(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 6 月 1 日(01.06.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/090684 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 19/34* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/084807

(22) 国際出願日: 2016 年 11 月 24 日(24.11.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-231674 2015 年 11 月 27 日(27.11.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号 Fukuoka (JP). タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5250058 滋賀県草津市野路東七丁目４番３８号 Shiga (JP).

(72) 発明者: 石野 良純(ISHINO, Yoshizumi). 石野 園子(ISHINO, Sonoko). 山上 健(YAMAGAMI, Takeshi). 上森 隆司(UEMORI, Takashi). 高津 成彰(TAKATSU, Nariaki).

(74) 代理人: 細田 芳徳(HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目７番３１号 ＯＭＭビル５階 私書箱２６号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: DNA POLYMERASE MUTANT

(54) 発明の名称 : ＤＮＡポリメラーゼ変異体

(57) **Abstract**: The present invention pertains to: a Thermus aquaticus (Taq) polymerase having a strand substitution activity in which a mold DNA binding site of a Taq DNA polymerase is substituted by amino acid residues that increase the total number of electrical charges in the mold DNA binding site; a nucleic acid for coding the Taq polymerase; a vector including the nucleic acid; a transformant which includes the vector including the nucleic acid, or includes the nucleic acid; a method for producing the Taq polymerase; a method for amplifying the nucleic acid by using the Taq polymerase; and a kit including the polymerase. The present invention provides a DNA polymerase having high heat resistance, capable of efficiently duplicating mold DNA in long chains, and having strong strand substitution activity.

(57) 要約: Ｔｈｅｒｍｕｓ ａｑｕａｔｉｃｕｓ （Ｔａｑ） ＤＮＡポリメラーゼの鋳型ＤＮＡ結合部位において、当該部位の電荷の総和を増加するアミノ酸残基へ置換した鎖置換活性を有するＴａｑポリメラーゼ、当該ポリメラーゼをコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該核酸を含むベクターまたは当該核酸を含む形質転換体、当該ポリメラーゼの製造方法、当該ポリメラーゼを利用した核酸増幅方法、当該ポリメラーゼを含むキットに関する。本発明により、高耐熱性を有し、鋳型ＤＮＡの効率的な長鎖複製が可能であり、かつ強力な鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼが提供される。

WO 2017/090684 A1

明　細　書

発明の名称 ： ＤＮＡポリメラーゼ変異体

技術分野

[0001] 本発明はＤＮＡポリメラーゼ変異体に関する。

背景技術

[0002] ＤＮＡポリメラーゼは遺伝子工学用試薬として有用な酵素であり、核酸増幅法、ＤＮＡ塩基配列決定法、核酸の標識化、部位特異的変異導入法などに広く使用されている。また、核酸増幅法の一種であるＰＣＲ法や全ゲノム増幅反応（Ｗｈｏｌｅ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ；以下、ＷＧＡと記載することがある）に適した種々のＤＮＡポリメラーゼが開発され、各社から市販されている。

[0003] 現在知られているＤＮＡポリメラーゼはそのアミノ酸配列の類似性に基づき、７つのファミリー（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｘ、およびＹ）に分類されている。そのうち、ファミリーＡ（ポルＩ型酵素ともいう）およびファミリーＢ（α型酵素ともいう）に属するＤＮＡポリメラーゼが遺伝子工学用試薬として市販されている。

[0004] ファミリーＡに属する酵素の例として、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓ由来ＰｏｌＩ（以下、Ｔａｑポリメラーゼと記載することがある）、Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来ＰｏｌＩ（以下、Ｂｓｔポリメラーゼと記載することがある）やＴｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来ＰｏｌＩ（以下、Ｔｔｈポリメラーゼと記載することがある）が挙げられる。

ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼの特徴として、ＤＮＡ鎖伸長活性が強い、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性（プルーフリーディング活性、以下、３’→５’エキソ活性と記載することがある）を持たない酵素が多い、ＴｄＴ（末端デオキシヌクレオチド転移）活性を有すること等が挙げられる。また、鎖置換活性を有する酵素と有さない酵素があり、Ｔａｑポリメ

ラーゼは鎖置換活性を有さないが、Ｂｓｔポリメラーゼのラージフラグメントは該活性を有する。Ｔｔｈポリメラーゼは、逆転写活性を併せ持つＤＮＡポリメラーゼとして知られている。

[0005] 鎖置換活性（ｓｔｒａｎｄ ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ ａｃｔｉｖｉｔｙ；以下、ＳＤ活性と記載することがある）とは、鋳型となる二本鎖ＤＮＡの水素結合を自ら解離しつつ、新しいＤＮＡ鎖を複製する活性である。鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼは、その特性から鋳型二本鎖ＤＮＡの解離を必要としないため一定温度でのＤＮＡ合成が可能であり、またＤＮＡの二次構造による合成阻害を受けにくいという特徴を有している。

[0006] 鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼは等温核酸増幅反応に利用されることが多い。等温核酸増幅反応としては、鎖置換型ＤＮＡ伸長反応（Ｓｔｒａｎｄ Ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ；以下、ＳＤＡと記載することがある；非特許文献１、２）、ローリングサークル増幅法（Ｒｏｌｌｉｎｇ ｃｉｒｃｌｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ；以下、ＲＣＡと記載することがある；非特許文献３）、交差プライミング増幅法（ｃｒｏｓｓ ｐｒｉｍｉｎｇ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ；以下、ＣＰＡと記載することがある；非特許文献４）、ループ介在等温増幅法（Ｌｏｏｐ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ；以下、ＬＡＭＰと記載することがある；非特許文献５）、ＩＣＡＮ法（Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ ａｎｄ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ ｐｒｉｍｅｒ－ｉｎｉｔｉａｔｅｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ；以下、ＩＣＡＮと記載することがある；特許文献１、２）等がある。

[0007] ファミリーＢに属する、ｐｈｉ２９ファージ由来ＤＮＡポリメラーゼ（以下、φ２９ポリメラーゼと記載することがある）は非常に強い鎖置換活性を有している。この酵素は、鋳型ＤＮＡの複製をローリングサークル増幅法に利用されている。市販品の例として、ＴｅｍｐｌｉＰｈｉ、ＧｅｎｏｍｉＰｈｉ（ともにＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）がある。

[0008] 等温核酸増幅法を高い特異性で実施するためには、高温条件下でプライマ

ーを配列特異的に鋳型ＤＮＡへアニーリングさせる必要がある。Ｂｓｔポリメラーゼは鎖置換活性を有する耐熱性ＤＮＡポリメラーゼだが、至適温度は約６３℃であり、６８℃以上では失活する。φ２９ポリメラーゼは、２０～３７℃の中温域で活性を示し、６５℃で１０分間加熱することにより失活する特徴を有する。そのため、これらのポリメラーゼは、鋳型ＤＮＡを熱変性によって乖離させる核酸増幅反応には使用できない。

[0009] 鎖置換活性を付与した、かつエキソ活性を欠失した耐熱性のＴａｑポリメラーゼ変異体として、ＳＤ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＢＩＯＲＯＮ社製、ＷＯ２０１４／１６１７１２）が市販されている。しかしながら、該ＳＤ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを使用したＰＣＲでの増幅効率は、既存のＴｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｌｉｔｏｒａｌｉｓ 由来Ｖｅｎｔ ＤＮＡポリメラーゼやＰｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆｕｒｉｏｓｕｓ由来Ｐｆｕポリメラーゼと同等の性能である。

[0010] そのため、高耐熱性を有し、鋳型ＤＮＡの効率的な長鎖複製が可能であり、かつ好ましくは強力な鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼが求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：日本国特許第３４３３９２９号

特許文献2：日本国特許第４１２８０７４号

非特許文献

[0012] 非特許文献1：ヌクレイック アシッズ リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．）、第２０巻、第7号、１６９１～6ページ（１９９２年）

非特許文献2：米国科学アカデミー紀要（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．）、第８９巻、第１号、３９２～6ページ（１９９２年）

非特許文献3：米国科学アカデミー紀要（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．）、第９２巻、第１０号、４６４１～5ページ（１９９

５年）

非特許文献4：サイエンス　リポート（Ｓｃｉ　Ｒｅｐ．）、第２巻、２４６ページ（２０１２年）　ｄｏｉ：　１０．１０３８／ｓｒｅｐ００２４６

非特許文献5：ヌクレイック　アシッズ　リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．）、第２８巻、第１２号、Ｅ６３ページ（２０００年）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の目的は、高耐熱性と、好ましくは強力な鎖置換活性を有し、長鎖の鋳型ＤＮＡを効率よく複製することが可能なＤＮＡポリメラーゼを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼ間のアミノ酸配列を比較、解析した。その結果、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を失ったＤＮＡポリメラーゼの鋳型ＤＮＡ結合部位において、当該部位の電荷の総和を増加するようなアミノ酸置換を導入することにより、高い鎖置換活性が付与されたＤＮＡポリメラーゼを創製できることを明らかにし、本発明を完成させた。

[0015] すなわち、本発明の第一の発明は、ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列において、鋳型ＤＮＡ結合部位にその電荷の総和が増加するようなアミノ酸置換を有し、かつ５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を有さないＤＮＡポリメラーゼ、または該ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性を有するＤＮＡポリメラーゼに関する。

[0016] 本発明の第一の発明において、「電荷の総和を増加するアミノ酸」は、例えば、アルギニン、リジン、ヒスチジン、セリンおよびアラニンから選択されるアミノ酸が挙げられる。

[0017] 本発明の第一の発明において、「ＤＮＡポリメラーゼの鋳型ＤＮＡ結合部位」は、本発明を何ら限定するものではないが、例えば、配列表の配列番号１で示されるＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列の６８５～６８７

番目のアミノ酸に相当するアミノ酸残基を含む部位が挙げられる。

[0018] 本発明の第一の発明において、「置換されたアミノ酸配列」を有するＤＮＡポリメラーゼは、例えば、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列の

（１）６８５番目のプロリンに相当するアミノ酸のアルギニンまたはセリンへの置換、

（２）６８６番目のチロシンに相当するアミノ酸のアルギニンへの置換、および

（３）６８７番目のグルタミン酸に相当するアミノ酸のアルギニン、リジンまたはアラニンへの置換、

からなる群より選択される１以上の置換を有するＤＮＡポリメラーゼである。具体的には、配列表の配列番号４０～４８のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むＤＮＡポリメラーゼが挙げられる。

[0019] 本発明の第一の発明において、「ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼ」は、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼが好ましい。

[0020] また本発明の第一の発明において、「ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼ」は、Ｔｈｅｒｍｕｓ属細菌由来ＤＮＡポリメラーゼであってもよい。

[0021] さらに本発明の第一の発明において、「ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼ」は、野生型のファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列と比較してＮ末端側配列が欠失したＤＮＡポリメラーゼが好ましく、特に限定はされないがＮ末端側配列が欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、好ましくはＮ末端から２８９残基までのアミノ酸を欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼやＮ末端から２８０残基までのアミノ酸を欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼが挙げられる。本明細書において、ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼとしては、野生型のファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼの５’→３’エキソヌクレアーゼ活性に関係するＮ末端側配列が欠失したＤＮＡポリメラーゼも好ましい例である。

[0022] 本発明の第二の発明は、本発明の第一の発明のＤＮＡポリメラーゼをコー

ドする塩基配列を含む核酸に関する。当該核酸としては、特に限定はされないが、配列表の配列番号５～９および２０～２３のいずれかに示される塩基配列を含む、前記第一の発明のＤＮＡポリメラーゼをコードする核酸が例示される。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。

[0023] 本発明の第三の発明は、本発明の第二の発明のＤＮＡポリメラーゼをコードする核酸を含むベクターに関する。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。

[0024] 本発明の第四の発明は、本発明の第三の発明のベクターまたは本発明の第二の発明の核酸を含む形質転換体に関する。

[0025] 本発明の第五の発明は、本発明の第四の発明の形質転換体を培養し、培養物からＤＮＡポリメラーゼを採取することを特徴とするＤＮＡポリメラーゼの製造方法に関する。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。

[0026] 本発明の第六の発明は、本発明の第一の発明のＤＮＡポリメラーゼおよび鋳型ＤＮＡを共にインキュベートする工程を含むＤＮＡ分子の製造方法に関する。本発明の第六の発明において、ＤＮＡ分子の製造方法はポリメラーゼ連鎖反応または等温核酸増幅反応であってもよい。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。

[0027] 本発明の第七の発明は、本発明の第一の発明のＤＮＡポリメラーゼを含むキットに関する。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。

発明の効果

[0028] 本発明により、高耐熱性を有し、鋳型ＤＮＡの効率的な長鎖複製が可能であり、かつ好ましくは強力な鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼが提供される。

図面の簡単な説明

[0029] [図1]精製ＤＮＡポリメラーゼのＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果である。

[図2-1]プライマー伸長活性の結果である。

[図2-2]プライマー伸長活性の結果である。

[図3]ゲルシフトアッセイの結果である。

[図4]アガロースゲル電気泳動の結果である。

[図5]アルカリアガロースゲル電気泳動の結果である。

[図6]アルカリアガロースゲル電気泳動の結果である。

発明を実施するための形態

[0030] 本発明において、「鎖置換活性」とは、鋳型となる二本鎖ＤＮＡの水素結合を自ら解離しつつ、新しいＤＮＡ鎖を複製する活性を指す。本発明の好ましいＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有するものであり、例えば、鎖置換活性を有することが知られている公知のＤＮＡポリメラーゼと同程度又はより強い鎖置換活性を有する。

[0031] 本発明において、「電荷の総和を増加する」とは、ある部位の置換後の各アミノ酸残基の電荷の総和が、当該部位の置換前の各アミノ酸残基の電荷の総和より大きいことを指す。本発明を何ら限定するものではないが、例えば、置換前のアミノ酸配列がプロリン－チロシン－グルタミン酸（３残基）の場合、電荷の総和は０＋０＋（－１）＝－１である。これをアルギニン－アルギニン－アルギニンへ置換した場合、電荷の総和は（＋１）＋（＋１）＋（＋１）＝＋３である。この置換において、当該部位の電荷の総和は－１から＋３へ変化しており、電荷の総和が増加したという。

[0032] 以下、さらに詳細に説明する。

[0033] １．本発明のＤＮＡポリメラーゼおよびそれをコードする核酸

本発明の第一の態様は、ＤＮＡポリメラーゼに関し、これは、ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列において、鋳型ＤＮＡ結合部位にその電荷の総和が増加するようなアミノ酸置換を有し、かつ５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を有さないＤＮＡポリメラーゼ、ならびに前記ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性を有し、かつ同等の活性を有するＤＮＡポリメラーゼである。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。なお、本明細書において、「配列同一性」と

は、ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列において、鋳型ＤＮＡ結合部位以外のアミノ酸配列を１００％とする場合の配列同一性のことであり、好ましくはＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列と９５％以上、より好ましくは１００％の配列同一性を有する。

[0034] 本発明の第一の態様の好ましい形態において、ＤＮＡポリメラーゼは、アミノ酸置換によってその鋳型ＤＮＡ結合部位の電荷の総和が増加していればよく、当該部位において置換の前後で電荷が変わらないアミノ酸残基と電荷が増加したアミノ酸残基が混在していてもよい。総電荷の増加は、負電荷を有するアミノ酸から電荷を有しないアミノ酸または正電荷を有するアミノ酸への置換、ならびに電荷を有しないアミノ酸から正電荷を有するアミノ酸への置換によって達成される。本発明には、電荷が変わらないアミノ酸残基の数より電荷が増加したアミノ酸残基の数が多いＤＮＡポリメラーゼが好ましく、当該部位のアミノ酸残基すべてにおいて電荷が増加したＤＮＡポリメラーゼがより好ましい。例えば、当該部位のアミノ酸残基すべてが正電荷を有する塩基性アミノ酸に置換されたＤＮＡポリメラーゼ、さらに、当該部位のアミノ酸残基すべてが最も高電荷のアルギニンに置換されたＤＮＡポリメラーゼが本発明に好ましい。

[0035] ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼの鋳型ＤＮＡ結合部位は、当該ポリメラーゼの立体構造から鋳型ＤＮＡに結合する部位を選択してもよい。特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号１で示されるＴａｑポリメラーゼにおいては、当該ポリメラーゼのアミノ酸配列の６８５～６８７番目のアミノ酸に相当するアミノ酸残基を含む部位として、鋳型ＤＮＡ結合部位を特定することができる。

[0036] 本発明の第一の態様の好ましい形態において、置換されたアミノ酸配列は、例えば、野生型Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列における

（１）６８５番目のプロリンに相当するアミノ酸のアルギニンまたはセリンへの置換、

（２）６８６番目のチロシンに相当するアミノ酸のアルギニンへの置換、

および

（３）６８７番目のグルタミン酸に相当するアミノ酸のアルギニン、リジンまたはアラニンへの置換、

からなる群より選択される１以上の置換を有する、好ましくは鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼである。

[0037] 本発明のＤＮＡポリメラーゼは５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を有していないという特徴を有している。ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼの多くは５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を有しているが、公知の方法で当該活性を欠失させることにより、本発明に利用することが可能である。例えば、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性に寄与するアミノ酸残基を置換もしくは欠失させるような変異の導入や、前記活性に重要なドメインを欠失させる方法が知られている。

[0038] 本発明のＤＮＡポリメラーゼとしては、特に本発明を限定するものではないが、耐熱性を有するものであることが望ましい。ＤＮＡの熱変性工程を含むＰＣＲ法は言うまでもなく、等温核酸増幅法においても、ＤＮＡの塩基対結合を弱めることができる高温条件下での反応に使用できる耐熱性ＤＮＡポリメラーゼは有利である。ファミリーＡに属する、好熱性微生物のＤＮＡポリメラーゼを利用して作製された本発明のＤＮＡポリメラーゼは、特に好適な態様である。本明細書において耐熱性を有するとは、例えば、特に限定するものではないが、ＤＮＡポリメラーゼを９０℃にて３０分間保持した場合の残存活性が１００％であるか、又は９５℃にて３０分間保持した場合の残存活性が７５％以上である性質を指すものである。

[0039] Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼやその他のＴｈｅｒｍｕｓ属細菌（例えば、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｆｌａｖｕｓ等）の耐熱性ＤＮＡポリメラーゼでは５’→３’エキソヌクレアーゼ活性ドメインがＮ末端側に位置しているので、これらのＤＮＡポリメラーゼのＮ末端側欠失体の鋳型ＤＮＡ結合部位に前記のアミノ酸置換を導入することにより、本発明のＤＮＡポリメラーゼを作製することができる。例えば、Ｎ末

端から２８０残基までのアミノ酸を欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（ＫｌｅｎＴａｑ）や、本明細書の実施例に記載された、Ｎ末端から２８９残基までのアミノ酸を欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｔａｑ　ｌａｒｇｅ　ｆｒａｇｍｅｎｔ）は本発明に好適である。例えば、配列表の配列番号４０～４８から選択されるアミノ酸配列を含む、好ましくは鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼが、本発明のＤＮＡポリメラーゼ（即ち、ＤＮＡポリメラーゼ変異体）として挙げられる。本発明のＤＮＡポリメラーゼとして特に好適には、配列表の配列番号４４で示されるアミノ酸配列を有するＤＮＡポリメラーゼである。さらに本発明の別態様としては、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼの１１７番目のグルタミン酸残基をアラニン残基に、１１９番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に、１４２番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に、さらに１４４番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した５’→３’エキソヌクレアーゼ欠失体と本発明を組み合わせてもよい。

[0040] 本発明の第一の態様のより好ましい形態において、本発明のＤＮＡポリメラーゼの性能を高めることを目的として、上記以外のアミノ酸置換をさらに導入してもよい。本発明を何ら限定するものではないが、例えば、特許第４１９３９９７号記載の変異（Ｔａｑポリメラーゼの７４２位のグルタミン酸と７４３位のアラニンの電荷の総和を増加する変異）を本発明のＤＮＡポリメラーゼへ導入してもよい。特許第４１９３９９７号記載のＤＮＡポリメラーゼ変異体は、伸長活性が高くなったと開示されており、該変異をさらに導入することにより、本発明のＤＮＡポリメラーゼの伸長活性がさらに高くなることが期待できる。

[0041] あるいは、本発明の第一の態様において、当該ＤＮＡポリメラーゼの性能を高めることを目的として、特定の機能を有する分子と融合させたＤＮＡポリメラーゼであってもよい。前記の「特定の機能を有する分子」としては、ＤＮＡと親和性を有するペプチド・ポリペプチドや、ＤＮＡの合成に関与するタンパク質と相互作用するペプチド・ポリペプチドが例示される。本明細

書において、「特定の機能を有する分子と融合させたＤＮＡポリメラーゼ」を「融合ポリペプチド」と称する場合があり、かかる融合ポリペプチドもＤＮＡポリメラーゼに包含される。

[0042] ＰＣＮＡ（増殖細胞核抗原：ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｎｇ ｃｅｌｌ ｎｕｃｌｅａｒ ａｎｔｉｇｅｎ）は、ホモ多量体で「スライディング・クランプ（ｓｌｉｄｉｎｇ ｃｌａｍｐ）」と呼ばれる環状構造を形成し、ＤＮＡ合成反応を促進する。ＰＣＮＡは酵母からヒトまで高度に保存されており、真核細胞において、ＰＣＮＡは細胞分裂、ＤＮＡ複製、修復、細胞周期調節、ＤＮＡメチル化やクロマチンリモデリングのような複製後修飾で重要な役割を担っている。ＰＣＮＡは、ＤＮＡポリメラーゼやＲＦＣ（ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ Ｃ；複製因子Ｃ）以外にもさまざまなタンパク質と複合体を形成し、ＤＮＡの修復・複製やその他の遺伝子制御機能に関与する。ヒトでは少なくとも１２個のタンパク質がＰＣＮＡと結合することが知られている。各タンパク質はＰＩＰボックス（ＰＩＰ ｂｏｘ；ＰＣＮＡ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎ ｂｏｘ）を介してＰＣＮＡと結合することでＤＮＡ鎖上に留め置かれることになる。

[0043] ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼの多くはＰＣＮＡと相互作用することはない。しかしながら、本発明ＤＮＡポリメラーゼにＰＣＮＡと結合するペプチドを付加することにより、ＤＮＡ合成反応における反応速度や伸張性を向上させることができる。

[0044] 「ＰＣＮＡと結合するペプチド」とは、ＰＣＮＡと結合する能力を有するペプチドであれば特に限定はない。該ペプチドとして、種々のＰＣＮＡ結合性タンパク質に存在するペプチドであるＰＩＰボックスを含むペプチドが例示される。ＰＩＰボックスはＰＣＮＡと相互作用するタンパク質に存在するアミノ酸配列で、ＰＣＮＡを介して当該タンパク質をＤＮＡ鎖上に留める働きをする。ＤＮＡ複製などに関与する、好熱性細菌のタンパク質（例えば複製因子Ｃラージサブユニット等）がＰＩＰボックスを有していることが知られている。本発明において好適なＰＩＰボックスは、少なくとも８アミノ酸か

らなるオリゴペプチドであって、Ａ１－Ａ２－Ａ３－Ａ４－Ａ５－Ａ６－Ａ７－Ａ８と表記すると、Ａ１はグルタミン残基、Ａ２とＡ３は任意のアミノ酸残基、Ａ４はロイシン残基、イソロイシン残基およびメチオニン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基、Ａ５とＡ６は任意のアミノ酸残基、Ａ７はフェニルアラニン残基又はトリプトファン残基、Ａ８はフェニルアラニン残基、トリプトファン残基又はロイシン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基、であるものが例示される。特に好ましくは、８アミノ酸のＱＡＴＬＦＤＦＬを含む配列表の配列番号５２記載のものが挙げられる。さらに本発明においては、前記８アミノ酸のオリゴペプチドのＮ末端側にさらにリジン残基を有する９アミノ酸を含むものであってもよい。

[0045] さらに本発明で使用するＰＩＰボックスは、特に限定はされないが好熱性細菌が産生するタンパク質由来のものが挙げられる。好ましくは好熱性細菌の複製因子Ｃラージサブユニット由来のＰＩＰボックスが例示され、さらに好ましくはＰｙｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｕｒｉｏｓｕｓの複製因子Ｃラージサブユニット由来のＰＩＰボックスが例示される。あるいはこれと実質的に同等の活性を有する機能的同等物であってもよい。

また、これらのＰＩＰボックスは、本発明の融合ポリペプチド内に複数個存在してもよい。融合ポリペプチドに含まれるＰＩＰボックスの数は、特に限定はないが、１～６個、好ましくは２～４個が例示される。これら複数のＰＩＰボックスは、その機能を果たす限りにおいては、それぞれのアミノ酸配列が異なっていてもよい。また、複数のＰＩＰボックス同士の間には、例えば後述のリンカーペプチドなど、別のアミノ酸配列が挟まっていてもよい。

[0046] さらに上記ＰＩＰボックスのＣ末側には、「リンカーペプチド」が存在してもよい。本発明の融合ポリペプチドを構成する「リンカーペプチド」とは、本発明の融合ポリペプチドにおいて、その機能やフォールディングが阻害されるのを回避するために、融合されるポリペプチド同士あるいはペプチドとポリペプチドの間に挿入されるペプチドである。リンカーペプチドの長さ

に特に制限はないが、３～１００アミノ酸、好ましくは５～５０アミノ酸のペプチドが例示される。当該リンカーペプチドを構成するアミノ酸の種類に特に制限はないが、リンカー自身が複雑な高次構造を形成するものは避けた方がよく、側鎖が比較的小さいアミノ酸、例えばセリンやグリシンを多く含むペプチドがよく用いられる。

[0047] 本発明を何ら限定するものではないが、上記ＰＩＰボックスをＮ末端側に付加された本発明のＤＮＡポリメラーゼが好適である。当該ＰＩＰボックスをＮ末端側に付加された本発明のＤＮＡポリメラーゼを使用する際には、本発明を何ら限定するものではないが、ＰＣＮＡを含有する反応液が使用される。前記のＰＣＮＡとしては公知のＰＣＮＡもしくはその変異体を使用することができるが、好ましくは耐熱性のＰＣＮＡもしくはその変異体が使用される。特に限定はされないがＰｙｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｕｒｉｏｓｕｓ由来ＰＣＮＡあるいはＴｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ　ｋｏｄａｋａｒｅｎｓｉｓ由来ＰＣＮＡなどが例示される。さらに変異型ＰＣＮＡも本発明の核酸増幅用組成物等の本発明の種々の態様に使用することができる。本発明に使用可能な好ましい変異型ＰＣＮＡとしては、例えば国際公開ＷＯ２００７／００４６５４号パンフレットに記載された変異型ＰＣＮＡ、すなわち、Ｐ．ｆｕｒｉｏｓｕｓのＰＣＮＡの第８２番目、第８４番目、第１０９番目、第１３９番目、第１４３番目、第１４７番目のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換した配列を有する変異型ＰＣＮＡが例示される。本発明の特に好ましい態様では、第１４３番目のアミノ酸残基をアスパラギン酸からアルギニン（Ｄ１４３Ｒ）に換えた配列を有する変異型ＰＣＮＡが例示される。

[0048] 本発明の第二の態様は、本発明の第一の態様のＤＮＡポリメラーゼをコードする核酸である。好適には、配列表の配列番号４０～４８から選択されるアミノ酸配列を含むＤＮＡポリメラーゼをコードする核酸であればよい。さらに好適には、配列表の配列番号５～９および２０～２３から選択される塩基配列を含む核酸である。特に好適には、配列表の配列番号９で示される塩基配列を含む核酸である。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有すること

が好ましい。

[0049] 本発明の第一の態様のＤＮＡポリメラーゼをコードする核酸は、使用する宿主（ｈｏｓｔ）において発現可能かつＤＮＡポリメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするコドンであれば特に限定は無く、発現可能にするためまたは発現量を増加させるためにコドンの最適化を行ってもよい。該最適化は、本分野において通常使用されている方法によって行うことが好ましい。なお、コドンの最適化を行う場合、コードされているアミノ酸配列に変化が生じないようにする必要がある。

[0050] 本発明の第二の態様の核酸は、発現させたポリペプチドの精製を容易にするために、アフィニティタグをコードする核酸をさらに含んでいてもよい。本発明を何ら限定するものではないが、本発明の第二の態様の核酸としては、例えば、ヒスチジン（Ｈｉｓ）タグ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグ、マルトース結合タンパク質（ｍａｌｔｏｓｅ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ；ＭＢＰ）タグ、８残基のアミノ酸（Ｔｒｐ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｐｈｅ－Ｇｌｕ－Ｌｙｓ）からなるＳｔｒｅｐ（ｌｌ）タグなどをコードする核酸である。当該タグを付加する位置は、本発明のＤＮＡポリメラーゼをコードする核酸の５’末端および／または３’末端側のいずれでもよく、発現およびタグ機能の障害とならない位置に適宜付加すればよい。なお、該タグは、発現させた融合ポリペプチドの精製段階において切断できるタグが好ましい。本発明を何ら限定するものではないが、かかる切断できるタグとしては、例えば、Ｆａｃｒｏｒ Ｘａ、ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅａｓｅ、トロンビン（Ｔｈｒｏｍｂｉｎ）、エンテロキナーゼ（ｅｎｔｅｒｏｋｉｎａｓｅ）、ＴＥＶプロテアーゼ（Ｔｏｂａｃｃｏ Ｅｔｃｈ Ｖｉｒｕｓ Ｐｒｏｔｅａｓｅ）などの融合ポリペプチド切断用プロテアーゼの認識配列をコードする核酸を含むタグである。

[0051] 本発明の第三の態様は、本発明の第二の態様の核酸を含むベクターである。本発明の第二の態様の核酸を挿入するベクターとしては、本分野において

通常使用されている発現ベクターであれば、特に限定は無い。宿主細胞において自立複製が可能なベクターや宿主染色体に組み込まれ得るベクターを使用することができる。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等を使用することができる。プラスミドベクターとしては、使用する宿主に適したプラスミド、例えば大腸菌由来のプラスミド、バチルス属細菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミドが当業者に周知であり、また、市販されているものも多い。本発明にはこれら公知のプラスミドやその改変体を使用することができる。ファージベクターとしては、例えば、λファージ（例えば、Ｃｈａｒｏｎ４Ａ、Ｃｈａｒｏｎ２１Ａ、ＥＭＢＬ３、ＥＭＢＬ４、λｇｔ１０、λｇｔ１１、λＺＡＰ）等を使用することができ、ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスを使用することができる。発現ベクターに搭載するプロモーターは宿主に応じて選択することができ、例えば大腸菌ではｔｒｐプロモーター、Ｉａｃプロモーター、ＰＬプロモーター、ＰＲプロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーターやそれらの改変体を使用することができるが、前記のものに限定されるものではない。さらに、ファージ由来のプロモーターとＲＮＡポリメラーゼ遺伝子を組み合わせた発現系（例えばｐＥＴ発現系等）を利用してもよい。さらに、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞を宿主とする異種タンパク質発現系も数多く構築されており、また、すでに市販もされている。本発明の融合ポリペプチド等のＤＮＡポリメラーゼの製造にはこれらの発現系を使用してもよい。

[0052] 本発明の第四の態様は、本発明の第三の態様のベクターまたは本発明の第二の態様の核酸を含む形質転換体である。本発明の第三の態様のベクターによって形質転換される宿主または本発明の本発明の第二の態様の核酸を導入される宿主としては、本分野において通常使用されている宿主であれば、特に限定は無く、本発明の融合ポリペプチド等のＤＮＡポリメラーゼを発現し得る限り、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等のいずれを使

用してもよい。

[0053] 原核細胞を宿主細胞とする場合、例えば、エッシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ：大腸菌）等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）等のバチルス属、シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ）等のシュードモナス属、及びリゾビウム・メリロティ（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｍｅｌｉｌｏｔｉ）等のリゾビウム属に属する細菌を宿主細胞として使用することができる。異種タンパク質の製造に使用可能な大腸菌は当業者に周知であり、また、市販されているものも多い（例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＢＬ２１、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＸＬ２－Ｂｌｕｅ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＨ１、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＪＭ１０９、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＢ１０１等）。また、バチルス属細菌であるＢａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ＭＩ１１４、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　２０７－２１等、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｌｕｓ属細菌であるもＢｒｅｖｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｈｏｓｈｉｎｅｎｓｉｓ等が異種タンパク質の製造用宿主として知られている。これらの宿主細胞を適切な発現ベクターと組み合わせ、本発明の融合ポリペプチド等のＤＮＡポリメラーゼの製造に使用することができる。

[0054] 発現ベクターの宿主への導入方法としては、宿主に核酸を導入し得る方法であれば特に限定されず、例えば、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を使用することができる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法は、昆虫細胞にＤＮＡを導入し得る限り特に限定されず、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等を使用することができる。ファージベクターやウイルスベクターは、これらベクターに応じた方法で宿主細胞への感染を実施し、本発明の融合ポリペプチド等のＤＮＡポリメラーゼを発現する形質転換体を得ることができる。

[0055] 本発明の第五の態様は、本発明の第四の態様の形質転換体を培養し、培養物からＤＮＡポリメラーゼを採取することを特徴とするＤＮＡポリメラーゼ

の製造方法である。該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。培養条件は、使用する発現ベクター、宿主等に適した条件であれば特に限定はない。本発明を何ら限定するものではないが、例えば、ｐＥＴベクターにて大腸菌を形質転換した場合、形質転換体をＬＢ培地へ接種し、例えば３７℃にて振盪培養する。培養液のＯＤが０．２～０．３になった時点でＩＰＴＧを添加、目的タンパク質の発現を誘導するために、例えば３７℃で２～５時間、３７℃では発現量が少ない場合には１５～３０℃で２～２４時間、好ましくは２０～２５℃で４～５時間、あるいは発現量をさらに増やす目的には好ましくは２０～２５℃で１０～２０時間、振盪培養する。培養液を遠心分離し、得られた菌体を洗浄後、超音波破砕することによって本発明のＤＮＡポリメラーゼを得ることができる。破砕物は夾雑物が多いため、本分野において使用されている精製方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿法、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、アフィニティクロマトカラム、透析等を適宜組み合わせるによって精製を行うことが望ましい。

[0056] ２．本発明のＤＮＡポリメラーゼを用いる核酸増幅方法

本発明のＤＮＡポリメラーゼを用いた核酸増幅方法は、ＤＮＡ分子の製造に利用可能である。本発明を何ら限定するものではないが、前記本発明の核酸増幅方法の例としては、本発明のＤＮＡポリメラーゼおよび鋳型ＤＮＡを共にインキュベートする工程を含むＤＮＡ分子の製造方法である。ここで、該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。該方法は、さらにプライマーを含んでいてもよい。当該プライマーは、一種でも複数種でもよい。また、当該プライマーは、特異的プライマーでもランダムプライマーあるいはそれらの混合物でもよい。当該プライマーの種類は、目的に応じて適宜選択することができる。当該ＤＮＡ分子の製造方法は、本分野において通常使用されている方法であればよい。本発明を何ら限定するものではないが、前記本発明の核酸増幅方法は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応または等温核酸増幅反応に使用できる。

[0057] 本発明のＤＮＡポリメラーゼを利用する反応を実施する際には、通常、二価金属塩（マグネシウム塩等）、ｄＮＴＰ（デオキシリボヌクレオチド三リン酸）、ｐＨ維持のための緩衝成分等を含む反応液が調製される。二価金属塩を構成する二価金属イオンとしては、マグネシウムイオン、マンガンイオン、およびコバルトイオンが例示される。各ＤＮＡポリメラーゼに適する二価金属イオンとその濃度は、当該分野で知られている。二価金属イオンは塩化物、硫酸塩、または酢酸塩等の塩の形態で供給され得る。本発明を特に限定するものではないが、本発明の組成物中の二価金属イオンの濃度としては、例えば０．５～２０ｍＭが好ましく例示される。ｄＮＴＰとしては、ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＴＴＰ、もしくはそれらの誘導体の少なくとも１種が使用される。好適にはｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、およびｄＴＴＰの４種類の混合物が使用される。

[0058] プライマーを使用してＤＮＡ合成を実施する場合、鋳型となる核酸の核酸配列に相補的な配列を有しており、使用される反応条件において鋳型となる核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドがプライマーとして使用される。プライマーの鎖長は、ハイブリダイゼーションの特異性の観点から、好ましくは６ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは１０ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは１００ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは３０ヌクレオチド以下である。前記オリゴヌクレオチドは、例えば公知の方法により化学的に合成することができる。また、生物試料由来のオリゴヌクレオチドであっても良く、例えば天然の試料より調製したＤＮＡの制限エンドヌクレアーゼ消化物から単離して作製しても良い。

[0059] 本発明のＤＮＡポリメラーゼは好ましくは優れた鎖置換活性を有していることから、二本鎖核酸を鋳型とした等温条件下でのＤＮＡ合成に特に有用である。下記実施例３に記載のとおり、微生物ゲノムＤＮＡを鋳型として、等温条件下で長鎖長のＤＮＡを合成することができる。当該長鎖長のＤＮＡは、ゲノム解析やゲノム編集用のＤＮＡとして有用である。

[0060] さらに本発明の核酸増幅方法は、リアルタイム検出技術と組み合わせてもよい。当該リアルタイム検出では、インターカーレーターや蛍光標識プローブを使用して、増幅反応と並行して増幅産物が経時的に検出される。インターカーレーターとしてはＳＹＢＲ（登録商標） Ｇｒｅｅｎ Ｉやその他の核酸結合性色素が、蛍光標識プローブとしてはＣｙＣｌｅａｖｅ（登録商標）プローブあるいはモレキュラービーコンプローブ等が、それぞれ挙げられる。

[0061] ３．本発明のキット

本発明のキットは、本発明のＤＮＡポリメラーゼを含むキットである。ここで、該ＤＮＡポリメラーゼは鎖置換活性を有することが好ましい。本発明を何ら限定するものではないが、当該キットには、本発明のＤＮＡポリメラーゼに加えて、上記反応に使用するプライマー、二価金属塩、ｄＮＴＰ、緩衝液、滅菌水等反応に必要な試薬類、陽性コントロール用の天然のまたは人工の鋳型ＤＮＡおよび容器である滅菌チューブをさらに含んでいてもよい。さらに、本発明のＤＮＡポリメラーゼ、二価金属塩、ｄＮＴＰ、緩衝成分などを混合し、使用時に鋳型ＤＮＡと水（滅菌水等）を添加するのみで使用可能な組成物を含むキットも本発明に包含される。

[0062] さらに本発明のキットは、インターカーレーターや蛍光標識プローブを含有していてもよい。インターカーレーターとしてはＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ Ｉやその他の核酸結合性色素が、蛍光標識プローブとしては、ＣｙＣｌｅａｖｅ（登録商標）プローブあるいはモレキュラービーコンプローブ等が、それぞれ挙げられる。

実施例

[0063] 以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

[0064] 実施例１ ＳＤ活性を有するＴａｑポリメラーゼの作製

（１）ポリメラーゼ変異体プラスミドの調製

Ｔａｑポリメラーゼ（ＧｅｎＢａｎｋ Ｎｏ．：ＡＡＡ２７５０７のアミ

ノ酸配列中のＰ６８５～Ｅ６８７の領域に注目し、以下に示す変異体を作製した。すなわち、配列表の配列番号４記載の塩基配列を有するＴａｑ　ｌａｒｇｅ　ｆｒａｇｍｅｎｔ（Ｎ末端から２８９残基までのアミノ酸を欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ；以下、ＴａｑＬＦと表記することがある）が挿入されたｐＥＴ２４ａプラスミド（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）を調製した。当該プラスミドを、ｐＥＴ－ＴａｑＬＦプラスミドと称す。このプラスミドをもとに、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｋｉｔ（アジレント・バイオテクノロジー社製）を用いて部位特異的変異を導入した。

[0065] またＴａｑ５５～Ｔａｑ５９変異体は、前述のｐＥＴ－ＴａｑＬＦプラスミドを鋳型ＤＮＡとし、表１記載の変異導入用プライマーセットの組み合わせで部位特異的変異を行った。作製時のＰＣＲ条件は、９５℃；３０秒、５５℃；６０秒、６８℃；８分を１サイクルとし、１４サイクル行った。反応終了後、反応液の１μｌを用いてＥ．ｃｏｌｉ　ＪＭ１０９株（タカラバイオ社製）を形質転換し、ＬＢ－カナマイシンプレートに撒いた。生じたコロニーからプラスミドを精製し、塩基配列を解析し、目的の配列が得られていることを確認した。

[0066] [表1]

#	変異体名称	変異箇所	プライマー１	プライマー２
1	Ｔａｑ５５（配列番号５）	Ｅ６８７Ａ	ＴａｑＰＹＡ－５（配列番号１０）	ＴａｑＰＹＡ－３（配列番号１１）
2	Ｔａｑ５６（配列番号６）	Ｅ６８７Ｋ	ＴａｑＰＹＫ－５（配列番号１２）	ＴａｑＰＹＫ－３（配列番号１３）
3	Ｔａｑ５７（配列番号７）	Ｙ６８６Ｒ、Ｅ６８７Ｋ	ＴａｑＰＲＫ－５（配列番号１４）	ＴａｑＰＲＫ－３（配列番号１５）
4	Ｔａｑ５８（配列番号８）	Ｐ６８５Ｓ、Ｙ６８６Ｒ、Ｅ６８７Ｋ	ＴａｑＳＲＫ－５（配列番号１６）	ＴａｑＳＲＫ－３（配列番号１７）
5	Ｔａｑ５９（配列番号９）	Ｐ６８５Ｒ、Ｙ６８６Ｒ、Ｅ６８７Ｒ	ＴａｑＲＲＲ－５（配列番号１８）	ＴａｑＲＲＲ－３（配列番号１９）

[0067] さらに、Ｔａｑ５９変異体をベースにＴａｑ６２～Ｔａｑ６５変異体を作

成した。すなわち、Ｔａｑ６２変異体は、実施例１（１）記載のｐＥＴ２８－ＴａｑＬＦプラスミドを鋳型ＤＮＡとし、表２記載の配列番号２４および２５の組み合わせ、配列番号２６および２７の組み合わせあるいは配列番号２８および２９の組み合わせの変異導入用プライマーセットで３回部位特異的変異を行った。Ｔａｑ６３～Ｔａｑ６５変異体もＴａｑ６２同様、表２記載の変異導入用プライマーセットで部位特異的変異を行った。変異導入および精製は、前述の操作と同じである。

[0068] [表2]

#	変異体名称	変異箇所	プライマー１	プライマー２
6	Ｔａｑ６２（配列番号２０）	Ｈ６７６Ｙ、Ｐ６８５Ｒ、Ｙ６８６Ｒ、Ｅ６８７Ｒ、Ｅ７４２Ａ	ＴａｑＡＹＲ－５（配列番号２４）	ＴａｑＡＹＲ－３（配列番号２５）
			ＴａｑＲＲＲ－５（配列番号２６）	ＴａｑＲＲＲ－３（配列番号２７）
			ａａ５（配列番号２８）	ａａ３（配列番号２９）
7	Ｔａｑ６３（配列番号２１）	Ｈ６７６Ｙ、Ｐ６８５Ｒ、Ｙ６８６Ｒ、Ｅ６８７Ｒ、Ｅ７４２Ｈ	ＴａｑＡＹＲ－５（配列番号３０）	ＴａｑＡＹＲ－３（配列番号３１）
			ＴａｑＲＲＲ－５（配列番号３２）	ＴａｑＲＲＲ－３（配列番号３３）
			ｈａ５（配列番号３４）	ｈａ３（配列番号３５）
8	Ｔａｑ６４（配列番号２２）	Ｈ６７６Ｙ、Ｐ６８５Ｒ、Ｙ６８６Ｒ、Ｅ６８７Ｒ、Ｅ７４２Ｈ、Ａ７４３Ｋ	ＴａｑＡＹＲ－５（配列番号３０）	ＴａｑＡＹＲ－３（配列番号３１）
			ＴａｑＲＲＲ－５（配列番号３２）	ＴａｑＲＲＲ－３（配列番号３３）
			ｈｋ５（配列番号３６）	ｈｋ３（配列番号３７）
9	Ｔａｑ６５（配列番号２３）	Ｈ６７６Ｙ、Ｐ６８５Ｒ、Ｙ６８６Ｒ、Ｅ６８７Ｒ、Ｅ７４２Ｒ、Ａ７４３Ｒ	ＴａｑＡＹＲ－５（配列番号３０）	ＴａｑＡＹＲ－３（配列番号３１）
			ＴａｑＲＲＲ－５（配列番号３２）	ＴａｑＲＲＲ－３（配列番号３３）
			ｒｒ５（配列番号３８）	ｒｒ３（配列番号３９）

[0069] （２）変異Ｔａｑポリメラーゼの産生および精製

変異Ｔａｑポリメラーゼの産生は、以下の様に行った。実施例１（２）で

調製した変異体プラスミドを用いて取扱説明書に沿ってＥ．　ｃｏｌｉ　ＢＬ２１－ＣｏｄｏｎＰｌｕｓ－ＲＩＬ株（アジレント・バイオテクノロジー社製）を形質転換した。

この培養液のＯＤ６００が０．２～０．３となったところでＩＰＴＧ（和光純薬社製）を終濃度１ｍＭとなるよう添加した。目的タンパク質遺伝子の発現を誘導するために２５℃で１４時間振とう培養し、培養液を遠心分離（５０００×ｇ、１０分間）して集菌した。得られた菌体をＰＢＳ溶液（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Na_2HPO_4、２ｍＭ　NaH_2PO_4、ｐＨ７．５）で洗浄した。菌体を溶液Ａ［５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．０、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１ｍＭ　フッ化フェニルメチルスルホニル（ｐｈｅｎｙｌｍｅｔｈｙｌｓｕｌｆｏｎｙｌ　ｆｌｕｏｒｉｄｅ、ＰＭＳＦ（和光純薬社製）］に懸濁し、氷上で超音波により菌体を破砕した。破砕液を遠心分離（２３，７００×ｇ、４℃、１０分間）し、その上清を８０℃、２０分間熱処理し、遠心分離（２３，７００×ｇ、４℃、１０分間）した。得られた上清に塩化ナトリウムを終濃度１Ｍとなるように添加し、その液へ終濃度が０．１５％（ｗ／ｖ）となるように５％ポリエチレンイミン（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）溶液を添加後、氷上に３０分間静置した。遠心分離（２３，７００×ｇ、４℃、１０分間）により得られた上清に硫酸アンモニウムを８０％飽和溶液となるように添加した。遠心分離（２３，７００×ｇ、４℃、１０分間）後、沈殿を溶液Ｂ［５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ　８．０、１Ｍ　$(NH_4)_2SO_4$］に溶解し、溶液Ｂで平衡化した疎水性カラム　ＨｉＴｒａｐ　Ｂｕｔｙｌ　ＦＦ（ＧＥヘルスケア社製）　５ｍｌに供し、１Ｍから０Ｍまでの硫酸アンモニウム濃度勾配によってタンパク質を溶出させた。溶出画分を溶液Ｃ［５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ　８．０、５０ｍＭ　ＮａＣｌ］で透析用セルロースチューブを用いて透析し、溶液Ｃで平衡化したアフィニティカラム　ＨｉＴｒａｐ　Ｈｅｐａｒｉｎ　ＨＰ（ＧＥヘルスケア社製）　１ｍｌに供し、５０ｍＭから１Ｍまでの塩化ナトリウム濃度勾配によってタ

ンパク質を溶出させた。溶出画分を溶液Ｃで透析し、最後に陰イオン交換カラムＨｉＴｒａｐ　Ｑ　ＨＰ（ＧＥヘルスケア社製）　１ｍｌに供し、５０ｍＭから０．５Ｍまでの塩化ナトリウム濃度勾配によってタンパク質を溶出させた。得られたタンパク質は、１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、定法に従ってＣＢＢ染色を行い、純度を検定した。Ｔａｑ５５～Ｔａｑ５９およびＴａｑ６２～６５を上記方法にて、タンパク質を産生および精製した。その結果を図１に示した。

[0070] 図１に示したように、産生されたタンパク質は単一のバンドを示し、精製されていることが確認された。また、得られた変異体Ｔａｑ５５～５９、６２～６５のアミノ酸配列を配列表の配列番号４０～４８に示した。

[0071] （３）プライマー伸長活性

野生型および変異型のＴａｑＬＦのプライマー伸長活性測定には、5’末端を［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰを用いて放射性標識させた５５ｎｔのオリゴヌクレオチド（Ｍ１３－ｐｒｉ５５、配列番号４９）を２，９６１ｎｔの環状一本鎖ＤＮＡ［ｐＢｌｕｅＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ（＋）（アジレント・バイオテクノロジー社製）］にアニールさせたプライムドＤＮＡ（ｐｒｉｍｅｄ－ＤＮＡ）を基質ＤＮＡとして用いた。

反応液Ｄ　２０μｌ［２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ　８．８、１０ｍＭ　ＫＣｌ、３．５ｍＭ　$MgCl_2$、０．１ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、０．１％Ｔｗｅｅｎ　２０、５ｎＭ　ｐｒｉｍｅｄ－ＤＮＡおよび０．２５ｍＭ　ｄＮＴＰ］中で１０ｎＭになるように野生型ＴａｑＬＦまたは変異型ＴａｑＬＦを混合し、７２℃で２．５分間または１０分間反応させた。各反応混合液８μｌあたり反応停止液［３００ｍＭ　ＮａＯＨ、６ｍＭ　ＥＤＴＡ、１８％Ｆｉｃｏｌｌ　４００、０．１５％ｂｒｏｍｏｃｒｅｓｏｌ　ｇｒｅｅｎおよび０．２４％ｘｙｌｅｎｅ　ｃｙａｎｏｌ］　２μｌを加えることで反応を停止させた。これを０．８％アルカリアガロースゲルに供し、アルカリ溶液［５０ｍＭ　ＮａＯＨおよび１ｍＭ　ＥＤＴＡ］中で電気泳動した。電気泳動後、ゲルを乾燥させ、乾燥ゲルをイメージングプレート（ＦＵＪＩ

ＦＩＬＭ社製）に露光させた。Ｔｙｐｈｏｏｎ　ＴＲＩＯ＋（ＧＥヘルスケア社）を用いて、合成されたＤＮＡを検出した。野生型及び各変異Ｔａｑポリメラーゼのプライマー伸長活性の結果を図２－１および図２－２に示した。

[0072] 図２－１に示したように、ＴａｑＬＦ　ＷＴは、２．５分の反応ですでに鋳型一周分の３．２ｋｂになっており、１０分の反応で３．８ｋｂの濃いバンドと６ｋｂの位置に薄いバンドが検出された。

一方、Ｔａｑ５５は２．５分の反応で、３．４ｋｂまで伸長した。１０分では４．３ｋｂの位置まで濃いバンドが、７ｋｂの位置まで薄いバンドが見られた。

Ｔａｑ５６は２．５分の反応で、４．３ｋｂまで伸長した。１０分では６．５ｋｂの位置まで濃いバンドが、９ｋｂの位置まで薄いバンドが見られた。

Ｔａｑ５７は２．５分の反応で、６．５ｋｂまで伸長した。１０分では１０ｋｂ以上の位置まで濃いバンドが見られた。

Ｔａｑ５８は２．５分の反応で、７．０ｋｂまで伸長した。１０分では１０ｋｂ以上の位置まで濃いバンドが見られた。

Ｔａｑ５９は２．５分の反応で、８．０ｋｂまで伸長した。１０分では１０ｋｂ以上の位置まで濃いバンドが見られた。

[0073] ＴａｑＬＦ　ＷＴの鋳型ＤＮＡ結合部位の配列はＰＹＥであり、荷電は－１である。Ｔａｑ５５の荷電は０、Ｔａｑ５６の荷電は＋１、Ｔａｑ５７およびＴａｑ５８の荷電は＋２、Ｔａｑ５９の荷電は＋３である。このことから荷電が正になるにつれ、伸長活性が大きくなり、ＳＤ活性も増大することがわかった。

[0074] さらに伸長活性の増大についてＴａｑ５９、Ｔａｑ６２～Ｔａｑ６５について検討した。評価方法は、前記で述べた方法と同じである。すなわち、図２－２に示したように、変異体Ｔａｑ５９のＥ７４２あるいはＥ７４２およびＡ７４３部位についてアミノ酸を正荷電に変異させたＴａｑ６２～Ｔａｑ

６５について、Ｔａｑ５９よりも鎖置換活性の改善が見られた。以上のことから、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼの鋳型ＤＮＡ結合部位に相当する６８５～６８７位のアミノ酸配列の置換とその他の部位のアミノ酸配列の置換を組み合わせることにより、鎖置換活性を向上できることが確認できた。

[0075] 実施例２　ゲルシフト法によるプライムドＤＮＡとの結合能の測定

ゲルシフトアッセイを用いて変異ＴａｑポリメラーゼとプライムドＤＮＡとの親和性を調べた。測定は以下のようにして行った。

まず、ＤＮＡ結合能測定の基質は、５’末端を^{32}Ｐで放射性標識させた２７ｎｔの一本鎖ＤＮＡ（ｄ２７、配列番号５０）と非標識の４９ｎｔの一本鎖ＤＮＡ（４９Ｎ、配列番号５１）をアニールさせたＤＮＡを基質ＤＮＡとして使用した。２ｎＭ　基質ＤＮＡを含む溶液Ｅ　［２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ　８．８、１０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$MgCl_2$、１４ｍＭ　２－ｍｅｒｃａｐｔｏｅｔｈａｎｏｌ、０．１ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡおよび５％（ｖ／ｖ）ｇｌｙｃｅｒｏｌ］１０μｌ中でＤＮＡポリメラーゼタンパク質を０．６～４００ｎＭになるよう加え、４０℃で５分間恒温させた。ＤＮＡ－酵素混合液を１％アガロースゲルに供し、０．１×ＴＡＥ溶液［４ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｂａｓｅ、２ｍＭ　ａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄおよび０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ］中で電気泳動した。電気泳動終了後、ゲルを乾燥させ、乾燥させたゲルをイメージングプレートに露光させた。Ｔｙｐｈｏｏｎ　ＴＲＩＯ＋を用いて、標識ＤＮＡを検出した。

[0076] ゲルシフトアッセイの結果を図３に示した。

以前の結果［フロンティアーズ　イン　マイクロバイオロジー（Ｆｒｏｎｔ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．）、第５巻、４６１ページ（２０１４年）、ｄｏｉ：　１０．３３８９／ｆｍｉｃｂ．２０１４．００４６１］から、野生型Ｔａｑポリメラーゼとプライムドの見かけの解離定数Ｋｄ値は、４００ｎＭであった。

一方、Ｔａｑ５５～Ｔａｑ５９変異体では、領域内の荷電が＋２のＴａｑ５７およびＴａｑ５８は、Ｔａｑ５７のシフトバンドはみられないものの、

４００ｎＭのタンパク質の添加ではプライムドＤＮＡの量が減少していた。Ｔａｑ５８では、２５ｎＭのタンパク質量でシフトバンドが現れ、見かけのＫｄ値は１００ｎＭであった。

次に、荷電が＋３のＴａｑ５９では、２５ｎＭのタンパク質で、明らかなシフトバンドがあらわれ、４００ｎＭでは２段階のシフトが見られた。見かけのＫｄ値は、４０ｎＭであった。

以上の結果から、プライマー伸長活性とゲルシフトには相関があった。

[0077] 実施例３　Ｔａｑ５９ポリメラーゼを用いたゲノムＤＮＡの増幅

（１）既知Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼとの比較

実施例１で調製したＴａｑ５９を用いてＰｆｕ　ゲノムＤＮＡを鋳型としてＤＮＡ増幅をおこなった。反応液組成は、８ｎＭ　Ｔａｑ５９ポリメラーゼ、ｘ１　ＳＤ　ｂｕｆｆｅｒ、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、１０ｎｇ　Ｐｆｕ　ゲノムＤＮＡ、１０μＭ　ｐｄ（Ｎ）６、０．２５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡである。反応は、（Ａ）５０℃；６時間または（Ｂ）３０℃；６０秒、６８℃；６０秒を９９サイクル行った。また、対照サンプルとして、配列表の配列番号１記載のアミノ酸配列を有する野生型Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、配列表の配列番号３記載のアミノ酸配列を有するＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ　Ｌａｒｇｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔおよび市販品のＳＤ活性を有するＳＤ－ポリメラーゼ（ＢＩＯＲＯＮ社製）も使用した。

[0078] 生成物は、０．７％アガロースゲルで分離し、ＳＹＢＲ（登録商標）　Ｇｏｌｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｇｅｌ　Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）で染色した。結果を図４に示した。

[0079] 図４（Ａ）および（Ｂ）に示したように、それぞれの条件において、野生型Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ　Ｌａｒｇｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔおよびｓｄ－ポリメラーゼでは増幅バンドは得られなかったが、本発明のＴａｑ５９はアプライしたウェルとゲルとの境にバンドが得られた。

[0080] 次に、アルカリアガロースゲルを用いて生成物を解析した。

まず、伸長温度を（Ａ）５０℃および（Ｂ）７０℃の２通りで行った。反応は、３２ｎＭ ポリメラーゼ、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．８、１０ｍＭ ＫＣｌ、３．５ｍＭ $MgCl_2$、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、０．５ｍＭ ｄＮＴＰｓ、１０ｎｇ Ｐｆｕ ｇｅｎｏｍｅ ＤＮＡ、１０μＭ ｐｄ（Ｎ）６、０．２５ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡを含む液量２０μｌの反応液で４０℃；１０秒、５０℃；１分、５０℃または７０℃；５分を６０サイクル行った。得られた生成物を０．８％アルカリアガロースゲル電気泳動に供し、ＳＹＢＲ（登録商標） Ｇｒｅｅｎ ＩＩ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｇｅｌ Ｓｔａｉｎ（タカラバイオ社製）により染色した。結果を図５に示した。

[0081] 図５に示したように、５０℃の伸長温度では、野生型Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼおよびＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼ Ｌａｒｇｅ ＦｒａｇｍｅｎｔではほとんどＤＮＡが増幅されなかったが、本発明のＴａｑ５９では２３．１ｋｂのマーカーとウェルの間に高分子ＤＮＡの増幅が見られた。

７０℃の伸長温度では、野生型Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼでは２３ｋｂまでの広範囲にＤＮＡが増幅された。一方、Ｔａｑ ｌａｒｇｅ ｆｒａｇｍｅｎｔではＤＮＡは増幅されなかった。Ｔａｑ５９では、２３．１ｋｂのマーカーとウェルの間に高分子ＤＮＡの増幅が見られた。このように、本発明のＤＮＡポリメラーゼは高い耐熱性を有することが分かった。さらに、本発明のＤＮＡポリメラーゼは２３ｋｂ以上という長鎖長のＤＮＡであっても効率良く複製できることが分かった。

[0082] 次に、Ｔａｑ５９の濃度を１～３２ｎＭの範囲でＤＮＡの増幅を行った。

反応組成は、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ， ｐＨ８．８、１０ｍＭ ＫＣｌ、３．５ｍＭ $MgCl_2$、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、０．５ｍＭ ｄＮＴＰｓ、１０ｎｇ Ｐｆｕ ｇｅｎｏｍｅ ＤＮＡ、１０μＭ ｐｄ（Ｎ）６、０．２５ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡである。反応は、５０℃で６時間行った。生成物（［００８２］）を０．８％ アルカリアガロースゲル電気泳動に供し、ＳＹＢＲ（登録商標） Ｇｒｅｅｎ ＩＩ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ

Ｇｅｌ　Ｓｔａｉｎにより染色した。その結果を図６に示した。

[0083] 図６に示したようにＴａｑ５９の濃度が１～８ｎＭまでは酵素濃度に比例してバンドの濃度が濃くなり、それ以上の濃度では一定であった。バンドの位置は、ウェルよりは下にあった。

[0084] （２）ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼとの比較

本発明のＴａｑ５９と市販のｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼについて比較した。本実験で使用したｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼはニュー・イングランド・バイオラボ社製（商品名：ｐｈｉ２９　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ）であり、非常に強い鎖置換活性を有することが知られている。

反応は、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，　ｐＨ７．５、１０ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、１０ｍＭ　$MgCl_2$、４ｍＭ　ＤＴＴ、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、１０ｎｇ　Ｐｆｕ　ｇｅｎｏｍｅ　ＤＮＡ、１０μＭ　ｐｄ（Ｎ）６、０．２５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡを含む容量２０μｌの反応液を用いた。反応液に１０Ｕの前記市販ポリメラーゼを加え、反応は３０℃で１８時間行った。生成物および［００８２］の生成物を０．８％アルカリアガロースゲル電気泳動に供し、ＳＹＢＲ（登録商標）　Ｇｒｅｅｎ　ｌｌ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｇｅｌ　Ｓｔａｉｎにより染色した。その結果を図６に示した。

[0085] 図６に示したように、ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼは２３ｋｂのマーカーとウェルの間にＤＮＡが増幅された。一方、本発明のＴａｑ５９は、ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼと比較して、増幅産物量が多いことが確認できた。このことから、本発明の鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼがｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼよりゲノム増幅に適していることが確認できた。このように、本発明のＤＮＡポリメラーゼは強力な鎖置換活性を有することが分かった。

産業上の利用可能性

[0086] 本発明の鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼが高耐熱性を有し、鋳型ＤＮＡの効率的な長鎖複製が可能であり、かつ強力な鎖置換活性を有することにより、鋳型ＤＮＡの効率的な長鎖複製が可能となった。当該鎖置換活性

を有するＤＮＡポリメラーゼは、遺伝子工学、生物学、医学、農業等幅広い分野において有用である。

配列表フリーテキスト

[0087] 配列番号１：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｔａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｗｉｌｄ ｔｙｐｅ

配列番号２：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｔａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｗｉｌｄ ｔｙｐｅ

配列番号３：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｔａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｌａｒｇｅ ｆｒａｇｍｅｎｔ

配列番号４：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｔａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｌａｒｇｅ ｆｒａｇｍｅｎｔ

配列番号５：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５５

配列番号６：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５６

配列番号７：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５７

配列番号８：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５８

配列番号９：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５９

配列番号１０：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＰＹＡ－５

配列番号１１：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＰＹＡ－３

配列番号１２：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＰＹＫ－５

配列番号１３：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＰＹＫ－３

配列番号１４：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＰＲＫ－５

配列番号１５：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＰＲＫ－３

配列番号１６：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＳＲＫ－５

配列番号１７：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＳＲＫ－３

配列番号１８：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＲＲＲ－５

配列番号１９：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＲＲＲ－３

配列番号２０：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６２

配列番号２１：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６３

配列番号２２：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６４

配列番号２３：Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６５

配列番号２４：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＡＹＲ－５

配列番号２５：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＡＹＲ－３

配列番号２６：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＲＲＲ－５

配列番号２７：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＲＲＲ－３

配列番号２８：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ａａ５

配列番号２９：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ａａ３

配列番号３０：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＡＹＲ－５

配列番号３１：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＡＹＲ－３

配列番号３２：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＲＲＲ－５

配列番号３３：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ＴａｑＲＲＲ－３

配列番号３４：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ｈａ５

配列番号３５：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ｈａ３

配列番号３６：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ｈｋ５

配列番号３７：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ｈｋ３

配列番号３８：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ｒｒ５

配列番号３９：Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｐｒｉｍｅｒ ｒｒ３

配列番号４０：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ

ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５５

配列番号４１：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５６

配列番号４２：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５７

配列番号４３：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５８

配列番号４４：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ５９

配列番号４５：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６２

配列番号４６：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６３

配列番号４７：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６４

配列番号４８：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｖａｒｉａｎｔ Ｔａｑ６５

配列番号４９：５５ｎｔ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ｍ１３－ｐｒｉ５５

配列番号５０：２７ｎｔ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｄ２７

配列番号５１：４９ｎｔ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ４９Ｎ

配列番号５２：Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆｕｒｉｏｓｕｓ ＲＦＣ－Ｌ ＰＩＰ－ｂｏｘ

請求の範囲

[請求項1] ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列において、鋳型ＤＮＡ結合部位にその電荷の総和が増加するようなアミノ酸置換を有し、かつ５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を有さないＤＮＡポリメラーゼ、または該ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性を有するＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項2] さらに鎖置換活性を有する請求項１記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項3] 鋳型ＤＮＡ結合部位のアミノ酸のうち、少なくとも１残基がアルギニン、リジン、ヒスチジン、セリンおよびアラニンから選択されるアミノ酸残基に置換されている請求項１または２記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項4] 鋳型ＤＮＡ結合部位が、配列表の配列番号１で示されるＴｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓ　（Ｔａｑ）　ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列の６８５～６８７番目のアミノ酸に相当する部位である請求項１～３のいずれか１項に記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項5] Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列の

（１）６８５番目のプロリンに相当するアミノ酸のアルギニンまたはセリンへの置換、

（２）６８６番目のチロシンに相当するアミノ酸のアルギニンへの置換、および

（３）６８７番目のグルタミン酸に相当するアミノ酸のアルギニン、リジンまたはアラニンへの置換、

からなる群より選択される１以上の置換を有する請求項４記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項6] ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼが、耐熱性のＤＮＡポリメラーゼである請求項１記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項7] 前記ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼが、Ｔｈｅｒｍｕｓ属細菌のＤＮＡポリメラーゼである請求項６記載のＤＮＡポリメラー

ゼ。

[請求項8] 前記ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼが、野生型のファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼのＮ末端側配列が欠失したＤＮＡポリメラーゼである請求項６または７記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項9] 前記ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼが、Ｎ末端側配列が欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼである請求項８記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項10] 前記ファミリーＡに属するＤＮＡポリメラーゼが、Ｎ末端から２８９残基までのアミノ酸を欠失したＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼである請求項９記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項11] 配列表の配列番号４０～４８のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む請求項１記載のＤＮＡポリメラーゼ。

[請求項12] 請求項１～１１いずれか１項に記載のＤＮＡポリメラーゼをコードする塩基配列を含む核酸。

[請求項13] 配列表の配列番号５～９および２０～２３のいずれかに示される塩基配列を含む請求項１記載のＤＮＡポリメラーゼをコードする核酸。

[請求項14] 請求項１２または１３記載の核酸を含むベクター。

[請求項15] 請求項１４記載のベクター、または請求項１２または１３記載の核酸を含む形質転換体。

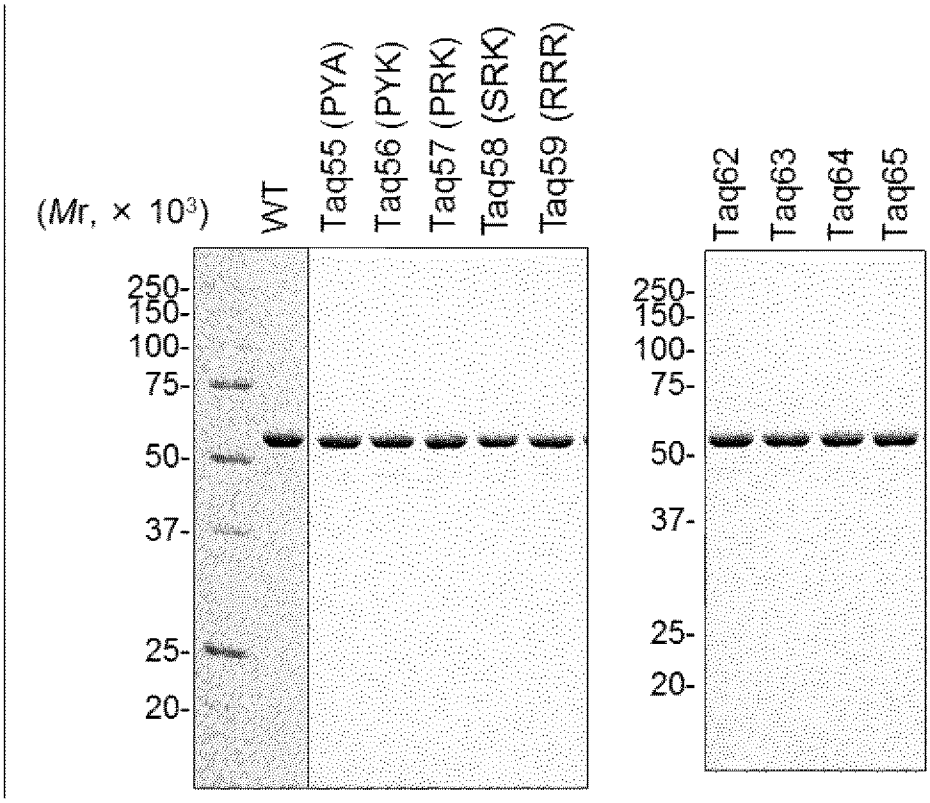
[請求項16] 請求項１５記載の形質転換体を培養し、培養物からＤＮＡポリメラーゼを採取することを特徴とするＤＮＡポリメラーゼの製造方法。

[請求項17] 請求項１～１１いずれか１項に記載のＤＮＡポリメラーゼおよび鋳型ＤＮＡを共にインキュベートする工程を含むＤＮＡ分子の製造方法。

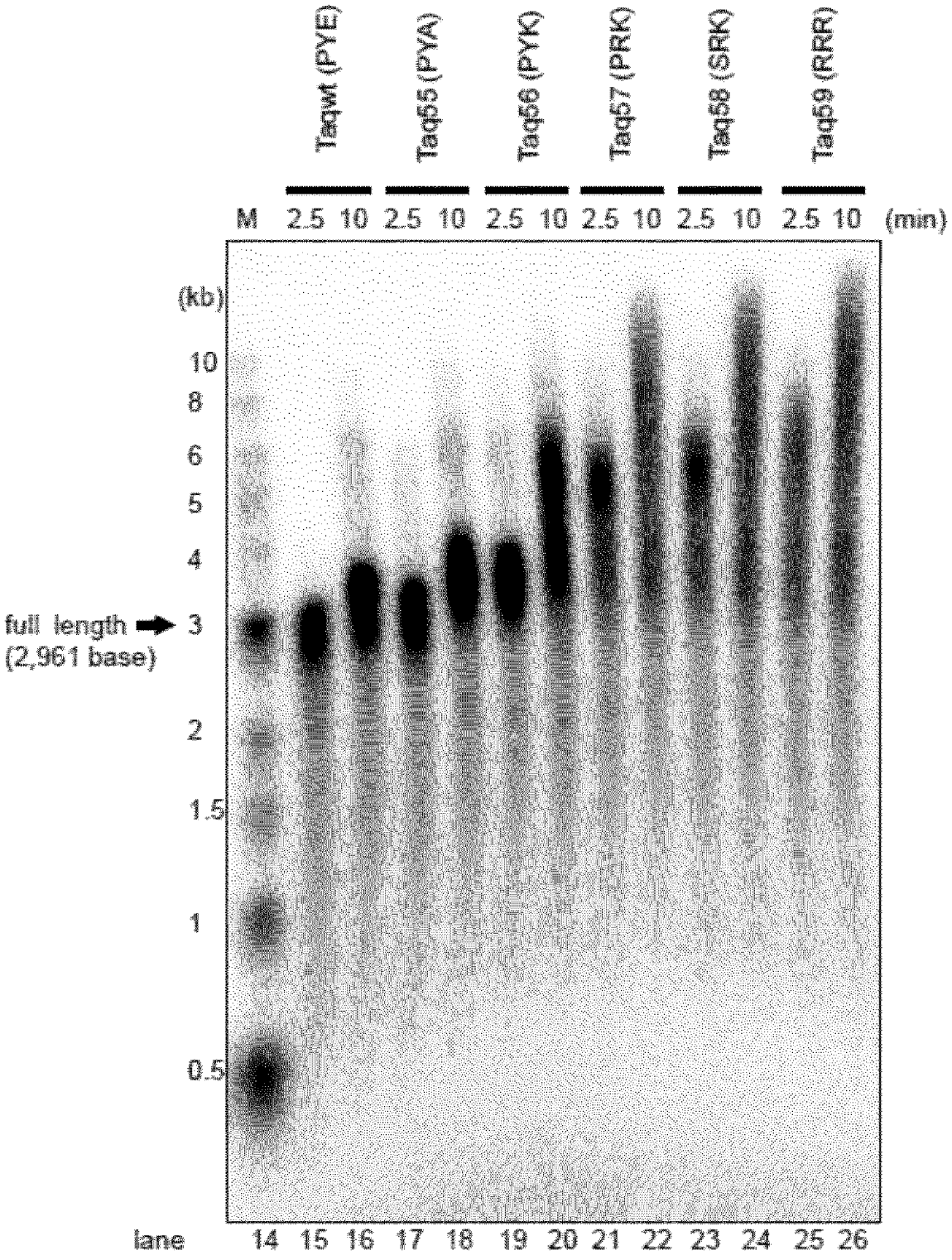
[請求項18] 前記製造方法がポリメラーゼ連鎖反応または等温核酸増幅反応で実施される請求項１７記載の製造方法。

[請求項19] 請求項１～１１いずれか１項に記載のＤＮＡポリメラーゼを含むキット。

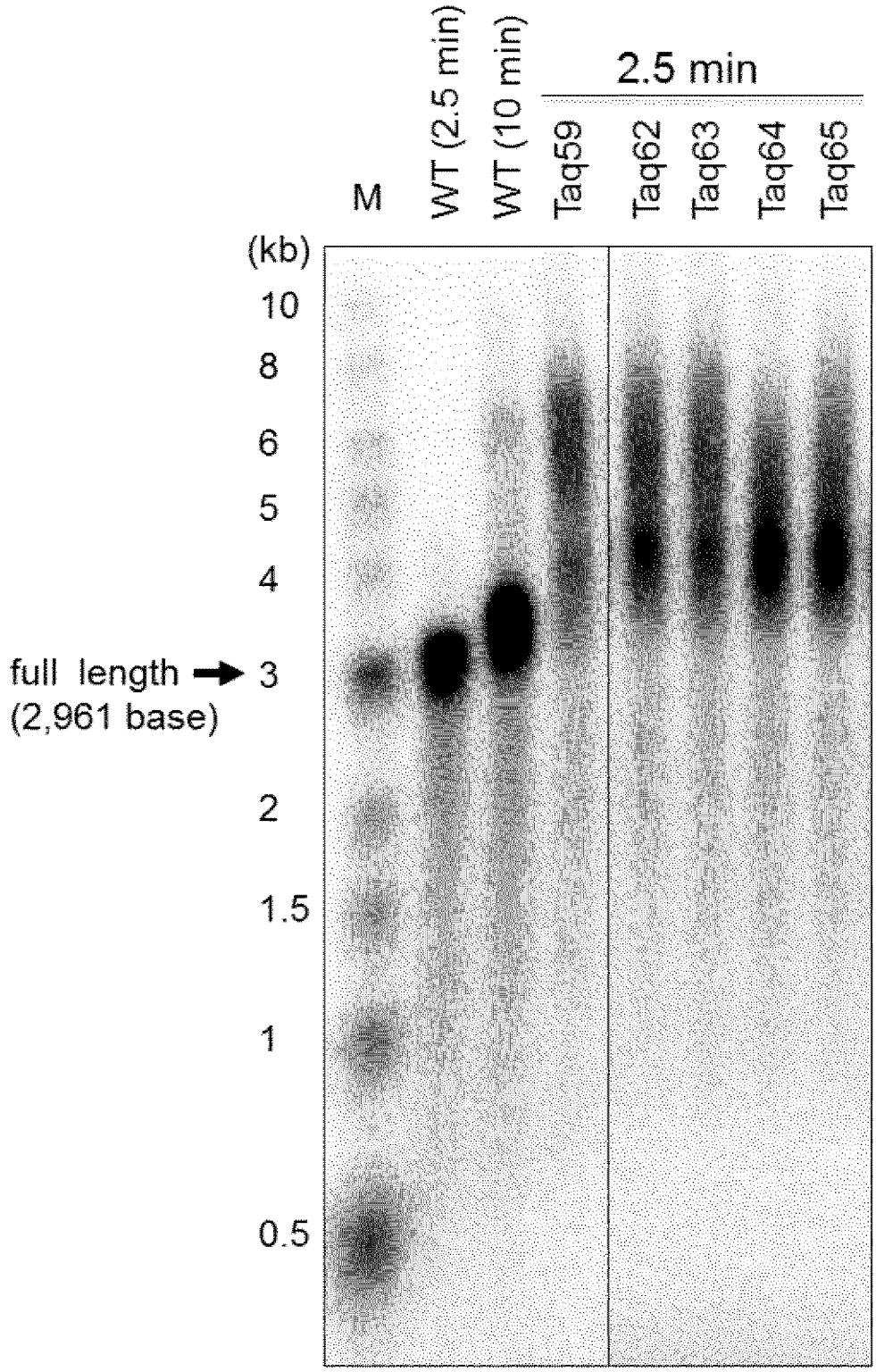
[図1]


(Mr, × 10³)
WT
Taq55 (PYA)
Taq56 (PYK)
Taq57 (PRK)
Taq58 (SRK)
Taq59 (RRR)
Taq62
Taq63
Taq64
Taq65
250-
150-
100-
75-
50-
37-
25-
20-

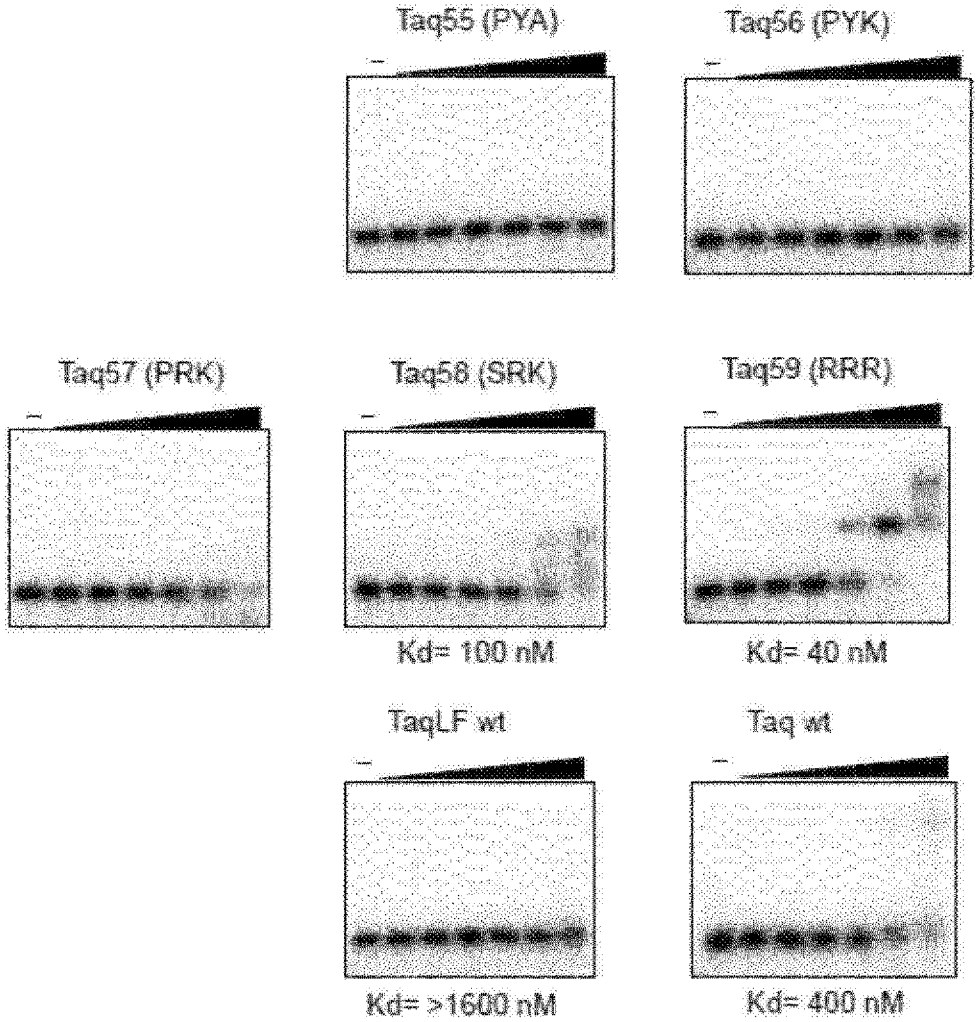
[図2-1]


Taqwt (PYE)
Taq55 (PYA)
Taq56 (PYK)
Taq57 (PRK)
Taq58 (SRK)
Taq59 (RRR)
M 2.5 10 2.5 10 2.5 10 2.5 10 2.5 10 2.5 10 (min)
(kb)
10
8
6
5
4
full length
(2,961 base)
3
2
1.5
1
0.5
lane 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

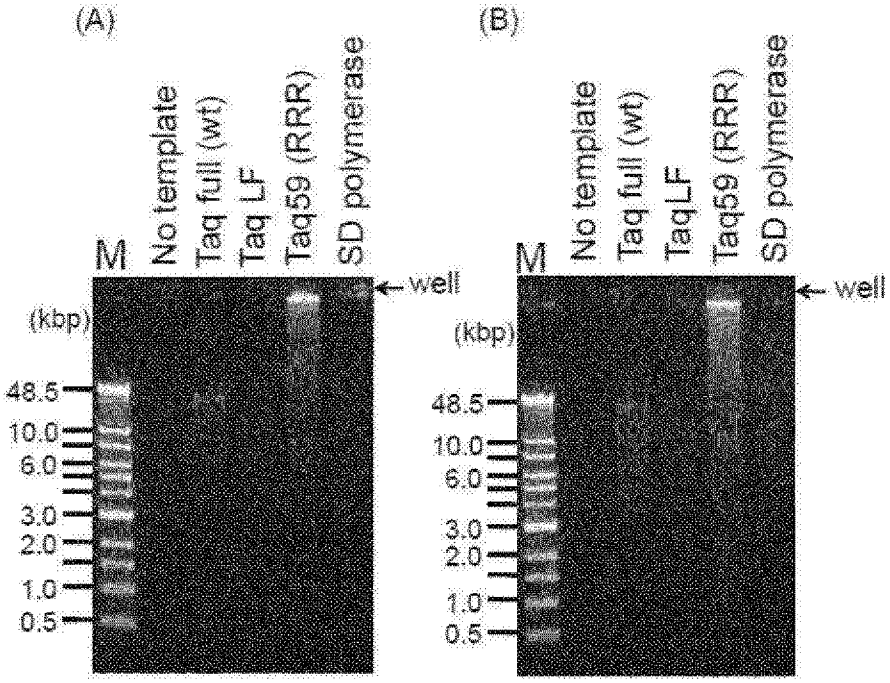
[図2-2]


M
WT (2.5 min)
WT (10 min)
2.5 min
Taq59
Taq62
Taq63
Taq64
Taq65
(kb)
10
8
6
5
4
3
2
1.5
1
0.5
full length
(2,961 base)

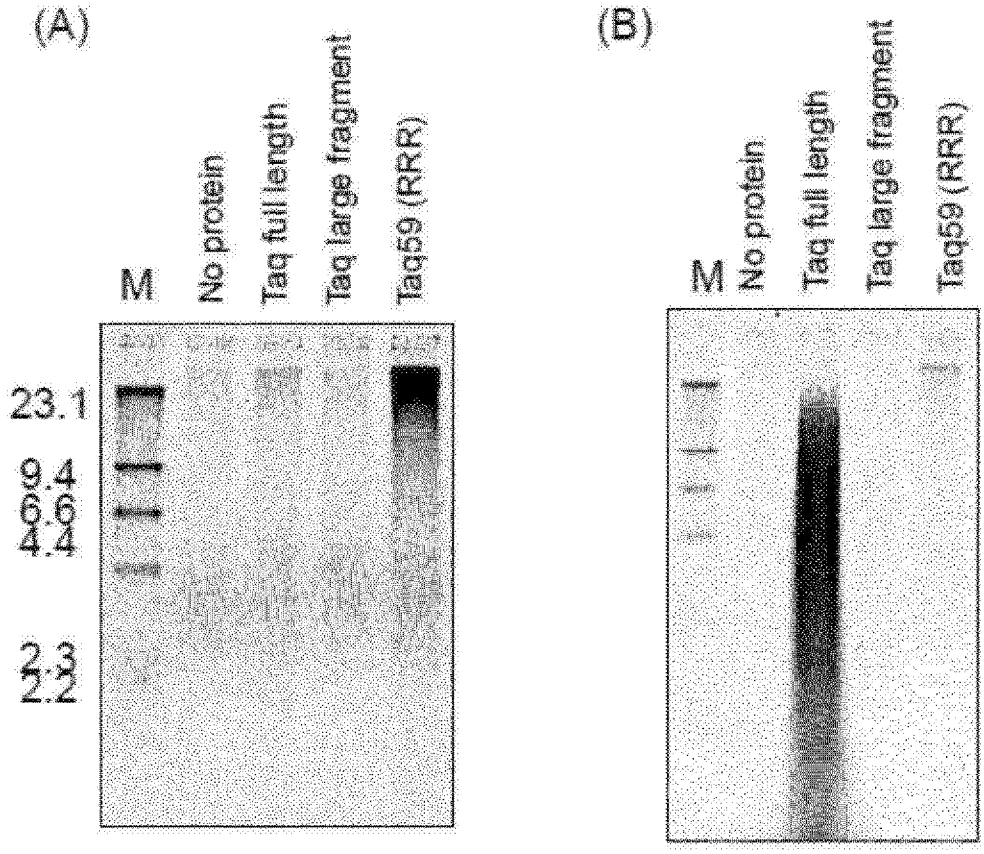
[図3]


Taq55 (PYA)
Taq56 (PYK)
Taq57 (PRK)
Taq58 (SRK)
Taq59 (RRR)
Kd= 100 nM
Kd= 40 nM
TaqLF wt
Taq wt
Kd= >1600 nM
Kd= 400 nM

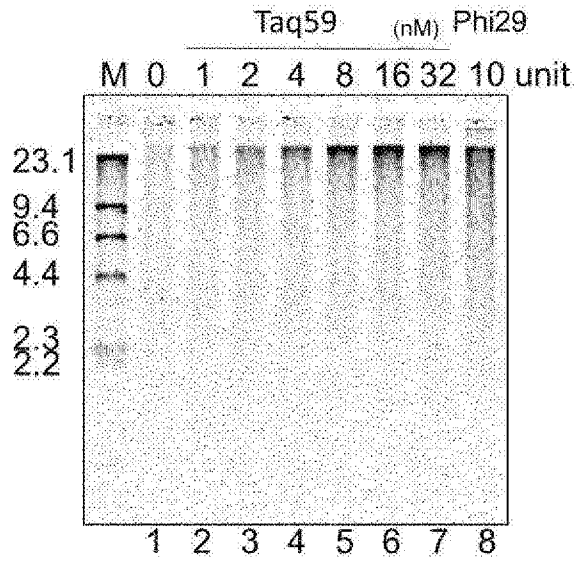
[図4]


(A)
(B)
M
No template
Taq full (wt)
Taq LF
TaqLF
Taq59 (RRR)
SD polymerase
well
(kbp)
48.5
10.0
6.0
3.0
2.0
1.0
0.5

[図5]


(A)
M
No protein
Taq full length
Taq large fragment
Taq59 (RRR)
23.1
9.4
6.6
4.4
2.3
2.2
(B)
M
No protein
Taq full length
Taq large fragment
Taq59 (RRR)

[図6]


Taq59 (nM) Phi29
M 0 1 2 4 8 16 32 10 unit
23.1
9.4
6.6
4.4
2.3
2.2
1 2 3 4 5 6 7 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/084807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N9/12(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12P19/34*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N9/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P19/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS/WPIX(STN), UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2009-136188 A (Precision System Science Co., Ltd.), 25 June 2009 (25.06.2009), claims; paragraphs [0008], [0009], [0019], [0027], [0032], [0069]; examples 1, 3, 5 to 11; table 1 (Family: none)	1-3,6-10,12, 14-19/1-19
X	JP 2005-512566 A (Amersham Biosciences Corp.), 12 May 2005 (12.05.2005), claims; paragraphs [0011], [0017]; fig. 2, 6; examples 1 to 3, 9, 11 & US 2003/0157533 A1 claims; paragraphs [0013], [0035]; fig. 2, 6; examples 1 to 3, 9, 11 & EP 1458740 A2 & WO 2003/054181 A2	1-3,6,8,12, 14-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 February 2017 (10.02.17)	21 February 2017 (21.02.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/084807

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-506417 A (Milko B Kermekchiev), 06 March 2008 (06.03.2008), claims; paragraph [0037] & US 2005/0260606 A1 claims; paragraph [0030] & EP 1747290 A2 & WO 2005/113829 A2	1,4,6-9,12, 14-19
X/Y	WO 2010/091203 A2 (LUCIGEN CORP.), 12 August 2010 (12.08.2010), page 11, lines 3 to 4; example 2 & US 2013/0022980 A1 & EP 2393933 A4	1,4,6-10,12, 14-19/1-19
X	WO 2011/055737 A1 (Nippon Gene Co., Ltd.), 12 May 2011 (12.05.2011), claims; examples 1, 2 (Family: none)	1-3,6,8,10, 12,14-19
Y/A	YAMAGAMI T., et al., "Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering", Frontiers in Microbiology (2014) Vol.5, Article 461, pp.1-10, ISSN: 1664-302X, page 9, left column, lines 30 to 32	1-19/1-3, 6-10,12, 14-19
Y/A	Teruya NAKAMURA et al., "Watching DNA Polymeraseη Make a Phosphodiester Bond", Biophysics (2013), vol.53, pages 254 to 257, ISSN: 0582-4052, page 254, left column, line 20 to right column, line 1	1-19/1-3,6, 8,12,14-19
Y	LI Y., et al., "Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation", EMBO J. (1998) Vol.17, No.24, pp.7514-7525, ISSN: 0261-4189, page 7519, fig. 4	1-19

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０８４８０７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N9/12(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P19/34(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N9/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P19/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS/WPIX (STN), UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/ Y	JP 2009-136188 A（プレシジョン・システム・サイエンス株式会社）2009.06.25、 特許請求の範囲、【０００８】、【０００９】、【００１９】、【００２７】、【００３２】、【００６９】、実施例１、３、５－１１、表１ （ファミリーなし）	1-3,6-10,12,14-19/ 1-19

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１０．０２．２０１７	２１．０２．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　５８０２
藤澤　雅樹
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2005-512566 A（アマシャム・バイオサイエンス・コーポレイション）2005.05.12、 特許請求の範囲、【００１１】、【００１７】、図２、図６、 実施例１－３、９、１１ & US 2003/0157533 A1、特許請求の範囲、[0013]、[0035]、図２、 図６、実施例１－３、９、１１ & EP 1458740 A2 & WO 2003/054181 A2	1-3,6,8,12, 14-19
X	JP 2008-506417 A（ミルコ・ビー・ケルメクキエフ）2008.03.06、 特許請求の範囲、【００３７】 & US 2005/0260606 A1、特許請求の範囲、[0030] & EP 1747290 A2 & WO 2005/113829 A2	1,4,6-9,12, 14-19
X/ Y	WO 2010/091203 A2 (LUCIGEN CORPORATION) 2010.08.12、 第 11 頁第３行－４行、実施例２ & US 2013/0022980 A1 & EP 2393933 A4	1,4,6-10,12, 14-19/ 1-19
X	WO 2011/055737 A1（株式会社ニッポンジーン）2011.05.12 特許請求の範囲、実施例１、２ (ファミリーなし)	1-3,6,8,10,, 12,14-19
Y/ A	YAMAGAMI T., et al.、 “Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering”、 Frontiers in Microbiology (2014) Vol.5, Article 461, pp.1-10、 ISSN: 1664-302X、 第９頁左欄第 30 行－32 行	1-19/ 1-3,6-10,12, 14-19
Y/ A	中村照也、外２名、 「DNA ポリメラーゼηによるリン酸ジエステル結合の形成過程の観察」、 生物物理（2013）Vol.53, pp.254-257 ISSN: 0582-4052 第 254 頁左欄第 20 行－右欄第１行	1-19/ 1-3,6,8,12, 14-19

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	LI Y., et al.、 “Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation”、 EMBO J. (1998) Vol.17, No.24, pp.7514-7525、 ISSN: 0261-4189、 第7519頁図４	1-19