

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4220557号
(P4220557)

(45) 発行日 平成21年2月4日(2009.2.4)

(24) 登録日 平成20年11月21日(2008.11.21)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12 Z N A
C 1 2 N 15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 1 2 R 1/19	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
		C 1 2 R	1:19

請求項の数 1 外国語出願 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2007-64495 (P2007-64495)	(73) 特許権者	592239707
(22) 出願日	平成19年3月14日 (2007.3.14)		ニュー・イングランド・バイオレイブズ・ インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平8-205125の分割		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 915、ピバリー、トザー・ロード・32
原出願日	平成8年8月2日 (1996.8.2)	(74) 代理人	100062007
(65) 公開番号	特開2007-143566 (P2007-143566A)		弁理士 川口 義雄
(43) 公開日	平成19年6月14日 (2007.6.14)	(72) 発明者	ヒューミン・コン
審査請求日	平成19年4月12日 (2007.4.12)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 984、ウエナム、コンラッド・サークル ・5
(31) 優先権主張番号	510215	(72) 発明者	ジョン・ジエイ・ペルチャー
(32) 優先日	平成7年8月2日 (1995.8.2)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 913、エイムズベリ、ホワイトホール・ ロード・130
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質融合による切頭型耐熱性DNAポリメラーゼの過発現及び精製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) マルトース結合タンパク質(MBP)をコードするDNAを含むクローニングベクターに、5'末端切頭型Bst I遺伝子を挿入し、MBP融合遺伝子を作製する工程、

(b) 工程(a)のベクターで宿主細胞を形質転換する工程、

(c) 発現されたMBPに融合した切頭型Bst Iポリメラーゼを回収する工程、および、

(d) プロテアーゼを用いてBst IポリメラーゼからMBPを切断して、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失した67kDの活性型Bst Iポリメラーゼを得る工程

を含む、ゲル電気泳動で測定された67kDの大きさを有する組換えBst I DNAポリメラーゼ大断片を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、耐熱性Bst DNAポリメラーゼI、及び切頭型(truncated)耐熱性DNAポリメラーゼを組換えDNA技術やタンパク質融合技術を用いて商業的に有用な量製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

DNAは大半の生物の遺伝物質である。DNAポリメラーゼはDNAの複製や修復に関与する酵素である。細菌、酵母及びヒトを含む種々の生物に由来するDNAポリメラーゼの単離や特性分析に関しては広範な研究が行われている。

【0003】

DNAポリメラーゼは、基本的な重合機能の他に、そのポリペプチドのN末端ドメインに5' 3'又は3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を含み得る。両方のエキソヌクレアーゼが存在する場合、5' 3'エキソヌクレアーゼドメインがN末端に存在し、その次に3' 5'エキソヌクレアーゼドメイン及びC末端ポリメラーゼドメインが来る。ニックトランスレーションや修復のためには、進行する(advancing)DNAポリメラーゼの経路内にあるDNAを5' 3'方向に切り出しする5' 3'エキソヌクレアーゼが必要である。ミスマッチのヌクレオチドを3' 5'方向に切り出しして正しく修復するには3' 5'エキソヌクレアーゼ活性が必要である。配列の比較により3種の3' 5'エキソヌクレアーゼ(Exo I、II、III)が同定された(Blanco等, (1991) Gene, 100, 27-38)。

【0004】

耐熱性真正細菌や耐熱性古細菌から幾つかの耐熱性DNAポリメラーゼが単離された。これらのポリメラーゼは、その耐熱性を基準にして3つのグループに分けることができる。高度好熱菌から単離されたDNAポリメラーゼは100で安定である。例えば、Thermococcus litoralis由来のVent(登録商標)DNAポリメラーゼは100で2時間の半減期を有し、このことは100で2時間インキュベートした後に、Ventポリメラーゼの重合活性の半分が保持されることを意味している(Kong等, J. Biol. Chem. 268:1965-1975(1993), 同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。超耐熱性のThermus aquaticusから単離されたTaq DNAポリメラーゼは95で1.6時間の半減期を有する(Kong等, J. Biol. Chem., 上掲(1993), 同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。Bst DNAポリメラーゼIは第3のグループである中度好熱菌に属し、65で安定である。

【0005】

Bst DNAポリメラーゼは最初Stenesh及びRoe(Stenesh及びRoe Biochim. Biophys. Acta 272:156-6(1972))によって単離され、Kaboev等(J. Bacteriol., 145:21-6(1981))は更にBst DNAポリメラーゼを精製し、このポリメラーゼが分子量76kDaで、5' 3'及び3' 5'の両方のエキソヌクレアーゼ活性を有すると結論付けた(上記文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。ポリメラーゼに対するエキソヌクレアーゼの相対活性は非常に低く、Kaboevはそれが汚染によるものであり得るとコメントとした。Sellman等(Sellmann等, J. Bacteriol., 174:4350-4355(1992), 同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)は、エキソヌクレアーゼ活性を持たない95kDaのBst DNAポリメラーゼを精製した。Bst DNAポリメラーゼはクローニングされたように思えるが(Epicentre Technologyのカatalog)、クローニング手順や配列情報に関する刊行物は入手できない。Epicentre Technologiesは、5' 3'及び3' 5'の両方のエキソヌクレアーゼ活性がrBst DNAポリメラーゼ中に存在すると報告している。

【0006】

耐熱性DNAポリメラーゼは分子生物学や医薬研究で非常に有用である。例えば、Taq DNAポリメラーゼの耐熱性は、DNA増幅(Lawyer, J. Biol. Chem., 264:6427-6437(1989), 同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)のためのポリメラーゼ連鎖反応法(米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号)の収率、特異性

10

20

30

40

50

、自動化及び有用性に大きく寄与した。他の具体例は、Bst DNAポリメラーゼの大断片(Bst L.F.)のDNA配列決定のための使用である(Ye, Scientia Sinica, 30:503-506(1987); McClary, DNA SEQ. 1:173-180(1991)、同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。耐熱性Bstポリメラーゼを用いることにより、配列決定反応を高温(65)で行って二次構造を壊し、オートラジオグラム上で均一なバンド強さと低いバックグラウンドを得ることができる。Bst L.F.は、Becton DickinsonのG. Terrance Walker等によって開発された等温指数的DNA増幅技術である鎖置換増幅法(Strand Displacement Amplification)(SDA)でも使用され得る。例えば、Walker等, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:392-396(1992)(同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)を参照されたい。

10

【0007】

Bst DNAポリメラーゼのN末端ドメインをズブチリシン(プロテイナーゼ)による部分消化によって重合ドメインから分離して、E. coli Pol Iのクレノー断片に類似する75kDa DNAポリメラーゼドメイン(「大断片」と称する)を産生することができる(Ye, Scientia Sinica, 上掲(1987)、同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。ズブチリシンを使用してBst L.F.を産生することができるが、ズブチリシンによってBstポリメラーゼが非特異的分解を起こすため、その有効性は低い。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、これまでに産生されたもので見られる欠点や無効性を克服するBst I DNAポリメラーゼ(その大断片を含む)の新規製造方法が必要となる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、耐熱性Bst DNAポリメラーゼI、及び切頭型耐熱性DNAポリメラーゼを組換えDNA技術やタンパク質融合技術を用いて商業的に有用な量製造する方法に関する。

30

【0010】

具体的には、好ましい一実施態様では、3' 5'エキソヌクレアーゼを含まず、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を含んでいる点で、これまでに報告されたBstポリメラーゼとは異なるBst I DNAポリメラーゼを提供する。他の好ましい実施態様では、5' 3'エキソヌクレアーゼを不活化してもよい。本発明は更に、組換えDNA技術やタンパク質融合技術を用いたBst DNAポリメラーゼIの大断片の独特の製造方法を提供する。タンパク質融合系では、クローニングした遺伝子を、マルトース結合タンパク質(MBP)をコードするmalE遺伝子の下流のpMALベクター内に挿入すると、MBP融合タンパク質が発現される(Guan, C等,(1987)Gene 67, 21-30; Maina, C.V.等,(1988)Gene 74, 365-373、同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。この技術は、多量の融合タンパク質を発現するために強いPtacプロモーターとMBP翻訳開始シグナルを使用する。次いで、MBPの一ステップ親和性精製により融合タンパク質を精製することができる(Kellerman及びFerenci(1982)Methods in Enzymol. 90, 459-463、同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。

40

【0011】

1つの好ましいアプローチによれば、本発明のBst DNAポリメラーゼIをBacillus stearothermophilusからほぼ均質になるまで精製し、そのN末端の最初の21アミノ酸残基の配列を決定した。このアミノ酸配列に基づいて、縮

50

重オリゴヌクレオチドを作製した。Bst Pol I 遺伝子の3'末端ヌクレオチド配列を決定するために逆PCRを実施した。Bst 染色体DNAをNgoMI又はSau3AIで消化し、次いでT4リガーゼを用いて連結して環を形成した。使用する2個のプライマーは、遺伝子の3'末端付近の642bp DNA断片の配列データを用いて設計した。この断片を、Pol I様DNAポリメラーゼ中に保存されたアミノ酸配列モチーフの存在に基づいてクローニングした。PCR断片のヌクレオチド配列を決定し、Bst Pol I 遺伝子の3'末端を同定した。5'末端及び3'末端両方のヌクレオチド配列を決定した後に、全Bst Pol I 遺伝子をPCRにより増幅し、これをpET21a発現ベクター内にクローニングした。耐熱性Bst Pol Iを組換えプラスミドを含むE. coli中で産生し、その後全Bst Pol I 遺伝子のヌクレオチド配列を決定した。Bst DNAポリメラーゼをズブチリシンで部分消化して、BstポリメラーゼIの大断片を生成した。ズブチリシンで部分消化した断片を生成し、この大断片のN末端アミノ酸配列を決定した。その後、切頭型(truncated)遺伝子をE. coli内に発現させようとしたが失敗した。切頭型mRNA又はタンパク質はin vivoで不安定であると考えられる。更には、Bst大断片はホロ酵素に比べてE. coli宿主に対して致死的であり、クローニングに際し問題となった。このような問題を克服し、更には精製ステップを簡略化するために、MBP融合タンパク質を産生することによって転写mRNAを安定化させるか又はより安定したもしくはほとんど致死的ではない翻訳タンパク質を製造することを期待して、5'末切頭型Bst Pol I 遺伝子をpMAL-c2ベクター内にクローニングした。実際、融合タンパク質及び大きな切断Bst断片は共に65%で活性を有した。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

Bst Pol I大断片の製造について本明細書に記載する好ましい方法は以下のステップからなる：

1. Bst DNAポリメラーゼIをBacillus stearothermophilusから精製する。この生物は好熱菌であって、増殖温度範囲は45~70°Cである。細胞増殖後、以下のような複数ステッププロセスを用いてBst DNAポリメラーゼIを精製する。まず、細胞を緩衝液A(20mM KPO₄緩衝液, pH6.5; 1mM EDTA; 10mM β-メルカプトエタノール)中に懸濁させ、超音波処理し、遠心分離にかける。KPO₄濃度は上清中200mMに調整し、次いで上清を、DEAEセファロースカラムのような核酸に対して高い親和性を示すカラムに通す。上清溶液中に存在する核酸はDEAEに結合するため、核酸はKPO₄塩濃度200mMでカラムを素通りするタンパク質と分離される。素通りしたタンパク質をヘパリンセファロースカラムに添加する。カラムを洗浄し、DNAポリメラーゼ酵素活性を緩衝液A中0.07M KClのような直線勾配で溶離する。緩衝液B(20mM トリス-HCl, pH7.4; 0.5mM EDTA; 10mM β-メルカプトエタノール)中でピークDNAポリメラーゼ活性を透析し、Q-セファロースカラムに添加する。酵素活性を緩衝液B中0.025~1M KClのような直線勾配で溶離する。再度、DNAポリメラーゼのピーク活性を透析し、ヘパリンTsK1カラム(Toso Haas)に添加する。酵素を、緩衝液B中0.025~1M KCl直線勾配で溶離する。この段階での酵素純度は約95%である(図1)。

2. ステップ1で得たBst Pol I酵素を、Matsudaira, J. Biol. Chem. 262:10035-10038(1987)の手順に従って電気泳動及びエレクトロブロットイングに付す。上記文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする。膜をクーマシーブルーR-250で染色し、90kDaの主タンパク質バンドを切り出し、Waite-Rees等, J. Bacteriol., 173:5207-5219(1991)の手順に従って連続的に分解させた。上記文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする。90kDaタンパク質の最初の21残基はMet-Lys-Lys-Lys-Leu-Val-Leu-Ile-A

10

20

30

40

50

s p - G l y - A s n - S e r - V a l - A l a - T y r - A r g - A l a - P h e - P h e - A l a - L e u (配列番号3) である。B s t P o l I 遺伝子のE . c o l i 内へのクローニング及び発現を行うために、制限酵素 (X b a I) クローニング部位及びリボソーム結合部位を含む縮重プライマー (プライマーA) をアミノ酸配列に基づいて作製する。

3 . B s t P o l I 遺伝子がP C Rによって直接クローニングされ得るように3 ' 末端ヌクレオチド配列を決定するために、N g o M I 及びS a u 3 A I で切断 / 自己連結したB . s t e a r o t h e r m o p h i l u s ゲノムDNA鋳型から逆P C R産物を増幅させる。N g o M I で消化、自己連結したB s t DNAを鋳型として使用した反応では、寸法が約0 . 9 5 k b の断片が得られる。S a u 3 A I で消化、自己連結したB s t DNAを鋳型として使用した反応では、寸法が約1 . 5 k b の断片が得られる。0 . 9 5 k b 及び1 . 5 k b の2つの増幅DNAバンドをアガロースゲルから切り出し、直接DNAの配列決定に付す。終結コドン (T A A) がN g o M I で消化 / 自己連結した配列中1 8 0 塩基対に見出され、これはB s t DNAポリメラーゼI 遺伝子の終結コドンであると考えられる。B s t P o l I 遺伝子の3 ' 末端にアニーリングする、N o t I クローニング部位を含む他のプライマー (プライマーB) を作製する。

4 . P C R 反応を実施すると、予測される2 . 6 k b バンドがアガロースゲル上で観察される。ゲルから2 . 6 k b 断片を精製し、次いでN o t I 及びX b a I で消化し、N o t I / X b a I で消化したp E T - 2 1 a ベクター (N o v a g e n , M a d i s o n , W i s c o n s i n) 内にクローニングする。B s t P o l I 遺伝子を含む組換えプラスミドをE R 2 1 6 9 コンピテント細胞 (N e w E n g l a n d B i o l a b s , B e v e r l y , M a s s a c h u s e t t s) 内に形質転換する。6 5 °C で耐熱性のDNAポリメラーゼ活性 (約3 0 , 0 0 0 u / g 宿主細胞) が中温好性E . c o l i 宿主で観察され、このことはB s t P o l I 遺伝子のクローニング及び発現に成功したことを示している。中断のない2 6 3 1 b p の読み取り枠 (O R F) に相当する全B s t P o l I 遺伝子のヌクレオチド配列を決定する (図2 A 、2 B 、2 C) 。2 6 3 1 b p 遺伝子は分子量計算値9 9 , 0 0 7 . 6 7 の8 7 6 アミノ酸タンパク質をコードし、この分子量は1 0 ~ 2 0 % ポリアクリルアミド勾配ゲル上で観察された約9 7 k D a の分子量と一致する (図1) 。

5 . B s t DNAポリメラーゼI をプロテアーゼズブチリシンで消化すると、B s t 大断片 (B s t L . F .) が産生されることが観察された。B s t L . F . は5 ' 3 ' エキソヌクレアーゼドメインの欠如した切頭型ポリメラーゼであり、DNAの配列分析で非常に有用な酵素である (Y e 及びH o n g , S c i e n t i a S i n i c a , 3 0 : 5 0 3 - 5 0 6 (1 9 8 7) 、同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする) 。ズブチリシンを使用してB s t L . F . を産生することができるが、ズブチリシンによってB s t ポリメラーゼの非特異的分解が生じるために有効性は低い。本発明によれば、B s t L . F . を5 ' 末端に欠失を有するB s t P o l I 遺伝子から直接産生する方がズブチリシン消化よりも効果的であり、これによりDNAの配列決定や鎖置換増幅法 (W a l k e r 等、上掲) のような用途でのB s t L . F . の実用性が高くなる。しかしながら、B s t L . F . のクローニング及び発現のための独創的な実験は失敗した。転写されるm R N A 、又は切頭型遺伝子から翻訳されるタンパク質はi n v i v o で不安定であると考えられる。更には、B s t 大断片はE . c o l i 宿主に対して非常に致死的であり、ポリメラーゼ活性が低いか又はポリメラーゼ活性を持たない変異体だけが選択されたと考えられる。このような問題を克服するために、M B P - B s t L . F . 融合タンパク質を産生することによって転写m R N A を安定化させるか又はより安定したもしくはほとんど致死的ではない翻訳タンパク質を製造することを期待して、5 ' 末端切頭型B s t P o l I 遺伝子をp M A L - c 2 ベクター内にクローニングした。

【 0 0 1 3 】

B s t L . F . のN末端境界部分を解明するために、精製したB s t DNAポリメ

10

20

30

40

50

ラーゼI (図1) を適量のズブチリシンで消化し、次いでズブチリシンで消化した大きな断片を、トリス-トリシン10-20%ポリアクリルアミド勾配ゲル (Novex, San Diego, California) 上の電気泳動に付し、次いでエレクトロブロットイングした (Matsudaira, J. Biol. Chem, 262: 10035-10038 (1987)、同文献の内容は参考として本明細書の一部を構成するものとする)。Bst L.F. に相当する約67kDaのタンパク質バンドを切り出し、N末端タンパク質の配列決定に付した (Waite-Rees等, 上掲)。67kDaタンパク質の最初の7残基はAla-Glu-Gly-Glu-Lys-Pro-Leu (配列番号4) に相当し、これはズブチリシン切断部位がAla289~Ala290の間に位置することを示している (図2A、2B、2C)。大断片のN末端アミノ酸配列は、クローニングしたBst Pol I遺伝子から推定されるアミノ酸配列に適合する (図2A、2B、2C)。

10

【0014】

この配列に基づいて、Fsp I制限酵素部位を含むプライマー (プライマーC) を、Bst L.F. の開始部に相当する868~890位の部位でBst Pol I遺伝子にアニーリングするように設計する (図2A、2B、2C)。Xba I部位を有する他のプライマー (プライマーD) を、前記遺伝子の3'末端にアニーリングするように設計する。PCRを実施して、Bst大断片をコードする5'末端-切頭型Bst Pol I遺伝子を増幅させる。Bst大断片の予想される寸法に相当する1.8kbのDNA断片を増幅させる。1.8kbの断片をFsp I (プラント末端) 及びXba Iによって切断し、次いでXmn I (プラント末端) 及びXba Iで切断したpMAL-c2ベクター (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) 内にクローニングする。クローニングした遺伝子を、マルトース結合タンパク質 (MBP) をコードする (E. coli由来の) pMAL-c2 male遺伝子のすぐ下流に導入すると、MBP-Bst L.F. 融合タンパク質が発現される (図3)。組換えプラスミドをE. coli RRI細胞 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) 内に形質転換する。このプラスミドを含む細胞を超音波処理し、遠心分離にかける。ここでも65°Cで好熱性のDNAポリメラーゼ活性 (約130,000u/g宿主細胞) が中温好性宿主で観察され、このことはMBP-Bst融合タンパク質が65°Cで活性を有することを示している。

20

30

7. ステップ6の上清を (実施例VIで詳述する) アミロース親和性カラムに添加する。核酸及び他の全ての宿主細胞タンパク質 (MBP-Bst融合タンパク質は除く) をカラムに通し、カラムをカラム容量の数倍の緩衝液C (200mM NaCl; 20mMトリス-HCl, pH7.4; 1mM EDTA; 1mM DTT) で洗浄して除去する。MBP-Bst L.F. 融合タンパク質を緩衝液C中の10mMマルトースで溶離する。溶離した融合タンパク質をS-100サイズ排除カラムで更に精製して、遊離MBPを排除する。

8. 精製したMBP-Bst融合タンパク質を因子Xaプロテアーゼ (New England Biolabs #800-10) で切断することができる。因子Xaの切断後、110kDaのMBP-Bst L.F. 融合タンパク質が分解し、予想される67kDaのBst L.F. 及び40kDaのMBPが得られた (図3)。MBP-Bst L.F. 融合タンパク質及び因子Xaで切断したBst L.F. は共に活性を有するが、因子Xaで切断したBst L.F. (45,300u/mg) は融合タンパク質 (6,300u/mg) の約7倍の比活性を有する。融合体の比活性が低いために、MBP-Bst融合タンパク質中の耐中温性MBPが65°Cで熱変性を起こし得る。切断したBst L.F. は耐熱性があり比活性もより高いので、産生のための好ましい酵素とされるはずである。

40

9. 因子Xa及び切断した遊離MBPを除去するために、65°Cで20分間インキュベートして因子Xa消化体に熱負荷を加え、次いで緩衝液E (50mM NaCl; 20mMトリス-HCl pH7.8; 0.1mM EDTA; 1mM DTT) に平衡化し

50

たSource-Q (Pharmacia Biotech) カラムに添加する。酵素を緩衝液D中50mM 600mM NaClの直線勾配で溶離する。Bst L.F.を7倍容量の緩衝液F (20mM KPO₄, pH6.9; 0.1mM EDTA; 1mM DTT)で希釈し、緩衝液G (50mM NaCl, 20mM KPO₄, pH6.9; 0.1mM EDTA; 1mM DTT)に平衡化した1cm×10cmのヘパリン-TSK 5PWガード樹脂カラムに添加する。酵素を緩衝液F中50mM 600mM NaClの直線勾配で溶離する。酵素含有画分をSDS-PAGEで調べると、予想分子量が67,000で純度が90%以上であることが判明した(図4)。この組換えBst L.F.の比活性は100,800u/mgである。

【0015】

本明細書に記載する組換えBst L.F.は複製中に鎖置換することが可能で、5' 3'及び3' 5'のいずれのエキソヌクレアーゼ活性も有さない(図6)。これは、Bst Pol Iが3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有することを示すEpicentre (Madison, Wisconsin)のカタログに記載のものとは異なる。

10. エキソヌクレアーゼ活性アッセイを実施して、本発明のBst DNAポリメラーゼIと関連するエキソヌクレアーゼ活性の方向性を決定する。5' - ³²P及び3' - ³H末端ラベルを用いて線状PUC19 DNA基質を調製し、BstポリメラーゼIと共に、また対照としてVent、E. coli Pol I及びTaq DNAポリメラーゼを用いてインキュベートする間の2つのラベルの可溶化を監視する。Ventは3' 5'エキソヌクレアーゼを有し、結果として³Hラベルを可溶化する。Taqは5' 3'エキソヌクレアーゼを有し、従って³²Pラベルを可溶化する。E. coli Pol Iは5' 3'及び3' 5'の両方のエキソヌクレアーゼを有し、従ってE. coli Pol Iと共にインキュベートする間に³²P及び³Hの両方のラベルが可溶化する。Bst Pol Iと共にインキュベートすると、Taqと同様に³²Pラベルだけが可溶化し、このことはBst Pol Iが5' 3'エキソヌクレアーゼを有するが、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性は欠如していることを示している(図5)。配列データは、Bst Pol Iが3' 5'エキソヌクレアーゼドメイン中に「DXE」exoIモチーフを持たないことを示しており、これは本発明のエキソヌクレアーゼアッセイデータと一致していた。

【0016】

Bst Pol Iには3' 5'エキソヌクレアーゼ活性が欠如していることを更に確かめるために、3'末端にG:A mismatchesを含むプライマーでアニーリングしたM13 ssDNAを用いて、ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼアッセイを実施する。3' 5'エキソヌクレアーゼを有するVent DNAポリメラーゼは mismatchesのGを効果的に除去し、次いでプライマーを伸長して、より高い相対的ポリメラーゼ活性を得ることができる(図6、Vent exo⁺)。Taqポリメラーゼは3' 5'エキソヌクレアーゼを持たず、従って mismatchesを修正することができず、相対的ポリメラーゼ活性は5分の1である(図6、Taq)。Taqと同様に、Bstの相対的ポリメラーゼ活性も低く、このことはBstには mismatchesのGの除去に必要な3' 5'エキソヌクレアーゼ活性が欠如しており、このため3'末端が、伸長されたDNAポリメラーゼとなり得ることを示している。

【0017】

実施することが好ましい本発明の実施態様を以下の実施例で説明する。本実施例は例示的であり、本発明は特許請求の範囲に記載する範囲を除いて以下の実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0018】

実施例1

B. stearothermophilus DNAポリメラーゼI遺伝子のクローニン

10

20

30

40

50

グ

1. 逆 (inverse) PCR を用いての Bst Pol I 遺伝子の 3' 末端の決定
 1 反応当たり 1.2 μ g の B. stearothermophilus ゲノム DNA
 を用いて、複数の個別管内で制限消化を行なった。前記 DNA を 45 μ l の NE Buffer
Sau3AI (New England Biolabs NE Buffer Sau3AI = 100 mM NaCl、10 mM ビストリスプロパン - HCl、10 mM
 MgCl₂、1 mM ジチオトレイトール; pH 7.0 @ 25) に加えた混合物に、50
 U の Sau3AI (New England Biolabs, #169) を添加した。
 前記 DNA を 45 μ l の NE Buffer 4 (New England Biola
 bs NE Buffer 4 = 50 mM 酢酸カリウム、20 mM トリス - 酢酸塩、10 m 10
 M 酢酸マグネシウム、1 mM ジチオトレイトール; pH 7.9 @ 25) に加えた混合物
 には、50 U の NgoMI (New England Biolabs, #564) を
 添加した。Sau3AI 反応混合物には 100 μ g/ml の BSA を含有させた。いずれ
 の反応混合物も最終体積を 50 μ l とした。両消化物を 37 °C で 1 時間インキュベートし
 た。消化物から制限酵素を、フェノール (1 回) 及びクロロホルム (2 回) での抽出によ
 って除去した。各消化物に 5 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム及び 100 μ l の 95 % エタノール / 5 % イソプロパノールを添加することによって DNA を沈澱させ、これを遠心によ
 って回収した。DNA を個別管内で 500 μ l の T4 DNA リガーゼ緩衝液 (New E
 ngland Biolabs T4 DNA リガーゼ緩衝液 = 50 mM トリス - HCl
 pH 7.8、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオトレイトール、1 mM ATP、
 25 μ g/ μ l BSA) 中に再懸濁させ、3,000 U の T4 DNA リガーゼ (Ne
 w England Biolabs, #202) を添加した。両連結反応混合物を 16 °C
 で一晩、次いで 72 °C で 20 分間インキュベートした。

【0019】

次に、自己連結した Bst ゲノム DNA を、DNA ポリメラーゼ遺伝子の 3' 末端を位
 置決めする逆 PCR 反応において鋳型として用いた。上述のように消化し、かつ自己連結
 させた DNA 各 10 ng、200 μ M dNTP、50 ng の順方向 (forward)
 プライマー [5' GATTTAGCGGCACGGCTGAAAGAA3' (配列番号 5
)] 及び 50 ng の逆方向 (reverse) プライマー [5' CTGCAAAACTG
 CGGACGTTGA3' (配列番号 6)] を 49.5 μ l の ThermoPol 緩衝液
 (New England Biolabs ThermoPol 緩衝液 = 10 mM K
 Cl、20 mM トリス - HCl pH 8.8 @ 25、10 mM (NH₄)₂SO₄、
 2 mM MgSO₄、0.1% Triton X-100) に加えたものを用いて、個
 別管内で PCR 反応を生起させた。順方向及び逆方向プライマーは Bst ゲノム DNA に
 、互いから 55 塩基対離隔してアニールし、これらのプライマーは DNA を反対方向へ伸
 長させるように設計してある。

【0020】

プライマー設計の基とした DNA 配列は Bst DNA ポリメラーゼ I 遺伝子の、予め
 pGEM-T ベクター [Promega, #A362A (Promega, Madison, Wisconsin)] 中へクローニングし、かつ配列決定した (Sanger
 等, PNAS 74, pp. 5463 - 5467, 1977; この開示は本明細書
 中に参考として含まれる) 642 塩基対断片に由来した。各反応混合物に 2.5 U の Taq
DNA ポリメラーゼ [Perkin Elmer, N801-0046 (Perk
 in Elmer, Branchburg, New Jersey)] を添加し、最
 終体積を 50 μ l とした。上述のものと同じ反応混合物中に各鋳型を 10 ng ずつ用いて
 、付加的な 4 種の PCR 反応も生起させた。しかし、これらの反応では、2 種のプライマ
 ーの各一方を 2 種の DNA 鋳型のそれぞれと共にインキュベートした (4 種の反応)。こ
 れらの反応の生成物は、2 箇所における同一プライマーアニール及び前記 2 箇所の間
 の領域の増幅によって創出されるバックグラウンドを表わす。

【0021】

10

20

30

40

50

いずれのPCR反応でも、最初のセグメントは94 で2分間のサイクル1回から成った。後続PCRセグメントはそれぞれ、94 で0.5分間、62 で1分間及び72 で2分間のサイクル20回、並びに94 で0.5分間、62 で1分間及び72 で4分間のサイクル10回から成った。最後のセグメントは、72 で2分間及び25 で10分間のサイクル1回から成った。各50 µl 反応混合物から20 µl を取り分け、エチジウムブロミド存在下でのアガロースゲル電気泳動に掛けて増幅が生じたかどうかを判定した。Sau3AIで消化し、かつ自己連結させたBst DNAを鋳型として用いた反応混合物では、約1.5 kbの大きさの増幅断片が得られた。NgomIで消化し、かつ自己連結させたBst DNAを鋳型として用いた反応混合物では、約0.95 kbの大きさの増幅断片が得られた。これら二つの断片は、4種のバックグラウンド反応で創出されたいずれの断片にも対応しなかった。

10

【0022】

順方向プライマーと逆方向プライマーとの両方を用いて2種の鋳型を別個に増幅するPCR反応を繰り返した。前回と同じPCR条件を用いたが、いずれの反応も8個の個別管内で、体積50 µl の反応混合物中に同等の試薬を用いて生起させた。総量400 µl の各反応混合物を、エチジウムブロミド存在下にTAE緩衝液(40 mM トリス-酢酸、1 mM EDTA)中の1%低温融解アガロースゲル上で行なうアガロースゲル電気泳動に掛けた。適当なバンド(Sau3AIの場合1.5 kb、NgomIの場合0.95 kb)を切り取り、別個の管内で65 に加熱した。アガロースが融解した後、50 µl の -アガロースI緩衝液(New England Biolabs -アガロースI緩衝液 = 10 mMピストリス-HCl pH 6.5、1 mM Na₂EDTA)を添加し、管を40 に冷却した。各反応混合物に4 Uの -アガロースI(New England Biolabs, #392)を添加した。 -アガロースI処理は40 で1時間行なった。 -アガロース及びDNAポリメラーゼをフェノール(1回)及びクロロホルム(2回)での抽出によって除去した。50 µl の3 M酢酸ナトリウム及び1,000 µl の95%エタノール/5%イソプロパノールを添加することによってDNAを沈澱させ、これを遠心によって回収した。各DNAペレットを50 µl の1×TE(10 mM トリス-HCl pH 8.0、1 mM EDTA)中に再懸濁させ、1 µl 試料をアガロースゲル電気泳動に掛けてDNA濃度を測定した。両DNA断片を、DNAをポリメラーゼ遺伝子の3'末端方向へ伸長させると考えられる順方向プライマーを用いて配列決定した(Sanger等, PNAS 74, pp. 5463-5467, 1977; この開示は本明細書中に参考として含まれる)。NgomIで消化し、かつ自己連結させた配列中の180塩基対の位置に終結コドン(TAA)を見出した。

20

30

【0023】

2. Bst Pol I 遺伝子の増幅

2 µgのBst DNAポリメラーゼIをトリス-トリシン10-20%勾配ポリアクリルアミドゲル(Novex, San Diego, California)上での電気泳動に掛け、電気プロット(electroblot)した(Matsudaira, J. Biol. Chem. 262, pp. 10035-10038, 1987; この開示は本明細書中に参考として含まれる)。膜をクーマシーブルーR-250で染色し、約97 kDaのタンパク質のバンドを切り取り、連続的に分解(sequential degradation)した(Waite-Rees等, J. Bacteriol. 173, pp. 5207-5219, 1992; この開示は本明細書中に参考として含まれる)。97 kDaタンパク質の最初の7残基はMet-Lys-Lys-Lys-Leu-Val-Leu(配列番号7)に対応した。プライマーは、Bst DNAポリメラーゼIのN末端アミノ酸配列[5 WTGAARAARAARC TNGTNYT3 (配列番号8)]と、逆PCRから得られた遺伝子の3'末端の配列[5 TCTTATTTNGCATCATACCATGT3 (配列番号9)]とに基づき設計した。150 ngのBstゲノムDNAと、100 pmolの各プライマーと、200 µM dNTPとを98 µlのThermoPol緩衝液に添加した。1 µl(5 U

40

50

)の Taq DNAポリメラーゼ及び1 μ l (0.05 U)の Deep Vent DNAポリメラーゼ (New England Biolabs, #258) を添加してPCR反応 (94 で0.5分間、45 で1分間及び72 で3分間のサイクル35回) を開始させた。15 μ l を取り分け、エチジウムブロミド存在下でのアガロースゲル電気泳動に掛けた。 Bst DNAポリメラーゼI 遺伝子の予測される大きさに対応する2.6 kbの断片が増幅された。残りの85 μ l を、エチジウムブロミド存在下に TAE 緩衝液中の1%低温融解アガロースゲル上で行なうゲル電気泳動に掛け、2.6 kb断片を切り取った。DNAを含有する切片を -アガロースI で処理し、フェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール及び酢酸ナトリウムで沈澱させ、これらの操作はいずれも先に述べたように行なった。DNAペレットを TE 緩衝液中に再懸濁させた。2.6 kb断片の制限マッピングを行なって、完全な断片のベクター中へのクローニングを可能にするプライマーの設計がそれによって可能となる単一の制限部位の存在を確認した。 NcoI、 NotI 及び XbaI がDNA断片を切断しなかったため、断片の3' 末端にアニールする、 NcoI 及び NotI 部位を有する第一のプライマー [5' TCCATGGCGCCGCTCTTATTTNGCATCATACCATGTT3' (配列番号10)] と、断片の5' 末端にアニールする、 XbaI 部位を有する第二のプライマー [5' ATTCTAGAGGAAACAGACCWGTGAARAAARAAARCTNGTNYT3' (配列番号11)] との二つのプライマーを設計した。2.6 kb断片の増幅に用いたのとまさに同じ条件下に、ただし本来のプライマーを上記制限酵素部位を有するプライマーに置き換えてPCR反応を生起させた。総量600 μ l のPCR反応混合物を収容した同等の管を6本用いた。

10

20

【0024】

総ての600 μ l 混合物を1%低温融解アガロースゲル上でのゲル電気泳動に掛け、2.6 kbの増幅DNA断片をゲルから切り取った。アガロース中に埋まったDNAを1mlの NE Buffer 2 (New England Biolabs NE Buffer 2 = 10mM トリス-HCl、10mM MgCl₂、50mM NaCl、1mM DTT; pH 7.9 @ 25) に対し、4 で45分間透析した。次に、アガロースを新しい管に入れ、65 で10分間融解させた。融解したアガロースゲルを37 に冷却し、7 μ l の10mg/mlの BSA、3.5 Uの -アガロースI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) 及び100 Uの XbaI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) を添加した。37 で1時間インキュベートした後、pH 8.0の5M NaCl 及び1M トリスを添加して、NaCl 及びトリスの最終濃度をそれぞれ100mM及び50mMとした。その後、XbaI 消化物に100 Uの NotI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) を添加し、37 で更に1時間インキュベートした。T7プロモーターを含有する pET-21a (Novagen, Madison, Wisconsin) 1 μ g を45 μ l の NE Buffer 2 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) 中で37 で1時間、25 Uの NotI 及び50 Uの XbaI で消化した。先に述べたのと同様に、反応混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、酢酸ナトリウム及びエタノールで沈澱させ、60 μ l の1x TE 中に再懸濁させた。400 ngの XbaI/NotI 消化PCR生成物を45 μ l のT4 DNAリガーゼ緩衝液中で100 ngの XbaI/NotI 消化 pET-21a に連結させた。5,000 UのT4 DNAリガーゼを添加して最終体積を50 μ l とし、反応混合物を16 で4時間インキュベートした。

30

40

【0025】

100 μ l の CaCl₂ コンピテント (Maniatis等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982; この開示は本明細書中に参考として含まれる) RR1 細胞 (New England Biolabs) を10 μ l の連結混合物で形質転換し、アンピシリン (100 μ g/ml) を含有

50

するLB (ルリアブロス; 1 l; トリプトン 10 g、酵母抽出物 5 g、170 mM NaCl、0.5 mM グルコース、0.5 mM MgCl₂; pH 7.2) プレート上で37で一晩インキュベートした。コロニーを採取し、2.6 kb 挿入物に関してミニプラスミド調製物 (Wizard Minipreps; DNA精製系; Promega, Madison, Wisconsin) でスクリーニングした。スクリーニングした38個の形質転換体中5個が適正な挿入物を有し、これら適正な挿入物を有する形質転換体のうちの1個から得た1 μlのミニプレップDNAを用いて、IPTGで誘導されるとT7 RNAポリメラーゼを産生し得るCaCl₂コンピテントER2169細胞 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) 50 μlを形質転換した。細胞をアンピシリン (100 μg/ml) 含有LBプレート上に播種し、37で一晩インキュベートした。一つのコロニーを採取し、20 mlのアンピシリン (100 μg/ml) 含有LB中でKlett 200の読み取りができるまで37で増殖させた。IPTGを最終濃度0.5 mMとなるように添加し、細胞を37で更に2時間増殖させた。細胞を遠心によって回収し、10 mlの音波処理緩衝液 (50 mM NaCl、10 mM トリス pH 7.4、0.1 mM EDTA、1 mM 2-メルカプトエタノール) 中に再懸濁させ、音波処理によって溶解させた。溶解物を遠心によって分離し、かつ65で20分間インキュベートして、大腸菌宿主細胞に由来するDNAポリメラーゼを変性させた。変性タンパク質を遠心によってペレット化し、上清をBst DNAポリメラーゼI活性に関して、プライミングされた (primed) M13mp18 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) の一本鎖DNA中への³H dTTPの取り込みを定量することによってアッセイした。5 μlの上清を、2.86 mMの、プライマー#1224 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) をアニールされたM13一本鎖DNA、200 μM dATP、dCTP、dGTP、100 μM ³H dTTP、100 μg/ml BSA、20 mM トリス pH 8.8、50 mM KCl及び10 mM MgCl₂を含有するBstポリメラーゼアッセイ混合物45 μlと共に65で5分間インキュベートした。40 μlの反応混合物を濾紙 (Whatman, 024-1030) にスポットし、濾紙を10%トリクロ酢酸で3回、100%イソプロパノールで1回洗浄した。濾紙を乾燥し、³H dTTPの取り込みを液体シンチレーション計数によって定量した。1 gの誘導ER2169細胞が約30,000 UのBst DNAポリメラーゼIを産生することが確認された。

【0026】

実施例 2

Bst大断片をコードする5'末端切頭型Bst Pol I遺伝子のクローニング

1. Bst L. F. のN末端境界 (border) のズブチリシンでの解明
50 μgのBst DNAポリメラーゼIを、140 mM K₂PO₄、3 mM -メルカプトエタノール、30 mM 硫酸アンモニウム、及び125 μgの仔ウシ胸腺DNAの存在下に室温で5分間ズブチリシン (最終濃度75 ng/μl) で消化した。フェニルメチルスルホニルフルオリドを2.4 mg/mlの最終濃度で添加することによって消化を停止した。得られたズブチリシン消化Bst L. F.を4-20%勾配SDS-PAGEゲル (Daichi Integrated Separation Systems, Natick, Massachusetts) 上での電気泳動によって定量した。2 μgのズブチリシン消化BstポリメラーゼIを、トリス-トリシン10-20%勾配ポリアクリルアミドゲル (Novex, San Diego, California) 上での電気泳動に掛け、電気プロットした (Matsudaira, J. Biol. Chem. 262, pp. 10035-10038, 1987; この開示は本明細書中に参考として含まれる)。この67 kDa大断片のN末端アミノ酸配列を先に述べたように決定した。67 kDaタンパク質の最初の7残基はAla-Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Leu (配列番号12) に対応し、このことはBst L. F. のN末端境界がAla289とAla290との間であることを示している

(図2)。この情報に基づき、Bst L. F. の境界の下流にアニールするプライマー [5 AATTTGCGCAGAAGGGGAGAAACCGCTTGA3 (配列番号13)] を設計した。このプライマーはFspI切断部位を有するように設計したので、FspIで消化してpMAL-c2ベクターのXmnI部位に連結させることができた。Bst Pol I 遺伝子の3'末端にアニールする、XbaI切断部位を有する別のプライマー [5 TATTCTAGATCTTATTTGGCATCATACCATGT3 (配列番号14)] も設計した。

【0027】

PCRを生起させて、Bst大断片遺伝子を増幅した。392 µlのThermoPol緩衝液に400 ngの各プライマー及び200 µM dNTPを加えたものに1.6 µgのBstゲノムDNAを添加した。反応混合物に、40 UのTaq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey) 及び0.4 UのDeep Vent DNAポリメラーゼ (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) を添加した。PCRは、94 °Cで0.5分間、50 °Cで1分間及び72 °Cで3分間生起させるサイクルを18回実施した。Bst大断片遺伝子の予測される大きさに対応する1.8 kb断片が増幅された。残りのPCR生成物を精製し、FspI及びXbaIで切断した。195 ngのFspI/XbaI消化PCR生成物を45 µlのT4 DNAリガーゼ緩衝液 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) 中で75 ngのXmnI/XbaI消化pMAL-c2に連結させた。5,000 UのT4 DNAリガーゼを添加し、反応混合物を16 °Cで4時間インキュベートした。100 µlのCaCl₂ コンピテント (Maniatis等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982; この開示は本明細書中に参考として含まれる) RRI細胞 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) を10 µlの連結混合物で形質転換し、アンピシリン (100 µg/ml) を含有するLBプレート上で37 °Cで一晩インキュベートした。適正な挿入物をミニプラスミド調製物でスクリーニングした。スクリーニングした16個の形質転換体中2個が予測された1.8 kb挿入物を有した。クローニングした遺伝子を、マルトース結合タンパク質 (MBP) をコードするpMAL-c2 malE遺伝子 (大腸菌由来) の下流に直接挿入し、それによってIPTGで誘導すればMBP-Bst L. F. 融合タンパク質が発現されるようにした。正しく構築した組み換えプラスミドを用いて、50 µlのCaCl₂ コンピテントTB1細胞 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) を形質転換した。形質転換プレートから得た単一コロニーを20 mlのアンピシリン (100 µg/ml) 含有LBに接種した。培養がKlett 200に到達した時IPTGを濃度0.5 mMとなるように添加し、細胞を37 °Cで更に2時間増殖させた。

【0028】

細胞を遠心によって回収し、10 mlの音波処理緩衝液中に再懸濁させ、音波処理によって溶解させた。溶解物を遠心によって分離し、かつ65 °Cで20分間インキュベートして、宿主細胞に由来するDNAポリメラーゼを変性させた。変性タンパク質を遠心によってペレット化し、上清をBstポリメラーゼ活性に関して実施例1に述べたようにアッセイした。1 gの形質転換TB1細胞が約130,000 UのBst大断片を産生することが確認された。Bst L. F. を有する融合構築物のサンプルを、ブダベスト条約に基づき1995年8月2日付でAmerican Type Culture Collectionに寄託し、ATCC受託番号第69877号を付与された。

【0029】

実施例3

Bst DNAポリメラーゼ大断片の精製

ステップ5以外、いずれのステップも4 °Cで実施した。

ステップ1: 粗抽出物の調製

10

20

30

40

50

64gの酵素保持 (bearing) 細胞 (NEB #956) を解凍し、緩衝液C (200mM NaCl、20mM トリス-HCl pH7.4、1mM EDTA、1mM DTT) 中に再懸濁させた。細胞を8分間の音波処理によって破壊した。抽出物を4において、Beckman J2-21遠心機で12,000rpmで30分間遠心した。デカンテーションによって上清を分離した。

ステップ2：アミロースアフィニティークロマトグラフィー

ステップ1で得た上清を、緩衝液Cで平衡させた200ml容アミロース (NEB #800-21) カラムに添加した。カラムを2,200mlの緩衝液Cで洗浄し、10mMのマルトースを含有する緩衝液C 800mlで酵素を溶離した。タンパク質ピーク画分をプールし、緩衝液D (500mM NaCl、20mM トリス-HCl pH7.4、0.1mM EDTA、1mM DTT、50%グリセロール) 中への透析で濃縮した。

10

ステップ3：S-100サイズ排除クロマトグラフィー

前ステップで得られた貯溜物を、緩衝液Dで平衡させた5cm×90cm S-100 (Pharmacia Biotech., Piscataway, New Jersey) カラムに添加した。2,000mlのS緩衝液の添加によって酵素を溶離した。酵素含有画分をSDS-PAGEによって確認し、プールし、緩衝液E (50mM NaCl、20mM トリス-HCl pH7.8、0.1mM EDTA、1mM DTT) 中へ透析した。

ステップ4：Xa因子プロテアーゼによる融合タンパク質の切断

20

前ステップで得られた酵素200mg (150ml中) を2mgのXa因子 (New England Biolabs #800-10) と共に4で22時間インキュベートした。

ステップ5：Xa因子への熱負荷付与 (heat-stressing)

ステップ4で得られた切断生成物150mlに、65で20分間のインキュベーションと、続く4への冷却とによって熱負荷を付与した。

ステップ6：Source-Qイオン交換クロマトグラフィー

前ステップで得られた貯溜物を、緩衝液Eで平衡させた1.6cm×10cm Source-Q (Pharmacia Biotech., Piscataway, New Jersey) カラムに添加した。上記と同じ緩衝液中で、150mlの50-600mM直線勾配NaClで酵素を溶離した。酵素含有画分をSDS-PAGEで確認し、プールした。

30

ステップ7：ヘパリン-TSK 5PWガードレジンカラムクロマトグラフィー

前ステップで得られた貯溜物を7倍容量の20mM KPO₄ (pH6.9)、0.1mM EDTA、1mM DTTで希釈し、緩衝液G (50mM NaCl、20mM KPO₄ pH6.9、0.1mM EDTA、1mM DTT) で平衡させた1cm×10cmヘパリン-TSK 5PWガードレジンカラムに添加した。H緩衝液中で、100mlの50-600mM直線勾配NaClで酵素を溶離した。酵素含有画分をSDS-PAGE (図4) で確認し、プールし、20倍容量の貯蔵緩衝液 (50mM KCl、10mM トリス-HCl pH7.5、0.1mM EDTA、1mM DTT) に対して透析した。50μlの反応混合物中の1,000単位を最適反応条件下に4時間インキュベートして確認したところ、酵素調製物は実質的に純粋で、他の汚染酵素/タンパク質を含有せず、かつ検出可能なエキソヌクレアーゼ活性を有しなかった。

40

【0030】

【表 1】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2631

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：1 . . 2631

配列

ATG AAG AAG AAG CTA GTA CTA ATT GAT GGC AAC AGT GTG GCA TAC CGC	48	20
Met Lys Lys Lys Leu Val Leu Ile Asp Gly Asn Ser Val Ala Tyr Arg		
1 5 10 15		
GCC TTT TTT GCC TTG CCA CTT TTG CAT AAC GAC AAA GGC ATT CAT ACG	96	
Ala Phe Phe Ala Leu Pro Leu Leu His Asn Asp Lys Gly Ile His Thr		
20 25 30		
AAT GCG GTT TAC GGG TTT ACG ATG ATG TTG AAC AAA ATT TTG GCG GAA	144	
Asn Ala Val Tyr Gly Phe Thr Met Met Leu Asn Lys Ile Leu Ala Glu		
35 40 45		
GAA CAA CCG ACC CAT TTA CTT GTA GCG TTT GAC GCC GGA AAA ACG ACG	192	30
Glu Gln Pro Thr His Leu Leu Val Ala Phe Asp Ala Gly Lys Thr Thr		
50 55 60		
TTC CCG CAT GAA ACG TTT CAA GAG TAT AAA GGC GGA CCG CAA CAA ACT	240	
Phe Arg His Glu Thr Phe Gln Glu Tyr Lys Gly Gly Arg Gln Gln Thr		
65 70 75 80		
CCC CCG GAA CTG TCC GAG CAG TTT CCG CTG TTG CCG GAG CTA TTA AAA	288	
Pro Pro Glu Leu Ser Glu Gln Phe Pro Leu Leu Arg Glu Leu Leu Lys		
85 90 95		
CCG TAC CCG ATT CCC GCT TAT GAA CTT GAT CAT TAC GAA GCG GAC GAT	336	
Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Tyr Glu Leu Asp His Tyr Glu Ala Asp Asp		
100 105 110		40
ATT ATC GGG ACG CTC GCT GCC CGC GCT GAG CAA GAA GCG TTT GAA GTG	384	
Ile Ile Gly Thr Leu Ala Ala Arg Ala Glu Gln Glu Gly Phe Glu Val		
115 120 125		

AAA ATC ATT TCC GGC GAC CGC GAT TTA ACC CAG CTC GCC TCC CGT CAT	432	
Lys Ile Ile Ser Gly Asp Arg Asp Leu Thr Gln Leu Ala Ser Arg His		
130 135 140		
GTG ACG GTC GAT ATT ACG AAA AAA GGG ATT ACC GAC ATT GAG CCG TAT	480	
Val Thr Val Asp Ile Thr Lys Lys Gly Ile Thr Asp Ile Glu Pro Tyr		
145 150 155 160		
ACG CCA GAG ACC GTT CGC GAA AAA TAC GGC CTG ACT CCG GAG CAA ATA	528	
Thr Pro Glu Thr Val Arg Glu Lys Tyr Gly Leu Thr Pro Glu Gln Ile		
165 170 175		10
GTG GAT TTA AAA GGA TTG ATG GGC GAT AAA TCC GAC AAC ATC CCG GGC	576	
Val Asp Leu Lys Gly Leu Met Gly Asp Lys Ser Asp Asn Ile Pro Gly		
180 185 190		
GTG CCC GGC ATC GGG GAA AAA ACG GCG GTC AAG CTG CTG AAG CAA TTT	624	
Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Lys Leu Leu Lys Gln Phe		
195 200 205		
GGT ACG GTG GAA AAT GTG CTC GCA TCG ATT GAT GAG GTG AAA GGG GAA	672	
Gly Thr Val Glu Asn Val Leu Ala Ser Ile Asp Glu Val Lys Gly Glu		
210 215 220		
AAA CTG AAA GAA AAC TTG CGC CAA CAC CGG GAT TTA GCT CTC TTG ACG	720	20
Lys Leu Lys Glu Asn Leu Arg Gln His Arg Asp Leu Ala Leu Leu Ser		
225 230 235 240		
AAA CAG CTG GCG TCC ATT TGC CGC GAC GCC CCG GTT GAG CTG TCG TTA	768	
Lys Gln Leu Ala Ser Ile Cys Arg Asp Ala Pro Val Glu Leu Ser Leu		
245 250 255		
GAT GAC ATT GTC TAC GAA GGA CAA GAC CGC GAA AAA GTC ATC GCG TTA	816	
Asp Asp Ile Val Tyr Glu Gly Gln Asp Arg Glu Lys Val Ile Ala Leu		
260 265 270		
TTT AAA GAA CTC GGG TTT CAG TCG TTC TTG GAA AAA ATG GCC GCG CCG	864	30
Phe Lys Glu Leu Gly Phe Gln Ser Phe Leu Glu Lys Met Ala Ala Pro		
275 280 285		
GCA GCC GAA GGG GAG AAA CCG CTT GAG GAG ATG GAG TTT GCC ATC GTT	912	
Ala Ala Glu Gly Glu Lys Pro Leu Glu Glu Met Glu Phe Ala Ile Val		
290 295 300		

GAC GTC ATT ACC GAA GAG ATG CTT GCC GAC AAG GCA GCG CTT GTC GTT Asp Val Ile Thr Glu Glu Met Leu Ala Asp Lys Ala Ala Leu Val Val 305 310 315 320	960	
GAG GTG ATG GAA GAA AAC TAC CAC GAT GCC COG ATT GTC GGA ATC GCA Glu Val Met Glu Glu Asn Tyr His Asp Ala Pro Ile Val Gly Ile Ala 325 330 335	1008	
CTA GTG AAC GAG CAT GGG CGA TTT TTT ATG CGC COG GAG ACC GCG CTG Leu Val Asn Glu His Gly Arg Phe Phe Met Arg Pro Glu Thr Ala Leu 340 345 350	1056	
GCT GAT TCG CAA TTT TTA GCA TGG CTT GCC GAT GAA ACG AAG AAA AAA Ala Asp Ser Gln Phe Leu Ala Trp Leu Ala Asp Glu Thr Lys Lys Lys 355 360 365	1104	10
AGC ATG TTT GAC GCC AAG CCG GCA GTC GTT GCC TTA AAG TGG AAA GGA Ser Met Phe Asp Ala Lys Arg Ala Val Val Ala Leu Lys Trp Lys Gly 370 375 380	1152	
ATT GAG CTT CGC GGC GTC GCC TTT GAT TTA TTG CTC GCT GCC TAT TTG Ile Glu Leu Arg Gly Val Ala Phe Asp Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Leu 385 390 395 400	1200	
CTC AAT CCG GCT CAA GAT GCC GGC GAT ATC GCT GCG GTG GCG AAA ATG Leu Asn Pro Ala Gln Asp Ala Gly Asp Ile Ala Ala Val Ala Lys Met 405 410 415	1248	20
AAA CAA TAT GAA GCG GTG CCG TCG GAT GAA GCG GTC TAT GGC AAA GGC Lys Gln Tyr Glu Ala Val Arg Ser Asp Glu Ala Val Tyr Gly Lys Gly 420 425 430	1296	
GTC AAG CCG TCG CTG CCG GAC GAA CAG ACG CTT GCT GAG CAT CTC GTT Val Lys Arg Ser Leu Pro Asp Glu Gln Thr Leu Ala Glu His Leu Val 435 440 445	1344	
CGC AAA GCG GCA GCC ATT TGG GCG CTT GAG CAG CCG TTT ATG GAC GAT Arg Lys Ala Ala Ala Ile Trp Ala Leu Glu Gln Pro Phe Met Asp Asp 450 455 460	1392	30
TTG CCG AAC AAC GAA CAA GAT CAA TTA TTA ACG AAG CTT GAG CAG CCG Leu Arg Asn Asn Glu Gln Asp Gln Leu Leu Thr Lys Leu Glu Gln Pro 465 470 475 480	1440	

CTG GCG GCG ATT TTG GCT GAA ATG GAA TTC ACT GGG GTG AAC GTG GAT	1488	
Leu Ala Ala Ile Leu Ala Glu Met Glu Phe Thr Gly Val Asn Val Asp		
485 490 495		
ACA AAG CCG CTT GAA CAG ATG GGT TCG GAG CTC GCC GAA CAA CTG CGT	1536	
Thr Lys Arg Leu Glu Gln Met Gly Ser Glu Leu Ala Glu Gln Leu Arg		
500 505 510		
GCC ATC GAG CAG CGC ATT TAC GAG CTA GCC GGC CAA GAG TTC AAC ATT	1584	
Ala Ile Glu Gln Arg Ile Tyr Glu Leu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ile		
515 520 525		10
AAC TCA CCA AAA CAG CTC GGA GTC ATT TTA TTT GAA AAG CTG CAG CTA	1632	
Asn Ser Pro Lys Gln Leu Gly Val Ile Leu Phe Glu Lys Leu Gln Leu		
530 535 540		
CCG GTG CTG AAG AAG ACG AAA ACA GGC TAT TCG ACT TCG GCT GAT GTG	1680	
Pro Val Leu Lys Lys Thr Lys Thr Gly Tyr Ser Thr Ser Ala Asp Val		
545 550 555 560		
CTT GAG AAG CTT GCG CCG CAT CAT GAA ATC GTC GAA AAC ATT TTG CAT	1728	
Leu Glu Lys Leu Ala Pro His His Glu Ile Val Glu Asn Ile Leu His		
565 570 575		
TAC CGC CAG CTT GCG AAA CTG CAA TCA ACG TAT ATT GAA GGA TTG TTG	1776	
Tyr Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu Leu		
580 585 590		20
AAA GTT GTG CGC CCT GAT ACC GGC AAA GTG CAT ACG ATG TTC AAC CAA	1824	
Lys Val Val Arg Pro Asp Thr Gly Lys Val His Thr Met Phe Asn Gln		
595 600 605		
GCG CTG ACG CAA ACT GGG CCG CTC AGC TCG GCC GAG CCG AAC TTG CAA	1872	
Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ala Glu Pro Asn Leu Gln		
610 615 620		
AAC ATT CCG ATT CCG CTC GAA GAG GGG CCG AAA ATC CGC CAA GCG TTC	1920	
Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala Phe		
625 630 635 640		30
GTC CCG TCA GAG CCG GAC TGG CTC ATT TTC GCC GCC GAT TAC TCA CAA	1968	
Val Pro Ser Glu Pro Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser Gln		
645 650 655		

ATT GAA TTG CGC GTC CTC GCC CAT ATC GCC GAT GAC GAC AAT CTA ATT 2016
 Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Asp Asp Asp Asn Leu Ile
 660 665 670

GAA GCG TTC CAA CGC GAT TTG GAT ATT CAC ACA AAA ACG GCG ATG GAC 2064
 Glu Ala Phe Gln Arg Asp Leu Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met Asp
 675 680 685

ATT TTC CAT GTG AGC GAA GAG GAA GTC ACG GCC AAC ATG CGC CGC CAG 2112
 Ile Phe His Val Ser Glu Glu Glu Val Thr Ala Asn Met Arg Arg Gln
 690 695 700

GCA AAG GCC GTT AAC TTC GGT ATC GTT TAC GGA ATT AGC GAT TAC GSA 2160
 Ala Lys Ala Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr Gly
 705 710 715 720

TTG GCG CAA AAC TTG AAC ATT ACG CGC AAA GAA GCT GCC GAA TTT ATC 2208
 Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Thr Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe Ile
 725 730 735

GAA CGT TAC TTC GCC AGC TTT CCG GGC GTA AAG CAG TAT ATG GAA AAC 2256
 Glu Arg Tyr Phe Ala Ser Phe Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Glu Asn
 740 745 750

ATT GTG CAA GAA GCG AAA CAG AAA GGA TAT GTG ACA ACG CTG TTG CAT 2304
 Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu His
 755 760 765

CGG CGC CGC TAT TTG CCT GAT ATT ACA AGC CGC AAT TTC AAC GTC CGC 2352
 Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val Arg
 770 775 780

AGT TTT GCA GAG CGG ACG GCC ATG AAC ACG CCA ATT CAA GGA AGC GCC 2400
 Ser Phe Ala Glu Arg Thr Ala Met Asn Thr Pro Ile Gln Gly Ser Ala
 785 790 795 800

GCT GAC ATT ATT AAA AAA GCG ATG APT GAT TTA GCG GCA CGG CTG AAA 2448
 Ala Asp Ile Ile Lys Lys Ala Met Ile Asp Leu Ala Ala Arg Leu Lys
 805 810 815

GAA GAG CAG CTT CAG GCT CGT CTT TTG CTG CAA GTG CAT GAC GAG CTC 2496
 Glu Glu Gln Leu Gln Ala Arg Leu Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu
 820 825 830

ATT TTG GAA GCG CCA AAA GAG GAA ATT GAG CGA TTA TGT GAG CTT GTT 2544

10

20

30

Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu Glu Ile Glu Arg Leu Cys Glu Leu Val
835 840 845

CCG GAA GTG ATG GAG CAG GCC GTT ACG CTC CGC GTG CCG CTG AAA GTC 2592
Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Thr Leu Arg Val Pro Leu Lys Val
850 855 860

GAC TAC CAT TAC GGC CCA ACA TGG TAT GAT GCC AAA TA 2631
Asp Tyr His Tyr Gly Pro Thr Trp Tyr Asp Ala Lys
865 870 875

10

配列番号：2

配列の長さ：876

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Lys Lys Lys Leu Val Leu Ile Asp Gly Asn Ser Val Ala Tyr Arg 20
1 5 10 15

Ala Phe Phe Ala Leu Pro Leu Leu His Asn Asp Lys Gly Ile His Thr
20 25 30

Asn Ala Val Tyr Gly Phe Thr Met Met Leu Asn Lys Ile Leu Ala Glu
35 40 45

Glu Gln Pro Thr His Leu Leu Val Ala Phe Asp Ala Gly Lys Thr Thr
50 55 60

Phe Arg His Glu Thr Phe Gln Glu Tyr Lys Gly Gly Arg Gln Gln Thr 30
65 70 75 80

Pro Pro Glu Leu Ser Glu Gln Phe Pro Leu Leu Arg Glu Leu Leu Lys
85 90 95

Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Tyr Glu Leu Asp His Tyr Glu Ala Asp Asp
100 105 110

Ile Ile Gly Thr Leu Ala Ala Arg Ala Glu Gln Glu Gly Phe Glu Val
115 120 125

20

30

Lys Ile Ile Ser Gly Asp Arg Asp Leu Thr Gln Leu Ala Ser Arg His
 130 135 140

Val Thr Val Asp Ile Thr Lys Lys Gly Ile Thr Asp Ile Glu Pro Tyr
 145 150 155 160

Thr Pro Glu Thr Val Arg Glu Lys Tyr Gly Leu Thr Pro Glu Gln Ile
 165 170 175

Val Asp Leu Lys Gly Leu Met Gly Asp Lys Ser Asp Asn Ile Pro Gly
 180 185 190

Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Lys Leu Leu Lys Gln Phe
 195 200 205

Gly Thr Val Glu Asn Val Leu Ala Ser Ile Asp Glu Val Lys Gly Glu
 210 215 220

Lys Leu Lys Glu Asn Leu Arg Gln His Arg Asp Leu Ala Leu Leu Ser
 225 230 235 240

Lys Gln Leu Ala Ser Ile Cys Arg Asp Ala Pro Val Glu Leu Ser Leu
 245 250 255

Asp Asp Ile Val Tyr Glu Gly Gln Asp Arg Glu Lys Val Ile Ala Leu
 260 265 270

Phe Lys Glu Leu Gly Phe Gln Ser Phe Leu Glu Lys Met Ala Ala Pro
 275 280 285

Ala Ala Glu Gly Glu Lys Pro Leu Glu Glu Met Glu Phe Ala Ile Val
 290 295 300

Asp Val Ile Thr Glu Glu Met Leu Ala Asp Lys Ala Ala Leu Val Val
 305 310 315 320

Glu Val Met Glu Glu Asn Tyr His Asp Ala Pro Ile Val Gly Ile Ala
 325 330 335

Leu Val Asn Glu His Gly Arg Phe Phe Met Arg Pro Glu Thr Ala Leu
 340 345 350

Ala Asp Ser Gln Phe Leu Ala Trp Leu Ala Asp Glu Thr Lys Lys Lys
 355 360 365

10

20

30

Ser	Met	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Lys	Trp	Lys	Gly	
370						375					380					
Ile	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	
385					390					395					400	
Leu	Asn	Pro	Ala	Gln	Asp	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala	Ala	Val	Ala	Lys	Met	
				405					410					415		
Lys	Gln	Tyr	Glu	Ala	Val	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Gly	
			420					425					430			
Val	Lys	Arg	Ser	Leu	Pro	Asp	Glu	Gln	Thr	Leu	Ala	Glu	His	Leu	Val	10
		435					440					445				
Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Glu	Gln	Pro	Phe	Met	Asp	Asp	
	450					455					460					
Leu	Arg	Asn	Asn	Glu	Gln	Asp	Gln	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Glu	Gln	Pro	
465					470					475					480	
Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Met	Glu	Phe	Thr	Gly	Val	Asn	Val	Asp	
				495					490					495		
Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	20
			500					505					510			
Ala	Ile	Glu	Gln	Arg	Ile	Tyr	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Glu	Phe	Asn	Ile	
		515					520					525				
Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Leu	Gly	Val	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	
	530					535					540					
Pro	Val	Leu	Lys	Lys	Thr	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ala	Asp	Val	
545					550					555					560	
Leu	Glu	Lys	Leu	Ala	Pro	His	His	Glu	Ile	Val	Glu	Asn	Ile	Leu	His	30
				565					570					575		
Tyr	Arg	Gln	Leu	Gly	Lys	Leu	Gln	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	
			580					585					590			
Lys	Val	Val	Arg	Pro	Asp	Thr	Gly	Lys	Val	His	Thr	Met	Phe	Asn	Gln	
		595					600					605				

Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ala Glu Pro Asn Leu Gln
610 615 620

Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala Phe
625 630 635 640

Val Pro Ser Glu Pro Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser Gln
645 650 655

Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Asp Asp Asp Asn Leu Ile
660 665 670

10

Glu Ala Phe Gln Arg Asp Leu Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met Asp
675 680 685

Ile Phe His Val Ser Glu Glu Glu Val Thr Ala Asn Met Arg Arg Gln
690 695 700

Ala Lys Ala Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr Gly
705 710 715 720

Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Thr Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe Ile
725 730 735

20

Glu Arg Tyr Phe Ala Ser Phe Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Glu Asn
740 745 750

Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu His
755 760 765

Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val Arg
770 775 780

Ser Phe Ala Glu Arg Thr Ala Met Asn Thr Pro Ile Gln Gly Ser Ala
785 790 795 800

Ala Asp Ile Ile Lys Lys Ala Met Ile Asp Leu Ala Ala Arg Leu Lys
805 810 815

30

Glu Glu Gln Leu Gln Ala Arg Leu Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu
820 825 830

Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu Glu Ile Glu Arg Leu Cys Glu Leu Val
835 840 845

Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Thr Leu Arg Val Pro Leu Lys Val
850 855 860

40

Asp Tyr His Tyr Gly Pro Thr Trp Tyr Asp Ala Lys
865 870 875

配列番号：3

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列

10

```

Met Lys Lys Lys Leu Val Leu Ile Asp Gly Asn Ser Val Ala Tyr Arg
1           5           10           15
Ala Phe Phe Ala Leu
                20

```

配列番号：4

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

20

配列の種類：タンパク質

配列

```

Ala Glu Gly Glu Lys Pro Leu
1           5

```

配列番号：5

配列の長さ：24

30

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

GATTTAGCGG CAAGGCTGAA AGAA

24

40

配列番号：6

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

10

CTGCAAAACT GCGGAOGTGA

21

配列番号：7

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列

20

Met Lys Lys Lys Leu Val Leu
1 5

配列番号：8

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

30

WTGAARAARA ARCTNGTNYT

20

40

配列番号：9

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

10

TCTTATTTCG CATCATACCA TGT

23

配列番号：10

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

20

TCCATGGCGG CCGCTCTTAT TINGCATCAT ACCATGT

37

配列番号：11

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

30

ATTCTAGAGG AACAGACON TGAARAARA RCTNGTNYT

39

40

「*」によって示し、またN末端タンパク質配列によって確認されたアミノ酸配列は下線を付して示す。

【図2C】Bst DNAポリメラーゼI遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)及び前記遺伝子がコードするタンパク質配列(配列番号2)を示す。ズブチリシン切断部位を「*」によって示し、またN末端タンパク質配列によって確認されたアミノ酸配列は下線を付して示す。

【図3】Xa因子によるMBP-Bst L.F.融合タンパク質の切断を示す説明図である。レーン1~4は切断されていないS-100貯溜物(それぞれ約2.7、5.4、10.7及び21.4 μ g)を示す。レーン5~8は、Xa因子プロテアーゼ(重量比1%)によって4で18時間インキュベートして切断された同量の融合タンパク質を示す。レーンMの分子量マーカーは、212、158、116、97.2、66.4、55.6、42.7、36.5、26.6、20.0、14.3及び6.5kDaである。融合タンパク質は約110kDaに対応する。Xa因子プロテアーゼは約39kDaに対応する。Bstポリメラーゼ大断片は約67kDaに対応し、MBP部分は約42.7kDaに対応する。

10

【図4】Xa因子による切断後の精製Bst L.F.を示す10-20%勾配SDS-PAGEゲルを示す説明図である。レーン1は約4 μ gの最終精製Bstポリメラーゼ大断片タンパク質を示す。レーン8の分子量マーカーは、212、158、116、97.2、66.4、55.6、42.7、36.5、26.6、20.0、14.3及び6.5kDaである。Bstポリメラーゼ大断片は約67kDaに対応する。

20

【図5】Bst Pol Iエキソヌクラーゼの方向性を測定するエキソヌクラーゼ活性アッセイの結果を示すグラフである。5'及び3'エキソヌクラーゼ活性を、3'末端を ^3H で標識し、5'末端を ^3P で標識したEcoRI消化pUC19を用いて測定する。pUC19をEcoRIで消化し、4塩基5'突出部を残す。クレノウ断片によって突出部に ^3H dTTPを取り込ませ、即ち3'末端を ^3H で標識する。5'末端は、T4ポリヌクレオチドキナーゼにより ^3P -ATPでリン酸化(phosphorylate)する。この二重標識基質を、Bst DNAポリメラーゼI、Vent DNAポリメラーゼ及びTaq DNAポリメラーゼそれぞれと共に65で、また大腸菌DNAポリメラーゼIと共に37で様々な時間インキュベートする。DNAを10% TCAの添加によって沈澱させ、遠心によって回収する。上清中に存在する酸溶解性の放射能を液体シンチレーションによって定量する。3'末端からの ^3H の可溶化は3' 5'エキソヌクラーゼ活性の存在を示す。5'末端からの ^3P の放出は5' 3'エキソヌクラーゼ活性の存在を示す。Bst DNAポリメラーゼ()は3'末端から ^3H を除去せず、従って3' 5'エキソヌクラーゼ活性を欠如するのでTaq DNAポリメラーゼ()に類似する。

30

【図6】ブルーフリーディングエキソヌクラーゼ活性アッセイの結果を示すグラフである。M13mp18一本鎖DNAを、3'末端にG:A mismatchesを有するプライマーとアニールした。3' 5'エキソヌクラーゼを有するVent DNAポリメラーゼは mismatchesのGを効率的に除去してプライマーを伸長させ得、その結果相対ポリメラーゼ活性が高くなる(図6の「Vent(exo+)」)。Taqポリメラーゼは3' 5'エキソヌクラーゼを有せず、従って mismatchesを修正できないので、1/5の低い相対ポリメラーゼ活性しか有しない(図6の「Taq」)。Taqポリメラーゼ同様、Bst DNAポリメラーゼも低い相対ポリメラーゼ活性しか有せず、このことは、3'末端が伸長したDNAポリメラーゼであり得るように、 mismatchesのGを除去するのに必要な3' 5'エキソヌクラーゼ活性を有しないことを示している。

40

【 図 3 】

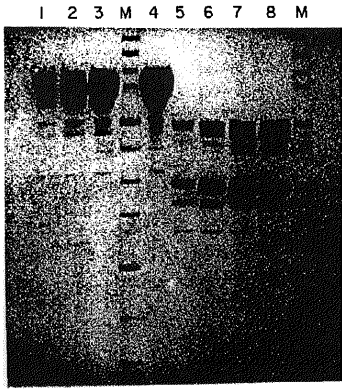


FIG. 3

【 図 4 】

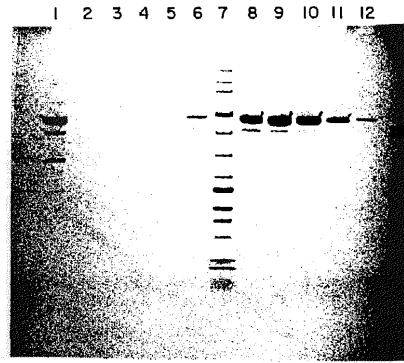


FIG. 4

【 図 5 】

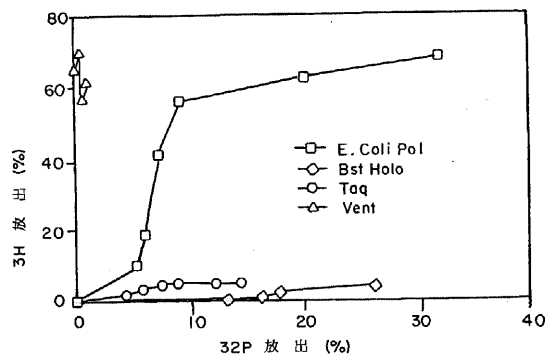


FIG. 5

【 図 6 】

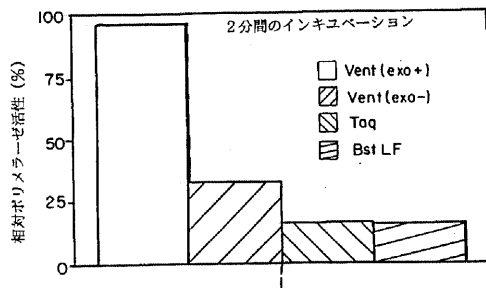


FIG. 6

フロントページの続き

(72)発明者 ジエイスン・エム・アリオツタ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02159、ニュートン、コモンウェルス・アベニュー・910

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特開平05-304964(JP,A)

J. Bacteriol., (1992), 174 (13), p. 4350-4355

Biochimica et Biophysica acta, (1972), Vol. 272, p. 156-166

J. Bacteriology, (1981), Vol. 145, No. 1, p. 21-26

蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊号 遺伝子操作1990、1990年10月10日発行、Vol. 35, No. 14, p. 2302-2311

Gene, (1988), 67, p. 21-30

Current Opinion in Structural Biology, (1992), Vol. 2, p. 569-575

Biotech. Adv., (1993), Vol. 11, p. 31-78

Trends in Biotechnology, (1992), Vol. 10, p. 310-315

Protein. Expr. Purif., (1991), Vol. 2, p. 95-107.

Genetic Analysis, (1996), Vol. 12, p. 185-195

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9/00

C12N 15/00

C12P 21/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed