最後の約25、最後の約30、最後の約35、最後の約40、最後の約45、最後の約50または最後の約55アミノ酸である。

10

【0222】

C末端領域は、グリシンおよび/またはプロリンのリッチ領域を典型的には含む。このプロリン/グリシンリッチ領域は、C末端領域に可動性を与え、C末端領域を同定するために使用され得る。

【0223】

正味の負電荷を減少させるための好適な修飾は、米国仮特許出願第61/673,457号(2012年7月19日出願)、米国仮特許出願第61/774,688号(2013年3月8日出願)および本出願と同時に公開された国際公開に開示されている(Oxford Nanopore Ref:ONT IP 035)。SSBは、米国仮特許出願および国際公開に開示されているいずれのSSBであってもよい。

20

【0224】

修飾SSBは、配列番号64、65および81から84に示されるものから選択される配列を最も好ましくは含む。

【0225】

2本鎖結合タンパク質は高親和性で2本鎖DNAに結合する。好適な2本鎖結合タンパク質は、これだけに限らないがミューテーターS(MutS;NCBI参照配列:NP_417213.1;配列番号105)、Sso7d(スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)P2;NCBI参照配列:NP_343889.1;配列番号106;Nucleic Acids Research、2004、Vol 32、No. 3、1197-1207)、Sso10b1(NCBI参照配列:NP_342446.1;配列番号107)、Sso10b2(NCBI参照配列:NP_342448.1;配列番号108)トリプトファンリプレッサー(Trpリプレッサー;NCBI参照配列:NP_291006.1;配列番号109)、ラムダリプレッサー(NCBI参照配列:NP_040628.1;配列番号110)、Cren7(NCBI参照配列:NP_342459.1;配列番号111)、主なヒストンクラスH1/H5、H2A、H2B、H3およびH4(NCBI参照配列:NP_066403.2;配列番号112)、dsbA(NCBI参照配列:NP_049858.1;配列番号113)、Rad51(NCBI参照配列:NP_002866.2;配列番号114)、スライディングクランプおよびトポイソメラーゼV Mka(配列番号89)またはこれらのタンパク質のいずれかの変種を含む。配列番号89、105、106、107、108、109、110、111、112、113または114の変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列全体にわたって、配列番号89、105、106、107、108、109、110、111、112、113または114に少なくとも50%相同性(またはヘリカーゼと関連して上に考察した任意の%相同性)を典型的には有し、1本鎖ポリヌクレオチド結合活性を保持している。変種は、ヘリカーゼと関連して上に考察したいずれの方法においても配列番号89、105、106、107、108、109、110、111、112、113または114と異なっていてよい。具体的には変種は、表8および9に示す1つまたは複数の保守的置換を有する場合がある。大部分のポリメラーゼは、スライディングクランプと相互作用することにより前進性を達成してい

30

40

50

る。一般にこれらは、 $dsDNA$ の周囲を囲む多量体タンパク質（ホモ二量体またはホモ三量体）である。これらのスライディングクランプは、 ATP 依存性プロセスでそれらを DNA ヘリックスの周囲に会合させるためにアクセサリタンパク質（クランプローダー）を必要とする。それらも DNA と直接接触せず、形態的テザーとして作用する。スライディングクランプがポリメラーゼドメインを介する特異的様式で同族ポリメラーゼと相互作用することから、この断片はヘリカーゼのスライディングクランプへの動員刺激のためにヘリカーゼに融合され得る。この相互作用は共有結合の作製によってさらに安定化され得る（システインまたは非天然アミノ酸の導入）。

【0226】

DNA スライディングクランプに関して前進性因子は、それらの同族ポリメラーゼを DNA に固着させるウイルス性タンパク質であり、作製される断片の長さの劇的な増大を導く。それらは、単量体（単純ヘルペスウイルス（Herpes simplex virus）1由来UL42についての場合）または多量体（サイトメガロウイルス（Cytomegalovirus）由来UL44は二量体である）であってよく、それらは DNA 鎖周囲に閉じた環を形成せず、それらは DNA に直接接触する。UL42は、その対応するポリメラーゼの速度を低減することなく前進性を増大させることが示されており、それがSSBとは異なるモードで DNA と相互作用することを示唆している。UL42は、配列番号58もしくは配列番号63に示す配列またはその変種を好ましくは含む。配列番号58または63の変種は、配列番号58または63のものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持しているタンパク質である。これは、上に記載のとおり測定され得る。変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列全体にわたって、配列番号58または63に少なくとも50%相同性（またはヘリカーゼと関連して上に考察した任意の%相同性）を典型的には有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している。変種はヘリカーゼと関連して上にまたはボアと関連して下に考察したいずれの方法においても配列番号58または配列番号63と異なっていてよい。変種は、上に考察したとおりヘリカーゼへの付着を促進するために1つもしくは複数の置換システイン残基および/または1つもしくは複数の置換Faz残基を好ましくは含む。

【0227】

UL42をヘリカーゼに付着させることは、遺伝子的融合または化学的付着（システイン、非天然アミノ酸）を介して行われ得る。UL42に結合しているポリメラーゼポリペプチドが結晶構造において観察できることから、これらの35アミノ酸（残基1200～1235）はヘリカーゼのC末端に融合でき、このポリペプチドと前進性因子との間の天然の親和性は複合体を形成するために使用される。相互作用は、共有結合相互作用（システインまたは非天然アミノ酸）を導入することによって安定化され得る。選択肢の1つは、ポリペプチド相互作用部位近くに位置付けられている天然UL42システイン（C300）を利用し、ポリメラーゼポリペプチドに点変異（例えばL1234C）を導入することである。

【0228】

ポリメラーゼ前進性を増大する報告された方法は、大腸菌（*E. coli*）チオレドキシン（Trx）とバクテリオファージT7 DNA ポリメラーゼのチオレドキシン結合ドメイン（TBD）（残基258～333）との間の相互作用を活用することである。TrxからTBDへの結合は、 DNA に結合するものへのコンホメーション変化をポリペプチドに生じさせる。TBDは、 DNA 鎖上に固定され、ポリメラーゼオフ速度を限定し、それにより前進性を増大させると考えられている。キメラポリメラーゼは、TBDを非前進性ポリメラーゼに転移することによって作製され、重合された断片長の1000倍増加を生じる。TBDを任意の他のクラスのタンパク質に付着させる試みはなかったが、TBDとTrxとの間の共有結合は操作され、相互作用を安定化するために使用できる。

【0229】

いくつかのヘリカーゼは、前進性を達成するためにアクセサリタンパク質を*in vivo*で使用する（例えば大腸菌（*E. coli*）Repヘリカーゼに関して、ファージ x 1

10

20

30

40

50

74由来cisAおよびファージM13由来gene Iタンパク質)。これらのタンパク質のいくつかは、1つより多いヘリカーゼと相互作用することが示されている（例えばMutLは同程度ではないがUvrDおよびRepの両方に作用する）。これらのタンパク質は内在性DNA結合能力を有し、それらのいくつかは特異的DNA配列を認識する。いくつかのこれらのアクセサリタンパク質のそれら自体を特異的DNA配列に共有結合的に付着させる能力は、ヘリカーゼ活性についての一連の開始点を作出するためにも使用できる。

【0230】

染色体の末端を保護するタンパク質は、テロメアssDNA配列に高特異性の様式で結合する。この能力は、そのまままたは配列特異性を消滅させる点変異を使用することによってのいずれかで活用され得る。

10

【0231】

小さなDNA結合モチーフ（ヘリックス-ターン-ヘリックスなど）は、特異的DNA配列を認識する。バクテリオファージ434リプレッサーの場合、62残基断片が操作され、DNA結合能力および特異性を保持していることが示されている。

【0232】

真核生物タンパク質における豊富なモチーフ、亜鉛フィンガーは特異の様式でDNAに結合するおよそ30アミノ酸からなる。典型的には各亜鉛フィンガーは3個のDNA塩基だけを認識するが、マルチプルフィンガーはより長い配列を認識するために連結されてよい。

20

【0233】

増殖細胞核抗原（PCNA）は、dsDNAまたはssDNAを引き上げるおよび下げる非常に堅固なクランプ（ドーナツ）を形成する。クレン古細菌門（crenarchaeota）由来PCNAは、ヘテロ三量体になることが特有であり、それにより1つのサブユニットを機能化し、活性を保持することが可能である。そのサブユニットは、配列番号59、60および61に示されている。PCNAは、好ましくは配列番号59、60および61に示す配列またはその変種を含む三量体である。pCNAスライディングクランプ（NCBI参照配列：ZP_006863050.1；配列番号115）は二量体を形成する。pCNAは、好ましくは配列番号115またはその変種を含む二量体である。変種は、配列番号59、60、61または115から変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持しているタンパク質である。これは、上に記載のとおり測定され得る。変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列全体にわたって配列番号59、60、61および115のそれぞれに少なくとも50%相同性（またはヘリカーゼと関連して上に考察した任意の%相同性）を有する配列を含む典型的には三量体であり、ポリヌクレオチド結合活性を保持している。変種はヘリカーゼと関連して上にまたはポアと関連して下に考察したいずれの方法においても配列番号59、60、61または115と異なっている配列を含んでよい。変種は、上に考察したとおりヘリカーゼへの付着を促進するために1つもしくは複数の置換システイン残基および/または1つもしくは複数の置換Faz残基を好ましくは含む。好ましい実施形態では、サブユニット1および2（すなわち配列番号59および60またはその変種）は、遺伝子的に融合されるなど付着し、得られたタンパク質は構築物を形成するようにヘリカーゼに付着される。構築物の使用の際にサブユニット3（すなわち配列番号61またはその変種）は、構築物がポリヌクレオチドに結合すると、PCNAクランプ（またはドーナツ）を完了するために付加される場合がある。好ましい実施形態では、1つの単量体（すなわち配列番号111またはその変種）は、遺伝子的に融合されているなど、付着されていて、得られるタンパク質は本発明の構築物を形成するようにヘリカーゼに付着されている。構築物の使用の際に第二の単量体（すなわち配列番号111またはその変種）は、構築物がポリヌクレオチドに結合すると、PCNAクランプ（またはドーナツ）を完了するために付加される場合がある。

30

40

【0234】

ポリヌクレオチド結合モチーフは、下の表4に示すもののいずれかから選択されてよい

50

。【 0 2 3 5 】
【 表 4 】

表 4 適切なポリヌクレオチド結合モチーフ

番号	名称	クラス	生物	構造	配列	機能形態	MW (Da)	備考	配列番号
1	SSBEco	ssb	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	1QVC, 1EYG	P0AGE0	ホモ四量体	18975		116
2	SSBBhe	ssb	バルトネラ・ヘンセラ (<i>Bartonella henselae</i>)	3LGJ, 3PGZ	Q6G302	ホモ四量体	16737	構造のみ	117
3	SSBCbu	ssb	コクシエラ・ブルネッティ (<i>Coxiella burnetii</i>)	3TQY	Q83EP4	ホモ四量体	17437	構造のみ	118
4	SSBTma	ssb	テルモトガ・マリティマ (<i>Thermothoga maritima</i>)	1Z9F	Q9WZ73	ホモ二量体	16298	小さな、熱安定性、塩非依存性 DNA 結合	119
5	SSBHp	ssb	ヘリコバクター・ピロリ (<i>Helicobacter pylori</i>)	2VW9	Q25841	ホモ四量体	20143		120
6	SSBDra	ssb	ディノコッカス・ラディオデュランス (<i>Deinococcus radiodurans</i>)	1SE8	Q9RY51	ホモ二量体	32722		121
7	SSBTaq	ssb	サーマス・アクアティクス (<i>Thermus aquaticus</i>)	2FXQ	Q9KH06	ホモ二量体	30026		122
8	SSBMsm	ssb	マイコバクテリウム・スマグマチス (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	3A5U, 1X3E	Q9AF15	ホモ四量体	17401	四量体は大腸菌 (<i>E.coli</i>) より安定性、結合はあまり塩依存性ではない	123
9	SSBSso	ssb/RPA	スルホロブス・ソルファタリカス (<i>Sulfolobus solfataricus</i>)	1O7I	Q97W73	ホモ四量体	16138	RPA と類似	124
10	SSBMHsm	ssb	ヒト (<i>Homo sapiens</i>)	3ULL	Q04837	ホモ四量体	17260		125
11	SSBMle	ssb	マイコバクテリウム・レプラエ (<i>Mycobacterium leprae</i>)	3AFP	P46390	ホモ四量体	17701		126
12	gp32T4	ssb	バクテリオファージ T4	1GPC	P03695	単量体	33506	DNA 非存在時にホモ二量体、DNA 結合時に単量体	127
13	gp32RB69	ssb	バクテリオファージ RB69	2A1K	Q7Y265	単量体	33118		128

10

20

30

40

14	gp2.5T7	ssb	バクテリオファージ T7	1JE5	<u>P03696</u>	単量体	25694		<u>129</u>
15	UL42	前進性因子	ヘルペスウイルス 1	IDML	<u>P10226</u>	単量体	51159	ssDNA dsDNA と結合、構造はポリメラーゼとの連結を示す	<u>130</u>
16	UL44	前進性因子	ヘルペスウイルス 5 (サイトメガロウイルス (cytomegalovirus))	IYYP	P16790	ホモ二量体	46233	DNA 上に C 形クランプを形成	<u>131</u>
17	pf8	前進性因子	K S H V	3I2M	<u>Q77ZG5</u>	ホモ二量体	42378		<u>132</u>
18	RPAMja	RPA	メタノコッカス・ジャンナス (Methanococcus jannaschii)	3DM3	Q58559	単量体	73842	OB ホールド 4 個を含有、断片の構造	<u>133</u>
19	RPAMma	RPA	メタノコッカス・マリパルデイス (Methanococcus maripaludis)	3E0E, 2K5V	Q6LYF9	単量体	71388	コアドメイン構造	<u>134</u>
20	RPAMth	RPA	メタノサーモバクター・サーモアウトロフィカス (Methanothermobacter thermoautotrophicus)			単量体	120000	Hel308. との直接相互作用を示す、論文からの配列	
21	RPA70Sce	RPA	サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)	1YNX	P22336	ヘテロ三量体	70348	ユニットは OB ホールド 2 個を有し、DNA に結合する	<u>135</u>
22	RPAMbu1	RPA	メタノコッコイデス・ブルトニイ (Methanococcoides burtonii)		Q12V72	?	41227	OB ホールド 3 個が同定された	<u>136</u>
23	RPAMbu2	RPA	メタノコッコイデス・ブルトニイ (Methanococcoides burtonii)		Q12W96	?	47082	OB ホールド 2 個が同定された	<u>137</u>
24	RPA70Hsa	RPA	ヒト (Homo sapiens)	1JMC	<u>P27694</u>	ヘテロ三量体	68138		<u>138</u>
25	RPA14Hsa	RPA	ヒト (Homo sapiens)	3KDF	<u>P35244</u>	ヘテロ三量体	13569	RPA32 との複合体	<u>139</u>
26	gp45T4	スライディングクランプ	バクテリオファージ T 4	1CZD	P04525	ホモ三量体	24858	DNA を通す環状	<u>140</u>

10

20

30

27	BetaEco	スライ ディン グクラ ンブ	大腸菌 (E.coli)	3BEP	P0A988	ホモ二量体	40587	DNA を通す環状 ポケットで ssDNA に結合で きる	141
28	PCNASce	スライ ディン グクラ ンブ	サッカロマイ セス・セレビ シエ (Saccharomyce s cerevisiae)	1PLQ, 3K4X	P15873	ホモ二量体	28916	DNA を通す環状	142
29	PCNATko	スライ ディン グクラ ンブ	サーモコッカ ス・コダカラ エンシス (Thermococcus kodakaraensis)	3LX1	Q5JF32	ホモ二量体	28239		143
30	PCNAHvo	スライ ディン グクラ ンブ	ハロフェラッ クス・ボルカ ニ (Haloferax volcanii)	3IFV	D0VWY8	ホモ二量体	26672		144
31	PCNAPfu	スライ ディン グクラ ンブ	パイロコッカ ス・フリオサ ス (Pyrococcus furiosus)	1GE8	O73947	ホモ二量体	28005		145
32	PCNAMbu	スライ ディン グクラ ンブ	メタノコッコ イデス・ブル トニイ (Methanococco ides burtonii)		Q12U18	ホモ二量体	27121	相同性から推測	146
33	BetaMtu	スライ ディン グクラ ンブ	マイコバクテ リウム・ツベ ルクローシス (Mycobacteriu m tuberculosis)	3P16	Q50790	ホモ二量体	42113		147
34	BetaTma	スライ ディン グクラ ンブ	サーモトガ・ マリティマ (Thermotoga maritima)	1VPK	Q9WYA0	ホモ二量体	40948		148
35	BetaSpy	スライ ディン グクラ ンブ	ストレプトコ ッカス・ピロ ゲネス (Streptococcus pyrogenes)	2AVT	Q9EVR1	ホモ二量体	41867		149
36	gp45RB69	スライ ディン グクラ ンブ	バクテリオフ アージRB69	1B77	Q80164	ホモ三量体	25111	構造は、ポリメ ラーゼ由来ポリペ プチドとの相互 作用を示す	150
37	p55Hsa	DNA 結 合タン パク質	ヒト (Homo sapiens) (ミト コンドリア)	2G4C, 3IKL 3IKM	Q9UHN1	単量体	54911	特異的ポリメ ラーゼドメインと 相互作用	151
38	p55Dmc	DNA 結 合タン パク質	ドロソフィ ラ・メラノガ スター (Drosophylla melanogaster)		Q9VJV8	単量体	41027	ポリメラーゼガ ンマとの会合は 耐塩性、前進性お よび活性の増大 を付与する	152

10

20

30

39	p55Xla	DNA 結合タンパク質	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	Q9W6G7	単量体	52283		153	
40	RepDSau	複製開始タンパク質	黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	P08115	ホモ二量体	37874	PcrA の前進性を増大、DNA に共有結合的および特異的に連結	154	
41	G2P	複製開始タンパク質	腸内細菌 (<i>Enterobacteria</i>) ファージ 1	P69546	単量体	46168	Rep の前進性を増大、DNA に共有結合的および特異的に連結	155	
42	MutLEco	ミスマッチ修復タンパク質	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	1BKN, 1B62, 1B63	P23367	ホモ二量体	67924	UvrD (および Rep) の前進性を増大	156
43	KuMtu	DNA 修復タンパク質	マイコバクテリウム・ツベルクローシス (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)		O05866	ホモ二量体	30904	UvrD1 の前進性の増大 ヒト Ku についての利用可能な構造	157
44	OnTEBP	テロメア結合タンパク質	オキシトリカ・ノバ・アルファ (<i>Oxytricha nova-Alpha</i>)	IOTC	P29549	ヘテロ二量体	56082	3'末端 T4G4T4G4 に特異的に結合、アルファサブユニットで十分である場合がある	158
			オキシトリカ・ノバ・ベータ (<i>Oxytricha nova-Beta</i>)		P16458		41446		159
45	EcrTEBP	テロメア結合タンパク質	ユープロテス・クラッサス (<i>Euplotes crassus</i>)		Q06183	単量体	53360	OnTEBP に相同性、ゲノムはベータサブユニットを有さない	160
46	TteTEBP	テロメア結合タンパク質	テトラヒメナ・テルモフィラ・アルファ (<i>Tetrachymena termophila Alpha</i>)		Q23FB9	ヘテロ二量体	53073	OnTEBP アルファに相同性	161
			テトラヒメナ・テルモフィラ・ベータ (<i>Tetrachymena termophila Beta</i>)		Q23FH0		54757	OnTEBP ベータに相同性であってよい	162
47	pot1Spo	テロメア結合タンパク質	シゾサッカロマイセス・ポンベ (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)		O13988	単量体	64111	TEBP に関連	163

48	Cdc13pSce	テロメ ア結合 タンパ ク質	サッカロマイ セス・セレビ シエ (<i>Saccharomyce s cerevisiae</i>)		C7GSV7	単量体	104936	テロメア DNA に 特異的に結合	164
49	C1	リプレ ッサー	バクテリオフ ァージ 4 3 4		P16117	ホモ二量体	10426	ホモ二量体とし て DNA に特異的 に結合	165
50	LexA	リプレ ッサー	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	1LEB	P0A7C2	ホモ二量体	22358	ホモ二量体とし て特異的に DNA に結合	166

10

20

30

40

50

【0236】

ポリヌクレオチド結合成分は、ポリヌクレオチド結合酵素に好ましくは由来する。ポリヌクレオチド結合酵素は、ポリヌクレオチドに結合でき、ポリヌクレオチドの少なくとも1つの特徴と相互作用し、修飾するポリペプチドである。酵素は、個々のヌクレオチドまたは、ジまたはトリヌクレオチドなどのヌクレオチドの短い鎖を形成するように切断することによってポリヌクレオチドを修飾できる。酵素は、ポリヌクレオチドを特異的位置に方向付けるまたは移動させることによってそれを修飾できる。ポリヌクレオチド結合成分は、ポリヌクレオチドに結合でき、その移動を制御できる限り酵素活性を示す必要はない。例えば成分は、その酵素活性を除去するように修飾されている酵素由来であってよく、またはそれが酵素として作用することを妨げる条件下で使用されてよい。

10

【0237】

ポリヌクレオチド結合成分は、好ましくは核酸分解酵素由来である。酵素は、より好ましくは酵素分類 (EC) 群 3.1.1.1、3.1.1.3、3.1.1.4、3.1.1.5、3.1.1.6、3.1.2.1、3.1.2.2、3.1.2.5、3.1.2.6、3.1.2.7、3.1.3.0 および 3.1.3.1 のいずれかのメンバー由来である。酵素は、国際出願第 PCT/GB10/000133 号 (WO2010/086603 として公開) に開示のもののいずれかであってよい。

【0238】

好ましい酵素は、エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、ヘリカーゼおよび、ジャイレースなどのトポイソメラーゼである。好適なエキソヌクレアーゼは、これだけに限らないが、大腸菌 (*E. coli*) 由来エキソヌクレアーゼ I、大腸菌 (*E. coli*) 由来エキソヌクレアーゼ III 酵素、高度好熱菌 (*T. thermophilus*) 由来 *RecJ* ならびにバクテリオファージラムダエキソヌクレアーゼおよびその変種を含む。

20

【0239】

ポリメラーゼは、好ましくは成分分類 (EC) 群 2.7.7.6、2.7.7.7、2.7.7.19、2.7.7.48 および 2.7.7.49 のいずれかのメンバーである。ポリメラーゼは、好ましくは DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ、RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼまたは RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである。ポリヌクレオチド結合成分は、好ましくは *Phi29* DNA ポリメラーゼ (配列番号 62) 由来である。成分は、配列番号 62 に示す配列またはその変種を含む場合がある。配列番号 62 の変種は、配列番号 62 のものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持している酵素である。変種は、ポリヌクレオチドの結合を促進するならびに / または高塩濃度および / もしくは室温での活性を促進する修飾を含む場合がある。

30

【0240】

配列番号 62 のアミノ酸配列の全長にわたって変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも 50% 相溶性である。より好ましくは変種ポリペプチドは、アミノ酸同一性に基づいて配列の全長にわたって配列番号 62 のアミノ酸配列に少なくとも 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% およびより好ましくは少なくとも 95%、97% または 99% 相溶性であってよい。少なくとも 80%、例えば少なくとも 85%、90% または 95% のアミノ酸同一性が 200 以上のストレッチ、例えば 230、250、270 または 280 以上の連続するアミノ酸にわたってあり得る (「高い相溶性」)。相溶性は下に記載のとおり決定される。変種は配列番号 2 および 4 を参照して下に考察したいずれの方法においても野生型配列と異なっていてよい。

40

【0241】

ヘリカーゼは、上に考察したもののいずれであってよい。ヘリカーゼ二量体および多量体は下に詳細に考察される。ポリヌクレオチド結合成分は、ヘリカーゼ由来のポリヌクレオチド結合ドメインであってよい。例えばポリヌクレオチド結合成分は、配列番号 66 または 67 に示す配列またはその変種を好ましくは含む。配列番号 66 または 67 の変種

50

は、配列番号 66 または 67 のものから変化しているアミノ酸配列を有し、ポリヌクレオチド結合活性を保持しているタンパク質である。これは、上に記載のとおり測定され得る。変種は、ポリヌクレオチドの結合を促進するならびに、または高塩濃度および/もしくは室温での活性を促進する修飾を含む場合がある。

【0242】

配列番号 66 または 67 のアミノ酸配列の全長にわたって変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも 50% 相同性である。より好ましくは変種ポリペプチドは、アミノ酸同一性に基づいて配列番号 66 または 67 のアミノ酸配列の配列の全長にわたって少なくとも 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% およびより好ましくは少なくとも 95%、97% または 99% 相同性であってよい。少なくとも 80%、例えば少なくとも 85%、90% または 95% のアミノ酸同一性が 40 以上のストレッチ、例えば 50、60、70 または 80 以上の連続するアミノ酸にわたってあり得る(「高い相同性」)。相同性は上に記載のとおり決定される。変種は配列番号 2 および 4 を参照して下に考察したいずれの方法においても野生型配列と異なっていてよい。

10

【0243】

トポイソメラーゼは、好ましくは成分分類 (EC) 群 5.99.1.2 および 5.99.1.3 のいずれかのメンバーである。

【0244】

ポリヌクレオチド結合成分は、上に考察したいずれの酵素であってもよい。構築物は、ポリメラーゼ、トポイソメラーゼまたはプライマーゼに付着しているヘリカーゼを好ましくは含まない。構築物は、互いに付着している 2 つ以上の NS3 ヘリカーゼを好ましくは含まない。構築物は、ピス (スルホサクシニミジル) スペレート (BS³) を使用して互いに付着している 2 つ以上の NS3 ヘリカーゼをより好ましくは含まない。

20

【0245】

成分は、明示用標識 (revealing label) で標識されてよい。標識は、上に記載のもののいずれであってもよい。

【0246】

成分は、大腸菌 (E. coli)、T. サーマフィルス (T. thermophilus) またはバクテリオファージ、などの任意の成分産生生物から単離され得る、または合成的もしくは組換え的手段によって作製できる。例えば成分は、下に記載のとおり *in vitro* 翻訳および転写によって合成できる。成分は、下に記載のとおり大規模に産生されてよく、精製が続く。

30

【0247】

好ましい構築物

上の考察から明らかであるとおり、ポリヌクレオチド結合成分は、ヘリカーゼに好ましくは由来する。例えばそれは、ヘリカーゼ由来ポリヌクレオチドドメインであってよい。成分は、1 つまたは複数のヘリカーゼをより好ましくは含む。ヘリカーゼは、上に考察したもののいずれであってもよい。そのような実施形態では構築物は、互いに付着している 2 個以上のヘリカーゼを当然ながら含む。本発明は、互いに付着している 2 つ以上のヘリカーゼを含む構築物を提供する。上に考察したとおり各ヘリカーゼは、そのままヘリカーゼとして機能できなければならない。本発明の方法において使用できる構築物、具体的には使用できるヘリカーゼの型および付着方法を参照して上に考察の任意の実施形態は、本発明の構築物に等しく適用可能である。2 つ以上のヘリカーゼは、好ましくは単量体ヘリカーゼである。2 つ以上のヘリカーゼは、好ましくはヘリカーゼ酵素由来の 2 つ以上のヘリカーゼドメインではない。

40

【0248】

本発明の構築物は、互いに付着している 2 つ以上の NS3 ヘリカーゼを好ましくは含まない。本発明の構築物は、ピス (スルホサクシニミジル) スペレート (BS³) を使用して互いに付着している 2 つ以上の NS3 ヘリカーゼをより好ましくは含まない。

50

【 0 2 4 9 】

構築物は、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のヘリカーゼを含んで良い。換言すると本発明の構築物は、ヘリカーゼ二量体、ヘリカーゼ三量体、ヘリカーゼ四量体、ヘリカーゼ五量体などを含んでよい。

【 0 2 5 0 】

2つ以上のヘリカーゼは、任意の方向で互いに付着してよい。同一または類似のヘリカーゼは、各ヘリカーゼ中の同一のアミノ酸残基（すなわち同じ位置）または空間的に近接しているアミノ酸残基（すなわち空間的に近接している位置）を介して付着してよい。これは、「ヘッドトゥーヘッド」編成と呼ばれる。代替的に同一または類似のヘリカーゼは、各ヘリカーゼの反対または異なる側のアミノ酸残基（または位置）を介して付着してよい。これは、「ヘッドトゥーテール」編成と呼ばれる。3つの同一のまたは類似のヘリカーゼを含むヘリカーゼ三量体は、ヘッドトゥーヘッドおよびヘッドトゥーテール編成の両方を含む場合がある。

【 0 2 5 1 】

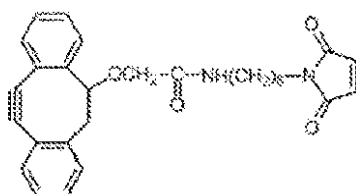
2つ以上のヘリカーゼは、互いに異なっていてよい（すなわち構築物はヘテロ二量体、三量体、四量体または五量体などである）。例えば本発明の構築物は：（a）1つもしくは複数のH e l 3 0 8ヘリカーゼおよび1つもしくは複数のX P Dヘリカーゼ；（b）1つもしくは複数のH e l 3 0 8ヘリカーゼおよび1つもしくは複数のR e c Dヘリカーゼ；（c）1つもしくは複数のH e l 3 0 8ヘリカーゼおよび1つもしくは複数のT r a Iヘリカーゼ；（d）1つもしくは複数のX P Dヘリカーゼおよび1つもしくは複数のR e c Dヘリカーゼ；（e）1つもしくは複数のX P Dヘリカーゼおよび1つもしくは複数のT r a Iヘリカーゼ；または（f）1つもしくは複数のR e c Dヘリカーゼおよび1つもしくは複数のT r a Iヘリカーゼを含む場合がある。構築物は、同じヘリカーゼの2つの異なる変種を含む場合がある。例えば構築物は、各変種において異なる位置に導入された1つまたは複数のシステイン残基またはF a z残基を有する、上に考察したヘリカーゼの内の1つの2つの変種を含む場合がある。この場合ヘリカーゼは、ヘッドトゥーテール編成であってよい。好ましい実施形態では、Q 4 4 2 Cを含む配列番号10の変種はシステイン連結を介してQ 5 5 7 Cを含む配列番号10の変種に付着されてよい。H e l 3 0 8 M b uのC y s変異体は、必要に応じてヘテロ二量体に作製されてもよい。この手法ではH e l 3 0 8 M b u - Q 4 4 2 CおよびH e l 3 0 8 M b u - Q 5 5 7 Cなどの2つの異なるC y s変異体対は、ヘッドトゥーテール様式で連結されてよい。ヘテロ二量体は、2つの可能な方法で形成されてもよい。第一は、上に考察したホモ二機能性リンカーの使用を含む。ヘリカーゼ変種の1つは、1つのリンカーがタンパク質の1分子に付着されるように大過剰量のリンカーで修飾されてよい。このリンカー修飾変種は、次いで未修飾タンパク質、潜在的水素二量体、および他のヘリカーゼ変種と反応する未反応リンカーから精製されてよい。得られた二量体は、次いで他の分子種から精製されてよい。

【 0 2 5 2 】

第二は、ヘテロ二機能性リンカーの使用を含む。例えばヘリカーゼ変種の1つは、一方の末端にマレイミドまたはヨードアセトアミド官能基および他方の末端にシクロオクチン官能基（D I B O）を含有する第一のP E Gリンカーで修飾されてよい。この一例は下に示される：

【 0 2 5 3 】

【 化 3 】



【 0 2 5 4 】

第二のヘリカーゼ変種は、一方の末端にマレイミドまたはヨードアセトアミド官能基および他方の末端にアジド官能基を含有する第二のPEGリンカーで修飾されてよい。一例を下に示す：

【0255】

【化4】



【0256】

10

2つの異なるリンカーを有する2つのヘリカーゼ変種は、次いで精製され、二量体を作製するために合わせてクリック（Cu²⁺フリークリックケミストリーを使用する）されてよい。銅フリークリックケミストリーは、その望ましい特徴によりこれらの応用において使用されている。例えばそれは、迅速、清潔およびタンパク質に無毒である。しかし他の好適な生体直交型化学は、これだけに限らないが、シュタウディンガー化学、ヒドラジンまたはヒドラジド/アルデヒドまたはケトン試薬（HyNic + 4FB化学、全てのSolulink（商標）試薬を含む）、ディール・アルダー試薬対およびボロン酸/サリチルヒドロキサム酸試薬を含む。

【0257】

同じヘリカーゼの2つの異なる変種を連結するこれらの2つの方法は、2つの異なるヘリカーゼの二量体およびヘリカーゼポリメラーゼ二量体などのヘリカーゼと成分とが互いに異なっている上に考察した構築物のいずれについても有効である。

20

【0258】

類似の方法がさまざまなFaz変種を連結するために使用され得る。1つのFaz変種（Q442Cを含む配列番号10など）は、1つのリンカーがタンパク質の1つの分子に付着されるように大過剰量のリンカーで修飾されてよい。このリンカー修飾Faz変種は、次いで未修飾タンパク質、潜在的ホモ二量体、および第二のFaz変種（Q577Fazを含む配列番号10など）と反応する未反応リンカーから精製されてよい。得られた二量体は、次いで他の分子種から精製されてよい。

【0259】

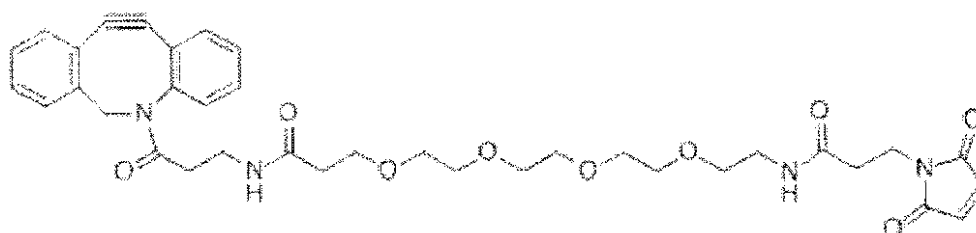
30

ヘテロ二量体は、同じヘリカーゼまたは異なるヘリカーゼのシステイン変種とFaz変種とを連結することによっても作製できる。例えば任意の上のシステイン変種（Q442Cを含む配列番号10など）は、任意の上のFaz変種（Q577Fazを含む配列番号10など）と二量体を作製するために使用できる。一方の末端にマレイミドまたはヨードアセトアミド官能性および他方の末端にDBC O官能性を有するヘテロ二機能性PEGリンカーは、この変異体の組合せにおいて使用できる。そのようなリンカーの一例は、下に示されている（DBC O - PEG4 - マレイミド）：

【0260】

【化5】

40



【0261】

リンカーの長さは、2つの官能基間のPEG単位の数を変えることによって変更できる。

50

【0262】

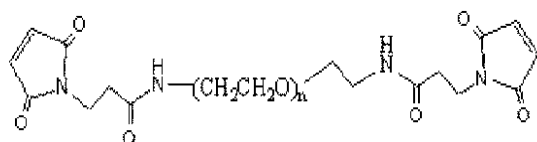
ヘリカーゼヘテロ三量体は、H e l 3 0 8ヘリカーゼ、X P Dヘリカーゼ、R e c Dヘリカーゼ、T r a Iヘリカーゼおよびこれらの変種から選択される3種の異なる型のヘリカーゼを含んでよい。3個より多いヘリカーゼを含むオリゴマーについても同様である。構築物中の2つ以上のヘリカーゼは、配列番号10、13、16または19の異なる変種などの同じヘリカーゼの異なる変種であってよい。異なる変種は、異なる位置を介する付着を促進するために異なる位置で修飾されてよい。ヘテロ三量体は、したがってヘッドトゥーテールおよびヘッドトゥーヘッド編成である場合がある。

【0263】

本発明の構築物中の2つ以上のヘリカーゼは、互いに同じであってよい（すなわち構築物はホモ二量体、三量体、四量体または五量体などである）。ホモオリゴマーは、2つ以上のH e l 3 0 8ヘリカーゼ、2つ以上のX P Dヘリカーゼ、2つ以上のR e c Dヘリカーゼ、2つ以上のT r a Iヘリカーゼまたは2つ以上の上に考察した任意の変種を含んでよい。そのような実施形態ではヘリカーゼは、各ヘリカーゼ中の同じアミノ酸残基（すなわち同じ位置）を使用して好ましくは付着している。ヘリカーゼは、したがってヘッドトゥーヘッドで付着している。ヘリカーゼは、同じ位置でヘリカーゼに置換されているシステイン残基またはF a z 残基を使用して連結されてよい。同一のヘリカーゼ変種中のシステイン残基は、マレイミドまたはヨードアセトアミドなどのチオール反応性基を含有するホモ二機能性リンカーを使用して連結されてよい。これらの官能基は、次の例のとおりポリエチレングリコール（P E G）鎖の末端にあってよい：

【0264】

【化6】



【0265】

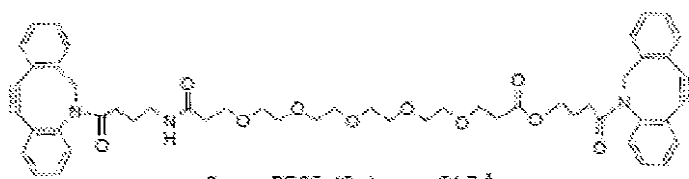
リンカーの長さは、必要とされる応用に合わせて変更できる。例えばnは、2、3、4、8、11、12、16またはそれ以上であってよい。P E Gリンカーは、水溶性などの好都合な特徴を有することから好適である。他の非P E Gリンカーもシステイン連結において使用できる。

【0266】

同様の手法を使用することによって同一のF a z 変種は、ホモ二量体に作製され得る。D I B O官能基を有するホモ二機能性リンカーは、C u ²⁺ フリークリック化学を使用してホモ二量体を作製するために、同じF a z 変種の2分子を連結するために使用できる。リンカーの一例は下に示されている：

【0267】

【化7】



【0268】

P E Gリンカーの長さは、2、4、8、12、16またはそれ以上のP E G単位を含んで変化してよい。そのようなリンカーは、定量を容易にするために蛍光タグを組み込んで作製されてもよい。そのような蛍光タグは、マレイミドリンカーにも組み込まれ得る。

【0269】

本発明の好ましい構築物は下の表 5 に示されている。

【 0 2 7 0 】

【表 5】

本発明の好ましい構築物
Hel308Mbu-A700C 二量体2kDa
Hel308Mbu-A700C 二量体3.4kDa
Hel308Mbu-Q442C 2kDaリンカー-ホモ二量体
Hel308Mbu-Q442C 3.4kDaリンカー-ホモ二量体
Hel308Mbu-A700C 2kDaリンカー-ホモ二量体
Hel308Mbu-A700C-strepII. 2kDa PEGホモ二量体
Hel308Mhu-WT 2kDa二量体
ヘリカーゼ2k二量体(Hel308Mbu R681A、R687A、A700C-STrEP)
ヘリカーゼ2k二量体(Hel308Mbu R687A、A700C-STrEP)
Hel308Mhu-WT 2kDa二量体
Hel308Tga N674C 二量体2kDa
アッセイ用のHel308Tga N674C 二量体2kDa検査物
Hel308 Tga-R657A-N674C-STrEP 二量体2kDa

10

20

【 0 2 7 1 】

本発明の好ましい構築物は、下の表 6 に示されている。各列は、左側のカラムのヘリカーゼが右側のカラムの追加的ポリヌクレオチド結合成分に本発明により付着している好ましい構築物を示す。

【 0 2 7 2 】

【表 6】

ヘリカーゼ	追加的ポリヌクレオチド結合成分
上に定義の Hel308 ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 10、13、16 もしくは 19 または上に定義のその変種)	ポリメラゼ(好ましくは配列番号 62 または上に定義のその変種)
上に定義の TraI ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 46、87、98 および 102 または上に定義のその変種)	ポリメラゼ(好ましくは配列番号 62 または上に定義のその変種)
上に定義の Hel308 ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 10、13、16 または 19 または上に定義のその変種)	上に定義の Hel308 ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 10、13、16 または 19 または上に定義のその変種)
上に定義の TraI ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 46、87、98 および 102 または上に定義のその変種)	上に定義の TraI ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 46、87、98 および 102 または上に定義のその変種)
上に定義の Hel308 ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 10、13、16 または 19 または上に定義のその変種)	上に定義の TraI ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 46、87、98 および 102 または上に定義のその変種)
上に定義の TraI ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 46、87、98 および 102 または上に定義のその変種)	上に定義の Hel308 ヘリカーゼ(好ましくは配列番号 10、13、16 または 19 または上に定義のその変種)

30

40

【 0 2 7 3 】

本発明は、ヘリカーゼおよび配列番号 94 (メタノピュルス・カンドレリ (Methanopyrus kandleri) 由来トポイソメラーゼ V 由来 H - L ドメイン ; 配列番号 89) または配列番号 94 の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 94 に少なくとも 80 % 相同性を有するその変種を含むアミノ酸配列を含む構築物であって、ヘリカーゼがアミノ酸配列に付着されており、構築物が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も提供する。ヘリカーゼは、上に考察したいずれの方法でアミノ酸配列に付着されていてもよい。

【 0 2 7 4 】

構築物は、配列番号 90 または配列番号 90 の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基

50

づいて配列番号 90 に少なくとも 80 % 相同性を有するその変種を好ましくは含む。

【0275】

配列番号 94 または 90 のアミノ酸配列の全長にわたって、変種はアミノ酸同一性に基づいて配列に好ましくは少なくとも 80 % 相同性である。より好ましくは変種ポリペプチドは、その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 94 または 90 のアミノ酸配列に少なくとも 85 %、少なくとも 90 % およびより好ましくは少なくとも 95 %、97 % または 99 % 相同性であり得る。少なくとも 80 %、例えば少なくとも 85 %、90 % または 95 % のアミノ酸同一性が 200 以上のストレッチ、例えば 230、250、270 または 280 以上の連続するアミノ酸にわたってあり得る（「高い相同性」）。相同性は下に記載のとおり決定される。変種は配列番号 2 および 4 を参照して下に考察したいずれの方法においても野生型配列と異なっていてよい。

10

【0276】

ポリヌクレオチド配列

本発明は、2 つ以上のヘリカーゼが遺伝子的に融合されている構築物をコードしているポリヌクレオチド配列も提供する。標準的技術を使用してそのようなポリヌクレオチド配列を作製することは容易である。ヘリカーゼをコードしているポリヌクレオチド配列は、別のヘリカーゼをコードしているポリヌクレオチド配列に融合または挿入されてもよい。融合または挿入は、典型的にはインフレームである。ヘリカーゼをコードしているポリヌクレオチド配列が別のヘリカーゼをコードしているポリヌクレオチド配列に挿入される場合、成分をコードしている配列は B s p E 1 によって認識されるものなどの制限エンドヌクレアーゼ部位によって典型的には両端で隣接されている。それは、セリンまたはグリシンをそれぞれコードしている 5 から 10 コドンなどのリンカーをコードしているポリヌクレオチド配列によって両端で隣接されている場合もある。

20

【0277】

ポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を使用して単離および複製され得る。染色体 DNA は、メタノコッコイデス・ブルトニイ (*Methanococcoides burtoni*) などのヘリカーゼ産生生物からおよび/または大腸菌 (*E. coli*)、サーマスサーモフィルス (*T. thermophilus*) またはバクテリオファージ (*bacteriophage*) などの成分産生生物から抽出され得る。ヘリカーゼおよび成分をコードしている遺伝子は、特異的プライマーを伴う PCR を使用して増幅され得る。増幅された配列は、次いでクローニングベクターなどの組換え複製可能ベクターに組み込まれてよい。ベクターは、適合性の宿主細胞においてポリヌクレオチドを複製するために使用され得る。したがってヘリカーゼおよび/または成分をコードしているポリヌクレオチド配列は、ヘリカーゼおよび/または成分をコードしているポリヌクレオチドを複製可能ベクターに導入し、ベクターを適合性の宿主細胞に導入し、ベクターの複製をもたらす条件下で宿主細胞を増殖させることによって作製され得る。ベクターは宿主細胞から回収され得る。ポリヌクレオチドのクローニングのために好適な宿主細胞は、当技術分野において公知であり、下により詳細に記載される。

30

【0278】

ポリヌクレオチド配列は、好適な発現ベクターにクローニングされてよい。発現ベクターでは構築物をコードしているポリヌクレオチド配列は、典型的には、宿主細胞によるコード配列の発現をもたらすことができる制御配列に作動可能に連結される。そのような発現ベクターは構築物を発現するために使用され得る。

40

【0279】

用語「作動可能に連結する」は、記載される構成成分がそれらが意図する様式で機能する関係の近位にあることを指す。コード配列に「作動可能に連結される」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合性である条件下で達成されるような方法でライゲーションされる。同じまたは異なるポリヌクレオチドの複数のコピーは、ベクターに導入されてよい。

【0280】

50

発現ベクターは、次いで好適な宿主細胞に導入されてよい。それにより構築物は、構築物をコードしているポリヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、ベクターを適合性の細菌宿主細胞に導入し、ポリヌクレオチド配列の発現をもたらす条件下で宿主細胞を増殖させることによって産生され得る。

【0281】

ベクターは、複製開始点、場合により前記ポリヌクレオチド配列の発現のためのプロモーターおよび場合によりプロモーターのレギュレーターと共に提供される例えば、プラスミド、ウイルスまたはファージベクターであってよい。ベクターは、1つまたは複数の選択可能マーカー遺伝子、例えばアンピリシン耐性遺伝子を含むようによい。プロモーターおよび他の発現調節シグナルは、発現ベクターが設計された宿主細胞に適合性であるように選択されてよい。T7、trc、lac、araまたは_Lプロモーターは典型的には使用される。

10

【0282】

宿主細胞は、典型的には高いレベルで構築物を発現する。構築物をコードしているポリヌクレオチド配列で形質転換される宿主細胞は、細胞を形質転換するために使用される発現ベクターに適合性であるように選ばれる。宿主細胞は、典型的には細菌性、好ましくは大腸菌(E. coli)である。DE3溶原菌を有する任意の細胞、例えばC41(DE3)、BL21(DE3)、JM109(DE3)、B834(DE3)、TUNER、OrigamiおよびOrigami Bは、T7プロモーターを含むベクターを発現できる。

20

【0283】

本発明の方法

本発明は、本発明の構築物、すなわち互いに付着している2つ以上のヘリカーゼを含む構築物を使用して標的ポリヌクレオチドの移動を制御する方法を提供する。方法は、標的ポリヌクレオチドを本発明の構築物と接触させ、それによりポリヌクレオチドの移動を制御するステップを含む。方法は、好ましくはポアに電位が印加されて実行される。下により詳細に考察されるとおり、印加された電位は、ポアと構築物との複合体の形成を典型的には生じる。印加された電位は、電圧電位であってよい。代替的に印加された電位は、化学電位であってよい。この一例は、両親媒性層全体に塩勾配を用いている。塩勾配は、Hofmeisterら、J Am Chem Soc. 2007 Jul 11;129(27):8650-5に開示されている。

30

【0284】

本発明は標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法も提供する。方法は、(a)標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよび本明細書に記載の構築物に接触させて、構築物がポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するステップを含む。方法は、(b)ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときに1つまたは複数の測定値を取るステップであって、測定値が標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性の指標であり、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップも含む。

【0285】

ステップ(a)および(b)は、上に考察したとおり好ましくはポアに電位が印加されて実行される。いくつかの場合では、ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときにポアを通る電流が標的ポリヌクレオチドの配列を決定するために使用される。これは、鎖配列決定法である。

40

【0286】

本発明の方法は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためである。ポリヌクレオチドは上に定義されている。

【0287】

標的ポリヌクレオチドの全体または部分だけは、本方法を用いて特性付けられ得る。標的ポリヌクレオチドは、任意の長さであってよい。例えばポリヌクレオチドは、長さ少なくとも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または少なくとも500ヌク

50

レオチド対であってよい。ポリヌクレオチドは、1000ヌクレオチド対以上、長さ5000ヌクレオチド対以上または長さ100000ヌクレオチド対以上であってよい。

【0288】

標的ポリヌクレオチドは、任意の好適な試料中に存在する。本発明は、標的ポリヌクレオチドを含有することが公知であるまたは含有すると考えられる試料について典型的には実行される。代替的に本発明は、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドの同一性を確認するために試料中でのその存在が公知であるまたは期待される試料について実行され得る。

【0289】

試料は生物学的試料であってよい。本発明は、任意の生物または微生物から得られたまたは抽出された試料について *in vitro* で実行されてよい。生物または微生物は典型的には古細菌のもの、原核性または真核性であり、典型的には五界：植物界、動物界、菌界、モネラ界および原生生物界の1つに属する。本発明は、任意のウイルスから得られたまたは抽出された試料について *in vitro* で実行されてよい。試料は、好ましくは液体試料である。試料は典型的には、患者の体液を含む。試料は尿、リンパ液、唾液、粘液または羊水であってよいが、好ましくは血液、血漿または血清である。典型的には試料は、ヒト由来であるが、代替的に、ウマ、ウシ、ヒツジまたはブタなどの商業的に飼育される動物由来などの別の哺乳動物由来であってもよく、代替的にネコまたはイヌなどの愛玩動物であってもよい。代替的に植物由来の試料は、穀類、マメ、果実または野菜などの商品作物（例えばコムギ、オオムギ、カラスムギ、セイヨウアブラナ、トウモロコシ、ダイズ、イネ、バナナ、リンゴ、トマト、ジャガイモ、ブドウ、タバコ、マメ、レンズマメ、サトウキビ、ココア、ワタ）から典型的には得られる。

【0290】

試料は、非生物学的試料であってよい。非生物学的試料は、好ましくは液体試料である。非生物学的試料の例は、手術用液（surgical fluids）、水（飲料水、海水または河川水など）および検査室検査のための試薬を含む。

【0291】

試料は、典型的にはアッセイされる前に例えば遠心分離によってまたは、不要の分子または細胞（赤血球細胞など）をろ過して除く膜を通すことによって処理される。試料は採取されてから直ちに測定されてよい。試料は、典型的にはアッセイの前に好ましくは - 70より低くで、保存されてもよい。

【0292】

膜貫通ポアは、ある程度膜を超える構造である。それは印加された電位によって駆動された水和イオンが膜を超えてまたは膜内に流れるようにする。膜貫通ポアは、典型的には膜全体を超え、それにより水和イオンは膜の一方の側から膜の他方の側へ流れられる。しかし膜貫通ポアは、膜を超えている必要はない。それは、一方の端で閉じていてもよい。例えばポアは、水和イオンが膜に沿ってまたは膜内に流れ得る穴であってもよい。

【0293】

任意の膜貫通ポアが本発明において使用され得る。ポアは、生物学的または人工であってよい。好適なポアは、これだけに限らないが、タンパク質ポア、ポリヌクレオチドポアおよびソリッドステートポアを含む。

【0294】

任意の膜が本発明により用いられ得る。好適な膜は、当技術分野において周知である。膜は、好ましくは両親媒性層である。両親媒性層は、少なくとも1つの親水性の部分および少なくとも1つの親油性または疎水性の部分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る層である。両親媒性層は単層または二重層であってよい。両親媒性分子は合成または天然に存在するものでよい。天然に存在しない両親媒性物質、および単層を形成する両親媒性物質は当技術分野において公知であり、例えばブロック共重合体（Gonzalez-Perezら、Langmuir、2009、25、10447-10450）を含む。ブロック共重合体は、2つ以上の単量体サブユニットが1本のポリマー鎖を作るように併せて重合されている重合体

10

20

30

40

50

材料である。ブロック共重合体は、典型的には各単量体サブユニットによって寄与される特徴を有する。しかし、ブロック共重合体は、個々のサブユニットから形成されたポリマーが有さない特有の特徴を有する場合がある。ブロック共重合は、単量体サブユニットの1つが疎水性（すなわち親油性）である一方で他のサブユニット（複数可）が水性媒体中では親水性であるように操作されてよい。この場合ブロック共重合体は、両親媒性特徴を有する場合があり、生物学的膜を模倣する構造を形成できる。ブロック共重合体は、ジブロック（2個の単量体サブユニットからなる）であってよいが、両親媒性物質として振る舞うさらに複雑な配置を形成するために2個より多い単量体サブユニットから構築されてもよい。共重合体はトリブロック、テトラブロックまたはペンタブロック共重合体であってもよい。

10

【0295】

両親媒性層は、典型的には平面状脂質二重層または支持された二重層である。

【0296】

両親媒性層は典型的には、脂質二重層である。脂質二重層は細胞膜のモデルであり、さまざまな実験研究のための優れたプラットフォームとして役立つ。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 *in vitro* 調査のために用いられ得る。代替的に脂質二重層は、さまざまな物質の存在を検出するためのバイオセンサーとして用いられ得る。脂質二重層は、任意の脂質二重層であってよい。好適な脂質二重層は、これだけに限らないが平面状脂質二重層、支持された二重層またはリボソームを含む。脂質二重層は好ましくは平面状脂質二重層である。好適な脂質二重層は、国際出願第 PCT / G B 0 8 / 0 0 0 5 6 3 号 (W O 2 0 0 8 / 1 0 2 1 2 1 として公開)、国際出願第 PCT / G B 0 8 / 0 0 4 1 2 7 号 (W O 2 0 0 9 / 0 7 7 7 3 4 として公開) および国際出願第 PCT / G B 2 0 0 6 / 0 0 1 0 5 7 号 (W O 2 0 0 6 / 1 0 0 4 8 4 として公開) に開示されている。

20

【0297】

脂質二重層を形成するための方法は、当技術分野において公知である。好適な方法は実施例に開示する。脂質二重層は、脂質単層が水溶液 / 空気界面にその界面に垂直である開口部のいずれかの端を通して運ばれる、モンタルおよびミュラーの方法 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.、1972;69:3561-3566) によって一般的には形成される。

【0298】

モンタルおよびミュラーの方法は、タンパク質ポア挿入のために好適である良質な脂質二重層を形成する対費用効果が高くて比較的簡単な方法であることから一般的である。二重層形成の他の一般的な方法は、チップディッピング、ペインティング二重層およびリボソーム二重層のパッチクランプを含む。

30

【0299】

好ましい実施形態では、脂質二重層は国際出願第 PCT / G B 0 8 / 0 0 4 1 2 7 号 (W O 2 0 0 9 / 0 7 7 7 3 4 として公開) に記載のとおり形成される。別の好ましい実施形態では、膜は、ソリッドステート層である。ソリッドステート層は生物由来ではない。換言すると、ソリッドステート層は、生物または細胞などの生物学的環境由来でなく、またはそれから単離されず、生物学的に入手可能な構造の合成的に製造されたバージョンでもない。ソリッドステート層は、これだけに限らないがマイクロ電子材料、 Si_3N_4 、 Al_2O_3 および SiO_2 などの絶縁材料、ポリアミドなどの有機および無機ポリマー、Teflon (登録商標) などのプラスチックまたは2要素添加硬化シリコンゴム (two-component addition-cure silicone rubber) などのエラストマーならびにガラスを含む有機材料ならびに無機材料の両方から形成され得る。ソリッドステート層は、グラフェン (graphene) などの一原子層からまたは数原子厚だけである層から形成され得る。好適なグラフェン (graphene) 層は、国際出願第 PCT / U S 2 0 0 8 / 0 1 0 6 3 7 号 (W O 2 0 0 9 / 0 3 5 6 4 7 として公開) に開示されている。

40

【0300】

方法は、(i) ポアを含む人工両親媒性層、(ii) ポアを含む単離された天然に存在

50

する脂質二重層、または (i i i) 挿入されたポアを有する細胞を用いて典型的には実行される。方法は、人工脂質二重層などの人工両親媒性層を用いて典型的には実行される。両親媒性層は、ポアに加えて他の膜貫通タンパク質および/または膜内タンパク質ならびに他の分子を含んでもよい。好適な装置および条件は、下に考察される。本発明の方法は、典型的には *in vitro* で実行される。ポリヌクレオチドは、膜にカップリングされ得る。これは、任意の公知の方法を用いてされ得る。膜が脂質二重層などの両親媒性層である場合は (下に詳細に考察されるとおり)、ポリヌクレオチドは、膜に存在するポリペプチドまたは膜に存在する疎水性アンカーを介して膜に好ましくはカップリングされる。疎水性アンカーは、好ましくは脂質、脂肪酸、ステロール、カーボンナノチューブまたはアミノ酸である。

10

【0301】

ポリヌクレオチドは膜に直接カップリングされ得る。ポリヌクレオチドは好ましくは膜にリンカーを介してカップリングされる。好ましいリンカーは、これだけに限らないがポリヌクレオチド、ポリエチレングリコール (PEG) およびポリペプチドなどのポリマーを含む。ポリヌクレオチドが膜に直接カップリングされる場合、膜とヘリカーゼとの間の距離のためにポリヌクレオチドの末端まで特性決定が継続できないことから、いくつかのデータが失われる。リンカーが用いられる場合、ポリヌクレオチドは完了まで処理され得る。リンカーが用いられる場合、リンカーはポリヌクレオチドの任意の位置に付着され得る。リンカーは、テールポリマーでポリヌクレオチドに好ましくは付着される。

20

【0302】

カップリングは、安定または一過的であってよい。ある種の応用に関してカップリングの一過的な性質は好ましい。安定カップリング分子がポリヌクレオチドの 5' 末端または 3' 末端のいずれかに直接付着された場合、二重層とヘリカーゼ活性部位との間の距離のためにポリヌクレオチドの末端まで特性決定が継続できないことから、いくつかのデータが失われる。カップリングが一過的である場合、カップリングされた端は無作為に二重層から遊離し、ポリヌクレオチドは完了まで処理され得る。安定なまたは一過的連結を膜と形成する化学基は、下により詳細に考察される。ポリヌクレオチドは、コレステロール (cholesterol) または脂肪酸アシル鎖を用いて脂質二重層などの両親媒性層に一過的にカップリングされ得る。ヘキサデカン酸などの長さ 6 から 30 までの炭素原子を有する任意の脂肪酸アシル鎖は用いられ得る。

30

【0303】

好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドは、両親媒性層にカップリングされる。合成脂質二重層へのポリヌクレオチドのカップリングは、種々の異なるテザーリング戦略で既に行われている。これらを下の表 7 に要約する。

【0304】

【表 7】

表7

付着基	カップリングの種類	参考文献
チオール	安定	Yoshina-Ishii, C. および S. G. Boxer (2003). "Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers." <i>J Am Chem Soc</i> 125 (13):3696-7
ビオチン	安定	Nikolov, V., R. Lipowsky ら, (2007). "Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules." <i>Biophys J</i> 92 (12):4356-68
コレステロール	一過的	Pfeiffer, I. および F. Hook (2004). "Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies." <i>J Am Chem Soc</i> 126 (33):10224-5
脂質	安定	van Lengerich, B., R. J. Rawle ら, "Covalent attachment of lipid vesicles to a fluid-supported bilayer allows observation of DNA-mediated vesicle interactions." <i>Langmuir</i> 26 (11):8666-72

40

【0305】

ポリヌクレオチドは、合成反応において修飾ホスホラミダイトを用いて官能基化されることができ、チオール、コレステロール (cholesterol)、脂質およびビオチン基などの

50

反応基の付加に容易に適合される。これらのさまざまな付着化学物質は、ポリヌクレオチドに一連の付着選択肢をもたらす。さまざまな各修飾基は、わずかに異なる方法でポリヌクレオチドを繋ぎ止め、カップリングは常に永久的ではなく、二重層へのさまざまな残存時間をポリヌクレオチドにもたらす。一過的カップリングの有利点は、上に考察される。

【0306】

ポリヌクレオチドのカップリングは、反応基がポリヌクレオチドに付加され得る限り多数の他の手段によっても達成され得る。DNAのいずれかの端への反応基の付加は既に報告されている。チオール基はポリヌクレオチドキナーゼおよびATP Sを用いてssDNAの5'に付加され得る(Grant, G.P.およびP.Z.Qin (2007) "A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5' terminus of nucleic acids." *Nucleic Acid Res* 35(10):e77)。ビオチン、チオールおよびフルオロフォア(fluorophore)などの化学基のより多様な選択は、修飾オリゴヌクレオチドをssDNAの3'に組み込むためにターミナルトランスフェラーゼを用いて付加され得る(Kumar, A., P.Tchenら、(1988). "Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase." *Anal Biochem* 169(2):376-82)。

【0307】

代替的に反応基は、二重層に既にカップリングされたものに相補的なDNAの断片の付加のために考慮される場合があり、付着はハイブリダイゼーションを介して達成され得る。ssDNAの断片のライゲーションは、T4RNAリガーゼIを用いて報告されている(Troutt, A.B., M.G.McHeyzer-Williamsら、(1992). "Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20):9823-5)。代替的にssDNAまたはdsDNAのいずれかは、天然dsDNAにライゲーションされることができ、次いで2本鎖は熱的または化学的変性によって分離された。天然dsDNAについて、ssDNAの1片を二重鎖の1つもしくは両方の端に、またはdsDNAを1つまたは両方の端へのいずれかで付加できる。次いで、二重鎖が融解される際に、ssDNAが5'末端、3'末端もしくは両端でのライゲーションもしくは修飾のために用いられ、dsDNAがライゲーションのために用いられた場合、各一重鎖は5'または3'修飾のいずれかを有する。ポリヌクレオチドが合成鎖である場合、カップリング化学はポリペプチドの化学合成の際に組み込まれ得る。ここ例えばポリヌクレオチドは、付着された反応基を有するプライマーを用いて合成され得る。

【0308】

ゲノムDNAのセクションの増幅のための一般的技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いている。本明細書では、2個の合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてDNAの同じセクションの多数の複製物が作製される場合があり、各複製物について二重鎖中の各鎖の5'は合成ポリヌクレオチドである。コレステロール(cholesterol)、チオール(thiol)、ビオチン(biotin)または脂質などの反応基を有するアンチセンスプライマーを用いるステップによって、増幅された標的DNAの各複製物は、カップリングのための反応基を含有する。

【0309】

膜貫通ポアは、好ましくは膜貫通タンパク質ポアである。膜貫通タンパク質ポアは、分析物などの水和イオンが膜の一方の側から膜の他方の側へ流れるようにするポリペプチドまたはポリペプチドの集積物である。本発明では膜貫通タンパク質ポアは、水和イオンが印加された電位によって膜の一方の側から他方へ流れるように駆動されるようにするポアを形成できる。膜貫通タンパク質ポアは、ヌクレオチドなどの分析物が膜(脂質二重層など)の一方の側から他方へ流れるように好ましくはする。膜貫通タンパク質ポアは、DNAまたはRNAなどのポリヌクレオチドがポアを通して移動されることを可能にする。

【0310】

膜貫通タンパク質ポアは、単量体またはオリゴマーであってよい。ポアは、いくつかの反復サブユニット(6、7、8または9サブユニット)から好ましくは作られる。ポアは好ましくは六量体、七量体、八量体または九量体ポアである。

【0311】

膜貫通タンパク質ポアは、イオンが通って流れることができるバレルまたはチャネルを典型的には含む。ポアのサブユニットは、典型的には中央軸を取り囲み、膜貫通バレルもしくはチャネルまたは膜貫通ヘリックス束もしくはチャネルに鎖を供する。

【0312】

膜貫通タンパク質ポアのバレルまたはチャネルは、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸などの分析物との相互作用を促進するアミノ酸を典型的には含む。これらのアミノ酸は、バレルまたはチャネルの狭窄部付近に好ましくは位置する。膜貫通タンパク質ポアは、アルギニン、リシンもしくはヒスチジンなどの1つもしくは複数の正に荷電したアミノ酸またはチロシンもしくはトリプトファンなどの芳香族アミノ酸を典型的には含む。これらのアミノ酸は、ポアとヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸との間の相互作用を典型的には促進する。

【0313】

本発明による使用のための膜貫通タンパク質ポアは、
- バレルポアまたは
- ヘリックス束ポアから生じ得る。
- バレルポアは、
- 鎖から形成されるバレルまたはチャネルを含む。好適な
- バレルポアは、これだけに限らないが、
- ヘモリジン (hemolysin)、炭疽毒素およびロイコシジン (leukocidin) などの
- 毒素、スメグマ菌 (Mycobacterium smegmatis) ポリン (porin) (M s p)、例えば M s p A、M s p B、M s p C
または M s p D、外膜ポリン (porin) F (O m p F)、外膜ポリン (porin) G (O m p G)、外膜ホスホリパーゼ A およびナイセリア (Neisseria) オートトランスポーター
リポタンパク質 (N a l P) などの細菌の外膜タンパク質 / ポリン (porin) を含む。
-
ヘリックス束ポアは、
- ヘリックスから形成されたバレルまたはチャネルを含む。好適な
- ヘリックス束ポアは、これだけに限らないが内膜タンパク質ならびに、W Z A および C l y A 毒などの
外膜タンパク質を含む。膜貫通ポアは、M s p 由来または
- ヘモリジン (- H L) 由来である場合がある。

【0314】

膜貫通タンパク質ポアは、好ましくは M s p に由来し、好ましくは M s p A に由来する。そのようなポアはオリゴマーであり、典型的には M s p 由来の 7、8、9 または 10 個の単量体を含む。ポアは、同一の単量体を含む M s p 由来のホモオリゴマーポアであってよい。代替的にポアは、少なくとも 1 個の他とは異なる単量体を含む M s p 由来のヘテロオリゴマーポアであってもよい。好ましくはポアは、M s p A またはその相同体もしくはパラログ由来である。

【0315】

M s p 由来の単量体は典型的には、配列番号 2 に示す配列またはその変種を含む。配列番号 2 は M s p A 単量体の M S - (B 1) 8 変異体である。それは次の変異：D 9 0 N、D 9 1 N、D 9 3 N、D 1 1 8 R、D 1 3 4 R および E 1 3 9 K を含む。配列番号 2 の変種は、配列番号 2 のものから変化し、ポアを形成する能力を保持しているアミノ酸配列を有するポリペプチドである。ポアを形成する変種の能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてアッセイされ得る。例えば変種は、他の適切なサブユニットと共に両親媒性層に挿入されることができ、ポアを形成するためにオリゴマー化するその能力は測定され得る。サブユニットを両親媒性層などの膜に挿入するための方法は、当技術分野において公知である。例えばサブユニットは、脂質二重層に拡散し、脂質二重層に結合するステップおよび機能的状態に会合するステップによって挿入されるように脂質二重層を含有する溶液中に精製された形態で懸濁され得る。代替的にサブユニットは、M.A.Holden, H.B.ayley, J.Am.Chem.Soc.2005、127、6502-6503 および国際出願第 P C T / G B 2 0 0 6 / 0 0 1 0 5 7 号 (W O 2 0 0 6 / 1 0 0 4 8 4 として公開) に記載の「ピックアッププレス」法を用いて膜に直接挿入され得る。

【0316】

配列番号 2 のアミノ酸配列の全長にわたって変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも 50 % 相同である。より好ましくは変種は、配列全体にわたっ

10

20

30

40

50

て配列番号2のアミノ酸配列にアミノ酸同一性に基づいて少なくとも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%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同である。少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性が100以上(例えば125、150、175もしくは200またはそれ以上)のストレッチの連続アミノ酸にわたってある場合がある(「高い相同性」)。

【0317】

相同性を決定するために当技術分野における標準的方法が用いられ得る。例えばUWGC Gパッケージは、相同性を算出するために用いられ得るBESTFITプログラム(例えばその初期設定で用いられる)を提供する(Devereuxら、(1984) Nucleic Acids Research 12、387-395頁)。PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは、相同性を算出するためまたは配列を列挙するために(等価残基または対応する配列を同定するステップなど(典型的にはその初期設定で))用いられ得る、例えばAltschul S.F.(1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S.F.ら、(1990) J Mol Biol 215:403-10に記載のとおり。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、the National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて公開で入手可能である。

【0318】

配列番号2は、MspA単量体のMS-(B1)8変異体である。変種は、MspAと比較してMspB、CまたはD単量体中の任意の変異を含み得る。MspB、CおよびDの成熟形態は配列番号5から7に示される。詳細には変種は、MspBに存在する次の置換:A138Pを含む場合がある。変種は、MspCに存在する次の置換:A96G、N102EおよびA138Pの1つまたは複数を含む場合がある。変種はMspDに存在する次の置換:G1の欠失、L2V、E5Q、L8V、D13G、W21A、D22E、K47T、I49H、I68V、D91G、A96Q、N102D、S103T、V104I、S136KおよびG141Aの1つまたは複数を含む場合がある。変種は、MspB、CおよびD由来の1つまたは複数の変異および置換の組合せを含み得る。変種は、好ましくは変異L88Nを含む。配列番号2の変種は、MS-B1の全変異に加えて変異L88Nを有し、MS-(B2)8と称される。本発明において用いられるポアは、好ましくはMS-(B2)8である。配列番号2の変種は変異G75S/G77S/L88N/Q126RをMS-B1の全ての変異に加えて含み、MS-B2Cと称される。本発明において使用されるポアは、好ましくはMS-(B2)8またはMS-(B2C)8である。

【0319】

アミノ酸置換は、上に考察したものに加えて配列番号2のアミノ酸配列に作出され得る(例えば1、2、3、4、5、10、20または30置換まで)。保存的置換は、アミノ酸を同様の化学構造、同様の化学的特性または同様の側鎖容積を有する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同様の極性、親水性、疎水性、塩基性度、酸性度、中性度または電荷を有してよい。代替的に保存的置換は、既存の芳香族または脂肪族アミノ酸の代わりに芳香族または脂肪族である別のアミノ酸を導入する場合がある。保存的アミノ酸変更は、当技術分野において周知であり、下の表8に定義のとおり20種の主なアミノ酸の特性に従って選択され得る。アミノ酸が同様の極性を有する場合、これは表9におけるアミノ酸側鎖についてのハイドロパシースケールを参照することによっても決定され得る。

【0320】

【表 8】

表8-アミノ酸の化学的特性

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

10

20

【 0 3 2 1 】

【表 9】

表9-ハイドロパシースケール

側鎖	ハイドロパシー
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

30

40

【 0 3 2 2 】

配列番号 2 のアミノ酸配列の 1 つまたは複数のアミノ酸残基は、上に記載のポリペプチドから追加的に欠失され得る。1、2、3、4、5、10、20または30残基までまたはそれ以上が欠失され得る。

【 0 3 2 3 】

変種は、配列番号 2 の断片を含み得る。そのような断片は、ポア形成活性を保持する。

50

断片は、長さ少なくとも50、100、150または200アミノ酸であってよい。そのような断片は、ポアを生成するために用いられ得る。断片は、配列番号2のポア形成ドメインを好ましくは含む。断片は、配列番号2の残基88、90、91、105、118および134の1つを含まなければならない。典型的には断片は、配列番号2の残基88、90、91、105、118および134の全てを含む。

【0324】

1つまたは複数のアミノ酸は、上に記載のポリペプチドに代替的または追加的に付加され得る。伸長は、配列番号2のアミノ酸配列またはそのポリペプチド変種もしくは断片のアミノ末端またはカルボキシ末端に与えられ得る。伸長は極めて短い（例えば長さ1から10アミノ酸）場合がある。代替的に伸長はより長くても（例えば50または100アミノ酸まで）よい。担体タンパク質は、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、下により詳細に考察される。

10

【0325】

上に考察したとおり変種は、配列番号2から変更され、ポアを形成する能力を保持しているアミノ酸配列を有するポリペプチドである。変種は、ポア形成に關与する配列番号2の領域を典型的には含有する。 - バレルを含有するM s pのポア形成能力は、各サブユニットのシートによって与えられる。配列番号2の変種は、 - シートを形成する配列番号2中の領域を典型的には含む。1つまたは複数の修飾が、得られる変種がポアを形成する能力を保持する限り、 - シートを形成する配列番号2の領域に作出され得る。配列番号2の変種は、置換、付加または欠失などの1つまたは複数の修飾を - ヘリックスおよび/またはループ領域内に好ましくは含む。

20

【0326】

M s p由来の単量体は、それらの同定または精製を支援するために、例えばヒスチジン残基（histタグ）、アスパラギン酸残基（aspタグ）、ストレプトアビジンタグもしくはフラッグタグの付加によって、または（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ポリペプチドが天然でそのような配列を含有しない場合に）修飾され得る。遺伝子タグを導入するための別法は、ポア上の天然のまたは操作された位置にタグを化学的に反応させることである。この例は、ポアの外側に操作されたシステインにゲルシフト試薬を反応させることである。これは、ヘモリジンヘテロ - オリゴマーを分離するステップのための方法として実証されている（Chem Biol.1997 Jul;4(7):497-505）。

30

【0327】

M s p由来の単量体は、明示標識（revealing label）で標識され得る。明示標識は、ポアが検出されるようにする任意の好適な標識であってよい。好適な標識は、上に記載されている。

【0328】

M s p由来の単量体は、D - アミノ酸を用いても生成され得る。例えばM s p由来の単量体は、L - アミノ酸とD - アミノ酸との混合物を含み得る。これは、そのようなタンパク質またはペプチドを生成するための当技術分野における従来法である。

【0329】

M s p由来の単量体は、ヌクレオチド識別を促進するために1つまたは複数の特異的修飾を含有する。M s p由来の単量体は、他の非特異的な修飾をそれらがポア形成を干渉しない限り含有できる。多数の非特異的側鎖修飾が当技術分野において公知であり、M s p由来の単量体の側鎖に作出され得る。そのような修飾は、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的アルキル化、メチルアセトイミデート（methylacetimidate）でのアミジン化または無水酢酸でのアシル化を含む。

40

【0330】

M s p由来の単量体は、当技術分野において公知の標準的方法を用いて生成され得る。M s p由来の単量体は、合成的にまたは組換え手段によって作出され得る。例えばポアはin vitro翻訳および転写（IVTT）によって合成され得る。ポアを生成するた

50

めの好適な方法は、国際出願第PCT/GB09/001690号(WO2010/004273として公開)、第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)または第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)に考察されている。ポアを膜に挿入するための方法は考察されている。

【0331】

膜貫通タンパク質ポアは、好ましくは -ヘモリジン(-HL)由来でもある。野生型 -HLポアは、7個の同一単量体またはサブユニットから形成される(すなわち七量体である)。 -ヘモリジン -NNの1個の単量体またはサブユニットの配列は配列番号4に示されている。膜貫通タンパク質ポアは、配列番号4に示す配列またはその変種をそれぞれ含む7個の単量体を好ましくは含む。配列番号4のアミノ酸1、7から21、31から34、45から51、63から66、72、92から97、104から111、124から136、149から153、160から164、173から206、210から213、217、218、223から228、236から242、262から265、272から274、287から290および294はループ領域を形成する。配列番号4の残基113および147は -HLのバレルまたはチャネルの狭窄の一部を形成する。

【0332】

そのような実施形態では、配列番号4に示す配列またはその変種をそれぞれ含む7個のタンパク質または単量体を含むポアは、本発明の方法において好ましくは用いられる。7個のタンパク質は、同じ(ホモ七量体)または異なっていて(ヘテロ七量体)よい。

【0333】

配列番号4の変種は、配列番号4のものから変化したアミノ酸配列を有し、ポア形成能力を保持しているタンパク質である。ポアを形成する変種の能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてアッセイされ得る。例えば変種は、他の適切なサブユニットと共に脂質二重層などの両親媒性層に挿入されることができ、ポアを形成するためにオリゴマー化するその能力は決定され得る。サブユニットを脂質二重層などの両親媒性層に挿入するための方法は当技術分野において公知である。好適な方法は上に考察されている。

【0334】

変種は、構築物への共有結合付着または相互作用を促進する修飾を含み得る。変種は、構築物への付着を促進する1つまたは複数の反応性システイン残基を好ましくは含む。例えば変種は、配列番号4の位置8、9、17、18、19、44、45、50、51、237、239および287ならびに/またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端の1つまたは複数のシステインを含み得る。好ましい変種は、配列番号4の位置8、9、17、237、239および287の残基のシステインでの置換を含む(A8C、T9C、N17C、K237C、S239CまたはE287C)。変種は、好ましくは国際出願第PCT/GB09/001690号(WO2010/004273として公開)、第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)、または第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)に記載の変種のいずれか1つである。

【0335】

変種は、ヌクレオチドとの任意の相互作用を促進する修飾も含み得る。

【0336】

変種は、生物(例えば細菌ブドウ球菌(Staphylococcus))によって天然で発現される天然に存在する変種であってよい。代替的に変種は、大腸菌(Escherichia coli)などの細菌によって*in vitro*でまたは組換え的に発現されてもよい。変種は、組換え技術によって生成される天然に存在しない変種も含む。配列番号4のアミノ酸配列の全長にわたって変種は、アミノ酸同一性に基づいてその配列に好ましくは少なくとも50%相同である。より好ましくは変種ポリペプチドは、配列全体にわたって配列番号4のアミノ酸配列にアミノ酸同一性に基づいて少なくとも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%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同である。

少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性が200以上(例えば230、250、270もしくは280またはそれ以上)のストレッチの連続アミノ酸にわたってある場合がある(「高い相同性」)。相同性は上に考察のとおり決定され得る。

【0337】

アミノ酸置換は、上に考察したものに加えて配列番号4のアミノ酸配列に作出され得る(例えば1、2、3、4、5、10、20または30置換まで)。保存的置換は、上に考察の通り作出され得る。

【0338】

配列番号4のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸残基は、上に記載のポリペプチドから追加的に欠失され得る。1、2、3、4、5、10、20または30残基までまたはそれ以上が欠失され得る。

【0339】

変種は、配列番号4の断片であり得る。そのような断片はポア形成能力を保持する。断片は、長さ少なくとも50、100、200または250アミノ酸であってよい。断片は、配列番号4のポア形成ドメインを好ましくは含む。断片は典型的には配列番号4の残基119、121、135、113および139を含む。

【0340】

1つまたは複数のアミノ酸は、上に記載のポリペプチドに代替的にまたは追加的に付加され得る。伸長は、配列番号4のアミノ酸配列またはその変種もしくは断片のアミノ末端またはカルボキシ末端に与えられ得る。伸長は極めて短い(例えば長さ1から10アミノ酸)場合がある。代替的に伸長は、より長くても(例えば50または100アミノ酸まで)良い。担体タンパク質は、ポアまたは変種に融合されてもよい。

【0341】

上に考察したとおり、配列番号4の変種は、配列番号4のものから変更され、ポアを形成する能力を保持しているアミノ酸配列を有するサブユニットである。変種は、ポア形成に関与する配列番号4の領域を典型的には含有する。 - バレルを含有する - HLのポア形成能力は、各サブユニットのシートによって与えられる。配列番号4の変種は、鎖を形成する配列番号4の領域を典型的には含む。鎖を形成する配列番号4のアミノ酸は上に考察されている。1つまたは複数の修飾が、得られる変種がポアを形成する能力を保持する限り - 鎖を形成する配列番号4の領域に作出され得る。配列番号4の鎖領域に作られ得る具体的な修飾は、上に考察されている。

【0342】

配列番号4の変種は、置換、付加または欠失などの1つまたは複数の修飾を - ヘリックスおよび/またはループ領域内に好ましくは含む。 - ヘリックスおよびループを形成するアミノ酸は、上に考察されている。

【0343】

変種は、上に考察のとおり、その同定または精製を支援するために修飾され得る。

【0344】

- HL由来のポアは、Msp由来のポアに関連して上に考察のとおり作出され得る。

【0345】

いくつかの実施形態では膜貫通タンパク質ポアは、化学的に修飾される。ポアは、任意の方法および任意の部位で化学的に修飾され得る。膜貫通タンパク質ポアは、1つもしくは複数のシステインへの分子の付着(システイン連結)、1つもしくは複数のリシンへの分子の付着、1つもしくは複数の非天然アミノ酸への分子の付着、エピトープの酵素修飾または末端の修飾によって好ましくは化学的に修飾される。そのような修飾を実行するための好適な方法は、当技術分野において周知である。膜貫通タンパク質ポアは、任意の分子の付着によって化学的に修飾され得る。例えばポアは、色素またはフルオロフォアの付着によって化学的に修飾され得る。

【0346】

ポア中の任意の数の単量体は、化学的に修飾され得る。1つまたは複数(2、3、4、5、6、7、8、9または10個など)の単量体は、上に考察のとおり好ましくは化学的に修飾される。

【0347】

システイン残基の反応性は、隣接残基の修飾によって増強され得る。例えば近接アルギニン、ヒスチジンまたはリシ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 S^- 基のものに変化させる。システイン残基の反応性は、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、リンカーが付着する前にポアの1つまたは複数のシステイン残基と反応できる。

【0348】

(ポアが化学的に修飾される)分子は、国際出願第PCT/GB09/001690号(WO2010/004273として公開)、第PCT/GB09/001679号(WO2010/004265として公開)または第PCT/GB10/000133号(WO2010/086603として公開)に開示のとおりポアに直接付着され得るか、またはリンカーを介して付着され得る。

【0349】

構築物は、ポアに共有結合的に付着されていてもよい。構築物は、好ましくはポアに共有結合的に付着されていない。ポアおよび構築物への電圧の印加は、典型的には標的ポリヌクレオチドを配列決定できるセンサーの形成を生じる。これは、下により詳細に考察される。

【0350】

本明細書に記載の任意のタンパク質、すなわち膜貫通タンパク質ポアまたは構築物は、それらの同定または精製を支援するために、例えばヒスチジン残基(hisタグ)、アスパラギン酸残基(asnタグ)、ストレプトアビジンタグ、フラッグタグ、SUMOタグ、GSTタグもしくはMBPタグの付加によって、または、それらの細胞からの分泌を促進するために(ポリペプチドが天然でそのような配列を含有していない場合に)シグナル配列の付加によって修飾され得る。遺伝子タグを導入するための別法は、ポアまたは構築物上の天然のまたは操作された位置にタグを化学的に反応させることである。この例は、ポアの外側の操作されたシステインにゲルシフト試薬を反応させることである。これは、ヘモリジンヘテロ-オリゴマーを分離するステップのための方法として実証されている(Chem Biol.1997 Jul;4(7):497-505)。

【0351】

ポアおよび/または構築物は明示標識(revealing label)で標識され得る。明示標識は、ポアが検出されるようにする任意の好適な標識であってよい。好適な標識は、これだけに限らないが蛍光分子、放射性同位元素(例えば ^{125}I 、 ^{35}S)、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチドおよびリガンド(ビオチンなど)を含む。

【0352】

タンパク質は、合成的にまたは組換え手段によって作出され得る。例えばポアおよび/または構築物は、*in vitro*翻訳および転写(IVTT)によって合成され得る。ポアおよび/または構築物のアミノ酸配列は、天然に存在しないアミノ酸を含むようにまたはタンパク質の安定性を増大させるように修飾され得る。タンパク質が合成的手段によって生成される場合、そのようなアミノ酸は、生成の際に導入され得る。ポアおよび/または構築物は、合成的にまたは組換え生成のいずれかに続いて変更され得る。

【0353】

ポアおよび/または構築物は、D-アミノ酸を用いても生成し得る。例えばポアまたは構築物は、L-アミノ酸とD-アミノ酸との混合物を含み得る。これは、そのようなタンパク質またはペプチドを生成するための当技術分野における従来法である。

【0354】

ポアおよび/または構築物は、他の非特異的修飾もそれらがポア形成または構築物機能を干渉しない限り含有できる。多数の非特異的側鎖修飾が当技術分野において公知であり

10

20

30

40

50

、タンパク質（複数可）の側鎖に作出され得る。そのような修飾は、例えばアルデヒドとの反応に続く NaBH_4 での還元によるアミノ酸の還元的アルキル化、メチルアセトイミデート（methyllacetimidate）でのアミジン化または無水酢酸でのアシル化を含む。

【0355】

ポアおよび構築物は、当技術分野において公知の標準的方法を用いて生成され得る。ポアまたは構築物をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を用いて得られ、複製され得る。ポアまたは構築物をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的技術を用いて細菌宿主細胞において発現され得る。ポアおよび/または構築物は、組換え発現ベクターからのポリペプチドの原位置での発現によって細胞において生成され得る。場合により発現ベクターは、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保持する。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, NY に記載されている。

10

【0356】

ポアおよび/または構築物は、大規模に生成されることができ、タンパク質生成生物または組換え発現からの任意のタンパク質液体クロマトグラフィー系による精製が続く。典型的なタンパク質液体クロマトグラフィー系は、FPLC、AKTA systems、Bio-Cad system、Bio-Rad BioLogic system および Gilson HPLC system を含む。

【0357】

20

本発明の方法は、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を測定するステップを含む。方法は、標的ポリヌクレオチドの2つ、3つ、4つまたは5つ以上の特性を測定するステップを含み得る。1つまたは複数の特性は、好ましくは (i) 標的ポリヌクレオチドの長さ、(ii) 標的ポリヌクレオチドの同一性、(iii) 標的ポリヌクレオチドの配列、(iv) 標的ポリヌクレオチドの二次構造および (v) 標的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。(i) から (v) の任意の組合せは本発明により測定され得る。

【0358】

(i) に関して、ポリヌクレオチドの長さは、例えば標的ポリヌクレオチドとポアとの間の相互作用の数または標的ポリヌクレオチドとポアとの間の相互作用の持続時間を測定することによって測定され得る。

30

【0359】

(ii) に関して、ポリヌクレオチドの同一性は、多数の方法において測定され得る。ポリヌクレオチドの同一性は、標的ポリヌクレオチドの配列の測定を伴ってまたは標的ポリヌクレオチドの配列の測定を伴わずに測定され得る。前者は、簡単であり、ポリヌクレオチドは配列決定され、それにより同定される。後者は、いくつかの方法で行われ得る。例えばポリヌクレオチド中の具体的なモチーフの存在は (ポリヌクレオチドの残りの配列を測定するステップを伴わずに) 測定され得る。代替的に、方法における具体的な電気的および/または光学的シグナルの測定は、標的ポリヌクレオチドを具体的な供給源由来であるとして同定できる。

40

【0360】

(iii) に関して、ポリヌクレオチドの配列は、以前記載されたとおり決定され得る。好適な配列決定方法、詳細には電気的測定を用いるものは、Stoddart Dら、Proc Natl Acad Sci, 12;106(19):7702-7、Lieberman KRら、J Am Chem Soc. 2010;132(50):17961-72 および国際出願第 WO 2000/28312 号に記載されている。

【0361】

(iv) に関して、二次構造は、種々の方法において測定され得る。例えば方法が電気的測定を含む場合、二次構造は残存時間における変化またはポアを通して流れる電流における変化を用いて測定され得る。これは、1本鎖と2本鎖のポリヌクレオチドの領域を区別できるようにする。

50

【 0 3 6 2 】

(v) に関して、任意の修飾の存在または非存在は、測定され得る。方法は、好ましくは標的ポリヌクレオチドが、メチル化によって、酸化によって、損傷によって、1つまたは複数のタンパク質でまたは1つまたは複数の標識、タグもしくはスパーサーで修飾されているかどうかを決定するステップを含む。具体的な修飾は、下に記載の方法を用いて測定され得るポアとの特異的な相互作用を生じる。例えばメチルシトシンは、各ヌクレオチドとのその相互作用の際にポアを通して流れる電流に基づいてシトシンから区別され得る。

【 0 3 6 3 】

種々の異なる種類の測定が作出されてよい。これは、非限定的に：電気的測定および光学的測定を含む。可能性のある電気的測定は、電流測定：インピーダンス測定、トンネル測定 (Ivanov APら、Nano Lett.2011 Jan 12;11(1):279-85) および F E T 測定 (国際出願第 W O 2 0 0 5 / 1 2 4 8 8 8 号) を含む。光学的測定は、電気的測定 (Soni GVら、Rev Sci Instrum. 2010 Jan;81(1):014301) と組み合わせられ得る。測定は、ポアを通して流れるイオン電流の測定などの膜貫通電流測定であってよい。

【 0 3 6 4 】

電気的測定は、Stoddart Dら、Proc Natl Acad Sci、12;106(19):7702-7、Lieberman K Rら、J Am Chem Soc.2010;132(50):17961-72および国際出願第 W O - 2 0 0 0 / 2 8 3 1 2 号に記載の標準的単一チャネル記録機器を用いて作出され得る。代替的に電気的測定は、例えば国際出願第 W O - 2 0 0 9 / 0 7 7 7 3 4 号および国際出願第 W O - 2 0 1 1 / 0 6 7 5 5 9 号に記載のマルチチャネル系を用いても作出され得る。

【 0 3 6 5 】

好ましい実施形態では、方法は、
(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアおよび本明細書に記載の構築物と、標的ポリヌクレオチドがポアを通して移動し、構築物がポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させるステップ、ならびに
(b) ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときにポアを通る電流を測定するステップであって、電流が標的ポリヌクレオチドの特性の1つまたは複数を示し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含む。

【 0 3 6 6 】

方法は、ポアが膜内に存在している膜 / ポア系を調べるのに好適である任意の装置を用いて実行され得る。方法は、膜貫通ポアセンシングに好適である任意の装置を用いて実行され得る。例えば装置は、水性溶液および、チャンバーを2つのセクションに分離する障壁を含むチャンバーを含む。障壁は典型的にはポアを含有する膜が形成される開口部を有する。代替的に障壁は、ポアが存在する膜を形成する。

【 0 3 6 7 】

方法は、国際出願第 P C T / G B 0 8 / 0 0 0 5 6 2 号 (W O 2 0 0 8 / 1 0 2 1 2 0) に記載の装置を用いて実行され得る。

【 0 3 6 8 】

方法は、ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときにポアを通る電流を測定するステップを含んでよい。したがって装置は、電位を印加でき、膜およびポアを通る電気シグナルを測定できる電気回路も含む。方法は、パッチクランプまたは電圧クランプを用いても実行され得る。方法は、電圧クランプの使用を好ましくは含む。

【 0 3 6 9 】

本発明の方法は、ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときにポアを通過する電流の測定を含み得る。膜貫通タンパク質ポアを通るイオン電流を測定するための好適な条件は、当技術分野において公知であり、実施例で開示される。方法は、膜およびポア全体に印加される電圧と共に典型的には実行される。用いられる電圧は典型的には、+ 2 V から - 2 V まで、典型的には - 4 0 0 m V から + 4 0 0 m V までである。好ましくは用いられ

る電圧は、 -400 mV 、 -300 mV 、 -200 mV 、 -150 mV 、 -100 mV 、 -50 mV 、 -20 mV および 0 mV から選択される下限値および $+10\text{ mV}$ 、 $+20\text{ mV}$ 、 $+50\text{ mV}$ 、 $+100\text{ mV}$ 、 $+150\text{ mV}$ 、 $+200\text{ mV}$ 、 $+300\text{ mV}$ および $+400\text{ mV}$ から独立に選択される上限値を含む範囲内である。用いられる電圧は、より好ましくは 100 mV から 240 mV までの範囲内、最も好ましくは 120 mV から 220 mV までの範囲内である。印加される電位を増加させることによってポアによるさまざまなヌクレオチド間の識別を向上させることは可能である。

【0370】

方法は、金属塩（例えばアルカリ金属塩）、ハロゲン化塩（例えばアルカリ金属塩化物塩などの塩化物塩）などの任意の電荷担体の存在下で典型的には実行される。電荷担体は、イオン液体または有機塩、例えばテトラメチル塩化アンモニウム、トリメチルフェニル塩化アンモニウム、フェニルトリメチル塩化アンモニウムもしくは1-エチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド(1-ethyl-3-methyl imidazolium chloride)を含み得る。上に考察した例示的装置では、塩はチャンバー中の水性溶液中に存在する。塩化カリウム(KCl)、塩化ナトリウム(NaCl)、塩化セシウム(CsCl)また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は使用される。 KCl 、 NaCl およ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は好ましい。塩濃度は飽和であってよい。塩濃度は、 3 M 以下があり得、典型的には 0.1 から 2.5 M まで、 0.3 から 1.9 M まで、 0.5 から 1.8 M まで、 0.7 から 1.7 M まで、 0.9 から 1.6 M までまたは 1 M から 1.4 M までである。塩濃度は、好ましくは 150 mM から 1 M までである。 Hel308 、 XPD 、 RecD および TraI ヘリカーゼは、高塩濃度下で驚くべきことに作用する。方法は、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 または少なくとも 3.0 M などの少なくとも 0.3 M の塩濃度を用いて好ましくは実行される。高塩濃度は、高い信号対雑音比を提供し、通常の電流変動のバックグラウンドに対してヌクレオチドの存在を示す電流が同定されることを可能にする。

【0371】

方法は、緩衝剤の存在下で典型的には実行される。上に考察した例示的装置では、緩衝剤はチャンバー中の水性溶液に存在する。任意の緩衝剤が本発明の方法において用いられ得る。典型的には、緩衝剤は HEPES である。別の好適な緩衝剤は Tris-HCl 緩衝剤である。方法は、 4.0 から 12.0 まで、 4.5 から 10.0 まで、 5.0 から 9.0 まで、 5.5 から 8.8 まで、 6.0 から 8.7 までまたは 7.0 から 8.8 までまたは 7.5 から 8.5 までの pH で典型的には実行される。用いられる pH は好ましくは約 7.5 である。

【0372】

方法は、 0°C から 100°C まで、 15°C から 95°C まで、 16°C から 90°C まで、 17°C から 85°C まで、 18°C から 80°C まで、 19°C から 70°C までまたは 20°C から 60°C までで実行され得る。方法は典型的には室温で実行される。方法は、約 37 などの酵素機能を支持する温度で場合により実行される。

【0373】

方法は、遊離ヌクレオチドまたは遊離ヌクレオチド類似物および/または構築物の作用を促進する酵素補因子の存在下で実行されてもよい。方法は、遊離ヌクレオチドまたは遊離ヌクレオチド類似物の非存在下および酵素補因子の非存在下で実行されてもよい。遊離ヌクレオチドは、上に考察した個々のヌクレオチドの任意の1つまたは複数であってよい。遊離ヌクレオチドは、これだけに限らないがアデノシンーリン酸(AMP)、アデノシンニリン酸(ADP)、アデノシン三リン酸(ATP)、グアノシンーリン酸(GMP)、グアノシンニリン酸(GDP)、グアノシン三リン酸(GTP)、チミジンーリン酸(TMP)、チミジンニリン酸(TDP)、チミジン三リン酸(TTP)、ウリジンーリン酸(UMP)、ウリジンニリン酸(UDP)、ウリジン三リン酸(UTP)、シチジン

ーリン酸 (C M P)、シチジンニリン酸 (C D P)、シチジン三リン酸 (C T P)、環状アデノシンーリン酸 (c A M P)、環状グアノシンーリン酸 (c G M P)、デオキシアデノシンーリン酸 (d A M P)、デオキシアデノシンニリン酸 (d A D P)、デオキシアデノシン三リン酸 (d A T P)、デオキシグアノシンーリン酸 (d G M P)、デオキシグアノシンニリン酸 (d G D P)、デオキシグアノシン三リン酸 (d G T P)、デオキシチミジンーリン酸 (d T M P)、デオキシチミジンニリン酸 (d T D P)、デオキシチミジン三リン酸 (d T T P)、デオキシウリジンーリン酸 (d U M P)、デオキシウリジンニリン酸 (d U D P)、デオキシウリジン三リン酸 (d U T P)、デオキシシチジンーリン酸 (d C M P)、デオキシシチジンニリン酸 (d C D P) およびデオキシシチジン三リン酸 (d C T P) を含む。遊離ヌクレオチドは、好ましくは A M P、T M P、G M P、C M P、U M P、d A M P、d T M P、d G M P または d C M P から選択される。遊離ヌクレオチドは、好ましくはアデノシン三リン酸 (A T P) である。酵素補因子は、構築物を機能させる因子である。酵素補因子は、好ましくは二価金属カチオンである。二価金属カチオンは好ましくは Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} または Co^{2+} である。酵素補因子は、最も好ましくは Mg^{2+} である。

【 0 3 7 4 】

標的ポリヌクレオチドは、構築物およびポアと任意の順序で接触され得る。標的ポリヌクレオチドが構築物およびポアと接触される場合、標的ポリヌクレオチドは最初に構築物と複合体を形成することは好ましい。ポアに電圧が印加される場合、標的ポリヌクレオチド / 構築物複合体は次いでポアと複合体を形成し、ポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御する。

【 0 3 7 5 】

上に考察したとおり、ヘリカーゼは、ポアに関して2つのモードで作動できる。そのようなヘリカーゼを含む本明細書に記載の構築物は、2つのモードでも作動できる。第一に、方法は、印加された電圧から生じる場に沿ってポアを通して標的配列を移動させるように構築物を用いて好ましくは実行される。このモードでは、DNAの5'末端が最初にポアに捕捉され、標的配列が最終的に二重層の *t r a n s* 側に移行されるまで場に沿ってポアを通るように構築物は、DNAをポア中に移動させる。代替的に、方法は、印加された電圧から生じる場とは反対に構築物が標的配列をポアを通して移動させるように好ましくは実行される。このモードでは、DNAの3'末端が最初にポアに捕捉され、構築物は、標的配列が最終的に二重層の *c i s* 側に戻って放されるまで印加された場とは反対にポアの外側へ引かれるようにDNAをポアを通して移動させる。

【 0 3 7 6 】

他の方法

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーの形成方法も提供する。方法は、ポアと本明細書に記載の構築物との複合体を形成するステップを含む。複合体は、ポアと構築物とを標的ポリヌクレオチドの存在下で接触させ、次いで、ポアに電位を印加するステップによって形成され得る。印加される電位は、上に記載のとおり化学電位または電圧電位であってよい。代替的に複合体は、ポアを構築物に共有結合的に付着するステップによっても形成され得る。共有結合付着のための方法は、当技術分野において公知であり、例えば国際出願第 P C T / G B 0 9 / 0 0 1 6 7 9 号 (W O 2 0 1 0 / 0 0 4 2 6 5 として公開) および第 P C T / G B 1 0 / 0 0 0 1 3 3 号 (W O 2 0 1 0 / 0 8 6 6 0 3 として公開) において開示されている。複合体は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーである。方法は、M s p 由来のポアと本明細書に記載の構築物との複合体を形成するステップを好ましくは含む。本発明の方法を参照して上に考察した任意の実施形態は、この方法に等しく適用される。本発明は、本発明の方法を使用して産生されるセンサーも提供する。

【 0 3 7 7 】

キット

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキットも提供する。キットは、

(a) ポアおよび (b) 本明細書に記載の構築物を含む。本発明の方法に関連して上に考察された任意の実施形態は、キットに等しく適用する。

【0378】

キットは、脂質二重層などの両親媒性層を形成するために必要なリン脂質などの膜の構成成分をさらに含んでよい。

【0379】

本発明のキットは、上に述べた任意の実施形態が実行されるようにする1つまたは複数の他の試薬または器具を追加的に含んでよい。そのような試薬または器具は、次の：好適な緩衝剤（複数可）（水性溶液）、対象から試料を得るための手段（容器もしくは、針を含む器具など）、ポリヌクレオチドを増幅および／もしくは発現するための手段、上に定義の膜または電圧もしくはパッチクランプ装置、の1つまたは複数を含む。試薬は、液体試料が試薬を再懸濁するように乾燥状態でキット中に存在する場合がある。キットは、キットが本発明の方法において用いられ得るようにする説明書、またはいずれの患者に方法が用いられ得るかに関する詳細も場合により含む場合がある。キットは、場合によりヌクレオチドを含み得る。

【0380】

装置

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特性決定するための装置も提供する。装置は、複数のポアおよび複数の本明細書に記載の構築物を含む。装置は、本発明の方法を実行するための説明書を好ましくはさらに含む。装置は、アレイまたはチップなどのポリヌクレオチド分析のための任意の従来装置であってよい。本発明の方法に関連して上に考察された任意の実施形態は、本発明の装置に等しく適用可能である。

【0381】

装置は、本発明の方法を実行するために好ましくはセットアップされている。

【0382】

装置は、好ましくは：

複数のポアを支持でき、ポアおよび構築物を用いてポリヌクレオチド特性決定を実施するために作動可能であるセンサーデバイス；ならびに
特性決定を実施するための材料を保持するための少なくとも1つのリザーバー；
を含む。

【0383】

装置は、好ましくは：

膜および複数のポアを支持でき、ポアおよび構築物を用いてポリヌクレオチド特性決定を実施するために作動可能であるセンサーデバイス；
特性決定を実施するための材料を保持するための少なくとも1つのリザーバー；
少なくとも1つのリザーバーからセンサーデバイスに材料を制御可能に供給するように構成された流体系；および
各試料を受けるための1つまたは複数の容器を含み、
流体系は、1つまたは複数の容器からセンサーデバイスに試料を選択的に供給するように構成されている。装置は、国際出願第PCT/GB08/004127号（WO2009/077734として公開）、第PCT/GB10/000789号（WO2010/122293として公開）、国際出願第PCT/GB10/002206号（未公開）または国際出願第PCT/US99/25679号（WO00/28312として公開）において記載の任意のものであってよい。

【0384】

本発明の構築物を産生する方法

本発明は、本発明の構築物を産生する方法も提供する。一実施形態では方法は、2つ以上のヘリカーゼを付着するステップ、好ましくは共有結合で付着するステップを含む。別の実施形態では方法は、ヘリカーゼを、配列番号94または配列番号94の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号94に少なくとも80%相同性を有するその変

種を含むアミノ酸配列に付着させる、好ましくは共有結合で付着させ、それにより構築物を産生するステップを含む。上に考察した任意のヘリカーゼが方法において使用できる。付着の部位および方法は上に考察したとおり選択される。

【0385】

方法は、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御できるかどうかを決定するステップをさらに含んでもよい。これを行うためのアッセイは、上に記載されている。ポリヌクレオチドの移動が制御され得る場合、ヘリカーゼは正しく付着され、本発明の構築物が産生されている。ポリヌクレオチドの移動が制御され得ない場合、本発明の構築物は産生されていない。

【0386】

次の実施例は本発明を例示する。

実施例

【実施例1】

【0387】

本実施例および続く全ての実施例では、ビスマレイミド官能性PEGリンカーはそれらの分子量を参照して同定される。例えば「2kDa」、「2kDaリンカー」または「2kDa PEGリンカー」は2kDaの分子量を有するビスマレイミド官能性PEGリンカーを指す。

【0388】

本実施例は、He1308Mbu(R687A/A700C)-2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異R687A/A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)およびHe1308Mbu(R681A/R687A/A700C)-2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異R681A/R687A/A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)の合成する方法を記載する。これらの二量体の場合にはA700Cは、二量体タンパク質(Mbu/R687A A700C-2kDa PEGリンカー-A700C Mbu/R687AおよびMbu/R681A/R687A A700C-2kDa PEGリンカー-A700C Mbu/R681A/R687A)においてリンカーへの接続として役立つ追加変異である。He1308Mbu(配列番号10)中には天然でシステイン5個が存在するが、これらはあまり反応性ではなく、したがって反応はほとんどA700C上が中心である。

【0389】

DTTをHe1308Mbu R687A/A700C(2mg/mL)(変異R687A/A700Cを有する配列番号10)に5mMで添加し、30分間ローテータに置いた。還元したタンパク質を100mMリン酸カリウム、500mM NaCl、5mM EDTA、0.1% tween 20、pH 7.2に緩衝液交換した。30塩基長ssDNA(配列番号68)をヘリカーゼ(10倍過剰)に内部システインを保護するために添加し、タンパク質が安定のままである可能性を増大させる。タンパク質/DNA溶液を緩衝液で1.5mg/mLに希釈し、窒素雰囲気下に置き、室温、30分間インキュベートした。0.016mMビスマレイミド-PEG(2kDa)を添加し、反応を室温、窒素雰囲気下で2時間進行させた。10mM DTTを反応をクエンチするために添加し、いかなるジスルフィド架橋分子種も壊した。He1308Mbu(R687A/A700C)-2kDa変異体二量体をDNAおよび試薬を除去するために初回Strep-tactinステップ、続いて溶液中に存在する全ての他の分子種から二量体を分離するためにアニオン交換クロマトグラフィーステップを使用して直ちに精製した。

【0390】

AKTA精製装置を精製のために使用した。ストレップ(Strep)精製を1mL StrepTactin Sepharose High Performanceカラムで実施した。タンパク質溶液をカラムに添加する前に結合緩衝液(50mM Tris

10

20

30

40

50

、500mM NaCl、2mM EDTA、2mM DTT、0.05% tween 20、pH 8.0)に緩衝液交換した。全ての未結合材料を除去するための初回洗浄ステップ後、緩衝液中の10mMデスチオビオチンで溶出する前にタンパク質からDNAを解離するためにタンパク質を2M塩を含有する同じ緩衝液で洗浄した。二量体と溶液中に存在する全ての他の分子種との分離用に調製するために、溶出されたタンパク質をLOW緩衝液(50mM Tris、80mM NaCl、2mM DTT、0.05% tween 20、pH 8.0)に緩衝液交換した。イオン交換ステップをGE Mini Q PC 3.2/3カラム、流速0.4mL/分、LOWからHIGH緩衝液(50mM Tris、2M NaCl、2mM DTT、0.05% tween 20、pH 8.0)でのグラジエントで実施した。溶出された二量体ピークの開始時、中央および終了時を別々にプールし、別々のID番号を付けた。中央ピークを電気生理学での検査に使用する前に3つ全てを活性アッセイした。図1は、Hel308Mbu(R687A/A700C)単量体(変異R687A/A700Cを有する配列番号10、レーン2)およびHel308Mbu(R687A/A700C)-2kDa二量体(レーン4)のゲルを示す。上記手順はHel308Mbu(R681A/R687A/A700C)単量体(変異R681A/R687A/A700Cを有する配列番号10、図1、レーン3)からHel308Mbu(R681A/R687A/A700C)-2kDa二量体(図1、レーン5)を形成するために使用できる。

【実施例2】

【0391】

本実施例は、Hel308Mhu多量体(配列番号19複数単位)を合成する方法を記載する。Hel308Mhu(配列番号19)に追加的変異は無く、そのためWTに含有されるシステインは、連結のための部位として使用される。

【0392】

DTTをHel308Mhu(1.83mg/mL)(配列番号19)に10mMで添加し、30分間ローテータに置いた。還元したタンパク質を100mMリン酸カリウム、500mM NaCl、5mM EDTA、0.1% tween 20、pH 7.2に緩衝液交換した。30塩基長ssDNA(配列番号68)をヘリカーゼ(6倍過剰)に内部システインを保護するために添加し、タンパク質が安定のままである可能性を増大させる。タンパク質/DNA溶液を緩衝液で1.6mg/mLに希釈し、窒素雰囲気下に置き、室温、30分間インキュベートした。0.0095mMビスマレイミド-PEG(2kDa)を添加し、反応を室温、窒素雰囲気下で2時間進行させた。10mM DTTを反応をクエンチするために添加し、いかなるジスルフィド架橋分子種も壊した。Hel308Mhu多量体をDNAおよび試薬を除去するために初回Strep-tactinステップ、続いて溶液中に存在する全ての他の分子種から単量体を除去するためにアニオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーステップを使用して直ちに精製した。

【0393】

AKTA精製装置を精製のために使用した。ストレップ精製を5mL StrepTactin Sepharose High Performanceカラムで実施した。タンパク質溶液をカラムに添加する前に結合緩衝液(50mM Tris、500mM NaCl、0.1% tween 20、pH 8.0)に緩衝液交換した。全ての未結合材料を除去するための初回洗浄ステップ後、緩衝液中の10mMデスチオビオチンで溶出する前にタンパク質からDNAを解離するためにタンパク質を2M NaClを含有する同じ緩衝液で洗浄した。二量体と溶液中に存在する全ての他の分子種との分離用に調製するために、溶出されたタンパク質をLOW緩衝液(50mM Tris、80mM NaCl、2mM DTT、0.05% tween 20、pH 8.0)に緩衝液交換した。イオン交換ステップをGE Mono Q 5/50GLカラム、流速1mL/分、LOWからHIGH緩衝液(50mM Tris、2M NaCl、2mM DTT、0.05% tween 20、pH 8.0)でのグラジエントで実施した。溶出されたピークをアニオン交換によって同じカラムで3回さらに精製した。最後の精製ステップから回収した溶出ピ

ークを回収し、0.25 mLに濃縮し、緩衝液を50 mM Tris、500 mM NaCl、2 mM DTT、pH 8.0に交換し、Superdex (商標) 10/300 GLカラムでのゲルろ過によって精製した。最終タンパク質は、単量体：二量体：三量体：多量体 (ONT Ref-ONLP4454) の比がおよそ1：1：1：1であった。図2は、Hel308 Mhu多量体試料 (レーン2) のゲルを示す。

【実施例3】

【0394】

本実施例は、Hel308 Tga (R657A/N674C) - 2 kDa二量体 (ここで各単量体単位は変異R657A/N674Cを有する配列番号16を含み、1つの単量体単位は2 kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置674を介して連結されている) を合成する方法を記載する。この二量体の場合N674Cは、二量体タンパク質 (Tga N674C - 2 kDa PEGリンカー - N674C Tga) においてリンカーへの接続として役立つ追加変異である。

【0395】

DTTをHel308 Tga (R657A/N674C) (2 mg/mL) (ここで各単量体単位は変異R657A/N674Cを有する配列番号16を含み、1つの単量体単位は2 kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置674を介して他に連結されている) に10 mMで添加し、30分間ローテータに置いた。還元したタンパク質を100 mMリン酸カリウム、500 mM NaCl、5 mM EDTA、0.1% tween 20、pH 7.2に緩衝液交換した。30塩基長ssDNA (配列番号68) をヘリカーゼに添加し、タンパク質が安定のままである可能性を増大させる。タンパク質/DNA溶液を緩衝液で1.6 mg/mLに希釈し、窒素雰囲気下に置き、室温、30分間インキュベートした。0.038 mMビスマレイミド-PEG (2 kDa) を添加し、反応を23℃、窒素雰囲気下で2.5時間進行させた。10 mM DTTを反応をクエンチするために添加し、いかなるジスルフィド架橋分子種も壊した。Hel308 Tga (R657A/N674C) 変異体二量体をDNAおよび試薬を除去するために初回Strep-tactinステップ、続いて溶液中に存在する全ての他の分子種から二量体を分離するためにアニオン交換クロマトグラフィーステップを使用して直ちに精製した。

【0396】

AKTA精製装置を精製のために使用した。ストレップ精製を5 mL StrepTactin Sepharose High Performanceカラムで実施した。タンパク質溶液をカラムに添加する前に結合緩衝液 (50 mM Tris、200 mM NaCl、1 mM MgCl₂、2 mM DTT、0.05% tween 20、pH 8.0) に緩衝液交換した。全ての未結合材料を除去するための初回洗浄ステップ後、緩衝液中の10 mMデスチオピオチンで溶出する前にタンパク質からDNAを解離するためにタンパク質を4 mM ATPを含有する同じ緩衝液で洗浄した。溶出されたタンパク質を0.25 mLに濃縮し、50 mM Tris、250 mM NaCl、2 mM DTT、1 mM MgCl₂、0.05% tween 20、pH 8.0に緩衝液交換し、Superdex (商標) 10/300 GLカラムでのゲルろ過により精製した。図3は、Hel308 Tga (R657A/N674C) - 2 kDa二量体および単量体の形成および精製の際の種々の段階でのゲルを示す (レーン1 = タンパク質ラダー、レーン2 = Hel308 Tga (R657A/N674C) - 2 kDa二量体加熱処置後、レーン3 = Hel308 Tga (R657A/N674C) - 2 kDa二量体 (ここで各単量体単位は変異R657A/N674Cを有する配列番号16を含み、1つの単量体単位は2 kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置674を介して他に連結されている)、レーン4 = strep溶出、レーン5 = 初期反応混合物およびレーン6 = Hel308 Tga (R657A/N674C) 単量体 (変異R657A/N674Cを有する配列番号16))。

【実施例4】

【0397】

本実施例は、蛍光に基づくアッセイを使用して種々のH e l 3 0 8 M b uヘリカーゼ構築物のDNA結合能力をH e l 3 0 8 M b u単量体（配列番号10）のものと比較する。

【0398】

通例の蛍光基質を1本鎖DNAに結合する種々のヘリカーゼの能力をアッセイするために使用した。88nt1本鎖DNA基質（最終1nM、配列番号69）は、その5'末端にカルボキシフルオレセイン（FAM）塩基を有する。ヘリカーゼが緩衝溶液（400mM NaCl、10mM Hepes、pH8.0、1mM MgCl₂）中のオリゴヌクレオチドに結合することから、蛍光偏光（溶液中のオリゴヌクレオチドの自由回転の速度に関連する特性）は増大する。偏光を増大させるために必要なヘリカーゼの量が少ないほど、DNAとヘリカーゼとの間の結合親和性は強い（図4）。図5～8は、種々のH e l 3 0 8 (M b u) 構築物の量を増加させてDNAオリゴヌクレオチド（配列番号69、その5'末端にカルボキシフルオレセイン塩基を有する）の偏光における変化を示す。検査した全ての構築物は、単量体よりも低い濃度で偏光における増大を示す。検査した構築物は：

1. H e l 3 0 8 M b u A 7 0 0 C 2 k D a 二量体（各単量体単位は変異A 7 0 0 Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2 k D a P E G リンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されているヘリカーゼ二量体）、
2. H e l 3 0 8 M b u - G T G S G A - (H h H) 2（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はリンカー配列G T G S G Aによってヘリックス-ヘアピン-ヘリックス（H h H 2）ドメイン（配列番号75）に付着されている）、
3. H e l 3 0 8 M b u - G T G S G A - (H h H) 2 - (H h H) 2（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はリンカー配列G T G S G Aによって（H h H）2 - （H h H）2ドメイン（配列番号76）に付着されており、H h Hはヘリックス-ヘアピン-ヘリックスドメインである）、
4. H e l 3 0 8 M b u - G T G S G A - U L 4 2 H V 1 - I 3 2 0 D e l（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はリンカー配列G T G S G Aによって前進性因子U L 4 2 H V 1 - I 3 2 0 D e l（配列番号63）に付着されている）、
5. H e l 3 0 8 M b u - G T G S G A - g p 3 2 R B 6 9 C D（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はリンカー配列G T G S G AによってS S B g p 3 2 R B 6 9 C D（配列番号64）に付着されている）、
6. H e l 3 0 8 M b u - G T G S G A - g p 2 . 5 T 7 - R 2 1 1 D e l（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はリンカー配列G T G S G AによってS S B g p 2 . 5 T 7 - R 2 1 1 D e l（配列番号65）に付着されている）および
7. (g p 3 2 R B 6 9 C D) - H e l 3 0 8 M b u（ここでS S B g p 3 2 R B 6 9 C D（配列番号64）はリンカー配列G T G S G Tによってヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）に付着されている）。

である。

【0399】

図9は、Graphpad Prismソフトウェアを使用して図5～8に示すデータを二相解離結合曲線にフィットすることを通じて得られた種々のH e l 3 0 8 (M b u) 構築物についての相対平衡解離定数（K_d）（H e l 3 0 8 M b u単量体（配列番号10）に対して）を示す。付着した追加的結合ドメインを有するヘリカーゼ構築物の全ては、H e l 3 0 8 M b u単量体（配列番号10）単独よりも低い平衡解離定数を示す。したがって追加的結合構築物を有するH e l 3 0 8 M b uヘリカーゼは、全てH e l 3 0 8 M b u単量体よりもDNAにより強い結合を示す。

【実施例5】

【0400】

本実施例は、ナノポアを通るインタクトなDNA鎖（400塩基長）の移動を制御するH e l 3 0 8 M b u単量体（配列番号10）の能力をH e l 3 0 8 M b u A 7 0 0 C 2 k D a二量体（ここで各単量体単位は変異A 7 0 0 Cを有する配列番号10を含み、1

つの単量体単位は2 kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)のものと比較する。単量体による制御されたDNA移行のための一般的な方法を図10に、二量体によるものを図11に示す。

【0401】

材料および方法

400塩基長DNA配列:

プライマーをPhiX174の約400bp断片を増幅するために設計した。これらのプライマーの各5'末端は50ヌクレオチド非相補性領域、同種重合体ストレッチまたは10ヌクレオチド同種重合体セクションの反復単位のいずれかを含んだ。これらは、ナノポアを通る鎖の制御された移行についての識別子として役立ち、移行の方向を決定する。付加的にフォワードプライマーの5'末端は4個の2'-O-メチル-ウラシル(mU)ヌクレオチドを含んで「キャップ」され、リバースプライマーの5'末端は化学的にホスホリル化された。次いでこれらのプライマー修飾は、ラムダエキソヌクレアーゼを使用するアンチセンス鎖だけの優先的な制御された消化を可能にする。mUキャッピングはセンス鎖をヌクレアーゼ消化から保護する一方で、アンチセンス鎖の5'のPO4はそれを促進する。したがってラムダエキソヌクレアーゼとのインキュベーション後に2本鎖のセンス鎖だけが、ここでは1本鎖DNA(ssDNA)としてインタクトのまま残る。作製したssDNAを次いで既に記載のとおりPAGE精製した。

【0402】

本明細書に記載の全ての実験において使用されるDNA基質設計を図12に示す。DNA基質は、ナノポアによる捕捉を助けるために50T 5'-リーダーに付着している4個の2'-O-メチルウラシル塩基を配列の5'末端に含むPhiX由来ssDNAの400塩基セクションからなる(配列番号70、配列番号70の5'末端にナノポアによる捕捉を助けるために50Tリーダー配列に付着している4個の2'-O-メチルウラシル塩基がある)。50Tリーダーの直後でこの鎖にアニールするのは、二重層の表面上のDNAを増やし、それにより捕捉効率を改善するための3'コレステロールTEG(配列番号71)を含有するプライマーである。

【0403】

緩衝溶液: 1M KCl、10mM HEPES pH8.0、1mM ATP、10mM MgCl₂、1mM DTT

ナノポア: 大腸菌(E. coli)MS(B1-L88N)8MspA(配列番号2、変異L88Nを有する)

単量体酵素: Hel308Mbu(配列番号10)最終100nMで添加

二量体酵素: Hel308Mbu A700C 2kDaホモ二量体(ここで各単量体単位は変異A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)最終10nMで添加

【0404】

1,2-ジフィタノイル-グリセロ-3-ホスホコリン脂質(Avantil Polar Lipids)二重層に挿入された単一のMspAナノポアから電気計測値を得た。二重層は、モンタル-ミューラー技術によって開口部直径約100μm、厚さ20μmのPTFEフィルム(Delrin chambers注文生産)で形成され、2個の1mL緩衝溶液に分けた。全ての実験は、上記の緩衝溶液中で実行した。単一チャンネル電流を1440Aデジタイザーを備えたAxopatch 200B amplifiers(Molecular Devices)で測定した。Ag/AgCl電極を緩衝溶液に繋ぎ、cisコンパートメント(ナノポアおよび酵素/DNAの両方が添加されている)をAxopatch headstageのアースに繋ぎ、transコンパートメントをheadstageの探查電極に繋ぐ。

【0405】

二重層中に単一ポアを達成後、DTT(1mM)およびMgCl₂をcisチャンバー

に添加し、十分に混合した。次いでDNA構築物およびヘリカーゼを緩衝液100 uLに添加し、5分間予備インキュベートした(DNA = 1.5 nM (配列番号70および71 (3' コレステロールTEGを有する))、単量体酵素 = 1 uMまたは二量体酵素 = 0.1 uM)。この予備インキュベーション混合物をMspAナノポア中でのヘリカーゼ-DNA複合体の捕捉を開始するために電気生理学チャンバーのcisコンパートメント中の緩衝液900 uLに添加した(最終濃度、DNA = 0.15 nM、単量体酵素 = 0.1 uMまたは二量体酵素 = 0.01 uMをもたらす)。ヘリカーゼATPase活性を必要に応じてcisコンパートメントへのdNTP (最終ATP 1 mM) の付加によって開始した。実験は、+120 mVの一定電位で実行した。

【0406】

10

結果および考察

図13に示すとおり、ヘリカーゼ-単量体DNA基質のMspAナノポア(図10に示す)への添加は、特徴的電流遮断を生じる。所与の基質について本発明者らは、各ヘリカーゼ制御DNA移動に関してDNA配列を反映する特徴的な電流遷移のパターンを観察した。ヘリカーゼが結合していないDNAは、ナノポアと一過的に相互作用し、電流において一時的な遮断をもたらす(<1秒間)。結合し、活性な(すなわちATPase作用の下でDNA鎖に沿って移動する)Hel308Mbu単量体(配列番号10)を有するDNAは、図13に示すとおり電流における段階的变化を伴う長い特徴的な遮断レベルを生じる。ナノポア中の異なるDNAモチーフは、特有の電流遮断レベルを生じる。

【0407】

20

MspAナノポア(図11に示す)へのヘリカーゼ二量体-DNA基質の添加は、図14に示す特徴的な電流遮断を生じる。結合し、活性な(すなわちATPase作用の下でDNA鎖に沿って移動する)Hel308Mbu A700C 2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)を有するDNAは、図14に示すとおり電流における段階的变化を伴う長い特徴的な遮断レベルを生じる。二量体の10分の1濃度を使用することも可能であり、これらの特徴的な電流遮断をまだ観察できる。

【0408】

Hel308Mbu単量体(配列番号10)がポアを通る400塩基長DNA鎖の移行を制御する場合に産生される電流遮断は、Hel308Mbu A700C 2kDa二量体(ここで各単量体単位は変異A700Cを有する配列番号10を含み、1つの単量体単位は2kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置700を介して他に連結されている)によって産生されるものに類似している。しかし、2回の実験(同一条件下で単量体Hel308MbuまたはHel308Mbu A700C 2kDa二量体のいずれかで実行する)についてヘリカーゼ制御鎖移動の全長を比較する場合、二量体でのヘリカーゼ制御DNA移動(図16)は典型的には単量体(図15)によって観察されるものよりも長い。これは、酵素再結合を示し、したがって酵素解離を低減する。付加的に単量体実行について測定したヘリカーゼ制御DNA移動の37%がDNA鎖の末端のポリTに達した一方で、二量体実行について測定したヘリカーゼ制御DNA移動の47%がポリTに達し、二量体の解離の低減および前進性の改善を示している。図8および9は、DNA運動がHel308Mbu単量体(図17)またはHel308Mbu A700C 2kDa二量体(図18)のいずれかによって制御されている場合の状態指数(横軸)の関数としての鎖移動についての状態フィットデータの公知のDNA配列における位置(縦軸)の6例をそれぞれ示す。単量体データは、酵素解離およびトレイル酵素に出会うまで印加された場の下でDNAが逆戻りした結果である配列の先行部分への周期的な後退転位(破線円で強調)を含む、配列を通じた前進性直線移動を示す。ヘリカーゼ制御DNA移動の多数は、酵素解離のために配列の末端までたどり着けない。一方二量体データについては、酵素はより長くDNAの移動を制御し続け、解離後に酵素はDNAに再結合する。

30

40

50

【実施例 6】

【0409】

本実施例は、実施例 5 において考察の $\text{He1308Mb u A700C 2kDa}$ ホモ二量体と比較して異なるアミノ酸位置を介して繋がれており、異なる長さのリンカー (2 kb および 3.4 kb リンカー) を有する 2 つの異なる He1308Mb u ホモ二量体が、ナノポアを通るインタクトな DNA 鎖 (400 塩基長) の移動を制御できたことを示す。二量体による制御された DNA 移行のための一般的方法を図 11 に示す。

【0410】

緩衝溶液: 400 mM KCl、10 mM Hepes pH 8.0、1 mM ATP、1 mM MgCl_2 、1 mM DTT

ナノポア: 大腸菌 (*E. coli*) MS (B1-L88N) 8MspA (変異 L88N を有する配列番号 2)

二量体酵素: $\text{He1308Mb u Q442C 2kDa}$ リンカーホモ二量体 (ここで各単量体単位は変異 Q442C を有する配列番号 10 を含み、1 つの単量体単位は 2 kDa PEG リンカーを使用して各単量体単位の位置 442 を介して他に連結されている) はおよそ最終 1 nM で添加、 $\text{He1308Mb u Q442C 3.4kDa}$ リンカーホモ二量体 (ここで各単量体単位は変異 Q442C を有する配列番号 10 を含み、1 つの単量体単位は 3.4 kDa PEG リンカーを使用して各単量体単位の位置 442 を介して他に連結されている) は最終およそ 1 nM で添加。

【0411】

電気的実験を脂質二重層中に挿入された単一ポアを達成するために実施例 5 に記載のとおり設定した。二重層中に単一ポアを達成した後、DTT (1 mM) および MgCl_2 (1 mM) を cis チャンバーに添加し、十分に混合した。次いで DNA ポリヌクレオチド配列番号 70 および 71 (3' コレステロール TEG を有する) ($\text{DNA} = 0.15 \text{ nM}$)、ATP (1 mM) および $\text{He1308Mb u Q442C 2kDa}$ リンカーホモ二量体または $\text{He1308Mb u Q442C 3.4kDa}$ リンカーホモ二量体のいずれかを MspA ナノポア中でのヘリカーゼ-DNA 複合体の捕捉を開始するために電気生理化学チャンバーの cis コンパートメントに添加した。実験は、+180 mV の一定電位で実行した。

【0412】

結果および考察

MspA ナノポアを通る DNA 基質移行を制御するための $\text{He1308Mb u Q442C 2kDa}$ リンカーホモ二量体 (ここで各単量体単位は変異 Q442C を有する配列番号 10 を含み、1 つの単量体単位は 2 kDa PEG リンカーを使用して各単量体単位の位置 442 を介して他に連結されている) ヘリカーゼの使用は、図 19 A に示す特徴的な電流遮断を生じる。所与の基質について本発明者らは、各ヘリカーゼ制御 DNA 移動に関して DNA 配列を反映する特徴的な電流遷移のパターンを観察する。ヘリカーゼが結合していない DNA は、ナノポアと一過的に相互作用し、電流において一時的な遮断をもたらす (< 1 秒間)。結合し、活性な (すなわち ATPase 作用の下で DNA 鎖に沿って移動する) ヘリカーゼ二量体を有する DNA は、図 19 A に示すとおり電流における段階的变化を伴う長い特徴的な遮断レベルを生じる。ナノポア中の異なる DNA モチーフは、特有の電流遮断レベルを生じる。MspA ナノポアを通る DNA 移動を制御するための $\text{He1308Mb u Q442C 3.4kDa}$ リンカーホモ二量体ヘリカーゼ (ここで各単量体単位は変異 Q442C を有する配列番号 10 を含み、1 つの単量体単位は 3.4 kDa PEG リンカーを使用して各単量体単位の位置 442 を介して他に連結されている) の使用も、図 19 B に示す特徴的な電流遮断を生じる。これは、2 つのヘリカーゼを 2 つの異なるリンカー長を使用して異なる位置で互いに付着させ、酵素活性を保持できることを例示する。

【実施例 7】

【0413】

本実施例は、C末端に融合された追加的結合ドメインを有するヘリカーゼを使用する、ナノポアを通るヘリカーゼ制御DNA移動を示す。示す2つの例は、C末端に遺伝子的に融合されたHe1308 H1a（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はHe1308 H1a（配列番号66）の第5ドメインに付着されている）またはHe1308 Hvo（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はHe1308 Hvo（配列番号67）の第5ドメインに付着されている）由来の追加的第5ドメインを含むHe1308 Mbuである。

【0414】

緩衝溶液：400mM NaCl、10mM Hepes pH8.0、1mM ATP、1mM MgCl₂、1mM DTT

ナノポア：大腸菌（E. coli）MS（B1-L88N）MspA（変異L88Nを有する配列番号2）

二量体酵素：He1308 Mbu + He1308 H1a第5ドメイン（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はHe1308 H1a（配列番号66）の第5ドメインに付着されている）は最終100nMで添加され、He1308 Mbu + He1308 Hvo第5ドメイン（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はHe1308 Hvo（配列番号67）の第5ドメインに付着されている）は最終100nMで添加される。

【0415】

電気的実験を脂質二重層中に挿入された単一ポアを達成するために実施例5に記載のとおり設定した。二重層中に単一ポアを達成した後、DTT（1mM）およびMgCl₂（1mM）をcisチャンパーに添加し、十分に混合した。+140mVでの対照記録を5分間実行した。次いでDNAポリヌクレオチド配列番号70および71（3'コレステロールTEGを有する）（DNA = 0.6nM）および、He1308 Mbu + He1308 H1a第5ドメイン（100nM、ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はHe1308 H1a（配列番号66）の第5ドメインに付着されている）またはHe1308 Mbu + He1308 Hvo第5ドメイン（100nM、ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はHe1308 Hvo（配列番号67）の第5ドメインに付着されている）のいずれかをMspAナノポア中でのヘリカーゼ-DNA複合体の捕捉を開始するために電気生理学チャンパーのcisコンパートメントに添加した。+140mVでの第2の対照記録を10分間実行した。最終的にヘリカーゼATPase活性を必要に応じてcisコンパートメントへのATP（1mM）の添加によって開始した。実験は、+140mVの一定電位で実行した。

【0416】

結果および考察

MspAナノポアを通るDNA基質移行を制御するためのHe1308 Mbu + He1308 H1aヘリカーゼ第5ドメイン（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）はHe1308 H1a（配列番号66）の第5ドメインに付着されている）の使用は、図20Aに示す特徴的な電流遮断を生じる。所与の基質について本発明者らは、各ヘリカーゼ制御DNA移動に関してDNA配列を反映する特徴的な電流遷移のパターンを観察した。ヘリカーゼが結合していないDNAは、ナノポアと一過的に相互作用し、電流において一時的な遮断をもたらす（<1秒間）。結合し、活性な（すなわちATPase作用の下でDNA鎖に沿って移動する）He1308 Mbu + He1308 H1aヘリカーゼ第5ドメインを有するDNAは、図20Aに示すとおり電流における段階的变化を伴う長い特徴的な遮断レベルを生じる。ナノポア中の異なるDNAモチーフは、特有の電流遮断レベルを生じる。MspAナノポアを通るDNA移動を制御するためのHe1308 Mbu + He1308 Hvoヘリカーゼ（ここでヘリカーゼ単量体単位（配列番号10）第5ドメインはHe1308 Hvo（配列番号67）の第5ドメインに付着されている）の使用も、図20Bに示す特徴的な電流遮断を生じる。これは、ヘリカーゼの追加的結合ドメインを別のヘリカーゼに付着させ、酵素活性を保持できることを例示する。

【実施例 8】

【0417】

本実施例は、付着した追加的ヘリックス - ヘアピン - ヘリックス (HhH) ドメインを有するヘリカーゼを使用して、ナノポアを通るヘリカーゼ制御 DNA 移動を示す。示される 2 例は 2 個または 4 個いずれかのヘリックス - ヘアピン - ヘリックスドメインが C 末端に付着している He1308Mbu である。

【0418】

材料および方法

50 - ポリ T5' リーダーを PhiX dsDNA の約 900 塩基断片にライゲーションすることによって、DNA を形成した。リーダーは、DNA が二重層に挿入されるようにするために配列番号 74 (配列の 3' 末端に 2 個のチミン残基に付着している 6 個の iSp18 スペースおよび 3' コレステロール TEG を有する) がハイブリダイズされた相補性セクションも含有する。最終的に ACGT の 4 nt 3' - オーバーハングを得るために PhiX dsDNA の 3' 末端を AatII 消化酵素で消化した (DNA 基質設計の図に関して図 21 を参照されたい)。

【0419】

緩衝溶液: 400 mM NaCl、100 mM Hepes pH 8.0、10 mM フェロシアン化カリウム、10 mM フェリシアン化カリウム、1 mM ATP、1 mM MgCl₂、

ナノポア: 大腸菌 (E. coli) MS (B1 - G75S - G77S - L88N - Q126R) 8MspA (変異 G75S / G77S / L88N / Q126R を有する配列番号 2)

二量体酵素: He1308Mbu - GTGSGA - (HhH)₂ (ここでヘリカーゼ単量体単位 (配列番号 10) はリンカー配列 GTGSGA によって HhH2 ドメイン (配列番号 75) に付着されている) 最終 100 nM で添加、および He1308Mbu - GTGSGA - (HhH)₂ - (HhH)₂ (ここでヘリカーゼ単量体単位 (配列番号 10) はリンカー配列 GTGSGA によって (HhH)₂ - (HhH)₂ ドメイン (配列番号 76) に付着されている) 最終 100 nM で添加。

【0420】

電気的実験を脂質二重層中に挿入された単一ポアを達成するために実施例 5 に記載のとおりだが、白金電極を Ag / AgCl 電極の代わりに使用して設定した。二重層中に単一ポアを達成した後、MgCl₂ (1 mM) および ATP (1 mM) をチャンバーに添加した。+140 mV での対照記録を 5 分間実行した。次いで DNA ポリヌクレオチド配列番号 72、73 および 74 (配列の 3' 末端に 2 個のチミン残基に付着している 6 個の iSp18 スペースおよび 3' コレステロール TEG を有する) (DNA = 0.1 nM) を電気生理化学チャンバーの cis コンパートメントに添加し、DNA 移行事象を観察した。最後に He1308Mbu - GTGSGA - (HhH)₂ (100 nM、ここでヘリカーゼ単量体単位 (配列番号 10) はリンカー配列 GTGSGA によって HhH2 ドメイン (配列番号 75) に付着されている) または He1308Mbu - GTGSGA - (HhH)₂ - (HhH)₂ (100 nM、ここでヘリカーゼ単量体単位 (配列番号 10) はリンカー配列 GTGSGA によって (HhH)₂ - (HhH)₂ ドメイン (配列番号 76) に付着されている) のいずれかを MspA ナノポア中でのヘリカーゼ - DNA 複合体の捕捉を開始するために電気生理化学チャンバーの cis コンパートメントに添加した。実験は、+140 mV の一定電位で実行した。

【0421】

結果および考察

MspA ナノポアを通る DNA 基質移行を制御するための He1308Mbu - GTGSGA - (HhH)₂ (ここでヘリカーゼ単量体単位 (配列番号 10) はリンカー配列 GTGSGA によって HhH2 ドメイン (配列番号 75) に付着されている) の使用は、図 22A に示す特徴的な電流遮断を生じる。所与の基質について本発明者らは、各ヘリカー

10

20

30

40

50

ゼ制御DNA移動に関してDNA配列を反映する特徴的な電流遷移のパターンを観察した。ヘリカーゼが結合していないDNAは、ナノポアと一過的に相互作用し、電流において一時的な遮断をもたらす(<<1秒間)。結合し、活性な(すなわちATPase作用の下でDNA鎖に沿って移動する)Hel308MbU-GTGS GA-(HhH)2を有するDNAは、図22Aに示すとおり電流における段階的变化を伴う長い特徴的な遮断レベルを生じる。ナノポア中の異なるDNAモチーフは、特有の電流遮断レベルを生じる。MspAナノポアを通るDNA移動を制御するためのHel308MbU-GTGS GA-(HhH)2-(HhH)2(ここでヘリカーゼ単量体単位(配列番号10)はリンカー配列GTGS GAによって(HhH)2-(HhH)2ドメイン(配列番号76)に付着されている)の使用も、図22Bに示す特徴的な電流遮断を生じる。これは、ヘリカーゼに追加的ヘリックス-ヘアピン-ヘリックスドメインを付着させ、酵素活性を保持できることを例示する。

【実施例9】

【0422】

本実施例は、ナノポアを通るインタクトなDNA鎖(配列番号88の5'末端に付着しているのは28個のiSpC3スパーサー単位であり、その最後はスパーサー基の5'末端に付着している2つの追加的T'を有する、配列番号88の3'末端に付着しているは配列番号104の5'末端に付着されているさらに4個のiSpC3スパーサーである)の移動を制御するTrwC Cba単量体(配列番号87)の能力を、TrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)のものと比較する。二量体は、単量体よりも高い百分率のヘリカーゼ制御DNA移動の長い滞留(移動の長い滞留は、ヘリカーゼ制御DNA移動の主な集団での平均から3標準偏差を超えて離れているヘリカーゼ制御DNA移動である)を生じる。

【0423】

材料および方法

実験を設定する前に、DNA(1nM、配列番号88の5'末端に付着しているのは28個のiSpC3スパーサー単位であり、その最後はスパーサー基の5'末端に付着している2つの追加的T'を有する、配列番号88の3'末端に付着しているは配列番号104の5'末端に付着されているさらに4個のiSpC3スパーサーである)および酵素(TrwC Cba単量体(1nM、配列番号87)またはTrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体(0.3nM、ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)のいずれか)を合わせて>16時間予備インキュベートした。

【0424】

緩衝液(625mM KCl、100mM Hepes、75mMフェロシアン化カリウム(II)、25mMフェリシアン化カリウム(III)、pH8)中のブロック共重合体に挿入された単一MspAナノポアMS(G75S/G77S/L88N/D90N/D91N/D93N/D118R/Q126R/D134R/E139K)8MspA(変異G75S/G77S/L88N/D90N/D91N/D93N/D118R/Q126R/D134R/E139Kを有する配列番号2)から電気測定値を得た。MgCl₂(10mM)およびdTTP(5mM)を緩衝液(625mM KCl、100mM Hepes、75mMフェロシアン化カリウム(II)、25mMフェリシアン化カリウム(III)、pH8)と一緒に混合し、次いでDNA(配列番号88の5'末端に付着しているのは28個のiSpC3スパーサー単位であり、その最後はスパーサー基の5'末端に付着している2つの追加的T'を有する、配列番号88の3'末端に付着しているのは配列番号104の5'末端に付着されているさらに4個のiSpC3スパーサーである)、酵素予備混合物(TrwC Cba単量体(1nM、配列番号87)またはTr

10

20

30

40

50

wC Cba Q276C-3.4kDa二量体(1nM、ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)と合わせて混合した。二重層中に単一ポアを達成した後、予備混合物を単一ナノポア実験系に添加した。実験は、+120mVの一定電位で実行し、ヘリカーゼ制御DNA移動をモニターした。

【0425】

結果および考察

ヘリカーゼ制御DNA移動をヘリカーゼTrwC Cba単量体(配列番号87)およびTrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)について観察した。観察したヘリカーゼ制御DNA移動について検出された移動のおよそ95%を占める主要な集団がある、しかし、滞留時間が顕著に長い(ヘリカーゼ制御DNA移動の主な集団での平均から3標準偏差を超えて離れている)移動のわずかな百分率がある。これらの長い移動は、データ分析の改善を可能にする。TrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体(1nM、ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)をDNA移動を制御するために使用した場合、これらのより長い滞留時間移動(ヘリカーゼ制御DNA移動の主な集団での平均から3標準偏差を超えて離れている)のより高い百分率(TrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体と比較して20%、およびTrwC Cba単量体に対して5%)が観察された。二量体ヘリカーゼの使用は、ナノポア配列決定系におけるデータ分析の改善を可能にすることから単量体を超える有利点を提供する。

【実施例10】

【0426】

本実施例は、酵素活性を検査するための蛍光アッセイを使用してTrwC Cba-TopoV Mka(ここでTrwC CbaはリンカーAYDVGAによって配列番号90に示すトポイソメラーゼV Mka全長配列のドメインH-Lに付着されている)の耐塩性を例示する。

【0427】

材料および方法

通例の蛍光基質をTrwC Cba-TopoV Mka(ここでTrwC CbaはリンカーAYDVGAによって配列番号90に示すトポイソメラーゼV Mka全長配列のドメインH-Lに付着されている)のハイブリダイズされたdsDNAを置換する能力をアッセイするために使用した。図23の1)に示すとおり、蛍光基質鎖(最終50nM)は3'および5'ssDNAオーバーハングの両方、ならびにハイブリダイズされたdsDNAの44塩基セクションを有する。3'ssDNAオーバーハングを含有する上部鎖は、5'末端にカルボキシフルオレセイン塩基(配列番号91において5と標識)を有し、ハイブリダイズした相補体は3'末端にブラックホールクエンチャー(BHQ-1)塩基(配列番号92において6と標識)を有する。ハイブリダイズされると、フルオレセインからの蛍光は局在BHQ-1によってクエンチされ、基質は実質的に非蛍光性である。蛍光基質の下鎖に部分的に相補的である捕捉鎖(配列番号93)1μMはアッセイに含まれる。2)に示すとおりATP(1mM)およびMgCl₂(1mM)の存在下で、基質に添加されたヘリカーゼ(100nM)は、蛍光基質の3'尾部に結合し、上部鎖に沿って移動し、相補鎖を置換する。3)に示すとおりBHQ-1を有する相補鎖が完全に置換されると主要な鎖の上のフルオレセインは蛍光を発する。4)に示すとおり置換された鎖は過剰量の捕捉鎖に優先的にアニールし、初期基質の再アニールおよび蛍光の消失を防ぐ。

【0428】

結果および考察

10

20

30

40

50

図24のグラフは、TrwC Cba単量体(図24においてAと標識;配列番号87)およびTrwC Cba-Topo V Mka(図24においてBと標識;ここでTrwC CbaはリンカーAYDVGAによって配列番号90に示すトポイソメラーゼV Mka全長配列のドメインH-Lに付着されている)についての緩衝液溶液(10mM Hepes pH8.0、1mM ATP、1mM MgCl₂、50nM 蛍光基質DNA(配列番号91および92)、1μM 捕捉DNA(配列番号93))中の400mMのNaClでの活性の初期速度を示す。調査した塩濃度では、TrwC Cba-Topo V Mka(ここでTrwC CbaはリンカーAYDVGAによって配列番号90に示すトポイソメラーゼV Mka全長配列のドメインH-Lに付着されている)はTrwC Cba単量体(配列番号87)よりも高いdsDNA代謝回転の速度を示した(図24を参照されたい)。

10

【実施例11】

【0429】

本実施例は、TrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)を合成する方法を記載する。

【0430】

材料および方法

DTTをTrwC Cba Q276C単量体(2mg/mL、ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含む)に10mMで添加し、30分間ローテータに置いた。還元したタンパク質を100mMリン酸カリウム、500mM NaCl、5mM EDTA、0.1% tween 20、pH7.2に緩衝液交換した。TrwC Cba Q276C単量体(2mg/mL)(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含む)を2mg/mLで添加した。ビスマレイミド-PEG(3.4kDa;0.038mM)を添加し、反応を23℃、窒素雰囲気下で2.5時間進行させた。DTT(10mM)を反応をクエンチするために添加し、いかなるジスルフィド架橋分子種も壊した。TrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)を試薬を除去するために初回Strep-tactinステップ、続いて溶液中に存在する全ての他の分子種から二量体を分離するためにGF-クロマトグラフィーステップを使用して直ちに精製した。

20

30

【0431】

AKTA精製装置を精製のために使用した。ストレップ精製を5mL StrepTactin Sepharose High Performanceカラムで実施した。タンパク質溶液をカラムに添加する前に結合緩衝液(50mM Tris、200mM NaCl、1mM MgCl₂、2mM DTT、0.05% tween 20、pH8.0)に緩衝液交換した。全ての未結合材料を除去するための初回洗浄ステップ後、それを緩衝液中の10mM デスチオビオチンで溶出した。溶出されたタンパク質を0.25mLに濃縮し、50mM Tris、250mM NaCl、2mM DTT、1mM MgCl₂、0.05% tween 20、pH8.0に緩衝液交換し、Superdex(商標)10/300 GLカラムでのゲルろ過により精製した。図25および26は、形成および精製の際の種々の段階でのTrwC Cba Q276C-3.4kDa二量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含み、1つの単量体単位は3.4kDa PEGリンカーを使用して各単量体単位の位置276を介して他に連結されている)およびTrwC Cba Q276C単量体(ここで各単量体単位は変異Q276Cを有する配列番号87を含む)のゲルを示す(図25-レーンM=タンパク質ラダー、レーン1=E3-Q276C単量体出発材料、レーン2=反応混合物、レーン3=反応混合物。図26-レーンM=タンパク質ラダー、レーンX=TrwC Cba Q27

40

50

6 C - 3 . 4 k D a 二量体についての参照レーン、レーン 4 ~ 1 4 は T r w C C b a Q 2 7 6 C - 3 . 4 k D a 二量体（ここで各単量体単位は変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 を含み、1 つの単量体単位は 3 . 4 k D a P E G リンカーを使用して各単量体単位の位置 2 7 6 を介して他に連結されている）の溶出物からの精製画分を含有する。T r w C C b a Q 2 7 6 C - 3 . 4 k D a 二量体（ここで各単量体単位は変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 を含み、1 つの単量体単位は 3 . 4 k D a P E G リンカーを使用して各単量体単位の位置 2 7 6 を介して他に連結されている）に対応するバンドを図 2 5 および 2 6 の両方において灰色矢印によって示す。

【 0 4 3 2 】

本実施例に記載のものと類似の手順を使用して、次の T r w C C b a Q 2 7 6 C - 1 k D a 二量体（ここで各単量体単位は変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 を含み、1 つの単量体単位は 1 k D a P E G リンカーを使用して各単量体単位の位置 2 7 6 を介して他に連結されている）を作製することができた。

【 実施例 1 2 】

【 0 4 3 3 】

本実施例は、H e l 3 0 8 M b u - A 5 7 7 F a z - P E G 4 リンカー - T r w C C b a Q 2 7 6 C 二量体（ここで H e l 3 0 8 M b u 単量体単位は、位置 5 7 7 のアミノ酸が 4 - アジド - L - フェニルアラニン（F a z）に変異されている配列番号 1 0 を含み、P E G 4 リンカーによって T r w C C b a 単量体単位、変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 に付着されており、リンカーは H e l 3 0 8 M b u 単量体上の位置 5 7 7 および T r w C C b a 上の位置 2 7 6 で各単量体に付着されている）を合成する方法を記載する。2 つの単量体単位に付着する方法の模式図を図 2 7 に示す。

【 0 4 3 4 】

材料および方法

D T T (1 0 m M) を T r w C C b a Q 2 7 6 C 単量体 (0 . 9 m g / m L 、 1 m L 、ここで各単量体単位は変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 を含む) に添加し、試料を室温に 1 時間置いた。T r w C C b a Q 2 7 6 C 単量体 (0 . 9 m g / m L 、ここで各単量体単位は変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 を含む) 試料の緩衝液交換を 1 0 0 m M T r i s 4 0 0 m M N a C l p H 7 . 5 中の 4 0 K Z e b a カラムを使用して二回実施した。M a l - P E G 4 - D B C O (5 0 0 μ M) を緩衝液交換された T r w C C b a Q 2 7 6 C 単量体 (0 . 9 m g / m L 、ここで各単量体単位は変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 を含む) に添加し、試料を室温に 3 時間置いた。T r w C C b a Q 2 7 6 C 単量体 (0 . 9 m g / m L 、ここで各単量体単位は変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7 を含む) M a l - P E G 4 - D B C O を次いで 4 0 K Z e b a カラムを使用して 1 0 0 m M T r i s 4 0 0 m M N a C l p H 7 . 5 に 2 回緩衝液交換した。H e l 3 0 8 M b u - A 5 7 7 F a z (1 . 1 m g / m L 、 1 m L 、ここで各単量体単位は変異 A 5 7 7 F a z を有する配列番号 1 0 を含む) を 4 0 K Z e b a カラムを使用して 1 0 0 m M T r i s 4 0 0 m M N a C l p H 7 . 5 に緩衝液交換した。2 つの緩衝液交換タンパク質を合わせて混合し、室温に 3 時間置いた。最終的に次の試料を 4 ~ 1 2 % ゲル (図 2 8 に示す) で実行した、レーン a) T r w C C b a - Q 2 7 6 C 単量体 (変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7) 、レーン b) H e l 3 0 8 M b u - A 5 7 7 F a z (ここで各単量体単位は変異 A 5 7 7 F a z を有する配列番号 1 0 を含む) 、レーン c) T r w C C b a - Q 2 7 6 C 単量体 (変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7) + H e l 3 0 8 M b u - A 5 7 7 F a z (ここで各単量体単位は変異 A 5 7 7 F a z を有する配列番号 1 0 を含む) 、レーン d) T r w C C b a - Q 2 7 6 C 単量体 (変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7) + 5 k D a P E G 、レーン e) T r w C C b a - Q 2 7 6 C 単量体 (変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7) + アジドが付着している 5 k D a P E G 、レーン f) T r w C C b a - Q 2 7 6 C 単量体 (変異 Q 2 7 6 C を有する配列番号 8 7) + A z i d e A l e x a F l u o r (登録商標) 5 5 5 (L i f e T e c h n o l o g i e s 、フルオロフォアと T r w C C b a - Q 2 7 6 C 単量

体との非特異的相互作用を確認するために使用)、レーンg) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO、レーンh) TrwC Cba - Q276C - PEG4 - DBCO(PEG4 - DBCOリンカーに付着されている変異Q276Cを有する配列番号87) + Hel308Mbu(配列番号10)、レーンi) Hel308Mbu - A577Faz - PEG4リンカー - TrwC Cba Q276C二量体(Hel308Mbu単量体単位は、位置577のアミノ酸が4 - アジド - L - フェニルアラニン(Faz)に変異されている配列番号10を含み、PEG4リンカーによってTrwC Cba単量体単位、変異Q276Cを有する配列番号87に付着されており、リンカーはHel308Mbu単量体上の位置577およびTrwC Cba上の位置276で各単量体に付着されている)に加えて未反応TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO + Hel308Mbu - A577Faz単量体(ここで各単量体単位は変異A577Fazを有する配列番号10を含む)、レーンj) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO + アジドが付着している5kDa PEG、レーンk) TrwC Cba - Q276C単量体(変異Q276Cを有する配列番号87) + Mal - PEG4 - DBCO + Azide Alexa Fluor(登録商標)555(Life Technologies、フルオロフォアとTrwC Cba - Q276C単量体との非特異的相互作用を確認するために使用)。

10

また、本発明は以下を提供する。

20

[1] 標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、

(a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアならびにヘリカーゼおよび追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む構築物と、構築物がポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させるステップであって、ヘリカーゼがポリヌクレオチド結合成分に付着されており、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有するステップ;および

(b) ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときに1つまたは複数の測定値を取るステップであって、測定値が標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップ

を含む方法。

[2] ヘリカーゼとポリヌクレオチド結合成分とが共有結合的に付着されている、[1]に記載の方法。

30

[3] ヘリカーゼとポリヌクレオチド結合成分とが化学的に付着されている、または遺伝子的に融合されている、[1]または[2]に記載の方法。

[4] ヘリカーゼとポリヌクレオチド結合成分とが1つまたは複数のリンカーによって付着されている、前記のいずれか一項に記載の方法。

[5] 1つまたは複数のリンカーがアミノ酸配列である、[4]に記載の構築物。

[6] ポリヌクレオチド結合成分が1つまたは複数のヘリカーゼを含む、前記のいずれか一項に記載の方法。

[7] 構築物中の2つ以上のヘリカーゼが互いに異なっている、[6]に記載の方法。

[8] 2つ以上のヘリカーゼが同じであるまたは類似している、[6]に記載の方法。

40

[9] 2つ以上のヘリカーゼが各ヘリカーゼ中の同じアミノ酸残基を使用して付着されている、[8]に記載の方法。

[10] ポリヌクレオチド結合成分が、ヘリックス - ヘアピン - ヘリックス(HhH)ドメイン、真核生物1本鎖結合タンパク質(single-stranded binding protein)(SSB)、細菌性SSB、古細菌SSB、ウイルス性SSB、2本鎖結合タンパク質、スライディングクランプ、前進性因子、DNA結合ループ、複製開始タンパク質、テロメア結合タンパク質、リプレッサー、亜鉛フィンガーおよび増殖細胞核抗原(PCNA)から独立に選択される1つまたは複数のドメインを含む、[1]から[5]のいずれか一項に記載の方法。

[11] ポリヌクレオチド結合成分が表4に示されるものおよびその変種から選択され

50

る、[1 0] に記載の方法。

[1 2] ポリヌクレオチド結合成分がエキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼまたはトポイソメラーゼ由来である、[1] から [5] のいずれか一項に記載の方法。

[1 3] ポリメラーゼが P h i 2 9 ポリメラーゼ (配列番号 6 2) またはその変種である、[1 2] に記載の方法。

[1 4] 1 つまたは複数のヘリカーゼがスーパーファミリー 1 ~ 6 から独立に選択される、前記のいずれか一項に記載の方法。

[1 5] 1 つまたは複数のヘリカーゼが単量体である、前記のいずれか一項に記載の方法。

[1 6] 1 つまたは複数のヘリカーゼが、H e l 3 0 8 ヘリカーゼ、R e c D ヘリカーゼ、T r a I ヘリカーゼ、T r a I サブグループヘリカーゼ、X P D ヘリカーゼおよびその変種から独立に選択される、前記のいずれか一項に記載の方法。

[1 7] (a) H e l 3 0 8 ヘリカーゼがアミノ酸モチーフ Q - X 1 - X 2 - G - R - A - G - R (配列番号 8) (式中、X 1 は C、M もしくは L であり、X 2 は任意のアミノ酸残基である) を含み；

(b) R e c D ヘリカーゼが、

- アミノ酸モチーフ X 1 - X 2 - X 3 - G - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 (配列番号 8) (式中、X 1 は G、S もしくは A であり、X 2 は任意のアミノ酸であり、X 3 は P、A、S もしくは G であり、X 4 は T、A、V、S もしくは C であり、X 5 は G もしくは A であり、X 6 は K もしくは R であり、X 7 は T もしくは S である) ；および / または

- アミノ酸モチーフ X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - (X 6) ₃ - Q - X 7 (配列番号 1 2) (式中、X 1 は Y、W もしくは F であり、X 2 は A、T、S、M、C もしくは V であり、X 3 は任意のアミノ酸であり、X 4 は T もしくは N であり、X 5 は A、T、G、S、V もしくは I であり、X 6 は任意のアミノ酸であり、X 7 は G もしくは S である) を含み；

(c) T r a I ヘリカーゼまたは T r a I サブグループヘリカーゼが、

- アミノ酸モチーフ H - (X 1) ₂ - X 2 - R - (X 3) _{5 ~ 1 2} - H - X 4 - H (配列番号 3 1 ~ 3 8) (式中、X 1 および X 2 は任意のアミノ酸であり、X 2 および X 4 は D、E、K および R を除く任意のアミノ酸から独立に選択される) ；または

- アミノ酸モチーフ G - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - H - (X 8) _{6 ~ 1 2} - H - X 9 (配列番号 3 9 ~ 4 5) (式中、X 1、X 2、X 3、X 5、X 6、X 7 および X 9 は D、E、K および R を除く任意のアミノ酸から独立に選択され、X 4 は D または E であり、X 8 は任意のアミノ酸である)

を含み；または

(d) X P D ヘリカーゼが、

(a) アミノ酸モチーフ X 1 - X 2 - X 3 - G - X 4 - X 5 - X 6 - E - G (配列番号 8) (式中、X 1、X 2、X 5 および X 6 は D、E、K および R を除く任意のアミノ酸から独立に選択され、X 3 および X 4 は任意のアミノ酸残基であってよい) ；および / または

(b) アミノ酸モチーフ Q - X a - X b - G - R - X c - X d - R - (X e) ₃ - X f - (X g) ₇ - D - X h - R (配列番号 9) (式中、X a、X e および X g は任意のアミノ酸残基であってよく、式中、X b、X c および X d は D、E、K および R を除く任意のアミノ酸から独立に選択される)

を含む、[1 6] に記載の方法。

[1 8] H e l 3 0 8 ヘリカーゼ中の X 2 が A、F、M、C、V、L、I、S、T または P である、[1 7] に記載の方法。

[1 9] H e l 3 0 8 ヘリカーゼが表 1 に示すヘリカーゼの 1 つまたはその変種である、[1 7] または [1 8] に記載の方法。

[2 0] H e l 3 0 8 ヘリカーゼが、(a) 配列番号 1 0、1 3、1 6 もしくは 1 9 のいずれか 1 つに示す配列、または (b) その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて関連配列に少なくとも 4 0 % 相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持しているその変種を

10

20

30

40

50

含む、[1 9] に記載の方法。

[2 1] T r a Iヘリカーゼが、(a) 配列番号 4 6、8 7、9 8 もしくは 1 0 2 に示す配列、または (b) その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて関連配列に少なくとも 4 0 % 相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、[1 7] に記載の方法。

[2 2] X P Dヘリカーゼ中の X 1、X 2、X 5 および X 6 ならびに / または X b、X c および X d が G、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、Q、N、S および T から独立に選択される、[1 7] に記載の方法。

[2 3] X P Dヘリカーゼが、(a) 配列番号 5 2 のいずれか 1 つに示す配列、または (b) その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて関連配列に少なくとも 4 0 % 相同性を有し、ヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、[1 7] または [2 2] に記載の方法。

[2 4] 1 つまたは複数のヘリカーゼが付着を促進するために修飾されている、前記のいずれか一項に記載の方法。

[2 5] 1 つまたは複数のヘリカーゼが、1 つもしくは複数の非天然システイン残基および / または 1 つもしくは複数の 4 - アジド - L - フェニルアラニン (F a z) 残基の導入によって修飾されている、[2 4] に記載の方法。

[2 6] 1 つまたは複数の特性が、(i) 標的ポリヌクレオチドの長さ、(i i) 標的ポリヌクレオチドの同一性、(i i i) 標的ポリヌクレオチドの配列、(i v) 標的ポリヌクレオチドの二次構造および (v) 標的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、前記のいずれか一項に記載の方法。

[2 7] 標的ポリヌクレオチドがメチル化によって、酸化によって、損傷によって、1 つまたは複数のタンパク質でまたは 1 つまたは複数の標識、タグもしくはスパーサーで修飾されている、[2 6] に記載の方法。

[2 8] 標的ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性が電氣的測定および / または光学的測定によって測定される、前記のいずれか一項に記載の方法。

[2 9] 電氣的測定が電流測定、インピーダンス測定、トンネル測定または電界効果トランジスタ (F E T) 測定である、[2 8] に記載の方法。

[3 0] (a) 標的ポリヌクレオチドを膜貫通ポアならびにヘリカーゼおよび追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む構築物と、構築物がポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させるステップであって、ヘリカーゼがポリヌクレオチド結合成分に付着されており、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有するステップ ; および

(b) ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときにポアを通過する電流を測定するステップであって、電流が標的ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性を示し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップを含む、前記のいずれか一項に記載の方法。

[3 1] ポアに電圧を印加して、ポアと構築物との複合体を形成するステップをさらに含む、前記のいずれか一項に記載の方法。

[3 2] ポリヌクレオチドの少なくとも一部が 2 本鎖である、前記のいずれか一項に記載の方法。

[3 3] ポアが、膜貫通タンパク質ポアまたはソリッドステートポアである、前記のいずれか一項に記載の方法。

[3 4] 膜貫通タンパク質ポアが、ヘモリジン (hemolysin)、ロイコシジン (leukocidin)、スメグマ菌 (Mycobacterium smegmatis) ポリン (porin) A (M s p A)、M s p B、M s p C、M s p D、外膜ポリン (porin) F (O m p F)、外膜ポリン (porin) G (O m p G)、外膜ホスホリパーゼ A、ナイセリア (Neisseria) オートトランスポートリポタンパク質 (N a l P) および W Z A 由来である、[3 3] に記載の方法。

[3 5] 2 つ以上のヘリカーゼを含む構築物であって、ヘリカーゼが互いに付着しており、構築物が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。

10

20

30

40

50

[3 6] 構築物が [7] から [9] のいずれか一項に定義されており、および / または 2 つ以上のヘリカーゼが [1 4] から [2 5] のいずれか一項に定義されている、 [3 5] に記載の構築物。

[3 7] ヘリカーゼと、配列番号 9 4 または配列番号 9 4 の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 9 4 に少なくとも 8 0 % 相同性を有するその変種を含むアミノ酸配列とを含む構築物であって、ヘリカーゼがアミノ酸配列に付着されており、構築物が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。

[3 8] 配列番号 9 0、または配列番号 9 0 の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 9 0 に少なくとも 8 0 % 相同性を有するその変種を含む、 [3 7] に記載の構築物。

10

[3 9] [3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の構築物をコードしているポリヌクレオチド配列であって、2 つ以上のヘリカーゼが遺伝子的に融合されているポリヌクレオチド配列。

[4 0] ポリヌクレオチドの移動を制御する方法であって、ポリヌクレオチドを [3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の構築物に接触させ、それによりポリヌクレオチドの移動を制御するステップを含む方法。

[4 1] 標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成する方法であって、ポアと、 [1] から [2 5] のいずれか一項に記載の構築物または [3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の構築物との複合体を形成し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサーを形成するステップを含む方法。

20

[4 2] 複合体が、 (a) 標的ポリヌクレオチドの存在下で構築物とポアとを接触させるステップおよび (b) ポアに電位を印加するステップによって形成される、 [4 1] に記載の方法。

[4 3] 電位が、電圧電位または化学電位である、 [4 2] に記載の方法。

[4 4] 複合体が、ポアを構築物に共有結合的に付着するステップによって形成される、 [4 2] に記載の方法。

[4 5] ポアと、 [1] から [2 5] のいずれか一項に定義されている、構築物または [3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の構築物との間の複合体を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサー。

[4 6] ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための [3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の構築物または [1] から [2 5] のいずれか一項に定義されている、構築物の使用。

30

[4 7] (a) ポアおよび (b) [1] から [2 5] のいずれか一項に定義されている、構築物または [3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の構築物を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。

[4 8] 両親媒性膜を含むチップをさらに含む、 [4 7] に記載のキット。

[4 9] 複数のポア、および [1] から [2 5] のいずれか一項に定義されている、複数の構築物または [3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の複数の構築物を含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための装置。

[5 0] 複数のポアを支持でき、ポアおよび構築物を使用してポリヌクレオチド特性決定を実施するために作動可能であるセンサーデバイス ; ならびに特性決定を実施するための材料を保持するための少なくとも 1 つのリザーバーを含む、 [4 9] に記載の装置。

40

[5 1] 複数のポアを支持でき、前記ポアおよび構築物を用いてポリヌクレオチド特性決定を実施するために作動可能であるセンサーデバイス ; 特性決定を実施するための材料を保持するための少なくとも 1 つのリザーバー ; 前記少なくとも 1 つのリザーバーから前記センサーデバイスに材料を制御可能に供給するように構成された流体系 ; および

各試料を受けるための 1 つまたは複数の容器

を含み、前記流体系が前記 1 つまたは複数の容器から前記センサーデバイスに前記試料を

50

選択的に供給するように構成されている、[4 9] または [5 0] に記載の装置。

[5 2] [3 5] および [3 6] に記載の構築物を産生する方法であって、2つ以上のヘリカーゼを互いに付着させ、それにより構築物を産生するステップを含む方法。

[5 3] [3 7] または [3 8] に記載の構築物を産生する方法であって、ヘリカーゼを、配列番号 9 4 または配列番号 9 4 の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号 9 4 に少なくとも 8 0 % 相同性を有するその変種を含むアミノ酸配列に付着させ、それにより構築物を産生するステップを含む方法。

[5 4] 得られた構築物がポリヌクレオチドの移動を制御できるかどうかを決定するステップをさらに含む、[5 2] または [5 3] に記載の方法。

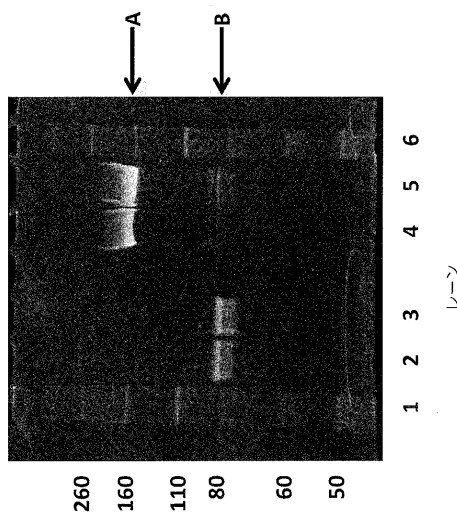
[5 5] (a) [3 9] に記載のポリヌクレオチドを提供するステップ；および (b) ポリヌクレオチド配列を発現するステップを含む、[5 2] から [5 4] のいずれか一項に記載の方法。

10

【 図 1 】

Fig. 1

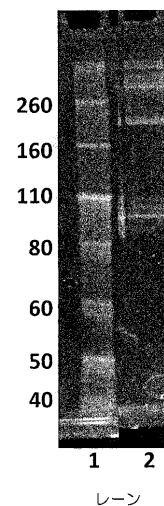
1/28



【 図 2 】

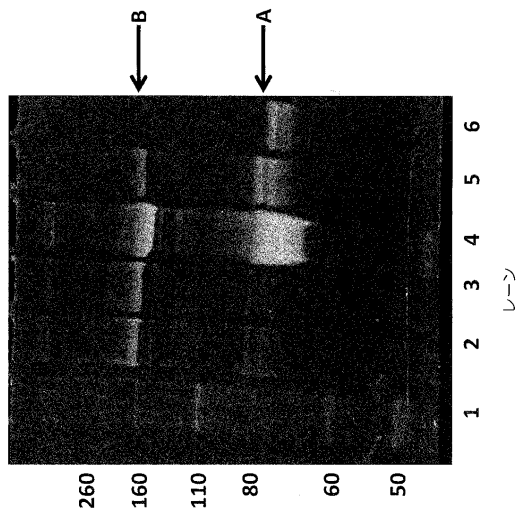
Fig. 2

2/28



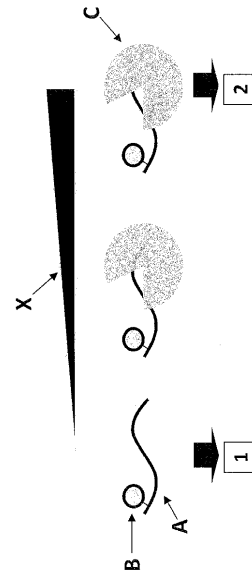
【 図 3 】

Fig. 3 3/28



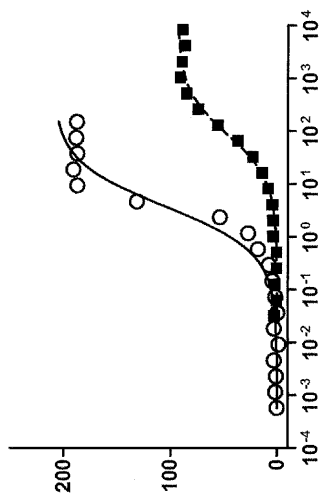
【 図 4 】

Fig. 4 4/28



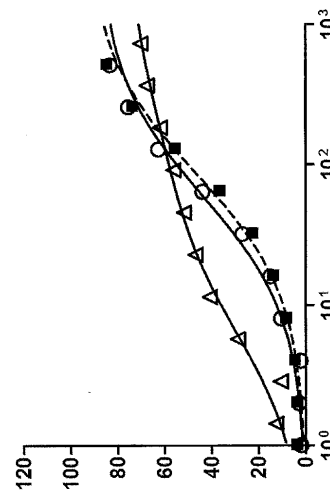
【 図 5 】

Fig. 5 5/28



【 図 6 】

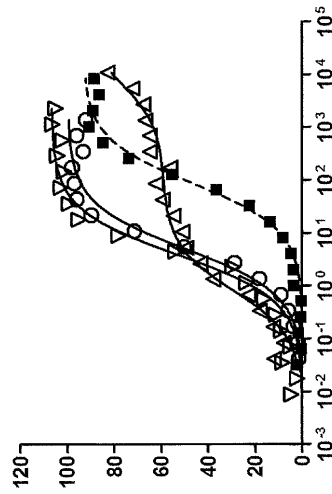
Fig. 6 6/28



【 図 7 】

Fig. 7

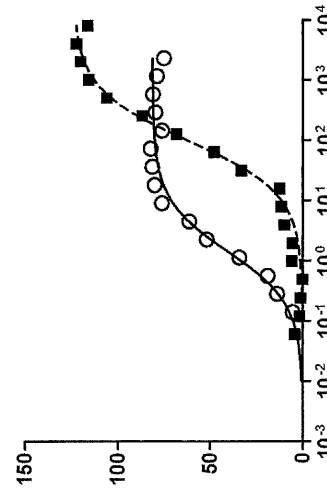
7/28



【 図 8 】

Fig. 8

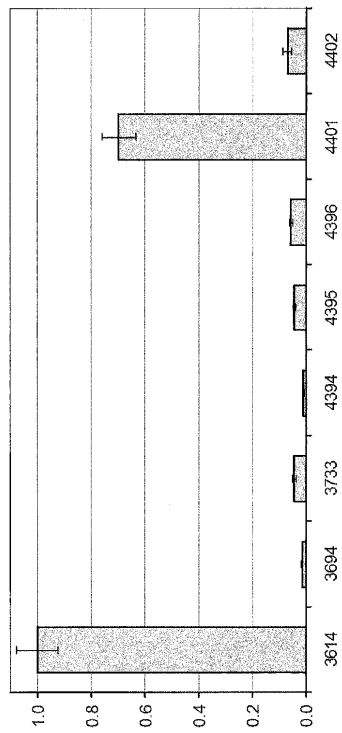
8/28



【 図 9 】

Fig. 9

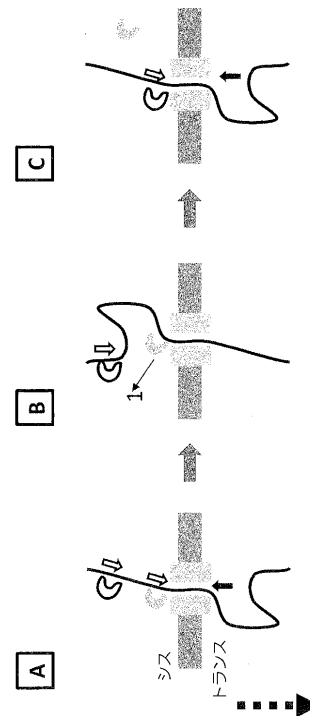
9/28



【 図 10 】

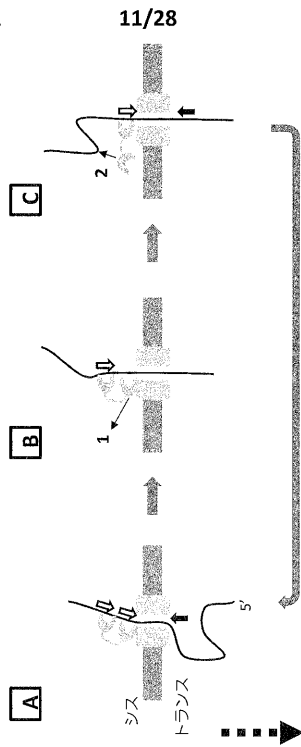
Fig. 10

10/28



【図 1 1】

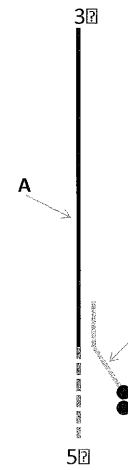
Fig. 11



【図 1 2】

Fig. 12

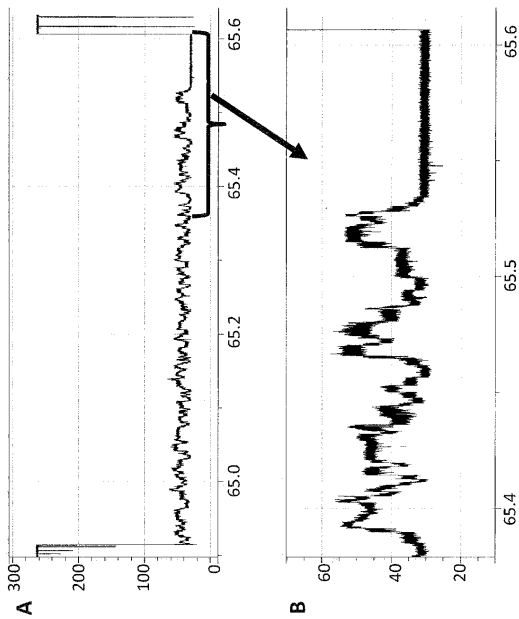
12/28



【図 1 3】

Fig. 13

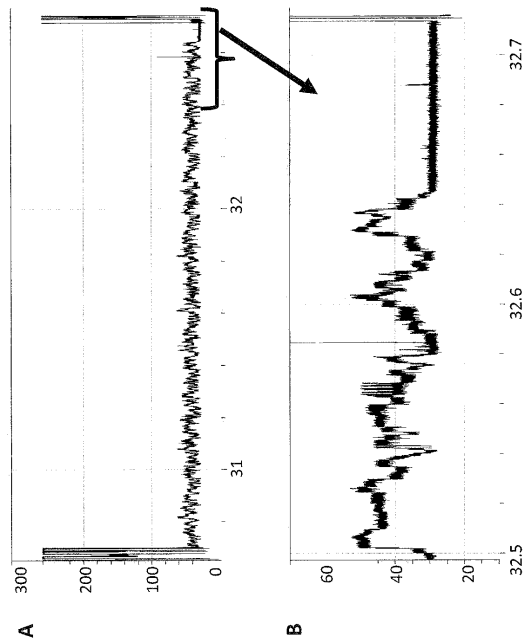
13/28



【図 1 4】

Fig. 14

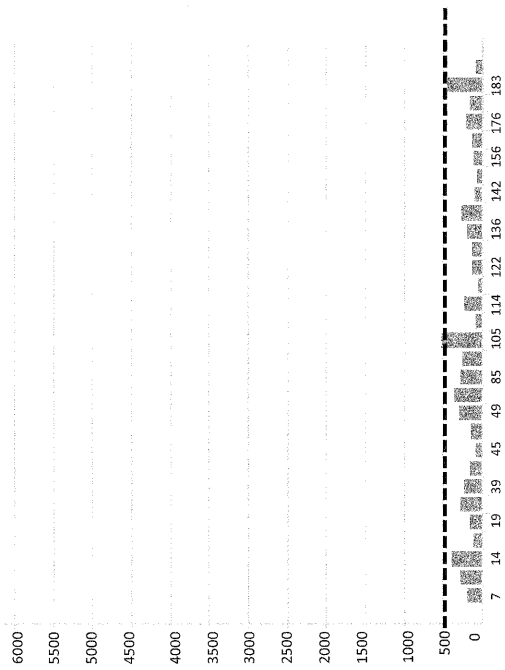
14/28



【図 15】

Fig. 15

15/28



【図 16】

Fig. 16

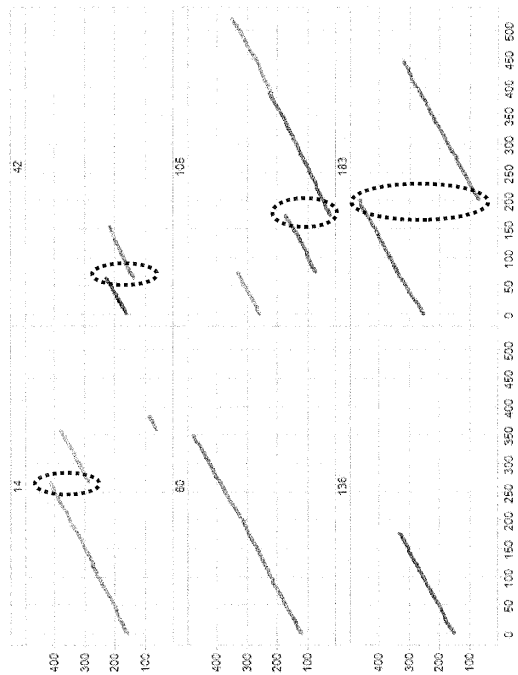
16/28



【図 17】

Fig. 17

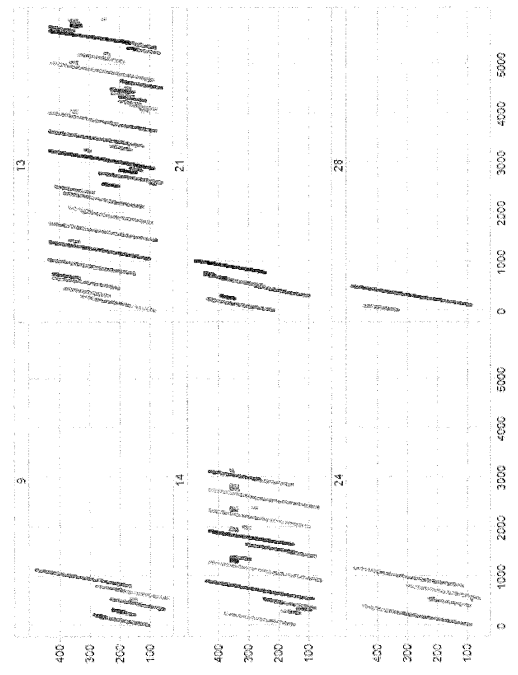
17/28



【図 18】

Fig. 18

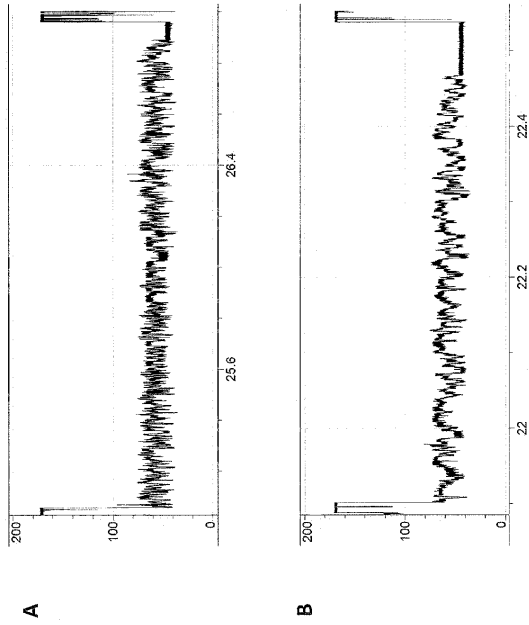
18/28



【図 19】

Fig. 19

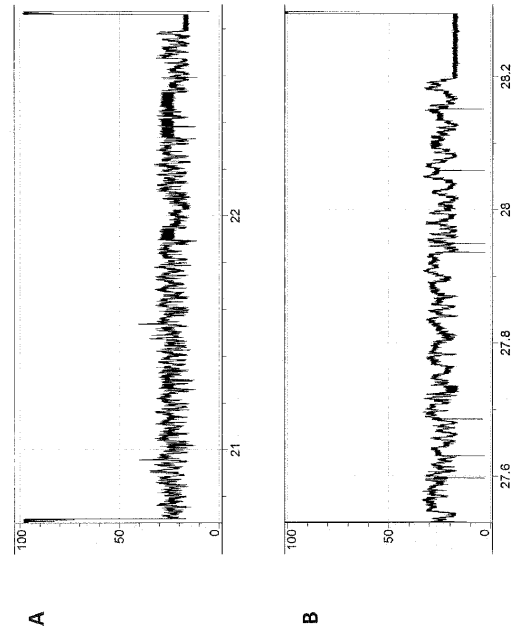
19/28



【図 20】

Fig. 20

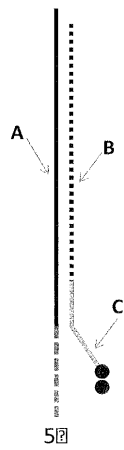
20/28



【図 21】

Fig. 21

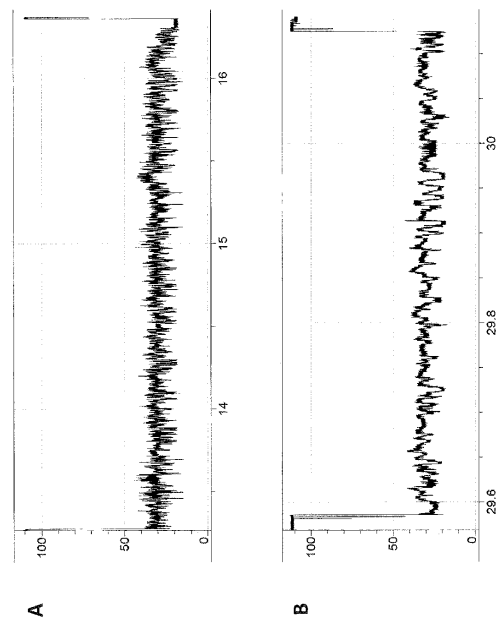
21/28



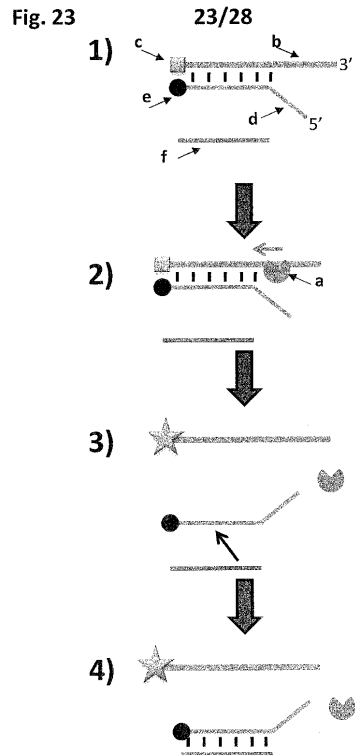
【図 22】

Fig. 22

22/28

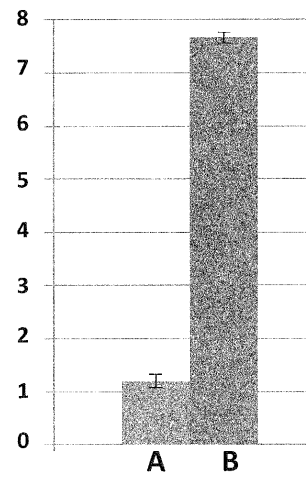


【 図 2 3 】



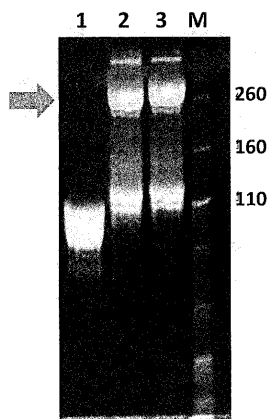
【 図 2 4 】

Fig. 24 24/28



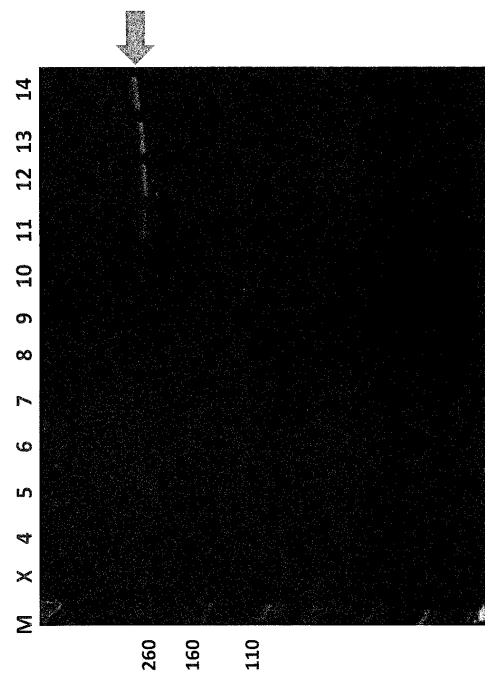
【 図 2 5 】

Fig. 25 25/28



【 図 2 6 】

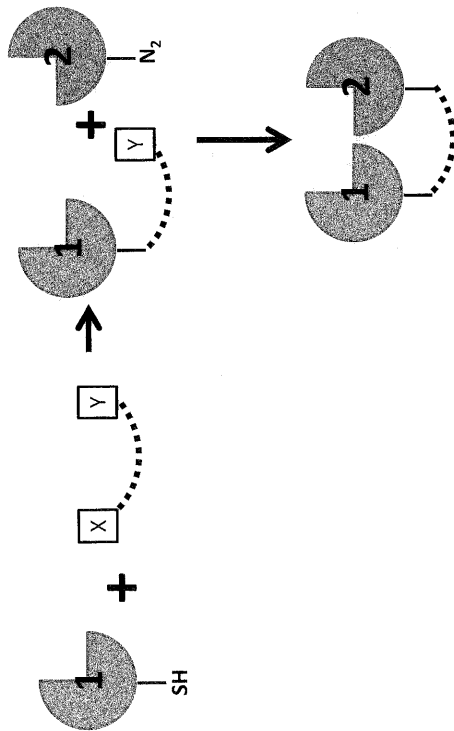
Fig. 26 26/28



【図 27】

Fig. 27

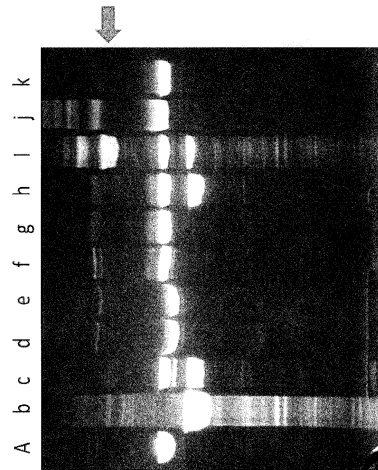
27/28



【図 28】

Fig. 28

28/28



【配列表】

0006429773000001.app

フロントページの続き

- | | | | |
|--------------------------|--|----------------|---|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| C 1 2 N 9/14 (2006.01) | | C 1 2 N 9/14 | |
| G 0 1 N 33/50 (2006.01) | | G 0 1 N 33/50 | P |
| G 0 1 N 33/483 (2006.01) | | G 0 1 N 33/483 | C |
| G 0 1 N 27/02 (2006.01) | | G 0 1 N 33/483 | E |
| G 0 1 N 27/00 (2006.01) | | G 0 1 N 27/02 | D |
| | | G 0 1 N 27/00 | Z |
- (72)発明者 ヘロン, アンドリュー
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 クラーク, ジェームス
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 モイセイ, ルース
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ウォレス, エリザベス ジェーン
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ブルース, マーク
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ジャヤシンゲ, ラクマル
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 カプロッティ, ドメニコ
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ソエロエス, サボルチ
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 マクニール, ルーク
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド
- (72)発明者 ミッシャ, ミハエラ
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード オックスフォードシャイアー, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第2010/004265(WO, A1)
特表2006-500028(JP, A)
国際公開第2002/092821(WO, A1)
米国特許第09617591(US, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)