(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
2016 年 9 月 29 日(29.09.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/153053 A1

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

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/059727

(22) 国際出願日: 2016 年 3 月 25 日(25.03.2016)

(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 2015-062107 2015 年 3 月 25 日(25.03.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP). 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所(NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目６番８号 Osaka (JP). 国立大学法人群馬大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目２番地 Gunma (JP).

(72) 発明者: 小比賀　聡(OBIKA, Satoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 星野　秀和(HOSHINO, Hidekazu); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 森廣邦彦(MORIHIRO, Kunihiko); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目６番８号　国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP). 笠原　勇矢(KASAHARA, Yuya); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目６番８号　国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP). ▲桑▼原　正靖(KUWAHARA, Masayasu); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目２番地　国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP).

(74) 代理人: 進藤　卓也, 外(SHINDO, Takuya et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満３丁目２番９号翁ビル５階 Osaka (JP).

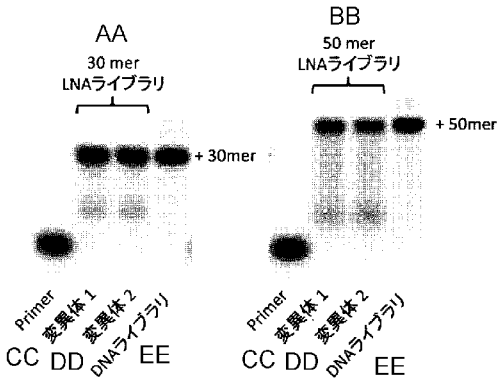
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, 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,

[続葉有]

(54) **Title**: MODIFIED POLYMERASE

(54) 発明の名称 : 改変ポリメラーゼ

［図3］



AA 30 mer LNA library
BB 50 mer LNA library
CC Mutant 1
DD Mutant 2
EE DNA library

(57) **Abstract**: Disclosed is a modified polymerase that comprises an amino acid sequence having prescribed mutations in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 of Sequence Listing. According to the present invention, a polymerase having an LNA chain extension activity and a polymerase having a reverse transcription activity are provided.

(57) 要約:　配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、所定の変異を有するアミノ酸配列からなる、改変型ポリメラーゼが開示される。本発明によれば、ＬＮＡ鎖伸長活性を有するポリメラーゼ、および逆転写活性を有するポリメラーゼが提供される。

WO 2016/153053 A1

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)）

明　細　書

発明の名称 ： 改変ポリメラーゼ

技術分野

[0001] 本発明は、改変ポリメラーゼに関する。

背景技術

[0002] 核酸アプタマーは、Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment（ＳＥＬＥＸ）法によって、多様な配列を含む核酸ライブラリから選出される。核酸アプタマーとは、自身の立体構造によって標的分子に特異的に結合することのできる核酸分子をいう。核酸アプタマーは、特異的に標的分子と結合するため副作用が少ない；大量に化学合成することが可能である；などのため、分子標的薬として期待される。

[0003] 核酸アプタマーはＤＮＡおよびＲＮＡのような天然核酸を用いて合成され得るが、このような天然核酸は核酸分解酵素によって生体内で容易に分解され得る。よって、これらの天然核酸は、化学修飾を付した人工核酸に置き換えることによって分解から保護する必要があるが、人工核酸への置換の際に、アプタマーの構造変化による活性の低下が高頻度で起こる。

[0004] 上記天然核酸の代替となり得る人工核酸として、キセノ核酸（Xeno Nucleic Acid：ＸＮＡ）が知られている。あらかじめ人工核酸ＸＮＡを含むライブラリを用いてＳＥＬＥＸを行うことにより、分解酵素耐性を有するアプタマーを得ることが期待される。この場合、ＤＮＡライブラリからＤＮＡからのＸＮＡへの転写（ＤＮＡ→ＸＮＡ）を通じてＸＮＡライブラリを作成し、次いで選別により得られた配列を、配列中のＸＮＡをＤＮＡに逆転写（ＸＮＡ→ＤＮＡ）して増幅させる。転写では、ＤＮＡ鎖をテンプレートとしてＸＮＡ鎖が合成され、そして逆転写では、ＸＮＡ鎖をテンプレートとしてＤＮＡ鎖が合成される。これらの合成反応は鎖伸長反応とも呼ばれ、通常、酵素を触媒として行われる。

[0005] ＤＮＡ鎖を増幅する（すなわち、ＤＮＡ鎖をテンプレートとしてＤＮＡ鎖

を伸長する）ためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）では、熱耐性型のＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼが用いられる。しかし、野生型のＤＮＡポリメラーゼは、特にＬＮＡのような分解酵素耐性を有する人工核酸の鎖を伸長させることは困難である。

[0006] 非特許文献１には、６種のＸＮＡ、すなわち、１，５－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）、２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン－β－Ｄ－リボ核酸（ＬＮＡ：「２，４－ＢＮＡ（bridged nucleic acid）／ＬＮＡ（locked nucleic acid）」ともいう）、アラビノ核酸（ＡＮＡ）および２’－フルオロ－アラビノ核酸（ＦＡＮＡ）、α－Ｌ－スレオフラノシル核酸（ＴＮＡ）を用いた鎖合成反応の検討が報告されている。

[0007] 非特許文献１では、超好熱性古細菌であるサーモコッカス・ゴルゴナリウス（Thermococcus gorgonarius）由来のＤＮＡポリメラーゼの変異体（ＴｇｏＴ）を基盤として改変ポリメラーゼの作出が試みられた。５つの改変ポリメラーゼのうち、ＰｏｌＩ６Ｇ１２、ＰｏｌＩＣ７およびＰｏｌＩＤ４ＫはＤＮＡ→ＸＮＡを触媒し、ＰｏｌＩ６Ｇ１２はＨＮＡ鎖を、ＰｏｌＩＣ７はＣｅＮＡ鎖およびＬＮＡ鎖を、ＰｏｌＩＤ４Ｋは、ＡＮＡ鎖およびＦＡＮＡ鎖を合成することが報告された。残りの２つであるＲＴ５２１およびＲＴ５２１Ｋは、ＸＮＡ→ＤＮＡを触媒し、ＲＴ５２１はＨＮＡ鎖、ＴＮＡ鎖、ＡＮＡ鎖およびＦＡＮＡ鎖を、ＲＴ５２１ＫはＣｅＮＡ鎖およびＬＮＡ鎖を逆転写することが報告された。

[0008] 非特許文献２には、ＬＮＡを用いたランダムライブラリーの作成が報告されている。ここでは、ＬＮＡ　ＡＴＰまたはＬＮＡ　ＴＴＰを用いてＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドを生成しており、すなわち、Ａ、Ｃ、ＧおよびＴの塩基のうち、Ａのみまたは Ｔのみが ＬＮＡであり、ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチド合成の際に、市販のＫＯＤ　ＸＬポリメラーゼ（Ｎｏｖａｇｅｎ）が用いられている。

[0009] しかし、ＳＥＬＥＸにおいて用いるためのＸＮＡライブラリを構成するＸ

ＮＡ鎖について、テンプレートのＤＮＡからの安定した鎖の生成が求められる。よって、そのような安定的な鎖伸長を可能とするポリメラーゼの必要性が存在する。

先行技術文献

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Science 2012, 336, 341-344

非特許文献2：Molecules 2012, 17, 13087-13097

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、人工核酸を含む鎖を伸長し得る改変ポリメラーゼを提供することを目的とする。本発明はまた、人工核酸を含む鎖からＤＮＡに逆転写し得る改変ポリメラーゼを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明は、以下（ｉ）～（iii）のような改変型ポリメラーゼを提供する。

[0013] 本発明の改変型ポリメラーゼ（ｉ）は、配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の（１）あるいは（２）の変異を有するアミノ酸配列からなる：

（１）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４０９位のチロシンがバリン、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている；あるいは

（２）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４０９位のチロシンがバリン、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、６１４位のアスパラギン酸がアスパラギンに、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置

換されている。

[0014] 本発明のさらなる改変型ポリメラーゼ（ii）は、配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の（１）あるいは（２）の変異を有するアミノ酸配列からなる：

（１）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている；あるいは

（２）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、６１４位のアスパラギン酸がアスパラギンに、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[0015] 本発明のなおさらなる改変型ポリメラーゼ（iii）は、配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の変異を有するアミノ酸配列からなる：

２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[0016] 本発明はまた、ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＬＮＡ含有オリゴヌクレオチド鎖を合成する方法を提供する。本方法は、当該ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドからなるテンプレート、プライマー、ＬＮＡ－ＮＴＰおよび改変型ポリメラーゼ（ｉ）または（ii）を反応させる工程を含む。

[0017] １つの実施形態では、上記プライマーは、ＬＮＡ含有プライマーである。

[0018] １つの実施形態では、上記テンプレートは、ランダム配列を含む。

[0019] 本発明はさらに、ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＤＮＡ含有オリゴヌクレオチド鎖を合成する方法を提供する。本方法は、当該ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドからなるテンプレート、プライマー、ｄＮＴＰおよび本発明の改変型ポリメラーゼ（ii）または（iii）を反応させる工程を含む。

[0020] １つの実施形態では、上記のＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＬＮＡ含

有オリゴヌクレオチド鎖を合成する方法および上記のＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＤＮＡ含有オリゴヌクレオチド鎖を合成する方法において、上記反応させる工程は、１２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７～９）、１０ｍＭ　ＫＣｌ、６ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、および１０μｇ／ｍＬ　牛血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する緩衝液中で行われる。

[0021] 本発明はまた、ＬＮＡ鎖伸長活性を有する改変型ポリメラーゼであって、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異、三リン酸体の結合に寄与する変異、およびＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異を含むように改変されたポリメラーゼである、改変型ポリメラーゼを提供する。

[0022] １つの実施形態では、上記改変型ポリメラーゼは、三リン酸体の糖構造の認識を緩和する変異をさらに含む。

[0023] 本発明はまた、逆転写活性を有する改変型ポリメラーゼであって、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異と、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異とを含む、あるいはエキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異と、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異と、三リン酸体の結合に寄与する変異とを含むように改変されたポリメラーゼを提供する。

発明の効果

[0024] 本発明によれば、人工核酸であるＬＮＡを含む鎖を伸長し得る改変ポリメラーゼが提供される。さらに、本発明によれば、ＬＮＡを含む鎖からＤＮＡに逆転写し得る改変ポリメラーゼも提供される。これにより、ＤＮＡからのＬＮＡ鎖の安定的な伸長が可能となる。また、ＬＮＡ鎖からのＤＮＡへの逆転写反応も可能となる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]各種ＫＯＤポリメラーゼ変異体について、Ｎ１０ランダム配列テンプレートによるＬＮＡ鎖伸長活性の結果を示す電気泳動写真である。

[図2]ＫＯＤポリメラーゼ変異体Ａ２、Ａ３４、Ａ４、Ａ１３、Ａ２６、Ａ４８、およびＡ５３について、Ｎ１０ランダム配列テンプレートによるＬＮＡ鎖伸長活性の結果を示す電気泳動写真である。

[図3]変異体１および変異体２について、３０ｍｅｒ（左側）および５０ｍｅｒ（右側）のＬＮＡライブラリの作成の結果を示す電気泳動写真である。

[図4]変異体２について、３０ｍｅｒのＬＮＡライブラリの作成に関して種々の反応時間にて検討した結果を示す電気泳動写真である。

[図5]変異体２について、ＬＮＡ－ＮＴＰを含まない条件（条件１）、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰをそれぞれ欠いた条件（条件２～５）、およびＬＮＡ－ＮＴＰを欠いていない条件（条件６）でＬＮＡ鎖伸長反応を行った結果を示す電気泳動写真である。

[図6]変異体２のＬＮＡ鎖伸長反応について、ＤＮＡプライマーおよびＬＮＡプライマーの比較結果を示す電気泳動写真である。

[図7]各種ＫＯＤポリメラーゼ変異体について、逆転写活性の結果を示す電気泳動写真である。

[図8]Ｙ４０９を種々に置換したＫＯＤポリメラーゼ変異体について、反応液にKOD-Plus-Ver.2用緩衝液を用いて行ったＮ１０ランダム配列テンプレートによるＬＮＡ鎖伸長活性の結果を示す電気泳動写真である。

[図9]Ｙ４０９を種々に置換したＫＯＤポリメラーゼ変異体について、反応液にＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液１を用いて行ったＮ１０ランダム配列テンプレートによるＬＮＡ鎖伸長活性の結果を示す電気泳動写真である。

[図10]Ｙ４０９を種々に置換したＫＯＤポリメラーゼ変異体について、反応液にＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２を用いて行ったＮ１０ランダム配列テンプレートによるＬＮＡ鎖伸長活性の結果を示す電気泳動写真である。

[図11]Ａ５３について、反応液にＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２を用いて、ＬＮＡ－ＮＴＰを含まない条件（条件１）、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰをそれぞれ欠いた条件（条件２～５）、およびＬＮＡ－ＮＴＰを欠いていない条件（条件６）でＬＮＡ鎖伸長反応を行った結果を示す電気泳動写真である。

[図12]Ａ５３について、反応液にKOD-Plus-Ver.2用緩衝液を用いて、ＬＮＡ

－ＮＴＰを含まない条件（条件１）、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰをそれぞれ欠いた条件（条件２～５）、およびＬＮＡ－ＮＴＰを欠いていない条件（条件６）でＬＮＡ鎖伸長反応を行った結果を示す電気泳動写真である。

[図13]Ａ６５について、反応液にＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２を用いて、ＬＮＡ－ＮＴＰを含まない条件（条件１）、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰをそれぞれ欠いた条件（条件２～５）、およびＬＮＡ－ＮＴＰを欠いていない条件（条件６）でＬＮＡ鎖伸長反応を行った結果を示す電気泳動写真である。

発明を実施するための形態

[0026] 本明細書においては、アミノ酸の置換を次のように表す。例えば、「Ｅ６６４Ｋ」は、６６４位のグルタミン酸をリジンに置換した変異体を表す。複数箇所を置換した場合は「／」で区切ってそれぞれの置換を併記して示す。例えば、「Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｖ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ」は、２１０位のアスパラギンをアスパラギン酸に、４０９位のチロシンをバリンに、４８５位のアラニンをロイシンに、６１４位のアスパラギン酸をアスパラギンに、ならびに６６４位のグルタミン酸をリジンに置換した変異体を示す。なお、例えば「Ｙ４０９」との記載は、４０９位がチロシンであることを表す。

[0027] 本発明の改変型ポリメラーゼ（ｉ）は、配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の（１）あるいは（２）の変異を有するアミノ酸配列からなる：

（１）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４０９位のチロシンがバリン、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている；あるいは

（２）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４０９位のチロシンが

バリン、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、６１４位のアスパラギン酸がアスパラギンに、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[0028] 本発明のさらなる改変型ポリメラーゼ（ii）は、配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の（１）あるいは（２）の変異を有するアミノ酸配列からなる：

（１）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている；あるいは

（２）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、６１４位のアスパラギン酸がアスパラギンに、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[0029] 本発明のなおさらなる改変型ポリメラーゼ（iii）は、配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の変異を有するアミノ酸配列からなる：

２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[0030] 配列表の配列番号２のアミノ酸配列は、サーモコッカス・コダカラエンシス（Thermococcus Kodakaraensis）ＫＯＤ１のＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ（本明細書においては、「ＫＯＤポリメラーゼ」ともいう）のアミノ酸配列に該当するが、その由来は問わない。

[0031] ここで、本発明において、配列番号２に記載のアミノ酸配列とは、所定の置換以外のアミノ酸のうちの１または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ所定のポリメラーゼ活性を有するもの

も含むものである。好ましくは、所定の置換を保持し、配列番号２のアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性を有する範囲内で、１または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加され、かつ所定のポリメラーゼ活性を有するものも含むものが挙げられる。ここでの「１または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加」におけるアミノ酸置換の例としては、各機能または効果を実質的に保持する限りにおいていずれの置換であってもよい。例えば、保存的置換が挙げられる。保存的置換としては、具体的には以下のグループ内（すなわち、括弧内に示すアミノ酸間）での置換が挙げられる：（グリシン、アラニン）、（バリン、イソロイシン、ロイシン）、（アスパラギン酸、グルタミン酸）、（アスパラギン、グルタミン）、（セリン、トレオニン）、（リジン、アルギニン）、（フェニルアラニン、チロシン）。

[0032] 本明細書において配列の「同一性」とは、当該技術分野で知られているとおり、配列を比較することにより決定される、２以上のタンパク質あるいは２以上のポリヌクレオチドの間の関係である。配列の「同一性」とは、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間のアラインメントによって、あるいは場合によっては、一続きの部分的な配列間のアラインメントによって決定されるような、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間の配列不変性の程度を意味する。また、「類似性」とは、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間のアラインメントによって、あるいは場合によっては、一続きの部分的な配列間のアラインメントによって決定されるような、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間の相関性の程度を意味する。より具体的には、配列の同一性と保存性（配列中の特定アミノ酸または配列における物理化学特性を維持する置換）によって決定される。なお、類似性は、後述するＢＬＡＳＴの配列相同性検索結果においてSimilarityとも称される。同一性および類似性を決定する方法は、対比する配列間で最も長くアラインメントするように設計される方法であることが好ましい。同一性および類似性を決定するための方法は、公衆に利用可能なプログラムとして提供されている。例えば、AltschulらによるＢＬＡＳＴ（Basic Local Alignment Search Tool）

プログラム（例えば、Altschulら，J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410；Altschylら，Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402）を利用し決定することができる。ＢＬＡＳＴのようなソフトウェアを用いる場合の条件は、特に限定するものではないが、デフォルト値を用いるのが好ましい。

[0033] 上記改変型ポリメラーゼ（ｉ）は、ＬＮＡ鎖伸長活性を有する。改変型ポリメラーゼ（ｉ）は、好ましくは、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｖ／Ａ４８５Ｌ／Ｅ６６４Ｋ；またはＮ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｖ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｇ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ａ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｓ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｔ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｌ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｆ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋ、Ｎ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｄ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４ＫもしくはＮ２１０Ｄ／Ｙ４０９Ｅ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋの変異を有する。

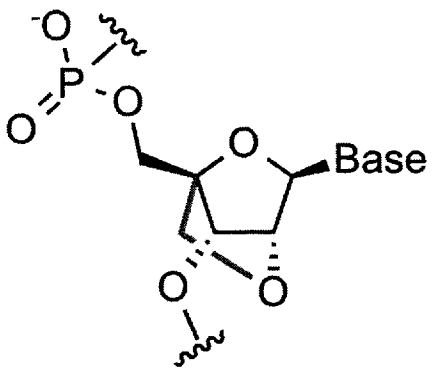
[0034] 上記改変型ポリメラーゼ（ii）は、ＬＮＡ鎖伸長活性を有する。改変型ポリメラーゼ（ii）は、ＬＮＡからのＤＮＡへの逆転写活性を有する。改変型ポリメラーゼ（ii）は、好ましくは、Ｎ２１０Ｄ／Ａ４８５Ｌ／Ｅ６６４Ｋ、またはＮ２１０Ｄ／Ａ４８５Ｌ／Ｄ６１４Ｎ／Ｅ６６４Ｋの変異を有する。Ｎ２１０Ｄ／Ａ４８５Ｌ／Ｅ６６４Ｑもまた好ましい。

[0035] 上記改変型ポリメラーゼ（iii）は、ＬＮＡからのＤＮＡへの逆転写活性（「逆転写活性」）を有する。改変型ポリメラーゼ（iii）は、好ましくは、Ｎ２１０Ｄ／Ｅ６６４ＫまたはＮ２１０Ｄ／Ｅ６６４Ｒの変異を有する。

[0036] 本明細書中において、「ＬＮＡ」とは、2’－Ｏ，4’－Ｃ－メチレン－β－Ｄ－リボ核酸をいう（「2，4－ＢＮＡ（bridged nucleic acid）／ＬＮＡ（locked nucleic acid）」ともいう）。「ＬＮＡ鎖」とは、ＬＮＡを含むオリゴヌクレオチドであって、例えば以下の式：

[0037]

[化1]



[0038] （ここで、「Ｂａｓｅ」は、アデニン（Ａ）、チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）およびグアニン（Ｇ）から選択される１つの塩基である）で表される所定の鎖長を有する核酸鎖である。さらに、本明細書中において「ＬＮＡ鎖伸長活性」とは、テンプレートＤＮＡにアニールされたＤＮＡまたはＬＮＡのオリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）の３’－ヒドロキシル基に、ＬＮＡの５’－トリホスフェート基のα－ホスフェートを共有結合させることにより、ＤＮＡのテンプレート依存的なＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドの合成、すなわちＬＮＡ鎖の伸長を生じさせる反応を触媒する活性をいう。当該ＬＮＡ鎖伸長活性は、当業者が通常用いる方法にて、例えば、参考例３に記載の手順を用いて決定され得る。本発明の改変型ポリメラーゼによるＬＮＡ鎖伸長にはＬＮＡが基質として用いられるが、このような基質として、メチルＣ型ＬＮＡ（ＬＮＡのシトシンのピリミジン環の５位炭素原子にメチル基が付加されている）もまた用いられ得る。

[0039] 本明細書中において、ＬＮＡからのＤＮＡへの逆転写活性（単に「逆転写活性」ともいう）とは、テンプレートとなるＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドにアニールされたＤＮＡのオリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）の３’－ヒドロキシル基に、ＬＮＡの５’－トリホスフェート基のα－ホスフェートを共有結合させることにより、テンプレート依存的なＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドの合成、すなわちＤＮＡ鎖の伸長を生じさせる反応を触媒する活性をいう。当該逆転写活性は、当業者が通常用い

る方法にて、例えば、実施例８に記載の手順を用いて決定され得る。

[0040] ＬＮＡ鎖伸長活性を有する改変型ポリメラーゼの構造的特徴には、以下が挙げられる。ここで、ＫＯＤポリメラーゼの立体構造は、例えば、Kaiら ＪＭol Biol.２００１，３０６、４６９－４７７に示されており、機能部位は、大きくはＮ末端領域（「N-ter」：１～１３０位および３２７～３６８位）、エキソヌクレアーゼ領域（「Exo」：１３１～３２６位）、およびポリメラーゼ活性領域（Palm領域：３６９～４４９位および５００～５８７位、Fingers領域：４５０～４９９位、およびThumb-1、Thumb-2領域（本明細書中では、併せて「Thumb領域」という）：５８８～７７４位）に分けられる。

[0041] Ｎ２１０Ｄ（２１０位のアスパラギンのアスパラギン酸への置換）は、エキソヌクレアーゼ領域に位置しており、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる。このＮ２１０Ｄは、ＬＮＡ鎖伸長活性を有する改変型ポリメラーゼに共通して存在する。

[0042] Ａ４８５（４８５位のアラニン）は、Fingers領域に位置しており、三リン酸体の結合に寄与していると考えられる。４８５位のアラニンは、中性アミノ酸（例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン）に置換され得る。４８５位にて、嵩の小さなアラニンを、嵩高い疎水性アミノ酸でもあり得る中性アミノ酸（例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン）に置換し得る。

[0043] Ｄ６１４Ｎ（６１４位のアスパラギン酸のアスパラギンへの置換）およびＥ６６４Ｋ（６６４位のグルタミン酸のリジンへの置換）は、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強め得る。二重鎖と結合するThumb領域中に、負電荷をもつアミノ酸（Ｄ６１４：６１４位のアスパラギン酸、Ｅ６６４：６６４位のグルタミン酸）が存在するが、このアミノ酸を電荷なし（例えば、Ｄ６１４Ｎ）、あるいは正電荷（例えば、Ｅ６６４Ｋ）に変更することによって、ポリメラーゼとＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強め、プライマー鎖の３’末端を反応部位に正しく位置させることができていると考えられる。ここで、６１４位のアスパラギン酸は、アスパラギンに置換され得、６６４位のグル

タミン酸は、リジン、グルタミン、またはアルギニンに置換され得る。６６４位のみの置換変異、または６１４位および６６４位の置換変異でもよい。

[0044] Ｙ４０９（４０９位のチロシン）がさらに置換され得る。Ｙ４０９は、Palm領域に位置しており、ＬＮＡ－ＮＴＰの糖部に接する。Ｙ４０９は、バリン、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸に置換され得る。Ｙ４０９の置換変異は、上記の置換変異、すなわち、２１０位、４８５位および６６４位、あるいは２１０位、４８５位、６１４位および６６４位の置換変異と共になされ得る。１つの実施形態では、Ｙ４０９の置換は、Ｎ２１０Ｄ、Ａ４８５Ｌ、Ｄ６１４ＮおよびＥ６６４Ｋの置換と共になされ得る。Ｙ４０９の置換は、三リン酸体の糖構造の認識を緩和し、ＬＮＡ－ＮＴＰの取り込み速度を向上させ得る。Ｙ４０９がサイズ（嵩高さ）が小さい基を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニンまたはセリン）に置換されることにより、より高いＬＮＡ鎖伸長活性が得られ得、また、Ｙ４０９がバリン（Ｙ４０９Ｖ）またはトレオニン（Ｙ４０９Ｔ）に置換されることにより、より高い正確性にてＬＮＡ伸長が得られ得る。

[0045] ＬＮＡ鎖伸長活性を有する改変型ポリメラーゼは、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異、三リン酸体の結合に寄与する変異、およびＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異を含むように改変されたポリメラーゼとなるように設計され得る。好ましくは、当該改変ポリメラーゼは、三リン酸体の糖構造の認識を緩和する変異をさらに含む。

[0046] 逆転写活性を有する改変型ポリメラーゼの構造的特徴には、以下が挙げられる。活性を有する改変型ポリメラーゼには、以下の特徴があると考えられる。

[0047] Ｎ２１０Ｄ（２１０位のアスパラギンのアスパラギン酸への置換）は、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる。このＮ２１０Ｄは、逆転写活性を有する改変型ポリメラーゼに共通して存在する。

[0048] 逆転写の際にはポリメラーゼがＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖と結合し、プライマ

一鎖の３’末端を反応部位に正しく位置させることが必要である。例えば、Thumb領域の負電荷アミノ酸が正電荷に変更された場合（例えば、Ｅ６６４ＫまたはＥ６６４Ｒ）に逆転写活性が見られ、これは、ポリメラーゼとＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合が強められた結果であると考えられる。Thumb領域の負電荷アミノ酸が正電荷に中性に変更される変異（Ｅ６６４Ｑ）（これにより、ポリメラーゼのＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖結合能が微増され得る）と共に、三リン酸との結合に関与するＡ４８５Ｌを導入した場合も、逆転写活性が見られる。また、Ｅ６６４Ｋを有する変異体も、Ａ４８５Ｌとの組み合わせで逆転写活性が向上される。

[0049] Ｅ６６４Ｋと共にＥ６１４Ｎを含む場合も、Ａ４８５Ｌとの組み合わせで逆転写活性が向上される。ここで、４８５位のアラニンは、中性アミノ酸（例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン）に置換され得る。６６４位のグルタミン酸は、リジン、グルタミン、またはアルギニンに置換され得る。

[0050] 逆転写活性を有する改変型ポリメラーゼは、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異と、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異とを含む、あるいはエキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異と、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異と、三リン酸体の結合に寄与する変異とを含むように改変されたポリメラーゼとなるように設計され得る。

[0051] 改変型ポリメラーゼを製造する方法としては、従来の公知の方法が使用できる。例えば、野生型ＤＮＡポリメラーゼをコードする遺伝子に変異を導入して、タンパク質工学的手法により新たな機能を有する変異型（改変型）ＤＮＡポリメラーゼを製造する方法がある（J. Biol. Chem., 264(11), 6447-6458(1989)）。変異を導入するＤＮＡポリメラーゼをコードする遺伝子は、配列番号２のアミノ酸配列をコードする遺伝子である限り、特に限定されない。例えば、遺伝子は、サーモコッカス・コダカラエンシスＫＯＤ１のＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼの遺伝子としてＮＣＢＩなどの遺伝子登録機関より入手可能な塩基配列、またはコドンの最適化を行った塩基配列（例えば、

配列表の配列番号１の塩基配列）などの配列情報に基づいて、当業者が通常用いる方法により得ることができる。

[0052] 遺伝子に変異を導入する方法は既知のいかなる方法を用いてもよい。例えば、タンパク質工学的手法、例えばＰＣＲや部位特異的変異などの方法を用いることができる。

[0053] 改変型ポリメラーゼの遺伝子を必要に応じて発現ベクターに挿入し、例えば大腸菌を宿主として当該発現ベクターを用いて形質転換した後、カナマイシンなどの選択薬剤を含む寒天培地に塗布し、コロニーを形成させる。コロニーを栄養培地、例えばＬＢ培地に接種し、適宜培養（例えば、３７℃にて増殖させた後、ＩＰＴＧなどの発現誘導剤の存在下で３０℃にて培養）した後、菌体を回収および破砕し、粗酵素液を抽出する。ベクターとしては、ｐＥＴベクターが好ましいが、これに限定されない。培地組成、ｐＨ、温度、培養の際の菌体密度および培養時間は、適宜設定し得る。菌体を破砕する方法としては公知のいかなる手法を用いても良いが、例えば超音波処理、フレンチプレスやガラスビーズ破砕のような物理的破砕法やリゾチームのような溶菌酵素を用いることができる。粗酵素液を熱処理、例えば８０℃にて１０分間処理し、その後遠心、膜濾過などにより粗精製酵素を得ることができる。この操作の後、ヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し得る。さらにこれを精製または濃縮する工程を実施することもできる。これらの工程およびそれらに要する手段は、当業者によって適宜選択される。

[0054] 改変型ポリメラーゼ（ｉ）および（ｉｉ）は、ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＬＮＡ含有オリゴヌクレオチド鎖を合成する方法（本明細書中においては、「ＬＮＡ鎖伸長方法」ともいう）に、そして改変型ポリメラーゼ（ｉｉ）および（ｉｉｉ）は、ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＤＮＡ含有オリゴヌクレオチド鎖を合成する方法（本明細書中においては、「逆転写方法」ともいう）に用いることができる。

[0055] 本発明のＬＮＡ鎖伸長方法は、ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドからなるテ

ンプレート、プライマー、ＬＮＡ－ＮＴＰおよび改変型ポリメラーゼ（ｉ）または（ii）を反応させる工程を含む。本発明の改変型ポリメラーゼを使用して、ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドをテンプレートとし、プライマー、ＬＮＡ－ＮＴＰ（すなわち、Ａ、Ｔ、ＣおよびＧのそれぞれを塩基とする４種類のＬＮＡ－ヌクレオシド三リン酸（ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＴＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰおよびＬＮＡ－ＧＴＰ）の混合物）を反応させることにより、テンプレートにアニールしたプライマーがＬＮＡを取り込みながら伸長し、プライマー伸長物としてＬＮＡ鎖（ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチド）が合成され得る。本発明のＬＮＡ鎖伸長方法は、ポリメラーゼを用いた反応工程の前に、アニーリング工程をさらに含み得る。アニーリング工程において、プライマーとテンプレート上の相補的領域とをハイブリダイズさせ、続く伸長工程で、プライマーを起点として本発明の改変型ポリメラーゼの働きによりテンプレートの一本鎖ＤＮＡに相補的なＬＮＡ鎖を伸長させ、ＤＮＡ－ＬＮＡ鎖が形成され得る。

[0056] ここで、「オリゴヌクレオチド」は、テンプレートに適した長さであればいずれでもよいが、例えば、その塩基数が、例えば、３０～１００、好ましくは、３５～７５であるものが挙げられる。

[0057] 上記アニーリングおよび伸長の反応温度は、通常のＰＣＲと同様の条件が用いられ得るが、例えば、９５℃にて１分間加熱後に１時間かけて室温まで温度を下げてアニーリングを行った後、ポリメラーゼを添加して７４℃にて伸長させ得る。反応液の組成は、以下の表２に示すものが例示として挙げられるが、これに限定されない。酵素の添加濃度は、伸長鎖の長さ、反応時間などに依存し得るが、例えば、２０ｎｇ／μＬ～３００ｎｇ／μＬ、好ましくは、２００ｎｇ／μＬ～３００ｎｇ／μＬであるが、これらに限定されない。反応時間は、伸長鎖の長さ、酵素の添加濃度などに依存し得るが、１．５時間～１３．５時間が採用され得るが、これらに限定されない。

[0058] プライマーは、ＤＮＡプライマー（ＤＮＡで構成されるプライマー）およびＬＮＡプライマー（ＬＮＡで構成されるプライマー）のいずれでもよい。

プライマーは、ＤＮＡとＬＮＡとの両方を含有するものであってもよい。プライマー伸長反応の途中での律速段階を回避する観点からは、ＬＮＡを少なくとも一部に含有するプライマー（好ましくは、全てがＬＮＡであるプライマー）が好ましい。プライマーの長さは適宜決定され得るが、その塩基数が、例えば、１１～２８、好ましくは、１２～２５であるものが挙げられる。プライマーは、テンプレートの配列情報に基づいて当業者により適宜設計され、作製され得る。

[0059] テンプレートは、特定配列からなるものであってもよく、またはランダム配列を含むものであってもよい。ランダム配列の長さは、例えば、１０～５０塩基である。ランダム配列を含むテンプレートを用いることにより、ＬＮＡライブラリを作成することができる。

[0060] 本発明の逆転写方法は、ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドからなるテンプレート、プライマー、ｄＮＴＰおよび改変型ポリメラーゼ（ｉｉ）または（ｉｉｉ）を反応させる工程を含む。本発明の改変型ポリメラーゼを使用して、ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドをテンプレートとし、プライマー、ｄＮＴＰ（すなわち、Ａ、Ｔ、ＣおよびＧのそれぞれを塩基とする４種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰおよびｄＧＴＰ）の混合物）を反応させることにより、テンプレートにアニールしたプライマーが、ＤＮＡを取り込みながら伸長し、プライマー伸長物としてＤＮＡ鎖（ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチド）が合成され得る。本発明の逆転写方法は、ポリメラーゼを用いた反応工程の前に、アニーリング工程をさらに含み得る。アニーリング工程において、プライマーとテンプレート上の相補的領域とをハイブリダイズさせ、続く伸長工程で、プライマーを起点として本発明の改変型ポリメラーゼの働きによりテンプレートの一本鎖ＬＮＡに相補的なＤＮＡ鎖を伸長させ、ＬＮＡ－ＤＮＡ鎖が形成され得る。

[0061] 逆転写方法のためのプライマーは、ＤＮＡプライマー（ＤＮＡで構成されるプライマー）であり得る。プライマーの長さは適宜決定され得るが、その塩基数が、例えば、１１～２８、好ましくは、１２～２５であるものが挙げ

られる。プライマーは、テンプレートの配列情報に基づいて当業者により適宜設計され、作製され得る。

[0062] 逆転写方法のためのテンプレートは、特定配列からなるものであってもよく、またはランダム配列を含むものであってもよい。ランダム配列の長さは、例えば、１０～５０塩基である。逆転写方法のためのテンプレートは、ＤＮＡテンプレートをもとに転写したＬＮＡ鎖（例えば、本発明のＬＮＡ鎖伸長方法において作製したＬＮＡ鎖）であってもよい。

[0063] 逆転写方法の場合も同様に、アニーリングおよび伸長の反応温度は通常のＰＣＲと同様の条件が用いられ得るが、例えば、９５℃にて１分間加熱後に１時間かけて室温まで温度を下げてアニーリングを行った後、ポリメラーゼを添加して７４℃にて伸長させ得る。反応液の組成は、実施例８に示すものが例示として挙げられるが、これに限定されない。酵素の添加濃度は、伸長鎖の長さ、反応時間などに依存し得るが、例えば、１０ｎｇ／μＬ～３００ｎｇ／μＬ、好ましくは、１０ｎｇ／μＬ～１００ｎｇ／μＬであるが、これらに限定されない。反応時間は、伸長鎖の長さ、酵素の添加濃度などに依存し得るが、３０分～３時間が採用され得るが、これらに限定されない。

[0064] ＬＮＡ鎖伸長方法および逆転写方法においては、本発明の改変型ポリメラーゼおよび上記核酸成分に加えて、例えば、マグネシウムイオンのような２価のイオン（例えば、$MgSO_4$として）を共存させることが好ましい。また、改変型ポリメラーゼを用いる反応においては、緩衝液として、市販のＰＣＲ緩衝液（例えば、KOD-Plus-Ver.2用Buffer（東洋紡株式会社製））、および当業者によって調製される任意の緩衝液（例えば、１２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７～９）、１０ｍＭ　ＫＣｌ、６ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、および１０μｇ／ｍＬ　牛血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する緩衝液）が用いられ得る。ここで、緩衝液のｐＨは、緩衝液温度および伸長反応温度によって変動し得る。例えば、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌでは緩衝液の温度が１℃上昇するとｐＨは０．０２５ほど低下し、伸長反応温度もまた作用ｐＨに影響し得る。

[0065] １つの実施形態では、ＬＮＡ鎖伸長反応および逆転写方法は、１２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７～９）、１０ｍＭ ＫＣｌ、６ｍＭ $(NH_4)_2SO_4$、および１０μｇ／ｍＬ 牛血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する緩衝液中で行われる。この緩衝液は、０．１％ Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００をさらに含有する。この実施形態において、例えば、緩衝液温度を２５℃として、通常のＰＣＲと同様の条件で反応を行うかまたは７４℃にて伸長反応を行う場合、この緩衝液のｐＨは、好ましくはｐＨ８～８．８であり、さらにはＬＮＡ鎖の伸長効率の面ではｐＨ８．８の方がｐＨ８よりも好ましい。

実施例

[0066] 以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0067] （実施例１：改変型ポリメラーゼの作出）

（１－１：プラスミドの構築）

ＫＯＤポリメラーゼ遺伝子は人工遺伝子合成によって、あらかじめインテイン配列を除去し、コドンの最適化を行った配列（配列番号１の塩基配列；それによりコードされたアミノ酸配列を配列番号２に示す）を作成した。遺伝子合成はオペロンバイオテクノロジーに依頼した。ＫＯＤポリメラーゼ遺伝子はpET49 vector （Novagen）のNdeIサイトとSalIサイトとの間に挿入し、ＫＯＤポリメラーゼタンパク質にタグなどの余分な配列が含まれないように発現プラスミドを構築した。点変異導入にはPrimeSTAR（登録商標）Mutagenesis Basal Kit（TAKARA）の手法を用いた。ＫＯＤポリメラーゼ変異体発現プラスミドについてＫＯＤポリメラーゼ変異体遺伝子の塩基配列解析を行うことで、目的の配列が正しく挿入されていることを確認した。表１に導入した変異の組み合わせを記載する。

[0068]

[表1]

導入した変異の組み合わせ

略称	変異箇所
A2	N210D/A485L
A4	N210D/E664K
A7	V93Q/N210D/A485L
A13	N210D/A485L/E664K
A19	V93Q/N210D/A485L/D614N
A20	V93Q/N210D/A485L/E664K
A22	V93Q/N210D/A485L/H663Y/E664Q/Q665P
A26	N210D/A485L/D614N/E664K
A28	N210D/A485L/D614N/H663Y/E664Q/Q665P
A29	V93Q/N210D/A485L/D614N/E664K
A32	N210D/D614K
A33	V93Q/N210D/A485L/D614K
A34	N210D/Y409V/A485L
A35	N210D/L408S/Y409A/P410V/A485L
A36	H147E/N210D/A485L
A37	V93Q/H147E/N210D/A485L/E664K
A40	N210D/A485F
A41	N210D/A485I
A42	N210D/A485M
A43	N210D/E664R
A44	N210D/D614R
A45	N210D/Y409V/A485F
A46	N210D/Y409V/A485I
A47	N210D/Y409V/A485M
A48	N210D/Y409V/A485L/E664K
A49	N210D/Y409V/A485L/H663Y/E664Q/Q665P
A50	N210D/E664Q
A51	N210D/A485L/E664Q
A52	N210D/Y409V/A485L/E664Q
A53	N210D/Y409V/A485L/D614N/E664K
A54	N210D/Y409V/A485L/D614N/E664Q

[0069] （１－２：ＫＯＤポリメラーゼ変異体の発現・精製）

ＫＯＤポリメラーゼ変異体発現プラスミドをT7 Express Competent E.coli (High Efficiency)（ＮＥＢ）にヒートショック法によって導入し、LB/Km

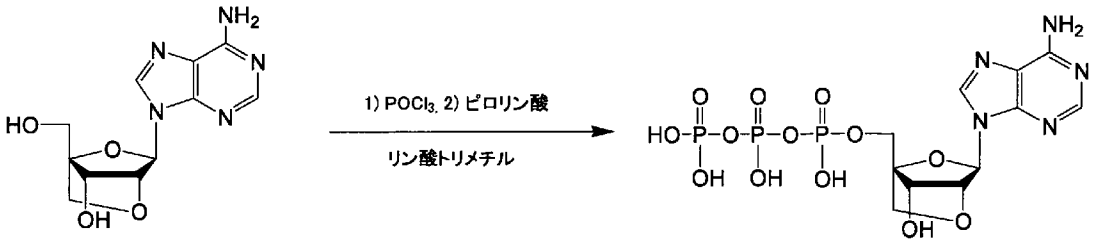
（５０μｇ／ｍＬ）プレートにまいて３７℃で静置した。生えてきたコロニーをＴＢ培地／１％グルコース／Ｋｍ（５０μｇ／ｍＬ）にうえて３７℃で振とうした。OD_{600}　０．４～０．６に到達した時点で１Ｍ　ＩＰＴＧを１／１０００ｖｏｌ添加（最終１ｍＭ）し、培養温度を３０℃に変更して発現誘導を行った。ＩＰＴＧを添加して６時間後に培養液を遠心して上清を除去し、大腸菌を回収した。大腸菌は－８０℃で保存して、精製の際に融解した。融解した大腸菌は緩衝液（１０ｍＭリン酸ナトリウム、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＤＴＴ、１０％グリセロール）に懸濁し、超音波によって菌体を破砕した。大腸菌破砕溶液を遠心（４℃、８０００ｇ、５分）後、上清を回収して８０℃の湯浴で１０分加熱した。加熱によって変性した夾雑物タンパク質を遠心（４℃、８０００ｇ、５分）して除去し、上清を０．４５μｍ　ＰＶＤＦメンブレンフィルターに通すことで微粒子を完全に除去した。得られた粗精製溶液はHiTrap Heparin HP Columns（５ｍＬ）を用いてAKTA pure（GE Healthcare）で精製した。カラムに吸着させたＫＯＤポリメラーゼ変異体について、緩衝液（１０ｍＭリン酸ナトリウム、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＤＴＴ、１０％グリセロール）のＮａＣｌ濃度を１００ｍＭ→２Ｍに徐々に上げることで溶出分画にＫＯＤポリメラーゼ変異体のピークを得た。溶出分画はAmicon Ultra 4（３０Ｋ）（Millipore）を用いた限外濾過によって濃縮後、緩衝液の置換を行い、最終的に保存緩衝液（Storage Buffer：５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、５０ｍＭ　ＫＣｌ、５０％グリセロール、０．１％　Tween 20、０．１％ Nonidet P40）に溶解させて－２０℃で保存した。ＫＯＤポリメラーゼ変異体の濃度はブラッドフォード法によって決定し、Storage Bufferで目的の濃度に希釈して反応に用いた。

[0070]　（実施例２：糖修飾塩基の合成）

（２－１：ＬＮＡ－ＡＴＰの合成）

[0071]

[化2]



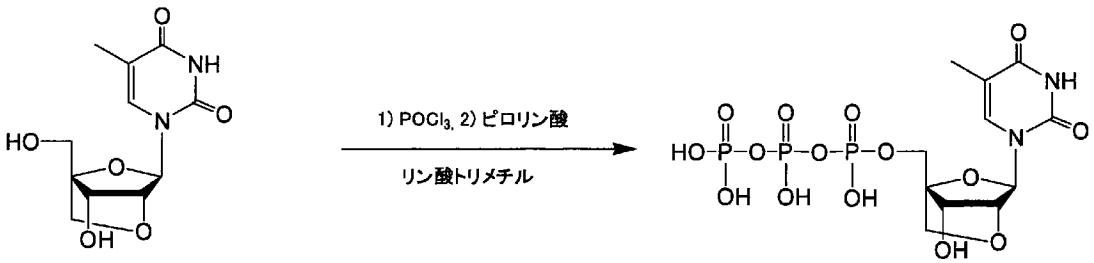
精密質量:279.10
分子量:279.26
LNA-A

精密質量:519.00
分子量:519.19
LNA-ATP

[0072] ＬＮＡ－Ａ（１０２ｍｇ、３．６５×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．０ｅｑ）と撹拌子を１００ｍＬナスフラスコに入れ一晩減圧乾燥させ、ｄｒｙ－ＤＭＦ（６ｍＬ）で２回共沸させた。次にｄｒｙ－ＭｅＣＮ（６ｍＬ）で３回共沸させた。一晩減圧乾燥させておいたプロトン・スポンジ（１１７ｍｇ、５．４６×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．４６ｅｑ）を入れた後さらに一晩減圧乾燥させた。アルゴン置換し、デシケーター内のセプタムキャップを付けアルゴン風船を取り付けた。リン酸トリメチル（１．３ｍＬ、１．２９×１０$^{-2}$ｍｏｌ、３６ｅｑ）を加え、懸濁させ氷浴中で３０分撹拌させた。ＰＯＣｌ$_3$（５５μＬ、５．９０×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．５ｅｑ）を加え氷浴下で４５分間撹拌した。氷浴下でｄｒｙ－トリブチルアミン（３５０μＬ、１．４６×１０$^{-3}$ｍｏｌ、４．０ｅｑ）と０．５Ｍピロリン酸ＤＭＦ（３．７ｍＬ、１．８７×１０$^{-3}$ｍｏｌ、５．０ｅｑ）を添加し室温で１時間反応させた。氷浴下で５分間撹拌し、ＴＥＡＢ緩衝液約６ｍＬ加え反応を止め、減圧留去した。少量の蒸留水を入れて溶かし、ジエチルエーテルで２回分液した。水相を減圧留去し、陰イオン交換カラム（ＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ａ－２５）で目的生成物である三リン酸を分取した。さらに、中圧カラム（Ｃ１８）で過剰のピロリン酸を除去し、逆相ＨＰＬＣ（Ｃ１８）により精製、フラクションを減圧留去、凍結乾燥しＬＮＡ－ＡＴＰを得た。収量：６．１６μｍｏｌ。収率：１．６％。ＥＳＩ－ＭＳ（ネガティブイオンモード）ｍ／ｚ、実測値＝５１７．８、計算値（［（Ｍ－Ｈ）$^-$］に対し）＝５１８．０。

[0073] （２－２：ＬＮＡ－ＴＴＰの合成）

[0074] [化3]



精密質量:279.09
分子量:270.24
LNA-T

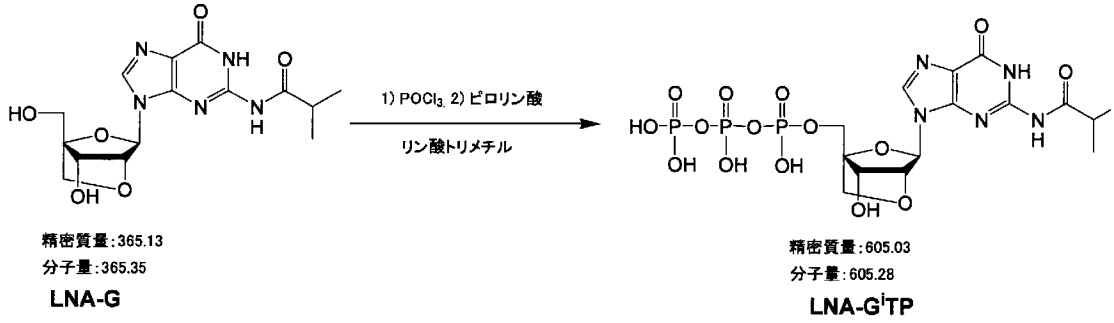
精密質量:509.98
分子量:510.18
LNA-TTP

[0075] ＬＮＡ－Ｔ（１０３ｍｇ、３．８１×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．０ｅｑ）と撹拌子を１００ｍＬナスフラスコに入れ一晩減圧乾燥させ、ｄｒｙ－ＤＭＦ（６ｍＬ）で２回共沸させた。次にｄｒｙ－ＭｅＣＮ（６ｍＬ）で３回共沸させた。一晩減圧乾燥させておいたプロトン・スポンジ（１１９ｍｇ、５．５５×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．４６ｅｑ）を入れた後さらに一晩減圧乾燥させた。アルゴン置換し、デシケーター内のセプタムキャップを付けアルゴン風船を取り付けた。リン酸トリメチル（１．４ｍＬ、１．３９×１０$^{-2}$ｍｏｌ、３６ｅｑ）を加え、完全に溶解させ氷浴中で３０分撹拌させた。ＰＯＣｌ$_3$（６０μＬ、６．４４×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．５ｅｑ）を加え氷浴下で４５分間撹拌した。氷浴下でｄｒｙ－トリブチルアミン（４００μＬ、１．６７×１０$^{-3}$ｍｏｌ、４．０ｅｑ）と０．５Ｍピロリン酸ＤＭＦ（４．０ｍＬ、２．０２×１０$^{-3}$ｍｏｌ、５．０ｅｑ）を添加し室温で１時間反応させた。氷浴下で５分間撹拌し重炭酸トリエチルアンモニウム（ＴＥＡＢ）緩衝液約６ｍＬ加え反応を止め、減圧留去した。少量の蒸留水を入れて溶かし、ジエチルエーテルで２回分液した。水相を減圧留去し、陰イオン交換カラム（ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ａ－２５）で目的生成物である三リン酸を分取した。さらに、中圧カラム（Ｃ１８）で過剰のピロリン酸を除去し、逆相ＨＰＬＣ（Ｃ１８）により精製、フラクションを減圧留去、凍結乾燥しＬＮＡ－ＴＴＰを得た。収量：１１５μｍｏｌ。収率：３０．２%。ＥＳＩ－ＭＳ（ネガテ

ィブイオンモード）ｍ／ｚ、実測値＝５０８．９、計算値（［（Ｍ－Ｈ）$^{-}$］に対し）＝５０９．１８。

[0076] （２－３：ＬＮＡ－Ｇ^{i}ＴＰの合成）

[0077] [化4]

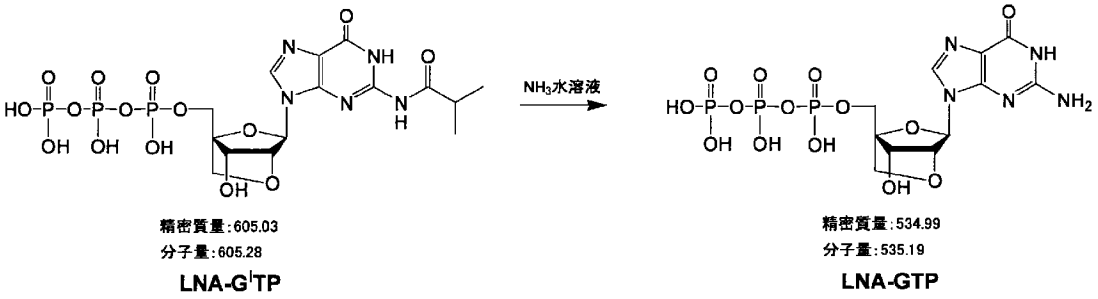


[0078] ＬＮＡ－Ｇ（１０１ｍｇ、２．７６×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．０ｅｑ）と撹拌子を１００ｍＬナスフラスコに入れ一晩減圧乾燥させ、ｄｒｙ－ＤＭＦ（６ｍＬ）で２回共沸させた。次にｄｒｙ－ＭｅＣＮ（６ｍＬ）で３回共沸させた。一晩減圧乾燥させておいたプロトン・スポンジ（１１８ｍｇ、５．５１×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．５ｅｑ）を入れた後さらに一晩減圧乾燥させた。アルゴン置換し、デシケーター内のセプタムキャップを付けアルゴン風船を取り付けた。リン酸トリメチル（１．０ｍＬ、９．９４×１０$^{-3}$ｍｏｌ、３６ｅｑ）を加え、懸濁させ氷浴中で３０分撹拌させた。ＰＯＣｌ$_{3}$（４０μＬ、４．２９×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．５ｅｑ）を加え氷浴下で４５分間撹拌した。氷浴下でｄｒｙ－トリブチルアミン（２６０μＬ、１．０９×１０$^{-3}$ｍｏｌ、４．０ｅｑ）と０．５Ｍピロリン酸ＤＭＦ（２．８ｍＬ、１．４１×１０$^{-3}$ｍｏｌ、５．０ｅｑ）を添加し室温で１時間反応させた。氷浴下で５分間撹拌し、ＴＥＡＢ緩衝液約６ｍＬ加え反応を止め、減圧留去した。少量の蒸留水を入れて溶かし、ジエチルエーテルで２回分液した。水相を減圧留去し、陰イオン交換カラム（ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ａ－２５）で目的生成物である三リン酸を分取した。さらに、中圧カラム（Ｃ１８）で過剰のピロリン酸を除去し、逆相ＨＰＬＣ（Ｃ１８）により精製、フラクションを減圧留去、凍結乾燥しＬＮＡ－Ｇ^{i}ＴＰを得た。収量：３２．３μｍｏｌ。収率：

１１．７％。ＥＳＩ－ＭＳ（ネガティブイオンモード）ｍ／ｚ、実測値＝６０３．８、計算値（［（Ｍ－Ｈ）⁻］に対し）＝６０４．０３。

[0079] （２－４：ＬＮＡ－ＧＴＰの合成）

[0080] [化5]

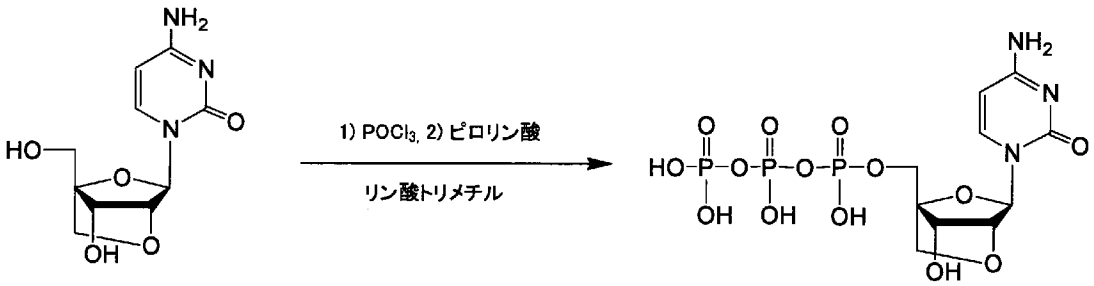


[0081] １００ｍＬのナスフラスコに入ったＬＮＡ－ＧⁱＴＰ（１．８６ｍｇ、２０．０３μｍｏｌ）を水１ｍＬで溶かし２８％濃アンモニア水（７．１ｍＬ）を加え撹拌した。４時間ごとにサンプリングしＨＰＬＣでピークを見た。反応液は濃縮した後、２８％濃アンモニア水（７．１ｍＬ）を加えさらに４時間撹拌した。ＨＰＬＣでＬＮＡ－ＧⁱＴＰのピークが消失するまで、これを繰り返した。４８時間後、反応液を減圧留去し、逆相ＨＰＬＣ（Ｃ１８）により精製、フラクションを減圧留去、凍結乾燥しＬＮＡ－ＧＴＰを得た。収量：１２．７４μｍｏｌ。収率：６３％。ＥＳＩ－ＭＳ（ネガティブイオンモード）ｍ／ｚ、実測値＝５３３．８、計算値（［（Ｍ－Ｈ）⁻］に対し）＝５３３．９９。

[0082] （２－５：ＬＮＡ－ＣＴＰの合成）

[0083]

[化6]



[0084] ＬＮＡ－Ｃ（１０１ｍｇ、３．７２×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．０ｅｑ）と撹拌子を１００ｍＬナスフラスコに入れ一晩減圧乾燥させ、ｄｒｙ－ＤＭＦ（６ｍＬ）で２回共沸させた。次にｄｒｙ－ＭｅＣＮ（６ｍＬ）で３回共沸させた。一晩減圧乾燥させておいたプロトン・スポンジ（１１３ｍｇ、５．２７×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．４６ｅｑ）を入れた後さらに一晩減圧乾燥させた。アルゴン置換し、デシケーター内のセプタムキャップを付けアルゴン置換した。リン酸トリメチル（４．５ｍＬ、４．４７×１０$^{-2}$ｍｏｌ、１２０ｅｑ）を加え、懸濁させ氷浴中で３０分撹拌させた。ＰＯＣｌ$_3$（６０μＬ、６．４４×１０$^{-4}$ｍｏｌ、１．５ｅｑ）を加え氷浴下で４５分間撹拌した。氷浴下でｄｒｙ－トリブチルアミン（４００μＬ、１．６７×１０$^{-3}$ｍｏｌ、４．０ｅｑ）と０．５Ｍピロリン酸ＤＭＦ（３．８ｍＬ、１．９２×１０$^{-3}$ｍｏｌ、５．０ｅｑ）を添加し室温で１時間反応させた。氷浴下で５分間撹拌し、ＴＥＡＢ緩衝液約６ｍＬ加え反応を止め、減圧留去した。少量の蒸留水を入れて溶かし、ジエチルエーテルで２回分液した。水相を減圧留去し、陰イオン交換カラム（ＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ａ－２５）で目的生成物である三リン酸を分取した。さらに、中圧カラム（Ｃ１８）で過剰のピロリン酸を除去し、逆相ＨＰＬＣ（Ｃ１８）により精製、フラクションを減圧留去、凍結乾燥しＬＮＡ－ＣＴＰを得た。収量：１８．２８μｍｏｌ。収率：４．８９％。ＥＳＩ－ＭＳ（ネガティブイオンモード）ｍ／ｚ、実測値＝４９

３．９、計算値（［（Ｍ－Ｈ）$^{-}$］に対し）＝４９３．９８。

[0085] （参考例：ＫＯＤポリメラーゼ変異体のＬＮＡ鎖伸長活性の試験法）

ＫＯＤポリメラーゼ変異体について活性の検討に用いた手法を参考例１～３に示す。本実施例では、特に言及しない限り、下記参考例１～３の手法を用いた。

[0086] （参考例１：変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ））

泳動緩衝液：１×ＴＢＥ緩衝液、変性ポリアクリルアミドゲル：１×ＴＢＥ緩衝液、７Ｍ尿素、２０％ポリアクリルアミド。反応液１０μＬあたり、４０ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ブロモフェノールブルー：２μＬ、１０Ｍ尿素１２μＬを添加して泳動サンプルとした。５５℃、２００Ｖ定電圧で３０分予備泳動を行った後、サンプルをゲルにアプライして同条件で泳動した。

[0087] （参考例２：アルカリアガロースゲル電気泳動）

ＤＮＡ・ＲＮＡの一本鎖の解析には、二重鎖を解離させるために変性ＰＡＧＥが通常用いられる。しかしＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖のＴｍ値は非常に高くなっているため、変性ＰＡＧＥの条件では解離させることができず、ＬＮＡ一本鎖の解析には適さない。そこで、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖を完全に解離させて解析するためにアルカリアガロースゲル電気泳動法を用いた。ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖であっても水酸化ナトリウム溶液中では解離するため、ＬＮＡを一本鎖の状態で解析することが可能である。

[0088] アガロースは低分子量核酸分離用のもの（Agarose 21(株式会社ニッポン・ジーン)）を用いた。ゲルと泳動緩衝液、ローディングダイの組成は以下の通りである。ゲル：５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、５％アガロース、泳動緩衝液：５ｍＭ　ＮａＯＨ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、６×ローディングダイ：３００ｍＭ　ＮａＯＨ、１２ｍＭ　ＥＤＴＡ、３０％グリセロール、０．１％ブロモフェノールブルー。泳動前にゲルを泳動緩衝液に１時間浸して平衡化した。泳動は室温、３Ｖ／ｃｍ定電圧の条件で行った。一本鎖ＬＮＡの検出にはプライマーに標識した蛍光色素を用いて、PharosFX（Bio-Rad社製）によって解析を行った。

[0089] （参考例３：ＫＯＤポリメラーゼ変異体のＬＮＡ鎖伸長活性反応）

ＫＯＤポリメラーゼ変異体のＬＮＡ鎖伸長活性比較に用いた反応液の組成を、以下の表２に示す。ＫＯＤポリメラーゼ変異体を未添加の反応液を９５℃で１分加熱後、１時間かけて室温まで下げることでアニーリングを行った後、ＫＯＤポリメラーゼ変異体を添加して７４℃でＬＮＡ鎖伸長反応を進行させた。ＬＮＡ鎖伸長反応に用いたテンプレートとプライマーの配列を表３に示す。

[0090] [表2]

LNA 鎖伸長活性比較に用いた反応液の組成

成分	容量	終濃度
10× KOD-Plus-Ver.2 用緩衝液（東洋紡製）	1 µl	1 x
25 mM $MgSO_4$	0.6 µl	1.5 mM
10 µM テンプレート	0.6 µl	0.6 µM
10 µM プライマー	0.5 µl	0.5 µM
2 mM LNA-ATP	1 µl	0.2 mM
2 mM LNA-CTP	1 µl	0.2 mM
2 mM LNA-GTP	1 µl	0.2 mM
2 mM LNA-TTP	1 µl	0.2 mM
滅菌蒸留水	1.3 µl	
KOD ポリメラーゼ変異体(100 ng/µL)	2 µl	20 ng/µL
合計	10 µl	

[0091]

[表3]

LNA 鎖伸長反応に用いた配列（斜字: LNA）

名称	修飾	配列(5'→3')
5'_6-FAM_labeled primer P2	5' : 6-FAM	GGATTAGCGAACAGGCCATACCTTT（配列番号3）
5'_6-FAM_labeled primer LP2	5' : 6-FAM	*GGATTAGCGAACAGGCCATACCTTT*（配列番号3）
Template DNA N10		NNNNNNNNNNAAAGGTATGGCCTGTTCGCTAATCC（配列番号4）
Template DNA N30		NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAAAGGTATGGCCTGTTCGCTAATCC（配列番号5）
Template DNA N50		NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAAAGGTATGGCCTGTTCGCTAATCC（配列番号6）
Template DNA L3-1		GCATCCAGTATCGAATACCGACACCGCTCTCTGTTCTACAAAGGTATGGCCTGTTCGCTAATCC（配列番号7）

[0092] （実施例３：ＫＯＤポリメラーゼ変異体のＬＮＡ鎖伸長活性の検討）

実施例１で作出したＫＯＤポリメラーゼ変異体について、プライマー鎖：5'_6-FAM_labeled primer P2、テンプレート鎖：Template DNA N10を用いて、ＬＮＡ鎖伸長活性を比較した。ＬＮＡ鎖伸長は７４℃で３０分の条件で反応を進行させた。得られた反応液に４０ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ブロモフェノールブルー：２μＬ、１０Ｍ尿素１２μＬを添加し、泳動サンプルとした。プライマー鎖０．６２５ｐｍｏｌを用いて、変性ＰＡＧＥによって解析を行った。ＬＮＡ鎖が短鎖であれば、変性ＰＡＧＥの条件でＤＮＡ／ＬＮＡ鎖を解離させることができるため、アルカリアガロースゲル電気泳動法を用いなかった。

[0093] 図１（図１－１，２，３，４）に解析結果を示す。図１の中から代表例を選んで変性ＰＡＧＥによって解析した結果を図２に示す。これらの図中、コントロールとして未改変の野生型（「ＷＴ」）の結果を示す。さらに、伸長の程度を明確化するためにプライマーのみ（「Ｐｒｉｍｅｒ」）およびテンプレートの伸長対応分（すなわち１０塩基分）伸長した場合（「Ｐｒｉｍｅｒ＋１０ｍｅｒ」）を併せて示す（以降の図においても同様である）。

[0094] 全ての変異体がエキソヌクレアーゼ活性を減弱させた変異Ｎ２１０Ｄを有

している。変異体Ａ２、Ａ３４、Ａ１３、Ａ２６、Ａ４８、およびＡ５３に共通する変異Ａ４８５Ｌは、Fingers領域に位置しており、三リン酸体の結合に寄与していると考えられる。またＡ３４およびＡ５３に共通する変異Ｙ４０９Ｖは、三リン酸体の糖構造の認識を緩和していると考えられる。元来、野生型のポリメラーゼにおいてはＤＮＡ鎖中にＲＮＡが含まれることは生存において不都合であるため、ＮＴＰの取り込みが起こらないようにヌクレオチドの糖部認識によって制限されている。しかし、この制限は糖部に修飾を加えたＬＮＡ－ＮＴＰの取り込み活性を低下させる要因になる。変異Ｙ４０９Ｖは糖部認識を緩和することによってＬＮＡ－ＮＴＰの取り込み速度を向上させている。

[0095] これらの三リン酸体に寄与する変異Ａ４８５Ｌ，Ｙ４０９ＶのみではＬＮＡ鎖の安定的な伸長には不十分である。ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖の構造（Ａ型らせん）はＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の構造（Ｂ型らせん）と異なるため、通常のポリメラーゼはＤＮＡ／ＬＮＡ鎖と安定して結合することができないと考えられるためである。実際に、Ａ２、Ａ３４では、ＬＮＡ鎖の伸長が早い段階で停止している。そこで、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強めるために、Ｄ６１４Ｎ（Ａ２６、Ａ５３）とＥ６６４Ｋ（Ａ４、Ａ１３、Ａ２６、Ａ４８、Ａ５３）を導入している。二重鎖と結合するThumb領域中には負電荷をもつアミノ酸（Ｄ６１４、Ｅ６６４）が存在するが、このアミノ酸を電荷なし（Ｄ６１４Ｎ）、あるいは正電荷（Ｅ６６４Ｋ）に変更することによって、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強め、プライマー鎖の３’末端を反応部位に正しく位置させることができていると考えられる。変異体Ａ４のようにＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強めただけではＬＮＡ伸長活性はそれほど高くないが、Ａ１３、Ａ２６、Ａ４８、Ａ５３のようにヌクレオチドモノマーとヌクレオチドポリマーそれぞれに寄与する変異を同時に導入することによって、ＬＮＡ鎖の安定的な伸長が可能になっている。これらの変異を包括的に有している変異体Ａ４８およびＡ５３が、特に高いＬＮＡ鎖伸長活性を示している。以下、Ａ４８を変異体１、Ａ５３を変異体２とも呼称する。

[0096] （実施例４：ＫＯＤポリメラーゼ変異体を用いたＬＮＡライブラリの作成）

ＬＮＡライブラリの作成に用いた反応液の組成を以下の表４に示す。ＫＯＤポリメラーゼ変異体を未添加の反応液を９５℃で１分加熱後、１時間かけて室温まで下げることでアニーリングを行った後、ＫＯＤポリメラーゼ変異体１または２を添加してＬＮＡ鎖伸長反応を進行させた。なお、コントロールとして、表４中のＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰの代わりに同量のｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＴＴＰを用いて、ＤＮＡライブラリを作成した。

[0097] [表4]

LNA 鎖ライブラリ作成に用いた反応液の組成

成分	容量	終濃度
10× KOD-Plus-Ver.2 用緩衝液（東洋紡製）	2 µl	1 x
25 mM $MgSO_4$	1.2 µl	1.5 mM
10 µM テンプレート	1.2 µl	0.6 µM
10 µM プライマー	1 µl	0.5 µM
2 mM LNA-ATP	2 µl	0.2 mM
2 mM LNA-CTP	2 µl	0.2 mM
2 mM LNA-GTP	2 µl	0.2 mM
2 mM LNA-TTP	2 µl	0.2 mM
滅菌蒸留水	2.6 µl	
KOD ポリメラーゼ変異体（1500 ng/µL）	4 µl	300 ng/µL
合計	20 µl	

[0098] プライマー鎖：5'_6-FAM_labeled primer P2、テンプレート鎖：Template DNA N30、Template DNA N50を用いて３０ｍｅｒおよび５０ｍｅｒのＬＮＡライブラリを作成した。ＬＮＡ鎖伸長は７４℃で９時間の条件で反応を進行させた。得られた反応液に６×ローディングダイを１／６容量添加し、プライマー鎖１ｐｍｏｌをアルカリアガロースゲルにアプライして電気泳動を行った。その結果、ｄＮＴＰを用いて作成したＤＮＡライブラリに匹敵するＬＮＡライブラリを作成することに成功した（図３）。

[0099] （実施例５：ＫＯＤポリメラーゼ変異体を用いたＬＮＡ鎖伸長反応時間の検討）

ＬＮＡ鎖伸長反応時間について検討を行った。

[0100] プライマー鎖：5'_6-FAM_labeled primer P2, テンプレート鎖：Template DNA N30を用いて３０ｍｅｒのＬＮＡライブラリを作成した。反応液の組成は表４に示すとおりであり、コントロールとして、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰの代わりにｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＴＴＰを用いて、ＤＮＡライブラリを作成した。ＫＯＤポリメラーゼ変異体２を用いて、反応時間：１．５時間、３時間、６時間、９時間の条件で比較した。伸長時間１．５時間で３０ｍｅｒのＬＮＡ伸長反応産物ができ始め、ＬＮＡライブラリを作成するための反応時間は９時間から短縮することが可能であることが示された（図４）。

[0101] （実施例６：ＫＯＤポリメラーゼ変異体を用いたＬＮＡ鎖合成の正確性）

ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰのうちの一つを除いた反応条件において、単一配列のテンプレートを用いてＬＮＡ鎖伸長反応を行った場合、伸長反応が停止するか調べた。誤った塩基の取り込みが許容される場合、途中で伸長反応が停止することなく最後まで反応が進行してしまうことがわかった。

[0102] プライマー鎖：5'_6-FAM_labeled primer P2、テンプレート鎖：Template DNA L3-1（表３）、ポリメラーゼ：変異体２を用いて、反応時間１３．５時間で反応を大過剰に進行させた。それぞれの反応液は、以下の表５の条件に従うこと以外は、表４に示すとおりとした。この結果を図５に示す。図５に対応して、反応条件を以下の表５に示す。

[0103]

[表5]

条件	
1	LNA-NTP なし
2	LNA-ATP なし
3	LNA-CTP なし
4	LNA-GTP なし
5	LNA-TTP なし
6	LNA-NTP あり

[0104] ＬＮＡ－ＮＴＰを含まない条件では、ＫＯＤポリメラーゼ変異体の微弱なエキソヌクレアーゼ活性によってプライマーが分解された（図５、条件１）。ＬＮＡ－ＮＴＰを欠いていない条件（条件６）と比べて、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰをそれぞれ欠いた条件（条件２～５）では、伸長反応が途中で停止することが示された。これによって、誤った塩基の取り込みがある程度制限されており、一定の正確性を有することが示された。

[0105] （実施例７：ＫＯＤポリメラーゼ変異体によるＬＮＡプライマーを用いたＬＮＡ鎖伸長反応）

ＤＮＡプライマーを用いてＬＮＡ鎖ライブラリを作成した場合、途中で伸長反応の進行が遅くなる律速段階のＬＮＡ鎖長が存在する。これは、プライマー鎖のＤＮＡ－ＬＮＡジャンクション領域を含む二重鎖の構造が不規則になっており、ポリメラーゼの結合が難しくなっているためだと考えられる。そこでＬＮＡプライマーを用いることによって、プライマー鎖のＤＮＡ－ＬＮＡジャンクション領域を削除した条件の反応を検討した。

[0106] プライマー鎖：5’_6-FAM_labeled primer P2（ＤＮＡプライマー）、5’_6-FAM_labeled primer LP2（ＬＮＡプライマー）、テンプレート鎖：Template DNA N30、ポリメラーゼ：変異体２を用いて、反応時間１．５時間、３時間、４．５時間および６時間で反応を進めた。コントロールとして、ＤＮＡプライマーについて、ｄＮＴＰを用いたＤＮＡライブラリを作成した。それぞれの反応液は、以下の表６の条件に従うこと以外は、表４に示すとおりとし、

ＤＮＡライブラリ作成の場合は、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰの代わりにｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＴＴＰを用いた。この結果を図６に示す。図６に対応して、反応条件を以下の表６に示す。

[0107] [表6]

レーン	プライマー	反応時間
1	DNA	1.5 時間
2	LNA	1.5 時間
3	DNA	3 時間
4	LNA	3 時間
5	DNA	4.5 時間
6	LNA	4.5 時間
7	DNA	6 時間
8	LNA	6 時間

[0108] その結果、ＬＮＡプライマーを用いた条件では、ＤＮＡプライマーを用いた条件のような伸長反応の途中段階での律速が生じなかった（図６）。伸長反応が全く進行していないプライマー鎖も存在するが、経時変化が観察されないため、ＬＮＡプライマーの合成の問題であると考えられる。

[0109] （実施例８：各種ＫＯＤポリメラーゼ変異体によるＬＮＡオリゴヌクレオチドからの逆転写によるＤＮＡ鎖の合成）

作製したＫＯＤポリメラーゼ変異体を用いて、ＬＮＡ鎖→ＤＮＡ鎖の逆転写活性を比較した。逆転写反応に用いたテンプレートとプライマーの配列を表７に示す。ＫＯＤポリメラーゼ変異体を未添加の反応液を９５℃で１分加熱後、１時間かけて室温まで下げることでアニーリングを行った後、ＫＯＤポリメラーゼ変異体を添加して７４℃で逆転写反応を進行させた。逆転写反応においては、反応液組成は、ＬＮＡ－ＡＴＰ、ＬＮＡ－ＣＴＰ、ＬＮＡ－ＧＴＰおよびＬＮＡ－ＴＴＰの代わりにｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＴＴＰを用いたこと以外は、表２の組成と同様のものを用いた。逆転写反応は３０分間行った。得られた反応液に６×ローディングダイを１／６ｖｏｌ添加し、プライマー鎖１ｐｍｏｌをアルカリアガロースゲルにアプライ

して電気泳動を行った。

[0110] [表7]

LNA 鎖→DNA 鎖 逆転写反応に用いた配列（下線:LNA）

名称	修飾	配列(5'→3')
5'_6-FAM_labeled Template LP2	5'：6-FAM	GGATTAGCGAACAGGCCATACCTTT（配列番号3）
5'-TAMRA-Primer_RT1	5'：TAMRA	AAAGGTATGGCC（配列番号8）

[0111] 逆転写活性の比較を図７に示す。図７（Ａ）および（Ｂ）は、調べたＫＯＤポリメラーゼ変異体の結果を示し、図７（ｃ）は、その中から特徴的な活性を呈するものを示す。

[0112] 全ての変異体において、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異Ｎ２１０Ｄを導入している。逆転写の際にはポリメラーゼがＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖と結合し、プライマー鎖の３’末端を反応部位に正しく位置させることが必要である。Thumb領域の負電荷アミノ酸を正電荷に変更した変異体Ａ４（Ｅ６６４Ｋ）およびＡ４３（Ｅ６６４Ｒ）において、逆転写活性が見られるのはＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖結合能を向上させた結果であると考えられる。一方で、三リン酸体との結合に関与するＡ４８５Ｌのみでは、逆転写活性を示さない（変異体Ａ２）。しかし、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖結合能を微増させた変異（Ｅ６６４Ｑ：負電荷→中性）と共にＡ４８５Ｌを導入（変異体Ａ５１）すると、逆転写活性が観察される。これは、リン酸ジエステル結合形成反応の進行が早く進むならば、要求されるＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖結合能は低くて済むことを示していると考えられる。また、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖結合能を向上させたＥ６６４Ｋを有する変異体でも、Ａ４８５Ｌによって逆転写活性を向上し（変異体Ａ１３）、これらの変異に加えてＤ６１４Ｎをさらに有する変異体でも、逆転写活性がみられた（変異体Ａ２６）。

[0113] （実施例９：転写（ＤＮＡ→ＬＮＡ）および逆転写（ＬＮＡ→ＤＮＡ）反応についてＫＯＤポリメラーゼ変異体を用いた正確性の検討）

ＤＮＡテンプレートをもとに、転写（ＤＮＡ→ＬＮＡ）にＡ４８（変異体１）およびＡ５３（変異体２）を用い、そして逆転写（ＬＮＡ→ＤＮＡ）に

Ａ５１を用いて反応を行い、得られたＤＮＡ鎖をＴＡクローニングによってpT7Blue T-Vector（タカラバイオ株式会社製）に挿入し、塩基配列を解析し、ポリメラーゼの正確性を評価した。転写・逆転写以外のステップにおいてもエラーが生じ得るので、全てのステップの反応をＤＮＡで進めるコントロール実験を行い、転写および逆転写のエラー率に補正をかけた。以下に手順を記す。

[0114] ＜転写（ＤＮＡ→ＬＮＡ）＞

反応液組成（反応液合計５０μＬ）：

１×

KOD-Plus-Ver.2用緩衝液

１．５ｍＭ　$MgSO_4$

０．２ｍＭ　ＬＮＡ－ＮＴＰ（コントロール：ｄＮＴＰ）

０．５μＭ　プライマー（Primer hmP3）

０．６μＭ　テンプレート（3'-B-Template_FA2-1A）

３００ｎｇ／μＬ　ＫＯＤ－Ａ４８またはＡ５３（コントロール：０．０２Ｕ／μＬ　ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（東洋紡株式会社製））。

[0115] ポリメラーゼ添加前の反応液（液量：４０μＬ）をアニーリング（９４℃にて３０秒、１時間かけて２５℃に徐冷）した後、１５００ｎｇ／μＬ　ポリメラーゼ変異体Ａ４８またはＡ５３を１０μＬ添加し、反応を進行させた（コントロール：反応液をそのままＰＣＲに用いた）。

[0116] 反応条件：

７４℃にて９時間

（コントロール：ステップ１：９５℃にて２分（×１）、ステップ２：９５℃にて３０秒、５５℃にて３０秒、６８℃にて１分（×３））。

[0117] ＬＮＡ伸長サンプルに１００ｍＭ　ＮａＯＨを５０μＬ添加し、ポリメラーゼを変性させた。５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）を２５０μＬ添加して中和した後、エタノール沈殿によって精製し、１×B/W Buffer（結合および洗浄緩衝液：５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、０．５

ｍＭ　ＥＤＴＡ、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％　ｖ／ｖ　Ｔｗｅｅｎ２０）：１ｍＬに溶解させた（コントロール：反応後のサンプルに２×B/W Bufferを５０μＬ、１×B/W Bufferを９００μＬ添加した）。

[0118] Dynabeads（登録商標）M-280 Streptavidin（Thermo Fisher Scientific, Inc.）５０μＬを１ｍＬの１×B/W Bufferによって３回洗浄した後、前述の反応後のサンプル１ｍＬを加え、６０分混和した。１ｍＬの１×B/W Bufferによって３回洗浄した後、１ｍＬの滅菌水で２回洗浄した。さらに１００ｍＭ　ＮａＯＨを５０μＬ加え、５分混和した後、上清を回収した。１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）を１ｍＬ添加して中和した後、新しいDynabeads（登録商標）M-280 Streptavidin（洗浄済み）を５０μＬ添加して３０分混和することで、微量に含まれる可能性のあるテンプレート鎖をビーズ上にトラップして除去した。上清は回収して、Vivaspin 500（５，０００ＭＷＣＯ）（Sartorius AG）を用いて、滅菌水に置換・濃縮した。

[0119] ＜逆転写（ＬＮＡ→ＤＮＡ）＞

反応液組成（反応液合計５０μＬ）：

１× KOD-Plus-Ver.2用緩衝液

１．５ｍＭ　$MgSO_4$

０．２ｍＭ　ｄＮＴＰ

０．５μＭ　プライマー（5'-Primer hP5）

ＬＮＡテンプレート溶液２．５μＬ

２ｎｇ／μＬ　ＫＯＤ＿Ａ５１（コントロール：０．０２Ｕ／μＬ　ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－）。

[0120] 反応条件：

ステップ１：９５℃にて２分（×１）、ステップ２：９５℃にて３０秒、５５℃にて３０秒、７４℃（コントロール：６８℃）にて１分（×２０）。

[0121] 反応後のサンプルに２×B/W Bufferを５０μＬ、１×B/W Bufferを９００μＬ添加した。

[0122] Dynabeads（登録商標）M-280 Streptavidin ５０μＬを１ｍＬの１×B/W B

ufferによって３回洗浄した後、前述の逆転写反応後のサンプル１ｍＬを加え、６０分混和した。１ｍＬの１×B/W Bufferによって３回、１ｍＬの１００ｍＭ　ＮａＯＨで４回、１ｍＬの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で１回、１ｍＬの滅菌水で２回洗浄した。洗浄操作によって、ＬＮＡ伸長鎖を可能な限り除去し、逆転写鎖をビーズにトラップした。ビーズを滅菌水５０μＬに懸濁させた。

[0123] ＰＣＲ（ＴＡクローニング用）：反応液２５μＬ。１×Ｔａｑ反応緩衝液、１．５ｍＭ　$MgSO_4$、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰ、０．３μＭプライマー（Primer hP1, Primer hP5）、逆転写鎖をトラップしたビーズ懸濁液２．５μＬ、０．１Ｕ／μＬ　ｒＴａｑポリメラーゼ（東洋紡株式会社製）。反応条件：ステップ１：９４℃にて２分（×１）、ステップ２：９４℃にて３０秒、５０℃にて３０秒、７２℃にて１分（×２０）。QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc.) を用いて精製し、ＴＡクローニングに用いた。

[0124] ＴＡクローニング：ＰＣＲ産物１．５μＬ、２．５ｎｇ／μＬ　pT7Blue T-Vector　０．５μＬ、Ligation High Ver.2（東洋紡株式会社製）２μＬを混合し、１６℃にて６０分反応させた後、大腸菌ＤＨ５αに導入した。得られたシングルコロニーから各々のプラスミドを抽出し、塩基配列解析を行った。

[0125] 表８は、ＬＮＡ転写・逆転写の正確性評価に用いたプライマーおよびテンプレートの配列を示す。

[0126]

[表8]

LNA 転写・逆転写の正確性評価に用いたプライマーおよびテンプレート

名称	配列（5'→3'）
Primer hmP3	CAATAGCGAGCAGAGCATACTTTCAGATAGCAACGCATAGG（配列番号9）
3'-B-Template_FA2-1A	TAATCTCACTACGACTCGACACAACTGGATAGTTCAAGCTTGCCCGATACGG TCCCTATGCGTTGTTATCTGAAAGAAAAAAAAA-Biotin（配列番号10）
5'-B-Primer hP5	Biotin-TAATCTCACTACGACTCGACA（配列番号11）
Primer hP1	CAATAGCGAGCAGAGCATAC（配列番号12）
Primer hP5	TAATCTCACTACGACTCGACA（配列番号13）

[0127] 実験系の都合上、転写・逆転写以外に、クローニングの際にエラーが生じ得る。従って、バックグラウンドのエラー率を求めるためのコントロール実験として、全てのステップをＤＮＡで反応を進めてエラー率を調べた。表９は、ＬＮＡ転写・逆転写の正確性評価のための塩基配列解析結果を示す。

[0128]

[表9]

(A)コントロールエラー

置換(↓)／期待(→)	A	C	G	T	ー(挿入)	合計
A	ー	0	0	0	0	0
C	0	ー	0	0	0	0
G	0	0	ー	2	0	2
T	0	2	1	ー	0	3
ー(欠失)	0	1	0	0	ー	1
合計	0	3	1	2	0	6

(B)A48／A51エラー

置換(↓)／期待(→)	A	C	G	T	ー(挿入)	合計
A	ー	0	2	0	0	2
C	0	ー	0	0	5	5
G	1	1	ー	0	0	2
T	0	3	1	ー	1	5
ー(欠失)	0	1	1	1	ー	3
合計	1	5	4	1	6	17

(C)A53／A51エラー

置換(↓)／期待(→)	A	C	G	T	ー(挿入)	合計
A	ー	0	1	0	0	1
C	0	ー	0	0	2	2
G	0	1	ー	1	3	5
T	0	1	0	ー	0	1
ー(欠失)	0	0	0	0	ー	0
合計	0	2	1	1	5	9

[0129] 結果として、コントロール実験では、解析した１０２４塩基中に６個のエラーが含まれていた。よって実験系のエラー率は、エラー率＝６エラー／（３２サンプル×３２塩基）＝５．８×１０$^{-3}$（１塩基あたり０．５８％のエラー）と求められた。対して、Ａ４８（転写）とＡ５１（逆転写）を用いた条件では、補正なしで生エラー率＝１７エラー／（３１サンプル×３２塩基）＝１７．１×１０$^{-3}$、コントロールのエラー率を引いて補正すると、補正エラー率＝１７．１×１０$^{-3}$－５．８×１０$^{-3}$＝１１．３×１０$^{-3}$（１塩基あたり１．１％のエラー）と求められた。また、Ａ５３（転写）とＡ５１（

逆転写）を用いた条件では、補正なしで生エラー率＝９エラー／（２６サンプル×３２塩基）＝１０．８×１０$^{-3}$、コントロールのエラー率を引いて補正すると補正エラー率＝１０．８×１０$^{-3}$－５．８×１０$^{-3}$＝５．０×１０$^{-3}$（１塩基あたり０．５％のエラー）と求められた。よって、Ａ５３のＬＮＡ転写は、その後の逆転写反応で得られるＤＮＡ鎖の塩基配列解析からも正確性を維持したことが示された。また、ＳＥＬＥＸにおいては、Ａ５３（転写）とＡ５１（逆転写）とがより好適に用いられ得る。

[0130] （実施例１０：改変型ポリメラーゼ（ＫＯＤポリメラーゼ変異体）の作出およびＬＮＡ鎖伸長活性の検討）

表１０に示す改変型ポリメラーゼ（ＫＯＤポリメラーゼ変異体）を作製し、ＤＮＡ鎖を鋳型としたＬＮＡ鎖伸長活性を評価した。これらのＫＯＤポリメラーゼ変異体は、Ｙ４０９を下記のアミノ酸にそれぞれ置換したものである。

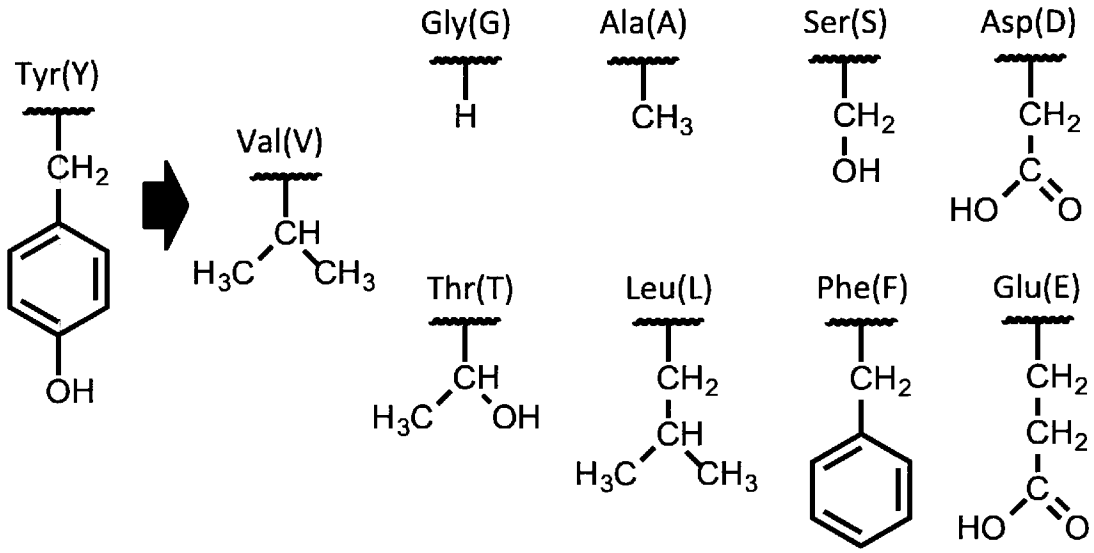
[0131] [表10]

作製した改変型ポリメラーゼ(KOD ポリメラーゼ変異体)の変異箇所

略称	変異箇所
A62	N210D/Y409G/A485L/D614N/E664K
A63	N210D/Y409A/A485L/D614N/E664K
A64	N210D/Y409S/A485L/D614N/E664K
A65	N210D/Y409T/A485L/D614N/E664K
A66	N210D/Y409L/A485L/D614N/E664K
A67	N210D/Y409F/A485L/D614N/E664K
A68	N210D/Y409D/A485L/D614N/E664K
A69	N210D/Y409E/A485L/D614N/E664K

[0132]

[化7]



[0133] ＫＯＤポリメラーゼ変異体を未添加の反応液を９５℃にて１分加熱後、６０分かけて２５℃まで下げることでアニーリングを行い、次いでＫＯＤポリメラーゼ変異体を添加して７４℃でＬＮＡ鎖の伸長反応を進行させた。得られた反応液に６×ローディングダイを１／６容量添加し、アルカリアガロースゲルにて電気泳動を行った。

[0134] 各種ＫＯＤポリメラーゼ変異体について、以下の３通りの反応液組成にてＬＮＡ鎖の伸長反応を行った。

[0135] ＜評価１＞

反応液組成：１×KOD-Plus-Ver.2用緩衝液、ＫＯＤポリメラーゼ変異体：３００ｎｇ／μＬ、０．２ｍＭ　ＬＮＡ－ＮＴＰ、１．５ｍＭ　$MgSO_4$、プライマー：０．５μＭ　5'_6-FAM_labeled primer LP2、テンプレート：０．６μＭ　Template DNA N50

反応温度：７４℃、反応時間：６０分

泳動条件：２５℃、３５Ｖ、２時間

ゲル：５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、５％寒天

泳動緩衝液：５０ｍＭ　ＮａＯＨ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ

サンプル：１．２μＬ（０．５ｐｍｏｌ　プライマー）。

[0136] ＜評価２＞

反応液組成：１×ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液１（１２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）（２５℃）、１０ｍＭ　ＫＣｌ、６ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００、１０μｇ／ｍＬ　ＢＳＡ）、ＫＯＤポリメラーゼ変異体：３００ｎｇ／μＬ、０．２ｍＭ　ＬＮＡ－ＮＴＰ、１．５ｍＭ　$MgSO_4$、プライマー：０．５μＭ　5’_6-FAM_labeled primer LP2、テンプレート：０．６μＭ　Template DNA N50

反応温度：７４℃、反応時間：６０分

泳動条件：２５℃、３５Ｖ、２時間

ゲル：５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、５％寒天

泳動緩衝液：５０ｍＭ　ＮａＯＨ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ

サンプル：１．２μＬ（０．５ｐｍｏｌ　プライマー）。

[0137] ＜評価３＞

反応液組成：１×ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２（１２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．８）（２５℃）、１０ｍＭ　ＫＣｌ、６ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００、１０μｇ／ｍＬ　ＢＳＡ）、ＫＯＤポリメラーゼ変異体：３００ｎｇ／μＬ、０．２ｍＭ　ＬＮＡ－ＮＴＰ、１．５ｍＭ　$MgSO_4$、プライマー：０．５μＭ　5’_6-FAM_labeled primer LP2、テンプレート：０．６μＭ　Template DNA N50

反応温度：７４℃、反応時間：６０分

泳動条件：２５℃、３５Ｖ、２時間

ゲル：５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、５％寒天

泳動緩衝液：５０ｍＭ　ＮａＯＨ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ

サンプル：１．２μＬ（０．５ｐｍｏｌ　プライマー）。

[0138] 評価１、２および３の結果をそれぞれ図８、９および１０に示す。図８に示す通り、ＫＯＤポリメラーゼ変異体Ａ６２、Ａ６３およびＡ６４が特に高

いＬＮＡ鎖伸長活性を示した。これらは、Ｙ４０９を、嵩の低いアミノ酸（それぞれ、グリシン、アラニンおよびセリン）に置換された変異体である。図８においては、次いでＡ６５（トレオニン）、Ａ５３（バリン）およびＡ６８（アスパラギン酸）、さらにＡ６６（ロイシン）およびＡ６７（フェニルアラニン）についてもＬＮＡ鎖伸長活性が観察された。反応液の緩衝液の組成を変更することにより、効率的なＬＮＡ鎖伸長が可能になることが見出された（図８～１０）。１×KOD-Plus-Ver.2用緩衝液を用いた条件（評価１）よりも、図９の１×ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液１を用いた条件（評価２）でＬＮＡ鎖伸長効率が高くなり、さらに図１０の１×ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２を用いた条件（評価３）において、ＬＮＡ鎖伸長効率が特に高かった。図８～１０によれば、Ａ６９（グルタミン酸）についてもゲルのバンドの移動がみられており、ＬＮＡ鎖伸長活性があると評価された。Ａ５３とＡ６２～Ａ６９とのＬＮＡ鎖伸長活性を比較すると、Ｙ４０９についての置換後のアミノ酸の基のサイズ（嵩高さ）が小さい方が、より高いＬＮＡ鎖伸長活性が観察された。

[0139] （実施例１１：ＫＯＤポリメラーゼ変異体を用いたＬＮＡ鎖合成の正確性の検討）

作製した改変ポリメラーゼについて、ＬＮＡ取り込みの正確性について評価した。改変ポリメラーゼの種類はＡ５３を用いて、二通りの緩衝液の場合について評価した。正確性評価の手法として、４種類の塩基のうち１種類欠いた条件（下記条件２～５：塩基なしの場合を条件１、４種類の塩基が揃った場合を条件６とする）で伸長反応をおこなった。

[0140] 下記の反応液組成および条件でＬＮＡ鎖伸長反応を行い、ＬＮＡ鎖伸長活性を評価した。

[0141] 反応液組成：１×ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２（１２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．８）（２５℃）、１０ｍＭ　ＫＣｌ、６ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００、１０μｇ／ｍＬ　ＢＳＡ）、ＫＯＤポリメラーゼ変異体Ａ５３：３００ｎｇ／μ

Ｌ、１．５ｍＭ　$MgSO_4$、

条件１：ＬＮＡ－ＮＴＰなし，

条件２：０．２ｍＭ　ＬＮＡ－（Ｃ，Ｇ，Ｔ）ＴＰ（すなわちＬＮＡ－ＡＴＰを欠く），

条件３：０．２ｍＭ　ＬＮＡ－（Ａ，Ｇ，Ｔ）ＴＰ（すなわちＬＮＡ－ＣＴＰを欠く），

条件４：０．２ｍＭ　ＬＮＡ－（Ａ，Ｃ，Ｔ）ＴＰ（すなわちＬＮＡ－ＧＴＰを欠く），

条件５：０．２ｍＭ　ＬＮＡ－（Ａ，Ｃ，Ｇ）ＴＰ（すなわちＬＮＡ－ＴＴＰを欠く），

条件６：０．２ｍＭ　ＬＮＡ－ＮＴＰ，

プライマー：０．５μＭ　5’_6-FAM_labeled primer P2、

テンプレート：０．６μＭ　Template DNA L3-2（配列番号１４）

反応温度：７４℃、反応時間：１２０分

泳動条件：２５℃、３５Ｖ、２時間

ゲル：５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、５％寒天

泳動緩衝液：５０ｍＭ　ＮａＯＨ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ

サンプル：１．２μＬ（０．５ｐｍｏｌ　プライマー）。

[0142] さらに、上記反応液組成の１×ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２を１×KOD-Plus-Ver.2用緩衝液に代え、反応時間を１５時間とし、そしてサンプル量を１．５μＬ（０．６２５ｐｍｏｌ　プライマー）としてＬＮＡ鎖伸長反応を行い、ＬＮＡ鎖伸長活性を評価した。

[0143] これらの結果を図１１および１２に示す。ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２を用いた場合（図１１）も、KOD-Plus-Ver.2用緩衝液を用いた場合（図１２）とは伸長が同程度だった。反応緩衝液によって、伸長効率は大幅に向上するが、正確性については大きく変わらないことが示された。

[0144] （実施例１２：ＫＯＤポリメラーゼ変異体を用いたＬＮＡ鎖合成の正確性の検討）

実施例１１の改変ポリメラーゼＡ５３をＡ６５に代えたこと以外は、１×ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ用緩衝液２を用いた場合と同様にして、ＬＮＡ取り込みの正確性について評価した。この結果を図１３に示す。

[0145] Ａ６５においても、Ａ５３と同様に、塩基の種類を１種類欠いた条件（条件２～５）において過剰な伸長反応は効率的に抑制された（図１３）。

産業上の利用可能性

[0146] 本発明によれば、人工核酸であるＬＮＡを含む鎖を伸長し得る改変ポリメラーゼが提供される。これにより、ＤＮＡ鎖からＬＮＡ鎖を安定的に伸長させることが可能となる。さらに、ランダム配列からなるＤＮＡ鎖をテンプレートに用いて、ＬＮＡライブラリを作成することもできる。人工核酸ライブラリからアプタマーを選出することにより、予め分解酵素耐性を有するアプタマーが取得でき、よって、アプタマーの最適化にかかる時間を短縮できる。さらに、人工核酸ライブラリによって、ライブラリのサイズを拡大でき、候補アプタマーのスクリーニングの範囲が広がる。人工核酸ライブラリの作成により、医薬品などの候補となる人工核酸を含む配列のスクリーニングおよび人工核酸を含む核酸医薬品の効率的な開発に有用となる。

請求の範囲

[請求項1] 配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の（１）あるいは（２）の変異を有するアミノ酸配列からなる、改変型ポリメラーゼ：

（１）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４０９位のチロシンがバリン、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている；あるいは

（２）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４０９位のチロシンがバリン、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸またはグルタミン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、６１４位のアスパラギン酸がアスパラギンに、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[請求項2] 配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の（１）あるいは（２）の変異を有するアミノ酸配列からなる、改変型ポリメラーゼ：

（１）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている；あるいは

（２）２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、４８５位のアラニンが中性アミノ酸に、６１４位のアスパラギン酸がアスパラギンに、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[請求項3] 配列表の配列番号２に記載されるアミノ酸配列において、以下の変

異を有するアミノ酸配列からなる、改変型ポリメラーゼ：

２１０位のアスパラギンがアスパラギン酸に、ならびに６６４位のグルタミン酸がリジン、グルタミン、またはアルギニンに、それぞれ置換されている。

[請求項4] ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＬＮＡ含有オリゴヌクレオチド鎖を合成する方法であって、

該ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドからなるテンプレート、プライマー、ＬＮＡ－ＮＴＰおよび請求項１または２に記載の改変型ポリメラーゼを反応させる工程

を含む、方法。

[請求項5] 前記プライマーが、ＬＮＡ含有プライマーである、請求項４に記載の方法。

[請求項6] 前記ＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドが、ランダム配列を含む、請求項４または５に記載の方法。

[請求項7] ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドからＤＮＡ含有オリゴヌクレオチドを合成する方法であって、

該ＬＮＡ含有オリゴヌクレオチドからなるテンプレート、プライマー、ｄＮＴＰおよび請求項２または３に記載の改変型ポリメラーゼを反応させる工程

を含む、方法。

[請求項8] 前記反応させる工程が、１２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７～９）、１０ｍＭ　ＫＣｌ、６ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、および１０μｇ／ｍＬ　牛血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する緩衝液中で行われる、請求項４から７のいずれかに記載の方法。

[請求項9] ＬＮＡ鎖伸長活性を有する改変型ポリメラーゼであって、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異、三リン酸体の結合に寄与する変異、およびＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異を含むように改変されたポリメラーゼである、改変型ポリメラーゼ。

[請求項10] 前記改変型ポリメラーゼが、三リン酸体の糖構造の認識を緩和する変異をさらに含む、請求項９に記載の改変型ポリメラーゼ。

[請求項11] 逆転写活性を有する改変型ポリメラーゼであって、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異と、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異とを含む、あるいは、エキソヌクレアーゼ活性を減弱させる変異と、ＤＮＡ／ＬＮＡ二重鎖との結合を強める変異と、三リン酸体の結合に寄与する変異とを含むように改変されたポリメラーゼである、改変型ポリメラーゼ。

[図1]

図1-1

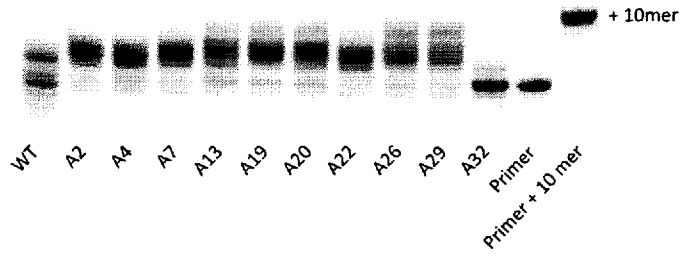


図1-2

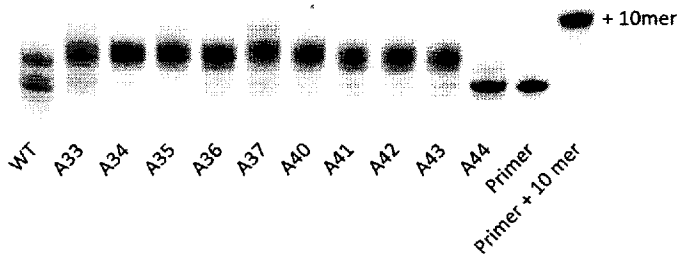


図1-3

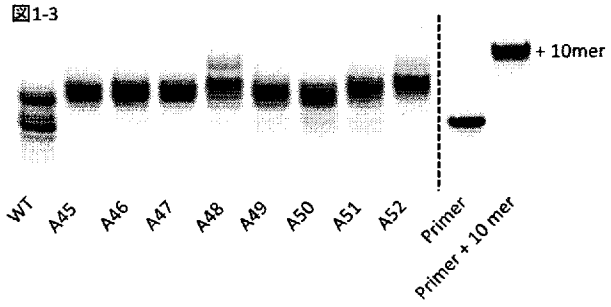
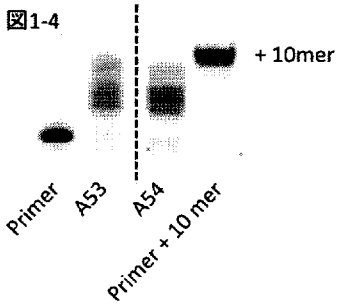
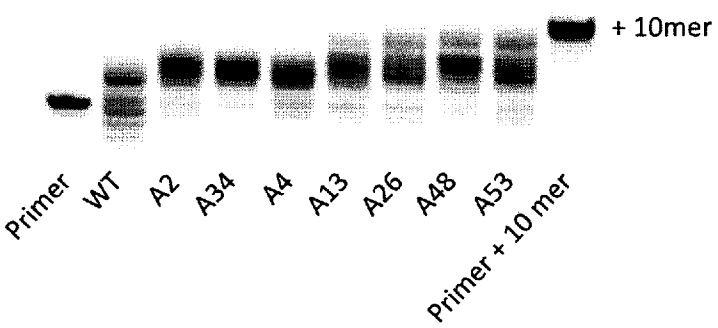


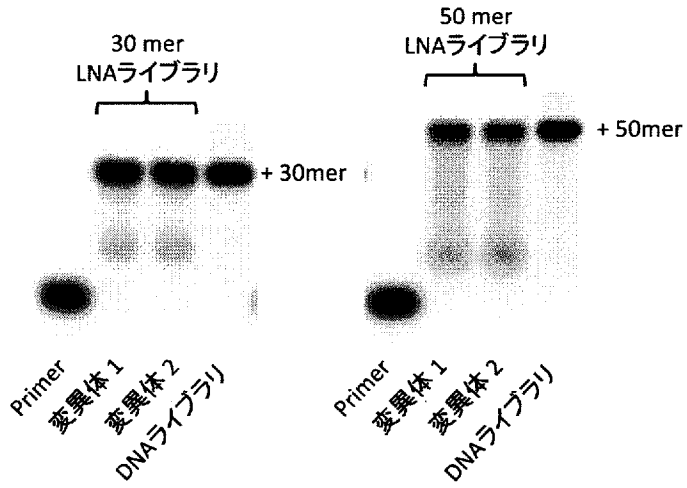
図1-4



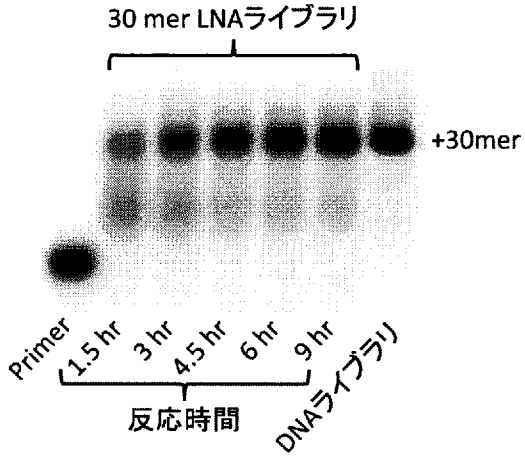
[図2]



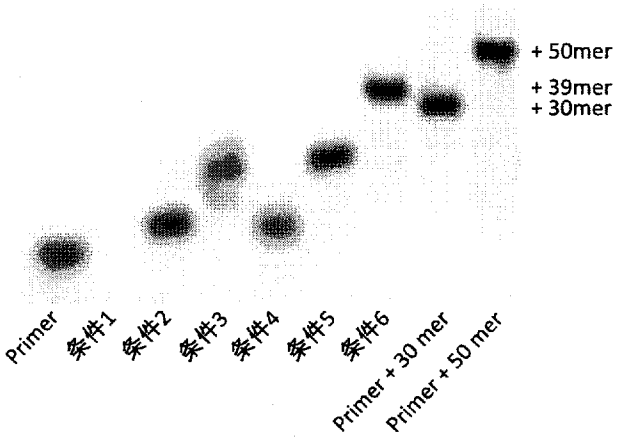
[図3]


30 mer
LNAライブラリ
+ 30mer
50 mer
LNAライブラリ
+ 50mer
Primer
変異体1
変異体2
DNAライブラリ
Primer
変異体1
変異体2
DNAライブラリ

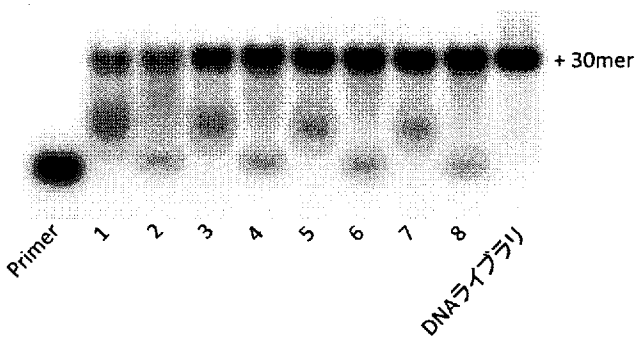
[図4]


30 mer LNAライブラリ
+30mer
Primer
1.5 hr
3 hr
4.5 hr
6 hr
9 hr
反応時間
DNAライブラリ

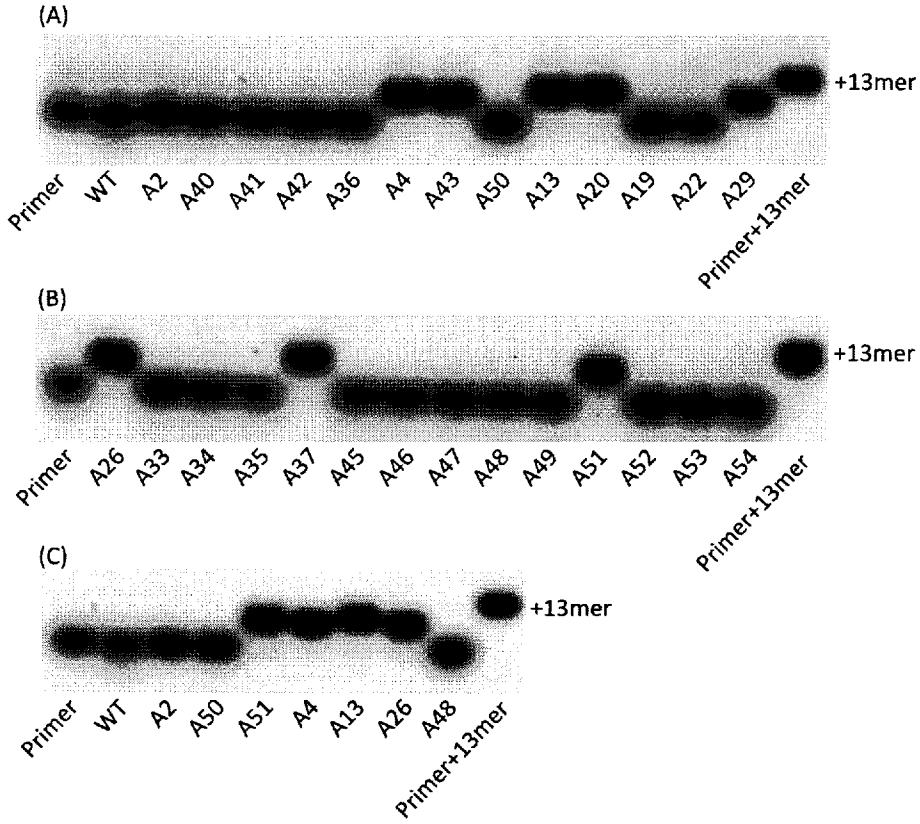
[図5]


+ 50mer
+ 39mer
+ 30mer
Primer
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6
Primer + 30 mer
Primer + 50 mer

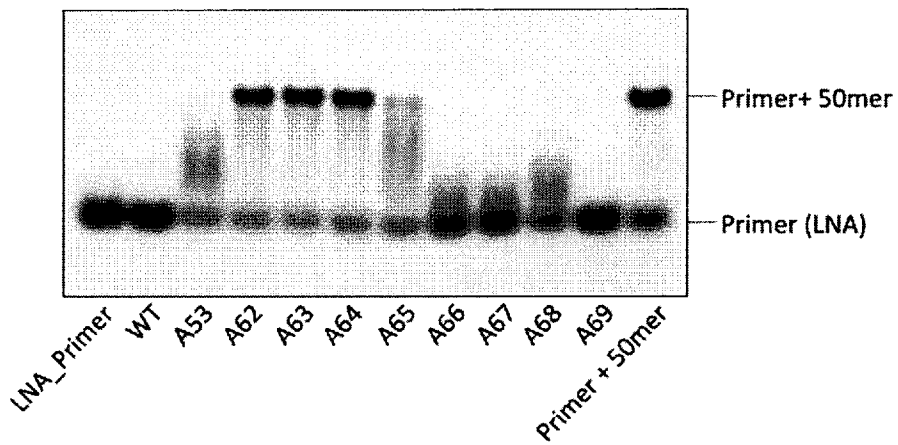
[図6]


+ 30mer
Primer
1
2
3
4
5
6
7
8
DNAライブラリ

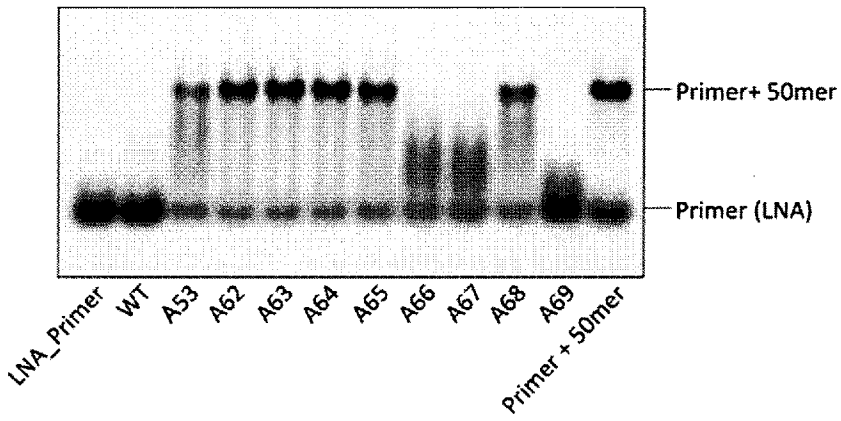
[図7]


(A)
+13mer
Primer
WT
A2
A40
A41
A42
A36
A4
A43
A50
A13
A20
A19
A22
A29
Primer+13mer
(B)
+13mer
Primer
A26
A33
A34
A35
A37
A45
A46
A47
A48
A49
A51
A52
A53
A54
Primer+13mer
(C)
+13mer
Primer
WT
A2
A50
A51
A4
A13
A26
A48
Primer+13mer

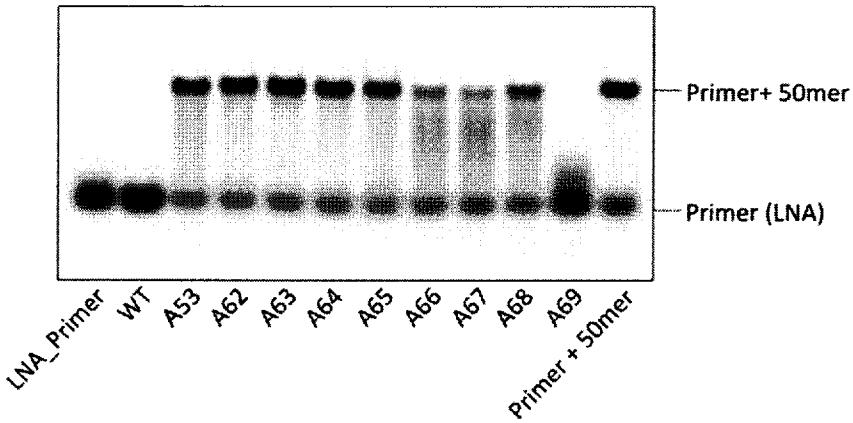
[図8]


Primer+ 50mer
Primer (LNA)
LNA_Primer
WT
A53
A62
A63
A64
A65
A66
A67
A68
A69
Primer + 50mer

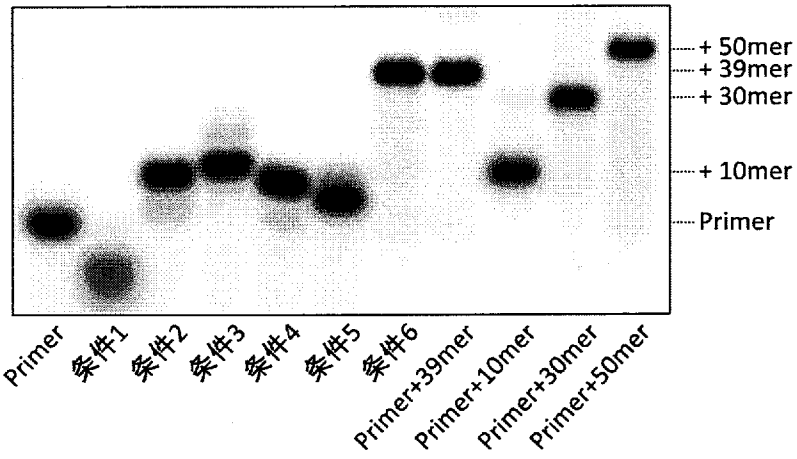
[図9]


Primer+ 50mer
Primer (LNA)
LNA_Primer
WT
A53
A62
A63
A64
A65
A66
A67
A68
A69
Primer + 50mer

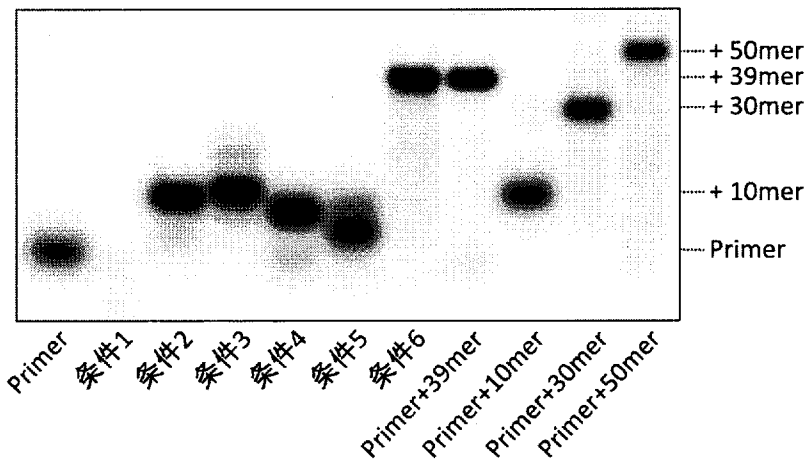
[図10]


Primer+ 50mer
Primer (LNA)
LNA_Primer
WT
A53
A62
A63
A64
A65
A66
A67
A68
A69
Primer + 50mer

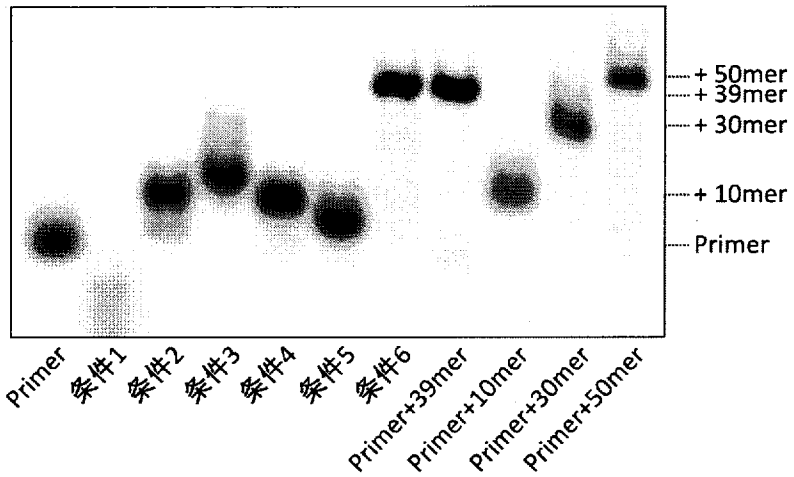
[図11]


+ 50mer
+ 39mer
+ 30mer
+ 10mer
Primer
Primer
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6
Primer+39mer
Primer+10mer
Primer+30mer
Primer+50mer

[図12]


+ 50mer
+ 39mer
+ 30mer
+ 10mer
Primer
Primer
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6
Primer+39mer
Primer+10mer
Primer+30mer
Primer+50mer

[図13]


+ 50mer
+ 39mer
+ 30mer
+ 10mer
Primer
Primer
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6
Primer+39mer
Primer+10mer
Primer+30mer
Primer+50mer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/059727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N9/12*(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)
C12N15/09, C12N9/12, 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 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), UniProt/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	COZENS Christopher, et al., "A short adaptive path from DNA to RNA polymerases", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, Vol.109, No.21, pp.8067-8072, all document	9-11/1-11
X/Y	WO 2011/135280 A2 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL), 03 November 2011 (03.11.2011), pages 3 to 8, 19 to 22; claims 1 to 18 (Family: none)	9-11/1-11
X/Y	PINHEIRO Vitor B., et al., "Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution", Science, 2012, Vol.336, pp.341-344, Abstract, p.342	9-11/1-11

☒ 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
08 June 2016 (08.06.16)	21 June 2016 (21.06.16)
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/JP2016/059727

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NISHIOKA Motomu, et al., "Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme", Journal of Biotechnology, 2001, Vol.88, pp.141-149, Abstract, Table 2	1-11
A	PINHEIRO Vitor B., et al., "Compartmentalized Self-Tagging for In Vitro-Directed Evolution of XNA Polymerases", Current Protocols in Nucleic Acid Chemisty, 2014, Vol.2014, Supp.57, pp. 9.9.1-9.9.18	1-11
A	WO 2014/107502 A2 (ARIZONA BOARD OF REGENTS, A BODY CORPORATE OF THE STATE OF ARIZONA, ACTING FOR AND ON BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY), 10 July 2014 (10.07.2014), (Family: none)	1-11

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０５９７２７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N9/12(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.　C12N15/09, C12N9/12, 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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), UniProt/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	COZENS Christopher, et al., "A short adaptive path from DNA to RNA polymerases", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, Vol.109, No.21, pp.8067-8072, all document	9-11/1-11
X/Y	WO 2011/135280 A2 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 2011.11.03, pp.3-8,19-22, claims 1-18 (ファミリーなし)	9-11/1-11

☑　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
０８．０６．２０１６	２１．０６．２０１６

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　４０４５
鳥居　敬司
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/Y	PINHEIRO Vitor B., et al., "Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution", Science, 2012, Vol.336, pp.341-344, Abstract, p.342	9-11/1-11
Y	NISHIOKA Motomu, et al., "Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme", Journal of Biotechnology, 2001, Vol.88, pp.141-149, Abstract, Table 2	1-11
A	PINHEIRO Vitor B., et al., "Compartmentalized Self-Tagging for In Vitro-Directed Evolution of XNA Polymerases", Current Protocols in Nucleic Acid Chemisty, 2014, Vol.2014, Supp.57, pp.9.9.1-9.9.18	1-11
A	WO 2014/107502 A2 (ARIZONA BOARD OF REGENTS, A BODY CORPORATE OF THE STATE OF ARIZONA, ACTING FOR AND ON BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY) 2014.07.10, (ファミリーなし)	1-11