

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4350815号
(P4350815)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月31日(2009.7.31)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	9/12	(2006.01)	C 12 N	9/12	
C 12 Q	1/68	(2006.01)	C 12 Q	1/68	A
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 R	1/01	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A

請求項の数 7 外国語出願 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平10-208533

(22) 出願日

平成10年7月9日(1998.7.9)

(65) 公開番号

特開平11-89588

(43) 公開日

平成11年4月6日(1999.4.6)

審査請求日

平成17年5月31日(2005.5.31)

(31) 優先権主張番号

60/052065

(32) 優先日

平成9年7月9日(1997.7.9)

(33) 優先権主張国

米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 98443

(73) 特許権者 591003013

エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCHE
E AKTIENGESELLSCHAFT

スイス・シーエイチ-4070バーゼル・

グレンツアーヘルストラッセ124

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬

(74) 代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74) 代理人 100088269

弁理士 戸田 利雄

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】変性キメラDNAポリメラーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：2に記載の1位のアミノ酸から190位のアミノ酸までのアミノ酸配列をN-末端領域とし、そして配列番号：10に記載の191位のアミノ酸から893位のアミノ酸までのアミノ酸配列をC-末端領域とするキメラ熱安定性DNAポリメラーゼにおいて、46位のGlyがAspにより置換されており、323位のAspがAlaにより置換されており、325位のGluがAlaにより置換されており、且つ730位のPheがTyrにより置換されている熱安定性DNAポリメラーゼ。

【請求項2】

請求項1に記載の熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNA。

10

【請求項3】

請求項2に記載のDNAを含んで成る発現ベクター。

【請求項4】

熱安定性DNAポリメラーゼの製造方法であって、

(a) 請求項3に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を、熱安定性DNAポリメラーゼの発現を促進する条件下で培養し；そして

(b) 前記宿主細胞から熱安定性DNAポリメラーゼを単離する；

ことを含んで成る方法。

【請求項5】

核酸增幅又は配列決定反応への請求項1に記載の熱安定性DNAポリメラーゼの使用。

20

【請求項 6】

請求項 1 に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ、及び 1 又は複数の非イオン性ポリマー界面活性剤を含んで成る核酸配列決定用又は核酸增幅用組成物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の熱安定性DNAポリメラーゼを含んで成る、プライマー延長反応を実施するためのキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、変異キメラ熱安定性DNAポリメラーゼ、それらの合成方法、及びそれらの使用方法に関する。前記酵素は、多くの組換えDNA技法、特に核酸配列決定、及びポリメラーゼ鎖反応（PCR）による核酸増幅において有用である。 10

【0002】**【従来の技術】**

DNAを形成するためにデオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTP）の錆型-指令された（template-directed）重合を触媒する熱安定性DNAポリメラーゼは、種々のインビトロDNA合成用途、例えばDNA配列決定及びDNA増幅に使用される。典型的には、天然に存在するDNAポリメラーゼは、ヌクレオチド類似体の組込みに対して強く識別する。この性質が、DNA複製及び修復の同一性に寄与する。しかしながら、ヌクレオチド類似体の組込みは、多くのDNA合成用途、特にDNA配列決定のために有用である。 20

【0003】

引用により本明細書に組込まれるSangerなど. , 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. 74; 5463 - 5467により初めに記載された鎖終結（chain termination）法を用いるDNA配列決定反応は、合成の終結のために異例な基質、すなわちジデオキシヌクレオチド三リン酸（ddNTP）に頼る。この鎖終結方法においては、DNAポリメラーゼの従来の基質（dNTP）及び鎖終結性の異例な基質（ddNTP又はラベルされたddNTP）の両者が、反応に存在する。合成は、ddNTPが組込まれるまで進行する。鎖-終結ddNTPが適切な割合で組込まれることを保証するためには、ddNTPの組込みに対する、これまでに利用されたDNAポリメラーゼの固有の識別能が、過剰のddNTPを供給することによって克服された。 30

【0004】

色素-ターミネーター配列決定、すなわち鎖終結法の変法は、合成を終結し、そして同時に、合成されたDNAをラベルするために、蛍光色素、たとえばフルオレセイン又はローダミンによりラベルされたddNTPを使用する。ddNTP上での色素ラベルの存在は、異例な基質の導入に対するDNAポリメラーゼによる識別性を悪化せしめる。

典型的には、鎖終結方法による配列決定は、プライマー延長の反復された段階、続くプライマー延長生成物-錆型複合体の熱変性を用いて実施される。サイクル配列決定として言及されるこの態様は、熱安定性DNAポリメラーゼを用いて熱サイクラーにおいて実施される。サイクル配列決定を実施するためのキットは、たとえばPerkin Elmer, Norwalk, CTから市販されている。 40

【0005】

種々の生物に由来する熱安定性DNAポリメラーゼは、文献に多数記載されており、そして当業者に良く知られている。特定の例としては、サーマス属の種々の種（アメリカ特許第5,466,591号を参照のこと）、特に、アメリカ特許第4,889,818号；第5,352,600号；及び第5,079,352号に記載されるサーマス・アクアチカスからのDNAポリメラーゼ（Taq DNAポリメラーゼ）；並びにアメリカ特許第5,374,553号及び第5,420,029号に記載されるサーマトガ・マリチマからのDNAポリメラーゼ（Tma DNAポリメラーゼ）を挙げることができる（前記特許のすべては、引用により本明細書に組込まれる）。 50

【0006】

DNAポリメラーゼは典型的には、1又は複数の関連するエキソヌクレオチド分解活性を有する。たとえば、Tma DNAポリメラーゼは、二本鎖DNAの5'-末端(5'3'エキソヌクレアーゼ活性又は5'-ヌクレアーゼ活性として言及される)、及び一本鎖又は二本鎖DNAの3'-末端(3'5'エキソヌクレアーゼ活性として言及される)からのヌクレオチドのエキソヌクレオチド分解除去を触媒する。対照的に、サーマス属からのDNAポリメラーゼは、5'-ヌクレアーゼ活性のみを有する。

【0007】

熱安定性DNAポリメラーゼ及びそれらの関連する活性の総説は、Abramsom, 1995, PCR Strategies (Innisなど. ed., Academic Press, Inc.)に見出される。DNA配列決定への使用のためには、関連するエキソヌクレオチド分解活性；すなわち5'-ヌクレアーゼ活性又は3'5'エキソヌクレアーゼ活性のいづれかを欠いているDNAポリメラーゼが好ましい。5'-ヌクレアーゼ活性を欠いている多くの熱安定性DNAポリメラーゼの変異形が、アメリカ特許第5,466,591号(引用により本明細書に組込まれる)に記載されている。

10

【0008】

ヨーロッパ特許出願第0655506号(引用により本明細書に組込まれる)は、ジデオキシヌクレオチドを組込む増強された能力を有する変異誘発されたDNAポリメラーゼを記載する(また、引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第5,614,365号も参照のこと)。その変異は、T7 DNAポリメラーゼのアミノ酸526に対応する点変異である。そのような変異の例は、Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸667における変異を包含する。

20

【0009】

Amplic Taq(登録商標)DNAポリメラーゼFS、すなわち5'-ヌクレアーゼ活性を実質的に有さず、そしてF667Y変異を組込むTaq DNAポリメラーゼの変異形は、Perkin Elmer, Norwalk, CTによりDNAサイクル配列決定キットの成分として市販されている。F667Y変異は、ddNTPに対する識別における有意な低下をもたらす。この性質は、色素-ターミネーター配列決定反応から得られた配列決定データを非常に改良し、そして個々の配列決定反応のために必要とされるddNTPの量を減じる。

30

【0010】

しかしながら、Amplic Taq(登録商標)DNAポリメラーゼFSの使用は、標準的ローダミン色素ファミリーによりラベルされたddNTPと共に使用される場合、配列決定トレースにおけるピークの高さの不均等性に関する問題を排除しない。色素-ターミネーターサイクル配列決定反応におけるAmplic Taq(登録商標)DNAポリメラーゼFSを用いて得られたピークの高さのパターンの分析が、Parkerなど., 1996, Biotechniques 21(4):694-699(引用により本明細書に組込まれる)に記載されている。

【0011】

当業者に知られている、分子生物学及び核酸化学の従来の技法は、文献に十分に説明されている。たとえば、Sambrookなど., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis(M.J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization(B.D. Hames and S.J. Higgins. eds., 1984); 及び Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.) (すべては、引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと。そこに引用されるすべての特許、特許出願及び出版物は、引用により本明細書に組込まれる。

40

【0012】

50

【発明の要約】

本発明は、これまで記載された熱安定性DNAポリメラーゼに対して有意に改良された性質を有する変異キメラ熱安定性DNAポリメラーゼに関する。前記DNAポリメラーゼは、DNA配列決定反応に使用される場合、実質的な改良点を付与する。特に、本発明のDNAポリメラーゼは、次の好都合な性質の組合せを提供する：

- ddNTPの改良された組込み；
- 特に、サイクル配列決定反応において色素 - ラベルされたddNTPと共に使用される場合、DNA配列決定トレースにおけるピークの高さの改良された均等性；
- 色素 - ラベルされたddNTPのピロリン酸分解の速度の抑制；及び
- dITPの改良された組込み。

10

【0013】

さらに、DNAポリメラーゼは、組換え発現系において高いレベルで容易且つ効果的に発現され得、それにより、酵素の商業的製造を促進する。本発明のDNAポリメラーゼが有する前記性質の組合せは、文献においてこれまで記載された熱安定性DNAポリメラーゼよりも有意な利点を表わす。

本発明のキメラDNAポリメラーゼは、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの5

- ヌクレアーゼドメインに由来するN - 末端領域、及びTma DNAポリメラーゼの3
5 エキソヌクレアーゼ及びポリメラーゼドメインに由来するC - 末端から成る。

【0014】

前記N - 末端領域は、Tma DNAポリメラーゼのアミノ酸1 - 138に対応するサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの領域を少なくとも含み、そしてサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの完全な5 - ヌクレアーゼドメインまでを含むことができる。

前記C - 末端領域は、Tma DNAポリメラーゼの3 5 エキソヌクレアーゼ及びポリメラーゼドメインの他に、N - 末端領域に存在しないサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの5 - ヌクレアーゼドメインの部分に対応するTma DNAポリメラーゼの5 - ヌクレアーゼドメインの部分を含む。

20

【0015】

従って、本発明のキメラDNAポリメラーゼは、N - 末端領域及びC - 末端領域から成り、ここで前記N - 末端領域は、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼのアミノ酸1 ~ nから成り、ここでnはTma DNAポリメラーゼのアミノ酸138 - 291に対応する、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの領域内のアミノ酸位置であり、そして前記C - 末端領域は、Tma DNAポリメラーゼのアミノ酸m + 1 ~ 893から成り、ここでTma DNAポリメラーゼにおけるアミノ酸mは、Tma DNAポリメラーゼ及びサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼが図におけるように整列される場合、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼにおけるアミノ酸nに対応する。

30

【0016】

本発明のキメラDNAポリメラーゼは、ジデオキシヌクレオチドを組込むDNAポリメラーゼの能力を高める、Tma DNAポリメラーゼに由来するDNAポリメラーゼにおけるF730Y変異により修飾される。

- 1つの態様においては、キメラDNAポリメラーゼの5 - ヌクレアーゼドメインは、5 - ヌクレアーゼ活性を実質的に減じ、又は好ましくは不活性化する少なくとも1つの点変異を含む。その変異は、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの5 - ヌクレアーゼドメインに由来するN - 末端に、又は存在するなら、Tma DNAポリメラーゼの5 - ヌクレアーゼドメインに由来するC - 末端領域の部分に存在することができる。

40

【0017】

適切な変異は、DNAポリメラーゼにおける5 - ヌクレアーゼ活性を実質的に減じ、又は好ましくは不活性化するそれらの変異（单一のアミノ酸置換又は欠失変異）である。従って、N - 末端領域が、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼにおける5 - ヌクレアーゼ活性を実質的に減じるか又は排除する少なくとも1つのアミノ酸の置換又は欠失により修飾され、又は前記C - 末端領域が、Tma DNAポリメラーゼにおける5 - ヌ

50

クレアーゼ活性を実質的に減じるか、又は排除する Tma DNA ポリメラーゼのアミノ酸 m + 1 ~ 291 である領域内での少なくとも 1 つのアミノ酸の置換又は欠失により修飾される。

【 0018 】

DNA ポリメラーゼの 5' - ヌクレアーゼ活性に対して決定的であるアミノ酸位置は、本明細書に記載されるように、良く知られている。1 又は複数のそれらの決定的位置でのアミノ酸の置換、又は 1 又は複数のそれらの決定的位置でのアミノ酸の欠失は典型的には、5' - ヌクレアーゼ活性の低下をもたらす。好ましくは、キメラ DNA ポリメラーゼは、5' - ヌクレアーゼ活性を実質的に減じるか、又は不活性化する変異を含む。

【 0019 】

1 つの態様において、Tma DNA ポリメラーゼに由来する 3' 5' - エキソヌクレアーゼドメインを含む C - 末端領域は、Tma DNA ポリメラーゼにおける 3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を実質的に減じるか、又は好ましくは不活性化する少なくとも 1 つの点変異を含む。

DNA ポリメラーゼの 3' 5' エキソヌクレアーゼ活性に対して決定的であるアミノ酸位置は、本明細書に記載されるように良く知られている。1 又は複数のそれらの決定的位置でのアミノ酸の置換、又は 1 又は複数のそれらの決定的位置でのアミノ酸の欠失は、典型的には、3' 5' - ヌクレアーゼ活性の低下をもたらす。好ましい態様においては、C - 末端領域は、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を不活性化する、D323A 及び E325A 変異を含む。

【 0020 】

1 つの態様において、N - 末端領域は、Taq DNA ポリメラーゼに由来する。好ましい態様においては、N - 末端領域は、Taq DNA ポリメラーゼのアミノ酸 1 - 190 から成り、そして C - 末端領域は Tma DNA ポリメラーゼのアミノ酸 191 - 893 から成る。F730Y Tma 30 DNA ポリメラーゼと称する特に好ましい態様においては、N - 末端領域は Taq DNA ポリメラーゼのアミノ酸 1 - 190 から成り、そして G46D 変異を含み、そして C - 末端領域は、Tma DNA ポリメラーゼのアミノ酸 191 - 893 から成り、そして D323A, E325A 及び F730Y 変異を含む。

【 0021 】

本発明のもう 1 つの観点は、本発明の変異キメラ熱安定性 DNA ポリメラーゼをコードする精製された DNA (キメラ遺伝子)、前記 DNA を含む組換え DNA ベクター、及び前記組換え DNA ベクターにより形質転換された宿主細胞に関する。サイレントヌクレオチド変化によってのみ異なる (すなわち、同じアミノ酸配列をコードする DNA 配列は、本発明の範囲内である。

【 0022 】

本発明の好ましい態様においては、精製された DNA は、G46D 変異をコードするよう修飾された Taq DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド 1 - 570、及び D323A, E325A 及び F730Y 変異をコードするよう修飾された Tma DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド 571 - 2679 から成る。

本発明のもう 1 つの観点は、本発明の精製された DNA を用いて、本発明の変異キメラ熱安定性 DNA ポリメラーゼを製造するための方法に関する。組換え発現ベクターは、宿主細胞において発現され、そしてその発現されたタンパク質は宿主細胞から精製される。

【 0023 】

【発明の実施の形態】

本発明は、変異キメラ熱安定性 DNA ポリメラーゼ、及び前記酵素を製造するための手段を提供する。本発明の理解を促進するために、多くの用語が下記に定義される。

用語 “細胞”、“細胞系”、及び “細胞培養物” は、交換可能的に使用され得、そしてすべてのそのような名称は子孫を包含する。従って、用語 “形質転換体” 又は “形質転換された細胞” は、形質転換された一次細胞、及びトランスクルーパーの数に関係なくその細胞に由来する培養物を包含する。すべての子孫は、意図的な又は偶然な変異のために、DNA

10

20

30

40

50

含有率においては、正確には同一ではない。初めに形質転換された細胞においてスクリーニングされる場合、同じ官能性を有する変異子孫が、形質転換体の定義に包含される。

【0024】

用語“制御配列”とは、特定の宿主生物においての作用可能に連結されたコード配列の発現のために必要なDNA配列を意味する。たとえば、原核生物のために適切である制御配列は、プロモーター、任意には、オペレーター配列、リボソーム結合部位、正のレトロレギュレーション要素（引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第4,666,848号を参照のこと）、及びおそらく他の配列を包含する。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用するところが知られている。

【0025】

用語“発現クローン”とは、作用可能な連鎖で所望のコード配列及び制御配列を含むDNA配列を意味し、その結果、それらの配列により形質転換された宿主は、コードされたタンパク質を生産することができる。用語“発現系”とは、発現クローンにより形質転換された宿主を意味する。形質転換をもたらすためには、発現クローンがベクター上に含まれ得るが、しかしながら、その対応するDNAはまた、宿主染色体中に組込まれてもよい。用語“遺伝子”とは、回収できる生物活性ポリペプチド又は前駆体の生成のために必要な制御及びコード配列を含んで成るDNA配列を意味する。

10

【0026】

用語“作用可能に連結される”とは、制御配列がコード配列によりコードされるタンパク質の発現を誘導するよう機能するであろうようなコード配列の位置を意味する。従って、配列を制御するために、“作用可能に連結される”コード配列は、そのコード配列が制御配列の指令下で発現され得る配置を意味する。

20

【0027】

用語“オリゴヌクレオチド”とは、本明細書において使用される場合、複数のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドから構成される分子として定義される。その正確な大きさは、多くの要因に依存し、すなわちオリゴヌクレオチドの究極的な機能又は用途に依存する。オリゴヌクレオチドは、たとえば適切な配列のクローニング及び制限酵素処理を包含する任意の適切な方法、及び次の方法による直接的な化学合成により調製され得る：Narangなど. , 1979, Meth. Enzymol. 68 : 90 - 99 のホスホトリエステル方法；Brownなど. , 1979, Meth. Enzymol. 68 : 109 - 151 のホスホジエ斯特ル方法；Beaucageなど. , 1981, Tetrahedron Lett. 22 : 1 859 - 1862 のジエチルホスホラミジット方法；及びアメリカ特許第4,458,066号の固体支持体方法（それらの文献は、引用により本明細書に組込まれる）。合成方法の総説は、Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry 1 (3) : 165 - 187（引用により本明細書に組込まれる）に提供される。

30

【0028】

用語“プライマー”とは、本明細書において使用される場合、プライマー延長が開始される条件下で配置される場合、合成の開始の点として作用することができるオリゴヌクレオチドを意味する。核酸鎖に対して相補的であるプライマー延長生成物の合成は、適切な温度で、適切な緩衝液において、必要な4種の異なったヌクレオシド三リン酸及び熱安定性DNAポリメラーゼの存在下で開始される。“緩衝液”は、補因子（たとえば二価の金属イオン）、及び所望するpHに調節された塩（適切なイオン強度を提供するために）を包含する。

40

【0029】

遺伝子配列の非コード鎖にハイブリダイズする（同等には、コード鎖のサブ配列である）プライマーは、本明細書においては、“上流”プライマーとして言及される。遺伝子配列のコード鎖にハイブリダイズするプライマーは、本明細書において、“下流”プライマーとして言及される。

用語“制限エンドヌクレアーゼ”及び“制限酵素”とは、特定のヌクレオチド配列で又は

50

その近くで二本鎖DNAを切断する、典型的には細菌起源の酵素を意味する。

【0030】

用語“熱安定性酵素”とは、本明細書で使用される場合、熱に対して安定であり、そして高温反応最適条件を有する酵素を意味する。本発明の熱安定性酵素は、60～90の温度でプライマー延長を最適に触媒し、そして典型的には、サイクル配列反応及びポリメラーゼ連鎖反応增幅において使用される温度サイクル条件下で使用できる（引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第4,965,188号に記載される）。

本明細書において使用される場合、アミノ酸配列における“点変異”とは、単一のアミノ酸の置換又は単一のアミノ酸の欠失のいづれかを意味する。点変異は好ましくは、コードDNAにおける適切なコドン変化によりアミノ酸配列中に導入される。

10

【0031】

配列における個々のアミノ酸は、本明細書においてANとして表わされ、ここでAは配列におけるアミノ酸についての標準の一文字記号であり、そしてNは前記配列における位置である。アミノ酸配列内の変異は、本明細書においてA₁NA₂として表わされ、ここでA₁は変異誘発されていないタンパク質配列におけるアミノ酸についての標準の一文字記号であり、A₂は変異誘発されたタンパク質配列におけるアミノ酸についての標準の一文字記号であり、そしてNはアミノ酸配列における位置である。

【0032】

たとえば、G46D変異は、アミノ酸位置46でのグリシンからアスパラギン酸への変更を表わす。そのアミノ酸位置は、変異を包含する領域が由来するタンパク質の完全な長の配列に基づいて番号付けされる。従って、本発明においては、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼに由来するタンパク質の領域における変異が、完全な長さのサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼ配列に従って番号付けされ、そしてTma DNAポリメラーゼに由来する領域における変異が完全な長さのTma DNAポリメラーゼ配列に従つて番号付けされる。DNA配列におけるヌクレオチド及び点変異の表示は類似する。

20

【0033】

本明細書において使用される場合、“キメラ”タンパク質とは、そのアミノ酸配列が少なくとも2つの異なったタンパク質からのアミノ酸配列のサブ配列の融合生成物を表わすタンパク質を意味する。キメラタンパク質は、好ましくは、アミノ酸配列の直接的な操作により生成されないが、しかしむしろ、キメラアミノ酸配列をコードする“キメラ”遺伝子から発現される。本発明のキメラタンパク質は、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼに由来するアミノ-末端(N-末端)、及びTma DNAポリメラーゼに由来するカルボキシ-末端(C-末端)から成る。

30

【0034】

前記N-末端領域は、N-末端(アミノ酸位置1)から内部アミノ酸に延長する領域を意味する。同様に、前記C-末端領域は、内部アミノ酸からC-末端に延長する領域を意味する。本発明のキメラタンパク質においては、N-末端領域はN-末端(アミノ酸位置1)からC-末端領域の開始点(これは、C-末端に延長する)に延長する。従つて、一緒に取られる場合、N-末端及びC-末端領域は、完全なアミノ酸配列を包含する。

40

【0035】

DNAポリメラーゼに関連するエキソヌクレオチド分解活性(3'→5'エキソヌクレアーゼ活性及び5'→3'ヌクレアーゼ活性、また5'→3'エキソヌクレアーゼ活性としても言及される)、及びそれらの活性を測定する方法は、当業界において知られている。本明細書において使用される場合、活性は、変異誘発されていない酵素に存在する活性の、約20%以下、好ましくは、約10%以下、そしてより好ましくは約1%以下に減じられる場合、“実質的に減じられる”。活性は、酵素の典型的な又は好ましい使用のために無視できるレベルに減じられる場合、“不活性化され”、又は“実質的に不活性化される”。

【0036】

本発明の熱安定性DNAポリメラーゼ

本発明の典型的な熱安定性DNAポリメラーゼは、N-末端領域がサーマス・スペーシス

50

D N A ポリメラーゼの N - 末端領域から成り、そして C - 末端領域が T m a D N A ポリメラーゼの C - 末端領域から成るキメラ D N A ポリメラーゼである。サーマス・スペーシス D N A ポリメラーゼからの N - 末端領域は、5' - ヌクレアーゼドメインの一部又はすべてを包含する。T m a D N A ポリメラーゼからの C - 末端領域は、5' - ヌクレアーゼドメインの一部を含むか、又はおそらく全く含まず、且つ完全な 3' - 5' エキソヌクレアーゼ及び D N A ポリメラーゼドメインを含む。

【0037】

キメラタンパク質の C - 末端領域により包含される T m a D N A ポリメラーゼの 5' - ヌクレアーゼドメインの一部は、キメラタンパク質の N - 末端領域により包含されないサーマス・スペーシス D N A ポリメラーゼの 5' - ヌクレアーゼドメインのその一部に対応するであろう。10

キメラ D N A ポリメラーゼはさらに、D N A ポリメラーゼが d d N T P を組込む効率を高める F 7 3 0 Y 変異を含む。キメラ D N A ポリメラーゼは、好ましくはまた、5' - ヌクレアーゼ活性を有意に減じるか又は排除する 1 又は複数の点変異、及び 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有意に減じるか又は排除する 1 又は複数の点変異を含む。

【0038】

1. キメラタンパク質ドメイン

サーマス属の種からの D N A ポリメラーゼ、及び T m a D N A ポリメラーゼは、全体の構造において類似する。それらの D N A ポリメラーゼにおいては、エキソヌクレアーゼ及び D N A ポリメラーゼ活性は、タンパク質の別々の領域（活性ドメイン）に存在する。代表的なサーマス・スペーシス D N A ポリメラーゼ、T a q D N A ポリメラーゼ、及び T m a D N A ポリメラーゼのおおまかな活性ドメインは、下記表に示されている（また、アメリカ特許第 5,420,029 号を参照のこと）。20

【0039】

5' - ヌクレアーゼ活性をコードする相同活性ドメイン、及び D N A ポリメラーゼ活性をコードするそれらのドメインは、ほぼ同じ長さである（図 1 及び 2 を参照のこと）。T m a D N A ポリメラーゼにおける 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性をコードする領域と、T a q D N A ポリメラーゼにおけるその対応する領域との間の長さの差異は、T a q D N A ポリメラーゼにおける 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の欠失に対応する。

【0040】

【表 1】

表 1

活性ドメイン（おおまかなアミノ酸位置）

	5' - ヌクレアーゼ	3' → 5' エキソヌクレアーゼ	ポリメラーゼ
Taq D N A ポリメラーゼ	1 - 289	-	432 - 832
T m a D N A ポリメラーゼ	1 - 291	294 - 484	485 - 893

【0041】

有意なアミノ酸類似性が、サーマス・スペーシス D N A ポリメラーゼと T m a D N A ポリメラーゼとの間に存在する。たとえば、欠失パラメーター値を有する G A P コンピュータ40

ープログラム (Genetics Computer Group, Madison, WI) を用いての、代表的なサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、及びTma DNAポリメラーゼのアミノ酸配列比較は、そのアミノ酸配列がその完全なアミノ酸配列又は5'-ヌクレアーゼドメインのいづれかに対して約44%同一であり、そして66%類似する。

【0042】

全体の構造の及び配列の類似性のために、キメラ酵素はTma DNAポリメラーゼに存在する全体の構造及び活性ドメインを保存する。実質的な変化は、キメラ酵素のN-末端領域のアミノ酸配列がサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼのその対応する領域のアミノ酸配列であることである。従って、本発明のキメラ酵素は、その5'-ヌクレアーゼドメインがサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼからのその対応するドメインにより置換されている変異誘発されたTma DNAポリメラーゼに対応する。その“対応するドメイン”とは、本明細書において、図に提供されるように、アミノ酸配列の整合性により定義される。

【0043】

図1及び2は、Tma DNAポリメラーゼ、及び7種の代表的なサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列整合性を提供する。7種の代表的なサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼは、本明細書において使用される略語、及び5'-ヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列のための配列番号と共に下記表に列挙される。

【0044】

【表2】

表2

略語	種	5'-ヌクレアーゼ ドメインの配列
Tma	サーマトガ・マリチマ	(配列番号1)
Taq	サーマス・アクアチカス	(配列番号2)
Tf1	サーマス・フラバス	(配列番号3)
Tth	サーマス・サーモフィラス	(配列番号4)
TZ05	サーマス・スペーシス Z05	(配列番号5)
Tca	サーマス・カルドフィラス	(配列番号6)
TspS17	サーマス・スペーシス sps17	(配列番号7)
Tfi	サーマス・フリホルミス	(配列番号8)

【0045】

それらのDNAポリメラーゼ内のアミノ酸及び領域の対応は、アミノ酸配列整合から得られる。本明細書で使用される場合、アミノ酸は、それらが図1及び2の配列整合で配列される場合、“対応する”。従って、対応とは、配列間で同一である（保存される）アミノ酸及び同一ではないが、しかし全体の配列相同性を最大にするために整合されるアミノ酸の両者を意味する。

10

20

30

40

50

【0046】

サーマス属の多くのさらなる種が同定されており、そしてAmerican Type Culture Collection(ATCC)及びDeutsche Sammlung von Mikroorganismen(DSM)のような寄託機関から入手できる。下記で論ぜられるように、DNAポリメラーゼ及びコード遺伝子は、寄託された菌株から回収され、そして通常の手段で配列決定され得る。たとえばGAPプログラムを用いてのTma DNAポリメラーゼ配列とサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼ配列とのアミノ酸配列の通常の配列整合は、本発明のキメラDNAポリメラーゼへのサーマスDNAポリメラーゼ配列の使用を可能にするであろう。

【0047】

10

本発明のキメラタンパク質においては、Tma DNAポリメラーゼからの領域の最初のアミノ酸が、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼ配列の最後のアミノ酸に対応するアミノ酸に続くアミノ酸により開始し、そしてTma DNAポリメラーゼ配列の残り(アミノ酸893まで)を含むであろう。完全なTma DNAポリメラーゼの配列は、配列番号10として提供される。

【0048】

好ましくは、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼからのアミノ酸配列は、2種のアミノ酸配列が同一であるか又は類似する点で、Tma DNAポリメラーゼからのアミノ酸配列に連結される。たとえば、好ましい態様は、Taq DNAポリメラーゼからのアミノ酸1-190及びTma DNAポリメラーゼのアミノ酸191-895から成る。Tma DNAポリメラーゼのアミノ酸190は、Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸190に対応し、そしてキメラ酵素のTma DNAポリメラーゼ部分は、次のアミノ酸、すなわちアミノ酸191から開始する。

20

【0049】

2種のDNAポリメラーゼが同一である領域においては、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼからの最後のアミノ酸の同定は、前記領域内で任意である。たとえば、アミノ酸191及び192はTaq DNAポリメラーゼ及びTma DNAポリメラーゼにおいて同一である(そして、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼ内で保存される)ので、Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸1-190を含むキメラタンパク質は、Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸1-191又は1-192を含むキメラタンパク質から区別がつかない。実施例に記載される本発明の態様は、酵素の最初の起源の観点から、Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸1-190を含むものとして言及される。

30

【0050】

図1及び2に提供される配列の整合においては、1つのアミノ酸の長さのギャップが位置54~55及び225~226でTma DNA配列中に挿入され、7種のサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの内のそれらの位置で追加のアミノ酸を含む5種との整合が可能にされた。従って、それらの5種のサーマス・スペーシスに存在するそれらの2個のアミノ酸については、Tma DNAポリメラーゼに対応するアミノ酸が存在しない。当業者は、Tma DNAポリメラーゼにおけるギャップと整合されるアミノ酸を末端とする、それらの5種のサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼの1つからのN-末端領域を含む適切なキメラタンパク質が、構成され得ることを十分に理解し、ここで前記Tma DNAポリメラーゼ由来の領域は、前記ギャップに続く最初のアミノ酸で開始する。

40

【0051】

キメラDNAポリメラーゼの決定的な観点は、それが、完全な長さのTma DNAポリメラーゼにおけるおよそのコドン133-137で存在する少なくとも代替的(alternative)リボソーム結合部位を通して、そして好ましくは、メチオニン140開始コドンを通して、Tma DNAポリメラーゼ配列をコードする領域が、サーマス・スペーシスDNAポリメラーゼからのその対応する領域をコードする遺伝子配列により置換されているキメラ遺伝子によりコードされることである。

【0052】

50

この代替的リボソーム結合部位及び開始コドンの完全な長さの Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子における存在は、アミノ酸 140 で開始する切断された Tma DNA ポリメラーゼの選択的発現をもたらす。下記に記載されるように、Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子のこの領域の置換は、完全な長さのキメラタンパク質の効果的な発現に対して決定的である。従って、本発明のキメラ DNA ポリメラーゼにおいては、サーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼからの N-末端領域が、少なくともアミノ酸 137 までの、そして好ましくはアミノ酸 140 までの Tma DNA ポリメラーゼの領域を置換する。

【0053】

Tma DNA ポリメラーゼのアミノ酸 1 - 137 に対応する個々のサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼの領域が、図に提供されるように、アミノ酸配列整合から得られる。たとえば、Tma DNA ポリメラーゼのアミノ酸 1 - 137 に対応する Taq DNA ポリメラーゼの領域はアミノ酸 1 - 142 であり（図 1 及び 2 を参照のこと）、そして Tma DNA ポリメラーゼの M140 に対応する Taq DNA ポリメラーゼのアミノ酸は L145 である。

10

【0054】

従って、N-末端領域が Taq DNA ポリメラーゼからである態様は、Taq DNA ポリメラーゼの少なくともアミノ酸 1 - 142、及び好ましくはアミノ酸 1 - 145 を含んで成るであろう。同様に、N-末端領域が他のサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼからである態様のためには、Tma DNA ポリメラーゼのアミノ酸 1 - 137 及び 140 に対応するサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼの領域が、図に提供される配列整合から得られる。

20

【0055】

当業者は、マイナーな変異、付加又は欠失が、酵素の機能特性を変更しない DNA ポリメラーゼ中に導入され得、そしてそのような変異誘発された酵素が、変異誘発されていない酵素に対して事実上、同等であることを理解するであろう。たとえば、いくつかの N-末端アミノ酸の Taq DNA ポリメラーゼにおける欠失が酵素の機能性を変更しないことは知られている。同様に、多くのアミノ酸位置での置換変異が実質的に影響を有さないようと思えることは知られている。本発明のためには、酵素の機能性を変更しないマイナーな変異を含む DNA ポリメラーゼは、変異誘発されていない DNA ポリメラーゼに等しいと思われる。

30

【0056】

2.5 - ヌクレアーゼドメインにおける点変異

1つの態様において、キメラ DNA ポリメラーゼの 5' - ヌクレアーゼドメインは、5' - ヌクレアーゼ活性を減じるか又は排除する 1 又は複数の点変異（單一アミノ酸置換又は欠失の変異）を含む。キメラタンパク質の 5' - ヌクレアーゼドメインはサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ及びほとんどの態様においては、Tma DNA ポリメラーゼに由来する部分を含むので、5' - ヌクレアーゼ活性を実質的に減じ又は排除する変異は、サーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ由来の部分又は Tma DNA ポリメラーゼ由来の部分中に導入され得る。

40

【0057】

アミノ酸配列の整合に基づいて、DNA ポリメラーゼは、E. コリ DNA ポリメラーゼ I, II 及び III との相同性に従って、A, B 及び C と称するグループに分類されている（たとえば、Ito and Braithwaite, Nucleic Acids Res. 19 (15) : 4045 - 4047 (引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと)。Tma 及びサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼは、E. コリ DNA ポリメラーゼに関係する A DNA ポリメラーゼのメンバーである。A DNA ポリメラーゼ間に保存され、そして DNA ポリメラーゼの 5' - ヌクレアーゼのために必須であるアミノ酸が同定されている（たとえば、Gutmann など. 1993, Nucleic Acids Res. 21 : 4406 - 4407 (引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと)。

【0058】

50

A DNAポリメラーゼにおける、5' - ヌクレアーゼ活性のために必須であるアミノ酸の保存のために、1つのDNAポリメラーゼ、たとえばE.コリDNAポリメラーゼI又はTaq DNAポリメラーゼにおける必須のアミノ酸の同定は、図1及び2に提供されるような配列整合に基づいて他の種類のA DNAポリメラーゼにおける必須のアミノ酸の同定を可能にする。必須のアミノ酸は、本明細書に提供される配列との通常の配列整合から追加のサーマス・スペーシスDNAポリメラーゼにおいて同定され得る。

【0059】

5' - ヌクレアーゼ活性のために必須であるものとして同定されているアミノ酸は、星印により図1及び2に示されている。個々のDNAポリメラーゼ内の必須のアミノ酸の位置は、その整合性から一括して示す。たとえば、Taq DNAポリメラーゼ配列(配列番号2)を参照すれば、それらの必須のアミノ酸は次の通りである: D18, R25, G46, D67, F73, R74, Y81, G107, E117, D119, D120, D142, D144, G187, D188, D191及びG195。

10

【0060】

追加の必須のアミノ酸が未来において同定されるかどうかは、驚くべきではない。本明細書に記載されるようなそれらのアミノ酸位置での変異が5' - ヌクレアーゼ活性の低下又は排除をもたらすので、そのような変異は本発明への使用のために適切である。

【0061】

一般的に、5' - ヌクレアーゼ活性を減じ又は排除するためには、それらのアミノ酸位置の1又は複数の位置が、欠失され、又は異なった性質を有するアミノ酸に変異誘発される。たとえば、酸性アミノ酸、たとえばAsp(D)は、塩基性(Lys, Arg, His)、中性(Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp)又は極性であるが、しかし荷電されていないアミノ酸(Gly, Ser, Thr, Gys, Tyr, Asn又はGln)に変更されるであろう。好ましいG46D変異は、極性であるが荷電されていないGlyの代わりに酸性Aspを置換する。一般的に、Ala又はGlyに対する変異が、タンパク質構造の変形を最少にするために好ましい。

20

【0062】

アミノ酸の電荷特性を保存する置換変異はまた、5' - ヌクレアーゼ活性を弱めることができる。たとえば、アメリカ特許第5,474,920号(引用により本明細書に組込まれる)は、5' - ヌクレアーゼ活性を減じるか又は排除するTaq DNA配列における3種の変異を記載する。1つの変異、すなわちR25C(塩基性から、極性であるがしかし荷電されていないものへ)は異なった性質を有するアミノ酸への変化をもたらすけれども、2つの変異、すなわちF73L(中性から中性)及びR74H(塩基性から塩基性)は、性質の変更をもたらさない。

30

【0063】

それにもかかわらず、すべての3種の変異は、5' - ヌクレアーゼ活性を弱める。5' - ヌクレアーゼ活性に影響を及ぼす、個々の必須のアミノ酸位置での特定の変異は、DNAポリメラーゼを変異誘発し、そしてその得られる活性を測定することによって、通常決定され得る。敏感且つ便利なアッセイが、アメリカ特許第5,466,591号(引用により本明細書に組込まれる)に記載される。

40

【0064】

好ましい態様においては、キメラDNAポリメラーゼの5' - ヌクレアーゼドメインは、5' - ヌクレアーゼ活性を少なくとも1000倍減じる、Taq DNAポリメラーゼにおけるG46D変異に対応する変異を含む(アメリカ特許第5,466,591号を参照のこと)。

アミノ酸における変異は、コード遺伝子配列に適切な変異を組込むことによって達成される。DNA配列におけるそのような変異は、下記にさらに記載されるように、当業界において良く知られている技法を用いて実施される。

【0065】

3.3 5 エキソヌクレアーゼドメインにおける点変異

50

1つの態様においては、キメラDNAポリメラーゼの3' → 5' エキソヌクレアーゼドメインは、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を減じるか又は排除する1又は複数の点変異（単一アミノ酸置換又は欠失の変異）を含む。キメラタンパク質の3' → 5' エキソヌクレアーゼドメインは、Tma DNAポリメラーゼ由来の部分内に含まれる。従って、適切な変異は、Tma DNAポリメラーゼの5' - ヌクレアーゼ活性を実質的に減じ又は排除する変異である。

【0066】

Tma DNAポリメラーゼにおける3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性のための必須の3種のアミノ酸“モチーフ”、及び個々のモチーフ内の必須のアミノ酸が同定されている（アメリカ特許第5,420,029号を参照のこと）。前記決定的アミノ酸が下記に列挙されている。Tma DNAポリメラーゼにおける3' → 5' エキソヌクレアーゼを減じる1又は複数のそれらのアミノ酸の変異が、本発明のDNAポリメラーゼに使用され得る。

【0067】

【表3】

表3

3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性に対して決定的な Tma DNAポリメラーゼアミノ酸	
モチーフ	決定的アミノ酸
A	D 3 2 3, E 3 2 5, L 3 2 9
B	N 3 8 5, D 3 8 9, L 3 9 3
C	Y 4 6 4, D 4 6 8

20

追加の決定的アミノ酸が未来において同定されるかどうかは驚くべきではない。本明細書に記載されるようなそれらのアミノ酸位置での変異は3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性の低下又は排除をもたらすので、そのような変異は本発明への使用のために適切である。

【0068】

5' - ヌクレアーゼ活性の低下について上記に記載されるように、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性の低下又は排除は、1又は複数のそれらの必須のアミノ酸位置での置換又は欠失変異、好ましくは異なる性質を有するアミノ酸への置換変異により達成される。好みの態様においては、Tma DNAポリメラーゼの3' → 5' エキソヌクレアーゼドメインが、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を、共に実質的に排除するD 3 2 3 A及びE 3 2 5 A変異により変異誘発される。

40

アミノ酸配列における変異は、コード遺伝子配列に適切な変異を組込むことによって達成される。DNA配列におけるそのような変異は、下記にさらに記載されるように、当業界において良く知られている技法を用いて実施される。

【0069】

本発明のDNAポリメラーゼの利点

本発明のキメラ熱安定性DNAポリメラーゼは、文献に記載される熱安定性DNAポリメラーゼよりも有意な改良点を示す。特に、本発明のDNAポリメラーゼは、次の性質の組合せを提供する：

- 特に、サイクル配列決定反応において色素 - ラベルされたd d N T Pと共に使用される場合、DNA配列決定トレースにおけるピークの高さの改良された均等性；

50

- 色素 - ラベルされた d d N T P のピロリン酸分解の速度の低下 ; 及び
- d I T P の改良された組込み。
- さらに、 D N A ポリメラーゼは、組換え発現系において、容易且つ効果的に、高レベルに発現され得、それにより、酵素の商業的製造を促進する。

【 0 0 7 0 】

本発明の D N A ポリメラーゼにより占有される性質の組合せは、特に色素 - ターミネーターサイクル配列決定反応において有用であり、そして有意に改良された結果を提供する。それらの性質の個々は下記に論ぜられる。

【 0 0 7 1 】

1 . d d N T P の改良された組込み

10

本発明のキメラ D N A ポリメラーゼは、 d d N T P の組込みの効率を高めることが知られている F 7 3 0 Y 変異を含む。

比較すれば、 A m p l i T a q (登録商標) D N A ポリメラーゼ F S は、類似する変異 (F 6 6 7 Y) を含む T a q D N A ポリメラーゼの変異誘発された形である。 A m p l i T a q (登録商標) D N A ポリメラーゼ F S はまた、 d d N T P の組込みの高められた効率を示すが、しかし本発明の D N A ポリメラーゼにより示されるいくつかの他の性質を欠いている。

【 0 0 7 2 】

2 . D N A 配列決定トレースにおけるピークの高さの改良された均等性

20

本発明の D N A ポリメラーゼの好都合な性質は、色素 - ターミネーター サイクル配列決定反応に使用される場合、それが配列決定トレース（また、クロマトグラム又はエレクトロフェログラムとしても言及される）における均等なピークの高さをもたらすことである。不均等なピークの高さは、ベース・コーリング (b a s e c a l l i n g) の精度を低め、そして変異及び多型現象検出をより困難にする。

【 0 0 7 3 】

色素 - ターミネーター サイクル配列決定反応におけるピークの高さの不均等性は、これまで解決されていない問題である。たとえば、 A m p l i T a q (登録商標) D N A ポリメラーゼ F S は、変異誘発されていない T a q D N A ポリメラーゼよりもより効果的に d d N T P を組込むが、色素 - ターミネーター 配列決定反応において得られるピークの高さのパターンは不均等である (P a r k e r など . , 1 9 9 6 , B i o T e c h n i q u e s 2 1 (4) : 6 9 4 - 6 9 9 (引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと) 。

30

【 0 0 7 4 】

その不均等性は、配列内容に基づくピークの高さの依存性に少なくとも起因する。たとえば、 A に続く G から得られるピークの高さは、非常に小さく、正確なベース・コールを困難にする。逆に言えば、 G に続く A から得られるピークの高さは非常に高い。特に問題のあるパターンは、 A 又は C の後の G , A 又は C の後の A 、及び T の後の T を包含し、これらは非常に低いピークの高さをもたらすことがある。非常に高いピーク、たとえば G の後の A からの結果は、単独ではほとんどの問題はないが、しかし隣接する低いシグナルを判読しにくくなる。

40

【 0 0 7 5 】

実施例に示されるように、サイクル配列決定反応への本発明のキメラ D N A ポリメラーゼの使用は、 A m p l i T a q (登録商標) D N A ポリメラーゼ F S を用いて得られるよりも有意により均等なピークの高さをもたらす。ピークの高さにおける改良された均等性は、基本コーリングの精度の有意な上昇をもたらし、そして変異及び多型現象検出を容易にする。

【 0 0 7 6 】

3 . 色素 - ラベルされた d d N T P のピロリン酸分解の速度の低下

D N A ポリメラーゼは、無機ピロリン酸 (P P i) の付随した開放を伴って、プライマーの 3' - ヒドロキシル末端上へのデオキシヌクレオチドの鋳型 - 依存的組込みを触媒する

50

。この重合反応は可逆的である。DNAポリメラーゼはまた、逆反応、すなわちPPiの存在下でのDNAの分解であるピロリン酸分解を触媒する。その反応は下記に要約される：



【0077】

また、ピロリン酸ホスホヒドロラーゼとしても知られている無機ピロホスファターゼ(PPアーゼ)は、オルトホスフェートの2つの分子への無機ピロホスフェート(PPi)の加水分解を触媒する。PPアーゼは、RNA及びDNA合成においてインビボで活性役割を演じる。PPiを分解することによって、その酵素は、合成のために全体の平衡性を変える。

10

【0078】

ピロリン酸分解は、DNA配列決定反応に対して是有害なものである。DNA配列決定反応における精度は、正確なバンド位置に依存し、わずか1個のヌクレオチドのサイズ減少が、ゲル人工産物、たとえば減じられた又は欠失したバンドをもたらすことがある。ピロリン酸分解は、プライマー延長生成物の3'-末端からの塩基の除去をもたらす。さらに、ddNTP-終結フラグメントからの組込まれた末端ddNTP(ジデオキシヌクレオシド-リン酸)の除去は、影響される位置でのシグナル強度の低下、及びエレクトロフェログラムにおける減じられた又はミッシングするピークを導びく続く延長を可能にする。

【0079】

従って、配列決定反応においてピロリン酸分解反応を最少にすることが所望される。前記反応へのPPアーゼの添加は、PPiを分解することによって合成のための全体の平衡性を変える。配列決定反応を改良するためへのPPアーゼの使用は、Tabor and Richardson, 1990, J. Biol. Chem. 265(14): 8322-8328; 及びPCT特許出願WO90/12111に記載されている(それらは、引用により本明細書に組込まれる)。AmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFSを含むPerkinElmer(Norwalk, CT)からの市販のサイクル配列決定キットは、ピロリン酸分解を減じるためにPPアーゼを含む。

20

【0080】

驚くべきことには、本発明のDNAポリメラーゼを用いるサイクル配列決定反応は、色素-ラベルされたddNTPターミネーターのピロリン酸分解によりほとんど影響されない。実施例に記載されるように、0~20単位の範囲のPPアーゼ濃度で実施されるサイクル配列決定反応は、実質的に同一の結果をもたらした。従って、本発明のDNAポリメラーゼは、サイクル配列決定反応におけるPPアーゼの必要性を非常に減じ又は排除するよう見える。

30

【0081】

4. dITPの改良された組込み

典型的なサイクル配列決定反応においては、G/Cに富む領域における圧縮を軽減するためにdITPがdTTPの代わりに使用される。DNA中へのdITPの組込みは、変性温度を低め、そして二次構造体の変性を促進する。DNAポリメラーゼは異例なヌクレオチドであるdITPに対して識別するので、適切な組込みを得るために、dITPの相対的濃度は、反応において実質的に高められるべきである。

40

【0082】

たとえば、AmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFSのために最適化される反応条件においては、dITPは、dATP, dCTP及びdTTPの濃度よりも5倍高い濃度で存在する。

対照的に、本発明のDNAポリメラーゼは、dITPをより効果的に組込み、より均等なdNTP濃度を伴ってのその反応の実施を可能にする。実施例に記載されるように、dATP, dCTP及びdTTPの濃度よりもわずか約2~3倍高いdITP濃度が、本発明のDNAポリメラーゼのために最適である。

【0083】

50

5. 発現の効率

上記のように、本発明のキメラ酵素は、変異誘発された Tma DNA ポリメラーゼに対応し、ここでその 5'-ヌクレアーゼドメインはサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼからのその対応するドメインにより置換されている。前記酵素は変異誘発された Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子に対応するキメラ遺伝子から発現され、ここで 5'-ヌクレアーゼドメインをコードする遺伝子の領域はサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ遺伝子のその対応する領域により置換されている。そのキメラ遺伝子の有意な利点は、それが Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子からであるよりもより一層、効果的に組換え発現系においての完全な長さの DNA ポリメラーゼの発現を可能にすることである。

【0084】

10

完全な長さの天然の Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子配列を含む組換え発現系からのその完全な長さの DNA ポリメラーゼの発現は、タンパク質の切断された形の選択的発現のために問題がある（アメリカ特許第 5,420,029 号を参照のこと）。Met 140 Tma として言及される切断されたタンパク質は、完全な長さのタンパク質のアミノ酸 140 - 893 から成り、そして位置 140 でのメチオニンでの翻訳開始に起因するよう見える。コドン 133 - 137 での推定上のリボソーム結合部位の存在は、切断されたタンパク質が内部メチオニンでの翻訳開始に起因することをさらに示唆する。Met 140 Tma 切断タンパク質の選択的発現は、完全な長さの Tma DNA ポリメラーゼの発現及び精製における有意な困難性を提供する。

【0085】

20

キメラ DNA ポリメラーゼ遺伝子は、完全な長さの Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子中のおよそコドン 133 - 137 に存在する代替的（alternative）リボソーム結合部位までに少なくとも対応する領域、そして好ましくは、内部開始コドン、すなわちコドン 140 までの対応する領域にサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ遺伝子配列を含む。従って、リボソーム結合部位及び好ましくは Met 140 Tma の翻訳を担当する開始コドンを含む領域までの Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子配列は、サーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ遺伝子のその対応する領域により置換される。サーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ遺伝子のその対応する領域は、切断されたタンパク質の不所望の内部開始を提供しない。結果として、キメラ DNA ポリメラーゼ遺伝子を含む組換え発現系は、もっぱら完全な長さのキメラ DNA ポリメラーゼを発現する。

【0086】

30

本発明の DNA ポリメラーゼの調製

本発明の DNA ポリメラーゼは、サーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼに由来する部分、及び Tma DNA ポリメラーゼに由来する部分から成るキメラ酵素である。そのキメラ酵素は、キメラ遺伝子、すなわちキメラ酵素をコードし、そしてサーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ遺伝子に由来する部分及び Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子に由来する部分から成る DNA から調製される。キメラ遺伝子は、下記に詳細に記載されるように、分子生物学の分野において良く知られている標準の遺伝子操作技法を用いて、サーマス・スペーシス DNA ポリメラーゼ遺伝子及び Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子から生成される。

【0087】

40

Tma DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子は、アメリカ特許第 5,420,029 号及び第 5,466,591 号に記載される。Tma DNA ポリメラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列、及びそのコードされたタンパク質の完全なアミノ酸配列が、そこに記載されている。前記 '029 号特許の例 5 は、プラスミド pTma 01 (1990 年 11 月 7 日に ATCC No. 68471 の寄託番号下で E. コリ DG 101, pBSM : Tma Xma 7-1 として寄託される；1998 年 5 月 22 日に ATCC No. 98764 として再寄託される) 及び pTma 04 (1990 年 11 月 7 日に ATCC No. 68472 下で E. コリ DG 101, pBSM : Tma Xma 11-1 Ba/Bg 1 として寄託される；1998 年 5 月 22 日に ATCC No. 98765 として再寄託され

50

る)により開始する完全な長さの T m a DNA ポリメラーゼを含む種々のプラスミド、たとえばプラスミド p T m a 1 2 - 1 及び p T m a 1 3 の構成を記載する。それらの発現ベクターのいづれかが、T m a DNA ポリメラーゼ遺伝子の源として適切である。

【 0 0 8 8 】

D N A ポリメラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列及びそのコードされたタンパク質のアミノ酸配列を包含する、多くのサーマス・スペーシスからのD N A ポリメラーゼをコードする遺伝子は記載されている。多くのそれらの遺伝子は、公開されているプラスミドから得ることができる。追加のサーマス・スペーシスからの遺伝子は、アメリカ特許第 5 , 0 7 9 , 3 5 2 号; 第 5 , 4 5 5 , 1 7 0 号; 第 5 , 4 0 5 , 7 7 4 号及び第 5 , 4 6 6 , 5 9 1 号(引用により本明細書に組込まれる)に記載される方法を用いて宿主生物から得られる。10

【 0 0 8 9 】

T a q DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子は、アメリカ特許第 5 , 0 7 9 , 3 5 2 号及び第 5 , 4 6 6 , 5 9 1 号に記載される。T a q DNA ポリメラーゼのヌクレオチド配列、及びそのコードされたタンパク質の完全なアミノ酸配列がそこに記載されている。前記' 3 5 2 号特許の例 V - VII は、プラスミド p F C 8 3 (1 9 8 7 年 5 月 2 9 日に寄託された A T C C 6 7 4 2 2 ; 1 9 9 8 年 5 月 2 2 日に A T C C N o . 9 8 7 6 3 として再寄託された)及び p F C 8 5 (1 9 8 7 年 5 月 2 9 日に寄託された A T C C 6 7 4 2 1 ; 1 9 9 8 年 5 月 2 2 日に A T C C N o . 9 8 7 6 2 として再寄託された)により開始する完全な長さの T a q DNA ポリメラーゼ遺伝子を含む種々の発現プラスミド、たとえばプラスミド p L S P 1 , p L S G 2 , p S Y C 1 5 7 8 , p L S G 5 及び p L S G 6 の構成を記載する。それらの発現ベクターのいづれかが、T a q DNA ポリメラーゼ遺伝子の源として適切である。20

【 0 0 9 0 】

T t h DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子、前記遺伝子を得るための方法、及び前記遺伝子を含む発現プラスミドが、アメリカ特許第 5 , 6 1 8 , 7 1 1 号及び第 5 , 4 6 6 , 5 9 1 号に記載される。

T Z 0 5 DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子、前記遺伝子を得るための方法、及び前記遺伝子を含む発現プラスミドが、アメリカ特許第 5 , 4 5 5 , 1 7 0 号及び第 5 , 4 6 6 , 5 9 1 号に記載される。30

【 0 0 9 1 】

T s p s 1 7 DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子、前記遺伝子を得るための方法、及び前記遺伝子を含む発現プラスミドが、アメリカ特許第 5 , 4 0 5 , 7 7 4 号及び第 5 , 4 6 6 , 5 9 1 号に記載される。

T f i DNA ポリメラーゼ遺伝子は、A k h m e t z j a n o v a n d V a k h i t o v , 1 9 9 2 , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 2 0 (2 1) : 5 8 3 9 (引用により本明細書に組込まれる)に記載される。

【 0 0 9 2 】

T f i DNA ポリメラーゼ遺伝子は、参照された特許に記載される方法を用いて A T C C 4 3 2 8 0 から回収され得る(また、1 9 8 4 , F E M S M i c r o b i o l . L e t t . 2 2 : 1 4 9 - 1 5 3 (1 9 8 4)も参照のこと)。40

T c a DNA ポリメラーゼ遺伝子は、K w o n , 1 9 9 7 , M o l . C e l l s 7 (2) : 2 6 4 - 2 7 1 に記載されており; そしてそのヌクレオチド配列は、E M B L / G e n B a n k 受託番号 U 6 2 5 8 4 として入手できる。

【 0 0 9 3 】

さらなるサーマス・スペーシスDNA ポリメラーゼ遺伝子は、次の A T C C 寄託から、上記引用される特許に記載される技法を用いて回収され得る: A T C C 4 3 8 1 4 及び 4 3 8 1 5 (A l f r e d s s o n , 1 9 8 6 , A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 5 2 : 1 3 1 3 - 1 3 1 6 を参照のこと); A T C C 2 7 9 7 8 (R a m a l e y , 1 9 7 0 , J . B a c t e r i o l . 1 1 4 : 5 5 6 - 5 6 2 ; 1 9 7 3 ; 前記、1 5 0

03:527-528を参照のこと) ; ATCC 31674(アメリカ特許第4,442,214号及び第4,480,036号を参照のこと) ; ATCC 35948(T.ルベル(*T. ruber*), *Loginova*, 1984, Int. J. Syst. Bacteriol. 34:498-499を参照のこと)。すべての文献は引用により本明細書に組込まれる。

【0094】

さらなるサーマス・スペーシスは、次のDeutsche Sammlung von Mikroorganismen(DSM)寄託から、上記引用される特許に記載される技法を用いて回収され得る: DSM: 1279(*Loginova*,など., 1975, Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.: 304-307を参照のこと); DSM: 579; DSM: 625(NUM: 2248)(*Degryse*など., 1978, Arch. Microbiol. 189: 196); DSM: 1279(NUM: 3844)(*Loginova*など., 1984, Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 498-499を参照のこと); 及びDSM: 625(NUM: 1002)(*Brook and Freeze*, 1969, J. Bacteriol.: 289-297を参照のこと)。すべての文献は、引用により本明細書に組込まれる。

【0095】

記載されるさらなるサーマス・スペーシスは、T.オシマイ(*T. oshimae*)(*Williams*など., 1996, Int. J. Syst. Bacteriol. 46(2): 403-408を参照のこと); T.シリベヌス(*T. silvanus*)及びT.クリアロフィラス(*T. chlariophilus*)(*Tenreiro*など., 1995, Int. J. Syst. Bacteriol. 45(4): 633-639を参照のこと); T.スコトダクタス(*T. scotoductus*)(*Tenreiro*など., 1995, Res. Microbiol. 146(4): 315-324を参照のこと); 及びT.ルベル(*T. ruber*)(*Shadrina*など., 1982, Mikrobiologija 51(4): 611-615を参照のこと)を包含する(前記すべての文献は引用により本明細書に組込まれる)。

【0096】

本明細書に提供される案内に従って、及びよく知られた技法のみを用いて、当業者は、DNAポリメラーゼ遺伝子から、種々の宿主システムのいづれかにおいて本発明のキメラDNAポリメラーゼを発現するために適切なキメラ遺伝子を含むいづれかの数の発現ベクターを調製することができるであろう。

【0097】

好ましい態様においては、本発明のキメラ遺伝子は、*Taq DNA*ポリメラーゼからのアミノ酸1-190及び*Tma DNA*ポリメラーゼからのアミノ酸191-893から成り、ここで前記両領域は関連するエキソヌクレアーゼ活性を排除するために適切に変異誘発される。この好ましい態様は、上記の寄託されたプラスミドから得られた又は宿主生物から回収された、*Taq DNA*ポリメラーゼ及び*Tma DNA*ポリメラーゼ遺伝子から直接的に構成され得る。しかしながら、そのようなキメラDNAポリメラーゼは、1997年5月28日に寄託番号第98443号としてATCCに寄託されたプラスミドpUC18:*Tma25*から最も容易に構成され得る。

【0098】

プラスミドpUC18:*Tma25*は、*Taq DNA*ポリメラーゼのアミノ酸1-190及び*Tma DNA*ポリメラーゼのアミノ酸191-893から成るキメラタンパク質をコードするキメラ遺伝子を含む。pUC18:*Tma25*によりコードされるキメラタンパク質は、*Taq DNA*ポリメラーゼ部分においてG46D変異を含む。pUC18:*Tma25*のキメラ遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号9として提供される。

【0099】

適切な発現系は、キメラ遺伝子を適切な発現ベクター中にサブクローニングし、コードされたタンパク質の3 5 エキソヌクレアーゼ活性を弱めるか又は排除する1又は複数

10

20

30

40

50

の点変異を導入し、そして T m a D N A ポリメラーゼ部分に F 7 3 0 Y 変異を導入することによって、p U C 1 8 : T m a 2 5 から構成される。5 - ヌクレアーゼドメインに G 4 6 D 変異、3 5 エキソヌクレアーゼドメインに D 3 2 3 A 及び E 3 2 5 A 変異、及び T m a D N A ポリメラーゼ部分に F 7 3 0 Y 変異を含むキメラタンパク質をコードする、好ましい発現系の構成は、実施例に記載される。

【 0 1 0 0 】

T a q D N A ポリメラーゼのアミノ酸 1 - 1 9 0 をコードする p U C 1 8 : T m a 2 5 のヌクレオチド配列は、アメリカ特許第 5 , 4 6 6 , 5 9 1 号に記載されるプラスミド p R D A 3 - 2 に関連し、そして従って、そこに記載される G 4 6 D 変異を含むアミノ酸配列をコードする。p R D A 3 - 2 及び従って、p U C 1 8 : T m a 2 5 のヌクレオチド配列はまた、サイレントである、すなわちコードされたアミノ酸配列を変更しない生来の T a q D N A ポリメラーゼ遺伝子配列（配列番号 9 ）に対する追加の変異を含む。

【 0 1 0 1 】

遺伝子コードの冗長性のために、典型的には多数の D N A 配列が、いづれか一定のアミノ酸配列をコードし、そしてこの場合、同等である。下記に説明されるように、発現ベクターが挿入されるであろう宿主細胞の好ましいコドン使用に基づいて、発現ベクターへの使用のための 1 又はもう 1 つの同等の D N A 配列を選択することが所望される。本発明は、キメラ酵素をコードするすべての D N A 配列を包含することが意図される。従って、本発明のキメラ遺伝子は、野生型サース種及び T m a D N A ポリメラーゼ遺伝子からの配列のみを含むことに制限されないが、しかし本発明のキメラ D N A ポリメラーゼをコードするいづれかの D N A 配列を含むことができる。

【 0 1 0 2 】

本発明の酵素の生成は、組換え発現クローニングを用いて実施される。組換え発現クローニングの構成、発現クローニングによる宿主細胞の形質転換、及び発現を促進する条件下での形質転換された宿主細胞の培養は、当業界において良く理解されている分子生物学の技法を用いて、宿主の手段で実施され得る。それらの段階の個々のための方法は、下記に一般的に記載される。好ましい方法は、実施例に詳細に記載される。

【 0 1 0 3 】

作用可能な発現クローニングは、発現ベクターにおける適切な制御配列により作用可能な連鎖におけるコード配列を置換することによって構成される。ベクターは、宿主細胞において自律的に複製し、又は宿主細胞の染色体 D N A 中に組込むように企画され得る。得られるクローニングは適切な宿主を形質転換するために使用され、そしてその形質転換された宿主がコード配列の発現のために適切な条件下で培養される。発現されたタンパク質は、多くの場合、タンパク質の回収及び精製は必要ではないが、培地又は細胞から単離される。

【 0 1 0 4 】

コード配列及び適切な制御配列を含む適切なクローニングの構成は、当業界において良く知られている標準の連結及び制御技法を用いる。一般的に、単離されたプラスミド、 D N A 配列又は合成されたオリゴヌクレオチドが、切断され、修飾され、そして所望する形で再連結される。適切な制限部位は、通常利用できない場合、発現クローニングの構成を促進するためにコード配列の末端に付加され得る。

【 0 1 0 5 】

部位特異的 D N A 切断は、当業界において一般的に理解され、そして市販の制限酵素の製造業者により規定される条件下で、適切な制限酵素（又は複数の酵素）により処理することによって実施される。たとえば、Amersham (Arlington Heights, IL) , Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) 及び New England Biolabs (Beverly, MA) からの製品カタログを参照のこと。一般的に、約 1 μ g のプラスミド又は他の D N A が、約 2 0 μ l の緩衝溶液における 1 単位の酵素により切断され；下記例においては、過剰の制限酵素が一般的に、 D N A の完全な消化を確保するために使用される。

【 0 1 0 6 】

10

20

30

40

50

特定の酵素のために最適である温度での約1～2時間のインキュベーション時間が典型的である。個々のインキュベーションの後、タンパク質はフェノール及びクロロホルムによる抽出により除かれ；この抽出の後、エーテル抽出、及びエタノールによる沈殿により水性画分からのDNAの回収が伴なう。所望により、切断されたフラグメントのサイズ分離が、標準の技法を用いて、ポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲル電気泳動により実施され得る。たとえば、Maxamなど、Methods in Zymology, 1980, 65: 499-560を参照のこと。

【0107】

一本鎖“オーバーハング”末端を有する制限・切断されたフラグメントは、50mMのトリス(pH7.6)、50mMのNaCl、10mMのMgCl₂、10mMのDTT及び5～10μMのdNTPの溶液において20～25で約15～25分のインキュベーション時間用いて、4種のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)の存在下で、E.コリDNAポリメラーゼの大きなフラグメント(クレノウ)により処理することによって、プラント末端化(二本鎖末端)され得る。10

【0108】

クレノウフラグメントは5突出末端でフィルインし、そして4種のdNTPが存在する場合でさえ、突出する3一本鎖をチューバックする。所望により、選択的修復が、前記突出する末端の性質により指図される制限内に1又は複数の選択されたdNTPを供給することによって実施され得る。クレノウによる処理の後、その混合物がフェノール／クロロホルムにより抽出され、そしてエタノール沈殿される。類似する結果が、S1ヌクレアーゼを用いて達成され得る。なぜならば、S1ヌクレアーゼによる適切な条件下での処理は核酸のいづれかの一本鎖部分の加水分解をもたらすからである。20

【0109】

連結は、次の標準の条件及び温度下で15～30μlの体積において実施される：20mMのトリス-C1, pH7.5, 10mMのMgCl₂, 10mMのDTT, 33μg/mlのBSA, 10～50mMのNaCl、及び40μMのATP及び0.01-0.02(Weiss)単位のT4 DNAリガーゼ(0)(相補的一本鎖末端を有するフラグメントの連結のための)又は1mMのATP及び0.3-0.6単位のT4 DNAリガーゼ(14)(“プラント末端”連結のための)のいづれか。相補的末端を有するフラグメントの分子間連結は通常、33～100μg/mlの合計DNA濃度(5～100nMの合計末端濃度)30で実施される。分子間プラント末端連結(通常、任意には、20～30倍モル過剰のリンカーを用いる)が1μMの合計末端濃度で実施される。

【0110】

ベクターの構成においては、ベクターフラグメントが、5リン酸を除去し、そしてベクターの再連結及び再構成を妨げるために細菌又はウシ小腸アルカリホスファターゼ(BAP又はCIAp)により通常処理される。BAP及びCIAp消化条件は、当業界において良く知られており、そして公開されたプロトコールは市販されているBAP及びCIAp酵素を通常付随する。核酸フラグメントを回収するためには、調製物がフェノール-クロロホルムにより抽出され、そしてエタノール沈殿され、ホスファターゼが除去され、そしてDNAが精製される。他方では、所望しないベクターフラグメントの再連結は、適切な制限部位が利用できる場合、連結の前又は後、制限酵素消化により阻止され得る。40

【0111】

下記に示される構成においては、プラスミド構成のための正しい連結は、その連結混合物により適切な宿主、たとえばE.コリ株DG101(ATCC 47043)又はE.コリ株DG116(ATCC 53606)をまず形質転換することによって確認される。好結果をもたらす形質転換体は、当業界において理解されているように、アンピシリン、テトラサイクリン又は他の抗生物質耐性により、又は他のマーカーを用いることにより、プラスミド構成の態様に依存して選択される。

【0112】

次に、形質転換体からのプラスミドが、任意には、クロラムフェニコール増幅(Clew50

e l l , 1 9 7 2 , J . B a c t e r i o l . 1 1 0 : 6 6 7) に続いて、 Clewell など . , 1 9 6 9 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 6 2 : 1 1 5 9 の方法に従って調製される。他方では、プラスミドDNAが、 Bethesda Research Laboratories Publication Focus 5 (2) のページ 11 の“塩基 - 酸”抽出法を用いて調製され得、そしてひじょうに純粋なプラスミドDNAが、DNAのCsCl / 臭化エチジウム超遠心分離により前記プロトコールの段階 12 ~ 17 を置換することによって得られる。

【 0 1 1 3 】

単離されたDNAは、制限酵素消化により分析され、そして / 又は Sangerなど . , 1 9 7 7 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 7 4 : 5 4 6 3 のジデオキシ方法 (Messingなど . , 1 9 8 1 , Nuc . Acids Res . 9 : 3 0 9 によりさらに記載されるような) により、又は Maxamなど . , 1 9 8 0 , Method s in Enzymology 6 5 : 4 9 9 の方法により配列決定される。

【 0 1 1 4 】

制御配列、発現ベクター及び形質転換方法は、遺伝子を発現するために使用される宿主細胞のタイプに依存する。一般的に、原核、酵母、昆虫、又は哺乳類細胞が宿主として使用される。原核宿主は一般的に、組換えタンパク質の生成のために最も効果的且つ便利な宿主であり、そして従って、タンパク質の発現のために好ましい。

【 0 1 1 5 】

組換えタンパク質を発現するために最も頻繁に使用される原核生物は、E. コリである。しかしながら、E. コリ以外の微生物株、たとえばバシラス (Bacillus) 、たとえばバシラス スブチリス (Bacillus subtilis) 、プソイドモナス (Pseudomonas) の種々の種、及び他の細菌株が、タンパク質の組換え発現のためにまた使用され得る。そのような原核システムにおいては、宿主又はその宿主と適合する種に由来する複製部位及び制御配列を含むプラスミドベクターが典型的には、使用される。

【 0 1 1 6 】

ほとんどの細菌プロモーターの制御下での構造体の発現のためには、G C S C # 6 1 3 5 としての E. コリ Genetic Stock Center から得られた E. コリ K 1 2 株 MM 2 9 4 が、宿主として使用され得る。P_L N_{RBS} 又は P_L T_{JRBS} 制御配列を有する発現ベクターのためには、E. コリ K 1 2 株 MC 1 0 0 溶原菌、すなわち N₇ N₅₃ C I 8 5 7 Sus P₈₀ (ATCC 3 9 5 3 1) が使用され得る。1 9 8 7 年 4 月 7 日に ATCC (ATCC 5 3 6 0 6) に寄託された E. コリ DG 1 1 6 、及び 1 9 8 5 年 3 月 2 9 日に ATCC (ATCC 5 3 0 7 5) に寄託された E. コリ K B 2 はまた、有用な宿主細胞である。M 1 3 ファージ組換え体のためには、ファージ感染に対して敏感な E. コリ 株、たとえば E. コリ K 1 2 株 DG 9 8 (ATCC 3 9 7 6 8) が使用される。DG 9 8 株は、1 9 8 4 年 7 月 1 3 日に ATCC に寄託された。

【 0 1 1 7 】

たとえば、E. コリは典型的には、Bolivarなど . , 1 9 7 7 , Gene 2 : 9 5 により記載される pBR 3 2 2 の誘導体を用いて形質転換される。プラスミド pBR 3 2 2 は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含む。それらの薬物耐性マーカーは、所望するベクターの構成において保持されるか、又は破壊され得、そしてその結果、所望する組換え体の存在の検出を助けることができる。

【 0 1 1 8 】

通常使用される原核制御配列、すなわちリボソーム結合部位配列と共に、任意にはオペレーターを有する転写開始のためのプロモーターは、 - ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) 及びラクトース (lac) プロモーターシステム (Changなど . , 1 9 7 7 , Nature 1 9 8 : 1 0 5 6) 、トリプトファン (trp) プロモーターシステム (Goeddelなど . , 1 9 8 0 , Nuc . Acids Res . 8 : 4 0 5 7) 、及び - 由来の P_L プロモーター (Shimatakeなど . , 1 9 8 1 , Nature 2 9 2 :

10

20

30

40

50

128)並びに遺伝子Nリボソーム結合部位(N_{RBS})を包含する。移植可能な制御システムカセットが、1987年12月8日に発行されたアメリカ特許第4,711,845号に示されている。

【0119】

このカセットは、 N_{RBS} 配列の3側の6個の塩基対内での切断を可能にする少なくとも1つの制御部位を有する第3DNA配列の上流に位置する N_{RBS} に操作可能的に連結されるPLプロモーターを含んで成る。1986年10月8日に公開されたヨーロッパ特許公開第196,864号においてChangなどにより記載されるホスファターゼA(phoA)システムがまた有用である。しかしながら、原核生物と適合できる、いづれかの利用できるプロモーターシステムが、本発明の発現ベクターを構成するために使用され得る。10

【0120】

細菌の他に、真核微生物、たとえば酵母がまた、粗換え宿主細胞としても使用され得る。サッカロミセスセレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)、すなわちパン酵母の実験室用菌株が最ともしばしば使用されるが、但し、多くの他の菌株も通常利用できる。複製の2ミクロロン起点を有するベクターが通常であるが(Broach, 1983, Meth. Enz. 101: 307)、酵母発現のために適切である他のプラスミドベクターも知られている(たとえば、Stinchcombeなど., 1979, Nature 282: 39; Tschempeなど., 1980, Gene 10: 157; 及びClarkeなど., 1983, Meth. Enz. 101: 300を参考のこと)。20

【0121】

酵母ベクターのための制御配列は、解糖酵素の合成のためのプロモーターを含む(Hessなど., 1968, J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149; Hollandなど., 1978, Biotechnology 17: 4900; 及びHollandなど., 1981, J. Biol. Chem. 256: 1385)。当業界において知られているさらなるプロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのためのプロモーター(Hitzemanなど., 1980, J. Biol. Chem. 255: 2073)、及び他の解糖酵素、たとえばグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのためのプロモーターを包含する。30

【0122】

増殖条件により制御される転写のさらなる利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、及びマルトース及びガラクトース使用を担当する酵素のためのプロモーター領域である(Holland、前記)。

ターミネーター配列はまた、コード配列の3末端で配置される場合、発現を増強するために使用され得る。そのようなターミネーターは、酵母由来の遺伝子におけるコード配列に続く3未翻訳領域に見出される。酵母適合性プロモーター、複製の起点、及び他の制御配列を含むいづれかのベクターが、酵母発現ベクターの構成への使用のために適切である。40

【0123】

前記コード配列はまた、複数細胞生物に由来する真核宿主細胞培養物においても発現され得る。たとえば、Tissue Culture, Academic Press, Cruz and Patterson, editors (1973)を参照のこと。有用な宿主細胞系は、COS-7, COS-A2, CV-1、ネズミ細胞、たとえばネズミ骨髄腫N51及びVERO, HeLa細胞、及びチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を包含する。50

【0124】

そのような細胞のための発現ベクターは、哺乳類細胞と適合するプロモーター及び制御配列、たとえば Simian Virus 40 (SV40) からの通常使用される初期及び後期プロモーター (Fiersなど., 1978, Nature 273: 113)、又は他のウィルスプロモーター、たとえばポリオーマ、アデノウィルス2、ウシ乳頭腫ウイルス (BPV) 又は鳥類肉腫ウイルスに由来するプロモーター、又は免疫グロブリンプロモーター及び熱ショックプロモーターを包含する。BPVベクターシステムを用いて哺乳類系においてDNAを発現するためのシステムが、アメリカ特許第4,419,446号に開示される。

【0125】

10

このシステムの修飾がアメリカ特許第4,601,978号に記載される。哺乳類宿主システム形質転換の一般的な観点がアメリカ特許第4,399,216号 (Axel) により記載されている。“エンハンサー”領域はまた、発現の最適化においても重要であり；それらは一般的に、プロモーター領域の上流に見出される配列である。複製の起点は、必要とされる場合、ウィルス源から得られる。しかしながら、染色体中への組込みは、真核生物におけるDNA複製のための通常の機構である。

【0126】

植物細胞はまた、宿主としても使用され得、そして植物細胞と適合できる制御配列、たとえばノバリンシンターゼプロモーター及びポリアデニル化シグナル配列 (Depickerなど., 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1: 561) が利用できる。バキュロウイルスベクターにより供給される制御システムを利用する、昆虫細胞使用の発現系がまた記載されている (Millerなど., Genetic Engineering (1986), Setlowなど., eds., Plenum Publishing, Vol. 8, pp. 277-297)。昆虫細胞に基づく発現は、ス Podoptera frugipedia において達成され得る。それらのシステムはまた、組換え酵素の生成においても好都合である。

20

【0127】

使用される宿主細胞に依存して、形質転換は、そのような細胞に対して適切な標準の技法を用いてなされる。Cohen, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 2110により記載されるような、塩化カルシウムを用いるカルシウム処理が、実質的な細胞壁バリヤーを含む、原核生物又は他の細胞のために使用される。アグロバクテリウム ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) による感染 (Shawなど., 1983, Gene 23: 315) が、一定の植物細胞のために使用される。哺乳類細胞のためには、Graham and van der Eb, 1978, Virology 52: 546のリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。酵母の形質転換は、Van Solingenなど., 1977, J. Bact. 130: 946及びHsiaoなど., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 3829の方法に従って実施される。

30

【0128】

コードされたタンパク質のアミノ酸配列を修飾しないで、宿主細胞のコドン使用とより適合できる配列を供給するために本発明の酵素をコードするDNAの配列を修飾することが所望される。初期5~6のコドンに対するそのような修飾は、発現効率を改良することができる。発現効率を改良するために修飾されているが、しかし同じアミノ酸配列をコードするDNA配列は、同等であり、そして本発明により包含されると思われる。

40

【0129】

種々の部位特異的プライマー指図された変異誘発方法が利用でき、そして当業界において良く知られている（たとえば、Sambrookなど., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989、第2版、Chapter 15.51, “Oligonucleotide-mediated Mutagenesis”、（引用により本明細書に組込まれ

50

る)を参照のこと)。ポリメラーゼ鎖反応(PCR)は、部位特異的変異誘発を行なうために用いられ得る。

【0130】

当業界において現在、標準であるもう1つの技法においては、所望する変異をコードする合成オリゴヌクレオチドが、変異誘発プライマーの延長生成物の構成のために鑄型として作用する、一本鎖ベクター、たとえばpBSM13+誘導体に含まれる相補的核酸配列の合成を方向付けるためにプライマーとして使用される。変異誘発されたDNAを用いて、宿主細胞が形質転換され、そして形質転換された細菌の培養物がプレートされ、そして同定される。

【0131】

修飾されたベクターの同定は、選択された形質転換体のDNAのニトロセルロースフィルター又は他の膜へのトランスファー、及び修飾された配列への正確なハイブリダイゼーションを可能にするが、しかし元の変異誘発されていない鎖とのハイブリダイゼーションを妨げる温度でのキナーゼ処理された合成変異誘発プライマーによりハイブリダイズされた“リフト(lift)”を包含する。プローブとハイブリダイズするDNAを含む形質転換体が次に培養され(DNAの配列が一般的に、配列分析により確認される)、そして修飾されたDNAの貯蔵として作用する。

【0132】

タンパク質が組換え宿主細胞において発現されると、そのタンパク質の精製が所望される。種々の精製方法が、本発明の組換え熱安定性DNAポリメラーゼを精製するために使用され得る。例としては、アメリカ特許第4,889,818号；第5,352,600号及び第5,079,352号に記載されるTaq DNAポリメラーゼを精製するための方法；アメリカ特許第5,618,711号及び第5,310,652号に記載されるサーマスサーモフィリス(Tth)からDNAポリメラーゼを精製するための方法；及びアメリカ特許第5,374,553号及び第5,420,029号に記載されるTma DNAポリメラーゼを精製するための方法を挙げることができる。それらのDNAポリメラーゼを精製するための方法はまた、アメリカ特許第5,466,591号にも記載される。上記特許のすべては、引用により本明細書に組込まれる。

【0133】

好ましい方法においては、DNAポリメラーゼの発現は、中温菌の細菌宿主細胞である。E.コリにおいて実施される。E.コリ宿主タンパク質は感熱性であるので、組換え熱安定性DNAポリメラーゼは、粗溶解物を熱不活性化することによって実質的に富化され得る。この段階は、他の細胞溶解物タンパク質とのDNAポリメラーゼのイオン性相互作用を減じるために、十分量の塩(典型的には、0.2~0.4Mの硫酸アンモニウム)の存在下で行なわれる。

精製されたDNAポリメラーゼの活性は、Lawyerなど., 1989, J. Biol. Chem. 264: 6427(引用により本明細書に組込まれる)に記載のようにしてアッセイされる。

【0134】

長期安定性のために、精製されたDNAポリメラーゼ酵素は、1又は複数の非イオン性ポリマー界面活性剤を含む緩衝液に貯蔵されるべきである。そのような界面活性剤は一般的に、約100~250,000、好ましくは約4,000~200,000ドルトンの範囲の分子量を有し、そして約3.5~約9.5、好ましくは約4~8.5のpHで酵素を安定化するものである。そのような界面活性剤の例は、McCutcheon Division of MC Publishing Co., 175 Rock Road, Clifton Rock, NJ(USA)により出版されたMcCutcheon's Emulsifiers & Detergents, North American edition(1983)の295~298ページに特定されるものを包含する(その開示は、引用により本明細書に組込まれる)。

【0135】

10

20

30

40

50

好ましくは、界面活性剤は、エトキシル化された脂肪アルコールエーテル及びラウリルエーテル、エトキシル化されたアルキルフェノール、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール化合物、変性されたオキシエチル化された及び／又はオキシプロピル化された直鎖アルコール、ポリエチレングリコールモノオレエート化合物、ポリソルベート化合物、及びフェノール性脂肪アルコールエーテルから成る群から選択される。より特定には、I C I Americas Inc. (Wilmington, DE) からの Tween 20™、すなわちポリエトキシエチル化された(20)ソルビタンモノラウレート、及び B A S F Wyandotte Corp. (Parsippany, NJ) からの Iconol™NP-40、すなわちエトキシル化されたアルキルフェノール(ノニル)が好ましい。

10

【0136】

本発明の熱安定性酵素は、熱安定性DNAポリメラーゼが必要であるか又は所望されるいづれかの目的のために使用され得る。好ましい態様においては、酵素はDNA配列決定のためである(Iannisなど., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9436-9440; 引用により本明細書に組込まれる)。

次の例は、例示的であって、本発明の範囲を限定するものではない。それらの例において、すべての百分率は、特にことわらない限り、固体の場合、重量によってであり、そして液体の場合、体積によってである。

【0137】

【実施例】

20

例1. 発現系の構成

発現系は、当業界において良く知られている従来の技法を用いて、スクレオチド配列、配列番号9を有する遺伝子を含む寄託されたプラスミドpUC18:Tma25から構成される。下記により詳細に記載される、関与する段階は、次の通りである。

- pUC18:Tma25に含まれるDNAポリメラーゼコード配列を、pDG160発現ベクター中にサブクローン化し、プラスミドpTMA25をもたらす。

【0138】

- D323A及びE325A変異を、部位特異的プライマー指図された変異誘発によりpTMA25に付加し、プラスミドpTMA30をもたらす。

- 次に、pTAM30からの変異誘発された遺伝子コード配列を、コドン1-283が欠失されるようにpDG184発現ベクター中にサブクローン化し、プラスミドpTMA31をもたらす。

30

- F730Y変異を、部位特異的プライマー指図された変異誘発によりpTMA31に付加し、プラスミドpTMA31[F730Y]をもたらす。

【0139】

- F730Y変異を含むpTMA31[F730Y]からの変異誘発されたコード配列のフラグメントを、その対応する変異誘発されていないフラグメントを置換するためにpTMA30中にサブクローン化し、プラスミドpTMA30[F730Y]をもたらす。

【0140】

個々の変異誘発又はサブクローニング段階に続いて、E.コリ株DG116宿主細胞を、プラスミド構造体により形質転換する。アンピシリン耐性(プラスミド含有)コロニーを、標準方法を用いて、所望するプラスミドの存在についてスクリーンする。典型的には、第1のコロニーを、ゲル電気泳動サイズ分別により予測されるサイズのプラスミドの存在について選択する。候補体コロニーを、1又は複数の制限酵素による消化に続いて、予測されるフラグメントパターンを示すプラスミドについてさらにスクリーンする。最終的に、突然誘発された部位及び連結接合部分を配列決定し、意図された配列を確認する。

40

【0141】

プラスミドpDG160は、アメリカ特許第5,618,711号(引用により本明細書に組込まれる)に記載される。プラスミドpDG160は、バクテリオファージPLプロモーター及び遺伝子Nリボソーム結合部位(アメリカ特許第4,711,845号、引

50

用により本明細書に組込まれる)、ポリリンカー中にクローン化された配列が P_L プロモーターの制御下で発現され得るように配置された制限部位ポリリンカー及び遺伝子Nリボソーム結合部位、及びバシラス・スリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) デルタ-トキシン遺伝子からの転写ターミネーター(アメリカ特許第4,666,848号を参照のこと、引用により本明細書に組込まれる)を含んで成るクローニング及び発現ベクターである。プラスミド pDG160はまた、そのプラスミドを、コピー数のために感温性にする変異誘発されたRNAII遺伝子を担持する(アメリカ特許第4,631,257号を参照のこと、引用により本明細書に組込まれる)。

【0142】

それらの要素は、プラスミド pDG160をひじょうに有用で且つ強力な発現ベクターにするために強力して作用する。30~32で、プラスミドのコピー数は低く、そして感温性リプレッサー遺伝子、たとえばcI857を担持する宿主細胞においては、 P_L プロモーターは機能しない。しかしながら、37~41で、プラスミドのコピー数は30~32でのコピー数よりも50倍高く、そしてcI857リプレッサーが不活性化され、 P_L プロモーターの機能を可能にする。プラスミド pDG160はまた、アンピシリン耐性(AmpR)マーカーも担持する。要約すると、プラスミド pDG160は、AmpRマーカー、 P_L プロモーター及び遺伝子Nリボソーム結合部位、ポリリンカー及びBTcryPRE(BT陽性逆調節要素、アメリカ特許第4,666,848号)を、ColE1 cop^{ts}ベクターに含んで成る。

【0143】

プラスミド pDG184は、アメリカ特許第5,420,029号(引用により本明細書に組込まれる)に記載される。プラスミド pDG184は、挿入された遺伝子の開始コドンでNcoI部位を含むよう修飾された、pDG160の誘導体である。前記プラスミドの残りは、pDG160からであり、機能的に変更されていない。

【0144】

I. サブクローニング I

プラスミド pUC18 : Tma25からのDNAポリメラーゼコード配列を、pDG160発現プラスミド中に次の通りにしてサブクローン化する:

A. プラスミド pUC18 : Tma25、すなわち5347個の塩基対(bp)のプラスミドを、位置2084(コード配列の最初のヌクレオチドから出発して番号付けされた)で切断するNspVによる消化により線状化する。

B. NspV消化に起因する線状化されたプラスミドを、ヌクレオチド(nt)位置1661, 1989, 2039及び2686で切断するBamHIによりさらに消化する。DNAポリメラーゼ遺伝子の3末端を含む602bpのNspV / BamHIフラグメントを、ゲル精製する。

【0145】

C. 別の反応において、NspV消化に起因する線状化されたプラスミドを、位置2629及び5342で切断するHindIIIによりさらに消化する。DNAポリメラーゼ遺伝子の5末端を含む2089bpのNspV / HindIIIフラグメント(nt5343-2084)をゲル精製する。

D. プラスミド pDG160を、HindIII及びBamHIにより消化し、そしてウシ腸アルカリホスファターゼ(CIAP)により処理し、5リン酸を除去し、そしてベクターの連結及び再構成を阻止する。他方では、その消化されたベクターフラグメントを、ゲル精製する。

【0146】

E. 段階B及びCからの単離されたフラグメントを、段階Dからの消化されたpDG160プラスミドと共に、合計のDNA 1 μl当たり10~40ngの濃度で2:2:1の比で組合し、そして連結し、8218bpのプラスミドをもたらす。

F. 連結生成物を用いて、E. コリ DG116細胞(上記に記載される)を形質転換し、そしてpTMA25と称する所望するプラスミドを含む形質転換体コロニーを、スクリー

10

20

30

40

50

ニングにより同定する。

【0147】

III. 変異誘発 I : D 3 2 3 A 及び E 3 2 5 A

D 3 2 3 A 及び E 3 2 5 A アミノ酸変異をもたらす、p T M A 2 5 の配列のコードする D N A ポリメラーゼにおける変異を、部位 - 特異的プライマー指図された変異誘発を用いて行なう。後での操作における便利さのために、B g 1 II 制限酵素切断部位を排除し、そして S p e I 制限酵素切断部位を創造する追加の変異誘発を行なう。それらの追加の変異は、コードされたアミノ酸配列が変更されないように行なわれる。

【0148】

次のプライマーが変異誘発に使用される :

10

- プライマー P 1 : 下記表に記載されるような変異を有する、配列番号 9 のヌクレオチド 9 5 8 - 9 8 8 に対応する変異誘発性上流プライマー。
- プライマー P 2 : プライマー P 1 の逆補体から成る変異誘発性下流プライマー。
- プライマー P 3 : X b a I 部位 (ヌクレオチド 6 2 1 - 6 2 6) を包含する、配列番号 9 のヌクレオチド 6 0 8 - 6 2 7 に対応する上流プライマー。
- プライマー P 4 : S a c I 部位の一部 (ヌクレオチド 1 3 1 8 - 1 3 2 3) を包含する、配列番号 9 のヌクレオチド 1 3 1 9 - 1 3 3 9 に対応する下流プライマー。

【0149】

変異誘発性上流プライマー P 1 の配列は、配列番号 9 のコード鎖のヌクレオチド 9 5 8 - 9 8 8 から成るが、但し、下記表に示される変更は伴わない。コドン 3 2 3 (ヌクレオチド 9 6 7 - 9 6 9) における変更は、B g 1 II 部位の排除をもたらした。コドン 3 2 6 (ヌクレオチド 9 6 6 - 9 7 8) 及び 3 2 7 (ヌクレオチド 9 7 9 - 9 8 1) における変更は、コードされたアミノ酸の配列に影響を及ぼさないが、しかし S p e I 部位の創造をもたらす。

20

【0150】

【表 4】

表 4

プライマー P 1 における突然変異

30

ヌクレオチド	コドン	ヌクレオチドの変更	アミノ酸の変更
967-969	323	G A T → G C T	D 3 2 3 A
973-975	325	G A G → G C G	E 3 2 5 A
976-978	326	A C G → A C T	ナシ
979-981	327	T C T → A G T	ナシ

40

【0151】

変異誘発は、下記に記載のようにして実施される。すべての増幅は、当業界において良く知られている条件下で P C R により実施される。たとえば、増幅は、A m p l i T a q 登録商標 DNA ポリメラーゼを有する G e n e A m p P C R R e a g e n t K i t (P e r k i n E l m e r , N o r w a l k , C T) を用いて、実施され得る。

A . コード配列の領域を、プライマー P 3 及び P 2 を用いて、精製された p T M A 2 5 から増幅し、そしてその得られる 3 8 1 bp の増幅された生成物をゲル精製する。

50

【0152】

B. コード配列の領域を、プライマー P1 及び P4 を用いて、精製された pTMA25 から増幅し、そしてその得られる 382 bp の増幅された生成物をゲル精製する。

C. 段階 A 及び B からの増幅された生成物を組合し、95℃で熱変性し、アニーリングし、そして標準の技法を用いて、DNA ポリメラーゼにより延長する。

D. 段階 C からのアニーリングされ、そして延長された複合 DNA を、プライマー P3 及び P4 を用いて再増幅し、そしてその得られる 732 bp の増幅された生成物をゲル精製する。

E. 段階 D からの増幅された DNA を、XbaI 及び SacI により消化する。

【0153】

10

F. プラスミド pTMA25 を XbaI 及び SacI により消化し、そしてウシ腸アルカリホスファターゼ (CIP) により処理し、5'リン酸を除去し、そしてベクターの再連結及び再構成を阻止する。

G. 段階 E からの消化された DNA を、段階 F からの消化されたプラスミドと、3:1 の比で組合し、そして連結する。

H. 前記連結生成物を用いて、E. コリ DG116 細胞を形質転換し、そして pTMA30 と称する、所望するプラスミドを含む形質転換体コロニーを、スクリーニングすることにより同定する。

【0154】

20

III. サブクローニングII

次に、pTMA30 からの配列をコードする変異誘発された遺伝子を、コドン 1 - 283 が欠失されるように pDG184 発現ベクター中にサブクローニングする。ここで使用されるヌクレオチド位置数は、プラスミド内の位置を言及し、ここで位置 1 は P_L プロモーターの上流の EcoRI 部位により定義される。サブクローニングは次の通りにして行なわれる。

【0155】

A. 8218 bp のプラスミドであるプラスミド pTMA30 を、ヌクレオチド位置 444-3 で切断する MluI；位置 1210, 4761, 5769 及び 5874 で切断する BspHI；及び位置 7827 で切断する Af1II により消化する。所望するフラグメントの、単離を促進するために、Af1II 消化を行ない、所望する 3233 bp の BspHI / MluI フラグメントにサイズ的に類似する 3554 bp の BspHI / BspHI フラグメントをさらに分解する。前記消化は、3233, 1952, 1601, 1008, 318 及び 105 bp の長さを有する 6 種のフラグメントを生成した。前記プラスミドのヌクレオチド 1211 - 4443 に対応する 3233 bp の BspHI / MluI フラグメントを、ゲル電気泳動により単離する。

30

【0156】

B. 5474 bp プラスミドのプラスミド pDG184 を、位置 1699 で切断する MluI、及び位置 284 で切断する NcoI により消化する。その消化されたフラグメントを、ウシ腸アルカリホスファターゼ (CIP) により処理し、5'リン酸を除去し、そしてベクターの再連結及び再構成を阻止する。他方では、4059 bp のフラグメントを、ゲル電気泳動により単離する。

40

【0157】

C. 段階 A からの単離されたフラグメントを、段階 B からの消化された pDG184 プラスミドと共に、合計 DNA 1 μl 当たり 10 ~ 40 ng の濃度で、1:1 の比で組合し、そして連結し、7292 bp のプラスミドをもたらす。

D. 前記連結生成物を用いて、E. コリ DG116 細胞を形質転換し、そして pTMA31 と称する所望するプラスミドを含む形質転換体コロニーを、スクリーニングにより同定する。

【0158】

IV. 変異誘発II : F730Y

50

コードされたアミノ酸配列変異においてF 7 3 0 Y変異をもたらすp T M A 3 1の配列をコードするD N Aポリメラーゼにおける追加の変異を、部位 - 特異的 - 指図された変異誘発を用いて行なった。前記変異誘発は、上記に記載される方法に類似する方法を用いて実施された。

次のプライマーが変異誘発に使用された。

- プライマー F R 1 : 下記表に記載されるような変異を有する、配列番号 9 のヌクレオチド 2 1 7 3 - 2 2 0 2 に対応する変異誘発性上流プライマー。

【 0 1 5 9 】

- プライマー F R 2 : プライマー F R 1 の逆補体から実質的に成るが、しかし配列番号 9 のヌクレオチド 2 1 7 2 - 2 2 0 0 に対応する変異誘発性下流プライマー。

10

- プライマー F R 3 : B s t X I 部位の上流に位置する、配列番号 9 のヌクレオチド 1 9 5 2 - 1 9 7 2 に対応する上流プライマー。

- プライマー F R 4 : X m a I 部位の下流に位置する、配列番号 9 のヌクレオチド 2 4 1 5 - 2 4 3 3 に対応する下流プライマー。

変異誘発性上流プライマー F R 1 の配列は、配列番号 9 のコード鎖のヌクレオチド 2 1 7 3 - 2 2 0 2 から成るが、但し、下記表に示される変更は存在しない。コドン 7 2 9 (2 1 8 5 - 2 1 8 7) における変更は、コードされたアミノ酸の配列に影響を及ぼさないが、しかし H p a I 部位の創造をもたらす。

【 0 1 6 0 】

【表 5】

20

表 5

プライマー F R 1 における突然変異

ヌクレオチド	コドン	ヌクレオチドの変更	アミノ酸の変更
2185-2187	729	A A T → A A C	なし
2188-2190	730	T T T → T A T	F 7 3 0 Y

30

【 0 1 6 1 】

変異誘発を、下記に記載のようにして実施した。

A . コード配列の領域を、プライマー F R 3 及び F R 2 を用いて、精製された p T M A 3 1 から増幅し、そして得られる 2 4 9 bp の増幅された生成物をゲル精製した。

B . コード配列の領域を、プライマー F R 1 及び F R 4 を用いて、精製された p T M A 3 1 から精製し、そして得られる 2 6 1 bp の増幅された生成物をゲル精製した。

40

【 0 1 6 2 】

C . 段階 A 及び B からの増幅された生成物を組合し、9 5 °で熱変性し、アニーリングし、そして標準の技法を用いて D N A ポリメラーゼにより延長した。

D . 段階 C からのアニーリングされ、そして延長された複合 D N A を、プライマー F R 3 及び F R 4 を用いて再増幅し、そして得られる 4 8 2 bp の増幅された生成物をフェノール / クロロホルム混合物を用いて抽出し、そして E t O H により沈殿せしめた。

E . 段階 D からの増幅された D N A を B s t X I 及び X m a I により消化し、そして所望される 3 3 7 bp の D N A フラグメントを、C E N T R I C O N 1 0 0 カラム (A m i c o n , B e v e r l y , M A) を用いて、より小さなフラグメントから分離した。

【 0 1 6 3 】

50

F . プラスミド p T M A 3 1 を、 B s t X I 及び X b a I により消化した。

G . 段階 E からの消化された D N A を、段階 F からの消化されたプラスミドと共に 3 : 1 の比で組合し、そして連結した。

H . 前記連結生成物を用いて、 E . コリ D G 1 1 6 細胞を形質転換した。変異誘発の間に導入されるユニーク H p a I 部位を包含する領域を増幅するプライマー F R 3 及び F R 4 を用いて、プラスミド D N A を増幅し、前記増幅された生成物を H p a I により消化し、そして前記消化生成物をゲル電気泳動により分析することによって、コロニーを、所望する変異誘発されたプラスミドの存在についてスクリーンした。 p T M A 3 1 [F 7 3 0 Y] と称する所望するプラスミドを含むコロニーを選択し、そしてその遺伝子配列を D N A 配列決定により確かめた。

10

【 0 1 6 4 】

その得られる発現系は、 D 3 2 3 A , E 3 2 5 A 及び F 7 3 0 Y 変異により変異誘発された、 T m a D N A ポリメラーゼのアミノ酸 2 8 4 - 8 9 3 から成る、 F 7 3 0 Y T m a 3 1 D N A ポリメラーゼと称する D N A ポリメラーゼを発現する。

【 0 1 6 5 】

V . サブクローニングIII

F 7 3 0 Y 変異を含む p T M A 3 1 [F 7 3 0 Y] からの変異誘発されたコード配列のフラグメントを、 p T M A 3 0 中にサブクローニングし、その対応する変異誘発されたフラグメントを置換し、プラスミド p T M A 3 0 [F 7 3 0 Y] をもたらした。ここで使用されるヌクレオチド位置数は、プラスミド内の位置を言及し、ここで位置 1 は、 P L プロモーターの上流の E c o R I 部位により定義される。サブクローニングを、次の通りにして実施した。

20

【 0 1 6 6 】

A . 7 2 9 2 bp のプラスミドであるプラスミド p T M A 3 1 [F 7 3 0 Y] を、ヌクレオチド位置 3 5 1 7 で切断する M l u I 、及び位置 4 1 2 で切断する S p e I により消化した。プラスミドのヌクレオチド 4 1 3 ~ 3 5 1 7 に対応する 3 1 0 5 bp の M l u I / S p e I フラグメントを、ゲル電気泳動により単離した。

【 0 1 6 7 】

B . 8 2 1 8 bp のプラスミドであるプラスミド p T M A 3 0 を、ヌクレオチド位置 4 4 4 3 で切断する M l u I 、及び位置 1 3 3 8 で切断する S p e I により消化する。プラスミドフラグメントのヌクレオチド 4 4 4 4 - 1 3 3 8 に対応する 5 1 1 3 bp の M l u I / S p e I フラグメントをゲル電気泳動により単離する。

30

C . 段階 A からの単離されたフラグメントを、段階 B からの単離されたフラグメントと共に、合計 D N A 1 μ l 当たり 1 0 ~ 4 0 ng の濃度で 1 : 1 の比で組合し、そして連結する。

【 0 1 6 8 】

D . 前記連結生成物を用いて、 E . コリ D G 1 1 6 細胞を形質転換した。変異誘発の間に導入されるユニーク H p a I 及び S p e I 部位を包含する領域を増幅するプライマーを用いてプラスミド D N A を増幅し、その増幅された生成物を H p a I 又は S p e I により消化し、そして前記消化生成物をゲル電気泳動により分析することによって、コロニーを、所望する 8 . 2 kb のフラグメントの存在についてスクリーンした。プラスミド D N A を、スクリーンにおいて予測される消化パターンを示すプラスミドを含むコロニーから調製し、そして H p a I , S p e I 及び M l u I による消化、続く、消化された D N A のゲル分析によりさらに分析した。 p T M A 3 0 [F 7 3 0 Y] と称する所望するプラスミドを含むコロニーを選択し、そしてその遺伝子配列を D N A 配列決定により確かめた。

40

【 0 1 6 9 】

得られる発現プラスミド p T M A 3 0 [F 7 3 0 Y] は、バクテリオファージ P L プロモーター及び遺伝子 N リボソーム結合部位、並びにバシラススリンギエンシスデルタ - トキシン遺伝子からの陽性逆調節要素 (P R E 、転写ターミネーター) の制御下にある。プラスミドはまた、プラスミドをコピー数のために感温性にする変異誘発された R N A II 遺

50

伝子、及びアンピシリン耐性遺伝子を担持する。

【0170】

例2. 組換えDNAポリメラーゼの発現

この例は、実質的に例1に記載されるようなプラスミドpTMA30[F730Y]を有するE.コリK12株DG116細胞の発現系を用いて、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼの発現及び精製を記載する。

発現系細胞の初期増殖を、種フランスコにおいて実施した。大規模発酵を、種培養物により接種された10lの発酵フランスコにおいて実施した。使用される培地及びプロトコールは、次の通りである。

【0171】

種培地は、IX Bonner-Vogel塩(9.6 mMのクエン酸、57 mMのK₂HPo₄、16.8 mMのNaNH₄HPO₄、0.8 mMのMgSO₄) + 25 mMの(NH₄)₂SO₄、2 mMのMgSO₄、10 μg/mlのチアミン-HCl、0.2%のグルコース、0.25%のカサミノ酸及び100 μg/mlのアンピシリン及びメチシリンから成った。培地は無菌貯蔵溶液から配合し、次に使用の前、フィルター殺菌した。

【0172】

発酵培地は、IX Bonner-Vogel塩(9.0 mMのクエン酸、57 mMのK₂HPo₄、16.8 mMのNaNH₄HPO₄、0.8 mMのMgSO₄) + 25 mMの(NH₄)₂SO₄、2 mMのMgSO₄、10 μMのMnSO₄、6.9 μMのZnCl₂、8.4 μMのCoCl₂、8.3 μMのNaMoO₄、6.8 μMのCaCl₂、7.4 μMのCuCl₂、8.1 μMのH₃BO₃、1 μMのFeCl₃、0.5 ml/lのMaco 11 P2000消泡剤、10 μg/mlのチアミン-HCl、1.6%のグルコース、2.0%のカサミノ酸、及び100 μg/mlのアンピシリンから成った。上記成分(消泡剤まで)を、121で20分間、現場殺菌し、そして残りを、接種の直前、殺菌された貯蔵溶液から添加した。

【0173】

種培養物を、0.1 mlの凍結された発現系細胞により接種された種培養物の100 mlフランスコにおいて増殖した。接種に続いて、その培養物を30で一晩、振盪した。全フランスコ培養物を用いて、10 lの発酵培養物を接種した。

発酵を次のようにして実施した。初期温度は30であり、pHは4 NのNH₄OH及び冰酢酸により6.9 ± 0.1で調整され、そして溶解される酸素は、300 rpmの初期最少値から必要とされるような攪拌速度を調節することによって、30%で調整された。エアレーション速度を、5 l/minで一定して維持した。培養物が2.5 OD(680 nm)に達した場合、約6~7.5時間後、温度を38.5に、0.4/minの速度で、DNAポリメラーゼの合成を誘発するために変えた。発酵を、約24時間の合計実験時間まで、一晩続けた。細胞ペーストを、交差流過及び遠心分離により収穫し、そして-20で凍結した。

【0174】

例3. 組換えDNAポリメラーゼの精製

この例は、上記発酵からの発現されたF730Y Tma30 DNAポリメラーゼの精製を記載する。前記精製は、下記変性を伴って、Lawyerなど、1993, P C R Method and Applications 2: 275-287に記載のようにして実質的に実施した。

【0175】

次の標準略語を使用する。

PEI = ポリエチレンイミン

TLC K = N - p - トシリ - L - リシンクロロメチルケトン - HCl

PEIは、特にPolysciences, Inc. (Warrington, PA)から入手できる。TLC Kは、中でも、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)から入手できる。

10

20

30

40

50

【0176】

発酵からの約150gの凍結された(-70)細胞を、10mMのEDTA, 1mMのジチオトレイトル(DTT)、2mMのPefabloc SC(Centerchem, Inc., Stamford, CT), 1μg/mlのLeupeptin(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)、及び1mMのTLCCKを含む溶解緩衝液(50mMのトリス-HCl, pH7.5)に融解した。細胞を、10,000psiでMicrofluidizerに5回通すことにより溶解した。その溶解物を、5.5×細胞の最終体積(湿量)に、溶解緩衝液により希釈した。得られる溶解物を画分Iと命名した。

【0177】

硫酸アンモニウムを画分Iに徐々に添加し、0.2Mの濃度にした。次に、画分Iを次のようにしてPEI-沈殿せしめた。

PEI滴定を用いて、核酸を沈殿せしめるのに必要な最少量のPEIを決定した。10μlの個々の試験沈殿物を、標準のマイクロウェルプレートにおいて0.5μg/mlの臭化エチジウム100μlに添加した。対照は、PEIを含まない適切に希釈された溶解物から成った。プレートをUV光により照射し、そして核酸の少なくとも99%を除去するために必要とされるPEIの濃度を決定した。

【0178】

PEIを攪拌しながらゆっくり添加し、0.4%(滴定から決定されるような濃度)にした。PEI処理された溶解物を、8,000RPM(11,300×g)で30分間、5でJA-10ローター(500mlボトル)において遠心分離した。上清液(画分II)をデカントし、そして保持した。

硫酸アンモニウムを画分II上清液に添加し、0.4Mの濃度とした。次に、画分IIを次のようにして熱処理した。

【0179】

熱処理は31のBraun発酵器において行なわれた。攪拌速度は250rpmであった。温度を75に6分間にわたって上げ、15分間維持し、次にできるだけ早く、発酵器において30に冷却した。PEI沈殿からの熱処理された画分II上清液を発酵器から除出し、そして少なくとも30分間、氷上に保持し、次に上記のようにして遠心分離した。上清液(画分III)をデカントし、そして維持した。

【0180】

画分IIIを次のようにして、フェニルセファロースカラムクロマトグラフィーにかけた。250mlのラジアル流カラム(Sepragen Corp., Hayward, CA)を、Phenyl Sepharose Fast Flow(High Sub)(Pharmacia, Piscataway, NJ)により充填した。画分IIIを50mMのトリス(pH7.5)、10mMのEDTA溶液により希釈し、硫酸アンモニウムの濃度を0.3Mに減じ、そして次に、カラムに適用した。

【0181】

カラムを15~20分間、次の4種の緩衝液の個々により(3~4カラム体積)、洗浄した(50ml/分の流速):(1)50mMのトリス、pH7.5, 10mMのEDTA, 0.3Mの硫酸アンモニウム、1mMのDTT;(2)25mMのトリス、pH7.5, 1mMのEDTA, 1mMのDTT;(3)25mMのトリス、pH7.5, 1mMのEDTA, 20%v/vのエチレングリコール、1mMのDTT;及び(4)25mMのトリス、pH7.5, 1mMのEDTA, 20%v/vのエチレングリコール、1mMのDTT, 2.0Mの尿素。DNAポリメラーゼを含む尿素溶離物(画分IV)を、約3~18分の尿素溶出から単一のプールとして集めた。全フェニルセファロースカラム段階を、2時間以内に完結した。

【0182】

画分IVを次のようにしてヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーにゆだねた。画分IV(約750ml)を、KCl(3Mの原液から)において0.05Mにし、そして次に、25mMのトリス、pH7.5, 1mMのEDTA, 0.05MのKCl, 1mMのDTT溶液

10

20

30

40

50

により平衡化された100mlのラジアル流ヘパリンセファロースカラム上に負荷した。

【0183】

負荷の後、カラムを平衡化緩衝液、次に25mMのトリス、pH7.5, 1mMのEDTA, 0.10MのKCl, 1mMのDTT溶液により30分間、洗浄した(20ml/分の流速)。最終的に、DNAポリメラーゼを、25mMのトリス、pH7.5, 1mMのEDTA, 0.10~0.5MのKCl、及び1mMのDTT溶液における12カラム体積グラジェントにおいて溶離し、それぞれ16mlの75の画分を集めた。ヘパリンセファロースカラム段階を、3時間以下で完結した。画分をSDS-PAGEにより分析し、そして低い純度である、DNAポリメラーゼを含むいくつかの初期画分をプールから除去した(画分V)。

【0184】

画分Vを、Amicon YM30膜(Amicon Inc., Beverly, MA)上で20mlに濃縮した。その濃縮物を、3×貯蔵緩衝液(60mMのトリス、pH8.0, 0.3mMのEDTA, 0.3mMのKCl, 3mMのDTT)に対して4で一晩、透析した。グリセロールを透析物に添加し、50%(v/v)~80%(v/v)の最終濃度の原液にした。Tween 20TMを添加し、0.2%(w/v)~10%(w/v)の最終濃度の原液にした。

【0185】

殺菌された水を添加し、調製物の体積を元の溶解物の体積の3倍にし、画分V、すなわち貯蔵安定性のF730Y Tma30 DNAポリメラーゼの調製物を生成した。

画分VIを、Lawyerなど., 1989, J. Biol. Chem. 264: 6427 (引用により本明細書に組込まれる)に実質的に記載されるようにして、DNAポリメラーゼ活性についてアッセイした。

【0186】

例4. 延長速度

F730Y Tma30 DNAポリメラーゼの延長速度を、鉄型-限定されたプライマー延長アッセイを用いて測定した。アッセイを、延長速度がDNAポリメラーゼ濃度に無関係な条件下で、過剰のDNAポリメラーゼを用いて実施した。

【0187】

本発明のキメラ酵素、すなわちF730Y Tma30 DNAポリメラーゼを、上記プラスミドpTMA31(F730Y)から発現されたF730Y Tma31 DNAポリメラーゼに比較した。F730Y Tma31 DNAポリメラーゼは、35エキソヌクレアーゼ活性を不活性化するD323A及びE325A変異及びF730Y変異を組込むUITmaTM DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer, Norwalk, CT)の変異誘発されたバージョンである。

【0188】

F730Y Tma30 DNAポリメラーゼ及びF731Y Tma31 DNAポリメラーゼは、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼが5'-ヌクレアーゼ活性を不活性化するよう変異誘発されているTaq DNAポリメラーゼからの5'-ヌクレアーゼドメインを含むが、ところがF730Y Tma31 DNAポリメラーゼはTma DNAポリメラーゼの最初の283個のアミノ酸をミッシングしていることにおいて主に異なる。従って、F730Y Tma31 DNAポリメラーゼは、5'-ヌクレアーゼドメインの欠失の結果として5'-ヌクレアーゼ活性を欠いている。

【0189】

DNAポリメラーゼ調製物を最初、Lawyerなど., 1989, J. Biol. Chem. 264: 6427に記載のようにしてアッセイし、その単位濃度を決定し、そして前記酵素が過剰に存在するよう、必要とされる酵素の量を決定した。それらのアッセイに基づけば、下記延長速度アッセイにおいて1単位のF730Y Tma30 DNAポリメラーゼ又は3.5単位のF730Y Tma31 DNAポリメラーゼの使用が、延長速度が酵素濃度に無関係であることを確かめるために十分であることが決定された。酵素の単位の定義は、Lawyerなど., 1989、前記に定義される通りである。

10

20

30

40

50

【0190】

延長速度は、 $5 \mu l$ の DNA ポリメラーゼ（上記単位量を含むように、Lawyerなど、1989、前記に記載のようにして希釈された）を含む反応混合物 $50 \mu l$ 、及び 50mM のBicine, pH 8.3, 25； 2.5mM のMgCl₂； 1mM の α -メルカプトエタノール； $200 \mu \text{M}$ の個々の dATP, dGTP 及び dTTP； $100 \mu \text{M}$ の[α -³³P]dGMP ($0.8 \mu \text{Ci}/\text{反応}$)；及びプライマー-DG48、すなわち（配列番号11；5'-GGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTCGC）にプレアニーリングされたM13mp18（Perkin Elmer, Norwalk, CT）鑄型DNA $0.075 \mu \text{mol}$ を含む反応緩衝液 $45 \mu l$ において、75度3分間、アッセイされた。反応は、 60mM のEDTA $10 \mu l$ の添加により停止され、そして0度貯蔵された。

10

【0191】

停止された反応の一部 $25 \mu l$ を、キャリヤーとして $50 \mu \text{g}/\text{ml}$ の剪断されたサケ精子DNAを含む 2mM のEDTA溶液 1ml により希釈した。DNAを 20% のトリクロロ酢酸（w/v）及び 2% ピロリン酸ナトリウム溶液 1ml の添加により沈殿せしめ、そして0度15分間インキュベートした。沈殿されたDNAをGF/Cフィルターディスク（Whatman International Ltd., Maidstone, England）上で集め、そして 5% トリクロロ酢酸及び 2% ピロリン酸ナトリウムにより、次に 5% トリクロロ酢酸により、次に 95% エタノール 5ml により広範に洗浄し、乾燥せしめ、そして計数した。

1分当たりに組込まれる[α -³³P]dCMPの量を、個々のサンプルについて決定した。下記に示されるデータは、2つの反応の平均を表わす。

20

【0192】

【表6】

表6

DNAポリメラーゼ	CPM
F730Y Tma30	1575
F730Y Tma31	1116
比	1.41

30

【0193】

データは、上記アッセイにより測定される場合、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼがF730Y Tma31 DNAポリメラーゼよりも41%早い延長速度を有することを示す。2種の酵素間の差異の観点から、データは、Taq DNAポリメラーゼからの5'-ヌクレアーゼドメインのF730Y Tma30 DNAポリメラーゼにおける存在が、G46D変異により不活性化されるけれども、有意に早い延長速度をもたらすことを示す。

40

一連の時点からの延長生成物を、変性アガロースゲル電気泳動によりさらに分析し、その結果が酵素の延長速度の上昇を示すことを確かめた。

【0194】

例5. 色素ターミネーターサイクル配列決定

この例は、色素-ラベルされた、ジデオキシ-ターミネーターサイクル配列決定へのF730Y Tma30 DNAポリメラーゼの適用を示す。比較のために、サイクル配列決

50

定反応をまた、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFS、すなわちF730Y Tma30 DNAポリメラーゼにおけるF730Y変異に対して類似する、エキソヌクレアーゼ活性を欠き、そしてF667Y変異を組んでいるTaq DNAポリメラーゼの変異形を用いて実施した。

【0195】

サイクル配列決定反応を、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSを有するABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT) の試薬及びプロトコールを用いて実施した。このキットにおける別の試薬のパッケージが、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSのためのF730Y Tma DNAポリメラーゼの容易な置換を可能にした。このキットにおいては、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSは、rTth熱安定性無機ピロホスファターゼと組合されて供給される。
10

【0196】

F730Y Tma30 DNAポリメラーゼを用いる反応のためには、キットのDNAポリメラーゼ/ピロホスファターゼ混合物が、10単位のF730Y Tma DNAポリメラーゼ及び20単位のrTth熱安定性無機ピロホスファターゼにより置換された。rTth熱安定性無機ピロホスファターゼは、同時続続アメリカ特許第5,665,551号（引用により本明細書に組込まれる）に記載される。

キットと共に供給される、陽性の対照鋳型、すなわちpGEM（登録商標）-3Zf (+) 及びプライマー、-21M13が使用された。反応を、推薦される熱サイクルプロトコール（25サイクル：96で10秒；50で5秒；及び60で4分）を用いて、GeneAmp（登録商標）PCR System 9600熱サイクラー（Perkin-Elmer, Norwalk, CT）において実施した。
20

【0197】

延長生成物を、Princeton Separations (Adelphia, NJ) からのCentri-Sep™カラムを用いての回転カラム精製により、組込まれていない色素ターミネーターについて精製し、そして前記プロトコールに推薦されるようにして、真空遠心分離機において乾燥せしめた。サンプルを、回転せしめ、90に3分間、加熱し、変性し、そして次に、予備電気泳動された48cm（ウェルから読取りまで）の4%ポリアクリルアミド/6M尿素ゲル上に負荷し、そして電気泳動せしめ、そして製造業者の説明書に従って、ABI PRISM™ 377 DNA配列決定機（Perkin-Elmer, Norwalk, CT）上で分析した。
30

【0198】

得られる配列決定トレースは、図に示される。図3, 4、及び5は、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼを用いてのサイクル配列決定反応からの配列決定トレースを提供し、そして図6, 7及び8は、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSを用いてのサイクル配列決定反応からの配列決定トレースを提供する。基本コーリングは、プライマーからの10番目のスクレオチドで開始するよう設定された。
40

【0199】

F730Y Tma30 DNAポリメラーゼの使用が、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSを用いて得られる結果に比較される場合、ピークの高さの全体的な均等性において有意な改良点をもたらすことが、配列トレースの比較から明白である。特に、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼの使用は、DNA配列の情況のために、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSが使用される場合、ひじょうに低いピークの高さをもたらすそれらの塩基、たとえばA又はCの後のG、A又はCの後のA、及びTの後のTのピークの高さを有意に高める。
40

【0200】

同様に、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼの使用は、DNA配列の情況のために、Amplic Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSが使用される場合、ひじ
50

ように高いピークの高さをもたらすそれらの塩基、たとえばGの後のAのピークの高さを有意に低める。ピークの高さの均等性は、配列決定の精度の上昇に寄与する。

【0201】

配列決定の精度、すなわち2回の重複された反応について平均された、正しく配列決定された塩基の割合が、ABI PRISM™ 377 DNA Sequencing System分析ソフトウェアにより、自動化された基本コーリングの結果から計算された。その結果は、下記表に要約される。典型的には、配列決定誤差は、プライマーに続く領域、及びプライマーから遠くの末端領域において最も有力である。従って、プライマーに続く最初の10個のヌクレオチドは無視され、そして精度が、続く50個のヌクレオチド、次の500個のヌクレオチド、及び最終的に2つの末端領域（それぞれ、長さ100個のヌクレオチド）について別々に計算された。10

【0202】

【表7】

表7

配列決定精度の比較

	ヌクレオチドの位置			
	11-60	61-560	561-660	661-760
F 7 3 0 Y Tma DNAポリメラーゼ	95%	100%	100%	97.5%
Amp 1 i Taq (登録商標) DNA ポリメラーゼ FS	97%	99%	97%	88.5%

20

【0203】

前記結果は、F 7 3 0 Y Tma 3 0 DNAポリメラーゼが配列決定の精度において実質的な改良性；目立ったことには、より長い読み取りの長さ（560個以上のヌクレオチド）でこのような改良性を提供することを示す。F 7 3 0 Y Tma 3 0 DNAポリメラーゼの使用は、ヌクレオチド51～550からの500個のヌクレオチド領域及びヌクレオチド551～660からの最初の末端領域において完全に誤差を排除した。さらに、F 7 3 0 Y Tma 3 0 DNAポリメラーゼの使用は、Amp 1 i Taq（登録商標）DNAポリメラーゼFSを用いての650個のヌクレオチドから、F 7 3 0 Y Tma 3 0 DNAポリメラーゼを用いての少なくとも750個のヌクレオチドまでの少なくとも100個のヌクレオチドを、少なくとも97%の精度で配列決定できる標的物の長さを延長した。40

【0204】

例6. 色素プライマーサイクル配列決定

この例は、色素プライマーサイクル配列決定への本発明のDNAポリメラーゼの適用を示す。

サイクル配列決定反応を、2.5 mMのトリス-HCl (pH 9.1) 及び3.5 mMのMgCl₂から成る緩衝液において実施する。4種の個々の反応、すなわち4種のジデオキシタミネーターの個々についての反応を実施する。それらの4種の反応の個々についての反応条件を、下記に記載する：

【0205】

1. ジデオキシ-ATP反応 (5 μl) :

40

30

50

100 μMの個々のdATP, dCTP、及びdTTP (Perkin - Elmer)、
 100 μMのc7dGTP (Pharmacia, Piscataway, NJ)、
 0.5 μMのddATP (Pharmacia)、
 0.1 μgのM13mp18一本鎖DNA鑄型 (Perkin - Elmer)、
 0.4 pモルのJOE色素プライマー (Perkin - Elmer)、
 1単位のDNAポリメラーゼ、及び
 5単位のrTth熱安定性無機ピロホスファターゼ。

【0206】

2. ジデオキシ - CTP 反応 (5 μl) :

100 μMの個々のdATP, dCTP 及びdTTP (Perkin - Elmer)、
 100 μMのc7dGTP (Pharmacia)、
 0.5 μMのddCTP (Pharmacia)、
 0.1 μgのM13mp18一本鎖DNA鑄型 (Perkin - Elmer)、
 0.4 pモルのFAM色素プライマー (Perkin - Elmer)、
 1単位のDNAポリメラーゼ、及び
 5単位のrTth熱安定性無機ピロホスファターゼ。

【0207】

3. ジデオキシ - GTP 反応 (10 μl) :

100 μMの個々のdATP, dCTP 及びdTTP (Perkin - Elmer)、
 100 μMのc7dGTP (Pharmacia)、
 0.5 μMのddGTP (Pharmacia)、
 0.2 μgのM13mp18一本鎖DNA鑄型 (Perkin - Elmer)、
 0.8 pモルTAMRA色素プライマー (Perkin - Elmer)、
 2単位のDNAポリメラーゼ、及び
 10単位のrTth熱安定性無機ピロホスファターゼ。

【0208】

4. ジデオキシ - TTP 反応 (10 μl) :

100 μMの個々のdATP, dCTP 及びdTTP (Perkin - Elmer)、
 100 μMのc7dGTP (Pharmacia)、
 0.5 μMのddTTP (Pharmacia)、
 0.2 μgのM13mp18一本鎖DNA鑄型 (Perkin - Elmer)、
 0.8 pモルのROX色素プライマー (Perkin - Elmer)、
 2単位のDNAポリメラーゼ、及び
 10単位のrTth熱安定性無機ピロホスファターゼ。

【0209】

4種の反応の個々を、予備加熱された(75)Perkin - Elmer GeneAmp (登録商標)PCR System 9600熱サイクラーに配置し、そして96で15秒間、55で1秒間、及び70で1分間の15サイクル、続いて、96で15秒及び70で1分間の15サイクルにゆだねる。4種の反応物をプールし、そして95%エタノール100 μl及び3Mの酢酸ナトリウム(pH 5.3)2.0 μlの4での15分間にわたっての添加により沈殿せしめる。

【0210】

プールされた反応物を15分間、微量遠心分離し、沈殿物を集め、上清液を除去し、そしてペレットを乾燥せしめる。ペレットを、脱イオン化されたホルムアミド/50 mMのEDTA (pH 8.0) 5/1(v/v) 6 μlに再懸濁し、90で2分間、加熱し、そして予備 - 電気泳動された4%ポリアクリルアミド/6 Mの尿素ゲル上に負荷し、そして電気泳動し、そして製造業者の説明書に従って、ABI PRISM™ 377 DNA配列決定機 (Perkin Elmer, Norwalk, CT) 上で分析する。

【0211】

例7. ピロホスファターゼの効果

上記例5に記載される色素-ターミネーター反応において、20単位のrTth熱安定性無機ピロホスファターゼ(PPアーゼ)を前記反応物に添加し、ピロリン酸分解の効果を低めた。この量のPPアーゼが、AmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFSを用いる反応のために有益であることが決定された。次の実験を、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼを用いて、サイクル配列決定反応の結果に対するPPアーゼ濃度の効果を決定するために実施した。

【0212】

色素-ターミネーターサイクル配列決定反応を、上記例5に実質的に記載のようにして実施した。但し、PPアーゼ濃度は反応間で変更された。反応当たり0, 0.5, 1及び20単位のPPアーゼ濃度を試験した。標的DNA, pGEM-3Zf(+)、及び使用されるプライマーM13(-21)は、PerkinElmer(Norwalk, CT)からのABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core kitからであった。すべての反応は、二重反復して行なわれた。

【0213】

個々の配列決定反応の結果を、配列決定トレースの直接的な比較により比較した。その結果は、4種PPアーゼ濃度間の明白な差異を示さなかった。配列決定トレースピークの高さ及びバックグラウンドは、少なくとも500個の塩基対の読み取りに匹敵した。従って、そのデータは、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼの使用が、添加されるPPアーゼを伴わないで、サイクル配列決定反応の実施を可能にすることを示す。

【0214】

例8. 最適dITP濃度

上記例5で使用される、AmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFSを有するABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core kit(Perkin Elmer, Norwalk, CT)が、5:1:1:1の比でdITP, dATP, dCTP及びdTTPを含むdNTP混合物を供給する。dITPの高められた濃度は、AmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFSにより所有される低いdITP組込み効率を補足する。

【0215】

例5に記載されるサイクル配列決定反応において生成されるGシグナルピークの強さの分析は、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼがdITPをより高い効率で組込み、そして従って、dITP濃度が低められるべきであることを示唆した。さらなる反応を実施し、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼを用いての色素-ターミネーターサイクル配列決定反応への使用のためのdITPの最適濃度を決定した。

【0216】

反応を、AmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFSを有するABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core kitを用いて、例5に実質的に記載のようにして実施した。前記キットにより供給されるdNTP混合物の代わりに、100μMの個々のdATP, dCTP、及びdTTP, TE緩衝液(10mMのトリス-HCl, pH8, 0.1mMのEDTA)中、広範囲のdITP濃縮物を含むdNTP混合物を使用した。例5に記載されるように、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼ/rTth熱安定性無機ピロホスファターゼ混合物を、キットにより供給されるAmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFS/rTth熱安定性無機ピロホスファターゼ混合物と置換した。

【0217】

最適dITP濃度を、配列トレース及び処理されていないシグナル強度データの両者の比較により決定した。それらの実験に基づいて、dITP濃度が好ましくは、150~250μMに低められたことが決定された。その結果は、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼがAmpliTaq(登録商標)DNAポリメラーゼFSよりも有意により効果的にdITPを組込むことが決定された。

10

20

30

40

50

他の熱安定性DNAポリメラーゼに対するF730Y Tma30 DNAポリメラーゼを比較するためのさらなる実験（結果は示されていない）はまた、F730Y Tma30 DNAポリメラーゼが、他の熱安定性DNAポリメラーゼに関して、dITP組込みの有意に高められた効率を有することも示唆した。

【0218】

寄託

次の寄託が下記の日に行なわれた：

【表8】

10

表8

株名	ATCC No.	寄託日
pUC18:Tma25	98443	1997年5月28日

【0219】

20

この寄託は、ブダペスト条件下での特許手続き及び規則のために微生物の寄託の国際認識に基づいてブダペスト条件の規定下で、American Type Culture Collection (ATCC), 123 01 Parklawn Drive, Rockville, MD20852, U.S.A. に、ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, U.S.A. により行なわれた。これは、寄託の日から30年間、生存培養物の維持を保証する。

【0220】

生物は、ブダペスト条件下でATCCにより入手され、そして出願人とATCCとの間の同意を必要とし、そしてATCCは、関連するアメリカ特許の発行に基づいて、又はいづれかのアメリカ又は外国特許出願の公衆への公開に基づいて、どちらが最初であろうと、培養物の子孫の永久的且つ自由な利用性を保証し、そしてB5 U.S.C. § 122及びそれに従ってのCommissionerの規則(8860G638に特に規定する37 C.F.R. § 1.14を含む)に従って権利を与えられるU.S. Commissioner of Patent and Trademarksによる決定により前記子孫の利用性を保証する。

30

【0221】

本出願の譲受人は、寄託上の培養物が適切な培養下で培養される場合、死亡し、又は失なわれ又は破壊される場合、それはすぐに、同じ培養物の生存検体により、通知に基づいて交換されるであろう。寄託された菌株の利用性は、その特許法に従っていづれかの政府の権力下で許可される権利に違反して本発明を実施するためのライセンスとして解釈されるべきではない。

40

【0222】

ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, U.S.A. は、アメリカ特許出願番号第60-023376からの優先権を主張する外国特許出願に前述の寄託された生物学的材料を照会するために公認されたF.HOFFMANN-LA ROCHE AG, 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Switzerlandを有し、そして寄託された材料が公衆に利用され得る、無条件で且つ変更できない同意を与えていた。

【0223】

【配列表】

50

(1) 一般情報 :

(i) 出願人 :

- (A) 名称 : F. Hoffmann - La Roche Ltd
- (B) 通り : Grenzacher Strasse 124
- (C) 市 : Basel
- (D) 州 : BS
- (E) 国 : Switzerland
- (F) 郵便番号 : (ZIP) : CH-4070
- (G) 電話 : (0) 61 688 24 03
- (H) テレファックス : (0) 61 688 13 95
- (I) テレックス : 962292/965512 hlr ch

10

(ii) 発明の名称 : 変異キメラDNAポリメラーゼ

(iii) 配列の数 : 1 1

(2) 配列番号 1 についての情報 :

20

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 291 個のアミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎮の数 : 一本鎮
- (D) トポロジー : 直鎮状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 1 :

30

Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala

1 5 10 15

Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr

20 25 30

Asn Ala Thr Tyr Gly Val Ala Arg Met Leu Val Arg Phe Ile Lys Asp

35 40 45

His Ile Ile Val Gly Lys Asp Tyr Val Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys

50 55 60

40

Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Gln Arg
 65 70 75 80
 Pro Lys Thr Pro Asp Leu Leu Ile Gln Gln Leu Pro Tyr Ile Lys Lys
 85 90 95
 Leu Val Glu Ala Leu Gly Met Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Tyr Glu
 100 105 110
 Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Lys Gly Leu Pro Leu Phe 10
 115 120 125
 Asp Glu Ile Phe Ile Val Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Gln Leu Val
 130 135 140
 Asn Glu Lys Ile Lys Val Trp Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu
 145 150 155 160
 Glu Leu Tyr Asp Ala Gln Lys Val Lys Glu Lys Tyr Gly Val Glu Pro
 165 170 175 20
 Gln Gln Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ile Asp Asn
 180 185 190
 Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Gln Leu Leu
 195 200 205
 Glu Lys Tyr Lys Asp Leu Glu Asp Ile Leu Asn His Val Arg Glu Leu
 210 215 220
 Pro Gln Lys Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Asn Ala Ile 30
 225 230 235 240
 Leu Ser Lys Lys Leu Ala Ile Leu Glu Thr Asn Val Pro Ile Glu Ile
 245 250 255
 Asn Trp Glu Glu Leu Arg Tyr Gln Gly Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Leu
 260 265 270
 Pro Leu Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Gln 40
 275 280 285
 Leu Tyr Glu
 290
 【 0 2 2 4 】

(2) 配列番号2についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：289個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号2：

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu

1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly

20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala

35 40 45

20

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val

50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly

65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu

85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu

100 105 110

30

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys

115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp

130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly

145 150 155 160

40

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro

	165	170	175	
Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn				
180	185		190	
Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu				
195	200	205		
Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu				10
210	215	220		
Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys				
225	230	235	240	
Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val				
245	250		255	
Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe				
260	265	270		
Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu				20
275	280	285		
Glu				

[0 2 2 5]

(2) 配列番号3についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：288個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号3：

Met Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val

1 5 10 15

Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu

20 25 30

Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys

35 40 45

20

Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Val Val Val Val Val

50 55 60

Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr

65 70 75 80

Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala

85 90 95

Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val

100 105 110

30

Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Arg Ala

115 120 125

Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp Leu

130 135 140

Tyr Gln Leu Leu Ser Glu Arg Ile Ala Ile Leu His Pro Glu Gly Tyr

145 150 155 160

40

Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro Glu

	165	170	175	
Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile				
180	185		190	
Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Gln Arg Leu Ile Arg				
195	200		205	
Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Phe Gln His Leu Asp Gln Val Lys				10
210	215	220		
Pro Ser Leu Arg Glu Lys Leu Gln Ala Gly Met Glu Ala Leu Ala Leu				
225	230	235	240	
Ser Arg Lys Leu Ser Gln Val His Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp				
245	250		255	
Phe Gly Arg Arg Arg Thr Pro Asn Leu Glu Gly Leu Arg Ala Phe Leu				
260	265	270		
Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu				20
275	280	285		

【 0 2 2 6 】

(2) 配列番号4についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：291個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号4：

Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu

1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly

20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala

35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe

50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu

65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln

85 90 95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu

100 105 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys

115 120 125

Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg

130 135 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu

145 150 155 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg

30

40

	165	170	175													
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	
	180			185							190					
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu	
	195			200							205					
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg	10
	210			215						220						
Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp	
	225			230					235				240			
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	
	245			250					255							
Glu	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	
	260			265					270							
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	20
	275			280					285							
Leu	Leu	Glu														
	290															

【 0 2 2 7 】

(2) 配列番号5についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：291個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号5：

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu

1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly

20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala

35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe

50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu

65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Pro Gln

85 90 95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu

100 105 110

Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys

115 120 125

Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg

130 135 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu

145 150 155 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys

30

40

165

170

175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp

180

185

190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu

195

200

205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg

210

215

220

Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp

225

230

235

240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu

245

250

255

Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg

260

265

270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly

275

280

285

Leu Leu Glu

290

[0 2 2 8]

(2) 配列番号6についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：291個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号6：

Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu

1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly

20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala

35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe

50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu

65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln

85 90 95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu

100 105 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys

115 120 125

Asn Pro Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg

130 135 140

Asp Leu Asp Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu

145 150 155 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Gln Lys Tyr Gly Leu Lys

30

40

	165	170	175													
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	
	180		185		190											
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu	
	195		200		205											
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg	10
	210		215		220											
Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp	
	225		230		235		240									
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	
	245		250		255											
Glu	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	20
	260		265		270											
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	
	275		280		285											
Leu	Leu	Glu														
	290															

[0 2 2 9]

(2) 配列番号7についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：287個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号7：

Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly

1 5 10 15

His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr

20 25 30

Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu

35 40 45

20

Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp

50 55 60

Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala

65 70 75 80

Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile

85 90 95

Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly

100 105 110

30

Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys Ala Glu Arg

115 120 125

Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Ser Ala Asp Arg Asp Leu Tyr Gln

130 135 140

Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Leu Leu His Pro Glu Gly Glu Val Leu

145 150 155 160

40

Thr Pro Gly Trp Leu Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp

	165	170	175													
Val	Glu	Tyr	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro	Gly	
	180		185		190											
Val	Pro	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Trp	
	195		200		205											
Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Lys	Pro	Glu	10
	210		215		220											
Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Lys	Leu	Gln	Met	Ser	
	225		230		235		240									
Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Phe	
	245		250		255											
Ala	Lys	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Trp	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Phe	Leu	Glu	
	260		265		270											
Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Glu		20
	275		280		285											
【 0 2 3 0 】																

(2) 配列番号8についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：287個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号8：

Met Leu Pro Leu Leu Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly

1 5 10 15

His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr

20 25 30

Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu

35 40 45

20

Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp

50 55 60

Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala

65 70 75 80

Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile

85 90 95

Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly

100 105 110

30

Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Arg Lys Ala Glu Arg

115 120 125

Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Ser Ala Asp Arg Asp Leu Tyr Gln

130 135 140

Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Leu Leu His Pro Glu Gly Glu Val Leu

145 150 155 160

40

Thr Pro Gly Trp Leu Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp

	165	170	175												
Val	Glu	Tyr	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro	Gly
	180		185		190										
Val	Pro	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Trp
	195		200		205										

Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Lys	Pro	Glu	10
	210		215		220											
Arg	Val	Trp	Glu	Ala	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Lys	Leu	Gln	Met	Ser	
	225		230		235		240									
Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Phe	
	245		250		255											
Ala	Lys	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Trp	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Phe	Leu	Glu	20
	260		265		270											
Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Glu		
	275		280		285											

[0 2 3 1]

(2) 配列番号9についての情報：

(1) 配列の特徴：

- (A) 長さ：2682個の塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

10

(xi) 配列：配列番号9：

ATGAGAGGCCA	TGCTTCCACT	TTTGAGCCC	AAGGGCCGGG	TCCTCCTGGT	GGACGGCCAC	60
CACCTGGCCT	ACCGCACCTT	CCACGCCCTG	AAGGGCCTCA	CCACCAGCCG	GGGGGAGCCG	120
GTGCAGGCCG	TCTACGACTT	CGCCAAGAGC	CTCCTCAAGG	CCCTCAAGGA	GGACGGGGAC	180
GCGGTGATCG	TGGTCTTGA	CGCCAAGGCC	CCCTCCTTCC	GCCACGAGGC	CTACGGTGGG	240
TACAAGGCCG	GCCGGGCCCG	CACGCCGGAG	GACTTCCCC	GGCAACTCGC	CCTCATCAAG	300
GAGCTGGTAG	ATCTCCTGGG	GCTGGCGCGC	CTCGAGGTCC	CGGGCTACGA	GGCGGACGAC	360
GT CCTGGCCA	GCCTGGCAA	GAAGGCCGAA	AAGGAGGGCT	ACGAGGTCCG	CATCCTCACC	420
GCCGACAAAG	ACCTTACCA	GCTCCTTCC	GACCGCATCC	ACGTCCCTCA	CCCCGAGGGG	480
TACCTCATCA	CCCCGGCCTG	GCTTGGGAA	AAGTACGGCC	TGAGGCCCGA	CCAGTGGGCC	540
GACTACCGGG	CCCTGACCGG	GGACGAGTCC	GACAACATCC	CCGGGGTCAC	TGGGATCGGT	600
GAGAAGACTG	CTGTTCAGCT	TCTAGAGAAC	TACAAAGACC	TCGAAGACAT	ACTGAATCAT	660
GTTCGCGAAC	TTCCCTAAAA	GGTGAGAAA	GCCCTGCTTC	GAGACAGAGA	AAACGCCATT	720
CTCAGCAAAA	AGCTGGCGAT	TCTGGAAACA	AACGTTCCCA	TTGAAATAAA	CTGGGAAGAA	780
CTTCGCTACC	AGGGCTACGA	CAGAGAGAAA	CTCTTACAC	TTTGAAAGA	ACTGGAATT	840
GCATCCATCA	TGAAGGAACT	TCAACTGTAC	GAAGAGTCCG	AACCCGTTGG	ATACAGAATA	900
GTGAAAGACC	TAGTGGAAATT	TGAAAAACTC	ATAGAGAAC	TGAGAGAAC	CCCTTCGTT	960
GCCATAGATC	TTGAGACGTC	TTCCCTCGAT	CCTTCGACT	GCGACATTGT	CGGTATCTCT	1020
GTGTCTTCA	AACCAAAGGA	AGCGTACTAC	ATACCACTCC	ATCATAGAAA	CGCCCAGAAC	1080
CTGGACGAAA	AAGAGGTTCT	GAAAAAGCTC	AAAGAAATT	TGGAGGACCC	CGGAGCAAAG	1140
ATCGTTGGTC	AGAATTGAA	ATTGATTAC	AAGGTGTTGA	TGGTGAAGGG	TGTTGAACCT	1200
GTTCCTCCTT	ACTTCGACAC	GATGATAGCG	GCTTACCTTC	TTGAGCCGAA	CGAAAAGAAC	1260

20

30

40

TTCAATCTGG ACGATCTCGC ATTGAAATT CTTGGATACA AAATGACATC TTACCAAGAG 1320
 CTCATGTCCT TCTCTTTCC GCTGTTGGT TTCAGTTTG CCGATGTTCC TGTAGAAAAA 1380
 GCAGCGAACT ACTCCTGTGA AGATGCAGAC ATCACCTACA GACTTTACAA GACCCTGAGC 1440
 TTAAAACCTCC ACGAGGCAGA TCTGGAAAAC GTGTTCTACA AGATAGAAAT GCCCCTTGTG 1500
 AACGTGCTTG CACGGATGGA ACTGAACGGT GTGTATGTGG ACACAGAGTT CCTGAAGAAA 1560
 CTCTCAGAAG AGTACGGAAA AAAACTCGAA GAACTGGCAG AGGAAATATA CAGGATAGCT 1620
 GGAGAGCCGT TCAACATAAA CTCACCGAAG CAGGTTCAA GGATCCTTT TGAAAAACTC 1680 10
 GGCATAAAAC CACGTGGTAA AACGACGAAA ACGGGAGACT ATTCAACACG CATAGAAGTC 1740
 CTCGAGGAAC TTGCCGGTGA ACACGAAATC ATTCCCTCTGA TTCTTGAATA CAGAAAGATA 1800
 CAGAAATTGA AATCAACCTA CATAGACGCT CTTCCAAGA TGGTCAACCC AAAGACCGGA 1860
 AGGATTCATG CTTCTTCAA TCAAACGGGG ACTGCCACTG GAAGACTTAG CAGCAGCGAT 1920
 CCCAATCTTC AGAACCTCCC GACGAAAAGT GAAGAGGGAA AAGAAATCAG GAAAGCGATA 1980
 GTTCCTCAGG ATCCAAACTG GTGGATCGTC AGTGCCGACT ACTCCCAAAT AGAACTGAGG 2040
 ATCCTCGCCC ATCTCAGTGG TGATGAGAAT CTTTGAGGG CATTGAAAGA GGGCATCGAC 2100
 GTCCACACTC TAACAGCTTC CAGAATATTG AACGTGAAAC CCGAAGAAGT AACCGAAGAA 2160
 ATGCGCCCGCG CTGGTAAAAT GTTTAATTTC TCCATCATAT ACGGTGTAAC ACCTTACGGT 2220
 CTGTCTGTGA GGCTTGGAGT ACCTGTGAAA GAAGCAGAAA AGATGATCGT CAACTACTTC 2280
 GTCCTCTACC CAAAGGTGCG CGATTACATT CAGAGGGTCG TATCGGAAGC GAAAGAAAAA 2340
 GGCTATGTTA GAACGCTGTT TGGAAGAAAA AGAGACATAC CACAGCTCAT GGCCCAGGAC 2400
 AGGAACACAC AGGCTGAAGG AGAACGAATT GCCATAAACCA CTCCCATACA GGGTACAGCA 2460
 GCGGATATAA TAAAGCTGGC TATGATAGAA ATAGACAGGG AACTGAAAGA AAGAAAAATG 2520 30
 AGATCGAAGA TGATCATACA GGTCCACGAC GAACTGGTT TTGAAGTGCC CAATGAGGAA 2580
 AAGGACGCGC TCGTCGAGCT GGTGAAAGAC AGAATGACGA ATGTGGTAAA GCTTCAGTG 2640
 CCGCTCGAAG TGGATGTAAC CATCGGCAAA ACATGGTCGT GA 2682

[0 2 3 2]

(2) 配列番号10についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：893個のアミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ii) 配列の種類：タンパク質

10

(xi) 配列：配列番号10：

Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala

1 5 10 15

Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr

20 25 30

Asn Ala Thr Tyr Gly Val Ala Arg Met Leu Val Arg Phe Ile Lys Asp

35 40 45

20

His Ile Ile Val Gly Lys Asp Tyr Val Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys

50 55 60

Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Gln Arg

65 70 75 80

Pro Lys Thr Pro Asp Leu Leu Ile Gln Gln Leu Pro Tyr Ile Lys Lys

85 90 95

Leu Val Glu Ala Leu Gly Met Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Tyr Glu

100 105 110

30

Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Lys Gly Leu Pro Leu Phe

115 120 125

Asp Glu Ile Phe Ile Val Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Gln Leu Val

130 135 140

Asn Glu Lys Ile Lys Val Trp Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu

145 150 155 160

40

Glu Leu Tyr Asp Ala Gln Lys Val Lys Glu Lys Tyr Gly Val Glu Pro

165	170	175	
Gln Gln Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ile Asp Asn			
180	185	190	
Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Gln Leu Leu			
195	200	205	
Glu Lys Tyr Lys Asp Leu Glu Asp Ile Leu Asn His Val Arg Glu Leu			
210	215	220	10
Pro Gln Lys Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Asn Ala Ile			
225	230	235	240
Leu Ser Lys Lys Leu Ala Ile Leu Glu Thr Asn Val Pro Ile Glu Ile			
245	250	255	
Asn Trp Glu Glu Leu Arg Tyr Gln Gly Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Leu			
260	265	270	
Pro Leu Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Gln			
275	280	285	
Leu Tyr Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu			
290	295	300	
Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe			
305	310	315	320
Ala Ile Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile			
325	330	335	
			30
Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro			
340	345	350	
Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys			
355	360	365	
Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln			
370	375	380	
Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro			
			40

385	390	395	400		
Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro					
405		410		415	
Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly					
420		425		430	
Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu					
435	440		445	10	
Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr					
450	455		460		
Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser					
465	470	475		480	
Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu					
485	490		495		
Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr					
500	505		510	20	
Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys					
515	520		525		
Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe					
530	535		540		
Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu					
545	550	555		560	30
Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr					
565	570		575		
Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro					
580	585		590		
Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile					
595	600		605	40	
Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala					

610	615	620	
Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp			
625	630	635	640
Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile			
645	650	655	
Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala			
660	665	670	10
Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp			
675	680	685	
Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu			
690	695	700	
Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu			
705	710	715	720
Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val			
725	730	735	20
Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala			
740	745	750	
Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp			
755	760	765	
Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg			
770	775	780	30
Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp			
785	790	795	800
Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile			
805	810	815	
Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp			
820	825	830	40
Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val			

835	840	845	
His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu			
850	855	860	
Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val			
865	870	875	880
Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser			
885	890		

10

【0233】

(2) 配列番号11についての情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：30個の塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

20

(ii) 配列の種類：DNA(ゲノム)

(xi) 配列：配列番号11：

GGGAAGGGCG ATCGGTGCGG GCCTCTTCGC

30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、Tma DNAポリメラーゼ、及びサーマス属の7つの種からのDNAポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列整合を示す。5'-ヌクレアーゼ活性に対して決定的であるアミノ酸は星印により示される。

30

【図2】図2は、図1の続きであって、同じようにDNAポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列整合を示す。

【図3】図3は、例5に記載されるようなF730Y-Tma30 DNAポリメラーゼを用いてのサイクル配列決定反応からの配列決定トレースを示す。

【図4】図4は、図3の続きであって、同じように配列決定トレースを示す。

【図5】図5は、図4の続きであって、同じように配列決定トレースを示す。

【図6】図6は、例5に記載されるようなAmpliTaq (登録商標) DNAポリメラーゼFSを用いてのサイクル配列決定反応からの配列決定トレースを示す。

【図7】図7は、図6の続きであって、同じように配列決定トレースを示す。

【図8】図8は、図7の続きであって、同じように配列決定トレースを示す。

40

【図1】

図1

Tba	= サーマトガ マリチマ (配列番号1)
Taq	= サーマス アクアチカス (配列番号2)
Tfl	= サーマス フラバス (配列番号3)
Tth	= サーマス サーモフィラス (配列番号4)
T205	= サーマス種 2.05 (配列番号5)
Tca	= サーマス カルドフィラス (配列番号6)
Tsp17	= サーマス タンシス17 (配列番号7)
Tfi	= サーマス ブリオミス (配列番号8)

Tma	* * * * * MARLPLFEDGTAYALRAYAVALRSLSSTSIPTNATYGVARNMLVRFKDH
Taq	MRGMLPLFEPGPGRLVLDGHLAYRTHFL KGLTTSRGEPVQAYYGPASKSLKALKE ..
Tfl	MAMPLPLFEPGPGRLVLDGHLAYRTHFL KGLTTSRGEPVQAYYGPASKSLKALKE ..
Tth	MEAMPLPLFEPGPGRLVLDGHLAYRTHFL KGLTTSRGEPVQAYYGPASKSLKALKE ..
T205	MKAMPLPLFEPGPGRLVLDGHLAYRTHFL KGLTTSRGEPVQAYYGPASKSLKALKE ..
Tca	MEAMPLPLFEPGPGRLVLDGHLAYRTHFL KGLTTSRGEPVQAYYGPASKSLKALKE ..
Tsp17	.. MLPPLPFGPGRLVLDGHLAYRTHFL KGLTTSRGEPVQAYYGPASKSLKALKE ..
Tfi	.. MLPPLPFGPGRLVLDGHLAYRTHFL KGLTTSRGEPVQAYYGPASKSLKALKE ..

【図2】

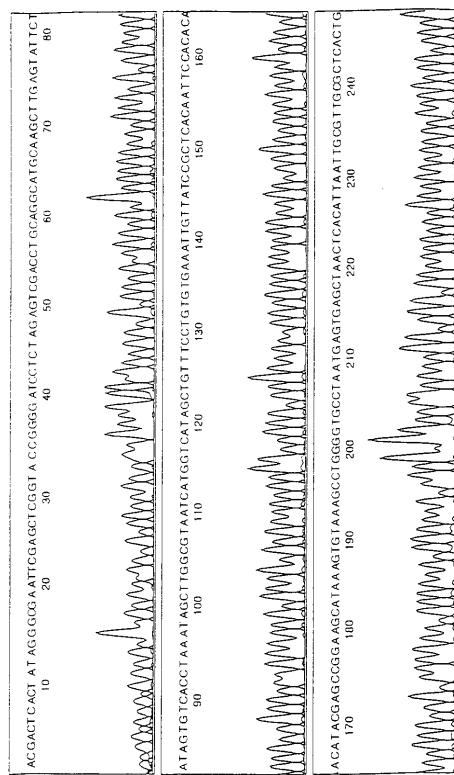
Tma	IVGK-DYVAVAFDKTAAKERHKLLTETYKAQRPKTDPLQLQOLPYIKKLVEALGMKVLEVEG
Taq	.. DG_DAVI VFDANKATSFHAEVAKAGRAPTPEDPROLALIKEVLVDLGLVRLEVPG
Tfl	.. DG_DVIVVFDANKATSFHAEVAKAGRAPTPEDPROLALIKEVLVDLGLVRLEVPG
Tth	.. DGKAVFVFVFDANKATSFHAEVAKAGRAPTPEDPROLALIKEVLVDLGLVRLEVPG
T205	.. DGKAVFVFVFDANKATSFHAEVAKAGRAPTPEDPROLALIKEVLVDLGLVRLEVPG
Tca	.. DGKAVFVFVFDANKATSFHAEVAKAGRAPTPEDPROLALIKEVLVDLGLVRLEVPG
Tsp17	.. DGKAVFVFVFDANKATSFHAEVAKAGRAPTPEDPROLALIKEVLVDLGLVRLEVPG
Tfi	.. DGKAVFVFVFDANKATSFHAEVAKAGRAPTPEDPROLALIKEVLVDLGLVRLEVPG

【図4】

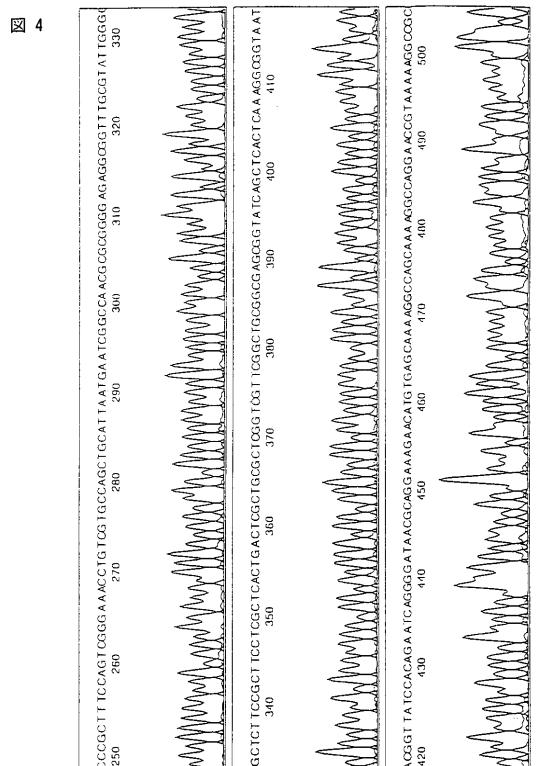
Tma	* * * YEADDI IATIAVKGPLPDEFIIVTGDKDMLOLVNIEKIKWRI1VKJISDLELYDAQKVE
Taq	YEADDVLASLKKAKKEKEGYEVRLTADKOLYQOLSSERIAFH .. PEGYLITPAWLE
Tfl	FEADDVLATLKKAKKEKEGYEVRLTADKOLYQOLSSERIAFH .. PEGYLITPAWLE
Tth	FEADDVLATLKKAKKEKEGYEVRLTADKOLYQOLSSERIAFH .. PEGYLITPAWLE
T205	FEADDVLATLKKAKKEKEGYEVRLTADKOLYQOLSSERIAFH .. PEGYLITPAWLE
Tca	FEADDVLATLKKAKKEKEGYEVRLTADKOLYQOLSSERIAFH .. PEGYLITPAWLE
Tsp17	FEADDVLATLKKAKKEKEGYEVRLTADKOLYQOLSSERIAFH .. PEGYLITPAWLE
Tfi	FEADDVLATLKKAKKEKEGYEVRLTADKOLYQOLSSERIAFH .. PEGYLITPAWLE

【図3】

図3



【図4】

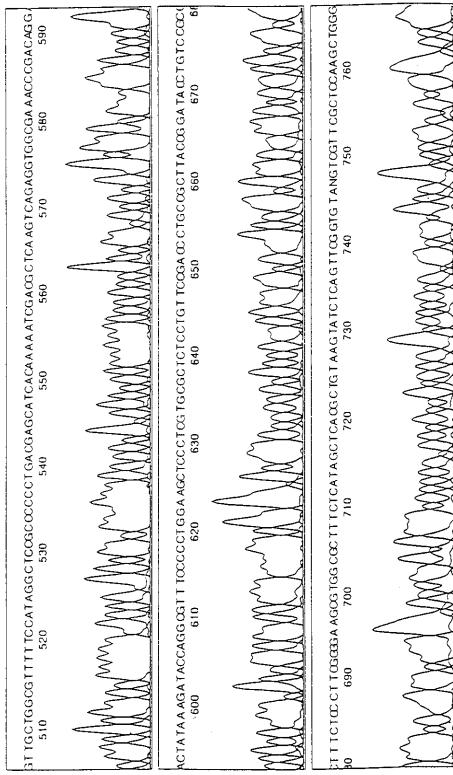


(64)

JP 4350815 B2 2009.10.21

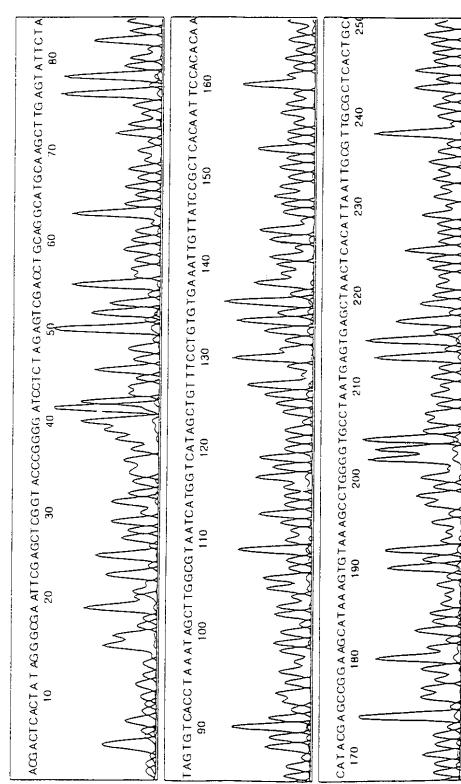
【図5】

図5



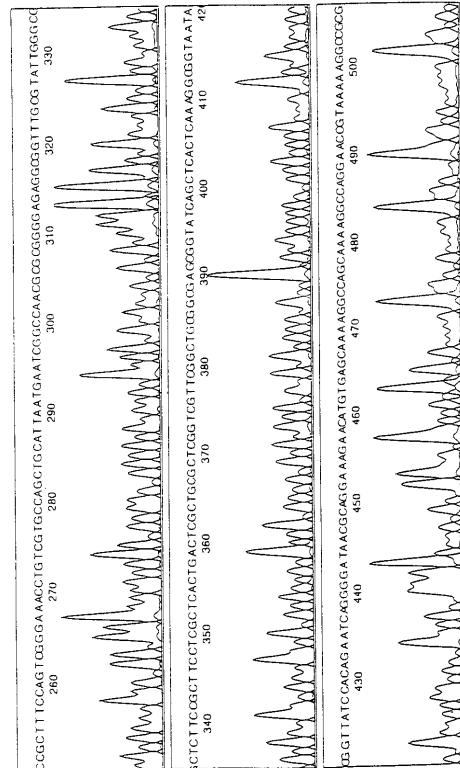
【図6】

図6



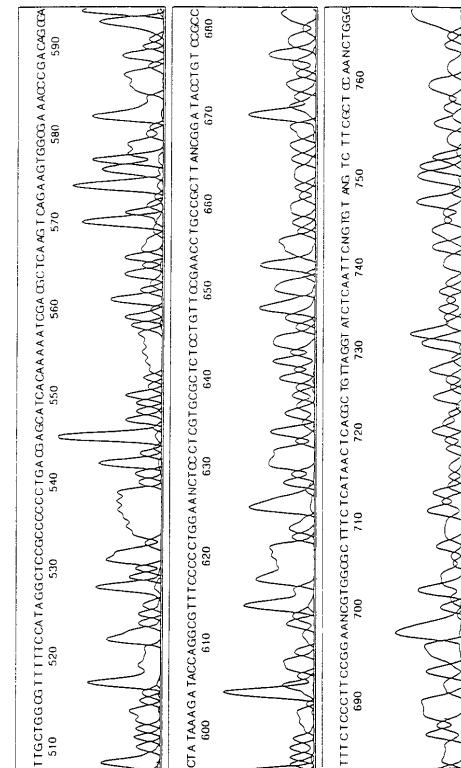
【図7】

図7



【図8】

図8



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 1 2 R 1/19 (2006.01)	C 1 2 R 1:01
	C 1 2 N 1/21
	C 1 2 R 1:19
	C 1 2 N 9/12
	C 1 2 R 1:19

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 デビッド ハーロウ ゲルファンド

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94611, オークランド, チェルトン ドライブ 6208

(72)発明者 フレッド ローレンス レイチャート

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94610, オークランド, ウォーフィールド アベニュー 8
59

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 米国特許第05374553(US, A)

特表平05-506364(JP, A)

国際公開第97/009451(WO, A1)

特表平09-506783(JP, A)

国際公開第96/041014(WO, A1)

米国特許第05455170(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA(STN)