

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5617075号
(P5617075)

(45) 発行日 平成26年11月5日(2014.11.5)

(24) 登録日 平成26年9月26日(2014.9.26)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	A
C 12 N 9/12	(2006.01)	C 12 N 9/12	Z N A
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21	

請求項の数 12 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-548164 (P2010-548164)
 (86) (22) 出願日 平成21年2月13日 (2009.2.13)
 (65) 公表番号 特表2011-512812 (P2011-512812A)
 (43) 公表日 平成23年4月28日 (2011.4.28)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2009/000411
 (87) 國際公開番号 WO2009/106795
 (87) 國際公開日 平成21年9月3日 (2009.9.3)
 審査請求日 平成23年12月6日 (2011.12.6)
 (31) 優先権主張番号 0803628.7
 (32) 優先日 平成20年2月28日 (2008.2.28)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

前置審査

(73) 特許権者 514200796
 ジェネシス バイオテック リミティド
 イギリス国, イーエヌ9 3ティーピー,
 エセックス, ウォルサム アビー, ハリア
 ウエイ, ピーオー ボックス148
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

熱安定性DNAポリメラーゼ活性を有し、且つ鎖置換活性を呈し、且つ配列番号1に示されるサーモデスルファテーター・インディクス(Thermodesulfatator indicus)DNAポリメラーゼIラージフラグメント(Large fragment)と、少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は当該アミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

【請求項2】

ループ媒介等温增幅 (loop-mediated isothermal amplification) (LAMP) 等の、等温增幅反応の実施に適する、及び/又は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の、熱サイクル增幅反応の実施に適する、請求項1に記載のポリペプチド。 10

【請求項3】

前記アミノ酸配列が、配列番号32である、請求項1又は2に記載のポリペプチド。

【請求項4】

Crene7エンハンサードメインをさらに含んでなる、請求項1~3のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項5】

請求項1~4のいずれか1項に記載のポリペプチドを含んでなる組成物。

【請求項6】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 7】

配列番号 3 又は配列番号 33 のスクレオチド配列を有する、請求項 6 に記載の核酸。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 9】

請求項 6 又は 7 に記載の核酸、又は請求項 8 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、及び / 又は請求項 5 に記載の組成物、及び / 又は請求項 6 又は 7 に記載の単離核酸、及び / 又は請求項 8 に記載のベクター、及び / 又は請求項 9 に記載の宿主細胞を、その包装材料と一緒に含んでなる、キット。 10

【請求項 11】

熱サイクル反応を用いる標的核酸の配列を増幅する方法であって、

(1) 前記標的核酸を、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと接触させるステップ；及び

(2) 前記標的核酸を、当該標的核酸を増幅させる熱サイクル反応条件下、前記ポリペプチドと一緒にインキュベートするステップ、

を含んでなる、方法。

【請求項 12】

20

等温反応を用いる標的核酸の配列を増幅する方法であって、

(1) 前記標的核酸を、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと接触させるステップ；及び

(2) 前記標的核酸を、当該標的核酸を増幅させる等温反応条件下、前記ポリペプチドと一緒にインキュベートするステップ、

を含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNA ポリメラーゼ活性を有する新規なポリペプチド、及びその使用に関する。 30

【背景技術】

【0002】

DNA ポリメラーゼは、DNA 修復及び複製において、インビオ (in vivo) で必要とされるが、分子生物学者のためのインビトロ (in vitro) での診断及び分析の重要なツールとなっている。遺伝子「DNA pol A」によりコードされる E. coli DNA ポリメラーゼ I は、1956 年に発見され、1970 年代初期にクローニング及び特性決定された。当該酵素は、ニックトランスレーション、cDNA クローニングにおける第二鎖 cDNA 合成、及び DNA 配列決定により DNA 標識等の様々な用途を有する。いわゆる E. coli DNA ポリメラーゼ I の「クレノウ (Klenow)」又は「ラージ (Large)」フラグメントは、元々プロテアーゼ酵素サブチリシンによる未変性酵素の切断で作製された巨大な (large) タンパク質フラグメントである。このラージフラグメントは、5' ~ 3' ポリメラーゼ活性、及び 3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ・プルーフリーディング活性を有するが、前記未変性酵素における DNA 修復の間に、ニックトランスレーションを媒介する 5' ~ 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠損する。 40

【0003】

E. coli において発見されているため、DNA ポリメラーゼ I 様酵素は、多くの原核生物において、特性決定されているが、非 E. coli 対応物は、3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ・プルーフリーディング機能を常に有するわけではない。様々な好熱性真正細菌、例えば、サーマス・フラバス (Thermus flavus)、サーマス・アクアテ

50

イクス (*Thermus aquaticus*)、サーマス・プロッキアナス (*Thermus brockianus*)、サーマス・ルバー (*Thermus ruber*)、サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*)、サーマス・フィリホルミス (*Thermus filiformis*)、サーマス・ラクテウス (*Thermus lacteus*)、サーマス・ルベンス (*Thermus rubens*)、バチルス・ステアロテルモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・カルドテナクス (*Bacillus caldotenax*) 及びサーモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) 由来のDNAポリメラーゼI様酵素が、熱安定性であり、約45 ~ 100 でポリメラーゼ活性を維持することがわかっている。

10

【0004】

一般的に、熱安定性DNAポリメラーゼは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の熱サイクル増幅反応によるか、又は鎖置換増幅 (SDA)、核酸配列ベース増幅 (NASBA)、自己持続配列複製法 (3SR)、及びループ媒介等温増幅 (LAMP; Notomi等、2000、Nucleic Acids Res. 28: e63を参照されたい) 等の等温増幅反応による、核酸配列の増幅のための方法において幅広い用途が発見されている。熱安定性DNAポリメラーゼは、熱安定性、鎖置換活性、フィデリティ (エラー率) 及びテンプレートDNA及び/又は遊離ヌクレオチドへの結合親和性等の様々な特性を有するため、典型的に、増幅反応の様々なタイプに適する。

20

【0005】

等温増幅反応には、強力な鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼが必要であり、且つBst DNAポリメラーゼIラージフラグメント及びBca DNAポリメラーゼIラージフラグメント等のDNAポリメラーゼI酵素は、LAMP等の反応に適している (Notomi等、2000、上記を参照されたい)。

【0006】

一方で、PCR等の熱サイクル増幅反応には、使用されるサイクル温度 (典型的には、最大94) で適切な処理能力及び熱安定性を有するDNAポリメラーゼが必要である。PCRのための市販のDNAポリメラーゼの多くは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠如するが、ブルーフリー-ディング3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する、DNAポリメラーゼII様酵素である (例えば、Vent、Deep Vent、Pwo、Pfu、KOD, 9N7、Tfu DNAポリメラーゼ)。いくつかのDNAポリメラーゼI酵素 (典型的には、サーモトガ及びサーマス種由来のもの、例えば、Taq DNAポリメラーゼ) がPCRで使用されるが、例えばTaq DNAポリメラーゼは、等温増幅反応において十分に機能するよう、不十分な鎖置換活性を有する。

30

【0007】

WO2007/127893は、サーモトガ・ナフトフィラ (*Thermotoga naphthophila*) 及びサーモトガ・ペトフェリア (*Thermotoga petrophila*) 由来の熱安定性DNAポリメラーゼを開示する。

【0008】

Moussard等 (Int. J. Systemic & Evolutionary Microbiology. (2004) 54: 227-233) は、当該タイプの種として、サーモデスルファテーター・インディクスが属する、サーモデスルファテーター属の発見を開示している。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、核酸増幅反応等のDNAポリメラーゼ活性を必要とする反応における使用のための、新規な熱安定性DNAポリメラーゼI及びそのラージフラグメントを提供する。当該ポリメラーゼ、特にそのラージフラグメントは、驚くべきことに、且つ有利なことに、熱サイクル及び等温増幅反応の両方において有用であることがわかっている。熱安定性

50

及びDNA複製能を維持する様々な突然変異体（欠失及び置換）が、本発明の範囲に含まれる。

【0010】

本発明の特に非限定的な実施態様を、以下の図に関してここで記載する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、本発明の1つの実施態様による、サーモデスルファテーター・インディクス由来の新規なDNAポリメラーゼのクローニングの際に使用した遺伝子ウォーキング法を示す図である。

【図2】図2は、T.インディクスDNAポリメラーゼのクローニングにおいて使用される新規なpET24a(+)HIS領域の構造を示す図である。10

【図3】図3は、クローン化T.インディクスDNAポリメラーゼのラージフラグメントの発現を示すSDS-PAGEゲルである。レーン1は、サイズマーカー、レーン2は、インサートなしのpET24a(+)HISベクターでの誘導コントロール、レーン3は、100μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有するラージフラグメント、レーン4は、100μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグのないラージフラグメント、レーン5は、20μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有するラージフラグメント、レーン6は、20μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグのないラージフラグメント、レーン7は、5μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有するラージフラグメント、レーン8は、5μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグのないラージフラグメント、レーン9は、単一ステップキレーティングセファロース精製を介して精製した、50uのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有するラージフラグメント、及びレーン10は、12.5uのKlenTaq DNAポリメラーゼである。容量は、誘導E.coli KRX培養物の容量からロードしたタンパク質の量を表す。20

【図4】図4は、クローン化T.インディクスDNAポリメラーゼの全長の実施態様の発現を示すSDS-PAGEゲルである。レーン1は、サイズマーカー、レーン2は、インサートなしのpET24a(+)HISベクターでの誘導コントロール、レーン3は、100μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有する全長、レーン4は、100μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグのない全長、レーン5は、25uのPfu DNAポリメラーゼである。容量は、誘導E.coli KRX培養物の容量からロードしたタンパク質の量を表す。30

【図5】図5は、クローン化T.インディクスDNAポリメラーゼを用いるラムダ(λ)DNAの増幅を示すPCR反応サンプルのアガロースゲルである。レーン1は、ラムダEcoRI/HindIIIサイズマーカーであり、レーン2は、500bp、400bp、350bp、275bp、225bp及び175bpのサイズマーカーであり、レーン3は1.25u Taq DNAポリメラーゼを用いる増幅産物を示し、レーン4は、2μlの誘導T.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグなしのラージフラグメントを示し、レーン5は、2μlの誘導T.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有するラージフラグメントを示し、レーン6は、単一ステップキレーティングセファロース精製を介して精製した、8μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有するラージフラグメントを示し、レーン7は、10μlのT.インディクスDNAポリメラーゼのN末端HISタグを有する全長を示し、及びレーン8は、インサートを欠損する誘導pET24a(+)HISベクターを用いた増幅産物を示す（ネガティブコントロール）。容量は、誘導E.coli KRX培養物の容量からロードしたタンパク質の量を表す。40

【図6】図6は、クローン化T.インディクスDNAポリメラーゼを用いる増幅結果を示すLAMP反応サンプルのアガロースゲルである。レーン1は、ラムダEcoRI/HindIIIサイズマーカーであり、レーン2は、500bp、400bp、350bp、250bp、200bp、150bp、100bp、50bpのサイズマーカーである。容量は、誘導E.coli KRX培養物の容量からロードしたタンパク質の量を表す。50

75 bp、225 bp 及び 175 bp のサイズマーカーであり、レーン 3 は、8 μt DNA ポリメラーゼのラージフラグメントを用いる增幅産物を示し、レーン 4 は、2 μl の T. インディクス DNA ポリメラーゼの N 末端 HIS タグなしのラージフラグメントを示し、レーン 5 は、2 μl の T. インディクス DNA ポリメラーゼの N 末端 HIS タグを有するラージフラグメントを示し、レーン 6 は、単一ステップキーリングセファロース精製を介して精製した、8 μl の T. インディクス DNA ポリメラーゼの N 末端 HIS タグを有するラージフラグメントを示し、レーン 7 は、10 μl の T. インディクス DNA ポリメラーゼの N 末端 HIS タグを有する全長を示し、及びレーン 8 は、インサートを欠如する誘導 pET24a(+) HIS ベクターを用いた增幅産物を示す（ネガティブコントロール）。容量は、誘導 E. coli KRX 培養物の容量からロードしたタンパク質の量を表す。
10

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明のある態様によれば、熱安定性 DNA ポリメラーゼ活性を有し、且つ配列番号 1 に示されるサーモデスルファテーター・インディクス (Thermodesulfator indicus) DNA ポリメラーゼ I ラージ (Large) (又は「クレノウ (Klenow)」) フラグメントと、少なくとも 51% 同一、例えば少なくとも 55%、56%、57%、58%、59%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% も同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は当該アミノ酸配列からなる、ポリペプチドが提供される。好ましくは、当該ポリペプチドは単離される。
20

【0013】

T. インディクス DNA ポリメラーゼ I のラージフラグメントは、以下のアミノ酸配列を有する。

【0014】

M G L L K E L P A T K T L S M T R Y E L V L D P D K V K E I V E K A K G A E V
V A I D L E S D T K D P M R G K I V G V S L C F N P P K A Y Y F P F R H E G L E
A Q K Q L P W E A F T H L A S L I E D P S V K K I G H N I K Y D L I I L A R Y G
V T L K G L E G D T M L A S Y L L D P T R R T H G L D E L A E E V L G H T M I F
Y K E V T K E L A K G E S F A R V P L E K A K V Y A C E D A H V T Y L L Y Q Y F
W P K L K E E S L W K V F T E I D R P L I E V L A H M E M V G I K I D T A Y L R
G L S R E M A E K L K E L E E K I Y T L A G E K F N I N S S K Q L G Q I L F E K
L K L P T V K K T P K K T A Y S T D N E V L E E L S A V H E L P R L I L E Y R T
L A K L K S T Y V D A L P K M V N P E T G R L H T S F N Q T V T A T G R L S S S
D P N L Q N I P V R G E E G L K I R Q A F V P E E I F A A D Y T Q I D L R V L A
H Y S G D E T L I K A F W Q G E D I H R R T A A E I F G I P P E E V T P E M R R
M A K T I N F G I V Y G M S P Y G L A K E L K I G R R E A K A F I E R Y F E R Y
P G V K R Y M E Q I V A E A R E K G Y V E T L F G R K R P L P D I N S P N R T A
R E F A E R T A I N T P I Q G T A A D I I K L A M I K I H R I F K E K G F G T R
M L L Q V H D E L I F E A P K E I E E I Q P I V R Q I M E G V V E L K V P L K V
N L A I G K N W A E A K A (配列番号 1)
40

【0015】

さらなる、そして改善された配列解析により確認された、T. インディクス DNA ポリメラーゼ I のラージフラグメントについての別のアミノ酸配列は、以下の配列番号 32 である。

【0016】

M G L L K E L P A T K T L S Y D Q Y E L V L D P D K V K E I V E K A K G A E V
V A I D L E S D T K D P M R G K I V G V S L C F N P P K A Y Y F P F R H E G L E
A Q K Q L P W E A F T H L A S L I E D P S V K K I G H N I K Y D L I I L A R Y G
V T L K G L E G D T M L A S Y L L D P T R R T H G L D E L A E E V L G H T M I F
50

Y K E V T K E L A K G E S F A R V P L E K A K V Y A C E D A H V T Y L L Y Q Y F
 W P K L K E E S L W K V F T E I D R P L I E V L A H M E M V G I K I D T A Y L R
 G L S R E M A E K L K E L E E K I Y T L A G E K F N I N S S K Q L G Q I L F E K
 L K L P T V K K T P K K T A Y S T D N E V L E E L S A V H E L P R L I L E Y R T
 L A K L K S T Y V D A L P K M V N P E T G R L H T S F N Q T V T A T G R L S S S
 D P N L Q N I P V R G E E G L K I R Q A F V P E E I F A A D Y T Q I D L R V L A
 H Y S G D E T L I K A F W Q G E D I H R R T A A E I F G I P P E E V T P E M R R
 M A K T I N F G I V Y G M S P Y G L A K E L K I G R R E A K A F I E R Y F E R Y
 P G V K R Y M E Q I V A E A R E K G Y V E T L F G R K R P L P D I N S P N R T A
 R E F A E R T A I N T P I Q G T A A D I I K L A M I K I H R I F K E K G F G T R 10
 M L L Q V H D E L L F E V P E K E I E E I Q P I V R Q I M E G W E L K V P L K V
 N L A I G K N W A E A K A (配列番号32)

【0017】

この配列は、配列番号1と99%同一である。

【0018】

配列番号32に示される、613アミノ酸残基のT.インディクスDNAポリメラーゼIラージフラグメントの予測分子量は、約69,990ダルトンである。配列番号1に示される、612アミノ酸残基の予測分子量は、約69,820ダルトンである。

【0019】

本発明によるポリペプチドに加わるためのアミノ酸配列は、配列番号32に示される配列と、少なくとも51%同一、例えば、少なくとも55%、56%、57%、58%、59%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%も同一であるアミノ酸配列であってよい。

【0020】

配列同一性割合は、ベース配列として配列番号1又は32を用い、BLASTPコンピュータプログラムを用いて決定することができる。これは、必要に応じて、配列番号1又は32が、それに対して同一性割合が決定される配列であることを意味する。BLASTソフトウェアは、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (2009年2月11日にアクセス可能)で一般に利用可能である。

【0021】

T.インディクスは、深海の熱水噴出口から単離された好熱性無機独立栄養性硫酸塩還元細菌であり、55~80の生育温度範囲、及び70の至適生育温度が報告されている(Moussard等、2004、Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:227-233を参照されたい)。本発明者等は、T.インディクス由来のゲノムDNA(gDNA)を単離し、DNAポリメラーゼIをコードするDNAポリメラーゼA(polA)遺伝子及びそのラージフラグメントをクローニングする、洗練された遺伝子ウォーキング技術を用いている。配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するラージフラグメントは、PCR及びLAMP增幅反応の両方で、これらの反応について様々な好ましいDNAポリメラーゼと比較した場合、驚くほど有効であることが示されている。付近まで温度上昇するPCRにおいて機能する、十分に熱安定なT.インディクスDNAポリメラーゼIラージフラグメントの能力は、この細菌の至適生育温度が70であることによっては予測できないはずである。

【0022】

本発明のポリペプチドは、鎖置換活性を呈してもよい。したがって当該ポリペプチドは、LAMP等の等温增幅反応の実施に適していてもよい。

【0023】

当該ポリペプチドは、追加的に、又は代替的に、PCR等の熱サイクル增幅反応の実施に適していてもよい。

【0024】

10

20

30

40

50

本明細書に記載のポリペプチドは、約613アミノ酸残基長、例えば、約610～約620、約600～約630、約550～約650、又は約500～約750アミノ酸残基長であってよい。

【0025】

当該ポリペプチドは、配列番号1又は32のアミノ酸配列、又は当該ポリペプチドの任意の部分に付加されるか、又は当該部分から除去される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、約20、約30、約40、約50、約100、約200、約250、約260、約270、280、281、282、283、284、285、286、287又は288の連続アミノ酸、及び/又はN末端領域及び/又はC末端領域に付加されるか、又は当該領域から除去される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、約20、約30、約40、約50、約100、約200、約250、約260、約270、280、281、282、283、284、285、286、287又は288アミノ酸を有する配列番号1又は32のアミノ酸配列を含んでなるか、基本的に当該アミノ酸配列からなってよい。

【0026】

ある実施態様によれば、本発明のポリペプチドがN末端Hisタグを含む場合、全長は、619アミノ酸残基であってよい。

【0027】

本発明のさらなる態様によれば、熱安定性DNAポリメラーゼ活性を有し、配列番号2に示されるT.インディクスDNAポリメラーゼIと、少なくとも55%同一、例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%も同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は基本的にこれらからなってよい。好ましくは、本発明の本態様によるポリペプチドは、本発明の第一の態様によるポリペプチドであり、したがって、配列番号1に示されるT.インディクスDNA Iラージフラグメントと少なくとも51%同一である。

【0028】

T.インディクスDNAポリメラーゼIは、以下の全長アミノ酸配列を有する。

【0029】

MAQKSLFPKKLPFKDDKDPIFVIDGSSFVYRAYYAIRGH
LSNRKGGLPTKAVFGFTQMLLKLLREMNPNEYWVCFDAKGPT
FRHEMYKEYKANRPPMPDDLSVQIPYIKEVTRAFGVPILE
IEGFEADDLIAAIATRMRPIVIVGGDKDLFPLISEKVVM
WDPMKDELIDESWIKKRFGIEPKKLLDVRALAGDSIDNVP
GVPGIGEKTAALRILKEYGSLEEVLNHAEEDIKQKRLRENLI
KHAGDALISKKLVELEAKAPIPLEPDFYRKRPPLNALKLRE
LFLELEFKKLLKELPATKTLMSMTRYELVLDPPDKVKIEIVEK
AKGAEVVAIDLESDTKDPMRGKIVGVSLCFNPPKAYYFPF
RHEGLEAQKQLPWEAFTHLASLIEDPSVKKIGHNIKYDLI
ILARYGVTLKGLEGDTMLASYLLDPTRRTHGLDELAEEVL
GHTMIFYKEVTKELAKGESFARVPLEKAKVYACEDAHVTY
LLYQYFWPKLKEESLWKVFTIEDRPLIEVLAHMEMVGIKI
DTAYLRGLSREMAEKLKELEEKIYTLAGEKFNIINSSKQLG
QILFEKLKLPTVKKTPKKTAYSTDNEVLEELSAVHELPRL
ILEYRTLAKLKSTYVDALPKMVNPETGRLHTSFNQTVTAT
GRLSSSDPNLQNI PVRGE EGLKIRQAFVPEEIFAADYQTQI
DLRVLAHYSGDETLIKAFWQGEDIHRRTAAEEIFGIPPEEV
TPEMRRMAKTINF GIVYGMSPYGLAKEELKIGRREAKAFIE
RYFERYPGVKRYMEQIVAEAREKGYVETLFGRKRP LPDIN
SPNRTAREFAERTAINTPIQGTAA DpaikLAMIKIHRIFK
EKGF GT RMLLQVHDELI FEAPEKEIEEIQPIVRQIMEGWE

10

20

30

40

50

L K V P L K V N L A I G K N W A E A K A (配列番号 2)

【0030】

全長 T . インディクス DNA ポリメラーゼ I について、さらなる且つ向上した配列解析により識別される代替のアミノ酸は、以下の配列番号 34 である。

【0031】

MAQKSLFPKKLPFKDDKDPIFVIDGSSFVYRAYYAIRGH
 LSNRKGLPTKAVFGFTQMLLKLLREMNPNEYVWCFDAGPT
 FRHEMYKEYKANRPPMPDDLSSVQIPYIKEVTRAFGVPILE
 IEGFEADDLIAAIATRMERPIVIVGGDKDLFPLISEKWMW
 DPMKDELIDESWIKKRFGIEPKKLLDVRALAGDSIDNVPG 10
 VPGIGEKTLRLIKEYGSLLEEVLNHAEEIKQKRLRENLIK
 HAGDALISKKLVELEAKAPIPLEPDFYRKRPALNALKREL
 FLELEFKKLLKELPATKTLSYDQYELVLDPDFKVKEIVEKA
 KGAEVVAIDLESDTKDPMRGKIVGVSLCFNPPKAYYFPFR
 HEGLEAQKQLPWEAFTHLASLIEDPSVKIOGHNIKYDLII
 LARYGVTLKGLEGDTMLASYLLDPTRRTHGLDELAEEVLG
 HTMIFYKEVTKEAKGESFARVPLEKAKVYACEDAHVTYL
 LYQYFWPKLKEESLWKVFTEIFDRPLIEVLAHMEMVGIKID
 TAYLRGLSREMAEKLKELEEKIYTLAGEKFNFNINSSKQLGQ
 ILFEKLLKLPPTVKKTPKKTAYSTDNEVLEELSAVHELPRLI 20
 LEYRTLAKLKSTYVDALPKMVNPETGRLHTSFNQTVTATG
 RLSSSDPNLQNI PVRGE EGLKIRQAFVPEEIFAADYQTQID
 LRVLAHYSGDETTLIKAFWQGEDIHRRTAAEIFGIPPEEV
 PEMRRMAKTINF GIVYGMSPYGLAKELKIGRREAKAFIER
 YFERYPGVKRYMEQIVAEAREKGYYVETLFGRKRPPLDINS
 PNRTAREFAERTAINTPIQGTAADIK LAMIKIHRIFKEK
 GFGTRMLLQVHDELLFEVPEKEIEEIQPIVRQIMEGVVEL
 KVPLKVNL AIGKNWAEAKA (配列番号 34)

【0032】

この配列は、配列番号 2 と 99.44 % 同一である。 30

【0033】

配列番号 34 に示される、900 アミノ酸残基の T . インディクス DNA ポリメラーゼ I の予測分子量は、約 102,900 ダルトンである。配列番号 2 に示される 900 アミノ酸残基配列の予測分子量は、約 102,850 ダルトンである。

【0034】

本発明によるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列は、配列番号 34 に示される配列と、少なくとも 51 % 同一、例えば少なくとも 52 % 、 53 % 、 54 % 、 55 % 、 56 % 、 57 % 、 58 % 、 59 % 、 60 % 、 65 % 、 70 % 、 75 % 、 80 % 、 85 % 、 90 % 、 91 % 、 92 % 、 93 % 、 94 % 、 95 % 、 96 % 、 97 % 、 98 % 、又は 99 % も同一であるアミノ酸配列であってよい。 40

【0035】

配列同一性割合は、ベース配列として配列番号 2 又は 34 を用い、BLASTP コンピュータプログラムを用いて決定することができる。これは、必要に応じて、配列番号 2 又は 34 が、それに対して同一性割合が決定される配列であることを意味する。

【0036】

ポリペプチドは、配列番号 2 又は 34 のアミノ酸配列、又は当該ポリペプチドの任意の部分に付加されるか、又は当該部分から除去される、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、約 20 、約 30 、約 40 、約 50 、約 100 、約 200 、約 250 、約 260 、約 270 、 280 、 281 、 282 、 283 、 284 、 285 、 286 、 287 又は 288 の連続アミノ酸、及び / 又は N 末端領域及び / 又は

C末端領域に付加されるか、又は当該領域から除去される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、約20、約30、約40、約50、約100、約200、約250、約260、約270、280、281、282、283、284、285、286、287又は288アミノ酸を有する配列番号1又は32のアミノ酸配列を含んでなるか、基本的にこれらからなってもよい。

【0037】

本発明の本態様によるポリペプチドは、T.インディクスから得られ、且つ約102,500～103,500ダルトン（好ましくは、約102,900又は約103,000ダルトン）の分子量を有する単離熱安定性DNAポリメラーゼI、又はその酵素活性フラグメントであってよい。「酵素活性フラグメント」なる用語は、T.インディクスからえら得られ、且つ全長ポリメラーゼのものと比較して、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の酵素活性を有するようなポリメラーゼのフラグメントを意味する。所与の活性は、任意の標準的測定、例えば、所与の時間内に複製できるテンプレート配列のヌクレオチド塩基数により決定してもよい。当業者は、当該特性及び活性を定常的に決定することができる。

【0038】

配列番号1に示されるT.インディクスDNAポリメラーゼIラージフラグメントの残基3～612は、配列番号2に示される全長DNAポリメラーゼIの残基290～900に対応した。配列番号の残基1～2は、配列番号2の配列と比較して、宿主細胞においてラージフラグメントのインビトロ発現をさせるため、人工的に導入される（以下の実施例参照）。同様に、配列番号32に示されるT.インディクスDNAポリメラーゼIラージフラグメントの残基3～613は、配列番号34に示される全長DNAポリメラーゼIの残基290～900に対応した。

【0039】

本発明によるポリペプチドは、本発明のさらなる態様によって、それが追加の機能的又は構造的ドメイン、例えば、親和性精製タグ（His精製タグ等）、又はDNAポリメラーゼ活性向上ドメイン、例えばアーケオグロブス・フルギダス（Archaeoglobus fulgidus）由来の増殖細胞核抗原ホモログ、T3DNAポリメラーゼチオレドキシン結合ドメイン、スルホロブス・ソルファタリカス由来のDNA結合タンパク質Sso7d、Sso7d様タンパク質、もしくはその突然変異体、又はDANトポイソメラーゼV由来のヘリックス・ヘパリン・ヘリックスモチーフ等を含んでなる場合、サイズがより大きくてもよい。DNAポリメラーゼ活性向上ドメインは、Crenarchaeal微生物由来の高度に保存されたタンパク質ドメインが、DNAポリメラーゼの特性を向上させるために有用であることを開示する、同時継続の国際特許出願PCT/GB2009/000063に定義され且つ例示される、Cren7エンハンサードドメイン又はその変異体でもよい。国際特許出願PCT/GB2009/000063は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0040】

本発明のポリペプチドは、DNAポリメラーゼ活性を必要とする1又は複数の反応、例えば、ニックトランスレーション、cDNAクローニングにおける第二鎖cDNA合成、DNA配列決定、PCR等の熱サイクル增幅反応、及び等温增幅反応、例えば、鎖置換増幅（SDA）、核酸配列ベース増幅（NASBA）、自己持続配列複製法（3SR）、及びLAMPからなる群の1又は複数の使用に適していてもよい。

【0041】

本発明によれば、熱安定性5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を有し、且つ配列番号2又は34に示されるT.インディクスDNAポリメラーゼIの残基1～289と、少なくとも55%、例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%も同一であるポリペプチドも提供する。

10

20

30

40

50

【0042】

既知のDNAポリメラーゼとの配列比較に基づくと、ある態様によれば、本発明のポリペプチドは、3' 5'エキソヌクレアーゼ・ブルーフリー-ディング活性を有する。

【0043】

本発明のさらなる態様によれば、ポリペプチドは、熱サイクル増幅反応（例えばPCR）の間、高フィデリティのポリメラーゼ活性を呈する。高フィデリティは、PCRエラー率が、 300×10^6 増幅ヌクレオチド当たり1ヌクレオチド未満、例えば、 250×10^6 、 200×10^6 、 150×10^6 、 100×10^6 又は 50×10^6 増幅ヌクレオチド当たり1ヌクレオチド未満と定義することができる。あるいは、ポリペプチドのエラー率は、 10^6 増幅ヌクレオチド当たり1~300ヌクレオチドの範囲、例えば、 10^6 増幅ヌクレオチド当たり1~200、1~100、100~300、200~300、100~200又は75~200ヌクレオチドでもよい。エラー率は、Kunkel等（1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4865-4869）により定義されるオパール復帰アッセイを用いて決定できる。

【0044】

本発明の別の態様によれば、本明細書に記載のポリペプチドを含んでなる組成物が提供される。当該組成物は、例えば、緩衝剤、反応（DNA増幅反応、例えばPCR又はLAMP等）を実行するための大半又は全ての成分、安定化剤（熱安定性向上のための、E. coli GroELタンパク質）、及び/又の化合物を含んでもよい。

【0045】

本発明は、T.インディクスDNAポリメラーゼIラージフラグメントと同一性を有するポリペプチドをコードする単離核酸をさらに提供する。例えば、当該核酸は、以下に示される配列を有してよい。

【0046】

(5' 3') : atggggccctcttaaaggaaacttccagctactaa
 aacccctttcgatgaccagatacgagctggttcttgaccgg
 gataaagtaaaagaaattgttagaaaaaggccaaaggggccg
 aagtggtggtctattgaccctttagaaagtgtatagaaagacc
 catgcgtgggaaaaatagtaggggtctcgctttgttttaac
 ccgc cccaaagccattattttcccttttagacatgaaggcc
 ttgaggccccaaagcagcttccctggagggccttactca
 tctggccagccctcattgaagacccctcagttaaaaagata
 ggccacaaatatacaagtagatgactttagattttgcgc
 acggcgtaacttaaaggccctttagaaggggataccatgc
 ggcttcgtatctcccttgatccaacacgtcgtagccacggc
 cttgatgagctggccggaaagagggtccctggggcataccatg
 ttttttacaaggaaagttagactaaagaacttggccaaaggaga
 gagctttgcccagggtccctctttagaaaaaggccaaaagttac
 ccctgtgaagacgccccacgttacccatctgccttataat
 atttctggcccaaactcaaaaggaaaggccctctggaaagg
 cttaacggaaattgatcgaccccttaatagaagtttggcc
 cacatggaaatggtaggtatataagatttgacacccgcctatc
 tttagaggactttcgccgagaaatggctgtggaaaagttaaagg
 gctttagaagaaaaatttacacccctggctgggtgaaaaattt
 aatatacaattccagcaaaacttggcccgatatttatttg
 aaaaggctaaaaactccctacggttaaaaagaccccaaaaaaa
 aacggccctattcaacggataacgaagtatttagaggaaactt
 ctgcggtccacgaacttccgcgtctgatactttagtgc
 gaactctggctaaactcaaaatctacttataatgttgc
 cccgaagatggtaatccctgaaaacttggtcgtcttcataact 50

t c c t t t a a c c a g a c g g t t a c g g c c a c t g g a a g a c t t c a a
 g c a g t g a c c c t a a t c t c a a a a t a t t c c t g t g c g t g g t g a
 a g a g g g g c t t a a g a t t c g c c a g g c c t t g t g c c g g a g g a g
 A t t t t t g c t g c c g a t t a c a c t c a g a t c g a t c t g c g a g t t t
 t a g c c c a t t a c t c g g g a g a t g a a a c c t t g a t t a a g g c c t t
 c t g g c a g g g g g a a g a c a t t c a c c g g c g c a c g g c t g c a g a a
 a t t t t t g g t a t c c c g c c a g a a g a a g t a a c t c c t g a g a t g c
 g g c g t a t g g c c a a g a c t a t a a a c t t t g g c a t t g t t a c g g
 c a t g a g t c c t t a c g g t c t g g c g a a a g a a c t c a a a a t t g g c
 c g c c g t g a g g c c a a g g c c t t t a t t g a g c g c t a t t t g a a c
 g c t a c c c a g g t g t g a a a c g c t a t a t g g a a c a a a t c g t g g c
 t g a a g c c c g a g a a a a g g g c t a c g t g g a g a c c c t t t c g g a
 c g c a a a a g g c c t c t c c t g a c a t c a a t a g c c c t a a t c g t a
 c g g c g c g c g a g t t t g c c g a g c g c a c g g c t a t a a a c a c t c c
 t a t t c a g g g g a c a g c c g c t g a t a t t a t c a a g c t c g c c a t g
 a t a a a a a t t c a c c g g a t t t t a a a g a a a a a a g g c t t t g g g a
 c a a g g a t g c t t c a g g t g c a t g a c g a g c t t a t t t t g a
 a g c g c c a a a a a g a g a t t g a a g a a a t c c a g c c a a t t g t c c g a
 c a a a t c a t g g a a g g a g t g g t t g a a t t g a a g g t t c c t c t a a
 a a g t a a a c c t g g c a a t a g g g a a a a a t t g g g c a g a g g c a a a
 g g c a t a a (配列番号3) 10
 【0047】

配列番号3のヌクレオチドは、以下の配列番号1のT.インディクスDNAポリメラーゼIラージフラグメントをコードする。

【0048】

【化1】

1 atgggcctttaaggaaacttccagctactaaaaccctttcgatgaccagatacgagctg
 1 M G L L K E L P A T K T L S M T R Y E L
 61 gttttgaccggataaagtaaaagaattgttagaaaaggccaaaggggccgaagtggtg 30
 21 V L D P D K V K E I V E K A K G A E V V
 121 gctattgacccttggaaagtgatacggaaagacccatgcgtggaaaatagttaggggtctcg
 41 A I D L E S D T K D P M R G K I V G V S

【0049】

【化 2】

181 ctttgtttaacccggccaaaggcctattattcccttttagacatgaaggccttgaggcc
61 L C F N P P K A Y Y F P F R H E G L E A

241 caaaaagcagctccctgggaggcccttactcatctggccagcctcattgaagacccctca
81 Q K Q L P W E A F T H L A S L I E D P S

301 gttaaaaagataggccacaatatcaagatgacttgattattctgctcgctacggcgta
101 V K K I G H N I K Y D L I I L A R Y G V

361 actttaaaggcccttgaagggataccatgctggcttcgtatctccttgcataccacacgt
121 T L K G L E G D T M L A S Y L L D P T R 10

421 cgtacccacggccitgtatggccaaagaggaggtctggggcataccatgatttttac
141 R T H G L D E L A E E V L G H T M I F Y

481 aagaagtgactaaagaactggccaaaggagagacttgcagggcccttgcataaaag
161 K E V T K E L A K G E S F A R V P L E K

541 gcaaaagttaacgcctgtgaagacgcccacgttacccatctgtttatcaatattctgg
181 A K V Y A C E D A H V T Y L L Y Q Y F W

601 cccaaactcaaagggaaagcctctggaaaggcttacggaaattgatgcaccccttaata
201 P K L K E E S L W K V F T E I D R P L I

661 gaagtttggccacatggaaatggtaggttataagattgacaccgcctatcttagagga
221 E V L A H M E M V G I K I D T A Y L R G 20

721 cttdcgcgagaaatggctgaaaaggatggacttacggacttgcagaaaaatttacaccctggct
241 L S R E M A E K L K E L E E K I Y T L A

781 ggtaaaaatttaatatcaattccagcaaacaactggccagattttatggaaagcta
261 G E K F N I N S S K Q L G Q I L F E K L

841 aaactccctacggtaaaaagccccaaaaaaaaacggcctattcaacggataacgaagta
281 K L P T V K K T P K K T A Y S T D N E V

901 ttagaggaacttctggccacgaaactcccgctgtatacttgagtatagaactctg
301 L E E L S A V H E L P R L I L E Y R T L

961 gctaaactcaaacttacttatgttgcgtccatggccatggtaatcctgaaactgg
321 A K L K S T Y V D A L P K M V N P E T G 30

1021 cgtttcataacttcctttaaccagacggttacggccactggaaacttcaagcagtgac
341 R L H T S F N Q T V T A T G R L S S S D

1081 cctaatcttcaaaatattcctgtgcgtggtaagagggcttaagattccgcaggcc
361 P N L Q N I P V R G E E G L K I R Q A F

1141 gtgccggaggagattttgtgcgtggattacactcagatcgatcgcgatggccat
381 V P E E I F A A D Y T Q I D L R V L A H

1201 tactcgggagatgaaacctgtattaaggccttgcagggggaaagacattcaccggcg
401 Y S G D E T L I K A F W Q G E D I H R R

1261 acggctgcagaaaattttgttatccggccagaagaacttgcgtatggcgat
421 T A A E I F G I P P E E V T P E M R R M

1321 gccaagactataaacttggcattgttacggcatgagtccttacggctggcgaaagaa
441 A K T I N F G I V Y G M S P Y G L A K E

【 0 0 5 0 】

【化3】

1381 ctc当地tggccgcccgtgaggccaaggccttattgagcgtatggtaacgctaccca
 461 L K I G R R E A K A F I E R Y F E R Y P

 1441 ggtgtgaaacgctataatggaaacaaatcggtggctgaagcccgagaaaagggtacgtggag
 481 G V K R Y M E Q I V A E A R E K G Y V E

 1501 accctttccggacgc当地aaggccttccctgacatcaatagccctaattcgtacggcgcc
 501 T L F G R K R P L P D I N S P N R T A R

 1561 gagtttgc当地gagcgc当地cgtataaactcctattcagggacagccgtatattatc
 521 E F A E R T A I N T P I Q G T A A D I I 10

 1621 aagctcgccatgataaaaaattcaccggattttaaagaaaaaggcttggacaaggatg
 541 K L A M I K I H R I F K E K G F G T R M

 1681 cttcttcaggtgcatgacgagcttattttgaagc当地aaaaggatgaaagaaatccag
 561 L L Q V H D E L I F E A P K E I E E I Q

 1741 ccaattgtccgacaaaatcatggaaggagtgggtgaattgaaggttccctctaaaagtaaac
 581 P I V R Q I M E G V V E L K V P L K V N

 1801 ctggcaataaggaaaaattgggc当地aggcaaaggcatga (配列番号3)
 601 L A I G K N W A E A K A * (配列番号1).

20

【0051】

あるいは、核酸は、以下に示す配列を有する。

【0052】

(5' 3') : a t g g g c c t c t t a a a g g a a c t t c c a g c t a c t a a
 a a c c c t t c g t a t g a c c a g t a c g a g c t g g t t c t t g a c c c g
 g a t a a a g t a a a a g a a a t t g t a g a a a a a g g c c a a a g g g g c c g
 a a g t g g t g g c t a t t g a c c t t g a a a g t g a t a c g a a a g a c c c
 c a t g c g t g g g a a a a t a g t a g g g g t c t c g c t t t g t t t a a c
 c c g c c c a a a g c c t a t t a t t c c c t t t a g a c a t g a a g g c c 30
 t t g a g g c c c a a a a g c a g c t t c c c t g g g a g g c c t t t a c t c a
 t c t g g c c a g c c t c a t t g a a g a c c c c t c a g t t a a a a a g a t a
 g g c c a c a a t a t c a a g t a t g a c t t g a t t a t t c t t g c t c g c t
 a c g g c g t a a c t t a a a g g g c c t t g a a g g g g a t a c c a t g c t
 g g c t t c g t a t c t c c t t g a t c c a a c a c g t c g t a c c c a c g g c
 c t t g a t g a g c t g g c c g a a g a g g t c c t g g g g c a t a c c a t g a
 t t t t t a c a a g g a a g t g a c t a a a g a a c t t g g c c a a a g g a g a
 g a g c t t t g c c a g g g t c c c t c t t g a a a a a g g c a a a a g t t a c
 g c c t g t g a a g a c g c c c a c g t t a c c t a t c t g c t t t a t c a a t
 a t t t c t g g c c c a a a c t c a a a g a g g g a a a g c c t c t g g a a g g t
 c t t t a c g g a a a t t g a t c g a c c t t a a t a g a a g t t t t g g c c 40
 c a c a t g g a a a t g g t a g g t a t t a a g a t t g a c a c c g c c t a t c
 t t a g a g g a c t t c g c g a g a a a t g g c t g a a a a a g t t a a a g g a
 g c t t g a a g a a a a a a t t a c a c c c t g g c t g g t g a a a a a t t
 a a t a t c a a t t c c a g c a a a c a a c t g g g c c a g a t t t t a t t g
 a a a a g c t a a a a a c t c c c t a c g g t t a a a a a g a c c c c a a a a a
 a a c g g c c t a t t c a a c g g a t a a c g a a g t a t t a g a g g a a c t t
 t c t g c g g t c c a c g a a c t t c c g c g t c t g a t a c t t g a g t a t a
 g a a c t c t g g c t a a a c t c a a a t c t a c t t a t g t t g a t g c c c t
 c c c g a a g a t g g t t a a t c c t g a a a c t g g t c g t c t t c a t a c t 50

t c c t t t a a c c a g a c g g t t a c g g c c a c t g g a a g a c t t c a a
g c a g t g a c c c t a a t c t c a a a a t a t t c c t g t g c g t g g t g a
a g a g g g g c t t a a g a t t c g c c a g g c c t t g t g c c g g a g g a g
a t t t t t g c t g c c g a t t a c a c t c a g a t c g a t c t g c g a g t t
t a g c c c a t t a c t c g g g a g a t g a a a c c t t g a t t a a g g c c t t
c t g g c a g g g g g a a g a c a t t c a c c g g c g c a c g g c t g c a g a a
a t t t t t g g t a t c c c g c c a g a a g a a g t a a c t c c t g a g a t g c
g g c g t a t g g c c a a g a c t a a a c t t t g g c a t t g t t a c g g
c a t g a g t c c t t a c g g t c t g g c g a a a g a a c t c a a a a t t g g c
c g c c g t g a g g c c a a g g c c t t t a t t g a g c g c t a t t t g a a c
g c t a c c c a g g t g t g a a a c g c t a t a t g g a a c a a a t c g t g g c
t g a a g c c c g a g a a a a g g g c t a c g t g g a g a c c c t t t c g g a
c g c a a a a g g c c t c t t c c t g a c a t c a a t a g c c c t a a t c g t a
c g g c g c g c g a g t t t g c c g a g c g c a c g g c t a t a a a c a c t c c
t a t t c a g g g g a c a g c c g c t g a t a t t a t c a a g c t c g c c a t g
a t a a a a a t t c a c c g g a t t t t a a a g a a a a a g g c t t t g g g a
c a a g g a t g c t t c t t c a g g t g c a c g a c g a a c t t c t t t t g a
a g t g c c t g a a a a a g a g a t t g a a g a a a t c c a g c c a a t t g t c
c g a c a a a t c a t g g a a g g a g t g g t t g a a t t g a a g g t t c c t c
t a a a a g t a a a c c t g g c a a t a g g g a a a a a t t g g g c a g a g g c
a a a g g c a t a a (配列番号33)

【0053】

配列番号33のヌクレオチドは、以下の配列番号32のT.インディクスピリメラーゼ
Iラージフラグメントをコードする。

【0054】

【化4】

1 atgggcctcttaaggaacttccagctactaaaacccttcgtatgaccagtagctg
 1 M G L L K E L P A T K T L S Y D Q Y E L

 61 gttttgaccggataaagtaaaagaaattgttagaaaaggccaaaggggccaaagtggtg
 21 V L D P D K V K E I V E K A K G A E V V

 121 gctattgaccttcaaagtgatacggaaagacccatgcgtggaaaatagttaggggtctcg
 41 A I D L E S D T K D P M R G K I V G V S

 181 ctttgttttaaccggccaaagcctattttcccttttagacatgaaggccttggcc
 61 L C F N P P K A Y Y F P F R H E G L E A 10

 241 caaaaaggcagttccctggggaggccttactcatctggccaggcctattgaagacccctca
 81 Q K Q L P W E A F T H L A S L I E D P S

 301 gttaaaaaagataggccacaatatacgtatgacttgattttcttgcgtacggcgta
 101 V K K I G H N I K Y D L I I L A R Y G V

 361 actttaaaggccttgaaggggataccatgctggcgttatcccttgcgtatccaacacgt
 121 T L K G L E G D T M L A S Y L L D P T R

 421 cgtacccacggccttgcgtatgactggccaaaggaggtctggggcataccatgatttttac
 141 R T H G L D E L A E E V L G H T M I F Y

 481 aaggaaagtgactaaagaactggccaaaggagagatgtttgcggggcccttgcgtaaaag
 161 K E V T K E L A K G E S F A R V P L E K 20

 541 gcaaaagttaacgcctgtgaagacgcccacgttacctatctgcattcaatattctgg
 181 A K V Y A C E D A H V T Y L L Y Q Y F W

 601 cccaaactcaaagggaaaggccttgcgggtctttacggaaattgatcgaccccttaata
 201 P K L K E E S L W K V F T E I D R P L I

 661 gaagtttggccacatggaaatggtaggtatataagattgacaccgcctatcttagagga
 221 E V L A H M E M V G I K I D T A Y L R G

 721 ctttcgcgagaaaatggctgaaaagttaaaggagctgtgaagaaaaatttacaccctggct
 241 L S R E M A E K L K E L E E K I Y T L A

 781 ggtaaaaatttaatatacattccagcaaacaactggccagatttatggaaaagcta
 261 G E K F N I N S S K Q L G Q I L F E K L 30

 841 aaactccctacggtaaaaagacccaaaaacggcctattcaacggataacgaagta
 281 K L P T V K K T P K K T A Y S T D N E V

 901 tttagaggaactttctgcggcacgaaacttccgcgtctgataacttgagtatagaactctg
 301 L E E L S A V H E L P R L I L E Y R T L

 961 gctaaactcaaacttacttatgttgcgtatccctccggaaatggtaatcctgaaactgg
 321 A K L K S T Y V D A L P K M V N P E T G

 1021 cgtttcataacttcccttaaccagacgggttacggccactggaaagactttcaaggcgtgac
 341 R L H T S F N Q T V T A T G R L S S S D

【0055】

【化 5】

1081 cctaatcttcaaaatattcctgtgcgttgtgaagaggggcttaagattcgccaggcctt
 361 P N L Q N I P V R G E E G L K I R Q A F

1141 gtgccggaggagattttgcgcattacactcagatcgatctgcgagtttagccat
 381 V P E E I F A A D Y T Q I D L R V L A H

1201 tactcggagatgaaacctgattaaggcctctggcagggggaaagacattcaccggcgc
 401 Y S G D E T L I K A F W Q G E D I H R R R

1261 acggctgcagaaaattttgttatccgcagaagaagtaactcctgagatcgccgtatg
 421 T A A E I F G I P P E E V T P E M R R M

1321 gccaagactataaaactttgcattgttacggcatgagtccttacggcttgcgaaagaa
 441 A K T I N F G I V Y G M S P Y G L A K E

1381 ctcaaaattggccgcgtgaggccaaggccttattgagcgtatattgaacgctaccca
 461 L K I G R R E A K A F I E R Y F E R Y P

1441 ggtgtgaaacgctatatgaaacaaatcgtggctgaagccgagaaaaggctacgtggag
 481 G V K R Y M E Q I V A E A R E K G Y V E

1501 accctttcggacgcaaaaggcctcttgcacataatgcctaatcgatcgccgcgc
 501 T L F G R K R P L P D I N S P N R T A R

1561 gagtttgcgcagcgcacggctataaacactcctattcagggacagccgctgatattatc
 521 E F A E R T A I N T P I Q G T A A D I I

1621 aagctcgccatgataaaaattcaccggattttaaagaaaaaggcttgggacaaggatg
 541 K L A M I K I H R I F K E K G F G T R M

1681 cttttcaggtcacgacaaactctttgaagtgcctgaaaaagagatgaaagaaaatc
 561 L L Q V H D E L L F E V P E K E I E E I

1741 cagccaaattgtccgacaaatcatgaaaggagtggattttaaaggttcctctaaaagta
 581 Q P I V R Q I M E G V V E L K V P L K V

1801 aacctggcaatagggaaaaattgggcagaggcaaaaggcataa (配列番号33)
 601 N L A I G K N W A E A K A * (配列番号32).

10

20

30

〔 0 0 5 6 〕

本発明は、T.インディクス全長DNAポリメラーゼIと同一性を有するポリペプチドをコードする単離核酸をさらに提供する。例えば、当該核酸は、以下に示す配列を有してよい。

【 0 0 5 7 】

(5 ' 3 ') : a t g g c g c a g a a a a g c t t g t t t c c t a a a a a a t t
a c c a t t a a a g a t g a t a a a g a c c c c a t c t t c g t t a t t g a c
g g g a g t t c t t t g t t a c c g g g c t t a c t a t g c c a t a a g a g
g g c a t c t a t c a a a c c g c a a a g g g c t c c c a a c c a a g g c g g t
c t t t g g g t t a c c c a g a t g c i t t a a a g c i f f i g c g t g a g
a t g a a c c c t g a g t a t g t g g t g g t g t g c t t g a c g c c a a a g
g g c c t a c t t t c g c c a c g a g a t g t a c a a a g a a t a c a a a g c
c a a c c g c c c c c c c a t g c c a g a t g a t c t t c c g t c c a g a t t
c c c t a t a t c a a a g a g g t a a c c a g g g c t t t g g a g t c c c t a
t t c t t g a a a t a g a a g g c t t g a a g g c t g a c g a t c t c a t c g c
c g c t a t t g c c a c t c g t a t g g a a a g a c c a a t t g t c a t c g t t
g g t g g a g a t a a a g a t t g t t c c c c c t t a t t c a g a g a a a g
t t g t c a t g t g g g a c c c c a t g a a a g a g a c g a a c t g a t t g a c g a
a a g c t g g a t a a a g a a a c g t t t g g c a t t g a a c c t a a a a g
c t c c t t g a t g t a a g g g c c c c t t g c c c g g c g a t a g c a t t g a t a

40

50

a c g t g c c a g g g g t t c c g g g t a t t g g t g a a a a a a a c g g c c c t
a a g g c t c a t a a a a g a a t a c g g t t c c c t t g a a g a a g t c c t t
a a c c a t g c c g a a g a a a a t a a a a c a a a a a g c g c t t g c g t g a a a
a c c t c a t c a a a c a c g c c g g a g a c g c c c t t a t t c c a a a a a
a c t g g t t g a g c t t g a g g c c a a a g c c c c a a t c c c c t t g a g
c c t g a t t t t a c c g c a a a c g g c c a t t a a a t g c c c t a a a a c
t a a g g g a a c t c t c c t t g a g c t t g a a t t a a a a a g c t c t t
a a a g g a a c t t c c a g c t a c t a a a a c c c t t t c g a t g a c c a g a
t a c g a g c t g g t t c t t g a c c c g g a t a a a g t a a a a g a a a t t g
t a g a a a a g g c c a a a g g g g c c g a a g t g g t g g c t a t t g a c c t
t g a a a g t g a t a c g a a a g a c c c c a t g c g t g g g a a a a t a g t a
g g g g t c t c g c t t g t t t a a c c c g c c a a a g c c t a t t a t t
t c c c t t t a g a c a t g a a g g c c t t g a g g c c a a a a g c a g c t
t c c c t g g g a g g c c t t a c t c a t c t g g c c a g c c t c a t t g a a
g a c c c c t c a g t t a a a a a g a t a g g c c a c a a t a t c a a g t a t g
a c t t g a t t a t t c t t g c t c g c t a c g g c g t a a c t t t a a g g g
c c t t g a a g g g g a t a c c a t g c t g g c t t c g t a t c t c c t t g a t
c c a a c a c g t c g t a c c c a c g g c c t t g a t g a g c t g g c c g a a g
a g g t c c t g g g g c a t a c c a t g a t t t t a c a a g g a a g t g a c
t a a a g a a c t g g c c a a a g g a g a g c t t t g c c a g g g t c c c t
c t t g a a a a g g c a a a a g t t t a c g c c t g t g a a g a c g c c c a c g
t t a c c t a t c t g c t t t a t c a a t t t c t g g c c c a a a c t c c t t g a a
a g a g g a a a g c c t c t g g a a g g t c t t a c g g a a a t t g a t c g a
c c t t t a a t a g a a g t t t g g c c c a c a t g g a a a t g g t a g g t a
t t a a g a t t g a c a c c g c t a t c t t a g a g g a c t t t c g c g a g a
a a t g g c t g a a a a g t t a a g g a g c t t g a a g a a a a a a t t a c
a c c c t g g c t g g t g a a a a a t t a a t a t c a a t t c c a g c c a a c
a a c t g g g c c a g a t t t a t t g a a a a a g c t a a a a c t c c c t a c
g g t t a a a a a g a c c c c a a a a a a c g g c c t a t t c a a c g g a t
a a c g a a g t a t t a g a g g a a c t t t c t g c g g t c c a c g a a c t t c
c g c g t c t g a t a c t t g a g t a t a g a a a c t c t g g c t a a a a c t c a a
a t c t a c t t a t g t g a t g c c c t c c c g a a g a t g g t t a a t c c t
g a a a c t g g t c g t c t t c a t a c t t c c t t a a c c a g a c g g t t a
c g g c c a c t g g a a g a c t t t c a a g c a g t g a c c c t a a t c t t c a
a a a t a t t c c t g t g c g t g g g t g a a g a g g g g c t t a a g a t t c g c
c a g g c c t t t g t g c c c g g a g g a g a t t t g c t g c c g a t t a c a
c t c a g a t c g a t c t g c g a g t t t a g c c c a t t a c t c g g g a g a
t g a a a c c t t g a t t a a g g c c t t c t g g c a g g g g g a a g a c a t t
c a c c g g c g c a c g g c t g c a g a a a t t t g g t a t c c c g c c a g
a a g a a g t a a c t c c t g a g a t g c g g c g t a t g g c c a a g a c a t t
a a a c t t t g g c a t t g t t a c g g c a t g a g t c c t t a c g g t c t g
g c g a a a g a a a c t c a a a a a t t g g c c g c c g t g a g g g c c a a g g c c t
t t a t t g a g c g g c t a t t t g a a c g c t a c c c a g g t g t g a a a a c g
c t a t a t g g a a c a a a t c g t g g c t g a a g c c c g a g a a a a g g g c
t a c g t g g a g a c c c t t t c g g a c g c a a a a a g g c c t c t t c c t g
a c a t c a a t a g c c c t a a t c g t a c g g c g c g c g a g t t t g c c g a
g c g c a c g g c t a a a a c a c a c t c c t a t t c a g g g g a c a g c c g c t
g a t a t t a t c a a g c t c g c c a t g a a a a a t t c a c c g g a t t
t t a a a g a a a a a g g c t t t g g g a c a a g g a t g c t t c t t c a g g t
g c a t g a c g a g c t t t t g a a g c g c c t g a a a a a g a g a g a t t

g a a g a a a t c c a g c c a a t t g t c c g a c a a a t c a t g g a a g g a g
t g g t t g a a t t g a a g g t t c c t c t a a a a g t a a a c c t g g c a a t
a g g g a a a a a t t g g g c a g a g g c a a a g g c a t a a (配列番号4)

【0058】

配列番号4のヌクレオチドは、以下の配列番号2のT.インディクス全長DNAポリメラーゼIをコードする。

【0059】

【化6】

10

```

1 atggctaaaaaagttgtttcctaaaaattaccattaaagatgataaagacccatc
1 M A Q K S L F P K K L P F K D D K D P I

61 ttcgttattgacgggagttctttgtttaccgggcttactatgccataagagggcatcta
21 F V I D G S S F V Y R A Y Y A I R G H L

121 tcaaaccgcaaagggtccaaaccaaggcggtcttgggtttaccagatgtttaaag
41 S N R K G L P T K A V F G F T Q M L L K

181 ctttgcgtgagatgaaccctgagttatgtgggtgtgtttgacgccaaggccact
61 L L R E M N P E Y V V V C F D A K G P T

241 ttccgcacgagatgtacaaagaatacaaaggccaaaccgcggccatgccagatgtctt
81 F R H E M Y K E Y K A N R P P M P D D L

301 tccgtccagattccctatatacaaaggtaaccaggcccttggagttccctattcttggaa
101 S V Q I P Y I K E V T R A F G V P I L E

361 atagaaggcttgaagctgacgatctcatcgccgtattgccactcgatggaaagacca
121 I E G F E A D D L I A A I A T R M E R P

421 atgtcatcggtggagataaagatgtttcccttatttcagagaaagttgtcatg
141 I V I V G G D K D L F P L I S E K V V M

```

20

【0060】

30

【化7】

481 tgggacccatgaaagacgaactgattgacgaaagctggataaagaaacgtttggcatt
 161 W D P M K D E L I D E S W I K K R F G I

541 gaacctaaaaagctccttgcgtatgtgcgtggcccttgcgcgatagcattgataacgtgc
 181 E P K K L L D V R A L A G D S I D N V P

601 ggggttccgggtattgggtaaaaacggccctaaggctataaaaagaataacggttccctt
 201 G V P G I G E K T A L R L I K E Y G S L

661 gaagaagtccttaaccatgccgaagaaataaaacaaaagcgcttgcgtgaaaacctcatc
 221 E E V L N H A E E I K Q K R L R E N L I 10

721 aaacacgcggagacgcgccttattccaaaaactgggtgagcttgcggccaaagccca
 241 K H A G D A L I S K K L V E L E A K A P

781 atcccccttgcgtatttaccgcacggcattaaatgccttaaaactaaggaa
 261 I P L E P D F Y R K R P L N A L K L R E

841 ctcttccttgcgtatttaaaagctctttaaggacttccagctactaaaaccctt
 281 L F L E L E F K K L L K E L P A T K T L

901 tcgatgaccagatacgagctggttcttgaccggataaagtaaaagaaattgttagaaaag
 301 S M T R Y E L V L D P D K V K E I V E K

961 gccaaaggccgaagtgtggctattgacccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 321 A K G A E V V A I D L E S D T K D P M R 20

1021 gggaaaatagtaggggtctcgcttttacccgccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 341 G K I V G V S L C F N P P K A Y Y F P F

1081 agacatgaaggccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 361 R H E G L E A Q K Q L P W E A F T H L A

1141 agcctcattgaagacccctcagttaaaagataggccacaatatacaagtatgtacttgcatt
 381 S L I E D P S V K K I G H N I K Y D L I

1201 attcttgcgtacggcgttaactttaaaggcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 401 I L A R Y G V T L K G L E G D T M L A S

1261 tatctccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 421 Y L L D P T R R T H G L D E L A E E V L 30

1321 ggcataccatgatttttacaaggactgtactaaagaactggccaaaggagagagactt
 441 G H T M I F Y K E V T K E L A K G E S F

1381 gccagggtcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 461 A R V P L E K A K V Y A C E D A H V T Y

1441 ctgctttatcaatatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 481 L L Y Q Y F W P K L K E E S L W K V F T

1501 gaaattgtcgaccttaatagaagttggccacatggaaatggtaggttataagatt
 501 E I D R P L I E V L A H M E M V G I K I

1561 gacaccgcctatcttagaggactttcgcgagaaatggctgaaaatggacttgcgttgcgt
 521 D T A Y L R G L S R E M A E K L K E L E 40

1621 gaaaaaatttacaccctggctggtaaaaaatttataatcaattccagcaacaactggc
 541 E K I Y T L A G E K F N I N S S K Q L G

【0061】

【化8】

1681 cagattttatggaaaagctaaaactccctacggtaaaaagacccaaaaacggcc
 561 Q I L F E K L K L P T V K K T P K K T A
 1741 tattcaacggataacgaagtattagaggaactttctgcggccacgaacttccgcgtctg
 581 Y S T D N E V L E E L S A V H E L P R L
 1801 atacttgagttatagaactctggctaaaactcaaatctactttatgttgcgcctccgaag
 601 I L E Y R T L A K L K S T Y V D A L P K
 1861 atggtaatcctgaaactggcgtcttcatacttccttaaccagacggtaacggccact 10
 621 M V N P E T G R L H T S F N Q T V T A T
 1921 ggaagactttcaaggcgtgaccctaatttcataatattccgtgcgtggtaagaggggg
 641 G R L S S S D P N L Q N I P V R G E E G
 1981 cttaaagattcgccaggccttgcggaggagattttgcgcgattacactcagatc
 661 L K I R Q A F V P E E I F A A D Y T Q I
 2041 gatctgcgagtttagccattactcggagatgaaaccttgcattaggccttcggcag
 681 D L R V L A H Y S G D E T L I K A F W Q
 2101 gggaaagacattcaccggcgcacggctgcagaaattttgtatccgcagaagaagta
 701 G E D I H R R T A A E I F G I P P E E V
 2161 actcctgagatgcggcgtatggccaagactataaacttgcattttacggcatgagt 20
 721 T P E M R R M A K T I N F G I V Y G M S
 2221 cttacggctcggcggaaagaactcaaaattggccggcgtgaggccaaaggccttattgag
 741 P Y G L A K E L K I G R R E A K A F I E
 2281 cgctatttgaacgctacccagggtgtgaaacgctatatggacaaaatcggtggctgaagcc
 761 R Y F E R Y P G V K R Y M E Q I V A E A
 2341 cgagaaaaggcgtacgtggagaccctttcggacgcacggcttgcacatcaat
 781 R E K G Y V E T L F G R K R P L P D I N
 2401 agccctaactcgtaacggcgcgcgagttgcgcgcacggctataaacactcctattcag
 801 S P N R T A R E F A E R T A I N T P I Q
 2461 gggacagccgtgatattatcaagctgcgcattaaaaattcaccggattttaaagaa 30
 821 G T A A D I I K L A M I K I H R I F K E
 2521 aaaggcttggacaaggatgcttcagggtgcatacgagcttattttgaagccct
 841 K G F G T R M L L Q V H D E L I F E A P
 2581 gaaaaagagattgaagaaaatccagccaattgtccgacaaaatcatggaaaggagtggtaa
 861 E K E I E E I Q P I V R Q I M E G V V E
 2641 ttgaaggttctctaaaagtaaacctggcaataggaaaaattggcagaggcaaaggca
 881 L K V P L K V N L A I G K N W A E A K A
 2701 taa (配列番号4)
 901 * (配列番号2).

40

【0062】

あるいは、核酸は以下に示す配列を有する。

【0063】

(5' 3') : a t g g c g c a g a a a a g c t t g t t c c t a a a a a a t t
 a c c a t t t a a a g a t g a t a a a g a c c c c a t c t t c g t t a t t g a c
 g g g a g t t c t t t g t t a c c g g g c t t a c t a t g c c a t a a g a g
 g g c a t c t a t c a a a c c g c a a a g g g c t c c c a a c c a a g g c g g t
 c t t t g g g t t t a c c c a g a t g c t t t a a a g c t t t g c g t g a g
 a t g a a c c c t g a g t a t g t g g t g g t g c t t t g a c g c c a a a g
 g g c c t a c t t t c g c c a c g a g a t g t a c a a a g a a t a c a a a g c 50

ca a c c g c c c c c c a t g c c a g a t g a t c t t c c g t c c a g a t t
c c c t a t a t c a a a g a g g t a a c c a g g g c c t t g g a g t c c c t a
t t c t t g a a a t a g a a g g c t t g a a g c t g a c g a t c t c a t c g c
c g c t a t t g c c a c t c g t a t g g a a a g a c c a a t t g t c a t c g t t
g g t g g a g a t a a a g a t t g t t c c c c t t a t t c a g a g a a a g
t t g t c a t g t g g g a c c c a t g a a a g a c g a a c t g a t t g a c g a
a a g c t g g a t a a a g a a a c g t t t g g c a t t g a a c c t a a a a a g
c t c c t t g a t g t a a g g g c c t t g c c g g c g a t a g c a t t g a t a
a c g t g c c a g g g g t t c c g g g t a t t g g t g a a a a a a c g g c c c t
a a g g c t c a t a a a a g a a t a c g g t t c c c t t g a a g a a g t c c t t 10
a a c c a t g c c g a a g a a a t a a a a c a a a a g c g c t t g c g t g a a a
a c c t c a t c a a a c a c a c g c c g g a g a c g c c c t t a t t c c a a a a a
a c t g g t t g a g c t t g a g g c c a a a g c c c c a a t c c c c t t g a g
c c t g a t t t t a c c g c a a a c g g c c a t t a a t g c c c t a a a c
t a a g g g a a c t c t c c t t g a g c t t g a a t t t a a a a g c t c t t
a a a g g a a c t t c c a g c t a c t a a a a c c c t t c g t a t g a c c a g
t a c g a g c t g g t t c t t g a c c c g g a t a a a g t a a a a g a a a t t g
t a g a a a a g g c c a a a g g g g c c g a a g t g g t g g c t a t t g a c c t
t g a a a g t g a t a c g a a a g a c c c a t g c g t g g g a a a a t a g t a
g g g g t c t c g c t t g t t t a a c c c g c c c a a a g c c t a t t a t t
t c c c t t t a g a c a t g a a g g c c t t g a g g c c c a a a a g c a g c t 20
t c c c t t g g g a g g c c t t a c t c a t c t g g c c a g c c t c a t t g a a
g a c c c c t c a g t t a a a a g a t a g g c c a c a a t a t c a a g t a t g
a c t t g a t t t c t t g c t c g c t a c g g c g t a a c t t t a a a g g g
c c t t g a a g g g g a t a c c a t g c t g g c t t c g t a t c t c c t t g a t
c c a a c a c g t c g t a c c c a c g g c c t t g a t g a g c t g g c c g a a g
a g g t c c t g g g g c a t a c c a t g a t t t t a c a a g g a a g t g a c
t a a a g a a c t g g c c a a a g g g a g a g a g c t t t g c c a g g g t c c c t
c t t g a a a a g g c a a a a g t t t a c g c c t g t g a a g a c g c c c a c g
t t a c c t a t c t g c t t t a t c a a t t t c t g g c c c a a a c t c a a 30
a g a g g a a a g c c t c t g g a a g g t c t t t a c g g a a a t t g a t c g a
c c t t t a a t a g a a g t t t g g c c c a c a t g g a a a t g g t a g g t a
t t a a g a t t g a c a c c g c c t a t c t t a g a g g a c t t t c g c g a g a
a a t g g c t g a a a a g t t a a a g g a g c t t g a a g a a a a a a a t t a c
a c c c t g g c t g g t g a a a a a t t a a t a t c a a t t c c a g c a a a c
a a c t g g g c c a g a t t t t a t t g a a a a a g c t a a a a c t c c c t a c
g g t t a a a a a g a c c c c a a a a a a a c g g c c t a t t c a a c g g a t
a a c g a a g t a t t a g a g g a a c t t t c t g c g g t c c a c g a a c t t c
c g c g t c t g a t a c t t g a g t a t a g a a c t c t g g c t a a a c t c a a
a t c t a c t t a t g t g a t g c c c t c c c g a a g a t g g t t a a t c c t
g a a a c t t g g t c g t c t t c a t a c t t c c t t a a c c a g a c g g t t a 40
c g g c c a c t t g g a a g a c t t c a a g c a g t g a c c c t a a t c t t c a
a a a t a t t c c t g t g c g t g g g t g a a g a g g g g c t t a a g a t t c g c
c a g g c c t t t g t g c c g g a g g a g a t t t g c t g c c g a t t a c
c t c a g a t c g a t c t g c g a g t t t a g c c c a t t a c t c g g g a g a
t g a a a c c t t g a t t a a g g c c t t c t g g c a g g g g g a a g a c a t t
c a c c g g c g c a c g g c t g c a g a a a t t t t g g t a t c c c g c c a g
a a g a a g t a a c t c c t g a g a t g c g g c g t a t g g c c a a g a c a t t
a a a c t t t g g c a t t g t t a c g g c a t g a g t c c t t a c g g t c t g
g c g a a a g a a c t c a a a a t t g g c c g c g t g a g g g c c a a g g c c t 50

t t a t t g a g c g c t a t t t g a a c g c t a c c c a g g t g t g a a a c g
 c t a t a t g g a a c a a a t c g t g g c t g a a g c c c g a g a a a a g g g c
 t a c g t g g a g a c c c t t t c g g a c g c a a a a g g c c t c t c c t g
 a c a t c a a t a g c c c t a a t c g t a c g g c g c g a g t t t g c c g a
 g c g c a c g g c t a a a a c a c t c c t a t t c a g g g g a c a g c c g c t
 g a t a t t a t c a a g c t c g c c a t g a t a a a a a t t c a c c g g a t t
 t t a a a g a a a a a g g c t t t g g g a c a a g g a t g c t t c t c a g g t
 g c a c g a c g a a c t c t t t g a a g t g c c t g a a a a a g a g a t t
 g a a g a a a t c c a g c c a a t t g t c c g a c a a a t c a t g g a a g g a g
 t g g t t g a a t t g a a g g t t c c t c t a a a a g t a a a a c c t g g c a a t
 a g g g a a a a a t t g g g c a g a g g c a a a g g c a t a a (配列番号35)
 【0064】

配列番号35のヌクレオチドは、以下の配列番号34のT.インデックス全長DNAボリメラーゼIをコードする。

【0065】

【化9】

1 atggcgcagaaaagcttgcctaaaaattaccatcaaagatgataaagacccatc
 1 M A Q K S L F P K K L P F K D D K D P I
 61 ttcgttattgacgggagttctttgtttaccggctactatgccataagagggcatcta
 21 F V I D G S S F V Y R A Y Y A I R G H L
 121 tcaaaccgcaaaggcgtccaaaccaaggcggtctttgggtttaccagatgctttaaag
 41 S N R K G L P T K A V F G F T Q M L L K
 181 ctttgctgagatgaaccctgagttgtgggtgtgtcttgcgcctaaaggccact
 61 L L R E M N P E Y V V V C F D A K G P T

【0066】

10

20

30

【化10】

241 tttcgccacgagatgtacaaagaatacaaagccaaacggccccccatgccagatgtatctt
 81 F R H E M Y K E Y K A N R P P M P D D L

301 tccgtccagattccctatatacaaagaggttaaccaggcccttggagtccttattcttggaa
 101 S V Q I P Y I K E V T R A F G V P I L E

361 atagaaggctttaagctgacgatctcatcgccgtattgccactcgatggaaagacca
 121 I E G F E A D D L I A A I A T R M E R P

421 attgtcatcggtggagataaaagattgttcccttatttcagagaaagtgtcatg
 141 I V I V G G D K D L F P L I S E K V V M 10

481 tgggacccatgaaagacgaactgattgacgaaagctggataaaagaaacgtttggcatt
 161 W D P M K D E L I D E S W I K K R F G I

541 gaacctaaaaagctcttgcgttaagggccctgccccgatagcattgataacgtgcca
 181 E P K K L L D V R A L A G D S I D N V P

601 ggggtccgggtattggtaaaaaacggccctaaggctataaaagaataacggttccctt
 201 G V P G I G E K T A L R L I K E Y G S L

661 gaagaagtcccttaaccatgccgaagaaataaaacaaaagcgcttgcgtaaaaacctcatc
 221 E E V L N H A E E I K Q K R L R E N L I

721 aaacacgccccgagacgcccattttccaaaaactgggtgagcttgaggccaaagcccc
 241 K H A G D A L I S K K L V E L E A K A P 20

781 atcccccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 261 I P L E P D F Y R K R P L N A L K L R E

841 ctcttccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 281 L F L E L E F K K L L K E L P A T K T L

901 tcgtatgaccagtacgagctggttcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 301 S Y D Q Y E L V L D P D K V K E I V E K

961 gccaaaggggccgaagtggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 321 A K G A E V V A I D L E S D T K D P M R

1021 gggaaaatagtaggggtctcgcttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 341 G K I V G V S L C F N P P K A Y Y F P F 30

1081 agacatgaaggcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 361 R H E G L E A Q K Q L P W E A F T H L A

1141 agcctcattgaagccccctcagttaaaagataggccacaatatacaagtatgacttgcgt
 381 S L I E D P S V K K I G H N I K Y D L I

1201 attcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 401 I L A R Y G V T L K G L E G D T M L A S

1261 tatctcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 421 Y L L D P T R R T H G L D E L A E E V L

1321 gggcataccatgatttttacaaggaagtgcataaaagaactggccaaaggagagagctt
 441 G H T M I F Y K E V T K E L A K G E S F 40

【0067】

【化11】

1381 gccagggtcccttggaaaaggcaaaagttaacgcctgtgaagacgcccacgttacat
 461 A R V P L E K A K V Y A C E D A H V T Y

1441 ctgcatttatcaatattctggccaaactcaaagaggaaagcccttggaaaggctttacg
 481 L L Y Q Y F W P K L K E E S L W K V F T

1501 gaaattgtatcgaccttaatagaagtttggccacatggaaatggtaggtattaagatt
 501 E I D R P L I E V L A H M E M V G I K I

1561 gacaccgcctatcttagaggacttcgcgagaaatggctggaaatggagcttggaa 10
 521 D T A Y L R G L S R E M A E K L K E L E

1621 gaaaaaaatttacaccctggctggaaaaatttaatataatcaattccagcaaacaactgggc
 541 E K I Y T L A G E K F N I N S S K Q L G

1681 cagattttatttggaaaagctaaaactccctacgggaaaaagccccaaaaaaaaacggcc
 561 Q I L F E K L K L P T V K K T P K K T A

1741 tattcaacggataacgaagtatttagaggaacttgcgcgtccacgaacttccgcgtctg
 581 Y S T D N E V L E E L S A V H E L P R L

1801 atacttgagtatagaactctggctaaactcaaactacttatgttcatgttgcctccgaag
 601 I L E Y R T L A K L K S T Y V D A L P K

1861 atggtaatcctgaaactggcttcatacttccttaaccagacggttacggccact 20
 621 M V N P E T G R L H T S F N Q T V T A T

1921 ggaagacttcaagcagtgaccctaatttcataatccctgtgcgtggtaagagggg
 641 G R L S S S D P N L Q N I P V R G E E G

1981 cttaagattcgcaggccattgtgcggaggattttgcgtccattacactcagatc
 661 L K I R Q A F V P E E I F A A D Y T Q I

2041 gatctgcgagtttagccattactcgggagatggaaaccttgcattacggccatg
 681 D L R V L A H Y S G D E T L I K A F W Q

2101 gggaaagacattcacggcgacggctgcagaaattttgtatcccggcagaagaagta
 701 G E D I H R R T A A E I F G I P P E E V

2161 actcctgagatgcggctatggcaagactataaacttgcattttacggcatgagt 30
 721 T P E M R R M A K T I N F G I V Y G M S

2221 ccttacggctggcgaaagaactcaaaattggcccggtgaggccaaaggctttattgag
 741 P Y G L A K E L K I G R R E A K A F I E

2281 cgctatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 761 R Y F E R Y P G V K R Y M E Q I V A E A

2341 cgagaaaagggtacgtggagaccctttcgacgcggaaaaggcttgcgttgcgt
 781 R E K G Y V E T L F G R K R P L P D I N

2401 agccctaattcgtaacggcgcgagttgcgcgcacggctataaactcctattcag
 801 S P N R T A R E F A E R T A I N T P I Q

2461 gggacagccgtgtatattcaagctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 821 G T A A D I I K L A M I K I H R I F K E

2521 aaaggcttggacaaggatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 841 K G F G T R M L L Q V H D E L L F E V P

【0068】

【化12】

```

2581 gaaaaagagattgaagaaatccagccaaattgtccgacaaatcatggaaggagtggttgaa
861 E K E I E E I Q P I V R Q I M E G V V E

2641 ttgaagggttcctctaaaagtaaacctggcaataggaaaaattgggcagaggcaaaggca
881 L K V P L K V N L A I G K N W A E A K A

2701 taa (配列番号35)
901 * (配列番号34).

```

10

【0069】

以下に規定するような核酸の変異体も、本発明に包含される。

本明細書に記載される単離核酸を含んでなるベクターがさらに提供される。

本発明の核酸又はベクターで形質転換された宿主細胞が、さらに提供される。

宿主細胞由来の組換えポリペプチド発現も、本発明に包含される。

【0070】

本発明の別の態様によれば、本明細書に記載のポリペプチド、及び／又は本明細書に記載の組成物、及び／又は本明細書に記載の単離核酸、及び／又は本明細書に記載のベクター、及び／又は本明細書に記載の宿主細胞を、包装材料と一緒に含んでなるキットを提供する。当該キットは、例えば、PCR又はLAMP等、DNAポリメラーゼ活性を必要とする反応を行うためのポリペプチドを含む成分を含んでよい。

20

【0071】

本発明は、例えばPCR等の熱サイクル反応を用いる標的核酸の配列を増幅する方法であって、

(1) 前記標的核酸を、本明細書に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドと接触させるステップ；及び

(2) 前記標的核酸を、当該標的核酸を増幅させる熱サイクル反応条件下、前記ポリペプチドと一緒にインキュベートするステップ、

を含んでなる方法を提供する。

30

【0072】

本発明の別の態様は、等温反応、例えばLAMPを用いる標的核酸の配列を増幅する方法であって、

(1) 前記標的核酸を、本明細書に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドと接触させるステップ；及び

(2) 前記標的核酸を、当該標的核酸を増幅させる熱サイクル反応条件下、前記ポリペプチドと一緒にインキュベートするステップ、

を含んでなる方法を包含する。

【0073】

本発明はまた、本明細書に記載のポリペプチドの構造的変異体も包含する。本明細書で使用する場合、「変異体」なる用語は、ポリペプチドであって、ここでアミノ酸配列は、それが由来するベース配列とは、配列内の1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている点で異なるポリペプチドを意味する。アミノ酸置換は、あるアミノ酸が広義で類似する特性を有する異なるアミノ酸で置き換えられる場合、「保存的」であるとみなされる。非保存的置換は、アミノ酸が、異なるタイプのアミノ酸で置き換えられる場合のことを言う。

40

【0074】

「保存的置換」は、同じクラスの別のアミノ酸によるアミノ酸置換を意味し、ここで当該クラスは、以下の通りに定義される。

【0075】

50

【表1】

種類	<u>アミノ酸例</u>
無極性	A, V, L, I, P, M, F, W
非荷電極性	G, S, T, C, Y, N, Q
酸性：	D, E
塩基性：	K, R, H.

10

【0076】

当該技術分野における当業者に周知であるように、保存的置換によりペプチドの一次構造を変更することは、ペプチドの活性を実質的に変更させなくてもよい。それは、配列に挿入されるアミノ酸側鎖が、置換されたアミノ酸側鎖と類似する結合及び接触を形成できる可能性があるためである。これは、当該置換がペプチド立体配座の決定において決定的な領域内にある場合であっても、そうである。

【0077】

DNA結合ドメインポリペプチドの機能を干渉しない非保存的置換を提供することができる。

20

【0078】

概して、ポリペプチドの生物学的活性を変更することなしに、より少ない非保存的置換が可能となるはずである。任意の置換（及び、実際には、任意のアミノ酸の欠失又は挿入）の効果の決定は、変異体ポリペプチドが、本発明の熱安定性DNAポリメラーゼ活性を保持するかを容易に決定できる当業者の、完全に定常的能力の範囲内である。例えば、ポリペプチドの変異体が本発明の範囲内であるかを決定する場合、当業者は、当該変異体が、酵素活性（すなわち、ポリメラーゼ活性）を、非変異体ポリペプチドの、少なくとも60%、好ましくは70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%保持するかを決定するはずである。活性は、例えば、所与の時間で複製できるテンプレート配列の塩基数等の、任意の標準的測定により測定できる。

30

【0079】

好適には、変異体は、配列番号1、2、32又は34のいずれかの配列と、少なくとも55%同一、60%同一、65%同一、例えば、少なくとも70%又は75%同一、例えば、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%も同一である配列を有することができる。

【0080】

例えば、本発明には、熱安定性DNAポリメラーゼ活性を有し、且つ配列番号1、2、32又は34のアミノ酸配列と共に、N-又はC-末端から削除された最大約3分の1のアミノ酸を含んでなるか、もしくは基本的にそれらからなる、又はかかる配列と少なくとも55%配列同一性を有するポリペプチドを包含する。例えば、最大約300アミノ酸が、配列番号2又は34のN-又はC-末端のいずれかから除去されてもよく；最大約205アミノ酸が、配列番号1又は32のN-又はC-末端のいずれかから除去されてもよい。

40

【0081】

標準的な遺伝子コード、さらにポリペプチドをコードする核酸を用いることは、当業者に容易に想到且つ製造されることができる。当該核酸は、DNA又はRNAであってもよく、それがDNA分子である場合、例えばcDNA又はゲノムDNAを含んでもよい。

【0082】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする変異体核酸を包含する。核酸配列との関

50

連で「変異体」なる用語は、基本配列によりコードされるポリペプチドと、少なくとも同じ特性を呈するポリヌクレオチドによりコードされる得られたポリペプチド配列を提供するポリヌクレオチド配列からの、1又は複数の核酸の任意の置換、変動、改変、置き換え、欠失、又は当該配列への1又は複数の核酸の付加を意味する。したがって、当該用語には、対立遺伝子変異体が含まれ、そしてまた、本発明のポリヌクレオチド配列と実施的にハイブリダイズするポリヌクレオチドが含まれる。当該ハイブリダイゼーションは、低ストリンジエンシーと高ストリンジエンシー条件で、又はその間で発生してよい。一般的な用語では、低ストリンジエンシー条件は、洗浄ステップが、0.330～0.825 M NaCl緩衝溶液中、プローブ配列の計算又は実際の融解温度(T_m) (例えば、およそ環境実験室温度から約55) 未満である約40～48の温度で行い、一方、高ストリンジエンシー条件では、洗浄は、0.0165～0.0330 M NaCl緩衝溶液中、プローブの計算又は実際の T_m (例えば、約65) 未満である約5～10の温度での洗浄が必要である。緩衝溶液は、例えば、SSC緩衝剤 (0.15 M NaCl及び0.015 M tris-クエン酸ナトリウム) でよく、低ストリンジエンシー洗浄は、3×SSC緩衝剤で行い、且つ高ストリンジエンシー洗浄は、0.1×SSC緩衝剤で行う。核酸配列のハイブリダイゼーションに必要なステップは、例えばSambrook等 (1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor) に記載がある。

【0083】

典型的には、変異体は、本発明の核酸配列と同様に、ヌクレオチドの55%以上、典型的には、60%、65%、70%、80%、85%、又はさらに90%、95%、98%、又は99%又はそれ以上の配列同一性を有する。

【0084】

本発明の変異体核酸は、特定の宿主細胞における発現のために最適化コドンであってよい。

【0085】

本発明のDNAポリメラーゼ及び核酸は、従来の合成器を用いて合成的に調製できる。あるいは、これらを、組換えDNA技術を用いて調製しても、又は所望の場合は、任意の化学修飾を行った天然の供給源から単離してもよい。これらの場合、キメラタンパク質をコードする核酸は、その後好適な宿主細胞、例えばE.coli等の原核生物細胞を形質転換するために使用される好適な発現ベクターに組み込まれる。当該形質転換宿主細胞は、培養され、そしてタンパク質がそれから単離される。このタイプのベクター、細胞及び方法は、本発明のさらなる態様を形成する。

【0086】

ヌクレオチドとアミノ酸配列との間の配列同一性は、当該配列のアラインメントを比較することにより決定できる。比較される配列における同等の位置が同じアミノ酸又は塩基で占められると、当該分子はその位置で同一である。同一性割合としてアラインメントのスコア付けは、比較される配列によって共有される位置での同じアミノ酸又は塩基の数の関数である。配列を比較する場合、最適なアラインメントは、配列における可能な挿入及び欠失を考慮するため、1又は複数の配列に導入されるギャップを必要としてよい。配列比較法は、比較される配列における同一分子の同数について、2つの比較配列間のより高い同系性を反映する、可能な限り小数のギャップを有する配列アラインメントが、多数のギャップを有するものよりも高いスコアに到達するような、ギャップペナルティを使用できる。最大の同一性割合の計算には、ギャップペナルティを考慮した最適アラインメントの作製が必要である。

【0087】

上記のBLASTプログラムに加え、配列比較を行うためのさらに好適なコンピュータプログラムが、市販及び公開の部門において広く利用可能である。例には、MatGatプログラム (Campanella等、2003, BMC Bioinformatics 4: 29)、Gapプログラム (Needleman & Wunsch, 1970, J

. Mol. Biol. 48; 443-453) 及び FASTA プログラム (Altschul 等, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410) がある。Mat GAT バージョン 2.03 は、ウェブサイト <http://bitincka.com/ledion/matgat/> (2009 年 2 月 11 日にアクセスした) から無料で利用可能であり、且つこれは、Indiana University Biology Archive (IUBIO Archive) へ公共配布として提出されてもいる。Gap 及び FASTA は、以前から GCG Wisconsin パッケージとして知られている、Accelrys GCG パッケージ バージョン 11.1 (Accelrys, Cambridge, UK) の一部として利用できる。あるいは、FASTA プログラムは、European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/fasta>) (2009 年 2 月 11 日にアクセスした) 及び University of Virginia (<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta-www/2/list2.shtml>、2009 年 2 月 11 日にアクセスした) へ一般にアクセス可能である。FASTA は、所与の配列を有する配列データベースを調査するか、又は 2 つの所与の配列を比較するために使用できる (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta-www/cgi/search_frm2.cgi を参照されたい、2009 年 2 月 11 日にアクセスした)。典型的には、配列を比較する場合、コンピュータプログラムにより設定されるデフォルトパラメータを使用すべきである。当該デフォルトパラメータは、比較される配列のタイプと長さによって変化させてもよい。Mat GAT プログラムを用いる配列比較は、DNA について、スコアリング・マトリクス = Blosum50、ファースト・ギャップ = 16、エクステンディング・ギャップ = 4、及びタンパク質について、スコア・マトリクス = Blosum50、ファースト・ギャップ = 12、エクステンディング・ギャップ = 2 のデフォルトパラメータを使用してよい。FASTA プログラムを用いる比較は、Ktup = 2、スコアリング・マトリクス = Blosum50、ギャップ = -10 及び ext = -2 のデフォルトパラメータを使用してよい。
10

【0088】

本発明のある態様によれば、配列同一性は、上記のデフォルトパラメータを用いる Mat GAT プログラムバージョン 2.03 を用いて決定される。

【0089】

本明細書で使用される場合、「DNA ポリメラーゼ」は、テンプレート等の DNA 等の核酸を用いるヌクレオチド鎖へのヌクレオチド単位の付加により、ポリヌクレオチド合成を触媒する任意の酵素のことを言う。当該用語には、遺伝子的改変によるか、又は化学的修飾によるか、又は他の当該技術分野で既知の方法によるかにかかわらず、天然の核酸ポリメラーゼの任意の変異体及び組換え機能的誘導体が含まれる。
30

【0090】

本明細書で使用される場合、「熱安定性」DNA ポリメラーゼ活性は、例えば、DNA ポリメラーゼの非熱安定性状態と比較して、比較的に熱に対して安定であり、且つ例えば、45~100、好ましくは 55~100、65~100、75~100、85~100 又は 95~100 の高温で機能する DNA ポリメラーゼ活性を意味する。

【実施例】

【0091】

サーモデサルファテーター・インディクスの寒天プレート培養物を、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; 受託番号 DSM 15286) から入手した。以下に記載の通り、当該培養物から gDNA の抽出及び増幅後、以下に概説する遺伝子ウォーキング法を用い、DNA ポリメラーゼ A 遺伝子 (DNA ポリメラーゼ I をコードする「DNA pol A」) の予想される 5' 開始及び 3' 停止に到達した。DNA ポリメラーゼ I のラージ (又はクレノウ) フラグメントは、PCR 及び LAMP の両反応において非常に有効であることがわかった。
40
50

【0092】

実施例1 ゲノムDNA抽出

T.インディクス培養物からのゲノムDNA抽出のための方法は、Gottz等(2002, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1349-1359)に基づくが、これは、Ausubel等(1994; *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York)に記載される方法の修正法である。

【0093】

細胞ペレットを、567μlの1×TE緩衝剤(10mM Tris/HCl, pH 8.0; 1mM EDTA)、7.5% Chelex 100(Sigma)、50mM EDTA(pH 7.0)、1%(w/v) SDS及び200μg プロテイナーゼK中に再懸濁し、そして50℃で1時間、低速回転でインキュベートした。Chelexを遠心分離により除去した。その後、100μlの5M NaCl及び0.7M NaCl中の80μlの10%(w/v)臭化セチルトリメチルアンモニウムを、当該細胞溶解物に添加し、このサンプルを65℃で30分インキュベートした。DNAをフェノール/クロロホルム抽出し、イソプロパノール沈殿をし、そして当該DNAを水に再懸濁した。DNA濃度は、1%アガロースゲルで見積もった。

【0094】

実施例2 DNA pol A遺伝子の初期スクリーニング

スクリーニング方法は、Shandilya等(2004, *Extremophile* 8:243-251)に基づいた。

【0095】

縮重pol AプライマーPol AT F 1及びPol ATR(以下を参照されたい)を用いて、~570bpのフラグメントを、10ngのT.インディクスgDNAから増幅した。

【0096】

Pol AT F 1プライマーは、以下の配列を有する:

5' - C A T T T T T G C T G C C G A T T A y w s n c a r a t h g a - 3' (配列番号5) ; 及び

Pol ATRプライマーは以下の配列を有する:

5' - A A C C G C G A A G T T T T A T T y r a g y a g y a c - 3' (配列番号6)。

【0097】

PCR反応ミックスは以下の通りである。

【0098】

【表2】

10x PCR 緩衝剤	10μl	
(750mM Tris-HCl, pH8.8, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% (v/v) Tween-20)		40
5mM dNTP's	2μl	
5'プライマー(10pM/μl)	2.5μl	
3'プライマー(10pM/μl)	2.5μl	
gDNA	10ng	
Taq DNA ポリメラーゼ(5u/μl)	0.25μl	
水	50μlに調整	

【0099】

P C R サイクル条件は、94で4分の初期変性、その後、94で10秒の変性、42で30秒のアニーリング、72で30秒の伸長、を45サイクル行った。72で7分の最終伸長を行い、4に保った。

【0100】

~570 bp 増幅産物を、T A クローニングし (Invitrogen p C R 2.1 キット、カタログ番号 K 2 0 0 0 - 0 1)、そして M 1 3 順方向プライマー (5' - T G T A A A A C G A C G G C C A G T - 3') (配列番号 7) 及び逆方向プライマー (5' - A G C G G A T A A C A A T T T C A C A C A G G A - 3') (配列番号 8) を用いて、A B I - 3 1 0 0 D N A シーケンサーで配列決定した。配列決定データから 10 、当該フラグメントが D N A ポリメラーゼ A (D N A p o l A) 遺伝子であることを確認した。

【0101】

実施例 3 D N A p o l A 遺伝子ウォーキング

実施例 2 で得られた増幅産物から、T. インディクス g D N A が「歩行し (w a l k a l o n g) 」、 D N A p o l A 遺伝子の 5' 開始及び 3' 停止に到達するよう、プライマーを設計した。

【0102】

10 ng g D N A を、10 μ l 反応容量中の 5 u の様々な 6 塩基対 - カッター制限エンドヌクレアーゼで個別に消化し、そして 37 で 3 時間インキュベートした。各々に特有の 6 - カッター制限酵素 (R E) を用い、12 の個別の消化反応を行った。その後、5 μ l 消化テンプレートを、50 μ l 反応容量中 12.5 u の T 4 D N A リガーゼ、1 μ l 10 \times リガーゼ緩衝剤を用いて、16 でインキュベーションし、セルフライゲーションさせた。 20

【0103】

その後、セルフライゲーションした D N A を、P C R の 2 つのラウンドでテンプレートとして使用した。図 1 に示すように、P C R の第一ラウンドは、プライマー 2 及び 3 (以下を参照されたい) を使用し、第二ラウンド (ネスト化ラウンド) は、プライマー 1 及び 4 (以下を参照されたい) を使用し、増幅に特異性を与えた。

【0104】

第一ラウンド P C R :

第一ラウンド P C R 反応ミックスは、以下の通りとした。

【0105】

【表 3】

セルフ-ライゲーション反応 (~100 pg/ μ l D N A)	2 μ l
10x PCR 緩衝剤	5 μ l
(200 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% (v/v) Triton X-100,	
20 mM MgSO ₄	
5 mM dNTP's	2 μ l
プライマー 2	25 pM
プライマー 3	25 pM
Taq/Pfu (20:1) (5 u/ μ l)	1.25 u
水	50 μ l に調整

【0106】

サイクル条件は、94で4分の初期変性、その後、94で10秒の変性、55で10秒のアニーリング、72で5分の伸長、を35サイクル行った。72で7分の最終伸長を行い、4に保った。

【0107】

プライマー2 [15286_2_(pos. 2085)]は、以下の配列を有する：

5' - AATCAAGGTTCATCTCCCCG - 3' (配列番号9)；及び

プライマー3 [15286_3_(pos. 2453)]は、以下の配列を有する：

5' - TATTCAGGGGACAGCCGCTG - 3' (配列番号10)。

【0108】

第二ラウンド(ネスト化)PCR：

10

第二ラウンドPCR反応ミックスは、以下の通りとした。

【0109】

【表4】

第1ラウンド PCR 反応物	1 μ l	
10x PCR 緩衝剤	5 μ l	
(200mM Tris-HCl, pH8.8, 100mM KCl, 100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% (v/v) Triton X-100,		
20mM MgSO ₄		20
5mM dNTP's	2 μ l	
プライマー 1	25pM	
プライマー 4	25pM	
Taq/Pfu (20:1) (5u/ μ l)	1.25u	
水	50 μ lに調整	

【0110】

サイクル条件は、94で4分の初期変性、その後、94で10秒の変性、55で10秒のアニーリング、72で5分の伸長、を25サイクル行った。72で7分の最終伸長を行い、4に保った。

30

【0111】

プライマー1 [15286_1_(pos. 2063)]は、以下の配列を有する：

5' - TAATGGGCTAAAAACTCGCAG - 3' (配列番号11)；及び

プライマー4 [15286_4_(pos. 2521)]は、以下の配列を有する：

5' - AAGGCTTTGGGACAAAGGATG - 3' (配列番号12)。

【0112】

増幅PCRフラグメントを、ExoSAP処理し、ネスト化プライマーを用いて配列決定を行い、そこから新規な遺伝子ウォーキングプライマーを設計できるDNA pool A配列データをさらに明らかにした。T.インディクスDNA pool A遺伝子の開始及び停止に到達するフラグメントを作製するために、遺伝子ウォーキングの2つのさらなる別々のステップを必要とした。

40

【0113】

さらなる遺伝子ウォーキングステップ1：

プライマー2及び3(上記の通り)を用いる第一ラウンドPCRの後、プライマー1及び4(上記の通り)を用いるネスト化PCRを行った。

【0114】

~1.5kbと~2.5kbとの間のPCRフラグメントを、HindIII, KpnI、及びEcoRV消化/セルフライゲーション反応テンプレートから得た。

50

【0115】

これらのフラグメントを、ネスト化プライマー（プライマー1及び4）を用いて配列決定した。フラグメントの配列決定は、DNA pol AのC末端ストップコドンに到達し、そしてN末端に対する配列データのさらなる～1100 bpを与えた。新規な遺伝子ウォーキングプライマーを、N末端に対して歩行するように設計した。

【0116】

さらなる遺伝子ウォーキングステップ2：

プライマー6及び7（以下を参照されたい）を用いる第一ラウンドPCRの後、プライマー5及び8（以下を参照されたい）を用いるネスト化PCRを行った。

【0117】

プライマー5[15286_5_（pos. 1036）]は、以下の配列を有する：

5' - T C T C G C T T T G T T T T A A C C C - 3'（配列番号13）；

プライマー6[15286_6_（pos. 1013）]は、以下の配列を有する：

5' - C A T G C G T G G G A A A T A G T A - 3'（配列番号14）；

プライマー7[15286_7_（pos. 1008）]は、以下の配列を有する：

5' - A C T T T A T C C G G G T C A A G A A C - 3'（配列番号15）；及び

プライマー8[15286_8_（pos. 941）]は、以下の配列を有する：

5' - T T T C G T A T C A C T T T C A A G G T C - 3'（配列番号16）。

【0118】

～750 bpと～2 kbとの間のPCRフラグメントを、HindIII、PstI、及びKpnI消化／セルフライゲーション反応テンプレートから得た。

【0119】

これらのフラグメントを、ネスト化プライマー（プライマー5及び8）を用いて配列決定した。この配列データは、当該フラグメントが、DNA pol AのN末端ATG開始コドンに到達することを示した。

【0120】

実施例4 全長（「FL」）及びラージ（クレノウ）フラグメント（「LF」）DNA pol Aの増幅

実施例3に記載の遺伝子ウォーキングプロトコールから得た配列データに基づき、ラージ（クレノウ）フラグメントについての開始及び停止が予測でき（既知のDNA pol A配列を有するアラインメント、例えばTaqKlenTaqフラグメントに基づき）、全体のラージフラグメント遺伝子（～1.7 kb）を増幅する特異的プライマーの設計が可能となった。

【0121】

これらの特異的プライマーは：

15286_F L_上流（NdeI）

5' - G T C C A C C A T A T G G C G C A G A A A A G C T T G T T T C C
T A A A A A A T T A C C A T T T A A A G A T G A - 3'（配列番号17）；

15286_L F_上流（NdeI）

5' - C T T G A A C A T A T G G G C C T C T T A A A G A A C T T C C
A G C T A C - 3'（配列番号18）；及び

15286_下流（SalI）

5' - A G C C C T G T C G A C G G A T C C G C C A G C T T A T G C C T
T T G C C T C T G C - 3'（配列番号19）である

【0122】

上記の通り、発現ベクターへのクローニングを促進するために、NdeI又はSalIの制限部位（上記のプライマー配列中の下線部）を、当該プライマーに組み込んだ。

【0123】

遺伝子産物を、高フィデリティのPhusion DNAポリメラーゼ（New England Biolabs）を用いて増幅した。

【0124】

PCR反応ミックスは以下の通りである。

【0125】

【表5】

5x HF Phusion 反応 緩衝剤	20 μ l	
5mM dNTP's	4 μ l	
上流プライマー (FL or LF)	25pM	
下流プライマー	25pM	10
gDNA	10ng	
Phusion DNA ポリメラーゼ (2u/ μ l)	0.5 μ l	
水	100 μ lに調整	

【0126】

PCRサイクル条件は、98で30秒の初期変性、その後、98で3秒の変性、55で10秒のアニーリング、72で1.5分の伸長、を25サイクル行った。72で7分の最終伸長を行い、4に保った。

【0127】

実施例5 pET24a(+)HISベクター構築

pET24a(+)ベクター (Novagen) を改変し、NdeI部位の上流に 6x HISタグを付加した (図2を参照されたい)。当該HISタグは、以下の通り、XbaIとBamHI部位との間に挿入された。

【0128】

重複プライマー対は、その上流プライマー (XBAI) が以下の配列を有し：

5' - TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TA
A GAA GGA GAT ATA CTA TG CAC CA - 3' (配列番号20)、及び

その下流プライマー (BamHI) が以下の配列を有する：

5' - GAA TTC GGA TCC GCT AGC CAT ATG GTG ATG GT
G ATG GTG CAT AGT ATA TCT CCT T - 3' (配列番号21)。

【0129】

当該重複プライマーは、PCRにより増幅され、RE消化され、そしてpET24a(+)へライゲーションされた。当該ライゲーション反応物を、E.coli TOP10 F' (Invitrogen) に形質転換し、カナマイシンを加えたLuria-Bertaniプレートに播菌した。コロニーをPCRによりスクリーニングし、T7配列決定プライマーを用いて配列決定により評価した。T7配列決定プライマーは以下の通りである。

T7_プロモーター：5' - AAATTAAATACGACTCACTATAAGGG - 3' (配列番号22)、

T7_ターミネーター：5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3' (配列番号23)。

【0130】

実施例6 全長及びラージフラグメントDNA poolのクローニング

実施例4からのPCR産物を、Promega Wizard 精製キットを用いて精製し、その後NdeI/SalIを用いてRE消化を行った。DNAを、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿し、そして水に再懸濁した。その後、全長 (「FL」) 及びラージフラグメント (「LF」) 配列を、各々pET24a(+)及びpET24a

50

(+) HIS に、 NdeI と SalI との間にライゲーションし、 KRX 細胞 (Promega) にエレクトロポレート処理した。ベクター特異的 T7 プライマーを用いて、コロニーを PCR によりスクリーニングした。

【 0131 】

実施例 7 全長及びラージフラグメント DNA ポリメラーゼの発現

実施例 6 から得た組換えコロニーを、 5 ml の Luria Broth (カナマイシン / クロラムフェニコールを含有する) 中で一晩増殖させた。 50 ml の Terrific Broth バッフル付振とうフラスコに、一晩培養物の 1/100 希釈物を接種した。培養物を、 275 rpm 、 37 度、 OD₆₀₀ ~ 1 まで増殖させ、その後 24 まで低下させ、終濃度 0.1% の L - ラムノース、及び終濃度 10 mM の IPTG で誘導した。培養物を 275 rpm 、 24 度さらに 18 時間インキュベートした。その後、 10 ml の培養物を、 5000 × g で 10 分間遠心分離により回収し、そして細胞を 1 ml の溶解緩衝剤 (50 mM Tris - HCl , pH 8.0 , 100 mM NaCl , 1 mM EDTA) 中に再懸濁し、氷上で 30 秒、 2 バーストで超音波粉碎した (40 v) 。サンプルを 5000 × g で 5 分間遠心分離し、 70 度 20 分間熱溶解させ、バックグラウンド E. coli タンパク質を変性させた。サンプルを遠心分離し、上清の一定量を 8% SDS - PAGE でサイズ分画した。

【 0132 】

図 3 に示されるように、 T . インディクスラージフラグメント DNA ポリメラーゼ I を、予測値 ~ 70 kDa で発現した。

【 0133 】

図 4 は、 T . インディクス全長 DNA ポリメラーゼ I が予測値 ~ 103 kDa で発現されたことを示す。

【 0134 】

DNA ポリメラーゼは、 SDS - PAGE ゲル上で、予測されるよりもわずかに速く泳動することが知られているため、その見かけの分子量は、予測よりも小さくなる。

【 0135 】

実施例 8 PCR 活性アッセイ

実施例 7 で得られたサンプルの PCR 活性を、 500 bp の DNA PCR アッセイで試験した。 Taq DNA ポリメラーゼ (1.25 u) をポジティブコントロールとして使用した。

【 0136 】

PCR 溶液は以下のものを含む。

【 0137 】

【表 6 】

10x PCR 緩衝剤	5 μl	
(750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% (v/v) Tween-20)		
5 mM dNTP ミックス	2 μl	40
酵素試験サンプル	1 μl	
上流 λ プライマー	25 pM	
下流 λ プライマー	25 pM	
λ DNA	1 ng	
水	50 μl に調整	

【 0138 】

上流 プライマーは以下の配列を有する：

5' - GATGAGTTCGTGTCCGTAACACTGG - 3' (配列番号 24)、
一方、下流プライマーは以下の配列を有する：

5' - GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC - 3' (配列番号 25)。

【0139】

PCRは、94で3秒の変性、55で10秒のアニーリング、72で30秒の伸長、を35サイクル行った。72で7分の最終伸長を行い、4に保った。

【0140】

反応産物の一定量を1.5%アガロースゲルに供し、結果を図5に示す。使用したPCR条件下では、T.インディクスラージフラグメントは、N末端HISタグを有する場合でもなしの場合でも、Taq DNAポリメラーゼと同等のPCR活性を示す(レーン3)が、T.インディクス全長DNAポリメラーゼは、検出可能なPCR産物が作製されなかった(レーン7)。ここで使用されるPCRアッセイ条件下では、Bst DNAポリメラーゼは、検出可能なPCR産物を何ら作製しなかった(データは示さない)。

【0141】

実施例9 LAMP活性アッセイ

実施例7で得られたサンプルを、ループ媒介等温增幅(LAMP)活性についても試験した。

【0142】

使用したLAMPプライマー(Nagamine等、2002を参照されたい)は以下の通りである：

ラムダ-FIP-LAMP(「FIP」)

5' - CAGCCAGCCGCAGCACGTTCGCTCATAGGAGATATGG
TAGAGCCGC - 3' (配列番号 26)；

ラムダ-BIP-LAMP(「BIP」)

5' - GAGAGAAATTGTACCAACCTCCCCACCGGGCACATAGCA
GTCCCTAGGGACAGT - 3' (配列番号 27)；

ラムダ-F3-LAMP(「F3」)

5' - GGCTTGGCTCTGCTAACACGTT - 3' (配列番号 28)；

ラムダ-B3-LAMP(「B3」)

5' - GGACGTTGTAATGTCGGCTCC - 3' (配列番号 29)；

ラムダ-loopF-LAMP(「loopF」)

5' - CTGCATACGACGTTCT - 3' (配列番号 30)；及び

ラムダ-loopB-LAMP(「loopB」)

5' - ACCATCTATGACTGTAACGCC - 3' (配列番号 31)。

【0143】

LAMPは、各々0.8μMのFIP及びBIP、各々0.2μMのF3及びB3、各々0.4μMのloopF及びloopBのプライマー、1.6mM dNTP、1Mベタイン(Sigma)、2mM MgSO₄、1×Bst緩衝剤(New England Biolabs)、1ng DNA、及び8uのBst DNAポリメラーゼラージフラグメント(New England Biolabs)もしくは1μlの試験サンプル(実施例7から)のいずれかを含有し、水で容量を調整した、総量25μlの反応混合物中で行われた。当該混合物を、65で1時間インキュベートし、増幅の検出のための臭化エチジウムで染色した、一定量を1%アガロースゲルに供した。

【0144】

LAMPアッセイの結果を図6に示す。使用されるLAMP条件下、T.インディクスラージフラグメントは、N末端のHISタグを有する場合でもなしの場合でも、Bst DNAポリメラーゼラージフラグメントと同等のPCR活性を示す(レーン3)が、T.インディクス全長DNAポリメラーゼは、検出可能なLAMP産物を作製しなかった(レーン7)。これらのLAMP条件下では、全長DNAポリメラーゼが、任意のLAMP増

幅産物を破壊する 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する可能性がある。ここで使用される LAMP アッセイ条件下で、Taq DNA ポリメラーゼは、何ら検出可能な LAMP 産物を作製しなかった（データは示さない）。

【 0 1 4 5 】

実施例 10 熱安定性アッセイ

T. インディクスラージフラグメントの熱安定性を、実施例7に記載の通り、500 bp DNA PCRアッセイを用いて試験した。誘導したラージフラグメントのサンプルを、95℃で、0、2、4、6、8、10、15又は20分インキュベートし、その後、500 bp DNA PCRアッセイで使用した。使用した条件下で、ラージフラグメントは、95℃で最大4分のインキュベーションまで無影響であることがわかり、6分のインキュベーション後、PCR活性の低減を示し、そして8分のインキュベーション後は、検出可能なPCR産物は作製されなかった（データは示さない）。 10

[0 1 4 6]

このサンプルは、T.インディクスラージフラグメントが、PCRで有効な十分な期間、熱安定性であるが、95℃の変性温度でのインキュベーションの延長は、DNAポリメラーゼ活性に影響を及ぼすことを実証している。

[0 1 4 7]

本発明は、好ましいか又は例示的な実施態様に関して記載しているが、当該技術分野の当業者は、本発明の思想及び範囲を逸脱することなく、同じものに対する様々な改変及び変更を達成でき、且つ当該改変は、本明細書で明確に熟慮されていることを理解するはずである。本明細書に開示され、且つ添付の請求の範囲に明記される、特定の実施態様について限は定する意図はなく、またいずれの類推をされるべきものでもない。

[0 1 4 8]

本明細書で引用される全ての文書は、その全體が参照により組み込まれる。

【 図 1 】

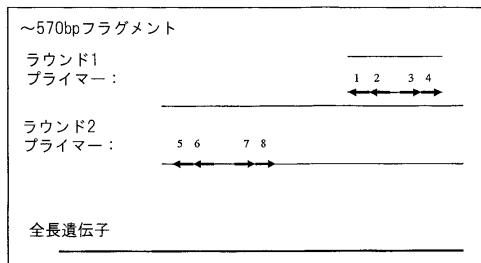


Figure 1

〔 2 〕

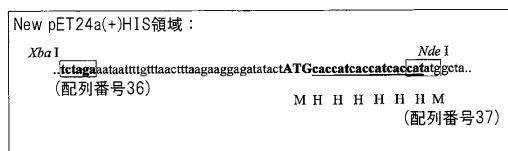


Figure 2

【図3】

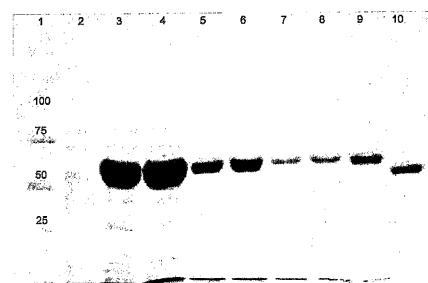
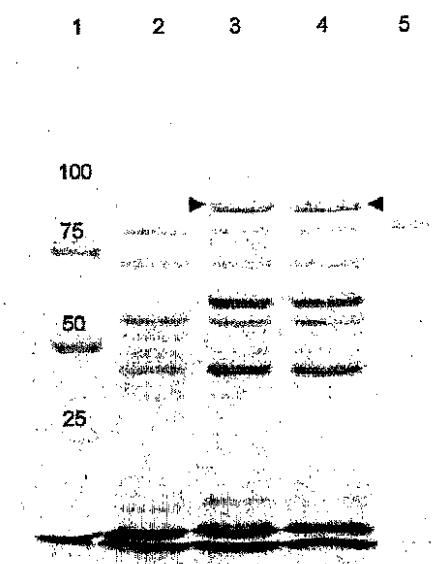
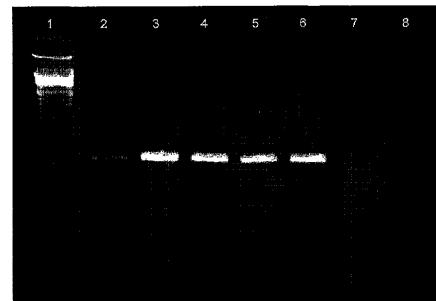


Figure 3

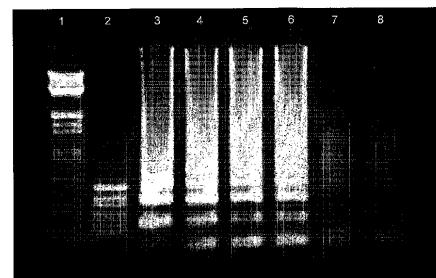
【図4】

Figure 4

【図5】

Figure 5

【図6】

Figure 6

【配列表】

0005617075000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 N 5/10 (2006.01) C 12 N 5/00 101

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 クラーク,ダンカン ロイ

イギリス国, サリー ジーユー 16 7 ピーエル, キャンバレー, アルバニー パーク, イノベイション ハウス, ジェネシス リミティド

(72)発明者 モラント,ニコラス

イギリス国, サリー ジーユー 16 7 ピーエル, キャンバレー, アルバニー パーク, イノベイション ハウス, ジェネシス リミティド

審査官 櫛引 明佳

(56)参考文献 國際公開第 2006 / 030455 (WO, A1)

Moussard H et al, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004年, Vol.54, p.227-233

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

C 12 N 9 / 10

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

UniProt / GeneSeq

Capplus / MEDLINE / BIOSIS (STN)

PubMed