

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4949585号
(P4949585)

(45) 発行日 平成24年6月13日 (2012. 6. 13)

(24) 登録日 平成24年3月16日 (2012. 3. 16)

(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 9/12 (2006. 01)	C 1 2 N 9/12
C 1 2 Q 1/48 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 27 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2001-535569 (P2001-535569)	(73) 特許権者	399117121
(86) (22) 出願日	平成12年10月27日 (2000. 10. 27)		アジレント・テクノロジーズ・インク
(65) 公表番号	特表2004-500052 (P2004-500052A)		AGILENT TECHNOLOGIE
(43) 公表日	平成16年1月8日 (2004. 1. 8)		S, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/029706		アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタク
(87) 国際公開番号	W02001/032887		ララ スティーブンス・クリーク・プール
(87) 国際公開日	平成13年5月10日 (2001. 5. 10)		バード 5301
審査請求日	平成19年10月23日 (2007. 10. 23)	(74) 代理人	100099623
(31) 優先権主張番号	60/162, 600		弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日	平成11年10月29日 (1999. 10. 29)	(74) 代理人	100096769
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(74) 代理人	100083806
			弁理士 三好 秀和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAポリメラーゼを使用した組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に提示したヌクレオチド配列を含む組換えベクター。

【請求項 2】

配列番号 2 に提示したアミノ酸配列を有する、単離組換え DNA ポリメラーゼ。

【請求項 3】

配列番号 2 に提示したアミノ酸配列を有し、さらに、配列番号 2 の S 3 4 5 部位にセリンからプロリンへの変異、および、配列番号 2 の P 4 1 0 部位にプロリンからロイシンへの変異を含む、二重変異を有する、単離組換え DNA ポリメラーゼ。

【請求項 4】

配列番号 2 の D 1 4 1 部位にアスパラギン酸からトレオニンまたはアラニンへの変異、および／または、配列番号 2 の E 1 4 3 部位にグルタミン酸からアラニンへの変異をさらに有する、請求項 3 に記載の単離組換え DNA ポリメラーゼ。

【請求項 5】

配列番号 2 に提示したアミノ酸配列を有し、さらに、配列番号 2 の L 4 0 8 部位にロイシンからヒスチジンへの変異、配列番号 2 の L 4 0 8 部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異、配列番号 2 の P 4 1 0 部位にプロリンからロイシンへの変異、および、配列番号 2 の A 4 8 5 部位にアラニンからトレオニンへの変異からなる群から選択される変異を有する、単離組換え DNA ポリメラーゼ。

【請求項 6】

10

20

単離組換えDNAポリメラーゼが、配列番号2のA485部位にアラニンからトレオニンへの変異を有し、さらに、配列番号2のL408部位にロイシンからヒスチジンへの変異、配列番号2のL408部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異、配列番号2のS345部位にセリンからプロリンへの変異、および、配列番号2のP410部位にプロリンからロイシンへの変異からなる群から選択される変異を有する、請求項5に記載の単離組換えDNAポリメラーゼ。

【請求項7】

配列番号2のD141部位にアスパラギン酸からトレオニンまたはアラニンへの変異、および／または、配列番号2のE143部位にグルタミン酸からアラニンへの変異をさらに有する、請求項5または6に記載の単離組換えDNAポリメラーゼ。

10

【請求項8】

配列番号2に提示したアミノ酸配列を有し、さらに、配列番号2のA485部位にアラニンからトレオニンへの変異を有する、単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

【請求項9】

熱安定性である、請求項8に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

【請求項10】

配列番号2のL408部位にロイシンからヒスチジンへの変異をさらに有する、請求項8または9に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

【請求項11】

配列番号2のL408部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異をさらに有する、請求項8または9に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

20

【請求項12】

配列番号2のP410部位にプロリンからロイシンへの変異をさらに有する、請求項8または9に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

【請求項13】

配列番号2のY496部位にチロシンからアスパラギンへの変異をさらに有する、請求項8または9に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

【請求項14】

ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび複合ヌクレオチドからなる群から選択される非慣用的なヌクレオチドに対する識別の低下した、請求項8～13のいずれか1項に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

30

【請求項15】

前記複合ヌクレオチドは、放射標識ヌクレオチド、蛍光標識ヌクレオチド、ビオチン標識ヌクレオチド、化学発光標識ヌクレオチドおよび量子ドット標識ヌクレオチドからなる群から選択される、請求項14に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

【請求項16】

配列番号2のアミノ酸409におけるYからVへの変異；配列番号2のアミノ酸494におけるYからSへの変異；配列番号2のアミノ酸496におけるYからLへの変異；および、配列番号2のアミノ酸490におけるAからYへの変異からなる群から選択される変異に対応する、DNAポリメラーゼにおけるアミノ酸残基の変異をさらに含む、請求項8または9に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

40

【請求項17】

配列番号2のD141部位にアスパラギン酸からトレオニンまたはアラニンへの変異、および／または、配列番号2のE143部位にグルタミン酸からアラニンへの変異をさらに有する、請求項8～16のいずれか1項に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ。

【請求項18】

DNAの相補鎖の標識法であって、前記方法は、鋳型DNA分子を、請求項8～17のいずれか1項に記載の単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ、ならびに、ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび複合ヌクレオチドからなる群から選択される非

50

慣用的なヌクレオチドと接触させて、前記単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼが相補的 DNA 鎖を合成し、前記の非慣用的なヌクレオチドを前記の相補的 DNA 鎖に取込む段階を含む、前記標識法。

【請求項 19】

前記単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼが請求項 8 に記載の単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼであり、配列番号 2 の S 3 4 5 アミノ酸にセリンからプロリンへの変異をさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

鋳型 DNA 鎖を、シーケンスプライマー、請求項 8 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼ、および、鎖終結ヌクレオチド類似体と、接触させる段階を含み、前記鎖終結ヌクレオチド類似体の取込みにより、鎖伸長が終結し、よって前記 DNA 鎖のヌクレオチド配列が決定される、DNA をシーケンスする方法。

10

【請求項 21】

前記単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼが請求項 8 に記載の単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼであり、該単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼが配列番号 2 の S 3 4 5 部位にセリンからプロリンへの変異をさらに有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記の鎖終結ヌクレオチド類似体はジデオキシヌクレオチドである、請求項 20 または 21 に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記ジデオキシヌクレオチドは、蛍光標識されている、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ジデオキシヌクレオチドは、フルオレセインおよびローダミンからなる群から選択された部分で標識されている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

残基 1 から 776 までの配列番号 2 に提示したアミノ酸配列を有する、精製された熱安定性の DNA ポリメラーゼの製造法であって、配列番号 1 に提示した核酸配列を含む宿主細胞を、前記 DNA ポリメラーゼの産生の可能な条件下で培養することを含む、前記製造法。

30

【請求項 26】

請求項 8 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の、単離組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼの製造法であって、前記組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼは、野生型形のそのポリメラーゼに比べて、非慣用的なヌクレオチドに対する識別が低下しており、前記組換え B ファミリー DNA ポリメラーゼをコードする核酸配列を含む宿主細胞を、前記 DNA ポリメラーゼの産生の可能な条件下で培養することを含む、前記製造法。

【請求項 27】

前記宿主細胞は大腸菌 (E. coli) である、請求項 25 または 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

(発明の分野)

本発明は、非慣用的なヌクレオチドに対する識別の低下した DNA ポリメラーゼ酵素を使用する、組成物および方法に関する。本発明の酵素は、検出可能な核酸の標識に必要な多くの適用に有用であり、DNA シーケンス適用に特に有用である。

【0002】

(発明の背景)

検出可能な核酸の標識は、研究ならびに臨床診断技術への適用を含む、分子生物学における多くの適用に必要である。一般に使用される核酸標識法は、1 つ以上の非慣用的なヌクレオチド、および、非慣用的なヌクレオチド (群) の新規合成相補鎖への鋳型依存的な取込みを触媒するポリメラーゼ酵素を使用する。

50

【0003】

DNAポリメラーゼが正しいデオキシヌクレオチドを取込む能力は、インビボでの高忠実度のDNA複製の基礎である。ポリメラーゼの活性部位内のアミノ酸は、鋳型ヌクレオチドとは逆の正しい相補ヌクレオチドの配置を好む特異的結合ポケットを形成する。ミスマッチのヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体はその位置を占める場合、来るヌクレオチドと接触するアミノ酸の正確なアラインメントは、DNA重合に好ましくない位置へと歪み得る。このために、DNAの標識に使用される非慣用的なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体は、標準的なデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP；いわゆる「標準的な」dNTPは、デオキシアデノシン三リン酸（dATP）、デオキシシトシン三リン酸（dCTP）、デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）およびチミジン三リン酸（TTP））よりも低い効率で伸長鎖に取り込まれる傾向がある。

10

【0004】

非慣用的なヌクレオチドがポリメラーゼにより取り込まれる効率の低下は、DNA標識に必要な非慣用的なヌクレオチドの量を増加させる。特定のヌクレオチドの取込み効率の低下はまた、均質なシグナル強度のために非慣用的なヌクレオチドの偏った取込みに依存した、DNAシーケンスなどの技術またはアッセイの性能に有害な影響を及ぼし得る。

【0005】

来るヌクレオチド三リン酸と接触するDNAポリメラーゼのアミノ酸の実体および正にその整列によって、そのポリメラーゼ酵素により取り込まれ得る、慣用的および非慣用的の両方のヌクレオチドの性質は決まる。結合または鎖伸長の任意の段階で来るヌクレオチド三リン酸と接触するアミノ酸の正にその配置の変化により、異常または非慣用的なヌクレオチドを利用するポリメラーゼの能力は劇的に変化し得る。時に、遠位のアミノ酸の変化が、間接的な全体的または構造的効果に因りヌクレオチド類似体の取込みに影響を及ぼし得る。ヌクレオチド類似体の取込み能の向上したポリメラーゼは、ダイ、反応性基または不安定同位体などのシグナル部分で修飾したヌクレオチドを用いたDNAまたはRNA鎖の標識に有用である。

20

【0006】

標識ヌクレオチドに加えて、極めて重要なクラスの修飾ヌクレオチドはジデオキシヌクレオチドである。いわゆる「サンガー」または「ジデオキシ」DNAシーケンス法（Sangerら、1977、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463、これは本明細書に参考として取込む）は、デオキシーおよびジデオキシヌクレオチドを含む混合物からの、DNAポリメラーゼによる、アニーリングしたプライマー上への鋳型により指示されるヌクレオチドの取込みに依拠する。ジデオキシヌクレオチドの取込みにより、酵素がその鎖のさらなる伸長を触媒できなくなる鎖終結が生じる。反応産物の電気泳動による分離により、伸長産物の「ラダー」が生じ、ここでの各伸長産物は、鋳型中のヌクレオチドとは逆のヌクレオチドに相補的な特定のジデオキシヌクレオチドで終結する。プライマーからのジデオキシヌクレオチド類似体の距離は、伸長産物の長さにより示される。各々が4つのジデオキシヌクレオチド類似体ddA、ddC、ddG、またはddT（ddNTP）の1つを含む4つの反応を同じゲルで分離すると、鋳型の配列をラダーパターンから直接解読し得る。伸長産物は、例えば、同位体または蛍光標識プライマー、デオキシヌクレオチド三リン酸またはジデオキシヌクレオチド三リン酸を反応に包含することを含む、数個の方法で検出し得る。

30

40

【0007】

蛍光標識は、より迅速なデータ収集（ゲルを流している間に検出を実施し得るため）、並びに、1つの反応およびゲルからのより長い配列データの解読という利点を有する。さらに、蛍光配列検出により、シーケンスを、4つの異なって標識した蛍光ダイ終結因子を含む1つの反応管で実施できる（いわゆるダイ終結因子法、Leeら、1992、Nucleic Acids Res. 20:2471、本明細書に参考として取込む）。

【0008】

DNAシーケンスに有用な所望の品質のポリメラーゼは、向上したジデオキシヌクレオ

50

チドの取込みである。ジデオキシヌクレオチドの取込み向上により、DNAシーケンスなどのプロセスは、高価な放射能または蛍光ダイ標識ジデオキシヌクレオチドの必要性を減少することにより、よりコスト効率的となる。さらに、偏っていないジデオキシヌクレオチド取込みは、シグナル均一の向上を提供し、塩基決定の正確性の向上をもたらす。均一なシグナル出力によりさらに、対立遺伝子変異のような因子により引き起こされる僅かな配列差異の検出が可能となる。関連位置において2つの異なる半強度シグナルを産生する、対立遺伝子変異は、非均一なddNTPを利用してポリメラーゼにより引き起こされる可変シグナル強度により容易に隠すことができる。

【0009】

天然形のDNAポリメラーゼによるリボヌクレオチドの取込みは、稀な事象である。より高いレベルのリボヌクレオチドを取り込んだ変異体を、部分的なリボ置換によるシーケンスなどの適用に使用できる。この系では、同じ塩基に対応するリボヌクレオチドおよびデオキシヌクレオチドの混合物を、変異ポリメラーゼにより取込む(Barnes、1978、J. Mol. Biol. 119:83~99)。リボシーケンス反応をアルカリ条件および熱に曝露すると、伸長鎖の断片化が生じる。全4つの塩基の反応を変性アクリルアミドゲル上で分離すると、シーケンスラダーが生じる。この代替のシーケンス法において、より多くのリボヌクレオチドの利用を伴うポリメラーゼ変異体が当分野で必要である。

【0010】

別法として、リボヌクレオチドの取込み、次いでアルカリ加水分解を、DNAシャッフリング((Stemmer、1994、Nature、370:389~391)これはまた分子交配、セクシャルPCRおよび指向性進化とも呼ばれる)などのDNA分子の無作為な切断を必要とする系において使用できる。

【0011】

DNA標識酵素の別の望ましい品質は、熱安定性である。熱安定性を示すDNAポリメラーゼは、熱変性、プライマーアニーリング、および酵素的プライマー伸長のサイクルを使用してDNA鋳型を増幅する、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の開発以来、分子生物学および臨床診断学の多くの態様を革新してきた。原型熱安定性DNAポリメラーゼは、好熱性真正細菌サーマス・アクアティカス(Thermus aquaticus)から初めて単離された、Taqポリメラーゼである。熱安定性DNAポリメラーゼを使用したいわゆる「サイクルシーケンス」反応は、慣用的な(すなわち非サイクル)シーケンス反応に比べて、より少量の開始鋳型が必要であるという利点を有する

A、BおよびCファミリーと称される3つの主要なDNAポリメラーゼファミリーがある。ポリメラーゼをこれらの3つのファミリーの1つに分類することは、特定のポリメラーゼの、大腸菌(E. coli)DNAポリメラーゼI(ファミリーA)、II(ファミリーB)またはIII(ファミリーC)に対する構造的類似性に基づく。例として、AファミリーDNAポリメラーゼは、クレノウDNAポリメラーゼ、サーマス・アクアティカス(Thermus aquaticus)DNAポリメラーゼI(Taqポリメラーゼ)およびバクテリオファージT7DNAポリメラーゼを含むがこれに限定されず；一ファミリープロテアーゼ(BraithwaiteおよびIto、1991、Nucleic Acids Res. 19:4045)として以前には知られていたBファミリーDNAポリメラーゼは、ヒト、およびDNAポリメラーゼ、T4、RB69および29バクテリオファージDNAポリメラーゼ、およびパイロコッカス・フリオス(Pyrococcus furiosus)DNAポリメラーゼ(Pfuポリメラーゼ)を含むがこれに限定されず；そして、CファミリーDNAポリメラーゼは、パチラス・スプチリスDNAポリメラーゼIII、および大腸菌(E. coli)DNAポリメラーゼIIIおよびサブユニット(BraithwaiteおよびIto、1993、Nucleic Acids Res. 21:787により、それぞれdnaEおよびdnaQ遺伝子産物として列挙)を含むがこれに限定されない。広域の古細菌、細菌、ウイルスおよび真核生物におよぶ各ファミリーのDNAポリメラーゼタンパク質配列のアラインメントを、Braithwaite

10

20

30

40

50

eおよびI t o (1993、上記)に提示し、これは本明細書に参考として取込む。

【0012】

DNAポリメラーゼが非天然ヌクレオチドの新生DNAポリマーへの取込みを実施しない傾向を記載するのに使用した用語は「識別」である。AファミリーDNAポリメラーゼにおいて、ジデオキシヌクレオチド類似体の取込みに対する効果的な識別は、1つのアミノ酸残基に大きく関連している。AファミリーDNAポリメラーゼ由来の大半の酵素は、DNAポリメラーゼの大腸菌(*E. coli*)クレノウ断片のF762に等価な位置にフェニルアラニン(*phe*またはF)残基を有し、ジデオキシヌクレオチドに対する強い識別を実証する。ほとんどのポリメラーゼ(例えばT7DNAポリメラーゼ)は、対応する位置にチロシン(*tyr*またはY)を有さず、ジデオキシヌクレオチドに対する比較的弱い識別を示す。この位置にチロシンを有するAファミリーポリメラーゼは、それらがデオキシヌクレオチドを取込むレベルと等しいか、またはほんの僅かに異なるレベルでジデオキシヌクレオチドを容易に取込む。識別に関与する部位におけるチロシンまたはフェニルアラニン残基の変換は、Aファミリー酵素のジデオキシヌクレオチド識別プロファイルを逆転する(TaborおよびRichardson、1995、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6449)。

10

【0013】

熱安定性DNAポリメラーゼの中で、AmpliTaqFS(登録商標)(Perkin Elmer)として知られる、サーマス アクアティカス(*Thermus aquaticus*)由来の変異形のAファミリーDNAポリメラーゼは、クレノウDNAポリメラーゼのF762に等価な位置にF667Y変異を含み、野生型酵素に比べてジデオキシヌクレオチド取込みの増加を示す(すなわち、ddNTPに対する識別の低下)。ジデオキシヌクレオチド取込みの識別低下により、それは野生型酵素よりも、蛍光および標識ジデオキシヌクレオチドシークエンスにおいてより有用となる。

20

【0014】

しかし、TaqDNAポリメラーゼのF667Y変異体は、ローダミンダイ終結因子の使用を必要とする、フルオレセイン標識ジデオキシヌクレオチドを用いた使用に適していない。しかし、Taqシークエンス反応で現在利用される、ローダミンダイ終結因子は、DNA二次構造を安定化し、シグナルの圧縮を引き起こす。圧縮問題を排除する努力により、デオキシグアノシン三リン酸の代わりに、大量のヌクレオチド類似体デオキシイノシン三リン酸(dITP)を使用する系が得られた。(dITP)の取込みがシグナルの圧縮を減少する場合、反応におけるdITPの存在により、反応温度の低下および反応時間の増加を含む追加の複雑化の要因が生じる。さらに、シークエンスにおけるローダミンダイの使用は、望ましくない反応後精製を必要とする(Brandis、1999、*Nucl. Acid Res.* 28:1912)。

30

【0015】

BファミリーDNAポリメラーゼは、いわゆるpalmdメインにおいて触媒に関与する酸性残基の位置を除き、AファミリーDNAポリメラーゼに比べて実質的に異なる構造を示す(Wangら、1997、*Cell* 89:1087;Hopfnerら、1999、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3600)。BファミリーDNAポリメラーゼの独特な構造により、構造的束縛に因り、AファミリーDNAポリメラーゼでの使用に不適切な、類似体の利用をおそらく可能とする、ヌクレオチド類似体との完全に異なるスペクトルの相互作用を可能とし得る。熱安定性Bファミリーポリメラーゼは、超好熱性古細菌で同定された。これらの生物は、901Cよりも高い温度で増殖し、その酵素は、好熱性真正細菌AファミリーDNAポリメラーゼよりも高い熱安定性を実証する(Mathurら、1992、*Strategies* 5:11)。超好熱性古細菌由来のBファミリーポリメラーゼは、非慣用的なヌクレオチドに対する識別を低下する修飾(群)の出発基質としてよく適し得る。

40

【0016】

3つのBファミリーDNAポリメラーゼの結晶構造が解像されたが(Wangら、199

50

7、上記；Hopfner, K. - P. ら、1999、Proc. Natl. Acad. Sci. 96:3600；Zhao、1999、Structure Fold Des. 7:1189）、DNAポリメラーゼまたはdNTP-ポリメラーゼ共複合体の構造は依然として報告されていない。現在では、ヌクレオチド類似体識別に寄与するアミノ酸残基の同定は、Aファミリー-dNTP構造への外挿から、または、関連BファミリーDNAポリメラーゼを用いて実施した変異誘発試験からのみ推定できる（例えばヒトpol、ファージT4、ファージ29、T. リトラリス（*T. litoralis*）DNAポリメラーゼ）。

【0017】

BファミリーDNAポリメラーゼの配列比較により、I～VIとナンバリングした6つの保存領域が示される（BraithwaiteおよびIto、1993、上記）。Wangら（Wangら、1997、上記）により提唱されたバクテリオファージRB69 DNAポリメラーゼ（Bファミリー）の結晶構造により、領域IIのY416（これはテルモコックス（*Thermococcus*）種JDF-3のBファミリーDNAポリメラーゼのY409に対応する）は、HIV逆転写酵素（RT）のY115およびクレノウ断片（Aファミリーポリメラーゼ）のE710と同じ位置を有する。RB69におけるdNTPおよびプライマー-鋳型複合体のモデリングは、逆転写酵素-DNA共結晶の原子座標を使用して実施した。このモデルは、dNTPのデオキシリボース部分下のRB69Y416パックを予測する。この位置のチロシンは、哺乳動物逆転写酵素（Y115）のリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの間のポリメラーゼ識別に寄与する、リボース選択性（Gaoら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:407；Joyce、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1619）、および、対応する不変グルタメート残基（E710）の修飾がリボヌクレオチドに対する識別を低下させるAファミリーDNAポリメラーゼに関与している（Gelfandら、1998、特許番号EPO823479号；Astatkera、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3402）。

【0018】

BファミリーDNAポリメラーゼで実施した変異誘発試験も、dNTP取込みおよびリボース選択性において、領域II中の類似Yを含む領域が示される。ヒトDNAポリメラーゼ中の対応するY865での変異は、3'-OH基の代わりにかさ高い3'-アジド基を有するAZT-TTP、dGTPのグアニン塩基のC-2位のアミノ基に付着したブチルフェニル基を含むBuPdGTP（よりかさ高くより疎水性のプリン塩基ヌクレオチドが生じる）、および、ピリミジンデオキシヌクレオチド三リン酸の競合的阻害剤であるアフィディコリンなどの、dNTPヌクレオチド阻害剤に対するポリメラーゼ忠実度および感度に影響を及ぼす。興味深いことに、変異体は、それによるddCTPの取込みに差異を全く示さなかった（Dongら、1993、J. Biol. Chem. 268:26143）。さらに、類似Y（411）のちょうど1アミノ酸前のL412をメチオニン（M）またはイソロイシン（I）に変換した、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ変異体は、無機ピロリン酸類似体ホスホノ酢酸（PAA）に対してそれぞれ極度および温和な感度を示す。PAA感度の変化は、ポリメラーゼとヌクレオチド類似体との相互作用を予測することが示された。T4 DNAポリメラーゼのL412は、テルモコックス（*Thermococcus*）種JDF-3 DNAポリメラーゼのL410に対応する。L412MT4 DNAポリメラーゼ変異体は、野生型ポリメラーゼよりも50倍少ないddGTPで阻害され、一方、dGTPの K_m は維持していた。研究で著者の記載したように、「L412M DNAポリメラーゼのddGTPに対する感度にも関わらず、野生型およびL412MDNAポリメラーゼによるddNTPの取込みには差異は全く見られなかった」（Reha-Krantzら、1993、J. Virol. 67:60）。バクテリオファージ29において、領域IIの変異（Yはテルモコックス（*Thermococcus*）種JDF3 DNAポリメラーゼY409に類似しているLYP）は、PAAで攻撃すると混合した結果を出し；P255Sは、PAAに対して過感度であったが、L253Vは、

10

20

30

40

50

野生型酵素よりも感度の低いことが示された (Blascoら、1993、J. Biol. Chem. 268:24106)。これらのデータは、ポリメラーゼヌクレオチド相互作用におけるLYP (領域II) の役割を支持するが、ddNTPの取込み向上は、これらの文献では達成されなかった。

【0019】

別の研究では、テルモコックス リトラリス (Thermococcus litoralis) DNAポリメラーゼ由来の古細菌BファミリーDNAポリメラーゼ (VENT (商標) ポリメラーゼ、ニューイングランドバイオラブズ) における領域IIの広範な変異を実施した。その研究では、26個の異なる部位特異的変異体を、単にヌクレオチド類似体識別の調査の目的で作成した (GardnerおよびJack、1999、Nucleic Acids Res. 27:2545)。VENT (商標) DNAポリメラーゼの部位特異的変異誘発は、Y412での3つの変異 (JDF-3 DNAポリメラーゼY409に対応する) がヌクレオチド結合を変化し得ることを実証した (GardnerおよびJack、1999、上記)。Y412Vは、ジデオキシヌクレオチド取込みにおいて2倍の増加、リボヌクレオチドATPの取込みにおいて200倍の増加で最も有意であった。変異Y412Fは、類似体取込みの変化は全く示さなかった。

【0020】

Bファミリーポリメラーゼの領域III (モチーフBとも称する) も、ヌクレオチド認識に役割を果たすことが実証された。JDF-3 BファミリーDNAポリメラーゼのAA487から495に対応する、この領域は、共通配列KX₃NSXYGを有し (Jungら、1990、上記; Blascoら、1992、上記; Dongら、1993、J. Biol. Chem. 268:21163; Zhuら、1994、Biochem. Biophys. Acta 1219:260; DongおよびWang、1995、J. Biol. Chem. 270:21563)、構造的ではないが (Wangら、1997、上記) 機能的に、AファミリーDNAポリメラーゼのヘリックスOのKX₃(F/Y)GX₂YGに類似している。クレノウ断片およびTaq DNAポリメラーゼなどのAファミリーDNAポリメラーゼにおいて、Oヘリックスは、dNTP結合に主要な役割を果たすアミノ酸を含む (Astatkeraら、1998、J. Mol. Biol. 278:147; Astatkeraら、1995、J. Biol. Chem. 270:1945; Poleskyら、1992、J. Biol. Chem. 267:8417; Poleskyら、1990、J. Biol. Chem. 265:14579; Pandeyら、1994、J. Biol. Chem. 269:13259; Kaushikら、1996、Biochem. 35:7256)。特に、ヘリックスOは、AファミリーDNAポリメラーゼ (KX₃(F/Y)GX₂YG) (TaborおよびRichardson、1995、上記) にddNTP識別を付与する、F (クレノウ断片のF763; TaqのF667) を含む。

【0021】

VENT (商標) DNAポリメラーゼの領域IIIの特異的変異誘発試験はまた、テルモコックス (Thermococcus) 種JDF-3 DNAポリメラーゼのA485に類似したアラニンに標的化した (Jungら、1990、上記)。これらの変異体 (A→C、A→S、A→L、A→I、A→FおよびA→V) は、前駆酵素のポリメラーゼ活性の0.12から1.2倍の範囲の比活性を示した (GardnerおよびJack、1999、Nucleic Acids Res. 27:2545)。ジデオキシヌクレオチド取込みは、非変異酵素の4から15倍の範囲であった。興味深いことに、ジデオキシヌクレオチド取込みの最も高い (15倍) 変異体は、最初の酵素の僅か0.12倍の比活性を示した。

【0022】

テルモコックス バロッシー (Thermococcus barossii) 由来のBファミリーDNAポリメラーゼに関する部位特異的変異誘発試験は、JDF-3 DNAポリメラーゼのAA残基488~493に対応する配列ILANSFの各々の残基を独立的に、チロシンに修飾した (Reidlら、米国特許第5,882,904号)。その研究

10

20

30

40

50

により、L 4 8 9 Y 変異体は、この部位に野生型ロイシン残基を有する酵素に比べて、約 3 倍高いジデオキシヌクレオチドの取込みを示すことが示された。

【0023】

活発な研究の 1 領域は、複数の異なる核酸配列の同時解析における、核酸または DNA 「チップ」も称されることの多い、核酸アレイの使用を含む。米国特許第 5, 8 8 2, 9 0 4 号に記載のようなこれらの適用の多くが (Reidl ら、1999 年 3 月 16 日に発行)、非慣用的なヌクレオチド、特に蛍光標識した非慣用的なヌクレオチドに対して識別の低下を示す DNA ポリメラーゼから利点が得られる。チップ型式で取り組む適用は、とりわけ、DNA シークエンスおよび変異検出を含む。例えば、「ミニシークエンス」法 (例えば Pastinen ら、1997、Genome Res. 7: 606; Syvanen、1999、Human Mutation 13: 1~10) および整列プライマー伸長 (APEX) 変異検出法 (Shumaker ら、1996、Hum. Mutat. 7: 346) およびそれに類似した方法は、蛍光標識または他の非慣用的なヌクレオチドに対する識別の低下した DNA ポリメラーゼから利点が得られ得る。チップまたはゲルをベースとしたミニシークエンス系に使用する非識別 DNA ポリメラーゼが当分野では必要である。かかる系により、有利には、複合した 1 ヌクレオチド多形 (SNP) の検出が可能となり、適量的遺伝子型分類が可能となる。配列変異の同定により、遺伝子疾患の診断および処置、多要素疾病の素因、および新しいまたは既存の医薬製品に対する感度が可能となる。

10

【0024】

非慣用的なヌクレオチドに対する識別の低下した DNA ポリメラーゼが当分野で必要である。ジデオキシヌクレオチドに対する識別の低下を示す熱安定性 DNA ポリメラーゼ、およびさらに、蛍光標識ジデオキシヌクレオチドに対する識別の低下を示す DNA ポリメラーゼが当分野で必要である。

20

【0025】

(発明の要約)

本発明は、非慣用的なヌクレオチドに対する識別の低下を示す DNA ポリメラーゼ酵素を使用した組成物および方法に関する。この品質をもつ酵素は、検出可能な核酸の標識を必要とする多くの適用に有用であり、特に DNA シークエンス適用に有用である。

【0026】

本発明はさらに、配列番号 2 の L 4 0 8、P 4 1 0、S 3 4 5 および／または A 4 8 5 に対応する部位または部位群に 1 つ以上の変異を有する B ファミリー DNA ポリメラーゼ、または、核酸の鋳型依存的な重合を指示する能力を保持したその断片に関する。本発明はまた、配列番号 2 の L 4 0 8、P 4 1 0 およびまたは A 4 8 5 に対応する部位で変異した B ファミリーポリメラーゼの変異体および修飾形 (例えば化学修飾または抗体複合体形成により調製された、例えば可逆的に不活性化された形の B ファミリーポリメラーゼ) を包含する。

30

【0027】

1 つの実施形態において、DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の S 3 4 5 に対応する部位にセリンからプロリンへの変異、および、配列番号 2 の P 4 1 0 に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を含む、二重変異を有する。

40

【0028】

本発明は、残基 1 から 776 までの配列番号 2 に提示したアミノ酸配列を有する、精製された熱安定性 DNA ポリメラーゼを包含する

1 つの実施形態において、熱安定性 DNA ポリメラーゼは、テルモコックス (Thermococcus) 種 JDF-3 から単離する。

【0029】

別の実施形態において、熱安定性ポリメラーゼは、テルモコックス (Thermococcus) 種 JDF-3 DNA ポリメラーゼの発現をコードするベクターで形質転換した組換え生物から単離される。

50

【0030】

本発明はさらに、配列番号1に提示したヌクレオチド配列を含む組換えベクターを包含する。

【0031】

本発明はさらに、配列番号2のアミノ酸配列またはその機能的断片を含む、単離組換えポリペプチドを包含する。

【0032】

本発明はさらに、3'から5'エキソヌクレアーゼ欠損である、テルモコックス (Thermococcus) 種JDF-3由来の単離組換えDNAポリメラーゼを包含する。

【0033】

1つの実施形態において、単離組換えDNAポリメラーゼは、配列番号2のD141に対応するアミノ酸にアスパラギン酸からトレオニンまたはアラニンへの変異、または配列番号2のE143に対応するアミノ酸にグルタミン酸からアラニンへの変異を有する。

【0034】

別の実施形態において、単離組換えDNAポリメラーゼは、配列番号2のD141に対応するアミノ酸にアスパラギン酸からトレオニンまたはアラニンへの変異、または配列番号2のE143に対応するアミノ酸にグルタミン酸からアラニンへの変異を有する。

【0035】

本発明はさらに、非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下した、単離組換えDNAポリメラーゼを包含する。

【0036】

1つの実施形態において、DNAポリメラーゼはBファミリーDNAポリメラーゼである。

【0037】

別の実施形態において、DNAポリメラーゼはさらに、配列番号2のL408に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異、配列番号2のL408に対応する部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異、配列番号2のP410に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異、および配列番号2のA485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む。

【0038】

本発明はさらに、配列番号2のL408に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異；配列番号2のL408に対応する部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異；および配列番号2のP410に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異からなる群から選択される変異をさらに含む、配列番号2のA485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を有する、単離組換えDNAポリメラーゼを包含する。

【0039】

本発明はさらに、配列番号2のS345に対応する部位にセリンからプロリンへの変異をさらに含む、配列番号2のP410に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を有する、単離組換えDNAポリメラーゼを包含する。

【0040】

別の実施形態において、DNAポリメラーゼは、ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび複合ヌクレオチドからなる群から選択される非慣用的なヌクレオチドに対して識別が低下している。

【0041】

別の実施形態において、複合ヌクレオチドは、放射標識ヌクレオチド、蛍光標識ヌクレオチド、ビオチン標識ヌクレオチド、化学発光標識ヌクレオチドおよび量子ドット標識ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0042】

本発明はさらに、配列番号2のA485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異、または、配列番号2のL408またはP410に対応する部位に変異を含む、単離組

10

20

30

40

50

換え Bファミリー DNA ポリメラーゼを包含し、ここでの DNA ポリメラーゼは、野生型形のそのポリメラーゼに比べて、非慣用的なヌクレオチドに対する識別が低下している。

【0043】

1つの実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、3' から 5' エキソヌクレアーゼ欠損である。

【0044】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の D 1 4 1 または E 1 4 3 に対応するアミノ酸に変異を有する。

【0045】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の D 1 4 1 に対応する部位にアスパラギン酸からトレオニンまたはアラニンへの変異を有する。

10

【0046】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の E 1 4 3 に対応する部位にグルタミン酸からアラニンへの変異を有する。

【0047】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の E 1 4 3 に対応する部位にグルタミン酸からアラニンへの変異を有し、配列番号 2 の D 1 4 1 に対応するアミノ酸にアスパラギン酸からトレオニンまたはアラニンへの変異を有する。

【0048】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは熱安定性である。

20

【0049】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは古細菌である。

【0050】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の L 4 0 8 に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異を含む。

【0051】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の L 4 0 8 に対応する部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異を含む。

【0052】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の P 4 1 0 に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を含む。

30

【0053】

別の実施形態において、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の A 4 8 5 に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む。

【0054】

別の実施形態において、配列番号 2 の A 4 8 5 に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の L 4 0 8 に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異を含む。

【0055】

別の実施形態において、配列番号 2 の A 4 8 5 に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の L 4 0 8 に対応する部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異を含む。

40

【0056】

別の実施形態において、配列番号 2 の A 4 8 5 に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む、Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の D 4 1 0 に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を含む。

【0057】

別の実施形態において、配列番号 2 の P 4 1 0 に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を含む Bファミリー DNA ポリメラーゼは、配列番号 2 の S 3 4 5 に対応する部位にセリンからプロリンへの変異をさらに有する。

50

【0058】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のS345に対応する部位にセリンからプロリンへの変異を含み、配列番号2のT604に対応する部位に変異をさらに含み得る。

【0059】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のY497に対応する部位にチロシンからシステインへの変異を含み、そして配列番号2のI630に対応する部位にイソロイシンからバリンへの変異をさらに含み得る。

【0060】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のE645に対応する部位にグルタミン酸からリジンへの変異を含む。

10

【0061】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のE578に対応する部位にグルタミン酸からリジンへの変異を含み、そして配列番号2のR465に対応する部位にアルギニンからメチオニンへの変異をさらに含み得る。

【0062】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のL396に対応する部位にロイシンからグルタミンへの変異を含み、そして配列番号2のV401、N424、P569、E617またはV640に対応する部位に変異をさらに含み得る。

【0063】

20

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のS651に対応する部位にセリンからアスパラギンへの変異を含む。

【0064】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のL396に対応する部位にロイシンからプロリンへの変異を含み、そして配列番号2のE459に対応する部位に変異をさらに含み得る。

【0065】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のL456に対応する部位にロイシンからプロリンへの変異を含み、そして配列番号2のE658に対応する部位に変異をさらに含み得る。

30

【0066】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のL408に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異を含み、そして配列番号2のV437またはL478に対応する部位に変異をさらに含み得る。L408H変異は、本明細書に記載したジデオキシヌクレオチドおよびダイージデオキシヌクレオチドスクリーンの両方で単離された。

【0067】

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、配列番号2のY496に対応する部位にチロシンからアスパラギンへの変異を含む。

【0068】

40

別の実施形態において、BファミリーDNAポリメラーゼは、ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび複合ヌクレオチドからなる群から選択される非慣用的なヌクレオチドに対して識別が低下している。

【0069】

別の実施形態において、複合ヌクレオチドは、放射標識ヌクレオチド、蛍光標識ヌクレオチド、ビオチン標識ヌクレオチド、化学発光標識ヌクレオチドおよび量子ドット標識ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0070】

別の実施形態において、非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下した単離組換えDNAポリメラーゼ、或いは、配列番号2のA485に対応する部位にアラニンからトレオニン

50

への変異もしくは配列番号2のL408またはP410に対応する部位に変異を含む単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ（ここでのDNAポリメラーゼは、野生型形のそのポリメラーゼに比べて、非慣用的ヌクレオチドに対する識別が低下している）は、さらに、配列番号2のアミノ酸409におけるYからVへの変異；配列番号2のアミノ酸485におけるAからC、S、L、I、FまたはVへの変異；配列番号2のアミノ酸494におけるYからSへの変異；配列番号2のアミノ酸496におけるYからLへの変異；および、配列番号2のアミノ酸490におけるAからYへの変異からなる群から選択される変異に対応する、ポリメラーゼ中のアミノ酸残基における変異を含む。

【0071】

別の実施形態において、非慣用的ヌクレオチドに対して識別の低下した単離組換えDNAポリメラーゼ、または、配列番号2のA485に対応する部位でのアラニンからトレオニンへの変異もしくは配列番号2のL408またはP410に対応する部位での変異を含む単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼ（ここでのDNAポリメラーゼは、野生型形のそのポリメラーゼに比べて、非慣用的ヌクレオチドに対する識別が低下している）は、さらに、配列番号のアミノ酸483から496（これを含む）の1つに対応するポリメラーゼのアミノ酸における変異を含む。

【0072】

1つの実施形態において、変異は、配列番号2のアミノ酸485、490、494、または496の1つに対応するポリメラーゼのアミノ酸においてである。

【0073】

本発明はさらに、配列番号2のA485Tに対応するアミノ酸におけるアラニンからトレオニンへの変異、および、ポリメラーゼ中の配列番号2のL408、Y409またはP410にそれぞれ対応するアミノ酸の少なくとも1つの置換を含む、単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼを包含する。

【0074】

本発明はさらに、配列番号2のA485に対応するポリメラーゼのアミノ酸においてA以外のアミノ酸、および、ポリメラーゼ中の配列番号2のL408、Y409またはP410にそれぞれ対応するアミノ酸の少なくとも1つの置換を含む、単離組換えBファミリーDNAポリメラーゼを包含する。

【0075】

本発明はさらに、BファミリーDNAポリメラーゼをコードする核酸配列を含む、組換えベクターを包含する。

【0076】

本発明はさらに、DNAの相補鎖を標識する方法を包含し、前記方法は、鋳型DNA分子を、テルモコックス（Thermococcus）種JDF-3由来の組換えBファミリーDNAポリメラーゼ（ここでのDNAポリメラーゼは、非慣用的ヌクレオチドに対する識別が低下している）および非慣用的ヌクレオチドと、DNAポリメラーゼが相補的DNA鎖を合成し、非慣用的ヌクレオチドを合成された相補的DNA鎖に取込むことの可能な条件下および十分な時間、接触させる段階を含む。

【0077】

本発明はさらに、DNAの相補鎖を標識する方法を包含し、前記方法は、鋳型DNA分子を、配列番号2のA485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異、または、配列番号2のL408またはP410に対応する部位に変異を含む組換えBファミリーDNAポリメラーゼ（ここでのDNAポリメラーゼは、非慣用的ヌクレオチドに対する識別が低下している）および非慣用的ヌクレオチドと、DNAポリメラーゼが相補的DNA鎖を合成し、非慣用的ヌクレオチドを合成された相補的DNA鎖に取込むことの可能な条件下および十分な時間、接触させる段階を含む。

【0078】

1つの実施形態において、組換えBファミリーDNAポリメラーゼは、3'から5'エキソヌクレアーゼ欠損である。

10

20

30

40

50

【0079】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸L408に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異を含む。

【0080】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸L408に対応する部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異を含む。

【0081】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸P410に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を含む。

【0082】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む。

【0083】

別の実施形態において、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のL408に対応するアミノ酸にロイシンからヒスチジンへの変異を含む。

【0084】

別の実施形態において、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のL408に対応するアミノ酸にロイシンからフェニルアラニンへの変異を含む。

【0085】

別の実施形態において、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を含む組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号1のP410に対応するアミノ酸にプロリンからロイシンへの変異を含む。

【0086】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、および複合ヌクレオチドからなる群から選択される非慣用的ヌクレオチドに対する識別が低下している。

【0087】

別の実施形態において、複合ヌクレオチドは、放射標識ヌクレオチド、蛍光標識ヌクレオチド、ビオチン標識ヌクレオチド、化学発光標識ヌクレオチドおよび量子ドット標識ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0088】

本発明はさらに、シーケンスするDNA鎖を、シーケンスプライマー、テルモコックス(Thermococcus)種JDF-3由来の組換えBファミリーDNAポリメラーゼ(ここでのDNAポリメラーゼは、非慣用的ヌクレオチドに対する識別が低下している)および鎖終結ヌクレオチド類似体と、DNAポリメラーゼが相補的DNA鎖を合成し、ヌクレオチドを合成された相補的DNA鎖に取込むことの可能な条件下で接触させる段階を含み、ここでの鎖終結ヌクレオチドの取込みにより鎖伸長は終結し、よって鋳型DNA鎖のヌクレオチド配列が決定される、DNAをシーケンスする方法を包含する。

【0089】

本発明はさらに、シーケンスするDNA鎖を、シーケンスプライマー、配列番号2のA485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異、または、配列番号2のL408、S345またはP410に対応する部位に変異を含む組換えBファミリーDNAポリメラーゼ(ここでのDNAポリメラーゼは、非慣用的ヌクレオチドに対する識別が低下している)、および鎖終結ヌクレオチド類似体と、DNAポリメラーゼが相補的DNA鎖を合成し、ヌクレオチドを合成された相補的DNA鎖に取込むことの可能な条件下で接触させる段階を含み、ここでの鎖終結ヌクレオチド類似体の取込みにより、鎖伸長は終結し、よって鋳型DNA鎖のヌクレオチド配列が決定される、DNAをシーケンスする方法を包含する。

10

20

30

40

50

【0090】

1つの実施形態において、組換えDNAポリメラーゼは、3'から5'エキソヌクレアーゼ欠損である。

【0091】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸L408に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異を有する。

【0092】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸L408に対応する部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異を有する。

【0093】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸P410に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を有する。

【0094】

別の実施形態において、配列番号2のP410に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を含むBファミリーDNAポリメラーゼは、さらに、配列番号2のS345に対応する部位にセリンからプロリンへの変異を有する。

【0095】

別の実施形態において、組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を有する。

【0096】

別の実施形態において、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を有する組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のL408に対応する部位にロイシンからヒスチジンへの変異を有する。

【0097】

別の実施形態において、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を有する組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のL408に対応する部位にロイシンからフェニルアラニンへの変異を有する。

【0098】

別の実施形態において、配列番号2のアミノ酸A485に対応する部位にアラニンからトレオニンへの変異を有する組換えBファミリーポリメラーゼは、配列番号2のP410に対応する部位にプロリンからロイシンへの変異を有する。

【0099】

別の実施形態において、鎖終結ヌクレオチド類似体はジデオキシヌクレオチドである。

【0100】

別の実施形態において、ジデオキシヌクレオチドは、検出可能なように標識されている。

【0101】

別の実施形態において、ジデオキシヌクレオチドは蛍光標識されている。

【0102】

別の実施形態において、ジデオキシヌクレオチドは、フルオレセインおよびローダミンからなる群から選択される部分で標識されている。

【0103】

本発明は、本明細書に開示した方法を実施するためのキットも包含する。

【0104】

本発明は、前記ポリメラーゼをコードする核酸配列を含む宿主細胞を、前記DNAポリメラーゼの産生を可能とする条件下で培養することを含む、ここで開示したような組換えDNAポリメラーゼの製造法も包含する。

【0105】

本発明は、本明細書に記載した変異DNAポリメラーゼとTaqDNAポリメラーゼ（好ましくは変異形、F667Y）などの別のDNAポリメラーゼの混合物を包含する。前記混合物は、標識ヌクレオチドの合成ヌクレオチドへの重合から生じるシグナル均一性を向

10

20

30

40

50

上し得る点で有用である。

【0106】

本明細書に使用したような「識別」は、DNAポリメラーゼが、非慣用的ヌクレオチドを新生DNAポリマーに取込まない傾向を意味する。DNAポリメラーゼは、ヌクレオチド塩基相補性および糖およびヘテロ環塩基の構造的特徴を含むがこれに限定されない、ヌクレオチド構造を感知する能力を有し、これにより、DNAポリメラーゼは、新生ポリマーに取込む上で非慣用的ヌクレオチドではなく慣用的なデオキシヌクレオチドを優先的に利用することが可能となる。DNAポリメラーゼは、慣用的なデオキシヌクレオチドdATP、dCTP、dGTPおよびTTPをDNAポリマーに取込むことを強力に好み；ポリメラーゼは、その結合ポケット内の非慣用的ヌクレオチドでは進行しないようである。

10

【0107】

本明細書に使用したような「識別の低下」は、識別の低下を示さない親すなわち野生型DNAポリメラーゼに比べて、新生DNAポリマーから、非慣用的ヌクレオチドを排除する（すなわち非慣用的ヌクレオチドを新生DNAポリマーに取り込まない）傾向の少なくとも50%の低下を意味する。DNAポリメラーゼが、非慣用的ヌクレオチドではなく慣用的デオキシヌクレオチドdATP、dCTP、dGTPおよびTTPを取込む優先性は、これにより、天然レベルの優先性に比べて低下し、よって、非慣用的ヌクレオチドは、DNAポリメラーゼによりDNAポリマーにより迅速に取り込まれる。本発明により、識別の低下を示すポリメラーゼは、少なくとも1つの非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下を示すが、全ての非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下を示さないだろう。

20

【0108】

本発明により、識別は、対応する慣用的なヌクレオチドの取込みを50%阻害するのに必要な非慣用的ヌクレオチドの濃度を測定することにより定量する。この濃度は、本明細書では非慣用的ヌクレオチドについて「I_{50%}」として言及する。特定の非慣用的ヌクレオチドに対する識別は、その非慣用的ヌクレオチドについてのI_{50%}が、変異DNAポリメラーゼの代わりに、親DNAポリメラーゼを含む、同一のアッセイに比べて、少なくとも2分の1（50%）低下する場合に「低下」する。

【0109】

別法として、識別低下は、野生型または親酵素を使用して産生したシークエン斯拉ダーに同一なシークエン斯拉ダーを作成するために、識別の低下した変異ポリメラーゼを用いて、反応に必要な非慣用的ヌクレオチド（例えば、ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはコルジセピン）の量を決定することにより定量し得る。シークエン斯拉ダーは、例えば、プライマー末端から1から400塩基の範囲であり得、ラダーは、作成された伸長産物の数、並びに、シークエンス反応で作成される伸長産物の長さにおいて同一である。この型のアッセイでは、一定量のdNTPおよび可変量の非慣用的ヌクレオチドを使用して、野生型（または親）酵素および変異ポリメラーゼ（リボヌクレオチドでは、シークエン斯拉ダーは、重合産物のアルカリ切断により生じる）の両方を用いてシークエン斯拉ダーを作成する。Gardner & Jack、1999、上記参照。変異体は、野生型または親酵素により生じるものと同一（生じる伸長産物の数および長さに関して）のシークエン斯拉ダーを生じる、野生型または親ポリメラーゼにより使用される非慣用的ヌクレオチドの量の少なくとも2分の1（50%）少ない、5分の1（80%）少ない、10分の1（100%）少ない等を必要とする場合、識別の低下を示す。

30

40

【0110】

本明細書に使用したような「親」または「前駆体」なる語は、識別の低下した変異ポリメラーゼを作成する上で、出発物質として使用するポリメラーゼを意味する。「親」なる語は、天然に存在するようないわゆる「野生型」酵素だけではなく、中間体形、例えば、非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下した酵素の作成において出発物質として使用するエキソヌクレアーゼ欠損酵素も包含することを意味する。

【0111】

本明細書に使用したような「非慣用的ヌクレオチド」は、a) DNAポリメラーゼにより

50

認識され取り込まれる4つの慣用的なデオキシヌクレオチドdATP、dCTP、dGTP、およびTTPの1つではないヌクレオチド構造、b) (a)の4つの慣用的デオキシヌクレオチドの1つではない合成ヌクレオチド、c) 修飾された慣用的ヌクレオチド、またはd) リボヌクレオチド(DNAポリメラーゼにより通常認識または取り込まれないので) および修飾形のリボヌクレオチドを意味する。非慣用的ヌクレオチドは、例えばNew England Nuclearから市販されている、表IIIに列挙したものを含むがこれに限定されない。上記の非慣用的ヌクレオチドのいずれか1つは、「複合ヌクレオチド」であり得、これは本明細書に使用したように、蛍光標識、同位体、化学発光標識、量子ドット標識、抗原、または親和性部分を含むがこれに限定されない検出標識を有するヌクレオチドを意味する。

10

【0112】

本明細書に使用したような「細胞」、「細胞系」および「細胞培養液」なる語は同義語として使用でき、全てのかかる呼称は前駆体を含む。従って、「形質転換体」または「形質転換細胞」なる語は、一次対象細胞、および、移行の数に関係なくそれから得られる培養液を含む。また、全ての前駆体は、慎重または不注意な変異に因り、DNA内容物が正確に同一でない場合があることを理解する。最初の形質転換細胞についてスクリーニングしたのと同じ機能を有する変異前駆体を含める。

【0113】

本明細書に使用したような「ベクターで形質転換した生物」なる語は、組換え遺伝子産物を有する生物を意味する。

20

【0114】

本明細書に使用したような「熱安定性」は、酵素は高温で活性であり、約93℃から約97℃の範囲のDNA二本鎖変性温度に抵抗性であるというような、DNAポリメラーゼの特性を意味する。「活性」は、酵素が、二本鎖核酸の変性を奏効するのに必要な時間、高温または変性温度にかける場合に、プライマー伸長反応を奏効できる能力を保持していることを意味する。本明細書に使用したような高温は、約70℃から約75℃の範囲を意味し、一方、本明細書に使用したような非高温は、約35℃から約50℃までの範囲を意味する。

【0115】

本明細書に使用したような「アーキア」は、古細菌(Archaea)界の生物またはその生物由来のDNAポリメラーゼを意味する。

30

【0116】

本明細書に使用したような「シークエンスプライマー」は、ポリメラーゼによる核酸合成の開始点、次いで、シークエンスするDNA鎖のアニールリング点として作用する、天然または合成のオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーは、典型的には、一本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドである。適切なプライマーの長さは、目的のプライマーの用途に依存するが、DNAシークエンス適用では、典型的には約15から約40ヌクレオチド長の範囲である。

【0117】

本明細書に使用したような「BファミリーDNAポリメラーゼ」は、BファミリーDNAポリメラーゼの一員として分類される任意のDNAポリメラーゼを意味し、ここでのBファミリー分類は、大腸菌(E. coli) DNAポリメラーゼIIに対する構造類似性に基づく。以前には一ファミリープロテアーゼとして知られていた、BファミリーDNAポリメラーゼは、表Iなどに列挙したものを含むがこれに限定されない。

40

【0118】

本明細書に使用したような「AファミリーDNAポリメラーゼ」は、AファミリーDNAポリメラーゼの一員として分類される任意のDNAポリメラーゼを意味し、ここでのAファミリー分類は、大腸菌(E. coli) DNAポリメラーゼIに対する構造類似性に基づく。AファミリーDNAポリメラーゼは、表Iなどに列挙したものを含むがこれに限定されない。

50

【0119】

本明細書に使用したような「3'から5'エキソヌクレアーゼ欠損」または「3'から5'エキソ」は、取込んだヌクレオチドを、DNAポリマーの3'末端から除去する能力を実質的に欠失した酵素を意味する。Bファミリーポリメラーゼのメンバーにより例示される3'から5'エキソヌクレアーゼ活性などの、DNAポリメラーゼエキソヌクレアーゼ活性は、変異により欠失し得、エキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼが生じる。本明細書に使用したような、3'から5'エキソヌクレアーゼ活性の欠損したDNAポリメラーゼは、実質的に、3'から5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失している。「実質的に欠失」は、完全な活性の欠失、または「実質的な」活性の欠失を包含する。「実質的な」活性の欠失は、変異ポリメラーゼの3'エキソヌクレアーゼ活性が、親ポリメラーゼに比べて、0.03%であり、そしてまた、0.05%、0.1%、1%、5%、10%または20%であり得るが、親または野生型ポリメラーゼの3'エキソヌクレアーゼ活性の50%よりも高くない。

10

【0120】

本明細書に使用したような「変異」は、DNAによりコードされるアミノ酸配列を変化させる、出発親DNA配列に導入された変化を意味する。変異の結果は、新しい特徴、機能、または親DNAによりコードされるタンパク質に見出されない特質の創造を含むがこれに限定されない。

【0121】

本明細書に使用したような「野生型」は、天然に存在するような、生物、株、遺伝子、タンパク質または特徴の典型的な状態を意味する。それ故、野生型は、野生型への変化（群）の導入による野生型から得られた、変異体から識別される天然状態である。

20

【0122】

本明細書に使用したような「対応する」は、2つ以上の核酸またはポリペプチドの比較における配列類似性を意味し、ここで機能的に等価なドメインまたはサブ配列が同定される；前記の機能的に等価なドメインまたはサブ配列、または、かかるドメインまたはサブ配列内のアミノ酸は「対応する」と言われる。すなわち、2つ以上の配列を、比較アラインメント解析により比較し、ここで全配列を、類似または同一の配列領域について調べ、よって、他の配列（群）由来の領域に機能的に等価でありそうな領域を同定する。

【0123】

アミノ酸、アミノ酸配列またはタンパク質ドメインの比較に関して本明細書に使用したような、「類似」なる語は、同一ではないが、「保存的」差異を示す、アミノ酸またはドメインを意味する。「保存的」により、異なるアミノ酸配列が、対応または基準配列中のアミノ酸と類似の特徴を有することを意味する。典型的な保存的置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間；SerとThr間；酸性残基AspとGlu間；AsnとGln間；および、塩基性残基LysとArg間；または、芳香族残基PheとTyr間である。2つのポリペプチド配列間の類似度（最も多いのは%）の計算において、比較する2つの分子の全長に関して、2つのポリペプチド配列中の対応するアミノ酸残基間に同一性または類似性が観察される位置の数を考える。

30

【0124】

本明細書に使用したような「機能的等価」なる語は、特定のモチーフ、領域、またはモチーフまたは領域内のアミノ酸が、酵素の全体的な機能に関して、モチーフ、領域、または、モチーフまたは領域内のアミノ酸が別の酵素で実施するのと同じ機能を実施することを意味する。

40

【0125】

本明細書に使用したような「鎖終結ヌクレオチド類似体」は、一旦取り込まれると、DNAポリメラーゼによるその後の伸長の基質として作用できず、よってDNAポリメラーゼによるDNAポリマーの伸長は終結する、ヌクレオチド類似体を意味する。かかるヌクレオチド類似体は、典型的には、DNAポリメラーゼが、来るヌクレオチドとホスホジエステル結合を合成できる、その糖部分上のヒドロキシル基を欠失している。鎖終結ヌクレオ

50

チド類似体は、非慣用的ヌクレオチドのサブセットであり、ジデオキシヌクレオチドを含むがこれに限定されない。

【0126】

本明細書に使用したような「検出可能なように標識」は、種々の手段により容易に検出できる、官能基（標識）を取り込んだ構造的修飾を意味する。検出可能なように標識できる化合物は、ヌクレオチド類似体を含むがこれに限定されない。検出可能なヌクレオチド類似体標識は、蛍光化合物、同位体化合物、化学発光化合物、量子ドット標識、ビオチン、酵素、高電子密度試薬、および抗血清またはモノクローナル抗体の入手できるハプテンまたはタンパク質を含むがこれに限定されない。種々の検出手段は、分光、光化学、生化学、免疫化学、または化学手段を含むがこれに限定されない。

10

【0127】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに関して本明細書に使用したような「単離」なる語は、天然配列が、その通常の細胞環境から取り出されたか、または、非天然環境で合成（例えば人工的に合成）することを意味する。従って、配列は、細胞非含有溶液にあり得るか、異なる細胞環境に置かれ得る。この語は、該配列が、存在する唯一のヌクレオチドまたはポリペプチド鎖であるが、それに天然に会合した、非ヌクレオチドまたは非ポリペプチド物質を実質的に含まない（少なくとも約90～95%純粋）ことを意味するものではない。

【0128】

本明細書に使用したような「組換え」なる語は、遺伝子工学（すなわち、そのポリヌクレオチドまたはポリペプチドをコードする遺伝子材料の修飾または操作により）により変化したポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

20

【0129】

本発明は、本明細書に記載したような全長の変異DNAポリメラーゼ、並びに、変異ポリメラーゼの機能的断片、すなわち、変異ポリメラーゼの全アミノ酸配列未満であり、少なくとも1セットの条件下で、ポリヌクレオチドの重合を触媒する能力を保持した、DNAポリメラーゼ断片を包含する。前記機能的断片は、別々の実体として存在しても、融合タンパク質などの、より大きなポリペプチドの構成成分であってもよい。

【0130】

本明細書に使用したような「相補的DNA鎖」なる語は、プライマー伸長反応においてDNAポリメラーゼにより鋳型DNA分子から合成されたDNA分子を意味する。

30

【0131】

本明細書に使用したような「鋳型DNA分子」なる語は、相補的核酸鎖が、例えば、プライマー伸長反応において、DNAポリメラーゼにより合成される、核酸鎖を意味する。

【0132】

本発明のさらなる特徴および利点は、以下のその実施形態および図面の説明に、および特許請求の範囲から、より完全に明らかとなろう。

【0133】

説明

本発明は、その非修飾野生型形に比べて、非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下をもたらす、1つ以上の遺伝子変化を有する、BファミリーDNAポリメラーゼの発見に基づく。本明細書に記載の全参考文献を、参考として本明細書にその全体を取込む。

40

【0134】

非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下を示すBファミリーDNAポリメラーゼ：

A. 本発明により有用なDNAポリメラーゼ

本発明により、BファミリーのDNAポリメラーゼを変異して、非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下を示す酵素を作成し得る。表Iは、ファミリーにより分類される既知のDNAポリメラーゼの非制限的なリストを含む。

【0135】

【表1】

50

表I ファミリーごとのDNAポリメラーゼ

AファミリーDNAポリメラーゼ

細菌DNAポリメラーゼ

参考文献

- a) *E. coli* DNAポリメラーゼI (1)
- b) *Streptococcus pneumoniae* DNAポリメラーゼI (2)
- c) *Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼI (3)
- d) *Thermus flavus* DNAポリメラーゼI (4)
- e) *Thermotoga maritima* DNAポリメラーゼI

10

バクテリオファージDNAポリメラーゼ

- a) T5 DNAポリメラーゼ (5)
- b) T7 DNAポリメラーゼ (6)
- c) Sp01 DNAポリメラーゼ (7)
- d) Sp02 DNAポリメラーゼ (8)

ミトコンドリアDNAポリメラーゼ

- 酵母ミトコンドリアDNAポリメラーゼII (9、10、11)

BファミリーDNAポリメラーゼ

細菌DNAポリメラーゼ

- E. coli* DNAポリメラーゼII (15)

バクテリオファージDNAポリメラーゼ

- a) RPD1 DNAポリメラーゼ (16、17)
- b) 29 DNAポリメラーゼ (18)
- c) M2 DNAポリメラーゼ (19)
- d) T4 DNAポリメラーゼ (20)

原始DNAポリメラーゼ

- a) *Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼ (Vent) (21)
- b) *Pyrococcus furiosus* DNAポリメラーゼ (22)
- c) *Sulfolobus solfataricus* DNAポリメラーゼ (23)
- d) *Thermococcus gorgonarius* DNAポリメラーゼ (64)
- e) *Thermococcus* 種TY (65)
- f) *Pyrococcus* 種KOD1株 (66)
- g) *Sulfolobus acidocaldarius* (67)
- h) *Thermococcus* 種9° N-7 (68)
- i) *Pyrodictium occultum* (69)
- j) *Methanococcus voltae* (70)
- k) *Desulfurococcus* TOK株 (D. Tok Pol) (71)

30

真核細胞DNAポリメラーゼ

- (1) DNAポリメラーゼ α (24)
- a) ヒトDNAポリメラーゼ α (24)
- b) *S. cerevisiae* DNAポリメラーゼ α (25)
- c) *S. pombe* DNAポリメラーゼI α (26)
- d) *Drosophila melanogaster* DNAポリメラーゼ α (27)
- e) *Trypanosoma brucei* DNAポリメラーゼ α (28)

40

(2) DNAポリメラーゼデルタ

- a) ヒトDNAポリメラーゼ (デルタ) (29、30)
- b) ウシDNAポリメラーゼ (デルタ) (31)
- c) *S. cerevisiae* DNAポリメラーゼIII (デルタ) (32)
- d) *S. pombe* DNAポリメラーゼIII (デルタ) (33)
- e) *Plasmodium falciparum* DNAポリメラーゼ (デルタ) (34)

(3) DNAポリメラーゼ ϵ

- S. cerevisiae* DNAポリメラーゼII (ϵ) (35)

10

(4) 他の真核DNAポリメラーゼ

- S. cerevisiae* DNAポリメラーゼRev3 (36)

ウイルスDNAポリメラーゼ

- a) 単純ヘルペスウイルス1型DNAポリメラーゼ (37)
- b) イヌヘルペスウイルス1型DNAポリメラーゼ (38)
- c) 水痘帯状疱疹ウイルスDNAポリメラーゼ (39)
- d) エプシュタインバーウイルスDNAポリメラーゼ (40)
- e) ヘルペスウイルス・サイミリDNAポリメラーゼ (41)
- f) ヒトサイトメガロウイルスDNAポリメラーゼ (42)
- g) ネズミサイトメガロウイルスDNAポリメラーゼ (43)
- h) ヒトヘルペスウイルス6型DNAポリメラーゼ (44)
- i) チャネルキャットフィッシュウイルスDNAポリメラーゼ (45)
- j) コレラウイルスDNAポリメラーゼ (46)
- k) 鶏痘ウイルスDNAポリメラーゼ (47)
- l) ワクシニアウイルスDNAポリメラーゼ (48)
- m) *Choristoneura biennis* DNAポリメラーゼ (49)
- n) *Autographa californica* 核ポリメラーゼウイルス (AcMNPV) DNAポリメラーゼ (50)
- o) *Lymantria dispar* 核多角体病ウイルスDNAポリメラーゼ (51)
- p) アデノウイルス-2 DNAポリメラーゼ (52)
- q) アデノウイルス-7 DNAポリメラーゼ (53)
- r) アデノウイルス-12 DNAポリメラーゼ (54)

20

30

DNAポリメラーゼをコードする真核鎖状DNAプラスミド

- a) S-1メイズDNAポリメラーゼ (55)
- b) *kalilo neurospora* 中間体DNAポリメラーゼ (56)
- c) pA12 *ascobolus immersus* DNAポリメラーゼ (57)
- d) pCLK1 *Claviceps purpurea* DNAポリメラーゼ (58)
- e) *maranhar neurospora crassa* DNAポリメラーゼ (59)
- f) pEM *Agaricus bitorquis* DNAポリメラーゼ (60)
- g) pGKL1 *Kluyveromyces lactis* DNAポリメラーゼ (61)
- h) pGKL2 *Kluyveromyces lactis* DNAポリメラーゼ (62)
- i) pSKL *Saccharomyces kluyveri* DNAポリメラーゼ (63)

40

【0136】

B. プラスミド

本発明に記載のBファミリーDNAポリメラーゼの作成用の出発配列は、プラスミドベクターに含み得る。クローン化したBファミリーDNAポリメラーゼの非制限的なリストお

50

よびジェンバンクアクセッション番号を表 I I に示す。

【0137】

【表2】

表II クローン化したBファミリーオリメラーゼのアクセッション情報

Vent Thermococcus litoralis	
アクセッション AAA72101	
PID g348689	
バージョン AAA72101.1 GI:348689	10
DBソース 座THCVDPE アクセッションM74198.1	
THEST THERMOCOCCUS属 (TY株)	
アクセッション O33845	
PID g3913524	
バージョン O33845 GI:39133524	
DBソース swissprot:座DPOL__THEST、アクセッションO33845	
Pab Pyrococcus abyssi	
アクセッション P77916	
PID g3913529	
バージョン P77916 GI:3913529	20
DBソース swissprot:座DPOL__PYRAB、アクセッションP77916	
PYRHO Pyrococcus horikoshii	
アクセッション O59610	
PID g3913526	
バージョン O59610 GI:3913526	
DBソース swissprot:座DPOL__PYRHO、アクセッションO59610	
PYRSE PYROCOCCUS属 (GE23株)	
アクセッションP77932	
PID g3913530	
バージョン P77932 GI:3913530	30
DBソース swissprot:座DPOL__PYRSE、アクセッションP77932	
DeepVent Pyrococcus属	
アクセッションAAA67131	
PID g436495	
バージョン AAA67131.1 GI:436495	
DBソース 座PSU00707アクセッションU00707.1	
Pfu Pyrococcus furiosus	
アクセッションP80061	
PID g399403	
バージョン P80061 GI:399403	40
DBソース swissprot:座DPOL__RYRFU、アクセッションP80061	
JDF-3 Thermococcus属	
未発表	
米国特許第5602011号からの	
Baross gi 2097756 pat US 5602011 12配列12	
9degN THERMOCOCCUS属 (9ON-7株)	
アクセッションQ56366	
PID g3913540	

バージョン Q56366 GI:3913540
 DBソース swissprot:座DPOL_THES9、アクセッションQ56366
 KOD *Pyrococcus* 属
 アクセッションBAA06142
 PID g1620911
 バージョンBAA06142.1 GI:1620911
 DBソース 座PYWKODPOLアクセッションD29671.1
 Tgo *Thermococcus gorgonarius*
 アクセッション4699806
 PID g4699806 10
 バージョン GI:4699806
 DBソース pdb:チェーン65、1999年2月23日リリース
 THEFM *Thermococcus fumicolans*
 アクセッションP74918
 PID g3913528
 バージョンP74918 GI:3913528
 DBソース swissprot:座DPOL_THEFM、アクセッションP74918
 METTH *Methanobacterium thermoautotrophicum*
 アクセッションO27276
 PID g3913522 20
 バージョンO27276 GI:3913522
 DBソース swissprot:座DPOL_METTH、アクセッションO27276
 Metja *Methanococcus jannaschii*
 アクセッションQ58295
 PID g3915679
 バージョンQ58295 GI:3915679
 DBソース swissprot:座DPOL_METJA、アクセッションQ58295
 POC *Pyrodictium occultum*
 アクセッションB56277
 PID g1363344 30
 バージョン B56277 GI:1363344
 DBソース pir:座B56277
 ApeI *Aeropyrum pernix*
 アクセッションBAA81109
 PID g5105797
 バージョンBAA81109.1 GI:5105797
 DBソース 座AP000063アクセッションAP000063.1
 ARCFU *Archaeoglobus fulgidus*
 アクセッションO29753
 PID g3122019 40
 バージョン O29753 GI:3122019
 DBソース swissprot:座DPOL_ARCFU、アクセッションO29753
 Desulfurococcus 属Tok
 アクセッション6435708
 PID g64357089
 バージョン GT:6435708
 DBソース pdb、チェーン65、1999年6月2日リリース

【0138】

修飾形のBファミリーDNAポリメラーゼの発現に許容されるプラスミドは、当業者によって、当分野で既知の多数から選択し得る。本発明に記載の修飾DNAポリメラーゼの発現用のプラスミドベクターは、好ましくは、高レベルのDNAポリメラーゼの発現を指令する配列を含み、より好ましくは、誘導性の高レベルのDNAポリメラーゼの発現を指令する配列を含む。誘導性の高レベルの発現系の一例として、本発明に記載の修飾DNAポリメラーゼコード配列を、バクテリオファージT7プロモーターの制御下に置いたプラスミドを、その染色体内に誘導性T7DNAポリメラーゼ遺伝子を含む細菌に導入し得る。T7RNAポリメラーゼ遺伝子の誘導は、その後、高レベルのT7プロモーター駆動DNAポリメラーゼ遺伝子の発現を誘導する（例えば、Gardner & Jack、Nucleic Acids Res. 27:2545参照）。 10

【0139】

C. 変異誘発

クローン化した野生型形のBファミリーDNAポリメラーゼを変異して、多くの方法により非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下を示す形を作成し得る。

【0140】

第一に、1つ以上の無作為な状況の変異を有する変異体のパネルをもたらし、無作為変異誘発法が当分野に存在する。次いで、かかる変異体のパネルを、野生型ポリメラーゼと比較して識別の低下を示すものについてスクリーニングし得る（以下の「識別の低下について変異体を評価する方法」参照）。無作為変異誘発法の例は、いわゆる「エラーしがちなPCR法」である。名前が示すように、この方法は、特定の配列を、DNAポリメラーゼが高忠実度の取込みを支持しない条件下で増幅する。異なるDNAポリメラーゼにおけるエラーしがちな取込みを促す条件は変化するが、当業者は、特定の酵素についてのかかる条件を決定し得る。増幅忠実度における多くのDNAポリメラーゼの可変の鍵は、例えば、緩衝液中の二価金属イオンの種類および濃度である。それ故、マンガンイオンの使用および／またはマグネシウムまたはマンガンイオン濃度の変化を適用して、ポリメラーゼの誤速度に影響を及ぼし得る。 20

【0141】

第二に、真っ直ぐな方法で特定の部位または領域を変化することの可能な、当分野で既知の多くの部位特異的変異誘発法が存在する。慣用的およびPCRをベースとした方法の両方を含む、部位特異的変異誘発の実施のために市販で入手可能な多くのキットがある。例は、Stratageneから入手できるEXSITE（商標）PCRをベースとした部位特異的変異誘発キット（カタログ番号200502；PCRをベース）およびStratageneのQUICKCHANGE（商標）部位特異的変異誘発キット（カタログ番号200518；PCRをベースとしていない）、および、これもStratageneのCHAMELEON（登録商標）二本鎖部位特異的変異誘発キット（カタログ番号200509）を含む。 30

【0142】

当分野で既知の古い部位特異的変異誘発法は、一本鎖DNA鋳型の単離を可能とする、M13バクテリオファージベクターなどの、ベクターへの変異すべき配列のサブクローニングに依拠する。これらの方法では、変異原性プライマー（すなわち、変異すべき部位にアニーリングできるが、変異すべき部位に1つまたはミスマッチのヌクレオチドを有するプライマー）を、一本鎖鋳型にアニーリングし、次いで変異原性プライマーの3'末端から開始して鋳型の相補体を重合した。次いで、得られた二本鎖を宿主細菌に形質転換し、プラークを所望の変異についてスクリーニングした。 40

【0143】

より近年では、部位特異的変異誘発は、一本鎖鋳型を必要としないという利点を有する、PCR方法論を使用した。さらに、サブクローニングを必要としない方法を開発した。PCRをベースとした部位特異的変異誘発を実施する場合には数個の組織を考えなければならない。第一に、これらの方法では、ポリメラーゼにより導入される望ましくない変異の 50

拡大を防ぐために、PCRサイクルの数を減少することが望ましい。第二に、反応に存続する非変異親分子の数を減少するために、選択を使用しなければならない。第三に、伸長された長さのPCR法が、単一のPCRプライマーセットの使用を可能とするために好ましい。そして第四に、いくつかの熱安定性ポリメラーゼの非鋳型依存的末端伸長活性のために、PCRにより作成した変異産物の平滑末端ライゲーション (l i g a t i o n) 前に、最終研磨段階を手順に取込む必要がしばしばある。

【0144】

下記のプロトコルは、以下の段階を通じてこれらの考察を適応させる。第一に、使用する鋳型濃度は、慣用的なPCR反応に使用するものの約1000倍であり、産物の収率を劇的に低下することなく、サイクル数を25～30から5～10まで減少することが可能となる。第二に、制限エンドヌクレアーゼDpnI（認識標的配列：5-Gm6ATC-3、ここでのA残基はメチル化されている）を使用して、親DNAに対して選択する。なぜなら、大半の一般的な大腸菌 (E . c o l i) D a m株は、そのDNAを配列5-GATC-3でメチル化するからである。第三に、Taqエクステンダーを、PCR混液に使用して、長い（すなわち完全なプラスミド長さの）PCR産物の比率を増加する。最後に、PfuDNAポリメラーゼを使用して、T4DNAリガーゼを使用した分子内ライゲーション (l i g a t i o n) 前に、PCR産物の末端を研磨する。

【0145】

この方法は、以下のように詳述する：

3'-5'エキソヌクレアーゼドメインのPCRをベースとした部位特異的変異誘発プラスミド鋳型DNA（約0.5 pmol）を、1×変異誘発緩衝液（20 mM トリスHCl、pH 7.5；8 mM MgCl₂；40 μg/ml BSA）を含むPCRカクテルに加え；12～20 pmolの各プライマー（当業者は、オリゴヌクレオチドプライマーのアニールング特徴に影響を及ぼす、塩基組成、プライマー長および目的の緩衝液塩濃度などの因子を考慮して、必要であれば変異原性プライマーを設計し得る；1つのプライマーは、所望の変異を含まなければならない、1つ（同じまたはその他）は、後のライゲーション (l i g a t i o n) を容易にするために5'リン酸を含まなければならない）、250 μMの各dNTP、2.5 U Taq DNAポリメラーゼ、および2.5 UのTaqエクステンダー（Stratageneから入手可能；Nielsonら（1994）Strategies 7：27、および米国特許第5,556,772号参照）を含むPCRカクテルに加える。PCRサイクリングは、以下のように実施する：94℃で4分間、50℃で2分間、72℃で2分間の1サイクル；次いで、94℃で1分間、54℃で2分間および72℃で1分間の5～10サイクル。親鋳型DNA、および、変異原性プライマーを取り込んだ線形でPCRにより作成されたDNAを、DpnI（10 U）およびPfuDNAポリメラーゼ（2.5 U）で処理する。これにより、インビボでのメチル化親鋳型およびハイブリッドDNAのDpnIによる消化、および、線形PCR産物に対する鋳型の指令しないTaq DNAポリメラーゼ伸長塩基（群）のPfuDNAポリメラーゼによる除去が生じる。反応液を37℃で30分間インキュベートし、次いで、さらに30分間72℃まで移行した。0.5 mM ATPを含む変異誘発緩衝液（115 μlの1×）を、DpnI消化PfuDNAポリメラーゼ研磨PCR産物に加える。溶液を混合し、10 μlを新しい微量遠心管に取り出し、T4DNAリガーゼ（2～4 U）を加える。ライゲーション (l i g a t i o n) 液を37℃で60分以上インキュベートする。最後に、処理した溶液を、標準的な方法に従ってコンピテント大腸菌 (E . c o l i) に形質転換する。

【0146】

D. 本発明により有用な非慣用的ヌクレオチド

当分野には利用可能な多種多様の非慣用的ヌクレオチドが存在する。それらのいずれかまたは全部を、本発明のDNAポリメラーゼとの使用に考える。前記非慣用的ヌクレオチドの非制限的なリストを表IIIに提示する。

【0147】

【表 3】

表 III 非慣用的ヌクレオチド

ジデオキシヌクレオチド類似体	
標識したフルオレセイン	標識した発蛍光団
フルオレセイン-12-ddCTP	エオシン-6-ddCTP
フルオレセイン-12-ddUTP	クマリン-5-ddUTP
フルオレセイン-12-ddATP	テトラメチルローダミン-6-ddUTP
フルオレセイン-12-ddGTP	テキサスレッド-5-ddATP
フルオレセイン-N6-ddATP	L I S S A M I N E (商標) - ローダミン-5-ddGTP
10	
標識したFAM	標識したTAMRA
FAM-ddUTP	TAMRA-ddUTP
FAM-ddCTP	TAMRA-ddCTP
FAM-ddATP	TAMRA-ddATP
FAM-ddGTP	TAMRA-ddGTP
標識したROX	標識したJOE
ROX-ddUTP	JOE-ddUTP
ROX-ddCTP	JOE-ddCTP
ROX-ddATP	JOE-ddATP
ROX-ddGTP	JOE-ddGTP
20	
標識したR6G	標識したR110
R6G-ddUTP	R110-ddUTP
R6G-ddCTP	R110-ddCTP
R6G-ddATP	R110-ddATP
R6G-ddGTP	R110-ddGTP
標識したビオチン	標識したDNP
ビオチン-N6-ATP	DNP N6 ddATP
30	
デオキシヌクレオチド類似体	
TTP類似体	dATP-類似体
フルオレセイン-12-dUTP	クマリン-5-dATP
クマリン-5-dUTP	ジエチルアミノクマリン-5-dATP
テトラメチルローダミン-6-dUTP	フルオレセイン-12-dATP
テトラエチルローダミン-6-dUTP	フルオレセインクロロトリアジニル- 4-dATP
テキサスレッド-5-dUTP	L I S S A M I N E (商標) -ロー ダミン-5-dATP
40	
L I S S A M I N E (商標) -ローダミン -5-dUTP	ナフトフルオレセイン-5-dATP
ナフトフルオレセイン-5-dUTP	ピレン-8-dATP
フルオレセインクロロトリアジニル-4 -dUTP	テトラメチルローダミン-6-dATP
ピレン-8-dUTP	テキサスレッド-5-dATP

ジエチルアミノクマリン-5-dUTP
 ビオチン-N6-dATP

DNA-N6-dATP

dCTP類似体

クマリン-5-dCTP
 フルオレセイン-12-dCTP
 テトラメチルローダミン-6-dCTP
 テキサスレッド-5-dCTP
 LISSAMINE (商標) -ローダミン-5-dCTP
 ナフトフルオレセイン-5-dCTP
 フルオレセインクロロトリアジニル-4-dCTP
 ビレン-8-dCTP
 フルオレセイン-N4-dCTP
 ビオチン-N4-dCTP
 DNP-N4-dCTP

dGTP類似体

クマリン-5-dGTP
 フルオレセイン-12-dGTP
 テトラメチルローダミン-6-dGTP
 テキサスレッド-5-dGTP
 LISSAMINE (商標) -ローダミン-5-dGTP

10

ジエチルアミノクマリン-4-dCTP

20

リボヌクレオチド類似体

CTP類似体

クマリン-5-CTP
 フルオレセイン-12-CTP
 テトラメチルローダミン-6-CTP
 テキサスレッド-5-CTP
 LISSAMINE (商標) -ローダミン-5-CTP
 ナフトフルオレセイン-5-CTP
 フルオレセインクロロトリアジニル-4-CTP
 ビレン-8-CTP
 フルオレセイン-N4-CTP
 ビオチン-N4-CTP

UTP類似体

フルオレセイン-12-UTP
 クマリン-5-UTP
 テトラメチルローダミン-6-UTP
 テキサスレッド-5-UTP
 LISSAMINE (商標) -5-UTP
 ナフトフルオレセイン-5-UTP
 フルオレセインクロロトリアジニル-4-UTP
 ビレン-8-UTP

30

ATP類似体

クマリン-5-ATP
 フルオレセイン-12-ATP
 テトラメチルローダミン-6-ATP
 テキサスレッド-5-ATP
 LISSAMINE (商標) -ローダミン-5-ATP
 フルオレセイン-N6-ATP
 ビオチン-N6-ATP
 DNP-N6-ATP

40

【0148】

本発明に有用な追加の非慣用的ヌクレオチドは、7-デアザ-dATP、7-デアザ-dGTP、5'-メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸を含むがこれに限定されない。上記に列挙したもののさらなる非慣用的ヌクレオチドまたは変形は、W r i g h

50

t & Brown、1990、Pharmacol. Ther. 47:447により考察されている。リボヌクレオチドは、非慣用的ヌクレオチドとして適正であると特に注記する。なぜなら、リボヌクレオチドは、一般にDNAポリメラーゼにより取り込まれないからである。ポリメラーゼが、標識または非標識リボヌクレオチドを取込む能力または能力の増強をもたらす、BファミリーDNAポリメラーゼの修飾を特に本明細書に考える。

【0149】

E. 識別の低下について変異体を評価する方法

当分野で既知のように、または本明細書に記載のように作成し、細菌で発現した、無作為または部位特異的変異体を、数個の異なるアッセイにより、非慣用的ヌクレオチドに対する識別の低下についてスクリーニングし得る。1つの方法では、宿主細菌を、例えばλ Z

10

【0150】

変異体ポリメラーゼライブラリーは、Sagnerら (Sagner, G、Ruger, R. および Kessler, C (1991) Gene 97:119~123) の使用した技術の変形を使用してスクリーニングし得る。このアプローチでは、λファージクローンは、平方cmあたり10~20個のプラークの密度で塗布する。プラークに存在するタンパク質をろ紙に移し、ポリメラーゼスクリーニング緩衝液 (50mM トリス (pH 8.0)、7mM MgCl₂、3mM β-ME) で湿らせる。ろ紙を、プラスチックラップ層とガラスの間に保ち、一方、宿主細胞タンパク質を、65℃で30分間インキュベートすることにより熱で失活させる。次いで、熱処理したろ紙を、新しいプラスチックラップに移し、約35μlのポリメラーゼアッセイカクテルを、ろ紙の各平方cmごとに加える。アッセイカクテルは、1×クローン化Pfu (cPfu) マグネシウム非含有緩衝液 (1×緩衝液は20mM トリス-HCl (pH 8.8)、10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、100μg/ml ウシ血清アルブミン (BSA)、および0.1%トリトンX-100からなり; Pfu マグネシウム非含有緩衝液は、Stratagene (カタログ番号200534)、125μg/mlの活性化仔牛胸腺またはサケ精子DNA、1.29μCi/ml⁻³ ³P d dNTPまたはジデオキシヌクレオチド (dNTP: ダイ- d dNTP比は1:15で) から得られ得る。初期スクリーニングは、MnCl₂の存在下で実施したが、好ましい方法は1×Taqポリメラーゼ緩衝液 (1.5mM MgCl₂) 中でスクリーニングすることであった。ろ紙を、プラスチックラップとガラスプレートの間に置き、次いで65℃で1時間、次いで70℃で1時間と15分間インキュベートする。次いで、ろ紙を3回、1回の洗浄あたり5分間、2×SSC中で洗浄し、その後、2回100%エタノール中で濯ぎ、真空乾燥する。次いで、ろ紙をX線フィルム (約16時間) に感光し、標識を取り込んだプラークを、ろ紙を、ファージクローンを有する最初のプレートとアラインすることにより同定する。このように同定したプラークをより希釈した濃度で再塗布し、精製プラークの単離の可能な類似した条件下でアッセイする。

20

30

40

【0151】

上記したアッセイなどのアッセイにおいて、標識により生じるシグナルは、アッセイに使用した特定の非慣用的ヌクレオチドまたは非慣用的ヌクレオチドの組合せに関して、ポリメラーゼの活性の直接の指標である。全4つの慣用的ヌクレオチドに対応する非慣用的ヌクレオチドを反応に含め得るか、または、別法として、唯1つの非慣用的ヌクレオチドを含めて、特定の非慣用的ヌクレオチドの利用に対する変異 (群) の効果を評価し得る。1つのアプローチは、最初のスクリーンにおいて全4つのヌクレオチドに対応する非慣用的ヌクレオチドを使用して、基準野生型クローンより多く取込んだクローンを同定し、次いで、その後のスクリーンで個々の非慣用的ヌクレオチドの取込みをモニタリングする。好

50

ましいスクリーニング形態において、 $ddATP$ 、 $ddCTP$ および $ddTTP$ のジデオキシヌクレオチドおよびジデオキシヌクレオチド類似体のみを使用する。なぜなら、 $ddGTP$ は、いくつかのDNAポリメラーゼにより識別されず、任意のスクリーンのバックグラウンドシグナルを増加させるからである。

【0152】

ジデオキシヌクレオチドの取込み能の増加したクローンについてスクリーニングするために、次いで、ジデオキシヌクレオチドのみを利用した最初のスクリーンで同定したクローンを、全4つの $dNTP$ 、 $a;H-TTP$ トレーサー、および低レベルの各 $ddNTP$ を使用して、DNAポリメラーゼヌクレオチド取込みアッセイにおいて、低レベルの各4つのジデオキシヌクレオチドに対するその感度により特徴づけられ得る。ジデオキシヌクレオチドの取込みは、DNA鎖伸長を停止するので、ジデオキシヌクレオチドを取込む優れた能力は、野生型DNAポリメラーゼに比べて、トリチウム標識ジデオキシヌクレオチドの取込みを減少させる。ヌクレオチド取込みの約50%阻害($I_{50\%}$)をもたらす $ddNTP$ 濃度の比較を使用して、異なるポリメラーゼまたはポリメラーゼ変異体の $ddNTP$ 取込み効率を比較できる。 $ddATP$ 、 $ddCTP$ 、 $ddGTP$ 、および $ddTTP$ の $I_{50\%}$ 値の比較を使用して、特定の塩基の選択性の低下した変異体を同定できる。かかる変異体は、より均一なDNAシーケンスラダーを生じることが期待される。

10

【0153】

個々の $ddNTP$ の取込みを測定するために、種々の濃度の目的の $ddNTP$ 、および計 $200\mu M$ の各ヌクレオチド三リン酸からなるカクテルを調製する。例えば、 $ddATP$ の野生型JDF-3ポリメラーゼによる取込みは、0、40、80、120および $160\mu M$ $ddATP$ で測定し得る。これらの反応において、 $dATP$ 濃度は、200、160、120、80および $40\mu M$ にそれぞれ調整し、よって、アデニンヌクレオチド三リン酸の全量は $200\mu M$ である。比較では、変異体を、0、5、10および $20\mu M$ の $ddATP$ の $ddATP$ 濃度、および、200、195、190、および $180\mu M$ の調整 $dATP$ 濃度をそれぞれ使用してアッセイし得る($dATP + ddATP = 200\mu M$)。追加のカクテルを、 $ddCTP$ 、 $ddGTP$ および $ddTTP$ 取込みを同じように測定するために調製する。

20

【0154】

上記の濃度パラメータ下でのヌクレオチドの取込みを、例えば、 $1\mu l$ の適切に希釈した細菌抽出物(すなわち、クローン化ポリメラーゼまたは変異クローン化ポリメラーゼを発現している細菌細胞の熱処理および清澄化抽出物(実施例1、M部参照))を、 $10\mu l$ の各ヌクレオチドカクテルに添加し、次いで $72^{\circ}C$ で30分間インキュベートすることにより、伸長反応において測定し得る。伸長反応は氷上でクエンチし、次いで $5\mu l$ のアリコートにDE81イオン交換ろ紙($2.3cm$; Whatman 3658323番)上に直ちにスポットする。非取込み標識を、 $2\times SSC$ ($0.3M NaCl$ 、 $30mM$ クエン酸ナトリウム、 $pH 7.0$)で6回洗浄し、次いで100%エタノールで簡潔に洗浄することにより除去する。次いで、取込まれた放射能を、シンチレーション計測により測定する。酵素を欠く反応も、試料インキュベート液と共に設定し、「全cpm」(ろ紙洗浄段階を省く)および「最小cpm」(上記のようにろ紙を洗浄)を決定する。

30

40

【0155】

Cpm結合は、細菌抽出物の容量あたりに存在するポリメラーゼ活性の量に比例する。約10,000cpmの取込みをもたらす、細菌抽出物(一般に約 $0.25\sim 1\mu l$)の容量を、その後のヌクレオチド類似体取込み試験に使用するために決定する。

【0156】

無作為変異により生じた変異DNAポリメラーゼの遺伝子をシーケンスして、変異の部位および数を同定し得る。2つ以上の変異を含む変異体については、特定の変異の効果を、特定の変異体により生じる他の変異からの単離において、部位特異的変異誘発により、同定した変異をエキソ-前駆遺伝子に導入することにより評価し得る。次いで、かくして産生した単一変異体のスクリーニングアッセイにより、その変異のみの効果を決定できる

50

。

【0157】

F. 本発明に記載の変異BファミリーDNAポリメラーゼの発現

当分野で既知の方法を適用して、本発明に記載のBファミリーDNAポリメラーゼの変異形を発現および単離し得る。多くの細菌発現ベクターは、外来配列によりコードされるタンパク質の高レベルの誘導性発現を可能とする、配列エレメントまたは配列エレメントの組合せを含む。例えば、上記したように、組込まれた誘導形のT7RNAポリメラーゼ遺伝子を発現している細菌を、T7プロモーターに連結した変異DNAポリメラーゼ遺伝子を有する発現ベクターで形質転換し得る。lac誘導性プロモーターのための、適切な誘導物質、例えば、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の添加によるT7RNAポリメラーゼの誘導は、T7プロモーターからの高レベルの変異遺伝子の発現を誘導する(Gardner&Jack、1999、上記参照)。

10

【0158】

適切な細菌宿主株を、当業者により入手可能なものから選択し得る。非制限的例として、大腸菌(E.coli)BL-21株を、外来性タンパク質の発現のために一般的に使用する。なぜなら、他の大腸菌(E.coli)株と比べて、プロテアーゼが欠損しているからである。誘導性T7RNAポリメラーゼ遺伝子を有するBL-21株は、WJ56およびER2566(Gardner&Jack、1999、上記)を含む。特定のポリメラーゼ遺伝子のコドン使用が、大腸菌(E.coli)遺伝子に通常見られるものとは異なる状況では、より稀なアンチコドンをもつtRNAをコードするtRNAを有するように修飾され、クローン化タンパク質遺伝子、例えばクローン化始原酵素遺伝子の高効率な発現を可能とする、BL-21株が存在する(例えば、稀なコドンtRNAを有するBL21-CODON PLUS(商標)細胞は、Stratageneから入手できる)。

20

【0159】

本発明の修飾DNAポリメラーゼの精製に適した当業者に公知の多くの方法が存在する。例えば、Lawyerら(1993、PCR Meth. & App. 2:275)の方法は、大腸菌(E.coli)に発現される熱安定性DNAポリメラーゼの開始によく適している。なぜなら、それは元々、Taqポリメラーゼの単離用に設計されたからである。別法として、宿主タンパク質を破壊するための熱変性段階、および、高度に活性で約80%純粋な熱安定性DNAポリメラーゼを単離するための2つのカラム精製段階を使用した、Kongら(1993、J. Biol. Chem. 268:1965、本明細書に参考として取込む)の方法を使用し得る。さらに、以下の実施例1のN部に詳述したように、DNAポリメラーゼ変異体は、硫酸アンモニウム分画、次いでQセファロースおよびDNAセルロースカラムにより、またはHiTrapQカラムでの混入物質の吸着により、次いでHiTrapヘパリンカラムからの勾配溶出により単離し得る。

30

【0160】

G. 識別の低下したテルモコックス(Thermococcus)種JDF-3熱安定性DNAポリメラーゼの調製

ジデオキシヌクレオチド三リン酸(ddNTP)の識別低下を示す熱安定性Bファミリーポリメラーゼを調製するために、超好熱性古細菌テルモコックス(Thermococcus)種JDF-3由来の3'から5'エキソヌクレアーゼ欠損(D141A)BファミリーポリメラーゼをコードするDNA配列を、本明細書に記載したような「エラーしがちなPCR」を使用して無作為変異誘発にかけ、バクテリオファージλZap(登録商標)IIにクローニングした。パイロコッカス フリオース(Pyrococcus furiosus)(Pfu)由来のBファミリーDNAポリメラーゼに比べて、優れた加工性、重合速度およびddNTP取込みに因り、JDF-3由来のポリメラーゼを選択した(以下の表IV参照)。変異体ライブラリーを、大腸菌(E.coli)宿主に蒔き、溶菌ブランクに存在するタンパク質を、DNA鋳型および全4つの³³P標識ジデオキシヌクレオチドを含む緩衝液中に浸漬した固相支持体に移した。標識ジデオキシヌクレオチドを取込んだ変異体は、³³PddNTPの取込み能に対応したシグナルを生じた。次いで

40

50

、単離クローンを、全4つのdNTPおよびa；H-TTPトレーサーを使用したDNAポリメラーゼヌクレオチド取込みアッセイにおいて、低レベルの各4つのジデオキシヌクレオチドに対するその感度により特徴づけた。ジデオキシヌクレオチドの取込みは、DNA鎖伸長を停止するので、ジデオキシヌクレオチドを取込む優れた能力は、トリチウム標識デオキシヌクレオチドの取込みを消失させる。非変異前駆DNAポリメラーゼは、ジデオキシヌクレオチドをほとんど取込まず、高ddNTPレベルで僅か50%阻害される(100~160 μmol の各ddNTP)。変異酵素は、5から40 μmol の濃度のddNTPで50%阻害を示し、取込み向上が、全4つのddNTPについて観察された(ddATP、ddCTP、ddTTPおよびddGTP；以下の実施例1の表VおよびVI参照)。

10

【0161】

非慣用的ヌクレオチドの取込みはまた、各々0.021 μM で存在する ^{-33}P 標識dNTPおよび2.1 μM で存在するdNTPを用いて、サイクルシーケンスにおける精製変異ポリメラーゼの使用により評価した。変異体は容易に全4つのジデオキシヌクレオチドを利用し、シーケンスラダーを生じ、これをF667Y Taq DNAポリメラーゼ変異体を使用するThermo Sequenase (登録商標)に好適に比較した(VanderHornら、1997、Bio Techniques 22:758)。

【0162】

40中17個の精製変異体の関連ドメインをシーケンスした。大半の無作為に変異したクローンは、シーケンスした領域には2つ以上の変異を含んだが、全変異体が3つの部位の1つでの変異を含んだ。増強されたddNTP取込み表現型を付与すると予測された変異を、部位特異的変異誘発により前駆エキソヌクレアーゼ欠損DNAポリメラーゼ配列に導入し、ジデオキシヌクレオチド取込み表現型の向上に寄与すると期待されなかった付属的変異を排除した。

20

【0163】

17中16個のJDF-3 DNAポリメラーゼ変異が、共通配列404DxxSLYPSII413のチロシンのいずれかの側上の領域II(モチーフA)に見出された。これらの変異は、DFRSLYLSII(P410L)、DFRSHYPSII(L408H)およびDFRSSFYPSII(L408F)から構成された。それ故、領域IIのLYPモチーフは、JDF-3BファミリーポリメラーゼのddNTP識別に重要であるようである。

30

【0164】

JDF3BファミリーDNAポリメラーゼのY409に対応するチロシンの従来技術の修飾は、ヌクレオチド結合ポケットのその位置を認識する。しかし、本明細書に示したように、Y409に隣接する残基の修飾(L408HまたはL408FまたはP410L)は、特にddNTP取込みに関して、ヌクレオチド結合を顕著に変化させるという意外な効果を示した。

【0165】

領域IIの外で生じる非慣用的ヌクレオチドの取込みの増強をもたらす唯一のJDF-3 DNAポリメラーゼ変異は、領域IIIの485位におけるアラニン(alaまたはA)からトレオニン(thrまたはT)変換(A485T)である。この部位は、AファミリーDNAポリメラーゼのヘリックスOのKX₃(F/Y)GX₂YGに機能的に類似しているが、構造的(Wangら、1997、上記)には類似していない、KX₃NSXYGの2残基上流である(Jungら、1990、上記；Blascoら、1992、上記；Dongら、1993、J. Biol. Chem. 268:21163；Zhuら、1994、Biochem. Biophys. Acta 1219:260；DongおよびWang、1995、J. Biol. Chem. 270:21563)(領域IIIまたはモチーフBと称される)。クレノウ断片およびTaq DNAポリメラーゼなどのAファミリーDNAポリメラーゼにおいて、Oヘリックスは、dNTP結合に主要な役割を果たすアミノ酸を含む(Astatkeら、1998、J. Mol. Biol. 278:14

40

50

7; Astatkeら、1995、J. Biol. Chem. 270:1945; Poliskyら、1992、J. Biol. Chem. 267:8417; Poliskyら、1990、J. Biol. Chem. 265:14579; Pandeyら、1994、J. Biol. Chem. 269:13259; Kaushikら、1996、Biochem. 35:7256)。特に、ヘリックスOは、AファミリーDNAポリメラーゼのddNTP識別を付与する、F（クレノウ断片のF762; TaqのF667）を含む（ $KX_3(F/Y)GX_2YG$ ）（TaborおよびRichardson、1995、上記）。

【0166】

JDF-3 DNAポリメラーゼのddNTP取込みに対するA485T変異の効果は驚くべきである。なぜなら、RB69およびテルモコックス ゴルゴナリウス（*Thermococcus gorgonarius*）結晶構造（Hopfnerら、1999、上記）は、ヌクレオチド結合表面の推定活性部位にそむくことを示す。さらに、古細菌ファミリーDNAポリメラーゼにおいてリボース選択性を付与する側鎖の種類（A：小さく非極性）は、AファミリーDNAポリメラーゼにおけるddNTP識別を指示するかさ高い芳香族YおよびF残基のそれとは異なる（TaborおよびRichardson、1995、上記）。さらに、この位置（A485）は、DNAポリメラーゼファミリー間でよく保存されておらず、このドメインの共通配列に含まれず（BraithwaiteおよびIto、1993、上記）、これは、ddNTP認識における決定的な重要性の欠如を意味する。

【0167】

変異P410LおよびA485Tを含む、JDF-3二重変異体を作成した。ジデオキシヌクレオチドサイクルシーケンスにおいて、二重変異体により実証されるバンドパターン強度は極めて均一であり、これは、その対応するddNTPよりも、任意のddNTPに対する選択性があるとしてもほとんどないことを示唆する（図8および実施例1Q参照）。このポリメラーゼ特徴は、自動化シーケンスに要求される塩基の正確度を向上する。我々は、P410LとA485変異、L408HとA485変異、およびL408FとA485変異の組合せにより、ddNTP取込みの向上を示す酵素が得られると仮定する。かかる二重変異体酵素によるジデオキシヌクレオチド取込み効率はまだ、取込みの相対的向上度を決定するための、本明細書に記載したような150%の測定により特徴づけられ得るか、または定量され得る。

【0168】

（実施例）

以下の実施例は、単に説明のために提供され、特許請求した本発明の範囲を限定するものではない。

【0169】

（実施例1）

A. テルモコックス（*Thermococcus*）種JDF-3 DNAポリメラーゼからのDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

テルモコックス（*Thermococcus*）種は、Juan de Fuca ridgeから採取した海洋試料から培養した。ゲノムDNAを単離し使用して、標準的な手順を使用してZAPII（Stratagene）のゲノムDNAファミリーを調製した。λファミリーを、XL-1 Blue MRF' 大腸菌（*E. coli*）に蒔き、Sagnerら（Sagner, G, Ruger, R, およびKessler, C (1991) Gene 97:119~123）により記載の方法の変形を使用してDNAポリメラーゼ活性をもつクローンについてスクリーニングした。活性ポリメラーゼを含むプラークの芯を抜き、SM緩衝液に保存した。陽性一次クローンを再度蒔き、再度アッセイして、単離クローンの精製を可能とした。二次クローンを、ZAPIIシステム（Stratagene）に具備された説明書に従って切断し、挿入断片のDNA配列を決定した（図1）。

【0170】

J D F-3 DNAポリメラーゼの翻訳アミノ酸配列を図2に示す。アミノ酸配列アラインメントにより、J D F-3 DNAポリメラーゼは、Bファミリーと称されるクラスのDNAポリメラーゼに相同性を示す。

【0171】

組換えJ D F-3 DNAポリメラーゼは下記のように精製した（「J D F-3の精製」（方法1）参照）。J D F-3 DNAポリメラーゼの生化学的特性を、他の市販で入手可能な古細菌DNAポリメラーゼと比較した。表I VおよびVに示した結果により、他の酵素に比べて、J D F-3は、より早い加工性、より早い重合速度（ K_{cat} ）、およびより高いddNTP利用傾向を示す。それ故、J D F-3 DNAポリメラーゼを、DNAシーケンス酵素の開発に選択した。

【0172】

【表4】

表I V. 原始BファミリーDNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性

olyme rase	Spec ific Activity (U/ mg) x 10 ⁴			
	Acti vated DNA	Prime d M13	N A (n M)	NT P μM eac h)
fu	2.6 ± .07 4.1 ± .07	2.0 ± .02 2.3	.7	6 ± 2
xo ⁻ <i>Pfu</i>			.5	2
DF-3	1.2 ± .07	5.2	.0	6 ± 2
ent	1.8 ^a	0.7 ^a	.1 ^a	7 ^a

^aH. Kong, R.B. Kucera, and W.E Jack, J. Biol. Chem. 268, 1965 (1993).

【0173】

B. JDF-3 DNAポリメラーゼをコードする遺伝子からのインテインの除去
BファミリーDNAポリメラーゼに対するアラインメントにより、JDF-3 DNAポリメラーゼクロンは、インテイン配列を含むことが判明した（図3および4）。組換えJDF-3ポリメラーゼの発現を向上するために、インテインを逆PCRにより除去した。PCRプライマーは、インテイン末端をコードする配列のすぐ上流および下流をプライムするように設計され、プライマーの3'末端はインテインにそむくように配向した。プライマーはまた、5'リン酸基で修飾して、ライゲーション（*l i g a t i o n*）を容易にした。プラスミド／挿入断片配列をPCR増幅し、標準的な方法により環状化した。

【0174】

C. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の消失したJDF-3 DNAポリメラーゼ変異体の作成

3'-5'エキソヌクレアーゼ（校正）活性の欠失したDNAポリメラーゼが、取込み後のヌクレオチド類似体の除去を防ぐために、ヌクレオチド類似体取込みを必要とする適用（例えばDNAシーケンス）に好ましい。校正DNAポリメラーゼに関連した3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を、変異誘発により減少または消失できる。配列比較により、DNAポリメラーゼの3'-5'エキソヌクレアーゼドメインに3つの保存モチーフ（エキソI、II、III）が同定された（V. Derbyshire、J. K. Pinsoneault、およびC. M. Joyce、*Methods Enzymol*、262、363（1995）で総説）。保存アスパラギン酸またはグルタミン酸残基のいずれかのアラニンとの交換は、Vent（H. Kong、R. B. Kucera、およびW. E. Jack、*J. Biol. Chem.* 268、1965（1993））およびPfu（*Stratagene*、未発表）などの古細菌DNAポリメラーゼを含む、多くのDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を消失することが示された。保存的置換により、古細菌9°N-7 DNAポリメラーゼの変異体について示されたように、エキソヌクレアーゼ活性は減少した（M. W. Southworth、H. Kong、R. B. Kucera、J. Ware、H. Jannasch、およびF. B. Perler、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 93、5281（1996））。

【0175】

実質的に減少した3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示すJDF-3 DNAポリメラーゼ変異体は、エキソIドメインの保存141Dまたは143E残基にアミノ酸置換を導入することにより調製した。CHAMELEON（登録商標）二本鎖部位特異的変異誘発キット（*Stratagene*）を使用して、以下のJDF-3変異体を作成した：D141A、D141N、D141S、D141T、D141EおよびE143A。

【0176】

JDF-3変異体タンパク質を解析するために、JDF-3 DNAポリメラーゼをコードするDNA配列を、プライマー、

【化1】

GGG AAA CAT ATG ATC CTT GAC GTT GAT TAC

（Nde I 部位は太字で、開始コドンには下線を付す）、および、

【化2】

GGG AAA **GGA** TCC TCA CTT CTT CTT CCC CTT C

（BamH I 部位は太字で示す）を使用してPCR増幅した。PCR産物を消化し、精製し、標準的な方法を使用して高発現レベルベクターにライゲートした（*l i g a t e d*）

。プラスミドクローンを、B L 2 1 (D E 3) に形質転換した。組換え細菌クローンを、標準的な手順を使用して増殖し、J D F - 3 ポリメラーゼ変異体を、誘導の非存在下で発現した。組換えクローンのエキソヌクレアーゼおよびポリメラーゼ活性を、細菌溶解液を使用してアッセイした。典型的には、粗抽出物を 7 0 ° C で 1 5 ~ 3 0 分間加熱し、次いで遠心分離して透明な溶解液を得た。

【 0 1 7 7 】

K o n g ら (K o n g ら、1 9 9 3、J . B i o l . C h e m . 2 6 8 : 1 9 6 5) の方法および S o u t h w o r t h ら (S o u t h w o r t h ら、1 9 9 6、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 3 : 5 2 8 1) の方法を含む、当分野で既知の 3 ' から 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を測定する数個の方法が存在し、その両方の全内容をこれにより参考として取込む。K o n g らの方法により測定したような、野生型および活性変異体ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性は、以下の通りであった：

エキソ活性 (U / m g)

野生型 9 1 5

D 1 4 1 A 7

D 1 4 1 N 9 5 3

D 1 4 1 S 9 5 4

D 1 4 1 T 0 . 5

D 1 4 1 E 9 4 0

E 1 4 3 A 0 . 3

組合せエキソヌクレアーゼ変異体 D 1 4 1 A + E 1 4 3 は、L 章に記載のように作成した。

【 0 1 7 8 】

E 1 4 3 A J D F - 3 変異体 (クローン 5 5 0 番) は、有意に減少した 3 ' - 5 ' エキソ活性を示し、d d N T P および他のヌクレオチド類似体の取込みを向上するために、さらなる変異誘発について選択した。J D F - 3 D 1 4 1 T 変異体などの、実質的に減少したエキソヌクレアーゼ活性を有する他の J D F - 3 変異体を、この目的のために、3 ' から 5 ' エキソヌクレアーゼ活性の完全な消失を必要とする実験または適用のために使用でき、二重変異体 D 1 4 1 A + E 1 4 3 A が好ましかった。

【 0 1 7 9 】

D . J D F - 3 D N A ポリメラーゼ遺伝子のエラーしがちな P C R 増幅

無作為変異を、全遺伝子 (クローン 5 5 0 番) を、高忠実度の複製を支持しない条件下で増殖することにより、エキソ - J D F - 3 に導入した。可能性ある変異のスペクトルを広げるために、3 つの異なる P C R 酵素を、エラーしがちな条件下で使用した。

【 0 1 8 0 】

好ましい形態において、各 1 0 0 μ l の 1 0 個の反応を、各 P C R 酵素を用いて増幅した。

【 0 1 8 1 】

i . T a q D N A ポリメラーゼで増幅

反応混合物

1 × マグネシウム非含有 T a q 緩衝液 (S t r a t a g e n e カタログ番号 2 0 0 5 3 0)

1 m M 各 T T P および d C T P

0 . 2 m M 各 d G T P および d A T P

2 n g / μ l プライマー 9 2 3 (4 9 0 と称される)

2 n g / μ l プライマー 7 2 1

0 . 0 5 μ / μ l T a q 2 0 0 0 (S t r a t a g e n e カタログ番号 6 0 0 1 9 5)

1 . 5 m M M g C l ₂

0 . 5 m M M n C l ₂

0 . 1 p M プラスミド D N A

サイクリングパラメータ

PCRは、Hot Topアセンブリを有するStratageneのROBOCYCLER（商標）40温度サイクラーを使用して実施した。以下のサイクル条件を使用した：

- 1) 95℃で1分間
- 2) 95℃で1分間
- 3) 54℃で1分間
- 4) 72℃で2.5分間
- 5) 2から4の段階を30回繰返す

iii. エクソ-JDF-3DNAポリメラーゼを用いた増幅

反応混合物

1× マグネシウム非含有Taq緩衝液（Stratageneカタログ番号200530）

450 μMの各デオキシヌクレオチド（dGTP、dATP、TTP、およびdCTP）

2 ng/μl プライマー923（490とも称される）

2 ng/μl プライマー721

0.1 μ/μl エクソ-JDF-3DNAポリメラーゼ

0.5 mM MnCl₂

0.1 pM プラスミドDNA（クローン番号550）

サイクリングパラメータ

PCRは、Hot Topアセンブリを有するStratageneのROBOCYCLER（商標）40温度サイクラーを使用して実施した。以下のサイクリング条件を使用した：

- 1) 95℃で1分間
- 2) 95℃で1分間
- 3) 54℃で1分間
- 4) 72℃で5分間
- 5) 2から4の段階を30回繰返す

iii. エクソ-PfuDNAポリメラーゼを用いた増幅

反応混合物

1×TAQPLUS（登録商標）プレジジョン緩衝液（Stratageneカタログ番号600210）

200 μMの各デオキシヌクレオチド（dGTP、dATP、TTP、dCTP）

2 ng/μl プライマー923（490とも称される）

2 ng/μl プライマー721

0.05 μ/μl エクソ-PfuDNAポリメラーゼ（Stratageneカタログ番号600163）

0.1 pM プラスミドDNA（クローン番号550）

サイクリングパラメータ

PCRは、Perkin-Elmer's 9600温度サイクラーを使用して実施した。

以下のサイクリング条件を使用した：

- 1) 95℃で1分間
- 2) 95℃で1分間
- 3) 53℃で1分間
- 4) 72℃で2.5分間
- 5) 2から4の段階を30回繰返す

正プライマー

変異ライブラリーのより以前の形は、EcoRI部位を含む正プライマー461を用いて作成した。プライマー461および923で増幅した産物を制限消化し、以下の章に記載のようにλベクターにクローニングすると、JDF-3DNAポリメラーゼが、ベクターのコードするβ-ガラクトシダーゼ（lacZ）タンパク質の最初の39アミノ酸との融

10

20

30

40

50

合タンパク質として合成された。

【0182】

【化3】

プライマー461 5' TCAGATGAATTCGATGATCCTTGACGTTGATTAC 3'

EcoR I

JDF-3 特異的配列

【0183】

プライマー461を使用して単離したクローンはp番号として設計した。

10

【0184】

好ましい増幅およびクローニングの形態は、EcoRI部位、次いで3つの連続的なインフレーム終止コドンおよびリボソーム結合部位を含む、正プライマー721を利用する。この配置により、JDF-3 DNAポリメラーゼは、アミノ末端にベクター由来残基が全くなくとも、翻訳が可能となる。正プライマー721を用いて作成したライブラリーから単離したクローンは、それらをp番号シリーズのクローンから区別するために1番と称した。

【0185】

【化4】

20

プライマー721

5' GAGAGAATTCATAATGATAAGGAGGAAAAAATTATGATCCTTGACGTTGATTAC 3'

EcoR I 3×終止

JDF-3 特異的配列

逆プライマー

プライマー923 (490) 5' TCAGATCTCGAGTCACCTTCTTCTTCCCCTTC 3'

Xho I

JGF-3 特異的配列

【0186】

30

E. クローニング用のPCR産物の調製

PCR産物を精製し、STRATAPREP (商標) PCR精製キット (Stratageneカタログ番号400771) を用いて濃縮した。次いで、PCR産物を、1.5×ユニバーサル緩衝液 (10×ユニバーサル緩衝液: 1M KOAc、250mM トリス-アセテート (pH 7.6)、100mM MgOAc、5mM β-メルカプトエタノールおよび100μg/ml BSA) 中、50単位のXhoIおよび50単位のEcoRIを用いて1時間37℃で消化した。消化した試料を1%アガロース、1×TBEゲル上に流し、臭化エチジウム染色により可視化した。2.3kbの増幅産物をゲル単離し、STRATAPREP (登録商標) DNAゲル抽出キット (Stratageneカタログ番号400766) で精製した。

40

【0187】

F. Uni-Zap (登録商標) XRλベクターへのPCR挿入断片のクローニング

200ngの精製増幅産物を、EcoRIおよびXhoIで予め消化しておいた、1μgのUNI-ZAP (登録商標) XRλベクター (Stratageneカタログ番号239213) とライゲート (ligated) し、次いでアルカリホスファターゼ (Stratageneカタログ番号237211) で脱リン酸化した。DNAを、反応容量10から15μl中、1×リガーゼ緩衝液 (50mM トリス-HCl (pH 7.5)、7mM MgCl₂、1mM DTT) 中、2単位のT4 DNAリガーゼ (Stratageneカタログ番号600011) および0.5mM ATPを使用してライゲートした (ligated)。ライゲーション (ligation) は16℃で最小16時間実施した

50

。

【0188】

G. λパッケージングおよび細菌感染

2 μlの各ライゲーション (ligation) 反応液を、GIGAPACK (登録商標) IIIゴールドパッケージング抽出物 (Stratageneカタログ番号200201) で90分間室温でパッケージングし、その後、500 μlのSM緩衝液 (50 mM トリス pH 7.5、100 mM NaCl、8 mM MgSO₄、および0.01%ゼラチン) および20 μlクロロホルムで停止した。パッケージングしたλベクターを、大腸菌 (E. coli) XL-1 Blue MRF' 宿主細胞に蒔いた。

【0189】

H. ジデオキシヌクレオチドスクリーニング

変異ポリメラーゼライブラリーを、Sagnerら (Sagner, G, Ruger, R、およびKessler, C (1991) Gene 97:119~123) の使用した技法の変形を使用してスクリーニングした。λファージクローンを、平方cmあたり10~20個のプラークの密度で蒔いた。プラークに存在するタンパク質をろ紙に移し、ポリメラーゼスクリーニング緩衝液 (50 mM トリス (pH 8.0)、7 mM MgCl₂、3 mM β-ME) を用いて湿らせた。ろ紙を、プラスチックラップ層とガラスの間に保ち、一方、宿主細胞タンパク質は、65℃で30分間のインキュベートにより熱失活させた。熱処理ろ紙を、新しいプラスチックラップに移し、平方cm当たり約35 μlのポリメラーゼアッセイカクテルを、ろ紙に加えた。ポリメラーゼアッセイカクテルは、1×クロン化Pfuマグネシウム非含有緩衝液 (Stratageneカタログ番号200534)、125 ng/mlの活性化ウシ胸腺またはサケ精子DNA、1.29 μCi/ml-³³P d dNTP (Amersham)、および0.5 mM MnCl₂ から構成された。初期スクリーニングは、MnCl₂ の存在下で実施したが、好ましい方法は、1×Taqポリメラーゼ緩衝液 (1.5 mM MgCl₂) 中でスクリーニングすることであった。ろ紙を、再度プラスチックラップとガラスの間に挟み、65℃で1時間、次いで70℃で1時間と15分間インキュベートした。ろ紙を3回、2×SSC中、各回5分間洗浄し、その後、2回100%エタノール中で濯ぎ、真空乾燥機で乾燥した。ろ紙を約16時間X線フィルムに感光した。強いシグナルに対応するプラークの芯を抜き、SM緩衝液に入れた。陽性一次プラークを、より希釈した濃度で再度蒔き、単離プラークの精製の可能な実質的に類似した条件下でアッセイした。

【0190】

ダイーデオキシヌクレオチドスクリーニング

ダイーデオキシヌクレオチドおよびダイーデオキシヌクレオチド利用能の向上した変異ポリメラーゼを検出するために、JDF-3変異DNAポリメラーゼライブラリーを、以下を除いて、前記した通りにスクリーニングした。

【0191】

Flu-12-dUTPスクリーニング用のポリメラーゼアッセイカクテル

0.9×Taq緩衝液 (Stratageneカタログ番号200435)、65 μM dATP、65 μM dCTP、65 μM dGTP、65 μM dTTP、0.3 μM フルオレセイン-12-dUTP (Stratagene研究室内製造)、0.75 μg/μl 活性化仔牛胸腺DNA。

【0192】

ROX d dNTP用のポリメラーゼアッセイカクテル

1×Taq緩衝液、0.9 μM dATP、0.9 μM dCTP、0.9 μM dGTP、0.9 μM TTP、0.6 μM ROX d dATP (New England Nuclear (NEN) NEN478)、0.06 μM ROX d dGTP (NEN NEL479)、0.06 μM ROX d dCTP (NEN NEL477)、0.06 μM ROX d dUTP (NEN NEL476)、0.84 μg/μl 活性化仔牛胸腺DNA。(注意: ROX d dGTPを含まないスクリーニング系が好ましい方法である。な

10

20

30

40

50

ぜなら、DNAポリメラーゼはddGTPに対して識別しないからである)。

【0193】

フルオレセインddUTP用のポリメラーゼアッセイカクテル

1×Taq緩衝液、70μM dATP、70μM dTTP、70μM dCTP、15μM dTTP、1μMフルオレセイン-12-ddUTP (NEN NEL401)、0.84μg/μl活性化仔牛胸腺DNA。

【0194】

フルオレセインへの抗体結合

ろ紙を、TBST (50mMトリspH8.0、150mM NaCl、0.05% Tween-20) に溶かした1%無脂肪ドライミルクを用いて遮断した。ろ紙を、簡潔にTBST中で洗浄し、その後、イルミネーターキット (Stratageneカタログ番号300360) からのアルカリホスファターゼコンジュゲート抗フルオレセイン抗体を、50ml TBST中1/10、000希釈度で加えた。抗体を、100mMトリspH9.5、100mM NaCl、および5mM MgCl₂ から構成される緩衝液中、それぞれ0.3mg/mlおよび0.15mg/mlの濃度のNBT/BCIPで検出した。

10

【0195】

ローダミンへの抗体結合

抗ROX抗体 (Zymedカタログ番号71-3600ウサギローダミン (5-ROXポリクローナル、1mg/ml)) を、TBST中1:1000まで希釈した。遮断したろ紙を、簡潔にブロットし、過剰の湿気を除去し、次いでプラスチックラップ上にのせ、2.5mlの希釈した抗体溶液で覆った。追加のシートのプラスチックラップを、ろ紙上にのせ、その後、室温で1時間インキュベートした。ろ紙を簡潔に3回TBSTで洗浄し、次いで3回穏やかに攪拌しながら各回15分間洗浄した。洗浄したろ紙を、TBST中1:5000に希釈したアルカリホスファターゼコンジュゲートヤギ抗ウサギ抗体と共にインキュベートした。ろ紙を、抗体と共に1時間インキュベートし、前記したようにNBT/BCIPで検出した。

20

【0196】

I. ジデオキシヌクレオチド定性

一次ライブラリークローンスクリーンで³³P標識ddNTPを取り込んだλファージクローンを、再度スクリーニングし、ポリメラーゼ活性を確認し、³³P-ddNTP取込みへの二価金属イオンの寄与を評価した。この回のスクリーニング中に選択したクローンをp番号と称した。これらのクローンは全て、「正プライマー」と題した章に議論したようにアミノ末端タグを含んだ。図5により、クローンp1、p2、p3、p6、p7、p8、p9、p10、p11、p12、p14、p15、およびp16は、親550番クローンに対するシグナル強度の類似性に基づいて、野生型レベルのDNAポリメラーゼ活性を示すことが示された (図5、パネル3)。初期のスクリーニングは0.5mM MnCl₂の存在下で実施したが、p9およびp10を除く全クローンが、³³P-標識ddNTPを、1.5mM MgCl₂の存在下で少なくともある程度まで取込むことができ、クローンp2、p4、p8、p11、p12、p13、p14、p15、p17、およびp18は最も高いシグナルを生じる。

30

40

【0197】

18個の変異体を評価のために選択した。各精製ブランクから単離した1μlのファージを、各3つの大腸菌 (E. coli) XL1-BlueMRF' ローンに蒔いた。親コピーのエキソ-JDF3DNA (550番クローン) を含むファージも格子上にスポットした。ファージにより形成されたブランクをろ紙に移し、最終緩衝液組成物を除き、前のスクリーニング章に記載のように処理した。各ろ紙 (ろ紙1~3) に使用した緩衝液は以下の通りである：

ろ紙1：塩化マンガンを用いたジデオキシヌクレオチドスクリーン

1×TaqDNAポリメラーゼマグネシウム非含有緩衝液

50

1. $28 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H PddNTP
 0. $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 活性化仔牛胸腺DNA (Sigma)
 0. 5mM MnCl_2
 ろ紙2: 塩化マグネシウムを用いたジデオキシヌクレオチドスクリーン
 1×Taq DNAポリメラーゼ緩衝液 (1.5mM MgCl_2 含有、カタログ番号200435)
 1. $28 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H PddNTP
 0. $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 活性化仔牛胸腺DNA (Sigma)
 ろ紙3: 塩化マグネシウムを用いたジデオキシヌクレオチドスクリーン
 1×Taq DNAポリメラーゼ緩衝液
 0. 072mM dGTP 、 dCTP および TTP
 $40 \mu\text{M}$ dATP
 0. $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 活性化仔牛胸腺DNA (Sigma)
 0. $01 \mu\text{Ci}$ ^3H PdATP
 結果を図5に示す。

【0198】

ダイージデオキシヌクレオチド定性

以前のセグメントに記載したように、一次λクロンを、大腸菌 (*E. coli*) ローン上にスポットし、適切な抗体または抗体群で再度スクリーニングした。

【0199】

J. λクロンの切断

適切な条件下でヘルパーファージと共にインキュベートすると、λZap (商標) ベクターを設計し、pブルースクリプト (pBluescript) (SK-) および挿入断片を含むベクターの一部のファージミドコピーを生成した。このプロセスにより、λクロンに含まれる同じ挿入断片を有するプラスミド (pブルースクリプトSK- (pBluescript SK-)) ベクターが得られる。所望の表現型をもつクロンの切断を、EXASSIST (登録商標) システム (Stratageneカタログ番号200253) で説明書に従って実施した。

【0200】

K. 変異体の配列解析

変異体は、Sequetech社 (カリフォルニア州マウンテンビュー) により以下のプライマーを使用してシーケンスした:

プライマー3 (またはプライマーG) $5' \text{CCAGCTTTCCAGACTAGTCGGCCAAAGGCC} 3'$

プライマー5 (またはJDF3-1128) $5' \text{AACTCTCGACCCGCTG} 3'$

L. ジデオキシヌクレオチド変異誘発

ddNTP識別の低下に寄与するアミノ酸を最終的に同定するために、個々の点変異を、エキソ-JDF-3 550番クロンに、QUIKCHANGE (商標) 部位特異的変異誘発キット (Stratageneカタログ番号200518) を使用して導入した。

以下の変異体を調製した: L408H、L408F、P410L、A485T、S345P、D373Y、A619V、およびL631V。さらに、二重変異体 (P410L/A485T) を、A485T変異を、エキソ-JDF-3 P410L変異クロンに導入することにより作成した。全ての $3'$ から $5'$ エキソヌクレアーゼ活性を完全に消失するために、変異D141Aを全クロンに加えた。既存の $5'$ から $3'$ エキソヌクレアーゼ変異 (E143A) は、親鋳型JDF-3 550に存在していた。

【0201】

ダイージデオキシヌクレオチド変異誘発

ダイヌクレオチドの識別の低下の寄与に関与するアミノ酸を最終的に同定するために、変異S345Pを、単独でおよびP410LおよびP410L+A485Tと組合せて作成した。

【0202】

M. 熱処理した細菌抽出物の調製

切断したプラスミドを含む大腸菌 (*E. coli*) SOLR細胞を、一晚37℃で増殖した。500 μ lの培養液に含まれる細胞を、微量遠心分離により集めた。細胞ペレットを、50 μ lの50 mM トリス (pH 8.0) に再懸濁した。リゾチームを加えて最終濃度を1 μ g/ μ lとし、細胞を、37℃で10分間、次いで65℃で10分間のインキュベート中に溶解した。熱不活性化細胞物質を、微量遠心分離により集め、上清を、下記したようにdNTPおよびddNTP取込みについてアッセイした。

【0203】

N. JDF-3およびJDF-3ポリメラーゼ変異体の精製

エキソ-JDF-3 DNAポリメラーゼを精製する1つの方法は、硫酸アンモニウム分画、次いでQセファロースおよびDNAセルロースカラムを含む。JDF-3ポリメラーゼ変異体の迅速な精製を可能とする第二の方法が開発され、HiTrap Qカラムでの混入物質の吸着、次いでHiTrap ヘパリンカラムからの勾配溶出を含む (iii章)。

【0204】

i. 細菌溶解液の調製

凍結細胞ペースト (3~14 g) を、50 mM トリス-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、および10 mM β -メルカプトエタノールからなる、3×容量の溶解緩衝液に再懸濁した。リゾチームを加えて、0.2 mg/mlとし、PMSFを加えて1 mMの最終濃度とした。細胞を氷上で1時間の期間かけて溶解した。次いで、溶解液を2分間超音波処理した (90%能率、2×2.5、1×3.0のレベル)。超音波処理後、溶解液を65℃で15分間加熱し、細菌タンパク質を変性した。次いで、加熱した溶解液を30分間14,500 rpmでSorvall RC-2B遠心機でSorvall SS-34ローターを使用して遠心分離し、上清を回収した。

【0205】

ii. 硫酸アンモニウム分画およびQセファロース/DNAセルロースクロマトグラフィー (方法1)

硫酸アンモニウムを細菌溶解液に加えて、最終濃度を45%とした。硫酸アンモニウムを15分間の期間かけて加え、混合物をさらに30分間攪拌した。混合物を上記のように遠心分離し、上清を回収した。次いで、追加の硫酸アンモニウムを加えて、最終濃度を65%とした。混合物を上記のように遠心分離し、上清を取り出した。ペレットを、50 mM トリス-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、10 mM β -メルカプトエタノール、0.1% (v/v) Tween 20、および10% (v/v) グリセロールからなる10 mlの緩衝液Aに再懸濁した。上清を一晚2回交換した緩衝液A (各3リットル) に対して透析した。

【0206】

透析液を、緩衝液Aで予め平衡化した、2.6×9.4 cm Q-セファロースファーストフローカラム (50 ml) にのせた。カラムを、吸光度 (OD₂₈₀) が基線に到達するまで緩衝液Aで洗浄した。次いで、カラムを0から1 M NaCl/緩衝液Aの勾配で溶出した。画分を集め、SDS-PAGEおよびDNAポリメラーゼ活性アッセイ (下記参照) により解析した。活性タンパク質は、典型的には130ないし240 mMのNaClで溶出した。活性画分をプールし、50 mM トリス-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、10 mM β -メルカプトエタノール、0.1% (v/v) Tween 20、10% (v/v) グリセロール、および50 mM NaClからなる、一晚2回交換した緩衝液B (各3リットル) に対して透析した。

【0207】

次いで、Q-セファロース溶出液を、緩衝液B中で平衡化した、1.6×4.9 cm (10 ml) DNAセルロースカラムにのせた。カラムを、吸光度 (OD₂₈₀) が基線に到達するまで緩衝液Bで洗浄した。次いで、カラムを、50から1000 mM NaCl/緩衝液Aの勾配で溶出した。画分を回収し、SDS-PAGEおよびDNAポリメラーゼ

10

20

30

40

50

活性アッセイにより解析した。活性タンパク質は、典型的には280ないし360mM NaClで溶出した。活性画分をプールし、25mMトリス-HCl (pH7.5)、100mM KCl、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.1% (v/v) Tween20、0.1% (v/v)、Igepal630、10μg/ml BSA、および50% (v/v) グリセロールからなる、JDF-3最終透析緩衝液に対して一晚透析した。

【0208】

iii. HiTrapQ/HiTrapヘパリンクロマトグラフィー (方法2)
複数の変異体を迅速に精製する好ましい方法は、以下の通りである。細菌細胞溶解液を、熱変性段階の直前にTween20およびIgepalCA630を加えて最終濃度を0.01% (v/v) にし、72℃の熱変性温度を使用する以外は、方法1で記載したように調製した。

【0209】

溶解液を、50mMトリス-HCl (pH8.2)、1mM EDTA、10mM β-メルカプトエタノール、0.1% (v/v) Tween20、および0.1% (v/v) IgepalCA630からなる、緩衝液C中で予め平衡化した、1.6×2.5cm (5ml) HiTrapQカラム (Pharmaciaの予め充填したカラム) にのせた。カラムを、吸光度 (OD₂₈₀) が基線に到達するまで緩衝液Cで洗浄した。分画による流出液 (バックグラウンドより高いOD₂₈₀ 吸光度) を集め、次いで、50mMトリス-HCl (pH8.2)、1mM EDTA、1mM DTT、0.1% (v/v) Tween20、0.1% (v/v) Igepal CA630、および10%グリセロール (v/v) からなる緩衝液Dで予め平衡化した、1.6×2.5cm (5ml) HiTrapヘパリンクラム (Pharmaciaの予め充填したカラム) にのせた。カラムを、吸光度 (OD₂₈₀) が基線に到達するまで緩衝液Dで洗浄した。次いで、カラムを、0から1M KCl/緩衝液Dの勾配で溶出した。画分を集め、SDS-PAGEおよびDNAポリメラーゼ活性アッセイにより解析した。活性タンパク質は、典型的には、390ないし560mM NaClで溶出した。活性画分をプールし、JDF-3最終透析緩衝液 (上記参照) に対して一晚透析した。精製したポリメラーゼを-20℃で保存した。

【0210】

iv. 精製タンパク質の解析
JDF-3および変異DNAポリメラーゼの濃度を、ピアスクーマシーブルータンパク質アッセイ試薬を使用して、BSA標準物質 (Pierce) と比較して決定した。さらに、異なるポリメラーゼ調製物の純度および相対的なタンパク質濃度をSDS-PAGEにより確認した。ポリメラーゼ試料を、4~20%トリス-グリシンゲル (Novex) 上で電気泳動し、ゲルを、標準的な手順を使用して銀染色した。

【0211】

O. ヌクレオチド取込みアッセイ
DNAポリメラーゼ活性を、種々の変異体クローンから調製した、精製JDF-3ポリメラーゼ変異体または熱処理した細菌抽出物を使用して測定した。DNAポリメラーゼ活性は、³H-TTPの、活性化仔牛胸腺DNAへの取込みをモニタリングすることにより測定した。含まれる典型的なDNAポリメラーゼ反応カクテル：

10mM トリス-HCl、pH8.8
1.5mM MgCl₂
50mM KCl
0.001%ゼラチン
200μMの各dATP、dCTP、dGTP
195μM TTP
5μM [³H] TTP (NEN 番号NET-221H、20.5Ci/mmol; 部分的に蒸発してEtOHを除去する)
250μg/mlの活性化仔牛胸腺DNA (例えばPharmacia 27-4575-

10

20

30

40

50

01番)

取込みは、1 μ l のポリメラーゼ試料の、10 μ l のアリコートのポリメラーゼカクテルへの添加により測定した。DNAポリメラーゼ試料を、適切な保存緩衝液（例えば、25 mM トリス-HCl (pH 7.5)、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.1% (v/v) Tween 20、0.1% (v/v) Igepal 630、10 μ g/ml BSA、および50% (v/v) グリセロール) 中に希釈した。重合反応を、72°Cで30分間実施した。伸長反応を氷上でクエンチし、次いで5 μ l アリコートを、DE81イオン交換ろ紙(2.3 cm; Whatman 3658323番)上に即座にスポットした。非取り込み [^{3} H] TTPを、2 $\times$ SSC (0.3 M NaCl、30 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0)で6回洗浄し、次いで100%エタノールで簡潔に洗浄することにより除去した。取込まれた放射活性は、シンチレーション計測により測定した。酵素を欠いた反応も、試料インキュベート液と共に設定し、「全cpm」(フィルター洗浄段階を省く)および「最小cpm」(上記のようにフィルターを洗浄)を決定した。

10

【0212】

Cpm結合は、細菌抽出物の容量あたりに存在するポリメラーゼ活性の量に比例する。約10,000 cpmの取込みをもたらす、細菌抽出物の容量(0.25~1 μ l)を、その後のヌクレオチド類似体取込み試験で使用するために決定した。

【0213】

P. ddNTP取込み効率の定量

20

JDF-3ポリメラーゼ変異体を評定して、相対的ddNTP取込み効率を評価した。ヌクレオチド取込みは、種々の濃度の各ddNTP終結因子(ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP)の存在下で測定した。ddNTP取込みは、伸長不可能な末端を生じるので、重合は、ddNTPを効率的に取込むポリメラーゼでは強く阻害される。ヌクレオチド取込みの約50%阻害($I_{50\%}$)をもたらすddNTP濃度の比較を使用して、異なるポリメラーゼまたはポリメラーゼ変異体のddNTP取込み効率を比較できる。ddATP、ddCTP、ddGTP、およびddTTPの $I_{50\%}$ 値の比較を使用して、特定の塩基についての選択性の低下した変異体を同定できる。前記変異体は、より均一なDNAシーケン斯拉ダーを生じると期待される。

【0214】

30

個々のddNTPの取込みを測定するために、種々の濃度の目的のddNTPおよび計200 μ Mの各ヌクレオチド三リン酸からなる、カクテルを調製した。例えば、野生型JDF-3ポリメラーゼによるddATPの取込みは、0、40、80、120、および160 μ M ddATPで測定した。これらの反応では、dATP濃度は、それぞれ200、160、120、80および40 μ Mに調整し、よって、アデニンヌクレオチド三リン酸の全量は200 μ Mであった。比較において、変異体を、0、5、10および20 μ M ddATPのddATP濃度を使用してアッセイし、それぞれ200、195、190および180 μ MのdATP濃度(dATP+ddATP=200 μ M)を調整した。追加のカクテルを調製し、ddCTP、ddGTPおよびddTTP取込みを測定した。3つの異なるddNTP濃度のJDF-3変異体によるddNTP取込みを評価するために、以下からなる12個の反応カクテルを調製した：

40

10 mM トリス-HCl、pH 8.8

1.5 mM MgCl₂

50 mM KCl

0.001%ゼラチン

5 μ M [^{3} H] TTP (NEN 番号NET-221H、20.5 Ci/mmol;部分的に蒸発してEtOHを除去する)

250 μ g/mlの活性化仔牛胸腺DNA (例えばPharmacia 27-4575-01番)

各12個の反応カクテルに、以下に要約したように、適切な量のdNTPおよびddNTP

50

Pを加えた。

【0215】

【表5】

oc	(	D	C	T	d	d	d	d
kt	1	A	T	P	G	A	C	T
ail	I	T	P		T	T	T	T
		P			P	P	P	P
-0	C	0	0	9				
	C	0	0	5				
	μ	μ	μ	μ				
	M	M	M	M				
-5	S	0	0	9				
	S	0	0	5				
	μ	μ	μ	μ				
	M	M	M	M				
-	S	0	0	9	0			
10	C	0	0	5				
	μ	μ	μ	μ				
	M	M	M	M				
-	S	0	0	9	0			
20	C	0	0	5				
	μ	μ	μ	μ				
	M	M	M	M				
-0	C	0	0	9				
	C	0	0	5				
	μ	μ	μ	μ				
	M	M	M	M				
-5	C	9	0	9				
	C	5	0	5				
	μ	μ	μ	μ				
	M	M	M	M				

10

20

30

40

-	C	9	0	9	0	
10	C	0	0	5		
	μ	μ	μ	μ		
	M	M	M	M		
-	C	8	0	9	0	
20	C	0	0	5		10
	μ	μ	μ	μ		
	M	M	M	M		
-0	C	0	0	9		
	C	0	0	5		
	μ	μ	μ	μ		
	M	M	M	M		20
-5	C	0	9	9		
	C	0	5	5		
	μ	μ	μ	μ		
	M	M	M	M		
-	C	0	9	9	0	
10	C	0	0	5		
	μ	μ	μ	μ		30
	M	M	M	M		
-	C	0	8	9	0	
20	C	0	0	5		
	μ	μ	μ	μ		
	M	M	M	M		
-0	C	0	0	9		40
	C	0	0	5		
	μ	μ	μ	μ		
	M	M	M	M		

	C	0	0	7	0
20	C	0	0	5	
	μ	μ	μ	μ	
	M	M	M	M	
-5	C	0	0	9	
	C	0	0	0	10
	μ	μ	μ	μ	
	M	M	M	M	
-	C	0	0	8	0
10	C	0	0	5	
	μ	μ	μ	μ	
	M	M	M	M	20

【0216】

取込みは、1 μl の適切に希釈した細菌抽出物（10, 000 cpm）の、10 μl の各ポリメラーゼカクテルへの添加により測定した。重合反応を30分間72℃で実施した。伸長反応を上記のように計測した。

【0217】

酵素を欠いた反応も、試料インキュベート液と共に設定し、「最小cpm」（上記のようにろ紙を洗浄）を決定した。ddNTP濃度の関数としての活性%を決定するために、バックグラウンド（「最小cpm」値）を最初に、各試料cpmから差し引いた。100%活性（0 ddNTP）に等価な「全cpm」を、ddNTPを欠いた4つの反応についての修正cpmを平均化することにより決定する（A-0、G-0、C-0、およびT-0）。次いで、残留活性率を、修正した試料cpm（ddNTPを用いて）を、修正全cpm（平均0 ddNTP）で割ることにより計算した。

【0218】

活性率を、ddNTP濃度の関数としてプロットした。各ddNTPのI₅₀%値（ヌクレオチド取込みを50%阻害するddNTP濃度）を、各変異体について決定した。比較により、野生型JDF-3に比較して、ddNTP取込みの向上した変異体の同定が可能となる。

【0219】

初期の研究は精製酵素を使用し、I₅₀%値は、40～160 μM ddNTPを使用し、阻害プロットから決定した。表Vの結果により、変異体p8（P41OL）、p11（P41OL）、およびp12（A485T）は、親エキソ-JDF-3ポリメラーゼよりも、低い濃度のddNTPにより阻害されることが示される。より高い感度により、変異体は、元のJDF-3ポリメラーゼよりも効率的に全4つのddNTPを取込むことが示される。

【0220】

ddTTP（エキソ-JDF-3、エキソ-Pfu）よりもTTPを優先的に取込む酵素では、一定量の[³H]TTP（5 μM）を組合わせた、漸増濃度のddTTP（80～160 μM）および対応するより低い濃度のTTP（115～35 μM）の使用により、

ddNTP濃度の増加と共に、取り込まれるcpmは増加する。それ故、これらの初期の実験において（ddTTP>120μM）、TTPのI_{50%}値は人工的に高い。それらは、異なるポリメラーゼ変異体間のddTTP取込みを比較するために使用できるが、ddCTP、ddGTPまたはddATPに比較した、ddTTPへの選択性の低下／増強の評価には使用できない。

【0221】

【表6】

表V 精製JDF-3およびJDF-3変異体のI_{50%}値

精製 ポリメラーゼ	primary mutation	I _{50%} 値 (μM)				10
		dAT	dGT	dCT	dT	
		P	P	P	P	
						20
	Exo JDF-3					
		60	10	160	>1	
	Exo Pfu					
		160	160	160	>1	
	JDF-3 変異体					
p8	410L	0	5	0	0	
	JDF-3 変異体					
p11	410L	0	0	0	16	
	JDF-3 変異体					30
p12	485T	0	5	5	50	

【0222】

より多数の変異クローンのスクリーニングを可能とするために、その後の実験は、JDF-3ポリメラーゼ変異体を含む細菌抽出物を使用した。さらに、より低濃度の各ddNTP阻害剤（5～20μM）の使用により感度が向上した。表VIの結果により、一次ろ紙スクリーンから選択した全変異体が、ddNTPの取込みの向上を示したことが実証される。ddNTP取込みの向上は20倍を超えていた。アミノ酸408（L408H/F）、410（P410L）、または485（A485T）での変異（「一次変異」と称する）を含む全変異体が、全4つのddNTPに対する識別の低下を示した。L408H/F一次変異を有する全部ではないが、大半の変異体が、全4つのddNTPに対して類似のI_{50%}値（2倍未満の差異）を生じ、これは、塩基選択性が消失または存在しないことを示す。

【0223】

【表7】

表VI JDF-3変異体のI_{50%}値(細菌抽出物)

(μM) -----		----- I _{50%} 値			
JDF-3 変異体					
クローン	rim ary mut atio n	dAT P	dGT P	dCT P	dT P
Exo ⁻ JDF-3					
		80	80	80	80
1-1, 1-4, 1-18					
	408	to	to 5	to 13	.5.
	H	>20			10
1-25, 1-28, 1-29, 1-17					
	408	.5 to	.5 to	to	to
	F	>20	10	6.5	
p8					
	410	8.5	2	.5	20
	L				
1-5, 1-6, 1-17					
	410	0 to	.5 to	6.5 to	1 t
	L	>20	9	>20	>2
1-41, 1-38, 1-37, 1-3,					to
	ot	to	.5 to	to	>2
1-19, 1-30, 1-27, 1,20					
	deter	>20	12	>20	
	mine				
1-26, 1-32, 1-16, 1-12					
	d				

【0224】

Q. 精製JDF-3ポリメラーゼ変異体を用いたスクリーニング

i. 放射標識ジデオキシヌクレオチドを用いたシーケンス

1から2 μlの精製酵素を、Thermo Sequenase放射標識ターミネーターシーケンスキット(Amersham-PharmaciaUS79750号)に置換した。試料を、キットに具備された対照プライマーおよび鋳型を使用して、製造業者の説明書に従って処理した。3 μlの各シーケンス反応を、6%アクリルアミド-7M尿素、1×TBE CASTAWAY(商標)プレキャストゲル(Stratageneカタログ番号401090および401094)にのせた。プロモフェノールブルー指示ダイがゲルの端に到達すると、ゲルを固定し、乾燥させ、24~72時間フィルムに感光した(図6)。

【0225】

40

50

図6の結果により、クローンp11（パネルD）およびp8（パネルE）は、親550番クローン（パネルB）に比べて、全4つのddNTPの取込みの劇的な向上を示すことが示される。変異体p11およびp8は両方共、一次P410L変異およびアミノタグを含むが、付属的変異の数および種類に関して異なる。変異体p12（パネルC）は、かすかなシーケンスラダーを生じ、これはおそらく、不十分量の酵素の使用または熱的安定性を低下する付属的変異の存在に起因するのだろう。全レーンで終結産物の証拠があり、これは、親クローンに比べて、全4つのddNTPの取込みの向上を示唆する。変異体p12は、付属的変異に加えて、一次変異A485Tを含む。ここに同定したJDF-3変異体とは対照的に、パネルクローンは、ddGTPを取込む強い選択性を示し、これは一次伸長（図6）およびddNTP阻害アッセイの両方で証明される（表VおよびVI）。

10

【0226】

ii. 放射標識プライマーおよび蛍光ジデオキシヌクレオチドを用いたシーケンス異なるDNAポリメラーゼおよびポリメラーゼ変異体は、ジデオキシヌクレオチド類似体上のダイ部分に対する種々の程度の識別を示す。JDF-3ポリメラーゼ変異体によるダイ標識ジデオキシヌクレオチド類似体の利用の評価を実施した。使用した手順は以下の通りであった：

a. プライマー標識

シーケンスプライマーSKを、KINACE-IT（商標）キネーシングキット（Stratageneカタログ番号200390）で放射標識した。インキュベート反応液（40 μ l）は以下の成分を含んだ：

20

1 $\times$ キナーゼ緩衝液1番

0.75 μ Ci/ μ l γ -³³P ATP

0.375 μ /ml T4ポリヌクレオチドキナーゼ

2.5 pmol/ μ l SKプライマー

反応液は37℃で45分間インキュベートした。プライマーを、サイズ排除マトリックス（NUC TRAP（登録商標）Stratageneカタログ番号400701）を用いてヌクレオチドから除去して精製した。

【0227】

b. ダイ標識ジデオキシヌクレオチド：dNTP比

蛍光ジデオキシヌクレオチドは、New England Nuclear（NEN）から購入した：

30

R6G-ddATP NENカタログ番号NEL-490

R110-ddTTP NENカタログ番号NEL-495

TAMRA-ddUTP NENカタログ番号NEL-472

ROX-ddCTP NENカタログ番号NEL-477

取込みは、3つの異なる濃度のダイ標識ジデオキシヌクレオチド（ddNTP）および一定量のデオキシヌクレオチド（dNTP；2.14 μ M）を使用して測定した：

条件3）1：1 （2～14 μ Mの各dNTP：2.14 μ Mのダイ標識ddNTP）

条件2）1：0.1 （2.14 μ Mの各dNTP：0.214 μ Mのダイ標識ddNTP）

40

条件1）1：0.01 （2.14 μ Mの各dNTP：0.0214 μ Mのダイ標識ddNTP）

c. DNAシーケンス反応混合物の調製

4つのポリメラーゼを、ダイ標識ddNTP、エキソ-JDF-3（550番クローン）、Thermo Sequenase（4 μ /ml）、JDF-3P410L（付属的変異およびアミノ末端タグをもつクローンp8）、およびJDF-3L408H（クローン1-1）の使用について試験した。以下の試薬を含む混合物を合わせた：

13.7 μ l H₂O

1 μ l 標識SKプライマー（2 pmol/ μ l）

1 μ l pBluescript KS（0.2 μ g/ μ l）

50

1 μ l ポリメラーゼ (約 1.5 μ l / μ l)
 2 μ l 10 $\times$ 緩衝液 (1.5 mM MgCl₂ 緩衝液を使用する L408H を除く全部
 について反応緩衝液 1) (下記参照)

10 $\times$ 反応緩衝液 1

260 mM トリス pH 9.5

65 mM MgCl₂

10 $\times$ 1.5 mM MgCl₂ 緩衝液

24 mM MgCl₂

260 mM トリス pH 9.5

2.5 μ l の各ダイ標識 ddNTP 終結因子 (ddGTP、ddATP、ddTTP、お
 よび ddGTP) を、別々に、4 つの管の 1 つに分注した。4.5 μ l の各ポリメラーゼ
 反応液を、各 4 つの管に加え、7 μ l の最終反応容量を得た。

10

【0228】

d. サイクルシーケンス反応

試料を、以下の条件を使用して、Hot Top アセンブリを有する RoboCycler
 (登録商標) 96 温度サイクラー (Stratagene カタログ番号 400870 お
 よび 400894) で循環した：

1) 95 $^{\circ}$ C で 1 分間

2) 95 $^{\circ}$ C で 1 分間

3) 50 $^{\circ}$ C で 1 分間

4) 72 $^{\circ}$ C で 2 分間

5) 2～4 の段階を 30 回繰返す

20

4 μ l の停止溶液 (95%ホルムアミド、20 mM EDTA、0.05%ブロモフェノ
 ールブルー、0.05%キシレンシアノール FF) を、それらを 99 $^{\circ}$ C まで 5 分間加熱す
 る前に、各増幅した反応液に加えた。試料を、上記したような 6%CASTAWAY (登
 録商標) ゲル上で電気泳動した。ゲルを乾燥し、次いで 72 時間フィルムに感光した (図
 7)。

【0229】

異なるポリメラーゼクローンによる、ダイ標識 ddNTP の利用を評価するために設計し
 た研究の結果を、図 7 に示す。クローン p8 (パネル C) および 1-1 (パネル D) は、
 親クローンに比べて、R6G-ddATP および R110-ddGTP の取込みの有意な
 向上を示した (パネル A)。向上は、0.01 $\times$ (1) および 0.1 $\times$ (2) ダイ-dd
 NTP/ddNTP 比でのシーケンスラダーの合成により証明した。反応条件および/ま
 たはダイ部分の最適化を実施して、ddTTP および ddCTP の取込みの向上を実現し
 得る。

30

【0230】

iii. 二重変異体エキソ-JDF-3 DNA ポリメラーゼを用いたシーケンス

408、410 および 485 残基での変化は、ddNTP 取込みを向上するのに十分であ
 ることを確認するために、個々の変異体を、親 550 (JDF-3 エキソ-DNA ポリメ
 ラーゼ) クローンに、部位特異的変異誘発により導入した。さらに、点変異を合わせて、
 1 変異を有するポリメラーゼよりも、ジデオキシヌクレオチド取込みにおいてさらなる向
 上が生じるかどうかを調べた。

40

【0231】

1 $\times$ 反応緩衝液、0.15 pmol/ μ l の長い 20 プライマー、および 10 ng/ μ g
 p ブルースクリプト KS (pBluescript KS) からなる DNA シーケンス
 反応液を以下のように調製した：

81 μ l H₂O

9 μ l -20 $^{\circ}$ C 長プライマー (2 pmol/ μ l)

6 μ l p ブルースクリプト KS (pBluescript KS) (0.2 μ g/ μ l)

** μ l ポリメラーゼ

50

12 μ l 10 $\times$ 緩衝液 (260mM トリス pH9.5、65mM MgCl₂)
 上記に列挙した18 μ lのカクテルを、適切な数の管 (1つのポリメラーゼあたり1つ) に分注した。各ポリメラーゼ (2 μ l) を、カクテルのアリコートに加え、管をよく混合した。次いで、得られた各ポリメラーゼ混合物 (4.5 μ l) を、すでに2.5 μ lの容量中に0.06mMの4つの³²P-ジデオキシヌクレオチドの1つ (ddATP、ddTTP、ddGTPまたはddCTP; 1500Ci/mmol; 450 μ Ci/ml) および6mMの各デオキシヌクレオチドを含む、各4つの管に加えた。

【0232】

シーケンス反応は、以下の条件を使用して、Hot Topアセンブリを有するROBOCYCLER (登録商標) 温度サイクラーで循環した：

- 1) 95℃で1分間
- 2) 95℃で45秒間
- 3) 60℃で45秒間
- 4) 72℃で1.5分間

5) 2～4の段階を30回繰返す

停止溶液 (μ l; 95%ホルムアミド、20mM EDTA、0.05%ブロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノールFF) を、各反応液に加え、その後、99℃まで5分間加熱した。各試料 (4 μ l) を、6%アクリルアミド変性Cast Awayゲルにのせた。ゲルを流し、前記のように処理した。

【0233】

図8は、P410L/A485T二重変異体が、例外的に均一なシグナルを示すことを示す。バンド均一度は、変異体p8 (P410L変異と、A485Tを含まない付属的変異) および変異体A485T (データは示していない) に比較して向上した。変異体p8は、配列依存的にddGTPおよびddCTPを優先的に取込む傾向を示した。最適量の酵素は、この実験で試験した量よりも高くあり得る。市販で入手可能なAファミリーDNAポリメラーゼ変異体のThermo Sequenaseにより産生される配列をパネルEに示す。

【0234】

iv. JDF-3ポリメラーゼ変異体によるリボヌクレオチド取込み

一本鎖鋳型DNAにアニーリングしたプライマーを、全リボヌクレオチドまたは全デオキシヌクレオチドを、変異体および前駆ポリメラーゼと共に含む混合物中で伸長した。

【0235】

M13mp18+一本鎖DNAを、混合物を95℃まで加熱し、室温でゆっくりと冷却することにより、95倍モル過剰の38merプライマーにアニーリングした。

【0236】

38merプライマー：5' GGTTTTC C CAGTCACGACGTTGTAAAA CGACGGCCAGT

予備アッセイを実施して、酵素のどの位の希釈が、非最大レベルでの取込み活性を調べるのに必要であるかを決定した。最終アッセイ溶液は、下記のように構成された：

リボヌクレオチド混合物

20ng/ μ l アニーリングしたプライマー/鋳型

1 $\times$ クローン化したPfu緩衝液 (Stratageneカタログ番号200532)

200 μ M 各GTP、UTP、ATP

50 μ M CTP

1 μ M 5-³H CTP 20.2Ci/mmol

0.05～0.3単位のJDF-3ポリメラーゼ*

デオキシリボヌクレオチド混合物

20ng/ μ l アニーリングしたプライマー/鋳型

1 $\times$ クローン化したPfu緩衝液

200 μ M 各dGTP、dATP、dCTP

50 μ M TTP (デオキシリボヌクレオチド)

1 μ M チミジン 5'-三リン酸、[メチル- ^{3} H] 20.5 Ci/mmol 0.05
~0.3 単位の JDF-3 ポリメラーゼ*

*別々に添加

9 μ l のポリメラーゼ非含有混合物を、0.2 ml の管に入れ、その後ポリメラーゼを加えた。試料を、Hot Top アセンブリ (Stratagene カタログ番号 400870 および 400894) を有する 72°C の ROBOCYCLER (登録商標) 96 鋳型サイクラー中でインキュベートした。デオキシリボヌクレオチド混合物を 2 分目に取り出し、約 2°C に配置した。リボヌクレオチド混合物を 30 分間インキュベートした。7 μ l のアッセイ混合物を DE81 ろ紙サークル (Whatman) にスポットし、乾燥し、その後、3 回 2 $\times$ SSC (0.3 M NaCl、0.03 M クエン酸ナトリウム) 中で各洗浄につき 5 分間洗浄した。ろ紙を 2 回エタノールで濯ぎ、乾燥させ、その後、シンチレーションカウンターで定量した。

【0237】

デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチド反応の 1 分あたりのバックグラウンド計数 (CPM) を、各酵素の複製試料のそれぞれの平均化 CPM 値から差し引いた。バックグラウンド修正リボヌクレオチド CPM 値を、バックグラウンド修正デオキシリボヌクレオチド CPM 値で割った (図 9)。

【0238】

【表 8】

Polym erase	R atio	Relati ve to JDF-3
	NTP/dNT P	550
JDF-3	0.	1
550	00016516	
	2	
JDF-3	0.	249
L408H	04108725	
	8	
JDF-3	0.	313
L408F	05170392	
	4	
JDF-3	0.	46
A485T	00762858	
	3	

【0239】

v. J D F-3 ポリメラーゼ変異体を用いたリボヌクレオチドシーケンス
デオキシリボヌクレオチドポリマーに取り込んだリボヌクレオチドは、アルカリ加水分解を受け易く、ポリマー長の亜個体群を生じ得る。標識プライマーを、特定のリボヌクレオチド塩基（例えば A T P）および4つのデオキシリボヌクレオチド塩基の存在下で伸長すると、アルカリ加水分解から生じる断片により、A T P が取り込まれた全ての可能性ある位置に対応する、異なる長さの個体群が創造された。それらの断片をサイズ分離し、他のリボヌクレオチド塩基（C T P、U T P、および G T P）加水分解産物に関するその移動パターンにより、鋳型配列を解読できる。前記したように、大半の D N A ポリメラーゼは、非慣用的デオキシヌクレオチドに対して識別する。非慣用的ジデオキシヌクレオチドの取込み向上を可能とする J D F-3 D N A ポリメラーゼのサブセットも、リボヌクレオチド取込みに対する抵抗性の向上を示す。

10

【0240】

100 ng の 38 mer プライマーを、K I N A C E-I T（商標）キネーシングキット（S t r a t a g e n e カタログ番号 300390）の説明書に従って、 γ -³³P でキナーゼ化した。

【0241】

38 mer プライマー：5' G G T T T T C C C A G T C A C G A C G T T G T A A A A C G A C G G C C A G T 3'

標識オリゴヌクレオチドを、10 T. 1 E（10 mM トリス pH 8.0、0.1 mM E D T A）中 N U C T R A P（登録商標）プローブ精製カラム（S t r a t a g e n e カタログ番号 400701）を用いて混入している遊離ヌクレオチドから精製した。標識オリゴヌクレオチド（約7ピコモル）を、95℃まで加熱し、次いで0.32 mM M g C l₂ の存在下で室温まで冷却することにより、0.09 pmol の M13 mp18+ にアニーリングした。

20

【0242】

伸長成分

0.054 pM アニーリングしたプライマー／鋳型

200 M 各 d N T P

1 × c P f u D N A ポリメラーゼ緩衝液（S t r a t a g e n e カタログ番号 200532）

30

4 ~ 200 A T P*

0.1 ~ 5 単位の J D F-3 ポリメラーゼ*

*別々に添加

上記に列挙した最初の3つの成分を含む8 μl のカクテルを、0.2 ml 管に分注した。1 μl のポリメラーゼおよび1 μl の2 mM、0.2 mM または0.4 mM A T P を加え、反応液を72℃で15分間インキュベートした。反応容量は、1 × c P f u ポリメラーゼ緩衝液で100 μl とし、1.5 ml の管に移した。反応液を70 mM N a O H の存在下で15分間100℃で加熱した後、反応液を70 mM H C l で中和し、10 μl の3 M 酢酸ナトリウムおよび327.5 μl のエタノールの添加により沈降した。試料を、30分間14 k r p m で微量遠心分離し、その後、上清を取り出し、ペレットを80% エタノールで洗浄した。真空乾燥した後、試料を5 μl のシーケンス停止溶液（95% ホルムアミド、20 mM E D T A、0.05% ブロモフェノールブルー、0.05% キシレンシアノール F F）に再懸濁し、2.5 μl を、6% アクリルアミド-7 M 尿素、1 × T B E C A S T A W A Y（商標）プレキャストゲル（S t r a t a g e n e カタログ番号 401090 および 401094）にのせた。ゲルを50ワットでブロモフェノールブルーダイがゲルの下方に移動するまで流し、その後、ゲルを固定し、乾燥し、72時間フィルムに感光した。

40

【0243】

試験した J D F-3 550（野生型ヌクレオチド取込み）および全変異体のシーケンスラダーは、200 μM および20 μM A T P レベルで可視であった。4 μM のレベル

50

では、L 4 0 8 H および L 4 0 8 F 変異体のみが、ラダーを生じた（データは示していない）。

【0244】

v i. ダイージデオキシヌクレオチド終結因子を用いたシーケンス

プライマーは、FAMddCTP（NENNEL481）の存在下で伸長した。配列反応液を精製し、ABI370上に流した。

【0245】

サイクルシーケンスの反応条件は下記の通りであった：

1×cPFU緩衝液、200ng pBluescriptIIKSプラスミド、3pmol T7プライマー、0.23mM dCTP、0.23mM dATP、0.23mM dTTP、0.046mM FAM ddCTPを有する0.23mM dGTP。

10

【0246】

試料を、Perkin-Elmerサイクラー中で、10μlの容量中、下記した温度および時間を25サイクル循環した。

【0247】

95℃ 30秒

55℃ 30秒

72℃ 2分間

試料を、製造業者の説明書に従って、CentriSepカラムを使用して精製した。乾燥後、試料を、66.7%の脱イオン化ホルムアミド、16.7mg/mlブルーデキストラン、および8.3mM EDTAからなる3μlのローディングダイに再懸濁した。試料を95℃で3分間加熱し、ABI PRISM377DNAシーケンサー中の5% LongRangelゲルにのせた。

20

【0248】

データをGene Scan2.1で処理した。

【0249】

（実施例2）

DNAの標識

本発明の修飾DNAポリメラーゼは、DNAの標識に適用できる。放射標識ヌクレオチドの取込みを含む、DNAを標識する数個の手段が存在することは当業者には公知である。1つのかかる共通の手段は、ランダムプライミングであり、これにより当業者は、典型的には約50から約1000塩基長の標識DNA断片を作成できる。本明細書に記載の手順は、F. Ausubelら、分子生物学の短いプロトコル、第3版、John Wiley and Sons社、1995から適応する。

30

【0250】

DNAのランダムプライミングへの第一段階として、2.5μlの0.5mM 3dNTP（各0.5mMのdCTP、dGTP、TTP）、50μCi [³²P] dATP、1μlの3～8単位/μlのDNAポリメラーゼを、50mMトリス-HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、1mMジチオトレイトール、0.05mg/mlウシ血清アルブミン中に含む反応混液を、全容量11μl中で調製し、氷上でインキュベートする。次に、約30から約100ngのDNAを、14μl中、約1から5μgのランダムヘキサヌクレオチドと混合し、2から3分間煮沸し、次いで氷上に置く。次いで、11μlの反応混液をDNA/ランダムヘキサマー混液に加え、ランダムプライミング反応を、10分間かけて、室温で4時間という長い時間インキュベートする。反応を停止するために、1μlの0.5M EDTA、3μlの10mg/ml tRNA、および100μlの10mMトリス-HCl、pH7.4を加え、混合物をフェノールで抽出する。次いで、標識したDNAを、クロマトグラフィーにより取り込まれていない放射性前駆体から分離する。

40

【0251】

R. ダイージデオキシヌクレオチド取込みのゲルアッセイ

50

標識オリゴヌクレオチド二本鎖を、ジデオキシヌクレオチドとダイーデオキシヌクレオチドの混合物を用いて伸長した。二本鎖を変性20%アクリルアミド/7M尿素ゲル上で分離すると、ジデオキシヌクレオチドで終結した標識オリゴヌクレオチドは、ダイーデオキシヌクレオチドで終結したオリゴヌクレオチドから解像できる。

【0252】

オリゴヌクレオチド：

259C ³²P-TAACGTTGGGGGGGGCA→
248C TGC AACCCCCCCCCGTAT

259Cの5'末端を、³²Pγ-ATPを使用する以外は、Q. i i . a章に記載のように標識し、精製した。標識オリゴヌクレオチド259Cは、約0.7ng/μlの濃度であった。相補的オリゴヌクレオチド(258C)は等しい濃度として加え、95℃まで3分間、50℃で5分間、室温で20分間加熱した。関連変異体の加熱で死滅した溶解液を、実施例C章に記載のように調製した。反応液を、計0.1mMのヌクレオチド混合物を有する30mMトリスpH8.0および3mM MgCl₂からなる5μlの容量中でインキュベートした。ddTTPとFLUddUTPまたはROXddUTPの比は10:1であった。ダイマーは、1.2ピコモルの濃度で存在し、0.5μlの酵素または粗溶解液または精製酵素を反応液に加え、その後、Hot Topを有するRobeCycller(登録商標)勾配96温度サイクラー中で50℃でインキュベートした。試料を20秒間インキュベートし、その後、3μlのホルムアミドをベースとした添加ダイを加え、試料を95℃で3分間加熱変性し、次いで20%アクリルアミド/7M尿素ゲルにのせ、一定60ワットで電気泳動にかけた。ゲルをX線フィルムに感光し、フィルムを、EagleEye(登録商標)Eagle Sightソフトウェアパッケージ中で解析した。

【0253】

表Iのリファレンス

- Joyce, C.M., Kelley, W.S. および Grindley N.D.F. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1958-1964.
- Lopes, P. Martinez, S., Diaz, A. Espinosa, M. および Lacks, S.A. (1989) J. Biol. Chem. 264, 4255-4263.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K. Drummond, R. および Gelfand, D.H. (1989) J. Biol. Chem. 264, 6427-6437.
- Akhmetzjanov, A.A. および Vakhitov, V.A. (1992) Nucl. Acids Res. 20, 5839.
- Leavitt, M.C. および Ito, J. (1989) Proc. Acad. Sci. U.S.A. 86, 4465-4469.
- Dunn, J.J, および Studier, F.W. (1983) J. Mol. Biol. 166, 477-535.
- Scarlato, V. および Gargano, S. (1992) Gene 118, 109-113.
- Raden, B. および Rutberg, L. (1984) J. Virol. 52, 9-15.
- Foury, F, (1989) J. Biol. Chem. 264, 20552-20560.
- Ito, J. および Braithwaite, D.K. (1990) Nucl. Acids Res. 18, 6716 .
- Blanco, L. Bernad, A. および Salas, M. (1991) Nucl. Acids res. 19, 955.
- Hahn, S. および Ruger, W, (1989) Nucl. Acids Res. 17, 6729.
- Hollingsworth, H.C. および Nossal, N.G. (1991) J. Biol. Chem. 266, 1888-1897.
- Kaliman, A.V., Krutilina. A.I., Kryukov, V.M. および Bayev, A.A. (1986) FEBS Lett. 195, 61-64.
- Iwasaki, H. Ishino, Y., Toh, H. Nakata, A. および Shinagawa, H. (1991) Mol. Gen Genet. 226, 24-33.

16. Jung, G., Leavitt, M.C., Hsieh, J.-C. および Ito, J. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 8287-8291.
17. Savilahti, H. および Bamford D.H. (1987) Gene 57, 121-130.
18. Yoshikawa, H. および Ito, J. (1982) Gene 17, 323-335.
19. Matsumoto, K., Takano, H., Kim, C.I. および Hirokawa, H. (1989) Gene 84, 247-255.
20. Spicer, E.K., Rush, J., Fung, C., Reha-Krantz, L.J., Karam, J.D. および Konigsberg, W.H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 7478-7486.
21. Perler, F.B., Comb, D.G., Jack, W.E., Moran, L.S., Qiang, B., Kucera, R.B., Benner, J., Slatko, B.E., Nwankwo, D.O., Hempstead, S.K., Carlow, C.K.S. および Jannasch, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5577-5581. 10
22. Mathur, E.J., Adams, M.W., Callen, W.N. および Cline, J.M. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 6952.
23. Pisani, F.W., De Martino, C. および Rossi, M. (1992) Nucl. Acids Res. 20, 2711-2716.
24. Wong S., W. Wahl, A.F., Yuan, P.-M., Arai, N., Pearson, B.E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M. W. および Wang, T.S.-F. (1988) EMBO J. 7, 37-47.
25. Pizzagalli, A., Valsasnini, P., Plevani, P. および Lucchini, G. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 3772-3776. 20
26. Damagnez, V., Tillit, J., deRecondo, A.-M. および Baldacci, G. (1991) Mol. Gen. Genet. 226, 182-189.
27. Hirose, F., Yamaguchi, M., Nishida, Y., Masutani, M., Miyazawa, H., Hanaoka, F. および Matsukage, A. (1991) Nucl. Acids Res. 19, 4991-4998.
28. Leegwater, P.A.J., Strating, M., Murphy, N. B., Kooy, R.F. van der Vliet, P.C. および Overdulve, J.P. (1991) Nucl. Acids Res. 19, 6441-6447.
29. Chung, D.W., Zhang, J., Tan C.-K., Davie, E.W., So, A.G. および Downey, K.M. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11197-11201. 30
30. Yang, C.-L., Chang, L.S., Zhang, P., Hao, H., Zhu, L., Tommey, N. L. および Lee, M.Y.W.T. (1992) Nucl. Acids Res. 20, 735-745.
31. Zhang, J., Chung, D.W., Tan, C.-K., Downey, K.M., Davie, E.W. および So, A.G. (1991) Biochemistry 30, 11742-11750.
32. Morrison, A. および Sugino, A. (1992) Nucl. Acids Res. 20, 375.
33. Pignede, G., Bouvier, D., deRecondo, A.-M. および Baldacci, G. (1991) J. Mol. Biol. 222, 209-218.
34. Ridley, R.G., White, J.H., McAleese, S.M., Gorman, M., Alano, P., deVries, E. および Kilbey, B.J. (1991) Nucl. Acids Res. 19, 6731-6736 40
35. Morrison, A., Araki, H., Clark, A.B., Hamatake, R.K. および Sugino, A. (1990) Cell 62, 1143-1151.
36. Morrison, A., Christensen, R.B., Alley, J., Beck, A.K., Bernstine, E.G., Lemontt, J.F. および Lawrence, C.W. (1989) J. Bacteriol. 171, 5659-5667.
37. Gibbs, J.S., Chiou, H.C., Hall, J.D., Mount, D.W., Retondo, M.J., Weller, S.K. および Coen, D.M. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 7969-7973.
38. Telford, E.A., Watson, M.S., McBride, K. および Davison, A.J. (1991) 50

- 2) Virology 189, 304-316.
39. Davison, A.J. および Scott, J.E. (1986) J.Gen. Virol. 67, 1759-1816.
40. Baer, R., Bankier, A.T. Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P. J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., Tuffnell, P.S. および Barrell, B.G. (1984) Nature 310, 207-211.
41. Albrecht, J.-C. および Fleckenstein, B. (1990) Virology 174, 533-542.
42. Kouzarides, T. Bankier, A.T., Satchwell, S.C., Weston, K., Tomlinson, P. and Barrell, B.G. (1987) J. Virol, 61, 125-133. 10
43. Elliott, R., Clark, C. Jaquish, D. および Spector, D.H. (1991) Virology 185, 169-186.
44. Teo, I.A., Griffin, B.E. および Jones, M.D. (1991) J. Virol. 65, 4670-4680.
45. Davison, A.J. (1992) Virology 186, 9-14.
46. Grabherr, R., Strasser, P. および Van Etten, J.L. (1992) Virology 188, 721-731.
47. Binns, M. M., Stenzler, L. Tomley, F.M., Campbell, J. および Brounsnell, M.E.G. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 6563-6573.
48. Earl P.L., Jones, E.V. および Moss, B. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 3659-3663. 20
49. Mustafa, A. および Yuen, L. (1991) DNA Seq. 2, 39-45.
50. Tomalski, M.D., Wu, J. および Miller, L.K. (1988) Virology 167, 591-600.
51. Bjornson, R.M. および Rohrmann, G.F. (1992) J. Gen. Virol 73, 1499-1504.
52. Gingeras, T.R., Sciaky, D., Gelinas, R.E., Bing-Dong, J., Yen, C.E., Kelly, M.M., Bullock, P.A. Parsons, B.L., O'Neill, K.E. および Roberts, R.J. (1982) J. Biol. Chem, 257, 13475-13491.
53. Engler, J.A., Hoppe, M.S. および van Bree, M.P. (1983) Gene 21, 145-159. 30
54. Shu, L., Hing, J.S., Wei, Y.-f. および Engler, J.A., (1986) Gene 46, 187-195.
55. Paillard, M., Sederoff, R.R. および Levings, C.S. III (1985) EMBO J. 4, 1125-1128.
56. Chan, B.S.-S., Court, D.A., Vierula, P.J. および Bertrand, H. (1991) Curr. Genet. 20, 225-237.
57. Kempken, F., Meinhardt, F. および Esser, K. (1989) Mol. Gen. Genet, 218, 623-530.
58. Oester, B. および Tudzynski, P. (1989) Mol. Gen. Genet. 217, 132-140. 40
59. Court D.A. および Bertrand, H. (1992) Curr. Genet. 22, 385-397.
60. Robison, M.M., Royer, J.C. and Horgen, P.A. (1991) Curr. Genet. 19, 495-502.
61. Stark, M.J.R., Mileham, A.J., Romanos, M.A. および Boyd, A. (1994) Nucl. Acids Res. 12, 6011-6030.
62. Tommasino, M. Ricci, S. および Galeotti, C.L. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 5863-5878.
63. Hishinuma, F. および Hirai, K. (1991) J. Gen. Genet. 226, 97-106.
64. Hopfner, K.P. ら (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 3600-36 50

05.

65. Niehaus, F. ら (1997) Gene 204, 153-158.
66. Tagaki et ら (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63, 4504-4510.
67. Datukishvili, N. ら (1996) Gene 177, 271-273.
68. Southworth, M.W. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 5281-5285.
69. Uemori, T. ら (1995) J. Bacteriol. 177, 2164-2177.
70. Konisky, J. ら (1994) J. Bacteriol. 176, 6402-6403.
71. Zhao (1999) Structure Fold Des. 7, 1189.

【0254】

10

他の実施形態

他の実施形態も、当業者には明らかである。前記の詳細な説明は、単に明瞭化のために提供され、単なる例示であることを理解すべきである。本発明の精神および範囲は、上記の実施例に限定されないが、以下の特許請求の範囲により包含される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、テルモコックス (Thermococcus) 種 JDF-3 DNA ポリメラーゼをコードする DNA 配列を示す (インティン除去) (配列番号1)。

【図2】 図2は、テルモコックス (Thermococcus) 種 JDF-3 DNA ポリメラーゼのアミノ配列を示す (インティン除去) (配列番号2)。

【図3】 図3は、テルモコックス (Thermococcus) 種 JDF-3 DNA ポリメラーゼをコードするゲノムクローンのアミノ酸配列を示す (配列番号3)。翻訳後プロセッシングにより除去されたインティンの位置を示す。

20

【図4】 図4は、テルモコックス (Thermococcus) 種 JDF-3 DNA ポリメラーゼをコードするゲノムクローンの DNA 配列を示す (配列番号4)。5' および 3' 非翻訳領域、ポリメラーゼコード領域 (エクステイン)、およびインティンコード領域に対応する DNA 配列を示す。

【図5】 図5は、JDF-3 変異体によるヌクレオチド取込みを示す。一次ライブラリースクリーンで ^{33}P 標識 ddNTP を取り込んだ入ファージクローンを再スクリーニングして、(パネル1) 0.5 mM MnCl_2 または (パネル2) 1.5 mM MgCl_2 の存在下で、 ^{33}P -ddNTP 取込みを評価した。ポリメラーゼ活性を、 ^{33}P -ddNTP を使用して、1.5 mM MgCl_2 の存在下で測定した (パネル3)。ヌクレオチド利用を、クローン1~18について、および親550番クローンについて示す。

30

【図6】 図6は、JDF-3 ポリメラーゼ変異体を使用して実施した ^{33}P -ddNTP サイクルシーケンス反応を示す。精製 JDF-3 変異体を、Thermo Sequenase 放射能標識ターミネーターサイクルシーケンスキットに置換した。DNA シーケンスラダーを、以下のポリメラーゼを使用してキットの説明書の通りに作成した：(A) Thermo Sequenase (B) JDF-3 550 番クローン (親) (C) JDF-3 A485T 変異体 (クローン p12) (D) JDF-3 P410L 変異体 (クローン p11) (E) JDF-3 P410L 変異体 (クローン p8)。最初のシーケンスゲルの上側を側に示す。レーンは (下) ddGTP、ddATP、ddTTP、ddCTP (上)。クローン p8、p11、および p12 は、付属的な変異およびアミノ末端タグを含む。

40

【図7】 図7は、ダイ標識 ddNTP および JDF-3 ポリメラーゼ変異体を使用して実施したサイクルシーケンス反応を示す。DNA シーケンスラダーを、(1) 2.14 μM dNTP : 0.0214 μM ddNTP ; (2) 2.14 μM dNTP : 0.214 μM ddNTP ; または (3) 2.14 μM dNTP : 2.14 μM ddNTP。以下の精製 DNA ポリメラーゼを使用した：(A) JDF-3 550 番クローン (親) (B) Thermo Sequenase (C) JDF-3 P410L 変異体 (クローン p8、付属的な変異およびアミノタグを含む) (E) JDF-3 L408H (クローン 1-1)。最初のシーケンスゲルの上を、右手側に示す。

50

【図8】 図8は、JDF-3P410L/A485T二重変異体および³³Pジデオキシヌクレオチドを使用して実施した、サイクルシーケンス反応を示す。DNAシーケンスラダーは、(A) 2 μl (B) 1 μl (C) 0.5 μlのJDF-3P410L/A485T二重変異体、JDF-3P410L変異体(クローンp8、付随的変異およびアミノ末端タグを含む)、またはThermo Sequenase (E)を使用して作成した。最初のシーケンスゲルの上を、左側に示す。レーンは：(下) ddGTP、ddATP、ddTTP、ddCTP (上)である。

【図9】 図9は、エキソJDF-3 (550) およびこの前駆クローンの変異体を使用した、リボヌクレオチド取込みアッセイの結果を示す。リボヌクレオチド対デオキシヌクレオチド取込みの比を、JDF-3 550、JDF-3L408H、JDF-3L408FおよびJDF-3A485Tについてプロットする。

10

【図10】 図10は、4つの形のJDF-3 DNAポリメラーゼおよびFAMddCTPにより作成した配列軌跡を示す。パネルAは、前駆ポリメラーゼJDF-3 550により生じた最小の軌跡を示し、パネルBは、JDF-3P410Lにより作成した僅かに向上した軌跡を実証し、パネルCは、二重変異体S345PおよびP410Lにより作成した配列を示し、パネルDは、JDF-3S345Pにより創造した軌跡を示す。

【図11】 図11は、パネルAでThermo Sequenaseにより実証されたピーク均一性の差異、および、パネルBで二重変異体JDF-3S345P+P410Lを示す。

【図12】 図12は、ROX-ddUTP (New England Nuclear (NEN) NEL476) またはフルオレセイン-12-ddUTP (NEN NEL401) のジデオキシヌクレオチドチミジン三リン酸を用いた、分離した標識オリゴヌクレオチドの3'伸長産物を示す。変異体4はJDF-3S345Pであり、変異体2はJDF-3P410Lであり、変異体3はJDF-3A485Tであり、変異体5はY496Nである。FはFLUddUTPを示し、RはROXddUTPを示す。

20

【図13】 図13は、図12からの相対的バンド強度の図解を示す。数値は、ddTTPバンドの強度値を、フルオレセイン-12-ddUTPバンドの強度値に分けることにより作成する。

【図14】 図14は、ダイージデオキシヌクレオチド選択JDF-3変異体(アミノ酸301~480)の配列アラインメントを示す。白いボックスにより強調した核酸残基は、変異の位置を示す。変異S345Pは、変異体28に存在する2つの変異の1つである。

30

【図15】 図15は、ダイージデオキシヌクレオチド選択JDF-3(アミノ酸481~660)の配列アラインメントを示す。白いボックスにより強調した核酸残基は変異の位置を示す。

TTCCGGGAGCGGGTCTTGAGGCTCCATTTTCAGTCCTCCTCGGGGGAAG 3' 非翻訳配列
 AAGTGGAACTCAAGCGGGTGTAGCTTATGTTATGTTCCCACTCCTCC
 AGCAGCTCCAGGATCCCTCAATCCCGGAACCTCGAGGCCCTCTCGTGG
 ATCTTTCTAACTTCTCTGCTCCGGGTTTATCCAGACCGCCACATGCC
 GGCTCTCAGCGCACCTCGAAATCTCGCGTGGGTGTCGCCGATGGA
 TTGCTCTGTCGGCTCGAGCCCGAAGCATCGAGCGGTTTCTGAACATCT
 CGGGCATCGGCTTTATACGCCAGAACCTCGTCGGCGAAGAAGTTCCCTCA
 ATGTAGTCCATCAGGCGGAACCTCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAAATTC
 GCCTATAGTGAAGTCATTACAAATTCAGTGGCGTGGTTTACAAAGTCG
 TGACTGGGAAJACCTCGGGGTTACCCCACTTAACTCGCTTTGAGCACAT
 CCCCC

【図 5】

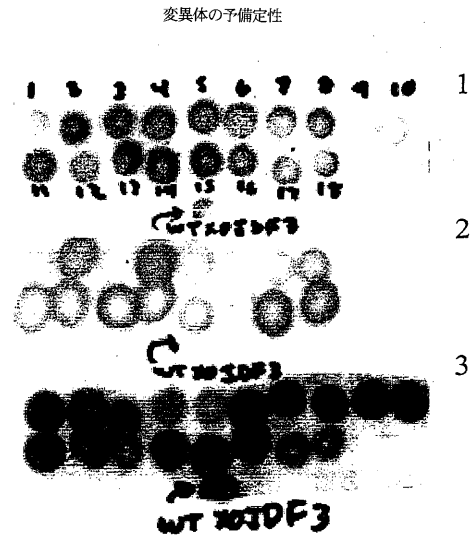


図 5

【図 6】

精製変異体を用いたシーケンス

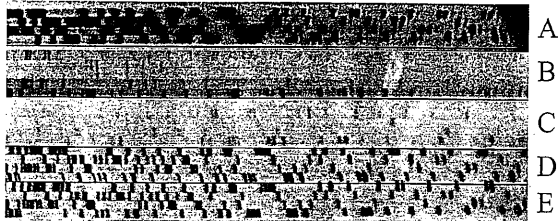


図 6

【図 7】

ダイ標識ジデオキシヌクレオチドを用いたシーケンス

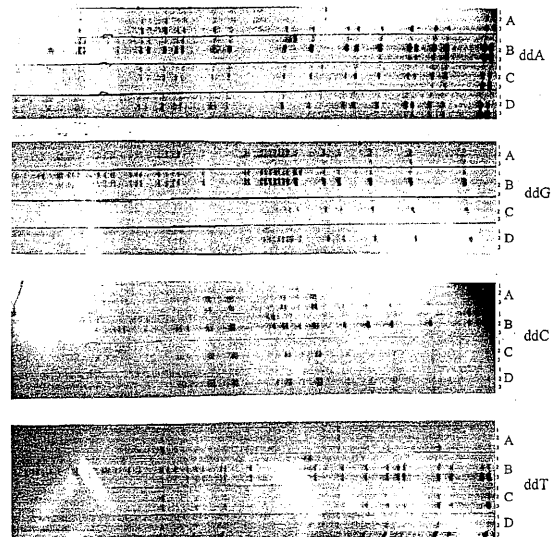


図 7

【図 8】

P410L、A485T二重変異体および α - ^{33}P ジデオキシヌクレオチドを用いたシーケンス

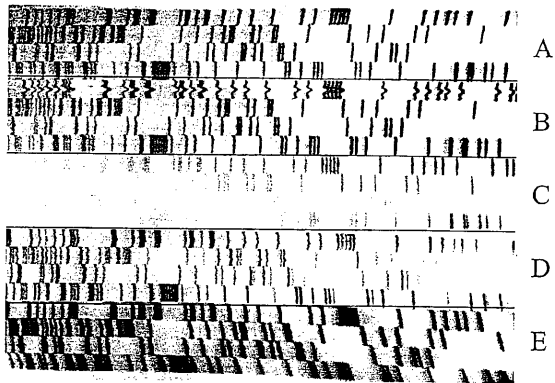
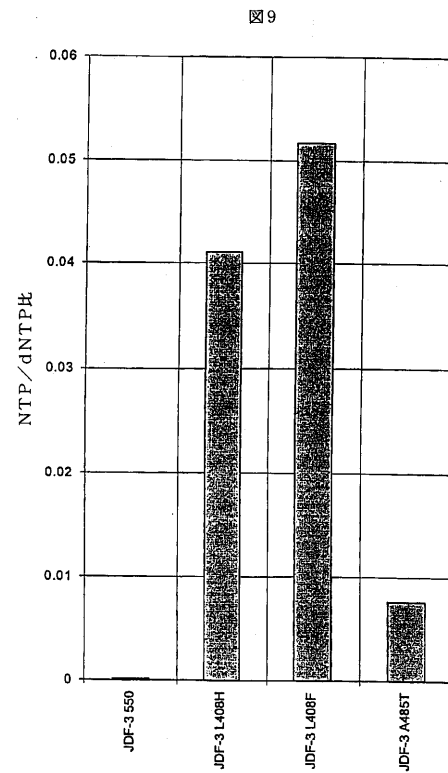


図8

【図 9】



【図 12】

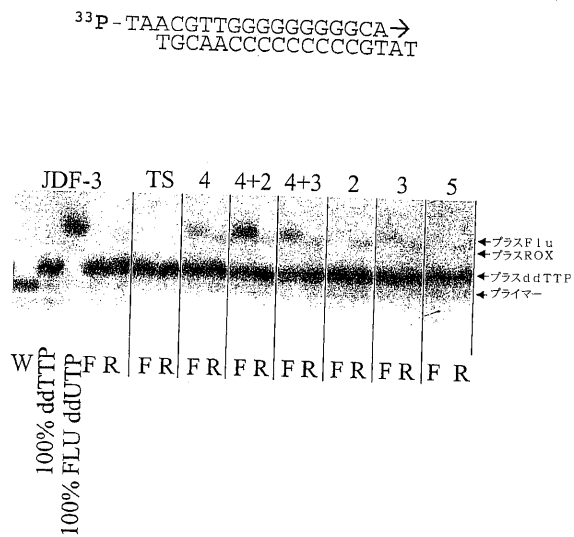
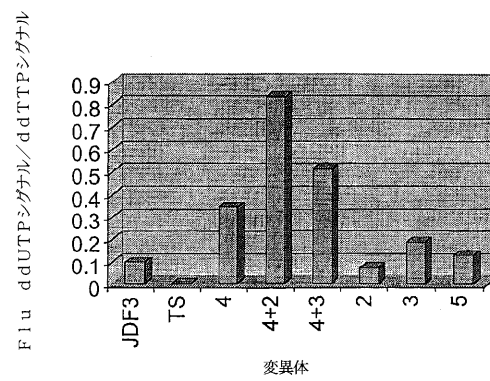
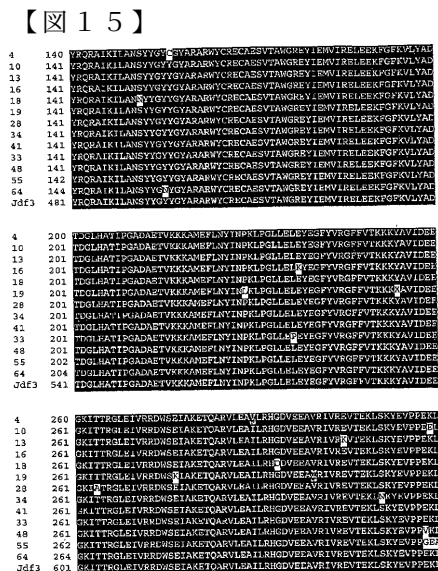
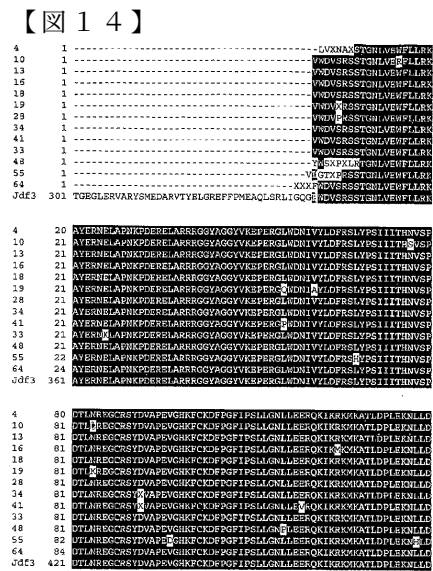
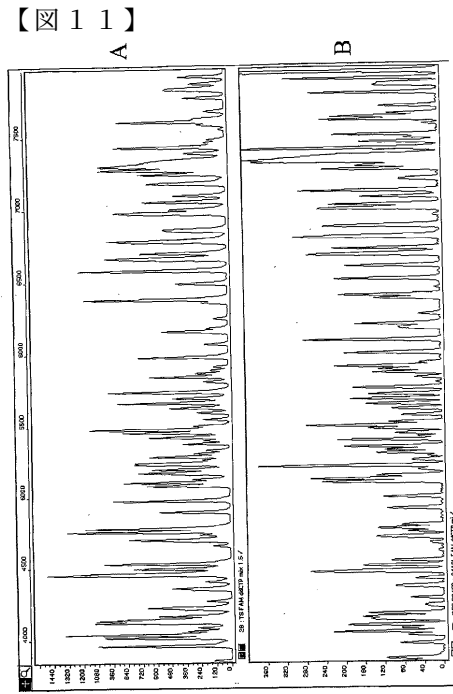
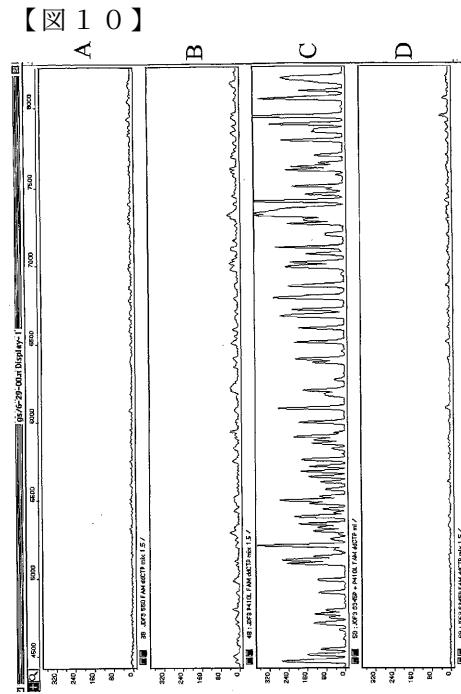


図12

【図 13】





フロントページの続き

(74)代理人 100095500

弁理士 伊藤 正和

(74)代理人 100111235

弁理士 原 裕子

(72)発明者 ソーグ、 ジョゼフ エイ.

アメリカ合衆国 ワイオミング州 83014 ウィルソン パイン メドウ ロード 5320

(72)発明者 ホグレフ、 ホリー エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ ディラク ストリート 6045

(72)発明者 ハンセン、 コニー ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92115 サンディエゴ ゲイル ストリート 3645

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表平10-503381 (JP, A)

国際公開第99/006538 (WO, A1)

国際公開第97/039150 (WO, A1)

特開平08-205874 (JP, A)

Nucleic Acids Res., Vol. 28, No. 5 (2000. Mar.) p. 1059-1066

Nucleic Acids Res., Vol. 21, No. 4 (1993) p. 787-802

J. Virol., Vol. 67, No. 1 (1993) p. 60-66

Nucleic Acids Res., Vol. 27, No. 12 (1999. Jun.) p. 2545-2553

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq