

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第5883036号
(P5883036)

(45) 発行日 平成28年3月9日(2016.3.9)

(24) 登録日 平成28年2月12日(2016.2.12)

(51) Int.Cl. F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/10 (2006.01) C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 1/15 (2006.01) C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 1/21

請求項の数 7 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-553352 (P2013-553352)	(73) 特許権者	505140373
(86) (22) 出願日	平成24年2月7日(2012.2.7)		バイオニア コーポレイション
(65) 公表番号	特表2014-506462 (P2014-506462A)		大韓民国 306-220 テジョン テ
(43) 公表日	平成26年3月17日(2014.3.17)		ドク-グ ムンピョンソーロ 8-11
(86) 国際出願番号	PCT/KR2012/000894	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開番号	W02012/108672		特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成24年8月16日(2012.8.16)	(72) 発明者	パク ハンオ
審査請求日	平成25年9月11日(2013.9.11)		大韓民国 305-761 テジョン ユ
(31) 優先権主張番号	10-2011-0011639		ソン-グ ジョンミン-ドン エキスポ
(32) 優先日	平成23年2月9日(2011.2.9)		アパート 208-601
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(72) 発明者	ヤン ソンジュン
前置審査			大韓民国 306-760 テジョン テ
			ドク-グ モクサン-ドン タサラン ア
			パート 102-603
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 熱安定性が増加した逆転写酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】
配列番号4、配列番号5及び配列番号7に記載されるアミノ酸配列からなる群から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸配列を有する熱安定性が増加した逆転写酵素。

【請求項 2】
60 ないし70 の温度で配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有する野生型M-MLV逆転写酵素に比べて優れた逆転写活性を表す請求項1に記載の逆転写酵素。

【請求項 3】
請求項1に記載の熱安定性が増加した逆転写酵素をコーディングする遺伝子。

【請求項 4】
配列番号13、配列番号14及び配列番号16に記載される塩基配列からなる群から選ばれた少なくとも1つの塩基配列を有する請求項3に記載の遺伝子。

【請求項 5】
請求項3に記載の遺伝子を含む発現ベクター。

【請求項 6】
請求項5に記載の発現ベクターに形質転換された形質転換体。

【請求項 7】
請求項1に記載の熱安定性が増加した逆転写酵素を含む逆転写反应用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、逆転写酵素に関し、より詳しくは、従来の逆転写酵素を構成する特定のアミノ酸残基を突然変異させることにより熱安定性を増加させた逆転写酵素に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

RNA腫瘍ウイルス、特にモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney-Murine Leukemia Virus、M-MLV) やヒト免疫不全ウイルス (HIV)、トリ骨髓芽球症ウイルス (Avian Myeloblastosis Virus、AMV) 由来の逆転写酵素 (reverse transcriptase) に関し多くの研究が行われ、多様な機能、性質が知られてきている。RNAを鋳型に用いて、これに相補的なDNA (cDNA) を合成することができるという特徴的な性質により、逆転写酵素は多数の分子生物学的方法、例えばcDNAライブラリの構築、逆転写及び重合酵素連鎖反応 (polymerase chain reaction、PCR) などに用いられている。

10

【 0 0 0 3 】

3種のプロトタイプ (prototype) 形態のレトロウイルス逆転写酵素が広範囲に研究されている。モロニーマウス白血病ウイルスの逆転写酵素は、RNA依存性DNA重合酵素及びRNase H活性を有する78 kDaの単一サブユニット (subunit) を含む。前記酵素は、E. coliで完全な活性形にクローニング及び発現されている。HIVの逆転写酵素はp66及びp51のサブユニットのヘテロダイマー (hetero-dimer) であって、p51サブユニットはp66サブユニットのタンパク質分解性切断により生成される。p66サブユニットは、RNA依存性DNA重合酵素及びRNase Hドメイン (domain) 全てを有しているが、p51サブユニットはDNA重合酵素ドメインのみを有する。活性形HIVのp66/p51逆転写酵素は、E. coliを含む多数の発現宿主でクローニング及び発現されている。HIV p66/p51ヘテロダイマー内で、51 kDaのサブユニットは触媒的に不活性であり、66 kDaのサブユニットはDNA重合酵素及びRNase H活性全てを有する。さらに、ラウス肉腫ウイルス (Rous Sarcoma Virus、RSV) の逆転写酵素、トリ骨髓芽球症ウイルスの逆転写酵素、トリ赤芽球症ウイルス (Avian Erythroblastosis Virus、AEV) ヘルパーウイルスMCAVの逆転写酵素、トリ骨髓球しゅ症ウイルス (Avian Myelocytomatosis Virus) MC29ヘルパーウイルスMCAVの逆転写酵素、トリ細網内皮症ウイルス (Avian Reticuloendotheliosis Virus、REV-T) ヘルパーウイルスREV-Aの逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスUR2のヘルパーウイルスUR2AVの逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスY73のヘルパーウイルスYAVの逆転写酵素、ラウス関連ウイルス (Rous Associated Virus、RAV) の逆転写酵素及び骨髓芽球症関連ウイルス (Myeloblastosis Associated Virus、MAV) の逆転写酵素のようなトリ肉腫白血病ウイルス (Avian Sarcoma-Leukosis Virus、ASLV) の逆転写酵素も2種のサブユニットアルファ (大凡62 kDa) 及びベータ (大凡94 kDa) のヘテロダイマーであり、前記アルファはベータからタンパク質分解性切断により生成される。ASLV逆転写酵素は、アルファ - ベータ及びベータ - ベータの2種の触媒的に活性の構造形態に存在することができる。沈降分析により、前記アルファ - ベータ及びベータ - ベータ構造はダイマーであり、前記アルファはモノマー形態とダイマー形態との間で平衡状態に存在するとのことが知られている。ASLVのアルファ - ベータ及びベータ - ベータ逆転写酵素は、同一のタンパク質複合体内でDNA重合酵素活性、RNase H活性及びDNAエンドヌクレアーゼ (endonuclease) (integrase) 活性の3種の別の活性を有している従来の公知の唯一のレトロウイルス逆転写酵素である。前記アルファ形態は、インテグラーゼドメイン及び活性を有していない。

20

30

40

【 0 0 0 4 】

逆転写酵素媒介性逆転写によりmRNAからcDNAに変換されることは、多くの遺伝子発現研究において重要である。しかし、逆転写を触媒するため変形されていない逆転写酵素を用いることは、幾多の側面で好ましくない。先ず、逆転写酵素は、逆転写酵素に存在するRNase H活性により第一鎖 (strand) 反応が開始されるか完了する前にRNA鋳型を分解してしまう場合がある。さらに、mRNA鋳型分子のミスプライミング (mis-priming) によりcDNAの第一鎖に誤謬が発生し得る。実は、cDNA合成過程でHIV逆転写酵素の場合は、3,000ないし6,000ヌクレオチド当たり1個の塩基、AMV逆転写酵素の場合は10,000ヌクレオチド当たり1個

50

の塩基に誤謬が発生するものと表れた。

【0005】

逆転写酵素の効能に影響を及ぼす他の因子は、RNAが2次構造を形成することができるか否かである。このような2次構造は、例えば、RNA分子領域が交雑して、二重鎖RNAを形成する程度に十分相補性があるときに形成され得る。一般に、RNA 2次構造の形成は、RNA分子を含有する溶液の温度を上昇させることにより減少され得る。したがって、多い場合、37 以上の温度でRNAを逆転写することが好ましい。しかし、本技術分野に公知の逆転写酵素は、一般に37 より随分高い温度（例えば、50 ）で培養してからこそ活性を失ってしまう。

【0006】

熱安定性逆転写酵素を加工するための多様な方法が本技術分野に公知となっている。前記方法では、逆転写酵素活性を有する熱安定性DNA重合酵素を利用する方法、熱安定性DNA重合酵素に変異を誘発させてその逆転写酵素活性を増大させる方法、熱不安定性逆転写酵素に変異を誘発させる工程、Taq/Tth DNA重合酵素の存在下で Mg^{2+} の代りに Mn^{2+} を利用する方法、熱不安定性逆転写酵素とともにトレハロースのような添加物を利用する方法などを含む。

【0007】

さらに、本技術分野の熟練した当業者は、DNA又はRNA鋳型を重合するときの正確性（fidelity）を増加させるため、幾多の酵素組成物と方法を用いてきている。例えば、シェベレブなど（Shevelev et al., Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:364（2002））は、3'-5' エキソヌクレアーゼに対するレビュー論文を提供している。ペリーノなど（Perrino et al., PNAS USA, 86:3085（1989））は、子牛胸腺DNA重合酵素アルファの正確性を増加させるためE. coli DNA重合酵素IIIのユプシロンサブユニットを用いている。バクハナスビリ（Bakhanashvili, Eur. J. Biochem. 268:2047（2001））は、p53タンパク質の校正（proofreading）活性を開示しており、ホアンなど（Huang et al., Oncogene, 17:261（1998））は、DNA複製の正確性を増強させるためp53を用いることに対し開示している。さらに、米国特許公開 第2003/0198944A1号及び米国特許第6,518,019号は、2つ以上の逆転写酵素（例えば、それぞれの逆転写酵素は相違する転写停止部位を有する）、及び必要に応じて1つ以上のDNA重合酵素を含有する酵素混合物を開示している。米国特許公開 第2002/0119465A1号は、変異体熱安定性DNA重合酵素及び変異体逆転写酵素を含む組成物（例えば、変異体Taq DNA重合酵素及び変異体MMLV-RT）を開示している。米国特許 第6,485,917B1号、米国特許公開 第2003/0077762号及び欧州特許公開EP1132470は、逆転写酵素活性を有する酵素及び3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する α 型DNA重合酵素の存在下でcDNAを合成する方法を開示している。

【0008】

逆転写酵素のRNase H活性を除去すればRNA鋳型のRNA分解問題を排除することができ、さらに逆転写効率を改善することができる。しかし、このような逆転写酵素（「RNase H-」型）は、ミスプライミング及びmRNA 2次構造のような問題は改善することができないとの欠点がある。さらに、従来の逆転写酵素は大体低い熱安定性を有し、これに伴い逆転写反応が相対的に低い温度でのみ進められているので、場合によって65 以上の高い温度でも安定した2次構造を形成するRNA進行の構造的な妨害により、効率的に逆転写産物を得ることができないという限界を有している。このような限界は、全RNAからcDNAを製作する過程のみならず、RNAの検出及びプロファイリングなどのように逆転写反応が求められる多様な生化学的実験で主な制限要素として作用している。したがって、更に高温でも安定的に逆転写活性を有する新規の逆転写酵素の必要性が増加している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、前記のような従来の逆転写酵素が有している問題点を改善するため導き出されたものであって、M-MLV由来の逆転写酵素の特定のアミノ酸残基を突然変異させること

10

20

30

40

50

により、RNAの構造変異が発生し得る温度以上の高温でも優れた逆転写活性を有し、cDNAを静的に生成可能な熱安定性が増加した逆転写酵素を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明に記載された用語、技術などは別に言及しない限り、本発明の属する技術分野で一般に用いられる意味として用いられる。さらに、本明細書に開始された文献等は全て本発明を説明するための文献であって、本明細書内に含まれる。

【0011】

本発明において、『逆転写酵素活性』又は『逆転写』との用語は、酵素がRNA鎖を鋳型に利用してDNA鎖（即ち、相補的なDNA又はcDNA）を合成することができる能力をいう。本発明において、『逆転写酵素』とは、本明細書で開示されるか本技術分野で公知の任意の方法に基づいて測定するとき、逆転写酵素活性を表す任意の酵素をいう。

10

【0012】

本発明において、『逆転写活性』又は『逆転写酵素活性』との用語は、RNA鎖を鋳型に利用してDNA鎖（即ち、cDNA）を合成する酵素（例えば、逆転写酵素又はDNA重合酵素）の能力を表すため相互交換可能に用いられる。

【0013】

本発明において、『変異』又は『突然変異』との用語は、DNAによりコーディングされるアミノ酸配列を変化させるため、野生型DNA配列に導入される変化を表す。これには、置換え、挿入、欠失、点突然変異などがあるが、これに限定されるものではない。

20

【0014】

本発明において、『野生型（wild type）』との用語は、遺伝子又は遺伝子産物が天然に存在する供給源から断離される場合と同様の特徴を有する遺伝子又は遺伝子産物をいう。これと対照的に、『変形された（modified）』又は『変異体（mutant）』との用語は、野生型の遺伝子又は遺伝子産物と比べて変更される特徴を有している遺伝子又は遺伝子産物を表す。

【0015】

本発明において、『発現ベクター（expression vector）』との用語は、コーディング配列（coding sequence）とプロモーター（promoter）を必ず含む1つ以上の転写調節部位等が作動可能に連結された集合体（発現体、expression cassette）、又は前記集合体を含むベクターを意味する。

30

【0016】

本発明において、『コーディング配列』との用語は、特定のアミノ酸又は機能的なRNAを暗号化するDNA配列を意味する。

【0017】

本発明において、『プロモーター』との用語は、コーディング配列のRNAへの転写過程を誘導する部位であって、通常プロモーターは重合酵素と転写因子等とが結合する部位を表す。

【0018】

本発明において、逆転写酵素を構成するアミノ酸残基等は、表1に示した3つ又は1つのアルファベットの略語で表現される。

40

【0019】

【表 1】

アラニン	A	Ala
システイン	C	Cys
アスパラギン酸	D	Asp
グルタミン酸	E	Glu
フェニルアラニン	F	Phe
グリシン	G	Gly
ヒスチジン	H	His
イソロイシン	I	Ile
リシン	K	Lys
ロイシン	L	Leu
メチオニン	M	Met
アスパラギン	N	Asn
プロリン	P	Pro
グルタミン	Q	Gln
アルギニン	R	Arg
セリン	S	Ser
トレオニン	T	Thr
セレノシステイン	U	Sec
バリン	V	Val
トリプトファン	W	Trp
チロシン	Y	Tyr

10

20

30

【 0 0 2 0 】

以下、本発明を詳しく説明する。

【 0 0 2 1 】

本発明は、配列番号1に記載されるM-MLV由来の逆転写酵素のアミノ酸配列の63番目のグルタミン（Q63）、264番目のリシン（K264）、295番目のリシン（K295）、306番目のトレオニン（T306）、346番目のグルタミン酸（E346）、408番目のプロリン（P408）、438番目のヒスチジン（H438）及び454番目のアスパラギン（N454）からなる群から選ばれる1つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置き換えられて熱安定性が増加した逆転写酵素を提供する。

40

【 0 0 2 2 】

前記のようなアミノ酸の置換えは、63番目のグルタミンからロイシンへの置換え（Q63L）、264番目のリシンからロイシンへの置換え（K264L）、295番目のリシンからグルタミンへの置換え（K295Q）、306番目のトレオニンからロイシンへの置換え（T306L）、346番目のグルタミン酸からメチオニンへの置換え（E346M）、408番目のプロリンからグルタミン酸への置換え（P408E）、438番目のヒスチジンからチロシンへの置換え（H438Y）、及び454番目のアスパラギンからフェニルアラニンへの置換え（N454F）からなる群から選ばれる1つ以上のアミノ酸置換えを含むが、これに限定されるものではない（図1を参照）。

50

本発明の一具現例によれば、前記8ヶ所の位置のアミノ酸がそれぞれ置き換えられた配列番号2ないし配列番号9に記載されるアミノ酸配列を有する8種の突然変異逆転写酵素の熱安定性効果を確認したが、2ヶ所以上の位置で同時に突然変異が発生した逆転写酵素も、高温での熱安定性を有している限り、本発明の思想の範囲内で本発明の権利範囲内に含まれ得る。

【0023】

本発明の好ましい具現例によれば、本発明の突然変異逆転写酵素は野生型逆転写酵素に比べて熱安定性を有し、その中でもK295Q、T306L及びP408E突然変異逆転写酵素は優れた熱安定性を表す(図10を参照)。特に、最も優れた熱安定性を表すT306L突然変異逆転写酵素の場合、60、65及び70でも野生型M-MLV由来の逆転写酵素より優れた熱安定性を表してcDNAを生成することができる(図11を参照)。

10

【0024】

本技術分野の熟練した当業者は、一般に前記のように置き換えられたアミノ酸が、相対的に類似の特性の他のアミノ酸(即ち、保存的アミノ酸置換え)に取り替えられても、類似の生理学的及び生化学的特性を有することができるものであることを認識するはずである。多様なアミノ酸の特性と、タンパク質構造及び機能に対するアミノ酸置換の効果は、本技術分野の広範囲な研究及び知識の対象になってきた。

【0025】

例えば、アミノ酸のヒドロパシー(hydropathic)指数が考慮され得る(Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157:105-132)。アミノ酸の相対的なヒドロパシー特性が結果物であるタンパク質の2次構造に寄与し、これは再度前記タンパク質と他の分子との相互作用を定義することになる。それぞれのアミノ酸は、その疎水性及び電荷特性に基づいてヒドロパシー指数が割り当てられており(Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157:105-132)、これらは次の通りである: イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); トレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(-1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸(-3.5); グルタミン(-3.5); アスパラギン酸(-3.5); アスパラギン(-3.5); リシン(-3.9); 及びアルギニン(-4.5)。保存的置換えの実施において、そのヒドロパシー指数が±2以内のアミノ酸を用いるのが好ましく、±1以内が一層好ましく、±0.5以内がさらに一層好ましい。

20

30

【0026】

アミノ酸置換えは、さらにアミノ酸残基の親水性を考慮することができる(例えば、米国特許 第4,554,101号を参照)。親水性値は、それぞれのアミノ酸残基に対し割り当てられており、これらは次の通りである: アルギニン(+3.0); リシン(+3.0); アスパラギン酸(+3.0); グルタミン酸(+3.0); セリン(+0.3); アスパラギン(+0.2); グルタミン(+0.2); グリシン(0); トレオニン(-0.4); プロリン(-0.5); アラニン(-0.5); ヒスチジン(-0.5); システイン(-1.0); メチオニン(-1.3); バリン(-1.5); ロイシン(-1.8); イソロイシン(-1.8); チロシン(-2.3); フェニルアラニン(-2.5); トリプトファン(-3.4)。アミノ酸を類似の親水性を有する他のアミノ酸に取り替えるのが好ましいが、必須のことではない。

40

【0027】

他の考慮事項としては、アミノ酸側鎖の大きさを考慮することができる。例えば、グリシン又はセリンのような稠密な側鎖を有するアミノ酸を、例えば、トリプトファン、チロシンのような大きな側鎖を有するアミノ酸に取り替えることは一般的に好ましくないはずである。タンパク質2次構造に対する多様なアミノ酸残基の影響も考慮事項である。経験的な研究を介し、タンパク質ドメインがアルファ-螺旋、ベータ-シート又はリバーサターン(reverse turn)2次構造を採用する傾向に対し相違するアミノ酸残基が及ぼす影響が測定されてきており、本技術分野に知られている(例えば、Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276; 1979, Biophys. J.,

50

26:367-384を参照)。

【0028】

このような考慮事項及び広範囲な経験的研究に基づき、保存的アミノ酸置換えの表が作られてきており、本技術分野に知られている。例えば、アルギニン及びリシン；グルタミン酸及びアスパラギン酸；セリン及びトレオニン；グルタミン及びアスパラギン；及びバリン、ロイシン及びイソロイシンである。他の一方、Ala (A) leu、ile、val；Arg (R) gln、asn、lys；Asn (N) his、asp、lys、arg、gln；Asp (D) asn、glu；Cys (C) ala、ser；Gln (Q) glu、asn；Glu (E) gln、asp；Gly (G) ala；His (H) asn、gln、lys、arg；Ile (I) val、met、ala、phe、leu；Leu (L) val、met、ala、phe、ile；Lys (K) gln、asn、arg；Met (M) phe、ile、leu；Phe (F) leu、val、ile、ala、tyr；Pro (P) ala；Ser (S) thr；Thr (T) ser；Trp (W) phe、tyr；Tyr (Y) trp、phe、thr、ser；Val (V) ile、leu、met、phe、alaである。

10

【0029】

アミノ酸置換えに対する他の考慮事項には、その残基がタンパク質の内部に位置しているのか、又は溶媒に露出しているか否かを含む。内部の残基の場合、保存的置換えは次を含むことができる：Asp及びAsn；Ser及びThr；Ser及びAla；Thr及びAla；Ala及びGly；Ile及びVal；Val及びLeu；Leu及びIle；Leu及びMet；Phe及びTyr；Tyr及びTrp。溶媒に露出した残基の場合、保存的置換えは次を含むことができる：Asp及びAsn；Asp及びGlu；Glu及びGln；Glu及びAla；Gly及びAsn；Ala及びPro；Ala及びGly；Ala及びSer；Ala及びLys；Ser及びThr；Lys及びArg；Val及びLeu；Leu及びIle；Ile及びVal；Phe及びTyr。

20

【0030】

アミノ酸置換えの決定において、陽に帯電された残基（例えば、His、Arg、Lys）と陰に帯電された残基（例えば、Asp、Glu）との間のイオン結合（塩架橋）又は隣接したシステイン残基の間の二硫化結合の形成のような分子間又は分子内結合の存在を考慮することが好ましい。

【0031】

さらに、本発明は、前記熱安定性が増加した逆転写酵素をコーディングする遺伝子を提供する。

【0032】

前記遺伝子は、配列番号1に記載される野生型逆転写酵素の63番目のグルタミンからロイシンへの置換え（Q63L）、264番目のリシンからロイシンへの置換え（K264L）、295番目のリシンからグルタミンへの置換え（K295Q）、306番目のトレオニンからロイシンへの置換え（T306L）、346番目のグルタミン酸からメチオニンへの置換え（E346M）、408番目のプロリンからグルタミン酸への置換え（P408E）、438番目のヒスチジンからチロシンへの置換え（H438Y）、及び454番目のアスパラギンからフェニルアラニンへの置換え（N454F）からなる群から選ばれる1つ以上のアミノ酸置換えを含む突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子である。本発明の一具現例によれば、本発明の遺伝子は、前記8ヶ所の位置のアミノ酸がそれぞれ置き換えられた配列番号2ないし配列番号9に記載されるアミノ酸配列を有する8種の突然変異逆転写酵素をコーディングする配列番号11ないし配列番号18に記載される塩基配列を有する遺伝子であるのが好ましいが、これに限定されるものではない。例えば、配列番号1に記載されるM-MLV由来の逆転写酵素のアミノ酸配列の63番目のグルタミン（Q63）、264番目のリシン（K264）、295番目のリシン（K295）、306番目のトレオニン（T306）、346番目のグルタミン酸（E346）、408番目のプロリン（P408）、438番目のヒスチジン（H438）及び454番目のアスパラギン（N454）のうち2種以上が突然変異された逆転写酵素をコーディングする任意の遺伝子も本発明の権利範囲内に含まれ得る（図2ないし図9を参照）。

30

40

【0033】

さらに、本発明で言及された前記遺伝子等と実質的に同一で機能的に同等なポリヌクレオチドも本発明の遺伝子の範囲に含まれる。「実質的に同一で機能的に同等なポリヌクレオチド」とは、公知のアルゴリズムのコンピューター化された実行により、又は調査によ

50

り適宜配列されたとき、2つのポリヌクレオチドが少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%以上の配列相同性を共有することを意味する。

【0034】

さらに、本発明は前記遺伝子を含む発現ベクターを提供する。

【0035】

本発明の発現ベクターの製造に用いられ得る母ベクターには特別な制限がなく、通常の前核生物又は真核生物形質転換ベクターが用いられ得る。本発明の好ましい具現例では、配列番号11ないし配列番号18に記載されるそれぞれの突然変異遺伝子を核外遺伝子ベクターPET 22b(+)に挿入させた組換え発現ベクターを製造した。

10

【0036】

さらに、本発明は、前記発現ベクターに形質転換された形質転換体を提供する。

【0037】

本発明の形質転換体は、前記発現ベクターを任意の前核細胞又は真核細胞に導入することにより容易に製造可能であり、特定のベクターを細胞内に導入させる方法は当業者によく知られている。このような方法の例にはリポフェクタミン法などがある。本発明の好ましい具現例では、前記突然変異遺伝子が挿入されたPET 22b(+)ベクターを大腸菌DH5α宿主細胞に導入した形質転換体を製造した。

【0038】

さらに、本発明は、前記逆転写酵素を含む逆転写反应用キットを提供する。

20

【0039】

本発明の逆転写反应用キットは、前記逆転写酵素以外にも逆転写反応に必要な通常的な構成成分、例えば、増幅を望む標的遺伝子又はオリゴヌクレオチドに特異的に結合するプライマー対、dNTP、反応緩衝液、選択的にはDNA重合酵素などをさらに含むことができる。

【発明の効果】

【0040】

本発明の突然変異逆転写酵素は、野生型逆転写酵素に比べて優れた熱安定性を表すので、高温でも安定した2次構造を形成することができる特定のRNAの構造的妨害により効率的に逆転写産物を得ることができない場合も、安定的に逆転写活性を表して所望のcDNAを得ることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】本発明に係る突然変異逆転写酵素で突然変異されたアミノ酸の位置及び種類を示す図である。

【図2】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩基の位置及びその配列を示す図である。

【図3】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩基の位置及びその配列を示す図である。

【図4】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩基の位置及びその配列を示す図である。

40

【図5】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩基の位置及びその配列を示す図である。

【図6】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩基の位置及びその配列を示す図である。

【図7】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩基の位置及びその配列を示す図である。

【図8】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩基の位置及びその配列を示す図である。

【図9】本発明に係る突然変異逆転写酵素をコーディングする遺伝子で突然変異された塩

50

基の位置及びその配列を示す図である。

【図10】野生型逆転写酵素（配列番号1）と、本発明に係る突然変異逆転写酵素（配列番号2ないし配列番号9）とを利用して42、50、60、65及び70 で逆転写反応させた結果を示す電気泳動写真である。

【図11】野生型逆転写酵素（配列番号1）と、本発明に係るT306L突然変異逆転写酵素（配列番号5）とを利用して37、42、50、60、65及び70 で逆転写反応させた結果を示す電気泳動写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0042】

以下、本発明を実施形態により詳しく説明する。

10

【0043】

但し、以下の実施形態は本発明を例示するためのものであるだけで、本発明の内容が以下の実施形態により限定されるものではない。

【0044】

実施例1. 突然変異逆転写酵素をコーティングする遺伝子の製作

配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するM-MLV由来の逆転写酵素に突然変異を導入するため、前記M-MLV由来の逆転写酵素をコーディングする遺伝子上の塩基配列を置き換えた。具体的に、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するM-MLV由来の逆転写酵素で63番目のグルタミンからロイシンへの変異（Q63L）、264番目のリシンからロイシンへの変異（K264L）、295番目のリシンからグルタミンへの変異（K295Q）、306番目のトレオニンからロイシンへの変異（T306L）、346番目のグルタミン酸からメチオニンへの変異（E346M）、408番目のプロリンでグルタミン酸への変異（P408E）、438番目のヒスチジンからチロシンへの変異（H438Y変異）、及び454番目のアスパラギンからフェニルアラニンへの変異（N454F）が導入された8種の突然変異逆転写酵素を製作しており（図1を参照）、このため前記配列番号1のアミノ酸配列を有する逆転写酵素をコーディングする配列番号10に記載される遺伝子に突然変異を導入した（図2ないし図9を参照）。前記突然変異遺伝子は、それぞれ配列番号11ないし配列番号18に記載される塩基配列を有する。前記突然変異遺伝子の製造過程は、次の通りである：

20

大腸菌（*Escherichia coli*）でのタンパク質発現量を高めるため、配列番号10に記載されるM-MLV逆転写酵素の遺伝子配列を大腸菌のコドン利用性（codon usage）に合わせて最適化させ、配列番号19に記載される塩基配列を得た。前記最適化された塩基配列に基づき野生型遺伝子とK295Q突然変異遺伝子を合成した。まず、配列番号19に記載される野生型遺伝子の塩基配列を得るため、全塩基配列に基づきセンス鎖とアンチセンス鎖をそれぞれアニーリング（annealing）温度が大凡60（20ないし40塩基）になるように設計したあと、設計されたオリゴヌクレオチド等を合成した（バイオニア、KOREA）。合成されたオリゴヌクレオチド等はそれぞれ配列番号20ないし配列番号149に記載される塩基配列を有する。前記合成されたオリゴヌクレオチド等を用いてキネーション（Kination）-LCR法（大韓民国特許出願第2008-0025050号）で40 と60 で反復的に反応させてライゲーション（ligation）させることにより、配列番号19に記載される塩基配列を有する二重鎖の全体遺伝子を合成した。さらに、K295Q突然変異遺伝子は、配列番号77及び配列番号78に記載される塩基配列の代りに配列番号150及び配列番号151に記載される塩基配列を用いたことを除いては、前記野生型遺伝子と同一の方法を利用して合成した。合成が完了した遺伝子を95 で5分間予め熱処理したあと、配列番号152及び配列番号153に記載されるプライマー対を利用して95 で1分、65 で1分、72 で2分30秒間反応させ、この過程を30回繰り返したあと72 でさらに10分間反応させて前記遺伝子を増量した。前記増量された合成遺伝子をpGEM-T easy vector（Promega、USA）にライゲーションさせたあと、大腸菌DH5a（RBC、USA）に形質転換させて野生型及びK295Q突然変異遺伝子のクローンを多量確保した。

30

40

【0045】

このように合成された野生型遺伝子配列を鋳型にし、Q63L、K264L、T306L、E346M、P40

50

8E、H438Y及びN454Fを位置指定突然変異法 (site-directed mutagenesis) を利用して突然変異させた。前記位置指定突然変異法は、次のように進めた：先ず、前記突然変異遺伝子に対し配列番号154ないし配列番号167に記載される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。95 で5分間熱処理したあと、前記合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーとしてpfu DNA重合酵素を用いて95 で1分、65 で1分、72 で5分30秒間反応させ、この過程を合計30回繰り返したあと72 で追加反応させて突然変異遺伝子産物を生成した。このように生成した突然変異遺伝子産物等をキネーション - セルフライゲーション (self ligation) させたあと、大腸菌DH5a (RBC、USA) に形質転換させてQ63L、K264L、T306L、E346M、P408E、H438Y及びN454F突然変異遺伝子のクローンを多量確保した。

【 0 0 4 6 】

10

実施例2. 突然変異遺伝子の形質転換

核外遺伝子PET 22b (+) (NOVAGEN CO.) を組換えベクターに用いて実施例1で製造された8種の突然変異逆転写酵素遺伝子をクローニングした。このため、pGEM-T easyベクター (Promega) に挿入して合成された変異遺伝子 (Q63L、K264L、T306L及びE346M) を、下記プライマー対を利用してPCRを進めた。

【 0 0 4 7 】

センス鎖：5'-GCG CGC CAT ATG CTG AAC ATC GAA GAC GAA CAC CGT CTG CAC GAA AC-3' (Nde I) (配列番号168)

アンチセンス鎖：5'-GCG CGC GCG GCC GCT TAG ATC AGC AGG GTA GAG GTG TCC GGG GTT TC-3' (Not I) (配列番号169)

20

他の変異遺伝子 (K295Q、P408E、H438Y、N454F) の場合、下記プライマー対を利用してPCRを進めた。

【 0 0 4 8 】

センス鎖：5'-GCG CGC CAT ATG CTG AAC ATC GAA GAC GAA CAC CGT CTG CAC GAA AC-3' (Nde I) (配列番号170)

アンチセンス鎖：5'-GCG CGC GCG GCC GCG ATC AGC AGG GTA GAG GTG TCC GGG GTT TC-3' (Not I) (配列番号171)

核外遺伝子ベクターPET 22b (+) とPCRとを介して得た各M-MLV逆転写遺伝子断片に対し、5'末端はNde I、3'末端はNot I を処理して切断したあと、ゲル抽出キット (BIONEER CO.) を利用して精製した。以後、T4 DNAリガーゼ (ligase) (TAKARA CO.) を利用して前記切断された断片等を16 で2時間反応させ、それぞれの突然変異遺伝子を核外遺伝子ベクターPET 22b (+) に挿入した。

30

【 0 0 4 9 】

前記突然変異遺伝子が挿入されたPET 22b (+) ベクターを大腸菌 (Escherichia coli) DH5 α 宿主細胞に形質転換させることにより組換え宿主細胞を生成した。前記形質転換は、次のような順に進めた：-70 で冷凍された状態のDH5 α 宿主細胞を解凍した。解凍された宿主細胞と前記DNA組換えベクター1 μg/μlを混合したあと30分間氷で放置し、42 で90秒間熱処理を行った。熱処理した宿主細胞をアンピシリン (50mg/ml) 入りのLB細胞培養液プレートに塗抹したあと、37 で一晩中培養してクローンを得た。得られたクローンは、下記塩基配列を有するプライマー対を利用して各遺伝子配列を確認し、確認されたクローンはプラスミドを再度BL21 (DE3) 宿主細胞に形質転換させて発現菌株を確保した。

40

【 0 0 5 0 】

T7プロモーターセンス鎖：5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' (配列番号172)

T7ターミネーターアンチセンス鎖：5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3' (配列番号173)

【 0 0 5 1 】

実施例 3. 突然変異逆転写酵素の発現

BL21 (DE3) 宿主細胞に形質転換した発現菌株の単一コロニーを採取したあと、アンピシリン (50mg/ml) が含まれたLB (Luria-Bertani medium) 細胞培養液15mlに投入し、37 で一晩中培養してシード (seed) 菌株細胞を確保した。アンピシリンが含まれたLB細胞培養液1lに前記シード菌株細胞を投入して37 で2時間の間培養したあと、0.5mM IPTG (I

50

sopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) を添加して2時間さらに発現させた。培養されたそれぞれの菌株細胞を遠心分離したあと、得られたペレット (pellet) を-50 で精製する前まで保管した。

【 0 0 5 2 】

実施例4. 突然変異逆転写酵素の精製

実施例3で得られた凍結細胞塊5gを破砕したあと、4 で攪拌しながら溶菌緩衝液 (25mM トリス塩酸 (Tris-HCl pH 7.6)、1mM EDTA、10% (v/v) β-メルカプトエタノール、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) 20ml) に30分間懸濁させた。その後、細胞均質器 (fisher sonicator) で細胞を溶菌させた。その後、前記細胞溶菌物を4 で1時間の間 11,000rpmで遠心分離させ、ペレットを溢して捨てた。澄んだ溶菌物を直ちに緩衝溶液 (4 0mM トリス塩酸 (Tris-HCl pH 7.6)、2mM EDTA、28.58mM β-メルカプトエタノール、100 mM KCl) に透析した。

【 0 0 5 3 】

実施例5. 突然変異逆転写酵素のクロマトグラフィー

突然変異逆転写酵素を精製するため、アマシャムFPLC装置を用いて行った。1次コラムはアマシャムXK16 (1.6cm×30.0cm) を用いた。コラムにイオン交換樹脂コラムクロマトグラフィーDEAE hyper-D (pall co.) を充填し、1M KClを含有するコラム緩衝液250mlで洗浄したあと、緩衝溶液で平衡化させた60mlのベッドを得た。その後、透明な細胞溶菌物 20mlを5ml/分の流速でコラムに適用した。適用された溶菌物のうちコラムに吸着されていない溶菌物を獲得して次のコラムに適用した。得られた溶菌物を2次クロマトグラフィー に適用した。コラムアマシャムXK16 (1.6cm×30.0cm) を洗浄して平衡化させたあと、親和性クロマトグラフィーヘパリンhyper-D (pall co.) を充填して50mlのベッドを得た。その後、緩衝溶液で平衡化させた。溶菌物をコラムに適用したあと、コラム緩衝液のうち 0.2M~0.6M KCl線形塩勾配100~150mlを用いて湧出させた。湧出させた溶菌物をコラム 26 X60 S-200 gel filtration (GE healthcare) に適用して高純度の逆転写酵素を得た。コラム分画をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に適用したあと染色 (coomassie brilliant blue staining) を行って分析した。各分画で採取した10μl分画物をそれぞれのゲルレーンで分析した。野生型と類似の分子量 (74kDa) のタンパク質を採取し、前記タンパク質の安定性を確保するため、保存液 (20mM トリス - 塩酸 (pH 7.6)、0.1mM EDTA、150mM NaCl、0.1% IGEPAL CA-630 (Polyethoxyethanol) 1mM DTT (Dithiothreitol)、50%グリセロール (Glycerol) で透析を進め、突然変異酵素を得て-20 で保管した。

【 0 0 5 4 】

実施例6. 突然変異逆転写酵素を利用したRT-PCRの実施

前記分離した逆転写酵素の活性を確認するため逆転写PCRを行った。逆転写 PCRに用いた物質は次の通りであり、全RNAは5ng/μl~500、50、5pg/μlの濃度を用いた。

【 0 0 5 5 】

5X反応バッファー	4μl (Bioneer co.)
10mM dNTP	2μl
dT (18) 10pmol	1μl
100mM DTT	2μl
RNase抑制剤 (50ng/μl)	1μl
蒸留水	7μl
全RNA	2μl

比較例には野生型逆転写酵素を利用し、42、50、60、65 及び70 (T306L変異は37 での反応を追加する) で1時間逆転写PCRを行った。前記で生成されたcDNAを利用してPCRを行った。増幅する遺伝子にはGAPDHを用い (遺伝子の大きさ500bp)、下記塩基配列を有するプライマー対を利用した。

【 0 0 5 6 】

センス鎖: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' (配列番号174)

10

20

30

40

50

アンチセンス鎖：5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGTTG-3'（配列番号175）

調剤物には下記組成のものを用いた：

PCRプリミックスタイプ（バイオニア）

センスプリマー： 5pmol、1 μl

アンチセンスプリマー： 5pmol、1 μl

蒸留水 13 μl

cDNA 5 μl

PCRは95 30秒、57 30秒及び72 30秒の反応条件で30サイクル行い、PCR結果物をアガロースゲルに電気泳動して増幅産物を確認した。

【0057】

10

その結果、野生型M-MLVから由来された本発明の突然変異逆転写酵素は、野生型逆転写酵素に比べて優れた熱安定性を有し、その中でもK295Q、T306L及びP408E突然変異逆転写酵素は特に優れた熱安定性を表した。特に、反応温度60 で野生型M-MLV逆転写酵素は逆転写活性を有することができないが、K295Q、T306L及びP408E突然変異逆転写酵素は逆転写活性を維持した（図10）。最も優れた熱安定性を表すT306L突然変異逆転写酵素の場合、37、42及び50 では野生型M-MLV由来の逆転写酵素と同等な熱安定が表れたが、60、65及び70 では野生型M-MLV由来の逆転写酵素より優れた熱安定性を表した（図11）。

【0058】

本技術分野の熟練者は、前記詳細な説明で開示された概念及び特定の具現例が本発明の同一の目的を行うため変形されるか、他の具現例のデザインのための基礎に直ちに利用され得ることを認識するはずである。さらに、本技術分野の熟練者は、このような同等な具現例は、請求項に開示されている本発明の思想及び範囲を外れないことを認識するはずである。

20

【図1】

```

1 mlniedeherl hetskepdivs lgsatwlsdflp qawaetggmg lavrqaplii plkatstpvss
61 ikqypmsqea rlgikphiqr lldqgilvpc qspwntpllp vkkpgtndyr pvqdlrevnk
  →L
121 rvedihptvp npynilsglp pshqwytvld lkdaaffclrl hptsqplfaf ewzdpemgis
181 gqitwtirlpq gfknsptlfd ealhrdladf riqhpdllil qyvddlllaa tseidcqqgt
241 rallqtignl gyasakkaq icqkqvkyig yllkeggrwl tearketvmg qptpktprql
  →L                               →Q
301 refigtagfc rlwipqfaem aaplyptlkt gtlfnwypdq qkayqeikqa lltapalglp
  →L                               →M
361 dltkpfelfv dekqgyakgv ltqklgpwrr pvaylakklid pvaagwppcl rmvaaiavit
  →E
421 kdagklimgq plvilaphav ealvkqppdr wlsnazmthy qallldtdrv qfgpvvalnp
  →Y                               →F
481 atilplpeeg lqhncldila eahgtrpdlit dqplpdadht wytdgssllq egqrkagaav
541 tteteviwak alpagsaqr aelialtqal kmaegkklnv ytdsryafat ahihgeiyrr
601 rglltsegke iknkdeilal lkalfipkrl siihpcghqk ghsaeargnr madqaarkaa
661 itetpdtstl li

```

【図2】

```

mat_peptide 2337..4349
• gene="gag-pol"
• product="p80 RT"
• protein_id="NP_955591.1"
• db_xref="GI:40796138"

4 ctaaataagaagatgagcatcggtacatgagacctcaaaagagccagatgtttctcta 63
|
1 ctaaataagaagatgagcatcggtacatgagacctcaaaagagccagatgtttctcta 60

64 gggccacatggctgtctgattttcctcaggcctggcggaacccggggcatgggactg 123
|
61 gggccacatggctgtctgattttcctcaggcctggcggaacccggggcatgggactg 120

124 gcagttcgccaagctcctctgatcatacctctgaaagcaacctctacccccgtgtccata 183
|
121 gcagttcgccaagctcctctgatcatacctctgaaagcaacctctacccccgtgtccata 180

```

【 図 3 】

184 aaacaataccocatgtcacagaagccagactggggatcaagccccacatacagagactg 243
|||||
181 aaacctttaccocatgtcacagaagccagactggggatcaagccccacatacagagactg 240
Q63L: CAA→CTT
244 ttggaccaggggaataactggtaccctgccagtcacctggaacacgccccctgctacccgtt 303
|||||
241 ttggaccaggggaataactggtaccctgccagtcacctggaacacgccccctgctacccgtt 300

304 aagaaaccagggaactaatgattataggcctgtccaggatctgagagaagtcaacaagcgg 363
|||||
301 aagaaaccagggaactaatgattataggcctgtccaggatctgagagaagtcaacaagcgg 360

364 gtggaagacatccacccaccgtgcccaaccctacaacctcttgagcgggtccaccgg 423
|||||
361 gtggaagacatccacccaccgtgcccaaccctacaacctcttgagcgggtccaccgg 420

【 図 4 】

424 tcccaccagtggtacactgtgcttgattaaaggatgcctttttctgectgagactccac 483
|||||
421 tcccaccagtggtacactgtgcttgattaaaggatgcctttttctgectgagactccac 480

484 cccaccagtcagcctctcttcgaccttgagtgagagatccagagatgggaatctcagga 543
|||||
481 cccaccagtcagcctctcttcgaccttgagtgagagatccagagatgggaatctcagga 540

544 caattgacctggaccagactcccacagggtttcaaaaacagtcccaccctgtttgatgag 603
|||||
541 caattgacctggaccagactcccacagggtttcaaaaacagtcccaccctgtttgatgag 600

604 gcactgcacagagacctagcagacttccggatccagcaccagacttgatcctgctacag 663
|||||
601 gcactgcacagagacctagcagacttccggatccagcaccagacttgatcctgctacag 660

664 tacgtggatgacttactgtgtggccgcaactctgagctagactgccacaaggtaactcgg 723
|||||
661 tacgtggatgacttactgtgtggccgcaactctgagctagactgccacaaggtaactcgg 720

【 図 5 】

724 gccctgttacaaacctagggaaacctcgggtatcgggcctcgggccaagaaagcccaatt 783
|||||
721 gccctgttacaaacctagggaaacctcgggtatcgggcctcgggccaagaaagcccaatt 780

784 tgccagaaacagggtcaagtatctgggtatcttctaaaagagggtcagagatggctgact 843
|||||
781 tgccagcttcagggtcaagtatctgggtatcttctaaaagagggtcagagatggctgact 840
K264L: AAA→CTT
844 gaggccagaaaaagagactgtgatggggcagcctactccgaagccctcgacaactaagg 903
|||||
841 gaggccagaaaaagagactgtgatggggcagcctactccgcaaacccctcgacaactaagg 900
K295Q: AAG→CAA
904 gagtctcagggaaggcaggtctctgtgcctctggatccctgggtttgcagaaatggca 963
|||||
901 gagtctcagggaaggcaggtctctgtgcctctggatccctgggtttgcagaaatggca 960
T306L: ACG→CTT

【 図 6 】

964 gccacctgtaccctctcaccaaaacggggactctgtttaattggggcccagaccaacaa 1023
|||||
961 gccacctgtaccctctcaccaaaacggggactctgtttaattggggcccagaccaacaa 1020

1024 aaggcctatcaagaaatcaagcaagctcttctaactgccccagcctggggttgccagat 1083
|||||
1021 aaggcctatcaaaatgatcaagcaagctcttctaactgccccagcctggggttgccagat 1080
E346M: GAA→ATG
1084 tgactaagccctttgaactctttgtcgacgagaagcaggggtacgccaaaggtgtccta 1143
|||||
1081 tgactaagccctttgaactctttgtcgacgagaagcaggggtacgccaaaggtgtccta 1140

1144 acgcaaaaactgggaccttgcgctcgccggtggcctacctgtccaaaagctagaccca 1203
|||||
1141 acgcaaaaactgggaccttgcgctcgccggtggcctacctgtccaaaagctagaccca 1200

1204 gtacgagctgggtggcccccttgacctacggatggtagcagccattgccgtactgacaaag 1263
|||||
1201 gtacgagctgggtggcccgaatgacctacggatggtagcagccattgccgtactgacaaag 1260
P408E: CCT→GAA

【図 7】

1264 gatgcaggcaagctaaccatgggacagccactagtcattctggcccccatgcagtagag 1323
|||||
1261 gatgcaggcaagctaaccatgggacagccactagtcattctggcccccatgcagtagag 1320
|||||
H438Y: CAT→TAC
1324 gcactagtcacaacaccccccgaccgctggctttccaacgcccggatgactcactatcag 1383
|||||
1321 gcactagtcacaacaccccccgaccgctggctttccaacgcccggatgactcactatcag 1380
|||||
H454F: AAC→TTC
1384 gccttgcttttggacacgacccgggtccagttcggacccgggtagccctgaacccggct 1443
|||||
1381 gccttgcttttggacacgacccgggtccagttcggacccgggtagccctgaacccggct 1440
|||||
1444 acgctgctcccaactgcctgaggaagggtcgaacacaactgccttgatatcctggccgaa 1503
|||||
1441 acgctgctcccaactgcctgaggaagggtcgaacacaactgccttgatatcctggccgaa 1500
|||||

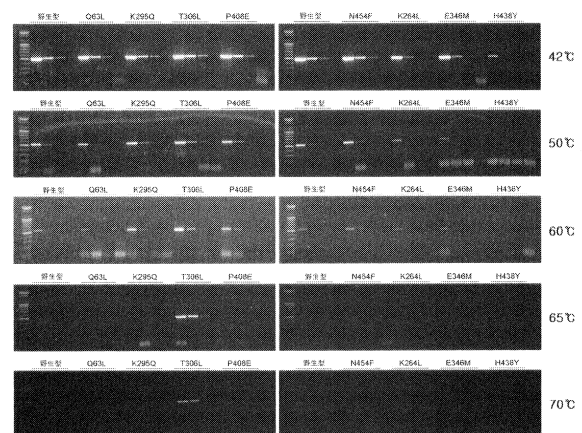
【図 8】

1504 gccacgggaacccgaccgacctaacggaccagccgctcccagacgcgaccacacctgg 1563
|||||
1501 gccacgggaacccgaccgacctaacggaccagccgctcccagacgcgaccacacctgg 1560
|||||
1564 tacacggatggaagcagtcctctacaagaggacagcgtaaggcgggagctgcggtgacc 1623
|||||
1561 tacacggatggaagcagtcctctacaagaggacagcgtaaggcgggagctgcggtgacc 1620
|||||
1624 accgagaccgaggtaatctgggctaagccctgccagccgggacatccgctcagcgggt 1683
|||||
1621 accgagaccgaggtaatctgggctaagccctgccagccgggacatccgctcagcgggt 1680
|||||
1684 gaactgatagcactcaccagccctaagatggcagaaggaagaagctaaatgtttat 1743
|||||
1681 gaactgatagcactcaccagccctaagatggcagaaggaagaagctaaatgtttat 1740
|||||
1744 actgatagccgttatgcttttgcactgcccataccatggagaaatatacagaaggcgt 1803
|||||
1741 actgatagccgttatgcttttgcactgcccataccatggagaaatatacagaaggcgt 1800
|||||

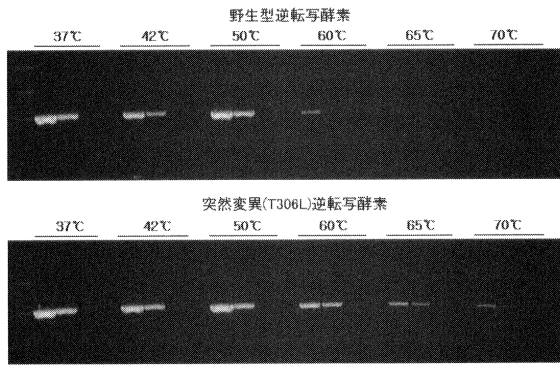
【図 9】

1804 gggttgtcacatcagaaggcaagagatcaaaaaataagacgagatcttggccctacta 1863
|||||
1801 gggttgtcacatcagaaggcaagagatcaaaaaataagacgagatcttggccctacta 1860
|||||
1864 aaagccctcttttgcgcaaaagacttagcataatccattgtccaggacatcaaaaggga 1923
|||||
1861 aaagccctcttttgcgcaaaagacttagcataatccattgtccaggacatcaaaaggga 1920
|||||
1924 cacagcgccgaggttagaggcaaccggatggctgaccaagcgccggaaggcagccatc 1983
|||||
1921 cacagcgccgaggttagaggcaaccggatggctgaccaagcgccggaaggcagccatc 1980
|||||
1984 acagagactccagacacctctacccctcctata 2016
|||||
1981 acagagactccagacacctctacccctcctata 2013
|||||

【図 10】



【図 1 1】



【配列表】

0005883036000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50 P

(72)発明者 ジュ ソンモ
 大韓民国 3 0 1 - 7 8 7 テジョン ジュン - グ オリュ - ドン サムソン アパート 1 4 -
 1 3 0 6

(72)発明者 ファン ピョンオ
 大韓民国 4 5 0 - 7 2 9 キョンギ - ド ピョンテク - シ ピジョン 2 - ドン エルジー ト
 クドン アパート 1 0 5 - 1 5 0 1

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表 2 0 0 9 - 5 0 4 1 6 2 (J P , A)
 特表 2 0 0 4 - 5 1 1 2 1 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 W P I D S (S T N)