

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3910142号
(P3910142)

(45) 発行日 平成19年4月25日(2007.4.25)

(24) 登録日 平成19年2月2日(2007.2.2)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
請求項の数 8 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-527273 (P2002-527273)	(73) 特許権者	302019245
(86) (22) 出願日	平成13年9月13日 (2001.9.13)		タカラバイオ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2001/007930		滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
(87) 国際公開番号	W02002/022831	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002.3.21)		弁理士 青山 稔
審査請求日	平成16年3月17日 (2004.3.17)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	特願2000-280785 (P2000-280785)		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成12年9月14日 (2000.9.14)	(72) 発明者	上森 隆司
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		滋賀県大津市大江3丁目1-16 シャル
(31) 優先権主張番号	特願2001-64074 (P2001-64074)		マンコーボ第2瀬田709号
(32) 優先日	平成13年3月7日 (2001.3.7)	(72) 発明者	佐藤 好美
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		滋賀県栗太郡栗東町縄3丁目8番23-1
			010号
		(72) 発明者	小山 信人
			京都府宇治市小倉町久保96
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性リボヌクレアーゼH

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の群より選択され、かつ、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有し、一方の鎖にRNAを2つ含む2本鎖DNAのうち、RNAを含む鎖を切断することができることを特徴とするポリペプチド：

- (a) 配列表の配列番号23に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；
 (b) 配列表の配列番号23に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するポリペプチド；
 (c) 配列表の配列番号22に示される塩基配列を有する核酸、当該核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうる核酸にコードされるポリペプチド。

10

【請求項2】

下記の群より選択され、かつ、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有し、一方の鎖にRNAを2つ含む2本鎖DNAのうち、RNAを含む鎖を切断することができるポリペプチドをコードする核酸：

- (a) 配列表の配列番号23に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸；
 (b) 配列表の配列番号23に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するポリペプチドをコードする核酸；
 (c) 配列表の配列番号22に示される塩基配列を有する核酸；
 (d) 配列表の配列番号22に示される塩基配列において、少なくとも1つの塩基がアミ

20

ノ酸配列に翻訳される形での欠失、付加、挿入又は置換を有する塩基配列からなる核酸；
(e) 前記(c)記載の核酸又はその相補鎖とストリンジントな条件下にハイブリダイズしうる核酸。

【請求項3】

請求項2記載の核酸を含んでなる組換えDNA。

【請求項4】

請求項3記載の組換えDNAにより形質転換されてなる形質転換体。

【請求項5】

請求項4記載の形質転換体を培養し、該培養物中より耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチドの製造方法。

10

【請求項6】

プラスミドpPFU220(FERM BP-7654として寄託)を導入した形質転換体を培養して得られる、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチド。

【請求項7】

下記の群より選択され、かつ、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有し、一方の鎖にRNAを2つ含む2本鎖DNAのうち、RNAを含む鎖を切断することができることを特徴とするポリペプチドを、一方の鎖にRNAを2つ含む2本鎖DNAに作用させる工程を包含する核酸の切断方法：

(a) 配列表の配列番号23、32、37のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

20

(b) 配列表の配列番号23、32、37のいずれか1つに示されるアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するポリペプチド；

(c) 配列表の配列番号22、31、36のいずれか1つに示される塩基配列を有する核酸、当該核酸又はその相補鎖とストリンジントな条件下にハイブリダイズしうる核酸にコードされるポリペプチド。

【請求項8】

下記の群より選択され、かつ、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有し、一方の鎖にRNAを2つ含む2本鎖DNAのうち、RNAを含む鎖を切断することができることを特徴とするポリペプチドを、一方の鎖にRNAを1つ含む2本鎖DNAに作用させる工程を包含する核酸の切断方法：

30

(a) 配列表の配列番号23または32に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 配列表の配列番号23または32に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するポリペプチド；

(c) 配列表の配列番号22または31に示される塩基配列を有する核酸、当該核酸又はその相補鎖とストリンジントな条件下にハイブリダイズしうる核酸にコードされるポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明はポリペプチド、さらに詳しくは、遺伝子工学において利用価値の高いリボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチドに関する。また、本発明は該ポリペプチドの遺伝子工学的生産に有用な遺伝子に関する。さらに、本発明は該ポリペプチドの遺伝子工学的な製造方法に関する。

40

背景技術

リボヌクレアーゼ(RNA分解酵素)にはエンド型とエキソ型が存在し、基質特異性も多様で、複雑な生理活性に関与している。リボヌクレアーゼ活性を有する酵素としては、リボヌクレアーゼT₁、リボヌクレアーゼT₂、リボヌクレアーゼH、リボヌクレアーゼP、リボヌクレアーゼI、リボヌクレアーゼII、リボヌクレアーゼIII、リボヌクレアーゼIV、リボヌクレアーゼL等の酵素が知られている。

リボヌクレアーゼH(本明細書に於いては、RNAse Hと称する場合もある)は196

50

9年にW・H・ステイン及びP・ハウゼンにより仔ウシ胸腺から初めて単離された。現在、RNase Hは種々の動物細胞、酵母等の真核生物及び大腸菌等の原核生物に広く存在する細胞性RNase Hと、RNA腫瘍ウイルスに存在するウイルス性RNase Hとに分けられている。1種の細胞に数種のRNase H活性が存在しており、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等の2価金属イオン要求性である。

大腸菌由来RNase Hは155アミノ酸からなる分子量約17kDaの加水分解酵素であって、DNA/RNAハイブリッドのRNA鎖のみを特異的にエンド型で切断するという基質特異性を有する。生成したオリゴマーは5'末端にリン酸基を、3'末端に水酸基を有する。

大腸菌由来RNase Hとしては、RNase HIとRNase HIIが同定されている。RNase HIの生理的機能として、ColE1プラスミドの複製において、1)正常な複製開始点ではない箇所に結合したRNAを分解し、正常な複製開始点を確保する、2)正常な複製開始点に特異的なRNAプライマーの合成をすることが示されている。しかしながら、RNase HIIの機能は未だ不明である。

RNase Hの重要性は遺伝子工学の発展に伴ってますます増大すると思われるが、この酵素は、大腸菌内での発現量が極めて低いことから、組換えDNA技術による該酵素の生産が試みられており、既にBRL、アマシャム ファルマシア バイオテック及び宝酒造等から、組換えDNA技術により生産されたRNase Hが供給されている。

これらの市販の組換えRNase Hは、大腸菌を宿主として生産されるものである〔金谷ら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)、第264巻、第11546-11549頁(1989)〕。また、大腸菌由来RNase Hよりも極めて高い安定性を有する好熱菌由来RNase Hの大腸菌による製造法も報告されている〔金谷ら、第2回日本蛋白工学会年会プログラム・要旨集(1990)、69頁;特許第2533671号公報〕が、大腸菌を用いて産生された好熱菌RNase Hの酵素活性は大腸菌由来RNase Hよりも低いものであった。

RNase Hは、その基質特異性に基づき、下記に例示される様な用途を有し、極めて利用価値の高い酵素として注目されている。

1) cDNAのクローニングの際の鋳型mRNAの除去。

2) mRNAのポリA領域の除去。

3) RNAの断片化。

しかしながら、上述のように耐熱性を有するRNase Hは大腸菌由来RNase Hよりも生産性及び酵素活性が低いものしかなく、RNase Hの用途拡大のため、大腸菌と同等もしくはそれ以上の生産性及び酵素活性を有する耐熱性RNase Hの開発が望まれていた。

発明の目的

本発明の目的は、遺伝子工学において利用価値の高いRNase H活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする遺伝子ならびに該ポリペプチドの遺伝子工学的製造方法を提供することにある。

発明の概要

本発明者らは、上記の事情を鑑み、耐熱性RNase Hを得るために鋭意研究及び探索を行った結果、高いRNase H活性を有する耐熱性RNase Hポリペプチドを見出した。更に、得られた耐熱性RNase Hは遺伝子工学的手法による製造においても生産性がよいことも見出し、本発明を完成するに至った。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、耐熱性リボヌクレアーゼHポリペプチドに関し、下記の群より選択され、かつ、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有することを特徴とするポリペプチドに関する。

(a) 配列表の配列番号9、17、23、32、37、47、57又は59のいずれか1つに示されるアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチド;

(b) 配列表の配列番号9、17、23、32、37、47、57又は59のいずれか1

10

20

30

40

50

つに示されるアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するポリペプチド；

(c) 配列表の配列番号9、17、23、32、37、47、57又は59のいずれか1つに示されるアミノ酸配列と少なくとも71%の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド。

本発明の第2の発明は、耐熱性リボヌクレアーゼHをコードする核酸に関し、下記の群より選択され、かつ、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチドをコードする核酸に関する。

(a) 配列表の配列番号9、17、23、32、37、47、57又は59のいずれか1つに示されるアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチドをコードする核酸；

10

(b) 配列表の配列番号9、17、23、32、37、47、57又は59のいずれか1つに示されるアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するポリペプチドをコードする核酸；

(c) 配列表の配列番号8、16、22、31、36、46、56又は58のいずれか1つに示される塩基配列を有する核酸；

(d) 配列表の配列番号8、16、22、31、36、46、56又は58のいずれか1つに示される塩基配列において、少なくとも1つの塩基がアミノ酸配列に翻訳される形での欠失、付加、挿入又は置換を有する塩基配列からなる核酸；

(e) 前記(a)～(d)のいずれか記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうる核酸；

20

(f) 配列表の配列番号8、16、22、31、36、46、56又は58のいずれか1つに示される塩基配列に少なくとも69%の相同性を有する塩基配列である核酸。

本発明の第3の発明は組換えDNAに関し、第2の発明の核酸を含んでなることを特徴とする。

本発明の第4の発明は形質転換体に関し、第3の発明の組換えDNAにより形質転換されてなることを特徴とする。

本発明の第5の発明は耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチドの製造方法に関し、第4の発明の形質転換体を培養し、該培養物中より耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする。

第6の発明はプラスミドpRHB11、pBCA3Nd2、pPFU220、pTM-RNH、pPHO238、pAFU204、pTLI204又はpTCE207のいずれか1つを導入した形質転換体を培養して得られる、耐熱性リボヌクレアーゼH活性を有するポリペプチドに関する。なお、これらのプラスミドを有する大腸菌株は、ブダペスト条約の下、それぞれFERM BP-7655、FERM BP-7653、FERM BP-7654、FERM BP-7652、FERM BP-7692、FERM BP-7691、FERM BP-7693およびFERM BP-7694の受託番号の下、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

30

発明の詳細な説明

以下、本発明に関して具体的に説明する。

本明細書において、RNase Hとは、DNA/RNAハイブリッドのRNA鎖のみを特異的にエンド型で切断するという基質特異性を有する加水分解酵素であって、生成したオリゴマーが5'末端にリン酸基を、3'末端に水酸基を有するものをいう。

40

本発明において、ポリペプチドが耐熱性のRNase H活性を有するとは、特に限定するものではないが、60以上の温度で15分間保持した後においてもRNase H活性を有することを意味する。

耐熱性RNase H活性は、例えば、次のようにして測定することができる。

ポリ(rA)及びポリ(dT)(ともにアマシャム ファルマシア バイオテク製)1mgをそれぞれ1mM EDTAを含む40mMトリス-HCl(pH7.7)1mlに溶解し、ポリ(rA)溶液及びポリ(dT)溶液を調製する。

次に、4mM MgCl₂、1mM DTT、0.003%BSA、4%グリセロールを

50

含む40 mM トリス - HCl (pH 7.7) に、終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにポリ (rA) 溶液を、終濃度 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにポリ (dT) 溶液を加え、37 で10分間反応後、4 に冷却し、ポリ (rA) - ポリ (dT) 溶液を調製する。

このポリ (rA) - ポリ (dT) 溶液 100 μl に酵素液 1 μl を加え、40 で10分間反応させ、0.5 M EDTA 10 μl を加えて反応を停止させた後、260 nmの吸光度を測定する。対照として、上記反応液に0.5 M EDTA 10 μl を加えた後、40 で10分間反応させ、吸光度を測定する。その後、EDTA非添加で反応させ求めた吸光度から対照の吸光度を引いた値 (吸光度差) を求めることにより、酵素反応によってポリ (rA) - ポリ (dT) ハイブリッドから遊離したヌクレオチドの濃度を吸光度差から求め、本発明の耐熱性 RNase H 活性を測定することができる。

10

また、活性測定しようとする酵素液 1 μl に40 であらかじめインキュベーションした反応液 [20 mM ヘプス - 水酸化カリウム (pH 8.5)、0.01% 牛血清アルブミン (宝酒造社製)、1% ジメチルスルホキシド、4 mM 酢酸マグネシウム、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリ (dT) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製)、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリ (rA) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製)] 100 μl を添加し、40 で10分間反応させた後、0.5 M EDTA (pH 8.0) 10 μl で反応を停止し、260 nmの吸光度を測定することにより、本発明の耐熱性 RNase H 活性を測定することもできる。

RNase H の1単位 (ユニット) は、1 nmol のリボヌクレオチドが遊離したのに相当する A_{260} を10分間に増加させる酵素量とし、下記の式に従って算出することができる。

20

単位 (unit) = [吸光度差 $\times$ 反応液量 (ml)] / 0.0152

本発明のポリペプチドは、耐熱性 RNase H 活性を示す限りにおいて、配列表の配列番号9、17、23、32、37、47、57又は59のいずれか1つに示されるアミノ酸配列に1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換の少なくとも1つがなされたアミノ酸配列で示されるポリペプチドを包含する。

すなわち、天然に存在するポリペプチドにはそれをコードするDNAの多型や変異の他、生成後のポリペプチドの生体内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こりうる。しかし、このような変異が該ポリペプチドの活性や構造の保持に関して重要でない部分に存在する場合には、変異を有しないポリペプチドと実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。

30

人為的にポリペプチドのアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列中のあるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている [サイエンス (Science)、第224巻、1431頁 (1984)]。

また、ある種のポリペプチドは、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるポリペプチドに存在するシグナルペプチド、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列あるいはプレ・プロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、あるいは活性型ポリペプチドへの転換に際して除去される。このようなポリペプチドは一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を発現するポリペプチドである。

40

本発明により単離された、配列表の配列番号8、16、22、31、36、46、56又は58に示される塩基配列の遺伝子には、それぞれ配列表の配列番号9、17、23、32、37、47、57又は59記載のアミノ酸配列を持つポリペプチドがコードされており、該ポリペプチドは耐熱性 RNase H 活性を有している。そこから、活性には必須でないペプチド領域が削除されたポリペプチドも、本願のポリペプチドに含まれる。

遺伝子工学的にポリペプチドの生産を行う場合には、目的のポリペプチドのアミノ末端、あるいはカルボキシル末端に該ポリペプチドの活性とは無関係のペプチド鎖が付加される

50

ことがある。例えば、目的のポリペプチドの発現量を上げるために、使用される宿主中で高発現されているポリペプチドのアミノ末端領域の一部を目的のポリペプチドのアミノ末端に付加した融合ポリペプチドが作製されることがある。あるいは、発現されたポリペプチドの精製を容易にするために、特定の物質に親和性を有するペプチドを目的のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に付加することも行われている。これらの付加されたペプチドは目的ポリペプチドの活性に悪影響をおよぼさない場合には付加されたままであってもよく、また、必要であれば適当な処理、例えば、プロテアーゼによる限定分解などによって目的ポリペプチドから除去できるようにすることもできる。

従って、本発明によって開示されたアミノ酸配列（配列番号 9、17、23、32、37、47、57 又は 59）に 1 個以上のアミノ酸残基の欠失、挿入、付加又は置換が生じたアミノ酸配列によって示されるポリペプチドであっても、耐熱性 RNase H 活性を有していれば本発明の範囲内に属するものである。

また、本発明によって開示されたアミノ酸配列（配列番号 9、17、23、32、37、47、57 又は 59）に少なくとも 71%、好ましくは 80%、さらに好ましくは 90% の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドは、耐熱性 RNase H 活性を有していれば本発明の範囲内に属するものである。

上記相同性は、例えばコンピュータプログラム DNASIS-Mac（宝酒造社製）、コンピュータアルゴリズム FASTA（バージョン 3.0；パーソン（Pearson, W. R.）ら、Pro. Natl. Acad. Sci., 85: 2444-2448, 1988）、コンピュータアルゴリズム BLAST（バージョン 2.0；Altschul 20 1ら、Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997）によって測定することができる。

例えば、上記アミノ酸配列の相同性が、バチルス カルドテナックス（*Bacillus caldotenax*）由来のリボヌクレアーゼ HII（配列表の配列番号 9）と少なくとも 44%、バチルス カルドテナックス由来のリボヌクレアーゼ HIII（配列表の配列番号 17）と少なくとも 47%、ピロコッカス フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）由来リボヌクレアーゼ H（配列表の配列番号 23）と少なくとも 69%、サーモトガ マリティマ（*Thermotoga maritima*）由来リボヌクレアーゼ H（配列表の配列番号 59）と少なくとも 53%、アルカエオグロバス フルギダス（*Archaeoglobus fulgidus*）由来リボヌクレアーゼ H（配 30 列表の配列番号 37）と少なくとも 51%、サーモコッカス リトラリス（*Thermococcus litoralis*）由来リボヌクレアーゼ H（配列表の配列番号 47）と少なくとも 65%、サーモコッカス セラー（*Thermococcus celer*）由来リボヌクレアーゼ H（配列表の配列番号 57）と少なくとも 71%、ピロコッカス ホリコシイ（*Pyrococcus horikoshii*）由来リボヌクレアーゼ H（配列表の配列番号 32）と少なくとも 71% であるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、耐熱性 RNase H 活性を有していれば本発明の範囲内に属するものである。

本発明のポリペプチドは、例えば、（1）本発明のポリペプチドを生産する微生物の培養物からの精製、（2）本発明のポリペプチドをコードする核酸を含有する形質転換体の培養物からの精製、等の方法により製造することができる。

（1）本発明のポリペプチドを生産する微生物の培養物からの精製

本発明のポリペプチドを生産する微生物としては、例えば、ドイッチェ・ザムルンク・フオン・ミクロオルガニズメン・ウント・ツェルクultzren GmbH（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH）より購入可能なバチルス カルドテナックス（DSM 406）、ピロコッカス フリオサス（DSM 3638）やサーモトガ マリティマ（DSM 3109）、アルカエオグロバス フルギダス（DSM 4139）、サーモコッカス リトラリス（DSM 5473）、サーモコッカス セラー（DSM 2476）又は理化学研究所より購入可能なピロコッカス ホリコシイ（JCM 9974）等が挙げられる。微生物の培養は、その微生物の生育に適した条件で行えばよく、好ましくは、目的のポリペプチドの 50

発現量が高くなるような培養条件が用いられる。かくして菌体あるいは培養液中に生産された目的のポリペプチドは、通常のタンパク質の精製に用いられる方法によって精製することができる。

上記菌株の培養にあたっては、通常、耐熱菌の培養に用いられる方法が利用でき、培地に加える栄養源は該菌株が利用しうるものであればよい。炭素源としては、例えば、デンプン等が利用でき、窒素源としては、例えば、トリプトン、ペプトン、酵母エキス等が利用できる。培地中には、マグネシウム塩、ナトリウム塩、鉄塩等の金属塩を微量元素として加えてもよい。また、例えば、海洋性の耐熱菌の場合、培地の調製に人工海水を用いることが有利である。

培養は静置培養又は攪拌培養で行なうことができるが、例えば、アブライド アンド エンバイロンメンタル マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology)、第55巻、第2086-2088頁(1992)に記載のように、透析培養法を用いてもよい。培養条件や培養時間は、使用する菌株、培地組成に応じ、ポリペプチドの生産量が最大になるように設定するのが好ましい。ポリペプチドを採取するにあたっては、まず、無細胞抽出液を調製する。無細胞抽出液は、例えば、培養液から遠心分離、ろ過などによって菌体を集め、ついで菌体を破碎することにより調製できる。菌体の破碎方法としては、超音波破碎、ビーズ破碎、溶菌酵素処理等のうちから目的酵素の抽出効果の高い方法を選べばよい。また、培養液上清中に該ポリペプチドが分泌されている場合には、硫酸塩析法や限外濾過法等によって培養液上清中のポリペプチドを濃縮し、これを無細胞抽出液とする。かくして得られた無細胞抽出液からポリペプチドを単離するにあたっては、通常のタンパク質の精製に用いられる方法を使用できる。例えば、硫酸塩析処理、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等の方法を組み合わせて使用できる。

(2) 本発明のポリペプチドをコードする核酸を含む組換えDNAにより形質転換された形質転換体の培養物からの精製

本発明のポリペプチドをコードする核酸、例えば配列番号8、16、22、31、36、46、56又は58に示される塩基配列を有する核酸を含む組換えDNAで形質転換された形質転換体より、本発明のポリペプチドを取得することができる。配列番号8に示される塩基配列からは配列番号9に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号16に示される塩基配列からは配列番号17に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号22に示される塩基配列からは配列番号23に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号31に示される塩基配列からは配列番号32に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号36に示される塩基配列からは配列番号37に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号46に示される塩基配列からは配列番号47に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号56に示される塩基配列からは配列番号57に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号58に示される塩基配列からは配列番号59に示されるアミノ酸配列のポリペプチドが、それぞれ生成する。

さらに、本発明のプラスミドpRHB11、pBCA3Nd2、pPFU220、pTM-RNH、pPHO238、pAFU204、pTLI204又はpTCE207のいずれか1つを導入した形質転換体を培養して得られる培養物から本発明のポリペプチドを精製してもよい。

形質転換される宿主には特に限定はなく、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物、動物、植物培養細胞、動物培養細胞等、組換えDNAの分野で通常使用されている宿主が挙げられる。

例えば、本発明のポリペプチドは、lacプロモーターやT7ファージプロモーターの下流に本発明の核酸を連結したプラスミドを保持する大腸菌を通常の培養条件、例えば、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地(トリプトン10g/リットル、酵母エキス5g/リットル、NaCl 5g/リットル、pH7.2)中、37℃で対数増殖期まで培養後、1mMとなるようイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらに37℃で培養することにより、培養菌体中にポリペプチドを発現させることができ

10

20

30

40

50

る。

培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を超音波で破碎し、さらに遠心分離して上清を集め、無細胞抽出液とする。該無細胞抽出液は耐熱性 R N a s e H 活性を示す。さらにイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水クロマトグラフィー、硫酸沈殿等の公知の方法を用いることにより該無細胞抽出液から本発明のポリペプチドを精製することができる。上記の精製過程において得られる部分精製品も、当然ながら R N a s e H 活性を示す。なお、本発明の核酸を連結したプラスミドを保持する大腸菌で発現される本発明のポリペプチドは耐熱性を有しているため、精製手段として培養菌体及び/又は無細胞抽出液に対して、例えば、40 以上の温度で、約 10 分間の熱処理を行って熱変性して不溶化した宿主由来のタンパク質を除去してもよい。また、この熱処理の温度や時間は、適宜、最

10

適な温度及び時間を選択すればよい。上記のように本発明のポリペプチドを、当該ポリペプチドをコードする核酸を保持する形質転換体を用いて常温、例えば、37 で発現させた場合でも、得られた発現産物はその活性、耐熱性を保持している。すなわち、本発明のポリペプチドは、その本来の生産菌が生育する温度とは離れた温度において発現された場合にも、その固有の高次構造を形成し得る。

本発明の核酸は、本発明のポリペプチドをコードする核酸であり、具体的には、配列表の配列番号 9、17、23、32、37、47、57 又 59 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列、または該配列において 1 個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換の少なくとも 1 つがなされたアミノ酸配列で示され、かつ、耐熱性 R N a s e H 活性を示すポリペプチドをコードする核酸(1)、配列表の配列番号 8、16、22、31、36、46、56 又は 58 のいずれか 1 つに記載の塩基配列で示される核酸(2)、および上記核酸(1)または(2)にストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であるか、(1)または(2)の塩基配列に少なくとも 69%、好ましくは 80%、さらに好ましくは 90%の相同性を有する塩基配列で、かつ耐熱性 R N a s e H 活性を示すポリペプチドをコードする核酸(3)等である。

20

上記塩基配列の相同性は、コンピュータープログラム D N A S I S - M a c、コンピュータアルゴリズム F A S T A (バージョン 3.0)、B L A S T (バージョン 2.0)によって測定することができる。

本明細書における核酸とは、1本鎖または2本鎖の D N A または R N A を意味する。上記核酸(2)が R N A である場合は、例えば配列表の配列番号 8 記載の塩基配列において T を U で置換した塩基配列で示される。

30

本発明の核酸は、例えば、次のようにして得ることができる。

まず、配列表の配列番号 8、16、22、31、36、46、56 又は 58 のいずれか 1 つに記載の塩基配列で示される核酸(2)は、本発明のポリペプチドの説明中に記載した方法で培養したバチルス カルドテナックス(D S M 406)、ピロコッカス フリオサス(D S M 3638)、サーモトガ マリティマ(D S M 3109)、アルカエオグロバス フルギダス(D S M 4139)、サーモコッカス リトラリス(D S M 5473)、サーモコッカス セラー(D S M 2476)又はピロコッカス ホリコシイ(J C M 9974)より常法にしたがってゲノム D N A を調製し、それを用いて作製した D N A ライブラリーから単離することができる。またこのゲノム D N A を鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応(P C R)により、配列表の配列番号 8、16、22、31、36、46、56 又は 58 のいずれか 1 つに記載の塩基配列で示される核酸を増幅することによっても取得できる。

40

また、本発明により提供される、本発明のポリペプチドをコードする核酸の塩基配列、例えば配列表の配列番号 8、16、22、31、36、46、56 又は 58 のいずれか 1 つに記載の塩基配列を基に、本発明のポリペプチドと同様の耐熱性 R N a s e H 活性を有するポリペプチドをコードする核酸を取得することも可能である。すなわち、本発明のポリペプチドをコードする核酸、またはその塩基配列の一部をハイブリダイゼーションのプロープに用いることにより、耐熱性 R N a s e H 活性を有するポリペプチドをコードする D

50

NAを、細胞から抽出したDNA、該DNAを鋳型として得られたPCR産物等からスクリーニングすることができる。あるいは上記の塩基配列から設計されたプライマーを使用したPCR等の遺伝子増幅法を用いることにより、耐熱性RNaseH活性を有するポリペプチドをコードするDNAを増幅することができる。また、耐熱性RNaseH活性を有するポリペプチドをコードするDNAを化学的に合成することも可能である。かかる方法により、上記核酸(1)または(3)を得ることができる。

上記の方法では目的の核酸の一部のみを含む核酸断片が得られることがあるが、その際には得られた核酸断片の塩基配列を調べて、それが目的の核酸の一部であることを確かめた上、該核酸断片、あるいはその一部をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うか、または該核酸断片の塩基配列に基づいて合成されたプライマーを用いてPCRを行うこと

10

上記の「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする」とは、1989年、コールドスプリングハーバーラボラトリー発行、T・マニアティス(T・Maniatis)ら編集、モレキュラークローニング：アラボラトリーマニュアル第2版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.)等に記載された条件でハイブリダイズ可能なことを意味し、例えば、以下の条件でハイブリダイズ可能なことをいう。すなわち、核酸を固定したメンブレンを0.5% SDS、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400、0.01%変性サケ精子核酸を含む6×SSC(1×SSCは0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0を示す)中で、50に

20

て12~20時間、プローブとともにインキュベートする。インキュベーション終了後、0.5% SDSを含む2×SSC中、37での洗浄から始めて、SSC濃度は0.1倍までの範囲で、また、温度は50までの範囲で変化させ、固定された核酸由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまでメンブレンを洗浄したうえ、プローブの検出を行う。また、こうして得られた新たな核酸について、そこにコードされているタンパクの有する活性を上記同様の方法によって調べることにより、得られた核酸が目的とするものであるかどうかを確認することができる。

30

また、オリゴヌクレオチドプローブを使用する場合、前記「ストリンジントな条件」としては、特に限定されないが、例えば、6×SSC、0.5% SDS、5×デンハルト、0.01%変性サケ精子核酸を含む溶液中、[Tm - 25]の温度で一晩保温する条件

などを用いる。

オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーのTmは、例えば、下記の式により求められる。

$$Tm = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - (600 / N)$$

(式中、Nはオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーの鎖長であり、%G + Cはオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー中のグアニンおよびシトシン残基の含有量である。)

また、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーの鎖長が18塩基より短い場合、Tmは、例えば、A + T(アデニン + チミン)残基の含有量と2との積と、G + C残基の含有量と4との積との和[(A + T) × 2 + (G + C) × 4]により推定することができる。

40

本発明においては、本発明のポリペプチドをコードする核酸にストリンジントな条件下でハイブリダイズ可能な核酸は、本明細書に開示された塩基配列と同一の塩基配列ではなくとも、それが耐熱性RNaseH活性を示すポリペプチドをコードする限り本発明の範囲に含まれるものであることは上記したとおりである。

すなわち、遺伝子上でアミノ酸を指定するコドン(3つの塩基の組み合わせ)はアミノ酸の種類ごとに1~6種類ずつが存在することが知られている。したがって、あるアミノ酸配列をコードする核酸はそのアミノ酸配列にもよるが多数存在することができる。核酸は自然界において決して安定に存在しているものではなく、その塩基配列に変異が起こるこ

50

とはまれではない。核酸上に起こった変異がそこにコードされるアミノ酸配列には変化を与えない場合（サイレント変異と呼ばれる）もあり、この場合には同じアミノ酸配列をコードする異なる核酸が生じたといえる。したがって、ある特定のアミノ酸配列をコードする核酸が単離されても、それを含有する生物が継代されていくうちに同じアミノ酸配列をコードする多種類の核酸ができていく可能性は否定できない。さらに同じアミノ酸配列をコードする多種類の核酸を人為的に作製することは種々の遺伝子工学的手法を用いれば困難なことではない。

例えば、遺伝子工学的なタンパク質の生産において、目的のタンパク質をコードする本来の核酸上で使用されているコドンが宿主中では使用頻度の低いものであった場合には、タンパク質の発現量が低いことがある。このような場合にはコードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドンを宿主で繁用されているものに人為的に変換することにより、目的タンパク質の高発現を図ることが行われている（例えば、特公平7-102146号公報）。このように特定のアミノ酸配列をコードする多種類の核酸は人為的に作製可能なことは言うまでもなく、自然界においても生成されうるものである。

本発明のポリペプチドをコードする核酸、例えば、配列表の配列番号7記載の塩基配列を有する核酸を適当なベクターに連結して組換えDNAを作成することができる。該組換えDNAの作成に使用されるベクターには特に限定はなく、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等を使用することができ、組換えDNAの使用目的に応じて適当なベクターを選択すれば良い。

さらに、当該組換えDNAを適当な宿主に導入して形質転換体を作成することができる。形質転換体の作成に使用される宿主にも特に限定はなく、細菌、酵母、糸状菌等の微生物の他、動物、植物、昆虫等の培養細胞等を使用することができる。当該形質転換体を培養して培養物中に本発明のポリペプチドを産生させることにより、本発明のポリペプチドを大量に製造することが可能となる。

実施例

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

実施例 1

好熱菌バチルス カルドテナックス由来のRNase Hの調製

トリプトン（ディフコラボラトリーズ社製）0.2%、酵母エキス（ディフコラボラトリーズ社製）1.5%を含む培地（pH 6.5）100mlにバチルスカルドテナックスYT-G株（*Bacillus caldotenax* YT-G、ドイッチェザムルンクフォンミクロオルガニスムスメンより購入：DSM 406）を植菌し、60℃で140分間振とう培養し、この培養液を前培養液とした。ついで、同組成の培地31に前培養液30mlを接種し、通気量2.5 l/min、攪拌数250回転/min、温度60℃で5時間培養した。

培養液を遠心分離（5000×g、15分）し、集菌した。湿菌重量402gの菌体を10mMメルカプトエタノール、0.5M NaCl、1mM EDTA、20μM PAPSを含む50mMトリス-HCl緩衝液（pH 7.5）1000mlに懸濁し、MINI-Lab（APV GAULIN/RANNIE社製）にて菌体を破碎後、遠心分離で細胞残渣を除き、上清を回収した。

得られた上清液に終濃度が0.1%となるようにポリエチレンジイミン溶液を加え、攪拌後、1時間放置し、遠心分離にて上清を回収した。この上清液に50%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、遠心分離で得られた沈殿を10mMメルカプトエタノール、0.1mM EDTA、50mM NaCl、10%グリセロールを含む20mMトリス-HCl緩衝液（pH 7.5）に溶解し、同緩衝液に対して透析した。同緩衝液で平衡化した280mlのDE52カラム（ワットマン社製）に透析試料を負荷し、非吸着画分を集めた。

さらに平衡化に用いた緩衝液420mlで洗浄し、洗浄画分を集めた。DE52カラムクロマトグラフィーでの非吸着画分と洗浄画分を混合し、10mMメルカプトエタノール、

10

20

30

40

50

0.1 mM EDTA、50 mM NaCl、10%グリセロールを含む20 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した240 ml のP-11 カラム (ワットマン社製) に負荷した。その後、0~0.5 M NaCl を含む平衡化緩衝液で溶出させた。得られた活性画分を透析チューブに入れ、固体のポリエチレングリコール20000 上に置き、4 で脱水濃縮した。次に、5 mMメルカプトエタノール、0.5 mM EDTA、30 mM NaCl、10%グリセロールを含む25 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した300 ml のSuperdex G-200 カラム (アマシャムファルマシア バイオテック社製) に、この酵素濃縮液を負荷した。平衡化に用いた緩衝液で溶出させ、活性画分を得た。10 mMメルカプトエタノール、0.1 mM EDTA、50 mM NaCl、10%グリセロールを含む20 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した15 ml のHeparin-Sepharose カラム (アマシャムファルマシア バイオテック社製) に活性画分を負荷し、0~0.5 M NaCl を含む平衡化緩衝液で溶出させた。

10

得られた活性画分を10 mMメルカプトエタノール、0.1 mM EDTA、50 mM NaCl、10%グリセロールを含む20 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した5 ml のHitrap-SP カラム (アマシャムファルマシア バイオテック社製) に負荷し、0~0.5 M NaCl を含む平衡化緩衝液で溶出させた。得られた活性画分を、再度5 mMメルカプトエタノール、0.5 mM EDTA、30 mM NaCl、10%グリセロールを含む25 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した300 ml のSuperdex G-200 カラム (アマシャムファルマシア バイオ

20

テク社製) に負荷し、得られた活性画分をRNase H 標品 (酵素液) とした。

耐熱性RNase H 活性は、次の方法により測定した。

ポリ(rA) 及びポリ(dT) (ともにアマシャムファルマシア バイオテック製) 1 mg をそれぞれ1 mM EDTA を含む40 mM トリス-HCl (pH 7.7) 1 ml に溶解し、ポリ(rA) 溶液及びポリ(dT) 溶液を調製した。

次に、4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.003% BSA、4%グリセロールを含む40 mM トリス-HCl (pH 7.7) に、終濃度20 µg/ml となるようポリ(rA) 溶液を、終濃度30 µg/ml となるようポリ(dT) 溶液を加え、37 で10 分間反応後、4 に冷却し、ポリ(rA) - ポリ(dT) 溶液を調製した。

ポリ(rA) - ポリ(dT) 溶液100 µl に酵素液1 µl を加え、40 で10 分間反応させ、0.5 M EDTA 10 µl を加えて反応を停止させた後、260 nm の吸光度を測定した。対照として、上記反応液に0.5 M EDTA 10 µl を加えた後、40 で10 分間反応させ、吸光度を測定した。その後、EDTA 非存在下で反応させ求めた吸光度から対照の吸光度を引いた値 (吸光度差) を求めた。すなわち、酵素反応によってポリ(rA) - ポリ(dT) ハイブリッドから遊離したヌクレオチドの濃度を吸光度差から求めた。RNase H の1 単位は、1 nmol のリボヌクレオチドが遊離したのに相当するA₂₆₀ を10 分間に増加させる酵素量とし、下記の式に従って算出した。なお、酵素液を希釈した場合は、下記式の値を希釈率で補正した。

30

単位 (unit) = [吸光度差 × 反応液量 (ml)] / 0.0152

実施例 2

40

バチルス カルドテナックス RNase H II 遺伝子のクローニング

(1) バチルス カルドテナックス ゲノムDNA の調製

バチルス カルドテナックス YT-G 株 (DSM 406) を60 ml のLB 培地 (1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、pH 7.2) に植菌し、65、20 時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し集菌した。得られた菌体を2 ml の25%ショ糖、50 mM トリス-HCl (pH 8.0) に懸濁し、0.2 ml の10 mg/ml 塩化リゾチーム (ナカライテスク社製) 水溶液を加えて、20 で1 時間反応させた。反応終了後、この反応液に12 ml の150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 mM トリス-HCl (pH 8.0)、0.1 ml の20 mg/ml プロテイナーゼK (宝酒造社製) 及び1 ml の10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37 で1 時間

50

保温した。

次いで2.1mlの5M NaClと2mlのCTAB-NaCl溶液〔10%セチルトリメチルアンモニウムブロミド(ナカライテスク社製)、0.7M NaCl〕を加えてよく混合し、65℃で10分間保温した。これに等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液(24:1、v/v)を加えて10分間緩やかに混合した後、10分間遠心(10000×g)を行った。遠心終了後、得られた上清に等量の100mMトリス-HCl(pH8.0)飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液(25:24:1、v/v)を加えて10分間緩やかに混合した後、更に10分間遠心(10000×g)を行った。遠心終了後、得られた上清に0.6容の2-プロパノールを加え、生じた糸状の沈殿をガラス棒で巻き取った。これを70%エタノール水溶液で洗浄し、風乾した後に0.5mlのTE緩衝液に溶解してゲノムDNA溶液を得た。

10

(2) RNase HII 遺伝子中央部のクローニング

様々な生物由来のRNase HIIのアミノ酸配列の間で保存されている部分の内、モチーフIとモチーフIII〔バイオケミストリー(Biochemistry)、第38巻、第605-608頁(1999)〕をもとにしてオリゴヌクレオチドBsuiI-3(配列番号1)とオリゴヌクレオチドBsuiI-6(配列番号2)を合成した。

上記実施例2-(1)で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNA溶液1μlを鋳型にして、100pmolのBsuiI-3及び100pmolのBsuiI-6をプライマーに用い、100μlの容量でPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラ タック(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94℃で30秒、45℃で30秒、72℃で1分を1サイクルとして、50サイクル行った。反応終了後、反応液にフェノール処理とエタノール沈殿を行ってDNAを精製した。得られたDNAをT4 DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いてDNAの末端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅された約0.4kbのDNA断片をゲルから回収した。得られた約0.4kbのDNA断片を、SmaI(宝酒造社製)で消化したpUC119(宝酒造社製)にT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。

20

この形質転換体を培養し、約0.4kbのDNA断片が挿入されたプラスミド21-12を得た。

(3) RNase HII 遺伝子上流部分のクローニング

30

上記実施例2-(2)で得たプラスミド21-12の約0.4kbの挿入断片の塩基配列を決定し、それをもとにオリゴヌクレオチドRNII-S1(配列番号3)とオリゴヌクレオチドRNII-S2(配列番号4)を合成した。

実施例2-(1)で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNAをBamHI(宝酒造社製)で消化し、得られたBamHI消化物とSau3AIカセット(宝酒造社製)をT4 DNAリガーゼで連結し、これを鋳型としRNII-S2を1次PCRのプライマー、RNII-S1を2次PCRのプライマーとして、タカラ LA PCR インビトロ クローニング キット(宝酒造社製)に添付のプロトコールに従って操作を行った。フェノール処理とエタノール沈殿によって2次PCR液からDNAを精製し、T4 DNAポリメラーゼを用いてこのDNAの末端を平滑化し、その後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅した約1.5kbのDNA断片をゲルから回収した。得られた約1.5kbのDNA断片を、SmaIで消化したpUC119にT4 DNAリガーゼを用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。

40

この形質転換体を培養し、約1.5kbのDNA断片が挿入されたプラスミドB25N16を得た。

(4) RNase HII 遺伝子全域のクローニング

実施例2-(3)で決定したプラスミド21-12の約0.4kbの挿入断片の塩基配列をもとにオリゴヌクレオチドRNII-S5(配列番号5)とオリゴヌクレオチドRNII-S6(配列番号6)を合成した。

実施例2-(2)で調製したプラスミド21-12を鋳型に、RNII-S5とRNII

50

- S 6 をプライマーとして P C R を行った。P C R で の D N A ポリメラーゼはタカラ E x タック (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、P C R は 9 4 で 3 0 秒、5 5 で 3 0 秒、7 2 で 3 0 秒を 1 サイクルとして、2 5 サイクル行った。反応終了後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅した約 0 . 3 k b の D N A 断片をゲルから回収した。得られた約 0 . 3 k b の D N A 断片を D I G ハイプライム (ロシュ ダイアグノスティックス社製) でジゴキシゲニン標識した。

上記のジゴキシゲニン標識 D N A をプローブとして、実施例 2 - (1) で調製したバチルス カルドテナックス ゲノム D N A を H i n d I I I (宝酒造社製)、S a c I (宝酒造社製) による消化、及び H i n d I I I と S a c I の 2 重消化をそれぞれ行い、得られた消化物とサザンハイブリダイゼーションを行った。

10

ハイブリダイゼーションと検出は D I G ルミネッセント デテクションキット (ロシュ ダイアグノスティックス社製) を添付のプロトコールに従って用いた。

その結果、H i n d I I I 消化では約 4 . 5 k b の D N A 断片、S a c I 消化では約 5 . 8 k b の D N A 断片、H i n d I I I と S a c I の 2 重消化では約 1 . 3 k b の D N A 断片がプローブとハイブリダイズした。

上記結果に基づき、バチルス カルドテナックス ゲノム D N A を H i n d I I I 消化してアガロースゲル電気泳動を行い、約 4 . 5 k b 付近の D N A 断片をゲルから回収した。得られた D N A 断片を S a c I で消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、1 . 3 k b 付近の D N A 断片をゲルから回収した。この D N A 断片を、H i n d I I I と S a c I で消化した p U C 1 9 (宝酒造社製) に T 4 D N A リガーゼを用いて連結し、大腸菌 H B 1 0 1 を形質転換した。

20

得られた形質転換体をハイボンド N (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) にレプリカし、上記のジゴキシゲニン標識プローブを用いて、常法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行った。こうして得られた陽性クローンからプラスミド p R H B 1 を調製した。

次に、p R H B 1 に挿入された D N A の塩基配列を決定し、それから予想されるアミノ酸配列を枯草菌の R N a s e H I I のアミノ酸配列と比較したところ、p R H B 1 中の D N A は開始コドンから約 4 0 b p を欠いていることが予想された。そこで以下のようにして完全長の R N a s e H I I 遺伝子を構築した。

実施例 2 - (3) で調製した B 2 5 N 1 6 を H i n d I I I で消化し、アガロースゲル電気泳動を行った後、約 1 6 0 b p の D N A 断片をゲルから回収した。得られた約 1 6 0 b p の D N A 断片を、上記で調製した p R H B 1 の H i n d I I I 消化物に T 4 D N A リガーゼを用いて連結し、大腸菌 H B 1 0 1 を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製した。

30

次に、予想される開始コドン周辺の塩基配列をもとにしてオリゴヌクレオチド R N I I - N d e (配列番号 7) を合成し、上記で得られた形質転換体から調製したプラスミドを鋳型とし、R N I I - N d e と R N I I - S 6 をプライマーとして、P C R を行った。この時に約 0 . 7 k b の D N A 断片が増幅するプラスミドを選択し、このプラスミドを p R H B 1 1 とした。

こうして得られたプラスミド p R H B 1 1 に挿入された D N A 断片の塩基配列を決定した。その結果を解析したところ、R N a s e H I I をコードすると考えられるオープンリーディングフレーム (O p e n r e a d i n g f r a m e ; O R F) が見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号 8 に示す。また、該塩基配列から推定される R N a s e H I I のアミノ酸配列を配列表の配列番号 9 に示す。

40

なお、プラスミド p R H B 1 1 で形質転換された大腸菌 H B 1 0 1 は、E s c h e r i c h i a c o l i H B 1 0 1 / p R H B 1 1 と命名、表示され、平成 1 2 年 9 月 5 日 (原寄託日) より日本国 〒 3 0 5 - 8 5 6 6 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P - 7 6 5 5 として寄託されている。

(5) バチルス カルドテナックス R N a s e H I I 遺伝子の発現

50

p R H B 1 1 又は p R H B 1 で形質転換された大腸菌 H B 1 0 1 を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 5 ml の L B 培地に植菌し、 37°C で 1 晩振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を 0.5 ml の T E 緩衝液に懸濁して超音波破碎し、遠心分離によって上清を得、これを菌体粗抽出液とした。

10 mM トリス - H C l ($\text{pH} 8.0$)、 1 mM D T T (ナカライテスク社製)、 0.003% B S A (フラクシオン V、シグマ社製)、 4% グリセロール、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ポリ (d T) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製)、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ポリ (r A) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を混合し、 37°C で 10 分間保温した。これを R N a s e H 活性を測定するための基質液として使用した。

$100 \mu\text{l}$ の基質液に $1 \mu\text{l}$ の 1 M M n C l ₂ を加えて 40°C で保温し、これに $10 \mu\text{l}$ の 10 倍希釈した菌体粗抽出液を加えて反応を開始した。 40°C で 30 分間反応を行った後、 $10 \mu\text{l}$ の 0.5 M E D T A を加えて反応を停止し、 260 nm における吸光度を測定した。

その結果、p R H B 1 を保持する大腸菌 H B 1 0 1 から調製した菌体粗抽出液で反応させたときに比べて、p R H B 1 1 を保持する大腸菌 H B 1 0 1 から調製した菌体粗抽出液で反応させたときに明らかに 260 nm における吸光度の値が高かった。よって、p R H B 1 1 は R N a s e H I I 遺伝子を含んでおり、この p R H B 1 1 を保持する大腸菌で R N a s e H 活性を発現することが明らかになった。

(6) 精製 R N a s e H I I 標品の調製

実施例 2 - (4) で得られた p R H B 1 1 で形質転換された大腸菌 H B 1 0 1 を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 1 l の L B 培地に植菌し、 37°C で 16 時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を 52.3 ml のソニケーションバッファー [50 mM トリス - H C l ($\text{pH} 8.0$)、 2 mM 2 - メルカプトエタノール、 10% グリセロール、 2 mM フェニルメタンスルフォニルフルオライド] に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を 12000 rpm で 10 分間の遠心分離を行い、得られた上清を 60°C 、15 分間の熱処理にかけた。その後、再度 12000 rpm で 10 分間の遠心分離を行い、上清を集め、 50.0 ml の熱処理上清液を得た。

この溶液をバッファー C [50 mM トリス - H C l ($\text{pH} 8.0$)、 2 mM 2 - メルカプトエタノール、 10% グリセロール] で平衡化した R E S O U R S E Q カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、R N a s e H I I は R E S O U R S E Q カラムを素通りした。

素通りした R N a s e H I I 画分 51 ml をバッファー C で平衡化した R E S O U R S E S カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システムを用いて $0 \sim 500 \text{ mM}$ N a C l 直線濃度勾配により溶出し、約 240 mM N a C l のところに溶出された R N a s e H I I 画分を得た。

この R N a s e H I I 画分 3.0 ml を 2 回に分けて 50 mM N a C l を含むバッファー C で平衡化した P D - 10 カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、得られた溶出液 7.0 ml を 50 mM N a C l を含むバッファー C で平衡化した H i T r a p - h e p a r i n カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システムを用いて $50 \sim 550 \text{ mM}$ N a C l 直線濃度勾配により溶出し、約 310 mM N a C l のところに溶出された R N a s e H I I 画分を得た。

この R N a s e H I I 画分 4.4 ml をセントリコン - 10 (アミコン社製) を用いた限外ろ過により濃縮し、 $280 \mu\text{l}$ の濃縮液を 100 mM N a C l、 0.1 mM E D T A を含む 50 mM トリス - H C l ($\text{pH} 8.0$) で平衡化した S u p e r d e x 200 ゲルろ過カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、R N a s e H I I は、 35 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、R N a s e H I I が 1 量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出された R N a s e H I I を B c a R N a s e H I I 標品とした。

上記で得られた B c a R N a s e H I I 標品を用いて、以下の方法により酵素活性を測定

10

20

30

40

50

した。

B c a R N a s e H I I 標品 1 μ l に 40 ° であらかじめインキュベーションした反応液〔20 mM ヘプス - 水酸化カリウム (pH 7.8)、0.01% 牛血清アルブミン (宝酒造社製)、1% ジメチルスルホキシド、10 mM 塩化マンガン、20 μ g / ml ポリ (d T) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製)、30 μ g / ml ポリ (r A) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製)〕100 μ l を添加し、40 ° で10分間反応させた後、0.5 M E D T A (pH 8.0) 10 μ l で反応を停止し、260 nm の吸光度を測定した。

その結果、B c a R N a s e H I I 標品にR N a s e H 活性が認められた。

実施例 3

10

バチルス カルドテナックス R N a s e H I I 遺伝子のクローニング

(1) R N a s e H I I 遺伝子断片のクローニング

バチルス サブチリス (B a c i l l u s s u b t i l i s) のR N a s e H I I のアミノ酸配列〔O t a n i N ら、バイオケミストリー、第38巻、第605 - 608頁 (1999)〕について、他の生物由来のR N a s e H I I のアミノ酸配列とのホモロジーを調べ、これらの間でよく保存されている領域のアミノ酸配列からR N a s e H I I をコードする遺伝子を探索するためのプライマー B s u I I I - 1 (配列番号10)、B s u I I I - 3 (配列番号11)、B s u I I I - 6 (配列番号12)、B s u I I I - 8 (配列番号13) を合成した。

実施例 2 - (1) で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNA 200 ng を鋳型にし、100 pmol のB s u I I I - 1 及び100 pmol のB s u I I I - 8 をプライマーにして、50 μ l の容量で1回目のPCRを行った。更にその反応液1 μ l を鋳型として100 pmol のB s u I I I - 3 及び100 pmol のB s u I I I - 6 をプライマーに用いて100 μ l の容量で2回目のPCRを行った。この2回のPCRでのDNAポリメラーゼには、タカラタック (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、1回目のPCRは94 ° で30秒、45 ° で30秒、72 ° で1分を1サイクルとして、25サイクル行い、2回目は30サイクル行なった。

20

増幅して得られた約450 bp のDNA断片をT4 DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いて末端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約450 bp のDNA断片を回収した。得られた約450 bp のDNA断片を、S m a I (宝酒造社製) で消化したp U C 1 1 9 (宝酒造社製) にT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製) を用いて連結し、大腸菌J M 1 0 9 を形質転換した。

30

形質転換体を培養し、約450 bp のDNA断片が挿入されたプラスミドp B C A 3 2 0 4 を得た。

(2) サザンハイブリダイゼーション法によるR N a s e H I I 遺伝子のクローニング
実施例 3 - (1) で得られたp B C A 3 2 0 4 に挿入されたDNA断片の塩基配列を決定し、得られた配列もとにプライマーR N I I I - S 3 (配列番号14) 及びB c a R N I I I - 3 (配列番号15) を合成した。このプライマーR N I I I - S 3 及びB c a R N I I I - 3 を用いて、p B C A 3 2 0 4 を鋳型にし、100 μ l の容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラZ タック (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、PCRは98 ° で0秒、55 ° で0秒、72 ° で20秒を1サイクルとして、30サイクル行なった。反応終了後、フェノール-クロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行った。そして、アガロースゲル電気泳動を行い、約0.4 kb のDNA断片をゲルから回収した。得られた約0.4 kb のDNA断片をD I G DNA 標識キット (ベーリンガー マンハイム社製) で標識し、プローブを調製した。

40

実施例 2 - (1) で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNA 20 μ g をB a m H I、E c o R I、H i n d I I I、P s t I、X b a I (すべて宝酒造社製) で、それぞれ完全消化した後、その半分量をアガロース電気泳動した。アガロースゲルからDNAを0.4 N N a O H をもちいてナイロンメンブレンにトランスファーした後、120 ° で30分間固定した。次に、メンブレンを30 ml のハイブリダイゼーションバッ

50

アー〔43.4 g/l 塩化ナトリウム、17.6 g/l クエン酸ナトリウム、1%ブロッキング剤（ベーリンガー マンハイム社製）、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）〕の入ったシールドバック中で、60、4時間ブレインキュベーションした後、プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー5 mlの入ったシールドバック中で、60、16時間インキュベーションした。

次に、メンブランを50 mlの0.1% SDSをふくむ2×SSC（17.5 g/l NaCl、7.7 g/l クエン酸ナトリウム）中、室温で2回、50 mlの0.1% SDSを含む0.5×SSC（4.4 g/l 塩化ナトリウム、1.9 g/l クエン酸ナトリウム）中、45で2回洗浄した後、DIG核酸検出キット（ベーリンガー マンハイム社製）を用いて、プローブと相補的な配列を持った約8 kbのEcoRI断片、約4.5 kbのPstI断片、約1 kbのHindIII断片を検出した。

10

PstIで完全消化したパチルス カルドテナックス ゲノムDNAの残り半分をアガロース電気泳動し、約4.5 kbのPstI断片をゲルから回収した。次に、このDNA断片と、PstI消化した後アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）を用いて脱リン酸化したプラスミドベクターpTV119Nとをライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換した。

プライマーRNIII-S3及びBcaRNIII-3を用いて、コロニーを鋳型にし、50 µlの容量でPCRを行ない、RNaseHIII遺伝子を持つと考えられるコロニーを選択した。このPCRには、タカラZタック（宝酒造社製）を添付のプロトコールに従って用い、PCRは98で0秒、55で0秒、72で20秒を1サイクルとして、30サイクル行った。この結果、No.88のコロニーに目的の遺伝子が含まれていることがわかった。

20

次に、このNo.88のコロニーからプラスミドを調製し、これを鋳型にプライマーRV-N（宝酒造社製）およびBcaRNIII-3又はプライマーM4（宝酒造社製）及びRNIII-S3を用いてPCRを行い、RNaseHIII遺伝子の全長が含まれているかどうかを調べた。その結果、増幅産物の鎖長よりRNaseHIIIの全長が含まれていることが予想された。このプラスミドをpBCA3P88とした。

（3）RNaseHIII遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

実施例3-（2）で得られたプラスミドpBCA3P88の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

30

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNaseHIIIのN末端アミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号16に、また、該塩基配列から推定されるRNaseHIIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号17にそれぞれ示す。

（4）RNaseHIIIを発現させるためのプラスミドの構築

実施例3-（2）に記載のプラスミドpBCA3P88を鋳型にし、上記で得られたRNaseHIIIのオープンリーディングフレームの周辺の配列を参考として設定したBcaRNIIIInde（配列番号18）及びM13プライマーM4（宝酒造社製）を用いて、100 µlの容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはパイロベストDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94で30秒、55で30秒、72で3分を1サイクルとして、30サイクル行った。この結果増幅した約4 kbのDNA断片をNdeI（宝酒造社製）で消化し、アガロース電気泳動を行い、約1.4 kbのNdeI断片をゲルから回収した。得られた約1.4 kbのDNA断片を、NdeI消化した後アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）を用いて脱リン酸化したpTV119Nd（pTV119NのNcoIサイトをNdeIサイトに変換したもの）とライゲーションを行い、大腸菌JM109を形質転換した。

40

次に、NdeI断片中のRNaseHIII遺伝子がpTV119Ndベクターのlacプロモーター下流につながったプラスミドをスクリーニングするため、コロニーを鋳型にし、プライマーRV-N（宝酒造社製）およびBcaRNIII-3（配列番号15）を用いて、50 µlの容量でPCRを行ない、RNaseHIII遺伝子を持つと考えられ

50

るコロニーを選択した。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラZタック（宝酒造社製）を添付のプロトコールに従って用い、PCRは98 で0秒、55 で0秒、72 で20秒を1サイクルとして、30サイクル行った。この結果、No. 2のコロニーがNdeI断片中のRNaseHIII遺伝子がpTV119Ndベクターのlacプロモーター下流につながったプラスミドを持つことが分かり、このプラスミドをpBCA3Nd2とした。

さらに該プラスミド中の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法で確認したところ、開始コドンがGTGからATGに変換したこと以外、PCRに起因する変異のないことを確認した。

なお、プラスミドpBCA3Nd2で形質転換された大腸菌JM109は、Escherichia coli JM109/pBCA3Nd2と命名、表示され、平成12年9月5日（原寄託日）より日本国特305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7653として寄託されている。 10

（5）精製RNaseHIII標品の調製

実施例3-（4）で得られたpBCA3Nd2で形質転換された大腸菌JM109を100μg/mlのアンピシリンを含む2lのLB培地に植菌し、37 で16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を39.6mlのソニケーションバッファ（50mMトリス-HCl（pH8.0）、1mM EDTA、2mMフェニルメタンスルフォニルフルオリド）に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を60 、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpmで10分間の遠心分離を行い、上清を集め、39.8mlの熱処理上清液を得た。 20

この熱処理上清液をバッファA（50mMトリス-HCl（pH8.0）、1mM EDTA）で平衡化したRESOURCE Qカラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、FPLCシステム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。

素通りしたRNaseHIII画分45mlをバッファB（50mMトリス-HCl（pH7.0）、1mM EDTA）2lを外液として、2時間の透析を3回行なった。透析後の酵素液55.8mlをバッファBで平衡化したRESOURCE Sカラム（ファルマシア ファルマシア バイオテク社製）に供し、FPLCシステムを用いて0~500mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、約105mM NaClのところに溶出されたRNaseHIII画分を得た。 30

この画分7.0mlにNaCl濃度が150mMになるように1M NaClを含むバッファBを添加し、150mM NaClを含むバッファBで平衡化したHiTrap-heparinカラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供した。その結果、RNaseHIIIはHiTrap-heparinカラムを素通りした。

素通りしたRNaseHIII画分7.5mlをセントリコン-10（ミリポア社製）を用いた限外ろ過により濃縮し、190μlの濃縮液を100mM NaCl、0.1mM EDTAを含む50mMトリス-HCl（pH7.0）で平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、同じバッファで溶出を行った結果、RNaseHIIIは、33キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNaseHIIIが1量体として存在する場合に相当する。 40

こうして溶出されたRNaseHIIIをBcaRNaseHIII標品とした。

上記で得られたBcaRNaseHIII標品を用いて、以下の方法により酵素活性を測定した。

BcaRNaseHIII標品1μlに40 であらかじめインキュベーションした反応液（20mMヘペス-水酸化カリウム（pH7.8）、0.01%牛血清アルブミン（宝 50

酒造社製)、1%ジメチルスルホキシド、4 mM酢酸マグネシウム、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリ(dT)(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリ(rA)(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)] 100 μl を添加し、40 で10分間反応させた後、0.5 M EDTA (pH 8.0) 10 μl で反応を停止し、260 nmの吸光度を測定した。

その結果、BcaRNaseHIII標品にRNaseH活性が認められた。

実施例 4

ピロコッカス フリオサスのRNaseHIII遺伝子のクローニング

(1) ピロコッカス フリオサス ゲノムDNAの調製

トリプトン(ディフコラボラトリーズ社製) 1%、酵母エキス(ディフコラボラトリーズ社製) 0.5%、可溶性でんぷん(ナカライテスク社製) 1%、ジャマリンス・ソリッド(ジャマリンスラボラトリー社製) 3.5%、ジャマリンス・リキッド(ジャマリンスラボラトリー社製) 0.5%、 MgSO_4 0.003%、 NaCl 0.001%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%、 CoSO_4 0.0001%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%、 ZnSO_4 0.0001%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1 ppm、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 0.1 ppm、 H_3BO_4 0.1 ppm、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 ppm、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 ppmの組成の培地2 lを2 l容のメジウムボトルにいれ、120、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹き込み、溶存酸素を除去し、これにピロコッカス フリオサス(*Pyrococcus furiosus*、ドイツ ザムルンク フォン ミクロオルガニスムより購入: DSM 3638)を接種して、95、16時間静置培養した後、遠心分離によって菌体を得た。

次に、得られた菌体を4 mlの25%ショ糖、50 mMトリス-HCl (pH 8.0)に懸濁し、0.4 mlの10 mg/ml塩化リゾチーム(ナカライテスク社製)水溶液を加えて、20 で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に24 mlの150 mM NaCl 、1 mM EDTA、20 mMトリス-HCl (pH 8.0)、0.2 mlの20 mg/mlプロテイナーゼK(宝酒造社製)及び2 mlの10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37 で1時間保温した。

反応終了後、フェノール-クロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約1 mgのゲノムDNAを調製した。

(2) RNaseHIII遺伝子のクローニング

ピロコッカス ホリコシ(*Pyrococcus horikoshii*)の全ゲノム配列が公開されており[Kawarabayashi, Yら、DNA リサーチ(DNA Research)、第5巻、第55-76頁(1998)]、RNaseHIIIのホモログをコードする遺伝子(PH1650)が1つ存在することが明らかになっている(配列番号19、日本国 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 ホームページ: <http://www.nite.go.jp/>)。

そこで、このPH1650遺伝子(配列番号19)と一部公開されているピロコッカス フリオサスのゲノム配列(University of Utah, Utah Genome Center ホームページ: <http://www.genome.utah.edu/sequence.html>)でホモロジー検索をおこなった。その結果、非常にホモロジーの高い配列が見つかった。

得られた配列をもとにプライマー1650Nde(配列番号20)及び1650Bam(配列番号21)を合成した。

実施例4-(1)で得たピロコッカス フリオサスDNA 200 ngを鋳型にして、20 pmolの1650Nde及び20 pmolの1650Bamをプライマーに用い、100 μl の容量でPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラExタック(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94 で30秒、55 で30秒、72 で1分を1サイクルとし、30サイクルを行った。増幅した約0.7 kbのDNA断片をNdeI及びBamHI(ともに宝酒造社製)で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpET3a(ノバジェン社製)のNdeI及びBamHI間に組込ん

10

20

30

40

50

だプラスミド p P F U 2 2 0 を作製した。

(3) R N a s e H I I 遺伝子を含む D N A 断片の塩基配列の決定

実施例 4 - (2) で得られた p P F U 2 2 0 の挿入 D N A 断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、R N a s e H I I をコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号 2 2 に示す。また、該塩基配列から推定される R N a s e H I I のアミノ酸配列を配列表の配列番号 2 3 に示す。

なお、プラスミド p P F U 2 2 0 で形質転換された大腸菌 J M 1 0 9 は、E s c h e r i c h i a c o l i J M 1 0 9 / p P F U 2 2 0 と命名、表示され、平成 1 2 年 9 月 5 日 (原寄託日) より日本国テ 3 0 5 - 8 5 6 6 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P - 7 6 5 4 として寄託されている。

(4) 精製 R N a s e H I I 標品の調製

実施例 4 - (2) で得られた p P F U 2 2 0 で大腸菌 H M S 1 7 4 (D E 3) (ノバジェン社製) を形質転換し、得られた p P F U 2 2 0 を含む大腸菌 H M S 1 7 4 (D E 3) を 1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを含む 2 l の L B 培地に植菌し、37℃ で 1 6 時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を 6 6 . 0 m l のソニケーションバッファー [5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) 、1 m M E D T A 、2 m M フェニルメタンスルフォニルフルオライド] に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間の遠心分離を行い、得られた上清を 8 0 、1 5 分間の熱処理にかけた。その後、再度 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分の遠心分離を行い、上清を集め、6 1 . 5 m l の熱処理上清液を得た。

この熱処理上清液をバッファー A [5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) 、1 m M E D T A] で平衡化した R E S O U R S E Q カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、R N a s e H I I は R E S O U R S E Q カラムを素通りした。

素通りした R N a s e H I I 画分 6 0 . 0 m l をバッファー A で平衡化した R E S O U R S E S カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システムを用いて 0 ~ 5 0 0 m M N a C l 直線濃度勾配により溶出し、約 1 5 0 m M N a C l のところに溶出された R N a s e H I I 画分を得た。

この R N a s e H I I 画分 2 . 0 m l をセントリコン - 1 0 (ミリポア社製) を用いた限外ろ過により濃縮し、2 5 0 μ l の濃縮液を 1 0 0 m M N a C l 、0 . 1 m M E D T A を含む 5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) で平衡化した S u p e r d e x 2 0 0 ゲルろ過カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、R N a s e H I I は、1 7 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、R N a s e H I I が 1 量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出された R N a s e H I I を P f u R N a s e H I I 標品とした。

上記で得られた P f u R N a s e H I I 標品を用いて、実施例 3 - (5) に記載の方法により酵素活性を測定した結果、P f u R N a s e H I I 標品に R N a s e H 活性が認められた。

実施例 5

サーモトガ マリティマ R N a s e H I I 遺伝子のクローニング

(1) サーモトガ マリティマ ゲノム D N A の調製

トリプトン 1 % 、酵母エキス 0 . 5 % 、可溶性でんぷん 1 % 、ジャマリン S ・ソリッド 3 . 5 % 、ジャマリン S ・リキッド 0 . 5 % 、M g S O ₄ 0 . 0 0 3 % 、N a C l 0 . 0 0 1 % 、F e S O ₄ ・ 7 H ₂ O 0 . 0 0 0 1 % 、C o S O ₄ 0 . 0 0 0 1 % 、C a C l ₂ ・ 7 H ₂ O 0 . 0 0 0 1 % 、Z n S O ₄ 0 . 0 0 0 1 % 、C u S O ₄ ・ 5 H ₂ O 0 . 1 p p m 、K A l (S O ₄) ₂ 0 . 1 p p m 、H ₃ B O ₃ 0 . 1 p p m 、N

10

20

30

40

50

$a_2 MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1 ppm、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.25 ppmの組成の培地2 lを2 l容のメディウムボトルにいれ、120、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹き込み、溶存酸素を除去し、これにサーモトガ マリティマ (*Thermotoga maritima*、ドイッチェ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルツレン GmbHより購入: DSM3109) を接種して、85、16時間静置培養した。

次に、遠心分離によって培地300 ml相当分の菌体を集め、3 mlのTE緩衝液〔10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA〕に懸濁し、150 μ lの10% ラウリル硫酸ナトリウム (ナカライテスク社製) 水溶液及び15 μ lの20 mg/ml プロテイナーゼK (宝酒造社製) を加えて37 で1時間保温した。

反応終了後、0.5 mlの5 M NaClを加えてよく混合した後、0.4 mlのCTAB-NaCl溶液〔10%セチルトリメチルアンモニウムブロミド (ナカライテスク社製)、0.7 M NaCl〕を加えてよく混合し、65 で10分間保温した。これに1.5 mlのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液(24:1、v/v)を加えて10分間緩やかに混合した後、5分間遠心(20000 $\times$ g)を行った。遠心終了後、得られた上清に等量の100 mM トリス-HCl (pH 8.0) 飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液(25:24:1、v/v)を加えて10分間緩やかに混合した後、更に5分間遠心(20000 $\times$ g)を行った。遠心終了後、得られた上清に0.6容の2-プロパノールを加え、5分間遠心(10000 $\times$ g)して得られた沈殿を、70%エタノール水溶液で洗浄し、風乾した後に200 μ lのTEに溶解してゲノムDNA溶液を得た。

(2) RNase HII 遺伝子のクローニング

サーモトガ マリティマ ゲノムDNAを鋳型としたPCRを行うことによりRNase HII 遺伝子を含む増幅DNA断片を得るため、サーモトガ マリティマ ゲノムDNAの塩基配列(<http://www.tigr.org/tdb/CMR/btm/htmls/SplashPage.html>)のうちRNase HII 遺伝子と同定されている部分の塩基配列をもとにして、オリゴヌクレオチド915-F1(配列番号24)、915-F2(配列番号25)、915-R1(配列番号26)及び915-R2(配列番号27)を合成した。

上記実施例5-(1)で調製したサーモトガ マリティマ ゲノムDNAを鋳型として、915-F1と915-R1、915-F1と915-R2、915-F2と915-R1又は915-F2と915-R2をプライマー対とし、それぞれPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラE×タック(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは95 で0.5分、55 で0.5分、72 で1.5分を1サイクルとして、25サイクル行った。反応終了後、各PCR反応物をアガロースゲル電気泳動に供し、約0.7 kbの増幅されたDNA断片を抽出精製した。

915-F1と915-R1及び915-F1と915-R2のプライマー対で増幅したDNAはHindIIIとXbaI(ともに宝酒造社製)で消化し、HindIIIとXbaIで消化したpUC19(宝酒造社製)にT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。

この形質転換体を培養し、約0.7 kbのDNA断片が挿入されたプラスミドDNAを調製した。その結果、915-F1と915-R1から増幅したDNA断片が挿入されたプラスミドNo.1とNo.2、915-F1と915-R2から増幅したDNAが挿入されたプラスミドNo.3とNo.4を得た。

また、915-F2と915-R1及び915-F2と915-R2のプライマー対で増幅したDNAをNcoI(宝酒造社製)とXbaIで2重消化し、NcoIとXbaIで2重消化したpTV119N(宝酒造社製)にT4 DNAリガーゼを用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。

この形質転換体を培養し、約0.7 kbのDNA断片が挿入されたプラスミドDNAを調製した。その結果、915-F2と915-R1から増幅したDNA断片が挿入されたプ

10

20

30

40

50

ラスミドNo. 5とNo. 6、915-F2と915-R2から増幅したDNAが挿入されたプラスミドNo. 7を得た。

なお、プラスミドNo. 7で形質転換された大腸菌JM109は、*Escherichia coli* JM109/pTM-RNHと命名、表示され、平成12年9月5日（原寄託日）より日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7652として寄託されている。

（3）サーモトガ マリティマ RNase HII 遺伝子の発現

プラスミドNo. 1～7又はpUC19で形質転換された大腸菌JM109を100μg/mlのアンピシリンを含む5mlのLB培地（トリプトン10g/l、酵母エキス5g/l、NaCl 5g/l、pH7.2）に植菌し、37℃で振盪培養した。660nmにおける吸光度が0.5になったときに終濃度が1mMになるようにイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを加え、更に1晩振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって菌体を集め、1mlのTE緩衝液に懸濁し、超音波破碎した。これを80℃で10分間熱処理し、遠心によって得た上清を菌体粗抽出液とした。

得られた菌体粗抽出液を用いて、実施例2-（5）に記載の方法で吸光度を測定した。その結果、pUC19を保持する大腸菌JM109から調製した粗抽出液で反応させたときに比べて、プラスミドNo. 3、5、6及び7を保持する大腸菌JM109から調製した菌体粗抽出液は、MnCl₂存在下で反応させたとき、明らかに260nmにおける吸光度の値が高かった。よって、プラスミドNo. 3、5、6及び7はRNase HII 遺伝子を含んでおり、これらのプラスミドを保持する大腸菌でRNase H活性を発現することが明らかになった。

こうして大腸菌内でRNase H活性が発現していることが明らかとなったプラスミドに挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNase HIIをコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号58に示す。また、該塩基配列から推定されるRNase HIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号59に示す。このプラスミドNo. 7に挿入されたDNA断片の塩基配列にはPCR時に生じたと思われる塩基置換が1箇所みとめられ、その箇所のアミノ酸残基が変化していることが分かった。

（4）精製RNase HII 標品の調製

実施例5-（2）で得られたプラスミドNo. 7（プラスミドpTM-RNH）で大腸菌JM109を形質転換し、得られたpTM-RNHを含む大腸菌JM109を100μg/mlのアンピシリンを含む1lのLB培地に植菌し、37℃で16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を31.0mlのソニケーションバッファー（50mMトリス-HCl（pH8.0）、2mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール、2mMフェニルメタンスルフォニルフルオリド）に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を70℃、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpm、10分の遠心分離を行い、上清を集め、32.0mlの熱処理上清液を得た。

この熱処理上清液をバッファーC（50mMトリス-HCl（pH8.0）、2mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール）で平衡化したRESOURCE Qカラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、FPLCシステム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNase HIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。

素通りしたRNase HII画分32.5mlをバッファーCで平衡化したRESOURCE Sカラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、FPLCシステムを用いて0～500mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、約240mM NaClのところに溶出されたRNase HII画分を得た。

このRNase HII画分2.0mlを50mM NaClを含むバッファーCで平衡化

10

20

30

40

50

したPD-10カラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、得られた溶出液3.5mlを50mM NaClを含むバッファーCで平衡化したHiTrap-heparinカラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、FPLCシステムを用いて50～550mM NaCl直線濃度勾配により溶出した。その結果、約295mM NaClのところに溶出されたRNaseHII画分を得た。

このようにして溶出されたRNaseHIIをTmaRNaseHII標品とした。

上記で得られたTmaRNaseHII標品を用いて、実施例2-（6）に記載の方法で酵素活性を測定した結果、TmaRNaseHII標品にRNaseH活性が認められた。

実施例 6

ピロコッカス ホリコシイのRNaseHII遺伝子のクローニング

（1）ピロコッカス ホリコシイ ゲノムDNAの調製

トリプトン（ディフコラボラトリーズ社製）1%、酵母エキス（ディフコラボラトリーズ社製）0.5%、可溶性でんぷん（ナカライテスク社製）1%、ジャマリンS・ソリッド（ジャマリンラボラトリー社製）3.5%、ジャマリンS・リキッド（ジャマリンラボラトリー社製）0.5%、MgSO₄ 0.003%、NaCl 0.001%、FeSO₄・7H₂O 0.0001%、CoSO₄ 0.0001%、CaCl₂・7H₂O 0.0001%、ZnSO₄ 0.0001%、CuSO₄・5H₂O 0.1ppm、KAl(SO₄)₂ 0.1ppm、H₃BO₄ 0.1ppm、Na₂MoO₄・2H₂O 0.1ppm、NiCl₂・6H₂O 0.25ppmの組成の培地2lを2l容のメジウムボトルにいれ、120、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹き込み、溶存酸素を除去し、これにピロコッカス ホリコシイOT3（Pyrococcus horikoshii、理化学研究所より購入：JCM9974）を接種して、95、16時間静置培養した後、遠心分離によって菌体を得た。

次に、得られた菌体を4mlの25%ショ糖、50mMトリス-HCl（pH8.0）に懸濁し、0.4mlの10mg/ml塩化リゾチーム（ナカライテスク社製）水溶液を加えて、20で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に24mlの150mM NaCl、1mM EDTA、20mMトリス-HCl（pH8.0）、0.2mlの20mg/mlプロテイナーゼK（宝酒造社製）及び2mlの10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37で1時間保温した。

反応終了後、フェノール-クロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約1mgのゲノムDNAを調製した。

（2）RNaseHII遺伝子のクローニング

ピロコッカス ホリコシイ（Pyrococcus horikoshii）は全ゲノム配列が公開されており〔DNA リサーチ（DNA Research）、第5巻、第55-76頁（1998）〕、RNaseHIIのホモログをコードする遺伝子（PH1650）が1つ存在することが明らかになっている（配列番号28、日本国 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 ホームページ：<http://www.nite.go.jp/>）。

そこで、このPH1650遺伝子（配列番号28）の配列をもとにプライマーPhoNde（配列番号29）及びPhoBam（配列番号30）を合成した。

実施例6-（1）で得たピロコッカス ホリコシイDNA 100ngを鋳型にして、20pmolのPhoNdeNde及び20pmolのPhoBamをプライマーに用い、100μlの容量でPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラExタック（宝酒造社製）を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94で30秒、55で30秒、72で1分を1サイクルとし、40サイクル行った。増幅した約0.7kbのDNA断片をNdeI及びBamHI（ともに宝酒造社製）で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpET3a（ノバジェン社製）のNdeI及びBamHI間に組込んだプラスミドpPHO238を作製した。

（3）RNaseHII遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

10

20

30

40

50

実施例 6 - (2) で得られた p P H O 2 3 8 の挿入 D N A 断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、R N a s e H I I をコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号 3 1 に示す。また、該塩基配列から推定される R N a s e H I I のアミノ酸配列を配列表の配列番号 3 2 に示す。

なお、プラスミド p P H O 2 3 8 で形質転換された大腸菌 J M 1 0 9 は、E s c h e r i c h i a c o l i J M 1 0 9 / p P H O 2 3 8 と命名、表示され、平成 1 3 年 2 月 2 2 日 (原寄託日) より日本国〒 3 0 5 - 8 5 6 6 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P - 7 6 9 2 として寄託されている。

10

(4) 精製 R N a s e H I I 標品の調製

実施例 6 - (2) で得られた p P H O 2 3 8 で大腸菌 H M S 1 7 4 (D E 3) (ノバジェン社製) を形質転換し、得られた p P H O 2 3 8 を含む大腸菌 H M S 1 7 4 (D E 3) を 1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを含む 1 l の L B 培地に植菌し、37 で 1 6 時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を 3 4 . 3 m l のソニケーションバッファー [5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) 、1 m M E D T A 、2 m M フェニルメタンスルフォニルフルオリド] に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間の遠心分離を行い、得られた上清を 8 0 、1 5 分間の熱処理にかけた。その後、再度 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分の遠心分離を行い、上清を集め、3 3 . 5 m l の熱処理上清液を得た。

20

この熱処理上清液をバッファー A [5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) 、1 m M E D T A] で平衡化した R E S O U R S E Q カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、R N a s e H I I は R E S O U R S E Q カラムを素通りした。

素通りした R N a s e H I I 画分 3 5 . 0 m l ををバッファー B [5 0 m M トリス - H C l (p H 7 . 0) 、1 m M E D T A] 2 L を外液として、2 時間の透析を 3 回行なった。透析後の酵素液 3 4 . 5 m l をバッファー B で平衡化した R E S O U R S E S カラム (ファルマシア ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システムを用いて 0 ~ 5 0 0 m M N a C l 直線濃度勾配により溶出し、約 1 5 5 m M N a C l のところに溶出された R N a s e H I I 画分を得た。

30

この画分 4 . 0 m l に N a C l 濃度が 5 0 m M になるようにバッファー B を添加し、5 0 m M N a C l を含むバッファー B で平衡化した H i T r a p - h e p a r i n カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、F P L C システムを用いて 5 0 ~ 5 5 0 m M N a C l 直線濃度勾配により溶出した。その結果、約 1 6 0 m M N a C l のところに溶出された R N a s e H I I 画分を得た。

この R N a s e H I I 画分 6 . 9 m l をセントリコン - 1 0 (ミリポア社製) を用いた限外ろ過により濃縮し、2 5 0 μ l の濃縮液を 2 回に分けて 1 0 0 m M N a C l 、0 . 1 m M E D T A を含む 5 0 m M トリス - H C l (p H 7 . 0) で平衡化した S u p e r o s e 6 ゲルろ過カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、R N a s e H I I は、2 4 . 5 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、R N a s e H I I が 1 量体として存在する場合に相当する。

40

こうして溶出された R N a s e H I I を P h o R N a s e H I I 標品とした。

上記で得られた P h o R N a s e H I I 標品を用いて、実施例 3 - (5) に記載の方法により酵素活性を測定した結果、P h o R N a s e H I I 標品に R N a s e H 活性が認められた。

実施例 7

アルカエオグロバス フルギダスの R N a s e H I I 遺伝子のクローニング

50

(1) アルカエオグロバス フルギダス ゲノムDNAの調製

アルカエオグロバス フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*、ドイッチェ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクツレン GmbHより購入: DSM 4139) 8ml相当分の菌体を集め、100μlの25%ショ糖、50mMトリス-HCl (pH 8.0) に懸濁し、20μlの0.5M EDTA、10μlの10mg/ml塩化リゾチーム (ナカライテスク社製) 水溶液を加えて、20で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に800μlの150mM NaCl、1mM EDTA、20mMトリス-HCl (pH 8.0)、10μlの20mg/mlプロテイナーゼK (宝酒造社製) 及び50μlの10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37で1時間保温した。反応終了後、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿、風乾した後に50μlのTEに溶解してゲノムDNA溶液を得た。

10

(2) RNase HII 遺伝子のクローニング

アルカエオグロバス フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*) は全ゲノム配列が公開されており [Klenk, HPら、ネイチャー (Nature)、第390巻、第364-370頁 (1997)]、RNase HII のホモログをコードする遺伝子 (AF0621) が1つ存在することが明らかになっている (配列番号33、<http://www.tigr.org/tdb/CMR/btm/htmls/SplashPage.html>)。

そこで、このAF0621遺伝子 (配列番号33) の配列をもとにプライマーAfunde (配列番号34) 及びAfubam (配列番号35) を合成した。

20

実施例7-(1) で得たアルカエオグロバス フルギダス 30ngを鋳型にして、20pmolのAfunde及び20pmolのAfubamをプライマーに用い、100μlの容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはパイロベストDNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94で30秒、55で30秒、72で1分を1サイクルとし、40サイクル行った。増幅した約0.6kbのDNA断片をNdeI及びBamHI (ともに宝酒造社製) で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpTV119Nd (pTV119NのNcoIサイトをNdeIサイトに変換したもの) のNdeI及びBamHI間に組込んだプラスミドpAFU204を作製した。

(3) RNase HII 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

30

実施例7-(2) で得られたpAFU204の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNase HII をコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号36に示す。また、該塩基配列から推定されるRNase HII のアミノ酸配列を配列表の配列番号37に示す。

なお、プラスミドpAFU204で形質転換された大腸菌JM109は、*Escherichia coli* JM109/pAFU204と命名、表示され、平成13年2月22日 (原寄託日) より日本国特305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7691として寄託されている。

40

(4) 精製RNase HII 標品の調製

実施例7-(2) で得られたpAFU204で大腸菌JM109を形質転換し、得られたpAFU204を含む大腸菌JM109を100μg/mlのアンピシリンを含む2lのLB培地に植菌し、37で16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を37.1mlのソニケーションバッファー (50mMトリス-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA、2mMフェニルメタンスルフォニルフルオリド) に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を70、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpmで10分の遠心分離を行い、上清を集め、40.3mlの熱処理上清液を得た。

50

この熱処理上清液をバッファーA〔50 mM トリス - HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA〕で平衡化したRESOURCE Qカラム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNase HIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。

バッファーAで平衡化したRESOURCE Sカラム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNase HIIはRESOURCE Sカラムを素通りした。

素通りしたRNase HII画分40.0 mlを50 mM NaClを含むバッファーB〔50 mM トリス - HCl (pH 7.0)、1 mM EDTA〕2 lを外液として、2時間の透析を3回行なった。透析後の酵素液40.2 mlを50 mM NaClを含むバッファーBで平衡化したHitrap-heparinカラム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)に供し、FPLCシステムを用いて50 ~ 550 mM NaCl直線濃度勾配により溶出した。その結果、約240 mM NaClのところに溶出されたRNase HII画分を得た。

このRNase HII画分7.8 mlをセントリコン-10(ミリポア社製)を用いた限外ろ過により濃縮し、約600 µlの濃縮液を4回に分けて100 mM NaCl、0.1 mM EDTAを含む50 mM トリス - HCl (pH 7.0)で平衡化したSuperose 6ゲルろ過カラム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、RNase HIIは、30.0 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNase HIIが1量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出されたRNase HIIをAfuRNase HII標品とした。

上記で得られたAfuRNase HII標品を用いて、実施例3-(5)に記載の方法により酵素活性を測定した結果、AfuRNase HII標品にRNase H活性が認められた。

実施例 8

サーモコッカス リトラリス RNase HII遺伝子のクローニング

(1) サーモコッカス リトラリス ゲノムDNAの調製 30

サーモコッカス リトラリス(Thermococcus litoralis、ドイツ ゼムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルツレン GmbH より購入: DSM 5473) 11 ml相当分の菌体を集め、500 µlの25% ショ糖、50 mM トリス - HCl (pH 8.0)に懸濁し、100 µlの0.5 M EDTA、50 µlの10 mg/ml 塩化リゾチーム(ナカライテスク社製)水溶液を加えて、20で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に4 mlの150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 mM トリス - HCl (pH 8.0)、50 µlの20 mg/ml プロテイナーゼK(宝酒造社製)及び250 µlの10% ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37で1時間保温した。反応終了後、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿、風乾した後に100 µlのTEに溶解してゲノムDNA溶液を得た。 40

(2) RNase HII遺伝子中央部のクローニング

様々な耐熱性RNase HIIのアミノ酸配列の間で保存されている部分をもとにしてオリゴヌクレオチドRN-F1(配列番号38)とオリゴヌクレオチドRN-R0(配列番号39)を合成した。

上記実施例8-(1)で調製したサーモコッカス リトラリス ゲノムDNA溶液5 µlを鋳型にして、100 pmolのRN-F1及び100 pmolのRN-R0をプライマーに用い、100 µlの容量でPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラタック(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94で30秒、45で30秒、72で1分を1サイクルとして、50サイクル行った。反応終了後、マイクロコン-100(宝酒造社製)で、プライマーを除去すると同時に濃縮した。 50

(3) RNase HII 遺伝子上流および下流部分のクローニング

上記実施例 8 - (2) で得た約 0.5 kb の断片 T l i F 1 R 0 の塩基配列を決定し、それをもとに上流をクローニングするための特異的なオリゴヌクレオチド T l i R N - 1 (配列番号 40) と下流をクローニングするための特異的なオリゴヌクレオチド T l i R N - 2 (配列番号 41) を合成した。さらに、表 1 に示す 48 種類のプライマーを合成した。表 1 中のタグ配列を配列表の配列番号 60 に示す。

表 1

5' - タグ配列 - NN - S S S S S S S - 3'

(N ; G、A、T、C のミックス、S は下記に示す塩基配列である。)

番号	塩基配列	番号	塩基配列	番号	塩基配列
1	ggagcag	19	gtaacgg	37	gcgcaag
2	ggcaaag	20	gtaagcg	38	gcgcttg
3	ggcaacg	21	gtacacg	39	gcggacg
4	ggcacag	22	gtagacg	40	gcgtaag
5	ggcattg	23	gtagcgg	41	gctacgg
6	ggccaag	24	gtcaacg	42	gctcacg
7	ggccttg	25	gcaccag	43	gctccag
8	ggctaag	26	gcagacg	44	gcttgcg
9	ggctacg	27	gcagcag	45	gcttggg
10	ggctcag	28	gcatggg	46	ggacacg
11	ggctttg	29	gccaaag	47	ggaccag
12	gggacag	30	gccacag	48	ggagacg
13	gggcaag	31	gccattg		
14	gggcttg	32	gccaag		
15	gggtacg	33	gcccttg		
16	ggtaacg	34	gcctacg		
17	ggtacgg	35	gcctcag		
18	ggtagcg	36	gcctttg		

実施例 8 - (1) で調製したサーモコッカス リトラリス ゲノム DNA 溶液 1 μl を鋳型にして 20 pmol の T l i R N - 1 または 20 pmol の T l i R N - 2 と各 20 pmol の表 1 記載の 48 種類のプライマーとの組み合わせで 20 mM トリス酢酸 (pH 8.5)、50 mM 酢酸カリウム、3 mM 酢酸マグネシウム、0.01% BSA、各 30 μM dNTP 混合物、2.5 単位の タカラ Ex Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を含む反応液中で PCR をおこなった。PCR は 94 で 3 分インキュベートした後、98 で 10 秒、50 で 10 秒、72 で 40 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。得られた PCR 産物の一部をアガロース電気泳動し、シングルバンドになったもの

10

20

30

40

50

を選び出し、それらの反応液をマイクロコン - 100 (宝酒造社製) で、プライマーを除去すると同時に濃縮し、ダイレクトシーケンスをおこない、RNase HII の上流または下流を含む断片をスクリーニングした。その結果、約 450 bp の PCR 増幅断片 T1iN7 に RNase HII 遺伝子の上流が、約 600 bp の PCR 増幅断片 T1iC25、約 400 bp の PCR 増幅断片 T1iC26 に下流が含まれていることがわかった。

(4) RNase HII 遺伝子全域のクローニング

T1iRNase HII を含む遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号 42 に示す。また、該塩基配列から推定される RNase HII のアミノ酸配列を配列表の配列番号 43 に示す。上記塩基配列をもとにプライマー T1iNde (配列番号 44) 及び T1iBam (配列番号 45) を合成した。

実施例 8 - (1) で得たサーモコッカス リトラリス ゲノム DNA 溶液 1 µl を鋳型にして、20 pmol の T1iNde 及び 20 pmol の T1iBam をプライマーに用い、100 µl の容量で PCR を行なった。PCR での DNA ポリメラーゼは ExTaq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、PCR は 94 で 30 秒、55 で 30 秒、72 で 1 分を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。増幅した約 0.7 kb の DNA 断片を NdeI 及び BamHI (ともに宝酒造社製) で消化し、得られた DNA 断片をプラスミドベクター pTV119Nd (pTV119N の NcoI サイトを NdeI サイトに変換したもの) または pET3a (ノバジェン社製) の NdeI 及び BamHI 間に組み込み、プラスミド pTLI223Nd および pTLI204 を作製した。

(5) RNase HII 遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列の決定

実施例 8 - (4) で得られた pTLI223Nd および pTLI204 の挿入 DNA 断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNase HII をコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。pTLI204 のオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号 46 に示す。また、該塩基配列から推定される RNase HII のアミノ酸配列を配列表の配列番号 47 に示す。pTLI223Nd のオープンリーディングフレームの塩基配列は、pTLI204 とくらべて 484 番目の T が C に置きかわっていた。また、アミノ酸配列では 162 番目のフェニルアラニンがロイシンに置きかわっていた。

なお、プラスミド pTLI204 で形質転換された大腸菌 HMS174 (DE3) は、Escherichia coli HMS174 (DE3) / pTLI204 と命名、表示され、平成 13 年 2 月 22 日 (原寄託日) より日本国特 305 - 8566 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP - 7693 として寄託されている。

(6) サーモコッカス リトラリス RNase HII 遺伝子の発現

pTLI223Nd で形質転換された大腸菌 JM109 を 100 µg/ml のアンピシリンおよび 1 mM IPTG を含む 10 ml の LB 培地に植菌し、37 で 1 晩振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を 196 µl のバッファー A に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を 12000 rpm で 10 分間の遠心分離を行い、得られた上清を 70 、10 分間の熱処理にかけた。その後、再度 12000 rpm で 10 分の遠心分離を行い、上清を集め、熱処理上清液を得た。同様に pTLI204 で形質転換された大腸菌 HMS174 (DE3) を 100 µg/ml のアンピシリンを含む 10 ml の LB 培地に植菌し、37 で 1 晩振盪培養し、培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を上記の方法で処理し、熱処理上清液を得た。

上記で得られた熱処理上清液を、実施例 3 - (5) に記載の方法により酵素活性を測定した結果、いずれの形質転換体においても RNase H 活性が認められた。すなわち、塩基配列あるいはアミノ酸配列において置換があった場合でも本発明のポリヌクレオチドの活性があることが確認できた。

(7) 精製 RNase HII 標品の調製

実施例 8 - (4) で得られた p T L I 2 2 3 N d で大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換し、得られた p T L I 2 2 3 N d を含む大腸菌 J M 1 0 9 を 1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを含む 2 l の L B 培地に植菌し、37 で 1 6 時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を 3 8 . 7 m l のソニケーションバッファー〔 5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) 、 1 m M E D T A 、 2 m M フェニルメタンスルフォニルフルオライド〕に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間の遠心分離を行い、得られた上清を 7 0 、 1 5 分間の熱処理にかけた。その後、再度 1 2 0 0 0 r p m で 2 0 分の遠心分離を行い、上清を集め、37 . 2 m l の熱処理上清液を得た。

この熱処理上清液をバッファー A〔 5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) 、 1 m M E D T A〕で平衡化した R E S O U R S E Q カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、 F P L C システム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、R N a s e H I I は R E S O U R S E Q カラムを素通りした。

10

バッファー A で平衡化した R E S O U R S E S カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、 F P L C システム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いて 0 ~ 5 0 0 m M N a C l 直線濃度勾配により溶出した。その結果、約 2 2 0 m M N a C l のところに溶出された R N a s e H I I 画分を得た。

この R N a s e H I I 画分 3 m l に N a C l 濃度が 5 0 m M になるようにバッファー A を添加し、 5 0 m M N a C l を含むバッファー A で平衡化した H i T r a p - h e p a r i n カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、 F P L C システムを用いて 5 0 ~ 5 5 0 m M N a C l 直線濃度勾配により溶出した。その結果、約 3 2 0 m M N a C l のところに溶出された R N a s e H I I 画分を得た。

20

この R N a s e H I I 画分 6 m l をセントリコン - 1 0 (ミリポア社製) を用いた限外ろ過により濃縮し、約 1 9 8 μ l の濃縮液を 1 0 0 m M N a C l 、 0 . 1 m M E D T A を含む 5 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) で平衡化した S u p e r o s e 6 ゲルろ過カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、R N a s e H I I は、 2 6 . 5 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、R N a s e H I I が 1 量体として存在する場合に相当する。こうして溶出された R N a s e H I I を T l i R N a s e H I I 標品とした。

上記で得られた T l i R N a s e H I I 標品を用いて、実施例 3 - (5) に記載の方法により酵素活性を測定した結果、T l i R N a s e H I I 標品に R N a s e H 活性が認められた。

30

実施例 9

サーモコッカス セラー R N a s e H I I 遺伝子のクローニング

(1) サーモコッカス セラー ゲノム DNA の調製

サーモコッカス セラー (T h e r m o c o c c u s c e l e r 、ドイツェ ザムリンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクツレン G m b H より購入 : D S M 2 4 7 6) 1 1 m l 相当分の菌体を集め、実施例 8 - (1) の記載の方法によりゲノム DNA 溶液を得た。

(2) R N a s e H I I 遺伝子中央部のクローニング

40

様々な耐熱性 R N a s e H I I のアミノ酸配列の間で保存されている部分をもとにしてオリゴヌクレオチド R N - F 1 (配列番号 4 8) とオリゴヌクレオチド R N - R 0 (配列番号 4 9) を合成した。

上記実施例 9 - (1) で調製したサーモコッカス セラー ゲノム DNA 溶液 5 μ l を鋳型にして、 1 0 0 p m o l の R N - F 1 及び 1 0 0 p m o l の R N - R 0 をプライマーに用い、 1 0 0 μ l の容量で P C R を行った。P C R での DNA ポリメラーゼはタカラタック (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、P C R は 9 4 で 3 0 秒、 4 5 で 3 0 秒、 7 2 で 1 分を 1 サイクルとして、 5 0 サイクル行った。反応終了後、増幅して得られた約 5 0 0 b p の DNA 断片を T 4 DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いて末端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅された約 5 0 0 b p の D N

50

A断片を回収した。得られた約500bp DNA断片を、Sma I (宝酒造社製)で消化したpUC119 (宝酒造社製)にT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製)を用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。

形質転換体を培養し、約500bpのDNA断片が挿入されたプラスミドpTceF1R0を得た。

(3) RNase HII 遺伝子上流および下流部分のクローニング

上記実施例9-(2)で得られたプラスミドpTceF1R0塩基配列を決定し、それをもとに上流をクローニングするための特異的なオリゴヌクレオチドTceRN-1 (配列番号50)と下流をクローニングするための特異的なオリゴヌクレオチドTceRN-2 (配列番号51)を合成した。

実施例9-(1)で調製したサーモコッカス セラー ゲノムDNA溶液1μlを鋳型にして20pmolのT1iRN-1または20pmolのT1iRN-2と各20pmolの48種類のプライマー (実施例8表1記載)との組み合わせで20mMトリス酢酸 (pH8.5)、50mM酢酸カリウム、3mM酢酸マグネシウム、0.01%BSA、各30μMdNTP混合物、2.5単位のタカラExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)を含む反応液中でPCRをおこなった。PCRは94 で3分インキュベートした後、98 で10秒、50 で10秒、72 で40秒を1サイクルとし、40サイクル行った。得られたPCR産物のうちシングルバンドになったものを選び出し、それらの反応液をマイクロコン-100 (宝酒造社製)で、プライマーを除去すると同時に濃縮し、ダイレクトシーケンスをおこない、RNase HIIの上流または下流を含む断片をスクリーニングした。その結果、約450bpのPCR増幅断片TceN24にRNase HII遺伝子上流が、約400bpのPCR増幅断片TceC29に下流が含まれていることがわかった。

(4) RNase HII 遺伝子全域のクローニング

TceRNase HIIを含む遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号52に示す。また、該塩基配列から推定されるRNase HIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号53に示す。上記塩基配列をもとにプライマーTceNde (配列番号54)及びTceBam (配列番号55)を合成した。

実施例9-(1)で得たサーモコッカス セラー ゲノムDNA溶液1μlを鋳型にして、20pmolのTceNde及び20pmolのTceBamをプライマーに用い、100μlの容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはパイロベストDNAポリメラーゼ (宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94 で30秒、55 で30秒、72 で1分を1サイクルとし、40サイクル行った。増幅した約0.7kbのDNA断片をNde I及びBamH I (ともに宝酒造社製)で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpTV119Nd (pTV119NのNco IサイトをNde Iサイトに変換したもの)またはpET3a (ノバジェン社製)のNde I及びBamH I間に組込み、プラスミドpTCE265NdおよびpTCE207を作製した。

(5) RNase HII 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

実施例9-(4)で得られたpTCE265NdおよびpTCE207の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNase HIIをコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。pTCE207のオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号56に示す。また、該塩基配列から推定されるRNase HIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号57に示す。pTCE265Ndのオープンリーディングフレームの塩基配列は、pTCE207とくらべて14番目のAがGに置きかわっており、693から696番目が欠失していた。また、アミノ酸配列では5番目のグルタミン酸がグリシンに置きかわっており、231番目のフェニルアラニンが欠失していた。

なお、プラスミドpTCE207で形質転換された大腸菌HMS174 (DE3)は、E

10

20

30

40

50

scherichia coli HMS174 (DE3) / pTCE207と命名、表示され、平成13年2月22日(原寄託日)より日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7694として寄託されている。

(6) サーモコッカス セラー RNaseHII遺伝子の発現

pTCE265Ndで形質転換された大腸菌JM109を100 µg/mlのアンピシリンおよび1 mM IPTGを含む10 mlのLB培地に植菌し、37 °Cで1晩振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を203 µlのバッファーAに懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000 rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を70 °C、10分間の熱処理にかけた。その後、再度12000 rpmで10分の遠心分離を行い、上清を集め、熱処理上清液を得た。同様にpTCE207で形質転換された大腸菌HMS174 (DE3)を100 µg/mlのアンピシリンを含む10 mlのLB培地に植菌し、37 °Cで1晩振盪培養し、培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を上記の方法で処理し、熱処理上清液を得た。

上記で得られた熱処理上清液を、実施例3-(5)に記載の方法により酵素活性を測定した結果、いずれの形質転換体においてもRNaseH活性が認められた。すなわち、塩基配列あるいはアミノ酸配列において置換、欠失があった場合でも本発明のポリヌクレオチドの活性があることが確認できた。

(7) 精製RNaseHII標品の調製

実施例9-(4)で得られたpTCE265Ndで大腸菌JM109を形質転換し、得られたpTCE265Ndを含む大腸菌JM109を100 µg/mlのアンピシリンを含む2 lのLB培地に植菌し、37 °Cで16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を39 mlのソニケーションバッファー〔50 mM トリス-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、2 mMフェニルメタンサルフォニルフルオライド〕に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000 rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を70 °C、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000 rpmで20分の遠心分離を行い、上清を集め、37.5 mlの熱処理上清液を得た。

この熱処理上清液をバッファーA〔50 mM トリス-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA〕で平衡化したRESOURCE Qカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。

バッファーAで平衡化したRESOURCE Sカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)を用いて0~500 mM NaCl直線濃度勾配により溶出した。その結果、約220 mM NaClのところに溶出されたRNaseHII画分を得た。

このRNaseHII画分3 mlにNaCl濃度が50 mMになるようにバッファーAを添加し、50 mM NaClを含むバッファーAで平衡化したHiTrap-heparinカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、FPLCシステムを用いて50~550 mM NaCl直線濃度勾配により溶出した。その結果、約415 mM NaClのところに溶出されたRNaseHII画分を得た。

このRNaseHII画分6 mlをセントリコン-10を用いた限外ろ過により濃縮し、約178 µlの濃縮液を100 mM NaCl、0.1 mM EDTAを含む50 mM トリス-HCl (pH 8.0)で平衡化したSuperose 6ゲルろ過カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、RNaseHIIは、29.5 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNaseHIIが1量体として存在する場合に相当する。こうして溶出されたRNaseHIIをTceRNaseHII標品とした。

上記で得られたTceRNaseHII標品を用いて、実施例3-(5)に記載の方法により酵素活性を測定した結果、TceRNaseHII標品にRNaseH活性が認めら

10

20

30

40

50

れた。

実施例 10

実施例 2 から実施例 9 において得られたバチルス カルドテナックス (以下 B C A とする)、ピロコッカス フリオサス (P F U)、サーモトガ マリティマ (T M A)、アルカエオグロバス フルギダス (A F U)、サーモコッカス リトラリス (T L I)、サーモコッカス セラー (T C E)、ピロコッカス ホリコシイ (P H O) のアミノ酸配列と塩基配列について、ホモロジー検索を行なった。検索プログラムは、DNA S I S - M a c (宝酒造社製) の M a x i m u m M a t c h i n g とコンピュータアルゴリズム F A S T A (バージョン 3.0; パーソン (P e a r s o n, W. R.) ら、P r o. N a t l. A c a d. S c i., 85: 2444 - 2448, 1988) で算出した。

まず、DNA S I S により P F U に対する P H O、A F U、T L I、T C E のアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 69%、45%、65%、58%、塩基配列の相同性はそれぞれ 68%、60%、65%、61% であった。

次にコンピュータアルゴリズム F A S T A で遺伝子データベースを P H O、A F U、T M A に関して検索した。その結果、P H O のアミノ酸配列に対して、リボヌクレアーゼであると推定されているアミノ酸配列で最も相同性の高かったものは 70%、最も低かったものは 20% の相同性を有していた。また、A F U とは 50%、T M A とは 35% の相同性を有していた。同様に、A F U のアミノ酸配列に対して行なったところ、高かったものは 50%、低かったものは 25%、T M A とは 32% の相同性を有していた。同様に、T M A のアミノ酸配列に対して行なったところ、高かったものは 52%、低かったものは 22% の相同性を有していた。

コンピュータアルゴリズム B L A S T で遺伝子データベースを B C A、P F U、T C E、T L I に関して検索した。その結果、B C A のリボヌクレアーゼ H I I のアミノ酸配列に対して、リボヌクレアーゼであると推定されているアミノ酸配列で最も相同性の高かったものは 43%、B C A のリボヌクレアーゼ H I I I のアミノ酸配列で 46% であった。同様に、P F U のアミノ酸配列では 68%、T C E のアミノ酸配列では 70%、T L I のアミノ酸配列では 64% であった。

また、DNA S I S によって P H O と A F U のアミノ酸配列の相同性を調べたところ 50% であった。上記のようにコンピュータアルゴリズム F A S T A でも 50% であったため、DNA S I S とコンピュータアルゴリズム F A S T A では相同性として表示される数値に大きな違いがないことがわかった。

実施例 11

各種 R N a s e H の作用機作と性質

(1) B c a R N a s e H I I I の作用機作

B c a R N a s e H I I I と E. c o l i R N a s e H I の切断様式を比較するため以下のように基質を調製した。大腸菌 O 157 熱抽出物を鋳型に 3' 側から 3 塩基が R N A である 5' 端 F I T C 標識キメラプライマー V T 2 - R 280N3 - I 7 (配列番号 61) と DNA プライマー V T 2 - F 110 (配列番号 62) を用いて P C R を行い、2 本鎖の一方の鎖に R N A を 3 つ含む DNA 断片を得た。P C R 産物よりマイクロコン - 100 (ミリポア社製) によりプライマーを除去して R N a s e H による切断の基質とした。次に、上記の基質 0.3 p m o l を含む反応バッファー (20 m M H e p e s - K O H (p H 7.8)、1% ジメチルスルホオキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、100 m M 酢酸カリウム、4 m M 酢酸マグネシウム、0.002% プロピレンジアミン) 39.2 μ l を調製した。これに E. c o l i R N a s e H I 30 U / μ l (宝酒造社製) または、実施例 3 - (5) で得られた B c a R N a s e H I I I 精製標品をバッファー A で 10 倍希釈した溶液を 0.8 μ l 加え、55 で 5 分間及び 10 分間で反応した。反応後、反応液の 2 μ l を 10% 変性アクリルアミドゲルで電気泳動し、切断された DNA 断片のサイズを確認した。

E. c o l i R N a s e H I の場合、18 b a s e と 19 b a s e の位置にシグナルが現われ、経時的に 19 b a s e のシグナルは減少した。また、プライマーが完全に除けて

いないために現われる 20 base のバックグランドも経時的に減少した。一方、Bca RNase H I I I の場合、19 base の位置にシグナルが現われ、プライマーのバックグランドの減少は見られなかった。

以上のことより、E. coli RNase H I は、2ヶ所のRNA間で切断した。また、3'側のRNAの5'側を切断した後、RNAがDNAに結合しない状態で、さらに3'側のRNAの5'側を切断する活性を有すると考えられる。一方、Bca RNase H I I I は3'側のRNAの5'側のみを切断し、RNAの3'側にDNAが結合していない時には切断しないと考えられる。E. coli RNase H I に比べ切断位置の選択性が高いと考えられる。

(2) Pfu、Pho、Afu RNase H I I の作用機作

Pfu (パイロコッカス フリオサス)、Pho (パイロコッカス ホリコシイ)、Afu (アルカエオグロバス フルギダス) のRNase H I I の切断様式を解析するため、以下のように基質を調製した。大腸菌O157熱抽出物を鋳型に3'側から3塩基がRNAである5'端FITC標識キメラプライマーVT2-IF20N3 (配列番号63)、2塩基がRNAである5'端FITC標識キメラプライマーVT2-IF19N2 (配列番号64)、1塩基がRNAである5'端FITC標識キメラプライマーVT2-IF18N1 (配列番号65) とDNAプライマーVT2IR20 (配列番号66) を用いてPCRを行い、2本鎖の一方の鎖にRNAを3つ、2つ、あるいは、1つ含むDNA断片、VFN3、VFN2、VFN1を得た。これらのPCR産物よりマイクロコン-100によりプライマーを除去してRNase Hによる切断の基質とした。

次に、上記の基質0.3 pmolを含む反応バッファー(20 mM Hepes-KOH (pH 7.8)、1% ジメチルスルホオキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、100 mM 酢酸カリウム、4 mM 酢酸マグネシウム、0.002% プロピレンジアミン) 39 µl を調製した。これに、各RNase Hの精製標品37.2 U/µlを1 µl 加え、55 °Cで5分間及び10分間反応した。反応後、反応液の2 µlを10%変性アクリルアミドゲルで電気泳動し、切断されたDNA断片のサイズを確認した。

VFN3を基質にした場合、Pfu、Pho、AfuのRNase H I I Iに関して、19 baseの位置にシグナルが得られ、VFN2を基質にした場合、Pfu、Pho、AfuのRNase H I I Iに関して、18 baseの位置にシグナルが得られ、VFN1を基質にした場合、Pfu、PhoのRNase H I I Iに関して、17 baseの位置にシグナルが得られた。

以上のことより、Pfu、Pho、AfuのRNase H I I Iは3'側のRNAの5'側を切断した。PfuとPhoのRNase H I I IはRNAが1つの場合でもRNAの5'側を切断した。RNAが1つでも切断するRNase Hは報告されていない。切断された場合のシグナル強度はRNAの数にかかわらず同様の強さを示し、RNAの数による切断効率に差がないことが示された。また、一旦現われたシグナルが経時的に減少したり、さらに短いシグナルが現われないことより、RNAの3'側にDNAが結合していないと切断されないことが示された。

(3) BcaとTma RNase H I I のイオン要求性

実施例1で記載したRNase H活性測定法においてMn²⁺要求性でMg²⁺では全く活性を示さないBca RNase H I I IとTma RNase H I I Iに関して、実施例11-(2)に記載のVFN3を基質としてMg²⁺あるいは、Mn²⁺存在下での切断を比較した。

基質0.3 pmolを含む反応バッファー(20 mM Hepes-KOH (pH 7.8)、1% ジメチルスルホオキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、100 mM 酢酸カリウム、4 mM 酢酸マグネシウム、0.002% プロピレンジアミン) 39.2 µl 及び、基質0.3 pmolを含むMn²⁺反応バッファー(20 mM Hepes-KOH (pH 7.8)、1% ジメチルスルホオキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、100 mM 酢酸カリウム、10 mM 塩化マンガン、0.002% プロピレンジアミン) 39.2 µl を調製した。これらにE. coli RNase H I 30 U/µl (

10

20

30

40

50

宝酒造社製)または、実施例2-(6)で得られたBca RNaseHII精製標品をバッファーAで10倍希釈した溶液、または、実施例5-(3)で得られたTma RNaseHII菌体粗抽出液をバッファーAで25倍希釈した溶液を0.8μl加え、55で5分間及び10分間で反応した。反応後、反応液の2μlを10%変性アクリルアミドゲルで電気泳動し、切断されたDNA断片のサイズを確認した。

Bca RNaseHIIとTma RNaseHIIに関して、ともにMg²⁺、Mn²⁺存在下のどちらにおいても19baseの位置にシグナルが現われた。そのシグナルレベルは同レベルであった。

実施例1記載のRNaseH活性測定法では全く活性を示さないMg²⁺存在下でBca RNaseHIIとTma RNaseHIIはMn²⁺の場合と同等の切断活性を示した。

10

以上のことより、基質の形状によっては切断にMn²⁺を要求せず、Mg²⁺でも代替可能であり、Mn²⁺やMg²⁺を要求する酵素と同一反応液で作用させられる可能性が示された。

(4) RNaseHの耐熱性の検討

バチルス カルドテナックス RNaseHとして実施例2-(5)、実施例3-(4)で得られたpRHB11、pBCA3Nd2、ピロコッカス フリオサス RNaseHとして実施例4-(2)で得られたpPFU220、サーモトガ マリティマ RNaseHとして実施例5-(2)で得られたpTM-RNH、ピロコッカス ホリコシイ RNaseHとして実施例6-(2)で得られたpPHO238、アルカエオグロバス フルギダス RNaseHとして実施例7-(2)で得られたpAFU204、サーモコッカス リトラリス RNaseHとして実施例8-(4)で得られたpTLI204、pTLI223Nd、サーモコッカス セラー RNaseHとして実施例9-(4)で得られたpTCE207、pTCE265Ndでそれぞれ形質転換された大腸菌を用いて耐熱性を調べた。すなわち、上記大腸菌を培養し、培養液から調製した素酵素抽出液を60、15分の条件で熱処理を行ない、実施例1と同様の方法でRNaseH活性を調べた。その結果、どの菌株由来のRNaseHにおいてもRNaseH活性が確認できた。

20

産業上の利用の可能性

本発明により、遺伝子工学において利用価値の高いRNaseH活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする遺伝子ならびに該ポリペプチドの遺伝子工学的製造方法を提供される。また、本発明のRNaseHは耐熱性を有しており、工業的に有利なRNaseHの製造方法も提供される。

30

本発明によって、さまざまな用途で本発明のRNaseHを用いることが可能となった。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1: PCR primer BsuII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:2: PCR primer BsuII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:3: PCR primer RNII-S1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Bacillus caldotenax*.

10

SEQ ID NO:4: PCR primer RNII-S2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:5: PCR primer RNII-S5 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:6: PCR primer RNII-S6 for cloning a gene encoding a

polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:7: PCR primer RNII-Nde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:10: PCR primer BsuIII-1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:11: PCR primer BsuIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

10

SEQ ID NO:12: PCR primer BsuIII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:13: PCR primer BsuIII-8 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:14: PCR primer RNIII-S3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

20

SEQ ID NO:15: PCR primer BcaRNIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:18: PCR primer BcaRNIIINde for amplifying a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:20: PCR primer 1650Nde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Pyrococcus furiosus*.

30

SEQ ID NO:21: PCR primer 1650Bam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Pyrococcus furiosus*.

SEQ ID NO:24: PCR primer 915-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO:25: PCR primer 915-F2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Thermotoga maritima*.

40

SEQ ID NO:26: PCR primer 915-R1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO:27: PCR primer 915-R2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO:29: PCR primer PhoNde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Pyrococcus horikoshii*.

SEQ ID NO:30: PCR primer PhoBam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Pyrococcus horikoshii*.

SEQ ID NO:34: PCR primer AfuNde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Archaeoglobus fulgidus*.

SEQ ID NO:35: PCR primer AfuBam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Archaeoglobus fulgidus*.

10

SEQ ID NO:38: PCR primer RN-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*.

SEQ ID NO:39: PCR primer RN-R0 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*.

SEQ ID NO:40: PCR primer TliRN-1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*.

20

SEQ ID NO:41: PCR primer TliRN-2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*.

SEQ ID NO:44: PCR primer TliNde for amplifying a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*.

SEQ ID NO:45: PCR primer TliBam for amplifying a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Thermococcus litoralis*.

30

SEQ ID NO:48: PCR primer RN-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus celer*.

SEQ ID NO:49: PCR primer RN-R0 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus celer*.

SEQ ID NO:50: PCR primer TceRN-1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus celer*.

40

SEQ ID NO:51: PCR primer TceRN-2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermococcus celer*.

SEQ ID NO:54: PCR primer TceNde for amplifying a gene encoding a

polypeptide having a RNaseHIII activity from *Thermococcus celer*.

SEQ ID NO:55: PCR primer TceBam for amplifying a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Thermococcus celer*.

SEQ ID NO:61: Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-R280N3-I 7 for amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "Nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

10

SEQ ID NO:62: Designed oligonucleotide primer as VT2-F110 for amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157.

SEQ ID NO:63: Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-IF20N3 for amplifying a VFN3 from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "Nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

20

SEQ ID NO:64: Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-IF19N2 for amplifying VFN2 from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "Nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:65: Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-IF18N1 for amplifying a VFN1 from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "Nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

30

SEQ ID NO:66: Designed oligonucleotide primer as VT21R20 for amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Thermostable ribonuclease H

<130> 662774

10

<150> JP 2000-280785

<151> 2000-09-14

<150> JP 2001-64074

<151> 2001-03-07

20

<160> 66

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

40

<400> 1

gtcgccagcg cagtnathyt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

10

<400> 2

cggtccctcg tcacyttngc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> PCR primer RNII-S1 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

30

<400> 3

cgcgcttttc cggcgtcagc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> PCR primer RNII-S2 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

<400> 4

acggcgcacg cttcaatttg 20

<210> 5

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-S5 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

20

<400> 5

acgcctatatt gccggggctt . 20

<210> 6

30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-S6 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

40

<400> 6

atgaccgacg cagcggcgat 20

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-Nde for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from *Bacillus caldotenax*

10

<400> 7

tagaagaggg agaggcatat gaagcggat acggtgaaa 39

<210> 8

<211> 780

<212> DNA

<213> *Bacillus caldotenax*

20

<400> 8

atgaagcgg atacggtgaa agacattgaa gcgtgcttc cgaagcttgg cgcggacgac 60
ccgcgctggg agatgctgcg gcaggatgag cgaaaaagcg tgcaggcgct tcttgeccgt 120
tttgaaaggc agaaagcgcg ccggcacgcc atcgagcagc ggtgggaaga actaatgcgt 180
tatgagaggg aactatacgc cgctggcggt agacggatcg ccggcattga tgaggccggg 240
cgcgccccgc tggccggccc ggtcgtcgcc gccgcgggtca tcttgccgaa agacgcctat 300
ttgccggggc ttgacgaact gaagcggctg acgccggaaa agcgcgagge attgtttgcg 360
caaattgaag cgtgcgccgt cgccatcggc atcgccatcg tcagcgcggc ggagatcgat 420
gaaaggaata ttacgaagc gacaaggcaa gcgatggcga aagcggtgaa cgccttttcc 480
ccgccgcctg aacatttgct tgttgatgcg atggcggtgc cgtgcccact gcgcgaacag 540
cgccataa aaggagacgc caacagcgct tcaatgccg ctgcgtcggc catcgccaaa 600

30

40

gtgacgcgcg accggtggat gaaagaactg gatcgccgct atccacaata cgggttcgeg 660
 cgccatatgg gctacggaac gcggaacat ttcgaggcga tccgccgcta cggcgttacg 720
 cctgagcacc gtcgttcgtt cgcaccggtg agggaggtgc tgaaggcgag cgagcagctc 780

<210> 9

<211> 260

<212> PRT

<213> Bacillus caldotenax

10

<400> 9

Met Lys Arg Tyr Thr Val Lys Asp Ile Glu Ala Leu Leu Pro Lys

1 5 10 15

Leu Gly Ala Asp Asp Pro Arg Trp Glu Met Leu Arg Gln Asp Glu

20

20 25 30

Arg Lys Ser Val Gln Ala Leu Leu Ala Arg Phe Glu Arg Gln Lys

35 40 45

Ala Arg Arg His Ala Ile Glu Gln Arg Trp Glu Glu Leu Met Arg

50 55 60

Tyr Glu Arg Glu Leu Tyr Ala Ala Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly

30

65 70 75

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

80 85 90

Ala Ala Val Ile Leu Pro Lys Asp Ala Tyr Leu Pro Gly Leu Asp

95 100 105

Asp Ser Lys Arg Leu Thr Pro Glu Lys Arg Glu Ala Leu Phe Ala

40

110 115 120

Gln Ile Glu Ala Cys Ala Val Ala Ile Gly Ile Gly Ile Val Ser

125 130 135

Ala Ala Glu Ile Asp Glu Arg Asn Ile Tyr Glu Ala Thr Arg Gln

140	145	150
Ala Met Ala Lys Ala Val Asn Ala Leu Ser Pro Pro Pro Glu His		
155	160	165
Leu Leu Val Asp Ala Met Ala Val Pro Cys Pro Leu Pro Gln Gln		
170	175	180
Arg Leu Ile Lys Gly Asp Ala Asn Ser Ala Ser Ile Ala Ala Ala		
185	190	195
Ser Val Ile Ala Lys Val Thr Arg Asp Arg Trp Met Lys Glu Leu		
200	205	210
Asp Arg Arg Tyr Pro Gln Tyr Gly Phe Ala Arg His Met Gly Tyr		
215	220	225
Gly Thr Pro Glu His Phe Glu Ala Ile Arg Arg Tyr Gly Val Thr		
230	235	240
Pro Glu His Arg Arg Ser Phe Ala Pro Val Arg Glu Val Leu Lys		
245	250	255
Ala Ser Glu Gln Leu		
260		

10

20

<210> 10

30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuIII-1 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

40

<400> 10

ggtaaggtct tgttcargg 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

10

<400> 11

ggaaccggag attayttygg 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> PCR primer BsuIII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

30

<400> 12

atgattgaag cagcngcnac 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> PCR primer BsuIII-8 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

<400> 13

gtattggcga aatgnarytt 20

10

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> PCR primer RNIII-S3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

<400> 14

cccgatcgtc gtcgcegcgcg 20

30

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> PCR primer BcaRNIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

<400> 15

gatacgtgga cactttccgc 20

<210> 16

<211> 915

<212> DNA

<213> *Bacillus caldotenax*

10

<400> 16

gtgattcaag ccgaccaaca gctgcttgac gccttgcgcg cccactacca agacgcctta 60

tccgaccggc ttccggctgg agcgttgttt gccgtcaagc gcccggtatgt cgtcatcacc 120

gcctaccgct caggcaaagt gctgtttcaa gggaaagcgg cggagcaaga agcagcgaaa 180

tggatatcag gggcgagcgc ctcaaacgaa acagctgacc accagccgtc cgttttgga 240

20

gctcatcaac tcgggtctct ttccgccatc ggttcgatg aagtggcac cggcgattat 300

ttcggccoga tcgtcgtcgc cgcgcctac gtggatcggc cgcatacgc caaatcgcg 360

gcgcttggcg tgaaagattc gaaacaattg aacgatgagg caatcaaacg gatcgcccc 420

gccatcatgg aaaccgtgcc gcatgcggtc accgtgttgg acaatgcga atacaaccgc 480

tggcagcgaa gcggcatgcc gcagacgaaa atgaaagcgc tcttcacaa ccggacgctc 540

gtgaaactcg ttgacgcat cgcgccgcc gaaccagaag caatcatcat cgacgaattt 600

30

ttaaaacggg attcgtattt ccgttacctt tccgatgaag atcgattat ccgcgagcgg 660

gtgcactgcc ttcccaaggc ggaaagtgtc cacgtatcag tcgccgcgc ctcgatcacc 720

gcccgctatg tgtttttaga ggagatggag caattatccc gcgcgctcg cctcctgctt 780

ccaaaaggcg ccggcgccat tgtcgatgaa gccgcggcca acatcatccg cgcgcggggg 840

gcggaagcgc ttgagacatg cgccaagott catttcgcca atacaaaaaa ggcgctggac 900

atcgccaaac gccgg 915

40

<210> 17

<211> 305

<212> PRT

<213> *Bacillus caldotenax*

<400> 17

Met Ile Gln Ala Asp Gln Gln Leu Leu Asp Ala Leu Arg Ala His	
1 5 10 15	
Tyr Gln Asp Ala Leu Ser Asp Arg Leu Pro Ala Gly Ala Leu Phe	
20 25 30	10
Ala Val Lys Arg Pro Asp Val Val Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gly	
35 40 45	
Lys Val Leu Phe Gln Gly Lys Ala Ala Glu Gln Glu Ala Ala Lys	
50 55 60	
Trp Ile Ser Gly Ala Ser Ala Ser Asn Glu Thr Ala Asp His Gln	
65 70 75	20
Pro Ser Ala Leu Ala Ala His Gln Leu Gly Ser Leu Ser Ala Ile	
80 85 90	
Gly Ser Asp Glu Val Gly Thr Gly Asp Tyr Phe Gly Pro Ile Val	
95 100 105	
Val Ala Ala Ala Tyr Val Asp Arg Pro His Ile Ala Lys Ile Ala	
110 115 120	30
Ala Leu Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Asn Asp Glu Ala Ile	
125 130 135	
Lys Arg Ile Ala Pro Ala Ile Met Glu Thr Val Pro His Ala Val	
140 145 150	
Thr Val Leu Asp Asn Ala Glu Tyr Asn Arg Trp Gln Arg Ser Gly	
155 160 165	40
Met Pro Gln Thr Lys Met Lys Ala Leu Leu His Asn Arg Thr Leu	
170 175 180	
Val Lys Leu Val Asp Ala Ile Ala Pro Ala Glu Pro Glu Ala Ile	
185 190 195	

Ile Ile Asp Glu Phe Leu Lys Arg Asp Ser Tyr Phe Arg Tyr Leu
 200 205 210
 Ser Asp Glu Asp Arg Ile Ile Arg Glu Arg Val His Cys Leu Pro
 215 220 225
 Lys Ala Glu Ser Val His Val Ser Val Ala Ala Ala Ser Ile Ile
 230 235 240
 Ala Arg Tyr Val Phe Leu Glu Glu Met Glu Gln Leu Ser Arg Ala
 245 250 255
 Val Gly Leu Leu Leu Pro Lys Gly Ala Gly Ala Ile Val Asp Glu
 260 265 270
 Ala Ala Ala Asn Ile Ile Arg Ala Arg Gly Ala Glu Ala Leu Glu
 275 280 285
 Thr Cys Ala Lys Leu His Phe Ala Asn Thr Lys Lys Ala Leu Asp
 290 295 300
 Ile Ala Lys Arg Arg
 305

10

20

<210> 18

<211> 39

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BcaRNIIIINde for amplifying a gene encoding a
 polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

40

<400> 18

cgaacgttgt caaacatat gattcaagcc gaccaacag 39

<210> 19

<211> 663

<212> DNA

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<400> 19

```

atgaaggttg ctggagttga tgaagcgggg agggggccgg taattggccc gttagtaatt  60
ggagtagccg ttatagatga gaaaaatatt gagaggttac gtgacattgg ggttaaagac 120
tccaaacaat taactcctgg gcaacgtgaa aaactattta gcaaattaat agatatacta 180
gacgattatt atgttcttct cgttaccccc aaggaaatag atgagaggca tcattctatg 240
aatgaactag aagctgagaa attcgttgta gccttgaatt ctttaaggat caagccgcag 300
aagatatatg tggactctgc cgatgtagat cctaagaggt ttgctagtct aataaaggct 360
gggttgaaat atgaagccac ggttatcgcc gagcataaag ccgatgcaaa giatgagata 420
gtatcggcag catcaataat tgcaaaggtc actagggata gagagataga gaagctaaag 480
caaaagtatg gggaatttgg ttctggctat ccgagtgatc cgagaactaa ggagtggctt 540
gaagaatatt acaaacaata tggtgacttt cctccaatag ttaggagAAC ttgggaaacc 600
gctaggaaga tagaggaaag gtttagaaaa aatcagctaa cgcttgataa attccttaag 660
tga  663

```

10

20

30

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> PCR primer 1650Nde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Pyrococcus furiosus*

<400> 20

caggaggaga gacatatgaa aataggggga att 33

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer 1650Bam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Pyrococcus furiosus*

<400> 21

gaaggttgtg gatccacttt ctaaggtttc tta 33

20

<210> 22

<211> 672

<212> DNA

<213> *Pyrococcus furiosus*

30

<400> 22

atgaaaatag ggggaattga cgaagcagga agaggaccag cgatagggcc attagtagta 60
gctactgtcg tcgttgatga gaaaaacatt gagaagctca gaaacattgg agtaaaagac 120
tccaaacaac taacacccca tgaaaggaag aatttatttt ccagataac ctcaatagcg 180
gatgattaca aaatagtgat agtatcccca gaagaaatcg acaatagatc aggaacaatg 240
aacgagttag aggtagagaa gtttgcctc gccttaaatt cgcttcagat aaaaccagct 300
cttatatacg ctgatgcagc ggatgtagat gccaatagat ttgcaagcct gatagagaga 360
agactcaatt ataaggcgaa gattattgcc gaacacaagg ccgatgcaa gtatccagta 420
gtttcagcag cttcaatact tgcaaagggtt gttagggatg aggaaattga aaaattaaaa 480
aagcaatatg gagactttgg ctctgggtat ccaagtgate caaaaacca gaaatggctt 540

40

gaagagtact acaaaaaaca caactctttc cctccaatag tcagacgaac ctgggaaact 600
 gtaagaaaaa tagaggaaag cattaaagcc aaaaaatccc agctaacgct tgataaatc 660
 tttaagaaac ct 672

<210> 23

<211> 224

<212> PRT

10

<213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 23

Met Lys Ile Gly Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile

1 5 10 15

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

20

20 25 30

Glu Lys Leu Arg Asn Ile Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Thr

35 40 45

Pro His Glu Arg Lys Asn Leu Phe Ser Gln Ile Thr Ser Ile Ala

50 55 60

Asp Asp Tyr Lys Ile Val Ile Val Ser Pro Glu Glu Ile Asp Asn

30

65 70 75

Arg Ser Gly Thr Met Asn Glu Leu Glu Val Glu Lys Phe Ala Leu

80 85 90

Ala Leu Asn Ser Leu Gln Ile Lys Pro Ala Leu Ile Tyr Ala Asp

95 100 105

Ala Ala Asp Val Asp Ala Asn Arg Phe Ala Ser Leu Ile Glu Arg

40

110 115 120

Arg Leu Asn Tyr Lys Ala Lys Ile Ile Ala Glu His Lys Ala Asp

125 130 135

Ala Lys Tyr Pro Val Val Ser Ala Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val

140 145 150
Val Arg Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Lys Lys Gln Tyr Gly Asp
155 160 165
Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Lys Thr Lys Lys Trp Leu
170 175 180
Glu Glu Tyr Tyr Lys Lys His Asn Ser Phe Pro Pro Ile Val Arg
185 190 195
Arg Thr Trp Glu Thr Val Arg Lys Ile Glu Glu Ser Ile Lys Ala
200 205 210
Lys Lys Ser Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro
215 220

10

<210> 24

20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 915-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

30

<400> 24

aaaaagcttg ggaatagatg agctttac 28

<210> 25

40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 915-F2 for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

<400> 25

aaaccatggg aatagatgag ctttac 26

10

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> PCR primer 915-R1 for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

<400> 26

aaatctagat cctcaacttt gtcgatgtg 29

30

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> PCR primer 915-R2 for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

<400> 27

aatctagatt aaaaaagagg gagattatgg 30

<210> 28

<211> 663

<212> DNA

<213> *Pyrococcus horikoshii*

10

<400> 28

atgaaggttg ctggagttga tgaagcgggg agggggcgg taattggccc gttagtaatt 60
 ggagtagccg ttatagatga gaaaaatatt gagaggttac gtgacattgg ggtaaagac 120
 tccaaacaat taactcctgg gcaacgtgaa aaactattta gcaaattaat agatataccta 180
 gacgattatt atgttcttct cgttaccccc aaggaaatag atgagaggca tcattctatg 240
 aatgaactag aagctgagaa attcgttgta gccttgaatt ctttaaggat caagccgcag 300
 aagatatatg tggactctgc cgatgtagat cctaagaggt ttgctagtct aataaaggct 360
 gggttgaaat atgaagccac ggttatcgcc gagcataaag ccgatgcaaa gtatgagata 420
 gtatcggcag catcaataat tgcaaaggtc actagggata gagagataga gaagctaaag 480
 caaaagtatg gggaatttgg ttctggctat ccgagtgatc cgagaactaa ggagtggctt 540
 gaagaatatt acaaacaata tggtagcttt cctccaatag ttaggagaac ttgggaaacc 600
 gctaggaaga tagaggaaag gtttagaaaa aatcagctaa cgcttgataa attccttaag 660
 tga 663

20

30

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> PCR primer PhoNde for cloning a gene encoding a polypeptide having
 a RNaseHIII activity from *Pyrococcus horikoshii*

<400> 29

aggaggaaaa tcatatgaag gttgctggag 30

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer PhoBam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Pyrococcus horikoshii*

<400> 30

ttacatgaag gatccaagat cacttaagga 30

20

<210> 31

<211> 673

<212> DNA

<213> *Pyrococcus horikoshii*

30

<400> 31

atgaaggttg ctggagttga tgaagcgggg agggggccgg taattggccc gttagtaatt 60
ggagtagccg ttatagatga gaaaaatatt gagaggttac gtgacattgg ggttaaagac 120
tccaaacaat taactcctgg gcaacgtgaa aaactattta gcaaattaat agatataccta 180
gacgattatt atgtttcttct cgttaccoccc aaggaaatag atgagaggca tcattctatg 240
aatgaactag aagctgagaa attcgttgta gccttgaatt ctttaaggat caagccgcag 300
aagatatatg tggactctgc cgatgtagat cctaagaggt ttgctagtct aataaaggct 360
gggttgaaat atgaagccac ggttatcgcc gagcataaag ccgatgcaaa gtatgagata 420

40

gtatcggcag catcaataat tgcaaaggtc actagggata gagagataga gaagctaaag 480
 caaaagtatg gggaatttgg ttctggctat cagagtgate cgagaactaa ggagtggctt 540
 gaagaatatt acaaacaata tggtagcttt cctccaatag ttaggagaac ttgggaaacc 600
 gctaggaaga tagaggaaag gtttagaaaa aatcagctaa cgcttgataa attccttaag 660
 tgatcttggg tcc 673

<210> 32

10

<211> 220

<212> PRT

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<400> 32

Met Lys Val Ala Gly Val Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile

20

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Arg Leu Arg Asp Ile Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Thr

35 40 45

Pro Gly Gln Arg Glu Lys Leu Phe Ser Lys Leu Ile Asp Ile Leu

30

50 55 60

Asp Asp Tyr Tyr Val Leu Leu Val Thr Pro Lys Glu Ile Asp Glu

65 70 75

Arg His His Ser Met Asn Glu Leu Glu Ala Glu Lys Phe Val Val

80 85 90

Ala Leu Asn Ser Leu Arg Ile Lys Pro Gln Lys Ile Tyr Val Asp

40

95 100 105

Ser Ala Asp Val Asp Pro Lys Arg Phe Ala Ser Leu Ile Lys Ala

110 115 120

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

125	130	135	
Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala Ser Ile Ile Ala Lys Val			
140	145	150	
Thr Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys Gln Lys Tyr Gly Glu			
155	160	165	
Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr Lys Glu Trp Leu			
170	175	180	10
Glu Glu Tyr Tyr Lys Gln Tyr Gly Asp Phe Pro Pro Ile Val Arg			
185	190	195	
Arg Thr Trp Glu Thr Ala Arg Lys Ile Glu Glu Arg Phe Arg Lys			
200	205	210	
Asn Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Leu Lys			
215	220		20

<210> 33

<211> 626

<212> DNA

<213> *Archaeoglobus fulgidus*

30

<400> 33

atgaaggcag gcatcgatga ggctggaaag ggctgcgtca tcggcccaact ggttggttgc 60
 ggagtggctt gcagcgatga ggataggctg agaaagcttg gtgtgaaaga ctccaaaaag 120
 ctaagtcagg ggaggagaga ggaactagcc gaggaataa ggaaaatctg cagaacggag 180
 gttttgaaag tttctccga aaatctcgac gaaaggatgg ctgctaaaac cataaacgag 240
 attttgaagg agtgctacgc tgaaataatt ctcaggctga agccggaaat tgcttatggt 300
 gacagtcttg atgtgattcc cgagagactt tcgagggagc ttgaggagat tacgggggtt 360
 agagttgttg ccgagcacia ggcgacgag aagtatcccc tggtagctgc ggcttcaatc 420
 atcgcaaagg tggaaaggga gcgggagatt gagaggctga aagaaaaatt cggggatttc 480
 ggcagcggct atgcgagcga tccgaggaca agagaagtgc tgaaggagtg gatagcttca 540

40

ggcagaattc cgagctgcgt gagaatgcgc tggaagacgg tgtcaaactct gaggcagaag 600
acgcttgacg atttctaaac gaaacc 626

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer AfuNde for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

<400> 34

20

aagctggggtt tcatatgaag gcaggcatcg 30

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> PCR primer AfuBam for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

<400> 35

40

tggtataaac ggatccgttt agaaatcgtc 30

<210> 36

<211> 638

<212> DNA

<213> *Archaeoglobus fulgidus*

<400> 36

catatgaagg caggcatcga tgaggetgga aagggtgcg tcatcgcccc actggttgtt 60
 gcaggagtgg cttgcagcga tgaggatagg ctgagaaagc ttggtgtgaa agactccaaa 120
 aagctaagtc aggggaggag agaggaaacta gccgaggaaa taaggaaaat ctgcagaacg 180
 gaggttttga aagtttctcc cgaaaatctc gacgaaagga tggctgctaa aaccataaac 240
 gagattttga aggagtgcta cgctgaaata attctcaggc tgaagccgga aattgcttat 300
 gttgacagtc ctgatgtgat tcccgagaga ctttcgaggg agcttgagga gattacgggg 360
 ttgagagttg tggccgagca caaggcggac gagaagtatc ccttggtagc tgcggcttca 420
 atcatcgcaa aggtggaaag ggagcgggag attgagaggc tgaagaaaaa attcggggat 480
 ttcggcagcg gctatgcgag cgatccgagg acaagagaag tgctgaagga gtggatagct 540
 tcaggcagaa ttccgagctg cgtgagaatg cgctggaaga cggtgtcaaa tctgaggcag 600
 aagacgcttg acgatttcta aacggatccc cgggtacc 638

10

20

<210> 37

<211> 205

<212> PRT

30

<213> *Archaeoglobus fulgidus*

<400> 37

Met Lys Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Lys Gly Cys Val Ile Gly
 1 5 10 15
 Pro Leu Val Val Ala Gly Val Ala Cys Ser Asp Glu Asp Arg Leu
 20 25 30
 Arg Lys Leu Gly Val Lys Asp Ser Lys Lys Leu Ser Gln Gly Arg
 35 40 45
 Arg Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Arg Lys Ile Cys Arg Thr Glu

40

50	55	60	
Val Leu Lys Val Ser Pro Glu Asn Leu Asp Glu Arg Met Ala Ala			
65	70	75	
Lys Thr Ile Asn Glu Ile Leu Lys Glu Cys Tyr Ala Glu Ile Ile			
80	85	90	
Leu Arg Leu Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Val Asp Ser Pro Asp Val			10
95	100	105	
Ile Pro Glu Arg Leu Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Thr Gly Leu			
110	115	120	
Arg Val Val Ala Glu HisLys Ala Asp Glu Lys Tyr Pro Leu Val			
125	130	135	
Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ala Lys Val Glu Arg Glu Arg Glu Ile			20
140	145	150	
Glu Arg Leu Lys Glu Lys Phe Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Ala			
155	160	165	
Ser Asp Pro Arg Thr Arg Glu Val Leu Lys Glu Trp Ile Ala Ser			
170	175	180	
Gly Arg Ile Pro Ser Cys Val Arg Met Arg Trp Lys Thr Val Ser			30
185	190	195	
Asn Leu Arg Gln Lys Thr Leu Asp Asp Phe			
200	205		

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RN-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide having

a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*

<400> 38

ggcattgatg aggctgggnar rgg 23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer RN-R0 for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*

20

<400> 39

gtccttgatg cgctgggrta ncc 23

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> PCR primer TliRN-1 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*

40

<400> 40

tagctttttt gaatctttga ctcc 24

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer TliRN-2 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*

10

<400> 41

ctgctgcatc aatactagct aaag 24

<210> 42

<211> 675

<212> DNA

<213> *Thermococcus litoralis*

20

<400> 42

atgaagctgg gaggaataga tgaagccggc aggggaccag ttataggccc tcttgtaatt 60
gcagcgggtt ttgtcgatga atcccgatg caggagcttg aagctttggg agtcaaagat 120
tcaaaaaagc taacaccaaa aagaagagaa gagctatctt aggagattgt gcaaatagtt 180
gatgaccacg ttatcattca gctttcccca gaggagatag acggcagaga tggtaaatg 240
aacgagcttg aaattgaaaa ctttgccaaa gcgttgaact cctttaaagt taagccggat 300
gtgctctaca tagatgcggc cgatgtcaag gaaaagcgt ttggcgacat tataggtgaa 360
agactttcct tctctccaaa gataatcgcc gaacataagg cagattcaaa gtacattcca 420
gtggctgctg catcaatact agctaaagtt acccgtgaca gggcaataga gaagctcaag 480
gagctttatg gggagatagg ctcaggatat ccaagtgatc caaatacaag gaggtttctg 540
gaggagtatt acaaggetca tggggaattc cccccaatag tgaggaaaag ctggaagacc 600
cttagaaaga tagaagaaaa actaaaagct aaaaagactc agcccactat cttggacttc 660

30

40

ttaaaaaagc cttaa 675

<210> 43

<211> 224

<212> PRT

<213> *Thermococcus litoralis*

10

<400> 43

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

1 5 10 15

Gly Pro Leu Val Ile Ala Ala Val Val Val Asp Glu Ser Arg Met

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Arg Glu Glu Leu Phe Glu Glu Ile Val Gln Ile Val

50 55 60

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

65 70 75

Arg Asp Gly Thr Met Asn Glu Leu Glu Ile Glu Asn Phe Ala Lys

80 85 90

Ala Leu Asn Ser Leu Lys Val Lys Pro Asp Val Leu Tyr Ile Asp

95 100 105

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

110 115 120

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

125 130 135

Ser Lys Tyr Ile Pro Val Ala Ala Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val

140 145 150

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

20

30

40

155	160	165	
Ile Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Asn Thr Arg Arg Phe Leu			
170	175	180	
Glu Glu Tyr Tyr Lys Ala His Gly Glu Phe Pro Pro Ile Val Arg			
185	190	195	
Lys Ser Trp Lys Thr Leu Arg Lys Ile Glu Glu Lys Leu Lys Ala			
200	205	210	10
Lys Lys Thr Gln Pro Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Lys Pro			
215	220		

<210> 44

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer TliNde for amplifying a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from *Thermococcus litoralis*

30

<400> 44

gaggaggtag gcatatgaag ctgggaggaa tagatgaag 39

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> PCR primer TliBam for amplifying a gene encoding a polypeptide

having a RNaseHIII activity from *Thermococcus litoralis*

<400> 45

aaaggaaacc ttcgatcca ttaaggcttt ttaagaag 39

<210> 46

<211> 675

<212> DNA

<213> *Thermococcus litoralis*

<400> 46

atgaagctgg gaggaataga tgaagcggc aggggaccag ttataggccc tcttgtaatt 60
gcagcggttg ttgtcgatga atcccgatg caggagcttg aagcttggg agtcaaagat 120
tcaaaaaagc taacaccaa aagaagagaa gagctatttg aggagattgt gcaaatagtt 180
gatgaccacg ttatcattca gctttcccca gaggagatag acggcagaga tggtaaatg 240
aacgagcttg aaattgaaaa ctttgccaaa gcgttgaact cccttaaagt taagccggat 300
gtgctctaca tagatgcggc cgatgtcaag gaaaagcgt ttggcgacat tataggtgaa 360
agactttcct tctctccaaa gataatcgcc gaacataagg cagattcaaa gtacattcca 420
gtggctgctg catcaatact agctaaagtt acccgtgaca gggcaataga gaagctcaag 480
gagttttatg gggagatagg ctcaggatat ccaagtgatc caattacaag gaggtttctg 540
gaggagtatt acaaggctca tggggaattc cccccaatag tgaggaaaag ctggaagacc 600
cttagaaaga tagaagaaaa actaaaagct aaaaagactc agcccactat cttggacttc 660
ttaaaaaagc cttaa 675

<210> 47

<211> 224

<212> PRT

<213> *Thermococcus litoralis*

<400> 47

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

1 5 10 15

Gly Pro Leu Val Ile Ala Ala Val Val Val Asp Glu Ser Arg Met

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Arg Glu Glu Leu Phe Glu Glu Ile Val Gln Ile Val

50 55 60

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

65 70 75

Arg Asp Gly Thr Met Asn Glu Leu Glu Ile Glu Asn Phe Ala Lys

80 85 90

Ala Leu Asn Ser Leu Lys Val Lys Pro Asp Val Leu Tyr Ile Asp

95 100 105

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

110 115 120

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

125 130 135

Ser Lys Tyr Ile Pro Val Ala Ala Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

Glu Glu Tyr Tyr Lys Ala His Gly Glu Phe Pro Pro Ile Val Arg

185 190 195

Lys Ser Trp Lys Thr Leu Arg Lys Ile Glu Glu Lys Leu Lys Ala

200 205 210

10

20

30

40

Lys Lys Thr Gln Pro Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Lys Pro

215

220

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer RN-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from Thermococcus celer

<400> 48

20

ggcattgatg aggctgggnar rgg 23

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> PCR primer RN-R0 for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from Thermococcus celer

<400> 49

40

gtccttggat cgctgggrta ncc 23

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer TceRN-1 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Thermococcus celer

10

<400> 50

tctctgagct tcggaacgtt cttc 24

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer TceRN-2 for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Thermococcus celer

30

<400> 51

acccgtagaca gggcgataga aaag 24

<210> 52

<211> 702

<212> DNA

40

<213> Thermococcus celer

<400> 52

ttgaagctcg caggaataga cgaggctgga aggggccccg taatcggccg gatggtcatc 60

gcggcgcgtcg tcctcgatga gaagaacgtt ccgaagotca gagatctcgg cgtcagggac 120
 tcgaaaaagc tgaccccaaa gaggagggag agattattta acgacataat taaacttttg 180
 gatgattatg taattcttga attatggccg gaggagatag actcccgcg cgggacgctt 240
 aacgagctcg aggtggagag gttcgtggag gccctcaact cgttaaggt gaagcccgac 300
 gtcgtttaca tagacgcggc ggacgtgaag gagggccgct ttggcgagga gataaaggaa 360
 aggttgaact tcgaggcgaa gattgtctca gaggcacagg cggaacgataa gtttttaccg 420
 gtgtcctctg cctcgatact ggccaaggtg acccgtgaca gggcgataga aaagctcaag 480
 gagaagtacg gcgagatcgg gagcggctac ccgagcgacc caaggacgag ggagttcctc 540
 gagaactact acagacaaca cggcgagtgc ccgcccgtag tccggcgaag ctggaagacg 600
 ctgagaaaga tagaggaaaa gctgaggaaa gaggcggggt caaaaaaccc ggagaattca 660
 aaggaaaagg gacagacgag cctggacgta tttttgaggt ag 702

10

<210> 53

20

<211> 233

<212> PRT

<213> Thermococcus celer

<400> 53

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

30

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Pro Met Val Ile Ala Ala Val Val Leu Asp Glu Lys Asn Val

20	25	30
----	----	----

Pro Lys Leu Arg Asp Leu Gly Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr

35	40	45
----	----	----

Pro Lys Arg Arg Glu Arg Leu Phe Asn Asp Ile Ile Lys Leu Leu

40

50	55	60
----	----	----

Asp Asp Tyr Val Ile Leu Glu Leu Trp Pro Glu Glu Ile Asp Ser

65	70	75
----	----	----

Arg Gly Gly Thr Leu Asn Glu Leu Glu Val Glu Arg Phe Val Glu

	80	85	90	
Ala Leu Asn Ser Leu Lys Val Lys Pro Asp Val Val Tyr Ile Asp				
	95	100	105	
Ala Ala Asp Val Lys Glu Gly Arg Phe Gly Glu Glu Ile Lys Glu				
	110	115	120	
Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Ile Val Ser Glu His Arg Ala Asp				
	125	130	135	10
Asp Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val				
	140	145	150	
Thr Arg Asp Arg Ala Ile Glu Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Gly Glu				
	155	160	165	
Ile Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr Arg Glu Phe Leu				
	170	175	180	20
Glu Asn Tyr Tyr Arg Gln His Gly Glu Phe Pro Pro Val Val Arg				
	185	190	195	
Arg Ser Trp Lys Thr Leu Arg Lys Ile Glu Glu Lys Leu Arg Lys				
	200	205	210	
Glu Ala Gly Ser Lys Asn Pro Glu Asn Ser Lys Glu Lys Gly Gln				
	215	220	225	30
Thr Ser Leu Asp Val Phe Leu Arg				
	230			

<210> 54

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer TceNde for amplifying a gene encoding a polypeptide

having a RNaseHII activity from *Thermococcus celer*

<400> 54

cagggggtga gcatatgaag ctgcaggaa tagacgagg 39

<210> 55

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer TceBam for amplifying a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from *Thermococcus celer*

20

<400> 55

tgaaccgcg taggatccta cctcaaaaat acgtccagg 39

<210> 56

<211> 702

<212> DNA

<213> *Thermococcus celer*

30

<400> 56

atgaagctcg cagaaataga cgaggtgga aggggccccg taatcgggcc gatggtcatc 60
gcgggcgcg tectcgatga gaagaacgtt ccgaagctca gagatctcgg cgtcaggac 120
tcgaaaaagc tgaccccaaa gaggaggag agattattta acgacataat taaacttttg 180
gatgattatg taattcttga attatggccg gaggagatag actcccgagg cgggacgctt 240
aacgagctcg aggtggagag gttcgtggag gccctcaact cgcttaaggt gaagcccgac 300
gtcgtttaca tagacgggc ggacgtgaag gagggccgct ttggcgagga gataaaggaa 360

40

aggttgaact tcgaggcgaa gattgtctca gagcacaggg cggacgataa gtttttaccg 420
 gtgtcctctg cctcgataact ggccaaggtg acccgtgaca gggcgataga aaagctcaag 480
 gagaagtaag gcgagatcgg gagcggctac ccgagcgacc caaggacgag ggagttcctc 540
 gagaactact acagacaaca cggcgagttc ccgcccgtag tccggcgaag ctggaagacg 600
 ctgagaaaaga tagaggaaaa gctgaggaaa gaggccgggt caaaaaaccc ggagaattca 660
 aaggaaaagg gacagacgag cctggacgta tttttgaggt ag 702

10

<210> 57

<211> 233

<212> PRT

<213> *Thermococcus celer*

<400> 57

20

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

1 5 10 15

Gly Pro Met Val Ile Ala Ala Val Val Leu Asp Glu Lys Asn Val

20 25 30

Pro Lys Leu Arg Asp Leu Gly Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr

35 40 45

Pro Lys Arg Arg Glu Arg Leu Phe Asn Asp Ile Ile Lys Leu Leu

50 55 60

Asp Asp Tyr Val Ile Leu Glu Leu Trp Pro Glu Glu Ile Asp Ser

65 70 75

Arg Gly Gly Thr Leu Asn Glu Leu Glu Val Glu Arg Phe Val Glu

80 85 90

Ala Leu Asn Ser Leu Lys Val Lys Pro Asp Val Val Tyr Ile Asp

95 100 105

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

110 115 120

30

40

Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Ile Val Ser Glu His Arg Ala Asp
 125 130 135
 Asp Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val
 140 145 150
 Thr Arg Asp Arg Ala Ile Glu Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Gly Glu
 155 160 165
 Ile Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr Arg Glu Phe Leu
 170 175 180
 Glu Asn Tyr Tyr Arg Gln His Gly Glu Phe Pro Pro Val Val Arg
 185 190 195
 Arg Ser Trp Lys Thr Leu Arg Lys Ile Glu Glu Lys Leu Arg Lys
 200 205 210
 Glu Ala Gly Ser Lys Asn Pro Glu Asn Ser Lys Glu Lys Gly Gln
 215 220 225
 Thr Ser Leu Asp Val Phe Leu Arg
 230

10

20

<210> 58

<211> 714

30

<212> DNA

<213> *Thermotoga maritima*

<400> 58

atgggaatag atgagcttta caaaaaagag tttggaatcg tagcaggtgt ggatgaagcg 60
 ggaagagggt gcctgcagg tcccgttggt gcggccgctg tcgttctgga aaaagaaata 120
 gaaggaataa acgattcaaa acagctttcc cctgcgaaga gggaaagact tttagatgaa 180
 ataatggaga aggcagcagt tgggttagga attgcgtctc cagaggaaat agatctctac 240
 aacatattca atgccacaaa acttgctatg aatcgagcac tggagaacct gtctgtgaaa 300
 ccatcatttg tactcgttga cgggaaagga atcgagttga gcgttcccgg tacatgctta 360

40

gtgaagggag accagaaaag caaatgata ggagcagctt ccattgttgc gaaggtcttc 420
 agagatagat tgatgagcga gtttcacagg atgtatccac agttttcctt ccacaaacac 480
 aaaggttacg ccacaaaaga acatctgaac gaaatcagaa agaacggagt tttaaccaatc 540
 caccggctga gttttgaacc tgttttagaa cttctgaccg atgatttggt gagggagttc 600
 ttcgaaaaag gcctcatctc cgaaaatcga ttcgaaacgaa tattgaatct tctgggggcg 660
 agaaaaagtg tggttttccg gaaagaaaga acaaaccata atctccctct tttt 714

10

<210> 59

<211> 238

<212> PRT

<213> *Thermotoga maritima*

<400> 59

20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Lys Gln Leu Ser Pro Ala Lys Arg Glu Arg Leu Leu Asp Glu

50 55 60

Ile Met Glu Lys Ala Ala Val Gly Leu Gly Ile Ala Ser Pro Glu

65 70 75

Glu Ile Asp Leu Tyr Asn Ile Phe Asn Ala Thr Lys Leu Ala Met

80 85 90

Asn Arg Ala Leu Glu Asn Leu Ser Val Lys Pro Ser Phe Val Leu

95 100 105

Val Asp Gly Lys Gly Ile Glu Leu Ser Val Pro Gly Thr Cys Leu

110 115 120

40

Val Lys Gly Asp Gln Lys Ser Lys Leu Ile Gly Ala Ala Ser Ile
 125 130 135
 Val Ala Lys Val Phe Arg Asp Arg Leu Met Ser Glu Phe His Arg
 140 145 150
 Met Tyr Pro Gln Phe Ser Phe His Lys His Lys Gly Tyr Ala Thr
 155 160 165
 Lys Glu His Leu Asn Glu Ile Arg Lys Asn Gly Val Leu Pro Ile
 170 175 180
 His Arg Leu Ser Phe Glu Pro Val Leu Glu Leu Leu Thr Asp Asp
 185 190 195
 Leu Leu Arg Glu Phe Phe Glu Lys Gly Leu Ile Ser Glu Asn Arg
 200 205 210
 Phe Glu Arg Ile Leu Asn Leu Leu Gly Ala Arg Lys Ser Val Val
 215 220 225
 Phe Arg Lys Glu Arg Thr Asn His Asn Leu Pro Leu Phe
 230 235

10

20

<210> 60

<211> 17

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as tag sequence.

40

<400> 60

ggcacgattc gataacg 17

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-R280N3-I7 for amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "Nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

10

<400> 61

tgctcaataa tcanacgaag

20

20

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Designed oligonucleotide primer as VT2-F110 for amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 62

tcgttaaata gtatacggga ag

22

40

<210> 63

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-IF20N3 for amplifying a VFN3 from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "Nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

10

<400> 63

tactggggttt ttcttcgua

19

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-IF19N2 for amplifying VFN2 from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "Nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

30

<400> 64

tactggggttt ttcttcgu

18

<210> 65

<211> 17

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer as VT2-IF18N1 for amplifying a VFN1 from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "Nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 65

tactggggttt ttcttcg

17

10

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Designed oligonucleotide primer as VT21R20 for amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 66

gtccccctgag atatatgttc

20

30

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/22 (2006.01) C 1 2 N 9/22

(72)発明者 平野 亮
 滋賀県草津市南笠 4 0 7 ヴィレッジ花水木 A 2 0 5

(72)発明者 高蔵 晃
 滋賀県大津市里 7 丁目 3 番 1 2 号

(72)発明者 小堀 博史
 滋賀県彦根市本町 1 丁目 3 - 2 9

(72)発明者 橋元 勇二
 滋賀県大津市南郷 5 丁目 2 4 - 1 6

(72)発明者 浅田 起代蔵
 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘 3 - 2 0 - 9

(72)発明者 加藤 郁之進
 京都府宇治市南陵町 1 - 1 - 1 5 0

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 Biochemistry (1999) vol.38, no.2, p.605-618
 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. AP000006, < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?3236133:OLD03:159286>> 06-Apr-2000 uploaded, Kawarabayashi, Y. et al., Definition: Pyrococcus horikoshii OT3 genomic DNA, 1166001-1485000 nt. position (6/7)
 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. AE001062 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?2689385:OLD12:450199>> 15-Dec-1997 uploaded, Klenk, H. P. et al., Definition: Archaeoglobus fulgidus section 45 of 172 of the complete genome

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C12N15/00-15/90
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 PubMed
 JSTPlus(JDream2)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 SwissProt/PIR/Geneseq