

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-516145

(P2012-516145A)

(43) 公表日 平成24年7月19日(2012.7.19)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A 4 B O 2 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁)

(21) 出願番号	特願2011-546948 (P2011-546948)	(71) 出願人	511005402
(86) (22) 出願日	平成22年1月29日 (2010.1.29)		オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年9月28日 (2011.9.28)		イギリス国 オーエックス4 4ジーエー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2010/000132		オックスフォード、オックスフォード
(87) 国際公開番号	W02010/086602		サイエンス パーク、ロバート ロビンソン
(87) 国際公開日	平成22年8月5日 (2010.8.5)		アヴェニュー4、エドムント カート
(31) 優先権主張番号	61/148,726		ライト ハウス
(32) 優先日	平成21年1月30日 (2009.1.30)	(74) 代理人	100100181
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 阿部 正博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリダイゼーションリンカー

(57) 【要約】

本発明は、

(a) (i) 第1のハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも1つの第1のリンカーと、(ii) 共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの第1の基とが、そこに共有結合している第1の成分を準備すること；

(b) (i) 第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることが可能な少なくとも1つの第2のリンカーと、(ii) 第1の基と共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの第2の基とが、そこに共有結合している第2の成分を準備すること；

(c) 第1および第2のハイブリダイズ可能な領域が成分とハイブリダイズして成分を連結させることが可能な条件下で、第1および第2の成分を接触させること；および

(d) 連結した成分を、第1および第2の基の間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること；

を含む、2つ以上の成分を共有結合させる方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) (i) 第 1 のハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも 1 つの第 1 のリンカーと、(i i) 共有結合を形成することが可能な少なくとも 1 つの第 1 の基が共有結合する、第 1 の成分を準備することと；

b) (i) 前記第 1 のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズ可能な第 2 のハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも 1 つの第 2 のリンカーと、(i i) 前記第 1 の基と共有結合を形成することが可能な少なくとも 1 つの第 2 の基が共有結合する、第 2 の成分を準備することと；

c) 前記第 1 および第 2 のハイブリダイズ可能な領域が前記成分とハイブリダイズし、前記成分を連結することを可能にする条件下で、前記第 1 および第 2 の成分を接触させることと；

d) 前記連結した成分を、前記第 1 および第 2 の基の間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること；

を含む、2 つ以上の成分を共有結合させる方法。

【請求項 2】

a) 前記少なくとも 1 つの第 1 の基が、前記第 1 の成分と直接的に共有結合しているか、または、別のリンカーを介して前記第 1 の成分と結合しており；かつ／または、

b) 前記少なくとも 1 つの第 2 の基が、第 2 の成分と直接的に共有結合しているか、または、別のリンカーを介して第 2 の成分と結合している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの第 1 の基が、前記第 1 のリンカーを介して前記第 1 の成分と共有結合しており；かつ／または、前記少なくとも 1 つの第 2 の基が、前記第 2 のリンカーを介して前記第 2 の成分と共有結合している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の成分は、2、3 または 4 つの第 1 のリンカーが、そこに共有結合し、かつ、前記第 2 の成分は、対応する数の第 2 のリンカーが、そこに結合し、前記リンカーは、第 1 および第 2 のリンカーの 1 つ以上の対を形成し、各対におけるハイブリダイズ可能な領域は、互いに特異的にハイブリダイズするが、その他の対におけるハイブリダイズ可能な領域のいずれともハイブリダイズしない、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

(a) (i) 第 1 のハイブリダイズ可能な領域を含む第 1 のリンカー、(i i) 共有結合を形成することが可能な第 1 の基、(i i i) 第 3 のハイブリダイズ可能な領域を含む第 3 のリンカー、および (i v) 共有結合を形成することが可能な第 3 の基が共有結合する、第 1 の成分を準備することと；

(b) (i) 第 1 のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズ可能な第 2 のハイブリダイズ可能な領域を含む第 2 のリンカー、(i i) 第 1 の基と共有結合を形成することが可能な第 2 の基、(i i i) 第 3 のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズ可能な第 4 のハイブリダイズ可能な領域を含む第 4 のリンカー、および (i v) 第 3 の基と共有結合を形成することが可能な第 4 の基が共有結合する、第 2 の成分を準備することと；

(c) 前記第 1 および第 2 のハイブリダイズ可能な領域がハイブリダイズし、かつ、前記第 3 および第 4 のハイブリダイズ可能な領域がハイブリダイズして、前記成分を連結することが可能な条件下で、前記第 1 および第 2 の成分を接触させることと；

(d) 前記連結した成分を、前記第 1 および第 2 の基と前記第 3 および第 4 の基との間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること；

を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の成分は、(i) 第 1 のハイブリダイズ可能な領域を含む第 1 のリンカー、(i i) 共有結合を形成することが可能な第 1 の基、(i i i) 第 3 のハイブリダイズ可能

10

20

30

40

50

な領域を含む第3のリンカー、および(i v)共有結合を形成することが可能な第3の基が共有結合し、かつ、前記第2の成分は、(i)前記第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域と、前記第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第4のハイブリダイズ可能な領域とを含む、第2のリンカー、(i i)前記第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基、および(i i i)前記第3の基と共有結合を形成することが可能な第4の基が共有結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

各成分が、(i)異なる成分におけるリンカーのハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができるハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも1つのリンカー、および(i i)異なる成分における基と共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの共有結合基が共有結合する、3、4または5つの成分を結合させることを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項8】

a) (i)第1のハイブリダイズ可能な領域を含む第1のリンカー、および(i i)共有結合を形成することが可能な第1の基が共有結合する、第1の成分を準備することと；

b) (i)前記第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域を含む第2のリンカー、(i i)前記第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基、(i i i)第3のハイブリダイズ可能な領域を含む第3のリンカー、および(i v)共有結合を形成することが可能な第3の基が共有結合する、第2の成分を準備することと；

20

c) (i)前記第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第4のハイブリダイズ可能な領域を含む第4のリンカー、および(i i)前記第3の基と共有結合を形成することが可能な第4の基が共有結合する、第3の成分を準備することと；

d) 前記第1、第2および第3の成分を、前記ハイブリダイズ可能な領域が前記成分とハイブリダイズし、連結させることが可能な条件下で、接触させることと；

e) 前記連結した成分を、前記基の間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露することと；

を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記基が、前記1つ以上のハイブリダイズ可能な領域を含むリンカーを介して、それぞれの各成分と共有結合する、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項10】

前記基のいずれも、それら自体とは反応しない、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記第1の成分および／または前記第2の成分が、ポリペプチド、タンパク質、核酸、化学基、色素、アフィニティータグ、ポリマー、ビーズ、抗体、支持体、固定化金属アフィニティーマトリックス、グルタチオンセファロース、デキストリンセファロース、アフィニティーマトリックス、IgGセファロース、活性化チオールセファロース、金属フィルム、ナノ粒子、ガラス、処理ガラス、プラスチック、樹脂表面、固体ナノ細孔、センサー表面および単一分子検出器である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項12】

前記第1の成分が、タンパク質であり、前記第2の成分が、タンパク質、核酸、レポーター基、アフィニティータグまたは支持体である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記第1の成分が、核酸結合タンパク質であり、前記第2の成分が、膜貫通タンパク質細孔である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記核酸結合タンパク質が、エキソヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、ヘリ

50

カーゼまたはトポイソメラーゼから得られる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記エキソヌクレアーゼが、配列番号 6 またはその変異体のいずれかに示される配列を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記エキソヌクレアーゼが、配列番号 6、52、54 および 56、または、その変異体のいずれかに示される配列を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記膜貫通タンパク質細孔が、 α -ヘモリジン (α -HL) である、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記細孔が、配列番号 2 または 4 またはその変異体のいずれかに示される配列を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 1 および第 2 の基が、それぞれの成分から 0.05 nm ~ 10 nm の距離にある、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記結合した第 1 の成分と第 2 の成分との間の距離が、0.1 nm ~ 500 nm である、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

20

前記第 1 および第 2 のハイブリダイズ可能な領域が、核酸を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記核酸が、6 ~ 15 ヌクレオチド長である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 1 および第 2 のハイブリダイズ可能な領域が、1 pM ~ 1 mM の濃度で、0.1 fM ~ 0.1 μ M の親和性を有する、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記第 1 のハイブリダイズ可能な領域が、配列番号 57 の 5' 末端から初めの 15、25 または 35 ヌクレオチドに相当する、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記第 1 および第 2 のハイブリダイズ可能な領域が、それぞれ、以下の配列：

- (a) 配列番号 58 および 61 に示されるヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号 59 および 62 に示されるヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号 60 および 63 に示されるヌクレオチド配列；
- (d) 配列番号 64 および 65 に示されるヌクレオチド配列；
- (e) 配列番号 66 および 68 に示されるヌクレオチド配列；
- (f) 配列番号 67 および 69 に示されるヌクレオチド配列；
- (g) 配列番号 70 および 73 に示されるヌクレオチド配列；
- (h) 配列番号 71 および 74 に示されるヌクレオチド配列；
- (i) 配列番号 72 および 75 に示されるヌクレオチド配列；
- (j) 配列番号 76 および 77 に示されるヌクレオチド配列；または、
- (k) 配列番号 78 および 67 に示されるヌクレオチド配列；

40

を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記第 1 および第 2 の基が、クリック化学により共有結合を形成する、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 の基が、アジド基であり、前記第 2 の基が、アルキン基である、請求項 26 に記載の方法。

50

【請求項 28】

前記第 1 および第 2 の基が、ジスルフィド結合、ヨードアセトアミド結合、またはメタセシス反応を介した結合を形成する、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 1～28 のいずれか一項に記載の方法を用いて結合した第 1 および第 2 の成分。

【請求項 30】

請求項 1～28 のいずれか一項に記載の第 1 および第 2 のリンカーを用いて、第 2 の成分と結合した第 1 の成分。

【請求項 31】

請求項 1～28 のいずれか一項に記載の第 1 および第 2 のリンカーの対。

10

【請求項 32】

第 1 の成分を第 2 の成分と結合させるための、請求項 31 に記載の一对のリンカーの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2 つ以上の成分を共有結合させる方法に関する。本発明は、それぞれがハイブリダイズ可能な領域を含む 2 つ以上のリンカーの使用と、共有結合を形成することが可能な 2 つ以上の基の使用を含む。リンカーにおけるハイブリダイズ可能な領域は、成分とハイブリダイズし、成分を連結する。連結した成分は、次に、基間の共有結合の形成を介して結合する。

20

【背景技術】

【0002】

2 つ以上の成分の共有結合は、化学および生化学において多くの用途を有する。化学的結合方法を用いる場合、成分同士の反応速度は、反応するために利用可能な成分の濃度に依存する。成分の濃度が低い場合には、結果として、反応速度は、成分濃度に律速される。多くの用途について、成分の濃度は低くてもよく、したがって、速度または反応を促進する方法（あるいは、必要とされる成分の濃度を下げる方法）を作り出すことが望ましい。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

自己集合して、より大きく、より複雑な構造を形成するように、特定の分子、または分子の集団を作ることができることは、よく知られており、これらの例としては、DNA、タンパク質、脂質、液晶、ポリマーなどが挙げられる。これらの種の分子成分は、低濃度で非常に高い親和性を有し、自己集合する場合が多い。自己集合系にとっての欠点は、それらが、非共有結合的相互作用によって凝集するので、安定性が制限されることが多い点である。

【課題を解決するための手段】

【0004】

40

本発明者等は、驚くべきことに、高親和性の自己集合系を利用して、低濃度で、2 つ以上の成分を共有結合させ得ることを実証した。より具体的には、本発明者等は、驚くべきことに、互いに共有結合反応し得る化学基を用いてそれらが結合する前に、2 つ以上の高親和性ハイブリダイゼーションリンカーを用いて、2 つ以上の成分を結合させ得ることを実証した。得られる複合体は、単なる高親和性ハイブリダイゼーションリンカーを用いて形成された同等の非共有結合性複合体よりも安定性がずっと高い。

【0005】

したがって、本発明は、以下の工程を含む、2 つ以上の成分を共有結合させる方法を提供する：

(a) (i) 第 1 のハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも 1 つの第 1 のリンカ

50

ーと、(i i) 共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの第1の基とが共有結合している第1の成分を準備すること；

(b) (i) 第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることが可能な少なくとも1つの第2のリンカーと、(i i) 第1の基と共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの第2の基とが共有結合している第2の成分を準備すること；

(c) 第1および第2のハイブリダイズ可能な領域が成分とハイブリダイズして成分を連結させることが可能な条件下で、第1および第2の成分を接触させること；および

(d) 連結した成分を、第1および第2の基の間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること。

【0006】

10

本発明はまた、以下を提供する：

- 本発明の方法を用いて結合させた第1および第2の成分；
- 本発明の第1および第2のリンカーを用いて第2の成分に結合させた第1の成分；
- 本発明の第1および第2のリンカーの対；および
- 第1の成分を第2の成分に結合させるための、本発明のリンカーの対の使用。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、天然のシステインの位置および残基の数を示すE c o E x o Iの構造の略図を示す（結晶構造から取得）。

【図2】図2は、接近可能なシステインの位置を示すE c o E x o Iの表面図を示す（結晶構造から取得）。

20

【図3】図3は、野生型と比較した場合のE x o I変異体の相対活性を示す。

【図4】図4は、タンパク質ナノ細孔と結合させるために単一のシステインを導入し得る位置を示すE c o E x o Iの図式を示す。

【図5a】図5aは、野生型と比較した場合のE x o I変異体の相対活性を示す。

【図5b】図5bは、野生型と比較した場合のE x o I変異体の相対活性を示す。

【図6】図6は、エキソヌクレアーゼIアッセイの概略図を示す。

【図7】図7は、エキソヌクレアーゼIアッセイからのデータの例を示す。

【図8】図8は、リンカーのE x o - A T T T T - A 8 3 Cへの結合が、酵素活性に影響しないことを示す。Y軸は相対活性である。左側のカラムのペアは、O N L P 1 4 0 3であり、右側のカラムのペアは、O N L P 1 4 0 5である。各ペアにおいて、左側の（暗色の）カラムは、リンカーを有する酵素であり、右側の（明色の）カラムは、リンカーを有しない酵素である。

30

【図9】図9は、P N AのE x o - A T T T T - A 8 3 Cへの結合が、酵素活性に影響しないことを示す。Y軸は相対活性である。左側のカラムは、O N L P 1 4 9 8であり、右側のカラムは、O N L P 1 4 9 9である。

【図10】図10は、P E GのE x o - A T T T TまたはE x o - A T T T T - M 1 8 4 Cへの結合が、酵素活性に影響しないことを示す。Y軸は相対活性である。左側のカラムのペアは、E x o - A T T T Tであり、右側のカラムのペアは、E x o - A T T T T - M 1 8 4 Cである。各ペアにおいて、左側の（暗色の）カラムは、リンカーを有する酵素であり、右側の（明色の）カラムは、リンカーを有しない酵素である。

40

【図11】図11は、実施例において使用された銅(I)結合リガンドを示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

配列表の説明

配列番号1は、野生型 α -ヘモリジン(α -H L)の1つのサブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

【0009】

配列番号2は、野生型 α -H Lの1つのサブユニットのアミノ酸配列を示す。アミノ酸2~6、73~75、207~209、214~216、および219~222は、 α -

50

ヘリックスを形成する。アミノ酸 22～30、35～44、52～62、67～71、76～91、98～103、112～123、137～148、154～159、165～172、229～235、243～261、266～271、285～286、および 291～293 は、 β -鎖を形成する。全てのその他の非末端アミノ酸、すなわち、7～21、31～34、45～51、63～66、72、92～97、104～111、124～136、149～153、160～164、173～206、210～213、217、218、223～228、236～242、262～265、272～274、および 287～290 は、ループ領域を形成する。アミノ酸 1 および 294 は、末端アミノ酸である。

【0010】

10

配列番号 3 は、 α -HL L135C/N139Q (HL-CQ) の 1 つのサブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

【0011】

配列番号 4 は、 α -HL L135C/N139Q (HL-CQ) の 1 つのサブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を示す。野生型 α -HL において、 α -ヘリックス、 β -鎖およびループ領域を形成する同じアミノ酸が、このサブユニットにおいて対応する領域を形成する。

【0012】

配列番号 5 は、大腸菌由来の sbcB 遺伝子から得られた、コドン最適化したポリヌクレオチド配列を示す。それは、大腸菌由来のエキソヌクレアーゼ I 酵素 (EcoExo I) をコードする。

20

【0013】

配列番号 6 は、大腸菌由来のエキソヌクレアーゼ I 酵素 (EcoExo I) のアミノ酸配列を示す。この酵素は、5'～3' の方向で、一本鎖 DNA (ssDNA) から 5'-リン酸ヌクレオシドの前進性消化 (processive digestion) を行う。アミノ酸 60～68、70～78、80～93、107～119、124～128、137～148、165～172、182～211、213～221、234～241、268～286、313～324、326～352、362～370、373～391、401～454、および 457～475 は、 α -ヘリックスを形成する。アミノ酸 10～18、28～26、47～50、97～101、133～136、229～232、243～251、258～263、298～302、および 308～311 は、 β -鎖を形成する。全てのその他の非末端アミノ酸 19～27、37～46、51～59、69、79、94～96、102～106、120～123、129～132、149～164、173～181、212、222～228、233、242、252～257、264～267、287～297、303～307、312、325、353～361、371、372、392～400、455、および 456 は、ループを形成する。アミノ酸 1～9 は、末端アミノ酸である。本酵素の全体的な折り畳みは、3つの領域が組み合わさって C の文字の外観を有する分子を形成するような状態であるが、残基 355～358 は結晶構造において不規則であり、この C が事実上 O のような形状に変化する。アミノ末端 (1～206) は、エキソヌクレアーゼドメインを形成し、DnaQ スーパーファミリーに対するホモロジーを有し、それに続く残基 (202～354) は SH3-様ドメインを形成し、カルボキシドメイン (359～475) は、エキソヌクレアーゼドメインを延長して、分子の C 文字様の形状を形成する。EcoExo I における 4 つの酸性残基は、DnaQ スーパーファミリーの活性部位の残基 (D15、E17、D108 および D186 に相当する) と共に保存されている。単金属イオンが残基 D15 および 108 に結合することが示唆される。DNA の加水分解は、切断を受けやすいリン酸が活性化された水分子により攻撃されることにより、触媒されるようであり、H181 が触媒残基となり、かつ、ヌクレオチド基質を整列させるようである。

30

40

【0014】

配列番号 7 は、EcoExo I C98S/C306S/C330T/C51A (O

50

N L D 0 3 9 3) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【0015】

配列番号8は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 9 8 S / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / C 5 1 A (O N L D 0 3 9 3) を示す。

【0016】

配列番号9は、E c o E x o I C 9 8 S / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / C 1 4 4 M (O N L D 0 4 0 3) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【0017】

配列番号10は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 9 8 S / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / C 1 4 4 M (O N L D 0 4 0 3) を示す。

10

【0018】

配列番号11は、E c o E x o I C 9 8 S / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / C 1 4 4 T (O N L D 0 4 0 4) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【0019】

配列番号12は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 9 8 S / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / C 1 4 4 T (O N L D 0 4 0 4) を示す。

【0020】

配列番号13は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 M / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / V 4 2 C (O N L D 0 4 1 5) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

20

【0021】

配列番号14は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 M / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / V 4 2 C (O N L D 0 4 1 5) を示す。

【0022】

配列番号15は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / V 4 2 C (O N L D 0 4 1 6) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【0023】

配列番号16は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / V 4 2 C (O N L D 0 4 1 6) を示す。

30

【0024】

配列番号17は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 M / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / M 1 8 4 C (O N L D 0 4 1 7) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【0025】

配列番号18は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 M / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / M 1 8 4 C (O N L D 0 4 1 7) を示す。

【0026】

配列番号19は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / M 1 8 4 C (O N L D 0 4 1 8) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

40

【0027】

配列番号20は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T / M 1 8 4 C (O N L D 0 4 1 8) を示す。

【0028】

配列番号21は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 1 1) をコードするコドンをも最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【0029】

配列番号22は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 S / C 1 4 4 T /

50

C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 1 1) を示す。

【 0 0 3 0 】

配列番号 2 3 は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 3 2) をコードするコドン在最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 1 】

配列番号 2 4 は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 3 2) を示す。

【 0 0 3 2 】

配列番号 2 5 は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 T / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 3 3) をコードするコドン在最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

10

【 0 0 3 3 】

配列番号 2 6 は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 T / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 3 3) を示す。

【 0 0 3 4 】

配列番号 2 7 は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 M / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 1) をコードするコドン在最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 5 】

20

配列番号 2 8 は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 M / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 1) を示す。

【 0 0 3 6 】

配列番号 2 9 は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 M / C 3 0 6 T / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 2) をコードするコドン在最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 7 】

配列番号 3 0 は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 M / C 3 0 6 T / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 2) を示す。

【 0 0 3 8 】

30

配列番号 3 1 は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 G / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 3) をコードするコドン在最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 9 】

配列番号 3 2 は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 G / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 3) を示す。

【 0 0 4 0 】

配列番号 3 3 は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 D / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 9 1) をコードするコドン在最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

40

【 0 0 4 1 】

配列番号 3 4 は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 D / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 9 1) を示す。

【 0 0 4 2 】

配列番号 3 5 は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 K / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 4) をコードするコドン在最適化したポリヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 4 3 】

配列番号 3 6 は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 K / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 4) を示す。

50

【0044】

配列番号37は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 L / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 5) をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。

【0045】

配列番号38は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 L / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 5) を示す。

【0046】

配列番号39は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 V / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 6) をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。

10

【0047】

配列番号40は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 V / C 1 4 4 T / C 3 0 6 S / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 5 6) を示す。

【0048】

配列番号41は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 V / C 1 4 4 T / C 3 0 6 T / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 6) をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。

【0049】

配列番号42は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 V / C 1 4 4 T / C 3 0 6 T / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 6) を示す。

20

配列番号43は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 M / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 7) をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。

【0050】

配列番号44は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 M / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 7) を示す。

【0051】

配列番号45は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 N / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 8) をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。

30

【0052】

配列番号46は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 N / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 8) を示す。

【0053】

配列番号47は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 D / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 9) をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。

【0054】

配列番号48は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 D / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 7 9) を示す。

40

【0055】

配列番号49は、E c o E x o I C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 A / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 8 0) をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。

【0056】

配列番号50は、E c o E x o I のアミノ酸配列 C 5 1 A / C 9 8 T / C 1 4 4 T / C 3 0 6 A / C 3 3 0 T (O N L D 0 4 8 0) を示す。

【0057】

配列番号7～50に記載される変異体の全てにおいて、野生型 E c o E x o I で、α

50

ーヘリックス、 β -鎖およびループ領域を形成する同じアミノ酸が、この変異体で、対応する領域を形成する。

【0058】

配列番号51は、大腸菌由来のxthA遺伝子から得られた、コドン最適化したポリヌクレオチド配列を示す。それは、大腸菌由来のエキソヌクレアーゼIII酵素をコードする。

【0059】

配列番号52は、大腸菌由来のエキソヌクレアーゼIII酵素のアミノ酸配列を示す。この酵素は、3'~5'の方向で、二本鎖DNA(dsDNA)から5'ーリン酸ヌクレオシドの分配性消化(distributive digestion)を行う。DNA鎖における酵素作用の開始には、5'における約4ヌクレオチドの突出部を必要とする。アミノ酸11~13、15~25、39~41、44~49、85~89、121~139、158~160、165~174、181~194、198~202、219~222、235~240、および248~252は、 α -ヘリックスを形成する。アミノ酸2~7、29~33、53~57、65~70、75~78、91~98、101~109、146~151、195~197、229~234、および241~246は、 β -鎖を形成する。全てのその他の非末端アミノ酸8~10、26~28、34~38、42、43、50~52、58~64、71~74、79~84、90、99、100、110~120、140~145、152~157、161~164、175~180、203~218、223~228、247、および253~261は、ループを形成する。アミノ酸1、267、および268は、末端アミノ酸である。酵素活性部位は、 β_1 - α_1 、 β_3 - β_4 、 β_5 - β_6 、 β_{111} - α_1 、 β_{1V} - α_{11} および β_V - β_{V1} (それぞれ、アミノ酸8-10、58-64、90、110-120、152-164、175-180、223-228、および253-261から構成される)を連結するループ領域によって形成される。単一の二価金属イオンが、残基E34にて結合しており、D229およびH259のヒスチジン-アスパラギン酸塩触媒対によるホスホジエステル結合における求核攻撃に対して役立つ。

【0060】

配列番号53は、T. thermophilus由来のrecJ遺伝子から得られた、コドン最適化されたポリヌクレオチド配列を示す。それは、T. thermophilus由来のRecJ酵素(TthRecJ-cd)をコードする。

【0061】

配列番号54は、T. thermophilus由来のRecJ酵素(TthRecJ-cd)のアミノ酸配列を示す。この酵素は、5'~3'の方向で、ssDNAから5'ーリン酸ヌクレオシドの前進性消化を行う。アミノ酸19~33、44~61、80~89、103~111、136~140、148~163、169~183、189~202、207~217、223~240、242~252、254~287、302~318、338~350、および365~382は、 α -ヘリックスを形成する。アミノ酸36~40、64~68、93~96、116~120、133~135、294~297、321~325、328~332、352~355、および359~363は、 β -鎖を形成する。全てのその他の非末端アミノ酸34、35、41~43、62、63、69~79、90~92、97~102、112~115、121~132、141~147、164~168、184~188、203~206、218~222、241、253、288~293、298~301、319、320、326、327、333~337、351~358および364は、ループを形成する。アミノ酸1~18および383~425は、末端アミノ酸である。結晶構造は、Thermus thermophilus由来のRecJのコアドメイン(残基40~463)についてのみ解析されている。RecJのコアドメインにおける翻訳開始およびインビボ発現を確実にするために、メチオニン残基がそのアミノ末端に付加された。このものは、結晶構造情報を欠いている。解析された構造は、長い α -ヘリックス(254~287)で連結された2つのドメインであ

10

20

30

40

50

るアミノ（2～253）およびカルボキシル（288～463）領域を示す。触媒残基（D46、D98、H122、およびD183）は、ホスホジエステル結合における求核攻撃のために、単一の二価金属イオンを配位する。D46およびH120は、触媒対であることが提案されているが、大腸菌 RecJ においてこれらの保存されている残基を何らかに変異させることは、活性を失うことが示された。

【0062】

配列番号55は、バクテリオファージ・ラムダエキソ（redX）遺伝子から得られた、コドンが最適化されたポリヌクレオチド配列を示す。それは、バクテリオファージ・ラムダエキソヌクレアーゼをコードする。

【0063】

配列番号56は、バクテリオファージ・ラムダエキソヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。この配列は、集合して3量体を形成する3つの同じサブユニットの1つである。この酵素は、3'～5'の方向で、dsDNAの一本の鎖から非常に前進性のヌクレオチド消化を行う。鎖における酵素作用の開始には、好ましくは、5'リン酸を有する約4ヌクレオチドの突出部を5'に必要とする。アミノ酸3～10、14～16、22～26、34～40、52～67、75～95、135～149、152～165および193～216は、 α -ヘリックスを形成する。アミノ酸100～101、106～107、114～116、120～122、127～131、169～175および184～190は、 β -鎖を形成する。全てのその他の非末端アミノ酸11～13、17～21、27～33、41～51、68～74、96～99、102～105、108～113、117～119、123～126、132～134、150～151、166～168、176～183、191～192、217～222は、ループを形成する。アミノ酸1、2および226は、末端アミノ酸である。ラムダエキソヌクレアーゼIは、dsDNAが一方の末端で入り、ssDNAのみ他方の末端で出るために中程度に、明らかに十分な大きさである、先細のチャンネルを有するトロイド構造を形成するホモ三量体である。触媒残基は決定されていないが、単一の二価金属イオンが、残基D119、E129およびL130によって各サブユニットに結合していると思われる。

【0064】

配列番号57は、好ましい核酸リンカーを作製し得る核酸配列を示す。

【0065】

配列番号58は、好ましい核酸リンカーを示す。MALはマレイミドである。このリンカーは、配列番号61と一緒に使用される。

【0066】

配列番号59は、好ましい核酸リンカーを示す。MALはマレイミドである。このリンカーは、配列番号62と一緒に使用される。

【0067】

配列番号60は、好ましい核酸リンカーを示す。MALはマレイミドである。このリンカーは、配列番号63と一緒に使用される。

【0068】

配列番号61は、好ましい核酸リンカーを示す。MALはマレイミドである。このリンカーは、配列番号58と、相補的であり、一緒に使用される。

【0069】

配列番号62は、好ましい核酸リンカーを示す。MALはマレイミドである。このリンカーは、配列番号59と、相補的であり、一緒に使用される。

【0070】

配列番号63は、好ましい核酸リンカーを示す。MALはマレイミドである。このリンカーは、配列番号60と、相補的であり、一緒に使用される。

【0071】

配列番号64は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号65と一緒に使用される。

10

20

30

40

50

【0072】

配列番号65は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号64と一緒に使用される。

【0073】

配列番号66は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号68と一緒に使用される。

【0074】

配列番号67は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号69と一緒に使用される。

【0075】

配列番号68は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号66と、相補的であり、一緒に使用される。

【0076】

配列番号69は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号67と、相補的であり、一緒に使用される。

【0077】

配列番号70は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号73と、相補的であり、一緒に使用される。

【0078】

配列番号71は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号74と、相補的であり、一緒に使用される。

【0079】

配列番号72は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号75と一緒に使用される。

【0080】

配列番号73は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号70と一緒に使用される。

【0081】

配列番号74は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号71と一緒に使用される。

【0082】

配列番号75は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号72と、相補的であり、一緒に使用される。

【0083】

配列番号76は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号77と一緒に使用される。

【0084】

配列番号77は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号76と一緒に使用される。

【0085】

配列番号78は、好ましい核酸リンカーを示す。このリンカーは、配列番号67と、相補的であり、一緒に使用される。

【0086】

発明の詳細な説明

開示された生成物および方法の異なる応用が、当技術分野における特定のニーズに応じて提供され得ることが理解されるべきである。本明細書中で使用される専門用語は、本発明の特定の実施形態を記載する目的で用いられるが、限定されることを意図しないことも理解されるべきである。

【0087】

本明細書中および添付の特許請求の範囲で用いられるものに加えて、単数形の「a」、

10

20

30

40

50

「an」および「the」は他に明確に言及がない限り、複数の指示対象を含む。すなわち、例えば、「リンカー」には「複数のリンカー」を含み、「膜貫通タンパク質細孔」という記載には2つ以上のそのような細孔を含み、「成分」という記載には、2つ以上のそのような成分を含む、等である。

【0088】

上掲または下掲によらず、本明細書中に引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、その全文を参照により本明細書中に組み入れるものとする。

【0089】

方法

本発明は、2つ以上の成分を結合させる方法を提供する。本発明は、(1) ハイブリダイズ可能な領域をそれぞれが含む2つ以上のリンカー、および(2) 共有結合を形成することが可能な2つ以上の基、の使用を含む。リンカーにおけるハイブリダイズ可能な領域は、成分とハイブリダイズし、連結させる。次に、連結した成分は、基間の共有結合の形成を介して結合する。

【0090】

本発明の方法は、2つ以上の成分を共有結合させる。この方法は、(i) 第1のハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも1つの第1のリンカーと、(ii) 共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの第1の基をそれに共有結合させる、第1の成分を提供することを含む。この方法はまた、(i) 第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることが可能な第2のハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも1つの第2のリンカーと、(ii) 第1の基と共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの第2の基をそれに共有結合させる、第2の成分を提供することを含む。第1および第2の成分は、第1および第2のハイブリダイズ可能な領域が成分とハイブリダイズし、連結させる条件下で、接触させる。ハイブリダイゼーション反応の高い親和性は、成分が低濃度で結合することを可能にする。このことについては、以下により詳細に考察される。次に、連結された成分を、第1および第2の基間の共有結合の形成が可能となる条件に曝露される。1つ以上の共有結合の形成が、2つの成分間の連結を強め、単なるハイブリダイゼーションを用いて得られるものよりも安定な複合体を生じる。

【0091】

本発明において使用される基のいずれも、それ自体とは反応しないことが好ましい。2つ以上の異なる成分を結合させる場合、結合すべき異なる成分とよりも、別のバージョンのそれ自体と成分が結合することを防ぐことから、このことは、本方法の収率を向上させる。

【0092】

1 実施形態において、少なくとも1つの第1の基は、第1の成分と直接的に共有結合するか、または、別のリンカー（すなわち、第1のリンカーとは異なるリンカー）を介して第1の成分と結合し、かつ／または、少なくとも1つの第2の基は、第2の成分と直接的に共有結合するか、または、別のリンカー（すなわち、第2のリンカーとは異なるリンカー）を介して第2の成分と結合する。別のリンカーは任意のタイプのリンカーであることができる。好適なリンカーは、当技術分野において公知であり、以下により詳細に考察される任意のリンカーであることができる。

【0093】

別の、より好ましい、実施形態において、少なくとも1つの第1の基は、第1のリンカーを介して、第1の成分と共有結合しており、かつ／または、少なくとも1つの第2の基は、第2のリンカーを介して、第2の成分と共有結合する。この実施形態において、第1の成分は、好ましくは、第1のハイブリダイズ可能な領域と、共有結合を形成することが可能な第1の基の両方とを含む少なくとも1つの第1のリンカーが、そこに共有結合し、かつ／または、第2の成分は、好ましくは、第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域と、第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基とを含む第2のリンカーが、そこに共有結合する。最も好まし

い実施形態において、第1および第2の基は、それぞれ第1および第2のリンカーを介して、第1および第2の成分と共有結合する。したがって、好ましい実施形態において、本方法は、(a) 第1のハイブリダイズ可能な領域と、共有結合を形成することが可能な第1の基とを含む少なくとも1つの第1のリンカーが、そこに共有結合する、第1の成分を準備することと；(b) 第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域と、第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基とを含む第2のリンカーが、そこに共有結合する、第2の成分を準備することと；(c) 第1および第2の成分を、第1および第2のハイブリダイズ可能な領域が、成分とハイブリダイズし、連結させることが可能な条件下で、接触させることと；(d) 連結した成分を、第1および第2の基の間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること、を含む。

10

【0094】

各成分は、少なくとも1つのリンカーが、そこに共有結合する。リンカーを成分に共有結合させる方法は、当技術分野において周知である。例えば、リンカーは、ジスルフィド結合を介して、タンパク質成分のシステイン残基と結合することができる。このことは、以下でより詳細に考察される。各成分は、それに共有結合する、1つより多いリンカー、例えば、2、3、4つ以上のリンカーを有し得る。そのような実施形態において、結合する2つ以上の成分は、典型的には、同じ数のリンカーが、そこに共有結合する。しかしながら、結合する2つ以上の成分はそれぞれ、異なる数のリンカーが、そこに共有結合することもできる。このことも、以下でより詳細に考察される。

20

【0095】

成分あたり1つより多いリンカーが用いられる場合、各成分におけるリンカーは、ともに結合する対を形成することが好ましい。言い換えれば、各成分における2つのリンカーのハイブリダイズ可能な領域は、好ましくは、互いに特異的にハイブリダイズすることができる。このことを達成する最も直接的な方法は、それらのみが互いにハイブリダイズし、本発明において使用される任意のその他のハイブリダイゼーション領域とは反応しないように、2つのリンカーのハイブリダイズ可能な領域を設計することである。第1および第2の基を第1および第2のリンカーと結合させる場合、リンカーの対は、以下に記載されるようなクリック化学を用いて形成させることもできる。

【0096】

好ましい実施形態において、第1の成分は、2、3または4つの第1のリンカーが、そこに共有結合し、かつ、第2の成分は、対応する数の第2のリンカーが、そこに結合し、リンカーは、第1および第2のリンカーの1つ以上の対を形成し、各対におけるハイブリダイズ可能な領域は、互いに特異的にハイブリダイズするが、その他の対におけるハイブリダイズ可能な領域のいずれともハイブリダイズしない。この実施形態において、成分は、2、3または4つの共有結合によって結合し得るから、安定した複合体を形成し得る。この実施形態はまた、2つの成分を所望の方向で固定するために、使用することができる。

30

【0097】

より好ましい実施形態において、成分は2つのリンカーと結合し、この方法は、(a) (i) 第1のハイブリダイズ可能な領域を含む第1のリンカー、(i i) 共有結合を形成することが可能な第1の基、(i i i) 第3のハイブリダイズ可能な領域を含む第3のリンカー、および(i v) 共有結合を形成することが可能な第3の基が、そこに共有結合する、第1の成分を準備することと；(b) (i) 第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域を含む第2のリンカー、(i i) 第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基、(i i i) 第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第4のハイブリダイズ可能な領域を含む第4のリンカー、および(i v) 第3の基と共有結合を形成することが可能な第4の基が、そこに共有結合する、第2の成分を準備することと；(c) 第1および第2の成分を、第1および第2のハイブリダイズ可能な領域がハイブリダイズし、かつ、第3および

40

50

第4のハイブリダイズ可能な領域がハイブリダイズして、成分を連結することが可能な条件下で、接触させることと；（d）連結した成分を、第1および第2の基と第3および第4の基との間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること、を含む。より好ましい実施形態において、本方法は、（a）（1）第1のハイブリダイズ可能な領域と、共有結合を形成することが可能な第1の基を含む第1のリンカー、および（2）第3のハイブリダイズ可能な領域と共有結合を形成することが可能な第3の基を含む第3のリンカーが、そこに共有結合する、第1の成分を準備することと；（b）（1）第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域と、第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基を含む第2のリンカー、および（2）第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第4のハイブリダイズ可能な領域と、第3の基と共有結合を形成することが可能な第4の基を含む第4のリンカーが、そこに共有結合する、第2の成分を準備することと；（c）第1および第2の成分を、第1および第2のハイブリダイズ可能な領域がハイブリダイズし、かつ、第3および第4のハイブリダイズ可能な領域がハイブリダイズして、成分を連結することが可能な条件下で、接触させることと；（d）連結した成分を、第1および第2の基と前記第3および第4の基との間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること、を含む。

10

【0098】

第1のハイブリダイズ可能な領域が第3および第4のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズしないこと、第2のハイブリダイズ可能な領域が第3および第4のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズしないこと、第3のハイブリダイズ可能な領域が第1および第2のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズしないこと、および第4のハイブリダイズ可能な領域が第1および第2のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズしないことが好ましい。

20

【0099】

各成分において異なる数のリンカーを用いて、2つ以上の成分を結合させる利点も存在する。例えば、成分の相対的方向を調節することができる。1実施形態において、成分の1つは、2、3または4つのリンカーを有し、その他の成分は、唯一のリンカーを有する。単一または個々のリンカーは当然、対応する成分における複数のリンカーのハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる2、3または4つのハイブリダイズ可能な領域を含む必要がある。複数のリンカーとのハイブリダイゼーションは、単一または個々のリンカーを曲げるまたは屈曲させ得る。好ましい実施形態において、第1の成分は、（i）第1のハイブリダイズ可能な領域を含む第1のリンカー、（i i）共有結合を形成することが可能な第1の基、（i i i）第3のハイブリダイズ可能な領域を含む第3のリンカー、および（i v）共有結合を形成することが可能な第3の基が、そこに共有結合し、第2の成分は、（i）第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域と、第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第4のハイブリダイズ可能な領域とを含む第2のリンカー、（i i）第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基、および（i i i）第3の基と共有結合を形成することが可能な第4の基が、そこに共有結合する。より好ましい実施形態において、第1の成分は、第1のリンカーおよび第3のリンカーがそこに共有結合し、第2の成分は、第2のリンカーがそこに共有結合し、この場合、第1のリンカーは、第1のハイブリダイズ可能な領域および共有結合を形成することが可能な第1の基を含み、第3のリンカーは、第3のハイブリダイズ可能な領域および共有結合を形成することが可能な第3の基を含み、かつ、第2のリンカーは、第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域、第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第4のハイブリダイズ可能な領域、ならびに、第1および第3の基と共有結合を形成することが可能な第2および第4の基を含む。

30

40

【0100】

各成分は、少なくとも1つの基が、そこに共有結合する。基を成分またはリンカーに共有結合させるための方法は、当技術分野において周知である。このことは、以下でより詳

50

細に考察される。各成分は、1つより多い基、例えば、2、3、4つ以上の基が、そこに共有結合する。このことは、成分を含む強力な複合体の形成を可能にする。リンカーおよび基はまた、互いに比較して所望の空間的配置で成分を固定するように設計することもできる。互いに比較して成分の可動性を制約するために、複数の基を使用することもできる。例えば、1つの成分が回転する自由またはその他の成分から離れるその能力を制約するために、複数の基を使用することもできる。

【0101】

2つより多い成分、例えば、3、4、5、6つ以上の成分を、本発明にしたがって結合させてもよい。このことは、複数の成分を含む複合体を製造することを可能にする。特定の配置にある複数の成分を含む複合体を製造することも可能にする。例えば、リンカーのハイブリダイズ領域または基は、それらが特定の配置で成分と結合するように設計することができる。例えば、3つの成分が使用される場合（A、BおよびC）、それらは、それぞれの特定の配置で、すなわち、A-B-C、A-C-B、B-A-C、B-C-A、C-A-BおよびC-B-Aで結合させることができる。これらの任意の配置の末端成分はまた、成分の「ループ」を形成するようにともに結合させることができる。

【0102】

当業者であれば、成分を連結させることが可能となる、好適な成分とリンカーの組み合わせを設計し得るであろう。例えば、上記したように3つの成分が使用される場合（A、BおよびC）、A-B-Cは、Bに、そこに共有結合する2つのリンカーを提供することによって形成させることができ、その一方は、Aの単一のリンカーを介して結合することを可能にし、その他方は、Bの単一のリンカーを介して結合することを可能にする。あるいは、各成分は、2つのリンカーがそこに共有結合してもよい。Aにおけるリンカーの1つが、Bにおけるリンカーの1つを介して結合することを可能にする場合、Bのその他のリンカーは、Cのリンカーの1つを介して結合することを可能にし、Cのその他のリンカーは、Aの残りのリンカーを介して結合することを可能にし、3つの成分は「ループ」状態で結合することができる。上記で考察した各成分を結合させるために、複数のリンカーを使用してもよい。

【0103】

さらにさらなる実施形態において、リンカーは、自己集合して成分と共有結合する構造となるように設計することができる。合成オリゴヌクレオチド、すなわち、ハイブリダイゼーションによってそれらが形成する構造の間の相互作用は、単純な規則（ジャンクション、G-四重体、i-モチーフなどの構造モチーフを示す規則により補足される、Watson-Crick塩基対合）を用いるそれらのヌクレオチド配列の設計によって制御することができる。例えば、Seemanらは、様々な三次元DNA格子を調製した（例えば、NC Seeman et al., J. Theor. Biol. 99, 237 (1982)）。自己集合構造は、リンカーにおける基の間の共有結合によって結合している。

【0104】

好ましい実施形態において、本方法は、3、4または5つの成分を結合させることを含み、各成分は、(i)異なる成分におけるリンカーのハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができるハイブリダイズ可能な領域を含む少なくとも1つのリンカー、および(ii)異なる成分における基と共有結合を形成することが可能な少なくとも1つの共有結合基が、そこに共有結合する。より好ましい実施形態において、本方法は、3、4または5つの成分を結合させることを含み、各成分は、別のリンカーのハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができるハイブリダイズ可能な領域と、別のリンカーの基と共有結合を形成することが可能な共有結合基を含む少なくとも1つのリンカーが、そこに共有結合する。

【0105】

さらにより好ましい実施形態において、本方法は、a) (i) 第1のハイブリダイズ可能な領域を含む第1のリンカー、および(ii) 共有結合を形成することが可能な第1の

基が、そこに共有結合する、第1の成分を準備することと；b) (i) 第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズ可能な第2のハイブリダイズ可能な領域を含む第2のリンカー、(ii) 第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基、(iii) 第3のハイブリダイズ可能な領域を含む第3のリンカー、および(iv) 共有結合を形成することが可能な第3の基が、そこに共有結合する、第2の成分を準備することと；c) (i) 第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第4のハイブリダイズ可能な領域を含む第4のリンカー、および(ii) 第3の基と共有結合を形成することが可能な第4の基が、そこに共有結合する、第3の成分を準備することと；d) 第1、第2および第3の成分を、ハイブリダイズ可能な領域が成分とハイブリダイズして連結させることが可能な条件下で、接触させることと；e) 連結した成分を、基の間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること、を含む。

10

【0106】

さらにより好ましい実施形態において、本方法は、(a) 第1のハイブリダイズ可能な領域を含む第1のリンカーと、共有結合を形成することが可能な第1の基が、そこに共有結合する、第1の成分を準備することと；(b) (1) 第1のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることができる第2のハイブリダイズ可能な領域を含む第2のリンカーと第1の基と共有結合を形成することが可能な第2の基、および(2) 第3のハイブリダイズ可能な領域を含む第3のリンカーと共有結合を形成することが可能な第3の基が、そこに共有結合する、第2の成分を準備することと；(c) 第3のハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイズすることが可能な第4のハイブリダイズ可能な領域と、第3の基と共有結合を形成することが可能な第4の基を含む第4のリンカーが、そこに共有結合している第3の成分を準備することと；(d) 第1、第2および第3の成分を、ハイブリダイズ可能な領域が成分とハイブリダイズして連結させることが可能な条件下で、接触させることと；(e) 連結した成分を、基の間で共有結合の形成が可能となる条件に曝露すること、を含む。

20

【0107】

成分

2つ以上の成分は、リンカーを使用して共有結合させ得る任意の物質または表面であり得る。好ましい成分としては、限定するものではないが、ポリペプチド、タンパク質、核酸、化学基、色素、アフィニティータグ、ポリマー、ビーズ、抗体、支持体、固定化金属アフィニティーマトリックス、グルタチオンセファロース、デキストリンセファロース、アフィニティーマトリックス、IgGセファロース、活性化チオールセファロース、金属フィルム、ナノ粒子、ガラス、処理ガラス、プラスチック、樹脂表面、固体ナノ細孔、センサー表面、および単一分子検出器が挙げられる。

30

【0108】

好適な固体細孔としては、限定するものではないが、窒化シリコン細孔、二酸化シリコン細孔、およびグラフェン細孔が挙げられる。その他の好適な固体細孔およびそれらの製造方法は、米国特許第6,464,842号、国際特許公開第WO 03/003446号、同第WO 2005/061373号、米国特許第7,258,838号、同第7,466,069号、同第7,468,271号、および同第7,253,434号に記載されている。

40

【0109】

2つ以上の成分は、同じであっても、異なってもよい。

【0110】

第1の成分が、タンパク質であり、第2の成分が、タンパク質、核酸、レポーター基、アフィニティータグまたは支持体であるのが好ましい。2つ以上の成分は、任意の立体配置で結合させ得る。例えば、それらがタンパク質であるならば、それらは、末端の（すなわち、アミノまたはカルボキシ末端の）アミノ酸を介して結合させ得る。

【0111】

第1の成分が、核酸結合タンパク質であり、第2の成分が、膜貫通タンパク質細孔であ

50

るのがより好ましい。好適な立体配置としては、限定するものではないが、核酸結合タンパク質のアミノ末端が、膜貫通タンパク質細孔のカルボキシ末端と結合しているもの、またはその逆が挙げられる。あるいは、2つの構成成分は、それらの配列内のアミノ酸を介して結合させてもよい。例えば、核酸結合タンパク質は、成分のループ領域内の1つ以上のアミノ酸と結合することができる。好ましい実施形態において、核酸結合タンパク質の末端アミノ酸は、成分のループ領域内の1つ以上のアミノ酸と結合する。末端アミノ酸およびループ領域については、以下で考察される。

【0112】

第1の成分が核酸結合タンパク質であり、第2の成分が膜貫通タンパク質細孔である場合、第1および第2の基は、それぞれの成分から、好ましくは、0.05 nm~10 nm、より好ましくは、0.05 nm~5 nm、最も好ましくは、約0.1 nm、または3ヌクレオチドにある。第1の成分が核酸結合タンパク質であり、第2の成分が膜貫通タンパク質細孔である場合、結合させた第1および第2の成分間の距離は、好ましくは、0.1 nm~100 nm、より好ましくは、0.1 nm~25 nm、より好ましくは、0.1 nm~5 nm、最も好ましくは、0.5 nmである。約0.5 nmの成分間の距離を達成するためには、結合したリンカーが「ヘッドトゥーヘッド」配置を有することが必要となり得る。リンカーが「ヘッドトゥーテール」配置で使用される場合、十分なハイブリダイゼーションを提供するために、各リンカーにおいて最小で5または6つのヌクレオチドは必要とされる。より短いリンカーは適切にハイブリダイズし得ず、もしそうであっても、すなわち、より短い成分間距離は、異なる立体構造を用いて達成することができる。

【0113】

好ましい実施形態において、共有結合部位は、成分が細孔である場合、標的配列中の一定の割合のヌクレオチドが細孔と相互作用するよう、核酸結合タンパク質が標的核酸を処理するように、選択される。次に、相互作用時に細孔を通じて流れる電流に影響を与える様式の違いに基づいて、ヌクレオチドは識別される。

【0114】

核酸分子を配列決定するために細孔を使用し得る多数の方法が存在する。1つの方法は、エキソヌクレアーゼ酵素、例えば、デオキシリボヌクレアーゼの使用を伴う。この方法において、エキソヌクレアーゼ酵素は、標的核酸鎖からヌクレオチドを連続的に分離させるために使用される。次に、ヌクレオチドは感知され、そして、それらの分離順で細孔によって識別され、したがって、元の鎖の配列が読み取られる。そのような実施形態のために、エキソヌクレアーゼ酵素は、好ましくは、標的核酸から遊離した一定の割合のヌクレオチドが、サブユニットを含む細孔のバレルまたはチャンネルに入り、相互作用し得るよう、細孔サブユニットと結合する。エキソヌクレアーゼは、好ましくは、細孔のバレルまたはチャンネルの開口部を形成するサブユニット部分に近接近する部位にあるサブユニットと結合する。エキソヌクレアーゼ酵素は、より好ましくは、そのヌクレオチド排出経路部位が、細孔の開口部を形成するサブユニットの部分に配向されるように、サブユニットと結合する。

【0115】

核酸の配列決定をする別の方法は、付加電位とともに、細孔を通じて標的核酸鎖を押したり引いたりする酵素の使用を伴う。この方法において、イオン電流は、標的鎖中のヌクレオチドが細孔を通過する時に変動する。電流の変動は、鎖の配列の指標である。そのような実施形態のために、酵素は、好ましくは、それが、サブユニットを含む細孔のバレルまたはチャンネルを通じて標的核酸を押したり引いたりすることができ、細孔を通るイオン電流の流れは妨げないように、細孔サブユニットと結合する。酵素は、好ましくは、細孔のバレルまたはチャンネルの開口部を形成するサブユニット部分に近接近する部位にあるサブユニットと結合する。酵素は、より好ましくは、その活性部位が、細孔の開口部を形成するサブユニットの部分に配向されるように、サブユニットと結合する。

【0116】

核酸鎖を配列決定する第3の方法は、細孔検出器に近接近するポリメラーゼの副生成物

を検出することである。この方法において、ヌクレオシドリン酸（ヌクレオチド）は、ポリメラーゼをヌクレオチド鎖に添加した時に遊離されるリン酸標識された種が細孔によって検出されるように、標識される。リン酸種は、各ヌクレオチドに対して特定の標識を含む。ヌクレオチドが核酸鎖に連続的に付加される時、塩基付加の副生成物が検出される。リン酸標識された種が検出される順番は、核酸鎖の配列を決定するために使用することができる。

【0117】

核酸結合タンパク質は、好ましくは、細孔のシス側の部分を形成する細孔または細孔サブユニットの部分と結合する。電気生理学において、シス側が、慣例により、接地されている。ヘモリジン細孔が、正確に、電気生理学装置に挿入された場合、Cap領域はシス側にある。正電位条件下で、ヌクレオチドは細孔のシス側からトランス側へ移動し得ることが、確率論的センシングを用いて、周知である。細孔のシス側に核酸結合タンパク質を配置すると、配列中の一定の割合のヌクレオチドが、細孔のバレルまたはチャンネルに入り、それと相互作用するように、核酸結合タンパク質が標的核酸を処理することが可能になる。好ましくは、配列中のヌクレオチドの、少なくとも20%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも80%または少なくとも90%が、細孔のバレルまたはチャンネルに入り、それと相互作用する。

【0118】

共有結合の部位および方法は、好ましくは、核酸結合タンパク質の可動性が制約されるように選択される。このことは、標的配列中の一定の割合のヌクレオチドが細孔と相互作用するように、タンパク質が標的核酸配列を確実に処理することに役立つ。例えば、核酸結合タンパク質が動く能力を制約することは、その活性部位が持続的に、細孔のバレルまたはチャンネルの開口部分を形成する細孔または細孔サブユニットに向かって配向され得ることを意味する。核酸結合タンパク質の可動性は、タンパク質が成分と結合する点の数および／または特定のリンカーの使用を増加させることにより、制約され得る。

【0119】

生物学的に活性な成分は、典型的には、それらが生物学的活性を保持するように結合する。本明細書において記載される任意の成分の生物学的活性は、当技術分野において周知の方法を用いて決定することができる。核酸結合タンパク質および膜貫通タンパク質細孔とともに結合させた場合、両方のタンパク質は、好ましくはそれぞれ、それらの結合特性および細孔特性を保持する。

【0120】

1つ以上の成分がタンパク質である場合、少なくとも1つの天然の接近可能なシステイン残基は、米国特許出願第61/148,726号からの優先権を主張し、本願と同時に出願された同時係属中の国際出願[J A Kemp & Co Ref: N. 106566A; Oxford Nanopore Technologies Ref: ONLIP 007]中に記載されるように、タンパク質から除去することができる。しかし、タンパク質は、1つ以上の接近可能なシステイン残基を含み、それらの残基を介して別の成分と結合することができる。限定的な数の接近可能なシステイン残基の存在は、成分間の制御された結合を可能にする。

【0121】

システイン残基のイオン化可能な側鎖は、付加反応にたずさわる強力な求核基なので、バイオコンジュゲーション技術において使用するための人気の高い選択である。しかしながら、これらの技術の効率的な使用に対する共通の障害は、野生型タンパク質中に存在する天然のシステイン残基である。1つ以上の天然のシステイン残基の修飾は、不明確な酵素活性と制御されない連結を生じ得る。

【0122】

本発明は、タンパク質成分由来のシステイン残基の部位特異的突然変異誘発を伴うことができる。1つ以上の他の全てアクセス可能なシステイン残基は、除去することができる。あるいは、全てのアクセス可能なシステイン残基は除去することができ、1つ以上のシ

10

20

30

40

50

ステイン残基をタンパク質に導入することができる。特定のアクセス可能なシステイン残基の存在は、結合タンパク質の別の成分、例えば、別のタンパク質、固体支持体または化学試薬の結合を促進する。

【0123】

天然のシステイン残基の除去および単一または複数のシステイン残基の目的とされた付加は、タンパク質が互いに相互作用し、望ましくない表面のチオールを介して、二量体、三量体等を形成する可能性を最小限にしながら、結合を制御する能力を有するので、これまでの方法を改良する。タンパク質が、その構造中、意図された位置に唯一のシステイン残基を含む場合、結果として、その残基のチオール基は、その他のスルフヒドリル基と直接的なジスルフィド結合を形成するか、または、反応性リンカーによって介在され得る結合を形成するために使用することができる。これらの意図されたシステイン残基は、一定の割合の好ましい立体配置（例えば、活性部位を最適に配向させ得る）も提供しながら、所望の数の酵素分子のみが所望の数の標的分子と架橋することを確実にする。

10

【0124】

野生型タンパク質中に存在する天然のシステイン残基は、チオール反応性基、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド、またはオルトピリジルジスルフィド（OPSS）を含む特定のリンカーの使用を容易には認めない。任意の構造的または触媒的に重要なシステイン残基との反応の可能性は、タンパク質の活性に影響を及ぼし得、これは、単一の分子への適用における使用のために特に重要である。バイオコンジュゲーションのためのリンカーの使用は、タンパク質活性が、別の成分、例えば、タンパク質または表面と近接近にあることにより影響されないよう、いくらかの空間的隔離状態を確実にするために重要である。

20

【0125】

核酸結合タンパク質

成分の1つは好ましくは、核酸結合タンパク質である。そのようなタンパク質の例としては、限定するものではないが、核酸処理酵素、例えば、ヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼおよびヘリカーゼ、ならびに、非触媒性結合タンパク質、例えば、SCOP（タンパク質の構造分類）によって分類される核酸結合タンパク質スーパーファミリー（50249）のもの、等が挙げられる。核酸処理酵素は、上記中、ならびに、米国特許出願第61/148,726号からの優先権を主張し、本願と同時に出願された同時係属中の国際出願[J A Kemp & Co Ref: N. 106566A; Oxford Nano細孔 Technologies Ref: ONL IP 007]中に記載されるように、システイン残基を除去および/または置換するために修飾される。少なくとも1つの天然の接近可能なシステイン残基は、好ましくは、核酸結合タンパク質から除去される。しかし、核酸結合タンパク質は、1つ以上の接近可能なシステイン残基を含み、それらの残基を介して別の成分と結合する。限定的な数の接近可能なシステイン残基の存在は、別の成分への制御された結合を可能にする。

30

【0126】

核酸は2つ以上のヌクレオチドを含む巨大分子である。タンパク質と結合する核酸は、任意のヌクレオチドの任意の組み合わせを含んでもよい。ヌクレオチドは、天然であっても、合成であってもよい。ヌクレオチドは、酸化またはメチル化され得る。ヌクレオチドは、典型的には、核酸塩基、糖、および少なくとも1つのリン酸基を含む。核酸塩基は、典型的には、複素環式である。核酸塩基としては、限定するものではないが、プリンおよびピリミジン、より好ましくは、アデニン、グアニン、チミン、ウラシルおよびシトシン、が挙げられる。糖は、典型的には、五炭糖である。ヌクレオチド糖としては、限定するものではないが、リボースおよびデオキシリボースが挙げられる。ヌクレオチドは、典型的には、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドは、典型的には、一リン酸、二リン酸または三リン酸を含む。リン酸は、ヌクレオチドの5'または3'側に結合され得る。

40

【0127】

50

ヌクレオチドとしては、限定するものではないが、アデノシン一リン酸（AMP）、アデノシン二リン酸（ADP）、アデノシン三リン酸（ATP）、グアノシン一リン酸（GMP）、グアノシン二リン酸（GDP）、グアノシン三リン酸（GTP）、チミジン一リン酸（TMP）、チミジン二リン酸（TDP）、チミジン三リン酸（TTP）、ウリジン一リン酸（UMP）、ウリジン二リン酸（UDP）、ウリジン三リン酸（UTP）、シチジン一リン酸（CMP）、シチジン二リン酸（CDP）、シチジン三リン酸（CTP）、環状アデノシン一リン酸（cAMP）、環状グアノシン一リン酸（cGMP）、デオキシアデノシン一リン酸（dAMP）、デオキシアデノシン二リン酸（dADP）、デオキシアデノシン三リン酸（dATP）、デオキシグアノシン一リン酸（dGMP）、デオキシグアノシン二リン酸（dGDP）、デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）、デオキシチミジン一リン酸（dTMP）、デオキシチミジン二リン酸（dTDP）、デオキシチミジン三リン酸（dTTP）、デオキシウリジン一リン酸（dUMP）、デオキシウリジン二リン酸（dUDP）、デオキシウリジン三リン酸（dUTP）、デオキシシチジン一リン酸（dCMP）、デオキシシチジン二リン酸（dCDP）、およびデオキシシチジン三リン酸（dCTP）が挙げられる。ヌクレオチドは、好ましくは、AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP、またはdCMPから選択される。

【0128】

核酸はデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）であることができる。核酸は、当技術分野において公知の任意の合成核酸、例えば、ペプチド核酸（PNA）、グリセロール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、ロックド核酸（LNA）、または、ヌクレオチド側鎖を有するその他の合成ポリマーであってもよい。タンパク質と結合する核酸は、好ましくは、一本鎖、例えば、cDNA、RNA、GNA、TNAまたはLNAである。タンパク質と結合する核酸は、好ましくは、二本鎖、例えば、DNAである。タンパク質と結合する前に、二本鎖DNAが一本鎖へと解離するならば、一本鎖核酸と結合するタンパク質を、二本鎖DNAを配列決定するために使用してもよい。

【0129】

核酸結合タンパク質の三次構造は公知であることが好ましい。結合タンパク質の三次元構造に関する知識は、結合した構造体においてその機能を促進するようにタンパク質に修飾を行うことを可能にする。

【0130】

このタンパク質は、任意のサイズであり、任意の構造を有することができる。例えば、タンパク質は、オリゴマー、例えば、ダイマーまたはトリマーであってもよい。タンパク質は、好ましくは、1つのモノマーから形成された小さな球状ポリペプチドである。このようなタンパク質は、操作しやすく、また、その他の成分を妨害しにくい。例えば、そのようなタンパク質は、細孔サブユニットの細孔形成能を妨害しにくい。

【0131】

タンパク質の活性部位の位置および機能が公知であることも好ましい。このことは、タンパク質の活性が損なわれる修飾が活性部位に対して行われるのを防ぐ。それはまた、タンパク質が標的核酸配列と特定の方法で結合できるように、そのタンパク質がその他の成分と結合することを可能にする。例えば、配列決定目的のために、本タンパク質を膜貫通タンパク質細孔と結合させた場合、以下に記載されるように、標的核酸中の一定の割合のヌクレオチドが細孔と相互作用することが可能となる。そのような実施形態において、本タンパク質自体が電流の障害となることなく、細孔チャンネルのバレル開口部分の可能な限り近くに、タンパク質の活性部位を配置することが有益である。タンパク質が核酸を配向し得る方法に対する知識はまた、効率的に結合する構造体が設計されることを可能にする。

【0132】

本発明の方法によって作製された構造体は、精製する必要がある場合もある。核酸結合タンパク質は、構造体を精製するために用いられる条件に耐え得ることが好ましい。

【0133】

その他の成分は細孔を含むことができる。そのような細孔を用いて、核酸の配列決定をすることができる。標的核酸中のヌクレオチドの多くを、確率学的センシングにより正確に同定するために、ヌクレオチドの識別と適合し得るバッファーバックグラウンド中で本タンパク質は核酸と結合するのが好ましい。本タンパク質は、好ましくは、通常の生理学的レベルよりもずっと高い塩濃度、例えば、100 mM～2000 mMで、少なくとも残存する活性を有する。本タンパク質は、より好ましくは、高い塩濃度でのその活性を増大させるために修飾されている。本タンパク質はまた、その処理性、安定性および保存期間を向上させるために修飾してもよい。

【0134】

好適な修飾は、好極限性微生物、例えば、好塩性、中度好塩性細菌、好熱性および中度好熱性生物の特性決定、ならびに、中度好熱性または好熱性エキソヌクレアーゼの耐塩性、安定性および温度依存性を変化させる指向性進化手法から決定することができる。

【0135】

この酵素はまた、好ましくは、10℃～60℃の温度、例えば、室温にて、少なくとも部分的な活性を保持する。このことは、様々な温度、例えば、室温にて、核酸が配列決定されることを可能にする。

【0136】

核酸結合タンパク質は、好ましくは、核酸処理酵素である。核酸処理酵素は、核酸相互作用することができ、核酸の少なくとも1つの特性を修飾することができるポリペプチドである。この酵素は、核酸を切断することにより、個々のヌクレオチド、またはより短いヌクレオチド鎖、例えば、ジもしくはトリヌクレオチドを形成するように、核酸を修飾し得る。この酵素は、核酸を配向させるか、または特定の位置に移動させることにより、核酸を修飾し得る。

【0137】

核酸処理酵素は、核酸分解酵素に由来するのが好ましい。核酸処理酵素は、酵素分類（EC）グループ3.1.11、3.1.13、3.1.14、3.1.15、3.1.16、3.1.21、3.1.22、3.1.25、3.1.26、3.1.27、3.1.30、および3.1.31のいずれかのメンバーに由来するのがより好ましい。核酸処理酵素は、以下の酵素のいずれか1つに基づくのがより好ましい：

・ 3.1.11. — 5' — ホスホモノエステル産生エキソデオキシリボヌクレアーゼ.

3.1.11.1 エキソデオキシリボヌクレアーゼ I.

3.1.11.2 エキソデオキシリボヌクレアーゼ I I I.

3.1.11.3 エキソデオキシリボヌクレアーゼ（ラムダー誘導性）.

3.1.11.4 エキソデオキシリボヌクレアーゼ（ファージSP3誘導性）.

3.1.11.5 エキソデオキシリボヌクレアーゼ V.

3.1.11.6 エキソデオキシリボヌクレアーゼ V I I.

・ 3.1.13. — 5' — ホスホモノエステル産生エキソリボヌクレアーゼ.

3.1.13.1 エキソリボヌクレアーゼ I I.

3.1.13.2 エキソリボヌクレアーゼ H.

3.1.13.3 オリゴヌクレオチダーゼ.

3.1.13.4 ポリ（A）—特異的リボヌクレアーゼ.

3.1.13.5 リボヌクレアーゼ D.

・ 3.1.14. — 3' — ホスホモノエステル産生エキソリボヌクレアーゼ.

3.1.14.1 酵母リボヌクレアーゼ.

・ 3.1.15. — 5' — ホスホモノエステル産生性の、リボ—またはデオキシ

リボ核酸のいずれかと活性を示すエキソヌクレアーゼ

3. 1. 15. 1 毒液エキソヌクレアーゼ.

・ 3. 1. 16. - 3'-ホスホモノエステル産生性の、リボ-またはデオキシリボ核酸のいずれかと活性を示すエキソヌクレアーゼ

3. 1. 16. 1 脾臓エキソヌクレアーゼ.

・ 3. 1. 21. - 5'-ホスホモノエステル産生エンドデオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 21. 1 デオキシリボヌクレアーゼ I.

3. 1. 21. 2 デオキシリボヌクレアーゼ I V (ファージ T (4) - 誘導性).

3. 1. 21. 3 タイプ I 部位特異的デオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 21. 4 タイプ I I 部位特異的デオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 21. 5 タイプ I I I 部位特異的デオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 21. 6 C C - 選択性エンドデオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 21. 7 デオキシリボヌクレアーゼ V.

・ 3. 1. 22. - 5'-ホスホモノエステル以外を産生するエンドデオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 22. 1 デオキシリボヌクレアーゼ I I.

3. 1. 22. 2 アスペルギルス デオキシリボヌクレアーゼ K (1).

3. 1. 22. 3 登録分類変更: 3. 1. 21. 7.

3. 1. 22. 4 交差分岐エンドデオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 22. 5 デオキシリボヌクレアーゼ X.

・ 3. 1. 25. - 改変塩基に対して特異的な、部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ.

3. 1. 25. 1 デオキシリボヌクレアーゼ (ピリミジンダイマー).

3. 1. 25. 2 登録分類変更: 4. 2. 99. 18.

・ 3. 1. 26. - 5'-ホスホモノエステル産生エンドリボヌクレアーゼ.

3. 1. 26. 1 モジホコリ (Phy s a r u m p o l y c e p h a l u m) リボヌクレアーゼ.

3. 1. 26. 2 リボヌクレアーゼ α.

3. 1. 26. 3 リボヌクレアーゼ I I I.

3. 1. 26. 4 リボヌクレアーゼ H.

3. 1. 26. 5 リボヌクレアーゼ P.

3. 1. 26. 6 リボヌクレアーゼ I V.

3. 1. 26. 7 リボヌクレアーゼ P 4.

3. 1. 26. 8 リボヌクレアーゼ M 5.

3. 1. 26. 9 リボヌクレアーゼ (ポリ- (U) - 特異的).

3. 1. 26. 10 リボヌクレアーゼ I X.

3. 1. 26. 11 リボヌクレアーゼ Z.

・ 3. 1. 27. - 5'-ホスホモノエステル以外を産生するエンドリボヌクレアーゼ.

3. 1. 27. 1 リボヌクレアーゼ T (2).

3. 1. 27. 2 バチルス・ズブチリス リボヌクレアーゼ.

3. 1. 27. 3 リボヌクレアーゼ T (1).

- 3. 1. 27. 4 リボヌクレアーゼ U (2) .
- 3. 1. 27. 5 臍リボヌクレアーゼ.
- 3. 1. 27. 6 エンテロバクターリボヌクレアーゼ.
- 3. 1. 27. 7 リボヌクレアーゼ F.
- 3. 1. 27. 8 リボヌクレアーゼ V.
- 3. 1. 27. 9 tRNA-イントロンエンドヌクレアーゼ.
- 3. 1. 27. 10 rRNA エンドヌクレアーゼ.

・ 3. 1. 30. - 5'-ホスホモノエステル産生性の、リボ-またはデオキシ
リボ核酸のいずれかと活性を示すエンドヌクレアーゼ

10

- 3. 1. 30. 1 アスペルギルスヌクレアーゼ S (1) .
- 3. 1. 30. 2 セラチア・マルセセンスヌクレアーゼ.

・ 3. 1. 31. - 3'-ホスホモノエステル産生性の、リボ-またはデオキシ
リボ核酸のいずれかと活性を示すエンドリボヌクレアーゼ

- 3. 1. 31. 1 微生物ヌクレアーゼ.

【0138】

酵素は、最も好ましくは、核酸を切断して、個々のヌクレオチドを形成する、エキソヌクレアーゼ、例えば、デオキシリボヌクレアーゼである。エキソデオキシリボヌクレアーゼの利点は、一本鎖および二本鎖 DNA の両方に活性を示し、5'-3' または 3'-5' の方向のいずれかで塩基を加水分解する点である。

20

【0139】

個々のヌクレオチドとは、単一のヌクレオチドである。個々のヌクレオチドは、任意の結合、例えば、ホスホジエステル結合によって、別のヌクレオチドまたは核酸と結合していないものである。ホスホジエステル結合は、ヌクレオチドのリン酸基の1つが別のヌクレオチドの糖基と結合していることを伴う。個々のヌクレオチドは、典型的には、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500、少なくとも1000、または少なくとも5000ヌクレオチドの別の核酸配列といかなる様式でも結合していないものである。

【0140】

本方法において使用するための好ましい酵素としては、大腸菌由来のエキソヌクレアーゼ I (配列番号6)、大腸菌由来のエキソヌクレアーゼ I I I (配列番号52)、T. thermophilus 由来の Rec J (配列番号54)、およびバクテリオファージ・ラムダエキソヌクレアーゼ (配列番号54)、およびそれらの変異体が挙げられる。配列番号56の3つ同じサブユニットは相互作用して、三量体エキソヌクレアーゼを形成する。大腸菌由来のエキソヌクレアーゼ I (配列番号6) に基づく酵素が最も好ましい。

30

【0141】

核酸処理酵素は、好ましくは、配列番号6、52、54および56に示される配列またはその変異体のいずれかを含むエキソヌクレアーゼ酵素に由来する。言い換えれば、本酵素は、好ましくは、そのシステイン残基が上記のように修飾される前に、配列番号6、52、54および56に示される配列またはその変異体のいずれかを含む。

40

【0142】

配列番号6、52、54または56の変異体は、配列番号6、52、54または56とは異なり、核酸処理能力を保持するアミノ酸配列を有する酵素である。核酸を処理する変異体の能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてアッセイすることができる。例えば、核酸を処理する変異体の能力は、実施例に記載されるようにしてアッセイすることができる。変異体はまた、実施例に記載されるようなその発現能を保持している必要がある。

【0143】

この変異体は、核酸の処理を促進し、かつ／または、高い塩濃度および／または室温に

50

てその活性を促進する修飾を含んでもよい。

【0144】

変異体は、生物によって、例えば、大腸菌によって発現される、天然の変異体であってもよい。変異体はまた、組み換え技術により作製される非天然の変異体を含む。配列番号6、52、54または56のアミノ酸配列の全長に亘り、変異体は、好ましくは、アミノ酸同一性に基づく配列に対して、少なくとも50%相同であり得る。より好ましくは、変異体ポリペプチドは、配列全体に亘って、配列番号6、52、54または56のアミノ酸配列に対して、アミノ酸同一性に基づき、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、および、より好ましくは、少なくとも95%、97%または99%相同であり得る。200個以上、例えば、230、250、270または280個以上連続するアミノ酸の幅に亘り、少なくとも80%、例えば、少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性が存在し得る（「高相同性（hard homology）」）。

10

【0145】

当技術分野における標準的方法を用いて、相同性を決定することができる。UWGC Gパッケージは、例えば、その既定の設定を使用して、相同性を計算するために使用し得るBESTFITプログラムを提供する（Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395）。PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは、例えば、Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S. F. et al. (1990) J Mol Biol 215:403-10に記載されるように、それを用いることにより、相同性を計算または配列を整列させることができる（例えば、同じ残基または対応する配列の同定（典型的には、それらの既定の設定における））。

20

【0146】

BLAST解析を実行するためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）を通じて、公然と入手することができる。このアルゴリズムは、まず、問い合わせ配列（query sequence）内の長さがWの短いワードであって、データベース配列内の同じ長さのワードとアラインメントした際に、ある正の値の閾値スコアTと一致するか、またはそれを満たすワードを特定することにより高スコア配列ペア（HSP）を同定することを含む。Tは、近傍ワードスコア閾値と呼ばれる（Altschul et al.、上記参照）。これら最初の近傍ワードヒットは、それらを含むHSPを見つける検索を開始するためのシードとして作用する。このワードヒットは、累積アラインメントスコアを増やすことができる限り、各配列に沿って両方向に伸長される。累積アラインメントスコアが最高到達値から数量Xだけ低下した場合；負のスコアを有する残基アラインメントが1つ以上累積したことにより累積スコアが0以下になった場合；または、いずれかの配列の末端に達した場合には、各方向におけるワードヒットの伸長が停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、およびXにより、アラインメントの感度および速度が決定される。BLASTプログラムは、既定値としてワード長（W）11を用い、BLOSUM62スコア行列（Henikoff & Henikoff (1992), PROC. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919を参照されたい）は、アラインメント（B）50、期待値（E）10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を既定値として用いる。

30

40

【0147】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計的解析を行う。例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照されたい。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小合計確率（P(N)）であり、これは、2つのアミノ酸配列間の一致が偶然起こり得る確率の指標を提供する。例えば、第1の配列と第2の配列を比較した際に、最小合計確率が、約1未満、好ましくは約0.1未満、より好

50

ましくは約 0.01 未満、および最も好ましくは約 0.001 未満である場合に、ある配列はもう一方の配列と類似していると見なされる。

【0148】

上記で考察したものの他に、配列番号 52、54 または 56 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸置換を、例えば、1、2、3、4、5、10、20 または 30 個までの置換を、行うことができる。保存的置換は、例えば、以下の表 1 にしたがって、実施することができる。

10

【0149】

【表 1】

表 1-保存的置換

第 2 列の同じブロックの、好ましくは、第 3 列の同じ行のアミノ酸は、互いに置換することができる。

20

非芳香族	非極性	G A P
		I L V
	極性-非荷電	C S T M
		N Q
	極性-荷電	D E
		H K R
芳香族		H F W Y

30

【0150】

配列番号 6、52、54 または 56 のアミノ酸配列の 1 個以上のアミノ酸残基を、上記したポリペプチドからさらに欠失させてもよい。1、2、3、4、5、10、20 または 30 個までの残基を欠失させてもよく、それ以上であってもよい。

【0151】

変異体は、配列番号 6、52、54 または 56 の断片であってもよい。そのような断片は、核酸処理活性を保持する。断片は、少なくとも 50、100、200 または 250 アミノ酸長であることができる。断片は、好ましくは、配列番号 6、52、54 または 56 の核酸処理ドメインを含む。

40

【0152】

1 個以上のアミノ酸を、上記したポリペプチドに対して、代替的または付加的に付加してもよい。配列番号 6、52、54 または 56 またはその変異体または断片のアミノ酸配列のアミノ末端またはカルボキシ末端において、伸長させてもよい。伸長は、かなり短くてもよく、例えば、1～10 個のアミノ酸長であってもよい。あるいは、伸長は、より長くてもよく、例えば、最大 50 個または 100 個のアミノ酸であってもよい。担体タンパ

50

ク質を、サブユニットまたは変異体に融合させてもよい。

【0153】

上記で考察したように、配列番号6、52、54または56の変異体は、配列番号6、52、54または56のアミノ酸配列から変化しており、その核酸処理能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質である。変異体は、典型的には、核酸処理に關与する配列番号6、52、54または56の領域を含む。配列番号6、52、54および56の触媒ドメインは、配列表の説明において上記で考察されている。配列番号6、52、54または56の変異体は、好ましくは、關連する触媒ドメインを含む。配列番号6、52、54または56の変異体は、典型的には、關連する触媒ドメイン外に、1個以上の修飾、例えば、置換、付加または欠失を含む。配列番号6の特定の変異体については、以下でより詳細に考察される。

10

【0154】

変異体は、例えば、その同定または精製を支援するために、ヒスチジンまたはアスパラギン酸残基を付加することにより、または、ポリペプチドがそのような配列を天然には含まない場合に、細胞からそれらの分泌を促進するためにシグナル配列を付加することにより、修飾してもよい。

【0155】

細孔を通して標的核酸配列を押したり引いたりすることができる好ましい酵素としては、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ、およびトポイソメラーゼ、例えば、ジャイレースが挙げられる。核酸処理酵素は、これらのタイプの酵素のいずれかに由来し得る。ポリメラーゼは、好ましくは、酵素分類（EC）グループ2.7.7.6、2.7.7.7、2.7.7.19、2.7.7.48および2.7.7.49のいずれかのメンバーである。ポリメラーゼは、好ましくは、DNA依存性DNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ、DNA依存性RNAポリメラーゼ、またはRNA依存性RNAポリメラーゼである。ヘリカーゼは、好ましくは、酵素分類（EC）グループ3.6.1.-および2.7.7.-のいずれかのメンバーである。ヘリカーゼは、好ましくは、ATP依存性DNAヘリカーゼ（ECグループ3.6.1.8）、ATP依存性RNAヘリカーゼ（ECグループ3.6.1.8）またはATP非依存性RNAヘリカーゼである。トポイソメラーゼは、好ましくは、酵素分類（EC）グループ5.9.9.1、2および5.9.9.1.3のいずれかのメンバーである。

20

30

【0156】

本酵素は明示用標識（revealing enzyme）を用いて標識してもよい。明示用標識は、細孔が検出され得る任意の好適な標識であり得る。好適な標識としては、限定するものではないが、蛍光分子、ラジオアイソトープ、例えば、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチド、およびリガンド、例えば、ビオチンが挙げられる。

【0157】

核酸結合タンパク質は、結合タンパク質産生生物、例えば、大腸菌、T.サーモフィルスまたはバクテリオファージから単離することができ、または、合成もしくは組み換え手段により作製することもできる。例えば、核酸結合タンパク質は、インビトロ翻訳および転写により合成することができる。核酸結合タンパク質のアミノ酸配列は、非天然のアミノ酸を含ませるために、または、タンパク質の安定性を増大させるために、修飾してもよい。核酸結合タンパク質が合成的手段により作製された場合、そのようなアミノ酸は、作製時に導入してもよい。核酸結合タンパク質はまた、合成または組み換え作製のいずれかの後で改変してもよい。

40

【0158】

核酸結合タンパク質はまた、D-アミノ酸を用いて作製してもよい。例えば、核酸結合タンパク質は、L-アミノ酸とD-アミノ酸の混合物を含んでもよい。このようなタンパク質またはペプチドを作製するために、このことは、当技術分野において、従来続けられている。

50

【0159】

核酸結合タンパク質はまた、それら修飾がその核酸処理能力またはその他の成分への結合を妨害しない限り、その他の非特異的な化学修飾を含んでもよい。多数の非特異的な側鎖修飾は、当技術分野において公知であり、細孔の側鎖に対して行ってもよい。そのような修飾としては、例えば、アルデヒドとの反応に続く、 NaBH_4 との還元によるアミノ酸の還元アルキル化、メチルアセトイミデートによるアミジン化、または無水酢酸によるアシル化が挙げられる。核酸結合タンパク質に対する修飾は、核酸結合タンパク質の発現後に行うこともできるし、本発明の方法において、核酸結合タンパク質が使用された後に行うこともできる。

【0160】

核酸結合タンパク質は、当技術分野において公知の標準的方法を用いて、作製することができる。核酸結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を用いて、単離および複製することができる。そのような配列は、以下により詳細に考察される。核酸結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を用いて、細菌宿主細胞中で発現させてもよい。核酸結合タンパク質は、組み換え発現ベクターからのポリペプチドのインサイチュ発現により、細胞中で作製してもよい。発現ベクターは、任意に、ポリペプチドの発現を制御するための誘導性プロモーターを担持する。

【0161】

核酸結合タンパク質は、細孔生成生物から、任意のタンパク質液体クロマトグラフィーシステムによる精製後に、または、以下に記載されるような組み換え発現後に、大規模で作製してもよい。典型的なタンパク質液体クロマトグラフィーシステムとしては、FPLC、AKTAシステム、Bio-Cadシステム、Bio-Rad BioLogicシステムおよびGilson HPLCシステムが挙げられる。

【0162】

核酸処理酵素は、好ましくは、配列番号6に示される配列またはその変異体を含むエキソヌクレアーゼ酵素に由来する。言い換えれば、本酵素は、好ましくは、そのシステイン残基が上記のように修飾される前に、配列番号6に示される配列またはその変異体を含む。配列番号6の変異体については、上記で考察されている。

【0163】

配列番号6は、51、98、144、306および330位に5つの天然のシステイン残基を有する。これらの位置にある5つのシステイン残基全ては、接近可能である。配列番号6の変異体は、好ましくは、本発明にしたがってそれが修飾される前に、5つのこれらの残基全てを含む。

【0164】

1実施形態において、51、98、144、306および330位の5つのシステイン全てが配列番号6から除去され、1つ以上の天然のシステイン以外の残基が導入される。

【0165】

別の実施形態において、51、98、144、306および330位の5つのシステイン残基のうちの1つ以上を除き、配列番号6から除去される。51、98、144、306および330位の5つのシステイン残基のうちの1つ以上の任意の組み合わせは、突然変異誘発後に、配列番号6由来の酵素中で残存し得る。好ましい組み合わせとしては、限定するものではないが、144および330が挙げられる。好ましい実施形態において、配列番号6の144位または330位に、唯一の天然のシステイン残基が残存している。

【0166】

配列番号6における5つのシステイン残基のうちの1つ以上は、好ましくは、アラニン、セリン、メチオニンまたはスレオニンで置換されている。配列番号6における51位のシステイン残基は、より好ましくは、アラニンで置換されている。配列番号6における98位のシステイン残基は、より好ましくは、セリンまたはスレオニンで置換されている。配列番号6における144位のシステイン残基は、より好ましくは、メチオニンまたはス

10

20

30

40

50

レオニンで置換されている。配列番号6における306位のシステイン残基は、より好ましくは、セリンまたはスレオニンで置換されている。配列番号6における330位のシステイン残基は、より好ましくは、スレオニンで置換されている。最も好ましい実施形態において、配列番号6における51位のシステイン残基は、アラニンで置換されており、配列番号6における98位のシステイン残基は、スレオニンで置換されており、配列番号6における144位のシステイン残基は、スレオニンで置換されており、配列番号6における306位のシステイン残基は、スレオニンで置換されており、配列番号6における330位のシステイン残基は、スレオニンで置換されている。

【0167】

核酸処理酵素は、好ましくは、配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48および50のうちのいずれか1つに示される配列またはその変異体を含む。配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48および50の変異体は、配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48および50の配列とは異なるアミノ酸配列を有し、その核酸処理能力を保持するタンパク質である。上記で考察したように、配列番号6の変異体が配列番号6とは異なるのと同じ程度に、変異体は、配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48または50と異なり得る。しかしながら、配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48および50の変異体は、野生型酵素と比較して行われた変更を含む必要がある。例えば、配列番号8、10および12の変異体は、配列番号8、10および12と同じ残基を、98、144、306および330位に含む必要がある。配列番号14および16の変異体は、配列番号14および16と同じ残基を、42、51、98、144、306および330位に含む必要がある。配列番号18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48および50の変異体は、配列番号18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48および50と同じ残基を、51、98、144、184、306および330位に含む必要がある。

【0168】

核酸処理酵素は、典型的には、好ましい方向性の側鎖を有するその表面接近可能な1つ以上の残基を介して、成分と結合する。配列番号6における以下の残基は、それらが覆い隠されてしまい、溶媒と接近することができないか、または、リンカーとの結合がタンパク質球状構造の重大な妨害をもたらし得ることから、結合点として使用されるべきでない：13、101、104、111、114、115、117、190、194、197、208、232、233、236、246、247、248、258、259、261、262、283、298、309、310、347、406、および267。配列番号6における以下の残基は、DNA結合溝部と接近しているので、それらが表面接近可能であったとしても、リンカーと結合するためには良好な場所とはなり得ない：21、22、103、105、106、107、109、110、114、115、117、118、231、242、252、256、257、285、287、288、289、300、301、302、304、305、307、355、356、357、358、359、360、368、369および371。配列番号6における全ての残りの残基は、結合点として潜在的に使用され得る。

【0169】

配列番号6における以下の残基は、それらが側鎖を提供し、曝露されて溶媒が接近可能であり、側鎖の変異を予測することにより、タンパク質構造全体の妨害を少なくすることにつながり得ることから、好ましい：8、9、37、38、39、41、43、44、45、47、76、77、96、150、151、153、156、159、161、17

1、173、176、178、179、184、195、198、199、200、203、209、218、222、225、227、256、273、275、277、278、280、281、282、285、292、293、311、313、316、318、321、326、327、328、332、335、338、339、340、342、345、353、374、381、385、387、389、390、395、397、401、417、420、423、424、429、432、437、438、441、445、448、452、456、458、459、465、458、459、462、466および467。以下の残基は、結合点として最も好ましい：184、83、42、94、90、188、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、215、216、217、218、219、220、221、222および223。好ましい結合残基のいずれも、置換により修飾することができる。好ましくは、1つ以上の好ましい結合残基は、システインで置換されている。配列番号6またはその変異体の好ましい置換としては、限定するものではないが、M184C、A83C、V42C、V94C、S90C、Y188C、Y188C、A219C、A219C、M218CおよびM218Cが挙げられる。以下でより詳細に考察されるように、本酵素は、1つより多い残基を介して成分と結合することができる。

10

【0170】

核酸結合タンパク質は、1ヶ所、例えば、1、2、3または4ヶ所で、別の成分と結合することができる。核酸結合タンパク質は、好ましくは、1または2ヶ所で結合する。核酸結合タンパク質から天然のシステイン残基を除去した後、1つ以上のシステイン残基を、結合のための特別の部位でタンパク質に取り込ませることができる。2ヶ所での結合は、複合体の柔軟性を低減することができ、選択された特定の方向で、成分上に核酸結合タンパク質を固定することができる。

20

【0171】

好ましい実施形態において、本方法は、(1)大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI(配列番号6)または置換M184CおよびV94Cを有するその変異体を、(2) α -HL(配列番号2)または置換N17CおよびE287Cを有するその変異体と結合させることを含む。配列番号6またはその変異体におけるM184C位は、配列番号2またはその変異体におけるN17C位と結合する。配列番号6またはその変異体におけるV94C位は、異なるリンカーにより、配列番号2またはその変異体におけるE287C位と結合する。

30

【0172】

【表 2】

以下の表 2 は、その他の好ましい第 1 および第 2 結合ポイントの場所を示す

	第 1 A	第 1 B (第 1 A と結 合)	第 2 A	第 B (第 2 A と結 合)
	配列番号 6 ま たはその変異 体	配列番号 2 ま たはその変異 体	配列番号 6 ま たはその変異 体	配列番号 2 ま たはその変異 体
1	M184C	N17C	A83C	K237C
2	M184C	N17C	S90C	S239C
3	M184C	N17C	V94C	E287C
4	V42C	T19C	A83C	K237C
5	V42C	T19C	S90C	S239C
6	V42C	T19C	V94C	E287C

10

【0173】

20

膜貫通タンパク質細孔

成分の 1 つは、好ましくは、膜貫通タンパク質細孔である。膜貫通タンパク質細孔は、付加電位により作動されるイオンが膜の片側から膜のもう一方の側へと流れることを可能にするひとつのポリペプチドまたはポリペプチドのコレクションである。細孔は、好ましくは、ヌクレオチドが、付加電位に沿って、膜の片側から膜のもう一方の側へと流れることを可能にする。細孔は、好ましくは、核酸、例えば、DNA または RNA が細孔を通じて押したり引いたりされることを可能にする。

【0174】

細孔は、モノマーまたはオリゴマーであり得る。細孔は、好ましくは、6、7 または 8 サブユニット等のいくつかの繰り返しサブユニットから形成される。細孔は、より好ましくは 7 量体の細孔である。細孔は、典型的には、バレルまたはチャンネルを含み、そこを通じてイオンが流れることができる。細孔のサブユニットは、典型的には、中心軸を取り囲み、膜貫通 β バレルまたはチャンネル、もしくは膜貫通 α -ヘリックスバンドルまたはチャンネルへと鎖を導く。

30

【0175】

細孔のバレルまたはチャンネルは、典型的には、ヌクレオチドまたは核酸との相互作用を促すアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、好ましくは、バレルまたはチャンネルの狭窄部の近傍に位置する。細孔は、典型的には、1 つ以上の、アルギニン、リジンまたはヒスチジン等の正に荷電したアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、典型的には、細孔とヌクレオチドまたは核酸の間の相互作用を促す。ヌクレオチドの検出は、アダプターにより促され得る。このことは以下に、詳細に考察する。

40

【0176】

本発明に関して使用するための細孔は、 β -バレル細孔、 α -ヘリックスバンドル細孔または固体細孔であり得る。 β -バレル細孔は、 β -鎖から形成されるバレルまたはチャンネルを含む。好適な β -バレル細孔としては、限定するものではないが、 α -ヘモリジン、炭疽菌毒素およびロイコシジン等の β -毒素、および、*Mycobacterium smegmatis* のポーリン A (MspA)、外膜ポーリン F (OmpF)、外膜ポーリン G (OmpG)、外膜ホスホリパーゼ A および *Neisseria* オートトランスポーターリポタンパク質 (NalP) 等の細菌の外膜タンパク質／ポーリンが挙げられる。 α -ヘリックスバンドル細孔は、 α -ヘリックスから形成されるバレルまたはチャネ

50

ルを含む。好適な α -ヘリックスバンドル細孔としては、限定するものではないが、WZ A等の内膜タンパク質および α 外膜タンパク質が挙げられる。

【0177】

成分は細孔自体であってもよい。あるいは、細孔がオリゴマーである場合、成分は細孔サブユニットであってもよい。成分は、上記したように、単離、実質的に単離、精製または実質的に精製することができる。

【0178】

細孔またはサブユニットは、好ましくは、 α -ヘモリジン (α -HL) に由来する。野生型 α -HLの細孔は、7つの同一のモノマーまたはサブユニットから形成される (すなわち、7量体である)。 α -ヘモリジンの1つの野生型モノマーまたはサブユニットの配列が、配列番号2に示される。成分は、好ましくは、配列番号2に示される配列またはその変異体を含む。配列番号2のアミノ酸1、7~21、31~34、45~51、63~66、72、92~97、104~111、124~136、149~153、160~164、173~206、210~213、217、218、223~228、236~242、262~265、272~274、287~290、および294は、ループ領域を形成する。配列番号2の残基113および147は、 α -HLのパレルまたはチャンネルの狭窄 (c o n s t r i c t i o n) 部分を形成する。核酸結合タンパク質は、好ましくは、配列番号2のアミノ酸8、9、17、18、19、44、45、50および51位のうちの1つ以上と結合している。

【0179】

配列番号2の変異体は、配列番号2のアミノ酸配列とは異なり、その細孔形成能力を保持するアミノ酸配列を有するサブユニットである。変異体の細孔形成能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてアッセイすることができる。例えば、変異体をその他の適当なサブユニットと一緒に膜内に挿入してもよく、オリゴマー化して細孔を形成するその能力を測定してもよい。サブユニットを膜、例えば、脂質二重層に挿入するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、サブユニットは、それが脂質二重層に拡散し、脂質二重層と結合することにより挿入され、機能し得る状態で集合するように、脂質二重層を含む溶液中、精製された形態で懸濁させてもよい。あるいは、サブユニットを、M. A. Holden, H. Bayley. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 6502-6503および国際特許出願第PCT/GB2006/001057号 (WO2006/100484として公開) に記載される「ピックアンドプレース (p i c k a n d p l a c e)」法を用いて、膜中に直接挿入してもよい。

【0180】

変異体は、核酸結合タンパク質との共有結合または相互作用を促す修飾を含んでもよい。変異体は、好ましくは、核酸結合タンパク質との結合を促す1つ以上の反応性システイン残基を含む。例えば、変異体は、8、9、17、18、19、44、45、50、51、237、239および287位の1ヶ所以上に、および/または、配列番号2のアミノまたはカルボキシ末端に、システイン残基を含んでもよい。好ましい変異体は、配列番号2の8、9、17、237、239および287位の残基とシステインの置換を含む (K8C、T9C、N17C、K237C、S239CまたはE287C)。

【0181】

変異体はまた、ヌクレオチドとの任意の相互作用を促すか、または、以下に記載される分子アダプターの配向を促す、修飾を含んでもよい。変異体はまた、分子アダプターの共有結合を促す修飾を含んでもよい。

【0182】

特に、変異体は、好ましくは、配列番号2の139位にグルタミンを有する。変異体は、好ましくは、配列番号2の119、121または135位にシステインを有する。配列番号4は、135位にアルギニン (L135C) と139位にグルタミン (N139Q) を有していること以外は、配列番号2の配列を示す。配列番号4またはその変異体を用いて、本発明の細孔を形成させてもよい。変異体は、配列番号2の113位にアルギニンを

有してもよい。

【0183】

変異体は、生物によって、例えば、ブドウ球菌によって、天然において発現される天然の変異体であっても、大腸菌などの細菌によって組み換え的に発現されてもよい。変異体はまた、組み換え技術により作製される非天然の変異体を含む。配列番号2または4のアミノ酸配列の全長に亘り、変異体は、好ましくは、アミノ酸同一性に基づく配列に対して、少なくとも50%相同であり得る。より好ましくは、変異体ポリペプチドは、配列全体に亘って、配列番号2または4のアミノ酸配列に対して、アミノ酸同一性に基づき、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、および、より好ましくは、少なくとも95%、97%または99%相同であり得る。200個以上、例えば、230、250、270または280個以上連続するアミノ酸の幅に亘り、少なくとも80%、例えば、少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性が存在し得る（「高相同性（hard homology）」）。相同性は、上記のようにして測定することができる。

10

【0184】

上記で考察したものの他に、配列番号2または4のアミノ酸配列に対して、アミノ酸置換を、例えば、1、2、3、4、5、10、20または30個までの置換を、行うことができる。保存的置換は、例えば、上記表1にしたがって、実施することができる。

【0185】

配列番号2のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸残基を、上記したポリペプチドからさらに欠失させてもよい。1、2、3、4、5、10、20または30個までの残基を欠失させてもよく、それ以上であってもよい。

20

【0186】

変異体は、配列番号2または4の断片であってもよい。そのような断片は、細孔形成活性を保持する。断片は、少なくとも50、100、200または250アミノ酸長であり得る。断片は、好ましくは、配列番号2または4の細孔形成ドメインを含む。断片は、典型的には、配列番号2または4の残基119、121、135、113および139を含む。

【0187】

1つ以上のアミノ酸を、上記したポリペプチドに代替的にまたは付加的に追加してもよい。配列番号2または4またはその変異体または断片のアミノ末端またはカルボキシ末端を、伸長させ得る。伸長は、かなり短くても、例えば、1~10アミノ酸長であってもよい。あるいは、伸長は、より長くても、例えば、50または100アミノ酸までであってもよい。担体タンパク質を、細孔または変異体に融合させてもよい。

30

【0188】

上記で考察したように、配列番号2または4の変異体は、配列番号2または4のアミノ酸配列とは異なり、その細孔形成能力を保持するアミノ酸配列を有するサブユニットである。変異体は、典型的には、細孔形成に關与する配列番号2または4の領域を含む。β-バレルを含むα-HLの細孔形成能力は、各サブユニットにおけるβ-鎖によって提供される。配列番号2または4の変異体は、典型的には、β-鎖を形成する配列番号2の領域を含む。β-鎖を形成する配列番号2または4のアミノ酸については、上記で考察されている。得られた変異体はその細孔形成能力を保持している限り、β-鎖を形成する配列番号2または4の領域に対して1つ以上の修飾を行うことができる。配列番号2または4のβ-鎖領域に対して行うことができる特定の修飾については、上記で考察されている。

40

【0189】

配列番号2または4の変異体は、好ましくは、そのα-ヘリックスおよび／またはループ領域内に、1つ以上の修飾、例えば、置換、付加または欠失を含む。α-ヘリックスおよびループを形成するアミノ酸については、上記で考察されている。

【0190】

50

変異体は、例えば、その同定または精製を支援するために、ヒスチジンまたはアスパラギン酸残基を付加することにより、または、ポリペプチドがそのような配列を天然には含まない場合に、細胞からそれらの分泌を促進するためにシグナル配列を付加することにより、修飾してもよい。

【0191】

変異体はまた、核酸結合タンパク質について上記で考察した、非特異的修飾のいずれかを含んでもよい。サブユニットまたは細孔は、上記で考察したようにして作製することができる。

【0192】

リンカーおよび基

2つ以上の成分は、それらに共有結合している、上記で規定されるような少なくとも1つのリンカーおよび少なくとも1つの基を有する。リンカーおよび基を成分に結合させる方法は、当技術分野において周知である。リンカーおよび基は、好ましくは、成分と化学的に融合されている。好適な方法としては、限定するものではないが、一級アミン／カルボン酸結合、チオール間反応、非天然アミノ酸間反応、およびシステイン結合が挙げられる。

【0193】

本発明の方法は、各成分に、少なくとも1つのリンカーおよび／または少なくとも1つの基を結合させるステップをさらに含んでもよい。

【0194】

第1の成分は、好ましくは、1ヶ所以上の位置、例えば、2、3または4ヶ所の位置でリンカーを使用して、第2の成分と結合している。各リンカーのその関連する成分との結合の位置は、成分の相対的可動性を制約するように設計してもよい。成分と結合する位置の数は、最終的な複合体の剛性に影響を及ぼすことになる。

【0195】

リンカーおよび／または基は、成分における1つ以上の反応基、例えば、システイン残基、反応性リジン残基または非天然アミノ酸にと結合させてもよい。好ましくは、リンカーおよび／または基は、成分の1つ以上の接近可能なシステイン残基に結合させてもよい。典型的には、リンカーおよび／または基は、1つのシステイン残基から別の残基へのジスルフィド架橋を介して結合している。

【0196】

リンカーは、高い親和性のハイブリダイゼーションリンカーである。それらは、少なくとも1つのハイブリダイズ可能な領域を含み、好ましくは、共有結合を形成させることが可能な少なくとも1つの基を含む。特に好ましいのは、低濃度、例えば、ナノモルレベルの親和性で有効であるリンカーである。リンカーの長さ、柔軟性および親水性は、典型的には、それらが、結合する成分の機能を妨げないように設計される。ハイブリダイゼーションリンカーを使用する利点は、成分の不必要なホモダイマーの形成を最小限にすることである。

【0197】

ハイブリダイズ可能な領域は、別のリンカーのハイブリダイズ可能な領域とハイブリダイゼーションすることが可能な領域である。ハイブリダイズ可能な領域は、好ましくは、核酸を含む。核酸ハイブリダイゼーションリンカーは、上記した核酸のいずれかを含むことができる。例えば、それらは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、または当技術分野において公知のいずれかの合成核酸、例えば、ペプチド核酸（PNA）、グリセロール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、ロックド核酸（LNA）、またはヌクレオチド側鎖を有するその他の合成ポリマーを含み得る。2つのリンカーをハイブリダイズさせる核酸は、同じであっても、異なってもよい。最も好ましいのは、リンカーがDNAを含む。典型的には、各リンカーがDNAを含む場合、少なくとも1つのリンカーは、一本鎖DNAを含む必要がある。好ましくは、両方のリンカーが一本鎖DNAを含む。

10

20

30

40

50

【0198】

ハイブリダイゼーションは、2つ以上のリンカー間、好ましくは、2つまたは3つのリンカー間で有り得る。3つのリンカーが使用される場合、それらはトリプレックスを形成する。リンカーは、様々な立体構造で、例えば、「ヘッドトゥーヘッド」構造または「ヘッドトゥーテール」構造でハイブリダイズすることができる。「ヘッドトゥーヘッド」構造の場合、ハイブリダイズしたリンカーの同じ端部で成分が近接するように、リンカーは整列する。「ヘッドトゥーテール」構造の場合、ハイブリダイズしたリンカーの反対の端部に成分が位置するように、リンカーは整列する。リンカーは任意の好適な三次元立体構造を有することができる。典型的には、リンカーは線状であるが、三角形、または、別の幾何学的立体構造 (geometrical confirmation) の形状であることもできる。

10

【0199】

好ましい核酸ハイブリダイゼーションリンカーは、配列番号57の5'末端から最初の15、25または35ヌクレオチドに相当する。リンカーはまた、好ましくは、特別な柔軟性を提供するために、3'末端にTTを有する。3'末端に、リンカーは、基、例えば、マレイミドまたはチオールを有し、この基は、リンカーが成分と結合することを可能にする。マレイミドまたはチオール修飾されたオリゴヌクレオチドが、市販で、例えば、ATDBioから取得することができる。より好ましいリンカーは、配列番号58、59および60に示される。相補的リンカーは、配列番号61、62および63に示される。配列番号58、59または60は、成分の1つと結合させることができ、相補的リンカー（それぞれ、配列番号61、62または63）は、その他の成分と結合する。次に、成分は、リンカーとハイブリダイズさせることにより結合させることができる。

20

【0200】

ハイブリダイゼーションの安定性は、ハイブリダイズするリンカーの融点に依存する。用途および必要とされる安定性に応じて、これは、リンカーの配列（例えば、リンカーをよりGCリッチに変更すると、それらの融点を上昇させ、したがって、安定性を増大させる）、リンカーの長さ（すなわち、それらの長さを増大させると、安定性を増大させる）、または反応条件（例えば、それらの濃度を増大させると、安定性を増大させる）を変更することにより、最適化することができる。

【0201】

ハイブリダイゼーションの最大の安定性のためには、高融点の長いハイブリダイゼーションリンカー、例えば、15ヌクレオチド長より長い、特に15~45ヌクレオチド長、例えば、15、20、25、30、35、40または45ヌクレオチド長のリンカーを有することが望ましい。しかしながら、長いリンカーの使用は成分間の距離を増大させる。成分間の相互作用が妨害されることから、あるいは、もう一方の成分から遊離される基質を検出するためには、一方の成分の近接性が要求されることから、このことは、欠点となり得る。凝集または静電的相互作用を防ぐことができ、屈曲することを可能とし得る場合には、増大させた距離は利点となり得る。増大させた距離の欠点は、核酸の結合の向きを変化させることにより克服することができる。最も好ましくは、リンカーは、6~15ヌクレオチド長、例えば、6、8または10ヌクレオチド長である核酸を含む。

30

40

【0202】

第1および第2のハイブリダイズ可能な領域は、好ましくは、1 pM~1 mMの濃度で、1 fM~1 μ Mの親和性を有する。第1および第2のハイブリダイズ可能な領域は、より好ましくは、1 pM~1 μ Mの濃度で、1 fM~10 nMの親和性を有する。第1および第2のハイブリダイズ可能な領域は、最も好ましくは、100 pM~10 nMの濃度で、1 pM~100 pMの親和性を有する。

【0203】

好ましい配列は、配列番号64に示される。このリンカーの3'末端は、表面上のシステイン残基と結合させることができる。リンカーはまた、好ましくは、高い柔軟性を提供するために、3'末端にTTTTTを有する。次に、配列番号65の5'末端は、核酸結

50

合タンパク質と結合させることができる。この例において、配列番号64の3'末端は、配列番号65の5'末端において、ある幅の配列に対して相補的である。

【0204】

一旦、リンカーが互いにハイブリダイズしたら、2つのリンカー間で持続的な結合が存在しないならば、特定の条件の下（例えば、高温またはより少ない塩という条件の下）、それらは融解する（バラバラになる）。持続的結合を形成させるために、一旦それらがハイブリダイズしたら、それらが互いに反応するように、成分は修飾される。各成分は、別の成分中の基と共有結合を形成することが可能な、それに共有結合している基を有する。上記で考察したように、基は、好ましくは、ハイブリダイゼーションリンカーを介して成分と結合する。1対の成分は、1つ以上の共有結合、例えば、1、2または3つの共有結合によって連結させることができる。

10

【0205】

典型的には、結合は、2つの成分間の単純なジスルフィド結合であることができる。成分またはハイブリダイゼーションリンカーはまた、1ヶ所以上、例えば、2ヶ所でチオール基を取り込ませるように修飾することができる。用途および好みに応じて、チオール基は、内部または末端のいずれかに、リンカー中に取り込ませることができる。

【0206】

成分またはハイブリダイゼーションリンカーはまた、1つ以上、例えば、2つのヨードアセトアミド基を含むように修飾することもできる。この場合も、ヨードアセトアミド基は、内部または末端のいずれかに、リンカー中に取り込ませることができる。1つ以上のヨードアセトアミド基を有する成分またはハイブリダイゼーションリンカーは、相補的成分またはハイブリダイゼーションリンカー上のチオールと共有結合することができる。

20

【0207】

成分またはハイブリダイゼーションリンカーは、アルケン基で修飾することもできる。ハイブリダイゼーションリンカー中に取り込ませた場合、アルケン基は内部または末端になり得る。好ましい位置にある1つ以上のアルケン基は、成分またはハイブリダイゼーションリンカーにおけるアルケン間で共有結合を形成するように、オレフィンメタセシスを受け得る。

【0208】

必要な場合には、成分またはハイブリダイゼーションリンカーと、反応性基、例えば、チオール基、ヨードアセトアミド基およびアルケン基との間に、成分またはハイブリダイゼーションリンカー間の効率的な共有結合を形成するのに必要な適当な距離を得るために、小さなリンカーを加えることができる。

30

【0209】

好ましい実施形態において、成分またはハイブリダイゼーションリンカー間の共有結合は、クリック化学を用いて形成させることができる。クリック化学とは、小規模および大規模用途の両方において確実に機能する、強力で、選択的、かつモジュール式の広範なビルディングブロック群を表すために、Kolbらによって、2001年に最初に導入された用語である（Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, Angew. Chem. Int. Ed. 40 (2001) 2004-2021）。それらは、以下の通りに、クリック化学のための厳しい基準を規定している：「反応は、モジュール式であって、範囲が広く、非常に高い収率を得、クロマトグラフィー以外の方法で除去し得る無害の副生成物のみを生成し、かつ立体特異的である必要がある（しかし、エナンチオマー選択的である必要はない）」。要求されるプロセス特性としては、単純な反応条件（理想的には、プロセスは、酸素および水に対して非感受性である必要がある）、容易に入手可能な出発物質および試薬、溶媒の不使用または無害である（例えば、水）か、容易に除去される溶媒の使用、および単純な生成物の単離が挙げられる。要求される場合には、精製は、クロマトグラフィー以外の方法、例えば、結晶化または蒸留による必要があり、生成物は、生理学的条件下で

40

50

安定である必要がある。

【0210】

クリック化学の好適な例としては、限定するものではないが、以下：

(a) 1, 3 双極子環状付加反応の銅不含変法、この場合、アジドが、緊張状態 (under strain)、例えば、シクロオクタン環のアルキンと反応する；

(b) 1つのリンカーにおける酸素求核基の他のリンカーにおけるエポキシドまたはアジリジン反応性成分の反応；および

(c) シュタウディングー連結反応、この場合、アルキン成分はアリールホスフィンと置換することができ、これにより、アジドと特定の反応をし、アミド結合を生じる。

【0211】

好ましくは、クリック化学反応は、Cu (I) によって触媒されるアルキンとアジドとの間の 1, 3 双極子環状付加反応である。好ましい実施形態において、第 1 の基はアジド基であり、第 2 の基はアルキン基である。核酸塩基は、アジドおよびアルキン基を好ましい位置に取り込ませることによって、これまでに合成されている (例えば、Kocalka P, El-Sagheer AH, Brown T, Rapid and efficient DNA strand cross-linking by click chemistry, ChemBiochem. 2008. 9 (8) : 1280-5)。アルキン基は Berry Associates (Michigan, USA) から市販で入手することができ、アジド基は ATDBio によって合成されている。

【0212】

リンカーの核酸領域内のヌクレオチドが、共有結合を形成し得る基を含むように修飾された場合、修飾されたヌクレオチドは、好ましくは、連結を達成するために、1つのヌクレオチドで互いに埋め合わされる。このことは、Tom Brown の発表された仕事へとつながる (Kocalka et al. (2008) ChemBiochem 9 8 1280-1285)。

【0213】

好ましい実施形態において、単一のアジド基 (配列番号 66) またはそれ以上、例えば、2つのアジド基 (配列番号 67) を、15 塩基デオキシリボ核酸配列内の特定の場所のウラシル塩基に取り込ませることができる。次に、成分のシステイン残基を、5' 末端のチオール基 (配列番号 66 および 67) を用いるこれらのアジドハイブリダイゼーションリンカーで修飾することができる。アルキン基もまた、配列番号 66 および 67 に対して相補的な配列 (それぞれ、配列番号 68 および 69) の好ましい位置のウラシル塩基に取り込ませることができる。これらの配列は、成分の 1 つにおけるシステインと結合させることができる。DNA ハイブリダイゼーション、それに続くアジドとアルキン基との間の「クリック化学」を用いることにより、ハイブリダイゼーションリンカーを共有結合的に架橋させることができる。成分間の距離をハイブリダイゼーションリンカーの長さを変化させることによって調節した場合、アジドおよびアルキンが修飾された塩基の場所を、それに応じて変化させる必要がある。

【0214】

好ましい実施形態において、2つのウラシル塩基がアジド基で修飾されている 6 量体 (配列番号 70)、8 量体 (配列番号 71) または 10 量体 (配列番号 72) DNA は、成分のシステインと結合することができる。2つのウラシル塩基がアルキン基で修飾されている 6 量体 (配列番号 73)、8 量体 (配列番号 74) または 10 量体 (配列番号 75) DNA の相補配列は、DNA 結合タンパク質などの成分のシステインと結合することができる。これらのハイブリダイゼーションリンカーを用いることにより、本発明のその他の好ましいハイブリダイゼーションリンカー、例えば、配列番号 67 および 69 を用いるよりも、成分を互いにより接近させ得る。アジドおよびアルキン基の DNA のウラシル塩基単位への取り込みは、ATDBio によって開発された。

【0215】

本発明において使用するためのその他の好ましい基は、以下の表 3 に示される。

【0216】

【表3】

表3ー共有結合を形成することが可能ないくつかの好ましい基

名称	反応対象	構造
1,4-ビス[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン	チオール	
1,11-ビス-マレイミドトリエチレングリコール	チオール	
3,3'-ジチオジプロピオン酸 ジ(N-ヒドロキシスクシンイミド エステル)	一級アミン	
エチレングリコール-ビス(コハク酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル)	一級アミン	
4,4'-ジイソチオシアナトステイルベン-2,2'-ジスルホン酸二ナトリウム塩	一級アミン	
ビス[2-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド	光活性性, 非特異性	
3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル	チオール, 一級アミン	
4-マレイミド酪酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル	チオール, 一級アミン	
ヨード酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル	チオール, 一級アミン	
S-アセチルチオグリコール酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル	チオール, 一級アミン	
アジド-PEG-マレイミド	チオール, アルキン	
アルキン-PEG-マレイミド	チオール, アジド	

10

20

30

40

50

【0217】

条件

成分は、初めに、第1および第2のハイブリダイズ可能な領域が成分とハイブリダイズし、連結させることが可能な条件下で、接触させる。ハイブリダイゼーションが可能となる条件は、当技術分野において周知である（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press; および、Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Ausubel et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)）。ハイブリダイゼーションは、例えば、30～35%ホルムアミド、1M NaClおよび1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝溶液の存在下、37℃にて行い、次に、1X（0.1650M Na⁺）～2X（0.33M Na⁺）SSC（標準クエン酸ナトリウム）、50℃にて洗浄することによる、低ストリンジェンシー条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、40～45%ホルムアミド、1M NaClおよび1% SDSの緩衝溶液の存在下、37℃にて行い、次に、0.5X（0.0825M Na⁺）～1X（0.1650M Na⁺）SSC、55℃にて洗浄することによる、中度ストリンジェンシー条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、50%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDSの緩衝溶液の存在下、37℃にて行い、次に、0.1X（0.0165M Na⁺）SSC、60℃にて洗浄することによる、高ストリンジェンシー条件下で行うことができる。好ましい条件は、実施例1に記載されるものである。

【0218】

連結した成分を、次に、第1および第2の基の間の共有結合の形成が可能となる条件に曝露する。これらの条件は、当然、用いられる基に依存する。反応は、好ましくは、pH 7.0未満で行われる。好ましい条件は、実施例1に記載されるものである。

【0219】

1つ以上の成分が酵素、例えば、核酸結合タンパク質である場合、酵素の活性は、好ましくは、結合および連結反応時に阻害される。マグネシウム依存性酵素、例えば、エキソヌクレアーゼIは、EDTAにより、またはCaCl₂により阻害され得る（Lehman (1960) J. Biol. Chem. 235 5 1479-1487および内部データ）。

【0220】

好ましい成分の組み合わせ

好ましい実施形態において、第1の成分はタンパク質であり、第2の成分はレポーター基である。好適なレポーター基としては、限定するものではないが、光学的または蛍光標識、立体タグ、質量の増加、電荷の変化、スピン標識、放射標識、磁気基、およびこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0221】

別の好ましい実施形態において、第1の成分はタンパク質であり、第2の成分はアフィニティータグである。アフィニティータグの例は、当技術分野において周知である。好適なアフィニティータグとしては、限定するものではないが、His-NTA、FLAG-抗体-M2、myc、STREP-ストレプトアビジン、NANO-ストレプトアビジンおよびビオチン-アビジンが挙げられる。

【0222】

別の好ましい実施形態において、第1の成分はタンパク質であり、第2の成分は支持体である。支持体の例は、当技術分野において周知である。好適な支持体としては、限定するものではないが、金属表面、ポリマービーズ、磁気ビーズ、ガラス、修飾ガラスおよびシリカゲルが挙げられる。

【0223】

好ましい実施形態において、第1の成分は、少なくとも1つの天然の接近可能なシステイン残基を有する大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）またはその変異体を含み、第2の成分は、 α -HL（配列番号2）またはその変異体を含む。より好ましい実施形態において、第1の成分は、その天然の接近可能な全てのシステイン残基が除去されている大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）または全てのその変異体を含み、第2の成分は、 α -HL（配列番号2）またはその変異体を含む。より好ましい実施形態において、第1の成分は、144位および／または330位に唯一の天然のシステイン残基を有する大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）またはその変異体を含み、第2の成分は、 α -HL（配列番号2）またはその変異体を含む。より好ましい実施形態において、第1の成分は、全てのその天然の接近可能なシステイン残基は除去されていて、A83Cを有する大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）またはその変異体を含み、第2の成分は、E287Cを有する α -HL（配列番号2）またはその変異体を含む。

10

【0224】

好ましい実施形態において、第1の成分は、少なくとも1つの天然の接近可能なシステイン残基が除去されている大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）またはその変異体を含み、第2の成分は、L135CおよびN139Q（例えば、配列番号4）を有する α -HLまたはその変異体を含む。より好ましい実施形態において、第1の成分は、全てのその天然の接近可能なシステイン残基が除去されている大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）またはその変異体を含み、第2の成分は、L135CおよびN139Q（例えば、配列番号4）を有する α -HLまたはその変異体を含む。より好ましい実施形態において、第1の成分は、144位および／または330位に唯一の天然の接近可能なシステイン残基を有する大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）またはその変異体を含み、第2の成分は、L135CおよびN139Q（例えば、配列番号4）を有する α -HLまたはその変異体を含む。より好ましい実施形態において、第1の成分は、全てのその天然の接近可能なシステイン残基は除去されていて、A83Cを有する大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI（配列番号6）またはその変異体を含み、第2の成分は、L135C、N139QおよびE287Cを有する α -HLまたはその変異体を含む。

20

【0225】

生成物

本発明はまた、本発明の方法を用いて結合させた第1および第2の成分と、上記で規定される第1および第2のリンカーを用いて第2の成分と結合させた第1の成分を提供する。本発明はさらに、上記で規定される第1および第2のリンカーの対を提供する。リンカーは、好ましくは、共有結合を形成することが可能な基を含む。本発明の方法に関連して上記された実施形態のいずれも、本発明の生成物に対して同様に適用することができる。以下の実施例で本発明を説明する：

30

【実施例】

【0226】

1. 実施例1

1.1 材料および方法

この明示において、アジド官能基およびアルキン官能基が、銅（I）触媒存在下で互いに反応し、銅により触媒されるアルキンアジド付加環化反応（CuAAC）においてトリアゾール環を形成する。

40

【0227】

硫酸銅（II）、アスコルビン酸ナトリウム、MOPS遊離酸、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウムおよびEDTAは、例えば、Sigma and Fisher社等の標準的な研究室の供給業者から最高級のものを入手した。銅（I）結合リガンド（図11に示す）。

【0228】

チオール末端基または、内部アジドまたはアルキン基を伴うオリゴヌクレオチド、は、

50

AtdBio (Southampton, UK) から得られ；非修飾オリゴヌクレオチドはAtdBioまたはIDTDNA (Leuven, Belgium) から得た。オリゴヌクレオチドの配列は配列番号64～78で示される。全ての相補的なオリゴヌクレオチドの場合、修飾塩基は、1塩基ずつ順に相互に補完されて連結を達成する。

【0229】

1. 2 ハイブリダイゼーション

オリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションするとき、このハイブリダイゼーションは、緩衝液中でオリゴヌクレオチドを、4℃で少なくとも1時間インキュベーションすることにより行った。15塩基長のオリゴヌクレオチドに対しては、この緩衝液は、100 mMのMOPS, pH 6.8または100 mMのリン酸ナトリウム, pH 7.0であり得た。これより短いオリゴヌクレオチドに対しては、1000 mMのNaClを含有させた。酵素阻害剤 (10 mMのEDTAまたは20 mMのCaCl₂) を加える場合、これは100 mMのリン酸, pH 6.8 (EDTAに対して) または100 mMのMOPS, pH 6.8 (EDTAまたはCaCl₂のいずれか) 中に含有させた。

10

【0230】

1. 3 連結反応

4℃にて一晚 (15 bp以上の二本鎖について)、または1時間の (6～10 bpの二本鎖について) のハイブリダイゼーション後に、連結反応を実施した。連結反応は、第1の予め混合した銅 (II) イオン、アスコルビン酸還元剤、および銅 (I) 結合リガンドにより達成した。3つの成分を適当な濃度で混合し、最終的な状態を達成した。例えば、最終的に必要とされる状態が、100 μlの反応容量中に1 mMの銅、2 mMのアスコルビン酸、1 mMのリガンドである場合、相当する容量の100 mMの硫酸銅 (水溶液)、200 mMのアスコルビン酸ナトリウム (pH < 7.0である緩衝溶液)、および100 mMのリガンド (水溶液) を特定の順序で混合し、次いで、3 μlの得られた混合物を100 μlの反応へと添加した。この添加後に、反応液を4℃、暗所にて少なくとも60分間放置した。

20

【0231】

【表 4】

連結したオリ ゴ	二本鎖の長さ	連結条件/ [Cu ^I], [アス コルビン酸], [リガンド], 緩衝液	連結は？	確認
76+77	15bp	5μM, 10μM, 7μM, 1	なし	Gel
76+77	15bp	0.5mM, 1mM, 0.5mM, 1	あり	Gel
66+68 (1 連 結)	15bp	1mM, 2mM, 1mM, 2	あり	Gel, T _m
67+69 (2 連結)	15bp	1mM, 2mM, 1mM, 2	あり	Gel, T _m
70+73	6bp	1mM, 2mM, 1mM, 3	なし	
71+74	8bp	1mM, 2mM, 1mM, 3	あり	Gel, T _m
72+75	10bp	1mM, 2mM, 1mM, 3	あり	Gel, T _m

緩衝液 1=100mM リン酸, 500mM NaCl pH7.0

緩衝液 2=100mM リン酸 pH6.8

緩衝液 3=100mM MOPS, 1000mM NaCl, 20mM CaCl₂ pH6.8

【 0 2 3 2 】

1. 4 結合反応

オリゴヌクレオチドをタンパク質へと結合するために、オリゴヌクレオチドをまず活性化させる必要がある。この手順は、供給されるオリゴヌクレオチドの化学的特性を、タンパク質に対して不活性なものから、タンパク質に対して活性なものへと変化させる。この工程は、連結反応に何ら差異を生じない。

【 0 2 3 3 】

必要であれば、オリゴヌクレオチドは、ジスルフィド結合を通じてタンパク質へと結合した。これは、活性化させた 5 倍過剰量のオリゴヌクレオチドを、還元した後のタンパク質と 1 時間、37℃（エキソヌクレアーゼに対して）、または室温で一晩（ナノ細孔に対して）インキュベーションすることにより達成した。全ての場合において、アジド塩基を含有するオリゴヌクレオチドは、ナノ細孔に結合（モノマーにおける E287C を介して）し、アルキン塩基を含有するオリゴヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼに結合（A83C を介して）した。ストレプトアビジン親和性ビーズ上で精製を行うことにより、未反応の DNA を除去した。

【 0 2 3 4 】

1. 5 タンパク質の結合

精製された修飾タンパク質は、オリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーションを促進するために、設計された条件下で共にインキュベートした。15塩基以上のオリゴヌクレオチドに対しては、この緩衝液は 100mM の MOPS pH6.8 または 100mM のナトリウムリン酸 pH7.0 であり得た。酵素阻害剤が必要とされる場合、100mM

のMOPS pH 6.8に20mMのCaCl₂を添加した。6～10塩基のオリゴに対しては、緩衝液は100mMのMOPS、1000mMのNaCl、20mMのCaCl₂ pH 6.8であった。

【0235】

連結反応は、上述の通りに行い、これらの条件は酵素活性と両立するものであることが示されている。

【0236】

【表5】

タンパク質1	タンパク質2	二本鎖の長さ	連結条件 / [Cu ^I], [アスコルビン酸], [リガンド], 緩衝液	QNT 口語名
Exo-SEQ 78	pore-SEQ 67	15bp	1mM, 2mM, 1mM, 4	PK V3
Exo-SEQ 73	pore-SEQ 70	6bp	1mM, 2mM, 1mM, 3	TL

緩衝液 4=100mM MOPS, 20mM CaCl₂ pH6.8

【0237】

2. 実施例 2

2. 1 材料および方法

2. 1. 1 概説

確率的センシングを用いて核酸の配列決定を行う1つの方法は、α-HL細孔へと結合させたエキソヌクレアーゼの使用である。これは、2つのタンパク質間に化学的な連結を導入することによりなされ得る。化学的連結は、エキソヌクレアーゼ上の1つのシステインを、ヘモリジン上の1つのシステインへと、直接的に（ジスルフィド結合）、または2つのシステイン残基間にリンカー分子を介して、結合させる。

【0238】

制御され、方向付けられたアプローチで化学的連結を導入するためには、エキソヌクレアーゼI内部に見出される5つの天然システイン残基を、別の残基へと置換することが必要であった。そこで、システイン残基の結合点を導入するために、付加的な変異が作製されることとなった。好適な結合位置を同定するために、コンピューターモデリングを使用した（下記参照）。

【0239】

2. 1. 2 Exo I CYSノックアウト変異モデリング

分子モデリングは、大腸菌Exo Iの5つの野生型システイン残基における、タンパク質の安定性と両立する変異を予測するための試みにおいて用いられている。この目的を達成するため、錬金術的な自由エネルギーの摂動シミュレーションが行われ、これらの変異に関し行われた場合におけるそれらの相対的安定性に関する予測を可能にする。これらの予測が実験作業の手引きとして用いられた。

【0240】

NAMDと組み合わせたVMDが、野生型における錬金術的な自由エネルギーの摂動計算を実施するためのCHARMM27 force fieldと組み合わせて用いられた。

【0241】

大腸菌Exo Iタンパク質構造 (PDB accession code: 1fx

x [14])においてCYSをXXXに置換する変異が決定された。得られたラムダvs. デルタG曲線が、変異における自由エネルギー変化および、その計算が収束しているかどうかを決定するために用いられた。

【0242】

2. 1. 3 発現および精製

*Escherichia coli*由来のエキソヌクレアーゼI遺伝子であるscsB (配列番号: 5および6)のコドン最適化したものをGenScript Corporationより入手した。適合された様式でPCR産物のインビボ相同組換え (Jones, D. H. PCR mutagenesis and recombination in vivo. (1994) Genome Research, 3. pp141-148)を行うことにより、システイン残基の部位特異的突然変異誘発を行った。対象遺伝子を含むプラスミドをBL21 (DE3) pLysS (stratagene)へと形質転換した。2リットルの冷却つき震盪フラスコ中に、100μg/mlのアmpiシリンおよび20μg/mlのクロラムフェニコールを添加した500mlのTerrific Brothを含む培養液に、寒天プレートから得たコロニーを接種して、0.2mMのIPTGにより低温(18℃)下で誘導を行う前にOD600=2となるまで(約6時間)生育させた。4Kにおける遠心分離によって細胞を収穫し、次いで、bugbuster (Novagen)およびベンゾナーゼ (Merck)を用いて溶菌した。細胞残渣を10Kにおける遠心分離によって除去し、上清をHisTrap column (GE Healthcare)へと載せた。溶出したタンパク質をさらにゲル濾過により精製した。

【0243】

2. 1. 4 酵素アッセイ

エキソヌクレアーゼI (Exo I) アッセイは、dTを15番目の位置でフルオレセイン色素 (「Fluor」) にて、および、1番目の位置でフルオレセインの消光剤 (「BHQ1」) にて標識したオリゴデオキシヌクレオチド (DNAテンプレート) を利用する。テンプレートは、最初には、フルオレセインと消光剤が近傍に存在することにより消光状態で存在する。Exo Iを導入することにより、DNAテンプレートは、3'末端から前進的に消化され、最終的にdT-Fluorを溶液中に遊離して、色素が消光剤から拡散することにより、結果として蛍光が増加することを導く (図6)。

【0244】

アッセイを実施するために、DNAテンプレートをキュベット中に移し、Cary Eclipse fluorimeter中に設置して、所望の温度で平衡化させる。一方、ウォーターバスを用いてExo Iを別個に平衡化し、次いで、テンプレートを含むキュベットに添加する。その結果増加する蛍光シグナルを、抽出される初速度の増加によって経時的にモニターする (実験データについては図7参照)。蛍光に基づく速度を分子としての速度に変換するために、テンプレートが完全に消化された後のエンドポイント蛍光を、DNAテンプレートの初発量で補正する

【0245】

2. 2 結果

2. 2. 1 Exo I CYSノックアウト変異モデリング

変異モデリングの結果を下表にまとめる。

【0246】

10

20

30

40

【表 6】

変異	デルタ G(真空中)	デルタ G(水中)	収束(真空中)	収束(水中)
C51A	+3.4	+3.2	あり	あり
C51R	-239.2	-251.2	なし	なし
C51N	-69.5	-66.8	なし	なし
C51D	-67.7	-82.6	なし	なし
C51C	+0.9	+0.9	あり	あり
C51Q	-49.5	-50.7	なし	なし
C51E	-55.2	-68.9	なし	なし
C51G	-0.8	-0.5	あり	あり
C51H	-24.9	-18.5	あり	あり
C51I	+8.6	+11.0	あり	あり
C51L	-1.8	-11.7	あり	あり
C51K	-37.9	-12.1	あり	あり
C51M	-1.8	-0.4	あり	あり
C51F	+15.6	+9.4	あり	あり
C51S	+4.6	+11.9	あり	なし
C51T	-11.3	-10.7	あり	あり
C51W	+15.6	+11.6	あり	あり
C51Y	-9.3	-12.3	あり	あり
C51V	+3.4	+4.2	あり	あり

10

20

変異	デルタ G(真空中)	デルタ G(水中)	収束(真空中)	収束(水中)
C98A	+0.4	+4.2	あり	あり
C98R	-203.4	-231.0	なし	なし
C98N	-79.3	-76.1	なし	なし
C98D	-111.5	-113.7	なし	なし
C98C	+0.0	-0.3	あり	あり
C98Q	-48.2	-54.3	なし	なし
C98E	-55.7	-99.4	なし	なし
C98G	+1.3	-2.0	あり	あり
C98H	-14.9	-16.8	あり	あり
C98I	+6.5	+10.0	あり	あり
C98L	-2.7	-11.3	あり	あり
C98K	+11.7	-25.5	あり	あり
C98M	+0.7	+2.0	あり	あり
C98F	+10.1	+23.9	あり	あり
C98S	+3.0	+9.3	あり	なし
C98T	-13.3	-11.8	あり	あり
C98W	+17.7	+23.6	あり	あり
C98Y	+9.9	+2.2	あり	あり
C98V	+2.0	-0.3	あり	あり

30

40

【表 7】

変異	デルタ G(真空中)	デルタ G(水中)	収束(真空中)	収束(水中)
C144A	+1.2	-0.9	あり	あり
C144R	-218.0	-243.8	なし	なし
C144N	-64.9	-73.5	なし	なし
C144D	-70.6	-111.9	なし	なし
C144C	+0.4	+0.0	あり	あり
C144Q	-45.9	-52.4	なし	なし
C144E	-60.2	-71.4	なし	なし
C144G	-3.2	-1.5	あり	あり
C144H	-14.0	-16.0	あり	あり
C144I	+9.9	+7.3	あり	あり
C144L	-12.9	-11.4	あり	あり
C144K	-11.9	-25.6	あり	あり
C144M	-2.6	-2.5	あり	あり
C144F	+16.0	+8.5	あり	あり
C144S	+7.1	+7.6	あり	あり
C144T	-12.9	-9.2	あり	あり
C144W	+14.2	+9.2	あり	あり
C144Y	+5.8	-7.4	あり	あり
C144V	+0.4	+0.5	あり	あり

10

20

変異	デルタ G(真空中)	デルタ G(水中)	収束(真空中)	収束(水中)
C306A	+3.4	+1.1	あり	あり
C306R	-207.6	-245.2	なし	なし
C306N	-67.8	-77.1	なし	なし
C306D	-125.2	-106.6	なし	なし
C306C	+2.5	+0.0	あり	あり
C306Q	-49.8	-51.7	なし	なし
C306E	-66.6	-108.9	なし	なし
C306G	-5.1	-3.3	あり	あり
C306H	-12.6	-18.0	あり	なし
C306I	+11.0	+7.4	あり	あり
C306L	-7.3	-13.5	あり	あり
C306K	-25.1	-21.4	あり	あり
C306M	+0.5	-4.4	あり	あり
C306F	+10.7	+2.5	あり	あり
C306S	+2.7	+5.8	あり	あり
C306T	-15.5	-12.9	なし	あり
C306W	+15.5	+13.6	あり	あり
C306Y	-6.8	-15.7	あり	あり
C306V	+1.9	+4.0	あり	あり

30

40

【表 8】

変異	デルタ G(真空中)	デルタ G(水中)	収束(真空中)	収束(水中)	
C330A	+2.5	+1.6	あり	あり	
C330R	-219.2	-241.1	なし	なし	
C330N	-77.1	-65.8	なし	なし	
C330D	-62.2	-101.9	なし	なし	
C330C	+2.1	-0.1	あり	あり	
C330Q	-47.0	-49.8	なし	なし	10
C330E	-36.9	-66.2	なし	なし	
C330G	-1.1	-0.2	あり	あり	
C330H	-13.1	-19.0	あり	あり	
C330I	+7.0	+2.6	あり	あり	
C330L	-10.5	-10.9	あり	あり	
C330K	-31.8	-26.4	あり	なし	
C330M	-2.9	-4.6	あり	あり	
C330F	+8.3	+12.2	あり	あり	
C330S	+5.1	+4.7	あり	あり	20
C330T	-12.5	-14.8	あり	あり	
C330W	+5.8	+14.6	あり	あり	
C330Y	-1.8	-2.2	あり	あり	
C330V	+5.3	+1.3	あり	あり	

【0249】

これらの部位のそれぞれにおける明白な変異（C y s から S e r）が、エネルギー的に優位である（肯定的に予測されるデルタ G）とは推測されないことが、上述の表から明確である。タンパク質を安定化することが予測される変異は、それらの異なる位置環境の結果として、非常に多様である。 30

【0250】

我々は活性および発現データの両方を保持してはいるが、このことが直接的にはこれらの表におけるデルタ G と関連していないことは留意されるべきである。デルタ G 値は、変異がタンパク質のフォールディング経路を顕著に変化させないと仮定される場合には、（D S C から得られるもの等の）熱力学的データと関連し得るものである（文字通りの錬金術的な F E P における多くの適用において当てはまることが見出されている）。発現とデルタ G 変異または活性との間に直接的な関連は存在しない。

【0251】

DNA ポリメラーゼ I の K l e n o w 断片および E c o E x o I [14] の結晶構造の比較は、タンパク質触媒および金属結合に関与する残基が A s p 15、G l u 17、A s p 108、A s p 186 および H i s 181 であることを示唆する。 40

【0252】

A s p [1, 2]、G l u [1, 2]、L y s [3, 4, 5]、A r g [6, 7, 8]、H i s [9, 10]、T y r [11, 12]、T r p [11, 12] および M e t [13] を含む、C y s 以外の残基タイプも、化学的に修飾され得る。したがって、E x o I の方向付けされた化学的修飾を可能にするためにこれらの残基を変異させることは、我々が競合する化学反応を取り除くことを可能にする。

【0253】

実験作業（下記参照）は、これらの変異の多くが、それらの活性を保持するタンパク質 50

中にもたらされ、いくつかのケースにおいては、単変異または突然変異の組み合わせのいずれかとして、活性を向上させるように見えることを示す。大腸菌 Exo I 配列と、他の関連する Exo I タンパク質配列との比較、および、これらの配列のホモロジーモデルの構築により、これらの Cys 残基の多くが、配列および構造の両方において保存されていることを示唆する。このことは、大腸菌 Exo I の Cys 変異体の特性が、関連する Exo I 酵素の同様の変異体に対し、あてはまり得ることを示唆する。

【0254】

Swissprot データベースにおける、Exo I 酵素の配列アラインメントは、C51、C98、C144 および C306 が保存されていることを示す。

【0255】

2. 2. 2 5つのシステイン残基の同定

エキソヌクレアーゼ I (配列番号 6) は、5つの天然のシステイン残基を含む (図 1)。システイン残基のうちのいくつかは、大腸菌のエキソヌクレアーゼ I (EcoExo I) のその他のホモログ内で保存されている (以下参照)。エキソヌクレアーゼ I 内のシステイン残基のいずれも、内部ジスルフィド結合は形成しない。

【0256】

2. 2. 3 セリンへの変異による全ての5つのシステインの除去

セリン (Ser) アミノ酸は、システイン (Cys) と構造において最も類似しており、S 原子が O により置換されている。したがって、最も自明な変異は Cys (C) から Ser (S) である。この変異体における活性を試験するために、全ての5つのシステイン残基をセリンに変異させ、タンパク質発現を試みた。

【0257】

ONLD0217 (Exo I C51S/C98S/C144S/C306S/C330S) の発現により、低収量、乏しい発現、および不安定なタンパク質がもたらされた。タンパク質は精製することができなかった。このことは、全ての Cys が Ser へと置換された場合には、タンパク質が安定ではないことを立証する。システインを含まない EcoExo I を設計するためには、タンパク質構造のさらなる研究が必要とされた。このことは、部分的には、コンピューターモデリングにより手引きされた。

【0258】

2. 2. 4 セリンへの変異による、個々のシステインの置換

置換を容認し得るシステインの位置を同定するために、個々のシステイン残基をセリン残基で順に置き換えた。

【0259】

構築物 ONLD0233 (C51S)、ONLD0234 (C98S)、ONLD0235 (C144S)、ONLD0236 (C306S)、ONLD0237 (C330S) を発現させた。変異体 C98S は十分なレベルまで発現した。数回の試みの後に、十分なレベルの C306S もまた達成された。しかし、その他の全ての位置における発現レベルは、かなり低減した。

【0260】

したがって、エキソヌクレアーゼ活性を試験され得るように、十分な発現レベルを産生するための別の変異が考慮された。システインを、高度に接触可能な位置 (C98、C306、C330; 図 2) と、より埋没された残基 (C51、C144) へとグループ分けした。

【0261】

2. 2. 5 セリン代替物による C306 および C330 の置換

C306 および C330 の位置におけるシステイン残基の置換を、以下の変異体における実験によって調べた。

Exo I C306 → D、M、N、S、T

Exo I C330 → D、M、N、T、Y、H、L、M、Q

ONLD0335 (C306T) の発現レベルは最も高かった。この位置におけるその

10

20

30

40

50

他の変異はS、DおよびNであった。

ONLD0342 (C330T) の発現レベルは最も高かった。この位置におけるその他の変異はH、Qおよび、より低い程度ではD、N、LおよびYであった。

【0262】

2. 2. 6 C306SおよびC330TとC98Sの組み合わせ

互いに悪影響を及ぼす二重および三重変異において、以下の組み合わせを調査した。

【0263】

【表9】

ONLD 番号	EcoExo I 変異体	発現
ONLD0366	C98S/C306S/C330T (SST)	高
ONLD0368	C98S/C306T/C330T (STT)	高
ONLD0367	C98S/C306T/C330H (STH)	低
ONLD0364	C98S/C306D/C330T (SDT)	低
ONLD0365	C98S/C306S/C330H (SSH)	発現せず
ONLD0363	C98S/C306D/C330H (SDH)	発現せず

10

【0264】

ONLD0366の組み合わせは、最も高い発現を与え、次いでONLD0368であった。ONLD0365およびONLD0363の組み合わせのみが、発現しなかった。ONLD0367、ONLD0364からの収量は、より低かった。

20

【0265】

活性アッセイ（方法を参照）は、Exo I 変異体の相対活性が野生型よりも高いことを示した（3）。

【0266】

2. 2. 7 システイン結合点の導入

結合点は、エキソヌクレアーゼIの相当するシステインに対して直接的に、または、リンカーを介して、 α -HLからの共有結合を形成するように設計された。モデリングを介して予測された結合点（V42C、A83C、S90C、V94C、M184Cを図4に示す。

30

【0267】

上記のシステインを変異体 Exo I C98S、C306S、C330Tへと導入することにより、以下の構築物が与えられる：

【0268】

【表10】

ONLD 番号	EcoExo I 変異体	システインの位置
ONLD0379	C98S/C306S/C330T/M184C	184
ONLD0372	C98S/C306S/C330T/V42C	42
ONLD0373	C98S/C306S/C330T/S90C	90
ONLD0378	C98S/C306S/C330T/A83C	83
ONLD0374	C98S/C306S/C330T/V94C	84

40

【0269】

シゲルシフト試薬として作用するマレイミド-PEGと反応させることにより、ステインの活性を調べた。得られるゲルは、各タンパク質が反応性のシステインを有することを示した。このデータは、C144およびC51におけるシステインが、先に仮定された以

50

上に接近しやすく、マレイミド-PEGと反応することを示した。タンパク質が1つの位置のみで反応することを促すようにC144およびC51を置換するために、さらなる回の変異が実行された。

【0270】

2. 2. 8 セリン代替物によるC144の置換

合計18の変異体(A、E、G、I、L、N、R、T、W、D、F、H、K、M、Q、S、V、Y)から、分子モデリングを用いて、可能性のある変異を調べた。モデリングから予測される、残基144における6つの最も安定な変異体を得られた：

Exo I C98S、C306S、C330S、C144→A、G、L、T、H、M 10

【0271】

試験された6つの変異体のうち、(ONLD0403) Exo I C98S/C306S/C330T/C144Mおよび(ONLD0404) Exo I C98S/C306S/C330T/C144Tが良好に発現した。その他の変異体における発現レベルは低減されていた。

【0272】

2. 2. 9 セリン代替物による残基C51の置換

合計17の変異体(A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W、Y)から、分離モデリングを用いて、可能性のある変異体を調べた。モデリングから予測される、残基51における8つの最も安定な変異体を作製した： 20

Exo I C98S、C306S、C330S、C51→A、G、H、K、L、M、T、W

試験した8つの変異体の中で、(ONLD0393) Exo I C98S/C306S/C330T/C51Aのみが発現した。

【0273】

2. 2. 10 5つのシステイン置換の組み合わせと付加的な結合点

以下の組み合わせを調べた。これらは、5つのシステイン置換とシステイン結合点結合を含むものだった。結合は、N末端またはC末端に付加されたシステインに対して形成され得るものであった。 30

【0274】

【表 1 1】

ONLD 番号	EcoExo 1 変異体	発現
ONLD0416	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T/V42C	非常に良好
ONLD0418	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T/M184C	非常に良好
ONLD0415	C51A/C98S/C144M/C306S/C330T/V42C	良好
ONLD0417	C51A/C98S/C144M/C306S/C330T/M184C	良好
ONLD0413	C51A/C98S/C144M/C306S/C330T/n-term C	発現せず
ONLD0414	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T/n-term C	発現せず
ONLD0425	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T/V94C	不良/発現せず *
ONLD0422	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T/S90C	不良
ONLD0421	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T/A83C	良好

10

* ONLD0425 はあまり発現しなかった - 濃度を測定するには不十分であったが、活性を確認するだけのためには十分であった。

20

【0 2 7 5】

N-末端のシステイン残基を有する（2つの変異体ONLD0413、ONLD0414）は、発現しなかった。全てのその他の組み合わせは、発現し、活性を有するエキソヌクレアーゼであった。ONLD0415およびONLD0417の組み合わせは、ONLD0416およびONLD0418よりも発現が低かった。活性の結果を図5に示す。

【0 2 7 6】

以下の組み合わせについても評価した。

【0 2 7 7】

30

【表 1 2】

9 8 位および 3 0 6

ONLD 番号	EcoExo I 変異体	発現
ONLD0411	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T	高
ONLD0432	C51A/C98T/C144T/C306S/C330T	高
ONLD0433	C51A/C98T/C144T/C306T/C330T	高

10

9 8 位

ONLD 番号	EcoExo I 変異体	発現
ONLD0411	C51A/C98S/C144T/C306S/C330T	非常に良好
ONLD0432	C51A/C98T/C144T/C306S/C330T	非常に良好
ONLD0453	C51A/C98G/C144T/C306S/C330T	良好
ONLD0454	C51A/C98K/C144T/C306S/C330T	良好
ONLD0455	C51A/C98L/C144T/C306S/C330T	発現
ONLD0456	C51A/C98V/C144T/C306S/C330T	非常に良好

20

3 0 6 位

ONLD 番号	EcoExo I 変異体	発現
ONLD0433	C51A/C98T/C144T/C306T/C330T	良好
ONLD0477	C51A/C98T/C144T/C306M/C330T	良好
ONLD0478	C51A/C98T/C144T/C306N/C330T	良好
ONLD0479	C51A/C98T/C144T/C306D/C330T	不良
ONLD0480	C51A/C98T/C144T/C306A/C330T	不良

30

【0 2 7 8】

2. 2. 1 1 タンパク質の D S C 分析

示差走査熱量測定 (Differential scanning calorimetry (DSC)) は、サンプル内の熱遷移の測定を可能にする手法である。その主要な用途は、生分子の、遷移中点としての熱安定性の測定である。遷移中点は、熱安定性のマーカーとして用いられる。

【0 2 7 9】

5つのシステインが全て置換された初期の変異体 (Exo-ASTST) は、非常に不安定であり、時間とともに、活性が高損失することがわかった。T_mは、野生型の 49℃ に対し、35℃ であると決定された。

40

【0 2 8 0】

さらなる回の変異体スクリーニングに続いて、T_mが 40℃ で、長期に渡る安定性が非常に向上した酵素 Exo-ATTTT が同定された。別の組み合わせ、例えば Exo-ATMTT と Exo-AVTAT は、同様であるが向上はされていない 40℃ の T_m を有していた。

【0 2 8 1】

変異体 AVTMT は、ほんのすこし高い T_m を有することが見出されたが、同様の条件下で、より凝集しやすい傾向を有することがわかった。

50

【0282】

結合の目的で付加される、好ましい非天然システインの付加（A83C）は、安定性において悪影響を有するようには見受けられない。

【0283】

【表13】

サン プル	ONLD	Tm (融点) C									
ASTST	ONLD0411	35.5C	35.8C								
ATTTT	ONLD0433	40.5C	40.3C	39.8C	39.8C	39.8	39.6	39.6	39.3	39.7	39.9
WT	ONLD0267	49	48.9								
ATTST	ONLD0432	39.8C	39.9	40	40.1						
CSCST	ONLD0366	41.7	41.8								
AVTST	ONLD0456			39.7C	39.9C						
AGTST	ONLD0453			36C*	36C*						
AKTST	ONLD0454			nd	nd						
ATTMT	ONLD0477					40.8	40.7				
ATTNT	ONLD0478					39.6	39.5				
ATDIT	ONLD0479					37.5*	37.4*				
ATTAT	ONLD0480					38.6*	38.5*				
AVTTT	ONLD0476							40.3	40.2		
AVTMT	ONLD0492							42.13	42.3		
AVTNT	ONLD0493							40.15	40.18		
AVDIT	ONLD0494							38.4	38.3		
AVTAT	ONLD0495							40.1	40.1		
NTTTT	ONLD0497									x	x
NVTMT	ONLD0510									40.0	39.9
NVTNT	ONLD0511									37.7	37.8
NVTAD	ONLD0514									nd	nd
NVTTT	ONLD0496									37.7	37.7
ADTST	ONLD0491									x	x

DSC 結果	Tm	
サンプル	ONLD	Exp 1a Exp 1b
Exo-ATTTT-A83C-Strep-Strep	ONLD0540	40.68 40.94

【0284】

2. 2. 12 対象となるその他の変異：C144IおよびC330I

C144は、Exo-IのDNA結合部位および触媒部位の両方に隣接する。最適な組み合わせを見出すために、残基C144およびC330はその他のシステイン残基ほどは変異されていない。タンパク質配列の解析および既知のモデリング作業に基づいて、以下の2つのタンパク質（ATTTTおよびATITI）のモデルを構築した。

【0285】

ATTTTおよびATITIを比較するモデリング作業は、T330側鎖はタンパク質の2次構造をほとんど崩壊させないことを示唆する。しかし、T144は、このT144

側鎖が反転するときには破壊されるとみられる疎水性のコアを伴ってパッキングされ、コアに対し顕著な破壊をもたらす。A T I T I モデルシミュレーションはT 1 4 4 周辺における同程度の破壊を示さない。

【0286】

2. 2. 1 3 酵素活性

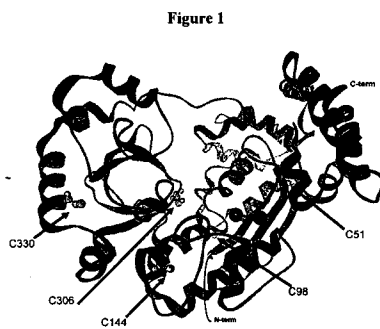
調べられた構築物は、E x o - A T T T T - A 8 3 Cであった。これらの試験で用いたリンカーは、5'末端がフリーであり3'末端に酵素が結合しているs s D N A リンカーである。結合したs s D N A リンカーを用いてE x o - A T T T T - A 8 3 Cの活性を測定し、次いで、D T T を添加することによりリンカーを除去して、活性を再度測定した。活性における変化は観察されず、リンカーの存在が活性に対して有害な影響を与えていないことが確認された(図8)。この実験において、E x o - A T T T T - A 8 3 Cの活性を、遊離の酵素およびP N A 修飾酵素と比較した。P N A リンカーの添加により、活性の損失は観察されなかった(図9)。E x o A T T T T - M 1 8 4 C (P E G を伴う)。対照はP E G 存在下でのE x o A T T T T であった。P E G リンカーの添加により、活性の損失は観察されなかった(図10)。

【0287】

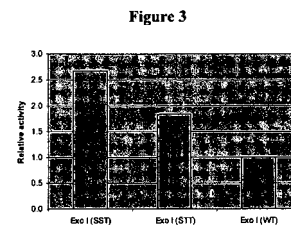
2. 3 結論

我々は、全てのシステインが除去されている一定範囲のE c o E x o I 変異体を創出した。さらに、E x o E c o I の結合親和性を制御するために、単独のシステインを導入した。いくぶん驚いたことに、変異体のいくつかにおける活性は、野生型よりも高かった。

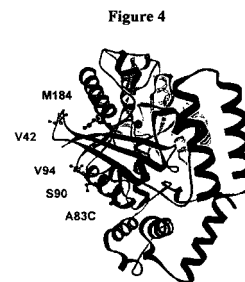
【図1】



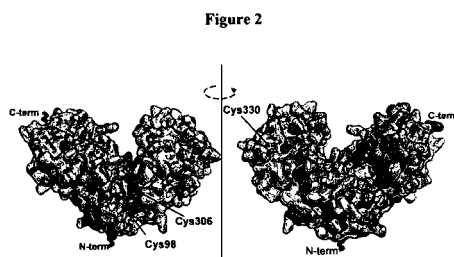
【図3】



【図4】

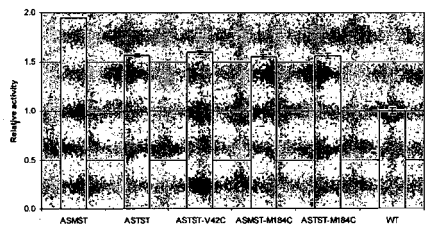


【図2】



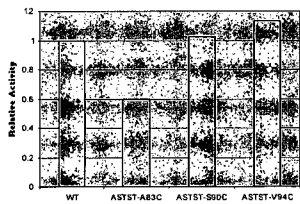
【 図 5 a 】

Figure 5a



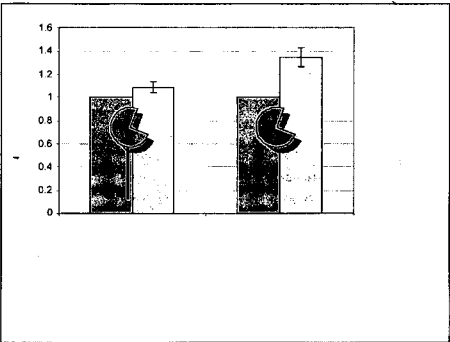
【 図 5 b 】

Figure 5b



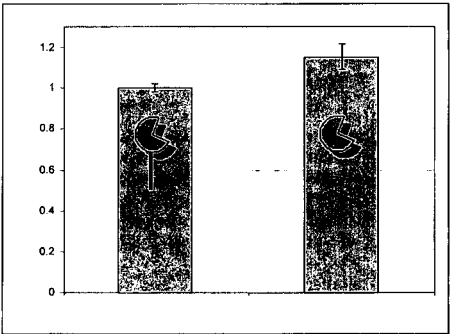
【 図 8 】

Figure 8



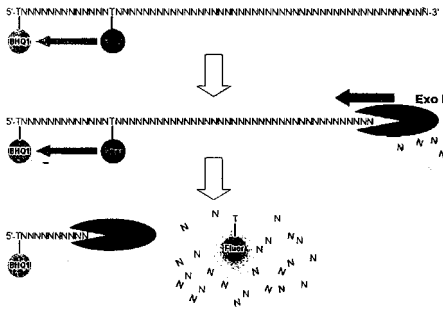
【 図 9 】

Figure 9



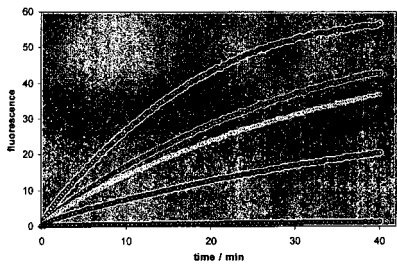
【 図 6 】

Figure 6



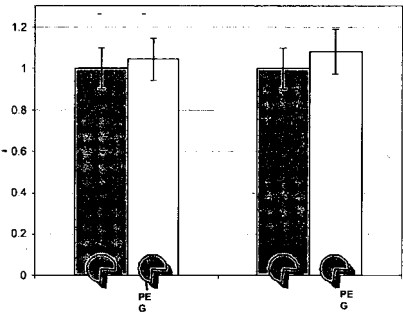
【 図 7 】

Figure 7



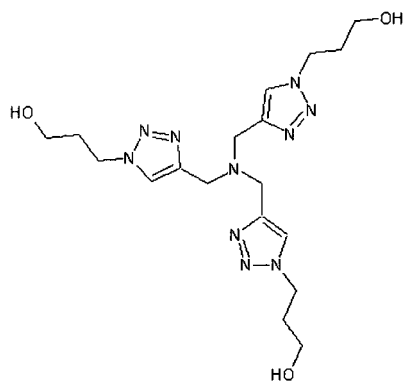
【 図 1 0 】

Figure 10



【図 11】

Figure 11



【配列表】

2012516145000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2010/000132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K19/00 C12N15/11 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRANTON DANIEL ET AL: "The potential and challenges of nanopore sequencing" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US LNKD-DOI:10.1038/NBT.1495, vol. 26, no. 10, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 1146-1153, XP002570701 ISSN: 1087-0156 [retrieved on 2008-10-09] figure 1b	1-32
A	WO 2008/124107 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; AKESON MARK A [US]; DEAMER DAVID W [US]; DUNBAR) 16 October 2008 (2008-10-16) page 23, lines 1-3 ----- -/-	1-32
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 May 2010		02/06/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Herrmann, Klaus

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2010/000132

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/053961 A1 (AKESON MARK [US] ET AL AKESON MARK [US] ET AL) 10 March 2005 (2005-03-10) paragraph [0076] -----	1-32
A	TUNG C-H ET AL: "PREPARATION AND APPLICATIONS OF PEPTIDE-OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATES" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US LNKD- DOI:10.1021/BC0000334, vol. 11, no. 5, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 605-618, XP001155364 ISSN: 1043-1802 the whole document -----	1-32
A	LOVRINOVIC ET AL: "Rapid synthesis of DNA-cysteine conjugates for expressed protein ligation" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US LNKD- DOI:10.1016/J.BBRC.2005.08.001, vol. 335, no. 3, 30 September 2005 (2005-09-30), pages 943-948, XP005100411 ISSN: 0006-291X abstract page 947, right-hand column -----	1-32
A	WANG Q ET AL: "Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, NEW YORK, US LNKD- DOI:10.1021/JA021381E, vol. 125, no. 11, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 3192-3193, XP002450640 ISSN: 0002-7863 the whole document -----	1-32
A	SEO T S ET AL: "Click chemistry to construct fluorescent oligonucleotides for DNA sequencing" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON.; US LNKD- DOI:10.1021/J0026615R, vol. 68, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 609-612, XP002977877 ISSN: 0022-3263 the whole document -----	1-32

International Application No. PCT/GB2010 /000132

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-32(partially)

Independent claim 1 covers methods of covalently coupling two or more moieties comprising the use of any "moieties" having covalently attached thereto any "linker" comprising a hybridizable region and a group capable of forming a covalent bond. However, the application provides support (Art. 6 PCT) and disclosure (Art. 5 PCT) for the use of only a limited number of such moieties and linkers. Thus, a meaningful search over the whole of the scope claimed is impossible. Besides an exonuclease having covalently attached thereto an oligonucleotide via an azide group forming a disulphide bond with a cysteine residue of the exonuclease and alpha-hemolysin having covalently attached thereto an oligonucleotide via an alkyne group forming a disulphide bond with a cysteine residue of the alpha-hemolysin, wherein the two oligonucleotides hybridize with each other and eventually the azide group and the alkyne group form a disulphide bond, no other moieties or linkers, respectively, have been shown to lead to the desired effect of covalently coupling two moieties (cf. p. 46 of present description). Since the independent claims do not contain the technical feature of claims 14, 17, 27 and 28 they do not meet the requirements of Art. 5/6 PCT. Consequently, the search has been limited to a method of covalently coupling two moieties comprising the use of moieties and linkers mentioned above, and subject-matter relating thereto (cf. Art. 17(2)(a)(ii) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2010/000132**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-32(partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2010/000132

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008124107 A1	16-10-2008	AU 2008236694 A1	16-10-2008
		CA 2684801 A1	16-10-2008
		CN 101680873 A	24-03-2010
		EP 2156179 A1	24-02-2010
		US 2010035260 A1	11-02-2010
US 2005053961 A1	10-03-2005	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ジャヤシンヒ、 ラクマル

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード、 オックスフォード サイエンス
パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー 4、 エドムンド カートライト ハウス、
オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 ミルトン、 ジョン

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード、 オックスフォード サイエンス
パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー 4、 エドムンド カートライト ハウス、
オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 マクニール、 ルーク

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード、 オックスフォード サイエンス
パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー 4、 エドムンド カートライト ハウス、
オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 クラーク、 ジェームズ

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード、 オックスフォード サイエンス
パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー 4、 エドムンド カートライト ハウス、
オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 ホワイト、 ジェームズ

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード、 オックスフォード サイエンス
パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー 4、 エドムンド カートライト ハウス、
オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 モイシー、 ルース

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード、 オックスフォード サイエンス
パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー 4、 エドムンド カートライト ハウス、
オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 CA11 HA19 HA20