

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-515103

(P2018-515103A)

(43) 公表日 平成30年6月14日(2018.6.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	4 B O 5 O
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2017-559318 (P2017-559318)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成28年5月13日 (2016.5.13)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成29年11月27日 (2017.11.27)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/032258		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02016/183403		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成28年11月17日 (2016.11.17)		グレンツァーヘルストラッセ124
(31) 優先権主張番号	62/161, 571	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成27年5月14日 (2015.5.14)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118902
(31) 優先権主張番号	62/202, 895		弁理士 山本 修
(32) 優先日	平成27年8月9日 (2015.8.9)	(74) 代理人	100106208
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 宮前 徹
(31) 優先権主張番号	15/012, 317	(74) 代理人	100120112
(32) 優先日	平成28年2月1日 (2016.2.1)		弁理士 中西 基晴
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリメラーゼバリエーションおよびその使用

(57) 【要約】

H 2 2 3、N 2 2 4、Y 2 2 5、H 2 2 7、I 2 9 5、Y 3 4 2、T 3 4 3、I 3 5 7、S 3 6 0、L 3 6 1、I 3 6 3、S 3 6 5、S 3 6 6、Y 3 6 7、P 3 6 8、D 4 1 7、E 4 7 5、Y 4 7 6、F 4 7 8、K 5 1 8、H 5 2 7、T 5 2 9、M 5 3 1、N 5 3 5、G 5 3 9、P 5 4 2、N 5 4 5、Q 5 4 6、A 5 4 7、L 5 4 9、I 5 5 0、N 5 5 2、G 5 5 3、F 5 5 8、A 5 9 6、G 6 0 3、A 6 1 0、V 6 1 5、Y 6 2 2、C 6 2 3、D 6 2 4、I 6 2 8、Y 6 2 9、R 6 3 2、N 6 3 5、M 6 4 1、A 6 4 3、I 6 4 4、T 6 4 7、I 6 4 8、T 6 5 1、I 6 5 2、K 6 5 5、W 6 5 6、D 6 5 7、V 6 5 8、H 6 6 0、F 6 6 2、L 6 9 0、およびそれらの組合せから選択される少なくとも1つの変異を有するバリエーション p o l 6 ポリメラーゼを本明細書において記載する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNAポリメラーゼ活性を有する改変DNAポリメラーゼであって、配列番号1または2に記載するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、H223、N224、Y225、H227、I295、Y342、T343、I357、S360、L361、I363、S365、S366、Y367、P368、D417、E475、Y476、F478、K518、H527、T529、M531、N535、G539、P542、N545、Q546、A547、L549、I550、N552、G553、F558、A596、G603、A610、V615、Y622、C623、D624、I628、Y629、R632、N635、M641、A643、I644、T647、I648、T651、I652、K655、W656、D657、V658、H660、F662、L690、およびそれらの組合せからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、前記改変DNAポリメラーゼ。

10

【請求項 2】

前記置換が、H223A、N224Y/L/Q/M/R/K、Y225L/T/I/F/A/M、H227P/E/F/Y、I295W/F/M/E、Y342L/F、T343N/F、I357G/L/Q/H/W/M/A/E/Y/P、S360G/E/Y、L361M/W/V/F、I363V/A/R/M/W、S365Q/W/M/A/G、S366A/L、Y367L/E/M/P/N/F、P368G、D417P、E475D、Y476V、F478L、K518Q、H527W/R/L/Y/T/M、T529M/F、M531H/Y/A/K/R/W/T/L/V/G、N535L/Y/M/K/I/R/W/Q、G539Y/F、P542E/S/G、N545K/D/S/L/R/Q/W、Q546W/F、A547M/Y/W/F/V/S、L549Q/Y/H/G/R/K、I550A/W/T/G/F/S、N552L/M/S/T、G553S/T/E/Q/K/R/M、F558P/T、A596S、G603T/A/L、A610T/E、V615A/T、Y622A/M、C623G/S/Y/F、D624F/K、I628Y/V/F/L/M、Y629W/H/M/K、R632L/C、N635D、M641L/Y、A643L、I644H/M/Y、T647G/A/E/K/S/Y、I648K/R/V/N/T/L、T651Y/F/M、I652Q/G/S/N/F/T/A/L/E/K/M、K655G/F/E/N/Q/M/A、W656E、D657R/P/A/E、V658L、H660A/Y、F662I/L、L690Mおよびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の改変DNAポリメラーゼ。

20

30

【請求項 3】

前記改変ポリメラーゼが、親ポリメラーゼと比較して変化した特性を有する、請求項1に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 4】

変化した特性が、忠実度、処理能力、伸長速度、安定性、溶解性、ならびに、ヌクレオチド四リン酸、ヌクレオチド五リン酸、ヌクレオチド六リン酸、ヌクレオチド七リン酸、またはヌクレオチド八リン酸のようなヌクレオチドポリリン酸に結合する能力、および/またはヌクレオチドポリリン酸を組み込む能力から選択される、請求項3に記載の改変DNAポリメラーゼ。

40

【請求項 5】

変化した特性が、4、5、6、7、または8個のリン酸を有するヌクレオチドポリリン酸を、成長しているDNA鎖に組み込む能力である、請求項3に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 6】

ヌクレオチドポリリン酸がタグ付きのものである、請求項5に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 7】

前記改変ポリメラーゼが、S366A/Lに一致した置換を有する、請求項1に記載の

50

改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 8】

前記改変ポリメラーゼが、E 4 7 5 D に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 9】

前記改変ポリメラーゼが、F 4 7 8 L に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 10】

前記改変ポリメラーゼが、K 5 1 8 Q に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

10

【請求項 11】

前記改変ポリメラーゼが、T 5 2 9 M に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 12】

前記改変ポリメラーゼが、N 5 3 5 L に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 13】

前記改変ポリメラーゼが、N 5 4 5 K / L に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 14】

前記改変ポリメラーゼが、A 5 4 7 F に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

20

【請求項 15】

前記改変ポリメラーゼが、G 5 5 3 S に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 16】

前記改変ポリメラーゼが、T 6 4 7 G / Y に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 17】

前記改変ポリメラーゼが、T 6 5 1 Y に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

30

【請求項 18】

前記改変ポリメラーゼが、I 6 5 2 Q / A / L / E / K / M に一致した置換を有する、請求項 1 に記載の改変DNAポリメラーゼ。

【請求項 19】

H 2 2 3 A ;
N 2 2 4 Y / L / Q / M / R / K ;
Y 2 2 5 L / I / T / F / A / M ;
H 2 2 7 P / E / F / Y ;
I 2 9 5 F / E / M / W ;
Y 3 4 2 L / F ;
T 3 4 3 N / F ;
I 3 5 7 G / L / Q / H / W / M / A / E / Y / P ;
S 3 6 0 G / E / Y ;
L 3 6 1 M / W / V / F ;
I 3 6 3 V / A / R / M / W ;
S 3 6 5 Q / W / M / A / G ;
S 3 6 6 A / L ;
Y 3 6 7 L / E / M / P / N / F ;
P 3 6 8 G ;

40

50

D 4 1 7 P ;
 E 4 7 5 D ;
 Y 4 7 6 V ;
 F 4 7 8 L ;
 K 5 1 8 Q ;
 H 5 2 7 W / R / L / Y / T / M ;
 T 5 2 9 M / F ;
 M 5 3 1 H / Y / A / K / R / W / T / L / V / G ;
 N 5 3 5 L / Y / M / K / I / R / W / Q ;
 P 5 4 2 E / S / G ;
 N 5 4 5 D / K / S / L / R / Q / W ;
 Q 5 4 6 W / F ;
 A 5 4 7 F / M / W / Y / V / S ;
 L 5 4 9 H / Y / Q / G / R / K ;
 I 5 5 0 A / W ;
 I 5 5 0 T / G / F / S ;
 N 5 5 2 L / M / T ;
 G 5 5 3 S / T / E / Q / K / R / M ;
 F 5 5 8 P / T ;
 A 5 9 6 S ;
 G 6 0 3 T / A / L ;
 A 6 1 0 T / E ;
 V 6 1 5 A / T ;
 Y 6 2 2 A / M ;
 C 6 2 3 G / S / Y / A / F ;
 D 6 2 4 F / K ;
 I 6 2 8 Y / V / F / L / M ;
 Y 6 2 9 W / H / M / K ;
 R 6 3 2 L / C ;
 N 6 3 5 D ;
 M 6 4 1 L / Y ;
 A 6 4 3 L ;
 I 6 4 4 H / M / Y ;
 T 6 4 7 G / A / E / K / S / Y ;
 I 6 4 8 K / R / V / N / T / L ;
 T 6 5 1 Y / F / M ;
 I 6 5 2 Q / G / S / N / F / T / A / L / E / K / M ;
 K 6 5 5 G / F / E / N / Q / M / A ;
 W 6 5 6 E ;
 D 6 5 7 R / P / A / E ;
 V 6 5 8 L ;
 H 6 6 0 A / Y ;
 F 6 6 2 I / L ;
 L 6 9 0 M ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L ;
 T 6 5 1 Y + N 5 3 5 L ;
 Y 3 4 2 L + E 4 7 5 D + F 4 7 8 L ;
 T 3 4 3 N + D 4 1 7 P + K 5 1 8 Q ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y ;
 I 3 6 3 V + E 4 7 5 D + Y 4 7 6 V ;

10

20

30

40

50

S 3 6 6 L + G 5 5 3 S + F 5 5 8 P ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M ;
 S 3 6 6 A + P 5 4 2 E + N 5 4 5 K ;
 S 3 6 6 A + P 5 4 2 E + I 6 5 2 Q ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + T 5 2 9 M ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + N 5 4 5 K ;
 T 6 5 1 Y + P 5 4 2 E + N 5 4 5 K ;
 T 6 5 1 Y + P 5 4 2 E + Q 5 4 6 W ;
 T 6 5 1 Y + P 5 4 2 E + S 3 6 6 A ;
 T 6 5 1 Y + N 5 3 5 L + N 5 4 5 K ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 I + I 6 5 2 Q ;
 T 6 5 1 Y + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 T 6 4 7 G + A 5 4 7 F + Y 2 2 5 T ;
 A 5 4 7 F + A 6 1 0 T + S 3 6 6 A ;
 A 5 4 7 F + A 6 1 0 T + Y 2 2 5 I ;
 S 3 6 6 A + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 T 6 4 7 E + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 T 5 2 9 M + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 N 5 4 5 K + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 T 6 4 7 G + A 5 4 7 F + T 5 2 9 M ;
 T 5 2 9 M + A 6 1 0 T + A 5 4 7 F ;
 M 6 4 1 Y + T 5 2 9 M + A 5 4 7 F ;
 T 6 4 7 G + C 6 2 3 G + A 5 4 7 F ;
 A 6 1 0 T + I 2 9 5 W + T 6 5 1 Y ;
 V 6 1 5 A + M 5 3 1 Y + T 6 4 7 G ;
 S 3 6 6 L + F 4 7 8 L + A 5 9 6 S + L 6 9 0 M ;
 H 2 2 3 A + G 5 5 3 S + A 6 4 3 L + F 6 6 2 I ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 5 2 9 M ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + N 6 3 5 D ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + T 5 2 9 M ;
 S 3 6 6 A + S 3 6 5 A + P 3 6 8 G + G 6 0 3 T ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + A 5 4 7 Y ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M + T 6 4 7 G ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 K ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 5 2 L ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + Y 6 2 9 W ;
 N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 5 2 9 M ;
 N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + N 6 3 5 D ;
 N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + C 6 2 3 G ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + I 6 2 8 Y ;
 S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M + T 6 4 7 G + S 3 6 0 G ;
 N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q + Y 2 2 5 I ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + K 6 5 5 G ;
 N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + L 5 4 9 Q ;

S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + A 5 4 7 Y + K 6 5 5 G ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 6 2 9 W ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 F ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + K 6 5 5 F ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + N 5 5 2 L ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + M 5 3 1 A ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + G 5 3 9 Y ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + V 6 5 8 L ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + N 5 5 2 L ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + I 6 5 2 G ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + I 6 5 2 Q ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + N 5 5 2 M
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R + N 2 2 4
 R ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R + I 6 2 8
 M ;
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R + K 6 5 5
 A ; および
 T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R + Y 6 2 9
 W

10

20

から選択される、請求項 1 に記載の改変 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 2 0】

S 3 6 6 A + T 5 2 9 M + N 5 4 5 L + A 5 4 7 F を含む、請求項 1 に記載の改変 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 2 1】

- a . Y 2 2 5 L / F / A / M ;
- b . M 5 3 1 A / G ;
- c . G 5 3 9 Y ;
- d . N 5 5 2 L / T ;
- e . Y 6 2 9 W / K ;
- f . K 6 5 5 F / Q / M / A ; および
- g . D 6 5 7 R / E / P / A

30

から選択される少なくとも 1 つの変異をさらに含む、請求項 2 0 に記載の改変 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 2 2】

S 3 6 5 A + S 3 6 6 A + P 3 6 8 G + G 6 0 3 T を含む、請求項 1 に記載の改変 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 2 3】

前記ポリメラーゼが 1 0 個未満の変異を含む、請求項 1 に記載の改変 DNA ポリメラーゼ。

40

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0 0 0 1】

[001]本出願は、2 0 1 6 年 2 月 1 日に出願された「Polymerase Variants」と題する米国特許出願第 1 5 / 0 1 2 , 3 1 7 号の一部継続出願であり、2 0 1 5 年 5 月 1 4 日に出願された「Polymerase Variants」と題する米国仮特許出願第 6 2 / 1 6 1 , 5 7 1 号、2 0 1 5 年 8 月 9 日に出願された「Polymerase Variants」と題する米国仮特許出願第 6 2 / 2 0 2 , 8 9 5 号、お

50

よび2016年5月10日に出願された「Polymerase Variants and Uses Thereof」と題する米国特許出願第15/151,364号に基づく優先権を主張する。

配列表

[002]本出願は、ASCIIフォーマットで電子出願された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2016年5月10日に作成された上記のASCIIコピーは、20-04338.521WO2__SL.txtという名前であり、17,989バイトのサイズである。

【技術分野】

【0002】

[003]本明細書においては、特に、組換えDNA技術における適用のために、より適する酵素を選択するよう設計された定向進化実験において同定される変異に基づくアミノ酸変化を含有する改変DNAポリメラーゼを提供する。

【背景技術】

【0003】

[004]DNAポリメラーゼは、1本鎖DNAを鋳型として使用して相補的なDNA鎖を合成する酵素のファミリーである。特に、DNAポリメラーゼは、新たに形成する鎖の3'末端に遊離のヌクレオチドを添加し、その結果、新しい鎖を5'から3'への方向に伸長させることができる。ほとんどのDNAポリメラーゼは、重合活性とエキソヌクレアーゼ活性の両方を有する多機能タンパク質である。例えば、多くのDNAポリメラーゼは、3'5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。これらのポリメラーゼは、誤って組み込まれたヌクレオチドを認識することができ、酵素の3'5'エキソヌクレアーゼ活性により、その間違ったヌクレオチドが除去される（この活性は、ブルーフリーディングとして知られる）。ヌクレオチドの除去後、ポリメラーゼは正しいヌクレオチドを再挿入することができ、複製が継続できる。多くのDNAポリメラーゼは、5'3'エキソヌクレアーゼ活性も有する。

【0004】

[005]ポリメラーゼには、ナノポアシーケンシングを含めた組換えDNAの応用例における用途が見出されている。しかしながら、DNA鎖は、1塩基あたり1μs~5μsの速度で急速にナノポアを通過する。これにより記録は困難になり、またバックグラウンドノイズを受けやすくなり、単一ヌクレオチドの分解能を得ることができなくなる。したがって、DNA鎖またはその断片のシーケンシングでは、検出可能なタグをヌクレオチドに使用することがある。よって、シーケンシングするDNAの速度を制御する必要性だけでなく、改変ヌクレオチド、例えばタグを有するか、または有しないヌクレオチドポリリン酸を組み込むことなどの、（野生型酵素と比較して）改良された特性を有するポリメラーゼを提供する必要性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

[006]本発明は、産業用途または研究用途で使用される条件下での有利な表現型、例えば高い塩濃度で例えばタグ付きヌクレオチドなどの改変ヌクレオチドポリリン酸の組み込みを触媒することなどを与える変異を選択するよう設計された定向進化実験に基づいた、改変DNAポリメラーゼ（例えば、変異体）を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

[007]一態様においては、配列番号2（Pol6（Hisタグ付き））のH223、N224、Y225、H227、I295、Y342、T343、I357、S360、L361、I363、S365、S366、Y367、P368、D417、E475、Y476、F478、K518、H527、T529、M531、N535、G539、P542、N545、Q546、A547、L549、I550、N552、G553、F

5 5 8、A 5 9 6、G 6 0 3、A 6 1 0、V 6 1 5、Y 6 2 2、C 6 2 3、D 6 2 4、I 6 2 8、Y 6 2 9、R 6 3 2、N 6 3 5、M 6 4 1、A 6 4 3、I 6 4 4、T 6 4 7、I 6 4 8、T 6 5 1、I 6 5 2、K 6 5 5、W 6 5 6、D 6 5 7、V 6 5 8、H 6 6 0、F 6 6 2、および L 6 9 0 に対応する位置で少なくとも 1 つの変化を含むバリエーションがある。

【0007】

[008]一実施形態においては、DNAポリメラーゼ活性を有する改変DNAポリメラーゼであって、配列番号 1 または 2 に記載するアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する改変DNAポリメラーゼを提供する。

10

【0008】

[009]第 2 の実施形態においては、DNAポリメラーゼ活性を有する改変DNAポリメラーゼであって、H 2 2 3、N 2 2 4、Y 2 2 5、H 2 2 7、I 2 9 5、Y 3 4 2、T 3 4 3、I 3 5 7、S 3 6 0、L 3 6 1、I 3 6 3、S 3 6 5、S 3 6 6、Y 3 6 7、P 3 6 8、D 4 1 7、E 4 7 5、Y 4 7 6、F 4 7 8、K 5 1 8、H 5 2 7、T 5 2 9、M 5 3 1、N 5 3 5、G 5 3 9、P 5 4 2、N 5 4 5、Q 5 4 6、A 5 4 7、L 5 4 9、I 5 5 0、N 5 5 2、G 5 5 3、F 5 5 8、A 5 9 6、G 6 0 3、A 6 1 0、V 6 1 5、Y 6 2 2、C 6 2 3、D 6 2 4、I 6 2 8、Y 6 2 9、R 6 3 2、N 6 3 5、M 6 4 1、A 6 4 3、I 6 4 4、T 6 4 7、I 6 4 8、T 6 5 1、I 6 5 2、K 6 5 5、W 6 5 6、D 6 5 7、V 6 5 8、H 6 6 0、F 6 6 2、および L 6 9 0、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸置換を有する配列番号 1 または 2 に記載するアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する改変DNAポリメラーゼを提供する。さらなる実施形態においては、1 つまたは複数のアミノ酸置換は、H 2 2 3 A、N 2 2 4 Y / L / Q / M / R / K、Y 2 2 5 L / T / I / F / A / M、H 2 2 7 P / E / F / Y、I 2 9 5 W / F / M / E、Y 3 4 2 L / F、T 3 4 3 N / F、I 3 5 7 G / L / Q / H / W / M / A / E / Y / P、S 3 6 0 G / E / Y、L 3 6 1 M / W / V / F、I 3 6 3 V / A / R / M / W、S 3 6 5 Q / W / M / A / G、S 3 6 6 A / L、Y 3 6 7 L / E / M / P / N / F、P 3 6 8 G、D 4 1 7 P、E 4 7 5 D、Y 4 7 6 V、F 4 7 8 L、K 5 1 8 Q、H 5 2 7 W / R / L / Y / T / M、T 5 2 9 M / F、M 5 3 1 H / Y / A / K / R / W / T / L / V / G、N 5 3 5 L / Y / M / K / I / R / W / Q、G 5 3 9 Y / F、P 5 4 2 E / S / G、N 5 4 5 K / D / S / L / R / Q / W、Q 5 4 6 W / F、A 5 4 7 M / Y / W / F / V / S、L 5 4 9 Q / Y / H / G / R / K、I 5 5 0 A / W / T / G / F / S、N 5 5 2 L / M / S / T、G 5 5 3 S / T / E / Q / K / R / M、F 5 5 8 P / T、A 5 9 6 S、G 6 0 3 T / A / L、A 6 1 0 T / E、V 6 1 5 A / T、Y 6 2 2 A / M、C 6 2 3 G / S / Y / F、D 6 2 4 F / K、I 6 2 8 Y / V / F / L / M、Y 6 2 9 W / H / M / K、R 6 3 2 L / C、N 6 3 5 D、M 6 4 1 L / Y、A 6 4 3 L、I 6 4 4 H / M / Y、T 6 4 7 G / A / E / K / S / Y、I 6 4 8 K / R / V / N / T / L、T 6 5 1 Y / F / M、I 6 5 2 Q / G / S / N / F / T / A / L / E / K / M、K 6 5 5 G / F / E / N / Q / M / A、W 6 5 6 E、D 6 5 7 R / P / A / E、V 6 5 8 L、H 6 6 0 A / Y、F 6 6 2 I / L、L 6 9 0 M およびそれらの組合せから選択される。1 つまたは複数のアミノ酸置換を有する改変DNAポリメラーゼは、親ポリメラーゼと比較して、酵素活性、忠実度、処理能力、伸長速度、シーケンシング精度、長時間連続性解読能、安定性、および溶解性から選択される変化した特性を有する。一実施形態においては、変化した特性は酵素活性である。一実施形態においては、変化した特性は忠実度である。一実施形態においては、変化した特性は処理能力である。一実施形態においては、変化した特性は伸長速度である。一実施形態においては、変化した特性は安定性である。一実施形態においては、変化した特性は溶解性である。一実施形態においては、変化した特性は、ヌクレオチドポリリン酸に結合する能力、および / またはヌクレオチドポリリン酸を組み込む能力である。ヌクレオチドポリリン酸は、例えばヌクレオチド四リ

20

30

40

50

ン酸、ヌクレオチド五リン酸、ヌクレオチド六リン酸、ヌクレオチド七リン酸、またはヌクレオチド八リン酸である。

【0009】

[0010]第3の実施形態においては、配列番号1または2と比較した場合に、酵素活性、忠実度、処理能力、伸長速度、安定性、または溶解性から選択される変化した特性を有する改変DNAポリメラーゼを提供する。一実施形態においては、変化した特性は酵素活性である。一実施形態においては、変化した特性は忠実度である。一実施形態においては、変化した特性は処理能力である。一実施形態においては、変化した特性は伸長速度である。一実施形態においては、変化した特性は安定性である。一実施形態においては、変化した特性は溶解性である。

10

【0010】

[0011]第4の実施形態においては、DNAポリメラーゼ活性を有する改変DNAポリメラーゼであって、H223A、N224Y/L/Q/M/R/K、Y225L/T/I/F/A、H227P/E/F/Y、I295W/F/M/E、Y342L/F、T343N/F、I357G/L/Q/H/W/M/A/E/Y/P、S360G/E/Y、L361M/W/V/F、I363V/A/R/M/W、S365Q/W/M/A/G、S366A/L、Y367L/E/M/P/N/F、P368G、D417P、E475D、Y476V、F478L、K518Q、H527W/R/L/Y/T/M、T529M/F、M531H/Y/A/K/R/W/T/L/V/G、N535L/Y/M/K/I/R/W/Q、G539Y/F、P542E/S/G、N545K/D/S/L/R/Q/W、Q546W/F、A547M/Y/W/F/V/S、L549Q/Y/H/G/R/K、I550A/W/T/G/F/S、N552L/M/S/T、G553S/T/E/Q/K/R/M、F558P/T、A596S、G603T/A/L、A610T/E、V615A/T、Y622A/M、C623G/S/Y/F、D624F/K、I628Y/V/F/L/M、Y629W/H/M/K、R632L/C、N635D、M641L/Y、A643L、I644H/M/Y、T647G/A/E/K/S/Y、I648K/R/V/N/T/L、T651Y/F/M、I652Q/G/S/N/F/T/A/L/E/K/M、K655G/F/E/N/Q/M/A、W656E、D657R/P/A/E、V658L、H660A/Y、F662I/L、L690Mおよびその組合せからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含む配列番号1に記載するアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、1つまたは複数のアミノ酸置換が、親ポリメラーゼと比較して、酵素活性、忠実度、処理能力、伸長速度、シーケンシング精度、長時間連続性解読能、安定性、または溶解性を変化させる、改変DNAポリメラーゼを提供する。一実施形態においては、変化した特性は酵素活性である。一実施形態においては、変化した特性は忠実度である。一実施形態においては、変化した特性は処理能力である。一実施形態においては、変化した特性は伸長速度である。一実施形態においては、変化した特性は安定性である。一実施形態においては、変化した特性は溶解性である。一実施形態においては、変化した特性は、ヌクレオチドポリリン酸に結合する能力、および/またはヌクレオチドポリリン酸を組み込む能力である。ヌクレオチドポリリン酸は、例えばヌクレオチド四リン酸、ヌクレオチド五リン酸、ヌクレオチド六リン酸、ヌクレオチド七リン酸、またはヌクレオチド八リン酸である。

20

30

40

【0011】

[0012]一実施形態においては、配列番号1または2と比較して変化した酵素活性を有するバリエーションポリメラーゼは、

- a. H223A;
- b. N224Y/L/Q/M/R/K;
- c. Y225L/I/T/F/A/M;
- d. H227P/E/F/Y;
- e. I295F/E/M/W;

50

f . Y 3 4 2 L / F ;
 g . T 3 4 3 N / F ;
 h . I 3 5 7 G / L / Q / H / W / M / A / E / Y / P ;
 i . S 3 6 0 G / E / Y ;
 j . L 3 6 1 M / W / V / F ;
 k . I 3 6 3 V / A / R / M / W ;
 l . S 3 6 5 Q / W / M / A / G ;
 m . S 3 6 6 A / L ;
 n . Y 3 6 7 L / E / M / P / N / F ;
 o . P 3 6 8 G ; 10
 p . D 4 1 7 P ;
 q . E 4 7 5 D ;
 r . Y 4 7 6 V ;
 s . F 4 7 8 L ;
 t . K 5 1 8 Q ;
 u . H 5 2 7 W / R / L / Y / T / M ;
 v . T 5 2 9 M / F ;
 w . M 5 3 1 H / Y / A / K / R / W / T / L / V / G ;
 x . N 5 3 5 L / Y / M / K / I / R / W / Q ;
 y . P 5 4 2 E / S / G ; 20
 z . N 5 4 5 D / K / S / L / R / Q / W ;
 a a . Q 5 4 6 W / F ;
 b b . A 5 4 7 F / M / W / Y / V / S ;
 c c . L 5 4 9 H / Y / Q / G / R / K ;
 d d . I 5 5 0 A / W ;
 e e . I 5 5 0 T / G / F / S ;
 f f . N 5 5 2 L / M / T ;
 g g . G 5 5 3 S / T / E / Q / K / R / M ;
 h h . F 5 5 8 P / T ;
 i i . A 5 9 6 S ; 30
 j j . G 6 0 3 T / A / L ;
 k k . A 6 1 0 T / E ;
 l l . V 6 1 5 A / T ;
 m m . Y 6 2 2 A / M ;
 n n . C 6 2 3 G / S / Y / A / F ;
 o o . D 6 2 4 F / K ;
 p p . I 6 2 8 Y / V / F / L / M ;
 q q . Y 6 2 9 W / H / M / K ;
 r r . R 6 3 2 L / C ;
 s s . N 6 3 5 D ; 40
 t t . M 6 4 1 L / Y ;
 u u . A 6 4 3 L ;
 v v . I 6 4 4 H / M / Y ;
 w w . T 6 4 7 G / A / E / K / S / Y ;
 x x . I 6 4 8 K / R / V / N / T / L ;
 y y . T 6 5 1 Y / F / M ;
 z z . I 6 5 2 Q / G / S / N / F / T / A / L / E / K / M ;
 a a a . K 6 5 5 G / F / E / N / Q / M / A ;
 b b b . W 6 5 6 E ;
 c c c . D 6 5 7 R / P / A / E ; 50

d d d . V 6 5 8 L ;
 e e e . H 6 6 0 A / Y ;
 f f f . F 6 6 2 I / L ;
 g g g . L 6 9 0 M ;
 h h h . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L ;
 i i i . T 6 5 1 Y + N 5 3 5 L ;
 j j j . Y 3 4 2 L + E 4 7 5 D + F 4 7 8 L ;
 k k k . T 3 4 3 N + D 4 1 7 P + K 5 1 8 Q ;
 l l l . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y ;
 m m m . I 3 6 3 V + E 4 7 5 D + Y 4 7 6 V ; 10
 n n n . S 3 6 6 L + G 5 5 3 S + F 5 5 8 P ;
 o o o . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M ;
 p p p . S 3 6 6 A + P 5 4 2 E + N 5 4 5 K ;
 q q q . S 3 6 6 A + P 5 4 2 E + I 6 5 2 Q ;
 r r r . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + T 5 2 9 M ;
 s s s . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q ;
 t t t . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + N 5 4 5 K ;
 u u u . T 6 5 1 Y + P 5 4 2 E + N 5 4 5 K ;
 v v v . T 6 5 1 Y + P 5 4 2 E + Q 5 4 6 W ;
 w w w . T 6 5 1 Y + P 5 4 2 E + S 3 6 6 A ; 20
 x x x . T 6 5 1 Y + N 5 3 5 L + N 5 4 5 K ;
 y y y . S 3 6 6 A + N 5 3 5 I + I 6 5 2 Q ;
 z z z . T 6 5 1 Y + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 a a a a . T 6 4 7 G + A 5 4 7 F + Y 2 2 5 T ;
 b b b b . A 5 4 7 F + A 6 1 0 T + S 3 6 6 A ;
 c c c c . A 5 4 7 F + A 6 1 0 T + Y 2 2 5 I ;
 d d d d . S 3 6 6 A + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 e e e e . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 f f f f . T 6 4 7 E + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 g g g g . T 5 2 9 M + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ; 30
 h h h h . N 5 4 5 K + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 i i i i . T 6 4 7 G + A 5 4 7 F + T 5 2 9 M ;
 j j j j . T 5 2 9 M + A 6 1 0 T + A 5 4 7 F ;
 k k k k . M 6 4 1 Y + T 5 2 9 M + A 5 4 7 F ;
 l l l l . T 6 4 7 G + C 6 2 3 G + A 5 4 7 F ;
 m m m m . A 6 1 0 T + I 2 9 5 W + T 6 5 1 Y ;
 n n n n . V 6 1 5 A + M 5 3 1 Y + T 6 4 7 G ;
 o o o o . S 3 6 6 L + F 4 7 8 L + A 5 9 6 S + L 6 9 0 M ;
 p p p p . H 2 2 3 A + G 5 5 3 S + A 6 4 3 L + F 6 6 2 I ;
 q q q q . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 5 2 9 M ; 40
 r r r r . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + N 6 3 5 D ;
 s s s s . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q ;
 t t t t . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + T 5 2 9 M ;
 u u u u . S 3 6 6 A + S 3 6 5 A + P 3 6 8 G + G 6 0 3 T ;
 v v v v . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G ;
 w w w w . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + A 5 4 7 Y ;
 x x x x . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M + T 6 4 7 G ;
 y y y y . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 K ;
 z z z z . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R ;
 a a a a a . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 5 2 L ; 50

b b b b b . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + Y 6 2 9 W ;
 c c c c c . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 5 2 9 M ;
 d d d d d . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + N 6 3 5 D ;
 e e e e e . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q ;
 f f f f f . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + C 6 2 3 G ;
 g g g g g . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + I 6 2 8 Y ;
 h h h h h . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M + T 6 4 7 G + S 3 6 0 G ;
 i i i i i . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q + Y 2 2 5 I ;
 j j j j j . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + K 6 5 5 G ;
 k k k k k . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + L 5 4 9 Q ;
 l l l l l . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + A 5 4 7 Y + K 6 5 5 G ;
 m m m m m . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 6 2 9 W ;
 n n n n n . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L ;
 o o o o o . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 F ;
 p p p p p . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + K 6 5 5 F ;
 q q q q q . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + N 5 5 2 L ;
 r r r r r . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + M 5 3 1 A ;
 s s s s s . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + G 5 3 9 Y ;
 t t t t t . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + V 6 5 8 L ;
 u u u u u . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5
 7 R ;
 v v v v v . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + N 5 5
 2 L ;
 w w w w w . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + I 6 5
 2 G ;
 x x x x x . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + I 6 5
 2 Q ;
 y y y y y . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + N 5 5
 2 M
 z z z z z . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5
 7 R + N 2 2 4 R ;
 a a a a a . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6
 5 7 R + I 6 2 8 M ;
 b b b b b . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6
 5 7 R + K 6 5 5 A ; および
 c c c c c . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6
 5 7 R + Y 6 2 9 W
 から選択される。一実施形態においては、変化した特性は酵素活性である。一実施形態に
 においては、変化した特性は忠実度である。一実施形態においては、変化した特性は処理能
 力である。一実施形態においては、変化した特性は伸長速度である。一実施形態において
 は、変化した特性は安定性である。一実施形態においては、変化した特性は溶解性である
 。一実施形態においては、変化した特性は、ヌクレオチドポリリン酸に結合する能力、お
 よび / またはヌクレオチドポリリン酸を組み込む能力である。ヌクレオチドポリリン酸は
 、例えばヌクレオチド四リン酸、ヌクレオチド五リン酸、ヌクレオチド六リン酸、ヌクレ
 オチド七リン酸、またはヌクレオチド八リン酸である。
 【 0 0 1 2 】
 [0013] 一部の実施形態においては、N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + N 6 3 5 D
 変異を有する配列番号 2、または配列番号 1 もしくは 2 と比較して変化した酵素活性を有
 するバリエーションポリメラーゼは、
 a . A 5 4 7 F + A 6 1 0 T + Y 2 2 5 I ;

10

20

30

40

50

b . Y 2 2 5 T + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 c . S 3 6 6 A + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 d . S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + A 6 1 0 T ;
 e . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 f . T 5 2 9 M + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 g . T 5 2 9 M + A 6 1 0 T + A 5 4 7 F ;
 h . N 5 4 5 K + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 i . N 5 4 5 K + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 j . A 6 1 0 T + I 2 9 5 W + T 6 5 1 Y ;
 k . V 6 1 5 A + M 5 3 1 Y + T 6 4 7 G ;
 l . M 6 4 1 Y + T 5 2 9 M + A 5 4 7 F ;
 m . T 6 4 7 E + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 n . T 6 4 7 G + A 5 4 7 F + T 5 2 9 M ;
 o . T 6 4 7 G + C 6 2 3 G + A 5 4 7 F ; および
 p . T 6 5 1 Y + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F 。

10

から選択される。

【 0 0 1 3 】

[0014] 一部の実施形態においては、バリエーションポリメラーゼは、

a . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y ;
 b . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q ;
 c . S 3 6 6 A + T 5 2 9 M + N 5 3 5 L ;
 d . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + N 5 4 5 K ;
 e . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M ;
 f . S 3 6 6 A + P 5 4 2 E + I 6 5 2 Q ;
 g . S 3 6 6 A + P 5 4 2 E + N 5 4 5 K ;
 h . S 3 6 6 A + P 5 4 2 E + T 6 5 1 Y ;
 i . P 5 4 2 E + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y ;
 j . P 5 4 2 E + Q 5 4 6 W + T 6 5 1 Y ;
 k . N 5 3 5 L + T 6 5 1 Y ;
 l . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L ;
 m . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 5 2 9 M ;
 n . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + N 6 3 5 D ;
 o . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q ;
 p . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + T 5 2 9 M ;
 q . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G ;
 r . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + A 5 4 7 Y ;
 s . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M + T 6 4 7 G ;
 t . S 3 6 6 A + N 5 3 5 I + I 6 5 2 Q ;
 u . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 5 2 9 M ;
 v . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + N 6 3 5 D ;
 w . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q ;
 x . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + C 6 2 3 G ;
 y . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + I 6 2 8 Y ;
 z . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + A 5 4 7 M + T 6 4 7 G + S 3 6 0 G ;
 a a . N 5 3 5 I + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + I 6 5 2 Q + Y 2 2 5 I ;
 b b . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + K 6 5 5 G ;
 c c . N 5 3 5 L + N 5 4 5 K + T 6 5 1 Y + T 6 4 7 G + L 5 4 9 Q ;
 d d . S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q + A 5 4 7 Y + K 6 5 5 G ;
 e e . T 6 4 7 G + A 5 4 7 F + Y 2 2 5 T ;
 f f . A 5 4 7 F + A 6 1 0 T + S 3 6 6 A ;

20

30

40

50

g g . A 5 4 7 F + A 6 1 0 T + Y 2 2 5 I ;
 h h . S 3 6 6 A + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 i i . T 6 5 1 Y + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 j j . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 k k . T 6 4 7 E + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 l l . T 5 2 9 M + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 m m . N 5 4 5 K + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F ;
 n n . T 6 4 7 G + A 5 4 7 F + T 5 2 9 M ;
 o o . N 5 4 5 K + T 6 4 7 G + A 5 4 7 F ;
 p p . T 5 2 9 M + A 6 1 0 T + A 5 4 7 F ; 10
 q q . M 6 4 1 Y + T 5 2 9 M + A 5 4 7 F ;
 r r . T 6 4 7 G + C 6 2 3 G + A 5 4 7 F ;
 s s . A 6 1 0 T + I 2 9 5 W + T 6 5 1 Y ;
 t t . V 6 1 5 A + M 5 3 1 Y + T 6 4 7 G ;
 u u . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 K ;
 v v . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R ;
 w w . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 5 2 L ;
 x x . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + Y 6 2 9 W ;
 y y . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 6 2 9 W ;
 z z . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L ; 20
 a a a . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 F ;
 b b b . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + K 6 5 5 F ;
 c c c . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + N 5 5 2 L ;
 d d d . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + M 5 3 1 A ;
 e e e . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + G 5 3 9 Y ;
 f f f . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R + V 6 5 8 L ;
 g g g . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R
 ;
 h h h . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + N 5 5 2 L 30
 ;
 i i i . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + I 6 5 2 G
 ;
 j j j . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + I 6 5 2 Q
 ;
 k k k . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + N 5 5 2 M
 l l l . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R
 + N 2 2 4 R ;
 m m m . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R
 + I 6 2 8 M ;
 n n n . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R 40
 + K 6 5 5 A ; および
 o o o . T 5 2 9 M + S 3 6 6 A + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L + Y 2 2 5 L + D 6 5 7 R
 + Y 6 2 9 W

から選択される。一部の実施形態においては、バリエーションポリメラーゼは、配列番号 1 もしくは 2、または親ポリメラーゼと比較して変化した酵素活性を有する。

【0014】

[0015] 一部の実施形態においては、S 3 6 6 A + T 5 2 9 M + N 5 4 5 L + A 5 4 7 F 変異を有する配列番号 2、または配列番号 1 もしくは 2 と比較して変化した酵素活性を有するバリエーションポリメラーゼは、

a . Y 2 2 5 L / F / A / M ;

b . M 5 3 1 A / G ;
 c . G 5 3 9 Y ;
 d . N 5 5 2 L / T ;
 e . Y 6 2 9 W / K ;
 f . K 6 5 5 F

から選択される。一実施形態においては、変化した特性は酵素活性である。一実施形態においては、変化した特性は忠実度である。一実施形態においては、変化した特性は処理能力である。一実施形態においては、変化した特性は伸長速度である。一実施形態においては、変化した特性は安定性である。一実施形態においては、変化した特性は溶解性である。一実施形態においては、変化した特性は、ヌクレオチドポリリン酸に結合する能力、および/またはヌクレオチドポリリン酸を組み込む能力である。ヌクレオチドポリリン酸は、例えばヌクレオチド四リン酸、ヌクレオチド五リン酸、ヌクレオチド六リン酸、ヌクレオチド七リン酸、またはヌクレオチド八リン酸である。

【 0 0 1 5 】

[0016] 一部の実施形態においては、親ポリメラーゼは野生型 P o l 6 (配列番号 1) である。一部の実施形態においては、親ポリメラーゼは、H i s タグを含む P o l 6 (配列番号 2) である。一部の実施形態においては、親ポリメラーゼは、S 3 6 6 A + T 5 2 9 M + A 5 4 7 F + N 5 4 5 L / R 変異を含む。一部の実施形態においては、親ポリメラーゼは、1 つまたは複数の変異を含む配列番号 1 としてもよい。例えば、S 3 6 6 A + T 5 2 9 M + A 5 4 7 F + N 5 4 5 R は、S 3 6 6 A + T 5 2 9 M + A 5 4 7 F を親ポリメラーゼとして使用し、その後 N 5 4 5 R を加えたものである。

【 0 0 1 6 】

[0017] 一部の実施形態においては、改変ポリメラーゼは、親ポリメラーゼよりも大きい $k_{c h e m}$ を有する。一部の実施形態においては、改変ポリメラーゼは、親ポリメラーゼよりも小さい $k_{o f f}$ を有する。一部の実施形態においては、改変ポリメラーゼは、親ポリメラーゼよりも少なくとも 1 . 5 倍、2 . 0 倍、または 2 . 5 倍大きい $k_{c h e m} / k_{o f f}$ (すなわち、比) を有する。

【 0 0 1 7 】

[0018] 本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体例は本発明の好ましい実施形態を示すが、この詳細な説明から本発明の範囲および趣旨内の様々な変化および改変が当業者に明らかになるので、詳細な説明および具体例は単に説明として提供するものであることを理解するべきである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 [0019] 置換アッセイにおいて使用する例示的な鑄型を示す図である。実施例 3 に関するものである。

【 図 2 】 [0020] 本明細書においてポリリン酸の組み込み速度の測定に使用する $k_{c h e m}$ アッセイの模式図である。実施例 6 に関するものである。

【 図 3 】 [0021] 本明細書においてバリエーションポリメラーゼの速度特性の測定に使用する、蛍光消光に基づく $k_{o f f}$ アッセイの概要を示す図である。実施例 4 に関するものである。

【 図 4 】 [0022] 蛍光偏光に基づく $k_{o f f}$ アッセイの図示、および例示的なデータトレースを示す図である。実施例 5 に関するものである。

【 図 5 】 [0023] 置換アッセイからのバリエーションポリメラーゼの代表的なデータを示すグラフである。実施例 3 に関するものである。

【 図 6 】 [0024] 蛍光偏光に基づく $k_{o f f}$ アッセイからの、2 種のバリエーションポリメラーゼの代表的なデータのグラフである。実施例 5 に関するものである。

【 図 7 】 [0025] 二重層の上下の H e p e s 7 . 5 2 0 m M 、 N a C l 3 0 0 m M 、 C a C l 2 3 m M 、および T C E P 5 m M における、アルファ溶血素ナノボアに連結した P

10

20

30

40

50

o 1 6 (S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q) - D N A 複合体による、100 mVでのタグ付きチミンヌクレオチドの静的捕獲のトレースを示す図である。縦軸は、% 開口チャネル電流 (正規化) であり、横軸は秒単位の時間である。実施例 8 に関するものである。

【図 8】[0026]二重層の上下の H e p e s p H 7 . 5 2 0 m M 、 N a C l 3 0 0 m M 、 C a C l 2 3 m M 、および T C E P 5 m M における、アルファ溶血素ナノボアに連結した P o 1 6 (S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q) - D N A 複合体を用いた、100 mVでの静的捕獲実験の滞留時間対電流のプロットのグラフである。d T N P タグ付きヌクレオチドの各捕獲の平均滞留時間は、1 . 2 秒である。実施例 8 に関するものである。

【図 9】[0027]蛍光消光に基づく $k_{c h e m}$ アッセイ (図 2 を参照のこと) からの、バリアントポリメラーゼの代表的なデータのグラフである。あらかじめ形成させたポリメラーゼとフルオレセイン - D N A 鑄型の二元複合体を、 Mg^{2+} の存在下で、K i n t e k ストップフローデバイスを使用して、飽和濃度の d C n P - A l e x a 5 5 5 と急速に混合する。フルオレセインの蛍光をある時間にわたってモニターする。律速段階から見積もった $k_{c h e m}$ は $0 . 2 s^{-1}$ である。x 軸は秒単位の時間 (T) であり、y 軸は相対蛍光単位 (R F U) である。

【図 10】[0028]蛍光消光に基づく k_{off} アッセイ (図 3 を参照のこと) からの、バリアントポリメラーゼの代表的なデータのグラフである。ポリメラーゼ、フルオレセイン - D N A 鑄型、および d C n P - A l e x a 5 5 5 のあらかじめ形成した三元複合体を、 Ca^{2+} 存在下でブレインキュベートし、過剰な未変性 d C T P を用いて追跡した。フルオレセインの蛍光をある時間にわたってモニターした。これより測定した k_{off} は $0 . 0 2 8 s^{-1}$ である。x 軸は秒単位の時間 (T) であり、y 軸は相対蛍光単位 (R F U) である。

【図 11】[0029]ローリングサークルアッセイの増副産物を示すゲルの写真である。左端および右端のレーンは分子ラダーである。左から 2 番目のレーンはゼロ時点のものである。他の全てのレーンは、様々なポリメラーゼヒットの 40 分時点のものである。実施例 9 に関するものである。

【図 12】[0030]成長している D N A 鎖にタグ付きヌクレオチドが組み込まれたときのタグ付きヌクレオチドの記録を与える電流変化を示すシーケンシングトレースを示す図である。鑄型 D N A 配列、および、 $> 70\%$ の精度を示す新生鎖の召集配列も示されている (登場順に、それぞれ配列番号 6 ~ 8) 。実施例 10 に関するものである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

[0031]これより、以下の定義および例を使用して、単なる参照として本発明を詳細に説明する。本明細書において参照するあらゆる特許および刊行物は、このような特許および刊行物で開示されているあらゆる配列を含めて、参照によって本明細書に明示的に組み入れられる。

【0020】

[0032]本明細書において別段の定めがない限り、本明細書中で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。S i n g l e t o n ら、D I C T I O N A R Y O F M I C R O B I O L O G Y A N D M O L E C U L A R B I O L O G Y 、第 2 版、J o h n W i l e y a n d S o n s 、N e w Y o r k (1 9 9 4) 、および H a l l e & M a r h a m 、T H E H A R P E R C O L L I N S D I C T I O N A R Y O F B I O L O G Y 、H a r p e r P e r e n n i a l 、N Y (1 9 9 1) により、本発明で使用する用語の多くの一般的な辞書が当業者に与えられる。本明細書において説明する方法および材料と類似または等価である任意の方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料を説明する。当技術分野の定義および用語について、S a m b r o o k ら、1 9 8 9 年、および A u s u b e l F M ら、1 9 9 3 年が実施者らに特に向くものである。方法、プロトコールおよび試薬は様々であり得るので、本発明は、記載する特定の方法、プロトコールおよび試薬に限定されないこと

10

20

30

40

50

を理解するべきである。

【0021】

[0033]数の範囲は、範囲を定める数を含める。約という用語は、本明細書においては、値のプラスまたはマイナス10パーセント(10%)を意味するよう使用する。例えば「約100」は、90~110の間の任意の数を指す。

【0022】

[0034]別段に示されていない限り、核酸は5'~3'の方向でそれぞれ左から右に書き、アミノ酸配列はアミノからカルボキシの方向でそれぞれ左から右に書く。

[0035]本明細書において示している見出しは、本発明の様々な態様または実施形態を限定するものではなく、本発明は、明細書を全体として参照によって理解され得る。したがって、直下で定義する用語は、明細書を全体として参照によってより十分に定義される。定義：

[0036]アミノ酸：本明細書において使用する場合、「アミノ酸」という用語は、広義には、ポリペプチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物および/または物質を指す。一部の実施形態においては、アミノ酸は、一般構造 $H_2N-C(H)(R)-COOH$ を有する。一部の実施形態においては、アミノ酸は、天然由来のアミノ酸である。一部の実施形態においては、アミノ酸は合成アミノ酸であり、一部の実施形態においては、アミノ酸はD-アミノ酸であり、一部の実施形態においては、アミノ酸はL-アミノ酸である。「標準アミノ酸」は、天然由来のペプチドにおいて一般に見出される20種の標準的なL-アミノ酸のいずれかを指す。「非標準アミノ酸」は、合成により調製されるものであるか天然源から得られるものであるかにかかわらず、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す。本明細書において使用する場合、「合成アミノ酸」は化学修飾アミノ酸を包含し、化学修飾アミノ酸としては、塩、アミノ酸誘導体(アミドなど)、および/または置換体が含まれるが、これらに限定されない。ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸および/またはアミノ末端アミノ酸を含めたアミノ酸は、それらの活性に悪影響を及ぼすことなく、メチル化、アミド化、アセチル化、および/または、他の化学物質での置換によって修飾することができる。アミノ酸は、ジスルフィド結合に関与することができる。「アミノ酸」という用語は、「アミノ酸残基」と互換的に使用され、遊離アミノ酸、および/またはペプチドのアミノ酸残基を指すことができる。その用語が遊離アミノ酸、またはペプチドの残基のいずれを指すかは、その用語が使用される文脈から明らかになる。本明細書においては、全てのアミノ酸残基配列は、左右の方向が、アミノ末端からカルボキシ末端への従来の方向になっている式によって示していることに留意するべきである。

【0023】

[0037]塩基対(bp)：本明細書において使用する場合、塩基対は、2本鎖DNA分子におけるアデニン(A)とチミン(T)、またはシトシン(C)とグアニン(G)との結び付きを指す。

【0024】

[0038]相補的：本明細書において使用する場合、「相補的」という用語は、塩基対形成による2本のポリヌクレオチド鎖の領域間、または2つのヌクレオチド間の配列相補性の広範な概念を指す。アデニンヌクレオチドが、チミンまたはウラシルであるヌクレオチドと特異的な水素結合を形成(「塩基対形成」)することができることは公知である。同様に、シトシンヌクレオチドがグアニンヌクレオチドと塩基対形成することができることは公知である。

【0025】

[0039]DNA結合親和性：本明細書において使用する場合、「DNA結合親和性」という用語は、典型的には、DNA核酸に結合することにおけるDNAポリメラーゼの活性を指す。一部の実施形態においては、DNA結合活性は、2バンドシフトアッセイにおいて測定することができる。例えば、Sambrookら(2001)Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY)の9.63~9.7

5 (核酸の末端標識について記載)を参照のこと。結合バッファー(リン酸ナトリウムバッファー(pH 8.0) 50 mM、グリセロール10%、KCl 25 mM、MgCl₂ 25 mM)約10 µl中に少なくとも約0.5 µgのポリペプチドを含有する反応混合物を調製する。反応混合物を10分間、37 に加熱する。標識した2本鎖核酸約1 × 10⁴ ~ 5 × 10⁴ cpm(または約0.5 ~ 2 ng)を反応混合物に加え、さらに10分間インキュベートする。反応混合物を、0.5倍トリスホウ酸バッファー中の未変性ポリアクリルアミドゲルに載せる。反応混合物を室温で電気泳動に付す。ゲルを乾燥させ、標準的な方法を使用してオートラジオグラフィーに付す。標識した2本鎖核酸の移動度において検出可能な減少がある場合は、ポリペプチドと2本鎖核酸の間に結合複合体が形成していることを示す。このような核酸結合活性は、標準的な濃度測定法を使用して、最初の反応混合物における放射能の総量と比較した結合複合体における放射能の量を測定することにより、定量することができる。DNA結合親和性を測定する他の方法は、当技術分野において公知である(例えば、Kongら(1993) J. Biol. Chem. 268(3): 1965 ~ 1975を参照のこと)。

【0026】

[0040]伸長速度:本明細書において使用する場合、「伸長速度」という用語は、DNAポリメラーゼがポリマー鎖を伸ばす平均速度を指す。本明細書において使用する場合、高伸長速度は、2 nt/sより大きい(例えば、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140 nt/sより大きい)伸長速度を指す。本出願において使用する場合、「伸長速度」、「延長速度」、および「組み込み速度」という用語は互換的に使用する。

【0027】

[0041]酵素活性:本明細書において使用する場合、「酵素活性」という用語は、DNAポリメラーゼの特異性および効率を指す。DNAポリメラーゼの酵素活性は「ポリメラーゼ活性」とも呼ばれ、典型的には、ポリヌクレオチドの鋳型特異的合成を触媒することにおけるDNAポリメラーゼの活性を指す。ポリメラーゼの酵素活性は、当技術分野で公知の様々な技術および方法を用いて測定することができる。例えば、ポリメラーゼの段階希釈物を、希釈バッファー(例えば、Tris.Cl、pH 8.0 20 mM、KCl 50 mM、NP40 0.5%、およびTween-20 0.5%)中で調製することができる。各希釈物について5 µlを取り出し、TAPS(pH 9.25) 25 mM、KCl 50 mM、MgCl₂ 2 mM、dATP 0.2 mM、dGTP 0.2 mM、dTTP 0.2 mM、dCTP 0.1 mM、活性化DNA 12.5 µg、[⁻³²P]dCTP(0.05 µCi/nmol) 100 µM、および滅菌脱イオン水を含有する反応混合物45 µlに加えることができる。反応混合物を37 (または、熱安定性DNAポリメラーゼでは74)で10分間インキュベートし、次いで反応物を4 に急冷して、氷冷した60 mM EDTA 10 µlを加えることによって停止させることができる。各反応混合物からアリコート25 µlを取り出すことができる。組み込まれなかった放射能標識dCTPを、ゲルろ過(Centri-Sep、Princeton Separations、Adelphia、N.J.)によって各アリコートから取り出すことができる。カラム溶離液を、シンチレーション液(1 ml)と混合することができる。シンチレーションカウンターを用いてカラム溶離液中の放射能を定量化して、ポリメラーゼによって合成された産物の量を決定する。ポリメラーゼ活性の1単位は、30分間に10 nモルの産物を合成するために必要なポリメラーゼの量として定義することができる(Lawyerら(1989) J. Biol. Chem. 264: 6427 ~ 647)。ポリメラーゼ活性を測定する他の方法は、当技術分野で公知である(例えば、Sambrookら(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY)を参照のこと)。

【0028】

[0042]精製された：本明細書において使用する場合、「精製された」は、分子が、含有されている試料の少なくとも90重量%、または少なくとも95重量%、または少なくとも98重量%の濃度で試料中に存在することを意味する。

【0029】

[0043]単離された：「単離された」分子は、通常、例えば分子の自然環境で会合している少なくとも1種の他の分子から分離されている核酸分子である。単離された核酸分子としては、その核酸分子を通常発現する細胞に含有された核酸分子が挙げられるが、その核酸分子は、染色体外、またはその自然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0030】

[0044]相同性%：本明細書においては、「相同性%」という用語は、本明細書の「同一性%」という用語と互換的に使用し、本発明のポリペプチドのいずれか1つをコードする核酸配列、または本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の間での、配列アライメントプログラムを使用して整列させた場合の核酸またはアミノ酸配列の同一性のレベルを指す。

【0031】

[0045]例えば、本明細書において使用する場合、相同性80%は、定義済みのアルゴリズムによって決定される配列同一性80%と同じことを意味し、したがって所与の配列の相同体は、所与の配列ある長さにわたって80%超の配列同一性を有する。配列同一性の例示的なレベルとしては、所与の配列、例えば本明細書に記載する本発明のポリペプチドのいずれか1つのコード配列との80、85、90、95、98%以上の配列同一性が挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】

[0046]2つの配列間の同一性を決定するのに使用することができる例示的なコンピュータプログラムとしては、インターネット上で公開されている一連のBLASTプログラム、例えば、BLASTN、BLASTX、およびTBLASTX、BLASTP、およびTBLASTNが挙げられるが、これらに限定されない。Altschulら、1990年、およびAltschulら、1997年、も参照のこと。

【0033】

[0047]配列検索は、GenBankのDNA配列および他の公開データベースの核酸配列と比較して所与の核酸配列を評価する場合には、典型的にはBLASTNプログラムを使用して行う。BLASTXプログラムは、GenBankのタンパク質配列および他の公開データベースのアミノ酸配列に対して、全ての読み枠で翻訳されている核酸配列を検索することに好ましい。BLASTNとBLASTXの両方は、11.0のオープンギャップペナルティー、および1.0のエクステンディッドギャップペナルティーのデフォルトパラメーターを使用し、BLOSUM-62マトリックスを利用して走らせる。（例えば、Altschul, S.F.ら、Nucleic Acids Res. 25:3389~3402、1997年を参照のこと。）

【0034】

[0048]2つ以上の配列間での「同一性%」を決定するための、選択された配列の好ましいアライメントは、例えば、MacVectorバージョン13.0.7のCLUSTAL-Wプログラムを使用し、10.0のオープンギャップペナルティー、0.1のエクステンディッドギャップペナルティーを含むデフォルトパラメーター、およびBLOSUM30類似度マトリックスを用いて動作させて行う。

【0034】

[0049]改変DNAポリメラーゼ：本明細書において使用する場合、「改変DNAポリメラーゼ」という用語は、別の（すなわち、親）DNAポリメラーゼから生じ、親DNAポリメラーゼと比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化（例えば、アミノ酸の置換、欠失または挿入）を含有するDNAポリメラーゼを指す。一部の実施形態においては、本発明の改変DNAポリメラーゼは、天然由来のDNAポリメラーゼ、または野生型DNAポリメラーゼから生じるか、またはそれから改変されている。一部の実施形態においては、本発明の改変DNAポリメラーゼは、組換えDNAポリメラーゼまたは操作されたDNAポリメラーゼから生じるか、またはそれから改変されている。組換えDNAポリメラーゼま

たは操作されたDNAポリメラーゼとしては、キメラDNAポリメラーゼ、融合DNAポリメラーゼ、または別の改変DNAポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。典型的には、改変DNAポリメラーゼは、親ポリメラーゼと比較して変更された表現型を少なくとも1つ有する。

【0035】

[0050]変異：本明細書において使用する場合、「変異」という用語は、親配列に導入された変更を指し、その変更としては、置換、挿入、欠失（切り詰めを含める）が挙げられるが、これらに限定されない。変異の結果としては、親配列によってコードされるタンパク質では見出されない新しい特性、特質、機能、表現型、または形質の創造が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0036】

[0051]変異体：本明細書において使用する場合、「変異体」という用語は、親タンパク質と比較した場合に変化した特性を示す改変タンパク質を指す。「バリエーション」および「変異体」という用語は、本明細書において互換的に使用する。

【0037】

[0052]野生型：本明細書において使用する場合、「野生型」という用語は、天然由来の供給源から単離された際に、その遺伝子または遺伝子産物の特性を有する遺伝子または遺伝子産物を指す。

【0038】

[0053]忠実度：本明細書において使用する場合、「忠実度」という用語は、鋳型依存性DNAポリメラーゼによるDNA重合の精度、または、鋳型DNAに結合している誤ったヌクレオチドに対する正しいヌクレオチドの k_{off} の測定差異のいずれかを指す。DNAポリメラーゼの忠実度は、典型的には、エラー率（不正確なヌクレオチド、すなわち、鋳型依存的な方式で組み込まれていないヌクレオチドを組み込む頻度）によって測定する。DNA重合の精度または忠実度は、DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性と3' - 5'エキソヌクレアーゼ活性の両方によって維持される。「高忠実度」という用語は、 4.5×10^{-6} 変異/nt/倍加未満（例えば、 4.0×10^{-6} 、 3.5×10^{-6} 、 3.0×10^{-6} 、 2.5×10^{-6} 、 2.0×10^{-6} 、 1.5×10^{-6} 、 1.0×10^{-6} 、 0.5×10^{-6} 変異/nt/倍加未満）のエラー率を指す。DNAポリメラーゼの忠実度またはエラー率は、当技術分野で公知のアッセイを使用して測定することができる。例えば、DNAポリメラーゼのエラー率は、本明細書に記載するように試験するか、またはJohnsonら、Biochim Biophys Acta、2010年5月；1804（5）：1041～1048において記載されているように試験することができる。

20

30

【0039】

[0054]ナノポア：本明細書において使用する場合、「ナノポア」という用語は概して、膜に形成された、または他の方法で膜に与えられた細孔、チャネル、または通路を指す。膜は、脂質二重層などの有機膜であっても、ポリマー材料で形成された膜などの合成膜であってもよい。膜はポリマー材料としてもよい。ナノポアは、例えば相補型金属酸化膜半導体（CMOS）回路または電界効果トランジスター（FET）回路などの検出回路、または検出回路に連結された電極に隣接して、またはその近傍に配置してもよい。一部の例においては、ナノポアは、0.1ナノメートル（nm）～約1000nmの桁の特徴的な幅または直径を有する。一部のナノポアはタンパク質である。アルファ溶血素、MspAは、タンパク質ナノポアの例である。

40

【0040】

[0055]ヌクレオチド：本明細書において使用する場合、DNAまたはRNAの単量体ユニットは、糖部分（ペントース）、リン酸、および窒素含有複素環塩基からなる。塩基はグリコシドの炭素（ペントースの1'炭素）を介して糖部分に連結され、その塩基と糖の組合せがヌクレオシドである。ヌクレオシドが、ペントースの3'位または5'位に結合したリン酸基を含有する場合、それはヌクレオチドと呼ばれる。作用的に連結されたヌク

50

レオチドの配列は、本明細書においては典型的に「塩基配列」または「ヌクレオチド配列」と呼び、本明細書においては、左から右への方向が、5'末端から3'末端への従来の方向になっている式によって表す。本明細書において使用する場合、「改変ヌクレオチド」は、ヌクレオチドポリリン酸、例えば、ヌクレオチド3、4、5、6、7、または8リン酸を指す。

【0041】

[0056]オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド：本明細書において使用する場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、2つ以上、好ましくは3つ超のデオキシリボヌクレオチドおよび/またはリボヌクレオチドを含む分子として定義される。その正確なサイズは多くの因子に依存し、その因子はさらにはオリゴヌクレオチドの最終的な機能または用途に依存することになる。オリゴヌクレオチドは、合成によって、またはクローニングによって得ることができる。本明細書において使用する場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、鎖内で共有結合したヌクレオチド単量体で構成されたポリマー分子を指す。DNA（デオキシリボ核酸）およびRNA（リボ核酸）は、ポリヌクレオチドの例である。

10

【0042】

[0057]ポリメラーゼ：本明細書において使用する場合、「ポリメラーゼ」は、ヌクレオチドの重合を触媒する（すなわち、ポリメラーゼ活性）酵素を指す。通常、その酵素は、ポリヌクレオチドの鋳型配列にアニーリングしたプライマーの3'末端で合成を開始し、鋳型鎖の5'末端へ進行することになる。「DNAポリメラーゼ」は、デオキシヌクレオチドの重合を触媒する。

20

【0043】

[0058]プライマー：本明細書において使用する場合、「プライマー」という用語は、核酸鎖に相補的なプライマー延長産物の合成が誘導される条件下に置かれた場合、例えば、好適な温度における適切なバッファー（「バッファー」は、pH、イオン強度、補助因子などを含む）中の4種の異なるヌクレオチド三リン酸および熱安定性酵素の存在下で、核酸合成の開始点の役割を果たすことができる、天然に存在しているものであっても合成によって生成されたものであってもよいオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、増幅効率を最大にするために1本鎖であることが好ましいが、代替的に2本鎖であってもよい。2本鎖の場合、プライマーは、まず、その鎖が分離するように処理し、その後、延長産物の調製に使用する。プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドであることが好ましい。プライマーは、熱安定性酵素の存在下での延長産物の合成の出発物質となるのに十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源、および方法の用途を含めた多くの因子に依存することになる。例えば、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは典型的には15~25ヌクレオチドを含有するが、それよりも多いか、または少ないヌクレオチドを含有することができる。短いプライマー分子は概して、鋳型と十分に安定なハイブリッド複合体を形成するにはより低い温度を必要とする。

30

【0044】

[0059]処理能力：本明細書において使用する場合、「処理能力」は、鋳型に付いてとどまり、複数の改変反応を行うポリメラーゼの能力を指す。「改変反応」としては、重合、およびエキソヌクレアーゼ的切断が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態においては、「処理能力」は、成長しているDNA鎖から酵素が途中で解離することなく一連の重合工程を行うDNAポリメラーゼの能力を指す。典型的には、DNAポリメラーゼの「処理能力」は、成長しているDNA鎖からDNAポリメラーゼが途中で解離することなく重合または改変されるヌクレオチドの長さ（例えば、20nt、300nt、0.5~1kb以上）によって測定する。「処理能力」は、ポリメラーゼの性質、DNA鋳型の配列、および反応条件、例えば、塩濃度、温度、または特定のタンパク質の存在に依存し得る。本明細書において使用する場合、「高処理能力」という用語は、鋳型との1会合/解離当たり20nt超（例えば、40nt超、60nt超、80nt超、100nt超、120nt超、140nt超、160nt超、180nt超、200nt超、220

40

50

nt 超、240 nt、260 nt 超、280 nt 超、300 nt 超、320 nt 超、340 nt 超、360 nt 超、380 nt 超、400 nt 超、またはそれ以上)の処理能力を指す。処理能力は、本明細書および WO 01/92501 A1 (MJ Bioworks, Inc., Improved Nucleic Acid Modifying Enzymes, 2001 年 12 月 06 日公開)において定義された方法に従って測定することができる。

【0045】

[0060]合成：本明細書において使用する場合、「合成」という用語は、鋳型依存的な方式で、新しいポリヌクレオチド鎖を作製するか、または現存するポリヌクレオチド(すなわち、DNA または RNA)を伸長する任意のインビトロ方法を指す。本発明による合成には、ポリメラーゼを使用してポリヌクレオチド鋳型配列の複製物の数を増加させる増幅が含まれる。ポリヌクレオチドの合成(例えば、増幅)の結果、ヌクレオチドがポリヌクレオチド(すなわちプライマー)に組み込まれ、それによってポリヌクレオチド鋳型に相補的な新しいポリヌクレオチド分子が形成される。形成されたポリヌクレオチド分子およびその鋳型は、さらなるポリヌクレオチド分子を合成するための鋳型として使用することができる。本明細書において使用する場合、「DNA 合成」には、PCR、ポリヌクレオチドの標識(すなわち、プローブおよびオリゴヌクレオチドプライマーに対して)、ポリヌクレオチドシーケンシングが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0046】

[0061]鋳型 DNA 分子：本明細書において使用する場合、「鋳型 DNA 分子」という用語は、例えばプライマー延長反応において、DNA ポリメラーゼによって相補的な核酸鎖が合成される核酸鎖を指す。

20

【0047】

[0062]鋳型依存的な方式：本明細書において使用する場合、「鋳型依存的な方式」という用語は、鋳型依存的なプライマー分子の延長(例えば、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成)を含むプロセスを指す。「鋳型依存的な方式」という用語は、典型的には、新たに合成されるポリヌクレオチド鎖の配列が、相補的な塩基対形成の周知の規則によって規定される、RNA または DNA のポリヌクレオチドの合成を指す(例えば、Watson, J. D. ら、Molecular Biology of the Gene、第 4 版、W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. (1987)を参照のこと)。

30

【0048】

[0063]タグ：本明細書において使用する場合、「タグ」という用語は、原子もしくは分子、または、原子もしくは分子の集団としてもよい検出可能な部分を指す。タグは、光学的、電気化学的、磁氣的、または静電的(例えば、誘導的、容量的)性状を示すことができ、その性質は、ナノポアを利用して検出することができる。

【0049】

[0064]タグ付きヌクレオチド：本明細書において使用する場合、「タグ付きヌクレオチド」という用語は、タグが付けられたヌクレオチドまたは改変ヌクレオチドを指す。タグは、糖、リン酸(もしくはポリリン酸)、または塩基に共有結合で付けてもよい。タグは、末端リン酸上にあってもよい。

40

【0050】

[0065]ベクター：本明細書において使用する場合、「ベクター」という用語は、異なる宿主細胞間の移動用に設計された核酸構造物を指す。「発現ベクター」は、外来性細胞において異種 DNA 断片を組み込んで発現する能力を有するベクターを指す。多くの原核生物発現ベクターおよび真核生物発現ベクターが市販されている。適切な発現ベクターの選択は、当業者に知られている。

【0051】

[0066]本明細書において示すポリメラーゼバリエーションは、WO 2013/188841 (Genia Technologies, Inc., Chip Set-Up and

50

High - Accuracy Nucleic Acid Sequencing、2013年12月19日公開)において記載されている、チップを用いたポリヌクレオチドシーケンシングに有用である。

【0052】

[0067] DNAのシーケンシングに用いられるポリメラーゼの望ましい特性は、以下のとおりである。

- a. 遅い k_{off} (改変ヌクレオチドに対して)
- b. 速い k_{on} (改変ヌクレオチドに対して)
- c. 高忠実度
- d. 低エキソヌクレアーゼ活性
- e. DNA鎖置換
- f. より速い k_{chem} (改変ヌクレオチド基質に対して)
- g. 向上した安定性
- h. 処理能力
- i. 塩耐性
- j. ナノポアへの取付けの適合性
- k. 4、5、6、7、または8個のリン酸を有するヌクレオチドポリリン酸、例えばヌクレオチド四リン酸、ヌクレオチド五リン酸、ヌクレオチド六リン酸、ヌクレオチド七リン酸、またはヌクレオチド八リン酸を組み込む能力
- l. シーケンシング精度
- m. 長いリード長、すなわち長時間連続性解読。

10

20

命名法

[0068] 本明細書および特許請求の範囲において、アミノ酸残基の従来の1文字表記および3文字表記を使用する。

【0053】

[0069] 参照を容易にするため、本出願のポリメラーゼバリエントは、以下の命名法を使用して記載する。

[0070] 元のアミノ酸 (1つまたは複数) : 位置 (1つまたは複数) : 置換したアミノ酸 (1つまたは複数)。この命名法によれば、例えば、位置242におけるセリンのアラニンによる置換は、

30

Ser 242 Ala または S 242 A

として示す。

【0054】

[0071] 複数の変異はプラス記号によって分ける。すなわち、

Ala 30 Asp + Glu 34 Ser または A 30 N + E 34 S

は、位置30および34における、アラニンとグルタミン酸をそれぞれアスパラギンとセリンに置換する変異を表す。

【0055】

[0072] 1つまたは複数の代替アミノ酸残基を所与の位置に挿入することができる場合は、A 30 N / E、またはA 30 NもしくはA 30 Eとして示す。

40

[0073] 別段に述べられていない限り、残基の番号は、配列番号2の残基の番号付けに対応する。

ポリメラーゼの部位特異的突然変異誘発

[0074] クロストリジウムファージ phiCPV 4 野生型配列は、本明細書において示しており (配列番号3、核酸コード領域および His タグ ; 配列番号1、タンパク質コード領域)、他の場所で入手可能である (National Center for Bioinformatics または GenBank 受入番号 AFH 27113)。

【0056】

[0075] 点変異は、QuickChange Lightning 2 キット (Stratagene / Agilent) を使用して、製造業者の指示書に従って導入することができる

50

。

【 0 0 5 7 】

[0076] プライマーは、営利会社、例えば I D T D N A に注文することができる。
ナノポア構築および挿入

[0077] 本明細書において記載する方法は、ポリメラーゼがナノポアに付いたナノポアを使用することができる。一部の案件においては、（例えば、各ナノポアで1つのみの核酸分子がシーケンシングされるように）ナノポア1つ当たりただ1つのポリメラーゼを有することが望ましい。しかしながら、例えばアルファ溶血素（a H L）を含めた多くのナノポアは、複数のサブユニット（例えば、a H L では7 サブユニット）を有する多量体タンパク質であり得る。サブユニットは、同じポリペプチドの同一複製物であり得る。本明細書においては、無改変サブユニット（例えば、a - H L）に対する改変サブユニット（例えば、a - H L バリエーション）の規定された比を有する多量体タンパク質（例えば、ナノポア）を提供する。本明細書においては、無改変サブユニットに対する改変サブユニットの規定された比を有する多量体タンパク質（例えば、ナノポア）を作製する方法も提供する

10

。

【 0 0 5 8 】

[0078] W O 2 0 1 4 / 0 7 4 7 2 7 (G e n i a T e c h n o l o g i e s , I n c .) の図 2 7 を参照すると、複数のサブユニットを有するタンパク質を構築する方法は、複数の第1のサブユニット 2 7 0 5 を用意すること、および複数の第2のサブユニット 2 7 1 0 を用意することを含み、第2のサブユニットは第1のサブユニットと比較すると改変されている。一部の案件においては、第1のサブユニットは野生型（例えば、天然源から精製したもの、または組換えで作製したもの）である。第2のサブユニットは、任意の好適な方法で改変することができる。一部の案件においては、第2のサブユニットは、（例えば、融合タンパク質として）付けられたタンパク質（例えば、ポリメラーゼ）を有する。

20

【 0 0 5 9 】

[0079] 改変サブユニットは、化学反応性部分（例えば、連結の形成に好適なアジド基またはアルキン基）を含むことができる。一部の案件においては、当該方法は、反応（例えば、C l i c k 化学付加環化）を行って、実在物（例えば、ポリメラーゼ）を化学反応性部分に付けることをさらに含む。

30

【 0 0 6 0 】

[0080] 当該方法は、第1のサブユニットを第2のサブユニット 2 7 1 5 と第1の比で接触させて、第1のサブユニットおよび第2のサブユニットを有する複数のタンパク質 2 7 2 0 を形成させることをさらに含むことができる。例えば、ポリメラーゼを付けるのに好適な反応基を有する改変 a H L サブユニット1部を、野生型 a H L サブユニット6部と混合することができる（すなわち、第1の比は1：6である）。複数のタンパク質は、第2のサブユニットに対する第1のサブユニットの複数の比を有することができる。例えば、混合したサブユニットは、改変サブユニット：無改変サブユニットの化学量論比（例えば、1：6、2：5、3：4）の分布を有するいくつかのナノポアを形成させることができる。

40

【 0 0 6 1 】

[0081] 一部の案件においては、タンパク質は、サブユニットを単純に混合することによって形成させる。例えば a H L ナノポアの場合においては、界面活性剤（例えば、デオキシコール酸）は、a H L 単量体が細孔構造をとることを引き起こすことができる。ナノポアは、脂質（例えば、1, 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン（D P h P C）または1, 2 - ジ - O - フィタニル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン（D o P h P C））、および中温（例えば、約 1 0 0 未満）を用いて形成させることもできる。一部の案件においては、D P h P C を緩衝溶液と混合すると、大きな多重膜ベシクル（L M V）が生じ、この溶液に a H L サブユニットを加えて、混合物を 4 0 で 3 0 分間インキュベートすると、細孔が形成する。

50

【 0 0 6 2 】

[0082]異なる2種類のサブユニット（例えば、天然野生型タンパク質と、単一点変異を含有することができる第2のaHL単量体）を使用する場合、得られるタンパク質は、（例えば野生型と変異体タンパク質の）混合化学量論比を有することができる。これらのタンパク質の化学量論比は、細孔形成反応において使用する2種のタンパク質の濃度比に依存した式に従うことができる。この式は以下のとおりである。

$$100P_m = 100[n! / m!(n-m)!] \cdot f_{mut}^m \cdot f_{wt}^{n-m}, \text{ 式中}$$

P_m = m個の変異体サブユニットを有する細孔の確率

n = サブユニットの総数（例えば、aHLでは7個）

m = 「変異体」サブユニットの数

f_{mut} = 一緒に混合した変異体サブユニットの割合または比

f_{wt} = 一緒に混合した野生型サブユニットの割合または比

[0083]当該方法は、複数のタンパク質を分画して、第2のサブユニット2725に対する第1のサブユニットの第2の比を有するタンパク質の割合を増やすことをさらに含むことができる。例えば、ただ1つの改変サブユニットを有するナノポアタンパク質を単離することができる（例えば、第2の比は1:6）。しかしながら、いずれの第2の比も好適である。第2の比の分布も分画することができ、例えば、1つまたは2つのいずれかの改変サブユニットを有するタンパク質の割合を増やすことができる。WO2014/074727の図27に示されているように、タンパク質を形成するサブユニットの総数は7個であるとは限らない（例えば、異なるナノポアを使用することができ、または6個のサブユニットを有するアルファ溶血素ナノポアが形成し得る）。一部の場においては、1つのみの改変サブユニットを有するタンパク質の割合を増やす。このような場合においては、第2の比は、第1のサブユニット($n-1$)個当たり、第2のサブユニット1個であり、 n はタンパク質を構成するサブユニットの数である。

【 0 0 6 3 】

[0084]第1の比は、第2の比と同じものとすることができるが、必要とされるものではない。一部の場においては、変異単量体を有するタンパク質は、変異サブユニットを有しないタンパク質よりも低い効率で形成し得る。この場合は、第1の比は、第2の比よりも大きいものとするすることができる（例えば、変異サブユニット1:無変異サブユニット6の第2の比がナノポアで所望される場合、好適な数の1:6タンパク質を形成させるには、1:6よりも大きい比でサブユニットを混合することが必要とされてもよい）。

【 0 0 6 4 】

[0085]異なる第2のサブユニット比を有するタンパク質は、分離において、異なる挙動を示す（例えば、異なる保持時間を有する）ことができる。一部の場においては、タンパク質は、イオン交換クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを使用して分画する。第1および第2のサブユニットは、改変を除いては同一とすることができるので、タンパク質における改変の数は、分離の根拠として役割を果たすことができる。一部の場においては、第1または第2のサブユニットのいずれかは、分画を可能にするか、または分画の効率を改良するよう、（例えば、改変に加えて）精製タグを有する。一部の場においては、ポリヒスチジンタグ（Hisタグ）、ストレプトアビジンタグ（Streptタグ）、または他のペプチドタグを使用する。一部の例においては、第1および第2のサブユニットはそれぞれ異なるタグを含み、分画工程では、各タグに基づき分画される。Hisタグの場合には、低いpHでタグに電荷を生じさせる（ヒスチジン残基は、側鎖のpKa未満で正に荷電する）。他のものと比較してaHL分子の1つにおいて電荷が有意に異なることにより、イオン交換クロマトグラフィーを使用して、0、1、2、3、4、5、6、または7個の「電荷タグ付き」aHLサブユニットを有するオリゴマーを分離することができる。原則的に、この電荷タグは、一定の電荷を運ぶ任意のアミノ酸が系状に連なるものとするすることができる。図28および図29では、Hisタグに基づくナノポアの分画の例が示されている。図28では、280ナノメートルにおける紫外吸光度、260ナノメートルにおける紫外吸光度、および伝導率の

プロットが示されている。ピークは、改変サブユニットと無改変サブユニットの様々な比を有するナノポアに対応する。WO 2014/074727の図29では、HisタグとStreptタグの両方を使用した、aHLナノポアおよびその変異体の分画が示されている。

【0065】

[0086] 一部の例においては、分画後に、実在物（例えば、ポリメラーゼ）をタンパク質に付ける。タンパク質はナノポアとすることができ、実在物はポリメラーゼとすることができる。一部の例においては、当該方法は、第2の比のサブユニットを有するタンパク質を二重層に挿入することをさらに含む。

【0066】

[0087] 一部の状況においては、ナノポアは、複数のサブユニットを含むことができる。ポリメラーゼは、サブユニットの1つに付けることができ、サブユニットの少なくとも1つつ全部未満が、第1の精製タグを含む。一部の例においては、ナノポアはアルファ溶血素またはそのバリエーションである。一部の例においては、サブユニットの全てが第1の精製タグまたは第2の精製タグを含む。第1の精製タグは、（例えば、ポリメラーゼが付いたサブユニットにおける）ポリヒスチジンタグとすることができる。

ナノポアに付けられたポリメラーゼ

[0088] 一部の例においては、ポリメラーゼ（例えば、DNAポリメラーゼ）は、ナノポアに付けられ、かつ/または、ナノポアの近傍に配置される。ポリメラーゼは、ナノポアが膜に組み込まれる前または後に、ナノポアに付けることができる。一部の例においては、ナノポアおよびポリメラーゼは融合タンパク質（すなわち、単一のポリペプチド鎖）である。

【0067】

[0089] ポリメラーゼは、任意の好適な方法でナノポアに付けることができる。一部の例においては、ポリメラーゼは、ナノポア（例えば、溶血素）タンパク質単量体に付け、その後、（例えば、ポリメラーゼが付いていないナノポア（例えば、溶血素）単量体6つに対し、ポリメラーゼが付いた単量体1つの比で）全体のナノポア七量体を構築する。次いでナノポア七量体を膜に挿入することができる。

【0068】

[0090] ポリメラーゼをナノポアに付ける別の方法は、溶血素単量体にリンカー分子を付けるか、または溶血素単量体を、取付け部位を有するよう変異させること、ならびに、その後、（例えば、リンカーおよび/または取付け部位を有しない溶血素単量体6つに対し、リンカーおよび/または取付け部位を有する単量体1つの比で）全体のナノポア七量体を構築することを含む。次いでポリメラーゼを、（例えば、膜への挿入前に、大量で）取付け部位または取付けリンカーに付けることができる。ポリメラーゼは、（例えば、七量体の）ナノポアを膜に形成させた後で、取付け部位または取付けリンカーに付けることもできる。一部の例においては、複数のナノポア-ポリメラーゼペアを、バイオチップの（例えば、ウェルおよび/または電極に配置した）複数の膜に挿入する。一部の例においては、ポリメラーゼのナノポア複合体への取付けは、各電極上のバイオチップにおいて行う。

【0069】

[0091] ポリメラーゼは、任意の好適な化学作用（例えば、共有結合および/またはリンカー）を用いてナノポアに付けることができる。一部の例においては、ポリメラーゼは、分子ステーブル（molecular staple）を用いてナノポアに付ける。一部の例においては、分子ステーブルは、3種のアミノ酸配列（リンカーA、B、およびCで示す）を含む。リンカーAは溶血素単量体から延びることができ、リンカーBはポリメラーゼから延びることができ、その場合にリンカーCは、リンカーAとリンカーBを（例えば、リンカーAとリンカーBの両方に巻き付くことによって）つなぐことができ、したがってポリメラーゼをナノポアとつなぐことができる。リンカーCは、リンカーAまたはリンカーBの一部分となるよう構築することもでき、したがってリンカー分子の数は減る

10

20

30

40

50

。

【 0 0 7 0 】

[0092]一部の例においては、ポリメラーゼは、Solulink（商標）化学を用いてナノポアに連結する。Solulink（商標）は、HyNic（6 - ヒドラジノ - ニコチン酸、芳香族ヒドラジン）と4FB（4 - ホルミル安息香酸エステル、芳香族アルデヒド）の間の反応とすることができる。一部の例においては、ポリメラーゼは、Click化学（例えば、Life Technologiesから入手可能）を用いてナノポアに連結する。一部の例においては、溶血素分子にジンクフィンガー変異を導入し、次に分子（例えば、DNA中間体分子）を使用してポリメラーゼを溶血素のジンクフィンガー部位に連結する。

10

【 0 0 7 1 】

[0093]ポリメラーゼをナノポアに付けることにおいて使用することができる他のリンカーは、直接の遺伝子連結（例えば、(GGGGS)₁₋₃（配列番号4）アミノ酸リンカー）、トランスグルタミナーゼ媒介連結（例えば、RSKLG（配列番号5））、ソルターゼ媒介連結、およびシス테인修飾による化学連結である。本明細書において有用であると考えられる具体的なリンカーは、(GGGGS)₁₋₃（配列番号4）、N末端のKタグ（RSKLG（配列番号5））、TEV部位（12～25）、TEV部位+SpyCatcherのN末端（12～49）である。

装置のセットアップ

[0094]ナノポアは、集積回路などの検出回路の検出電極に隣接して配置された膜に形成するか、または他の方法で埋め込んでもよい。集積回路は、特定用途向け集積回路（ASIC）としてもよい。一部の例においては、集積回路は電界効果トランジスターまたは相補型金属酸化膜半導体（CMOS）である。検出回路は、ナノポアを有するチップもしくは他のデバイスに位置するか、または、チップもしくはデバイスの外部に、例えばオフチップ配置などで位置することができる。半導体は任意の半導体とすることができ、IV族半導体（例えば、ケイ素）、およびIII-V族半導体（例えば、ヒ化ガリウム）が含まれるが、これらに限定されない。ヌクレオチドまたはタグを検出するための装置およびデバイスのセットアップについては、例えば、WO2013/123450を参照のこと。

20

【 0 0 7 2 】

[0095]細孔を用いたセンサー（例えば、バイオチップ）は、単一分子の電子照合に使用することができる。細孔を用いたセンサーは、検出電極に隣接して、またはその近傍に配置された膜に形成された本開示のナノポアを含むことができる。センサーは対電極を含むことができる。膜は、トランス側（すなわち、検出電極に面する側）およびシス側（すなわち、対電極に面する側）を含む。

30

【 0 0 7 3 】

[0096]この後の実験に関する開示においては、以下の略記が適用される：eq（当量）；M（モル濃度）；μM（マイクロモル濃度）；N（規定）；mol（モル）；mmol（ミリモル）；μmol（マイクロモル）；nmol（ナノモル）；g（グラム）；mg（ミリグラム）；kg（キログラム）；μg（マイクログラム）；L（リットル）；ml（ミリリットル）；μl（マイクロリットル）；cm（センチメートル）；mm（ミリメートル）；μm（マイクロメートル）；nm（ナノメートル）；（摂氏度）；h（時間）；min（分）；sec（秒）；msec（ミリ秒）。

40

【 実施例 】

【 0 0 7 4 】

[0097]本発明を以下の実施例においてさらに説明する。実施例は、いかなる方法でも、特許請求する本発明の範囲を限定することを意図するものではない。添付の図は、本発明の明細書および説明の一部をなす部分としてみなされることを意図している。全ての参考文献は、そこに記載されている全てが参照によって本明細書に明確に組み込まれる。以下の実施例は、説明するために提供するものであり、特許請求する本発明を限定するために提供するものではない。

50

【実施例 1】

【0075】

定方向突然変異誘発

[0098]この実施例では、p o l 6 ポリメラーゼへの所望の位置での変異導入を説明している。

【0076】

[0099]H i s タグ付き野生型 p o l 6 をコードする DNA を、商業的供給源 (DNA 2 . 0、Menlo Park、California) から購入した。配列は、シーケンシングによって確かめた。

【0077】

[0100]変異体スクリーニング用に、ポリメラーゼをそのまま発現させた (N 末端 H i s - P o l 6)。p o l がチップに付くことを試験するため、p o l 6 の N 末端または C 末端に S p y C a t c h e r ドメインを操作して入れた。

【0078】

[0101]P o l 6 - ヌクレオチド結合に影響を与える合理的な位置は、公知の結晶構造のホモロジーモデリングに基づいて同定した。

[0102]最初のスクリーニング用に、合理的な位置の各々を、Q 5 突然変異誘発プロトコルを用いて、G l y、A l a、L e u、G l u、G l n、L y s、H i s、T y r、P r o、T r p、T h r、または M e t に変異させた。

【0079】

[0103]各突然変異誘発反応用のプライマーは、NEB 塩基チェンジャープロトコルを用いて設計し、IDT に 96 ウェルプレートフォーマットで注文した。

[0104]順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、NEB から購入した T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (P N K) を使用して、ハイスループット (H T P) フォーマットで 5 ' リン酸化した。典型的な 25 μ l 反応物は、10 μ M のプライマー 15 μ l、5 倍反応バッファー (NEB より) 5 μ l、P N K 酵素 1 . 25 μ l、水 3 . 75 μ l を含有した。反応は 37 °C で 30 分間行い、酵素は 65 °C で 20 分間熱失活させた。

【0080】

[0105]P C R 突然変異誘発は、NEB からの Q 5 DNA ポリメラーゼを使用して行った。典型的な 25 μ l 反応物は、Q 5 バッファー 5 μ l、G C エンハンサー 5 μ l、10 m M d N T P 0 . 5 μ l、10 μ M リン酸化突然変異誘発順方向プライマーおよび逆方向プライマー 1 . 25 μ l、Q 5 ポリメラーゼ 0 . 25 μ l、および 5 n g / m l 野生型 P o l 6 鑄型、すなわち H i s - P o l 6 1 μ l、および H₂O 10 . 75 μ l を含有した。

【0081】

[0106]P C R が完了したら、D p n 1 0 . 5 μ l を P C R ミックス 25 μ l に加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。

[0107]D p n 1 で処理した P C R 産物 2 . 5 μ l を B l u n t / T A リガーゼマスターミックス 2 . 5 μ l に加える。室温で 1 時間インキュベートした。

【0082】

[0108]ライゲーションミックス 1 μ l を、96 ウェル B L 2 1 D E 3 細胞 (E M D M i l l i p o r e) 20 μ l に加え、氷上で 5 分間インキュベートする。

[0109]P C R デバイスを使用して、正確に 30 秒間、42 °C で熱ショックを与え、氷上に 2 分間置く。

【0083】

[0110]S O C 80 μ l を加え、37 °C のインキュベーターで 1 時間、振盪せずにインキュベートする。

[0111]S O C または超純水 100 μ l を加え、カナマイシン 50 ~ 100 μ g / m l を含む 48 ウェル L B 寒天プレートに蒔く。

【実施例 2】

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

発現および精製

[00112] 以下の実施例では、p o l 6 バリエーションをハイスループット法を用いてどのように発現させて精製したかを詳しく述べる。

【 0 0 8 5 】

[00113] p D 4 4 1 ベクター（発現プラスミド）中のバリエーションをコードする DNA を、大腸菌（E . c o l i ）コンピテント細胞に形質転換し、グリセロールストックを作製した。グリセロールストックから取った微量から開始し、グルコース 0 . 2 % およびカナマイシン 1 0 0 μ g / m l を含む LB でスターター培養物 1 m l を約 8 時間増殖させた。対数期のスターター培養物 2 5 μ l を、9 6 ディープウェルプレートの発現培地 1 m l （グルコース 0 . 2 %、リン酸カリウム 5 0 m M、M g C l 2 5 m M、およびカナマイシン 1 0 0 μ g / m l を追加した T e r r i f i c B r o t h （T B）自己誘導培地）に移す。プレートを、2 5 0 ~ 3 0 0 r p m で振盪しながら 2 8 3 6 ~ 4 0 時間インキュベートした。

10

【 0 0 8 6 】

[00114] 次に細胞を、4 で 3 0 分間、3 2 0 0 \times g にて遠心分離して収集した。デカントして培地を除き、細胞ペレットをあらかじめ冷却した溶解バッファー 2 0 0 μ l （リン酸カリウム 2 0 m M p H 7 . 5、Na C l 1 0 0 m M、T w e e n 2 0 0 . 5 %、T C E P 5 m M、イミダゾール 1 0 m M、P M S F 1 m M、1 \times B u g B u s t e r、リゾチーム 1 0 0 μ g / m l、およびプロテアーゼ阻害剤）中で再懸濁させ、穏やかに攪拌しながら室温で 2 0 分間インキュベートした。次いで 1 0 倍ストックからの 2 0 μ l を、最終濃度 1 0 0 μ g / m l の D N a s e、5 m M の M g C l 2、1 0 0 μ g / m l の R N a s e I に加え、氷上で 5 ~ 1 0 分間インキュベートして溶解液を生成させる。溶解液に、1 M リン酸カリウム 2 0 0 μ l、p H 7 . 5（最終濃度は、溶解液 4 0 0 μ l 中の約 0 . 5 M リン酸カリウムとなる）を追加し、4 で 1 0 分間、約 1 5 0 0 r p m にて遠心分離することにより P a l l フィルタープレート（部品番号 5 0 5 3、3 ミクロンフィルター）でろ過する。次いで、澄んだ溶解液を、平衡化した 9 6 ウェル H i s - P u r コバルトプレート（P i e r c e 部品番号 9 0 0 9 5）に入れ、1 5 ~ 3 0 分間結合させた。

20

【 0 0 8 7 】

[00115] 流出液（F T）を、5 0 0 \times G にて 3 分間遠心分離することによって収集した。次いで F T を 4 0 0 μ l の洗浄バッファー 1（リン酸カリウム 0 . 5 M p H 7 . 5、Na C l 1 M、T C E P 5 m M、イミダゾール 2 0 m M、および T w e e n 2 0 0 . 5 %）で 3 回洗浄した。次いで F T を 4 0 0 μ l の洗浄バッファー 2（トリス 5 0 m M p H 7 . 4、K C l 2 0 0 m M、T C E P 5 m M、T w e e n 2 0 0 . 5 %、イミダゾール 2 0 m M）で 2 回洗浄した。

30

【 0 0 8 8 】

[00116] P o l を、溶出バッファー 2 0 0 μ l（トリス 5 0 m M p H 7 . 4、K C l 2 0 0 m M、T C E P 5 m M、T w e e n 2 0 0 . 5 %、イミダゾール 3 0 0 m M、グリセロール 2 5 %）を使用して溶出させ、1 ~ 2 分のインキュベーション後に収集した。溶離液を 2 ~ 3 回、同じ H i s - P u r プレートに再び入れて、溶離液中に濃縮した P o l 6 を得る。精製したポリメラーゼは、S D S - P A G E で評価した場合に 9 5 % 超の純度である。タンパク質濃度は、N a n o d r o p によって評価した場合に約 3 μ M（0 . 3 5 m g / m l）であり、2 6 0 / 2 8 0 比は 0 . 6 である。

40

【 0 0 8 9 】

[00117] ポリメラーゼ活性は、蛍光置換アッセイによって確認する（実施例 3 を参照のこと）。

【 実施例 3 】

【 0 0 9 0 】

活性の測定

50

[00118]この実施例では、バリエーションポリメラーゼの活性を測定する方法を示す。

置換アッセイプロトコール

[00119]このアッセイでは、DNA鎖にヌクレオチドポリリン酸を組み込む変異体ポリメラーゼの能力、および2本鎖DNAをほどいて置換する変異体ポリメラーゼの能力を特性決定する。

【0091】

[00120]ストック試薬は以下のとおりである。

低塩

【0092】

【表1】

10

	試薬 A	試薬 B
試薬	濃度	濃度
KCl	21.4 mM	20 mM
ピシン 7.9	26.75 mM	25 mM
EDTA	0.284 mM	N/A
Triton X-100	0.0535 %	0.05 %
DTT	5.35 mM	5 mM
BSA	26.75 µg/ml	25 µg/ml
DNA FRET 鋳型	71 nM	N/A
MgSO4	N/A	20 mM

20

N/A=該当なし

【0093】

高塩

【0094】

【表2】

30

	試薬 A	試薬 B
試薬	濃度	濃度
NaCl	75 mM	300 または 150mM
HEPES 7.5	32.6 mM	25 mM
EDTA	0.3 mM	N/A
Triton X-100	0.065 %	0.05 %
TCEP	6.5 mM	5 mM
BSA	32.6 µg/ml	25 µg/ml
DNA FRET 鋳型	87 nM	N/A
MgCl	N/A	20 mM

N/A=該当なし

40

【0095】

[00121]単一変異体および二重変異体のスクリーニング用：

[00122]試薬 A を希釈液として使用して、1.42 倍にて4種の異なるヌクレオチド条件を作製する。

【0096】

【表 3】

1		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	28.4 μM	20 μM
dATP	21.3 μM	15 μM
dCTP	21.3 μM	15 μM
dGTP	21.3 μM	15 μM

2		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	2.84 μM	2 μM
dATP	21.3 μM	15 μM
dCTP	21.3 μM	15 μM
dGTP	21.3 μM	15 μM

10

3		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	0 μM	0 μM
dATP	21.3 μM	15 μM
dCTP	21.3 μM	15 μM
dGTP	21.3 μM	15 μM

4		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	0	0
dATP	0	0
dCTP	0	0
dGTP	0	0

20

【0097】

[00123] 三重変異体のスクリーニング用：

[00124] 試薬 A を希釈液として使用して、1.42 倍にて 4 種の異なるヌクレオチド条件を作製する。

【0098】

【表 4】

1		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	28.4 μM	20 μM
dAnP-NH ₂	28.4 μM	20 μM
dCnP-NH ₂	28.4 μM	20 μM
dGnP-NH ₂	28.4 μM	20 μM

2		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	1.42 μM	1 μM
dAnP-NH ₂	1.42 μM	1 μM
dCnP-NH ₂	1.42 μM	1 μM
dGnP-NH ₂	1.42 μM	1 μM

30

3		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	0 μM	0 μM
dATP	21.3 μM	15 μM
dCTP	21.3 μM	15 μM
dGTP	21.3 μM	15 μM

4		
ヌクレオチド	[1.42X]	[最終]
dTnP-NH ₂	0	0
dAnP-NH ₂	0	0
dCnP-NH ₂	0	0
dGnP-NH ₂	0	0

40

dNnP は、N がヌクレオチド(すなわち、A、T、C、または G)であり、nP が 4~8 個のリン酸であるヌクレオチドポリリン酸である。

50

【 0 0 9 9 】

[00125]ヌクレオチド条件 1 では、高濃度の六リン酸での活性について試験する。

[00126]ヌクレオチド条件 2 では、低濃度の六リン酸での活性について試験する。

[00127]ヌクレオチド条件 3 では、誤組み込み率（すなわち、忠実度）について試験する。変異体ポリメラーゼが、必要な 4 種のヌクレオチドのうちの 3 種のみでの有意な活性を示す場合には、変異体ポリメラーゼは、DNA 鎖の延長中に正しいヌクレオチドまたは誤ったヌクレオチドを識別しないと結論する。

【 0 1 0 0 】

[00128]ヌクレオチド条件 4 では、エキソヌクレアーゼ活性について試験する。ヌクレオチドが存在しないときにポリメラーゼが有意な活性を示す場合には、ポリメラーゼはエキソヌクレアーゼ活性を示していると結論する。

10

【 0 1 0 1 】

[00129] 9 6 ウェルハーフエリア透明プレートの各反応ウェルに、
試薬 A / ヌクレオチドミックス 23 μ l
ポリメラーゼ (1 ~ 10 μ M) 2 μ l
を加える。

【 0 1 0 2 】

[00130]プレート振盪機で 800 RPM にて 10 分間振盪する。

[00131]各ウェルに 1 . 4 M NaCl 5 μ l を加えて NaCl 濃度を 300 mM に上げるか、または各ウェルに 525 mM NaCl 5 μ l を加えて NaCl 濃度を 150 mM に上げる。

20

【 0 1 0 3 】

[00132] 30 分間インキュベートする。

[00133] BMG LABTECH プレートリーダーにおいて、試薬 B 10 μ l を注入して、蛍光シグナルを 2 ~ 10 分間読み取る。

【 0 1 0 4 】

[00134]バリエーションポリメラーゼの置換アッセイからの代表的なデータを図 5 に示す。ポリメラーゼの活性は、A . dTnP 20 μ M + dA、C、G 3 P 15 μ M (赤色四角形 ;)、B . dTnP 5 μ M + dA、C、G 3 P 15 μ M (青色ダイヤモンド形 ;)、C . dA、C、G 3 P 15 μ M (緑色三角形 ;) の存在下、または D . ヌクレオチドの非存在下 (紫色 x) での置換アッセイを用いて測定した。A および B は、変異体バリエーションがヌクレオチドポリリン酸を組み込み、ヌクレオチドポリリン酸を用いて DNA 鋳型に沿って延長することができることを示している。C は、バリエーションが忠実度を失っており、T ヌクレオチドの非存在下で無秩序なヌクレオチドを誤って組み込んでいないことを示している。D . は、発生したシグナルが、全てのヌクレオチドの非存在下でのポリメラーゼエキソヌクレアーゼ活性の結果ではないことを示している。4 つの全ての曲線は、ポリメラーゼスクリーニングの一部として 4 つの異なるアッセイプレートで試験した単一バリエーションの代表である。

30

【 実施例 4 】

【 0 1 0 5 】

40

k_{off} の測定

[00135]下記のストップフローアッセイを使用して、バリエーションポリメラーゼの k_{off} 速度を測定した。

【 0 1 0 6 】

[00136]試薬 A では、ポリメラーゼは、Ca²⁺ のような非触媒性 2 価金属の存在下で、フルオレセイン標識 DNA 鋳型 - プライマーに、Cy3 (または Alexa555) 連結ヌクレオチドポリリン酸と共に結合している。これは FRET ペアを形成し、フルオレセインはドナーフルオロフォアであり、Cy3 はアクセプターフルオロフォアである。試薬 B は追跡ヌクレオチドを含有する。このアッセイでは、鋳型 / プライマーに組み込まれる 1 番目のヌクレオチドはシトシンである。

50

【 0 1 0 7 】

[00137] 試薬 A (NaCl 75 mM、 HEPES 25 mM (pH 7.5)、 CaCl_2 2 mM、フルオレセイン - 誘型 / プライマー 250 nM、 dCnP-Cy3 20 μM 、およびポリメラーゼ > 250 nM) は、ポリメラーゼを確実に最後に加えながら成分を混合することによって新しく調製した。試薬 A 中でポリメラーゼを 10 分間インキュベートした。

【 0 1 0 8 】

[00138] 試薬 B (NaCl 75 mM、 HEPES 25 mM (pH 7.5)、 CaCl_2 2 mM、および dCTP 200 μM) を調製した。

[00139] 試薬 A と B を混合すると、 dCTP は dCnP-Cy3 と会合を競合し、 dCTP 濃度が過剰であるならば蛍光の増加が観測される。アッセイは、ストップフローデバイス (*Kintek Corp*) または蛍光プレートリーダーのいずれかを用いて行うことができる。時間に対する蛍光の増加を一次または二次指数関数にフィッティングして、その特定のポリメラーゼの速度定数 k_{off} を得る。

10

【 0 1 0 9 】

[00140] 選択したバリエーションの精製収量および k_{off} を表 1 に示す。

【 0 1 1 0 】

【表 5】

表 1-選択した Pol6 バリエーションの精製収量および k_{off}

	$k_{off} (s^{-1})$	調製物 2.5ml からの収量 (μg)
良好な k_{off} のヒットおよび 20 μM にて中程度に良好な活性		
S366A+N535L+A547M	0.0039	77.58
20mod からのヒット(20 μM ヌクレオチド六リン酸にて良好な活性、および 0 μM にて非常に低い活性または活性なし)		
T651Y+P542E+N545K	0.0562	5.16
T651Y+P542E+Q546W	0.0201	64.58
S366A+P542E+N545K	0.0295	125.24
20MSR からのヒット(20 μM にて良好な活性、0 μM にて活性)		
S366A+P542E+I652Q	0.0440	196.63
T651Y+P542E+S366A	0.0583	10.11
1MSR/1Mod からのヒット、20 μM にて中程度に良好な活性も示す		
S366A+N535L+N545K	0.0103	60.25
T651Y+N535L+N545K	0.0273	210.66
S366A+N535L+T529M	0.0327	153.09
S366A+N535L+I652Q	0.0097	161.55
二重変異体ヒット		
T651Y+N535L	0.0312	281.84
S366A+N535L	0.0134	666.95

FP=蛍光偏光

【0111】

【00141】アッセイの模式図、および例示的な反応のグラフについては、図 3 を参照のこと。代表的なデータについては、図 10 を参照のこと。

【実施例 5】

【0112】

k_{off} の測定

【00142】この実施例では、蛍光偏光を用いる、 k_{off} を測定する代替方法を示す。

【00143】トリス 25 mM pH 7.0、KCl 75 mM、Triton-X100 0.01%、1xBSA (100 $\mu g/ml$)、EDTA 0.5 mM、CaCl₂ 2 mM、DTT 2 mM を含むアッセイバッファーを使用して、ヘアピンプルオレセイン標識 DNA 鋳型および dC6P-C6-Cy3 タグ付きヌクレオチド 250 nM を含有するアッセイマスターミックスを調製した。マスターミックス 55 μl を黒色 96 ウェル Costar プレートのウェルの各々に加え、培養物 1 ml から精製したポリメラーゼ変異体 20 μl をハイスループット (HTP) フォーマットで加えた。プレートは、プレート振盪機で

1 分間振盪し、ポリメラーゼ - DNA 鋳型 - ヌクレオチドの均一な三元複合体を形成させた。プレートを BMG Polarstar プレートリーダー (BMG Labtech Inc.、North Carolina) に置き、2000 周辺でのゲインを有するよう標的ミリ偏光を 200 mP および 10 % に調節した。励起フィルターは 485 nm に設定し、発光フィルターは 590 ~ 20 nm に設定した。注射器に、1 mM dCTP 追跡ヌクレオチド溶液 1 ml を詰めた。データは、1 インターバルにつき 1 ウェル当たり最低 30 フラッシュで、開始の合計読取り時間 60 秒で収集した。遅い解離を示したヒット変異体では、フラッシュを 50 以上に増加させ、より長い読取り時間を取った。データ収集は、1 mM dCTP 25 μ l の注入で開始した。

【0113】

10

[00144] アッセイの模式図、および例示的な反応のグラフについては、図 4 を参照のこと。

[00145] 蛍光偏光に基づく k_{off} アッセイからの、2 種のバリエーションポリメラーゼ (S366A + N535L + I652Q (B6) および S366A + P542E + I652Q (C6)) の代表的なデータについては、図 6 を参照のこと。mP はミリ偏光である。あらかじめ形成させた、ポリメラーゼ - DNA 鋳型 - dCnP - Alexa555 の三元複合体を、未変性 dCTP を用いて追跡し、偏光 dCnP - Alexa555 をある時間にわたってモニターした。

【実施例 6】

【0114】

20

k_{chem} の測定

[00146] この実施例では、バリエーションポリメラーゼの k_{chem} を測定するための FRET に基づくアッセイを示す。

【0115】

[00147] 試薬 A では、ポリメラーゼはフルオレセイン標識 DNA 鋳型 - プライマーに結合している。試薬 B は、 Mg^{2+} のような触媒性 2 価金属の存在下で、Cy3 (または Alexa555) 連結ヌクレオチドポリリン酸を含有する。このプロトコールでは、鋳型 / プライマーに組み込まれる 1 番目のヌクレオチドはシトシンである。

【0116】

[00148] 試薬 A (NaCl 75 mM、HEPES 25 mM (pH 7.5)、フルオレセイン - 鋳型 / プライマー 250 nM、ポリメラーゼ > 250 nM) を調製した。ポリメラーゼは、試薬 A 中で 10 分間インキュベートした。

30

【0117】

[00149] 試薬 B (NaCl 75 mM、HEPES 25 mM (pH 7.5)、 $MgCl_2$ 10 mM、および dCnP - Cy3 20 μ M) を調製した。

[00150] 試薬 A と B を混合すると、ポリメラーゼ - フルオレセイン - 鋳型 - プライマー複合体は dCnP - Cy3 に結合し、蛍光が消光する。 Mg^{2+} は、ポリメラーゼがヌクレオチドを組み込むことを可能にし、ヌクレオチドは切断産物である、Cy3 が付いたピロリン酸、nP - Cy3 を放出する。消光剤が放出されるので、蛍光は増加する。アッセイは、ストップフローデバイス (KinTek Corp) または蛍光プレートリーダーのいずれかを用いて行うことができる。

40

【0118】

[00151] アッセイの模式図、および例示的な反応のグラフについては、図 2 を参照のこと。代表的なデータについては、図 9 を参照のこと。

【実施例 7】

【0119】

ナノポアへの取付け

[00152] この実施例では、バリエーションポリメラーゼをナノポア、例えば - 溶血素に付ける方法を示す。

【0120】

50

[00153]ポリメラーゼは、任意の好適な手段によってナノポアに連結してもよい。例えば、PCT/US2013/068967 (WO2014/074727として公開; Genia Technologies, Inc.)、PCT/US2005/009702 (WO2006/028508として公開; President and Fellows of Harvard College)、およびPCT/US2011/065640 (WO2012/083249として公開; Columbia University)を参照のこと。

【0121】

[00154]ポリメラーゼ、例えばバリエーションpol6 DNAポリメラーゼを、リンカー分子を介してタンパク質ナノポア (例えば、アルファ溶血素) に連結させた。詳細には、生理的条件下で共有結合性イソペプチド連結を自発的に形成するSpy TagおよびSpy Catcherシステムを使用した。例えば、Liら、J Mol Biol. 2014年1月23; 426(2): 309~17を参照のこと。

10

【0122】

[00155]pol6 バリエーションSpy Catcher His タグを実施例2に従って発現させ、コバルトアフィニティーカラムを使用して精製した。Spy Catcher ポリメラーゼおよびSpy Tag オリゴマー化ナノポアタンパク質を、3 mM SrCl₂ 中で、4 にて終夜インキュベートした。次に1:6 - ポリメラーゼ - 鋳型複合体を、分子ふるいクロマトグラフィーを使用して精製した。

20

【0123】

[00156]pol6 バリエーションのN末端またはC末端のいずれかに、リンカーを付けた。N末端で付けられたバリエーションはより頑強、例えばより安定であることが見出された。したがって、N末端に付けられたリンカーを使用した。

【実施例8】

【0124】

バイオチップにおける活性

[00157]この実施例では、ナノポアに結合したバリエーションポリメラーゼがタグ付きヌクレオチドに結合して、それによりポリメラーゼが付いたナノポアで閉鎖チャンネル電流の検出を可能にさせる、バリエーションポリメラーゼの能力を示す。

30

【0125】

[00158]ポリメラーゼをナノポアに付け、バイオチップとも呼ばれる半導体センサーチップのウェル上の脂質二重層に埋め込んだ。脂質二重層は、PCT/US2014/061853 (「Methods for Forming Lipid Bilayers on Biochips」という題名で、2014年10月22日に出願された) において記載されているように形成させて、ポリメラーゼが付いたナノポアを挿入した。

【0126】

[00159]バリエーションポリメラーゼは、低塩条件下で鋳型DNAと複合化した。

[00160]ナノポアに結合したバリエーションポリメラーゼのタグ付きヌクレオチドに結合する能力は、静的捕獲実験において測定した。静的捕獲実験では、タグ付きヌクレオチドがポリメラーゼに結合し、タグ付きヌクレオチドがナノポアに呈示されたときに閉鎖チャンネル電流を測定する。静的捕獲実験はCa²⁺の存在下で行い、Ca²⁺は、DNAの触媒作用および伸長を妨げ、また同じ種類のタグ付きヌクレオチドの繰り返しの捕獲を検出することを可能にする。この実験においては、使用したタグ付きヌクレオチドはdTnP-タグであった。

40

【0127】

[00161]バイオチップのアルファ溶血素ナノポアに連結した例示的なポリメラーゼバリエーションPol6 (S366A+N535L+I652Q) を、鋳型DNAと複合化した。

[00162]Pol6 (S366A+N535L+I652Q) - DNA 複合体によるタグ付きチミジンヌクレオチド (タグはT30である (配列番号9)) の静的捕獲は、二重層の上下でのHepes 7.5 20 mM、NaCl 300 mM、CaCl₂ 3 mM、お

50

よび T C E P 5 m M の存在下で、1 0 0 m V で記録した。

【0 1 2 8】

[00163]結果を図 7 および図 8 に示す。図 7 におけるトレースでは、時間の関数として、細孔をわたって 1 0 0 m V で測定した電解電流が示されている。この電圧における開口細孔電流は約 1 n A であり（一番上のトレース）、同じ電圧における閉鎖細孔電流は約 0 . 3 3 n A であった（中央のトレース）。システムのソフトウェアに従って、開口チャネル電流を 1 に対し正規化した。閉鎖チャネル電流は、d T n P - T 3 0（配列番号 9）によって開口チャネル電流の 3 3 % に減少した。このトレースで示されている電流遮断は、ナノポアの近傍で生じるバリエーション P o l 6 - D N A 複合体によるチミジンポリリン酸の結合に関連している。図 7（右）における、対応する一番上のヒストグラムでは、1 0 0 m V にて、同じ細孔での開口細孔電流に対し正規化された電流の変化で観測された電流遮断の頻度が示されており、中央のトレースに対応するヒストグラム（右）では、1 0 0 m V にて、同じ細孔での閉鎖細孔電流に対し正規化された電流の変化で観測された電流遮断の頻度が示されている。

10

【0 1 2 9】

[00164]図 8 では、図 7 に示されているタグ付きチミジンの静的捕獲の滞留時間が示されている。図 8（左）では、開口チャネル電流に対し正規化された電流の関数としての、タグ付き d T N P がバリエーション P o l 6 に結合することの発生回数のヒストグラムが示されている。d T N P タグ付きヌクレオチドの各捕獲の平均滞留時間は、1 . 2 秒と測定された。細孔におけるタグのバックグラウンド捕獲（すなわち、ポリメラーゼが媒介していないもの）は、数ミリ秒の範囲の滞留時間を有する（データ示さず）。酵素進化のゴールは、タグ付きヌクレオチドポリリン酸の解離速度を改良することであったので、バックグラウンドからはっきりと区別されるポリメラーゼ媒介捕獲を記録するのに充分長い滞留時間が理解され得る。図 8 に示されているように、1 . 2 秒の平均滞留時間は、バックグラウンドよりもかなり上である。セルインデックスは、この実験において使用するチップに存在する約 8 0 0 0 個のセルの、色に基づくスキームである。

20

【0 1 3 0】

[00165]データにより、例示的なバリエーションポリメラーゼ P o l 6（S 3 6 6 A + N 5 3 5 L + I 6 5 2 Q）は、タグ付きヌクレオチドに結合することができ、ポリメラーゼが付けられたナノポアによる電流変化の検出を可能にすることが示されている。

30

【0 1 3 1】

[00166]この結果は、バイオチップのナノポアに付けられたバリエーションポリメラーゼが、高忠実度でタグ付きヌクレオチドに結合し、そのタグ付きヌクレオチドを、ヌクレオチド組み込みの検出に充分な時間、また場合によっては例えばナノポアシーケンシング中の挿入、欠失などのシーケンシングエラーの確率を減らすのに充分な時間を与える滞留時間でナノポアに呈示することができる証拠を示している。

【実施例 9】

【0 1 3 2】

ローリングサークル増幅アッセイ

[00167]この実施例では、ローリングサークル型アッセイにおけるポリヌクレオチド鋳型の増幅を説明する。

40

【0 1 3 3】

[00168]使用した鋳型は、社内製の鋳型 H F c i r c 1 0 であった。その鋳型は、長さ約 1 5 0 b p の単純環状鋳型である。

[00169]合計反応容量 4 0 μ l（試薬 A 2 8 μ l + 2 μ M ポリメラーゼ 2 μ l + 試薬 B 1 0 μ l）でアッセイを行った。

【0 1 3 4】

[00170]試薬 A：

【0 1 3 5】

【表 6】

Kglu	75	mM
HEPES 7.5	25	mM
EDTA	0.2	mM
Triton X-100	0.05	%
TCEP	5	mM
BSA	25	μg/ml
プライマーが付き た環状鋳型	100	nM
dNTP/dN6P/タグ	25	μM

10

【 0 1 3 6 】

[00171]試薬 B :

【 0 1 3 7 】

【表 7】

HEPES 7.5	25	mM
Kglu	変動	mM
Triton X-100	0.05	%
TCEP	5	mM
BSA	25	μg/ml
MgCl ₂	40	mM

20

【 0 1 3 8 】

[00172] 2 μM ポリメラーゼ 2 μl を試薬 A 28 μl に加えて、最終アッセイミックス 40 μl 中での DNA : ポリメラーゼ (それぞれ 100 nM) のモル比を 1 : 1 にした。試薬 A / ポリメラーゼミックスを、この 75 mM の塩条件において 10 分間インキュベートして、ポリメラーゼを DNA に結合させた。

【 0 1 3 9 】

30

[00173]次に、試薬 B 10 μl を試薬 A / ポリメラーゼ混合物に加えて、反応を開始させた。

[00174]所定の時点にて試料 10 μl を反応物から取り出し、EDTA 50 mM を含むホルムアミド 10 μl に加えて反応を失活させた。試料は、0 分、10 分、30 分、および 40 分の時点で取った。

【 0 1 4 0 】

[00175]ホルムアミド試料を約 3 分間、94 に加熱して、タンパク質と、DNA の二次構造とを変性させた。試料は 4 に放冷しなかった。100 × SYBR GREEN または GOLD 色素 2 μl を加えた。

【 0 1 4 1 】

40

[00176]各試料の 15 μl を、1.2 % アガロースゲルにおいて、100 V で 1 時間 15 分間泳動させた。

[00177]Bio-rad GEL DOC EZ 撮像装置の青色トレイを使用して、ゲルの画像を取得した。

【 0 1 4 2 】

[00178]図 11 では、アッセイの 40 分時点の結果が示されている。左から右に数えてレーン 1 および 19 において分子ラダーが示されている。レーン 2 は t = 0 の試料を有し、産物は見えない。レーン 3 ~ 18 の各々は、異なるバリエーションの pol6 ポリメラーゼである。

【 0 1 4 3 】

50

[00179]示されている全てのバリエーションは鎖置換を行うことができ、長いキロベースのDNA産物を、全てヌクレオチド六リン酸を用いて産生することができる。

【実施例10】

【0144】

タグ付きヌクレオチドを使用した鋳型DNAのシーケンシング

[00180]この実施例では、バリエーションポリメラーゼが、バイオチップでの合成法によるシーケンシングにおいて機能的であることを示す。

【0145】

[00181] P o l 6 - 2 6 i - D 4 4 A ポリメラーゼを使用したヘテロポリマー鋳型のA C シーケンシングを、H e p e s 2 0 m M、p H 8、グルタミン酸カリウム 5 0 0 m M、および M g C l 2 3 m M において、室温で行った。ポリメラーゼが付いたナノポアを、本明細書において記載したように脂質二重層に埋め込んだ。プライマーが付いたDNAを加え、ポリメラーゼと複合化させた。4種の異なるタグ付きヌクレオチドを 2 5 μ M の濃度で加えた。合成によるシーケンシングは、「N u c l e i c A c i d S e q u e n c i n g U s i n g T a g s」という題名の W O 2 0 1 4 / 0 7 4 7 2 7 において記載されているように進めてもよい。図 1 2 におけるトレースでは、ヘテロポリマー鋳型に対する 7 6 % のシーケンシング精度、および 9 6 b p のリード長が示されている。

【0146】

[00182]本明細書において記載される実施例および実施形態は、単なる例示目的のものであり、またその実施例および実施形態を考慮した様々な改変または変化が当業者に提案されることになり、本出願の趣旨および範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれることになることが理解されよう。本明細書において引用されるあらゆる刊行物、特許、および特許出願は、参照によりその全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる。

【配列表フリーテキスト】

【0147】

配列番号 1 - 野生型 P o l 6 (D N A ポリメラーゼ [クロストリジウムファージ p h i C P V 4] ; G e n B a n k : A F H 2 7 1 1 3 . 1)

```

1 mdkhtqyvke hsfnydeykk anfdkiecli fdtesctnye ndntgarvyg wglgvtrnhn
    061 miyggqnlqf wevcqnifnd wyhdnkhtik itktkkgfpk rkyikfpia v hnlgdvfevl
    121 kyslvengfn ydkgllktvf skgapyqvtv dveepktfhi vqnnnivygc nvymdkffev
    181 enkdgsttei glclldffdsy kiiitcaesqf hnyvhdvdpf fykmgeeydy dtwrspthkq
41 ttlelryqyn diymrlrevie qfyidglcgg elpltgmrt a ssiafnvlkk mtfgeektee
    301 g
yinyfeldk ktkfevlrkr iemesytggy thanhkavgk tinkigcsld inssyps qma
    361 ykvfp
ygkpv rktwgrkpkt eknevylie v gfdvvepkhe eyaldifkig avnskalspi
    421 tgavsgqey
f ctnikdgkai pykelkdtk lttynnvlt sveyefwikh fnfgvfk kde
    481 ydcfevdnle ft
glkigsil yykaekgkfk pyvdhftkmk venkklgknk ltnqakli n
    541 gaygkfgtkq nkeekd
limd knglltftgs vteyegkefy rpyasfv t ay grlqlwnai i
    601 yavgvenfly ctdtdsiycnr
evnsliedmn aigetidkti lgkwdvehvf dkfkvl gqkk
    661 ymyhdckedk tdlkccglps dar
kiiigqg fdefylgknv egkkqrkkvi ggcllldtlf
    721 tikkimf

```

配列番号 2 - P o l 6 (H i s タグ付き)

```

MHSHHHHHHS GGSDKHTQYV KEHSFNYDEY KKANFDKIEC LIFDTESCTN
50
YENDNTGARV YGWLGLVTRN HNMIYQQLN QFWEVCQNIF NDWYHDNKHT
100
IKITKTKKGF PKRKYIKFPI AVHNLGWDVE FLKYSLEVNG FNYDKGLLKT
150
VFSKGAPYQT VTDVEEPKTF HIVQNNNIVY GCNVYMDKFF EVENKDGSTT
200
EIGLCLDFFD SYKIITCAES QFHNYVHDVD PMFYKMGEY DYDTWRSPTH
250
KQTTLELRYQ YNDIYMLREV IEQFYIDGLC GGELPLTGMR TASSIAFNVL
300
KKMTFGEEKT EGYINYFEL DKKTKEFLR KRIEMESYTG GYTHANHKAV
350
GKTINKIGCS LDINSSYPSQ MAYKVFPYK PVRKTWGRKP KTEKNEVYLI
400
EVGFDFVEPK HEEYALDIFK IGAVNSKALS PITGAVSGQE YFCTNIKDGK
450

```

AIPVYKELKD	TKLTTNYNVV	LTSVEYEFWI	KHFNFGVFKK	DEYDCFEVDN	500
LEFTGLKIGS	ILYYKAEK GK	FKPYVDHFTK	MKVENKKLGN	KPLTNQAKLI	550
LNGAYGKF GT	KQNKEEKDLI	MDKNGLLTFT	GSVTEYEGKE	FYRPYASFVT	600
AYGRLQLWNA	IIYAVGVENF	LYCDTDSIYC	NREVNSLIED	MNAIGETIDK	650
TILGKWDVEH	VFDKFKVLGQ	KKYMYHDCKE	DKTDLKCCGL	PSDARKIIIG	700
QGFDEFYLGK	NVEGKKQRKK	VIGGCLLLDT	LFTIKKIMF*		739

配列番号 3 - H i s タグ付き P o l 6 (D N A 配列)

ATGCATCACC	ATCATCATCA	CCACCACAGC	GGCGGTTCCG	ACAAACACAC	50	
GCAGTACGTC	AAAGAGCATA	GCTTCAATTA	TGACGAGTAT	AAGAAAGCGA	100	10
ATTTCGACAA	GATCGAGTGC	CTGATCTTTG	ACACCGAGAG	CTGCACGAAT	150	
TATGAGAACG	ATAATACCGG	TGCACGTGTT	TACGGTTGGG	GTCTTGCGGT	200	
CACCCGCAAC	CACAATATGA	TCTACGGCCA	AAATCTGAAT	CAGTTTTTGGG	250	
AAGTATGCCA	GAACATTTTC	AATGATTGGT	ATCACGACAA	CAAACATACC	300	
ATTAAGATTA	CCAAGACCAA	GAAAGGCTTC	CCGAAACGTA	AGTACATTAA	350	
GTTTCCGATT	GCAGTTCACA	ATTTGGGCTG	GGATGTTGAA	TTCCTGAAGT	400	
ATAGCCTGGT	GGAGAATGGT	TTCAATTACG	ACAAGGGTCT	GCTGAAAACT	450	
GTTTTTAGCA	AGGGTGCGCC	GTACCAAACC	GTGACCGATG	TTGAGGAACC	500	
GAAAACGTTT	CATATCGTCC	AGAATAACAA	CATCGTTTAT	GGTTGTAACG	550	
TGTATATGGA	CAAATTCTTT	GAGGTCGAGA	ACAAAGACGG	CTCTACCACC	600	20
GAGATTGGCC	TGTGCTTGGA	TTTCTTCGAT	AGCTATAAGA	TCATCACGTG	650	
TGCTGAGAGC	CAGTTCCACA	ATTACGTTCA	TGATGTGGAT	CCAATGTTCT	700	
ACAAAATGGG	TGAAGAGTAT	GATTACGATA	CTTGCGGTAG	CCCACGCAC	750	
AAGCAGACCA	CCCTGGAGCT	GCGCTACCAA	TACAATGATA	TCTATATGCT	800	
GCGTGAAAGT	ATCGAACAGT	TTTACATTGA	CGGTTTATGT	GGCGGCGAGC	850	
TGCCGCTGAC	CGGCATGCGC	ACCGCTTCCA	GCATTGCGTT	CAACGTGCTG	900	
AAAAAGATGA	CCTTTGGTGA	GGAAAAGACG	GAAGAGGGCT	ACATCAACTA	950	
TTTTGAATTG	GACAAGAAAA	CCAAATTCGA	GTTTCTGCGT	AAGCGCATTG	1000	
AAATGGAATC	GTACACCGGT	GGCTATACGC	ACGCAAATCA	CAAAGCCGTT	1050	
GGTAAGACTA	TTAACAAGAT	CGGTTGCTCT	TTGGACATTA	ACAGCTCATA	1100	30
CCCTTCGCAG	ATGGCGTACA	AGGTCTTTCC	GTATGGCAAA	CCGGTTCGTA	1150	
AGACCTGGGG	TCGTAAACCA	AAGACCGAGA	AGAACGAAGT	TTATCTGATT	1200	
GAAGTTGGCT	TTGACTTCGT	GGAGCCGAAA	CACGAAGAAT	ACGCGCTGGA	1250	
TATCTTTAAG	ATTGGTGCGG	TGAACTCTAA	AGCGCTGAGC	CCGATCACCG	1300	
GCGCTGTCAG	CGGTCAAGAG	TATTTCTGTA	CGAACATTAA	AGACGGCAAA	1350	
GCAATCCCGG	TTTACAAAGA	ACTGAAGGAC	ACCAAATTGA	CCACTAACTA	1400	
CAATGTGCTG	CTGACCAGCG	TGGAGTACGA	GTTCTGGATC	AAACACTTCA	1450	
ATTTTGGTGT	GTTTAAGAAA	GACGAGTACG	ACTGTTTCGA	AGTTGACAAT	1500	
CTGGAGTTTA	CGGGTCTGAA	GATTGGTTCC	ATTCTGTACT	ACAAGGCAGA	1550	
GAAAGGCAAG	TTTAAACCTT	ACGTGGATCA	CTTCACGAAA	ATGAAAGTGG	1600	40
AGAACAAGAA	ACTGGGTAAAT	AAGCCGCTGA	CGAATCAGGC	AAAGCTGATT	1650	
CTGAACGGTG	CGTACGGCAA	ATTCGGCACC	AAACAAAACA	AAGAAGAGAA	1700	
AGATTTGATC	ATGGATAAGA	ACGGTTTGCT	GACCTTCACG	GGTAGCGTCA	1750	
CGGAATACGA	GGGTAAAGAA	TTCTATCGTC	CGTATGCGAG	CTTCGTTACT	1800	
GCCTATGGTC	GCCTGCAACT	GTGGAACGCG	ATTATCTACG	CGGTTGGTGT	1850	
GGAGAATTTT	CTGTA CTGCG	ACACCGACAG	CATCTATTGT	AACCGTGAAG	1900	
TTAACAGCCT	CATTGAGGAT	ATGAACGCCA	TTGGTGAAAC	CATCGATAAA	1950	
ACGATTCTGG	GTAAATGGGA	CGTGGAGCAT	GTCTTTGATA	AGTTTAAGGT	2000	
CCTGGGCCAG	AAGAAGTACA	TGTATCATGA	TTGCAAAGAA	GATAAAACGG	2050	
ACCTGAAGTG	TTGCGGTCTG	CCGAGCGATG	CCCGTAAGAT	TATCATTGGT	2100	50

CAAGGTTTCG ACGAGTTTTA TCTGGGCAAA AATGTCGAAG GTAAGAAGCA 2150
 ACGCAAAAAA GTGATCGGCG GTTGCCTGCT GCTGGACACC CTGTTTACGA 2200
 TCAAGAAAAAT CATGTTCTAA 2220

先行技術文献

特許文献

[1] PCT/US2005/009702 (published as WO2006/028508 on 16 March 2006; President and Fellows of Harvard College; entitled METHODS AND APPARATUS FOR CHARACTERIZING POLYNUCLEOTIDES).

[2] PCT/US2011/065640 (published as WO2012/083249 on 21 June 2012; Columbia University; entitled DNA SEQUENCING BY SYNTHESIS USING MODIFIED NUCLEOTIDES AND NANOPORE DETECTION).

[3] PCT/US2013/068967 (published as WO2014/074727 on 15 May 2014; Genia Technologies; entitled NUCLEIC ACID SEQUENCING USING TAGS).

[4] PCT/US2013/046012 (Genia Technologies, Inc., entitled CHIP SET-UP AND HIGH-ACCURACY NUCLEIC ACID SEQUENCING, published 19 Dec 2013 as WO2013/188841).

[5] US 2013/0053544 (Isis Innovation Limited) entitled Peptide Tag Systems That Spontaneously Form an Irreversible Link to Protein Partners via Isopeptide Bonds, published 28 February 2013.

非特許文献

[1] Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. (1990) 215:403-410.

[2] Altschul, S. F., et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997.

[3] Ausubel, Frederick et al., (1992) Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Molecular Biology, 2nd ed., Greene Publishing Associates & John Wiley & Sons. New York, N.Y.

[4] Gardner et al., Nucleic Acids Res. (2012) pages 1-12 (doi: 10.1093/nar/gks330; First published online: May 8, 2012).

[5] Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991).

[6] Johnson, et al., Biochim Biophys Acta . 2010 May; 1804(5):1041-1048.

[7] Kong et al. (1993) J. Biol. Chem. 268(3):1965-1975).

[8] Lawyer et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:6427-647.

[9] Li et al, Structural Analysis and Optimization of the Covalent Association between SpyCatcher and a Peptide Tag; J Mol Biol. (2014 Jan 23) 426(2):309-17.

[10] Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY).

[11] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) at 9.63-9.75 (describing end-labeling of nucleic acids).

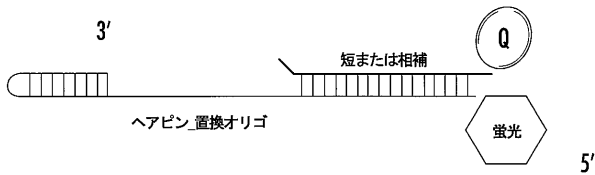
[12] Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2D ED., John Wiley and Sons, New York (1994).

[13] Watson, J. D. et al., In: Molecular Biology of the Gene, 4th Ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. (1987)).

[14] Zakari and Howarth, (2010) Spontaneous Intermolecular Amide Bond Formation between Side Chains for Irreversible Peptide Targeting, J. Am. Chem. Soc., 132(13):4526-4527.

[15] Zakari, B. et al., (2012) Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesion, PNAS 109 (12):E690-E697.

【図 1】



【図 2】

Kchemアッセイ

反応は、ストップフローまたはプレートリーダーを用いて行うことができる

シリンジA:

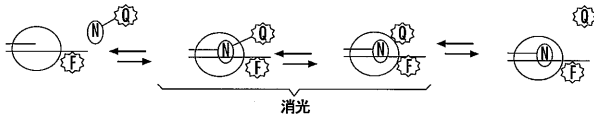
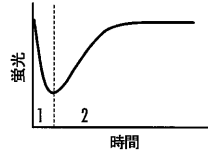
- ポリメラーゼ
- フルオレセイン標識鎖型/プライマー
- 75mM KCl, HEPES pH 7.5

シリンジB:

- MgCl₂
- dAnP-Cy3 (消光剤)
- 75mM KCl, pH 7.5

混合または注入時:

- ーポリメラーゼは三元複合体を形成し、Cy3はフルオレセインを消光する
- ーポリメラーゼはヌクレオチドを組み込み、切断産物を放出し、消光剤が付いたポリリン酸(dNPP-Cy3)が同時に放出される



【図 3】

Koffアッセイ

反応は、ストップフローまたはプレートリーダーを用いて行うことができる

シリンジA:

- ポリメラーゼ
- フルオレセイン標識鎖型/プライマー
- 75mM KCl, 25 HEPES pH 7.5
- CaCl₂
- dNPP-Cy3 (消光剤)

約10分プレインキュベーション

シリンジB:

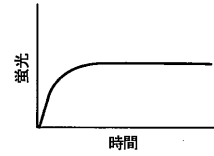
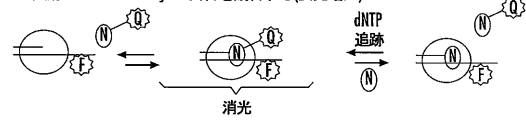
- CaCl₂
- dNTP (過剰で)
- 75mM KCl, 25mM HEPES pH 7.5

プレインキュベーション

ーdNPP-Cy3を加えると、ポリメラーゼは三元複合体を形成する(消光)。組み込みできない

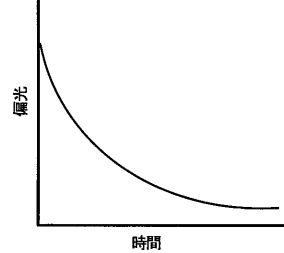
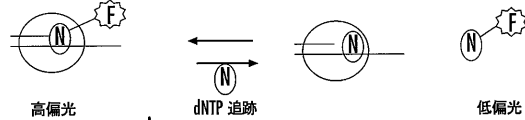
混合時:

ーdATP追跡:dNTPはdNPP-Cy3と会合を競合する(蛍光増加)

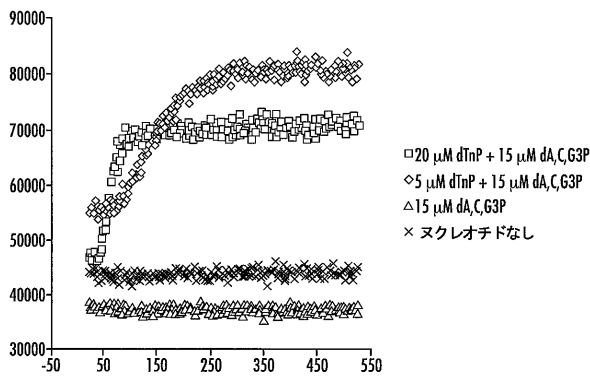


【図 4】

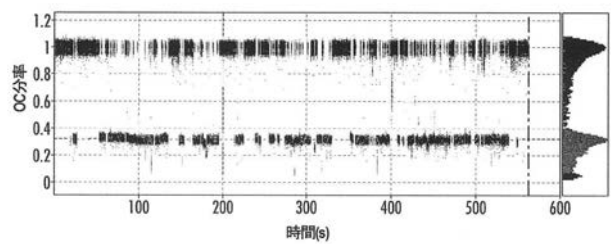
蛍光偏光に基づくKOFFアッセイ



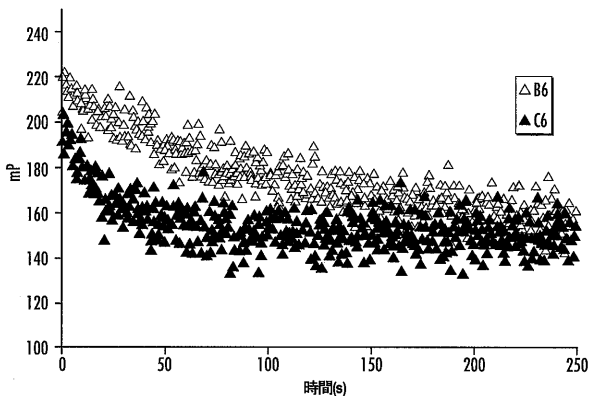
【図 5】



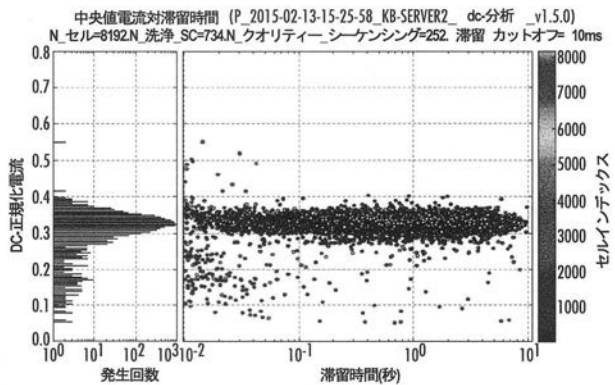
【図 7】



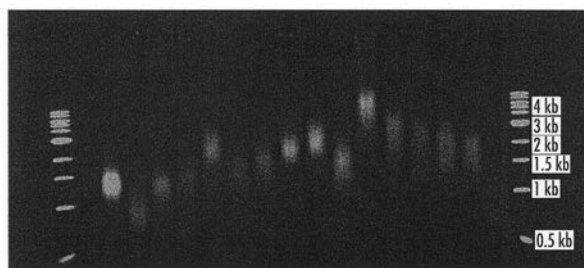
【図 6】



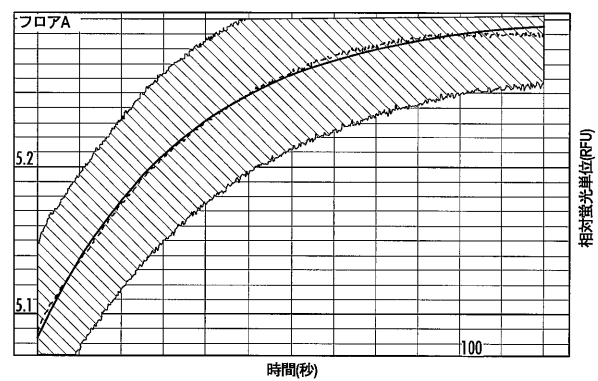
【図 8】



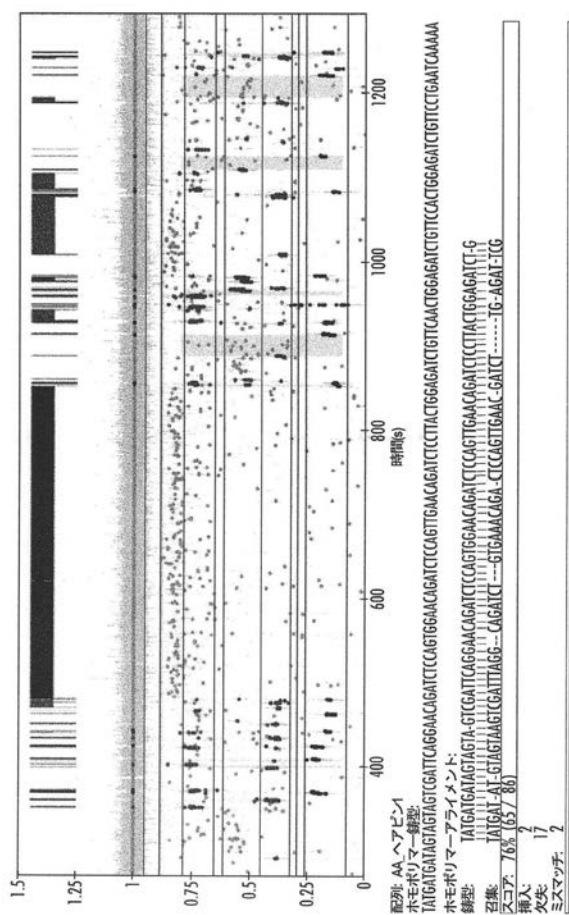
【 図 1 1 】



【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



【配列表】

2018515103000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/32258												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 1/00, C07K 14/00, C07K 17/00, C12N 9/12 (2016.01) CPC - A61K 38/00, C07K 14/47, C07K 2319/00, C07K 14/705, A61K 39/00, C12N 9/00, C12N 9/1252 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 1/00, C07K 14/00, C07K 17/00, C12N 9/12 (2016.01) CPC - A61K 38/00, C07K 14/47, C07K 2319/00, C07K 14/705, A61K 39/00, C12N 9/00, C12N 9/1252 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC- C12Y 207/07007 USPC- 530/350, 435/194, 435/6.12, 435/91.2, 435/91.5 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); PatBase, Google/Scholar: DNA polymerase, Clostridium perfringens, 3' 5' exonuclease activity, DNA_pol_B, Clostridium phage phiZP2, dsDNA viruses, Clostridium phage phiCPV4, Type B polymerase, I3PV37_9CAUD, GenBank NCBI JQ729991 [phi]CPV4... GenCore 6.4.1: SEQ ID NO:2														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category*</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">✓ Volozhanisev, et al. Molecular Characterization of Podoviral Bacteriophages Virulent for Clostridium perfringens and Their Comparison with Members of the Picovirinae. PLoS ONE 2012, 7:e38283-e38283; pg 3 col 1; pg 10, col 2;</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-6, 19, 23</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">✓ UniProt Submission I3PV37_9CAUD (01 April 2015) [Retrieved from the Internet 18 August 2016: <http://www.uniprot.org/uniprot/I3PV37.txt?version=12>]; 100% identity to SEQ ID NO:1</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-6, 19, 23</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">✓ Kranaster, et al. Taking fingerprints of DNA polymerases: multiplex enzyme profiling on DNA arrays. Angew Chem Int Ed Engl. 2009, 48(25):4625-4628; pg 4625, col 1; pg 4627</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-6, 19, 23</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	✓ Volozhanisev, et al. Molecular Characterization of Podoviral Bacteriophages Virulent for Clostridium perfringens and Their Comparison with Members of the Picovirinae. PLoS ONE 2012, 7:e38283-e38283; pg 3 col 1; pg 10, col 2;	1-6, 19, 23	A	✓ UniProt Submission I3PV37_9CAUD (01 April 2015) [Retrieved from the Internet 18 August 2016: <http://www.uniprot.org/uniprot/I3PV37.txt?version=12>]; 100% identity to SEQ ID NO:1	1-6, 19, 23	A	✓ Kranaster, et al. Taking fingerprints of DNA polymerases: multiplex enzyme profiling on DNA arrays. Angew Chem Int Ed Engl. 2009, 48(25):4625-4628; pg 4625, col 1; pg 4627	1-6, 19, 23
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	✓ Volozhanisev, et al. Molecular Characterization of Podoviral Bacteriophages Virulent for Clostridium perfringens and Their Comparison with Members of the Picovirinae. PLoS ONE 2012, 7:e38283-e38283; pg 3 col 1; pg 10, col 2;	1-6, 19, 23												
A	✓ UniProt Submission I3PV37_9CAUD (01 April 2015) [Retrieved from the Internet 18 August 2016: <http://www.uniprot.org/uniprot/I3PV37.txt?version=12>]; 100% identity to SEQ ID NO:1	1-6, 19, 23												
A	✓ Kranaster, et al. Taking fingerprints of DNA polymerases: multiplex enzyme profiling on DNA arrays. Angew Chem Int Ed Engl. 2009, 48(25):4625-4628; pg 4625, col 1; pg 4627	1-6, 19, 23												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family										
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 21 August 2016		Date of mailing of the international search report <div style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">28 NOV 2016</div>												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpline: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/32258

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

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

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

Group I+: claims 1-23, directed to a modified DNA polymerase having a DNA polymerase activity comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or 2. The modified DNA polymerase will be searched to the extent that it encompasses H223 mutation [NOTE: numeration is according to SEQ ID NO:2]. It is believed that claims 1-6, 19, 23 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a modified DNA polymerase having at least 70% sequence identity to the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or 2. The modified DNA polymerase and having a H223 mutation. An additional mutation(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected mutation(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an S366 mutation, i.e., claims 1-7, 19-23.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, 19, 23, restricted to a H223 mutation

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/32258

Supplemental Sheet

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The special technical feature of each invention of Group I+ is a specific mutation recited therein, because a nucleic acid sequence having at least 70% identity with SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2 was known in the art at the time of the invention (please see UniProt Submission I3PV37_9CAUD (01 April 2015) [Retrieved from the Internet 18 August 2016: <<http://www.uniprot.org/uniprot/I3PV37.txt?version=12>>] (hereinafter "UniProt") disclosing DNA polymerase of Clostridium phage phiCPV4, wherein amino acids 2-727 displays 100% identity to amino acids 2-727 of SEQ ID NO: 1 and amino acids 14-739 of SEQ ID NO: 2), and, therefore, no significant structural similarities can readily be ascertained among the mutations.

Common Technical Features

The inventions of Group I+ share the technical feature of a modified DNA polymerase having a DNA polymerase activity and at least 70% sequence identity to the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or 2. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being obvious over a paper titled "Molecular Characterization of Podoviral Bacteriophages Virulent for Clostridium perfringens and Their Comparison with Members of the Picovirinae" by Volozhantsev, et al. (PLoS ONE 2012, 7:e38283-e38283) (hereinafter "Volozhantsev") in view of a paper titled "Taking fingerprints of DNA polymerases: multiplex enzyme profiling on DNA arrays" by Kranaster, et al. (Angew Chem Int Ed Engl. 2009, 48(25):4625-8) (hereinafter "Kranaster") as follows:

Volozhantsev discloses a predicted DNA polymerase (pg 3, col 1, "The predicted Type B polymerases of all three phages were 727 amino acids in length and [phi]CPV4 and [phi]CP7R were more closely related (99% sequence similarity) than either one compared to the [phi]ZP2 (96% similar to [phi]CPV4 and [phi]CP7R). BLAST analyses revealed the three phage proteins were most closely related in sequence to the [phi]CPV1 [GenBank ADR30478; 36%] and [phi]CP24R [AEW47837; 34%] polymerases with overall similarity of 24% to other DNA polymerases of the Bacillus [phi]29-family") comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or 2 (pg 10, col 2, "GenBank NCBI accession numbers for the genomes were assigned as ... JQ729991 for [phi]CPV4", said genome comprising a nucleic acid encoding an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or 2 (see UniProt, as above, "DR EMBL; JQ729991... Genomic_DNA"; amino acids 2-727, 100% identity to amino acids 2-727 of SEQ ID NO: 1 and amino acids 14-739 of SEQ ID NO: 2). Volozhantsev neither discloses that said DNA polymerase is modified nor provides a motivation to do so. The motivation is provided by Kranaster disclosing a need for improved polymerases exhibiting altered properties (pg 4625, col 1, "customized and artificially engineered DNA polymerases that lead to more robust and specific reaction systems are urgently needed") and further disclosing a "microarray-based approach for DNA polymerase evolution which we term oligonucleotide-addressing enzyme assay (OAEA). First studies have proven the practicability of our approach and identified new DNA polymerase mutants with altered properties. In comparison with other known directed evolution approaches for DNA polymerases, OAEA offers several significant advantages. First, this approach allows the multiplex detection of various DNA polymerase activities in parallel under identical conditions. In addition, in OAEA each reaction can be duplicated readily. These features render OAEA reliable and less prone to false positives and negatives. Furthermore, all steps can be performed by automated pipetting devices, allowing high-throughput analysis requiring only minuscule amounts of reagents" (pg 4627, col 1 to col 2). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, Volozhantsev with Kranaster by applying the screening method of Kranaster to a library of mutagenized [phi]CPV4 DNA polymerase disclosed by, to achieve a customized DNA polymerase. As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the inventions.

The inventions of Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 15/151,364

(32)優先日 平成28年5月10日(2016.5.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 エイヤー, アルナ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 4, サンタ・クララ, ジャネラ・ストリート 2 3 1 6

(72)発明者 シュワブ, チャールズ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 0, サンタ・クララ, シビック・センター・ドライブ
9 8 9

(72)発明者 アーノルド, クレオマ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 0, サンタ・クララ, カレン・ドライブ 2 4 1 5, ア
partment 1

(72)発明者 レダーマン, イリア

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 1 6, サンフランシスコ, フォーティース・アベニュー
2 7 7 0

(72)発明者 タイ, アイリーン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 2, サンノゼ, オークランド・ロード 1 3 5 0, ナン
バー 8 2

(72)発明者 シュルツ, タイラー・オブライエン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 0, サンタ・クララ, スコット・ブルヴァード 2 8
4 1

(72)発明者 マクガー, コリン・アレクサンダー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 1, サンタ・クララ, フーバー・ドライブ 2 0 9 8

Fターム(参考) 4B050 CC03 CC04 DD20 FF01 FF14E LL10