

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7161291号

(P7161291)

(45)発行日 令和4年10月26日(2022.10.26)

(24)登録日 令和4年10月18日(2022.10.18)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/31

Z N A

C 0 7 K 14/245 (2006.01)

C 0 7 K 14/245

C 1 2 M 1/40 (2006.01)

C 1 2 M 1/40

B

C 1 2 Q 1/6825 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6825

Z

G 0 1 N 27/00 (2006.01)

G 0 1 N 27/00

J

請求項の数 17 (全195頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-512039(P2017-512039)

(86)(22)出願日 平成27年9月1日(2015.9.1)

(65)公表番号 特表2017-527284(P2017-527284

A)

(43)公表日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(86)国際出願番号 PCT/EP2015/069965

(87)国際公開番号 WO2016/034591

(87)国際公開日 平成28年3月10日(2016.3.10)

審査請求日 平成30年8月31日(2018.8.31)

審査番号 不服2020-16949(P2020-16949/J
1)

審査請求日 令和2年12月9日(2020.12.9)

(31)優先権主張番号 1415455.3

(32)優先日 平成26年9月1日(2014.9.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 514185600

ブイアイビー ブイゼットダブリュ

V I B V Z W

ベルギー王国 ビー - 9 0 5 2 ゲント、

リビシェストラート 1 2 0

R i j v i s s c h e s t r a a t 1

2 0 , B - 9 0 5 2 G e n t , B e

l g i u m

(73)特許権者 501180768

フリーエ・ユニヴェルシテイ・ブリ

ュッセル

V R I J E U N I V E R S I E I T B

R U S S E L

ベルギー国、1 0 5 0 ブリュッセル、

ブレインラン 2

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異体ポア

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定する方法であって、前記標的分析物がオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであり、

a . 前記標的分析物を絶縁膜内の C s g G ポアまたはその変異体と、前記標的分析物が前記ポア内または前記ポア付近に結合するかまたは前記ポアを通して移動するように接触させるステップであって前記変異体は、配列番号 3 9 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつポアを形成する能力を維持し、および、

b . 前記分析物が前記ポア内または前記ポア付近に結合するかまたは前記ポアを通して移動しているときに1回または複数回の電気的測定を行い、それによって前記分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定するステップ

を含み、

判定される前記特徴は、(i) 分析物の長さ、(i i) 分析物の同一性、および(i i i) 分析物の配列の少なくとも一つである、

方法。

【請求項 2】

前記標的分析物が、標的ポリヌクレオチドであり、ステップ a) が、前記ポリヌクレオチドをポリヌクレオチド結合タンパク質と、前記タンパク質が前記ポアを通る前記ポリヌクレオチドの移動をするように接触させることをさらに含み、任意で、前記ポリヌクレオチド結合タンパク質がヘリカーゼである、またはヘリカーゼに由来する、請求項 1 に記載

の方法。

【請求項 3】

前記 C s g G 変異体が、

(i) 配列番号 3 9 0 で示される配列のバリエーションを含む変異体 C s g G モノマーであって、前記バリエーションが、位置 Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 のうちの 1 つまたは複数に変異を含む、変異体 C s g G モノマー、または

(i i) 9 つのモノマーであって、該モノマーの少なくとも 1 つが配列番号 3 9 0 のバリエーションであり、前記バリエーションが、(a) 位置 N 4 0、Q 4 2、D 4 3、E 4 4、K 4 9、Y 5 1、S 5 4、N 5 5、F 5 6、S 5 7、Q 6 2、E 1 0 1、N 1 0 2、E 1 2 4、E 1 3 1、R 1 4 2、D 1 4 9、T 1 5 0、E 1 8 5、R 1 9 2、D 1 9 5、E 2 0 1 および E 2 0 3 のうちの 1 つもしくは複数における変異、ならびに / または (b) 位置 F 4 8、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5、F 5 6 および S 5 7 のうちの 1 つもしくは複数の欠失を含む、9 つのモノマーを含む、請求項 1 もしくは 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記バリエーションが、(i) 位置 N 4 0、D 4 3、E 4 4、S 5 4、S 5 7、Q 6 2、R 9 7、E 1 0 1、E 1 2 4、E 1 3 1、R 1 4 2、T 1 5 0 および R 1 9 2 における 1 つまたは複数の変異、(i i) Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6 または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 における変異、(i i i) Q 4 2 R または Q 4 2 K、(i v) K 4 9 R、(v) N 1 0 2 R、N 1 0 2 F、N 1 0 2 Y または N 1 0 2 W、(v i) D 1 4 9 N、D 1 4 9 Q または D 1 4 9 R、(v i i) E 1 8 5 N、E 1 8 5 Q または E 1 8 5 R、(v i i i) D 1 9 5 N、D 1 9 5 Q または D 1 9 5 R、(i x) E 2 0 1 N、E 2 0 1 Q または E 2 0 1 R、(x) E 2 0 3 N、E 2 0 3 Q または E 2 0 3 R、ならびに (x i) 位置 F 4 8、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5、F 5 6 および S 5 7 のうちの 1 つまたは複数の欠失のうちの 1 つまたは複数を含み、任意で、

20

(a) 前記バリエーションが、(i) において、置換 N 4 0 R、N 4 0 K、D 4 3 N、D 4 3 Q、D 4 3 R、D 4 3 K、E 4 4 N、E 4 4 Q、E 4 4 R、E 4 4 K、S 5 4 P、S 5 7 P、Q 6 2 R、Q 6 2 K、R 9 7 N、R 9 7 G、R 9 7 L、E 1 0 1 N、E 1 0 1 Q、E 1 0 1 R、E 1 0 1 K、E 1 0 1 F、E 1 0 1 Y、E 1 0 1 W、E 1 2 4 N、E 1 2 4 Q、E 1 2 4 R、E 1 2 4 K、E 1 2 4 F、E 1 2 4 Y、E 1 2 4 W、E 1 3 1 D、R 1 4 2 E、R 1 4 2 N、T 1 5 0 I、R 1 9 2 E および R 1 9 2 N のうちの 1 つもしくは複数を含む、

30

(b) 前記バリエーションが、(i i) において、

40

50

【化 1 - 1】

F56N/N55Q, F56N/N55R, F56N/N55K, F56N/N55S, F56N/N55G,
 F56N/N55A, F56N/N55T, F56Q/N55Q, F56Q/N55R, F56Q/N55K, F56Q/N55S, F56Q/N55G, F56Q/N55A,
 F56Q/N55T, F56R/N55Q, F56R/N55R, F56R/N55K, F56R/N55S, F56R/N55G, F56R/N55A, F56R/N55T,
 F56S/N55Q, F56S/N55R, F56S/N55K, F56S/N55S, F56S/N55G, F56S/N55A, F56S/N55T, F56G/N55Q,
 F56G/N55R, F56G/N55K, F56G/N55S, F56G/N55G, F56G/N55A, F56G/N55T, F56A/N55Q, F56A/N55R,
 F56A/N55K, F56A/N55S, F56A/N55G, F56A/N55A, F56A/N55T, F56K/N55Q, F56K/N55R, F56K/N55K,
 F56K/N55S, F56K/N55G, F56K/N55A, F56K/N55T, F56N/Y51L, F56N/Y51V, F56N/Y51A, F56N/Y51N,
 F56N/Y51Q, F56N/Y51S, F56N/Y51G, F56Q/Y51L, F56Q/Y51V, F56Q/Y51A, F56Q/Y51N, F56Q/Y51Q,
 F56Q/Y51S, F56Q/Y51G, F56R/Y51L, F56R/Y51V, F56R/Y51A, F56R/Y51N, F56R/Y51Q, F56R/Y51S,
 F56R/Y51G, F56S/Y51L, F56S/Y51V, F56S/Y51A, F56S/Y51N, F56S/Y51Q, F56S/Y51S, F56S/Y51G,
 F56G/Y51L, F56G/Y51V, F56G/Y51A, F56G/Y51N, F56G/Y51Q, F56G/Y51S, F56G/Y51G, F56A/Y51L,
 F56A/Y51V, F56A/Y51A, F56A/Y51N, F56A/Y51Q, F56A/Y51S, F56A/Y51G, F56K/Y51L, F56K/Y51V,
 F56K/Y51A, F56K/Y51N, F56K/Y51Q, F56K/Y51S, F56K/Y51G, N55Q/Y51L, N55Q/Y51V, N55Q/Y51A,
 N55Q/Y51N, N55Q/Y51Q, N55Q/Y51S, N55Q/Y51G, N55R/Y51L, N55R/Y51V, N55R/Y51A, N55R/Y51N,
 N55R/Y51Q, N55R/Y51S, N55R/Y51G, N55K/Y51L, N55K/Y51V, N55K/Y51A, N55K/Y51N, N55K/Y51Q,
 N55K/Y51S, N55K/Y51G, N55S/Y51L, N55S/Y51V, N55S/Y51A, N55S/Y51N, N55S/Y51Q, N55S/Y51S,
 N55S/Y51G, N55G/Y51L, N55G/Y51V, N55G/Y51A, N55G/Y51N, N55G/Y51Q, N55G/Y51S, N55G/Y51G,
 N55A/Y51L, N55A/Y51V, N55A/Y51A, N55A/Y51N, N55A/Y51Q, N55A/Y51S, N55A/Y51G, N55T/Y51L,
 N55T/Y51V, N55T/Y51A, N55T/Y51N, N55T/Y51Q, N55T/Y51S, N55T/Y51G, F56N/N55Q/Y51L,
 F56N/N55Q/Y51V, F56N/N55Q/Y51A, F56N/N55Q/Y51N, F56N/N55Q/Y51Q, F56N/N55Q/Y51S,
 F56N/N55Q/Y51G, F56N/N55R/Y51L, F56N/N55R/Y51V, F56N/N55R/Y51A, F56N/N55R/Y51N,
 F56N/N55R/Y51Q, F56N/N55R/Y51S, F56N/N55R/Y51G, F56N/N55K/Y51L, F56N/N55K/Y51V,
 F56N/N55K/Y51A, F56N/N55K/Y51N, F56N/N55K/Y51Q, F56N/N55K/Y51S, F56N/N55K/Y51G,
 F56N/N55S/Y51L, F56N/N55S/Y51V, F56N/N55S/Y51A, F56N/N55S/Y51N, F56N/N55S/Y51Q,
 F56N/N55S/Y51S, F56N/N55S/Y51G, F56N/N55G/Y51L, F56N/N55G/Y51V, F56N/N55G/Y51A,
 F56N/N55G/Y51N, F56N/N55G/Y51Q, F56N/N55G/Y51S, F56N/N55G/Y51G, F56N/N55A/Y51L,
 F56N/N55A/Y51V, F56N/N55A/Y51A, F56N/N55A/Y51N, F56N/N55A/Y51Q, F56N/N55A/Y51S,
 F56N/N55A/Y51G, F56N/N55T/Y51L, F56N/N55T/Y51V, F56N/N55T/Y51A, F56N/N55T/Y51N,
 F56N/N55T/Y51Q, F56N/N55T/Y51S, F56N/N55T/Y51G, F56Q/N55Q/Y51L, F56Q/N55Q/Y51V,
 F56Q/N55Q/Y51A, F56Q/N55Q/Y51N, F56Q/N55Q/Y51Q, F56Q/N55Q/Y51S, F56Q/N55Q/Y51G,
 F56Q/N55R/Y51L, F56Q/N55R/Y51V, F56Q/N55R/Y51A, F56Q/N55R/Y51N, F56Q/N55R/Y51Q,
 F56Q/N55R/Y51S, F56Q/N55R/Y51G, F56Q/N55K/Y51L, F56Q/N55K/Y51V, F56Q/N55K/Y51A, F56Q
 /N55K/Y51N, F56Q/N55K/Y51Q, F56Q/N55K/Y51S, F56Q/N55K/Y51G, F56Q/N55S/Y51L,
 F56Q/N55S/Y51V, F56Q/N55S/Y51A, F56Q/N55S/Y51N, F56Q/N55S/Y51Q, F56Q/N55S/Y51S,
 F56Q/N55S/Y51G, F56Q/N55G/Y51L, F56Q/N55G/Y51V, F56Q/N55G/Y51A, F56Q/N55G/Y51N,
 F56Q/N55G/Y51Q, F56Q/N55G/Y51S, F56Q/N55G/Y51G, F56Q/N55A/Y51L, F56Q/N55A/Y51V,
 F56Q/N55A/Y51A, F56Q/N55A/Y51N, F56Q/N55A/Y51Q, F56Q/N55A/Y51S, F56Q/N55A/Y51G,
 F56Q/N55T/Y51L, F56Q/N55T/Y51V, F56Q/N55T/Y51A, F56Q/N55T/Y51N, F56Q/N55T/Y51Q,
 F56Q/N55T/Y51S, F56Q/N55T/Y51G, F56R/N55Q/Y51L, F56R/N55Q/Y51V, F56R/N55Q/Y51A,
 F56R/N55Q/Y51N, F56R/N55Q/Y51Q, F56R/N55Q/Y51S, F56R/N55Q/Y51G, F56R/N55R/Y51L,

10

20

30

40

50

[illegible]

40

【化 1 - 3】

F56K/N55S/Y51V, F56K/N55S/Y51A, F56K/N55S/Y51N, F56K/N55S/Y51Q, F56K/N55S/Y51S,
 F56K/N55S/Y51G, F56K/N55G/Y51L, F56K/N55G/Y51V, F56K/N55G/Y51A, F56K/N55G/Y51N,
 F56K/N55G/Y51Q, F56K/N55G/Y51S, F56K/N55G/Y51G, F56K/N55A/Y51L, F56K/N55A/Y51V,
 F56K/N55A/Y51A, F56K/N55A/Y51N, F56K/N55A/Y51Q, F56K/N55A/Y51S, F56K/N55A/Y51G,
 F56K/N55T/Y51L, F56K/N55T/Y51V, F56K/N55T/Y51A, F56K/N55T/Y51N,
 F56K/N55T/Y51Q, F56K/N55T/Y51S, F56K/N55T/Y51G, F56E/N55R, F56E/N55K, F56D/N55R,
 F56D/N55K, F56R/N55E, F56R/N55D, F56K/N55E または F56K/N55D

10

を含む、ならびに / または

(c) 前記バリエーションが、(x i) において、Y 5 1 / P 5 2 の欠失、Y 5 1 / P 5 2 / A 5 3 の欠失、P 5 0 ~ P 5 2 の欠失、P 5 0 ~ A 5 3 の欠失、K 4 9 ~ Y 5 1 の欠失、K 4 9 ~ A 5 3 の欠失および単一のプロリン (P) での置換、K 4 9 ~ S 5 4 の欠失および単一の P での置換、Y 5 1 ~ A 5 3 の欠失、Y 5 1 ~ S 5 4 の欠失、N 5 5 / F 5 6 の欠失、N 5 5 ~ S 5 7 の欠失、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の P での置換、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一のグリシン (G) での置換、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一のアラニン (A) での置換、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の P での置換および Y 5 1 N、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の P での置換および Y 5 1 Q、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の P での置換および Y 5 1 S、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の G での置換および Y 5 1 N、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の G での置換および Y 5 1 Q、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の G での置換および Y 5 1 S、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の A での置換および Y 5 1 N、N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の A での置換、Y 5 1 Q、もしくは N 5 5 / F 5 6 の欠失および単一の A での置換および Y 5 1 S を含む、請求項 3 (i i) に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記バリエーションが、

30

40

50

【化 2 - 1】

D195N/E203N,

D195Q/E203N, D195N/E203Q, D195Q/E203Q, E201N/E203N, E201Q/E203N, E201N/E203Q,
 E201Q/E203Q, E185N/E203Q, E185Q/E203Q, E185N/E203N, E185Q/E203N, D195N/E201N/E203N,
 D195Q/E201N/E203N, D195N/E201Q/E203N, D195N/E201N/E203Q, D195Q/E201Q/E203N,
 D195Q/E201N/E203Q, D195N/E201Q/E203Q, D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E201N, D149Q/E201N,
 D149N/E201Q, D149Q/E201Q, D149N/E201N/D195N, D149Q/E201N/D195N, D149N/E201Q/D195N,
 D149N/E201N/D195Q, D149Q/E201Q/D195N, D149Q/E201N/D195Q, D149N/E201Q/D195Q,
 D149Q/E201Q/D195Q, D149N/E203N, D149Q/E203N, D149N/E203Q, D149Q/E203Q,
 D149N/E185N/E201N, D149Q/E185N/E201N, D149N/E185Q/E201N, D149N/E185N/E201Q,
 D149Q/E185Q/E201N, D149Q/E185N/E201Q, D149N/E185Q/E201Q, D149Q/E185Q/E201Q,
 D149N/E185N/E203N, D149Q/E185N/E203N, D149N/E185Q/E203N, D149N/E185N/E203Q,
 D149Q/E185Q/E203N, D149Q/E185N/E203Q, D149N/E185Q/E203Q, D149Q/E185Q/E203Q,
 D149N/E185N/E201N/E203N, D149Q/E185N/E201N/E203N, D149N/E185Q/E201N/E203N,
 D149N/E185N/E201Q/E203N, D149Q/E185N/E201N/E203Q, D149Q/E185Q/E201N/E203N,
 D149Q/E185N/E201Q/E203N, D149Q/E185N/E201N/E203Q, D149N/E185Q/E201Q/E203N,
 D149N/E185Q/E201N/E203Q, D149N/E185N/E201Q/E203Q, D149Q/E185Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185Q/E201N/E203Q, D149Q/E185N/E201Q/E203Q, D149N/E185Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185Q/E201Q/E203N, D149N/E185N/D195N/E201N/E203N,
 D149Q/E185N/D195N/E201N/E203N, D149N/E185Q/D195N/E201N/E203N,
 D149N/E185N/D195Q/E201N/E203N, D149N/E185N/D195N/E201Q/E203N,
 D149N/E185N/D195N/E201N/E203Q, D149Q/E185Q/D195N/E201N/E203N,
 D149Q/E185N/D195Q/E201N/E203N, D149Q/E185N/D195N/E201Q/E203N,
 D149Q/E185N/D195N/E201N/E203Q, D149N/E185Q/D195Q/E201N/E203N,
 D149N/E185Q/D195N/E201Q/E203N, D149N/E185Q/D195N/E201N/E203Q,
 D149N/E185N/D195Q/E201Q/E203N, D149N/E185N/D195Q/E201N/E203Q,

10

20

30

40

50

【化 2 - 2】

D149N/E185N/D195N/E201Q/E203Q, D149Q/E185Q/D195Q/E201N/E203N,
 D149Q/E185Q/D195N/E201Q/E203N, D149Q/E185Q/D195N/E201N/E203Q,
 D149Q/E185N/D195Q/E201Q/E203N, D149Q/E185N/D195Q/E201N/E203Q,
 D149Q/E185N/D195N/E201Q/E203Q, D149N/E185Q/D195Q/E201Q/E203N,
 D149N/E185Q/D195Q/E201N/E203Q, D149N/E185Q/D195N/E201Q/E203Q,
 D149N/E185N/D195Q/E201Q/E203Q, D149Q/E185Q/D195Q/E201Q/E203N,
 D149Q/E185Q/D195Q/E201N/E203Q, D149Q/E185Q/D195N/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185N/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/E201N/E203N, D149Q/E185R/E201N/E203N,
 D149N/E185R/ E201Q/E203N, D149N/E185R/ E201N/E203Q, D149Q/E185R/ E201Q/E203N,
 D149Q/E185R/ E201N/E203Q, D149N/E185R/ E201Q/E203Q, D149Q/E185R/ E201Q/E203Q,
 D149R/E185N/ E201N/E203N, D149R/E185Q/ E201N/E203N, D149R/E185N/ E201Q/E203N,
 D149R/E185N/ E201N/E203Q, D149R/E185Q/ E201Q/E203N, D149R/E185Q/ E201N/E203Q,
 D149R/E185N/ E201Q/E203Q, D149R/E185Q/ E201Q/E203Q, D149R/E185N/D195N/E201N/E203N,
 D149R/E185Q/D195N/E201N/E203N, D149R/E185N/D195Q/E201N/E203N,
 D149R/E185N/D195N/E201Q/E203N, D149R/E185Q/D195N/E201N/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201N/E203N, D149R/E185Q/D195N/E201Q/E203N,
 D149R/E185Q/D195N/E201N/E203Q, D149R/E185N/D195Q/E201Q/E203N,
 D149R/E185N/D195Q/E201Q/E203Q, D149R/E185Q/D195Q/E201N/E203Q,
 D149R/E185Q/D195N/E201Q/E203Q, D149R/E185N/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201N/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201N/E203N, D149N/E185R/D195Q/E201N/E203N,
 D149N/E185R/D195N/E201Q/E203N, D149N/E185R/D195N/E201N/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201N/E203N, D149Q/E185R/D195N/E201Q/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201N/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201Q/E203N,
 D149N/E185R/D195Q/E201N/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201Q/E203N, D149Q/E185R/D195Q/E201N/E203Q,
 D149Q/E185R/D195N/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201R/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201R/E203N, D149N/E185R/D195Q/E201R/E203N,
 D149N/E185R/D195N/E201R/E203Q, D149Q/E185R/D195Q/E201R/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201R/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201R/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201R/E203Q, E131D/K49R, E101N/N102F, E101N/N102Y, E101N/N102W,
 E101F/N102F, E101F/N102Y, E101F/N102W, E101Y/N102F, E101Y/N102Y, E101Y/N102W,
 E101W/N102F, E101W/N102Y, E101W/N102W, E101N/N102R, E101F/N102R, E101Y/N102Rまたは
 E101W/N102F.

10

20

30

40

を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記バリエーションが、T 1 5 0 に変異を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記バリエーションが、置換 (i) F 5 6 N , F 5 6 Q , F 5 6 R , F 5 6 S , F 5 6 G ,
 F 5 6 A または F 5 6 K または F 5 6 A , F 5 6 P , F 5 6 R , F 5 6 H , F 5 6 S , F
 5 6 Q , F 5 6 I , F 5 6 L , F 5 6 T または F 5 6 G 、 (i i) N 5 5 Q , N 5 5 R ,
 N 5 5 K , N 5 5 S , N 5 5 G , N 5 5 A または N 5 5 T 、 (i i i) Y 5 1 L , Y 5 1
 V , Y 5 1 A , Y 5 1 N , Y 5 1 Q , Y 5 1 S または Y 5 1 G 、 (i v) T 1 5 0 I 、 (v) S 5 4 P 、および (v i) S 5 7 P のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 3 (i i

50

）に記載の方法。

【請求項 8】

標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーであって、C s g G ポアまたはその変異体とポリヌクレオチド結合タンパク質との複合体を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のためのセンサー。

【請求項 9】

C s g G 変異体が、請求項 3 ～ 7 のいずれか一項で定義されたものである、請求項 8 に記載のセンサー。

【請求項 10】

標的分析物を特徴づけるためのキットであって、(a) C s g G ポアまたはその変異体と (b) 膜の成分とを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のためのキット。

10

【請求項 11】

C s g G 変異体が、請求項 3 ～ 7 のいずれか一項で定義されたものである、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

配列番号 390 で示される配列のバリエーションを含む変異体 C s g G モノマーを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のための組成物であって、

(a) 前記バリエーションが、以下における変異：

(i) Y51、ここで変異は、F、M、L、I、V、A、P、G、C、N、T、S、E、D、K、H もしくは R による置換であり、

20

(i i) N55、ここで変異は、F、M、L、I、V、P、G、C、Q、T、E、D、K、H もしくは R による置換であり、

(i i i) F56、

(i v) Y51 および N55、ここで変異は Y51 Q および N55 S ではなく、

(v) Y51 および F56、

(v i) N55 および F56、または

(v i i) Y51、N55 および F56 を含み、または、

(b) 前記バリエーションが、Y51 Q および N55 S 以外の、請求項 4 または 5 に定義されたものである、

30

組成物。

【請求項 13】

2 つ以上の共有結合 C s g G モノマーを含む構築物を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のための組成物であって、前記モノマーの少なくとも 1 つが、請求項 12 に規定される変異体モノマーである、組成物。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの C s g G モノマーを含む修飾 C s g G ポアを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のための組成物であって、前記モノマーが、配列番号 390 で示される配列の 38 ～ 63 位の間の修飾を含む、組成物。

【請求項 15】

40

(a) 前記ポアが、請求項 12 (a) に規定されるモノマーを含む、または、

(b) 前記モノマーが、配列番号 4 ～ 388 による 38 ～ 63 位のポリペプチド配列を有する、

請求項 14 に記載の修飾 C s g G 組成物。

【請求項 16】

請求項 12 に規定される同一の変異体モノマーまたは請求項 13 に規定される同一の構築物を含む、ホモオリゴマー修飾 C s g G ポアを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のための組成物。

【請求項 17】

請求項 12 に規定される変異体 C s g G モノマーをコードするポリヌクレオチドを含む

50

、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規タンパク質ポアおよびそれらの使用に関する。詳細には、本発明は、核酸シーケンシング用途および分子センシングにおける生体ナノポアに関する。

【0002】

本発明は、C s g G の変異型に関する。本発明は、C s g G を使用する分析物の検出および特徴づけにも関する。

【背景技術】

【0003】

タンパク質ポアは、膜貫通ポリペプチドであり、その膜内でイオンおよびある特定の分子が通過しうるチャネルを形成している複合体である。このチャネルの最小直径は、通常はナノメートル (10^{-9} メートル) 範囲であり、したがって、これらのポリペプチドの一部は「ナノポア」と名づけられている。

【0004】

ナノポアには、生体センサーとしての大きな可能性がある。膜結合ナノポアを介して電氣的電位を印加すると、イオンがチャネルを通して流れる。イオンのこの流れを電流として測定することができる。単一チャネル記録機器を使用する好適な電氣的測定技術は、例えば、国際公開第 2000/28312 号パンフレットおよび D. Stoddart et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2010, 106, 7702-7 に記載されている。多チャネル記録技術は、例えば、国際公開第 2009/077734 号パンフレットに記載されている。

【0005】

ポアによって翻訳するまたはポア内もしくは付近に結合する分子は、チャネルを通るイオン流を妨げることによってそのイオン流を低減させるように作用する。電流の低減によって測定されるイオン流の低減の程度は、ポア内のまたはポアの付近の妨害の大きさを示す。したがって、測定される電流をチャネルに対する妨害の大きさおよび程度の測度として使用することができる。電流の変化は、分子または分子の一部がポア内もしくは付近に結合したことの同定 (分子センシング) に使用することができ、またはある特定のシステムでは、ポア内に存在する分子の正体のそのサイズに基づく判定 (核酸シーケンシング) に使用することができる。

【0006】

生体ナノポアを使用して核酸をシーケンシングする「鎖シーケンシング」法は公知である。1本のポリヌクレオチド鎖をナノポアに通過させることで、個々のヌクレオチド上の塩基を、それらがナノポアのチャネルを一時的に通過するとき測定される電流の変化によって判定する。この方法は、核酸シーケンシングの旧来の方法に比べて有意な時間およびコスト節約をもたらす。

【0007】

以前に報告されたタンパク質ナノポア、例えば、変異体 M s p A (Manrao et al., Nature Biotechnology, 2012, 30(4), 349-353) およびアルファ溶血素ナノポア (Nat. Nanotechnol., 2009, 4(4), 265-70) は、「鎖シーケンシング」アプローチを使用する核酸シーケンシングに使用されている。同様に、タンパク質センシングに他のポア、例えば、アルファ溶血素 (J Am Chem Soc, 2012, 134(5), 2781-7) および C l y A (Am. Chem. Soc. Nano. 2014, 8(12), 12826-35) (J. Am. Chem. Soc, 2013, 135(36), 13456-63) も適応されている。

【0008】

先行技術の不足、特に、分子センシング用途および例えば核酸シーケンシング用途のためのポアの寸法および特徴の最適化の点での先行技術の不足を克服する新規ナノポアが依然として必要とされている。

【0009】

10

20

30

40

50

ナノポアセンシングは、分析物分子と受容体との個々の結合または相互作用事象の観察に依存するセンシングへのアプローチである。ナノポアセンサーは、ナノメートル寸法の単一ポアを絶縁膜内に配置し、そのポアを通る電圧依存性イオン輸送を分析物分子の存在下で測定することによって、作り出すことができる。分析物の正体は、その特有の電流兆候、特に、電流遮断の継続時間および程度ならびに電流レベルの変動によって明らかにされる。

【 0 0 1 0 】

迅速で安価な核酸（例えばDNAまたはRNA）シーケンシング技術が、現今、幅広い用途にわたって必要とされている。既存の技術は、時間がかかり、費用がかかり、その主な理由は、それらの技術が、大量の核酸の産生を増幅技術に頼り、シグナル検出に多量の専門蛍光化学物質を必要とすることにある。ナノポアセンシングには、要求ヌクレオチドおよび試薬量を低減させることによって迅速で安価な核酸シーケンシングを提供する可能性がある。

10

【 0 0 1 1 】

ナノポアセンシングを使用する核酸のシーケンシングの必須要素のうちの2つは、（1）ポアを通る核酸の移動の制御および（2）ポアを通して核酸ポリマーを移動させながらのヌクレオチドの識別である。従来、ヌクレオチド識別を果たすために、核酸を溶血素の変異体に通してきた。これによって電流兆候が得られており、そのような電流兆候は、配列依存性であることが証明されている。溶血素ポアを使用すると多数のヌクレオチドが観測電流に寄与して、観測電流とポリヌクレオチドとの直接的関連を困難にすることも証明されている。

20

【 0 0 1 2 】

ヌクレオチド識別のための電流範囲は、溶血素ポアの変異によって改善されたが、ヌクレオチド間の電流の違いをさらに改善することができればシーケンシングシステムはより高い性能を有することになる。加えて、ポアを通して核酸を移動させたとき、一部の電流状態はより大きな変動を示すことが観測されている。一部の変異体溶血素ポアが他のものより大きい変動を示すことも証明されている。これらの状態の変動は配列特異的情報を有することもあるが、システムを単純にするために変動が小さいポアを生じさせることが望ましい。観測電流に寄与するヌクレオチドの数を低減させることも望ましい。

【 発明の概要 】

30

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 3 】

本発明者らは、細菌アミロイド分泌チャネルCsgGの構造を同定した。CsgGチャネルは、およそ0.9 nmの最小直径を有するチャネルを形成する膜貫通オリゴマータンパク質である。CsgGナノポアのこの構造のため、CsgGナノポアは、タンパク質センシング用途、特に、核酸センシングにおける使用に好適である。CsgGポリペプチドの修飾バージョンは、そのような特定の用途に対するそのチャネルの適合性をさらに向上させるのに役立つことができる。

【 0 0 1 4 】

CsgGポアは、その構造がDNAセンシング用途に好都合である点でClyAまたはアルファ溶血素などの既存のタンパク質ポアより有利である。CsgGポアは、ClyAより有利なアスペクト比を有し、その結果、ClyAより短い膜貫通チャネルを含む。CsgGポアは、アルファ溶血素ポアと比較して広いチャネル開口部も有する。これは、ある特定の用途、例えば、核酸シーケンシング用途のための酵素の結合を助長することができる。これらの実施形態では、それは、酵素と読み取りヘッド（最も狭いポア部分と定義する）の間に位置する核酸鎖部分の長さを最小化し、その結果、読み出しシグナルを向上させることもできる。CsgGポアのチャネルの狭い内部狭窄は、核酸シーケンシングを含む本発明の実施形態では、一本鎖DNAの移行も助長する。この狭窄は、隣接タンパク質モノマーにおける51位のチロシン残基（Tyr51）の並置ならびにまた56および55位のそれぞれフェニルアラニンおよびアスパラギン残基（Phe56およびAsp

40

50

n 5 5) によって形成される 2 つの輪状の環で作られる。この狭窄の寸法を変更することができる。C l y A は、現在はシーケンシングに使用されない二本鎖 DNA の通過を可能にする、はるかに広い内部狭窄を有する。アルファ溶血素ポアは、1 つの 1 . 3 n m 幅内部狭窄を有するが、さらなる読み取りヘッドを特徴とする 2 n m 幅ベータバレルも有する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

第 1 の態様では、本発明は、分子センシングのための方法であって、

a) 少なくとも 1 つの C s g G モノマーで形成される C s g G 生体ポアを絶縁層内に設けるステップ、

b) 絶縁層を介して電氣的電位を印加し、それによって生体ポアを通る電流の流れを確立するステップ、

c) C s g G 生体ポアを試験基質と接触させるステップ、および

d) 生体ポアを通る電流の流れを測定するステップ

を含む方法に関する。

【0016】

通常、絶縁層は、脂質二重層などの膜である。実施形態では、ポアを通る電流は、絶縁層の第 1 の側面から絶縁層の第 2 の側面への可溶性イオンの流れによって搬送される。

【0017】

本発明の実施形態では、分子センシングは、分析物検出である。特定の実施形態では、分析物を検出するための方法は、ステップ (d) の後に、試験基質が不在であるときに生体ポアを通る電流と比較して生体ポアを通る電流を低減させることによって試験基質の存在を判定するさらなるステップを含む。

【0018】

本発明の代替実施形態では、分子センシングは、核酸シーケンシングである。通常は、前記方法によってシーケンシングされる核酸のタイプは、DNA または RNA である。本発明の特異的实施形態では、C s g G 生体ポアは、さらなるアクセサリタンパク質に順応するように適合される。通常は、さらなるアクセサリタンパク質は、DNA または RNA ポリメラーゼ、イソメラーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、テロメラーゼ、エキソヌクレアーゼ、およびヘリカーゼからなる群から選択される、核酸プロセッシング酵素である。

【0019】

本発明の実施形態では、C s g G 生体ポアは、修飾 C s g G ポアであり、修飾 C s g G ポアは、C s g G ポアを形成する C s g G モノマーの少なくとも 1 つにおけるモノマー野生型大腸菌 (E - coli) C s g G ポリペプチド配列に少なくとも 1 つの修飾を有する。通常は、C s g G ポアを形成する C s g G モノマーすべてに同じ修飾が施される。本発明の特定の実施形態では、修飾 C s g G モノマーは、配列番号 4 ~ 3 8 8 による 3 8 ~ 6 3 位のポリペプチド配列を有する。

【0020】

第 2 の態様では、本発明は、少なくとも 1 つの C s g G モノマーを含む修飾 C s g G 生体ポアであって、0 . 5 n m ~ 1 . 5 n m の範囲の直径を有するチャネル狭窄を 1 つしか有さない修飾 C s g G 生体ポアに関する。通常は、C s g G モノマーのポリペプチド配列の 3 8 ~ 6 3 位に修飾がある。好適には、T y r 5 1、A s n 5 5 および P h e 5 6 から選択される位置に修飾がある。特定の実施形態では、位置 T y r 5 1 に修飾があるか、位置 A s n 5 5 と P h e 5 6 の両方に修飾がある。

【0021】

本発明の実施形態では、C s g G モノマーへの修飾は、天然に存在するアミノ酸の置換、天然に存在するアミノ酸の欠失、および天然に存在するアミノ酸側鎖の修飾からなる群から選択される。好適には、修飾によって未修飾アミノ酸の立体障害が低減または除去される。特異的实施形態では、ポアの少なくとも 1 つの C s g G モノマーは、配列番号 4 ~

10

20

30

40

50

388による38～63位のポリペプチド配列を有する。

【0022】

第3の態様では、本発明は、本発明の第2の態様の修飾C s g G生体ポアの少なくとも1つのC s g Gモノマーをコードする単離されたポリペプチドに関する。

【0023】

第4の態様では、本発明は、本発明の第3の態様の単離されたポリペプチドをコードする単離された核酸に関する。

【0024】

第5の態様では、本発明は、

- a) 絶縁層と、
- b) 絶縁層内のC s g G生体ポアと、
- c) 生体ポアを通る電流を測定するための装置と

を含むバイオセンサーに関する。

【0025】

特定の実施形態では、バイオセンサー内のC s g G生体ポアは、本発明の第2の態様による修飾C s g G生体ポアである。

【0026】

第6の態様では、本発明は、生体センシング用途のためのC s g G生体ポアの使用に関し、生体センシング用途は、分析物検出または核酸シーケンシングである。本発明の第6の態様の実施形態では、核酸シーケンシングは、DNAシーケンシングまたはRNAシーケンシングである。

【0027】

本発明者らは、驚くべきことに、C s g Gおよびその新規変異体をポリヌクレオチドなどの分析物の特徴づけに使用することができる可能性があることを立証した。本発明は、変異体C s g Gモノマーであって、ポリヌクレオチドなどの分析物と相互作用するそのモノマーの能力を向上させるために1つまたは複数の修飾が施された変異体C s g Gモノマーに関する。本発明者らは、驚くべきことに、新規変異体モノマーを含むポアは、ポリヌクレオチドなどの分析物との相互作用能力が向上されており、したがって、ポリヌクレオチドの配列などの分析物の特徴を推定する特性の向上を示すことも立証した。変異体ポアは、ヌクレオチド識別の向上を驚くほど示した。詳細には、変異体ポアは、異なるヌクレオチド間の識別をより容易にする電流範囲の増加、およびシグナル対ノイズ比を増加させる状態変動の低減を、驚くほど示した。加えて、ポアを通してポリヌクレオチドが移動しているときに電流に寄与するヌクレオチドの数が減少される。これは、ポアを通してポリヌクレオチドが移動しているときに観測される電流とポリヌクレオチドとの直接的関連の同定をより容易にする。加えて、変異体ポアは、スループット増加を示すこともあり、すなわち、ポリヌクレオチドなどの分析物と相互作用する可能性がより高い。これは、ポアを使用する分析物の特徴づけをより容易にする。変異体ポアは、より容易に膜に入ることができる。

【0028】

したがって、本発明は、配列番号390で示される配列のバリエーションを含む変異体C s g Gモノマーであって、バリエーションが位置Y51、N55およびF56のうちの1つもしくは複数に修飾を含む、変異体C s g Gモノマーを提供する。

【0029】

したがって、本発明は、配列番号390で示される配列のバリエーションを含む変異体C s g Gモノマーであって、バリエーションが以下の1つまたは複数を含む、変異体C s g Gモノマーを提供する：(i) 次の位置における1つもしくは複数の変異(すなわち、次の位置の1つもしくは複数における変異)：N40、D43、E44、S54、S57、Q62、R97、E101、E124、E131、R142、T150およびR192、(ii) Y51/N55、Y51/F56、N55/F56もしくはY51/N55/F56における変異、(iii) Q42RもしくはQ42K、(iv) K49R、(v) N102

10

20

30

40

50

R、N 1 0 2 F、N 1 0 2 YもしくはN 1 0 2 W、(v i) D 1 4 9 N、D 1 4 9 QもしくはD 1 4 9 R、(v i i) E 1 8 5 N、E 1 8 5 QもしくはE 1 8 5 R、(v i i i) D 1 9 5 N、D 1 9 5 QもしくはD 1 9 5 R、(i x) E 2 0 1 N、E 2 0 1 QもしくはE 2 0 1 R、(x) E 2 0 3 N、E 2 0 3 QもしくはE 2 0 3 R、ならびに(x i) 位置 F 4 8、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5、F 5 6およびS 5 7の1つもしくは複数の欠失。

【 0 0 3 0 】

本発明は、

- 共有結合している2つ以上のC s g Gモノマーを含む構築物であって、モノマーの少なくとも1つが本発明の変異体モノマーである、構築物、

10

- 本発明の変異体モノマーまたは本発明の構築物をコードするポリヌクレオチド、

- 本発明の同一の変異体モノマーまたは本発明の同一の構築物を含むC s g Gに由来するホモオリゴマーポア、

- 本発明の少なくとも1つの変異体モノマーまたは本発明の少なくとも1つの構築物を含むC s g Gに由来するヘテロオリゴマーポア、

- 標的分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定する方法であって、

a) 標的分析物をC s g Gポアまたはその変異体と、標的分析物がポアに対して移動するように接触させるステップ、および

b) 分析物がポアに対して移動しているときに1回または複数回測定を行い、それによって分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定するステップ

20

を含む方法、

- 標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーを形成する方法であって、C s g Gポアまたはその変異体とポリヌクレオチド結合タンパク質との複合体を形成し、それによって、標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーを形成するステップを含む方法、

- 標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーであって、C s g Gポアまたはその変異体とポリヌクレオチド結合タンパク質との複合体を含むセンサー、

- 標的分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定するためのC s g Gポアまたはその変異体の使用、

- 標的分析物を特徴づけるためのキットであって、(a) C s g Gポアまたはその変異体と(b) 膜の成分とを含むキット、

30

- 試料中の標的分析物を特徴づけるための装置であって、(a) 複数のC s g Gポアまたはそれらの変異体と(b) 複数の膜とを含む装置、

- 標的ポリヌクレオチドを特徴づける方法であって、

a) ポリヌクレオチドをC s g Gポアまたはその変異体、ポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドと、リン酸塩標識化学種がポリメラーゼによって標的ポリヌクレオチドに逐次的に付加されるように接触させ、リン酸塩化学種が各ヌクレオチドに特異的な標的を含有するものであるステップ、および

b) ポアを使用してリン酸塩標識化学種を検出し、それによってポリヌクレオチドを特徴づけるステップ

40

を含む方法、ならびに

- 本発明の変異体モノマーまたは本発明の構築物を産生する方法であって、好適な宿主細胞において本発明のポリヌクレオチドを発現させ、それによって本発明の変異体モノマーまたは構築物を産生するステップを含む方法

も提供する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 1 】

【図1】リボン表示および表面表示でのC s g Gノナマーのそのチャネルコンフォメーションの構造を示す側面断面図である。

【図2】C s g Gチャネル狭窄(すなわち、ナノポアセンシング用途の状況でのポアの読

50

み取りヘッド)および関連する直径の測定を示す断面図である。

【図3】スタックされた3つの同心円の側鎖層: Tyr 51、Asn 55、およびPhe 56を含む、ポア狭窄に寄与する構造モチーフ図である。

【図4】Cs g G様タンパク質(配列番号442~配列番号448)の多重配列アライメントを含む、Cs g Gホモログの配列相同性を示す図である。選択された配列は、Cs g G様配列の系統樹(示していない)全体の単系統クレードから選択され、配列多様性の代表的な図を示す。- スtrandまたは-ヘリックスの二次構造エレメントをそれぞれ、矢印またはバーとして示し、これらは大腸菌(E.coli)Cs g Gの結晶構造に基づく。重要であることから、大腸菌(E.coli)のThr 51、Asn 55およびPhe 56と同等の残基を矢印で強調する。これらの残基は、ポアの内部狭窄、すなわち、ナノポアセンシング用途の状況でのポアの読み取りヘッドを形成する。

10

【図5】平面リン脂質二重層に再構成され、+50 mV (n = 33)または-50 mV (n = 13)の電場で測定したCs g Gの代表的な単一チャネル電流記録(a)およびコンダクタンスのヒストグラム(b)を示すグラフ図である。

【図6】PPB再構成Cs g Gの+50 mVまたは-50 mVでの、ならびにCs g Eの増加濃度を補充した場合の単一チャネル電流記録を示すグラフ図である。水平方向のスケールバーは0 pAに存在する。

【図7】a、C8E4/LDAO可溶化Cs g Gの未加工のネガティブ染色EM画像を示す図である。矢印は、gに示されるサイズ排除プロファイルに表示される異なる粒子集団を示し、(I)Cs g Gノナマーの凝集体、(II)Cs g Gオクタデカマー、および(III)Cs g Gノナマーである。スケールバー、20 nm。b、表記のオリゴマー化状態の上面図および側面図の代表的なクラス平均画像。c、9回の対称性を示す、上面図のLDAO可溶化Cs g Gの回転方向の自己相関関数グラフ。d、Cs g G_{C1S}の未加工のネガティブ染色EM画像。矢印は、gのサイズ排除クロマトグラフィーで観察されたヘキサデカマー(IV)およびオクタマー(V)粒子を示す。e、Cs g G_{C1S}オリゴマーの側面図の代表的なクラス平均画像。この構築物に関して上面図は観察されなかった。f、gで示されるサイズ排除クロマトグラフィーで観察されたCs g G_{C1S}およびCs g G粒子の溶出体積(EV)、計算分子量(MW_{calc})、Cs g Gのオリゴマー化状態(Cs g G_n)に対応する予想分子量(MW_{Cs g G})、ならびにネガティブ染色EMおよびX線結晶学で観察された粒子の対称性の表。g、Superdex 200 10/300 GL(GE Healthcare)で実行したCs g G_{C1S}(黒色)およびC8E4/LDAO可溶化Cs g G(灰色)のサイズ排除クロマトグラム。h、i、結晶化オリゴマーのリボン表示の上面図および側面図であり、Cs g G_{C1S}のD₈ヘキサデカマー(h)、および膜抽出Cs g GのD₉オクタデカマー(i)を示す。1つのプロトマーをN末端(青色)からC末端(赤色)にかけて虹色で示す。結晶に捕捉されるテール-テールダイマーを形成する2つのC₈オクタマー(C₈G_{C1S})またはC₉ノナマー(Cs g G)を青色と黄褐色で示す。rおよびはそれぞれ、半径およびプロトマー間回転を示す。

20

30

【図8】NCSにより平均化して密度を修正した実験的SAD相を使用して計算し、1.5 Åの等高線で表示するCs g G_{C1S}の2.8 Åでの電子密度マップを示す図である。マップは、チャネル構築領域(CL:単一のプロトマーを表示する)を示し、最終の精密化モデルに重ね合わせている。Cs g G_{C1S}は、成熟Cs g G配列のN-末端Cys、すなわちCys 1がSerに置換され、それによって大腸菌(E.coli)LOL経路による脂質修飾が欠如している変異体Cs g Gである。これによって、ネイティブの脂質修飾Cs g Gによって形成される膜標的化ホモノナマーポアとは反対のプレポアコンフォメーションで存在する(図42を参照されたい)可溶性のホモオクタマーオリゴマーが得られる(図43)。

40

【図9】C-末端からN-末端方向に示す、細長いコンフォメーションのチャネルの中を貫通するポリアラニン鎖によるCs g G狭窄モデルの上面図(図9a)および側面図(図9b)を示す図である。図9bに存在するポリアラニン鎖のモデル溶媒和を、明確にするためにC-ループを除去して図9cに示す(ポリアラニン鎖全体の10 Å以内の溶媒分子

50

を示す)。

【図10】大腸菌 (E.coli) からの C s g G を示す図である。

【図11】C s g G の寸法を示す図である。

【図12】10 / ナノ秒での 1 G 転位を示す図である。グアニンが C s g G - E c o の F 5 6 環に入るためには大きい障壁が存在する。* = G は F 5 6 環に入る。A = G は 5 6 環との相互作用を中止する。B = G は、5 5 環との相互作用を中止する。C = G は 5 1 環との相互作用を中止する。

【図13】100 / ナノ秒での s s D N A 転位を示す図である。D N A を C s g G - E c o の狭窄の中に引っ張るにはより大きい力が必要である。

【図14】10 / ナノ秒での s s D N A 転位を示す図である。C s g G - F 5 6 A - N 5 5 S および C s G - F 5 6 A - N 5 5 S - Y 5 1 A 変異体はいずれも、s s D N A 転位の障壁がより低い。

【図15】野生型 (W T) と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図16】野生型 (W T) と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図17】野生型 (W T) と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図18】野生型 (W T) と比較してスループットの増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図19】野生型 (W T) と比較してスループットの増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図20】野生型 (W T) と比較して挿入の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図21】野生型 (W T) と比較して挿入の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図22】実施例18で使用したD N A 構築物Xを示す図である。1と表示される領域は、30個のS p C 3 スペースーに対応した。2と表示される領域は配列番号415に対応した。3と表示される領域は、4個のi S p 1 8 スペースーに対応した。4と表示される領域は、配列番号416に対応した。5と表示される部分は、4個の5 - ニトロインドールに対応した。6と表示される領域は、配列番号417に対応した。7と表示される領域は配列番号418に対応した。8と表示される領域は、4個のi S p 1 8 スペースー (9と表示される領域) が配列番号419の3'末端に結合している配列番号419に対応した。i S p 1 8 スペースーの反対側の末端は、3'コレステロールテザーであった (10と表示される)。11と表示される領域は4個のS p C 3 スペースーに対応した。

【図23】C s g G タンパク質のS t r e p t r a p (G E H e a l t h c a r e) 精製の一例としてのクロマトグラフィートレースを示すグラフ図である (x 軸の表示 = 溶出体積 (m L)、Y 軸の表示 = 吸光度 (m A u))。25 m M T r i s、150 m M N a C l、2 m M E D T A、0.01% D D M 中の試料をロードして、10 m M デスチオビオチンによって溶出させた。C s g G タンパク質が溶出する溶出ピークをE 1と表示する。

【図24】最初のS t r e p 精製後のC s g G タンパク質の典型的なS D S - P A G E 可視化の例を示す写真である。4 ~ 20% T G X ゲル (B i o R a d) を1x T G S 緩衝液中、300 V で22分間泳動 (run) させた。ゲルをS y p r o R u b y 染色で染色した。レーン1 ~ 3は、矢印で示されるC s g G タンパク質を含有する主な溶出ピーク (図23においてE 1と表示) を示す。レーン4 ~ 6は混入物質を含有する主要な溶出ピーク (図23においてE 1と表示) のテールの溶出分画に対応した。Mは、使用した分子量マーカーを示し、これはN o v e x S h a r p U n s t a i n e d (単位 = k D) であった。

【図25】C s g G タンパク質のサイズ排除クロマトグラム (S E C) の一例を示すグラフ図である (120 m L S 200、G E H e a l t h c a r e、x 軸の表示 = 溶出体積 (m L)、y 軸の表示 = 吸光度 (m A u))。S E C は、S t r e p 精製後でタンパク質試料の加熱後に実施した。S E C のランニング緩衝液は、25 m M T r i s、150 m M N a C l、2 m M E D T A、0.01% D D M、0.1% S D S、p H 8.0であり、カラムを1 m L / 分の速度で溶出させた。Xと表示されるトレースは、220 n m での吸光度を示し、Yと表示されるトレースは、280 n m での吸光度を示す。星印で表示され

10

20

30

40

50

るピークを収集した。

【図26】SEC後のCs g Gタンパク質の典型的なSDS-PAGE可視化の一例を示す写真である。4~20% TGXゲル(Bio Rad)を、1×TGS緩衝液中、300 Vで22分間泳動させた後、ゲルをSypro Ruby染色で染色した。レーン1は、Strept精製後で加熱後であるがSECの前のCs g Gタンパク質試料を示す。レーン2~8は、図25において星で表示される、図25のおおよそ48 mL~60 mL(ピークの中心=55 mL)に溶出するピーク全体を収集した分画を示す。Mは、使用した分子量マーカーを示し、これはNovex Sharp Unstained(単位=kD)であった。Cs g G-Ecoポアに対応するバーを矢印で示す。

【図27】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

10

【図28】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図29】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図30】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図31】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図32】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図33】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図34】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図35】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図36】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図37】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

20

【図38】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図39】野生型(WT)と比較して範囲の増加を示す変異体ポアを示すグラフ図である。

【図40】シミュレーション(実験1から3)において0および20ナノ秒で撮影したポア(Cs g G-Eco-(Y51T/F56Q)-StreptII(C))9(変異Y51T/F56Qを有し、StreptII(C)が配列番号435であり、C-末端ポア変異体番号20に結合する配列番号390)上の酵素(T4 Dda-(E94C/C109A/C136A/A360C)(変異E94C/C109A/C136A/A360C)および次に(M1)G1G2を有する配列番号412)を示すスナップショット写真である。

【図41】シミュレーション(実験1から3)において30および40ナノ秒で撮影したポア(Cs g G-Eco-(Y51T/F56Q)-StreptII(C))9(変異Y51T/F56Qを有し、StreptII(C)が配列番号435であり、C-末端ポア変異体番号20に結合する配列番号390)上の酵素(T4 Dda-(E94C/C109A/C136A/A360C)(変異E94C/C109A/C136A/A360C)および次に(M1)G1G2を有する配列番号412)を示すスナップショット写真である。

30

【図42】プレポアコンフォメーションのCs g G_{C1S}のX線構造を示す図である。a、N-末端からC-末端にかけて青色から赤色への虹色で表示するCs g G_{C1S}モノマーのリボン図。二次構造エレメントをABD様の折り畳みに従って表示し、さらなるN-末端およびC-末端ヘリックス、ならびに1と1とを接続する細長いループをそれぞれ、N、C、およびC-ループ(CL)と表示する。b、Cs g G_{C1S}C8オクタマーの側面図であり、複数のサブユニットを色で識別するが、1つのサブユニットの方向および色はaと同じである。

40

【図43】Cs g Gのそのチャンネルコンフォメーションの構造を示す図である。a、Cs g G_{C1S}(青色)および膜抽出Cs g G(赤色)のATR-FTIRスペクトルのアミドI領域(1,700~1,600 cm⁻¹)。b、TM1およびTM2配列(配列番号449および配列番号450)(青色で示される二重層に面する残基)、ならびに野生型Cs g G(WT)で補完される大腸菌(E.coli)BW25141 Cs g G、空のベクター、またはTM1もしくはTM2の下線の断片を欠如するCs g Gのコンゴレッド結合。データは、3回の生物学的反復実験の代表である。c、プレポア(水色; TM1はピン

50

く色、T M 2 は紫色)とチャネルコンフォメーション(黄褐色; T M 1 は緑色、T M 2 はオレンジ色)のC s g Gモノマーとの重ね合わせ。C L、C - ループ。d、e、リボン表示および表面表示でのC s g Gノナマーの側面図(d)および断面図(e);ヘリックス2、コアドメイン、およびT Mヘアピンをそれぞれ、青色、水色、および黄褐色で示す。単一のプロトマーを図4 2 aと同じ色で表示する。マゼンタ色の球は、L e u 2 の位置を示す。O M、外膜。

【図4 4】C s g Gチャネル狭窄を示す図である。a、C s g Gチャネル狭窄の断面図およびその溶媒を除いた直径。b、狭窄は、スタックされた3個の同心円の側鎖層で構成される:周辺質側からP h e 4 8の後にT y r 5 1、A s n 5 5、およびP h e 5 6。c、C s g Gチャネルの位相学。d、c s g G(W T)で補完される大腸菌(E.coli)B W 2 5 1 4 1 c s g G、空のベクター、または表記の狭窄変異体を有するc s g Gのコンゴアレッド結合。データは、6回の生物学的反復実験の代表である。e、f、平面リン脂質二重層に再構成され、+ 5 0 m V (n = 3 3) または - 5 0 m V (n = 1 3) の電場で測定したC s g Gの代表的な単一チャネル電流記録(e)およびコンダクタンスヒストグラム(f)。

【図4 5】C s g G輸送メカニズムのモデル図である。a、C s g E (E)、C s g G (G)、および過剰のC s g Eを補充したC s g G (E + G)のネイティブP A G Eは、C s g G - C s g E複合体(E - G^{*})の形成を示す。データは、4つのタンパク質バッチを含む7回の実験の代表である。b、ネイティブP A G Eから回収したC s g E (E)、C s g G (G)、およびE - G^{*}複合体のS D S - P A G E。データは、2回の繰り返し実験の代表である。M、分子量マーカー、c、C s g G - C s g E粒子の選択されたクラス平均画像。左から右に:クライオ - E Mによって可視化された上面図および側面図、ならびにネガティブ染色側面図とC s g Gノナマーとの比較。d、上面図および斜め側面図のC s g E粒子のクライオ - E M平均画像。回転方向の自己相関は、9回の対称性を示す。e、C s g G - C s g Eの三次元再構築(分解能2 4 Å、1, 2 2 1個の単粒子)は、C s g Gを含むノナマー粒子(青色)およびC s g Eノナマーとして割付されるさらなる密度(オレンジ色)を示す。f、+ 5 0 m Vまたは- 5 0 m Vで、C s g Eの増加濃度を補充したP P B再構成C s g Gの単一チャネル電流記録。水平尺度のバーは0 p Aに存在する。g、推定されるC s g G媒介タンパク質分泌モデル。C s g GおよびC s g Eは、C s g Aを捕捉する分泌複合体を形成すると提唱されており(図5 4に考察)、チャネルの上にエントロピー電位を生成する。チャネル狭窄でのC s g Aの捕捉後、D S調整ブラウン拡散は、外膜を超えてのポリペプチドの進行性の転位を促進する。

【図4 6】大腸菌(E.coli)におけるC u r l i生合成経路を示す図である。c u r l i大サブユニットC s g A(明るい緑色)は、可溶性のモノマータンパク質として細胞から分泌される。c u r l i小サブユニットC s g B(暗い緑色)は、外膜(O M)に会合し、C s g Aを可溶性タンパク質からアミロイド沈着物に変換するための核剤として作用する。C s g G(オレンジ色)は外膜におけるオリゴマーc u r l i特異的転位チャネルにアセンブルする。C s g E(紫色)およびC s g F(水色)は、生産的なC s g AおよびC s g Bの輸送ならびに沈着にとって必要な可溶性のアクセサリタンパク質を形成する。C s g Cは、機能不明の推定オキシドレダクターゼを形成する。全てのc u r l iタンパク質は、細胞質(内)膜(I M)を超えて輸送するために、推定S e cシグナル配列を有する。

【図4 7】サイズ排除クロマトグラフィーおよびネガティブ染色電子顕微鏡によって分析したC s g GおよびC s g G c 1 sの溶液中のオリゴマー化状態を示す図である。a、C 8 E 4 / L D A O可溶性C s g Gの未加工のネガティブ染色E M画像。矢印は、gに示されるサイズ排除プロファイルに表示される異なる粒子集団を示し、(I) C s g Gノナマーの凝集体、(I I) C s g Gオクタデカマー、および(I I I) C s g Gノナマーである。スケールバー、2 0 n m。b、表記のオリゴマー化状態の上面図および側面図の代表的なクラス平均画像。c、9回の対称性を示す、上面図のL D A O可溶性C s g Gの回転方向の自己相関関数グラフ。d、C s g G c 1 sの未加工のネガティブ染色E M画像。矢印は

10

20

30

40

50

、gに示されるサイズ排除クロマトグラフィーで観察されたヘキサデカマー（I V）およびオクタマー（V）粒子を示す。e、C s g G c 1 sオリゴマーの側面図の代表的なクラス平均画像。上面図はこの構築物に関して観察されなかった。f、gに示されるサイズ排除クロマトグラフィーで観察されたC s g G c 1 sおよびC s g G粒子の溶出体積（E V）、計算分子量（M W c a l c）、C s g Gオリゴマー化状態（C s g G_n）に対応する予想分子量（M W C s g G）、ならびにネガティブ染色E MおよびX線結晶学で観察された粒子の対称性の表。g、S u p e r d e x 200 10 / 300 G L（G E H e a l t h c a r e）で実行したC s g G c 1 s（黒色）およびC 8 E 4 / L D A O可溶化C s g G（灰色）のサイズ排除クロマトグラム。h、i、結晶化オリゴマーのリボン表示の上面図および側面図であり、C s g G c 1 sのD 8ヘキサデカマー（h）および膜抽出C s g GのD 9オクタデカマー（i）を示す。1つのプロトマーをN末端（青色）からC末端（赤色）にかけて虹色で示す。結晶に捕捉されるテール-テールダイマーを形成する2つのC 8オクタマー（C g G c 1 s）またはC 9ノナマー（C s g G）を青色と黄褐色で示す。rおよびhはそれぞれ、半径およびプロトマー間回転を示す。

【図48】C s g Gと構造ホモログの比較およびC s g Gにおけるプロトマー間接触を示す図である。a、b、いずれもN-末端（青色）からC末端（赤色）にかけて虹色を示す、C s g G c 1 sモノマー（例えば、プレポアコンフォメーションのC s g G）（a）およびT o l Bのヌクレオチド結合ドメイン様ドメイン（b）（P D B 2 h q s）のリボン図。共通の二次構造エレメントを同等に表示する。c、左から右に、キサントモナス・カンペストリス（*Xanthomonas campestris*）のまれなりボタンパク質B（P D B 2 r 7 6、ピンク色）、シュワネラ・オネイデシス（*Shewanella oneidensis*）仮想りボタンパク質D U F 3 3 0（P D B 2 i q i、ピンク色）、大腸菌（*Escherichia coli*）T o l B（P D B 2 h q s、N末端およびb-プロペラドメインに関してそれぞれ、ピンク色および黄色で表示）と重ね合わせたC s g G c 1 s（灰色）。C s g G特異的構造エレメントを、左上のパネルのように表示して色付けした。d、e、オリゴマーの外部（c）または内部（d）のいずれかから二重層平面に沿って見たC s g G構造において見出される2つの隣接するプロトマーのリボン図。1つのプロトマーをN末端からC末端にかけて虹色（暗い青色から赤色）で示す。第二のプロトマーを水色（コアドメイン）、青色（ヘリックス2）、および黄褐色（T Mドメイン）で示す。4つの主なオリゴマー化境界面が明白である：b-バレル内のb 6 - b 3 9の主鎖相互作用、狭窄ループ（C L）、b 1 - b 3 - b 4 - b 5に対するヘリックス1（ 1）の側鎖パッキング、およびヘリックス2（ 2）のヘリックス-ヘリックスパッキング。脂質アンカー（マゼンタの球はL e u 2におけるC aの位置を示す）とN-末端ヘリックス（ N）とを接続する18残基のN末端ループも同様に、隣接する2つのプロトマーの上を包むように見える。脂質アンカーの突出した位置は、+ 2プロトマーのT M 1およびT M 2ヘアピンに反して存在すると予想される（明確にするために示していない）。

【図49】C s g Gオリゴマーにおける選択された表面残基のC y sのアクセス可能性アッセイを示す。a ~ c、周辺質（a）、側面（b）、および細胞外の図で示すC s g Gノナマーのリボン表示。1つのプロトマーをN末端（青色）からC末端（赤色）にかけて虹色で示す。システイン置換を表示して、S原子の同等の位置を球として示し、大腸菌（*E. coli*）外膜におけるM A L - P E G（5, 000 D a）標識に対するアクセス可能性に従って色付けした。d、導入されたシステインのM A L P E G結合により5 k D aの増加を示す、S D S - P A G Eで分析したM A L - P E G反応試料のウェスタンブロット。アクセス可能（1 1および1 1 1）、中等度にアクセス可能（1）、およびアクセス不能（2）部位をそれぞれ、a ~ eにおいて緑色、オレンジ色、および赤色で表示する。A r g 9 7およびA r g 1 1 0では、44 k D aで第二の化学種が存在し、これは、導入されたシステインとネイティブシステインの両方が標識されるようになるタンパク質の分画に対応する。データは、生物学的反復実験からの4回の独立した実験の代表である。e、X線構造に存在するD 9オクタデカマーにおけるダイマー形成境界面の側面図。ダイマー形成界面またはD 9粒子の管腔内部に導入されたシステインを標識する。膜結合C s g Gにおいて

10

20

30

40

50

、これらの残基は、MAL-PEGにアクセス可能であり、D9粒子が、膜抽出Cs g Gの濃縮溶液のアーチファクトであること、およびC9複合体が生理的に関連する化学種を形成することを証明している。C-末端ヘリックスの残基(aC; Lys242、Asp248、およびHis255)は、アクセス不能であるかまたはアクセス不良であることが見出され、aCが大腸菌(E.coli)細胞エンベロープ、おそらくペプチドグリカン層とのさらなる接触を形成しうることを示している。

【図50】モデルポリアラニン鎖によるCs g G狭窄の分子動力学シミュレーションを示す図である。a、b、C-末端からN-末端方向に示す、細長いコンフォメーションのチャネルの中を貫通するポリアラニン鎖によってモデル化したCs g G狭窄の上面図(a)および側面図(b)。Cs g Gトランスポーター内の基質の通過は、それ自身配列特異的ではない参考文献16、23。明確にするために、ポリアラニン鎖を、通過するポリペプチド鎖の推定の相互作用をモデル化するために使用した。モデル領域は、それぞれが47~58残基を含む9個の同心円Cs g G C-ループで構成される。狭窄の内側に並ぶ側鎖をスティック表示で示し、それぞれ、Phe51をくすんだ青色、Asn55(アミドクランプ)をシアン、ならびにPhe48およびPhe56(β-クランプ)を明るいおよび暗いオレンジ色で示す。N、O、およびH原子(ヒドロキシルまたは側鎖アミドH原子のみを示す)をそれぞれ、青色、赤色、および白色で示す。ポリアラニン鎖のC、N、O、およびH原子をそれぞれ、緑色、青色、赤色、および白色で示す。狭窄(11~15と表示される残基)内のポリアラニン残基の10内の溶媒分子(水)を赤色の点で示す。c、bと同様に位置する、明確にするためにC-ループを除去した、ポリアラニン鎖のモデル溶媒和(ポリアラニン鎖全体の10以内の溶媒分子を示す)。アミド-クランプおよびβ-クランプの最高点では、ポリアラニン鎖の溶媒和は、ペプチド骨格とアミド-クランプ側鎖とをつなぐ単一の水シェルに低減される。Tyr51環におけるほとんどの側鎖は、Cs g G(およびCs g G c1s)X線構造で観察されるその内向きの中心を向く位置と比較して溶媒に向かって回転している。モデルは、AMBER99SB-ILDN54力場を使用し、C-ループの末端残基(Gln47およびThr58)のC原子の位置を制限した、GROMACS参考文献53による40ナノ秒の全ての原子の明白な溶媒分子動力学シミュレーションの結果である。

【図51】Cs g Gホモログにおける配列の保存を示す図である。a、配列類似性に従って色付けし(保存スコアの低から高へ、黄色から青色に色付け)、周辺質(一番左側)、側面(左中央)、細胞外環境(右中央)、または断面側面(一番右)から見たCs g Gノナーの表面表示を示す。図は、最高の配列保存領域が、周辺質前庭の入口、狭窄ループの前庭側面、およびTMドメインの管腔表面にマップされることを示している。b、Cs g G様リポタンパク質の多重配列アライメント。選択される配列は、配列多様性の代表的な図を提供するために、Cs g G様配列の系統発生樹(示していない)全体の単系統クレードから選択した。大腸菌(E.coli)のCs g G結晶構造に基づいて、二次構造エレメントをα-ストランドまたはβ-ヘリックスに関してそれぞれ、矢印またはバーとして示す。c、d、二次構造表示のCs g Gプロトマー(c)および表面表示でのCs g Gノナーの断面側面図(d)をいずれも灰色で示し、高い配列保存を有する3つの連続ブロックを赤色(HCR1)、青色(HCR2)および黄色(HCR3)で示した。HCR1およびHCR2は、狭窄ループの前庭側面を形成する。HCR3は、周辺質前庭の入口に存在するヘリックス2に対応する。狭窄内で、Phe56は100%保存されるが、Asn55はSerまたはThrに、例えば水素結合ドナー/アクセプターとして作用することができる小さい極性側鎖に保存的に置換することができる。狭窄の出口での同心円の側鎖環(Tyr51)は、保存されない。狭窄の入口でのPhe環の存在は、ポリペプチドの捕捉および通過を触媒することが示されている炭疽菌保護抗原PA63参考文献20のPhe427環(β-クランプと呼ばれる)と位相的に類似である。tox Bスーパーファミリタンパク質のMSTにより、Phe環の最高点での保存されたモチーフD(D/Q)(F)(S/N)Sが明らかとなる。これは、curl様トランスポーターで見られるS(Q/N/T)(F)STモチーフと類似である。ポアコンフォメーションのPA63の

10

20

30

40

50

原子分解構造は、まだ利用可能ではないが、利用可能な構造から、P h e 環の後に同様に、保存された水素結合ドナー / アクセプター (S e r / A s n 4 2 8) が転位チャネルにおけるその後の同心円の環として続きうることが示唆されている (エLEMENT の方向は両方のトランスポーターで逆であることに注意されたい)。

【図 5 2】C s g G および C s g G : C s g E ポアの単一チャネル電流分析を示すグラフ図である。a、陰性電場電位の下では、C s g G ポアは 2 つのコンダクタンス状態を示す。左上および右上のパネルはそれぞれ、正常 (+ 5 0 、 0 、 および - 5 0 m V で測定) および低コンダクタンス型 (0 、 + 5 0 、 および - 5 0 m V で測定) の代表的な単一チャネル電流トレースを示す。全観察時間 (n = 2 2) の間に 2 つの状態の間での変換は観察されず、コンダクタンス状態が、長い寿命 (数秒から数分の時間尺度) を有することを示している。左下のパネルは、+ 5 0 および - 5 0 m V (n = 3 3) で獲得した C s g G ポアの正常および低コンダクタンス型の電流ヒストグラムを示す。通常および低コンダクタンスを有する C s g G ポアの I - V 曲線を右下のパネルに示す。データは、少なくとも 4 回の独立した記録からの平均値および標準偏差を表す。低コンダクタンス型の性質または生理的存在は不明である。b、アクセサリ因子 C s g E で滴定した C s g G チャネルの電気生理学。プロットは、C s g E 濃度の関数としての開状態、中間状態、および閉状態のチャネルの分画を示す。C s g G の開状態および閉状態を図 4 5 f に図示する。C s g E 濃度を 1 0 n M 超に増加させると、C s g G ポアは閉鎖する。この効果は、+ 5 0 m V (左) および - 5 0 m V (右) で起こり、ポアの遮断が C s g E (計算 p I 4 . 7) の C s g G ポアへの電気泳動によって引き起こされる可能性を除外する。頻度の低い (, 5 %) 中間状態は、開状態のチャネルのコンダクタンスのほぼ半分を有する。これは、C s g E によって誘導される C s g G チャネルの不完全な閉鎖を表しうる。あるいは、これは電解質溶液の残留 C s g G モノマーが膜に埋もれたポアに結合することによって引き起こされる C s g G ダイマーの一時的な形成を表しうる。3 つの状態の分画は、単一チャネル電流トレースの全ての時点のヒストグラム分析から得られた。ヒストグラムから、最大 3 つの状態のピーク面積が得られ、所定の状態の分画は、対応するピーク面積を、記録における他の全ての状態の合計で除することによって得られた。陰性電場電位の下では、2 つの開コンダクタンス状態は、C s g G に関する知見と同様に識別される (a を参照されたい)。開状態のチャネルの変化形はいずれも、より高い C s g E 濃度によって遮断されることから、b の「開状態の」トレースは、両方のコンダクタンス型を合わせたものである。プロットのデータは、3 回の独立した記録からの平均値および標準偏差を表す。c、結晶構造、サイズ排除クロマトグラフィー、および E M は、洗浄剤抽出 C s g G ポアが、より高いタンパク質濃度で非ネイティブのテール - テールスタックダイマー (例えば、D 9 粒子としての 2 つのノナマー、図 4 7) を形成することを示している。これらのダイマーはまた、単一チャネル記録でも観察することができる。上のパネルは、+ 5 0 、 0 および - 5 0 m V (左から右) でスタックされた C s g G ポアの単一チャネル電流トレースを示す。左下のパネルは、+ 5 0 m V および - 5 0 m V で記録されたダイマー C s g G ポアの電流ヒストグラムを示す。+ 5 0 m V および - 5 0 m V での実験的コンダクタンス + 1 6 . 2 ± 1 . 8 および - 1 6 . 0 ± 3 . 0 p A (n = 1 5) はそれぞれ、理論的計算値 2 3 p A に近い。右下のパネルは、スタックされた C s g G ポアの I - V 曲線を示す。データは、6 回の独立した記録からの平均値および標準偏差を表す。d、C s g E がスタックされた C s g G ポアに結合して遮断する能力を電気生理学によって試験した。+ 5 0 m V (上) および - 5 0 m V (下) で 1 0 または 1 0 0 n M C s g E の存在下でスタックされた C s g G ポアの単一チャネル電流トレースを示す。電流トレースは、そうでなければ飽和濃度の C s g E によってスタックされた C s g G ダイマーのポア閉鎖が起こらないことを示している。これらの知見は、E M および部位特異的変異誘発によって識別されるように、C s g G - C s g E 接触域がヘリックス 2 および C s g G 周辺質キャビティの口部分にマッピングされることと良好に一致する (図 4 5 および図 5 2)。

【図 5 3】C s g E オリゴマーおよび C s g G - C s g E 複合体を示す図である。a、C s g E のサイズ排除クロマトグラフィー (S u p e r o s e 6 、 1 6 / 6 0 0 ; ランニ

10

20

30

40

50

ング緩衝液 20 mM Tris-HCl、pH 8、100 mM NaCl、2.5% グリセロール) は、2つのオリゴマー状態 1 および 2 の平衡を示し、見かけの分子質量比は 9 : 16 : 1 である。ピーク 1 のネガティブ染色 EM を調べたところ、Cs g E の 9 コピーとサイズが適合する別個の Cs g E 粒子 (5つの代表的なクラス平均画像を、傾斜角の増加順に挿入図に示す) が示される。b、クライオ-EM の上面図で観察された Cs g E オリゴマーの選択されたクラス平均画像およびその回転方向の自己相関は、C9 対称性の存在を示す。c、Cs g G - Cs g E クライオ-EM モデルの FSC 分析。三次元再構築により、1, 221 個の粒子に対応する 125 のクラスを使用して、FSC によって 0.5 の相関の閾値で決定した場合に 24 の分解能が達成された。d、Cs g G - Cs g E クライオ-EM 密度と X 線構造で観察された Cs g G ノナマーの重ね合わせ。半透明密度として (左) または断面図として側面から見た重ね合わせを示す。e、野生型 cs g G (WT) で補完された大腸菌 (E.coli) BW25141 cs g G、空のベクター (cs g G)、または cs g G ヘリックス 2 変異体 (一文字コードで表示される 1 アミノ酸置換) のコンゴーレッド結合。データは、4 回の生物学的反復実験の代表である。f、cs g G (WT) で補完された大腸菌 (E.coli) LSR12 に及ぼす、または (1) cs g E で補完されたもしくは補完されない (2) 異なるヘリックス 2 変異を有する cs g G に及ぼす胆汁酸塩毒性の効果。細菌 107 個から開始する連続 10 倍希釈液を McConkey アガープレートにスポットした。外膜における Cs g G ポアの発現によって、胆汁酸塩感受性の増加が起こるが、これは Cs g E の同時発現によって遮断することができる (n = 6、3 回の生物学的反復実験、各 2 回の反復)。g、分子表面表示での Cs g G の X 線構造の断面図。コンゴーレッド結合または毒性に対して効果を示さない Cs g G 変異体を青色で示し、胆汁酸塩感受性の Cs g E による救出を妨害する変異体を赤色で示す。

【図 54】Cs g G 分泌複合体の集合および基質動員を示す図である。curl 1 トランスポーター Cs g G および可溶性の分泌補因子 Cs g E は、24, 000³ の小室を格納する 9 : 9 の化学量論を有する分泌複合体を形成し、これは Cs g A 基質を捕捉して、外膜 (OM; 本文および図 45 を参照されたい) を超えてのそのエントロピー駆動性の拡散を促進すると提唱されている。理論的見地から、分泌複合体の基質動員および集合に関して 3 つの推定の経路 (a ~ c) を想像することができる。a、「キャッチアンドキャップ」メカニズムは、Cs g A の apo Cs g G 転位チャネルに対する結合 (1) を伴い、apo Cs g G 転位チャネルのコンフォメーションの変化により、Cs g E 結合のための高親和性結合プラットフォームを露出する (2)。Cs g E の結合によって基質ケージのキャッピングが起こる。Cs g A が分泌されると、Cs g G は、その低親和性コンフォメーションへと戻り、新たな分泌サイクルのために分泌チャネルの Cs g E の解離および放出が起こる。b、「ドックアンドトラップ」メカニズムにおいて、周辺質 Cs g A は、Cs g E によって最初に捕捉されて (1)、Cs g E は、Cs g G 転位ポアにドックする高親和性複合体となり (2)、分泌複合体の中に Cs g A を閉じ込める。Cs g A の結合は、Cs g E オリゴマーまたは Cs g E モノマーに対して直接でありえて、Cs g E モノマーはその後オリゴマー化されて Cs g G に結合する。Cs g A が分泌されると、Cs g E は、その低親和性コンフォメーションへと戻り、分泌チャネルから解離する。c、Cs g G および Cs g E は、構成的複合体を形成し、Cs g E コンフォメーション動力学は、Cs g A の動員および分泌の際に開形態と閉形態との間でサイクルする。現在公表されているまたは利用可能なデータでは、これらの推定の動員モードもしくはその派生モードを識別することができないか、またはそれらの 1 つを提唱することができない。

【図 55】Cs g G c1s および Cs g G のデータ収集統計値および電子密度マップを示す図である。a、Cs g G c1s および Cs g G の X 線構造のデータ収集統計値。b、NC S 平均および密度修正実験的 SAD 位相を使用して計算し、1.5 の等高線で表示した Cs g G c1s に関する 2.8 での電子密度マップ。マップは、チャネル構築領域 (CL; 単一プロトマーを表示する) を示し、最終的な精密化モデルに重ね合わせる。c、NC S 平均および密度修正分子置換位相から計算した (TM ループはインプットモデルに存在しなかった) Cs g G TM ドメイン領域における電子密度マップ (逆格子ベクトル a*, b

、および c^ に沿ってそれぞれ、分解能 3.6、3.7、および 3.8) ; B 因子を -20^{-2} で鮮明化して 1.0 の等高線で表示した。図は、最終の精密化モデルと重ね合わせた 1 つの C s g G プロトマーの T M 1 (L y s 1 3 5 ~ L e u 1 5 4) および T M 2 (L e u 1 8 2 ~ A s n 2 0 9) 領域を示す。

【図 5 6】一本鎖 DNA オーバーハングを有する DNA ヘアピンと相互作用する C s g G W T タンパク質の単一チャネル電流トレース (左) とその拡大領域 (右) を示すグラフ図である。トレースは、+ 5 0 m V または - 5 0 m V の間隔 (矢印で示す) で測定した電位に応答して変化する電流を示す。最後の + 5 0 m V セグメントでの下向き電流の遮断は、ポア管腔内のヘアピン二重鎖のロッキングと、内部ポア構築への一本鎖ヘアピン末端の貫通が同時に起こり、ほぼ完全な電流の遮断が起こることを表している。電場を - 5 0 m V に反転させると、ポアの電気泳動の遮断解除が起こる。新たな + 5 0 m V エピソードにより、再度 DNA ヘアピンロッキング / 貫通およびポア遮断が起こる。+ 5 0 m V セグメント上では、ヘアピン構造のアンフォールディングによって、電流遮断の逆転によって示される電流遮断の終了が起こりうる。配列 3' G C G G G G A G C G T A T T A G A G T T G G A T C G G A T G C A G C T G G C T A C T G A C G T C A T G A C G T C A G T A G C C A G C A T G C A T C C G A T C - 5' を有するヘアピンを、最終濃度 1 0 n M で小室のシス側に添加した。

【図 5 7】P Y P A 配列 (残基 5 0 ~ 5 3) の狭窄残基 Y 5 1 が G G に変異している変異体 C s g G ポアである C s g G - P Y P A の精製およびチャネル特性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 2 】

配列表の説明

配列番号 1 は、シグナル配列を含む野生型大腸菌 (E. coli) C s g G のアミノ酸配列 (U n i p r o t 寄託番号 P 0 A E A 2) を示す。

【 0 0 3 3 】

配列番号 2 は、シグナル配列を含む野生型大腸菌 (E. coli) C s g G のポリヌクレオチド配列 (G e n e I D : 1 2 9 3 2 5 3 8) を示す。

【 0 0 3 4 】

配列番号 3 は、配列番号 2 の 5 3 ~ 7 7 位の野生型大腸菌 (E. coli) C s g G のアミノ酸配列を示す。これは、成熟野生型大腸菌 (E. coli) C s g G モノマー (すなわち、シグナル配列を欠いている) の 3 8 ~ 6 3 位のアミノ酸配列に対応する。

【 0 0 3 5 】

配列番号 4 ~ 3 8 8 は、シグナル配列を欠いている C s g G の修飾モノマーの 3 8 ~ 6 3 位のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 6 】

配列番号 3 8 9 は、大腸菌 K - 1 2 株 M C 4 1 0 0 亜株 (Escherchia coli Str. K-12 substr. MC4100) からの野生型 C s g G モノマーをコードする、コドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。このモノマーは、シグナル配列を欠いている。

【 0 0 3 7 】

配列番号 3 9 0 は、大腸菌 K - 1 2 株 M C 4 1 0 0 亜株 (Escherchia coli Str. K-12 substr. MC4100) からの野生型 C s g G モノマーの成熟形態のアミノ酸配列を示す。このモノマーは、シグナル配列を欠いている。この C s g G に使用される略語 = C s g G - E c o .

【 0 0 3 8 】

配列番号 3 9 1 は、Y P _ 0 0 1 4 5 3 5 9 4 . 1 : 仮想タンパク質 C K O _ 0 2 0 3 2 [シトロバクター・コセリ ([Citrobacter koseri) A T C C B A A - 8 9 5] の 1 ~ 2 4 8 のアミノ酸配列を示し、これは配列番号 3 9 0 と 9 9 % 同一である。

【 0 0 3 9 】

配列番号 3 9 2 は、W P _ 0 0 1 7 8 7 1 2 8 . 1 : 部分的、c u r l i 産生集合体 (c u r l i production assembly) / 輸送成分 C s g G [サルモネラ菌 (Salmonella enteric

10

20

30

40

50

a)] の 16 ~ 238 のアミノ酸配列を示し、これは配列番号 390 と 98 % 同一である。

【0040】

配列番号 393 は、KEY44978.1 | : curl i 産生集合体 / 輸送タンパク質 C s g G [シトロバクター・アマロナティカス (Citrobacter amalonaticus)] の 16 ~ 277 のアミノ酸配列を示し、これは配列番号 390 と 98 % 同一である。

【0041】

配列番号 394 は、YP__003364699.1 : curl i 産生集合体 / 輸送成分 [シトロバクター・ローデンチウム (Citrobacter rodentium)] ICC168] の 16 ~ 277 のアミノ酸配列を示し、これは配列番号 390 と 97 % 同一である。

【0042】

配列番号 395 は、YP__004828099.1 : curl i 産生集合体 / 輸送成分 [エンテロバクター・アズブリア (Enterobacter asburiae)] LF7a] の 16 ~ 277 のアミノ酸配列を示し、これは配列番号 390 と 94 % 同一である。

【0043】

配列番号 396 は、Phi29 DNA ポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

【0044】

配列番号 397 は、Phi29 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列を示す。

【0045】

配列番号 398 は、大腸菌 (E. coli) からの sbcB 遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。これは、大腸菌 (E. coli) からのエキソヌクレアーゼ I 酵素 (EcoExo I) をコードする。

【0046】

配列番号 399 は、大腸菌 (E. coli) からのエキソヌクレアーゼ I 酵素 (EcoExo I) のアミノ酸配列を示す。

【0047】

配列番号 400 は、大腸菌 (E. coli) からの xthA 遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。これは、大腸菌 (E. coli) からのエキソヌクレアーゼ I II 酵素をコードする。

【0048】

配列番号 401 は、大腸菌 (E. coli) からのエキソヌクレアーゼ I II 酵素のアミノ酸配列を示す。この酵素は、二本鎖 DNA (dsDNA) の一方の鎖からの 5' - リン酸ヌクレオシドの 3' - 5' 方向での分配性消化を行う。鎖上の酵素開始は、およそ 4 ヌクレオチドの 5' オーバーハングを必要とする。

【0049】

配列番号 402 は、高度好熱菌 (T. thermophilus) からの recJ 遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。これは、高度好熱菌 (T. thermophilus) からの RecJ 酵素 (TthRecJ - cd) をコードする。

【0050】

配列番号 403 は、高度好熱菌 (T. thermophilus) からの RecJ 酵素 (TthRecJ - cd) のアミノ酸配列を示す。この酵素は、ssDNA からの 5' - リン酸ヌクレオシドの 5' - 3' 方向での前進性消化を行う。鎖上の酵素開始は、少なくとも 4 ヌクレオチドを必要とする。

【0051】

配列番号 404 は、バクテリオファージラムダエキソ (redX) 遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。これは、バクテリオファージラムダエキソヌクレアーゼをコードする。

【0052】

配列番号 405 は、バクテリオファージラムダエキソヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。この配列は、集合してトリマーを構築する 3 つの同一のサブユニットの 1 つである。

10

20

30

40

50

この酵素は、dsDNAの一方の鎖からのヌクレオチドの5' - 3' 方向での高前進性消化を行う (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0262.asp>)。鎖上の酵素開始は、5' リン酸を有するおおよそ4ヌクレオチドの5' オーバーハングを優先的に必要とする。

【0053】

配列番号406は、Hel308 Mbuのアミノ酸配列を示す。

【0054】

配列番号407は、Hel308 Csyのアミノ酸配列を示す。

【0055】

配列番号408は、Hel308 Tgaのアミノ酸配列を示す。

10

【0056】

配列番号409は、Hel308 Mhuのアミノ酸配列を示す。

【0057】

配列番号410は、Tral Ecoのアミノ酸配列を示す。

【0058】

配列番号411は、XPD Mbuのアミノ酸配列を示す。

【0059】

配列番号412は、Dda 1993のアミノ酸配列を示す。

【0060】

配列番号413は、Trwc Cbaのアミノ酸配列を示す。

20

【0061】

配列番号414は、WP__006819418.1: 輸送体 [ヨケネラ・レンゲスブルゲイ (Yokenella regensburgei)] の19 ~ 280のアミノ酸配列を示し、これは配列番号390と91%同一である。

【0062】

配列番号415は、WP__024556654.1: curl i 産生集合体 / 輸送タンパク質 CsgG [クロノバクター・プルベリス (Cronobacter pulveris)] の16 ~ 277のアミノ酸配列を示し、これは配列番号390と89%同一である。

【0063】

配列番号416は、YP__005400916.1: curl i 産生集合体 / 輸送タンパク質 CsgG [ラーネラ・アクアティリス (Rahnella aquatilis) HX2] の16 ~ 277のアミノ酸配列を示し、これは配列番号390と84%同一である。

30

【0064】

配列番号417は、KFC99297.1: CsgGファミリー curl i 産生集合体 / 輸送成分 [クライベラ・アスコルバータ (Kluyvera ascorbata) ATCC33433] の20 ~ 278のアミノ酸配列を示し、これは配列番号390と82%同一である。

【0065】

配列番号418は、KFC86716.1: CsgGファミリー curl i 産生集合体 / 輸送成分 [ハフニア・アルベイ (Hafnia alvei) ATCC13337] の16 ~ 274のアミノ酸配列を示し、これは配列番号390と81%同一である。

40

【0066】

配列番号419は、YP__007340845.1: curl i ポリマーの形成に関与する特徴づけされていないタンパク質 [腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) 細菌株 FG I 57] の16 ~ 270のアミノ酸配列を示し、これは配列番号390と76%同一である。

【0067】

配列番号420は、WP__010861740.1: curl i 産生集合体 / 輸送タンパク質 CsgG [プレジオモナス・シゲロイデス (Plesiomonas shigelloides)] の17 ~ 274のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号390と70%同一である。

【0068】

50

配列番号 421 は、Y P__205788.1 : *curl i* 産生集合体 / 輸送外膜リポタンパク質成分 C s g G [ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) E S 1 1 4] の 23 ~ 270 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 60 % 同一である。

【0069】

配列番号 422 は、W P__017023479.1 : *curl i* 産生集合体タンパク質 C s g G [アリイビブリオ・ロゲイ (*Aliivibrio logei*)] の 23 ~ 270 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 59 % 同一である。

【0070】

配列番号 423 は、W P__007470398.1 : *Curl i* 産生集合体 / 輸送成分 C s g G [フォトバクテリウム属種 (*Photobacterium* sp.) A K 1 5] の 22 ~ 275 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 57 % 同一である。

10

【0071】

配列番号 424 は、W P__021231638.1 : *curl i* 産生集合体タンパク質 C s g G [エロモナス・ペロニ (*Aeromonas veronii*)] の 17 ~ 277 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 56 % 同一である。

【0072】

配列番号 425 は、W P__033538267.1 : *curl i* 産生集合体 / 輸送タンパク質 C s g G [シュワネラ属種 (*Shewanella* sp.) E C S M B 1 4 1 0 1] の 27 ~ 265 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 56 % 同一である。

【0073】

20

配列番号 426 は、W P__003247972.1 : *curl i* 産生集合体タンパク質 C s g G [プチダ菌 (*Pseudomonas putida*)] の 30 ~ 262 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 54 % 同一である。

【0074】

配列番号 427 は、Y P__003557438.1 : *curl i* 産生集合体 / 輸送成分 C s g G [シュワネラ・ビオラセア (*Shewanella violacea*) D S S 1 2] の 1 ~ 234 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 53 % 同一である。

【0075】

配列番号 428 は、W P__027859066.1 : *curl i* 産生集合体 / 輸送タンパク質 C s g G [マリノバクテリウム・ジャナスキイ (*Marinobacterium jannaschii*)] の 36 ~ 280 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 53 % 同一である。

30

【0076】

配列番号 429 は、C E J 7 0 2 2 2.1 : *Curl i* 産生集合体 / 輸送成分 C s g G [クリセオバクテリウム・オラニメンセ (*Chryseobacterium oranimense*) G 3 1 1] の 29 ~ 262 のアミノ酸配列を示し、これは、配列番号 390 と 50 % 同一である。

【0077】

配列番号 430 は、実施例 18 で使用するポリヌクレオチド配列を示す。

【0078】

配列番号 431 は、実施例 18 で使用するポリヌクレオチド配列を示す。

【0079】

40

配列番号 432 は、実施例 18 で使用するポリヌクレオチド配列を示す。

【0080】

配列番号 433 は、実施例 18 で使用するポリヌクレオチド配列を示す。

【0081】

配列番号 434 は、実施例 18 で使用するポリヌクレオチド配列を示す。配列番号 434 の 3' 末端に結合されているのは、6 つの *i S p 1 8* スペース (反対側の末端が 2 つのチミンに結合されている) および 3' コレステロール T E G である。

【0082】

配列番号 435 は、*S t r e p I I (C)* のアミノ酸配列を示す。

【0083】

50

配列番号 436 は、Pro のアミノ酸配列を示す。

【0084】

配列番号 437 ~ 440 は、実施例 1 からのプライマーを示す。

【0085】

配列番号 441 は、実施例 21 からのヘアピンを示す。

【0086】

配列番号 442 ~ 448 は、図 4 からの配列を示す。

【0087】

配列番号 449 および 450 は、図 43 からの配列を示す。

【0088】

発明の詳細な説明

別段の指示がない限り、本発明の実施は、当業者の能力の範囲内である化学、分子生物学、微生物学、組換え DNA 技術および化学的方法の従来技法を利用する。そのような技法は、文献、例えば、M. R. Green, J. Sambrook, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ; Ausubel, F. M. et al., (1995 and periodic supplements, Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.) ; B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons ; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridisation: Principles and Practice, Oxford University Press ; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press ; および D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press でも説明されている。これらの一般テキストの各々が参照により本明細書に組み入れられている。

【0089】

本発明を説明する前に、本発明の理解を助けることになる多数の定義を提供する。本明細書において言及するすべての参考文献は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられている。別段の定義がない限り、本明細書で用いるすべての専門および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。

【0090】

本明細書で使用する場合、用語「～を含む (comprising)」は、言及する要素のいずれかを必ず含み (include)、場合により、他の要素も含む (include) ことがあることを意味する。「～から本質的になる」は、言及するあらゆる要素を必ず含み、列挙する要素の基本的および新規の特徴に実質的な影響を及ぼすことになる要素を除外し、場合により、他の要素を含むことがあることを意味する。「～からなる」は、列挙するもの以外のすべての要素を除外することを意味する。これらの用語の各々によって定義される実施形態は、本発明の範囲内である。

【0091】

本明細書で使用する場合の用語「核酸」は、各ヌクレオチドの 3' および 5' 末端がホスホジエステル結合によって連結されている、ヌクレオチドの一本鎖または二本鎖共有結合配列である。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド塩基で構成されていることもあり、またはリボヌクレオチド塩基で構成されていることもある。核酸としては DNA および RNA を挙げることができる。核酸は、in vitro で合成的に製造されることもあり、または天然源から単離されることもある。核酸としては、修飾 DNA または RNA、例えば、メチル化された DNA もしくは RNA、または翻訳後修飾、例えば、7-メチルグアノシンでの 5' キャッピング、切断およびポリアデニル化などの 3' プロセシング、ならびにスプライシングに付された RNA をさらに挙げることができる。核酸としては、合成核酸 (XNA)、例えば、ヘキシトール核酸 (HNA)、シクロヘキセン核酸 (CeNA)、トレオース核酸 (TNA)、グリセロール核酸 (GNA)、ロックド核酸 (

10

20

30

40

50

LNA) およびペプチド核酸 (PNA) も挙げることができる。本明細書では「ポリヌクレオチド」とも呼ばれる核酸のサイズは、通常は、二本鎖ポリヌクレオチドについては塩基対 (bp) の数として、または一本鎖ポリヌクレオチドの場合はヌクレオチド (nt) の数として表される。1000bp または nt は、キロベース (kb) に等しい。長さ約 40ヌクレオチド未満のポリヌクレオチドは、通常は「オリゴヌクレオチド」と呼ばれ、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によるものなどの DNA の操作に使用するためのプライマーを含むこともある。

【0092】

本発明に関して、用語「アミノ酸」は、その最も広い意味で使用しており、天然に存在する L - アミノ鎖または残基を含むことを意図したものである。天然に存在するアミノ酸について一般に使用される 1 および 3 文字略号を本明細書でも使用する: A = Ala、C = Cys、D = Asp、E = Glu、F = Phe、G = Gly、H = His、I = Ile、K = Lys、L = Leu、M = Met、N = Asn、P = Pro、Q = Gln、R = Arg、S = Ser、T = Thr、V = Val、W = Trp、および Y = Tyr (Lehninger, A. L. (1975) Biochemistry, 2d ed., pp. 71-92, Worth Publishers, New York)。一般用語「アミノ酸」は、さらに、D - アミノ酸、レトロ - インベルソアミノ酸はもちろん、化学的に修飾されたアミノ酸、例えばアミノ酸類似体、タンパク質に通常は組み込まれていない天然に存在するアミノ酸、例えばノルロイシン、およびアミノ酸に特有であることが当技術分野において公知の特性を有する化学的に合成された化合物、例えば - アミノ酸も含む。例えば、ペプチド化合物に対する天然 Phe または Pro と同じ配座制限を可能にする、フェニルアラニンまたはプロリンの類似体または模倣物は、アミノ酸の定義に含まれる。そのような類似体および模倣物を本明細書ではそれぞれのアミノ酸の「機能的等価物」と呼ぶ。アミノ酸の他の例は、Roberts and Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Gross and Meiehofer, eds., Vol. 5 p. 341, Academic Press, Inc., N. Y. 1983 に記載されており、この参考文献は、参照により本明細書に組み入れられている。

【0093】

「ポリペプチド」は、天然に産生されるか、合成手段によって *in vitro* で産生されるかを問わず、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基のポリマーである。長さ約 12 アミノ酸残基未満のポリペプチドは、通常は「ペプチド」と呼ばれ、長さ約 12 ~ 約 30 アミノ酸残基のものは、「オリゴペプチド」と呼ばれることがある。用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、天然に存在するポリペプチド、前駆形態またはプロタンパク質の生成物を示す。ポリペプチドは、変異または翻訳後修飾プロセスを経ることもでき、そのようなプロセスとしては、これらに限定されるものではないが、グリコシル化、タンパク質切断、脂質化、シグナルペプチド切断、プロペプチド切断、リン酸化などを挙げることができる。用語「タンパク質」は、1 本または複数のポリペプチド鎖を含む高分子を指すために本明細書では使用する。

【0094】

「生体ポア」は、膜の一方の側から他方への分子およびイオンの移行を可能にするチャネルまたは穴を規定する膜貫通タンパク質構造である。このポアを通るイオン化学種の移行は、そのポアの両側に印加される電気的電位の差によって駆動されうる。「ナノポア」は、分子またはイオンが通過するチャネルの最小直径がナノメートル (10⁻⁹メートル) 程度である生体ポアである。

【0095】

本発明のすべての態様および実施形態について、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 で示される野生型大腸菌 (E. coli) CsgG との少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95% または 99% 完全配列同一性を有するポリヌクレオチドを含むことができる。同様に、ポリペプチドは、配列番号 1 で示される野生型大腸菌 (E. coli) CsgG との少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95% または 99% 完全配列同一性を有するポリペプチドを含むことができる。ポリペプチドは、CsgG 様タンパク

10

20

30

40

50

質の特徴である P F A M ドメイン P F 0 3 7 8 3 を含有するポリペプチドを含むことができる。現在公知の C s g G 相同体および C s g G 構造のリストは、<http://pfam.xfam.org/family/PF03783>で見つけることができる。例えば、配列同一性は、完全長ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの断片または一部分との配列同一性であることもある。したがって、配列は、本発明の配列との 50 % 全配列同一性しか有さないことがあっても、特定の領域、ドメインまたはサブユニットは、本発明の配列と 80 %、90 %、または 99 % ほどもの配列同一性を共有することがありうる。本発明によると、配列番号 2 の核酸配列との相同性は、単に配列同一性に限定されない。多くの核酸配列は、一見低い配列同一性を有するにもかかわらず互いに生物学的に有意な相同性を示すことができる。本発明では、相同核酸配列は、低ストリンジェンシー条件下で互いにハイブリダイズすることになるものであると考える (M. R. Green, J. Sambrook, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。

【0096】

用語「ベクター」は、適切なサイズの別の核酸 (通常は D N A) 配列断片を組み込むことができる、直鎖状または環状である D N A 分子を示すように使用される。そのような D N A 断片は、その D N A 配列断片によってコードされた遺伝子の転写をもたらす、さらなるセグメントを含むことができる。さらなるセグメントは、プロモーター、転写ターミネーター、エンハンサー、配列内リボソーム進入部位、非翻訳領域、ポリアデニル化シグナル、選択マーカー、複製起点などを含むことができるが、これらに限定されない。原核生物宿主のための様々な好適なプロモーター (例えば、大腸菌 (E. coli) のための、[ベータ] - ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系、lac、tac、T3、T7 プロモーター) および真核生物宿主のための様々な好適なプロモーター (例えば、シミアンウイルス 40 初期または後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、EG - 1 a プロモーター) が利用可能である。発現ベクターは、プラスミド、コスミド、ウイルスベクターおよび酵母人工染色体に由来することが多く、ベクターは、いくつかの源からの D N A 配列を含有する組換え分子であることが多い。本発明の特異的实施形態は、本明細書に記載の野生型または修飾 C s g G ポリペプチドをコードする発現ベクターを提供する。用語「作動可能に連結された」は、D N A 配列、例えば、上述のものなどの核酸ベクターにおける D N A 配列に適用される場合、該配列が、それらの所期の目的を果たす (すなわち、プロモーター配列が、関連コード配列を通して終結配列のところまで進む転写を開始させる) ために、協同的に機能するように配置されていることを示す。

【0097】

生体ポアの膜貫通タンパク質構造は、実際はモノマー状またはオリゴマー状でありうる。通常は、ポアは、複数のポリペプチドサブユニットであって、中心軸の周りに配置されており、その結果、ナノポア残基が存在する膜に略垂直に伸びる、タンパク質で裏打ちされたチャンネルを形成している、ポリペプチドサブユニットを含む。ポリペプチドサブユニットの数は限定されない。通常は、サブユニットの数は 5 から 30 まであり、好適には、サブユニットの数は 6 ~ 10 である。あるいは、サブユニットの数は、パーフリンゴリジンまたは関連大型膜ポアの場合のように、定義されない。タンパク質で裏打ちされたチャンネルを形成する、ナノポア内のタンパク質サブユニットの部分は、1 つまたは複数の膜貫通 - バレル、および / または - ヘリックス部分を含むことがある、二次構造を通常は含む。

【0098】

開示する生成物および方法の様々な適用が当技術分野における具体的な要求に合わせて調整されうることは、理解されるはずである。本明細書において使用する用語法が本発明の特定の实施形態の説明を目的にしたものに過ぎず、限定を意図したものでないことも、理解されるはずである。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

加えて、本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈による別段の明白な指図がない限り、複数の言及対象も含む。したがって、例えば、「ポリヌクレオチド(a polynucleotide)」への言及は、2つ以上のポリヌクレオチドを含み、「ポリヌクレオチド結合タンパク質(a polynucleotide binding protein)」への言及は、2つ以上のそのようなタンパク質を含み、「ヘリカーゼ(a helicase)」への言及は、2つ以上のヘリカーゼを含み、「モノマー(a monomer)」への言及は、2つ以上のモノマーを含み、「ポア(a pore)」への言及は、2つ以上のポアを含むなど。

【 0 1 0 0 】

上文または下文を問わず、本明細書の中で引用するすべての出版物、特許および特許出願は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【 0 1 0 1 】

本発明は、一部は、細菌アミロイド分泌チャネル(CsgG)、その製造方法、および核酸シーケンシング用途および分子センシングにおけるその使用に関する。

【 0 1 0 2 】

CsgGは、大腸菌(E. coli)の外膜に存在する膜リポタンパク質(UniProt 寄託番号 P0AEA2; Gene ID: 12932538)である。この外側脂質膜の中で、CsgGは、9つのCsgGモノマーサブユニットのオリゴマー複合体を含むナノポアを形成する。II型(リポタンパク質)シグナル配列のために、CsgGタンパク質前駆体は、SECTransloconを介して移行され、その後、成熟CsgG(すなわち、II型シグナル配列が切断されたCsgG)のN末端Cys残基においてトリアセチル化される。トリアセチル化された、または「脂質化された」CsgGは、グラム陰性宿主の外膜に輸送され、そこでノナマーポアとしてその二重層に入る。脂質化されていない形態のCsgG、例えばCsgG_{C1S}は、プレポア立体構造で可溶性タンパク質としてペリプラズムに存在する(図42)。

【 0 1 0 3 】

野生型CsgGナノポアのX線構造(Goyal et al., Nature, 2014, 516(7530), 250-3)は、それが120 の幅および85 の高さを有することを示す(本明細書では以降、ナノポアの「幅」という用語は、膜表面と平行のその寸法に関するものとし、ナノポアの「高さ」という用語は、膜に対して垂直なその寸法に関するものとする)。CsgGポア複合体は、36本鎖 - パレルによって膜を貫通して内径40 のチャンネルをもたらす(図1)。CsgGチャンネルの集合モノマー各々が、保存された12残基ループ(Cループ、「CL」、図2)を有し、このループが協同してチャンネル内におおよそ9.0 の直径への狭窄を作り出す(図1および2)。野生型CsgGナノポアの狭窄は、CsgGオリゴマー中に存在する各々のCsgGモノマーのアミノ酸残基Tyr51、Asn55およびPhe56の側鎖によって形成される3つの積み重なった同心環で作られる(図3)。残基のこのナンバリングは、N末端のネイティブ15アミノの酸シグナル配列を欠いている成熟タンパク質に基づく。したがって、成熟タンパク質は、配列番号1の残基16~277に対応する。Tyr51は、配列番号1の66位にあり、Asnは、配列番号1の70位にあり、Phe56は、配列番号1の71位にある。

【 0 1 0 4 】

狭窄は、イオンおよび他の分子のCsgGチャンネル通過を制限するように作用する。平面リン脂質二重層内に再構成されたCsgGの単一チャンネル電流記録は、標準電解質条件および+50mVまたは-50mVの電位を使用して、それぞれ、43.1±4.5pA(n=33)または-45.1±4.0pA(n=13)の定常電流となった(図5)。

【 0 1 0 5 】

CsgGチャンネルを通る電流の流れは、化学量論量のペリプラズム因子CsgE(UniProt 寄託番号 P0AE95)の付加によって有効に遮断することができる(実施例10~12)。理論によって拘束されることを望むものではないが、電流の痕跡は、Cs

10

20

30

40

50

g E が C s g G ポアと複合体を形成してチャンネルの一方の末端をキャップするように作用する機序を強く示唆する。C s g G チャンネルを通るイオンの流れの有意な低減を、標準単一チャンネル記録技術を使用して測定することができる（実施例 12 および 13、図 6）。本発明者らは、電流の流れについての測定パラメータ（最大電流、および電流変動をモニターする能力）が、ナノポアを本発明の一実施形態による核酸シーケンシングおよび分子センシングでの使用に好適なものにすることを見出した。

【0106】

したがって、本発明は、一部は、ナノポアを通して流れる電流の電氣的測定値の変動に基づく核酸シーケンシングの方法およびそのような核酸シーケンシングにおける C s g G ナノポアタンパク質複合体の使用に関する。

【0107】

核酸は、ナノポアシーケンシングに特に好適である。DNA および RNA 中に天然に存在する核酸塩基を、それらの物理的サイズによって区別することができる。核酸分子または個々の塩基がナノポアのチャンネルを通過すると、それらの塩基間のサイズ差に起因して、チャンネルを通るイオン流の直接相関する低減が生ずる。イオン流の変動を記録することができる。イオン流変動を記録する好適な電氣的測定技術は、例えば、国際公開第 2000/28312 号パンフレットおよび D. Stoddart et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2010, 106, pp 7702-7（単一チャンネル記録機器）に、ならびに例えば国際公開第 2009/077734 号パンフレット（多チャンネル記録技術）に記載されている。適切な較正により、イオン流の特徴的低減を使用して、チャンネルを横断する特定のヌクレオチドおよび関連塩基をリアルタイムで同定することができる。

【0108】

膜貫通チャンネルの最も狭い狭窄のサイズは、概して、核酸シーケンシング用途に対するナノポアの適合性を判定する上で重要な因子である。狭窄が小さすぎると、シーケンシングされる分子は通過できないことになる。しかし、チャンネルを通るイオン流に対する最大効果を達成するには、その最も狭い位置で（すなわち、狭窄箇所）チャンネルが大きすぎてはならない。理想的には、いずれの狭窄も直径が通過する塩基のサイズに可能な限り近くあるべきである。核酸および核酸塩基のシーケンシングに好適な狭窄の直径は、ナノメートル範囲（ 10^{-9} メートル範囲）である。好適には、直径は、ほぼ 0.5 ~ 1.5 nm であるべきであり、通常は、直径は、ほぼ 0.7 ~ 1.2 nm である。野生型大腸菌（E. coli）C s g G 内の狭窄は、およそ 9（0.9 nm）の直径を有する。本発明者らは、C s g G チャンネル内の狭窄のサイズおよび立体配置が核酸シーケンシングに好適であると演繹した。

【0109】

核酸シーケンシングに関する用途のための C s g G ナノポアは、野生型形態で使用されることもあり、または使用中のナノポアの所望の特性をさらに向上させるように、例えば特定のアミノ酸残基の定方向突然変異誘発によって、さらに修飾されることもある。例えば、本発明の実施形態では、変異は、チャンネル内の狭窄の数、サイズ、形状、配置または配向を変更することを企図したものである。修飾変異体 C s g G ナノポア複合体は、ポリペプチド配列内の特異的標的アミノ酸残基の挿入、置換および/または欠失をもたらす公知遺伝子工学技術によって調製することができる。オリゴマー C s g G ナノポアの場合、変異をモノマーのポリペプチドサブユニット各々において生じさせることもあり、またはモノマーのいずれか 1 つにおいて生じさせることもあり、またはモノマーのすべてにおいて生じさせることもある。好適には、本発明の一実施形態では、記載の変異をオリゴマータンパク質構造内のモノマーのポリペプチドすべてに生じさせる。

【0110】

本発明の実施形態によると、ポア内のチャンネル狭窄数が低減されている修飾変異体 C s g G ナノポアを提供する。

【0111】

野生型大腸菌（E. coli）C s g G ポアは、2 カ所のチャンネル狭窄を含む（図 1 を参照さ

10

20

30

40

50

れたい)。これらは、54位からの53位への追加のアミノ酸を含むより広い構造の一部としての(i)アミノ酸残基Phe56およびAsn55と(ii)アミノ酸残基Tyr51、ならびにCループモチーフによって形成される(図2および3)。

【0112】

典型的ナノポア核酸シーケンシングでは、目的の核酸配列の個々のヌクレオチドがナノポアのチャンネルを逐次的に通過すると、ヌクレオチドによるチャンネルの部分的閉塞のため、開口チャンネルイオン流が低減される。上に記載した好適な記録技術を使用してイオン流のこの低減が測定される。イオン流の低減を、チャンネルを通る既知ヌクレオチドについて測定されるイオン流の低減に対応させてもよく、これは、結果的に、どのヌクレオチドがチャンネルを通過しているのかを判定する手段、したがって、逐次的に行った場合にはナノポアを通過する核酸のヌクレオチド配列を判定する方法となる。個々のヌクレオチドの正確な判定のために、チャンネルを通るイオン流の低減を、単一の狭窄(すなわち「読み取りヘッド」)を通過する個々のヌクレオチドのサイズに直接関連させる必要があることが一般的になっている。ポアを例えば関連ポリメラーゼの作用によって「通り抜け」させるインタクト核酸ポリマーに関してシーケンシングを行うことができるということは理解されるであろう。あるいは、ポアに近接している標的核酸から逐次的に除去されたヌクレオチド三リン酸塩基の通過によって配列を判定することができる(例えば国際公開2014/187924パンフレットを参照されたい)。

【0113】

2カ所以上の狭窄が存在し、相互に隔たっている場合、各狭窄は相互作用することがあり、または核酸鎖内の別々のヌクレオチドを同時に「読み取る」ことがある。この状況で、チャンネルを通るイオン流の低減は、ヌクレオチドを含有するすべての狭窄箇所の流れの総合制限の結果である。したがって、場合によっては、二重狭窄が1つの複合電流シグナルをもたらすこともある。ある特定の状況では、1カ所の狭窄、すなわち1つの「読み取りヘッド」、の電流読み出しを、2つのそのような読み取りヘッドが存在する場合、個別に判定することができないことがある。

【0114】

CsgGの野生型ポア構造は、組換え遺伝子技術によって2カ所の狭窄の一方を広げるように、変更するように、または除去するように再操作して、チャンネル内に単一箇所の狭窄を残し、かくして単一の読み取りヘッドを規定することができる。CsgGオリゴマーポア内の狭窄モチーフは、モノマー野生型大腸菌(E. coli)CsgGのポリペプチド内の38~63位のアミノ酸残基に位置する。この領域の野生型アミノ酸配列を配列番号3として提供する。この領域を考慮する上で、アミノ酸残基位置50~53、54~56および58~59のいずれかにおける変異が本発明の権限の範囲内に企図されると考えられる。CsgG相同体との配列類似性(図4)に基づいて、アミノ酸残基位置38~49、53、57、および61~63は、高度に保存されると考えられ、したがって、置換または他の修飾にあまり適していない。野生型CsgG構造のチャンネル内のTyr51、Asn55およびPhe56の側鎖の重要な位置設定のため、これらの位置における変異は、読み取りヘッドの特徴を修飾または変更するのに有利でありうる。

【0115】

CsgGタンパク質モノマーの所与の位置における変異は、その位置の野生型アミノ酸の他のいずれかの天然または非天然アミノ酸での置換をもたらすことがある。本発明の一実施形態では、狭窄を広げるまたは除去することが望ましく、好適には、修飾CsgGタンパク質中のアミノ酸側鎖は、それが置換する野生型構造内のアミノ酸側鎖より立体的妨害が少なくなるように選択されることになる。所与の位置の置換アミノ酸残基は、同様の静電特性を有することもあり、または異なる静電特性を有することもある。好適には、置換アミノ酸側鎖は、チャンネルの二次構造または特性に対する破壊を最小にするために、それが置換する野生型構造内のアミノ酸側鎖と同様の静電電荷を有することになる。

【0116】

置換アミノ酸の選択は、大規模多重配列アラインメントに基づいてアミノ酸が別のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸を置換する尤度を算出するための標準方法論を提供する、B L O S U M 6 2 行列に基づくこともある。B L O S U M 6 2 行列の例を当業者はインターネット上で自由に入手できる。例えば、米国国立生物学情報センター (National Center for Biotechnology Information) のウェブサイト (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa_explorer.cgi) を参照されたい。

【0117】

C s g G チャンネル内の第 1 の狭窄を形成するように作用する野生型 C s g G 構造内の T y r 5 1 に対して、任意のアミノ酸での置換が施される。特に、本発明のある特定の実施形態では、T y r 5 1 は、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン、グルタミンおよびフェニルアラニンで置換されることがある (配列番号 3 9 ~ 3 1 8)。本発明の実施形態では、アラニンまたはグリシンでの T y r 5 1 の置換が特に好適である (配列番号 3 9 ~ 1 0 8)。実施形態では、残基 5 0 ~ 5 3 (野生型配列中の P Y P A) は、グリシン - グリシン (G G) で置換されることがある (配列番号 3 5 4 ~ 3 8 8)。

10

【0118】

C s g G チャンネル内の第 2 の狭窄に寄与する A s n 5 5 に対して、任意のアミノ酸での置換が施される。特に、本発明のある特定の実施形態では、A s n 5 5 は、アラニン、グリシン、バリン、セリンまたはトレオニンで置換されることがある (配列番号 9 ~ 3 3、4 4 ~ 6 8、7 9 ~ 1 0 3、1 1 4 ~ 1 3 8、1 4 9 ~ 1 7 3、1 8 4 ~ 2 0 8、2 1 9 ~ 2 4 3、2 5 4 ~ 2 7 8、2 8 9 ~ 3 1 3 および 3 2 4 ~ 3 4 8)。

20

【0119】

C s g G チャンネル内の第 2 の狭窄の一部を形成する P h e 5 6 に対して、任意のアミノ酸での置換が施される。特に、本発明のある特定の実施形態では、P h e 5 6 は、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギンおよびグルタミンで置換されることがある (配列番号 5 ~ 1 3、1 5 ~ 1 8、2 0 ~ 2 3、2 5 ~ 2 8、3 0 ~ 3 3、4 0 ~ 4 3、4 5 ~ 4 8、5 0 ~ 5 3、5 5 ~ 5 8、6 0 ~ 6 3、6 5 ~ 6 8、7 5 ~ 7 8、8 0 ~ 8 3、8 5 ~ 8 8、9 0 ~ 9 3、9 5 ~ 9 8、1 0 0 ~ 1 0 3、1 1 0 ~ 1 1 3、1 1 5 ~ 1 1 8、1 2 0 ~ 1 2 3、1 2 5 ~ 1 2 8、1 3 0 ~ 1 3 3、1 3 5 ~ 1 3 8、1 4 5 ~ 1 4 8、1 5 0 ~ 1 5 3、1 5 5 ~ 1 5 8、1 6 0 ~ 1 6 3、1 6 5 ~ 1 6 8、1 7 0 ~ 1 7 3、1 8 0 ~ 1 8 3、1 8 5 ~ 1 8 8、1 9 0 ~ 1 9 3、1 9 5 ~ 1 9 8、2 0 0 ~ 2 0 3、2 0 5 ~ 2 0 8、2 1 5 ~ 2 1 8、2 2 0 ~ 2 2 3、2 2 5 ~ 2 2 8、2 3 0 ~ 2 3 3、2 3 5 ~ 2 3 8、2 4 0 ~ 2 4 3、2 5 0 ~ 2 5 3、2 5 5 ~ 2 5 8、2 6 0 ~ 2 6 3、2 6 5 ~ 2 6 8、2 7 0 ~ 2 7 3、2 7 5 ~ 5 7 8、2 8 5 ~ 2 8 8、2 9 0 ~ 2 9 3、2 9 5 ~ 2 9 8、3 0 0 ~ 3 0 3、3 0 5 ~ 3 0 8、3 1 0 ~ 3 1 3、3 2 0 ~ 3 2 3、3 2 5 ~ 3 2 8、3 3 0 ~ 3 3 3、3 3 5 ~ 3 3 8、3 4 0 ~ 3 4 3 および 3 4 5 ~ 3 4 8)。本発明の実施形態では、アラニンおよびグリシンでの P h e 5 6 の置換が特に好適である (配列番号 5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 3 5、1 4 0、1 4 5、1 5 0、1 5 5、1 6 0、1 6 5、1 7 0、1 7 5、1 8 0、1 8 5、1 9 0、1 9 5、2 0 0、2 0 5、2 1 0、2 1 5、2 2 0、2 2 5、2 3 0、2 3 5、2 4 0、2 4 5、2 5 0、2 5 5、2 6 0、2 6 5、2 7 0、2 7 5、2 8 0、2 8 5、2 9 0、2 9 5、3 0 0、3 0 5、3 1 0、3 1 5、3 2 0、3 2 5、3 3 0、3 3 5、3 4 0、3 4 5、3 5 0、3 5 5、3 6 0、3 6 5、3 7 0、3 7 5、3 8 0、3 8 5、6、1 1、1 6、2 1、2 6、3 1、3 6、4 1、4 6、5 1、5 6、6 1、6 6、7 1、7 6、8 1、8 6、9 1、9 6、1 0 1、1 0 6、1 1 1、1 1 6、1 2 1、1 2 6、1 3 1、1 3 6、1 4 1、1 4 6、1 5 1、1 5 6、1 6 1、1 6 6、1 7 1、1 7 6、1 8 1、1 8 6、1 9 1、1 9 6、2 0 1、2 0 6、2 1 1、2 1 6、2 2 1、2 2 6、2 3 1、2 3 6、2 4 1、2 4 6、2 5 1、2 5 6、2 6 1、2 6 6、2 7 1、2 7 6、2 8 1、2 8 6、2 9 1、

30

40

50

2 9 6、3 0 1、3 0 6、3 1 1、3 1 6、3 2 1、3 2 6、3 3 1、3 3 6、3 4 1
3 4 6、3 5 1、3 5 6、3 6 1、3 6 6、3 7 1、3 7 6、3 8 1および3 8 6)。

【0120】

所与の変異体C s g Gタンパク質において、T y r 5 1の置換は、5 5および5 6位のどちらか一方と同時に進行することもあり(配列番号4 4、4 9、5 4、5 9、6 4、7 9、8 4、8 9、9 4、9 9、1 1 4、1 1 9、1 2 4、1 2 9、1 3 4、1 4 9、1 5 4、1 5 9、1 6 4、1 6 9、1 8 4、1 8 9、1 9 4、1 9 9、2 0 4、2 1 9、2 2 4、2 2 9、2 3 4、2 3 9、2 5 4、2 5 9、2 6 4、2 6 9、2 7 4、2 8 9、2 9 4、2 9 9、3 0 4、3 0 9、3 5 9、3 6 4、3 6 9、3 7 4、3 7 9、4 0、4 1、4 2、7 5、7 6、7 7、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 4 5、1 4 6、1 4 7、1 8 0、1 8 1、1 8 2、2 1 5、2 1 6、2 1 7、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 8 5、2 8 6および2 8 7)、この場合、チャンネル内の好適な寸法の少なくとも1カ所の狭窄が維持される。あるいは、T y r 5 1の置換は、位置A s n 5 5およびP h e 5 6の両方における置換に対して相互排他的である(配列番号3 9、7 4、1 0 9、1 4 4、1 7 9、2 1 4、2 4 9、2 8 4、3 5 4、1 0、1 1、1 2、1 5、1 6、1 7、2 0、2 1、2 2、2 5、2 6、2 7、3 0、3 1および3 2)。

10

【0121】

あるいは、野生型C s g Gタンパク質中のT y r 5 1、A s n 5 5またはP h e 5 6の1つまたは複数欠失されることもある(配列番号3 1 9~3 5 3、3 4~3 8、6 9~7 3、1 0 4~1 0 8、1 3 9~1 4 3、1 7 4~1 7 8、2 0 9~2 1 3、2 4 4~2 4 8、2 7 9~2 8 3、3 1 4~3 1 8、3 8 4~3 8 8、8、1 3、1 8、2 3、2 8、3 3、4 3、4 8、5 3、5 8、6 3、6 8、7 8、8 3、8 8、9 3、9 8、1 0 3、1 1 3、1 1 8、1 2 3、1 2 8、1 3 3、1 3 8、1 4 8、1 5 3、1 5 8、1 6 3、1 6 8、1 7 3、1 8 3、1 8 8、1 9 3、1 9 8、2 0 3、2 0 8、2 1 8、2 2 3、2 2 8、2 3 3、2 3 8、2 4 3、2 5 3、2 5 8、2 6 3、2 6 8、2 7 3、2 7 8、2 8 8、2 9 3、2 9 8、3 0 3、3 0 8および3 1 3)。チャンネル内の少なくとも1カ所の狭窄を維持するために、所与の実施形態では、アミノ酸残基T y r 5 1の欠失は、アミノ酸残基A s n 5 5およびP h e 5 6両方の欠失に対して相互排他的である(配列番号3 1 9~3 2 2、3 2 4~3 2 7、3 2 9~3 3 2、3 3 4~3 3 7、3 3 9~3 4 2、3 4 4~3 4 7、3 8、7 3、1 0 8、1 4 3、1 7 8、2 1 3、2 4 8、2 8 3および3 1 8)。5 3位と5 4位および4 8位と4 9位におけるある特定の隣接アミノ酸残基も欠失されることがある。

20

30

【0122】

本発明は、上記修飾が孤立して行われることもあり、あらゆる組合せで行われることもある実施形態を提供するものであることは、理解されるはずである。

【0123】

T y r 5 1における狭窄またはA s n 5 5 / T y r 5 6における狭窄のどちらか一方の除去の結果、C s g Gチャンネル内の狭窄は単一箇所になる。理論によって拘束されることを望むものではないが、A s n 5 5 / T y r 5 6における狭窄は、望ましいこともあるT y r 5 1における狭窄より高い配座安定性を有することになると想定される。しかし、A s n 5 5 / T y r 5 6狭窄がヌクレオチドと比較して(中心ボア軸に沿って測定して)高すぎることもある。これは、移行中のD N A鎖内の個々の塩基対の分解能不良につながる可能性がある。

40

【0124】

反対のことがT y r 5 1狭窄について言える可能性が高い。A s n 5 5 / T y r 5 6狭窄の除去後、そのオリゴマー中のT y r 5 1残基の残存する環は、ネイティブ構造の場合より配座安定性が低いことがある。しかし、T y r 5 1狭窄のほうが、(中心ボア軸に沿って測定して)短く、個々の塩基を区別しうる狭窄をチャンネル内に設けることができる可能性が高い。

【0125】

50

どちらの実施形態においても、（中心軸に沿って測定して）単一箇所の狭い狭窄の存在は、ポアを核酸シーケンシング用途に利用するときに電流読み取りの複雑さを低減させる可能性が高い。したがって、ポアを通して核酸が移行している間に発生する観測電流の変調は、別個のヌクレオチドの単一の狭窄、すなわち「読み取りヘッド」、の通過をもっぱら反映することになる。

【0126】

1カ所の狭窄の有効な除去は、そのポアバリエーションの開口チャネル電流も増加させることができる。開口チャネル電流の増加は、より高いバックグラウンドコンダクタンスとして有利であり、異なる核酸塩基対シグナルについての電流遮断レベルのより良好な分解につながる。このように、読み取りヘッドに対する修飾は、核酸シーケンシングおよび他の分子センシング用途の両方に対する生体ポアの適合性を向上させることができる。

10

【0127】

代替実施形態として、または上記の配列修飾に加えて、A s n 5 5 / P h e 5 6 狭窄が（中心ポア軸に沿って測定したときの）その高さの調整にさらに適応されうることも条件とする。A s n 5 5 / P h e 5 6 狭窄のそのようなさらなる適応形態は、C s g Gチャネル内のT y r 5 1もしくは他の位置の変異を伴うこともあり、または伴わないこともある。好適には、A s n 5 5 / P h e 5 6 狭窄のさらなる適応形態は、T y r 5 1残基によって形成される狭窄を広げるまたは除去する変異の一部として企図される。

【0128】

野生型形態の場合、A s n 5 5 / P h e 5 6 チャネル狭窄は、互いに垂直に方向に隣接して位置する2つのアミノ酸環で作られる。結果として、狭窄は、1 nmより長い長さを有する。1 nm長の狭窄は、イオン流から発生する電気シグナルを移行中の核酸鎖内の別個の塩基に分解することを可能とすることができない。通常は、核酸シーケンシングに使用される公知ナノポアの狭窄は、1 nm未満の長さを概して有する。例えば、DNAシーケンシングに使用されるM s p Aナノポアは、（中心ポア軸に沿って測定して）0.6 nmの狭窄高を有する（Manrao et al., Nature Biotechnology, 2012, 30(4), 349-353）。

20

【0129】

A s n 5 5 / P h e 5 6 狭窄の（中心ポア軸に沿って測定したときの）高さを低減させるために、2つの残基のどちらか一方を置換してまたは欠失させて狭窄の頂部または底部を広げてよい。

30

【0130】

C s g Gチャネル内の第2の狭窄の一部を形成するA s n 5 5 に対して、任意のアミノ酸での置換が企図される。特に、アラニン、グリシン、バリン、セリンまたはトレオニンでの置換（配列番号9～33、44～68、79～103、114～138、149～173、184～208、219～243、254～278、289～313および324～348）。

【0131】

C s g Gチャネル内の第2の狭窄の一部を形成するP h e 5 6 に対して、任意のアミノ酸での置換が企図される。特に、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギンおよびグルタミンでの置換（配列番号5～13、15～18、20～23、25～28、30～33、40～43、45～48、50～53、55～58、60～63、65～68、75～78、80～83、85～88、90～93、95～98、100～103、110～113、115～118、120～123、125～128、130～133、135～138、145～148、150～153、155～158、160～163、165～168、170～173、180～183、185～188、190～193、195～198、200～203、205～208、215～218、220～223、225～228、230～233、235～238、240～243、250～253、255～258、260～263、265～268、270～273、275～278、285～288、290～293、295～298、300～303、3

40

50

05～308、310～313、320～323、325～328、330～333、335～338、340～343および345～348)。本発明の実施形態では、アラニンおよびグリシンでのPhe56の置換が特に好適である(配列番号5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、61、11、16、21、26、31、36、41、46、51、56、61、66、71、76、81、86、91、96、101、106、111、116、121、126、131、136、141、146、151、156、161、166、171、176、181、186、191、196、201、206、211、216、221、226、231、236、241、246、251、256、261、266、271、276、281、286、291、296、301、306、311、316、321、326、331、336、341、346、351、356、361、366、371、376、381および386)。

【0132】

野生型CsgGポアの狭窄の最小直径を調整するための修飾も企図される。CsgGポア内の両方の狭窄の最小直径は、およそ0.9nm(9Å)であり、これは、DNAシーケンシングに対する有用性を示す公知MspAナノポア内の狭窄についての直径1.2nm(Manrao et al., Nature Biotechnology, 2012, 30(4), 349-353)より小さい。0.5～1.5nmの最小直径を有する修飾CsgGポア内の残存狭窄をもたらす上記のいずれかの変異が好適であるであろう。

【0133】

上に列挙した修飾のいずれかは、狭窄箇所のアミノ酸の親水性および電荷分布を有益に変更して、移行中の核酸鎖に関して通過および非共有結合性相互作用を向上させて電流読み出しを向上させることができる。上に列挙した変異のいずれかは、チャネル狭窄近くの親水性および電荷分布を有益に変更して、その狭窄を通る電解質イオンの流れを最適化すること、および移行中の核酸鎖の通過中のヌクレオチド間のより良好な識別を果たすこともできる。

【0134】

チャネル内腔内の表面電荷分布を変化させる結果となりうるCsgGタンパク質のさらなる修飾が企図される。本発明の一実施形態では、これらの修飾は、移行中の核酸のチャネル壁への望ましくない静電吸着を回避するために施される。核酸は負電荷を有し、CsgGチャネル内腔は多少の正電荷を有する(図1)ので、静電相互作用が核酸シーケンシング中に通り抜けまたは移行に干渉しうると想定される。好適には、正電荷を有するアミノ酸残基、例えばリシン、ヒスチジンおよびアルギニンを中性または負電荷を有する側鎖で置換して、ポアを通る核酸移行の効率およびしたがって電流読み出しの明確さをさらに向上させることができる。

【0135】

核酸鎖(または個々のヌクレオチド)のポア狭窄内の移行または通り抜けを助長するための、野生型大腸菌(E. coli)CsgGまたは変異体CsgGのチャネル内腔の修飾も、本発明の実施形態によって提供する。内部狭窄を有するCsgGの膜貫通部分は、中心の穴を特徴とする蓋を伴うバレルに似ている。バレルと蓋に最も近いポア内腔に追加のループを加えることによって通り抜けを助長することができる。

【0136】

本発明の特異的实施形態は、CsgGポアが、共有結合している1つまたは複数のモノマー、ダイマーまたはオリゴマーからなりうることを条件とする。非限定的な例として、

モノマーは、任意の立体配置で、例えばそれらの末端アミノ酸によって、遺伝子的に融合されていることがある。この場合、1つのモノマーのアミノ末端が別のモノマーのカルボキシ末端に融合されていることもある。

【0137】

本発明の実施形態によると、C s g Gポアが、分子のそのポアの通過に有益な特性を有しうるさらなるアクセサリタンパク質に順応するように適合されうることも条件とする。ポアへの適合は、核酸プロセシング酵素の固定化を助長することができる。核酸プロセシング酵素としては、DNAまたはRNAポリメラーゼ、イソメラーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、テロメラーゼ、およびヘリカーゼを挙げることができる。これらの酵素の1つまたは複数をナノポアと会合させることで、核酸によるポアの通り抜け増進に関して、および核酸鎖がポアによって翻訳される速度を制御する点で恩恵にあずかることができる (Manrao et al., Nature Biotechnology, 2012, 30(4), 349-353)。ポアを通る核酸鎖の移行速度の制御には、イオン流の電流測定に関して、読み出しにより好適であり、より均一である、向上した応答をもたらすという利点がある。

10

【0138】

本発明の実施形態では、ナノポアの膜外領域における修飾は、1つまたは複数の結合/固定化部位を設けることによってチャンネルの内腔の内部にまたは内腔に隣接してDNAポリメラーゼなどの好適な核酸プロセシング酵素をドッキングさせることを助長するのに役立つことができると予想される。好適な固定化部位は、酵素の静電結合のための静電パッチ、共有結合性カップリングを可能にするための1つもしくは複数のシステイン残基、および/または立体アンカーを設けるための膜貫通チャンネル部分の内部幅変更を含むことがある。

20

【0139】

下でより詳細に述べる特異的实施形態では、本発明は、核酸シーケンシングで使用するためのC s g G野生型ポアのさらなる適応形態を提供する。

【0140】

本発明の実施形態では、C s g Gポアの膜外領域 (図1に示す下の部分) は、チャンネル内腔の反対側に核酸鎖の退出を助長するために短縮または除去されることがある。膜外領域の短縮または除去は、チャンネルのイオン流からの電気シグナルの電流分解能を向上させることもできる。後者の利点は、膜外領域によるイオン流に対して生じた抵抗を低下することによってもたらされる。本C s g Gポアの場合、膜貫通チャンネル、内部狭窄およびキャップ領域が、直列に存在する3つの抵抗領域に相当する。これらのうちの1つの寄与を除去することまたは低下させることは、開口チャンネル電流を増加させることになり、したがって、電流分解能を向上させることになる。そのような変更は、 α -ヘリックス2 (α 2)、C末端 α -ヘリックス (α C) (図1) および/またはこれらの組合せの欠失を含むことができる。

30

【0141】

本発明のさらなる実施形態では、野生型大腸菌 (E. coli) C s g Gポアの外面の膜対向アミノ酸は、その膜へのポアの挿入を助長するように修飾することができる。ある特定の实施形態では、単一アミノ酸置換によって野生型残基がより疎水性の高い好適な類似体で置換されうることを条件とする。例えば、残基Ser136、Gly138、Gly140、Ala148、Ala188またはGly202の1つまたは複数をAla、Val、LeuまたはIleに変化させることができる。加えて、チロシンまたはトリプトファンなどの芳香族残基は、疎水性膜と親水性溶媒の界面に位置するように適切な野生型アミノ酸を置換することができる。例えば、残基Leu154またはLeu182の1つまたは複数をTyr、PheまたはTrpによって置換することができる。

40

【0142】

本発明の実施形態では、タンパク質ポアの熱安定性を増加させることができる。この結果、シーケンシングデバイス内でのナノポアの有効期限が有利に増されることになる。実施形態では、タンパク質ポアの熱安定性の増加は、ベータ・ターン配列の修飾によって

50

またはタンパク質表面での静電相互作用の向上によって達成される。一実施形態では、膜貫通領域の - ヘアピンを、隣接 - ヘアピン内または間の2本の隣接鎖にわたる共有結合性ジスルフィドの形成によって安定させることができる。そのような交差鎖システム対の例は、Val139 - Asp203、Gly139 - Gly205、Lys135 - Thr207、Glu201 - Ala141、Gly147 - Gly189、Asp149 - Gln187、Gln151 - Glu185、Thr207 - Glu185、Gly205 - Gln187、Asp203 - Gly189、Ala153 - Lys135、Gly137 - Gln151、Val139 - Asp149またはAla141 - Gly147でありうる。

【0143】

本発明のさらなる実施形態では、ポリペプチド配列のコドン使用頻度を、Biotechnol. J., 2011, 6(6), 650-659に記載されている方法に従って、Cs g Gタンパク質の高レベルかつ低エラー率での発現を可能にするように修飾することができる。この修飾は、mRNAのあらゆる二次構造も標的にすることができる。

【0144】

本発明は、タンパク質配列の、そのプロテアーゼ安定性を向上させるための変更も、提供する。これは、可撓性ループ領域の除去、例えば、 - ヘリックス2 (2)、C末端a - ヘリックス (C) (図1) および/またはこれらの組合せの欠失によって果たすことができる。

【0145】

本発明の実施形態では、Cs g Gポリペプチド配列/発現系は、起こりうるタンパク質凝集を回避するように変更される。

【0146】

本発明は、タンパク質のフォールディング効率を向上させるためのポリペプチド配列の変更も提供する。好適な技術は、Biotechnol. J., 2011, 6(6), 650-659に提供されている。

【0147】

本発明の一実施形態は、Cs g Gタンパク質の精製を助長するためのバイオアフィニティータグの置換または付加をさらに提供する。発表されているCs g Gポア構造は、Strept IIタグを含有する(Goyal et al., Nature, 2014, 516(7530), 250-3)。本発明の実施形態は、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによる精製を助長するためのヒスチジンタグなどの、他のバイオアフィニティータグを含む。本発明の代替実施形態では、タグは、FLAGタグまたはエピトープタグ、例えばMy cタグもしくはHAタグを含むことがある。本発明のさらなる実施形態では、ナノポアをピオチンまたはその類似体(例えばデスチオピオチン)でのピオチン化によって修飾することにより、ストレプトアビジンとの相互作用によって精製を助長することもある。

【0148】

本発明の実施形態では、ポリペプチドの正味電荷を増加させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の際のタンパク質の泳動を助長するために、タンパク質末端に負電荷を付加させることがある。これは、Cs g Gのヘテロオリゴマーの、これらの化学種が目的の化学種である場合、分離向上をもたらすことができる(Howorka et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 2001, 98(23), 12996-13001を参照されたい)。ヘテロオリゴマーは、ポア1つにつき1つだけのシステイン残基の導入に有用でありえ、この導入は、上記のDNA - ポリメラーゼなどの好適な核酸プロセッシング酵素の結合を助長するのに有利でありうる。

【0149】

本発明は、一部は、ナノポアを通して流れる電流の電氣的測定値の変動に基づく分子センシング用途における野生型または修飾Cs g Gナノポアの使用に関する。

【0150】

Cs g Gポアのチャンネル内でのまたはチャンネルのどちらか一方の開口部付近での分子の結合は、ポアを通る開口チャンネルイオン流に対して影響を及ぼすことになる。上に記載し

10

20

30

40

50

た核酸シーケンシング用途と同様に、好適な測定技術を使用して電流の変化によって開口チャネルイオン流の変動を測定することができる（例えば、国際公開第2000/28312号パンフレットおよびD. Stoddart et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2010, 106, 7702-7、または国際公開第2009/077734号パンフレット）。電流の低減によって測定されるようなイオン流の低減の程度は、ポア内のまたはポアの付近の妨害の大きさに関係づけられる。したがって、ポア内のまたはポア付近の目的の分子（分析物とも呼ぶ）の結合は、検出可能かつ測定可能な事象をもたらすことによって、生体センサーの基礎を成す。ナノポアセンシングに好適な分子としては、核酸、タンパク質、ペプチド、および小分子、例えば医薬、毒素またはサイトカインが挙げられる。

【0151】

生体分子の存在の検出は、個別化創薬、医学、診断学、生命科学研究、環境モニタリングに、ならびに警備および/または防衛産業に応用される。

【0152】

本発明の実施形態では、本明細書において開示する野生型もしくは修飾大腸菌（*E. coli*）C s g G ナノポアまたはその相同体は、分子センサーとして役立つことができる。分析物検出の手順は、Howorka et al., Nature Biotechnology (2012) Jun 7; 30(6):506-7に記載されている。検出されることになる分析物分子は、チャネルのどちらかの面に結合することもあり、チャネル自体の内腔内に結合することもある。結合位置は、センシングされる分子のサイズによって決まりうる。野生型C s g G ポアは、センサーとして作用することがあり、または本発明の実施形態では、C s g G ポアは、組換え法もしくは化学的方法によって、センシングされる分子の結合の強度、結合の位置もしくは結合特異性を増加させるように修飾される。典型的な修飾としては、センシングされる分子の構造に相補的な特異的結合部分の付加が挙げられる。分析物分子が核酸を含む場合、この結合部分は、シクロデキストリンまたはオリゴヌクレオチドを含むことがあり；小分子については、これは、公知相補性結合領域、例えば、抗体のもしくは非抗体分子の抗原結合部分（一本鎖可変断片（s c F v）領域、もしくはT細胞受容体（T C R）からの抗原認識ドメインを含む）であることがあり；またはタンパク質については、それは、標的タンパク質の公知リガンドであることがある。このように、野生型または修飾大腸菌（*E. coli*）C s g G ナノポアまたはその相同体を試料中の好適な抗原（エピトープを含む）の存在を検出する分子センサーとして作用できるようすることができ、そのような好適な抗原としては、細胞表面抗原（受容体、固形腫瘍または血液がん細胞（例えばリンパ腫または白血病）のマーカーを含む）、ウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原、アレルギー、アレルギー関連分子、アルブミン（例えば、ヒト、齧歯動物またはウシ）、蛍光分子（フルオレセインを含む）、血液型抗原、小分子、薬物、酵素、酵素または酵素基質の触媒部位、および酵素基質の遷移状態類似体を挙げることができる。

【0153】

修飾は、公知の遺伝子工学および組換えDNA技術を使用して果たすことができる。いずれの適応形態の位置設定も、センシングされる分子の性質、例えば、サイズ、三次元構造およびその生化学的性質に依存することになる。適応させる構造の選択にはコンピュータ構造設計を使用することができる。各々が予定されるセンシング用途に特に適応している一連の特注C s g G ナノポアが構想される。タンパク質-タンパク質相互作用またはタンパク質-小分子相互作用の判定および最適化は、表面プラズモン共鳴を使用して分子相互作用を検出するB I A c o r e（登録商標）（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ; www.biacore.comも参照されたい）などの技術を使用して調査することができる。

【0154】

実施形態では、C s g G ポアは、タンパク質N末端の脂質化を防止するためにN末端C y s 残基が代替アミノ酸によって置換されている水溶性オクタマー形態のものであることができる。代替実施形態では、細菌脂質化経路によるプロセッシングを回避するためにN末端リーダー配列を除去することによってタンパク質を細胞質において発現させることがで

10

20

30

40

50

きる。

【0155】

C s g Gモノマー可溶性タンパク質、オクタマー可溶性タンパク質およびオリゴマー脂質化C s g Gポアの製造方法は、参照によって本明細書に組み入れられているGoyal et al. (Nature, 2014; 516(7530): 250-3)に記載されており、ならびにそのような製造方法を実施例1および2に記載する。

【0156】

変異体C s g Gモノマー

本発明は、変異体C s g Gモノマーを提供する。それらの変異体C s g Gモノマーを使用して、本発明のポアを形成することができる。変異体C s g Gモノマーは、配列が野生型C s g Gモノマーのものとは異なるモノマーであって、ポアを形成する能力を保持するモノマーである。ポアを形成する変異体モノマーの能力を確認する方法は当技術分野において周知であり、そのような方法を下でより詳細に論じる。

10

【0157】

変異体モノマーは、ポリヌクレオチド読み出し特性が向上している、すなわち、ポリヌクレオチド捕捉およびヌクレオチド識別の向上を示す。詳細には、変異体モノマーから構築されるポアは、野生型より容易にヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを捕捉する。加えて、変異体モノマーから構築されるポアは、異なるヌクレオチド間の識別をより容易にする電流範囲の増加、およびシグナル対ノイズ比を増加させる状態変動の低減を示す。加えて、ポリヌクレオチドが変異体から構築されるポアを通して移動するときの電流に寄与するヌクレオチドの数が減少される。これは、ポリヌクレオチドがポアを通して移動しているときに観測される電流とポリヌクレオチド配列との直接的関連の同定をより容易にする。加えて、変異体モノマーから構築されるポアは、スループット増加を示すこともあり、すなわち、ポリヌクレオチドなどの分析物と相互作用する可能性がより高い。これは、ポアを使用する分析物の特徴づけをより容易にする。変異体モノマーから構築されるポアは、より容易に膜に入ることができる。

20

【0158】

本発明の変異体モノマーは、配列番号390で示される配列のバリエーションを含む。配列番号390は、大腸菌K12株MC4100亜株 (Escherichia coli Str. K-12 substr. MC4100) からの野生型C s g Gモノマーである。配列番号390のバリエーションは、配列番号390のものとは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、ポアを形成するその能力を保持するポリペプチドである。ポアを形成するバリエーションの能力は、当技術分野において公知の任意の方法を使用してアッセイすることができる。例えば、バリエーションを両親媒性層に他の適切なサブユニットとともに挿入してもよく、オリゴマー化してポアを形成するその能力を判定してもよい。両親媒性層などの膜にサブユニットを挿入する方法は、当技術分野において公知である。例えば、サブユニットを精製形態でトリブロックコポリマー膜を含有する溶液に懸濁させてもよく、その結果、サブユニットは膜に分散し、膜と結合することによって膜に挿入され、集合して機能性状態になる。

30

【0159】

本明細書での論述のすべてにおいて、アミノ酸の標準1文字表記を使用する。これらは、次の通りである：アラニン (A)、アルギニン (R)、アスパラギン (N)、アスパラギン酸 (D)、システイン (C)、グルタミン酸 (E)、グルタミン (Q)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、リシン (K)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、プロリン (P)、セリン (S)、トレオニン (T)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) およびバリン (V)。標準置換表記法も使用する。すなわちQ42Rは、42位のQがRで置換されていることを意味する。

40

【0160】

一実施形態では、本発明の変異体モノマーは、次のうちの1つまたは複数を含む配列390のバリエーションを含む：(i) 次の位置における1つまたは複数の変異 (すなわち、次の位置の1つもしくは複数における変異)：N40、D43、E44、S54、S57、

50

Q 6 2、R 9 7、E 1 0 1、E 1 2 4、E 1 3 1、R 1 4 2、T 1 5 0 および R 1 9 2、
 例えば、次の位置における 1 つまたは複数の変異（すなわち、次の位置の 1 つもしくは複
 数における変異）：N 4 0、D 4 3、E 4 4、S 5 4、S 5 7、Q 6 2、E 1 0 1、E 1
 3 1 および T 1 5 0、または N 4 0、D 4 3、E 4 4、E 1 0 1 および E 1 3 1、(i i
) Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6 または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 にお
 ける変異、(i i i) Q 4 2 R または Q 4 2 K、(i v) K 4 9 R、(v) N 1 0 2 R、
 N 1 0 2 F、N 1 0 2 Y または N 1 0 2 W、(v i) D 1 4 9 N、D 1 4 9 Q または D 1
 4 9 R、(v i i) E 1 8 5 N、E 1 8 5 Q または E 1 8 5 R、(v i i i) D 1 9 5 N
 、D 1 9 5 Q または D 1 9 5 R、(i x) E 2 0 1 N、E 2 0 1 Q または E 2 0 1 R、(x
) E 2 0 3 N、E 2 0 3 Q または E 2 0 3 R、ならびに (x i) 次の位置の 1 つもしくは
 は複数の欠失：F 4 8、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5、F
 5 6 および S 5 7。バリエーションは、(i) ~ (x i) の任意の組合せを含むことがある。
 特に、バリエーションは、

【 0 1 6 1 】

【 化 1 - 1 】

{i} {ii} {iii} {iv} {v} {vi} {vii} {viii} {ix} {x} {xi} {i,ii} {i,iii} {i,iv} {i,v} {i,vi} {i,vii} {i,viii} {i,ix} {i,x} {i,xi}
 {ii,iii} {ii,iv} {ii,v} {ii,vi} {ii,vii} {ii,viii} {ii,ix} {ii,x} {ii,xi} {iii,iv} {iii,v} {iii,vi} {iii,vii} {iii,viii} {iii,ix} {iii,x} {iii,xi} {iv,v}
 {iv,vi} {iv,vii} {iv,viii} {iv,ix} {iv,x} {iv,xi} {v,vi} {v,vii} {v,viii} {v,ix} {v,x} {v,xi} {vi,vii} {vi,viii} {vi,ix} {vi,x} {vi,xi}
 {vii,viii} {vii,ix} {vii,x} {vii,xi} {viii,ix} {viii,x} {viii,xi} {ix,x} {ix,xi} {x,xi} {i,ii,iii} {i,ii,iv} {i,ii,v} {i,ii,vi} {i,ii,vii} {i,ii,viii}
 {i,ii,ix} {i,ii,x} {i,ii,xi} {i,iii,iv} {i,iii,v} {i,iii,vi} {i,iii,vii} {i,iii,viii} {i,iii,ix} {i,iii,x} {i,iii,xi} {i,iv,v} {i,iv,vi} {i,iv,vii}

【 0 1 6 2 】

10

20

30

40

50

【化 1 - 2】

{i,iv,viii} {i,iv,ix} {i,iv,x} {i,iv,xi} {i,v,vii} {i,v,viii} {i,v,ix} {i,v,x} {i,v,xi} {i,vi,vii} {i,vi,viii} {i,vi,ix} {i,vi,x} {i,vi,xi} {i,vii,viii} {i,vii,ix} {i,vii,x} {i,viii,ix} {i,viii,x} {i,ix,xi} {i,ix,x} {i,ix,xi} {ii,iii,iv} {ii,iii,v} {ii,iii,vi} {ii,iii,vii} {ii,iii,viii} {ii,iii,ix} {ii,iii,x} {ii,iii,xi} {ii,iv,v} {ii,iv,vi} {ii,iv,vii} {ii,iv,viii} {ii,iv,ix} {ii,iv,x} {ii,iv,xi} {ii,v,vi} {ii,v,vii} {ii,v,viii} {ii,v,ix} {ii,v,x} {ii,v,xi} {ii,vi,vii} {ii,vi,viii} {ii,vi,ix} {ii,vi,x} {ii,vi,xi} {ii,vii,viii} {ii,vii,ix} {ii,vii,x} {ii,viii,ix} {ii,viii,x} {ii,viii,xi} {ii,ix,x} {ii,ix,xi} {ii,x,xi} {iii,iv,v} {iii,iv,vi} {iii,iv,vii} {iii,iv,viii} {iii,iv,ix} {iii,iv,x} {iii,iv,xi} {iii,v,vi} {iii,v,vii} {iii,v,viii} {iii,v,ix} {iii,v,x} {iii,v,xi} {iii,vi,vii} {iii,vi,viii} {iii,vi,ix} {iii,vi,x} {iii,vi,xi} {iii,vii,viii} {iii,vii,ix} {iii,vii,x} {iii,viii,ix} {iii,viii,x} {iii,viii,xi} {i,ii,iii,iv} {i,ii,iii,v} {i,ii,iii,vi} {i,ii,iii,vii} {i,ii,iii,ix} {i,ii,iii,x} {i,ii,iii,xi} {i,ii,iv,v} {i,ii,iv,vi} {i,ii,iv,vii} {i,ii,iv,viii} {i,ii,iv,ix} {i,ii,iv,x} {i,ii,iv,xi} {i,ii,v,vi} {i,ii,v,vii} {i,ii,v,viii} {i,ii,v,ix} {i,ii,v,x} {i,ii,v,xi} {i,ii,vi,vii} {i,ii,vi,viii} {i,ii,vi,ix} {i,ii,vi,x} {i,ii,vi,xi} {i,ii,vii,viii} {i,ii,vii,ix} {i,ii,vii,x} {i,ii,viii,ix} {i,ii,viii,x} {i,ii,viii,xi} {i,ii,ix,x} {i,ii,ix,xi} {i,ii,x,xi} {i,iii,iv,v} {i,iii,iv,vi} {i,iii,iv,vii} {i,iii,iv,viii} {i,iii,iv,ix} {i,iii,iv,x} {i,iii,iv,xi} {i,iii,v,vi} {i,iii,v,vii} {i,iii,v,viii} {i,iii,v,ix} {i,iii,v,x} {i,iii,v,xi} {i,iii,vi,vii} {i,iii,vi,viii} {i,iii,vi,ix} {i,iii,vi,x} {i,iii,vi,xi} {i,iii,vii,viii} {i,iii,vii,ix} {i,iii,vii,x} {i,iii,viii,ix} {i,iii,viii,x} {i,iii,viii,xi} {i,iii,ix,x} {i,iii,ix,xi} {i,iii,x,xi} {i,iv,v,vi} {i,iv,v,vii} {i,iv,v,viii} {i,iv,v,ix} {i,iv,v,x} {i,iv,v,xi} {i,iv,vi,vii} {i,iv,vi,viii} {i,iv,vi,ix} {i,iv,vi,x} {i,iv,vi,xi} {i,iv,vii,viii} {i,iv,vii,ix} {i,iv,vii,x} {i,iv,viii,ix} {i,iv,viii,x} {i,iv,viii,xi} {i,iv,ix,x} {i,iv,ix,xi} {i,iv,x,xi} {i,v,vi,vii} {i,v,vi,viii} {i,v,vi,ix} {i,v,vi,x} {i,v,vi,xi} {i,v,vii,viii} {i,v,vii,ix} {i,v,vii,x} {i,v,viii,ix} {i,v,viii,x} {i,v,viii,xi} {i,v,ix,x} {i,v,ix,xi} {i,v,x,xi} {i,vi,vii,viii} {i,vi,vii,ix} {i,vi,vii,x} {i,vi,viii,ix} {i,vi,viii,x} {i,vi,viii,xi} {i,vi,ix,x} {i,vi,ix,xi} {i,vi,x,xi} {i,vii,viii,ix} {i,vii,viii,x} {i,vii,viii,xi} {i,vii,ix,x} {i,vii,ix,xi} {i,vii,x,xi} {i,viii,ix,x} {i,viii,ix,xi} {i,viii,x,xi} {i,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v} {ii,iii,iv,vi} {ii,iii,iv,vii} {ii,iii,iv,viii} {ii,iii,iv,ix} {ii,iii,iv,x} {ii,iii,iv,xi} {ii,iii,v,vi} {ii,iii,v,vii} {ii,iii,v,viii} {ii,iii,v,ix} {ii,iii,v,x} {ii,iii,v,xi} {ii,iii,vi,vii} {ii,iii,vi,viii} {ii,iii,vi,ix} {ii,iii,vi,x} {ii,iii,vi,xi} {ii,iii,vii,viii} {ii,iii,vii,ix} {ii,iii,vii,x} {ii,iii,viii,ix} {ii,iii,viii,x} {ii,iii,viii,xi} {ii,iii,ix,x} {ii,iii,ix,xi} {ii,iii,x,xi} {ii,iv,v,vi} {ii,iv,v,vii} {ii,iv,v,viii} {ii,iv,v,ix} {ii,iv,v,x} {ii,iv,v,xi} {ii,iv,vi,vii} {ii,iv,vi,viii} {ii,iv,vi,ix} {ii,iv,vi,x} {ii,iv,vi,xi} {ii,iv,vii,viii} {ii,iv,vii,ix} {ii,iv,vii,x} {ii,iv,viii,ix} {ii,iv,viii,x} {ii,iv,viii,xi} {ii,iv,ix,x} {ii,iv,ix,xi} {ii,iv,x,xi} {ii,v,vi,vii} {ii,v,vi,viii} {ii,v,vi,ix} {ii,v,vi,x} {ii,v,vi,xi} {ii,v,vii,viii} {ii,v,vii,ix} {ii,v,vii,x} {ii,v,viii,ix} {ii,v,viii,x} {ii,v,viii,xi} {ii,v,ix,x} {ii,v,ix,xi} {ii,v,x,xi} {ii,vi,vii,viii} {ii,vi,vii,ix} {ii,vi,vii,x} {ii,vi,viii,ix} {ii,vi,viii,x} {ii,vi,viii,xi} {ii,vi,ix,x} {ii,vi,ix,xi} {ii,vi,x,xi} {ii,vii,viii,ix} {ii,vii,viii,x} {ii,vii,viii,xi} {ii,vii,ix,x} {ii,vii,ix,xi} {ii,vii,x,xi} {ii,viii,ix,x} {ii,viii,ix,xi} {ii,viii,x,xi} {ii,ix,x,xi} {iii,iv,v,vi} {iii,iv,v,vii} {iii,iv,v,viii} {iii,iv,v,ix} {iii,iv,v,x} {iii,iv,v,xi} {iii,iv,vi,vii} {iii,iv,vi,viii} {iii,iv,vi,ix} {iii,iv,vi,x} {iii,iv,vi,xi} {iii,iv,vii,viii} {iii,iv,vii,ix} {iii,iv,vii,x} {iii,iv,viii,ix} {iii,iv,viii,x} {iii,iv,viii,xi} {iii,iv,ix,x} {iii,iv,ix,xi} {iii,iv,x,xi} {iii,v,vi,vii} {iii,v,vi,viii} {iii,v,vi,ix} {iii,v,vi,x} {iii,v,vi,xi} {iii,v,vii,viii} {iii,v,vii,ix} {iii,v,vii,x} {iii,v,viii,ix} {iii,v,viii,x} {iii,v,viii,xi} {iii,v,ix,x} {iii,v,ix,xi} {iii,v,x,xi} {iii,vi,vii,viii} {iii,vi,vii,ix} {iii,vi,vii,x} {iii,vi,viii,ix} {iii,vi,viii,x} {iii,vi,viii,xi} {iii,vi,ix,x} {iii,vi,ix,xi} {iii,vi,x,xi} {iii,vii,viii,ix} {iii,vii,viii,x} {iii,vii,viii,xi} {iii,vii,ix,x} {iii,vii,ix,xi} {iii,vii,x,xi} {iii,viii,ix,x} {iii,viii,ix,xi} {iii,viii,x,xi} {iii,ix,x,xi} {iv,v,vi,vii} {iv,v,vi,viii} {iv,v,vi,ix} {iv,v,vi,x} {iv,v,vi,xi} {iv,v,vii,viii} {iv,v,vii,ix} {iv,v,vii,x} {iv,v,viii,ix} {iv,v,viii,x} {iv,v,viii,xi} {iv,v,ix,x} {iv,v,ix,xi} {iv,v,x,xi} {iv,vi,vii,viii} {iv,vi,vii,ix} {iv,vi,vii,x} {iv,vi,viii,ix} {iv,vi,viii,x} {iv,vi,viii,xi} {iv,vi,ix,x} {iv,vi,ix,xi} {iv,vi,x,xi} {iv,vii,viii,ix} {iv,vii,viii,x} {iv,vii,viii,xi} {iv,vii,ix,x} {iv,vii,ix,xi} {iv,vii,x,xi} {iv,viii,ix,x} {iv,viii,ix,xi} {iv,viii,x,xi} {iv,ix,x,xi} {v,vi,vii,viii} {v,vi,vii,ix} {v,vi,vii,x} {v,vi,viii,ix} {v,vi,viii,x} {v,vi,viii,xi} {v,vi,ix,x} {v,vi,ix,xi} {v,vi,x,xi} {v,vii,viii,ix} {v,vii,viii,x} {v,vii,viii,xi} {v,vii,ix,x} {v,vii,ix,xi} {v,vii,x,xi} {v,viii,ix,x} {v,viii,ix,xi} {v,viii,x,xi} {v,ix,x,xi} {vi,vii,viii,ix} {vi,vii,viii,x} {vi,vii,viii,xi} {vi,vii,ix,x} {vi,vii,ix,xi} {vi,vii,x,xi} {vi,viii,ix,x} {vi,viii,ix,xi} {vi,viii,x,xi} {vi,ix,x,xi} {vii,viii,ix,x} {vii,viii,ix,xi} {vii,viii,x,xi} {vii,ix,x,xi} {viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,iv,v} {i,ii,iii,iv,vi} {i,ii,iii,iv,vii}

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

{i,ii,iii,iv,viii} {i,ii,iii,iv,ix} {i,ii,iii,iv,x} {i,ii,iii,iv,xi} {i,ii,iii,v,vi} {i,ii,iii,v,vii} {i,ii,iii,v,viii} {i,ii,iii,v,ix} {i,ii,iii,v,x} {i,ii,iii,v,xi} {i,ii,iii,vi,vii} {i,ii,iii,vi,viii} {i,ii,iii,vi,ix} {i,ii,iii,vi,x} {i,ii,iii,vi,xi} {i,ii,iii,vii,viii} {i,ii,iii,vii,ix} {i,ii,iii,vii,x} {i,ii,iii,vii,xi} {i,ii,iii,viii,ix} {i,ii,iii,viii,xi} {i,ii,iii,ix,x} {i,ii,iii,ix,xi} {i,ii,iii,x,xi} {i,ii,iv,v,vi} {i,ii,iv,v,vii} {i,ii,iv,v,viii} {i,ii,iv,v,ix} {i,ii,iv,v,xi} {i,ii,iv,v,xi} {i,ii,iv,vi,viii} {i,ii,iv,vi,ix} {i,ii,iv,vi,x} {i,ii,iv,vi,xi} {i,ii,iv,vii,viii} {i,ii,iv,vii,ix} {i,ii,iv,vii,x} {i,ii,iv,vii,xi} {i,ii,iv,ix,x} {i,ii,iv,ix,xi} {i,ii,iv,x,xi} {i,ii,v,vi,vii} {i,ii,v,vi,viii} {i,ii,v,vi,ix} {i,ii,v,vi,x} {i,ii,v,vi,xi} {i,ii,v,vii,viii} {i,ii,v,vii,ix} {i,ii,v,vii,x} {i,ii,v,vii,xi} {i,ii,v,ix,x} {i,ii,v,ix,xi} {i,ii,v,x,xi} {i,ii,vi,vii,viii} {i,ii,vi,vii,ix} {i,ii,vi,vii,x} {i,ii,vi,vii,xi} {i,ii,vi,ix,x} {i,ii,vi,ix,xi} {i,ii,vi,x,xi} {i,ii,vii,viii,ix} {i,ii,vii,viii,xi} {i,ii,vii,ix,x} {i,ii,vii,ix,xi} {i,ii,vii,x,xi} {i,ii,ix,x,xi} {i,iii,iv,v,vi} {i,iii,iv,v,vii} {i,iii,iv,v,viii} {i,iii,iv,v,ix} {i,iii,iv,v,x} {i,iii,iv,v,xi} {i,iii,iv,vi,vii} {i,iii,iv,vi,viii} {i,iii,iv,vi,ix} {i,iii,iv,vi,x} {i,iii,iv,vi,xi} {i,iii,iv,vii,viii} {i,iii,iv,vii,ix} {i,iii,iv,vii,x} {i,iii,iv,vii,xi} {i,iii,iv,viii,ix} {i,iii,iv,viii,xi} {i,iii,iv,ix,x} {i,iii,iv,ix,xi} {i,iii,iv,x,xi} {i,iii,v,vi,vii} {i,iii,v,vi,viii} {i,iii,v,vi,ix} {i,iii,v,vi,x} {i,iii,v,vi,xi} {i,iii,v,vii,viii} {i,iii,v,vii,ix} {i,iii,v,vii,x} {i,iii,v,vii,xi} {i,iii,v,ix,x} {i,iii,v,ix,xi} {i,iii,v,x,xi} {i,iii,vi,vii,viii} {i,iii,vi,vii,ix} {i,iii,vi,vii,x} {i,iii,vi,vii,xi} {i,iii,vi,ix,x} {i,iii,vi,ix,xi} {i,iii,vi,x,xi} {i,iii,vii,viii,ix} {i,iii,vii,viii,xi} {i,iii,vii,ix,x} {i,iii,vii,ix,xi} {i,iii,vii,x,xi} {i,iii,viii,ix,x} {i,iii,viii,ix,xi} {i,iii,viii,x,xi} {i,iii,ix,x,xi} {i,iii,ix,xi,xi} {i,iii,x,xi,xi} {i,iv,v,vi,vii} {i,iv,v,vi,viii} {i,iv,v,vi,ix} {i,iv,v,vi,x} {i,iv,v,vi,xi} {i,iv,v,vii,viii} {i,iv,v,vii,ix} {i,iv,v,vii,x} {i,iv,v,vii,xi} {i,iv,v,ix,x} {i,iv,v,ix,xi} {i,iv,v,x,xi} {i,iv,vi,vii,viii} {i,iv,vi,vii,ix} {i,iv,vi,vii,x} {i,iv,vi,vii,xi} {i,iv,vi,ix,x} {i,iv,vi,ix,xi} {i,iv,vi,x,xi} {i,iv,vi,viii,ix} {i,iv,vi,viii,xi} {i,iv,vi,ix,x} {i,iv,vi,ix,xi} {i,iv,vi,x,xi} {i,iv,vi,viii,ix} {i,iv,vi,viii,xi} {i,iv,vi,ix,x} {i,iv,vi,ix,xi} {i,iv,vi,x,xi} {i,iv,vi,viii,ix} {i,iv,vi,viii,xi} {i,iv,vi,ix,x} {i,iv,vi,ix,xi} {i,iv,vi,x,xi} {i,v,vi,vii,ix} {i,v,vi,vii,x} {i,v,vi,vii,xi} {i,v,vi,viii,ix} {i,v,vi,viii,xi} {i,v,vi,ix,x} {i,v,vi,ix,xi} {i,v,vi,x,xi} {i,v,vii,viii,ix} {i,v,vii,viii,xi} {i,v,vii,ix,x} {i,v,vii,ix,xi} {i,v,vii,x,xi} {i,v,viii,ix,x} {i,v,viii,ix,xi} {i,v,viii,x,xi} {i,v,ix,x,xi} {i,vi,vii,viii,ix} {i,vi,vii,viii,xi} {i,vi,vii,ix,x} {i,vi,vii,ix,xi} {i,vi,vii,x,xi} {i,vi,viii,ix,x} {i,vi,viii,ix,xi} {i,vi,viii,x,xi} {i,vi,ix,x,xi} {i,vii,viii,ix,x} {i,vii,viii,ix,xi} {i,vii,viii,x,xi} {i,vii,ix,x,xi} {i,viii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v,vi} {ii,iii,iv,v,vii} {ii,iii,iv,v,viii} {ii,iii,iv,v,ix} {ii,iii,iv,v,x} {ii,iii,iv,v,xi} {ii,iii,iv,vi,vii} {ii,iii,iv,vi,viii} {ii,iii,iv,vi,ix} {ii,iii,iv,vi,x} {ii,iii,iv,vi,xi} {ii,iii,iv,vii,viii} {ii,iii,iv,vii,ix} {ii,iii,iv,vii,x} {ii,iii,iv,vii,xi} {ii,iii,iv,viii,ix} {ii,iii,iv,viii,xi} {ii,iii,iv,ix,x} {ii,iii,iv,ix,xi} {ii,iii,iv,x,xi} {ii,iii,v,vi,vii} {ii,iii,v,vi,viii} {ii,iii,v,vi,ix} {ii,iii,v,vi,x} {ii,iii,v,vi,xi} {ii,iii,v,vii,viii} {ii,iii,v,vii,ix} {ii,iii,v,vii,x} {ii,iii,v,vii,xi} {ii,iii,v,ix,x} {ii,iii,v,ix,xi} {ii,iii,v,x,xi} {ii,iii,vi,vii,viii} {ii,iii,vi,vii,ix} {ii,iii,vi,vii,x} {ii,iii,vi,vii,xi} {ii,iii,vi,ix,x} {ii,iii,vi,ix,xi} {ii,iii,vi,x,xi} {ii,iii,vii,viii,ix} {ii,iii,vii,viii,xi} {ii,iii,vii,ix,x} {ii,iii,vii,ix,xi} {ii,iii,vii,x,xi} {ii,iii,viii,ix,x} {ii,iii,viii,ix,xi} {ii,iii,viii,x,xi} {ii,iii,ix,x,xi} {ii,iii,ix,xi,xi} {ii,iii,x,xi,xi} {ii,iv,v,vi,vii} {ii,iv,v,vi,viii} {ii,iv,v,vi,ix} {ii,iv,v,vi,x} {ii,iv,v,vi,xi} {ii,iv,v,vii,viii} {ii,iv,v,vii,ix} {ii,iv,v,vii,x} {ii,iv,v,vii,xi} {ii,iv,v,ix,x} {ii,iv,v,ix,xi} {ii,iv,v,x,xi} {ii,iv,vi,vii,viii} {ii,iv,vi,vii,ix} {ii,iv,vi,vii,x} {ii,iv,vi,vii,xi} {ii,iv,vi,ix,x} {ii,iv,vi,ix,xi} {ii,iv,vi,x,xi} {ii,iv,vi,viii,ix} {ii,iv,vi,viii,xi} {ii,iv,vi,ix,x} {ii,iv,vi,ix,xi} {ii,iv,vi,x,xi} {ii,iv,vi,viii,ix} {ii,iv,vi,viii,xi} {ii,iv,vi,ix,x} {ii,iv,vi,ix,xi} {ii,iv,vi,x,xi} {ii,iv,vi,viii,ix} {ii,iv,vi,viii,xi} {ii,iv,vi,ix,x} {ii,iv,vi,ix,xi} {ii,iv,vi,x,xi} {ii,iv,vi,viii,ix} {ii,iv,vi,viii,xi} {ii,iv,vi,ix,x} {ii,iv,vi,ix,xi} {ii,iv,vi,x,xi} {ii,iv,vii,viii,ix} {ii,iv,vii,viii,xi} {ii,iv,vii,ix,x} {ii,iv,vii,ix,xi} {ii,iv,vii,x,xi} {ii,iv,viii,ix,x} {ii,iv,viii,ix,xi} {ii,iv,viii,x,xi} {ii,iv,ix,x,xi} {ii,v,vi,vii,viii} {ii,v,vi,vii,ix} {ii,v,vi,vii,x} {ii,v,vi,vii,xi} {ii,v,vi,ix,x} {ii,v,vi,ix,xi} {ii,v,vi,x,xi} {ii,v,vii,viii,ix} {ii,v,vii,viii,xi} {ii,v,vii,ix,x} {ii,v,vii,ix,xi} {ii,v,vii,x,xi} {ii,v,viii,ix,x} {ii,v,viii,ix,xi} {ii,v,viii,x,xi} {ii,v,ix,x,xi} {ii,vi,vii,viii,ix} {ii,vi,vii,viii,xi} {ii,vi,vii,ix,x} {ii,vi,vii,ix,xi} {ii,vi,vii,x,xi} {ii,vi,viii,ix,x} {ii,vi,viii,ix,xi} {ii,vi,viii,x,xi} {ii,vi,ix,x,xi} {ii,vii,viii,ix,x} {ii,vii,viii,ix,xi} {ii,vii,viii,x,xi} {ii,vii,ix,x,xi} {ii,viii,ix,x,xi} {iii,iv,v,vi,vii} {iii,iv,v,vi,viii} {iii,iv,v,vi,ix} {iii,iv,v,vi,x} {iii,iv,v,vi,xi} {iii,iv,v,vii,viii} {iii,iv,v,vii,ix} {iii,iv,v,vii,x} {iii,iv,v,vii,xi} {iii,iv,v,ix,x} {iii,iv,v,ix,xi} {iii,iv,v,x,xi} {iii,iv,vi,vii,viii} {iii,iv,vi,vii,ix} {iii,iv,vi,vii,x} {iii,iv,vi,vii,xi} {iii,iv,vi,ix,x} {iii,iv,vi,ix,xi} {iii,iv,vi,x,xi} {iii,iv,vii,viii,ix} {iii,iv,vii,viii,xi} {iii,iv,vii,ix,x} {iii,iv,vii,ix,xi} {iii,iv,vii,x,xi} {iii,iv,viii,ix,x} {iii,iv,viii,ix,xi} {iii,iv,viii,x,xi} {iii,iv,ix,x,xi} {iii,iv,ix,xi,xi} {iii,iv,x,xi,xi} {iii,v,vi,vii,viii} {iii,v,vi,vii,ix} {iii,v,vi,vii,x} {iii,v,vi,vii,xi} {iii,v,vi,ix,x} {iii,v,vi,ix,xi} {iii,v,vi,x,xi} {iii,v,vii,viii,ix} {iii,v,vii,viii,xi} {iii,v,vii,ix,x} {iii,v,vii,ix,xi} {iii,v,vii,x,xi} {iii,v,viii,ix,x} {iii,v,viii,ix,xi} {iii,v,viii,x,xi} {iii,v,ix,x,xi} {iii,vi,vii,viii,ix} {iii,vi,vii,viii,xi} {iii,vi,vii,ix,x} {iii,vi,vii,ix,xi} {iii,vi,vii,x,xi} {iii,vi,viii,ix,x} {iii,vi,viii,ix,xi} {iii,vi,viii,x,xi} {iii,vi,ix,x,xi} {iii,vii,viii,ix,x} {iii,vii,viii,ix,xi} {iii,vii,viii,x,xi} {iii,vii,ix,x,xi} {iii,viii,ix,x,xi} {iiii,iv,v,vi,vii} {iiii,iv,v,vi,viii} {iiii,iv,v,vi,ix} {iiii,iv,v,vi,x} {iiii,iv,v,vi,xi} {iiii,iv,v,vii,viii} {iiii,iv,v,vii,ix} {iiii,iv,v,vii,x} {iiii,iv,v,vii,xi} {iiii,iv,v,ix,x} {iiii,iv,v,ix,xi} {iiii,iv,v,x,xi} {iiii,iv,vi,vii,viii} {iiii,iv,vi,vii,ix} {iiii,iv,vi,vii,x} {iiii,iv,vi,vii,xi} {iiii,iv,vi,ix,x} {iiii,iv,vi,ix,xi} {iiii,iv,vi,x,xi} {iiii,iv,vii,viii,ix} {iiii,iv,vii,viii,xi} {iiii,iv,vii,ix,x} {iiii,iv,vii,ix,xi} {iiii,iv,vii,x,xi} {iiii,iv,viii,ix,x} {iiii,iv,viii,ix,xi} {iiii,iv,viii,x,xi} {iiii,iv,ix,x,xi} {iiii,iv,ix,xi,xi} {iiii,iv,x,xi,xi} {iiii,v,vi,vii,viii} {iiii,v,vi,vii,ix} {iiii,v,vi,vii,x}

【 0 1 6 4 】

{iii,iv,v,vi,viii}	{iii,iv,v,vi,ix}	{iii,iv,v,vi,x}	{iii,iv,v,vi,vii,viii}	{iii,iv,v,vii,ix}	{iii,iv,v,vii,x}	{iii,iv,v,vii,x}	{iii,iv,v,vii,ix}
{iii,iv,v,viii,ix}	{iii,iv,v,viii,x}	{iii,iv,v,viii,xi}	{iii,iv,v,ix,x}	{iii,iv,v,ix,xi}	{iii,iv,v,x,xi}	{iii,iv,vi,vii,viii}	{iii,iv,vi,vii,ix}
{iii,iv,vi,vii,x}	{iii,iv,vi,vii,xi}	{iii,iv,vi,viii,ix}	{iii,iv,vi,viii,x}	{iii,iv,vi,viii,xi}	{iii,iv,vi,ix,x}	{iii,iv,vi,ix,xi}	{iii,iv,vi,x,xi}
{iii,iv,vii,viii,ix}	{iii,iv,vii,viii,x}	{iii,iv,vii,viii,xi}	{iii,iv,vii,ix,x}	{iii,iv,vii,ix,xi}	{iii,iv,vii,x,xi}	{iii,iv,viii,ix,x}	{iii,iv,viii,ix,xi}
{iii,iv,viii,ix,xi}	{iii,iv,viii,x,xi}	{iii,iv,ix,x,xi}	{iii,v,vi,vii,viii}	{iii,v,vi,vii,ix}	{iii,v,vi,vii,x}	{iii,v,vi,vii,xi}	{iii,v,vi,viii,ix}
{iii,v,vi,viii,x}	{iii,v,vi,viii,xi}	{iii,v,vi,ix,x}	{iii,v,vi,ix,xi}	{iii,v,vi,x,xi}	{iii,v,vii,viii,ix}	{iii,v,vii,viii,x}	{iii,v,vii,viii,xi}
{iii,v,vii,ix,x}	{iii,v,vii,ix,xi}	{iii,v,vii,x,xi}	{iii,v,viii,ix,x}	{iii,v,viii,ix,xi}	{iii,v,viii,x,xi}	{iii,v,ix,x,xi}	{iii,vi,vii,viii,ix}
{iii,vi,vii,viii,x}	{iii,vi,vii,viii,xi}	{iii,vi,vii,ix,x}	{iii,vi,vii,ix,xi}	{iii,vi,vii,x,xi}	{iii,vi,viii,ix,x}	{iii,vi,viii,ix,xi}	{iii,vi,viii,ix,xi}
{iii,vi,viii,x,xi}	{iii,vi,ix,x,xi}	{iii,vii,viii,ix,x}	{iii,vii,viii,ix,xi}	{iii,vii,viii,x,xi}	{iii,vii,ix,x,xi}	{iii,viii,ix,x,xi}	{iii,viii,ix,x,xi}
{iv,v,vi,vii,viii}	{iv,v,vi,vii,ix}	{iv,v,vi,vii,x}	{iv,v,vi,vii,xi}	{iv,v,vi,viii,ix}	{iv,v,vi,viii,x}	{iv,v,vi,viii,xi}	{iv,v,vi,ix,x}
{iv,v,vi,ix,xi}	{iv,v,vi,x,xi}	{iv,v,vii,viii,ix}	{iv,v,vii,viii,x}	{iv,v,vii,viii,xi}	{iv,v,vii,ix,x}	{iv,v,vii,ix,xi}	{iv,v,vii,x,xi}
{iv,v,viii,ix,x}	{iv,v,viii,ix,xi}	{iv,v,viii,x,xi}	{iv,v,ix,x,xi}	{iv,vi,vii,viii,ix}	{iv,vi,vii,viii,x}	{iv,vi,vii,viii,xi}	{iv,vi,vii,viii,xi}
{iv,vi,vii,ix,x}	{iv,vi,vii,ix,xi}	{iv,vi,vii,x,xi}	{iv,vi,viii,ix,x}	{iv,vi,viii,ix,xi}	{iv,vi,viii,x,xi}	{iv,vi,ix,x,xi}	{iv,vi,vii,viii,ix}
{iv,vii,viii,ix,x}	{iv,vii,viii,ix,xi}	{iv,vii,viii,x,xi}	{iv,vii,ix,x,xi}	{iv,viii,ix,x,xi}	{v,vi,vii,viii,ix}	{v,vi,vii,viii,x}	{v,vi,vii,viii,xi}
{v,vi,vii,viii,xi}	{v,vi,vii,ix,x}	{v,vi,vii,ix,xi}	{v,vi,vii,x,xi}	{v,vi,viii,ix,x}	{v,vi,viii,ix,xi}	{v,vi,viii,x,xi}	{v,vi,ix,x,xi}
{v,vii,viii,ix,x}	{v,vii,viii,ix,xi}	{v,vii,viii,x,xi}	{v,vii,ix,x,xi}	{v,viii,ix,x,xi}	{vi,vii,viii,ix,x}	{vi,vii,viii,ix,xi}	{vi,vii,viii,ix,xi}
{vi,vii,viii,x,xi}	{vi,vii,ix,x,xi}	{vi,viii,ix,x,xi}	{vii,viii,ix,x,xi}	{i,ii,iii,iv,v,vi}	{i,ii,iii,iv,v,vii}	{i,ii,iii,iv,v,viii}	{i,ii,iii,iv,v,ix}
{i,ii,iii,iv,v,ix}	{i,ii,iii,iv,v,x}	{i,ii,iii,iv,v,xi}	{i,ii,iii,iv,vi,vii}	{i,ii,iii,iv,vi,viii}	{i,ii,iii,iv,vi,ix}	{i,ii,iii,iv,vi,x}	{i,ii,iii,iv,vi,xi}
{i,ii,iii,iv,vii,viii}	{i,ii,iii,iv,vii,ix}	{i,ii,iii,iv,vii,x}	{i,ii,iii,iv,vii,xi}	{i,ii,iii,iv,viii,ix}	{i,ii,iii,iv,viii,x}	{i,ii,iii,iv,viii,xi}	{i,ii,iii,iv,ix,x}
{i,ii,iii,iv,ix,xi}	{i,ii,iii,iv,ix,xi}	{i,ii,iii,v,vi,vii}	{i,ii,iii,v,vi,viii}	{i,ii,iii,v,vi,ix}	{i,ii,iii,v,vi,x}	{i,ii,iii,v,vi,xi}	{i,ii,iii,v,vii,viii}
{i,ii,iii,v,vii,viii}	{i,ii,iii,v,vii,ix}	{i,ii,iii,v,vii,x}	{i,ii,iii,v,vii,xi}	{i,ii,iii,v,viii,ix}	{i,ii,iii,v,viii,x}	{i,ii,iii,v,viii,xi}	{i,ii,iii,v,ix,x}
{i,ii,iii,v,ix,x}	{i,ii,iii,v,ix,xi}	{i,ii,iii,v,x,xi}	{i,ii,iii,vi,vii,viii}	{i,ii,iii,vi,vii,ix}	{i,ii,iii,vi,vii,x}	{i,ii,iii,vi,vii,xi}	{i,ii,iii,vi,viii,ix}
{i,ii,iii,vi,viii,ix}	{i,ii,iii,vi,viii,x}	{i,ii,iii,vi,viii,xi}	{i,ii,iii,vi,ix,x}	{i,ii,iii,vi,ix,xi}	{i,ii,iii,vi,x,xi}	{i,ii,iii,vii,viii,ix}	{i,ii,iii,vii,viii,xi}
{i,ii,iii,vii,viii,x}	{i,ii,iii,vii,viii,xi}	{i,ii,iii,vii,ix,x}	{i,ii,iii,vii,ix,xi}	{i,ii,iii,vii,x,xi}	{i,ii,iii,viii,ix,x}	{i,ii,iii,viii,ix,xi}	{i,ii,iii,viii,ix,xi}
{i,ii,iii,viii,x,xi}	{i,ii,iii,ix,x,xi}	{i,ii,iv,v,vi,vii}	{i,ii,iv,v,vi,viii}	{i,ii,iv,v,vi,ix}	{i,ii,iv,v,vi,x}	{i,ii,iv,v,vi,xi}	{i,ii,iv,v,vii,viii}
{i,ii,iv,v,vii,viii}	{i,ii,iv,v,vii,ix}	{i,ii,iv,v,vii,x}	{i,ii,iv,v,vii,xi}	{i,ii,iv,v,viii,ix}	{i,ii,iv,v,viii,x}	{i,ii,iv,v,viii,xi}	{i,ii,iv,v,ix,x}
{i,ii,iv,v,ix,x}	{i,ii,iv,v,ix,xi}	{i,ii,iv,v,x,xi}	{i,ii,iv,vi,vii,viii}	{i,ii,iv,vi,vii,ix}	{i,ii,iv,vi,vii,x}	{i,ii,iv,vi,vii,xi}	{i,ii,iv,vi,viii,ix}
{i,ii,iv,vi,viii,ix}	{i,ii,iv,vi,viii,xi}	{i,ii,iv,vi,viii,xi}	{i,ii,iv,vi,ix,x}	{i,ii,iv,vi,ix,xi}	{i,ii,iv,vi,x,xi}	{i,ii,iv,vii,viii,ix}	{i,ii,iv,vii,viii,xi}
{i,ii,iv,vii,viii,x}	{i,ii,iv,vii,viii,xi}	{i,ii,iv,vii,ix,x}	{i,ii,iv,vii,ix,xi}	{i,ii,iv,vii,x,xi}	{i,ii,iv,viii,ix,x}	{i,ii,iv,viii,ix,xi}	{i,ii,iv,viii,ix,xi}
{i,ii,iv,viii,x,xi}	{i,ii,iv,ix,x,xi}	{i,ii,v,vi,vii,viii}	{i,ii,v,vi,vii,ix}	{i,ii,v,vi,vii,x}	{i,ii,v,vi,vii,xi}	{i,ii,v,vi,viii,ix}	{i,ii,v,vi,viii,xi}
{i,ii,v,vi,viii,x}	{i,ii,v,vi,viii,xi}	{i,ii,v,vi,ix,x}	{i,ii,v,vi,ix,xi}	{i,ii,v,vi,x,xi}	{i,ii,v,vii,viii,ix}	{i,ii,v,vii,viii,xi}	{i,ii,v,vii,viii,xi}
{i,ii,v,vii,viii,xi}	{i,ii,v,vii,ix,x}	{i,ii,v,vii,ix,xi}	{i,ii,v,vii,x,xi}	{i,ii,v,viii,ix,x}	{i,ii,v,viii,ix,xi}	{i,ii,v,viii,ix,xi}	{i,ii,v,ix,x,xi}
{i,ii,vi,vii,viii,ix}	{i,ii,vi,vii,viii,xi}	{i,ii,vi,vii,viii,xi}	{i,ii,vi,vii,viii,xi}	{i,ii,vi,vii,ix,x}	{i,ii,vi,vii,ix,xi}	{i,ii,vi,vii,ix,xi}	{i,ii,vi,vii,x,xi}
{i,ii,vi,viii,ix,x}	{i,ii,vi,viii,ix,xi}	{i,ii,vi,viii,x,xi}	{i,ii,vi,ix,x,xi}	{i,ii,vii,viii,ix,x}	{i,ii,vii,viii,ix,xi}	{i,ii,vii,viii,ix,xi}	{i,ii,vii,viii,ix,xi}
{i,ii,vii,ix,x,xi}	{i,ii,viii,ix,x,xi}	{i,iii,iv,v,vi,vii}	{i,iii,iv,v,vi,viii}	{i,iii,iv,v,vi,ix}	{i,iii,iv,v,vi,x}	{i,iii,iv,v,vi,xi}	

50

{i,iii,v,vi,viii,x}	{i,iii,v,vi,viii,xi}	{i,iii,v,vi,ix,x}	{i,iii,v,vi,ix,xi}	{i,iii,v,vi,ix,x}	{i,iii,v,vii,viii,ix}	{i,iii,v,vii,viii,xi}
{i,iii,v,vii,viii,xi}	{i,iii,v,vii,ix,x}	{i,iii,v,vii,ix,xi}	{i,iii,v,vii,x,xi}	{i,iii,v,viii,ix,x}	{i,iii,v,viii,ix,xi}	{i,iii,v,viii,x,xi}
{i,iii,v,ix,x,xi}	{i,iii,vi,vii,viii,ix}	{i,iii,vi,vii,viii,x}	{i,iii,vi,vii,viii,xi}	{i,iii,vi,vii,ix,x}	{i,iii,vi,vii,ix,xi}	{i,iii,vi,vii,x,xi}
{i,iii,vi,viii,ix,x}	{i,iii,vi,viii,ix,xi}	{i,iii,vi,viii,x,xi}	{i,iii,vi,ix,x,xi}	{i,iii,vii,viii,ix,x}	{i,iii,vii,viii,ix,xi}	{i,iii,vii,viii,x,xi}
{i,iii,vii,ix,x,xi}	{i,iii,viii,ix,x,xi}	{i,iv,v,vi,vii,viii}	{i,iv,v,vi,vii,ix}	{i,iv,v,vi,vii,x}	{i,iv,v,vi,vii,xi}	{i,iv,v,vi,viii,ix}
{i,iv,v,vi,viii,x}	{i,iv,v,vi,viii,xi}	{i,iv,v,vi,ix,x}	{i,iv,v,vi,ix,xi}	{i,iv,v,vi,x,xi}	{i,iv,v,vii,viii,ix}	{i,iv,v,vii,viii,x}
{i,iv,v,vii,viii,xi}	{i,iv,v,vii,ix,x}	{i,iv,v,vii,ix,xi}	{i,iv,v,vii,x,xi}	{i,iv,v,viii,ix,x}	{i,iv,v,viii,ix,xi}	{i,iv,v,viii,x,xi}
{i,iv,v,ix,x,xi}	{i,iv,vi,vii,viii,ix}	{i,iv,vi,vii,viii,x}	{i,iv,vi,vii,viii,xi}	{i,iv,vi,vii,ix,x}	{i,iv,vi,vii,ix,xi}	{i,iv,vi,vii,x,xi}
{i,iv,vi,viii,ix,x}	{i,iv,vi,viii,ix,xi}	{i,iv,vi,viii,x,xi}	{i,iv,vi,ix,x,xi}	{i,iv,vii,viii,ix,x}	{i,iv,vii,viii,ix,xi}	{i,iv,vii,viii,x,xi}
{i,iv,vii,ix,x,xi}	{i,iv,viii,ix,x,xi}	{i,v,vi,vii,viii,ix}	{i,v,vi,vii,viii,x}	{i,v,vi,vii,viii,xi}	{i,v,vi,vii,ix,x}	{i,v,vi,vii,ix,xi}
{i,v,vi,vii,x,xi}	{i,v,vi,viii,ix,x}	{i,v,vi,viii,ix,xi}	{i,v,vi,viii,x,xi}	{i,v,vi,ix,x,xi}	{i,v,vii,viii,ix,x}	{i,v,vii,viii,ix,xi}
{i,v,vii,viii,x,xi}	{i,v,vii,ix,x,xi}	{i,v,viii,ix,x,xi}	{i,vi,vii,viii,ix,x}	{i,vi,vii,viii,ix,xi}	{i,vi,vii,viii,x,xi}	{i,vi,vii,ix,x,xi}
{i,vi,viii,ix,x,xi}	{i,vii,viii,ix,x,xi}	{ii,iii,iv,v,vi,vii}	{ii,iii,iv,v,vi,viii}	{ii,iii,iv,v,vi,ix}	{ii,iii,iv,v,vi,x}	{ii,iii,iv,v,vi,xi}
{ii,iii,iv,v,vii,viii}	{ii,iii,iv,v,vii,ix}	{ii,iii,iv,v,vii,xi}	{ii,iii,iv,v,viii,ix}	{ii,iii,iv,v,viii,x}	{ii,iii,iv,v,viii,xi}	{ii,iii,iv,v,viii,x}
{ii,iii,iv,v,ix,x}	{ii,iii,iv,v,ix,xi}	{ii,iii,iv,v,x,xi}	{ii,iii,iv,vi,vii,viii}	{ii,iii,iv,vi,vii,ix}	{ii,iii,iv,vi,vii,xi}	{ii,iii,iv,vi,vii,x}
{ii,iii,iv,vi,viii,ix}	{ii,iii,iv,vi,viii,x}	{ii,iii,iv,vi,viii,xi}	{ii,iii,iv,vi,ix,x}	{ii,iii,iv,vi,ix,xi}	{ii,iii,iv,vi,x,xi}	{ii,iii,iv,vii,viii,ix}
{ii,iii,iv,vii,viii,x}	{ii,iii,iv,vii,viii,xi}	{ii,iii,iv,vii,ix,x}	{ii,iii,iv,vii,ix,xi}	{ii,iii,iv,vii,x,xi}	{ii,iii,iv,viii,ix,x}	{ii,iii,iv,viii,ix,xi}
{ii,iii,iv,viii,x,xi}	{ii,iii,iv,ix,x,xi}	{ii,iii,v,vi,vii,viii}	{ii,iii,v,vi,vii,ix}	{ii,iii,v,vi,vii,x}	{ii,iii,v,vi,vii,xi}	{ii,iii,v,vi,viii,ix}
{ii,iii,v,vi,viii,x}	{ii,iii,v,vi,viii,xi}	{ii,iii,v,vi,ix,x}	{ii,iii,v,vi,ix,xi}	{ii,iii,v,vi,x,xi}	{ii,iii,v,vii,viii,ix}	{ii,iii,v,vii,viii,x}
{ii,iii,v,vii,viii,xi}	{ii,iii,v,vii,ix,x}	{ii,iii,v,vii,ix,xi}	{ii,iii,v,vii,x,xi}	{ii,iii,v,viii,ix,x}	{ii,iii,v,viii,ix,xi}	{ii,iii,v,viii,x,xi}
{ii,iii,v,ix,x,xi}	{ii,iii,vi,vii,viii,ix}	{ii,iii,vi,vii,viii,x}	{ii,iii,vi,vii,viii,xi}	{ii,iii,vi,vii,ix,x}	{ii,iii,vi,vii,ix,xi}	{ii,iii,vi,vii,x,xi}
{ii,iii,vi,viii,ix,x}	{ii,iii,vi,viii,ix,xi}	{ii,iii,vi,viii,x,xi}	{ii,iii,vi,ix,x,xi}	{ii,iii,vi,ix,xi}	{ii,iii,vii,viii,ix,x}	{ii,iii,vii,viii,ix,xi}
{ii,iii,vii,viii,x,xi}	{ii,iii,vii,ix,x,xi}	{ii,iii,viii,ix,x,xi}	{ii,iv,v,vi,vii,viii}	{ii,iv,v,vi,vii,ix}	{ii,iv,v,vi,vii,x}	{ii,iv,v,vi,vii,xi}
{ii,iv,v,vi,viii,ix}	{ii,iv,v,vi,viii,xi}	{ii,iv,v,vi,ix,x}	{ii,iv,v,vi,ix,xi}	{ii,iv,v,vi,x,xi}	{ii,iv,v,vii,viii,ix}	{ii,iv,v,vii,viii,x}
{ii,iv,v,vii,viii,x}	{ii,iv,v,vii,viii,xi}	{ii,iv,v,vii,ix,x}	{ii,iv,v,vii,ix,xi}	{ii,iv,v,vii,x,xi}	{ii,iv,v,viii,ix,x}	{ii,iv,v,viii,ix,xi}
{ii,iv,v,viii,x,xi}	{ii,iv,v,ix,x,xi}	{ii,iv,vi,vii,viii,ix}	{ii,iv,vi,vii,viii,x}	{ii,iv,vi,vii,viii,xi}	{ii,iv,vi,vii,ix,x}	{ii,iv,vi,vii,ix,xi}
{ii,iv,vi,vii,x,xi}	{ii,iv,vi,viii,ix,x}	{ii,iv,vi,viii,ix,xi}	{ii,iv,vi,viii,x,xi}	{ii,iv,vi,ix,x,xi}	{ii,iv,vii,viii,ix,x}	{ii,iv,vii,viii,ix,xi}
{ii,iv,vii,viii,ix,xi}	{ii,iv,vii,viii,x,xi}	{ii,iv,vii,ix,x,xi}	{ii,iv,viii,ix,x,xi}	{ii,v,vi,vii,viii,ix}	{ii,v,vi,vii,viii,x}	{ii,v,vi,vii,viii,xi}
{ii,v,vi,vii,viii,xi}	{ii,v,vi,vii,ix,x}	{ii,v,vi,vii,ix,xi}	{ii,v,vi,vii,x,xi}	{ii,v,vi,viii,ix,x}	{ii,v,vi,viii,ix,xi}	{ii,v,vi,viii,x,xi}
{ii,v,vi,ix,x,xi}	{ii,v,vii,viii,ix,x}	{ii,v,vii,viii,ix,xi}	{ii,v,vii,viii,x,xi}	{ii,v,vii,ix,x,xi}	{ii,v,viii,ix,x,xi}	{ii,vi,vii,viii,ix,x}
{ii,vi,vii,viii,ix,xi}	{ii,vi,vii,viii,x,xi}	{ii,vi,vii,ix,x,xi}	{ii,vi,viii,ix,x,xi}	{ii,vii,viii,ix,x,xi}	{iii,iv,v,vi,vii,viii}	
{iii,iv,v,vi,vii,ix}	{iii,iv,v,vi,vii,x}	{iii,iv,v,vi,vii,xi}	{iii,iv,v,vi,viii,ix}	{iii,iv,v,vi,viii,x}	{iii,iv,v,vi,viii,xi}	{iii,iv,v,vi,ix,x}
{iii,iv,v,vi,ix,xi}	{iii,iv,v,vi,x,xi}	{iii,iv,v,vii,viii,ix}	{iii,iv,v,vii,viii,x}	{iii,iv,v,vii,viii,xi}	{iii,iv,v,vii,viii,xi}	{iii,iv,v,vii,ix,x}
{iii,iv,v,vii,ix,xi}	{iii,iv,v,vii,x,xi}	{iii,iv,v,viii,ix,x}	{iii,iv,v,viii,ix,xi}	{iii,iv,v,viii,x,xi}	{iii,iv,v,viii,x,xi}	{iii,iv,v,ix,x,xi}
{iii,iv,vi,vii,viii,ix}	{iii,iv,vi,vii,viii,x}	{iii,iv,vi,vii,viii,xi}	{iii,iv,vi,vii,ix,x}	{iii,iv,vi,vii,ix,xi}	{iii,iv,vi,vii,ix,xi}	{iii,iv,vi,vii,x,xi}
{iii,iv,vi,viii,ix,x}	{iii,iv,vi,viii,ix,xi}	{iii,iv,vi,viii,x,xi}	{iii,iv,vi,ix,x,xi}	{iii,iv,vii,viii,ix,x}	{iii,iv,vii,viii,ix,xi}	{iii,iv,vii,viii,xi}
{iii,iv,vii,viii,x,xi}	{iii,iv,vii,ix,x,xi}	{iii,iv,viii,ix,x,xi}	{iii,v,vi,vii,viii,ix}	{iii,v,vi,vii,viii,x}	{iii,v,vi,vii,viii,x}	{iii,v,vi,vii,viii,xi}
{iii,v,vi,vii,ix,x}	{iii,v,vi,vii,ix,xi}	{iii,v,vi,vii,x,xi}	{iii,v,vii,viii,ix,x}	{iii,v,vii,viii,ix,xi}	{iii,v,vii,viii,ix,xi}	{iii,v,vii,viii,xi}
{iii,vi						

【 0 1 6 6 】

【化 1 - 6】

{iv,v,vi,vii,viii,x}	{iv,v,vi,vii,viii,xi}	{iv,v,vi,vii,ix,x}	{iv,v,vi,vii,ix,xi}	{iv,v,vi,vii,x,xi}	{iv,v,vi,viii,ix,x}
{iv,v,vi,viii,ix,xi}	{iv,v,vi,viii,x,xi}	{iv,v,vi,ix,x,xi}	{iv,v,vii,viii,ix,x}	{iv,v,vii,viii,ix,xi}	{iv,v,vii,viii,x,xi}
{iv,v,vii,ix,x,xi}	{iv,v,viii,ix,x,xi}	{iv,v,vii,viii,ix,x}	{iv,v,vii,viii,ix,xi}	{iv,v,vii,viii,x,xi}	{iv,v,vii,ix,x,xi}
{iv,vi,viii,ix,x,xi}	{iv,vii,viii,ix,x,xi}	{v,vi,vii,viii,ix,x}	{v,vi,vii,viii,ix,xi}	{v,vi,vii,viii,x,xi}	{v,vi,vii,ix,x,xi}
{v,vi,viii,ix,x,xi}	{v,vii,viii,ix,x,xi}	{vi,vii,viii,ix,x,xi}	{i,ii,iii,iv,v,vi,vii}	{i,ii,iii,iv,v,vi,viii}	{i,ii,iii,iv,v,vi,ix}
{i,ii,iii,iv,v,vi,x}	{i,ii,iii,iv,v,vi,xi}	{i,ii,iii,iv,v,vii,viii}	{i,ii,iii,iv,v,vii,ix}	{i,ii,iii,iv,v,vii,x}	{i,ii,iii,iv,v,vii,xi}
{i,ii,iii,iv,v,viii,ix}	{i,ii,iii,iv,v,viii,x}	{i,ii,iii,iv,v,viii,xi}	{i,ii,iii,iv,v,ix,x}	{i,ii,iii,iv,v,ix,xi}	{i,ii,iii,iv,v,x,xi}
{i,ii,iii,iv,vi,vii,viii}	{i,ii,iii,iv,vi,vii,ix}	{i,ii,iii,iv,vi,vii,x}	{i,ii,iii,iv,vi,vii,xi}	{i,ii,iii,iv,vi,viii,ix}	{i,ii,iii,iv,vi,viii,x}
{i,ii,iii,iv,vi,viii,xi}	{i,ii,iii,iv,vi,ix,x}	{i,ii,iii,iv,vi,ix,xi}	{i,ii,iii,iv,vi,x,xi}	{i,ii,iii,iv,vii,viii,ix}	{i,ii,iii,iv,vii,viii,x}
{i,ii,iii,iv,vii,viii,xi}	{i,ii,iii,iv,vii,ix,x}	{i,ii,iii,iv,vii,ix,xi}	{i,ii,iii,iv,vii,x,xi}	{i,ii,iii,iv,viii,ix,x}	{i,ii,iii,iv,viii,ix,xi}
{i,ii,iii,iv,viii,x,xi}	{i,ii,iii,iv,ix,x,xi}	{i,ii,iii,v,vi,vii,viii}	{i,ii,iii,v,vi,vii,ix}	{i,ii,iii,v,vi,vii,x}	{i,ii,iii,v,vi,vii,xi}
{i,ii,iii,v,vi,viii,ix}	{i,ii,iii,v,vi,viii,x}	{i,ii,iii,v,vi,viii,xi}	{i,ii,iii,v,vi,ix,x}	{i,ii,iii,v,vi,ix,xi}	{i,ii,iii,v,vi,x,xi}
{i,ii,iii,v,vii,viii,ix}	{i,ii,iii,v,vii,viii,x}	{i,ii,iii,v,vii,viii,xi}	{i,ii,iii,v,vii,ix,x}	{i,ii,iii,v,vii,ix,xi}	{i,ii,iii,v,vii,x,xi}
{i,ii,iii,v,viii,ix,x}	{i,ii,iii,v,viii,ix,xi}	{i,ii,iii,v,viii,x,xi}	{i,ii,iii,v,ix,x,xi}	{i,ii,iii,vi,vii,viii,ix}	{i,ii,iii,vi,vii,viii,x}
{i,ii,iii,vi,vii,viii,xi}	{i,ii,iii,vi,vii,ix,x}	{i,ii,iii,vi,vii,ix,xi}	{i,ii,iii,vi,vii,x,xi}	{i,ii,iii,vi,viii,ix,x}	{i,ii,iii,vi,viii,ix,xi}
{i,ii,iii,vi,viii,x,xi}	{i,ii,iii,vi,ix,x,xi}	{i,ii,iii,vii,viii,ix,x}	{i,ii,iii,vii,viii,ix,xi}	{i,ii,iii,vii,viii,x,xi}	{i,ii,iii,vii,ix,x,xi}
{i,ii,iii,viii,ix,x,xi}	{i,ii,iv,v,vi,vii,viii}	{i,ii,iv,v,vi,vii,ix}	{i,ii,iv,v,vi,vii,x}	{i,ii,iv,v,vi,vii,xi}	{i,ii,iv,v,vi,viii,ix}
{i,ii,iv,v,vi,viii,xi}	{i,ii,iv,v,vi,viii,xi}	{i,ii,iv,v,vi,ix,x}	{i,ii,iv,v,vi,ix,xi}	{i,ii,iv,v,vi,x,xi}	{i,ii,iv,v,vii,viii,ix}
{i,ii,iv,v,vii,viii,xi}	{i,ii,iv,v,vii,viii,xi}	{i,ii,iv,v,vii,ix,x}	{i,ii,iv,v,vii,ix,xi}	{i,ii,iv,v,vii,x,xi}	{i,ii,iv,v,viii,ix,x}
{i,ii,iv,v,viii,ix,xi}	{i,ii,iv,v,viii,x,xi}	{i,ii,iv,v,viii,xi}	{i,ii,iv,vi,vii,viii,ix}	{i,ii,iv,vi,vii,viii,xi}	{i,ii,iv,vi,vii,viii,xi}
{i,ii,iv,vi,vii,ix,xi}	{i,ii,iv,vi,vii,ix,xi}	{i,ii,iv,vi,viii,ix,x}	{i,ii,iv,vi,viii,ix,xi}	{i,ii,iv,vi,viii,ix,xi}	{i,ii,iv,vi,viii,xi}
{i,ii,iv,vi,ix,x,xi}	{i,ii,iv,vii,viii,ix,x}	{i,ii,iv,vii,viii,ix,xi}	{i,ii,iv,vii,viii,x,xi}	{i,ii,iv,vii,ix,x,xi}	{i,ii,iv,viii,ix,x,xi}
{i,ii,v,vi,vii,viii,ix}	{i,ii,v,vi,vii,viii,x}	{i,ii,v,vi,vii,viii,xi}	{i,ii,v,vi,vii,ix,x}	{i,ii,v,vi,vii,ix,xi}	{i,ii,v,vi,vii,x,xi}
{i,ii,v,vi,viii,ix,x}	{i,ii,v,vi,viii,ix,xi}	{i,ii,v,vi,viii,x,xi}	{i,ii,v,vi,ix,x,xi}	{i,ii,v,vii,viii,ix,x}	{i,ii,v,vii,viii,ix,xi}
{i,ii,v,vii,viii,xi}	{i,ii,v,vii,ix,x,xi}	{i,ii,v,viii,ix,x,xi}	{i,ii,vi,vii,viii,ix,x}	{i,ii,vi,vii,viii,ix,xi}	{i,ii,vi,vii,viii,x,xi}
{i,ii,vi,vii,ix,x,xi}	{i,ii,vi,viii,ix,x,xi}	{i,ii,vii,viii,ix,x,xi}	{i,iii,iv,v,vi,vii,viii}	{i,iii,iv,v,vi,vii,ix}	{i,iii,iv,v,vi,vii,x}
{i,iii,iv,v,vi,vii,xi}	{i,iii,iv,v,vi,viii,ix}	{i,iii,iv,v,vi,viii,x}	{i,iii,iv,v,vi,viii,xi}	{i,iii,iv,v,vi,ix,x}	{i,iii,iv,v,vi,ix,xi}
{i,iii,iv,v,vi,x,xi}	{i,iii,iv,v,vii,viii,ix}	{i,iii,iv,v,vii,viii,x}	{i,iii,iv,v,vii,viii,xi}	{i,iii,iv,v,vii,ix,x}	{i,iii,iv,v,vii,ix,xi}
{i,iii,iv,v,vii,x,xi}	{i,iii,iv,v,viii,ix,x}	{i,iii,iv,v,viii,ix,xi}	{i,iii,iv,v,viii,x,xi}	{i,iii,iv,v,ix,x,xi}	{i,iii,iv,vi,vii,viii,ix}
{i,iii,iv,vi,vii,viii,x}	{i,iii,iv,vi,vii,viii,xi}	{i,iii,iv,vi,vii,ix,x}	{i,iii,iv,vi,vii,ix,xi}	{i,iii,iv,vi,vii,x,xi}	{i,iii,iv,vi,viii,ix,x}
{i,iii,iv,vi,viii,xi}	{i,iii,iv,vi,ix,x,xi}	{i,iii,iv,vii,viii,ix,x}	{i,iii,iv,vii,viii,ix,xi}	{i,iii,iv,vii,viii,ix,xi}	{i,iii,iv,vii,viii,x,xi}
{i,iii,iv,vii,ix,x,xi}	{i,iii,iv,viii,ix,x,xi}	{i,iii,v,vi,vii,viii,ix}	{i,iii,v,vi,vii,viii,x}	{i,iii,v,vi,vii,viii,xi}	{i,iii,v,vi,vii,ix,x}
{i,iii,v,vi,vii,ix,xi}	{i,iii,v,vi,vii,x,xi}	{i,iii,v,vi,viii,ix,x}	{i,iii,v,vi,viii,ix,xi}	{i,iii,v,vi,viii,x,xi}	{i,iii,v,vi,ix,x,xi}
{i,iii,v,vii,viii,ix,x}	{i,iii,v,vii,viii,ix,xi}	{i,iii,v,vii,viii,x,xi}	{i,iii,v,vii,ix,x,xi}	{i,iii,v,viii,ix,x,xi}	{i,iii,vi,vii,viii,ix,x}
{i,iii,vi,vii,viii,ix,xi}	{i,iii,vi,vii,viii,x,xi}	{i,iii,vi,vii,ix,x,xi}	{i,iii,vi,viii,ix,x,xi}	{i,iii,vii,viii,ix,x,xi}	{i,iv,v,vi,vii,viii,ix}
{i,iv,v,vi,vii,viii,x}	{i,iv,v,vi,vii,viii,xi}	{i,iv,v,vi,vii,ix,x}	{i,iv,v,vi,vii,ix,xi}	{i,iv,v,vi,vii,x,xi}	{i,iv,v,vi,viii,ix,x}
{i,iv,v,vi,viii,xi}	{i,iv,v,vi,viii,x,xi}	{i,iv,v,vi,ix,x,xi}	{i,iv,v,vii,viii,ix,x}	{i,iv,v,vii,viii,ix,xi}	{i,iv,v,vii,viii,x,xi}
{i,iv,v,vii,ix,x,xi}	{i,iv,v,viii,ix,x,xi}	{i,iv,vi,vii,viii,ix,x}	{i,iv,vi,vii,viii,ix,xi}	{i,iv,vi,vii,viii,x,xi}	{i,iv,vi,vii,ix,x,xi}
{i,iv,vi,viii,ix,x,xi}	{i,iv,vii,viii,ix,x,xi}	{i,v,vi,vii,viii,ix,x}	{i,v,vi,vii,viii,ix,xi}	{i,v,vi,vii,viii,x,xi}	{i,v,vi,vii,ix,x,xi}
{i,v,vi,viii,ix,x,xi}	{i,v,vii,viii,ix,x,xi}	{i,vi,vii,viii,ix,x,xi}	{ii,iii,iv,v,vi,vii,viii}	{ii,iii,iv,v,vi,vii,ix}	{ii,iii,iv,v,vi,vii,x}

10

20

30

40

【 0 1 6 7 】

【化 1 - 8】

{i,iii,iv,v,viii,ix,x,xi} {i,iii,iv,vi,vii,viii,ix,x} {i,iii,iv,vi,vii,viii,ix,xi} {i,iii,iv,vi,vii,viii,x,xi} {i,iii,iv,vi,vii,ix,x,xi}
 {i,iii,iv,vi,viii,ix,x,xi} {i,iii,iv,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,v,vi,vii,viii,ix,x} {i,iii,v,vi,vii,viii,ix,xi} {i,iii,v,vi,vii,viii,x,xi}
 {i,iii,v,vi,viii,ix,x,xi} {i,iii,v,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,vi,vii,viii,ix,x,xi}
 {i,iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,iv,v,vi,vii,viii,x,xi} {i,iv,v,vi,vii,ix,x,xi} {i,iv,v,vi,viii,ix,x,xi} {i,iv,v,vii,viii,ix,x,xi}
 {i,iv,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,iv,vi,vii,viii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix} {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,x} {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,xi}
 {ii,iii,iv,v,vi,vii,ix,x} {ii,iii,iv,v,vi,vii,ix,xi} {ii,iii,iv,v,vi,vii,x,xi} {ii,iii,iv,v,vi,viii,ix,x} {ii,iii,iv,v,vi,viii,ix,xi}
 {ii,iii,iv,v,vi,viii,x,xi} {ii,iii,iv,v,vi,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v,vii,viii,ix,x} {ii,iii,iv,v,vii,viii,ix,xi} {ii,iii,iv,v,vii,viii,x,xi}
 {ii,iii,iv,v,vii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v,viii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,vi,vii,viii,ix,x} {ii,iii,iv,vi,vii,viii,ix,xi} {ii,iii,iv,vi,vii,viii,x,xi}
 {ii,iii,iv,vi,vii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,vi,viii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,vii,viii,ix,x,xi} {ii,iii,v,vi,vii,viii,ix,x} {ii,iii,v,vi,vii,viii,ix,xi}
 {ii,iii,v,vi,vii,viii,x,xi} {ii,iii,v,vi,vii,ix,x,xi} {ii,iii,v,vi,viii,ix,x,xi} {ii,iii,v,vii,viii,ix,x,xi} {ii,iii,v,vii,viii,ix,x,xi}
 {ii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x} {ii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi} {ii,iv,v,vi,vii,viii,x,xi} {ii,iv,v,vi,vii,ix,x,xi} {ii,iv,v,vi,viii,ix,x,xi}
 {ii,iv,v,vii,viii,ix,x,xi} {ii,iv,vi,vii,viii,ix,x,xi} {ii,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x} {iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi}
 {iii,iv,v,vi,vii,viii,x,xi} {iii,iv,v,vi,vii,ix,x,xi} {iii,iv,v,vi,viii,ix,x,xi} {iii,iv,v,vii,viii,ix,x,xi} {iii,iv,vi,vii,viii,ix,x,xi}
 {iii,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,x} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,xi}
 {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,ix,x} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,ix,xi} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,x,xi} {i,ii,iii,iv,v,vi,viii,ix,x} {i,ii,iii,iv,v,vi,viii,ix,xi}
 {i,ii,iii,iv,v,vi,viii,x,xi} {i,ii,iii,iv,v,vi,ix,x,xi} {i,ii,iii,iv,v,vii,viii,ix,x} {i,ii,iii,iv,v,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iii,iv,v,vii,viii,x,xi}
 {i,ii,iii,iv,v,vii,ix,x,xi} {i,ii,iii,iv,v,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,iv,vi,vii,viii,ix,x} {i,ii,iii,iv,vi,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iii,iv,vi,vii,viii,x,xi}
 {i,ii,iii,iv,vi,vii,ix,x,xi} {i,ii,iii,iv,vi,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,iv,vii,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,v,vi,vii,viii,ix,x} {i,ii,iii,v,vi,vii,viii,ix,xi}
 {i,ii,iii,v,vi,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iii,v,vi,vii,ix,x,xi} {i,ii,iii,v,vi,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,v,vii,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,vi,vii,viii,ix,x,xi}
 {i,ii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x} {i,ii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iv,v,vi,vii,viii,x,xi} {i,ii,iv,v,vi,vii,ix,x,xi} {i,ii,iv,v,vi,viii,ix,x,xi}
 {i,ii,iv,v,vii,viii,ix,x,xi} {i,ii,iv,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,ii,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x} {i,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi}
 {i,iii,iv,v,vi,vii,viii,x,xi} {i,iii,iv,v,vi,vii,ix,x,xi} {i,iii,iv,v,vi,viii,ix,x,xi} {i,iii,iv,v,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,iv,vi,vii,viii,ix,x,xi}
 {i,iii,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x} {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi} {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi}
 {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,x,xi} {ii,iii,iv,v,vi,vii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v,vii,viii,ix,x,xi} {iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi}
 {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,x,xi} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi}
 {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iii,iv,v,vii,viii,ix,xi} {i,ii,iii,iv,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,ii,iii,v,vi,vii,viii,ix,x,xi}
 {i,ii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {i,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} {ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi} または {i,ii,iii,iv,v,vi,vii,viii,ix,x,xi}.

10

20

30

を含むことがある。

【0169】

バリエーションは、(i)および(iii)～(xi)のいずれか1つを含む場合、Y51、N55およびF56の1つもしくは複数、例えば、Y51、N55、F56、Y51/N55、Y51/F56、N55/F56またはY51/N55/F56における変異をさらに含むことがある。

40

【0170】

(i)において、バリエーションは、N40、D43、E44、S54、S57、Q62、R97、E101、E124、E131、R142、T150およびR192のあらゆる数および組合せでの変異を含むことがある。(i)において、バリエーションは、好ましくは、次の位置における1つまたは複数の変異(すなわち、次の位置の1つもしくは複数における変異)を含む：N40、D43、E44、S54、S57、Q62、E101、E131およびT150。(i)において、バリエーションは、好ましくは、次の位置における1つまたは複数の変異(すなわち、次の位置の1つもしくは複数における変異)を含む：N40、D43、E44、E101およびE131。(i)において、バリエーションは、好ましくは、S54および/またはS57における変異を含む。(i)において、バリエーション

50

は、より好ましくは、(a) S 5 4 および / または S 5 7 ならびに (b) Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6 または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 における変異を含む。(x i) で S 5 4 および / または S 5 7 が欠失されている場合、それ / それらは (i) における変異を受けることができず、逆もまた同様である。(i) において、バリエーションは、好ましくは、T 1 5 0 における変異、例えば T 1 5 0 I を含む。あるいは、バリエーションは、好ましくは、(a) T 1 5 0 ならびに (b) Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6 または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 における変異を含む。(i) において、バリエーションは、好ましくは、Q 6 2 における変異、例えば Q 6 2 R または Q 6 2 K を含む。あるいは、バリエーションは、好ましくは、(a) Q 6 2 ならびに (b) Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6 または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 における変異を含む。バリエーションは、D 4 3、E 4 4、Q 6 2 またはこれらの任意の組合せ、例えば、D 4 3、E 4 4、Q 6 2、D 4 3 / E 4 4、D 4 3 / Q 6 2、E 4 4 / Q 6 2 または D 4 3 / E 4 4 / Q 6 2 における変異を含むことがある。あるいは、バリエーションは、好ましくは、(a) D 4 3、E 4 4、Q 6 2、D 4 3 / E 4 4、D 4 3 / Q 6 2、E 4 4 / Q 6 2 または D 4 3 / E 4 4 / Q 6 2 ならびに (b) Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6 または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 における変異を含む。

【 0 1 7 1 】

本出願における (i i) および他の箇所での / という記号は「および」を意味し、したがって Y 5 1 / N 5 5 は、Y 5 1 および N 5 5 である。(i i) において、バリエーションは、好ましくは、Y 5 1 / N 5 5 における変異を含む。C s g G 内の狭窄は、残基 Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の側鎖によって形成される 3 つの積み重なった同心環で作られると提唱されている (Goyal et al., 2014, Nature, 516, 250-253)。したがって、(i i) においてのこれらの残基の変異は、ポリヌクレオチドがポアを通過して移動しているときに電流に寄与するヌクレオチドの数を減少させることによって、(ポリヌクレオチドがポアを通過して移動しているときの) 観測電流とポリヌクレオチドとの直接的関連の同定をより容易にすることができる。本発明の方法に有用なバリエーションおよびポアに関して下で論じる方法のいずれかで Y 5 6 を変異させてもよい。

【 0 1 7 2 】

(v)において、バリエーションは、N102R、N102F、N102YまたはN102Wを含むことがある。バリエーションは、好ましくは、(a)N102R、N102F、N102YまたはN102W、ならびに(b)Y51、N55およびF56の1つもしくは複数、例えば、Y51、N55、F56、Y51/N55、Y51/F56、N55/F56またはY51/N55/F56における変異を含む。

【 0 1 7 3 】

(x i) において、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5、F 5 6 および S 5 7 のあらゆる数および組合せが、欠失されていることがある。好ましくは、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5 および S 5 7 の 1 つもしくは複数が、欠失されていることがある。(x i) で Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 のいずれかが欠失されている場合、それ/それらは (i i) における変異を受けることができず、逆もまた同様である。

【 0 1 7 4 】

(i) において、バリエントは、好ましくは、次の置換： N 4 0 R、N 4 0 K、D 4 3 N、D 4 3 Q、D 4 3 R、D 4 3 K、E 4 4 N、E 4 4 Q、E 4 4 R、E 4 4 K、S 5 4 P、S 5 7 P、Q 6 2 R、Q 6 2 K、R 9 7 N、R 9 7 G、R 9 7 L、E 1 0 1 N、E 1 0 1 Q、E 1 0 1 R、E 1 0 1 K、E 1 0 1 F、E 1 0 1 Y、E 1 0 1 W、E 1 2 4 N、E 1 2 4 O、E 1 2 4 R、E 1 2 4 K、E 1 2 4 F、E 1 2 4 Y、E 1 2 4 W、E 1 3 1

D、R 1 4 2 E、R 1 4 2 N、T 1 5 0 I、R 1 9 2 EおよびR 1 9 2 Nの1つまたは複数、例えば、N 4 0 R、N 4 0 K、D 4 3 N、D 4 3 Q、D 4 3 R、D 4 3 K、E 4 4 N、E 4 4 Q、E 4 4 R、E 4 4 K、S 5 4 P、S 5 7 P、Q 6 2 R、Q 6 2 K、E 1 0 1 N、E 1 0 1 Q、E 1 0 1 R、E 1 0 1 K、E 1 0 1 F、E 1 0 1 Y、E 1 0 1 W、E 1 3 1 DおよびT 1 5 0 Iの1つもしくは複数、またはN 4 0 R、N 4 0 K、D 4 3 N、D 4 3 Q、D 4 3 R、D 4 3 K、E 4 4 N、E 4 4 Q、E 4 4 R、E 4 4 K、E 1 0 1 N、E 1 0 1 Q、E 1 0 1 R、E 1 0 1 K、E 1 0 1 F、E 1 0 1 Y、E 1 0 1 WおよびE 1 3 1 Dの1つもしくは複数を含む。バリエーションは、これらの置換のあらゆる数および組合せを含むことがある。(i)において、バリエーションは、好ましくは、S 5 4 Pおよび/またはS 5 7 Pを含む。(i)において、バリエーションは、好ましくは、(a) S 5 4 Pおよび/またはS 5 7 P、ならびに(b) Y 5 1、N 5 5およびF 5 6の1つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6またはY 5 1 / N 5 5 / F 5 6における変異を含む。Y 5 1、N 5 5およびF 5 6の1つもしくは複数における変異は、下で論じるもののいずれであってもよい。(i)において、バリエーションは、好ましくは、F 5 6 A / S 5 7 PまたはS 5 4 P / F 5 6 Aを含む。バリエーションは、好ましくは、T 1 5 0 Iを含む。あるいは、バリエーションは、好ましくは、(a) T 1 5 0 Iならびに(b) Y 5 1、N 5 5およびF 5 6の1つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6またはY 5 1 / N 5 5 / F 5 6における変異を含む。

10

【0175】

20

(i)において、バリエーションは、好ましくは、Q 6 2 RまたはQ 6 2 Kを含む。あるいは、バリエーションは、好ましくは、(a) Q 6 2 RまたはQ 6 2 K、ならびに(b) Y 5 1、N 5 5およびF 5 6の1つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6またはY 5 1 / N 5 5 / F 5 6における変異を含む。バリエーションは、D 4 3 N、E 4 4 N、Q 6 2 RもしくはQ 6 2 Kまたはこれらのあらゆる組合せ、例えば、D 4 3 N、E 4 4 N、Q 6 2 R、Q 6 2 K、D 4 3 N / E 4 4 N、D 4 3 N / Q 6 2 R、D 4 3 N / Q 6 2 K、E 4 4 N / Q 6 2 R、E 4 4 N / Q 6 2 K、D 4 3 N / E 4 4 N / Q 6 2 RまたはD 4 3 N / E 4 4 N / Q 6 2 Kを含むことがある。あるいは、バリエーションは、好ましくは、(a) D 4 3 N、E 4 4 N、Q 6 2 R、Q 6 2 K、D 4 3 N / E 4 4 N、D 4 3 N / Q 6 2 R、D 4 3 N / Q 6 2 K、E 4 4 N / Q 6 2 R、E 4 4 N / Q 6 2 K、D 4 3 N / E 4 4 N / Q 6 2 RまたはD 4 3 N / E 4 4 N / Q 6 2 K、ならびに(b) Y 5 1、N 5 5およびF 5 6の1つもしくは複数、例えば、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6またはY 5 1 / N 5 5 / F 5 6における変異を含む。

30

【0176】

(i)において、バリエーションは、好ましくは、D 4 3 Nを含む。

【0177】

(i)において、バリエーションは、好ましくは、E 1 0 1 R、E 1 0 1 S、E 1 0 1 FまたはE 1 0 1 Nを含む。

【0178】

40

(i)において、バリエーションは、好ましくは、E 1 2 4 N、E 1 2 4 Q、E 1 2 4 R、E 1 2 4 K、E 1 2 4 F、E 1 2 4 Y、E 1 2 4 WまたはE 1 2 4 D、例えばE 1 2 4 Nを含む。

【0179】

(i)において、バリエーションは、好ましくは、R 1 4 2 EおよびR 1 4 2 Nを含む。

【0180】

(i)において、バリエーションは、好ましくは、R 9 7 N、R 9 7 GまたはR 9 7 Lを含む。

【0181】

(i)において、バリエーションは、好ましくは、R 1 9 2 EおよびR 1 9 2 Nを含む。

50

【 0 1 8 2 】

(i i) において、バリエーションは、好ましくは、

【 0 1 8 3 】

【 化 2 - 1 】

F56N/N55Q, F56N/N55R, F56N/N55K, F56N/N55S,
 F56N/N55G, F56N/N55A, F56N/N55T, F56Q/N55Q, F56Q/N55R, F56Q /N55K, F56Q/N55S,
 F56Q/N55G, F56Q/N55A, F56Q/N55T, F56R/N55Q, F56R/N55R, F56R/N55K, F56R/N55S,
 F56R/N55G, F56R/N55A, F56R/N55T, F56S/N55Q, F56S/N55R, F56S/N55K, F56S/N55S, F56S/N55G,
 F56S/N55A, F56S/N55T, F56G/N55Q, F56G/N55R, F56G/N55K, F56G/N55S, F56G/N55G, 10
 F56G/N55A, F56G/N55T, F56A/N55Q, F56A/N55R, F56A/N55K, F56A/N55S, F56A/N55G, F56A/N55A,
 F56A/N55T, F56K/N55Q, F56K/N55R, F56K/N55K, F56K/N55S, F56K/N55G, F56K/N55A, F56K/N55T,
 F56N/Y51L, F56N/Y51V, F56N/Y51A, F56N/Y51N, F56N/Y51Q, F56N/Y51S, F56N/Y51G, F56Q/Y51L,
 F56Q/Y51V, F56Q/Y51A, F56Q/Y51N, F56Q/Y51Q, F56Q/Y51S, F56Q/Y51G, F56R/Y51L, F56R/Y51V,
 F56R/Y51A, F56R/Y51N, F56R/Y51Q, F56R/Y51S, F56R/Y51G, F56S/Y51L, F56S/Y51V, F56S/Y51A,
 F56S/Y51N, F56S/Y51Q, F56S/Y51S, F56S/Y51G, F56G/Y51L, F56G/Y51V, F56G/Y51A, F56G/Y51N,
 F56G/Y51Q, F56G/Y51S, F56G/Y51G, F56A/Y51L, F56A/Y51V, F56A/Y51A, F56A/Y51N, F56A/Y51Q,
 F56A/Y51S, F56A/Y51G, F56K/Y51L, F56K/Y51V, F56K/Y51A, F56K/Y51N, F56K/Y51Q, F56K/Y51S,
 F56K/Y51G, N55Q/Y51L, N55Q/Y51V, N55Q/Y51A, N55Q/Y51N, N55Q/Y51Q, N55Q/Y51S, 20
 N55Q/Y51G, N55R/Y51L, N55R/Y51V, N55R/Y51A, N55R/Y51N, N55R/Y51Q, N55R/Y51S,
 N55R/Y51G, N55K/Y51L, N55K/Y51V, N55K/Y51A, N55K/Y51N, N55K/Y51Q, N55K/Y51S,
 N55K/Y51G, N55S/Y51L, N55S/Y51V, N55S/Y51A, N55S/Y51N, N55S/Y51Q, N55S/Y51S,
 N55S/Y51G, N55G/Y51L, N55G/Y51V, N55G/Y51A, N55G/Y51N, N55G/Y51Q, N55G/Y51S,
 N55G/Y51G, N55A/Y51L, N55A/Y51V, N55A/Y51A, N55A/Y51N, N55A/Y51Q, N55A/Y51S,
 N55A/Y51G, N55T/Y51L, N55T/Y51V, N55T/Y51A, N55T/Y51N, N55T/Y51Q, N55T/Y51S, N55T/Y51G,
 F56N/N55Q/Y51L, F56N/N55Q/Y51V, F56N/N55Q/Y51A, F56N/N55Q/Y51N, F56N/N55Q/Y51Q,
 F56N/N55Q/Y51S, F56N/N55Q/Y51G, F56N/N55R/Y51L, F56N/N55R/Y51V, F56N/N55R/Y51A,
 F56N/N55R/Y51N, F56N/N55R/Y51Q, F56N/N55R/Y51S, F56N/N55R/Y51G, F56N/N55K/Y51L, 30
 F56N/N55K/Y51V, F56N/N55K/Y51A, F56N/N55K/Y51N, F56N/N55K/Y51Q, F56N/N55K/Y51S,
 F56N/N55K/Y51G, F56N/N55S/Y51L, F56N/N55S/Y51V, F56N/N55S/Y51A, F56N/N55S/Y51N,
 F56N/N55S/Y51Q, F56N/N55S/Y51S, F56N/N55S/Y51G, F56N/N55G/Y51L, F56N/N55G/Y51V,
 F56N/N55G/Y51A, F56N/N55G/Y51N, F56N/N55G/Y51Q, F56N/N55G/Y51S, F56N/N55G/Y51G,

【 0 1 8 4 】

10

20

30

40

50

[illegible]

【 0 1 8 5 】

【化 2 - 3】

F56G/N55A/Y51Q, F56G/N55A/Y51S, F56G/N55A/Y51G, F56G/N55T/Y51L, F56G/N55T/Y51V,
 F56G/N55T/Y51A, F56G/N55T/Y51N, F56G/N55T/Y51Q, F56G/N55T/Y51S, F56G/N55T/Y51G,
 F56A/N55Q/Y51L, F56A/N55Q/Y51V, F56A/N55Q/Y51A, F56A/N55Q/Y51N, F56A/N55Q/Y51Q,
 F56A/N55Q/Y51S, F56A/N55Q/Y51G, F56A/N55R/Y51L, F56A/N55R/Y51V, F56A/N55R/Y51A,
 F56A/N55R/Y51N, F56A/N55R/Y51Q, F56A/N55R/Y51S, F56A/N55R/Y51G, F56A/N55K/Y51L,
 F56A/N55K/Y51V, F56A/N55K/Y51A, F56A/N55K/Y51N, F56A/N55K/Y51Q, F56A/N55K/Y51S,
 F56A/N55K/Y51G, F56A/N55S/Y51L, F56A/N55S/Y51V, F56A/N55S/Y51A, F56A/N55S/Y51N,
 F56A/N55S/Y51Q, F56A/N55S/Y51S, F56A/N55S/Y51G, F56A/N55G/Y51L, F56A/N55G/Y51V,
 F56A/N55G/Y51A, F56A/N55G/Y51N, F56A/N55G/Y51Q, F56A/N55G/Y51S, F56A/N55G/Y51G,
 F56A/N55A/Y51L, F56A/N55A/Y51V, F56A/N55A/Y51A, F56A/N55A/Y51N, F56A/N55A/Y51Q,
 F56A/N55A/Y51S, F56A/N55A/Y51G, F56A/N55T/Y51L, F56A/N55T/Y51V, F56A/N55T/Y51A,
 F56A/N55T/Y51N, F56A/N55T/Y51Q, F56A/N55T/Y51S, F56A/N55T/Y51G, F56K/N55Q/Y51L,
 F56K/N55Q/Y51V, F56K/N55Q/Y51A, F56K/N55Q/Y51N, F56K/N55Q/Y51Q, F56K/N55Q/Y51S,
 F56K/N55Q/Y51G, F56K/N55R/Y51L, F56K/N55R/Y51V, F56K/N55R/Y51A, F56K/N55R/Y51N,
 F56K/N55R/Y51Q, F56K/N55R/Y51S, F56K/N55R/Y51G, F56K/N55K/Y51L, F56K/N55K/Y51V,
 F56K/N55K/Y51A, F56K/N55K/Y51N, F56K/N55K/Y51Q, F56K/N55K/Y51S, F56K/N55K/Y51G,
 F56K/N55S/Y51L, F56K/N55S/Y51V, F56K/N55S/Y51A, F56K/N55S/Y51N, F56K/N55S/Y51Q,
 F56K/N55S/Y51S, F56K/N55S/Y51G, F56K/N55G/Y51L, F56K/N55G/Y51V, F56K/N55G/Y51A,
 F56K/N55G/Y51N, F56K/N55G/Y51Q, F56K/N55G/Y51S, F56K/N55G/Y51G, F56K/N55A/Y51L,
 F56K/N55A/Y51V, F56K/N55A/Y51A, F56K/N55A/Y51N, F56K/N55A/Y51Q, F56K/N55A/Y51S,
 F56K/N55A/Y51G, F56K/N55T/Y51L, F56K/N55T/Y51V, F56K/N55T/Y51A, F56K/N55T/Y51N,
 F56K/N55T/Y51Q, F56K/N55T/Y51S, F56K/N55T/Y51G, F56E/N55R, F56E/N55K, F56D/N55R,
 F56D/N55K, F56R/N55E, F56R/N55D, F56K/N55E または F56K/N55D.

10

20

を含む。

30

【0186】

(ii)において、バリエーションは、好ましくは、Y51R/F56Q、Y51N/F56N、Y51M/F56Q、Y51L/F56Q、Y51I/F56Q、Y51V/F56Q、Y51A/F56Q、Y51P/F56Q、Y51G/F56Q、Y51C/F56Q、Y51Q/F56Q、Y51N/F56Q、Y51S/F56Q、Y51E/F56Q、Y51D/F56Q、Y51K/F56QまたはY51H/F56Qを含む。

【0187】

(ii)において、バリエーションは、好ましくは、Y51T/F56Q、Y51Q/F56QまたはY51A/F56Qを含む。

【0188】

(ii)において、バリエーションは、好ましくは、Y51T/F56F、Y51T/F56M、Y51T/F56L、Y51T/F56I、Y51T/F56V、Y51T/F56A、Y51T/F56P、Y51T/F56G、Y51T/F56C、Y51T/F56Q、Y51T/F56N、Y51T/F56T、Y51T/F56S、Y51T/F56E、Y51T/F56D、Y51T/F56K、Y51T/F56HまたはY51T/F56Rを含む。

40

【0189】

(ii)において、バリエーションは、好ましくは、Y51T/N55Q、Y51T/N55SまたはY51T/N55Aを含む。

【0190】

50

(i i)において、バリエーションは、好ましくは、Y 5 1 A / F 5 6 F、Y 5 1 A / F 5 6 L、Y 5 1 A / F 5 6 I、Y 5 1 A / F 5 6 V、Y 5 1 A / F 5 6 A、Y 5 1 A / F 5 6 P、Y 5 1 A / F 5 6 G、Y 5 1 A / F 5 6 C、Y 5 1 A / F 5 6 Q、Y 5 1 A / F 5 6 N、Y 5 1 A / F 5 6 T、Y 5 1 A / F 5 6 S、Y 5 1 A / F 5 6 E、Y 5 1 A / F 5 6 D、Y 5 1 A / F 5 6 K、Y 5 1 A / F 5 6 HまたはY 5 1 A / F 5 6 Rを含む。

【 0 1 9 1 】

(i i)において、バリエーションは、好ましくは、Y 5 1 C / F 5 6 A、Y 5 1 E / F 5 6 A、Y 5 1 D / F 5 6 A、Y 5 1 K / F 5 6 A、Y 5 1 H / F 5 6 A、Y 5 1 Q / F 5 6 A、Y 5 1 N / F 5 6 A、Y 5 1 S / F 5 6 A、Y 5 1 P / F 5 6 AまたはY 5 1 V / F 5 6 Aを含む。

10

【 0 1 9 2 】

(x i)において、バリエーションは、好ましくは、Y 5 1 / P 5 2の欠失、Y 5 1 / P 5 2 / A 5 3の欠失、P 5 0 ~ P 5 2の欠失、P 5 0 ~ A 5 3の欠失、K 4 9 ~ Y 5 1の欠失、K 4 9 ~ A 5 3の欠失および単一のプロリン (P)での置換、K 4 9 ~ S 5 4の欠失および単一のPでの置換、Y 5 1 ~ A 5 3の欠失、Y 5 1 ~ S 5 4の欠失、N 5 5 / F 5 6の欠失、N 5 5 ~ S 5 7の欠失、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のPでの置換、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のグリシン (G)での置換、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のアラニン (A)での置換、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のPでの置換およびY 5 1 N、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のPでの置換およびY 5 1 Q、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のPでの置換およびY 5 1 S、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のGでの置換およびY 5 1 N、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のGでの置換およびY 5 1 Q、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のGでの置換およびY 5 1 S、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のAでの置換およびY 5 1 N、N 5 5 / F 5 6の欠失および単一のAでの置換 / Y 5 1 Q、もしくはN 5 5 / F 5 6の欠失および単一のAでの置換およびY 5 1 Sを含む。

20

【 0 1 9 3 】

バリエーションは、より好ましくは、

【 0 1 9 4 】

30

40

50

【化 3 - 1】

D195N/E203N, D195Q/E203N, D195N/E203Q,
 D195Q/E203Q, E201N/E203N, E201Q/E203N, E201N/E203Q, E201Q/E203Q, E185N/E203Q,
 E185Q/E203Q, E185N/E203N, E185Q/E203N, D195N/E201N/E203N, D195Q/E201N/E203N,
 D195N/E201Q/E203N, D195N/E201N/E203Q, D195Q/E201Q/E203N, D195Q/E201N/E203Q,
 D195N/E201Q/E203Q, D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E201N, D149Q/E201N, D149N/E201Q,
 D149Q/E201Q, D149N/E201N/D195N, D149Q/E201N/D195N, D149N/E201Q/D195N,
 D149N/E201N/D195Q, D149Q/E201Q/D195N, D149Q/E201N/D195Q, D149N/E201Q/D195Q,
 D149Q/E201Q/D195Q, D149N/E203N, D149Q/E203N, D149N/E203Q, D149Q/E203Q, 10
 D149N/E185N/E201N, D149Q/E185N/E201N, D149N/E185Q/E201N, D149N/E185N/E201Q,
 D149Q/E185Q/E201N, D149Q/E185N/E201Q, D149N/E185Q/E201Q, D149Q/E185Q/E201Q,
 D149N/E185N/E203N, D149Q/E185N/E203N, D149N/E185Q/E203N, D149N/E185N/E203Q,
 D149Q/E185Q/E203N, D149Q/E185N/E203Q, D149N/E185Q/E203Q, D149Q/E185Q/E203Q,
 D149N/E185N/E201N/E203N, D149Q/E185N/E201N/E203N, D149N/E185Q/E201N/E203N,
 D149N/E185N/E201Q/E203N, D149N/E185N/E201N/E203Q, D149Q/E185Q/E201N/E203N,
 D149Q/E185N/E201Q/E203N, D149Q/E185N/E201N/E203Q, D149N/E185Q/E201Q/E203N,
 D149N/E185Q/E201N/E203Q, D149N/E185N/E201Q/E203Q, D149Q/E185Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185Q/E201N/E203Q, D149Q/E185N/E201Q/E203Q, D149N/E185Q/E201Q/E203Q, 20
 D149Q/E185Q/E201Q/E203N, D149N/E185N/D195N/E201N/E203N,
 D149Q/E185N/D195N/E201N/E203N, D149N/E185Q/D195N/E201N/E203N,
 D149N/E185N/D195Q/E201N/E203N, D149N/E185N/D195N/E201Q/E203N,
 D149N/E185N/D195N/E201N/E203Q, D149Q/E185Q/D195N/E201N/E203N,
 D149Q/E185N/D195Q/E201N/E203N, D149Q/E185N/D195N/E201Q/E203N,
 D149Q/E185N/D195N/E201N/E203Q, D149N/E185Q/D195Q/E201N/E203N,
 D149N/E185Q/D195N/E201Q/E203N, D149N/E185Q/D195N/E201N/E203Q,
 D149N/E185N/D195Q/E201Q/E203N, D149N/E185N/D195Q/E201N/E203Q,
 D149N/E185N/D195N/E201Q/E203Q, D149Q/E185Q/D195Q/E201N/E203N, 30
 D149Q/E185Q/D195N/E201Q/E203N, D149Q/E185Q/D195N/E201N/E203Q,
 D149Q/E185N/D195Q/E201Q/E203N, D149Q/E185N/D195Q/E201N/E203Q,
 D149Q/E185N/D195N/E201Q/E203Q, D149N/E185Q/D195Q/E201Q/E203N,
 D149N/E185Q/D195Q/E201N/E203Q, D149N/E185Q/D195N/E201Q/E203Q,
 D149N/E185N/D195Q/E201Q/E203Q, D149Q/E185Q/D195Q/E201Q/E203N,
 D149Q/E185Q/D195Q/E201N/E203Q, D149Q/E185Q/D195N/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185N/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/E201N/E203N, D149Q/E185R/E201N/E203N,
 D149N/E185R/ E201Q/E203N, D149N/E185R/ E201N/E203Q, D149Q/E185R/ E201Q/E203N, 40

【 0 1 9 5 】

【化 3 - 2】

D149Q/E185R/ E201N/E203Q, D149N/E185R/ E201Q/E203Q, D149Q/E185R/ E201Q/E203Q,
 D149R/E185N/ E201N/E203N, D149R/E185Q/ E201N/E203N, D149R/E185N/ E201Q/E203N,
 D149R/E185N/ E201N/E203Q, D149R/E185Q/ E201Q/E203N, D149R/E185Q/ E201N/E203Q,
 D149R/E185N/ E201Q/E203Q, D149R/E185Q/ E201Q/E203Q, D149R/E185N/D195N/E201N/E203N,
 D149R/E185Q/D195N/E201N/E203N, D149R/E185N/D195Q/E201N/E203N,
 D149R/E185N/D195N/E201Q/E203N, D149R/E185Q/D195N/E201N/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201N/E203N, D149R/E185Q/D195N/E201Q/E203N,
 D149R/E185Q/D195N/E201N/E203Q, D149R/E185N/D195Q/E201Q/E203N,
 D149R/E185N/D195Q/E201N/E203Q, D149R/E185N/D195N/E201Q/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q, D149R/E185N/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201N/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201N/E203N, D149N/E185R/D195Q/E201N/E203N,
 D149N/E185R/D195N/E201Q/E203N, D149N/E185R/D195N/E201N/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201N/E203N, D149Q/E185R/D195N/E201Q/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201N/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201Q/E203N,
 D149N/E185R/D195Q/E201N/E203Q, D149Q/E185R/D195Q/E201N/E203Q,
 D149Q/E185R/D195N/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201R/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201R/E203N, D149N/E185R/D195Q/E201R/E203N,
 D149N/E185R/D195N/E201R/E203Q, D149Q/E185R/D195Q/E201R/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201R/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201R/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201R/E203Q, E131D/K49R, E101N/N102F, E101N/N102Y, E101N/N102W,
 E101F/N102F, E101F/N102Y, E101F/N102W, E101Y/N102F, E101Y/N102Y, E101Y/N102W,
 E101W/N102F, E101W/N102Y, E101W/N102W, E101N/N102R, E101F/N102R, E101Y/N102R または
 E101W/N102F.

10

20

30

を含む。

【 0 1 9 6】

ポリヌクレオチドがポアを通過して移動しているときの電流により少ないヌクレオチドが
 寄与するポアを形成する本発明の好ましいバリエーションは、Y 5 1 A / F 5 6 A、Y 5 1 A
 / F 5 6 N、Y 5 1 I / F 5 6 A、Y 5 1 L / F 5 6 A、Y 5 1 T / F 5 6 A、Y 5 1 I
 / F 5 6 N、Y 5 1 L / F 5 6 NもしくはY 5 1 T / F 5 6 N、またはより好ましくはY
 5 1 I / F 5 6 A、Y 5 1 L / F 5 6 AもしくはY 5 1 T / F 5 6 Aを含む。上で論じた
 ように、これは、（ポリヌクレオチドがポアを通過して移動しているときに）観測される電
 流とポリヌクレオチドとの直接的関連の同定をより容易にする。

40

【 0 1 9 7】

範囲増加を示すポアを形成する好ましいバリエーションは、次の位置における変異を含む：

Y 5 1、F 5 6、D 1 4 9、E 1 8 5、E 2 0 1およびE 2 0 3、
 N 5 5およびF 5 6、
 Y 5 1およびF 5 6、
 Y 5 1、N 5 5およびF 5 6、または
 F 5 6およびN 1 0 2。

【 0 1 9 8】

50

範囲増加を示すポアを形成する好ましいバリエーションは、以下を含む：

Y 5 1 N、F 5 6 A、D 1 4 9 N、E 1 8 5 R、E 2 0 1 NおよびE 2 0 3 N、
N 5 5 SおよびF 5 6 Q、
Y 5 1 AおよびF 5 6 A、
Y 5 1 AおよびF 5 6 N、
Y 5 1 IおよびF 5 6 A、
Y 5 1 LおよびF 5 6 A、
Y 5 1 TおよびF 5 6 A、
Y 5 1 IおよびF 5 6 N、
Y 5 1 LおよびF 5 6 N、
Y 5 1 TおよびF 5 6 N、
Y 5 1 TおよびF 5 6 Q、
Y 5 1 A、N 5 5 SおよびF 5 6 A、
Y 5 1 A、N 5 5 SおよびF 5 6 N、
Y 5 1 T、N 5 5 SおよびF 5 6 Q、または
F 5 6 QおよびN 1 0 2 R。

10

【0199】

ポリヌクレオチドがポアを通過して移動しているときの電流により少ないヌクレオチドが寄与するポアを形成する好ましいバリエーションは、

位置N 5 5およびF 5 6における変異、例えば、N 5 5 XおよびF 5 6 Q（ここでXは任意のアミノ酸である）、または

20

位置Y 5 1およびF 5 6における変異、例えば、Y 5 1 XおよびF 5 6 Q（ここでXは任意のアミノ酸である）

を含む。

【0200】

スループット増加を示すポアを形成する好ましいバリエーションは、次の位置における変異を含む：

D 1 4 9、E 1 8 5およびE 2 0 3、
D 1 4 9、E 1 8 5、E 2 0 1およびE 2 0 3、または
D 1 4 9、E 1 8 5、D 1 9 5、E 2 0 1およびE 2 0 3。

30

【0201】

スループット増加を示すポアを形成する好ましいバリエーションは、以下を含む：

D 1 4 9 N、E 1 8 5 NおよびE 2 0 3 N、
D 1 4 9 N、E 1 8 5 N、E 2 0 1 NおよびE 2 0 3 N、
D 1 4 9 N、E 1 8 5 R、D 1 9 5 N、E 2 0 1 NおよびE 2 0 3 N、または
D 1 4 9 N、E 1 8 5 R、D 1 9 5 N、E 2 0 1 RおよびE 2 0 3 N。

【0202】

ポリヌクレオチドの捕捉が増加されるポアを形成する好ましいバリエーションは、次の変異を含む：

D 4 3 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q、
E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q、
D 4 3 N / E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q、
Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R、
D 4 3 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R、
E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R、または
D 4 3 N / E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R。

40

【0203】

好ましいバリエーションは、次の変異を含む：

D 1 4 9 R / E 1 8 5 R / E 2 0 1 R / E 2 0 3 RもしくはY 5 1 T / F 5 6 Q / D 1 4 9 R / E 1 8 5 R / E 2 0 1 R / E 2 0 3 R、

50

D 1 4 9 N / E 1 8 5 N / E 2 0 1 N / E 2 0 3 N もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / D 1
 4 9 N / E 1 8 5 N / E 2 0 1 N / E 2 0 3 N、
 E 2 0 1 R / E 2 0 3 R もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 2 0 1 R / E 2 0 3 R、
 E 2 0 1 N / E 2 0 3 R もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 2 0 1 N / E 2 0 3 R、
 E 2 0 3 R もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 2 0 3 R、
 E 2 0 3 N もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 2 0 3 N、
 E 2 0 1 R もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 2 0 1 R、
 E 2 0 1 N もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 2 0 1 N、
 E 1 8 5 R もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 1 8 5 R、
 E 1 8 5 N もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / E 1 8 5 N、
 D 1 4 9 R もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / D 1 4 9 R、
 D 1 4 9 N もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / D 1 4 9 N、
 R 1 4 2 E もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / R 1 4 2 E、
 R 1 4 2 N もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / R 1 4 2 N、
 R 1 9 2 E もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / R 1 9 2 E、または
 R 1 9 2 N もしくは Y 5 1 T / F 5 6 Q / R 1 9 2 N。

10

【 0 2 0 4 】

好ましいバリエーションは、次の変異を含む：

Y 5 1 A / F 5 6 Q / E 1 0 1 N / N 1 0 2 R、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / R 9 7 N / N 1 0 2 G、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / R 9 7 N / N 1 0 2 R、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / R 9 7 N、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / R 9 7 G、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / R 9 7 L、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / N 1 0 2 R、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / N 1 0 2 F、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / N 1 0 2 G、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / E 1 0 1 R、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / E 1 0 1 F、
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / E 1 0 1 N、または
 Y 5 1 A / F 5 6 Q / E 1 0 1 G。

20

30

【 0 2 0 5 】

本発明は、配列 3 9 0 で示される配列のバリエーションを含む変異体 C s g G モノマーであ
 って、バリエーションが T 1 5 0 における変異を含む、変異体 C s g G モノマーも提供する。
 挿入増加を示すポアを形成する好ましいバリエーションは、T 1 5 0 I を含む。T 1 5 0 にお
 ける変異、例えば T 1 5 0 I は、上で論じた変異または変異の組合せのいずれかと、組み
 合わせることができる。

【 0 2 0 6 】

本発明は、実施例において開示するバリエーション中に存在する変異の組合せを含む配列 3
 9 0 で示される配列のバリエーションを含む変異体 C s g G モノマーも提供する。

40

【 0 2 0 7 】

天然に存在するアミノ酸を導入または置換する方法は、当技術分野において周知である。
 例えば、メチオニン (M) は、変異体モノマーをコードするポリヌクレオチド中の適切
 な位置のメチオニンのコドン (A T G) をアルギニンのコドン (C G T) で置き換えるこ
 とによって、アルギニン (R) で置換することができる。その後、そのポリヌクレオチド
 を下で論じるように発現させることができる。

【 0 2 0 8 】

天然に存在しないアミノ酸を導入または置換する方法も当技術分野において周知である。
 例えば、変異体モノマーを発現させるために使用される I V T T 系に合成アミノアシル
 - t R N A を含めることによって、天然に存在しないアミノ酸を導入することができる。

50

あるいは、特異的アミノ酸に対して栄養要求性である大腸菌 (*E. coli*) においてそれらの特異的アミノ酸の合成 (すなわち天然に存在しない) 類似体の存在下で変異体モノマーを発現させることによって、天然に存在しないアミノ酸を導入することができる。部分ペプチド合成を使用して変異体モノマーを導入する場合、ネイキッドライゲーション (naked ligation) によって、天然に存在しないアミノ酸を導入することもできる。

【0209】

本発明の他のモノマー

別の実施形態では、本発明は、配列番号390で示される配列のバリエーションを含む変異体Cs g Gモノマーであって、バリエーションが位置Y51、N55およびF56の1つもしくは複数における変異を含む、変異体Cs g Gモノマーを提供する。バリエーションは、Y51、N55、F56、Y51/N55、Y51/F56、N55/F56、またはY51/N55/F56における変異を含むことがある。バリエーションは、好ましくは、Y51、N55またはF56における変異を含む。バリエーションは、上で論じた位置Y51、N55およびF56の1つもしくは複数における、およびあらゆる組合せでの、特異的変異のいずれかを含むことがある。Y51、N55およびF56の1つもしくは複数がいずれのアミノ酸で置換されていることもある。Y51は、F、M、L、I、V、A、P、G、C、Q、N、T、S、E、D、K、HまたはR、例えば、A、S、T、NまたはQで置換されていることがある。N55は、F、M、L、I、V、A、P、G、C、Q、T、S、E、D、K、HまたはR、例えば、A、S、TまたはQで置換されていることがある。F56は、M、L、I、V、A、P、G、C、Q、N、T、S、E、D、K、HまたはR、例えば、A、S、T、NまたはQで置換されていることがある。

【0210】

バリエーションは、以下の1つまたは複数をさらに含むことがある：(i) 次の位置における1つまたは複数の変異 (すなわち、次の位置の1つもしくは複数における変異) (i) N40、D43、E44、S54、S57、Q62、R97、E101、E124、E131、R142、T150およびR192；(ii) Q42RまたはQ42K；(iv) K49R；(v) N102R、N102F、N102YまたはN102W；(vi) D149N、D149QまたはD149R；(vii) E185N、E185QまたはE185R；(viii) D195N、D195QまたはD195R；(ix) E201N、E201QまたはE201R；(x) E203N、E203QまたはE203R；ならびに(xi) 次の位置の1つもしくは複数の欠失：F48、K49、P50、Y51、P52、A53、S54、N55、F56およびS57。バリエーションは、上で論じた(i) および(ii) ~ (xi) の組合せのいずれかを含むことがある。バリエーションは、(i) および(ii) ~ (xi) について上で論じた実施形態のいずれかを含むことがある。

【0211】

バリエーション

上で論じた特異的変異に加えて、バリエーションは、他の変異を含むことがある。配列番号390のアミノ酸配列の全長にわたって、バリエーションは、好ましくは、アミノ酸同一性に基づいてその配列と少なくとも50%相同であることになる。より好ましくは、バリエーションは、アミノ酸同一性に基づいて、配列全体にわたって配列番号390のアミノ酸配列と少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であることがある。連続する100以上、例えば125、150、175または200以上、のアミノ酸のストレッチにわたって、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%アミノ酸同一性 (「強い相同性 (hard homology)」) があることもある。

【0212】

当技術分野における標準的方法を使用して相同性を判定することができる。例えば、UW GCG Packageは、相同性を算出するために使用することができ、例えばそのデフォルト設定で使用される、BESTFITプログラムを提供している (Devereux et

al., (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。例えば、Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300 ; Altschul, S. F et al., (1990) J Mol Biol 215:403-10に記載されているように、P I L E U PおよびB L A S Tアルゴリズムを使用して、相同性を算出し、配列を並べる（例えば、等価の残基または対応する配列を（通常はそれらのデフォルト設定で）同定する）ことができる。B L A S T解析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物学情報センター（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）で公的に入手できる。

【0213】

配列番号390は、大腸菌K12株MC4100亜株（*Escherichia coli* Str. K-12 substr. MC4100）からの野生型C s g Gモノマーである。配列番号390のバリエーションは、別のC s g G相同体中に存在する置換のいずれかを含むことがある。好ましいC s g G相同体は、配列番号391～395および414～429で示される。バリエーションは、配列番号390と比較して配列番号391～395および414～429に存在する置換の1つまたは複数についての組合せを含むことがある。

【0214】

上で論じたものに加えて、アミノ酸置換、例えば1、2、3、4、5、10、20または30以下の置換が、配列番号390のアミノ酸配列に施されることもある。保存的置換は、アミノ酸を類似の化学構造、類似の化学的特性または類似の側鎖体積の他のアミノ酸で置換する。導入されるアミノ酸は、それらが置換するアミノ酸と同様の極性、親水性、疎水性、塩基性、酸性、中性または電荷を有することができる。あるいは、保存的置換は、既存の芳香族または脂肪族アミノ酸の代わりに、芳香族または脂肪族である別のアミノ酸を導入することもある。保存的アミノ酸変化は当技術分野において周知であり、下の表1において定義するような20の主要アミノ酸の特性に従ってそのような変化を選択することができる。アミノ酸が同様の極性を有する場合、このことも、表2中のアミノ酸側鎖についてのハイドロパシースケールを参照することによって判定することができる。

【0215】

【表1】

表1-アミノ酸の化学的特性

Ala	脂肪族、疎水性、中性	Met	疎水性、中性
Cys	極性、疎水性、中性	Asn	極性、親水性、中性
Asp	極性、親水性、荷電(-)	Pro	疎水性、中性
Glu	極性、親水性、荷電(-)	Gln	極性、親水性、中性
Phe	芳香族、疎水性、中性	Arg	極性、親水性、荷電(+)
Gly	脂肪族、中性	Ser	極性、親水性、中性
His	芳香族、極性、親水性、荷電(+)	Thr	極性、親水性、中性
Ile	脂肪族、疎水性、中性	Val	脂肪族、疎水性、中性
Lys	極性、親水性、荷電(+)	Trp	芳香族、疎水性、中性
Leu	脂肪族、疎水性、中性	Tyr	芳香族、極性、疎水性

【0216】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2-ハイドロパシースケール

側鎖	ハイドロパシー
Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

10

20

【0217】

配列番号 390 のアミノ酸配列の 1 つまたは複数のアミノ酸残基が、上記のポリペプチドからさらに欠失されることもある。1、2、3、4、5、10、20 または 30 以上までの残基が欠失されることがある。

【0218】

バリエーションは、配列番号 390 の断片を含むこともある。そのような断片は、ポア形成活性を保持する。断片は、長さ少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 150、少なくとも 200 または少なくとも 250 アミノ酸であることがある。そのような断片を、ポアを生成するために使用してもよい。断片は、好ましくは、配列番号 390 の膜貫通ドメイン、すなわち、K135～Q153 および S183～S208 を含む。

30

【0219】

1 つまたは複数のアミノ酸が上記のポリペプチドに代替的にまたはさらに付加されることもある。配列番号 390 のアミノ酸配列またはそのポリペプチドバリエーションもしくは断片のアミノ末端またはカルボキシ末端に伸長部が設けられることもある。伸長部は、かなり短いことがあり、例えば、長さ 1～10 アミノ酸であることがある。あるいは、伸長部は、より長いこともあり、例えば、50 または 100 アミノ酸以下であることもある。担体タンパク質が本発明によるアミノ酸配列に融合されることもある。他の融合タンパク質は、下でより詳細に論じる。

40

【0220】

上で論じたように、バリエーションは、配列番号 390 のものとは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、ポアを形成するその能力を保持するポリペプチドである。バリエーションは、ポア形成に関与している配列番号 390 の領域を通常は含有する。 - バレルを含有する C s g G のポア形成能力は、各サブユニット内の - シートによってもたらされる。配列番号 390 のバリエーションは、 - シートを形成する配列番号 390 内の領域、すなわち、K135～Q153 および S183～S208 を通常は含む。結果として生じるバリエーションが、ポアを形成するその能力を保持するのであれば、 - シートを形成す

50

る配列番号 390 の領域に 1 つまたは複数の修飾を施すことができる。配列番号 390 のバリエーションは、好ましくは、1 つまたは複数の修飾、例えば置換、付加または欠失、をその - ヘリックスおよび / またはループ領域内に含む。

【0221】

C s g G に由来するモノマーは、それらの同定または精製を支援するように、例えば、ストレプトアビジンタグの付加によって、または細胞からのそれらの分泌を促進するためのシグナル配列の付加（モノマーがそのような配列を天然に含有しない場合）によって、修飾されることがある。他の好適なタグは、下でより詳細に論じる。モノマーは、顕現標識で標識されることがある。顕現標識は、モノマーを検出できるようにするいずれの好適な標識であってもよい。好適な標識は、下で説明する。

10

【0222】

C s g G に由来するモノマーは、D - アミノ酸を使用して産生されることもある。例えば、C s g G に由来するモノマーは、L - アミノ酸と D - アミノ酸の混合物を含むことがある。これは、そのようなタンパク質またはペプチドの産生に関する技術分野では当たり前のことである。

【0223】

C s g G に由来するモノマーは、ヌクレオチド識別を助長するために 1 つまたは複数の特異的修飾を有する。C s g G に由来するモノマーは、他の非特異的修飾も、そのような修飾がポア形成に干渉しないのであれば、有することができる。多数の非特異的側鎖修飾が当技術分野において公知であり、そのような修飾を C s g G に由来するモノマーの側鎖に施すことができる。そのような修飾としては、例えば、アルデヒドとの反応、その後の N a B H ₄ での還元による、還元アルキル化、アセトイミド酸メチルでのアミド化、または無水酢酸でのアシル化が挙げられる。

20

【0224】

C s g G に由来するモノマーは、当技術分野において公知の標準的方法を使用して産生することができる。C s g G に由来するモノマーは、合成的に作製されることもあり、または組換え手段によって作製されることもある。例えば、モノマーを *in vitro* 翻訳および転写 (I V T T) によって合成してもよい。ポアおよびモノマーの好適な産生方法は、国際出願第 P C T / G B 0 9 / 0 0 1 6 9 0 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 4 2 7 3 号パンフレットとして公開）、同第 P C T / G B 0 9 / 0 0 1 6 7 9 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 4 2 6 5 号パンフレットとして公開）または同第 P C T / G B 1 0 / 0 0 0 1 3 3 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 6 6 0 3 号パンフレットとして公開）において論じられている。膜へのポアの挿入方法が論じられている。

30

【0225】

一部の実施形態では、変異体モノマーは、化学的に修飾される。変異体モノマーを任意の方法で、任意の部位で、化学的に修飾することができる。変異体モノマーは、好ましくは、1 つもしくは複数のシステインへの分子の結合（システイン結合）、1 つもしくは複数のリシンへの分子の結合、1 つもしくは複数の非天然アミノ酸への分子の結合、エピトープの酵素修飾、または末端の修飾によって化学的に修飾される。そのような修飾の好適な実施方法は、当技術分野において周知である。いずれの分子の結合によって変異体モノマーを化学的に修飾してもよい。例えば、変異体モノマーを色素またはフルオロフォアの結合によって化学的に修飾してもよい。

40

【0226】

一部の実施形態では、変異体モノマーは、該モノマーを含むポアと標的ヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチド配列との相互作用を助長する分子アダプターで化学的に修飾される。アダプターの存在は、ポアとヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列とのホスト・ゲストケミストリーを向上させることによって、変異体モノマーから形成されるポアのシーケンシング能力を向上させる。ホスト・ゲストケミストリーの原理は当技術分野において周知である。アダプターは、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列とのその相互作用を向上させるポアの物理的または化学的特性に対して影響を及ぼす。アダプターは

50

、ポアのパレルもしくはチャネルの電荷を変更することによって、またはヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド配列と特異的に相互作用もしくは結合することによって、ポアとのその相互作用を助長することができる。

【0227】

分子アダプターは、好ましくは、環状分子、シクロデキストリン、ハイブリダイゼーションできる化学種、DNA結合剤もしくは挿入剤、ペプチドもしくはペプチド類似体、合成ポリマー、芳香族平面分子、正電荷を有する小分子、または水素結合できる小分子である。

【0228】

アダプターは、環状であることがある。環状アダプターは、好ましくは、ポアと同じ対称性を有する。C s g G は中心軸の周囲に 8 または 9 個のサブユニットを通常は有するので、アダプターは好ましくは 8 回または 9 回対称性である。このことは、下でより詳細に論じる。

【0229】

アダプターは、通常は、ホスト・ゲストケミストリーによってヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列と相互作用する。アダプターは、通常は、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列と相互作用することができる。アダプターは、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列と相互作用することができる 1 つまたは複数の化学基を含む。1 つまたは複数の化学基は、好ましくは、非共有結合性相互作用、例えば、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、 π -カチオン相互作用および/または静電力によって、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列と相互作用する。ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列と相互作用することができる 1 つまたは複数の化学基は、好ましくは、正電荷を有する。ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列と相互作用することができる 1 つまたは複数の化学基は、より好ましくは、アミノ基を含む。アミノ基を第 1 級、第 2 級または第 3 級炭素原子に結合させることができる。アダプターは、よりいっそう好ましくは、アミノ基の環、例えば、アミノ基 6、7 または 8 個の環を含む。アダプターは、最も好ましくは、アミノ基 8 個の環を含む。プロトン化アミノ基の環は、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列中の負電荷を有するリン酸基と相互作用することができる。

【0230】

ポア内のアダプターの正しい位置設定を、アダプターと変異体モノマーを含むポアとのホスト・ゲストケミストリーによって助長することができる。アダプターは、好ましくは、ポア内の 1 つまたは複数のアミノ酸と相互作用することができる 1 つまたは複数の化学基を含む。アダプターは、好ましくは、非共有結合性相互作用、例えば、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、 π -カチオン相互作用および/または静電力によってポア内の 1 つまたは複数のアミノ酸と相互作用することができる 1 つまたは複数の化学基を含む。ポア内の 1 つまたは複数のアミノ酸と相互作用することができる化学基は、通常はヒドロキシルまたはアミンである。ヒドロキシル基を第 1 級、第 2 級または第 3 級炭素原子に結合させることができる。ヒドロキシル基は、ポア内の非荷電アミノ酸と水素結合を形成することができる。ポアとヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列との相互作用を助長するあらゆるアダプターを使用することができる。

【0231】

好適なアダプターとしては、シクロデキストリン、環状ペプチドおよびククルビツリルが挙げられるが、これらに限定されない。アダプターは、好ましくは、シクロデキストリンまたはその誘導体である。シクロデキストリンまたはその誘導体は、Eliseev, A. V., and Schneider, H.-J. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 6081-6088に開示されているもののいずれかであってもよい。アダプターは、より好ましくは、ヘプタキス - 6 - アミノ - シクロデキストリン (am₇ - CD)、6 - モノデオキシ - 6 - モノアミノ - シクロデキストリン (am₁ - CD) またはヘプタキス - (6 - デオキシ - 6 - グアニジノ) - シクロデキストリン (gu₇ - CD) である。gu₇ - CD 中のグアニジノ基は、am₇ - CD 中の第 1 級アミンよりはるかに高い pK_a を有し、そのためよ

10

20

30

40

50

り大きい正電荷を有する。この γ -CD アダプターは、ポア内のヌクレオチドの滞留時間を増加させるために、測定される残留電流の精度を増すために、ならびに高温および低いデータ収集率で塩基検出率を増加させるために使用することができる。

【0232】

下でより詳細に論じるように 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジル(SPP)架橋剤を使用する場合、アダプターは、好ましくは、ヘプタキス(6-デオキシ-6-アミノ)-6-N-モノ(2-ピリジル)ジチオプロパノイル- β -シクロデキストリン(α -MPP-CD)である。

【0233】

より好適なアダプターとしては、9糖単位を含む(したがって9回対称性を有する) β -シクロデキストリンが挙げられる。 β -シクロデキストリンは、リンカー分子を含有することがあり、または上で論じた β -シクロデキストリンの例に使用される修飾糖単位のすべて乃至はそれより多くを含むように修飾されることもある。

【0234】

分子アダプターは、好ましくは、変異体モノマーに共有結合される。当技術分野において公知の任意の方法を使用してアダプターをポアに共有結合させることができる。アダプターは、通常は化学結合によって結合される。分子アダプターが、システイン結合によって結合される場合、1つまたは複数のシステインが変異体に、例えばバレル内に、置換によって導入されているほうが好ましい。変異体モノマーは、該変異体モノマー中の1つまたは複数のシステインへの分子アダプターの結合によって、化学的に修飾されることがある。1つまたは複数のシステインは、天然に存在することがあり、すなわち、配列番号390の1位および/または215位にあることがある。あるいは、変異体モノマーは、他の位置に導入された1つまたは複数のシステインへの分子の結合によって、化学的に修飾されることもある。215位のシステインは、分子アダプターが1位のシステインまたは別の位置に導入されたシステインではなくその位置に結合しないことを確実にするために、例えば置換によって除去されることがある。

【0235】

システイン残基の反応性が隣接残基の修飾によって向上されることがある。例えば、隣接するアルギニン、ヒスチジンまたはリシン残基の塩基性基は、システインのチオール基の pK_a をより反応性の高い S^- 基の pK_a へと変化させることになる。システイン残基の反応性がdTNBなどのチオール保護基によって保護されることがある。リンカーを結合させる前に変異体モノマーの1つまたは複数のシステイン残基とこれらの保護基を反応させることができる。分子が変異体モノマーに直接結合されることがある。分子は、好ましくは、化学的架橋剤またはペプチドリンカーなどのリンカーを使用して変異体分子に結合される。

【0236】

好適な化学的架橋剤は、当技術分野において周知である。好ましい架橋剤としては、3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロパン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル、4-(ピリジン-2-イルジスルファニル)ブタン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル、および8-(ピリジン-2-イルジスルファニル)オクタン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルが挙げられる。最も好ましい架橋剤は、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジル(SPP)である。通常は、分子を二官能性架橋剤に共有結合させた後、その分子/架橋剤複合体を変異体モノマーに共有結合させるが、二官能性架橋剤をモノマーに共有結合させた後、その二官能性架橋剤/モノマー複合体を分子に結合させることも可能である。

【0237】

リンカーは、好ましくは、ジチオトレイトール(DTT)に耐性である。好適なリンカーとしては、ヨードアセトアミド系およびマレイミド系リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0238】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、モノマーは、ポリヌクレオチド結合タンパク質に結合されることがある。これによって、本発明のシークエンシング方法で使用されうるモジュラーシークエンシングシステムが形成される。ポリヌクレオチド結合タンパク質は、下で論じる。

【0239】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、好ましくは、変異体モノマーに共有結合される。当技術分野において公知の任意の方法を使用してタンパク質をモノマーに共有結合させることができる。モノマーおよびタンパク質は、化学的に融合されることもあり、または遺伝子的に融合されることもある。構築物全体を単一のポリヌクレオチド配列から発現される場合、モノマーおよびタンパク質を遺伝子的に融合させる。モノマーのポリヌクレオチド結合タンパク質への遺伝子的融合は、国際出願第 P C T / G B 0 9 / 0 0 1 6 7 9 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 4 2 6 5 号パンフレットとして公開）において論じられている。

10

【0240】

ポリヌクレオチド結合タンパク質がシステイン結合によって結合される場合、1つまたは複数のシステインが置換によって変異体に導入されているほうが好ましい。1つまたは複数のシステインは、好ましくは、相同体の中で保存が低度である（これは変異または挿入が許容されうることを示す）ループ領域に導入される。したがって、それらの領域は、ポリヌクレオチド結合タンパク質の結合に好適である。そのような実施形態では、251位に天然に存在するシステインが除去されることがある。システイン残基の反応性は、上記の修飾によって向上させることができる。

20

【0241】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、変異体モノマーに直接結合されることもあり、または1つもしくは複数のリンカーを介して結合されることもある。国際出願第 P C T / G B 1 0 / 0 0 0 1 3 2 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 6 6 0 2 号パンフレットとして公開）に記載されているハイブリダイゼーションリンカーを使用して分子を変異体モノマーに結合させてもよい。あるいは、ペプチドリinkerを使用してもよい。ペプチドリinkerは、アミノ酸配列である。ペプチドリinkerの長さ、可撓性、および親水性は、通常は、そのペプチドリinkerがモノマーおよび分子の機能を妨げないように設計される。好ましい可撓性リンカーは、セリンおよび/またはグリシンアミノ酸2～20個、例えば4、6、8、10または16個のストレッチである。より好ましい可撓性リンカーとしては、(S G)₁、(S G)₂、(S G)₃、(S G)₄、(S G)₅および(S G)₈が挙げられ、この場合のSはセリンであり、Gはグリシンである。好ましい剛性リンカーは、プロリンアミノ酸2～30個、例えば4、6、8、16または24個のストレッチである。より好ましい剛性リンカーとしては、(P)₁₂が挙げられ、この場合のPはプロリンである。

30

【0242】

変異体モノマーは、分子アダプターおよびポリヌクレオチド結合タンパク質で化学的に修飾されることがある。

【0243】

分子（モノマーを化学的に修飾する分子）は、モノマーに直接結合されることもあり、または国際出願第 P C T / G B 0 9 / 0 0 1 6 9 0 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 4 2 7 3 号パンフレットとして公開）、同第 P C T / G B 0 9 / 0 0 1 6 7 9 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 4 2 6 5 号パンフレットとして公開）もしくは同第 P C T / G B 1 0 / 0 0 0 1 3 3 号明細書（国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 6 6 0 3 号パンフレットとして公開）に開示されているようなリンカーを介して結合されることもある。

40

【0244】

本発明の変異体モノマーおよびポアなどの、本明細書に記載するタンパク質のいずれかは、それらの同定または精製を支援するように、例えば、ヒスチジン残基(hisタグ)、アスパラギン酸残基(asnタグ)、ストレプトアビジンタグ、flagタグ、SUMOタグ、GSTタグもしくはMBPタグの付加によって、または細胞からのそれらの分泌

50

を促進するためのシグナル配列の付加（ポリペプチドがそのような配列を天然に含有しない場合）によって、修飾されることがある。遺伝子タグを導入するための代替法は、タグをタンパク質上のネイティブ位置または工学的に操作された位置に化学反応させる方法である。この方法の例は、タンパク質の外側の工学的に操作されたシステインにゲルシフト試薬を反応させる方法であろう。この方法は、溶血素ヘテロオリゴマーを分離する方法として立証されている（Chem Biol. 1997 Jul;4(7):497-505）。

【0245】

本発明の変異体モノマーおよびポアなどの、本明細書に記載するタンパク質のいずれかは、顕現標識で標識されることがある。顕現標識は、タンパク質を検出できるようにするいずれの好適な標識であってもよい。好適な標識としては、蛍光分子、放射性同位元素、例えば、 ^{125}I 、 ^{35}S 、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチドおよびリガンド、例えばビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0246】

本発明のモノマーまたはポアなどの、本明細書に記載するタンパク質のいずれかは、合成的に作製されることがあり、または組換え手段によって作製されることもある。例えば、タンパク質は、*in vitro* 翻訳および転写（IVTT）によって合成されることがある。タンパク質のアミノ酸配列は、天然に存在しないアミノ酸を含むように修飾されることもあり、またはタンパク質の安定性を増すように修飾されることもある。タンパク質が合成手段によって産生される場合、そのようなアミノ酸を産生中に導入することができる。タンパク質は、合成的産生または組み換え産生のどちらか一方の後に改変されることもある。

20

【0247】

タンパク質は、D - アミノ酸を使用して産生されることもある。例えば、タンパク質は、L - アミノ酸とD - アミノ酸の混合物を含むことがある。これは、そのようなタンパク質またはペプチドの産生に関する技術分野では当たり前のことである。

【0248】

タンパク質は、他の非特異的修飾も、それらのタンパク質の機能に干渉しないのであれば、有することができる。多数の非特異的側鎖修飾が当技術分野において公知であり、そのような修飾をタンパク質の側鎖に施すことができる。そのような修飾としては、例えば、アルデヒドとの反応、その後の NaBH_4 での還元による、アミノ酸の還元アルキル化、アセトイミド酸メチルでのアミド化、または無水酢酸でのアシル化が挙げられる。

30

【0249】

本発明のモノマーおよびポアを含む、本明細書に記載するタンパク質のいずれかは、当技術分野において公知の標準的方法を使用して産生することができる。タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を使用して誘導および複製することができる。タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準技術を使用して細菌宿主細胞において発現させることができる。タンパク質は、組換え発現ベクターからのポリペプチドのインサイチュ発現によって細胞において産生されることもある。発現ベクターは、ポリペプチドの発現を制御するための誘導性プロモーターを場合により有する。これらの方法は、Sambrook, J. and Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載されている。

40

【0250】

タンパク質は、任意のタンパク質液体クロマトグラフィーシステムによるタンパク質産生生物からの精製後、または組換え発現後、大規模に産生することができる。典型的なタンパク質液体クロマトグラフィーシステムとしては、FPLC、AKTAシステム、Bio - Cadシステム、Bio - Rad BioLogicシステムおよびGilsen HPLCシステムが挙げられる。

【0251】

構築物

50

本発明は、共有結合している２つ以上のＣｓｇＧモノマーを含む構築物であって、モノマーの少なくとも１つが本発明の変異体モノマーである、構築物も提供する。本発明の構築物は、ポアを形成するその能力を保持する。このことは、上で論じたようにして判定することができる。本発明の１つまたは複数の構築物を使用して、ポリヌクレオチドを特徴づける、例えばシーケンシングするためのポアを形成することができる。構築物は、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つまたは少なくとも１０のモノマーを含むことがある。構築物は、好ましくは２つのモノマーを含む。２つ以上のモノマーは、同じであることもあり、または異なることもある。

【０２５２】

構築物中の少なくとも１つのモノマーは、本発明の変異体モノマーである。構築物中の２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上、６つ以上、７つ以上、８つ以上、９つ以上または１０以上のモノマーが本発明の変異体モノマーであることもある。好ましくは、構築物中のすべてのモノマーが、本発明の変異体モノマーである。変異体モノマーは、同じであることもあり、または異なることもある。好ましい実施形態では、構築物は、本発明の２つの変異体モノマーを含む。

【０２５３】

構築物中の本発明の変異体モノマーは、好ましくはほぼ同じ長さである、または同じ長さである。構築物中の本発明の変異体モノマーのパレルは、好ましくはほぼ同じ長さである、または同じ長さである。長さは、アミノ酸の数および／または長さの単位で測定することができる。

【０２５４】

構築物は、本発明の変異体モノマーでない１つまたは複数のモノマーを含むことがある。本発明の非変異体モノマーでないＣｓｇＧ変異体モノマーとしては、上で論じたいずれのアミノ酸／位置も変異されていない配列番号３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８もしくは４２９または配列番号３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８もしくは４２９の比較バリエーションを含むモノマーが挙げられる。構築物中の少なくとも１つのモノマーは、配列番号３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８もしくは４２９で示される配列の比較バリエーションを含むことがある。配列番号３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８または４２９の比較バリエーションは、アミノ酸同一性に基づいて、その全配列にわたって３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８または４２９、４０または４１と少なくとも５０％相同である。より好ましくは、比較バリエーションは、アミノ酸同一性に基づいて、配列全体にわたって配列番号３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８または４２９のアミノ酸配列と少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、およびより好ましくは少なくとも９５％、９７％または９９％相同であることがある。

【０２５５】

構築物中のモノマーは、好ましくは遺伝子的に融合されている。モノマーは、構築物全体が単一のポリヌクレオチド配列から発現される場合、遺伝子的に融合されている。構築物をコードする単一のポリヌクレオチド配列を形成するためにモノマーのコード配列をいかなる形で組み合わせてもよい。

【0256】

モノマーは、いかなる立体配置で遺伝子的に融合されていてもよい。モノマーは、それらの末端アミノ酸によって融合されていることもある。例えば、1つのモノマーのアミノ末端が別のモノマーのカルボキシ末端に融合されていることもある。構築物中の（アミノからカルボキシ方向に）第2のおよび後続のモノマーは、それらのアミノ末端にメチオニンを含むことがある（末端の各々が前のモノマーのカルボキシ末端に融合されている）。例えば、Mが（アミノ末端メチオニンを伴わない）モノマーであり、mMが、アミノ末端メチオニンを伴うモノマーである場合、構築物は、配列M - mM、M - mM - mM、またはM - mM - mM - mMを含むことがある。これらのメチオニンの存在は、通常は、全構築物をコードするポリヌクレオチド中の第2のまたは後続のモノマーをコードするポリヌクレオチドの5'末端の開始コドン（すなわちATG）の発現の結果として生ずる。構築物中の（アミノからカルボキシ方向に）第1のモノマーもメチオニンを含むことがある（例えば、mM - mM、mM - mM - mM、またはmM - mM - mM - mM）。

10

【0257】

2つ以上のモノマーが、互いに、直接、遺伝子的に融合されていることもある。モノマーは、好ましくは、リンカーを使用して遺伝子的に融合されている。モノマーの移動性を制限するようにリンカーを設計してもよい。好ましいリンカーは、アミノ酸配列（すなわち、ペプチドリリンカー）である。上で論じたペプチドリリンカーのいずれかを使用してもよい。

20

【0258】

別の好ましい実施形態では、モノマーは、化学的に融合されている。2つのモノマーは、2つの部分が化学的に結合されている、例えば化学的架橋剤によって結合されている場合、化学的に融合されている。上で論じた化学的架橋剤のいずれかを使用してもよい。リンカーは、本発明の変異体モノマーに導入された1つまたは複数のシステイン残基に結合されることもある。あるいは、リンカーは、構築物中のモノマーのうちの1つの末端に結合されることもある。

30

【0259】

構築物が様々なモノマーを含有する場合、大過剰のモノマー中のリンカーの濃度を保持することによってモノマー同士の架橋を防止することができる。あるいは、2つのリンカーが使用される「鍵と鍵穴」配置を使用してもよい。各リンカーの一方の末端のみが互いに反応してより長いリンカーを形成することができる。そのリンカーの他方の末端は、各々が様々なモノマーと反応する。そのようなリンカーは、国際出願第PCT/GB10/000132号明細書（国際公開第2010/086602号パンフレットとして公開）に記載されている。

【0260】

ポリヌクレオチド

40

本発明は、本発明の変異体モノマーをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。変異体モノマーは、上で論じたもののいずれかであってもよい。ポリヌクレオチド配列は、ヌクレオチド同一性に基づいて、全配列にわたって配列番号389と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%相同の配列を好ましくは含む。連続する300以上、例えば375、450、525または600以上のヌクレオチドのストレッチにわたって、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%ヌクレオチド同一性（「堅い相同性」）があることもある。相同性は、上で説明したように算出することができる。ポリヌクレオチド配列は、遺伝コードの縮重に基づいて配列番号389とは異なる配列を含むことがある。

【0261】

50

本発明は、本発明の遺伝子融合構築物のいずれかをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。ポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号 389 で示される配列の 2 つ以上のバリエーションを含む。ポリヌクレオチド配列は、ヌクレオチド同一性に基づいて、全配列にわたって配列番号 389 と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 95 % の同一性を有する 2 つ以上の配列を好ましくは含む。連続する 600 以上、例えば 750、900、1050 または 1200 以上のヌクレオチドのストレッチにわたって、少なくとも 80 %、例えば少なくとも 85 %、90 % または 95 % ヌクレオチド同一性（「堅い同一性」）があることもある。同一性は、上で説明したように算出することができる。

【0262】

ポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を使用して誘導および複製することができる。野生型 CsgG をコードする染色体 DNA を大腸菌（*Escherichia coli*）などのポア産生物から抽出することができる。特異的プライマーを伴う PCR を使用して、ポアサブユニットをコードする遺伝子を増幅することもできる。その後、その増幅された配列は定方向突然変異誘発されることがある。好適な定方向突然変異誘発方法は当技術分野において公知であり、連鎖反応を含む、例えば併用する。本発明の構築物をコードするポリヌクレオチドは、周知の技術、例えば、Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY に記載されている技術を使用して、作製することができる。

【0263】

その後、その得られたポリヌクレオチド配列をクローニングベクターなどの複製可能な組換えベクターに組み込むことができる。そのベクターを使用して、適合性宿主細胞においてポリヌクレオチドを複製することができる。このように、ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチドを複製可能なベクターに導入すること、適合性宿主にベクターを導入すること、およびベクターの複製を起こさせる条件下で宿主細胞を増殖させることによって作製することができる。ベクターを宿主細胞から回収することができる。ポリヌクレオチドのクローニングに好適な宿主細胞は当技術分野において公知であり、そのような宿主細胞は、下でより詳細に説明する。

【0264】

ポリヌクレオチド配列を好適な発現ベクターにクローニングすることができる。発現ベクター中のポリヌクレオチド配列は、通常は、宿主細胞によるコード配列の発現をもたらすことができる制御配列に作動可能に連結されている。そのような発現ベクターを使用してポアサブユニットを発現させることができる。

【0265】

用語「作動可能に連結された」は、記載する成分がそれらの所期の様式で機能することを可能にする関係にある、並置を指す。コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合する条件下で達成されるようにライゲーションされている。同じまたは異なるポリヌクレオチド配列の複数のコピーがベクターに導入されることもある。

【0266】

その後、その発現ベクターを好適な宿主細胞に導入することができる。このように、本発明の変異体モノマーまたは構築物は、ポリヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入すること、ベクターを適合性細菌宿主細胞に導入すること、およびポリヌクレオチド配列の発現を起こさせる条件下で宿主細胞を増殖させることによって産生することができる。これらの組換え発現モノマーまたは構築物は、宿主細胞膜内で自己集合してポアを構築することができる。あるいは、このようにして産生された組換えポアを宿主細胞から除去し、別の膜に挿入することができる。少なくとも 2 つの異なるモノマーまたは構築物を含むポアを産生する場合、それらの異なるモノマーまたは構築物を、上記の異なる宿主細胞で別々に発現させ、宿主細胞から除去し、別の膜、例えばウサギ細胞膜または合成膜の中でポア

10

20

30

40

50

に組立てることができる。

【0267】

ベクターは、例えば、複製起点、場合によっては前記ポリヌクレオチド配列の発現のためのプロモーター、および場合によってはプロモーターの制御因子を備えている、プラスミド、ウイルスまたはファージベクターでありうる。ベクターは、1つまたは複数の選択マーカー遺伝子、例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子を含むことがある。プロモーターおよび他の発現調節シグナルは、発現ベクターが設計される宿主細胞と適合するように選択することができる。T7、trc、lac、araまたはLプロモーターが通常は使用される。

【0268】

宿主細胞は、通常は、モノマーまたは構築物を高レベルで発現する。ポリヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、その細胞を形質転換するために使用された発現ベクターと適合するように選択されることになる。宿主細胞は、通常は細菌細胞、好ましくは大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞である。DE3溶原菌、例えば、C41(DE3)、BL21(DE3)、JM109(DE3)、B834(DE3)、TUNER、OrigamiおよびOrigami Bを有するあらゆる細胞が、T7プロモーターを含むベクターを発現することができる。上に列挙した条件に加えて、Cao et al., 2014, PNAS, Structure of the nonameric bacterial amyloid secretion channel, doi - 1411942111およびGoyal et al., 2014, Nature, 516, 250-253 structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgGにおいて言及されている方法のいずれかを使用してCsgGタンパク質を発現させることができる。

【0269】

本発明は、本発明の変異体モノマーまたは本発明の構築物を産生する方法も含む。この方法は、好適な宿主細胞において本発明のポリヌクレオチドを発現させるステップを含む。ポリヌクレオチドは、好ましくはベクターの一部であり、好ましくはプロモーターに作動可能に連結されている。

【0270】

ポア

本発明は、様々なポアも提供する。本発明のポアは、高い感度で異なるヌクレオチドを識別することができるため、ポリヌクレオチド配列の特徴づけ、例えばシークエンシングに理想的である。ポアは、DNAおよびRNA中の4ヌクレオチドを驚くほど区別することができる。本発明のポアは、メチル化ヌクレオチドと非メチル化ヌクレオチドを区別することさえできる。本発明のポアの塩基分解能は、驚くほど高い。ポアは、4つすべてのDNAヌクレオチドのほぼ完全な分離を示す。さらに、ポアは、ポア内での滞留時間およびポアを通して流れる電流に基づいて、デオキシチジン酸 (dCMP) とメチル-dCMPとを識別する。

【0271】

本発明のポアは、広範な条件下で異なるヌクレオチド間の識別をすることもできる。特に、ポアは、核酸の特徴づけ、例えばシークエンシングに好都合である条件下で、ヌクレオチド間の識別をすることになる。本発明のポアが異なるヌクレオチド間の識別をすることができる程度は、印加する電位、塩濃度、緩衝液、温度、ならびに添加剤、例えば尿素、ベタインおよびDTT、の存在を変更することによって制御することができる。このことによって、特にシークエンシングの際、ポアの機能を微調整することが可能になる。このことは、下でより詳細に論じる。本発明のポアを使用して、ヌクレオチドごとではなく、1つまたは複数のモノマーとの相互作用からポリヌクレオチドポリマーを同定することもできる。

【0272】

本発明のポアは、単離されていることもあり、実質的に単離されていることもあり、精製されていることもあり、または実質的に精製されていることもある。本発明のポアは、脂質または他のポアなどのいずれの他の成分も完全になく、単離または精製されてい

10

20

30

40

50

る。ポアは、その所期の使用に干渉しないであろう担体または希釈剤と混合されている場合、実質的に単離されている。例えば、ポアは、10%未満、5%未満、2%未満または1%未満の他の成分、例えばトリブロックコポリマー、脂質または他のポア、を含む形態で存在する場合、実質的に単離または実質的に精製されている。あるいは、本発明のポアは、膜内に存在することもある。好適な膜は、下で論じる。

【0273】

本発明のポアは、個別のまたは単一のポアとして存在することがある。あるいは、本発明のポアは、2つ以上のポアの均質なまたは不均質な集団で存在することもある。

【0274】

ホモオリゴマーポア

本発明は、本発明の同一の変異体モノマーを含むC s g Gに由来するホモオリゴマーポアも提供する。ホモオリゴマーポアは、本発明の変異体のいずれかを含むことがある。本発明のホモオリゴマーポアは、ポリヌクレオチドの特徴づけ、例えばシーケンシングに理想的である。本発明のホモオリゴマーポアは、上で論じた利点のいずれかを有することができる。

【0275】

ホモオリゴマーポアは、あらゆる数の変異体モノマーを含有することがある。ポアは、通常は、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10の同一の変異体モノマー、例えば、7つ、8つ、9つまたは10の変異体モノマーを含む。ポアは、好ましくは、8つまたは9つの同一の変異体モノマーを含む。1つまたは複数、例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つまたは10の変異体モノマーは、好ましくは、上で論じたように化学的に修飾される。

【0276】

ポアを作製する方法は、下でより詳細に論じる。

【0277】

ヘテロオリゴマーポア

本発明は、本発明の少なくとも1つの変異体モノマーを含むC s g Gに由来するヘテロオリゴマーポアも提供する。本発明のヘテロオリゴマーポアは、ポリヌクレオチドの特徴づけ、例えばシーケンシングに理想的である。ヘテロオリゴマーポアは、当技術分野において公知の方法（例えば、Protein Sci. 2002 Jul; 11 (7): 1813-24）を使用して作製することができる。

【0278】

ヘテロオリゴマーポアは、そのポアを形成するために十分なモノマーを含有する。それらのモノマーは、いかなるタイプのものであってもよい。ポアは、通常は、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10のモノマー、例えば、7つ、8つ、9つまたは10のモノマーを含む。ポアは、好ましくは、8つまたは9つのモノマーを含む。

【0279】

好ましい実施形態では、モノマーのすべて（例えば、モノマーのうちの10、9、8または7つ）が本発明の変異体モノマーであり、それらのうちの少なくとも1つは、他と異なる。より好ましい実施形態では、ポアは、本発明の8つまたは9つの変異体モノマーを含み、それらのうちの少なくとも1つは、他と異なる。それらは、すべてが互いに異なることもある。

【0280】

ポア中の本発明の変異体モノマーは、好ましくはほぼ同じ長さである、または同じ長さである。ポア中の本発明の変異体モノマーのパレルは、好ましくはほぼ同じ長さである、または同じ長さである。長さは、アミノ酸の数および/または長さの単位で測定することができる。

【0281】

別の好ましい実施形態では、変異体モノマーの少なくとも1つは、本発明の変異体モノ

10

20

30

40

50

マーではない。この実施形態での残りのモノマーは、好ましくは、本発明の変異体モノマーである。したがって、ポアは、本発明の9つ、8つ、7つ、6つ、5つ、4つ、3つ、2つまたは1つの変異体モノマーを含むことがある。ポア内のいかなる数のモノマーが本発明の変異体モノマーでなくてもよい。ポアは、好ましくは、本発明の7つまたは8つの変異体モノマーと、本発明のモノマーでないモノマーとを含む。本発明の変異体モノマーは、同じであることもあり、または異なることもある。

【0282】

構築物中の本発明の変異体モノマーは、好ましくはほぼ同じ長さである、または同じ長さである。構築物中の本発明の変異体モノマーのパレルは、好ましくはほぼ同じ長さである、または同じ長さである。長さは、アミノ酸の数および/または長さの単位で測定することができる。

10

【0283】

ポアは、本発明の変異体モノマーでない1つまたは複数のモノマーを含むことがある。本発明の変異体モノマーでないC s g Gモノマーとしては、上で論じたいずれのアミノ酸/位置も変異/置換されていない配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428もしくは429または配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428もしくは429の比較バリエーションを含むモノマーが挙げられる。配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428または429の比較バリエーションは、アミノ酸同一性に基づいて、その全配列にわたって配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428または429と通常は少なくとも50%相同である。より好ましくは、比較バリエーションは、アミノ酸同一性に基づいて、配列全体にわたって配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428または429のアミノ酸配列と少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であることがある。

20

30

【0284】

上で論じたすべての実施形態では、変異体モノマーの1つまたは複数、例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つまたは10が、好ましくは、上で論じたように化学的に修飾される。

【0285】

ポアを作製する方法は、下でより詳細に論じる。

【0286】

構築物含有ポア

40

本発明は、本発明の少なくとも1つの構築物を含むポアも提供する。本発明の構築物は、C s g Gに由来する共有結合している2つ以上のモノマーを含み、モノマーの少なくとも1つは本発明の変異体モノマーである。言い換えると、構築物は、1つより多くのモノマーを含有しなければならない。ポアは、そのポアを形成するために十分な構築物および、必要に応じて、モノマーを含有する。例えば、オクタマーポアは、(a)各々が2つの構築物を含む4つの構築物を含むこともあり、(b)各々が4つのモノマーを含む2つの構築物を含むこともあり、または(b)2つのモノマーを含む1つの構築物と、構築物の一部を形成しない6つのモノマーとを含むこともある。例えば、ナノマーポアは、(a)各々が2つの構築物を含む4つの構築物と、構築物の一部を形成しない1つのモノマーとを含むこともあり、(b)各々が4つのモノマーを含む2つの構築物と、構築物の一部を

50

形成しないモノマーとを含むこともあり、または (b) 2 つのモノマーを含む 1 つの構築物と、構築物の一部を形成しない 7 つのモノマーとを含むこともある。構築物とモノマーの他の組合せを当業者は予想することができる。

【 0 2 8 7 】

ポア中のモノマーの少なくとも 2 つは、本発明の構築物の形態のものである。構築物およびしたがってポアは、本発明の少なくとも 1 つの変異体モノマーを含む。ポアは、合計で、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを通常は含む (モノマーの少なくとも 2 つは、構築物中になければならない)。ポアは、好ましくは、8 つまたは 9 つのモノマーを含む (モノマーの少なくとも 2 つは、構築物中になければならない)。

10

【 0 2 8 8 】

構築物含有ポアは、ホモオリゴマーである (すなわち、同一の構築物を含む) こともあり、またはヘテロオリゴマー (すなわち、少なくとも 1 つの構築物が他と異なる場合) であることもある。

【 0 2 8 9 】

ポアは、通常は、(a) 2 つのモノマーを含む 1 つの構築物および (b) 5 つ、6 つ、7 つまたは 8 つのモノマーを含有する。構築物は、上で論じたもののいずれかであってもよい。モノマーは、本発明の変異体モノマー、配列番号 3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8 または 4 2 9 を含むモノマー、および上で論じた通りの配列番号 3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8 または 4 2 9 の比較バリエーションを含む変異体モノマーを含む、上で論じたもののいずれかであってもよい。

20

【 0 2 9 0 】

別の典型的なポアは、本発明の 1 つより多くの構築物、例えば、本発明の 2 つ、3 つまたは 4 つの構築物を含む。必要に応じて、そのようなポアは、そのポアを形成するために十分なさらなるモノマーまたは構築物をさらに含む。さらなるモノマーは、本発明の変異体モノマー、配列番号 3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8 または 4 2 9 を含むモノマー、および上で論じた通りの配列番号 3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8 または 4 2 9 の比較バリエーションを含む変異体モノマーを含む、上で論じたもののいずれかであってもよい。さらなる構築物は、上で論じたもののいずれかであってもよく、あるいは上で論じた配列番号 3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8 もしくは 4 2 9 を含むモノマーまたは配列番号 3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8 または 4 2 9 の比較バリエーションを各々が含む、共有結合している 2 つ以上の C s g G モノマーを含む構築物であってもよい。

30

40

【 0 2 9 1 】

本発明のさらなるポアは、2 つのモノマーを含む構築物のみを含み、例えば、ポアは、2 つのモノマーを含む 4 つ、5 つ、6 つ、7 つまたは 8 つの構築物を含むことがある。少なくとも 1 つの構築物は、本発明の構築物であり、すなわち、少なくとも 1 つの構築物中の少なくとも 1 つのモノマー、好ましくは、少なくとも 1 つの構築物中の各モノマーは、本発明の変異体モノマーである。2 つのモノマーを含む構築物のすべてが本発明の構築物であることもある。

【 0 2 9 2 】

50

本発明による特異的ポアは、2つのモノマーを各々が含む本発明の4つの構築物であって、各構築物中の少なくとも1つのモノマー、好ましくは各構築物中の各モノマーが本発明の変異体モノマーである、4つの構築物を含む。構築物はオリゴマー化して、各構築物の1つだけのモノマーがポアのチャンネルに寄与するような構造を有するポアにすることもできる。通常は、構築物の他のモノマーは、ポアのチャンネルの外側にあることになる。例えば、本発明のポアは、2つのモノマーを含む7つ、8つ、9つまたは10の構築物であって、チャンネルが7つ、8つ、9つまたは10のモノマーを含む、構築物を含むことがある。

【0293】

上記の構築物に変異を導入することができる。変異は、交互であることもある。すなわち、2つのモノマー構築物内の各モノマーの変異が異なり、構築物がホモオリゴマーとして組立てられ、その結果、交互修飾となる。言い換えると、Mut AおよびMut Bを含むモノマーが融合され、A-B:A-B:A-B:A-Bポアを形成するように組立てられる。あるいは、変異は、隣接していることもある。すなわち、同一の変異が構築物中の2つのモノマーに導入され、ついでこの構築物が、異なる変異体モノマーまたは構築物を用いてオリゴマー化される。言い換えると、Mut Aを含むモノマーが融合され、その後、Mut B含有モノマーを用いてA-A:B:B:B:B:B:Bを形成するようにオリゴマー化される。

【0294】

構築物含有ポア中の本発明のモノマーの1つまたは複数が、上で論じたように化学的に修飾されることもある。

【0295】

分析物特徴づけ

本発明は、標的分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定する方法を提供する。この方法は、標的分析物とC s g Gポアまたはその変異体、例えば本発明のポアとを、標的分析物がポアに対して、例えばポアを通して、移動するように接触させるステップ、および分析物がポアに対して移動しているときに1回または複数回の測定を行うことによって分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定するステップを含む。標的分析物をテンプレート分析物または目的的分析物と呼ぶこともある。

【0296】

方法は、標的分析物とC s g Gポアまたはその変異体、例えば本発明のポアとを、標的分析物がポアを通して移動するように接触させるステップを含む。ポアは、通常は、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10のモノマー、例えば、7つ、8つ、9つまたは10のモノマーを含む。ポアは、好ましくは、8つまたは9つの同一のモノマーを含む。好ましくは、1つまたは複数、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10、のモノマーが、上で論じたように化学的に修飾される。

【0297】

C s g Gポアは、いずれの生物に由来してもよい。C s g Gポアは、配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428または429で示される配列を含むモノマーを含むことがある。C s g Gポアは、配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428または429で示される配列を各々が含む、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10のモノマー、例えば、7つ、8つ、9つまたは10のモノマーを含むことがある（すなわち、ポアは、同じ生物からの同一のモノマーを含むホモオリゴマーである）。C s g Gは、配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428または429で示される配列を各々が含む、モノマーの任意の組合せを含むこともある。例えば、ポアは、配列番号390で

10

20

30

40

50

示される配列を含む7つのモノマーと、配列番号391で示される配列を含む2つのモノマーとを含むことがある。

【0298】

C s g G変異体は、あらゆる数の変異体モノマー、例えば、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10のモノマー、例えば、7つ、8つ、9つまたは10のモノマーを含むことがある。変異体モノマーは、配列番号390、391、392、393、394、395、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428または429で示される配列の比較バリエーションを含むこともある。比較バリエーションは、上で論じている。比較バリエーションは、ポアを形成することができなければならず、本発明のポアに関して上で論じた相同性%のいずれかを有することがある。

10

【0299】

C s g G変異体は、好ましくは9つのモノマーを含み、それらのモノマーの少なくとも1つは、配列番号390で示される配列のバリエーションであって、(a)次の位置の1つもしくは複数における変異：N40、Q42、D43、E44、K49、Y51、S54、N55、F56、S57、Q62、E101、N102、E124、E131、R142、D149、T150、E185、R192、D195、E201およびE203、例えば、次の位置の1つもしくは複数における変異：N40、Q42、D43、E44、K49、Y51、S54、N55、F56、S57、Q62、E101、N102、E131、D149、T150、E185、D195、E201およびE203、または次の位置の1つもしくは複数における1つもしくは複数の変異：N40、Q42、D43、E44、K49、Y51、N55、F56、E101、N102、E131、D149、T150、E185、D195、E201およびE203、ならびに/あるいは(b)次の位置の1つもしくは複数の欠失：F48、K49、P50、Y51、P52、A53、S54、N55、F56およびS57、を含むバリエーションである。バリエーションは、(a)を含むこともあり、(b)を含むこともあり、または(a)と(b)を含むこともある。(a)において、位置N40、Q42、D43、E44、K49、Y51、S54、N55、F56、S57、Q62、E101、N102、R124、E131、R142、D149、E185、R192、D195、E201およびE203のあらゆる数および組合せが、変異されていることがある。上で論じたように、Y51、N55およびF56の1つまたは複数の変異は、ポリヌクレオチドがポアを通過して移動するときの電流に寄与するヌクレオチドの数を減少させることによって、ポリヌクレオチドがポアを通過して移動するときの観測電流とポリヌクレオチドとの直接的関連の同定をより容易にすることができる。

20

30

【0300】

(b)において、F48、K49、P50、Y51、P52、A53、S54、N55、F56およびS57のあらゆる数および組合せが、欠失されていることがある。バリエーションは、本発明の変異体モノマーに関して上で論じた特異的変異/置換またはそれらの組合せのいずれかを含むことがある。

【0301】

本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、次の置換の1つまたは複数を含む：(a)F56N、F56Q、F56R、F56S、F56G、F56AまたはF56KまたはF56A、F56P、F56R、F56H、F56S、F56Q、F56I、F56L、F56TまたはF56G、(b)N55Q、N55R、N55K、N55S、N55G、N55AまたはN55T、(c)Y51L、Y51V、Y51A、Y51N、Y51Q、Y51SまたはY51G、(d)T150I、(e)S54P、および(f)S57P。バリエーションは、(a)~(f)のあらゆる数および組合せを含むことがある。

40

【0302】

本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、Q62RまたはQ62Kを含む。

【0303】

本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、D43、E44、Q62またはこれら

50

の任意の組合せ、例えば、D 4 3、E 4 4、Q 6 2、D 4 3 / E 4 4、D 4 3 / Q 6 2、E 4 4 / Q 6 2またはD 4 3 / E 4 4 / Q 6 2における変異を含む。

【 0 3 0 4 】

バリエーションは、

位置 Y 5 1、F 5 6、D 1 4 9、E 1 8 5、E 2 0 1およびE 2 0 3における変異、例えば、Y 5 1 N、F 5 6 A、D 1 4 9 N、E 1 8 5 R、E 2 0 1 NおよびE 2 0 3 N、

位置 N 5 5における変異、例えば、N 5 5 AまたはN 5 5 S、

位置 Y 5 1における変異、例えば、Y 5 1 NまたはY 5 1 T、

位置 S 5 4における変異、例えば、S 5 4 P、

位置 S 5 7における変異、例えば、S 5 7 P、

位置 F 5 6における変異、例えば、F 5 6 N、F 5 6 Q、F 5 6 R、F 5 6 S、F 5 6 G、F 5 6 AもしくはF 5 6 KもしくはF 5 6 A、F 5 6 P、F 5 6 R、F 5 6 H、F 5 6 S、F 5 6 Q、F 5 6 I、F 5 6 L、F 5 6 TもしくはF 5 6 G、

位置 Y 5 1およびF 5 6における変異、例えば、Y 5 1 AおよびF 5 6 A、Y 5 1 AおよびF 5 6 N、Y 5 1 IおよびF 5 6 A、Y 5 1 LおよびF 5 6 A、Y 5 1 TおよびF 5 6 A、Y 5 1 TおよびF 5 6 Q、Y 5 1 IおよびF 5 6 N、Y 5 1 LおよびF 5 6 N、もしくはY 5 1 TおよびF 5 6 N、好ましくはY 5 1 IおよびF 5 6 A、Y 5 1 LおよびF 5 6 A、もしくはY 5 1 TおよびF 5 6 A、より好ましくはY 5 1 TおよびF 5 6 Q、もしくはより好ましくはY 5 1 XおよびF 5 6 Q（ここでXは任意のアミノ酸である）、

位置 N 5 5およびF 5 6における変異、例えば、N 5 5 XおよびF 5 6 Q（ここでXは任意のアミノ酸である）、

位置 Y 5 1、N 5 5およびF 5 6における変異、例えば、Y 5 1 A、N 5 5 SおよびF 5 6 A、Y 5 1 A、N 5 5 SおよびF 5 6 N、もしくはY 5 1 T、N 5 5 SおよびF 5 6 Q、

位置 S 5 4およびF 5 6における変異、例えば、S 5 4 PおよびF 5 6 A、もしくはS 5 4 PおよびF 5 6 N、

位置 F 5 6およびS 5 7における変異、例えば、F 5 6 AおよびS 5 7 P、もしくはF 5 6 NおよびS 5 7 P、

位置 D 1 4 9、E 1 8 5およびE 2 0 3における変異、例えば、D 1 4 9 N、E 1 8 5 NおよびE 2 0 3 N、

位置 D 1 4 9、E 1 8 5、E 2 0 1およびE 2 0 3における変異、例えば、D 1 4 9 N、E 1 8 5 N、E 2 0 1 NおよびE 2 0 3 N、

位置 D 1 4 9、E 1 8 5、D 1 9 5、E 2 0 1およびE 2 0 3における変異、例えば、D 1 4 9 N、E 1 8 5 R、D 1 9 5 N、E 2 0 1 NおよびE 2 0 3 N、もしくはD 1 4 9 N、E 1 8 5 R、D 1 9 5 N、E 2 0 1 RおよびE 2 0 3 N、

位置 F 5 6およびN 1 0 2における変異、例えば、F 5 6 QおよびN 1 0 2 R、

(a) 位置 Q 6 2における変異、例えば、Q 6 2 RもしくはQ 6 2 K、および(b) 位置 Y 5 1、N 5 5およびF 5 6の1つもしくは複数、例えば、位置 Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6もしくはY 5 1 / N 5 5 / F 5 6における変異、例えば、Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R、

(i) 位置 D 4 3、E 4 4、Q 6 2もしくはこれらの任意の組合せ、例えば、位置 D 4 3、E 4 4、Q 6 2、D 4 3 / E 4 4、D 4 3 / Q 6 2、E 4 4 / Q 6 2もしくはD 4 3 / E 4 4 / Q 6 2における変異、および(i i) 位置 Y 5 1、N 5 5およびF 5 6の1つもしくは複数、例えば、位置 Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6もしくはY 5 1 / N 5 5 / F 5 6における変異、例えば、D 4 3 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q、E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q、D 4 3 N / E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q、D 4 3 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R、E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R、もしくはD 4 3 N / E 4 4 N / Y 5 1 T / F 5 6 Q / Q 6 2 R、または

位置 T 1 5 0における変異、例えば、T 1 5 0 I

を含むことがある。

【 0 3 0 5 】

本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10のモノマー、例えば、7つ、8つ、9つまたは10のモノマーを含み、モノマーの各々が、次の置換 (a) F 5 6 N、F 5 6 Q、F 5 6 R、F 5 6 S、F 5 6 G、F 5 6 AまたはF 5 6 KまたはF 5 6 A、F 5 6 P、F 5 6 R、F 5 6 H、F 5 6 S、F 5 6 Q、F 5 6 I、F 5 6 L、F 5 6 TまたはF 5 6 G、(b) N 5 5 Q、N 5 5 R、N 5 5 K、N 5 5 S、N 5 5 G、N 5 5 AまたはN 5 5 T、(c) Y 5 1 L、Y 5 1 V、Y 5 1 A、Y 5 1 N、Y 5 1 Q、Y 5 1 SまたはY 5 1 G、(d) T 1 5 0 I、(e) S 5 4 P、および (f) S 5 7 Pのうちの1つまたは複数を含む、配列番号390のバリエーションを含む。バリエーションは、(a) ~ (f) のあらゆる数および組合せを含むことがある。これらの好ましいポア中のモノマーは、好ましくは同一である。

10

【 0 3 0 6 】

本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10のモノマー、例えば、7つ、8つ、9つまたは10のモノマーを含み、モノマーの各々が、

【 0 3 0 7 】

20

30

40

50

【化 4】

Y51N, F56A, D149N, E185R, E201N および E203N;
 N55A;
 N55S;
 Y51N;
 S54P;
 S57P;
 F56N, F56Q, F56R, F56S, F56G, F56A または F56K;
 F56A, F56P, F56R, F56H, F56S, F56Q, F56I, F56L, F56T または F56G;
 Y51A および F56A;
 Y51A および F56N;
 Y51I および F56A;
 Y51L および F56A;
 Y51T および F56A;
 Y51T および F56Q;
 Y51I および F56N;
 Y51L および F56N;
 Y51T および F56N;
 N55S および F56Q;
 Y51A, N55S および F56A;
 Y51A, N55S および F56N;
 Y51T, N55S および F56Q;
 S54P および F56A;
 S54P および F56N;
 F56A および S57P;
 F56N および S57P;
 D149N, E185N および E203N;
 D149N, E185N, E201N および E203N;
 D149N, E185R, D195N, E201N および E203N;
 D149N, E185R, D195N, E201R および E203N;
 T150I;
 F56Q および N102R;
 F56 および N102, F56Q および N102R など;
 Y51T/F56Q/Q62R;
 D43N/Y51T/F56Q;
 E44N/Y51T/F56Q;
 D43N/E44N/Y51T/F56Q
 D43N/Y51T/F56Q/Q62R;
 E44N/Y51T/F56Q/Q62R; または
 D43N/E44N/Y51T/F56Q/Q62R.

10

20

30

40

を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

【 0 3 0 8 】

本発明で使用するための C s g G 変異体は、好ましくは 9 つのモノマーを含み、それらのモノマーの少なくとも 1 つは、位置 Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数に変異を含む、配列番号 3 9 0 で示される配列のバリエーションである。本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 1 0 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 1 0 のモノマーを含み、モノマーの各々が、位置 Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数に変異を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。これらの好ましいポア中のモノマーは、好ましくは同一である。

50

バリエーションは、Y 5 1、N 5 5、F 5 6、Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6、または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 における変異を含むことがある。バリエーションは、上で論じた位置 Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数における、およびあらゆる組合せでの、特異的変異のいずれかを含むことがある。Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 の 1 つもしくは複数がいかなるアミノ酸で置換されていてもよい。Y 5 1 は、F、M、L、I、V、A、P、G、C、Q、N、T、S、E、D、K、H または R、例えば、A、S、T、N または Q で置換されていることがある。N 5 5 は、F、M、L、I、V、A、P、G、C、Q、T、S、E、D、K、H または R、例えば、A、S、T または Q で置換されていることがある。F 5 6 は、M、L、I、V、A、P、G、C、Q、N、T、S、E、D、K、H または R、例えば、A、S、T、N または Q で置換されていることがある。バリエーションは、以下の 1 つまたは複数をさらに含むことがある：(i) 次の位置における 1 つまたは複数の変異(すなわち、次の位置の 1 つもしくは複数における変異)(i) N 4 0、D 4 3、E 4 4、S 5 4、S 5 7、Q 6 2、R 9 7、E 1 0 1、E 1 2 4、E 1 3 1、R 1 4 2、T 1 5 0 および R 1 9 2；(i i i) Q 4 2 R または Q 4 2 K；(i v) K 4 9 R；(v) N 1 0 2 R、N 1 0 2 F、N 1 0 2 Y または N 1 0 2 W；(v i) D 1 4 9 N、D 1 4 9 Q または D 1 4 9 R；(v i i) E 1 8 5 N、E 1 8 5 Q または E 1 8 5 R；(v i i i) D 1 9 5 N、D 1 9 5 Q または D 1 9 5 R；(i x) E 2 0 1 N、E 2 0 1 Q または E 2 0 1 R；(x) E 2 0 3 N、E 2 0 3 Q または E 2 0 3 R；ならびに(x i) 次の位置の 1 つもしくは複数の欠失：F 4 8、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5、F 5 6 および S 5 7。バリエーションは、上で論じた(i) および(i i i) ~ (x i) の組合せのいずれかを含むことがある。バリエーションは、(i) および(i i i) ~ (x i) について上で論じた実施形態のいずれかを含むことがある。

10

20

【0309】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または(2) 本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、Y 5 1 R / F 5 6 Q、Y 5 1 N / F 5 6 N、Y 5 1 M / F 5 6 Q、Y 5 1 L / F 5 6 Q、Y 5 1 I / F 5 6 Q、Y 5 1 V / F 5 6 Q、Y 5 1 A / F 5 6 Q、Y 5 1 P / F 5 6 Q、Y 5 1 G / F 5 6 Q、Y 5 1 C / F 5 6 Q、Y 5 1 Q / F 5 6 Q、Y 5 1 N / F 5 6 Q、Y 5 1 S / F 5 6 Q、Y 5 1 E / F 5 6 Q、Y 5 1 D / F 5 6 Q、Y 5 1 K / F 5 6 Q、または Y 5 1 H / F 5 6 Q を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

30

【0310】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または(2) 本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、Y 5 1 T / F 5 6 Q、Y 5 1 Q / F 5 6 Q、または Y 5 1 A / F 5 6 Q を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

【0311】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または(2) 本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、Y 5 1 T / F 5 6 F、Y 5 1 T / F 5 6 M、Y 5 1 T / F 5 6 L、Y 5 1 T / F 5 6 I、Y 5 1 T / F 5 6 V、Y 5 1 T / F 5 6 A、Y 5 1 T / F 5 6 P、Y 5 1 T / F 5 6 G、Y 5 1 T / F 5 6 C、Y 5 1 T / F 5 6 Q、Y 5 1 T / F 5 6 N、Y 5 1 T / F 5 6 T、Y 5 1 T / F 5 6 S、Y 5 1 T / F 5 6 E、Y 5 1 T / F 5 6 D、Y 5 1 T / F 5 6 K、Y 5 1 T / F 5 6 H、または Y 5 1 T / F 5 6 R を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

40

【0312】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または(2) 本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なく

50

とも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、Y 5 1 T / N 5 5 Q、Y 5 1 T / N 5 5 S、または Y 5 1 T / N 5 5 A を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

【 0 3 1 3 】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または (2) 本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、Y 5 1 A / F 5 6 F、Y 5 1 A / F 5 6 L、Y 5 1 A / F 5 6 I、Y 5 1 A / F 5 6 V、Y 5 1 A / F 5 6 A、Y 5 1 A / F 5 6 P、Y 5 1 A / F 5 6 G、Y 5 1 A / F 5 6 C、Y 5 1 A / F 5 6 Q、Y 5 1 A / F 5 6 N、Y 5 1 A / F 5 6 T、Y 5 1 A / F 5 6 S、Y 5 1 A / F 5 6 E、Y 5 1 A / F 5 6 D、Y 5 1 A / F 5 6 K、Y 5 1 A / F 5 6 H、または Y 5 1 A / F 5 6 R を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

10

【 0 3 1 4 】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または (2) 本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、Y 5 1 C / F 5 6 A、Y 5 1 E / F 5 6 A、Y 5 1 D / F 5 6 A、Y 5 1 K / F 5 6 A、Y 5 1 H / F 5 6 A、Y 5 1 Q / F 5 6 A、Y 5 1 N / F 5 6 A、Y 5 1 S / F 5 6 A、Y 5 1 P / F 5 6 A、または Y 5 1 V / F 5 6 A を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

20

【 0 3 1 5 】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または (2) 本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、

【 0 3 1 6 】

【 化 5 】

D149R/E185R/E201R/E203R または Y51T/F56Q/D149R/E185R/E201R/E203R;

D149N/E185N/E201N/E203N または Y51T/F56Q/D149N/E185N/E201N/E203N;

E201R/E203R または Y51T/F56Q/E201R/E203R

E201N/E203R または Y51T/F56Q/E201N/E203R;

E203R または Y51T/F56Q/E203R;

E203N または Y51T/F56Q/E203N;

E201R または Y51T/F56Q/E201R;

E201N または Y51T/F56Q/E201N;

E185R または Y51T/F56Q/E185R;

E185N または Y51T/F56Q/E185N;

D149R または Y51T/F56Q/D149R;

D149N または Y51T/F56Q/D149N;

R142E または Y51T/F56Q/R142E;

R142N または Y51T/F56Q/R142N;

R192E または Y51T/F56Q/R192E; または

R192N または Y51T/F56Q/R192N.

30

40

を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

【 0 3 1 7 】

(1) 本発明の方法での使用に好ましいバリエーションは、または (2) 本発明の方法での

50

使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、

【 0 3 1 8 】

【 化 6 】

Y51A/F56Q/E101N/N102R;

Y51A/F56Q/R97N/N102G;

Y51A/F56Q/R97N/N102R;

Y51A/F56Q/R97N;

Y51A/F56Q/R97G;

Y51A/F56Q/R97L;

Y51A/F56Q/N102R;

Y51A/F56Q/N102F;

Y51A/F56Q/N102G;

Y51A/F56Q/E101R;

Y51A/F56Q/E101F;

Y51A/F56Q/E101N; または

Y51A/F56Q/E101G.

10

20

を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。

【 0 3 1 9 】

これらの好ましいポア中のモノマーは、好ましくは同一である。

【 0 3 2 0 】

本発明の方法での使用に好ましいポアは、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つまたは少なくとも 10 のモノマー、例えば、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 のモノマーを含み、モノマーの各々が、F 5 6 A、F 5 6 P、F 5 6 R、F 5 6 H、F 5 6 S、F 5 6 Q、F 5 6 I、F 5 6 L、F 5 6 T または F 5 6 G を含む、配列番号 3 9 0 のバリエーションを含む。これらの好ましいポア中のモノマーは、好ましくは同一である。

30

【 0 3 2 1 】

C s g G 変異体は、本実施例において開示する配列番号 3 9 0 のバリエーションのいずれかを含むことがあり、または本実施例において開示するポアのいずれかを含むことがある。

【 0 3 2 2 】

C s g G 変異体は、最も好ましくは本発明のポアである。

【 0 3 2 3 】

ステップ (a) および (b) は、好ましくは、膜を介して印加される電位を用いて行われる。下でより詳細に論じるように、印加される電位によって、通常は、ポアとポリヌクレオチド結合タンパク質との複合体が形成される結果となる。印加される電位は、電圧電位であることがある。あるいは、印加される電位は、化学的電位であることもある。これについての一例は、両親媒性層を横断する塩勾配の使用である。塩勾配は、Holden et al., J Am Chem Soc. 2007 Jul 11; 129(27):8650-5 に開示されている。

40

【 0 3 2 4 】

方法は、標的分析物の存在、不在または 1 つもしくは複数の特徴を判定する方法である。方法は、少なくとも 1 つの標的分析物の存在、不在または 1 つもしくは複数の特徴を判定する方法であることがある。方法は、2 つ以上の標的分析物の存在、不在または 1 つもしくは複数の特徴の判定に関することがある。方法は、あらゆる数の分析物、例えば、2、5、10、15、20、30、40、50、100 以上の分析物の存在、不在または 1 つもしくは複数の特徴の判定を含むことができる。1 つまたは複数の分析物のあらゆる数

50

の特徴、例えば、1、2、3、4、5、10以上の特徴を判定することができる。

【0325】

標的分析物は、好ましくは、金属イオン、無機塩、ポリマー、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、色素、漂白剤、医薬品、診断剤、レクリエーションドラッグ、爆発物または環境汚染物質である。方法は、同じタイプの2つ以上の分析物、例えば、2つ以上のタンパク質、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上の医薬品の存在、不在または1つもしくは複数の特徴の判定に関することもある。あるいは、方法は、異なるタイプの2つ以上の分析物、例えば、1つもしくは複数のタンパク質、1つもしくは複数のヌクレオチドおよび1つもしくは複数の医薬品の存在、不在または1つもしくは複数の特徴の判定に関することもある。

10

【0326】

標的分析物を細胞から分泌することができる。あるいは、標的分析物は、細胞内に存在する分析物であることもあり、したがって、本発明を行う前に該分析物を細胞から抽出しなければならない。

【0327】

分析物は、好ましくは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドおよび/またはタンパク質である。アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、天然に存在することもあり、または天然に存在しないこともある。ポリペプチドまたはタンパク質は、合成または修飾アミノ酸を含有することができる。アミノ酸に対する多数の異なるタイプの修飾が当技術分野において公知である。好適なアミノ酸およびそれらの修飾は、上記である。本発明の目的について、標的分析物を当技術分野において利用できる任意の方法によって修飾することができると解されたい。

20

【0328】

タンパク質は、酵素、抗体、ホルモン、増殖因子または増殖調節タンパク質、例えばサイトカインであることができる。サイトカインは、インターロイキン、好ましくはIFN-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12およびIL-13、インターフェロン、好ましくはIL-、ならびに他のサイトカイン、例えばTNF- から選択することができる。タンパク質は、細菌タンパク質、真菌タンパク質、ウイルスタンパク質または寄生虫由来タンパク質であってもよい。

【0329】

標的分析物は、好ましくは、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドである。ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、下で論じる。オリゴヌクレオチドは、通常は50以下のヌクレオチド、例えば、40以下、30以下、20以下、10以下または5以下のヌクレオチドを有する、短いヌクレオチドポリマーである。オリゴヌクレオチドは、脱塩基および修飾ヌクレオチドを含む、下で論じるヌクレオチドのいずれかを含むことがある。

30

【0330】

標的ポリヌクレオチドなどの標的分析物は、下で論じる好適な試料のいずれかの中に存在することができる。

【0331】

ポアは、通常は、下で論じるような膜内に存在する。下で論じる方法を使用して標的分析物をその膜とカップリングすることまたはその膜に送達することができる。

40

【0332】

下で論じる測定 of the ใดๆを使用して、標的分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定することができる。方法は、好ましくは、標的分析物とポアとを、分析物がポアに対して、例えばポアを通過して、移動するように接触させるステップ、および分析物がポアに対して移動しているときにポアを通過する電流を測定することによって分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定するステップを含む。

【0333】

標的分析物は、電流が分析物に特異的な様式でポアを通過して流れた場合（すなわち、ポ

50

アを通過して流れる、分析物と関連づけられる特有の電流が検出された場合)、存在する。分析物は、電流がヌクレオチドに特異的な様式でポアを通過して流れなかった場合、不在である。対照実験を分析物の存在下で行って、ポアを通過して流れる電流に対するその分析物の影響の与え方を判定することができる。

【0334】

本発明を使用して、類似した構造の分析物をそれらがポアを通過する電流に与える異なる影響に基づいて区別することができる。個々の分析物を、単一分子レベルで、それらがポアと相互作用するときのそれらの電流振幅から同定することができる。本発明を使用して、特定の分析物が試料中に存在するか否かを判定することもできる。本発明を使用して、試料中の特定の分析物の濃度を測定することもできる。C s g G以外のポアを使用する分析物特徴づけは、当技術分野において公知である。

10

【0335】

ポリヌクレオチド特徴づけ

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特徴づける、例えば、ポリヌクレオチドをシーケンシングする方法を提供する。ナノポアを使用してポリヌクレオチドを特徴づけるまたはシーケンシングするための2つの主要戦略、すなわち、鎖特徴づけ/シーケンシングおよびエキソヌクレアーゼ特徴づけ/シーケンシングがある。本発明の方法は、両方の方法に関しうる。

【0336】

鎖シーケンシングの場合、DNAは、印加電位に伴ってまたは反発してナノポアを通過して移行される。二本鎖DNAに対して漸進的にまたは前進的に作用するエキソヌクレアーゼを、印加電位のもとで残りの一本鎖を送り込むためにポアのシス側で使うことができ、または逆転電位のもとでトランス側で使うことができる。同様に、二本鎖DNAを巻き戻すヘリカーゼも、同じように使うことができる。ポリメラーゼも使うことができる。シーケンシング用途のために印加電位に逆らって鎖移行を要する可能性もあるが、逆転電位のもとではまたは電位のない状態ではDNAが酵素によって最初に「捕らえられる」はずである。その後、結合後に電位が切り替わると、鎖は、シスからトランスへとポアを通過し、伸長された高次構造で電流によって保持される。一本鎖DNAエキソヌクレアーゼまたは一本鎖DNA依存性ポリメラーゼは、分子モーターとして作用して、ポアを通過して移行されたばかりの一本鎖を印加電位に反発してトランスからシスへ、制御された段階的様式で引き戻すことができる。

20

30

【0337】

一実施形態では、標的ポリヌクレオチドを特徴づける方法は、標的配列とポアおよびヘリカーゼ酵素とを接触させるステップを含む。あらゆるヘリカーゼを方法において使うことができる。好適なヘリカーゼは、下で論じる。ヘリカーゼは、ポアに対して2つのモードで作用することができる。第一に、方法は、好ましくは、ヘリカーゼが印加された電圧の結果として生ずる場に伴ってポアを通る標的配列の移動を制御するように、ヘリカーゼを使用して行われる。このモードでは、DNAの5'末端が先ずポア内に捕捉され、酵素は、標的配列が最終的に二重層のトランス側に移行するまで場に伴って標的配列をポアに通すように、DNAのポア内への移動を制御する。あるいは、方法は、好ましくは、印加電圧の結果として生ずる場に反発してポアを通る標的配列の移動をヘリカーゼ酵素が制御するように行われる。このモードでは、DNAの3'末端が先ずポア内に捕捉され、酵素は、標的配列が最終的に二重層のシス側に押し戻されるまで印加された場に反発してポアから引き出されるように、ポアを通るDNAの移動を制御する。

40

【0338】

エキソヌクレアーゼシーケンシングの場合、エキソヌクレアーゼは、標的ポリヌクレオチドの一方の末端から個々のヌクレオチドを遊離させ、これらの個々のヌクレオチドが下で論じるように同定される。別の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを特徴づける方法は、標的配列とポアおよびエキソヌクレアーゼ酵素とを接触させるステップを含む。下で論じるエキソヌクレアーゼのいずれかを方法において使うことができる。酵素を下

50

で論じるようにポアに共有結合させることができる。

【0339】

エキソヌクレアーゼは、通常は、ポリヌクレオチドの一方の末端にしっかりつかまっていてその配列をその末端から1ヌクレオチドずつ消化する酵素である。エキソヌクレアーゼは、ポリヌクレオチドを5'から3'方向にまたは3'から5'方向に消化することができる。エキソヌクレアーゼが結合するポリヌクレオチドの末端は、通常は、使用する酵素の選択によっておよび/または当技術分野において公知の方法を使用して判定される。ポリヌクレオチドのいずれかの末端でヒドロキシル基またはキャップ構造を使用して、ポリヌクレオチドの特定の末端とのエキソヌクレアーゼの結合を防止または助長することが通常はできる。

10

【0340】

方法は、ポリヌクレオチドをエキソヌクレアーゼと、ヌクレオチドがポリヌクレオチドの末端から上で論じたような割合のヌクレオチドの特徴づけまたは同定を可能にする速度で消化されるように接触させるステップを含む。これを行う方法は、当技術分野において周知である。例えば、エドマン分解を使用してポリペプチドの末端から単一のアミノ酸を順次消化し、その結果、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用してそれらを同定することができる。類似の方法を本発明において使用することができる。

【0341】

エキソヌクレアーゼが機能する速度は、通常は野生型エキソヌクレアーゼの最適速度より遅い。本発明の方法でのエキソヌクレアーゼの活性に好適な速度は、毎秒0.5~1000ヌクレオチド、毎秒0.6~500ヌクレオチド、毎秒0.7~200ヌクレオチド、毎秒0.8~100ヌクレオチド、毎秒0.9~50ヌクレオチド、または毎秒1~20もしくは10ヌクレオチドの消化を含む。この速度は、好ましくは、毎秒1、10、100、500または1000ヌクレオチドである。エキソヌクレアーゼ活性の好適な速度を様々な方法で達成することができる。例えば、活性の最適速度が低下されたバリエーションエキソヌクレアーゼを本発明に従って使用することができる。

20

【0342】

鎖特徴づけ実施形態では、方法は、ポリヌクレオチドをCsGGポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと、ポリヌクレオチドがポアに対して、例えばポアを通して、移動するように接触させるステップ、およびポリヌクレオチドがポアに対して移動しているときに1回または複数回の測定を行い、測定がポリヌクレオチドの1つまたは複数の特徴を示し、それによって標的ポリヌクレオチドを特徴づけるステップを含む。

30

【0343】

エキソヌクレオチド特徴づけ実施形態では、方法は、ポリヌクレオチドを、CsGGポアまたはその変異体、例えば本発明のポア、およびエキソヌクレアーゼと、エキソヌクレアーゼが標的ポリヌクレオチドの一方の末端から個々のヌクレオチドを消化し、個々のヌクレオチドがポアに対して、例えばポアを通して移動するように、接触させるステップ、および個々のヌクレオチドがポアに対して移動しているときに1回または複数回の測定を行い、測定が個々のヌクレオチドの1つまたは複数の特徴を示し、それによって標的ポリヌクレオチドを特徴づけるステップを含む。

40

【0344】

個々のヌクレオチドは、単一のヌクレオチドである。個々のヌクレオチドは、ヌクレオチド結合によって別のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと結合されていないヌクレオチドである。ヌクレオチド結合は、別のヌクレオチドの糖基と結合しているヌクレオチドのリン酸基の1つを含む。個々のヌクレオチドは、通常は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500、少なくとも1000または少なくとも5000ヌクレオチドの別のポリヌクレオチドと結合しているヌクレオチドによって結合されていないものである。例えば、個々のヌクレオチドは、DNAまたはRNA鎖などの標的ポリヌクレオチド配列から消化されたものである。ヌクレオチドは、下で論じるもののいずれかであってもよい。

50

【 0 3 4 5 】

個々のヌクレオチドは、あらゆる様式で、あらゆる部位で、ポアと相互作用することができる。ヌクレオチドは、好ましくは、上で論じたようなアダプターによってまたはそのようなアダプターとともにポアと可逆的に結合する。ヌクレオチドは、最も好ましくは、それらがポアを通して膜を通過しているときにアダプターによってまたはアダプターとともにポアと可逆的に結合する。ヌクレオチドは、それらがポアを通して膜を通過しているときにアダプターによってまたはアダプターとともにポアの平行またはチャンネルと可逆的に結合することもできる。

【 0 3 4 6 】

個々のヌクレオチドとポアとの相互作用中、ヌクレオチドは、そのヌクレオチドに特異的な様式でポアを通して流れる電流に作用するのが一般的である。例えば、特定のヌクレオチドは、ポアを通して流れる電流を特定の平均時間にわたって、特定の程度に低減させることになる。言い換えると、ポアを通して流れる電流は、特定のヌクレオチドに特有のものである。対照実験を行って、特定のヌクレオチドがポアを通して流れる電流に与える影響を判定することができる。その後、試験試料に対する本発明の方法の実施の結果を、そのような対照実験から導出されたものと比較して、試料中の特定のヌクレオチドを同定することができる、または特定のヌクレオチドが試料中に存在するかどうかを判定することができる。ポアを通して流れる電流に特定のヌクレオチドを示す形で影響を与える周波数を使用して、試料中のそのヌクレオチドの濃度を判定することができる。試料中の異なるヌクレオチドの比も算出することができる。例えば、d C M P のメチル - d C M P に対する比を算出することができる。

【 0 3 4 7 】

方法は、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特徴を測定するステップを含む。標的ポリヌクレオチドをテンプレートポリヌクレオチドまたは目的のポリヌクレオチドと呼ぶこともある。

【 0 3 4 8 】

この実施形態は、C s g G ポアまたはその変異体、例えば本発明のポアも使用する。標的分析物に関して上で論じたポアおよび実施形態のいずれかを使用することができる。

【 0 3 4 9 】

ポリヌクレオチド

核酸などのポリヌクレオチドは、2つ以上のヌクレオチドを含む高分子である。ポリヌクレオチドまたは核酸は、あらゆるヌクレオチドのあらゆる組合せを含むことがある。ヌクレオチドは、天然に存在することもあり、または人工的なものであることもある。ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、酸化またはメチル化されることもある。ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、損傷されることもある。例えば、ポリヌクレオチドは、ピリミジンダイマーを含むことがある。そのようなダイマーは、概して紫外線によって損傷され、皮膚黒色腫の主原因である。ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、例えば標識またはタグで、修飾されることもある。好適な標識は、下で説明する。ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のスパーサーを含むこともある。

【 0 3 5 0 】

ヌクレオチドは、通常は、核酸塩基、糖および少なくとも1つのリン酸基を含有する。核酸塩基と糖がヌクレオチドを形成する。

【 0 3 5 1 】

核酸塩基は、通常は複素環式のものである。核酸塩基としては、プリンおよびピリミジン、より具体的にはアデニン (A)、グアニン (G)、チミジン (T)、ウラシル (U) およびシトシン (C) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 3 5 2 】

糖は、通常はペントース糖である。ヌクレオチド糖としては、リボースおよびデキストロースが挙げられるが、これらに限定されない。糖は、好ましくはデオキシリボースであ

る。

【 0 3 5 3 】

ポリヌクレオチドは、好ましくは次のヌクレオシドを含む：デオキシアデノシン（d A）、デオキシウリジン（d U）および/またはチミジン（d T）、デオキシグアノシン（d G）ならびにデオキシシチジン（d C）。

【 0 3 5 4 】

ヌクレオチドは、通常は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドは、通常は、一リン酸、二リン酸または三リン酸を含有する。ヌクレオチドは、3つより多くのリン酸、例えば、4つまたは5つのリン酸を含むこともある。リン酸は、ヌクレオチドの5'側に結合されることもあり、または3'側に結合されることもある。ヌクレオチドとしては、アデノシンーリン酸（AMP）、グアノシンーリン酸（GMP）、チミジンーリン酸（TMP）、ウリジンーリン酸（UMP）、5-メチルシチジンーリン酸、5-ヒドロキシメチルシチジンーリン酸、シチジンーリン酸（CMP）、環状アデノシンーリン酸（cAMP）、環状グアノシンーリン酸（cGMP）、デオキシアデノシンーリン酸（dAMP）、デオキシグアノシンーリン酸（dGMP）、デオキシチミジンーリン酸（dTMP）、デオキシウリジンーリン酸（dUMP）、デオキシシチジンーリン酸（dCMP）およびデオキシメチルシチジンーリン酸が挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、好ましくは、AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP、dCMPおよびdUMPから選択される。

【 0 3 5 5 】

ヌクレオチドは、脱塩基性である（すなわち、核酸塩基を欠いている）ことがある。ヌクレオチドは、核酸塩基および糖も欠いていることがある（すなわち、C3スパーサーである）。

【 0 3 5 6 】

ポリヌクレオチド中のヌクレオチドは、いかなる様式で互いに結合されていてもよい。ヌクレオチドは、通常は、それらの糖およびリン酸基によって核酸の場合と同様に結合されている。ヌクレオチドは、それらの核酸塩基によってピリミジンダイマーの場合のように接続されていることもある。

【 0 3 5 7 】

ポリヌクレオチドは、一本鎖状であることもあり、または二本鎖状であることもある。ポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、好ましくは二本鎖状である。

【 0 3 5 8 】

ポリヌクレオチドは、核酸、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）であることができる。ポリヌクレオチドは、1本のDNA鎖にハイブリダイズしている1本のRNA鎖を含むことができる。ポリヌクレオチドは、ペプチド核酸（PNA）、グリセロール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、ロックド核酸（LNA）、またはヌクレオチド側鎖を有する他の合成ポリマーなどの、当技術分野において公知のいかなる合成核酸であってもよい。PNA主鎖は、ペプチド結合によって連結された反復N-（2-アミノエチル）-グリシン単位で構成されている。GNA主鎖は、ホスホジエステル結合によって連結された反復グリコール単位で構成されている。TNA主鎖は、ホスホジエステル結合によって互いに連結された反復トレオース糖で構成されている。LNAは、リボース部分の2'酸素と4'炭素を接続する余分な架橋を有する、上で論じたようなリボヌクレオチドから形成される。架橋核酸（BNA）は、修飾RNAヌクレオチドである。BNAは、束縛または隔絶RNAと呼ばれることもある。BNAモノマーは、「固定された」C3'-endo糖パッカリングを有する5員、6員またはさらには7員の架橋構造を含有することができる。架橋をリボースの2'，4'位に合成的に組み込んで、2'，4'-BNAモノマーを生成する。

【 0 3 5 9 】

ポリヌクレオチドは、最も好ましくはリボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA）である。

【0360】

ポリヌクレオチドは、あらゆる長さであることができる。例えば、ポリヌクレオチドは、長さ少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも400または少なくとも500ヌクレオチドまたはヌクレオチド対であることができる。ポリヌクレオチドは、長さ1000ヌクレオチドもしくはヌクレオチド対以上、長さ5000ヌクレオチドもしくはヌクレオチド対以上、または長さ10000ヌクレオチドもしくはヌクレオチド対以上であることができる。

【0361】

あらゆる数のポリヌクレオチドを調査することができる。例えば、本発明の方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、100以上のポリヌクレオチドの特徴づけに関することがある。2つ以上のポリヌクレオチドを特徴づける場合、それらは、異なるポリヌクレオチドであることもあり、同じポリヌクレオチドの2つの実例であることもある。

10

【0362】

ポリヌクレオチドは、天然に存在することもあり、または人工的なものであることもある。例えば、方法を使用して、製造されたオリゴヌクレオチドの配列を検証することができる。方法は、通常は*in vitro*で行われる。

【0363】

試料

20

ポリヌクレオチドは、通常は、あらゆる好適な試料中に存在する。本発明は、通常は、ポリヌクレオチドを含有することが分かっているまたは含有すると推測される試料を用いて行われる。あるいは、本発明は、試料を用いて、その試料中に存在することが分かっているまたは予想されるポリヌクレオチドの同一性を確認するため行われることもある。

【0364】

試料は、生体試料であってもよい。本発明は、あらゆる生物または微生物から得られたまたは抽出された試料を使用して*in vitro*で行うことができる。生物または微生物は、通常は、古細菌性、原核性または真核性であり、通常は、五界、すなわち植物界、動物界、菌界、原核生物界および原生生物界、の1つに属する。本発明は、あらゆるウイルスから得られたまたは抽出された試料を用いて*in vitro*で行うことができる。試料は、好ましくは流体試料である。試料は、通常は患者の体液を含む。試料は、尿、リンパ液、唾液、粘液または羊水であってもよいが、好ましくは血液、血漿または血清である。

30

【0365】

試料は、通常は、起源がヒトであるが、代替的に、別の哺乳類動物からのもの、例えば、商業飼育動物、例えばウマ、ウシ、ヒツジ、魚、ニワトリもしくはブタからのものであってもよく、または代替的にペット、例えばネコもしくはイヌであってもよい。あるいは、試料は、植物起源のもの、例えば、商品作物、例えば、穀類、マメ科植物、果実または野菜、例えば、コムギ、オオムギ、オートムギ、キャノーラ、トウモロコシ、ダイズ、イネ、ダイオウ、バナナ、リンゴ、トマト、ジャガイモ、ブドウ、タバコ、マメ、レンズマメ、サトウキビ、カカオノキ、ワタから得られた試料であってもよい。

40

【0366】

試料は、非生体試料であってもよい。非生体試料は、好ましくは流体試料である。非生体試料の例としては、外科用流体、水、例えば飲用水、海水または河川水、および検査室検査用の試薬が挙げられる。

【0367】

試料は、通常は、本発明で使用される前に、例えば、遠心分離によって、または望ましくない分子もしくは細胞、例えば赤血球を濾過して取り除く膜を通過させることによって処理される。試料は、採取され次第、測定されることもある。試料がアッセイ前に、好ましくは-70で保存されることがあることも一般的である。

50

【0368】

特徴づけ

方法は、ポリヌクレオチドの2、3、4または5以上の特徴を測定するステップを含むことがある。1つまたは複数の特徴は、好ましくは、(i)ポリヌクレオチドの長さ、(ii)ポリヌクレオチドの同一性、(iii)ポリヌクレオチドの配列、(iv)ポリヌクレオチドの二次構造、および(v)ポリヌクレオチドが修飾されているか否かから選択される。{i}、{ii}、{iii}、{iv}、{v}、{i, ii}、{i, iii}、{i, iv}、{i, v}、{ii, iii}、{ii, iv}、{ii, v}、{iii, iv}、{iii, v}、{iv, v}、{i, ii, iii}、{i, ii, iv}、{i, ii, v}、{i, iii, iv}、{i, iii, v}、{i, iv, v}、{ii, iii, iv}、{ii, iii, v}、{ii, iv, v}、{iii, iv, v}、{i, ii, iii, iv}、{i, ii, iii, v}、{i, ii, iv, v}、{i, ii, v, v}、{i, iii, iv, v}、{i, iii, v, v}または{i, ii, iii, iv, v}などの、(i)~(v)のいずれの組合せを、本発明に従って測定してもよい。上に列挙した組合せのいずれかを含む(i)~(v)の異なる組合せを、第2のポリヌクレオチドと比較して、第1のポリヌクレオチドについて測定することができる。

10

【0369】

(i)については、ポリヌクレオチドの長さを、例えば、ポリヌクレオチドとポアとの相互作用の数、またはポリヌクレオチドとポアとの相互作用の継続時間を判定することによって測定することができる。

20

【0370】

(ii)については、ポリヌクレオチドの同一性を、多数の方法で測定することができる。ポリヌクレオチドの同一性は、ポリヌクレオチドの配列の測定とともに測定されることもあり、またはポリヌクレオチドの配列の測定を伴わずに測定されることもある。先に述べた測定は容易であり、ポリヌクレオチドをシーケンシングし、それによって同定する。後で述べた測定は、いくつかの方法で行うことができる。例えば、ポリヌクレオチド内の特定のモチーフの存在を(ポリヌクレオチドの残存配列を測定せずに)測定してもよい。あるいは、その方法の中で特定の電気および/または光シグナルを測定することによって、ポリヌクレオチドが特定の源に由来すると同定されることもある。

30

【0371】

(iii)については、ポリヌクレオチドの配列を、以前に記載されたように判定することができる。好適なシーケンシング方法、特に電氣的測定を用いるものは、Stoddart D et al., Proc Natl Acad Sci, 12;106(19):7702-7、Lieberman KR et al., J Am Chem Soc. 2010;132(50):17961-72、および国際出願国際公開第2000/28312号パンフレットに記載されている。

【0372】

(iv)については、二次構造を様々な方法で測定することができる。例えば、その方法が電氣的測定を含む場合、滞留時間の変化、またはポアを通して流れる電流の変化を使用して、二次構造を測定してもよい。これによって、一本鎖ポリヌクレオチド領域と二本鎖ポリヌクレオチド領域を区別することが可能になる。

40

【0373】

(v)については、あらゆる修飾の存在または不在を測定することができる。この方法は、ポリヌクレオチドがメチル化によって、酸化によって、損傷によって、1つもしくは複数のタンパク質でまたは1つもしくは複数の標識、タグもしくはスパーサーで修飾されているか否かを判定することを好ましくは含む。特異的修飾は、ポアとの特異的相互作用をもたらすことになり、下で説明する方法を用いてそのような特異的相互作用を測定することができる。例えば、メチルシトシンを、各ヌクレオチドとのその相互作用中にポアを通過して、流れる電流に基づいて、シトシンと区別してもよい。

【0374】

50

標的ポリヌクレオチドをC s g Gポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと接触させる。ポアは、通常は膜内に存在する。好適な膜は、下で論じる。ポアが膜内に存在する膜/ポア系の調査に適しているあらゆる装置を使用して方法を行うことができる。膜貫通ポアセンシングに適しているあらゆる装置を使用して方法を行うことができる。例えば、装置は、水溶液を含むチャンバーと、そのチャンバーを2区画に分ける遮断壁とを含む。遮断壁は、通常は、ポアを含有する膜が形成される開口部を有する。あるいは、遮断壁は、ポアが存在する膜を形成する。

【0375】

国際出願第PCT/GB08/000562号明細書(国際公開2008/102120号パンフレット)に記載されている装置を使用して方法を行ってもよい。

10

【0376】

様々な異なるタイプの測定を行うことができる。この測定は、限定ではないが、電気的測定および光学的測定を含む。可能な電気的測定としては、電流測定、インピーダンス測定、トンネル効果測定(Ivanov AP et al., Nano Lett. 2011 Jan 12; 11(1):279-85)、およびFET測定(国際公開出願第2005/124888号パンフレット)が挙げられる。光学的測定を電気的測定と併用してもよい(Soni GV et al., Rev Sci Instrum. 2010 Jan; 81(1):014301)。測定は、膜貫通電流測定、例えば、ポアを通して流れるイオン電流の測定であることもある。

【0377】

Stoddart D et al., Proc Natl Acad Sci, 12; 106(19):7702-7、Lieberman KR et al., J Am Chem Soc. 2010;132(50):17961-72、および国際出願国際公開第2000/28312号パンフレットに記載されているような標準的単一チャンネル記録機器を使用して、電気的測定を行ってもよい。あるいは、例えば国際出願国際公開第2009/077734号パンフレットおよび国際出願国際公開第2011/067559号パンフレットに記載されているような多チャンネルシステムを使用して、電気的測定を行ってもよい。

20

【0378】

方法は、好ましくは、膜を介して印加される電位を用いて行われる。印加される電位は、電圧電位であることがある。あるいは印加される電位は、化学的電位であることもある。この方法の例は、両親媒性層などの膜を横断する塩勾配の使用である。塩勾配は、Holden et al., J Am Chem Soc. 2007 Jul 11; 129(27):8650-5に開示されている。場合によっては、ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときにポアを通過する電流を使用して、ポリヌクレオチドの配列を推定または判定する。これが鎖シークエンシングである。

30

【0379】

方法は、ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときにポアを通過する電流を測定するステップを含むことがある。したがって、方法で使用する装置は、電位を印加することができる電気回路であって、膜およびポアを横断する電気シグナルを測定することができる電気回路も含むことがある。方法は、パッチクランプまたは電圧固定を使用して行われることもある。方法は、好ましくは電圧固定の使用を含む。

【0380】

本発明の方法は、ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときポアを通過する電流を測定するステップを含むことがある。膜貫通タンパク質ポアを通るイオン電流の測定に好適な条件は、当技術分野において公知であり、実施例において開示する。方法は、通常は、膜とポアを介して印加される電圧を用いて行われる。使用される電圧は、通常は、+5V~-5V、例えば、+4V~-4V、+3V~-3V、または+2V~-2Vである。使用される電圧は、通常は、-600mV~+600mV、または-400mV~+400mVである。使用される電圧は、好ましくは、-400mV、-300mV、-200mV、-150mV、-100mV、-50mV、-20mVおよび0mVから選択される下限と+10mV、+20mV、+50mV、+100mV、+150mV、+200mV、+300mVおよび+400mVから独立して選択される上限とを有する範囲である。使用される電圧は、より好ましくは、100mV~240mVの範囲、および最も好

40

50

ましくは $120\text{ mV} \sim 220\text{ mV}$ の範囲である。増加された印加電位の使用により、ポアによる異なるヌクレオチド間の識別を増すことが可能である。

【0381】

方法は、通常は、金属塩、例えばアルカリ金属塩、ハロゲン化物塩、例えば塩化物塩、例えばアルカリ金属塩化物塩などの、任意の電荷担体の存在下で行われる。電荷担体としては、イオン性液体または有機塩、例えば塩化テトラメチルアンモニウム、塩化トリメチルフェニルアンモニウム、塩化フェニルトリメチルアンモニウムもしくは塩化1-エチル-3-メチルイミダゾリウムを挙げることができる。上で論じた例示的装置では、塩は、チャンバー内の水溶液中に存在する。塩化カリウム (KCl)、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化セシウム (CsCl)、またはフェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリウムの混合物が通常は使用される。 KCl 、 NaCl 、およびフェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリウムの混合物が好ましい。電荷担体は、膜に対して非対称であることがある。例えば、電荷担体のタイプおよび/または濃度が膜の両側で異なることがある。

10

【0382】

塩濃度は、飽和時のものでありうる。塩濃度は、 3 M 以下であることができるが、通常は $0.1 \sim 2.5\text{ M}$ 、 $0.3 \sim 1.9\text{ M}$ 、 $0.5 \sim 1.8\text{ M}$ 、 $0.7 \sim 1.7\text{ M}$ 、 $0.9 \sim 1.6\text{ M}$ 、または $1\text{ M} \sim 1.4\text{ M}$ である。塩濃度は、好ましくは、 $150\text{ mM} \sim 1\text{ M}$ である。方法は、好ましくは、少なくとも 0.3 M 、例えば、少なくとも 0.4 M 、少なくとも 0.5 M 、少なくとも 0.6 M 、少なくとも 0.8 M 、少なくとも 1.0 M 、少なくとも 1.5 M 、少なくとも 2.0 M 、少なくとも 2.5 M または少なくとも 3.0 M の塩濃度を使用して行われる。高い塩濃度は、高いシグナル対ノイズ比をもたらし、正常電流変動のバックグラウンドに対してヌクレオチドの存在を示す電流を同定することを可能にする。

20

【0383】

方法は、通常は緩衝液の存在下で行われる。上で論じた例示的装置では、緩衝液は、チャンバー内の水溶液中に存在する。いかなる緩衝液を本発明の方法において使用してもよい。通常は、緩衝液はリン酸緩衝液である。他の好適な緩衝液は、HEPES および Tris-HCl 緩衝液である。方法は、通常は、 $4.0 \sim 12.0$ 、 $4.5 \sim 10.0$ 、 $5.0 \sim 9.0$ 、 $5.5 \sim 8.8$ 、 $6.0 \sim 8.7$ 、または $7.0 \sim 8.8$ 、または $7.5 \sim 8.5$ の pH で行われる。使用される pH は、好ましくは約 7.5 である。

30

【0384】

方法は、 $0 \sim 100$ 、 $15 \sim 95$ 、 $16 \sim 90$ 、 $17 \sim 85$ 、 $18 \sim 80$ 、 $19 \sim 70$ 、または $20 \sim 60$ で行われることがある。方法は、通常は室温で行われる。方法は、場合により、酵素機能を支援する温度、例えば、約 37 で行われる。

【0385】

ポリヌクレオチド結合タンパク質

鎖特徴づけ方法は、ポリヌクレオチドをポリヌクレオチド結合タンパク質と、タンパク質がポリヌクレオチドのポアに対する、例えばポアを通る、移動を制御するように接触させるステップを好ましくは含む。

40

【0386】

より好ましくは、方法は、(a) ポリヌクレオチドを CsG ポアまたはその変異体、例えば本発明のポア、およびポリヌクレオチド結合タンパク質と、タンパク質がポリヌクレオチドのポアに対する、例えばポアを通る、移動を制御するように接触させるステップ、ならびに (b) ポリヌクレオチドがポアに対して移動しているときに1回または複数回の測定を行い、測定がポリヌクレオチドの1つまたは複数の特徴を示し、それによってポリヌクレオチドを特徴づけるステップを含む。

【0387】

より好ましくは、方法は、(a) ポリヌクレオチドを CsG ポアまたはその変異体、例えば本発明のポア、およびポリヌクレオチド結合タンパク質と、タンパク質がポリヌク

50

レオチドのポアに対する、例えばポアを通る、移動を制御するように接触させるステップ、ならびに (b) ポリヌクレオチドがポアに対して移動しているときにポアを通る電流を測定し、電流がポリヌクレオチドの1つまたは複数の特徴を示し、それによってポリヌクレオチドを特徴づけるステップを含む。

【0388】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、ポリヌクレオチドと結合することおよびポアを通るその移動を制御することができる、あらゆるタンパク質であることができる。当技術分野ではタンパク質がポリヌクレオチドと結合するか否かを判定することは容易である。タンパク質は、通常は、ポリヌクレオチドと相互作用し、ポリヌクレオチドの少なくとも1つの特性を修飾する。タンパク質は、ポリヌクレオチドを切断して個々のヌクレオチドまたはより短いヌクレオチド鎖、例えばジもしくはトリヌクレオチド、にすることによって、ポリヌクレオチドを修飾することがある。タンパク質は、ポリヌクレオチドを特異的位置に配向または移動させること、すなわちその移動を制御することによって、ポリヌクレオチドを修飾することもある。

【0389】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、好ましくは、ポリヌクレオチドハンドリング酵素 (polynucleotide handling enzyme) に由来する。ポリヌクレオチドハンドリング酵素は、ポリヌクレオチドと相互作用してポリヌクレオチドの少なくとも1つの特性を修飾することができるポリペプチドである。酵素は、ポリヌクレオチドを切断して個々のヌクレオチドまたはより短いヌクレオチド鎖、例えばジもしくはトリヌクレオチド、にすることによって、ポリヌクレオチドを修飾することがある。酵素は、ポリヌクレオチドを特異的位置に配向または移動させることによって、ポリヌクレオチドを修飾することもある。ポリヌクレオチドハンドリング酵素は、ポリヌクレオチドに結合することができ、かつポアを通るその移動を制御することができるのであれば、酵素活性を示す必要がない。例えば、酵素は、その酵素活性を除去するように修飾されることもあり、または酵素として作用することを妨げる条件下で使用されることもある。そのような条件は、下でより詳細に論じる。

【0390】

ポリヌクレオチドハンドリング酵素は、好ましくは、核酸分解酵素に由来する。酵素の構築物に使用されるポリヌクレオチドハンドリング酵素は、より好ましくは、酵素分類 (EC) 群 3.1.11、3.1.13、3.1.14、3.1.15、3.1.16、3.1.21、3.1.22、3.1.25、3.1.26、3.1.27、3.1.30 および 3.1.31 のいずれかのメンバーに由来する。酵素は、国際出願第 PCT/GB 10/000133 号明細書 (国際公開第 2010/086603 号パンフレットとして公開) に開示されているもののいずれかであってもよい。

【0391】

好ましい酵素は、ポリメラーゼ、エキソヌクラーゼ、ヘリカーゼおよびトポイソメラーゼ、例えばジャイレースである。好適な酵素としては、大腸菌 (*E. coli*) からのエキソヌクラーゼ (配列番号 399)、大腸菌 (*E. coli*) からのエキソヌクラーゼ III 酵素 (配列番号 401)、高度好熱菌 (*T. thermophilus*) からの RecJ (配列番号 403)、およびバクテリオファージラムダエキソヌクラーゼ (配列番号 405)、TatD エキソヌクラーゼ、ならびにこれらのバリエーションが挙げられるが、それらに限定されない。配列番号 403 で示される配列またはそのバリエーションを構成する3つのサブユニットは相互作用してトリマーエキソヌクラーゼを形成する。これらのエキソヌクラーゼを本発明のエキソヌクラーゼ方法において使用することもできる。ポリメラーゼは、PyroPhage (登録商標) 3173 DNAポリメラーゼ (Lucigen (登録商標) Corporation から市販されている)、SDポリメラーゼ (Bioron (登録商標) から市販されている)、またはそのバリエーションであってもよい。酵素は、好ましくは、Phi29 DNAポリメラーゼ (配列番号 397) またはそのバリエーションである。トポイソメラーゼは、好ましくは、部分分類 (EC) 群 5.99.1.2 および 5.

10

20

30

40

50

99.1.3のいずれかについてのメンバーである。

【0392】

酵素は、最も好ましくは、ヘリカーゼ、例えば、He1308 Mbu（配列番号406）、He1308 Csy（配列番号407）、He1308 Tga（配列番号408）、He1308 Mhu（配列番号409）、Tra1 Eco（配列番号410）、XPD Mbu（配列番号411）またはそのバリエーションに由来する。いかなるヘリカーゼを本発明で使用してもよい。ヘリカーゼは、He1308ヘリカーゼ、RecDヘリカーゼ、例えばTra1ヘリカーゼもしくはTrwCヘリカーゼ、XPDヘリカーゼまたはDdaヘリカーゼであることがあり、またはこれらに由来することもある。ヘリカーゼは、国際出願第PCT/GB2012/052579号明細書（国際公開第2013/057495号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2012/053274号明細書（国際公開第2013/098562号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2012/053273号明細書（国際公開第2013/098561号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2013/051925号明細書（国際公開第2014/013260号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2013/051924号明細書（国際公開第2014/013259号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2013/051928号明細書（国際公開第2014/013262号パンフレットとして公開）および同第PCT/GB2014/052736号明細書に開示されている、ヘリカーゼ、修飾ヘリカーゼまたはヘリカーゼ構築物のいずれかであってもよい。

【0393】

ヘリカーゼは、好ましくは、配列番号413（TrwC Cba）で示される配列もしくはそのバリエーション、配列番号406（He1308 Mbu）で示される配列もしくはそのバリエーション、または配列番号412（Dda）で示される配列もしくはそのバリエーションを含む。バリエーションは、膜貫通ポアについて下で論じる点のいずれかでネイティブ配列と異なることがある。配列番号412の好ましいバリエーションは、（a）E94CおよびA360Cまたは（b）E94C、A360C、C109AおよびC136A、次いで場合により（M1）G1G2（すなわち、M1の欠失、次いで追加のG1およびG2）を含む。

【0394】

あらゆる数のヘリカーゼを本発明に従って使用することができる。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のヘリカーゼが使用されることもある。一部の実施形態では、異なる数のヘリカーゼが使用されることもある。

【0395】

本発明の方法は、好ましくは、ポリヌクレオチドと2つ以上のヘリカーゼを接触させるステップを含む。2つ以上のヘリカーゼは、通常は同じヘリカーゼである。2つ以上のヘリカーゼは、異なるヘリカーゼであることもある。

【0396】

2つ以上のヘリカーゼは、上で言及したヘリカーゼのいかなる組合せであってもよい。2つ以上のヘリカーゼは、2つ以上のDdaヘリカーゼであることもある。2つ以上のヘリカーゼは、1つまたは複数のDdaヘリカーゼと1つまたは複数のTrwCヘリカーゼであることもある。2つ以上のヘリカーゼは、同じヘリカーゼの異なるバリエーションであることもある。

【0397】

2つ以上のヘリカーゼは、好ましくは、互いに結合される。2つ以上のヘリカーゼは、より好ましくは、互いに共有結合される。いかなる順序で、およびいかなる方法を使用して、ヘリカーゼを結合させてもよい。本発明での使用に好ましいヘリカーゼ構築物は、国際出願第PCT/GB2013/051925号明細書（国際公開第2014/013260号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2013/051924号明細書（国際公開第2014/013259号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2013/051928号明細書（国際公開第2014/013262号パンフレットとして

公開) および同第 P C T / G B 2 0 1 4 / 0 5 2 7 3 6 号明細書に記載されている。

【 0 3 9 8 】

配列番号 3 9 7、3 9 9、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、4 1 1、4 1 2 または 4 1 3 のバリエーションは、配列番号 3 9 7、3 9 9、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、4 1 1、4 1 2 または 4 1 3 のものとは異なるアミノ酸配列を有する酵素であって、ポリヌクレオチド結合能力を保持する酵素である。この能力を、当技術分野において公知の任意の方法を使用して測定することができる。例えば、バリエーションをポリヌクレオチドと接触させることができ、ポリヌクレオチドと結合するおよびポリヌクレオチドに沿って移動するその能力を測定することができる。バリエーションは、ポリヌクレオチドの結合を助長する修飾ならびに / または高い塩濃度および / もしくは室温でその活性を助長する修飾を含むことがある。バリエーションは、ポリヌクレオチドに結合する (すなわち、ポリヌクレオチド結合活性を保持する) がヘリカーゼとして機能しない (すなわち、移動を助長するためのすべての必要成分、例えば A T P および Mg^{2+} 、が備わっているときポリヌクレオチドに沿って移動しない) ように修飾されることもある。そのような修飾は、当技術分野において公知である。例えば、ヘリカーゼ中の Mg^{2+} 結合ドメインの修飾は、通常は、ヘリカーゼとして機能しないバリエーションをもたらす。これらのタイプのバリエーションは、分子ブレーキとして作用 (下記参照) することができる。

10

【 0 3 9 9 】

配列番号 3 9 7、3 9 9、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、4 1 1、4 1 2 または 4 1 3 のアミノ酸配列の全長にわたって、バリエーションは、好ましくは、アミノ酸同一性に基づいてその配列と少なくとも 5 0 % 相同であることになる。より好ましくは、バリエーションポリペプチドは、アミノ酸同一性に基づいて、配列全体にわたって配列番号 3 9 7、3 9 9、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、4 1 1、4 1 2 または 4 1 3 のアミノ酸配列と少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、およびより好ましくは少なくとも 9 5 %、9 7 % または 9 9 % 相同でありうる。連続する 2 0 0 以上、例えば 2 3 0、2 5 0、2 7 0、2 8 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0 または 1 0 0 0 以上のアミノ酸のストレッチにわたって、少なくとも 8 0 %、例えば少なくとも 8 5 %、9 0 % または 9 5 % アミノ酸同一性 (「堅い相同性」) があることもある。相同性は、上で論じたように判定される。バリエーションは、上記配列番号 3 9 0 に関して上で論じた点のいずれかで野生型配列と異なることがある。酵素をポアに共有結合されることもある。いかなる方法を使用して酵素をポアに共有結合させてもよい。

20

30

【 0 4 0 0 】

好ましい分子ブレーキは、T r w C C b a - Q 5 9 4 A (変異 Q 5 9 4 A を有する配列番号 4 1 3) である。このバリエーションは、ヘリカーゼとして機能しない (すなわち、ポリヌクレオチドに結合するが、移動を助長するためのすべての必要な成分、例えば A T P および Mg^{2+} 、が備わっているときにポリヌクレオチドに沿って移動しない)。

【 0 4 0 1 】

鎖シーケンシングの場合、ポリヌクレオチドは、印加電位に伴ってまたは反発してポアを通して移行される。二本鎖ポリヌクレオチドに対して漸進的にまたは前進的に作用するエキソヌクレアーゼを、印加電位のもとで残りの一本鎖を送り込むためにポアのシス側で使うことができ、または逆転電位のもとでトランス側で使うことができる。同様に、二本鎖 DNA を巻き戻すヘリカーゼも、同じように使うことができる。ポリメラーゼも使うことができる。シーケンシング用途のために印加電位に逆らって鎖移行を要する可能性もあるが、逆転電位のもとではまたは電位のない状態では DNA が酵素によって最初に「捕らえられる」はずである。その後、結合後に電位が切り替わると、鎖は、シスからトランスへとポアを通過し、伸長された高次構造で電流によって保持される。一本鎖 DNA エキソヌクレアーゼまたは一本鎖 DNA 依存性ポリメラーゼは、分子モー

40

50

ターとして作用して、ポアを通して移行されたばかりの一本鎖を印加電位に反発してトランスからシスへ、制御された段階的様式で引き戻すことができる。

【0402】

あらゆるヘリカーゼを方法において使用することができる。ヘリカーゼは、ポアに対して2つのモードで作用することができる。第一に、方法は、好ましくは、ヘリカーゼによってポリヌクレオチドが印加電圧の結果として生ずる場に伴ってポアを通して移動するように、ヘリカーゼを使用して行われる。このモードでは、ポリヌクレオチドの5'末端が先ずポア内に捕捉され、ヘリカーゼによってポリヌクレオチドは、最終的に膜のトランス側に移行するまで場に伴ってポアに通されるように、ポア内に移動する。あるいは、方法は、好ましくは、ヘリカーゼによってポリヌクレオチドが印加された電圧の結果として生ずる場に反発してポアを通して移動するように行われる。このモードでは、ポリヌクレオチドの3'末端が先ずポア内に捕捉され、ヘリカーゼによってポリヌクレオチドは、最終的に膜のシス側に押し戻されるまで印加された場に反発してポアから引き出されるように、ポアを通して移動する。

10

【0403】

方法は、反対方向で行われることもある。ポリヌクレオチドの3'末端が先ずポア内に捕捉されることがあり、ヘリカーゼによってポリヌクレオチドは、最終的に膜のトランス側に移行するまで場に伴ってポアを通されるようにポア内に移動することもある。

【0404】

ヘリカーゼに移動を助長するために必要な成分が備わっていない場合、またはヘリカーゼがその移動を妨げるもしくは防止するように修飾されている場合、ヘリカーゼはポリヌクレオチドに結合し、印加された場によってポリヌクレオチドがポアの中に引き入れられたときにポリヌクレオチドの移動を遅速させるブレーキとして作用することができる。この不活性モードでは、ポリヌクレオチドが3'から下って捕捉されるのか5'から下って捕捉されるのかは問題にならず、問題になるのは、酵素がブレーキとして作用してポリヌクレオチドをポア内のトランス側の方に引き入れる、印加される場である。不活性モードの場合のヘリカーゼによるポリヌクレオチドの移動制御は、漸減、スライドおよび制動はじめとする多数の方法で説明することができる。ヘリカーゼ活性を欠いているヘリカーゼバリエーションもこのようにして使用することができる。

20

【0405】

ポリヌクレオチドをポリヌクレオチド結合タンパク質およびポアといかなる順番で接触させてもよい。ポリヌクレオチドをヘリカーゼなどのポリヌクレオチド結合タンパク質およびポアと接触させる場合、ポリヌクレオチドは、先ず第一に、タンパク質と複合体を形成することが好ましい。ポアを介して電圧を印加すると、ポリヌクレオチド/タンパク質複合体はポアと複合体を形成し、ポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御する。

30

【0406】

ポリヌクレオチド結合タンパク質を使用する方法におけるあらゆるステップが、通常は、遊離ヌクレオチドまたは遊離ヌクレオチド類似体とポリヌクレオチド結合タンパク質の作用を助長する酵素補因子との存在下で行われる。遊離ヌクレオチドは、上で論じた個々のヌクレオチドのいずれかの1つまたは複数でありうる。遊離ヌクレオチドとしては、アデノシン一リン酸 (AMP)、アデノシン二リン酸 (ADP)、アデノシン三リン酸 (ATP)、グアノシン一リン酸 (GMP)、グアノシン二リン酸 (GDP)、グアノシン三リン酸 (GTP)、チミジン一リン酸 (TMP)、チミジン二リン酸 (TDP)、チミジン三リン酸 (TTP)、ウリジン一リン酸 (UMP)、ウリジン二リン酸 (UDP)、ウリジン三リン酸 (UTP)、シチジン一リン酸 (CMP)、シチジン二リン酸 (CDP)、シチジン三リン酸 (CTP)、環状アデノシン一リン酸 (cAMP)、環状グアノシン一リン酸 (cGMP)、デオキシアデノシン一リン酸 (dAMP)、デオキシアデノシン二リン酸 (dADP)、デオキシアデノシン三リン酸 (dATP)、デオキシグアノシン一リン酸 (dGMP)、デオキシグアノシン二リン酸 (dGDP)、デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP)、デオキシチミジン一リン酸 (dTMP)、デオキシチミジン二リ

40

50

ン酸 (d T D P)、デオキシチミジン三リン酸 (d T T P)、デオキシウリジン一リン酸 (d U M P)、デオキシウリジン二リン酸 (d U D P)、デオキシウリジン三リン酸 (d U T P)、デオキシシチジン一リン酸 (d C M P)、デオキシシチジン二リン酸 (d C D P) およびデオキシシチジン三リン酸 (d C T P) が挙げられるが、これらに限定されない。遊離ヌクレオチドは、好ましくは、A M P、T M P、G M P、C M P、U M P、d A M P、d T M P、d G M P または d C M P から選択される。遊離ヌクレオチドは、好ましくはアデノシン三リン酸 (A T P) である。酵素補因子は、構築物が機能することを可能にする因子である。酵素補因子は、好ましくは二価金属カチオンである。二価金属カチオンは、好ましくは、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} または Co^{2+} である。酵素補因子は、最も好ましくは Mg^{2+} である。

10

【0407】

ヘリカーゼおよび分子ブレーキ

好ましい実施形態では、方法は、

(a) 1 つまたは複数のヘリカーゼおよび 1 つまたは複数の分子ブレーキが結合されたポリヌクレオチドを用意するステップ、

(b) ポリヌクレオチドを C s g G ポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと接触させ、1 つまたは複数のヘリカーゼおよび分子ブレーキと一緒にされ、両方がポアに対する、例えばポアを通る、ポリヌクレオチドの移動を制御するように、ポアにわたって電位を印加するステップ、ならびに

(c) ポリヌクレオチドがポアに対して移動しているときに 1 回または複数回測定を行い、測定がポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特徴を示し、それによってポリヌクレオチドを特徴づけるステップを含む。

20

【0408】

このタイプの方法は、国際出願第 P C T / G B 2 0 1 4 / 0 5 2 7 3 7 号パンフレットにおいて詳細に論じられている。

【0409】

1 つまたは複数のヘリカーゼは、上で論じたもののいずれかであってもよい。1 つまたは複数の分子ブレーキは、ポリヌクレオチドと結合してそのポリヌクレオチドのポアを通る移動を遅速させる、あらゆる化合物または分子であることができる。1 つまたは複数の分子ブレーキは、ポリヌクレオチドと結合する 1 つまたは複数の化合物を好ましくは含む。1 つまたは複数の化合物は、好ましくは、1 つまたは複数の大環状分子である。好適な大環状分子としては、シクロデキストリン、カリックスアレーン、環状ペプチド、クラウンエーテル、ククルピツリル、ピラーアレーン、これらの誘導体またはそれら組合せが挙げられるが、それらに限定されない。シクロデキストリンまたはその誘導体は、Eliseev, A. V., and Schneider, H.-J. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 6081-6088 に開示されているもののいずれかであってもよい。この作用物質は、より好ましくは、ヘプタキス - 6 - アミノ - シクロデキストリン (a m ₇ - C D)、6 - モノデオキシ - 6 - モノアミノ - シクロデキストリン (a m ₁ - C D) またはヘプタキス - (6 - デオキシ - 6 - グアニジノ) - シクロデキストリン (g u ₇ - C D) である。

30

40

【0410】

1 つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、1 つまたは複数の一本鎖結合タンパク質 (S S B) である。1 つまたは複数の分子ブレーキは、正味負電荷を有さないカルボキシ末端 (C 末端) 領域を含む一本鎖結合タンパク質 (S S B)、または (i i) その C 末端領域にその C 末端領域の正味負電荷を減少させる 1 つもしくは複数の修飾を含む修飾 S S B である。1 つまたは複数の分子ブレーキは、最も好ましくは、国際出願第 P C T / G B 2 0 1 3 / 0 5 1 9 2 4 号明細書 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 2 5 9 号パンフレットとして公開) に開示されている S S B の 1 つである。

【0411】

1 つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、1 つまたは複数のポリヌクレオチド結

50

合タンパク質である。ポリヌクレオチド結合タンパク質は、ポリヌクレオチドと結合することおよびポアを通るその移動を制御することができる、あらゆるタンパク質であることができる。当技術分野ではタンパク質がポリヌクレオチドと結合するか否かを判定することは容易である。タンパク質は、通常は、ポリヌクレオチドと相互作用し、ポリヌクレオチドの少なくとも1つの特性を修飾する。タンパク質は、ポリヌクレオチドを切断して個々のヌクレオチドまたはより短いヌクレオチド鎖、例えばジもしくはトリヌクレオチド、にすることによって、ポリヌクレオチドを修飾することがある。その部分は、ポリヌクレオチドを特定の位置に配向または移動させること、すなわち、その移動を制御することによって修飾することもある。

【0412】

10

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、好ましくは、ポリヌクレオチドハンドリング酵素に由来する。1つまたは複数の分子ブレーキは、上で論じたポリヌクレオチドハンドリング酵素のいずれかに由来するものであってもよい。分子ブレーキとして作用するPhi29ポリメラーゼ(配列番号396)の修飾バージョンは、米国特許第5,576,204号明細書に開示されている。1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくはヘリカーゼに由来する。

【0413】

ヘリカーゼに由来するあらゆる数の分子ブレーキを使用することができる。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のヘリカーゼが、分子ブレーキとして使用されることがある。2つ以上のヘリカーゼが分子ブレーキとして使用される場合、その2つ以上のヘリカーゼは、通常は同じヘリカーゼである。2つ以上のヘリカーゼは、異なるヘリカーゼであることもある。

20

【0414】

2つ以上のヘリカーゼは、上で言及したヘリカーゼのいかなる組合せであってもよい。2つ以上のヘリカーゼは、2つ以上のDdaヘリカーゼであることがある。2つ以上のヘリカーゼは、1つまたは複数のDdaヘリカーゼと1つまたは複数のTwrCヘリカーゼであることもある。2つ以上のヘリカーゼは、同じヘリカーゼの異なるバリエーションであることもある。

【0415】

2つ以上のヘリカーゼは、好ましくは、互いに結合される。2つ以上のヘリカーゼは、より好ましくは、互いに共有結合される。いかなる順序で、いかなる方法を使用して、ヘリカーゼを結合させてもよい。ヘリカーゼに由来する1つまたは複数の分子ブレーキは、少なくとも1つの配座状態でポリヌクレオチドがヘリカーゼから解離することができるポリヌクレオチド結合ドメイン内の開口のサイズを低減させるように、好ましくは修飾される。これは、国際公開第2014/013260号パンフレットに開示されている。

30

【0416】

本発明での使用に好ましいヘリカーゼ構築物は、国際出願第PCT/GB2013/051925号明細書(国際公開第2014/013260号パンフレットとして公開)、同第PCT/GB2013/051924号明細書(国際公開第2014/013259号パンフレットとして公開)、同第PCT/GB2013/051928号明細書(国際公開第2014/013262号パンフレットとして公開)および同第PCT/GB2014/052736号明細書に記載されている。

40

【0417】

1つまたは複数のヘリカーゼが活性モードで使用される場合(すなわち、1つまたは複数のヘリカーゼに移動を助長するためのすべての必要成分、例えばATPおよびMg²⁺が備わっているとき)、1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、(a)不活性モードで使用される(すなわち、移動を助長するための必要成分の不在下で使用される、もしくは能動移動ができない)、(b)その1つもしくは複数の分子ブレーキが1つもしくは複数のヘリカーゼとは反対方向に移動する活性モードで使用される、または(c)その1つもしくは複数の分子ブレーキが1つもしくは複数のヘリカーゼと同じ方向に、1つも

50

しくは複数のヘリカーゼより遅く移動する活性モードで使用される。

【0418】

1つまたは複数のヘリカーゼが不活性モードで使用される場合（すなわち、1つまたは複数のヘリカーゼに移動を助長するためのすべての必要成分、例えばATPおよび Mg^{2+} が備わっていないとき、もしくは能動移動ができない）、1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、（a）不活性モードで使用される（すなわち、移動を助長するための必要成分の不在下で使用される、もしくは能動移動ができない）、または（b）その1つもしくは複数の分子ブレーキがポリヌクレオチドに沿って、ポリヌクレオチドと同じ方向にポアを通して移動する、活性モードで使用される。

【0419】

1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数の分子ブレーキを、ポリヌクレオチドのいかなる位置に結合させてもよく、その結果、それらは一緒になり、両方がポリヌクレオチドのポアを通る移動を制御する。1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数の分子ブレーキは、少なくとも1ヌクレオチド離れており、例えば、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも5000、少なくとも10,000、少なくとも50,000、少なくとも100,000ヌクレオチド以上離れている。方法が、一方の末端にYアダプターおよび他方の末端にヘアピンループアダプターが備わっている二本鎖ポリヌクレオチドの特徴づけに関する場合、好ましくはYアダプターに1つまたは複数のヘリカーゼが結合され、好ましくはヘアピンループアダプターに1つまたは複数の分子ブレーキが結合される。この実施形態では、1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、ポリヌクレオチドに結合するがヘリカーゼとして機能しないように修飾されている1つまたは複数のヘリカーゼである。Yアダプターに結合された1つまたは複数のヘリカーゼは、好ましくは、下でより詳細に論じるようにスパーサーで停止される。ヘアピンループアダプターに結合された1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくはスパーサーで停止されない。1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、1つまたは複数のヘリカーゼがヘアピンループに達したとき一緒になる。1つまたは複数のヘリカーゼは、Yアダプターをポリヌクレオチドに結合させる前にYアダプターに結合させてもよく、またはYアダプターをポリヌクレオチドに結合させた後にYアダプターに結合させてもよい。1つまたは複数の分子ブレーキは、ヘアピンループアダプターをポリヌクレオチドに結合させる前にヘアピンループアダプターに結合させてもよく、またはヘアピンループアダプターをポリヌクレオチドに結合させた後にヘアピンループアダプターに結合させてもよい。

【0420】

1つまたは複数のヘリカーゼと1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、互いに結合されない。1つまたは複数のヘリカーゼと1つまたは複数の分子ブレーキは、より好ましくは、互いに共有結合されない。1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数の分子ブレーキは、好ましくは、国際出願第PCT/GB2013/051925号明細書（国際公開第2014/013260号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2013/051924号明細書（国際公開第2014/013259号パンフレットとして公開）、同第PCT/GB2013/051928号明細書（国際公開第2014/013262号パンフレットとして公開）および同第PCT/GB2014/052736号明細書に記載されているように結合されない。

【0421】

スパーサー

1つまたは複数のヘリカーゼを、国際出願第PCT/GB2014/050175号パンフレットにおいて論じられているように1つまたは複数のスパーサーで停止させてもよい。国際出願に開示されている1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数のスパーサーのいずれの立体配置を本発明において使用してもよい。

【0422】

ポリヌクレオチドの一部がポアに侵入し、印加された電位の結果として生じる場に沿っ

10

20

30

40

50

てポアを通して移動する場合、1つまたは複数のヘリカーゼは、ポリヌクレオチドがポアを通して移動するとそのポアによってスパーサーを超えて移動する。これは、(1つまたは複数のスパーサーを含む)ポリヌクレオチドがポアを通して移動し、1つまたは複数のヘリカーゼがそのポアの上部に残存するためである。

【0423】

1つまたは複数のスパーサーは、好ましくはポリヌクレオチドの一部であり、例えば、スパーサーはポリヌクレオチド配列に割り込んでいる。1つまたは複数のスパーサーは、好ましくは、ポリヌクレオチドにハイブリダイズされた1つまたは複数の遮断分子、例えばスピードバンプ、の一部ではない。

【0424】

ポリヌクレオチド内にあらゆる数のスパーサーがあることがあり、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のスパーサーがあることがある。好ましくは、ポリヌクレオチド内に2つ、4つまたは6つのスパーサーがある。ポリヌクレオチドの異なる領域内に1つまたは複数のスパーサーがあることもあり、例えば、Yアダプターおよび/またはヘアピンループアダプター内に1つまたは複数のスパーサーがあることもある。

【0425】

1つまたは複数のスパーサーは、1つまたは複数のヘリカーゼが活性モードであっても克服することができないエネルギー障壁を、各々がもたらす。1つまたは複数のスパーサーは、(例えばポリヌクレオチド中のヌクレオチドから塩基を除去することにより)ヘリカーゼの牽引力を低減させることによって、または(例えば嵩高い化学基を使用して)1つもしくは複数のヘリカーゼの移動を物理的に遮断することによって、1つまたは複数のヘリカーゼを停止させることができる。

【0426】

1つまたは複数のスパーサーは、1つまたは複数のヘリカーゼを停止させるあらゆる分子または分子の組合せを含むことができる。1つまたは複数のスパーサーは、1つまたは複数のヘリカーゼがポリヌクレオチドに沿って移動しないように防止する、あらゆる分子または分子の組合せを含むことができる。1つまたは複数のヘリカーゼが、膜貫通ポアおよび印加電位の不在下で1つまたは複数のスパーサーで停止されるか否かを判定することは容易である。例えば、スパーサーを超えて移動し、DNAの相補鎖を置換するヘリカーゼの能力を、PAGEによって測定することができる。

【0427】

1つまたは複数のスパーサーは、通常は、ポリマーなどの直鎖状分子を含む。1つまたは複数のスパーサーは、通常は、ポリヌクレオチドとは異なる構造を有する。例えば、ポリヌクレオチドがDNAである場合、1つまたは複数のスパーサーは通常はDNAではない。詳細には、ポリヌクレオチドが、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)である場合、1つまたは複数のスパーサーは、好ましくは、ペプチド核酸(PNA)、グリセロール核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、ロックド核酸(LNA)、またはヌクレオチド側鎖を有する合成ポリマーを含む。1つまたは複数のスパーサーは、1つまたは複数のヌクレオチドをポリヌクレオチドと反対方向で含むことがある。例えば、ポリヌクレオチドが5'から3'への方向である場合、1つまたは複数のスパーサーは、1つまたは複数のヌクレオチドを3'から5'への方向で含むことがある。ヌクレオチドは、上で論じたもののいずれかであってもよい。

【0428】

1つまたは複数のスパーサーは、1つもしくは複数のニトロインドール、例えば1つもしくは複数の5-ニトロインドール、1つもしくは複数のイノシン、1つもしくは複数のアクリジン、1つもしくは複数の2-アミノプリン、1つもしくは複数の2,6-ジアミノプリン、1つもしくは複数の5-プロモ-デオキシウリジン、1つもしくは複数の逆位チミジン(逆位dT)、1つもしくは複数の逆位ジデオキシチミジン(ddT)、1つもしくは複数のジデオキシシチジン(ddC)、1つもしくは複数の5-メチルシチジン、1つもしくは複数の5-ヒドロキシメチルシチジン、1つもしくは複数の2'-O-メチル

10

20

30

40

50

RNA塩基、1つもしくは複数のイソデオキシシチジン（イソdC）、1つもしくは複数のイソデオキシグアノシン（イソdG）、1つもしくは複数のiSpC3基（すなわち、糖および塩基を欠いているヌクレオチド）、1つもしくは複数の光切断性（PC）基、1つもしくは複数のヘキサンジオール基、1つもしくは複数のスペーサー9（iSp9）基、1つもしくは複数のスペーサー18（iSp18）基、ポリマーまたは1つもしくは複数のチオール結合を好ましくは含む。1つまたは複数のスペーサーは、これらの基のあらゆる組合せを含むことがある。これらの基の多くは、IDT（登録商標）（Integrated DNA Technologies（登録商標））から市販されている。

【0429】

1つまたは複数のスペーサーは、あらゆる数のこれらの基を含有することがある。例えば、2 - アミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、5 - プロモ - デオキシウリジン、逆位dT、ddT、ddC、5 - メチルシチジン、5 - ヒドロキシメチルシチジン、2' - O - メチルRNA塩基、イソdC、イソdG、iSpC3基、PC基、ヘキサンジオール基およびチオール結合については、1つまたは複数のスペーサーは、好ましくは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上含む。1つまたは複数のスペーサーは、好ましくは、2、3、4、5、6、7、8以上のiSp9基を含む。1つまたは複数のスペーサーは、好ましくは、2、3、4、5または6以上のiSp18基を含む。最も好ましいスペーサーは、4つのiSp18基である。

【0430】

ポリマーは、好ましくは、ポリペプチドまたはポリエチレングリコール（PEG）である。ポリペプチドは、好ましくは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上のアミノ酸を含む。PEGは、好ましくは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上のモノマーユニットを含む。

【0431】

1つまたは複数のスペーサーは、好ましくは、1つまたは複数の脱塩基ヌクレオチド（すなわち、核酸塩基を欠いているヌクレオチド）、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上の脱塩基ヌクレオチドを含む。核酸塩基は、脱塩基ヌクレオチドでは、-H（idSp）または-OHによって置換されていることがある。1つまたは複数の隣接ヌクレオチドから核酸塩基を除去することによって、脱塩基スペーサーをポリヌクレオチドに挿入することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、3 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、1, N6 - エテノアデニンイノシンまたはヒポキサンチンを含むように修飾されることがあり、核酸塩基は、ヒトアルキルアデニンDNAグリコシラーゼ（hAAG）を使用してこれらのヌクレオチドから除去されることがある。あるいは、ポリヌクレオチドは、ウラシルを含むように修飾されることがあり、核酸塩基は、ウラシル - DNAグリコシラーゼ（UDG）で除去されることもある。一実施形態では、1つまたは複数のスペーサーは、いかなる脱塩基ヌクレオチドも含まない。

【0432】

1つまたは複数のヘリカーゼは、各々の直鎖状分子スペーサーによって（すなわちそれらの前で）停止されることもあり、または各々の直鎖状分子スペーサーで停止されることもある。直鎖状分子スペーサーが使用される場合、ポリヌクレオチドには、1つまたは複数のヘリカーゼが超えて移動することになる各スペーサーの末端に隣接してポリヌクレオチドの二本鎖領域が好ましくは備えられている。この二本鎖領域は、通常は、隣接スペーサーで1つまたは複数のヘリカーゼを停止させるのに役立つ。二本鎖領域の存在は、方法が約100mM以下の塩濃度で行われる場合、特に好ましい。各二本鎖領域は、通常は、長さ少なくとも10、例えば少なくとも12ヌクレオチドである。本発明において使用されるポリヌクレオチドが一本鎖状である場合、二本鎖領域は、より短いポリヌクレオチドをスペーサーに隣接する領域にハイブリダイズすることによって形成することができる。このより短いポリヌクレオチドは、通常は、ポリヌクレオチドと同じヌクレオチドから形成されるが、異なるヌクレオチドから形成されることもある。例えば、より短いポリヌクレオチドは、LNAから形成されることがある。

【 0 4 3 3 】

直鎖状分子スパーサーが使用される場合、ポリヌクレオチドには、好ましくは、1つまたは複数のヘリカーゼが超えて移動することになる末端とは反対側の各スパーサーの末端に遮断分子が備えられている。この遮断分子は、1つまたは複数のヘリカーゼが各スパーサーで停止した状態を確実に維持するのに役立つことができる。その遮断分子は、1つまたは複数のヘリカーゼを、該ヘリカーゼが溶液に拡散する場合、ポリヌクレオチド上に保持するのに役立つことができる。遮断分子は、1つまたは複数のヘリカーゼを物理的に停止させる、下で論じる化学基のいずれかであることができる。遮断分子は、ポリヌクレオチドの二本鎖領域であることもある。

【 0 4 3 4 】

1つまたは複数のスパーサーは、1つまたは複数のヘリカーゼを物理的に停止させる1つまたは複数の化学基を好ましくは含む。1つまたは複数の化学基は、好ましくは、1つまたは複数のペンダント化学基である。1つまたは複数の化学基は、ポリヌクレオチド中の1つまたは複数の核酸塩基に結合されていることもある。1つまたは複数の化学基は、ポリヌクレオチド主鎖に結合されていることもある。2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上などのあらゆる数の化学基が存在することがある。好適な基としては、フルオロフォア、ストレプトアビジンおよび/またはビオチン、コレステロール、メチレンブルー、ジニトロフェノール(DNP)、ジゴキシゲニンおよび/または抗ジゴキシゲニンならびにジベンジルシクロオクチン基が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 4 3 5 】

ポリヌクレオチド中の異なるスパーサーは、異なる停止分子を含むことがある。例えば、あるスパーサーは、上で論じた直鎖状分子の1つを含むことがあり、別のスパーサーは、1つまたは複数のヘリカーゼを物理的に停止させる1つまたは複数の化学基を含むことがある。スパーサーは、上で論じた直鎖状分子のいずれか、ならびに1つまたは複数のヘリカーゼを物理的に停止させる1つまたは複数の化学基、例えば1つ以上の脱塩基およびフルオロフォアを含むことがある。

【 0 4 3 6 】

ポリヌクレオチドのタイプおよび本発明の方法が行われる条件に依存して、好適なスパーサーを設計することができる。大部分のヘリカーゼは、DNAに結合し、DNAに沿って移動するため、DNAではない何かを使用してそれらを停止させることができる。好適な分子は、上で論じている。

【 0 4 3 7 】

本発明の方法は、好ましくは、遊離ヌクレオチドの存在下、および/またはヘリカーゼ補因子の存在下で行われる。このことは、下でより詳細に論じる。膜貫通ポアおよび印加電位の不在下では、1つまたは複数のスパーサーは、好ましくは、遊離ヌクレオチドの存在下および/またはヘリカーゼ補因子の存在下で1つまたは複数のヘリカーゼを停止させることができる。

【 0 4 3 8 】

本発明の方法が、遊離ヌクレオチドおよび(1つまたは複数のヘリカーゼが活性モードであるように)下で論じるようなヘリカーゼ補因子の存在下で行われる場合、通常は、1つまたは複数のより長いスパーサーを使用して、1つまたは複数のヘリカーゼをポリヌクレオチド上で確実に停止させた後、それらを膜貫通ポアと接触させ、電位を印加する。遊離ヌクレオチドおよび(1つまたは複数のヘリカーゼが不活性モードであるように)ヘリカーゼの不在下では、1つまたは複数のより短いスパーサーを使用することができる。

【 0 4 3 9 】

塩濃度も、1つまたは複数のヘリカーゼを停止させる1つまたは複数のスパーサーの能力に影響を及ぼす。膜貫通ポアおよび印加電位の不在下では、1つまたは複数のスパーサーは、好ましくは、約100mM以下の塩濃度で1つまたは複数のヘリカーゼを停止させることができる。本発明の方法で使用される塩濃度が高いほど、概して使用される1つまたは複数のスパーサーは短く、逆もまた同様である。

10

20

30

40

50

【 0 4 4 0 】

特徴の好ましい組合せを下の表 3 に示す。

【 0 4 4 1 】

【表 3】

ポリヌクレオチド	スペーサー組成物*	スペーサー長(すなわち*の数)	塩[]	遊離ヌクレオチド?	ヘリカーゼ補因子?
DNA	iSpC3	4	1M	有り	有り
DNA	iSp18	4	100-1000mM	有り	有り
DNA	iSp18	6	<100-1000mM	有り	有り
DNA	iSp18	2	1M	有り	有り
DNA	iSpC3	12	<100-1000mM	有り	有り
DNA	iSpC3	20	<100-1000mM	有り	有り
DNA	iSp9	6	100-1000mM	有り	有り
DNA	idSp	4	1M	有り	有り

表 3

【 0 4 4 2 】

方法は、2 つ以上のヘリカーゼをスペーサーを超えて移動させることに関することもある。そのような場合、スペーサーの長さを通常は増加させて、ポアおよび印加電位の不在下で後従ヘリカーゼがスペーサーを超えて先導ヘリカーゼを押さないようにする。方法が、1 つまたは複数のスペーサーを超えて 2 つ以上のヘリカーゼを移動させることに関する場合、上で論じたスペーサー長は、少なくとも 1 . 5 倍、例えば 2 倍、2 . 5 倍または 3 倍増加されることがある。例えば、方法が、1 つまたは複数のスペーサーを超えて 2 つ以上のヘリカーゼを移動させることに関する場合、上の表 3 の第 3 列におけるスペーサー長は、1 . 5 倍、2 倍、2 . 5 倍または 3 倍増加されることがある。

【 0 4 4 3 】

膜

本発明のポアは、膜内に存在することがある。本発明の方法では、ポリヌクレオチドを膜内の C s g G ポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと通常は接触させる。あらゆる膜を本発明に従って使用することができる。好適な膜は、当技術分野において周知である。膜は、好ましくは両親媒性層である。両親媒性層は、親水性部分と親油性部分両方を有する両親媒性分子、例えばリン脂質、から形成される層である。両親媒性分子は、合成のものであることもあり、または天然に存在することもある。天然に存在しない両親媒性物質、および単層を形成する両親媒性物質は、当技術分野において周知であり、例えば、ブロックコポリマーを含む (Gonzalez-Perez et al., Langmuir, 2009, 25, 10447-10450)。ブロックコポリマーは、2 つ以上のモノマーサブユニットが互いに重合して単一ポリマー鎖を生成する高分子材料である。ブロックコポリマーは、通常は、各モノマーサブユニットが一因となる特性を有する。しかし、ブロックコポリマーは、個々のサブユニットから形成されたポリマーが有さない固有の特性を有することもある。ブロックコポリマーは、モノマーサブユニットの 1 つが疎水性 (すなわち親油性) であるが他のサブユニットは水性媒体中にあるとき親水性であるように、工学的に操作することができる。この場合、ブロックコポリマーは、両親媒特性を有することおよび生体膜を模倣する構造を形成することができる。ブロックコポリマーは、(2 つのモノマーサブユニットからなる) ジブロックであることがあるが、両親媒性物質として挙動する、より複雑な配置を形成するように、2 つより多くのモノマーサブユニットから構築されることもある。コポリマーは、トリブロック、テトラブロックまたはペンタブロックコポリマーであることがある。膜は、好ましくは、トリブロックコポリマー膜である。

【 0 4 4 4 】

古細菌双極性テトラエーテル脂質は、脂質が単層膜を形成するように構築される、天然に存在する脂質である。これらの脂質は、厳しい生物環境で生き残る好極限性細菌、好熱菌、好塩菌および好酸菌において一般に見出される。それらの安定性は、最終二重層の融合された性質に由来すると考えられている。親水性 - 疎水性 - 親水性の一般モチーフを有するトリブロックポリマーを生成することによってこれらの生物学的エンティティを模倣するブロックコポリマー材料を構築することは容易である。この材料は、脂質二重層と同様に挙動し、かつ小胞から層状の膜までの範囲の相挙動を包含する、モノマー膜を形成することができる。これらのトリブロックコポリマーから形成される膜は、生体脂質膜に勝るいくつかの利点を保持する。トリブロックコポリマーを合成するので、まさにその構築を注意深く制御して、膜を形成するためにならびにポアおよび他のタンパク質と相互作用するために必要な正確な鎖長および特性を得ることができる。

10

【0445】

ブロックコポリマーは、脂質複素材として分類されないサブユニットから構築されることもある。例えば、疎水性ポリマーは、シロキサンまたは他の非炭化水素系モノマーから製造されることもある。ブロックコポリマーの親水性小部分は、低いタンパク質結合特性を有することもでき、この低いタンパク質結合特性によって、未加工の生体試料に曝露されたときに高度に耐性である膜の生成が可能になる。このヘッド基ユニットは、非古典的脂質ヘッド基に由来することもある。

【0446】

トリブロックコポリマー膜は、生体脂質膜と比較して増加された機械的および環境安定性、例えば、より高い動作温度またはpH範囲も有する。ブロックコポリマーの合成性は、ポリマーに基づく膜を広範な用途に合わせてカスタマイズするためのプラットフォームをもたらす。

20

【0447】

膜は、最も好ましくは、国際出願第PCT/GB2013/052766号または同第PCT/GB2013/052767号パンフレットに開示されている膜の1つである。

【0448】

両親媒性分子は、ポリヌクレオチドのカップリングを助長するように化学的に修飾されるまたは官能化されることがある。

【0449】

両親媒性層は、単層であることもあり、または二重層であることもある。両親媒性層は、通常は平面状である。両親媒性層は、湾曲していることもある。両親媒性層は、支持されていることもある。

30

【0450】

両親媒性膜は、通常は自然移動性であり、本質的に二次元流体としておよそ $10^8 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ の脂質拡散速度で作用する。これは、ポアおよびカップリングされたポリヌクレオチドが通常は両親媒性膜内で移動することができることを意味する。

【0451】

膜は、脂質二重層であることがある。脂質二重層は、細胞膜のモデルであり、ある範囲の実験研究用の優れたプラットフォームとして役立つ。例えば、脂質二重層を単一チャネル記録による膜タンパク質の*in vitro*研究に使用することができる。あるいは、脂質二重層をバイオセンサーとして使用して、ある範囲の物質の存在を検出することができる。脂質二重層は、あらゆる脂質二重層であることができる。好適な脂質二重層としては、平面状脂質二重層、支持二重層またはリボソームが挙げられるが、これらに限定されない。脂質二重層は、好ましくは平面状脂質二重層である。好適な脂質二重層は、国際出願第PCT/GB08/000563号明細書（国際公開2008/102121号パンフレットとして公開）、国際出願第PCT/GB08/004127号明細書（国際公開第2009/077734号パンフレットとして公開）および国際出願第PCT/GB2006/001057号明細書（国際公開第2006/100484号パンフレットとして公開）に開示されている。

40

50

【 0 4 5 2 】

脂質二重層を形成する方法は、当技術分野において公知である。脂質二重層は、脂質単層が水溶液 / 空気界面に、その界面に対して垂直である開口部の両側を超えて担持される、モンタル (Montal) およびミュラー (Mueller) の方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1972; 69: 3561-3566) によって、一般に形成される。通常、脂質を電解質水溶液の表面に、先ず脂質を有機溶媒に溶解し、次いで溶媒の液滴を開口部の両側の水性溶液の表面で蒸発させることによって、加える。有機溶媒を蒸発させたら、二重層が形成されるまで、開口部の両側の溶液 / 空気界面を開口部を超えて物理的に上下に移動させる。平面状脂質二重層は、膜の開口部を横断して形成されることもあり、または開口を横断して凹所の中に形成されることもある。

10

【 0 4 5 3 】

モンタルおよびミュラーの方法は、タンパク質ポア挿入に適している良質脂質二重層を形成する対費用効果の高い比較的容易な方法であるため、評判がよい。他の一般的な二重層形成方法としては、先端部浸漬、二重層の塗装、および脂質二重層のパッチクランプが挙げられる。

【 0 4 5 4 】

先端部浸漬二重層形成は、脂質の単層を担持している試験溶液の表面に開口部表面 (例えばピペット先端部) を触れさせることを必要とする。この場合もやはり、有機溶媒に溶解された脂質の液滴を溶液表面で蒸発させることによって先ず脂質単層が溶液 / 空気界面で生成される。次いで、二重層がラングミュア (Langumur) ・シェーファー (Schaefer) 法によって形成され、溶液表面に対して開口部を移動させる機械的自動化を必要とする。

20

【 0 4 5 5 】

塗装される二重層については、有機溶媒に溶解された脂質の液滴が開口部に直接塗布され、その開口部が試験水溶液に沈められる。脂質溶液は、塗装用刷毛または同等物を使用して開口部全面に薄く塗られる。溶媒が薄くなることで、脂質二重層が形成される結果となる。しかし、二重層からの溶媒の完全除去は困難であり、したがって、この方法によって形成される二重層は、安定性がより低く、電気化学的測定中にノイズをより生じやすい。

【 0 4 5 6 】

パッチクランプは、生体細胞膜の研究に一般に使用される。細胞膜が吸引によってピペットの末端部にクランプされ、膜のパッチがその開口部全体に付着される。この方法は、リポソームをクランプする (その後、リポソームが破裂してピペットの開口部全面を封止する脂質二重層を残す) ことによる脂質二重層の生成に適している。この方法は、安定した巨大な単層状のリポソームと、ガラス表面を有する材料への小開口部の作製とを必要とする。

30

【 0 4 5 7 】

リポソームは、超音波処理、抽出またはモザファリ (Mozafari) 法 (Colas et al., (2007) Micron 38:841-847) によって形成することができる。

【 0 4 5 8 】

好ましい実施形態において、脂質二重層は、国際出願第 P C T / G B 0 8 / 0 0 4 1 2 7 号明細書 (国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 7 7 3 4 号パンフレットとして公開) に記載されているように形成される。有利には、この方法では脂質二重層が乾燥脂質から形成される。最も好ましい実施形態では、脂質二重層は、国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 7 7 3 4 号パンフレット (P C T / G B 0 8 / 0 0 4 1 2 7) に記載されているように開口を横断して形成される。

40

【 0 4 5 9 】

脂質二重層は、2つの対向する脂質層から形成される。2つの脂質層は、それらの疎水性テール基が互いに向き合って疎水性の内部を形成するように配置される。脂質の親水性ヘッド基は、その二重層の両側の水性環境に向かって外側に向いている。二重層は、これらに限定されるものではないが脂質無秩序相 (流体層状)、液体無秩序相、固体無秩序相 (層状ゲル相、インターデジティテッドゲル相) および平面状二重層結晶 (層状サブゲル

50

相、層状結晶相)を含む、多数の脂質相に存在することがある。

【0460】

脂質二重層を形成するあらゆる脂質組成物を使用することができる。脂質組成物は、必要な特性、例えば、表面電荷、膜タンパク質を支持する能力、充填密度または機械的特性を有する脂質二重層が形成されるように選択される。脂質組成物は、1つまたは複数の異なる脂質を含むことができる。例えば、脂質組成物は、100以下の脂質を含有することができる。脂質組成物は、好ましくは、1～10の脂質を含有する。脂質組成物は、天然に存在する脂質および/または人工脂質を含むことがある。

【0461】

脂質は、通常は、ヘッド基と、界面部分と、同じであってもまたは異なってもよい2つの疎水性テール基とを含む。好適なヘッド基としては、中性ヘッド基、例えばジアシルグリセリド(DG)およびセラミド(CM)、双性イオン性ヘッド基、例えばホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)およびスフィンゴリエリン(SM)、負電荷を有するヘッド基、例えばホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、リン酸(PA)およびカルジオリピン(CA)、ならびに正電荷を有するヘッド基、例えばトリメチルアンモニウム-プロパン(TAP)が挙げられるが、これらに限定されない。好適な界面部分としては、天然に存在する界面部分、例えば、グリセロール系またはセラミド系部分が挙げられるが、これらに限定されない。好適な疎水性テール基としては、飽和炭化水素鎖、例えばラウリン酸(n-ドデカン酸)、ミリスチン酸(n-テトラデカン酸)、パルミチン酸(n-ヘキサデカン酸)、ステアリン酸(n-オクタデカン酸)およびアラキドン酸(n-エイコサン酸)、不飽和炭化水素鎖、例えばオレイン酸(シス-9-オクタデカン酸)、ならびに分岐炭化水素鎖、例えばフィタノイルが挙げられるが、これらに限定されない。不飽和炭化水素鎖の鎖長ならびに不飽和炭化水素鎖中の二重結合の位置および数は、様々でありうる。分岐炭化水素鎖の鎖長ならびに分岐炭化水素鎖中のメチル基などの分枝の位置および数は、様々でありうる。疎水性テール基を界面部分にエーテルまたはエステルとして連結することができる。脂質は、ミコール酸であってもよい。

【0462】

脂質を化学的に修飾することもできる。脂質のヘッド基またはテール基は、化学的に修飾されることがある。ヘッド基が化学的に修飾されている好適な脂質としては、PEG修飾脂質、例えば1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]、官能化PEG脂質、例えば1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[ビオチニル(ポリエチレングリコール)2000]、ならびに結合用に修飾された脂質、例えば1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(スクシニル)および1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(ビオチニル)が挙げられるが、これらに限定されない。テール基が化学的に修飾されている好適な脂質としては、重合性脂質、例えば1,2-ビス(10,12-トリコサジノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、フッ素化脂質、例えば1-パルミトイル-2-(16-フルオロパルミトイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、変性脂質、例えば1,2-ジパルミトイル-D62-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、ならびにエーテル連結脂質、例えば1,2-ジ-O-フィタニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンが挙げられるが、これらに限定されない。脂質は、ポリヌクレオチドのカップリングを助長するように化学的に修飾されるまたは官能化されることもある。

【0463】

両親媒性層、例えば脂質組成物は、通常は、層の特性に影響を及ぼす1つまたは複数の添加剤を含む。好適な添加剤としては、脂肪酸、例えばパルミチン酸、ミリスチン酸およびオレイン酸、脂肪アルコール、例えばパルミチン酸アルコール、ミリスチン酸アルコールおよびオレイン酸アルコール、ステロール、例えばコレステロール、エルゴステロール、ラノステロール、シトステロールおよびスチグマステロール、リゾリン脂質、例えば1

10

20

30

40

50

- アシル - 2 - ヒドロキシ - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、ならびにセラミドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0464】

別の好ましい実施形態では、膜は固体層を含む。固体層は、これらに限定されるものではないがマイクロエレクトロニクス材料、絶縁材料、例えば Si_3N_4 、 Al_2O_3 および SiO_2 、有機および無機ポリマー、例えば、ポリアミド、プラスチック、例えばテフロン（登録商標）またはエラストマー、例えば二成分付加硬化シリコーンゴム、およびガラスを含む、有機材料と無機材料両方から形成することができる。固体層は、グラフェンから形成されることもある。好適なグラフェン層は、国際出願第PCT/US2008/010637号明細書（国際公開第2009/035647号パンフレットとして公開）に開示されている。膜が固体層を含む場合、ポアは、通常は、固体層の中に、例えば、固体層の穴、壁、間隙、チャネル、トレンチ、細隙の中に含まれている両親媒性膜または層中に存在する。当業者は、好適な固体/両親媒性ハイブリッド系を調製することができる。好適な系は、国際公開第2009/020682号パンフレットおよび国際公開第2012/005857号パンフレットに開示されている。上で論じた両親媒性膜または層のいずれかを使用することができる。

10

【0465】

方法は、通常は、(i)ポアを含む人工両親媒性層、(ii)ポアを含む単離された自然に存在する脂質二重層、または(iii)中にポアが挿入された細胞を使用して行われる。方法は、通常は、人工トリブロックコポリマー層などの人工両親媒性層を使用して行われる。層は、他の膜貫通および/または膜内タンパク質ならびに他の分子をポアに加えて含むことがある。好適な装置および条件は、下で論じる。本発明の方法は、通常は*in vivo*で行われる。

20

【0466】

カップリング

ポリヌクレオチドは、好ましくは、ポアを含む膜とカップリングされる。方法は、ポアを含む膜とポリヌクレオチドをカップリングするステップを含むことがある。ポリヌクレオチドは、好ましくは、1つまたは複数のアンカーを使用して膜とカップリングされる。いかなる公知の方法を使用してポリヌクレオチドを膜とカップリングしてもよい。

【0467】

各アンカーは、ポリヌクレオチドとカップリング（結合）する基、および膜とカップリング（結合）する基を含む。各アンカーは、ポリヌクレオチドおよび/または膜と共有結合でカップリング（結合）することができる。Yアダプターおよび/またはヘパリンループアダプターが使用される場合、ポリヌクレオチドは、好ましくは、アダプターを使用して膜とカップリングされる。

30

【0468】

あらゆる数のアンカー、例えば、2、3、4以上のアンカーを使用して、ポリヌクレオチドを膜とカップリングすることができる。例えば、各々がポリヌクレオチドと膜の両方と別々にカップリング（結合）する2つのアンカーを使用して、ポリヌクレオチドを膜にカップリングしてもよい。

40

【0469】

1つまたは複数のアンカーは、1つもしくは複数のヘリカーゼおよび/または1つもしくは複数の分子ブレーキを含むことがある。

【0470】

膜が両親媒性層、例えば、コポリマー膜または脂質二重層である場合、1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、膜中に存在するポリペプチドアンカー、および/または膜中に存在する疎水性アンカーを含む。疎水性アンカーは、好ましくは、脂質、脂肪酸、ステロール、カーボンナノチューブ、ポリペプチド、タンパク質またはアミノ酸、例えばコレステロール、パルミチン酸またはトコフェロールである。好ましい実施形態では、1つまたは複数のアンカーはポアではない。

50

【 0 4 7 1 】

膜の成分、例えば、両親媒性分子、コポリマーまたは脂質は、1つまたは複数のアンカーを形成するように化学的に修飾されるまたは官能化されることがある。好適な化学的修飾および膜の成分を官能化する好適な方法の例は、下でより詳細に論じる。膜成分のあらゆる割合、例えば、少なくとも0.01%、少なくとも0.1%、少なくとも1%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%または100%を、官能化することができる。

【 0 4 7 2 】

ポリヌクレオチドが膜に直接カップリングされることもある。膜にポリヌクレオチドをカップリングするために使用される1つまたは複数のアンカーは、好ましくはリンカーを含む。1つまたは複数のアンカーが1つまたは複数、例えば2、3、4以上、のリンカーを含むこともある。1つのリンカーが、1つより多く、例えば2、3、4以上、のポリヌクレオチドを膜とカップリングするために使用されることもある。

10

【 0 4 7 3 】

好ましいリンカーとしては、ポリマー、例えばポリヌクレオチド、ポリエチレングリコール (P E G)、多糖類およびポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリンカーは、直鎖状であってもよく、分岐していてもよく、または環状であってもよい。例えば、リンカーは、環状ポリヌクレオチドであることがある。ポリヌクレオチドは、環状ポリヌクレオチドリンカーを用いて相補配列にハイブリダイズすることもある。

【 0 4 7 4 】

1つもしくは複数のアンカーまたは1つもしくは複数のリンカーは、切断して破壊することができる成分、例えば、制限部位または光解離性基を含むこともある。

20

【 0 4 7 5 】

官能化されたリンカー、およびそれらが分子をカップリングできる方法は、当技術分野において公知である。例えば、マレイミド基で官能化されたリンカーは、タンパク質中のシステイン残基と反応して、該システイン残基に結合することになる。本発明に関連して、タンパク質は、膜中に存在することもあり、またはポリヌクレオチドとカップリング (もしくは結合) するために使用されることもある。このことは、下でより詳細に論じる。

【 0 4 7 6 】

ポリヌクレオチドの架橋は、「鍵と鍵穴」配置を使用して回避することができる。各リンカーの一方の末端のみが互いに反応してより長いリンカーを形成することがあり、リンカーの他方の末端は、各々がポリヌクレオチドまたは膜とそれぞれ反応する。そのようなリンカーは、国際出願第 P C T / G B 1 0 / 0 0 0 1 3 2 号明細書 (国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 6 6 0 2 号パンフレットとして公開) に記載されている。

30

【 0 4 7 7 】

下で論じるシークエンシング実施形態ではリンカーの使用が好ましい。ポリヌクレオチドが、ポアと相互作用しているときにはアンカップリングしない (すなわち、ステップ (b) でもステップ (e) でもアンカップリングしない) という意味で膜に直接、永続的にカップリングされている場合には、膜とポアとの距離のためシークエンシング実験をポリヌクレオチドの末端まで継続することができないので、一部の配列データが失われることになる。リンカーを使用すればポリヌクレオチドを完了まで処理することができる。

40

【 0 4 7 8 】

カップリングは、永続的または安定性であることがある。言い換えれば、カップリングは、ポリヌクレオチドが、ポアと相互作用しているときに膜とカップリングされたままであるようなカップリングであることがある。

【 0 4 7 9 】

カップリングは、一時的であることもある。言い換えれば、カップリングは、ポリヌクレオチドが、ポアと相互作用しているとき、膜からアンカップリングされうるカップリングであることもある。

【 0 4 8 0 】

50

アプタマー検出などの、ある特定の実施形態については、一時的な性質のカップリングが好ましい。永続的または安定性リンカーがポリヌクレオチドの5'または3'末端のどちらか一方に直接結合されており、リンカーが膜と膜貫通ポアのチャネル間の距離より短い場合には、シーケンシング実験をポリヌクレオチドの末端まで継続することができないので、一部の配列データが失われることになる。カップリングが一時的である場合には、カップリングされた末端から無作為に膜がなくなると、ポリヌクレオチドを完了まで処理することができる。永続的/安定性連結または一時的連結を形成する化学基は、下でより詳細に論じる。コレステロールまたは脂肪アシル鎖を使用して、ポリヌクレオチドを両親媒性層またはトリブロックコポリマー膜と一時的にカップリングすることもできる。6~30炭素原子の長さを有するあらゆる脂肪酸、例えば、ヘキサデカン酸を使用することができる。

10

【0481】

好ましい実施形態では、核酸などのポリヌクレオチドは、トリブロックコポリマーまたは脂質二重層などの両親媒性層とカップリングされる。核酸の合成脂質二重層へのカップリングは、様々な異なる繫留戦略を用いて以前に行われている。これらのことを下の表4に要約する。

【0482】

【表4】

表4

アンカーが含むもの	カップリングのタイプ	参考文献
チオール	安定的	Yoshina-Ishii, C. and S. G. Boxer (2003). "Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers." <i>J Am Chem Soc</i> 125 (13): 3696-7.
ビオチン	安定的	Nikolov, V., R. Lipowsky, et al. (2007). "Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules." <i>Biophys J</i> 92 (12): 4356-68
コレステロール	一時的	Pfeiffer, I. and F. Hook (2004). "Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies." <i>J Am Chem Soc</i> 126 (33): 10224-5
界面活性剤(例えば、脂質、パルミチン酸など)	安定的	van Lengerich, B., R. J. Rawle, et al. "Covalent attachment of lipid vesicles to a fluid-supported bilayer allows observation of DNA-mediated vesicle interactions." <i>Langmuir</i> 26 (11): 8666-72

20

30

【0483】

合成ポリヌクレオチドおよび/またはリンカーは、コレステロール、トコフェロール、パルミチン酸、チオール、脂質およびビオチン基などの好適なアンカー基の直接付加に容易に適合する修飾ホスホロアミダイトを合成反応中に使用して、官能化することができる。これらの様々な結合用化学物質は、ポリヌクレオチドへの結合の一連の選択肢をもたらす。異なる修飾基各々がポリヌクレオチドにわずかに異なる方法でカップリングし、カップリングは必ずしも永続的であるとは限らないため、膜へのポリヌクレオチドの滞留に異なる時間が費やされる。一時的カップリングの利点は、上で論じている。

40

【0484】

リンカーへのまたは官能化膜へのポリヌクレオチドのカップリングは、相補的反応性基またはアンカー基をそのポリヌクレオチドに付加させることができることを条件に、多数の他の手段によって果たすこともできる。ポリヌクレオチドのどちらか一方の末端への反応性基の付加は、以前に報告されている。T4ポリヌクレオチドキナーゼおよびATP Sを使用して、チオール基をssDNAまたはdsDNAの5'に付加させることができる(Grant, G. P. and P. Z. Qin (2007). "A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5' terminus of nucleic acids." *Nucleic Acids Res* **35**(10): e77

50

)。T4ポリヌクレオチドキナーゼおよび - [2 - アジドエチル] - ATPまたは - [6 - アジドヘキシル] - ATPを使用して、アジド基をssDNAまたはdsDNAの5'リン酸に付加させることができる。チオールまたはクリックケミストリーを使用して、チオール、ヨードアセトアミドOPSSもしくはマレイミド基(チオールに対して反応性)またはDIBO(ジベンゾシクロオクチン)もしくはアルキン基(アジドに対して反応性)のどちらか一方を含有するテザーをポリヌクレオチドに共有結合させることができる。末端トランスフェラーゼを使用して、ビオチン、チオールおよびフルオロフォアなどの化学基のより多様な選択物を付加させて、ssDNAの3'に修飾オリゴヌクレオチドを組み込むことができる(Kumar, A., P. Tchen, et al., (1988). "Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase." Anal Biochem 169(2): 376-82)。ストレプトアビジン/ビオチンおよび/またはストレプトアビジン/デスチオビオチンカップリングをあらゆる他のポリヌクレオチドに使用することができる。下の実施例は、ストレプトアビジン/ビオチンおよびストレプトアビジン/デスチオビオチンを使用してポリヌクレオチドを膜とカップリングすることができる方法を説明する。末端トランスフェラーゼと好適に修飾されたヌクレオチド(例えばコレステロールまたはパルミチン酸)を使用してアンカーがポリヌクレオチドに直接付加されうる可能性もありうる。

【0485】

1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、ポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションによって膜とカップリングする。1つまたは複数のアンカーのハイブリダイゼーションによって、上で論じたような一時的な様式でのカップリングが可能になる。ハイブリダイゼーションは、1つまたは複数のアンカーのいかなる部分に存在してもよく、例えば、1つまたは複数のアンカーとポリペプチドの間に、1つまたは複数のアンカー内に、または1つまたは複数のアンカーと膜の間に存在してもよい。例えば、リンカーは、互いにハイブリダイズされている2つ以上のポリヌクレオチド、例えば、3、4または5つのポリヌクレオチドを含むことがある。1つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることがある。1つまたは複数のアンカーは、(下で論じるように)ポリヌクレオチドに直接ハイブリダイズすることもあり、またはポリヌクレオチドに結合されたYアダプターおよび/もしくはリーダー配列に直接ハイブリダイズすることもあり、またはポリヌクレオチドに結合されたヘアピンループアダプターに直接ハイブリダイズすることもある。あるいは、1つまたは複数のアンカーが1つまたは複数、例えば2つまたは3つ、の中間ポリヌクレオチド(または「スプリント」)にハイブリダイズされることがあり、中間ポリヌクレオチドは、(下で論じるように)ポリヌクレオチドに、ポリヌクレオチドに結合されたYアダプターおよび/もしくはリーダー配列に、またはポリヌクレオチドに結合されたヘアピンループアダプターにハイブリダイズされる。

【0486】

1つまたは複数のアンカーは、一本鎖ポリヌクレオチドを含むこともあり、または二本鎖ポリヌクレオチドを含むこともある。アンカーの一部が一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションされていることもある。T4RNAリガーゼIを使用する短いssDNA片のライゲーションが報告されている(Troutt, A. B., M. G. McHeyzer-Williams, et al., (1992). "Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity." Proc Natl Acad Sci U S A 89(20): 9823-5)。あるいは、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドいずれかを二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションし、その後、2本の鎖を熱または化学変性によって分離することができる。二本鎖ポリヌクレオチドに対しては、その二重鎖の末端の一方もしくは両方に1本の一本鎖ポリヌクレオチドを付加させること、または一方もしくは両方の末端に二本鎖ポリヌクレオチドを付加させることが可能である。一本鎖ポリヌクレオチドの二本鎖ポリヌクレオチドへの付加については、この付加を、一本鎖ポリヌクレオチドの他の領域へのライゲーションの場合と同様にT4RNAリガーゼIを使用して果たすことができる。次に、二本鎖ポリヌクレオチドの二本鎖ポリヌクレオチドへの付加については、ライゲーションは

10

20

30

40

50

、ポリヌクレオチドおよび付加されたポリヌクレオチドそれぞれの相補的 3' d A / d T テールを用いる（多くの試料調製用途について鎖状体またはダイマー形成を防止するために常例的に行われているような）「平滑末端型」であることもあり、またはポリヌクレオチドの制限消化および適合性アダプターのライゲーションによって生成された「突出末端」の使用であることもある。次に、二重鎖が融解されると、各々の一本鎖は、一本鎖ポリヌクレオチドが 5' 末端、3' 末端でのライゲーションもしくは修飾に使用された場合には 5' もしくは 3' 修飾のいずれか一方、または二本鎖ポリヌクレオチドがライゲーションに使用された場合には両方の修飾を有することになる。

【0487】

ポリヌクレオチドが合成鎖である場合、そのポリヌクレオチドの化学合成中に 1 つまたは複数のアンカーを組み込むことができる。例えば、反応性基が結合されたプライマーを使用してポリヌクレオチドを合成することができる。

10

【0488】

アデニル化ポリヌクレオチドは、アデノシン-リン酸をポリヌクレオチドの 5' リン酸に結合させるライゲーション反応における中間体である。この中間体の生成には、NEB からの 5' DNA アデニル化キットなどの様々なキットが利用可能である。さらにまた、反応中に修飾ヌクレオチド三リン酸を ATP で置換することによって、ポリヌクレオチドの 5' に反応性基（例えばチオール、アミン、ピオチン、アジドなど）の付加が可能でありうる。5' DNA アデニル化キットと好適に修飾されたヌクレオチド（例えばコレステロールまたはパルミチン酸）を使用してアンカーがポリヌクレオチドに直接付加されうる可能性もありうる。

20

【0489】

ゲノム DNA 部分の一般的な増幅法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の使用である。ここで、2 つの合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、DNA の同じ部分の多数のコピーを生成することができ、この場合、各コピーの二重鎖における各鎖の 5' が合成ポリヌクレオチドとなる。ポリメラーゼを利用することによって、単一または複数のヌクレオチドを一本鎖または二本鎖 DNA の 3' 末端に付加させることができる。使用することができるポリメラーゼの例としては、ターミナルトランスフェラーゼ、クレノウおよび大腸菌（*E. coli*）ポリ（A）ポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。さらにまた、反応中に修飾ヌクレオチド三リン酸を ATP で置換することによって、コレステロール、チオール、アミン、アジド、ピオチンまたは脂質などのアンカーを二本鎖ポリヌクレオチドに組み込むことができる。したがって、増幅されたポリヌクレオチドの各コピーは、アンカーを含有することになる。

30

【0490】

理想的には、ポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドを官能化する必要なく、膜とカップリングされる。これは、1 つもしくは複数のアンカー、例えばポリヌクレオチド結合タンパク質または化学基、を膜とカップリングし、1 つもしくは複数のアンカーをポリヌクレオチドと相互作用させることによって、または膜を官能化することによって、果たすことができる。1 つまたは複数のアンカーを本明細書に記載する方法のいずれかによって膜とカップリングしてもよい。特に、1 つまたは複数のアンカーは、1 つまたは複数のリンカー、例えばマレイミド官能化リンカーを含むことがある。

40

【0491】

この実施形態では、ポリヌクレオチドは、通常 RNA、DNA、PNA、TNA または LNA であり、二本鎖状であってもよく、または一本鎖状であってもよい。この実施形態は、ゲノム DNA ポリヌクレオチドに特に適している。

【0492】

1 つまたは複数のアンカーは、一本鎖もしくは二本鎖ポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチド内の特異的ヌクレオチド配列と、またはポリヌクレオチド内の修飾ヌクレオチドのパターンと、またはポリヌクレオチド上に存在する任意の他のリガンドとカップリング、結合または相互作用する、あらゆる基を含むことができる。

50

【 0 4 9 3 】

アンカーに使用するために好適な結合タンパク質としては、下に列挙するものを含めて、大腸菌 (E. coli) 一本鎖結合タンパク質、P 5 一本鎖結合タンパク質、T 4 g p 3 2 一本鎖結合タンパク質、T O P O V d s DNA 結合領域、ヒトヒストンタンパク質、大腸菌 (E. coli) H U DNA 結合タンパク質、および他の古細菌性、原核性または真核性一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド (または核酸) 結合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 4 9 4 】

特異的ヌクレオチド配列は、転写因子、リボソーム、エンドヌクレアーゼ、トポイソメラーゼまたは複製開始因子によって認識される配列でありうる。修飾ヌクレオチドのパターンは、メチル化または損傷のパターンでありうる。

10

【 0 4 9 5 】

1 つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチドとカップリングする、ポリヌクレオチドと結合する、ポリヌクレオチドにインターカレートする、またはポリヌクレオチドと相互作用する、あらゆる基を含むことができる。この基は、静電相互作用、水素結合相互作用、またはファンデルワールス相互作用によって、ポリヌクレオチドにインターカレートするまたはポリヌクレオチドと相互作用することがある。そのような基としては、リシンモノマー、ポリリシン (s s DNA または d s DNA と相互作用することになる)、臭化エチジウム (d s DNA にインターカレートすることになる)、ユニバーサル塩基またはユニバーサルヌクレオチド (任意のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができる)、およびオスミウム錯体 (メチル化塩基と反応することができる) が挙げられる。したがって、ポリヌクレオチドと膜を、その膜に結合された 1 つまたは複数のユニバーサル塩基を使用してカップリングすることができる。各ユニバーサルヌクレオチドは、1 つまたは複数のリンカーを使用して膜とカップリングすることができる。ユニバーサルヌクレオチドは、好ましくは、次の核酸塩基のうちの 1 つを含む: ヒポキサンチン、4 - ニトロインドール、5 - ニトロインドール、6 - ニトロインドール、ホルミルインドール、3 - ニトロピロール、ニトロイミダゾール、4 - ニトロピラゾール、4 - ニトロベンゾイミダゾール、5 - ニトロインダゾール、4 - アミノベンゾイミダゾールまたはフェニル (C 6 - 芳香族環)。ユニバーサルヌクレオチドは、より好ましくは、次のヌクレオシドのうちの 1 つを含む: 2' - デオキシイノシン、イノシン、7 - デアザ - 2' - デオキシイノシン、7 - デアザ - イノシン、2 - アザ - デオキシイノシン、2 - アザ - イノシン、2 - O' - メチルイノシン、4 - ニトロインドール 2' - デオキシリボヌクレオシド、4 - ニトロインドールリボヌクレオシド、5 - ニトロインドール 2' - デオキシリボヌクレオシド、5 - ニトロインドールリボヌクレオシド、6 - ニトロインドール 2' - デオキシリボヌクレオシド、6 - ニトロインドールリボヌクレオシド、3 - ニトロピロール 2' - デオキシリボヌクレオシド、3 - ニトロピロールリボヌクレオシド、ヒポキサンチンの非環状糖類似体、ニトロイミダゾール 2' - デオキシリボヌクレオシド、ニトロイミダゾールリボヌクレオシド、4 - ニトロピラゾール 2' - デオキシリボヌクレオシド、4 - ニトロピラゾールリボヌクレオシド、4 - ニトロベンゾイミダゾール 2' - デオキシリボヌクレオシド、4 - ニトロベンゾイミダゾールリボヌクレオシド、5 - ニトロインダゾール 2' - デオキシリボヌクレオシド、5 - ニトロインダゾールリボヌクレオシド、4 - アミノベンゾイミダゾール 2' - デオキシリボヌクレオシド、4 - アミノベンゾイミダゾールリボヌクレオシド、フェニル C - リボヌクレオシド、フェニル C - 2' - デオキシリボシルヌクレオシド、2' - デオキシネブラリン、2' - デオキシイソグアノシン、K - 2' - デオキシリボース、P - 2' - デオキシリボースおよびピロリジン。ユニバーサルヌクレオチドは、より好ましくは、2' - デオキシイノシンを含む。ユニバーサルヌクレオチドは、より好ましくは、I M P または d I M P である。ユニバーサルヌクレオチドは、最も好ましくは、d P M P (2' - デオキシ - P - ヌクレオシド - リン酸) または d K M P (N 6 - メトキシ - 2 , 6 - ジアミノプリン - リン酸) である。

20

30

40

【 0 4 9 6 】

50

1つまたは複数のアンカーは、フーグスティーン（Hoogsteen）水素結合（2つの核酸塩基が水素結合によって一緒に保持される）または逆フーグスティーン水素結合（一方の核酸塩基が他方の核酸塩基に対して180°回転される）によってポリヌクレオチドとカップリング（または結合）されることもある。例えば、1つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチドとフーグスティーン水素結合または逆フーグスティーン水素結合を形成する、1つもしくは複数のヌクレオチド、1つもしくは複数のオリゴヌクレオチドまたは1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含むことがある。これらのタイプの水素結合は、第3のポリヌクレオチド鎖を二本鎖らせんの周りに巻きつかせ、三重鎖を形成させる。1つまたは複数のアンカーは、二本鎖ポリヌクレオチドと、その二本鎖二重鎖と三重鎖を形成することによって、カップリング（または結合）することもある。

10

【0497】

この実施形態では、膜成分の少なくとも1%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%または100%が官能化されることもある。

【0498】

1つまたは複数のアンカーがタンパク質を含む場合、それらのアンカーは、例えば、そのタンパク質が膜と適合性である外部疎水性領域を既に有する場合、さらなる官能化なしに直接膜内に係留することができる。そのようなタンパク質の例としては、膜貫通タンパク質、膜内タンパク質および膜タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、タンパク質は、膜と適合性である遺伝子的に融合された疎水性領域を伴って発現されることもある。そのような疎水性タンパク質領域は、当技術分野において公知である。

20

【0499】

1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、膜との接触前にポリヌクレオチドと混合されるが、1つまたは複数のアンカーを膜と接触させ、その後、ポリヌクレオチドと接触させてもよい。

【0500】

別の態様では、ポリヌクレオチドは、上記の方法を使用して特異的結合基によって認識されうるように官能化されることがある。具体的には、ポリヌクレオチドは、リガンド、例えば、ピオチン（ストレプトアビジンと結合させるため）、アミロース（マルトース結合タンパク質もしくは融合タンパク質と結合させるため）、Ni-NTA（ポリヒスチジンと、もしくはポリヒスチジntag付きタンパク質と結合させるため）、またはペプチド（例えば抗原）で官能化されることがある。

30

【0501】

好ましい実施形態によると、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列にポリヌクレオチドを結合させる場合、1つまたは複数のアンカーを使用してポリヌクレオチドを膜とカップリングすることができる。リーダー配列は、下でより詳細に論じる。好ましくは、ポリヌクレオチドは、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列に結合（例えばライゲーション）される。そのようなリーダー配列は、ホモポリマー型ポリヌクレオチドまたは脱塩基領域を含むことがある。リーダー配列は、1つまたは複数のアンカーに直接、または1つもしくは複数の中間ポリヌクレオチド（もしくはスプリント）を介して、ハイブリダイズするように設計されるのが一般的である。そのような場合、1つまたは複数のアンカーは、通常は、リーダー配列内の配列に相補的であるまたは1つもしくは複数の中間ポリヌクレオチド（もしくはスプリント）内の配列に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む。そのような場合、1つまたは複数のスプリントは、通常は、リーダー配列内の配列に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む。

40

【0502】

化学結合に使用される分子の例は、EDC（1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩）である。市販のキット（Thermo Pierce、部品番号22980）を使用して反応性基をポリヌクレオチドの5'に付加させることもできる。好適な方法には、ヒスチジン残基およびNi-NTAを使用する一時的親和性結合はもちろん、反応性システイン、リシンまたは非天然アミノ酸による、より頑強な共有結

50

合も含まれるが、これらに限定されない。

【0503】

二本鎖ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチドは、二本鎖状であることがある。ポリヌクレオチドが二本鎖状である場合、方法は、接触ステップの前に、ヘアピンループなどの架橋部分をポリヌクレオチドの一方の末端にライゲーションするステップを好ましくはさらに含む。その場合、ポリヌクレオチドを本発明に従ってポアと接触させながらまたは接触させる前に、ポリヌクレオチドの2本の鎖を分離することができる。ポアを通るポリヌクレオチドの移動がポリヌクレオチド結合タンパク質、例えばヘリカーゼ、または分子ブレーキによって制御されるので、2本の鎖を分離することができる。

10

【0504】

このようにして二本鎖構築物の両方の鎖を連結させ、調べることによって、特徴づけの効率および精度が増す。

【0505】

架橋部分は、標的ポリヌクレオチドの2本の鎖を連結させることができる。架橋部分は、通常は、標的ポリヌクレオチドの2本の鎖を共有結合で連結する。架橋部分は、その架橋部分が一本鎖ポリヌクレオチドの膜貫通ポアを通る移動に干渉しないことを条件に、標的ポリヌクレオチドの2本の鎖を連結させることができるあらゆるものであることができる。

【0506】

当技術分野において公知のあらゆる好適な手段によって架橋部分を標的ポリヌクレオチドに連結させることができる。架橋部が別途合成され、標的ポリヌクレオチドに化学的に結合または酵素的にライゲーションされることもある。あるいは、架橋部分が標的ポリヌクレオチドのプロセッシング中に生成されることもある。

20

【0507】

架橋部分は、標的ポリヌクレオチドに、その標的ポリヌクレオチドの一方の末端にまたは末端付近に連結される。架橋部分は、好ましくは、標的ポリヌクレオチドに、その標的ポリヌクレオチドの末端の10ヌクレオチド以内に連結される。

【0508】

好適な架橋部分としては、高分子リンカー、化学的リンカー、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、架橋部分は、DNA、RNA、修飾DNA（例えば脱塩基DNA）、RNA、PNA、LNAまたはPEGを含む。架橋部分は、より好ましくはDNAまたはRNAである。

30

【0509】

架橋部分は、最も好ましくは、ヘアピンループまたはヘアピンループアダプターである。好適なヘアピンアダプターは、当技術分野において公知の方法を使用して設計することができる。ヘアピンループは、いかなる長さであってもよい。ヘアピンループは、通常は、長さ110ヌクレオチド以下、例えば、100ヌクレオチド以下、90ヌクレオチド以下、80ヌクレオチド以下、70ヌクレオチド以下、60ヌクレオチド以下、50ヌクレオチド以下、40ヌクレオチド以下、30ヌクレオチド以下、20ヌクレオチド以下、または10ヌクレオチド以下である。ヘアピンループは、好ましくは、長さ約1~110、2~100、5~80、または6~50ヌクレオチドである。ヘアピンループがアダプターの分別選択可能性に関与する場合、50~110ヌクレオチドなどの、より長いヘアピンループ長が好ましい。同様に、ヘアピンループが、下で論じるような選択可能結合に関与しない場合、1~5ヌクレオチドなどの、より短いヘアピンループ長が好ましい。

40

【0510】

ヘアピンアダプターは、第1および/または第2のポリヌクレオチドのどちらか一方の末端、すなわち5'または3'末端にライゲーションされることがある。当技術分野において公知のいかなる方法を使用して、ヘアピンアダプターを第1および/または第2のポリヌクレオチドにライゲーションしてもよい。リガーゼ、例えば、T4 DNAリガーゼ、

50

大腸菌 (E. coli) DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、Tma DNAリガーゼおよび9⁰N DNAリガーゼを使用して、ヘアピンアダプターをライゲーションすることができる。

【0511】

当技術分野において公知のいかなる方法を使用してポリヌクレオチドの2本の鎖を分離してもよい。例えば、ポリヌクレオチド結合タンパク質によって、または脱ハイブリダイゼーションに有利に働く条件を使用して、それらの鎖を分離することができる(脱ハイブリダイゼーションに有利に働く条件の例としては、高温、高pH、ならびに水素結合または塩基対合を破壊することができる作用物質、例えばホルムアミドおよび尿素、の添加が挙げられるが、これらに限定されない)。

10

【0512】

ヘアピンアダプターは、選択可能結合部分を好ましくは含む。これによって、第1および/または第2のポリヌクレオチドを精製または単離することが可能になる。選択可能結合部分は、その結合特性に基づいて選択することができる部分である。したがって、選択可能結合部分は、好ましくは、表面と特異的に結合する部分である。選択可能結合部分は、本発明に使用される他の部分よりはるかに大きい程度に表面と結合する場合、その表面に特異的に結合する。好ましい実施形態において、部分は、本発明に使用されるいかなる他の部分も結合しない表面と結合する。

【0513】

好適な選択的結合部分は、当技術分野において公知である。好ましい選択的結合部分としては、ピオチン、ポリヌクレオチド表面、抗体、抗体断片、例えばFabおよびScSv、抗原、ポリヌクレオチド結合タンパク質、ポリヒスチジンテールおよびGSTタグが挙げられるが、これらに限定されない。最も好ましい選択的結合部分は、ピオチンおよび選択可能ポリヌクレオチド配列である。ピオチンは、アビジンで被覆された表面と特異的に結合する。選択可能ポリヌクレオチド配列は、相同配列で被覆された表面と特異的に結合(すなわちハイブリダイズ)する。あるいは、選択可能ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド結合タンパク質で被覆された表面と特異的に結合する。

20

【0514】

ヘアピンアダプターおよび/または選択可能結合部分は、切る、切り目を入れる、切断するまたは加水分解することができる領域を含むことができる。そのような領域は、第1および/または第2のポリヌクレオチドを、そのポリヌクレオチドが結合されている表面から精製または単離後に除去することを可能にするように設計することができる。好適な領域は、当技術分野において周知である。好適な領域としては、RNA領域、デスチオピオチンおよびストレプトアビジンを含む領域、ジスルフィド結合、および光切断性領域が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0515】

二本鎖標的ポリヌクレオチドは、好ましくは、ヘアピンループまたはヘアピンループアダプターなどの架橋部分の反対側の末端にリーダー配列を含む。リーダー配列は、下でより詳細に論じる。

【0516】

ラウンドザコーナースーケンシング(Round the corner sequencing)

40

好ましい実施形態では、標的二本鎖ポリヌクレオチドには一方の末端に架橋部分、例えば、ヘアピンループまたはヘアピンループアダプターが備えられており、方法は、ポリヌクレオチドをボアと、ポリヌクレオチドの両方の鎖がボアを通過して移動するように接触させるステップと、ポリヌクレオチドの両方の鎖がボアに対して移動しているときに1回または複数回の測定を行い、測定がポリヌクレオチドの鎖の1つまたは複数の特徴を示し、それによって標的二本鎖ポリヌクレオチドを特徴づけるステップとを含む。別の好ましい実施形態では、標的二本鎖ポリヌクレオチドには一方の末端に架橋部分、例えば、ヘアピンループまたはヘアピンループアダプターが備えられており、方法は、ポリヌクレオチドをボアおよびエキソヌクレアーゼと、ポリヌクレオチドの両方の鎖が消化されて個々のヌ

50

クレオチドになるように接触させるステップを含む。上で論じた実施形態のいずれかがこの方法に同等に適用される。

【0517】

リーダー配列

鎖特徴づけ/シーケンシング方法における接触ステップの前に、方法は、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列をポリヌクレオチドに結合させるステップを好ましくは含む。リーダー配列は、本発明の方法を助長する。リーダー配列は、ポアを優先的に通り抜けるように、およびそれによってポリヌクレオチドのポアを通る移動を助長するように、設計される。リーダー配列を使用して、ポリヌクレオチドを上で論じたような1つまたは複数のアンカーに連結させることもできる。

10

【0518】

リーダー配列は、通常はポリマーを含む。ポリマーは、好ましくは負電荷を有する。ポリマーは、好ましくは、ポリヌクレオチド、例えばDNAもしくはRNA、修飾ポリヌクレオチド（例えば脱塩基DNA）、PNA、LNA、ポリエチレングリコール（PEG）またはポリペプチドである。リーダーは、好ましくはポリヌクレオチドを含み、より好ましくは一本鎖ポリヌクレオチドを含む。リーダー配列は、上で論じたポリヌクレオチドのいずれかを含むことができる。一本鎖リーダー配列は、最も好ましくは、DNAの1本の鎖、例えば、ポリdT部分を含む。リーダー配列は、好ましくは1つまたは複数のスペーサーを含む。

【0519】

リーダー配列は、あらゆる長さであることができるが、通常は、長さ10～150ヌクレオチド、例えば、長さ20～150ヌクレオチドである。リーダーの長さは、方法に使用される膜貫通ポアに通常は依存する。

20

【0520】

リーダー配列は、好ましくは、下で定義するようなYアダプターの一部である。

【0521】

二重カップリング

本発明の方法は、二本鎖ポリヌクレオチドの二重カップリングを含むことがある。好ましい実施形態では、本発明の方法は、

(a) 一方の末端にYアダプターを有し、他方の末端にヘアピンループアダプターなどの架橋部分アダプターを有する、二本鎖ポリヌクレオチドを用意するステップであって、Yアダプターがポリヌクレオチドを膜とカップリングするための1つまたは複数の第1のアンカーを含み、架橋部分アダプターがポリヌクレオチドを膜とカップリングするための1つまたは複数の第2のアンカーを含み、架橋部分アダプターの膜へのカップリング強度がYアダプターの膜へのカップリング強度より大きい、ステップ、

30

(b) ステップ(a)で用意されたポリヌクレオチドを、CsGGポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと、ポリヌクレオチドがポアに対して、例えばポアを通して、移動するように接触させるステップ、および

(c) ポリヌクレオチドがポアに対して移動しているときに1回または複数回の測定を行い、測定が、ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示し、それによって標的ポリヌクレオチドを特徴づけるステップ

40

を含む。

【0522】

このタイプの方法は、英国特許出願公開第1406147号(1406147.7)明細書において詳細に論じられている。

【0523】

二本鎖ポリヌクレオチドには一方の末端にYアダプターがおよび他方の末端に架橋部分アダプターが備えられている。Yアダプターおよび/または架橋部分アダプターは、通常はポリヌクレオチドアダプターである。それらのアダプターは、上で論じたポリヌクレオチドのいずれかから形成することができる。

50

【0524】

Yアダプターは、通常は、(a)二本鎖領域、および(b)一本鎖領域または他方の末端に相補的でない領域を含む。Yアダプターは、一本鎖領域を含む場合、オーバーハングを有すると記述されることがある。Yアダプター内の非相補領域の存在がこのアダプターをY形にする。二本鎖部分とは異なり2本の鎖が通常は互いにハイブリダイズしないからである。Yアダプターは、1つまたは複数の第1のアンカーを含む。アンカーは、上でより詳細に論じている。

【0525】

Yアダプターは、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列を好ましくは含む。このことは、上で論じている。

10

【0526】

架橋部分アダプターは、上で論じたような選択可能結合部分を好ましくは含む。架橋部分アダプターおよび/または選択可能結合部分は、上で論じたように切る、切り目を入れる、切断するまたは加水分解することができる領域を含むことができる。

【0527】

1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数の分子ブレーキが上で論じたように使用される場合、Yアダプターが好ましくは1つまたは複数のヘリカーゼを含み、架橋部分アダプターが好ましくは1つまたは複数の分子ブレーキを含む。

【0528】

当技術分野において公知のいかなる方法を用いてYアダプターおよび/または架橋部分アダプターをポリヌクレオチドにライゲーションしてもよい。リガーゼ、例えば、T4 DNAリガーゼ、大腸菌(E. coli) DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、Tma DNAリガーゼおよび9⁰N DNAリガーゼを使用して、一方または両方のアダプターをライゲーションすることができる。あるいは、下で論じる本発明の方法を使用してアダプターをポリヌクレオチドに付加させることができる。

20

【0529】

好ましい実施形態では、方法のステップa)は、二本鎖ポリヌクレオチドを、該二本鎖ポリヌクレオチドが一方の末端にYアダプターをおよび他方の末端に架橋部分アダプターを含むように修飾することを含む。あらゆる修飾様式を使用することができる。方法は、好ましくは、本発明に従って二本鎖ポリヌクレオチドを修飾することを含む。このことは、下でより詳細に論じる。修飾方法と特徴づけ方法をいかなる形で組み合わせてもよい。

30

【0530】

架橋部分アダプターの膜とのカップリング(または結合)強度は、Yアダプターの膜とのカップリング(または結合)強度より大きい。この強度を任意の方法で測定することができる。カップリング(または結合)強度の好適な測定方法は、英国特許出願公開第1406147号(1406147.7)明細書の実施例に開示されている。

【0531】

架橋部分アダプターのカップリング(または結合)強度は、好ましくは、Yアダプターのカップリング(または結合)強度の少なくとも1.5倍、例えば、アンカーアダプターのカップリング(または結合)強度の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍である。架橋部分アダプターの膜に対する親和定数(K_d)は、好ましくは、Yアダプターの親和定数の少なくとも1.5倍、例えば、Yアダプターのカップリング強度の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍である。

40

【0532】

架橋部分アダプターがYアダプターより強く膜とカップリング(または結合)する方法はいくつかある。例えば、架橋部分アダプターは、Yアダプターより多くのアンカーを含むことがある。例えば、架橋部分アダプターは、2つ、3つ以上の第2のアンカーを含むことがあり、これに対してYアダプターは、1つの第1のアダプターを含むことがある。

【0533】

50

1つまたは複数の第2のアンカーの膜とのカップリング（または結合）強度は、1つまたは複数の第1のアンカーの膜とのカップリング（または結合）強度より大きいことがある。1つまたは複数の第2のアンカーの架橋部分アダプターとのカップリング（または結合）強度は、1つまたは複数の第1のアンカーのYアダプターとのカップリング（または結合）強度より大きいことがある。1つまたは複数の第1のアンカーおよび1つまたは複数の第2のアンカーは、それらのそれぞれのアダプターにハイブリダイゼーションによって結合されていることがあり、このハイブリダイゼーション強度は、1つまたは複数の第1のアンカーにおけるより1つまたは複数の第2のアンカーにおけるほうが大きい。これらの実施形態のあらゆる組合せも本発明に使用することができる。カップリング（または結合）強度は、当技術分野において公知の技術を使用して測定することができる。

10

【0534】

1つまたは複数の第2のアンカーは、膜とカップリング（または結合）する1つまたは複数の第1のアンカー中の1つまたは複数の基より大きい強度でその膜とカップリング（または結合）する1つまたは複数の基を好ましくは含む。好ましい実施形態では、架橋部分アダプター/1つまたは複数の第2のアンカーは、コレステロールを使用して膜とカップリング（または結合）し、Yアダプター/1つまたは複数の第1のアンカーは、パルミチン酸を使用して膜とカップリング（または結合）する。コレステロールは、パルミチン酸より強くトリブロックコポリマー膜および脂質膜と結合する。代替実施形態では、架橋部分アダプター/1つまたは複数の第2のアンカーは、パルミチン酸などのモノアシル化学種を使用して膜とカップリング（または結合）し、Yアダプター/1つまたは複数の第1のアンカーは、ジパルミトイルホスファチジルコリンなどのジアシル化学種を使用して膜とカップリング（または結合）する。

20

【0535】

ヘアピンループおよびリーダー配列の付加

用意する前に、二本鎖ポリヌクレオチドをMuAトランスポサゼ、および二本鎖MuA基質の集団と接触させてもよく、この場合、集団中の基質の一部は、リーダー配列を含むYアダプターであり、また集団中の基質の一部はヘアピンループアダプターである。トランスポサゼは、二本鎖ポリヌクレオチド分析物を断片化し、それらの断片の一方または両方の末端にMuA基質をライゲーションする。これは、一方の末端にリーダー配列をおよび他方にヘアピンループを含む、複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを生成する。その場合、本発明の方法を使用して修飾二本鎖ポリヌクレオチドを調査することができる。

30

【0536】

集団中の各基質は、好ましくは、ユニバーサルヌクレオチドの少なくとも1つのオーバーハングを含み、したがって、トランスポサゼがテンプレートポリヌクレオチドを断片化し、基質を二本鎖断片の一方または両方の末端にライゲーションし、その結果、複数の断片/基質構築物を生成する。この場合、方法は、オーバーハングを構築物中の断片にライゲーションすることによって複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを生成するステップをさらに含む。好適なユニバーサルヌクレオチドは、上で論じている。オーバーハングは、好ましくは、長さ5ヌクレオチドである。

【0537】

あるいは、集団中の各基質は、好ましくは、(i)少なくとも1つのオーバーハングと、(ii)少なくとも1つのオーバーハングと同じ鎖内に、テンプレートポリヌクレオチド中に存在しないヌクレオチドを含む少なくとも1つのヌクレオチドとを含み、したがって、トランスポサゼがテンプレートポリヌクレオチドを断片化し、二本鎖断片の一方または両方の末端に基質をライゲーションし、その結果、複数の断片/基質構築物を生成する。この場合、方法は、(a)少なくとも1つのヌクレオチドを選択的に除去することにより構築物からオーバーハングを除去することによって一本鎖ギャップを含む複数の二本鎖構築物を生成するステップ、および(b)構築物中の一本鎖ギャップを修復することによって複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを生成するステップをさらに含む。ポリヌクレオチドは、通常は、ヌクレオチド：デオキシアデノシン(dA)、デオキシウリジン(d

40

50

U) および / またはチミジン (d T)、デオキシグアノシン (d G) ならびにデオキシシチジン (d C) を含む。ポリヌクレオチド中に存在しないヌクレオシドは、好ましくは、脱塩基性、アデノシン (A)、ウリジン (U)、5 - メチルウリジン (m⁵ U)、シチジン (C) もしくはグアノシン (G) であるか、または尿素、5 , 6 - ジヒドロキシチミン、チミングリコール、5 - ヒドロキシ - 5 - メチルヒダントイン (5-hydroxy-5 methyl hydanton)、ウラシルグリコール、6 - ヒドロキシ - 5 , 6 - ジヒドロチミン (6-hydroxy-5,6-dihydrothimine)、メチルタルトロニル尿素、7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニン (8 - オキソグアニン)、8 - オキソアデニン、f a p y - グアニン、メチル - f a p y - グアニン、f a p y - アデニン、アフラトキシシン B 1 - f a p y - グアニン、5 - ヒドロキシ - シトシン、5 - ヒドロキシ - ウラシル、3 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、1、N 6 - エタノアデニン、ヒポキサンチン、5 - ヒドロキシウラシル、5 - ヒドロキシメチルウラシル、5 - ホルミルウラシルもしくはシス - s y n - シクロブタンピリミジンダイマーを含む。少なくとも 1 つのヌクレオチドは、好ましくは、オーバーハングからの 10 ヌクレオチド以下である。少なくとも 1 つのヌクレオチドは、オーバーハング中の第 1 のヌクレオチドである。オーバーハング中のヌクレオチドのすべてが、テンプレートポリヌクレオチド中に存在しないヌクレオシドを好ましくは含む。

【 0 5 3 8 】

これらの M u A ベースの方法は、国際出願第 P C T / G B 2 0 1 4 / 0 5 2 5 0 5 号パンフレットに開示されている。それらは、英国特許出願公開第 1 4 0 6 1 4 7 号 (1406147.7) 明細書においても詳細に論じられている。

【 0 5 3 9 】

1 つまたは複数のヘリカーゼを、二本鎖ポリヌクレオチドおよび M u A トランスポサーゼと接触させる前に、M u A 基質 Y アダプターに結合させてもよい。あるいは、1 つまたは複数のヘリカーゼを、二本鎖ポリヌクレオチドおよび M u A トランスポサーゼと接触させる前に、M u A 基質 Y アダプターに結合させてもよい。

【 0 5 4 0 】

1 つまたは複数の分子ブレーキを、二本鎖ポリヌクレオチドおよび M u A トランスポサーゼと接触させる前に、M u A 基質ヘアピンループアダプターに結合させてもよい。あるいは、1 つまたは複数の分子ブレーキを、二本鎖ポリヌクレオチドおよび M u A トランスポサーゼと接触させる前に、M u A 基質ヘアピンループアダプターに結合させてもよい。

【 0 5 4 1 】

アンカッピング

本発明の方法は、複数の標的ポリヌクレオチドの特徴づけおよび少なくとも第 1 の標的ポリヌクレオチドのアンカッピングを含むことがある。

【 0 5 4 2 】

好ましい実施形態では、本発明は、2 つ以上の標的ポリヌクレオチドの特徴づけを含む。方法は、

- (a) 第 1 の試料中の第 1 のポリヌクレオチドを用意するステップ、
- (b) 第 2 の試料中の第 2 のポリヌクレオチドを用意するステップ、
- (c) 1 つまたは複数のアンカーを使用して第 1 の試料中の第 1 のポリヌクレオチドを膜とカップリングするステップ、
- (d) 第 1 のポリヌクレオチドを、C s g G ポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと、ポリヌクレオチドがポアに対して、例えばポアを通して、移動するように接触させるステップ、
- (e) 第 1 ポリヌクレオチドがポアに対して移動しているときに 1 回または複数回の測定を行い、測定が第 1 のポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特徴を示し、それによって第 1 のポリヌクレオチドを特徴づけるステップ、
- (f) 第 1 のポリヌクレオチドを膜からアンカッピングするステップ、
- (g) 1 つまたは複数のアンカーを使用して第 2 の試料中の第 2 のポリヌクレオチドを膜とカップリングするステップ、

(h) 第2のポリヌクレオチドを、C s g G ポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと、第2ポリヌクレオチドがポアに対して、例えばポアを通して、移動するように接触させるステップ、および

(i) 第2のポリヌクレオチドがポアに対して移動しているときに1回または複数回の測定を行い、測定が第2のポリヌクレオチドの1つまたは複数の特徴を示し、それによって第2のポリヌクレオチドを特徴づけるステップを含む。

【0543】

このタイプの方法は、英国特許出願公開第1406155号(1406155.0)明細書において詳細に論じられている。

【0544】

ステップ(f)(すなわち、第1のポリヌクレオチドのアンカップリング)をステップ(g)の前に(すなわち、第2のポリヌクレオチドを膜とカップリングする前に)行ってもよい。ステップ(g)をステップ(f)の前に行ってもよい。第1のポリヌクレオチドをアンカップリングする前に第2のポリヌクレオチドを膜とカップリングする場合、ステップ(f)は、好ましくは、膜からの第1のポリヌクレオチドの選択的アンカップリング(すなわち、膜からの第2のポリヌクレオチドではなく第1のポリヌクレオチドのアンカップリング)を含む。当業者は、選択的アンカップリングを果たす系を設計することができる。ステップ(f)および(g)を同時に行ってもよい。このことは、下でより詳細に論じる。

【0545】

ステップ(f)では、第1のポリヌクレオチドの少なくとも10%が好ましくは膜からアンカップリングされる。例えば、第1のポリヌクレオチドの少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%が膜からアンカップリングされることもある。好ましくは、第1のポリヌクレオチドのすべてが膜からアンカップリングされる。膜からアンカップリングされる第1のポリヌクレオチドの量は、ポアを使用して判定することができる。このことは、実施例において開示する。

【0546】

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、互いに異なることがある。あるいは、第1および第2のポリヌクレオチドは、異なるポリヌクレオチドであることがある。そのような場合、第2のポリヌクレオチドを添加する前に第1の試料の少なくとも一部を除去する必要がないこともある。このことは、下でより詳細に論じる。方法が3つ以上のポリヌクレオチドの調査に関する場合、それらのポリヌクレオチドは、すべてが互いに異なることもあり、またはそれらの一部が互いに異なることもある。

【0547】

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、同じポリヌクレオチドの2つの実例であることもある。第1のポリヌクレオチドが、第2のポリヌクレオチドと同一であることもある。これは、較正を可能にする。方法が、3つ以上のポリヌクレオチドの調査に関する場合、それらのポリヌクレオチドは、すべてが同じポリヌクレオチドの3つ以上の実例であることもあり、またはそれらの一部が同じポリヌクレオチドの別個の実例であることもある。

【0548】

第1の試料および第2の試料は、互いに異なることがある。例えば、第1の試料はヒトに由来することがあり、第2の試料はウイルスに由来することがある。第1および第2試料が互いに異なる場合、それらの試料は、同じ第1および第2のポリヌクレオチドを含有することもあり、または含有することが疑われることもある。方法が3つ以上の試料の調査に関する場合、それらの試料は、すべてが互いに異なることもあり、またはそれらの一部が互いに異なることもある。

【0549】

第1の試料および第2の試料は、好ましくは、同じ試料の2つの实例である。第1の試料は、好ましくは、第2の試料と同一である。これは、較正を可能にする。方法が、3つ以上の試料の調査に関する場合、それらの試料は、すべてが同じ試料の3つ以上の实例であることもあり、またはそれらの一部が同じ試料の別個の实例であることもある。

【0550】

あらゆる数のポリヌクレオチドを調査することができる。例えば、本発明の方法は、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、100以上のポリヌクレオチドの特徴づけに関することがある。本発明の方法を使用して3つ以上のポリヌクレオチドを調査する場合、第2のポリヌクレオチドも膜からアンカップリングされ、必要数のステップが第3のポリヌクレオチドに加えられる。同じことが4つ以上のポリヌクレオチドについても言える。

10

【0551】

本発明の方法は、第1のポリヌクレオチドを膜からアンカップリングするステップを含む。本発明の方法は、3つ以上のポリヌクレオチドを調査することになる場合、第2のポリヌクレオチドを膜からアンカップリングするステップを含むことがある。

【0552】

公知のいかなる方法を使用して第1のポリヌクレオチドを膜からアンカップリングしてもよい。第1のポリヌクレオチドは、好ましくは、ステップ(f)では膜貫通ポアを使用して膜からアンカップリングされない。第1のポリヌクレオチドは、好ましくは、電圧または印加電位を使用して膜からアンカップリングされない。

20

【0553】

ステップ(f)は、好ましくは、膜から1つまたは複数のアンカーを除去することによってその膜から第1のポリヌクレオチドをアンカップリングすることを含む。アンカーを除去したら、他の(または別の)アンカーを使用して第2のポリヌクレオチドをその膜とカップリングする。第2のポリヌクレオチドのカップリングに使用するアンカーは、第1のポリヌクレオチドをカップリングするために使用した同じタイプのアンカーであってもよく、または異なるタイプのアンカーであってもよい。

【0554】

ステップ(f)は、1つまたは複数のアンカーを、その1つまたは複数のアンカーに対して、そのアンカーが膜に対して有する親和性より高い親和性を有する作用物質と接触させることを好ましくは含む。分子の特異的結合能力を判定するための競合結合または免疫放射定量測定アッセイの様々なプロトコルが当技術分野において周知である(例えば、Maddox et al., J. Exp. Med. 158, 1211-1226, 1993を参照されたい)。作用物質は、アンカーを膜から除去することによって第1のポリヌクレオチドをアンカップリングする。作用物質は、好ましくは糖である。1つまたは複数のアンカーが膜に対して有する親和性より高い親和性で1つまたは複数のアンカーと結合するいずれの糖を使用してもよい。糖は、シクロデキストリンまたは下で論じるようなその誘導体であることもある。

30

【0555】

1つまたは複数のアンカーがコレステロールなどの疎水性アンカーを含む場合、作用物質は、好ましくは、シクロデキストリンもしくはその誘導体または脂質である。シクロデキストリンまたはその誘導体は、Eliseev, A. V., and Schneider, H.-J. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 6081-6088に開示されているもののいずれかであってもよい。この作用物質は、より好ましくは、ヘプタキス-6-アミノ- -シクロデキストリン(am₇-CD)、6-モノデオキシ-6-モノアミノ- -シクロデキストリン(am₁-CD)またはヘプタキス-(6-デオキシ-6-グアニジノ)-シクロデキストリン(gu₇-CD)である。本明細書において開示する脂質のいずれかを使用することができる。

40

【0556】

アンカーがストレプトアビジン、ビオチンまたはデスチオビオチンを含む場合、作用物質は、好ましくは、ビオチン、デスチオビオチンまたはストレプトアビジンである。ビオ

50

チンとデスチオピオチンの両方は、ストレプトアビジンが膜と結合するより高い親和性でストレプトアビジンと結合し、逆もまた同様である。ピオチンは、ストレプトアビジンに対してデスチオピオチンより強い親和性を有する。したがって、ストレプトアビジンを含むアンカーは、ピオチンまたはストレプトアビジンを使用して膜から除去することができるし、逆もまた同様である。

【0557】

アンカーがタンパク質を含む場合、作用物質は、好ましくは、タンパク質と特異的に結合する抗体またはその断片である。抗体は、あるタンパク質と優先的なまたは高い親和性で結合するが、他のまたは異なるタンパク質とは結合しないまたは低い親和性でしか結合しない場合、そのタンパク質と特異的に結合する。抗体は、 1×10^{-6} M以下、より好ましくは 1×10^{-7} M以下、 5×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、またはより好ましくは 5×10^{-9} M以下のKdで結合する場合、優先的なまたは高い親和性で結合する。抗体は、 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、よりいっそう好ましくは 1×10^{-2} M以上のKdで結合する場合、低い親和性で結合する。いずれの方法を使用して結合または特異的結合を検出してもよい。抗体のタンパク質との結合を定量的に測定する方法は、当技術分野において周知である。抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、またはポリクローナル抗体であってもよい。抗体の好適な断片には、Fv、F(a b')およびF(a b')₂断片はもちろん、一本鎖抗体も含まれるが、これらに限定されない。さらに、抗体またはその断片は、キメラ抗体もしくはその断片、CDRグラフト抗体もしくはその断片、またはヒト化抗体もしくはその断片であってもよい。

【0558】

ステップ(f)は、1つまたは複数のアンカーの膜とカップリングする能力を低減させる作用物質と1つまたは複数のアンカーを接触させることを好ましくは含む。例えば、作用物質は、1つまたは複数のアンカーの構造および/または疎水性に干渉することによって膜とカップリングするそれらの能力を低減させることができる。アンカーがコレステロールを含む場合、作用物質は、好ましくはコレステロールデヒドロゲナーゼである。アンカーが脂質を含む場合、作用物質は、好ましくはホスホリパーゼである。アンカーがタンパク質を含む場合、作用物質は、好ましくはプロテイナーゼまたは尿素である。好適なアンカーと作用物質の他の組合せは、当業者には明らかである。

【0559】

ステップ(f)は、好ましくは、第1のポリヌクレオチドから1つまたは複数のアンカーを分離することによって、第1のポリヌクレオチドを膜からアンカカップリングすることを含む。これを任意の手法で行うことができる。例えば、リンカーを含むアンカーの場合、そのリンカーを切断することができる。この実施形態は、ハイブリダイゼーションによる連結に関わるアンカーに特に適用できる。そのようなアンカーは、上で論じている。

【0560】

ステップ(f)は、第1のポリヌクレオチドおよび1つまたは複数のアンカーを、その1つまたは複数のアンカーとの結合について第1のポリヌクレオチドと競合する作用物質と接触させることによって、第1のポリヌクレオチドを膜からアンカカップリングすることを好ましくは含む。競合的結合を判定および測定する方法は、当技術分野において公知である。作用物質は、好ましくは、1つまたは複数のアンカーとのハイブリダイゼーションについて第1のポリヌクレオチドと競合するポリヌクレオチドである。例えば、ハイブリダイゼーションに関わる1つまたは複数のアンカーを使用して第1のポリヌクレオチドを膜とカップリングする場合、ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のアンカーをハイブリダイゼーション部位に同じくハイブリダイズするポリヌクレオチドと接触させることによってアンカカップリングすることができる。ポリヌクレオチド作用物質は、通常は、第1のポリヌクレオチドおよび1つまたは複数のアンカーの濃度より高い濃度で添加される。あるいは、ポリヌクレオチド作用物質は、1つまたは複数のアンカーに第1のポリヌクレオチドより強くハイブリダイズすることができる。

【 0 5 6 1 】

ステップ (f) は、より好ましくは、 (i) 第 1 のポリヌクレオチドおよび 1 つまたは複数のアンカーを、尿素、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 、ジチオトレイトール (D T T) 、ストレプトアビジンもしくはビオチン、UV 線、酵素または結合剤と接触させるステップ、 (i i) 第 1 のポリヌクレオチドおよび 1 つまたは複数のアンカーを加熱するステップ、または (i i i) p H を変更するステップを含む。尿素、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) またはジチオトレイトール (D T T) は、アンカーを分解することができ、第 1 のポリヌクレオチドを膜から分離することができる。アンカーがストレプトアビジン - ビオチン連結を含む場合には、ストレプトアビジン作用物質は、ビオチンとの結合について競合することになる。アンカーがストレプトアビジン - デスチオビオチン連結を含む場合には、ビオチン作用物質は、ストレプトアビジンとの結合について競合することになる。UV 線は、光解離性基を分解するために使用することができる。酵素および結合剤は、アンカーを切断、破壊または分解するために使用することができる。好ましい酵素としては、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼまたはヘリカーゼが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい結合剤としては、酵素、抗体もしくはその断片、または一本鎖結合タンパク質 (S S B) が挙げられるが、これらに限定されない。下で論じる酵素または上で論じた抗体のいずれかを使用してよい。熱および p H は、ハイブリダイゼーションおよび他の連結を破壊するために使用することができる。

10

【 0 5 6 2 】

第 1 のポリヌクレオチドを 1 つまたは複数のアンカーから分離することによって第 1 のポリヌクレオチドを膜からアンカッピングした場合、1 つまたは複数のアンカーは、膜内に残存することになる。ステップ (g) は、好ましくは、第 1 のポリヌクレオチドから分離された 1 つまたは複数のアンカーを使用して第 2 のポリヌクレオチドを膜とカップリングすることを含む。例えば、第 2 のポリヌクレオチドに、膜内に残存する 1 つまたは複数のアンカーにハイブリダイズする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを備えさせることもできる。あるいは、ステップ (g) は、好ましくは、第 1 のポリヌクレオチドから分離されたものからの 1 つまたは複数の別個のアンカー (すなわち、1 つまたは複数の他のアンカー) を使用して第 2 のポリヌクレオチドを膜とカップリングすることを含む。1 つまたは複数の別個のアンカーは、第 1 のポリヌクレオチドを膜とカップリングするために使用した同じタイプのアンカーであってもよく、または異なるタイプのアンカーであってもよい。ステップ (g) は、好ましくは、第 1 のポリヌクレオチドから分離された 1 つまたは複数のアンカーとは異なる 1 つまたは複数のアンカーを使用して第 2 のポリヌクレオチドを膜とカップリングすることを含む。

20

30

【 0 5 6 3 】

好ましい実施形態では、ステップ (f) および (g) は、膜を第 2 のポリヌクレオチドと、第 2 のポリヌクレオチドが 1 つまたは複数のアンカーとの結合について第 1 のポリヌクレオチドと競合し、その第 1 のポリヌクレオチドを置換するように接触させることによって、膜から第 1 のポリヌクレオチドをアンカッピングすることを含む。例えば、ハイブリダイゼーションに関わる 1 つまたは複数のアンカーを使用して第 1 のポリヌクレオチドを膜とカップリングする場合、第 1 のポリヌクレオチドは、1 つまたは複数のアンカー中のハイブリダイゼーション部位に同じくハイブリダイズするポリヌクレオチドと結合された第 2 のポリヌクレオチドとアンカーを接触させることによって、アンカッピングすることができる。第 2 のポリヌクレオチドは、通常は、第 1 のポリヌクレオチドおよび 1 つまたは複数のアンカーの濃度より高い濃度で添加される。あるいは、第 2 のポリヌクレオチドは、1 つまたは複数のアンカーに第 1 のポリヌクレオチドより強くハイブリダイズすることができる。

40

【 0 5 6 4 】

除去および洗浄

第 1 のポリヌクレオチドをステップ (f) で膜からアンカッピングするが、それを必

50

ずしも除去するまたは洗い流すとは限らない。第2のポリヌクレオチドを第1のポリヌクレオチドと容易に区別することができる場合、第1のポリヌクレオチドを除去する必要はない。

【0565】

ステップ(f)と(g)の間に、方法は、好ましくは、第1の試料の少なくとも一部を膜から除去するステップをさらに含む。第1の試料の少なくとも10%、例えば、第1の試料の20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%が除去されることがある。

【0566】

方法は、好ましくは、膜から第1の試料のすべてを除去するステップをさらに含む。これを任意の方法で行うことができる。例えば、第1のポリヌクレオチドをアンカップリングした後、膜を緩衝液で洗浄することができる。好適な緩衝液は、下で論じる。

【0567】

修飾ポリヌクレオチド

特徴づけの前に、標的ポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドとポリメラーゼ、および遊離ヌクレオチドの集団とを、そのポリメラーゼが標的ポリヌクレオチドをテンプレートとして使用して修飾ポリヌクレオチドを形成する(ポリメラーゼは、修飾ポリヌクレオチドを形成するときに標的ポリヌクレオチド中のヌクレオチド化学種の1つまたは複数を、異なるヌクレオチド化学種で置換する)条件下で接触させることによって修飾されることがある。その場合、1つまたは複数のヘリカーゼがポリヌクレオチドに結合され1つまたは複数の分子ブレーキがポリヌクレオチドに結合された修飾ポリヌクレオチドを得ることができる。このタイプの修飾は、英国特許出願公開第1403096号(1403096.9)明細書に記載されている。上で論じたポリメラーゼのいずれかを使用してもよい。ポリメラーゼは、好ましくは、クレノウまたは90 Northである。

【0568】

テンプレートポリヌクレオチドをポリメラーゼと、ポリメラーゼがテンプレートポリヌクレオチドをテンプレートとして使用して修飾ポリヌクレオチドを形成する条件下で接触させる。そのような条件は、当技術分野において公知である。例えば、ポリヌクレオチドを、New England Biolabs(登録商標)からの緩衝液などの市販ポリメラーゼ緩衝液中でポリメラーゼと接触させるのが一般的である。温度は、好ましくは、クレノウについては好ましくは20~37、90 Northについては60~75である。プライマーまたは3'ヘアピンをポリメラーゼ伸長の核形成点として使用するのが一般的である。

【0569】

膜貫通ポアを使用するポリヌクレオチドの特徴づけ、例えばシーケンシングは、通常は、k個のヌクレオチド(kは正の整数である)で構成されているポリマーユニット(すなわち「k-mer」)の分析を含む。このことは、国際出願第PCT/GB2012/052343号明細書(国際公開第2013/041878号パンフレットとして公開)において論じられている。異なるk-merについての電流測定値間に明白な差があることが望ましいが、これらの測定値の一部が重複することはよくあることである。特に、k-mer中のポリマーユニットの数が多いと、すなわちkの値が大きいと、ポリヌクレオチドについての情報、例えばポリヌクレオチドの基礎配列の推定値、の導出が害されて、異なるk-merによって生じた測定値を分離することが困難になりうる。

【0570】

標的ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチド化学種を修飾ポリヌクレオチド中の異なるヌクレオチド化学種で置換することによって、修飾ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド中のものとは異なるk-merを含有する。修飾ポリヌクレオチド中の異なるk-merは、標的ポリヌクレオチド中のk-merとは異なる電流測定値を生じさせることができるため、修飾ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドとは異なる

10

20

30

40

50

情報を与える。修飾ポリヌクレオチドからのこの追加情報は、標的ポリヌクレオチドの特徴づけを容易にすることができる。場合によっては、修飾ポリヌクレオチド自体を特徴づけるほうが容易であることもある。例えば、電流測定値間の離隔が増したもしくは明白な離隔を有する $k - m e r$ 、またはノイズ低下を有する $k - m e r$ を含むように、修飾ポリヌクレオチドを設計することができる。

【0571】

ポリメラーゼは、好ましくは、修飾ポリヌクレオチドを形成するときに標的ポリヌクレオチド中の2つ以上のヌクレオチド化学種を異なるヌクレオチド化学種で置換する。ポリメラーゼは、標的ポリヌクレオチド中の2つ以上のヌクレオチド化学種の各々を異質のヌクレオチド化学種で置換することもある。ポリメラーゼは、標的ポリヌクレオチド中の2

10

【0572】

標的ポリヌクレオチドがDNAである場合、その修飾されたものの中の異なるヌクレオチド化学種は、通常は、アデニン、グアニン、チミン、シトシンもしくはメチルシトシンとは異なる核酸塩基を含む、および/またはデオキシアデノシン、デオキシグアニン、チミジン、デオキシシチジンもしくはデオキシメチルシチジンとは異なるヌクレオチドを含む。標的ポリヌクレオチドがRNAである場合、修飾ポリヌクレオチド中の異なるヌクレオチド化学種は、通常は、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシンもしくはメチルシトシンとは異なる核酸塩基を含む、および/またはアデノシン、グアニン、ウリジン、シチジンもしくはメチルシチジンとは異なるヌクレオチドを含む。異なるヌクレオチド化学種は、上で論じたユニバーサルヌクレオチドのいずれかであることができる。

20

【0573】

ポリメラーゼは、1つまたは複数のヌクレオチド化学種を、その1つまたは複数のヌクレオチド化学種に不在の化学基または原子を含む異なるヌクレオチド化学種で置換することもある。化学基は、プロピニル基、チオ基、オキソ基、メチル基、ヒドロキシメチル基、ホルミル基、カルボキシ基、カルボニル基、ベンジル基、プロパルギル基、またはプロパルギルアミン基であることがある。

【0574】

ポリメラーゼは、1つまたは複数のヌクレオチド化学種を、その1つまたは複数のヌクレオチド化学種中に存在する化学基または原子を欠いているヌクレオチド化学種で置換することもある。ポリメラーゼは、1つまたは複数のヌクレオチド化学種を、電気陰性度が変更された異なるヌクレオチド化学種で置換することもある。電気陰性度が変更された異なるヌクレオチド化学種は、好ましくはハロゲン原子を含む。

30

【0575】

方法は、好ましくは、修飾ポリヌクレオチド中の1つまたは複数の異なるヌクレオチド化学種から核酸塩基を選択的に除去するステップをさらに含む。

【0576】

分析物送達

標的分析物を、好ましくは、その分析物を膜の方に送達する微粒子に結合させる。このタイプの送達は、英国特許出願公開第1418469号(1418469.1)明細書に記載されている。あらゆるタイプの微粒子および結合方法を使用することができる。

40

【0577】

他の特徴づけ方法

別の実施形態では、ポリメラーゼによって標的ポリヌクレオチドに付加され、その後、遊離される標識化学種を検出することによって、ポリヌクレオチドを特徴づける。ポリメラーゼは、ポリヌクレオチドをテンプレートとして使用する。各々の標識化学種が各々のヌクレオチドに特異的である。ポリヌクレオチドを、C s g G ポアまたはその変異体、例えば本発明のポア、ポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドと、各ヌクレオチドに特異的な標識を含有するリン酸塩標識化学種がポリメラーゼによってポリヌクレオチドに逐次的に付加されるように接触させる。標識化学種を、それらがヌクレオチドから遊離される前に

50

(すなわち、それらが標的ポリヌクレオチドに付加されているときに)、またはヌクレオチドから遊離された後に、ポアを使用して検出することができる。

【0578】

ポリメラーゼは、上で論じたもののいずれかであってもよい。ポアを使用してリン酸塩標識化学種を検出することによってポリヌクレオチドを特徴づける。このタイプの方法は、欧州特許出願第13187149号明細書(13187149.3)(欧州特許出願公開第2682460号明細書として公開)明細書に開示されている。上で論じた実施形態のいずれかがこの方法に同等に適用される。

【0579】

標識化学種の例としては、ポリマー、ポリエチレングリコール、糖、シクロデキストリン、フルオロフォア、薬物、代謝物、ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。そのようなタグの非限定的な例は、Kumar et al., Sci Rep. 2012; 2:684. Epub 2012 Sep 21の著述の中で見つけることができる。

【0580】

センサーを形成する方法

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーを形成する方法も提供する。この方法は、CsGGポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと、ポリヌクレオチド結合タンパク質、例えばヘリカーゼまたはエキソヌクレアーゼとの複合体を形成するステップを含む。標的ポリヌクレオチドの存在下でポアをタンパク質と接触させ、次いでポアを介して電位を印加することによって、複合体を形成することができる。印加される電位は、上に記載したように、化学的電位であってもよく、または電圧電位であってもよい。あるいは、ポアをタンパク質に共有結合させることによって複合体を形成することができる。共有結合の方法は当技術分野において公知であり、例えば、国際出願第PCT/GB09/001679号明細書(国際公開第2010/004265号パンフレット)および同第PCT/GB10/000133号明細書(国際公開第2010/086603号パンフレット)に開示されている。複合体は、標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーである。方法は、好ましくは、CsGGポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと、ヘリカーゼとの複合体を形成するステップを含む。上で論じた実施形態のいずれかがこの方法に同等に適用される。

【0581】

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーも提供する。このセンサーは、CsGGポアまたはその変異体、例えば本発明のポア、とポリヌクレオチド結合タンパク質との複合体を含む。上で論じた実施形態のいずれかが本発明のセンサーに同等に適用される。

【0582】

キット

本発明は、標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのキットも提供する。このキットは、CsGGポアまたはその変異体、例えば本発明のポアと、膜の成分とを含む。膜は、好ましくは、成分から形成される。ポアは、好ましくは、膜内に存在する。キットは、上で開示した膜のいずれか、例えば両親媒性層またはトリブロックコポリマー膜、の成分を含むことができる。

【0583】

キットは、ポリヌクレオチド結合タンパク質をさらに含むことがある。上で論じたポリヌクレオチド結合タンパク質のいずれかを使用することができる。

【0584】

キットは、ポリヌクレオチドを膜とカップリングさせるための1つまたは複数のアンカーをさらに含むことがある。

【0585】

キットは、好ましくは、二本鎖ポリヌクレオチドを特徴づけるためのキットであり、好ましくは、Yアダプターおよびヘアピンループアダプターを含む。Yアダプターには、好

10

20

30

40

50

ましくは、１つまたは複数のヘリカーゼが結合されており、ヘアピンループアダプターには、好ましくは、１つまたは複数の分子ブレーキが結合されている。Ｙアダプターは、ポリヌクレオチドを膜とカップリングするための１つまたは複数の第１のアンカーを好ましくは含み、ヘアピンループアダプターは、ポリヌクレオチドを膜にカップリングするための１つまたは複数の第２のアンカーを好ましくは含み、ヘアピンループアダプターの膜とのカップリング強度は、好ましくは、Ｙアダプターのその膜とのカップリング強度より大きい。

【０５８６】

本発明のキットは、上述の実施形態のいずれかを行うことを可能にする１つまたは複数の他の試薬または器具をさらに含むことがある。そのような試薬または器具は、次のものの１つまたは複数を含む：好適な緩衝液（水溶液）、対象から試料を得るための手段（例えば、容器、もしくは針を備えている器具）、ポリヌクレオチドを増幅および／もしくは発現させるための手段、または電圧固定もしくはパッチクランプ装置。試薬は、流体試料によってそれらの試薬が再懸濁されるように、乾燥状態でキット内に存在することがある。キットは、場合により、キットを本発明の方法で使用することを可能にする説明書、またはその方法をどの生物に使用してもよいのかに関する詳説も含むことがある。

【０５８７】

装置

本発明は、標的ポリヌクレオチドなどの標的分析物を特徴づけるための装置も提供する。この装置は、複数のＣｓｇポアまたはそれらの変異体、および複数の膜を含む。複数のポアは、好ましくは、複数の膜内に存在する。ポアおよび膜の数は、好ましくは等しい。好ましくは、単一のポアが各膜内に存在する。

【０５８８】

装置は、好ましくは、本発明の方法を行うための説明書をさらに含む。装置は、分析物分析のための従来の装置のいずれか、例えば、アレイまたはチップであることができる。本発明の方法に関して上で論じた実施形態のいずれかが本発明の装置に同等に適用できる。装置は、本発明のキット中に存在する機構のいずれかをさらに含むことができる。

【０５８９】

装置は、好ましくは、本発明の方法を行うために組立てられる。

【０５９０】

装置は、好ましくは、

複数のポアおよび膜を支持することができ、かつポアおよび膜を使用して分析物の特徴づけを行うために操作可能である、センサーデバイスと、

特徴づけを行うための材料を送達するための少なくとも１つのポートとを含む。

【０５９１】

あるいは、装置は、好ましくは、

複数のポアおよび膜を支持することができ、かつポアおよび膜を使用して分析物の特徴づけを行うために操作可能であるセンサーデバイスと、

特徴づけを行うための材料を保持するための少なくとも１つのリザーバーとを含む。

【０５９２】

装置は、より好ましくは、

膜ならびに複数のポアおよび膜を支持することができ、かつポアおよび膜を使用して分析物の特徴づけを行うために操作可能である、センサーデバイスと、

特徴づけを行うための材料を保持するための少なくとも１つのリザーバーと、

少なくとも１つのリザーバーからセンサーデバイスに制御可能に材料を供給するように構成されている流体工学システムと、

それぞれの試料を受けるための１つまたは複数の容器と

を含み、流体工学システムは、１つまたは複数の容器からセンサーデバイスに試料を選択

10

20

30

40

50

的に供給するように構成されている。

【0593】

装置は、国際出願第PCT/GB08/004127号明細書（国際公開第2009/077734号パンフレットとして公開）、PCT/GB10/000789号明細書（国際公開第2010/122293号パンフレットとして公開）、国際出願第PCT/GB10/002206号明細書（国際公開第2011/067559号パンフレットとして公開）または国際出願第PCT/US99/25679号明細書（国際公開第00/28312号パンフレットとして公開）に記載されているもののいずれかであってもよい。

【0594】

以下の実施例は、本発明を例証するものである。

10

実施例

【実施例1】

【0595】

Cs g Gのクローニングおよび株

外膜に局在するC - 末端Strept IIタグCs g G (pPG1) および周辺質のC - 末端Strept IIタグCs g Gc1s (pPG2) を産生するための発現構築物は記述されている (Goyal, P. et al., Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 2013, 69, 1349-1353)。セレノメチオニン標識の場合、収量を増加させるためにStrept IIタグCs g Gc1sを細胞質で発現させた。したがって、プライマー5' - TCTTTAAACCGCCCCC GCC TAAAG - 3' (フォワード) (配列番号437)、および5' - CATTTT TTG CCC TCG TTA TC - 3' (リバース) (pPG3) (配列番号438) によるインバースPCRを使用して、N - 末端シグナルペプチドを除去するようにpPG2を変化させた。表現型アッセイの場合、大腸菌 (E.coli) BW25141 (大腸菌 (E.coli) NVG2) のCs g G欠失変異体を、[Datseenko, K. A. et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 6640-6645 (2000)] に記述される方法によって (プライマー5' - AAT AAC TCA ACC GAT TTT TAAAGCC CCA GCT TCA TAA GGA AAA TAA TCG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C - 3' (配列番号439) および5' - CGC TTA AAC AGT AAA ATG CCG GAT GAT AAT TCC GGC TTT TTT ATC TGC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G - 3' (配列番号440) を使用して) 構築した。Cy s アクセス可能性アッセイのためおよびチャンネル狭窄の表現型プロービングのために使用する様々なCs g G置換変異体を、trcプロモーターの制御下でCs g Gを含有するpTRC99aベクターであるpMC2 (Robinson, L. S., et al., Mol. Microbiol., 2006, 59, 870-881) から開始する部位特異的変異誘発 (Quick Change プロトコール; Stratagene) によって構築した。

20

30

【実施例2】

【0596】

タンパク質の発現および精製

Cs g GおよびCs g Gc1sを、記述されるように発現および精製した (Robinson, L. S., et al., Mol. Microbiol., 2006, 59, 870-881)。簡単に説明すると、Cs g Gを、pPG1で形質転換した大腸菌 (E.coli) BL21 (DE3) において組換えにより産生させ、単離された外膜から緩衝液A (50 mM Tris - HCl pH 8.0、500 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM ジチオスレイトール (DTT)) 中の1% n - ドデシル - D - マルトシド (DDM) を使用して抽出した。Strept IIタグCs g Gを5 ml Strept - Tactin Sepharose カラム (Iba, GmbH) にロードして、0.5% テトラエチレングリコールモノオクチルエーテル (C8E4; Affymetrix) および4 mM ラウリルジメチルアミン - N - オキシド (LDAO; Affymetrix) を補充した緩衝液Aの20カラム容積で洗浄することによって洗浄剤を交換した。2.5 mM D - デスチオピオチンを添加してタンパク質を溶出

40

50

させて、結晶化実験のために $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に濃縮した。セレノメチオニン標識の場合、C s g G c 1 s を、p P G 3 で形質転換したメチオニン栄養素要求株 B 8 3 4 (D E 3) において産生させて、 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L - セレノメチオニンを補充した M 9 最少培地で増殖させた。細胞ペレットを、c O m p l e t e P r o t e a s e I n h i b i t o r C o c k t a i l (R o c h e) を補充した 50 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 150 mM N a C l 、 1 mM E D T A 、 5 mM D T T に再懸濁させて、 $20 \times 10^3 \text{ l b i n}^{-2}$ で作動する T S シリーズ細胞破碎装置 (C o n s t a n t S y s t e m s L t d) の中に通過させることによって破碎した。標識した C s g G c 1 s を記述されるように精製した (Robinson, L. S., et al., Mol. Microbiol., 2006, 59, 870-881)。セレノメチオニンの酸化を防止するために精製手順を通して D T T (5 mM) を添加した。

10

【 0 5 9 7 】

C s g E を、p N H 2 7 を有する大腸菌 (E . c o l i) N E B C 2 5 6 6 細胞において産生させた (Nenninger, A. A. et al., Mol. Microbiol. 2011, 81, 486-499)。 25 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 150 mM N a C l 、 25 mM イミダゾール、 5% (容量 / 容量) グリセロール中の細胞溶解物を H i s T r a p F F (G E H e a l t h c a r e) にロードした。 C s g E - h i s を、 20 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 150 mM N a C l 、 5% (容量 / 容量) グリセロール緩衝液中で 500 mM イミダゾールへの直線勾配で溶出させた。 C s g E を含有する分画に 250 mM (N H ₄) ₂ S O ₄ を補充して、 20 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 100 mM N a C l 、 250 mM (N H ₄) ₂ S O ₄ 、 5% (容量 / 容量) グリセロールで平衡にした 5 ml H i T r a p P h e n y l H P カラム (G E H e a l t h c a r e) に適用した。 20 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 10 mM N a C l 、 5% (容量 / 容量) グリセロールへの直線勾配を溶出のために適用した。 C s g E 含有分画を、 20 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 100 mM N a C l 、 5% (容量 / 容量) グリセロールに平衡にした S u p e r o s e 6 P r e p G r a d e 10 / 600 (G E H e a l t h c a r e) カラムにロードした。

20

【 実施例 3 】

【 0 5 9 8 】

溶液中のオリゴマー化状態の評価

洗浄剤可溶化 C s g G (0.5% C 8 E 4 、 4 mM L D A O) および C s g G c 1 s のそれぞれ約 0.5 mg を、 25 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 500 mM N a C l 、 1 mM D T T 、 4 mM L D A O 、 および 0.5% C 8 E 4 (C s g G) 、 または 25 mM T r i s - H C l p H 8 . 0 、 200 mM N a C l (C s g G c 1 s) で平衡にした S u p e r d e x 200 10 / 300 G L 分析的ゲルろ過カラム (G E H e a l t h c a r e) に適用して $0.7 \text{ ml} \cdot \text{分}^{-1}$ で実験を行った。カラムの溶出体積をウシサイログロブリン、ウシ - グロブリン、ニワトリ卵アルブミン、ウマミオグロビン、およびビタミン B ₁₂ (B i o - R a d) によって校正した (図 7)。洗浄剤可溶化タンパク質である膜抽出 C s g G の $20 \mu \text{g}$ も同様に $3 \sim 10\%$ ブルーネイティブ P A G E で、 Swamy, M., et al., Sci. STKE 2006, p14, [http://dx.doi.Org/10.1126/stke.3452006p14(2006)] に記述される手順を使用して実験した (図 7)。 N a t i v e M a r k (L i f e T e c h n o l o g i e s) 非染色タンパク質標準物質 ($7 \mu \text{ l}$) を分子量推定のために使用した。成熟 C s g G は、 C 9 対称性を有する別個のノナマーポア形成粒子として、ならびにノナマーポアのテール - テールダイマー (すなわち、 D 9 対称性を有するオクタデカマー) として主に見出された。ナノポアセンシング用途の目的のために、タンパク質の好ましい状態は、単一ノナマーポアである。 D 9 オクタデカマーポアに対してノナマーポアの集団を、サイズ排除クロマトグラフィーの前に試料を加熱することによって、および / またはナノポアセンシング用途のために脂質二重層に挿入することによって、増加させることができる。

30

40

【 実施例 4 】

【 0 5 9 9 】

50

結晶化、データ収集、および構造の決定

セレノメチオニン標識 $CsgC_{15}$ を $3.8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ となるように濃縮して、 100 mM 酢酸ナトリウム、 $\text{pH} 4.2$ 、 8% PEG 4000、および 100 mM マロン酸ナトリウム $\text{pH} 7.0$ を含有する溶液に対して、シッティングドロップ蒸気拡散によって結晶化した。結晶を、 15% グリセロールを補充した結晶化緩衝液中でインキュベートして、液体窒素中で急速凍結した。洗浄剤可溶化 $CsgG$ を $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ となるように濃縮して、 100 mM Tris-HCl $\text{pH} 8.0$ 、 8% PEG 4000、 100 mM NaCl、および 500 mM $MgCl_2$ を含有する溶液に対してハンギングドロップ蒸気拡散によって結晶化させた。結晶を液体窒素中で急速凍結して、結晶化溶液中に存在する洗浄剤によって凍結保護した。結晶条件を最適にするためおよび良好な回折品質を有する結晶に関してスクリーニングするために、結晶を、beamlines Proxima-1 および Proxima-2a (Soleil, France)、PX-I (Swiss Light Source, Switzerland)、I02、I03、I04、および I24 (Diamond Light Source, UK) および ID14eh2、ID23eh1、および ID23eh2 (ESRF, France) において分析した。 $CsgG_{C_{15}}$ および $CsgG$ の構造決定のために使用した最終回折データをそれぞれ beamlines I04 および I03 で収集した (表 5)。

【0600】

10

20

30

40

50

【表 5】

データ収集および精密化統計値			
	CsgG _{CIS}	CsgG	
データ収集			
空間群	P1	C2	
単位格子寸法			
a, b, c (Å)	101.3, 103.6, 141.7	161.9, 372.8, 161.9	
α, β, γ (°)	111.3, 90.5, 118.2	90.0, 92.9, 90.0	
分解能 (Å)*	30-2.8 (2.9-2.8)	30-3.6 (3.7-3.6)	10
R_{meas} *	15.1 (81.8)	16.2 (90.6) †	
$I/\sigma I$ *	9.82 (2.03)	6.80 (1.89) †	
完全性(%)*	98.7 (98.3)	91.57 (27.26)	
重複度*	11.2 (7.0)	99.9 (99.1) †	
Wilson B (Å ²)	46.7	4.4 (4.3)	
		101.0	
精密化			
分解能 (Å)*	30-2.8 (2.9-2.8)	30-3.6 (3.7-3.6)	20
反射数*	112419 (11159)	30-3.6 (a*), -3.7 (b*), -3.8 (c*) †	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1881/0.2337	102130 (11094)	
原子数		0.3024/0.3542	
タンパク質	28853	34165	
リガンド/イオン	0	0	
水	0	0	
B 因子(Å ²)			
タンパク質	57.3	116.7	
リガンド/イオン			30
水			
R.m.s.偏差			
結合長(Å)	0.01	0.03	
結合角(°)	1.31	1.87	

それぞれの単結晶から収集した CsgG_{CIS} および膜抽出 CsgG のデータ統計値。

*最高分解能シェルを括弧内に示す。

†逆格子方向*a、*b、および*cに沿った異方性切り捨てに関して補正した値。

表 5

40

【 0 6 0 1 】

C s g G c 1 s の回折データを X i a 2 および X D S パッケージを使用して処理した (W inter, G., J. Appl. Cryst., 2010, 43, 186-190; Kabsch, W., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66, 125-132)。 C s g G c 1 s の結晶は、 a = 1 0 1 . 3 、 b = 1 0 3 . 6 、 c = 1 4 1 . 7 、 $\alpha = 1 1 1 . 3 ^\circ$ 、 $\beta = 9 0 . 5 ^\circ$ 、 $\gamma = 1 1 8 . 2 ^\circ$ の単位格子寸法を有する空間群 P 1 に属し、非対称単位にタンパク質 1 6 コピーを含有する。構造決定および精密化のために、波長 0 . 9 7 9 5 で収集したデータを、最高分解能シェルでの | / | カットオフ 2 に基づいて 2 . 8 で切り捨てた。単波長異常分散 (S A D) 実験から計算した実験的位相を使用して、構造を解析した。全体で 9 2 個のセレン部位が、 S h e l x C および S h e l x D (Sheldrick, G. M., Acta Cry

50

stallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66, 479-485) を使用して非対称単位に位置づけられ、これらを精密化して、Sharp (Bricogne, G., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2003, 59, 2023-2030) による位相計算のために使用した (フェーシングパワー (phasing power) 0.79、性能指数 (FOM) 0.25)。実験的位相を密度修正して Parrot (Cowtan, K., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66, 470-478) を使用して非結晶学的対称性 (NCS) によって平均化した (図7、FOM 0.85)。最初のモデルを、Buccaneer (Cowtan, K., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2006, 62, 1002-1011) によって作製して、Phoenix refine (Adams, P. D. et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66, 213-221) による最尤推定精密化の繰り返しラウンド、ならびに Coot (Emsley, P. et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66, 486-501) の手動での検分およびモデル (再) 構築によって精密化した。最終的な構造は16個のCsgGc1s鎖に属する3,700個の残基中に28,853原子を含有し (図7)、molprobity (Davis, I. W. et al., Nucleic Acids Res. 35 (Suppl 2), W375-W383) スコアは1.34であり; 残基の98%がRamachandranプロットの好ましい領域 (許容領域の99.7%) に存在する。電子密度マップは、可能性がある溶媒分子に対応する明白な密度を示さず、したがって、水分子またはイオンはその中に組み込まれなかった。精密化の初期および後期で厳密なローカルNCS制限をそれぞれ使用して、精密化を通して16回のNCS平均を維持した。

【0602】

CsgGの回折データを波長0.9763 Åで単結晶から収集し、XDSパッケージ (Winter, G., J. Appl. Cryst. 2010, 43, 186-190; Kabsch, W., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66, 125-132) を使用して、非対称単位にCsgG18コピーおよび72%溶媒含有量を包含する、単位格子寸法 $a = 161.7$ Å、 $b = 372.3$ Å、 $c = 161.8$ Å、および $\beta = 92.9^\circ$ の空間群C2に指数化してスケーリングした。構造決定および精密化のための回折データを、逆格子方向 a^* 、 b^* 、および c^* に沿って3.6 Å、3.7 Å、および3.8 Åの分解限界となるように、楕円形に切り捨てし、Diffraction Anisotropy Server (Strong, M. et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 2006, 103, 8060-8065) によって異方性にスケーリングした。CsgGc1sモノマーを使用する分子置換は、成功しなかった。自己回転関数の分析により、非対称単位におけるD₉対称性が明らかとなった (示していない)。CsgGc1sの構造に基づいて、C₈からC₉オリゴマーに移行すると、粒子周囲のプロトマー間アークは、45°から40°に変化するプロトマー間角度とほぼ同じままであり、計算される半径の増加は約4 Åであるという仮定に基づいてノナマー検索モデルを作成した。検索モデルとしての計算されたノナマーを使用して、2コピーを含有するという分子置換の解が Phaser (McCoy, A. J. et al., J. Appl. Cryst. 2007, 40, 658-674) によって見出された。密度修正およびNCS平均電子密度マップ (Parrot [Cowtan, K., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66, 470-478]; 図8) の精査によって、TM1およびTM2の手動での構築、タンパク質コアにおける隣接残基のリモデリングを行い、ならびにCsgGc1sモデルで欠失しており、N-末端脂質アンカーに1ヘリックスを連結させる残基2~18の構築を行った。CsgGモデルの精密化は、初回および最終精密化ラウンドに関してそれぞれ、Buster-TNT (Smart, O. S. et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2012, 68, 368-380) およびRefmac5 (Murshudov, G. N. et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 2011, 67, 355-367) によって実施した。18回のローカルNCS制限を、精密化を通して適用し、0.01のjelly-body精密化およびProsmart (Nicholls, R. A., Long, F. & Murshudov, G. N., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2011, 68, 404-417) によって作成された水素結合の制限を用いて、Refmac5を実行した。最終構造は、18CsgG鎖に属する4,451個の残基中に34,165個の原子を含有し (図7)、molprobityスコアは2.79であった。残基の93.0%がRamachandra

n プロットの好ましい領域（許容領域の 99.3%）に存在する。N - 末端脂質アンカーに対応する明白な電子密度は識別できなかった。

【実施例 5】

【0603】

コンゴレッドアッセイ

コンゴレッド結合の分析に関して、Lysogeny Broth (LB) 中、37℃で増殖させた細菌の一晩培養物を LB 培地で D_{600} が 0.5 に達するまで希釈した。試料 5 μ l を、アンピシリン ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)、コンゴレッド ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)、および 0.1% (重量/容量) イソプロピル - D - チオガラクトシド (IPTG) を補充した LB アガープレートにスポットした。プレートを室温 (20 ~ 22℃) で 48 時間インキュベートして、curl i 発現を誘導した。コロニーの形態の発達および色素の結合を 48 時間目に観察した。

10

【実施例 6】

【0604】

システインアクセス可能性アッセイ

システイン変異体を、部位特異的変異誘発を使用して pMC2 において作製して、大腸菌 (E.coli) LSR12 (Chapman, M. R. et al., Science, 2002, 295, 851-855) において発現させた。一晩増殖させた細菌培養物を、1 mM IPTG および $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ アンピシリンを含有する LB アガープレートにスポットした。プレートを室温でインキュベートして、細胞を 48 時間後に擦り取り、PBS 1 mL に再懸濁させ、 D_{600} を使用して標準化した。超音波処理によって細胞を溶解して、4℃、3,000 g で 20 秒間遠心分離して、細胞溶解物および懸濁させた膜から非破碎細胞を除去した。上清中のタンパク質を 15 mM メトキシポリエチレングリコール - マレイミド (MAL-PEG 5 kDa) によって室温で 1 時間標識した。100 mM DTT によって反応を停止させて、50.4 Ti ローターにおいて 40,000 rpm (約 100,000 g) で 4℃で 20 分間遠心分離して、全ての膜をペレットにした。ペレットを 1% ラウロイルサルコシン酸ナトリウムによって洗浄して、細胞膜を可溶化させて再度遠心分離した。得られた外膜を、1% DDM を含有する PBS を使用して懸濁し、可溶化した。ニッケルビーズによる金属親和性プルダウンを SDS-PAGE および抗 His ウェスタンブロットに使用した。空の pMC2 ベクターを有する大腸菌 (E.coli) LSR12 細胞を陰性対照として使用した。

20

30

【実施例 7】

【0605】

ATR - FTIR 分光法

ATR - FTIR 測定を、液体窒素冷蔵テルル化カドミウム水銀検出器および Golden Gate 反射測定用アクセサリ (Specac) を備えた Equinox 55 赤外線分光光度計 (Bruker) において乾燥空気中で絶えずパージしながら実施した。内部反射測定用元素はダイヤモンド結晶 (2 mm x 2 mm) であり、ビーム入射角は 45°であった。それぞれの精製タンパク質試料 (1 μ l) を結晶の表面に広げて、気体窒素流で乾燥させて被膜を形成させた。分解能 2 cm^{-1} で記録された各スペクトルは、シグナル対ノイズ比を改善するための積算処理が平均で 128 回であった。スペクトルは全て水蒸気の関与を差し引いて処理し、アボダイゼーションによって最終分解能 4 cm^{-1} で平滑化して、アミド I 結合 ($1,700 \sim 1,600 \text{ cm}^{-1}$) の領域で標準化して、その比較を可能にした (Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J. M., Spectrochim. Acta, 1994, 50A, 2137-2144)。

40

【実施例 8】

【0606】

ネガティブ染色 EM および対称性の決定

ネガティブ染色 EM を使用して、Cs g G、Cs g G c 1 s、および Cs g E の溶液中のオリゴマー化状態をモニターした。Cs g E、Cs g G c 1 s、および amph i p o l 結

50

合 C s g G を $0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度に調節して、グロー放電カーボンコーティング銅グリッド (CF-400; Electron Microscopy Sciences) に適用した。1 分間インキュベートした後、試料をプロットし、次いで洗浄して 2 % 酢酸ウラニルで染色した。画像を、電圧 120 kV で作動する Tecnai T12 BioTWIN Lab6 顕微鏡で、倍率 49,000 倍で 800 ~ 2,000 nm のデフォーカスにより収集した。コントラスト伝達関数 (CTF)、位相フリッピング、および粒子選択は、クライオ - EM に関して記述されたように実施した。膜抽出 C s g G に関して、オクタデカマー粒子 (全体で 1,780 個) を、ノナマーおよび上面図から個別に分析した。精製 C s g E に関して、全体で 2,452 個の粒子を分析した。三次元モデルを、以下の C s g G - C s g E のクライオ - EM 分析に関して記述されたように得て、数ラウンドの多重参照配列アライメント (MRA)、多重統計分析 (MSA)、およびアンカーセット精密化によって精密化した。全ての場合において、標準化および中心化後、クライオ - EM の章で記述したように IMAGIC - 4D を使用して画像を分類した。特徴的な図に対応する最善のクラスを各組の粒子に関して選択した。C s g G 上面図の対称性の決定は、クラスあたりおおよそ 20 個の画像の最善のクラス平均を使用して行った。回転方向の自己相関関数は IMAGIC を使用して計算してプロットした。

【実施例 9】

【0607】

ネガティブ染色 EM および対称性の決定

ネガティブ染色 EM を使用して、C s g G、C s g G C1S、および C s g E の溶液中のオリゴマー化状態をモニターした。C s g E、C s g G C1S、および amphipol 結合 C s g G を $0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度に調節して、グロー放電カーボンコーティング銅グリッド (CF-400; Electron Microscopy Sciences) に適用した。1 分間インキュベートした後、試料をプロットし、次いで洗浄して 2 % 酢酸ウラニルで染色した。画像を、電圧 120 kV で作動する Tecnai T12 BioTWIN Lab6 顕微鏡で、倍率 49,000 倍で 800 ~ 2,000 nm のデフォーカスにより収集した。コントラスト伝達関数 (CTF)、位相フリッピング、および粒子選択は、クライオ - EM に関して記述されたように実施した。膜抽出 C s g G に関して、オクタデカマー粒子 (全体で 1,780 個) を、ノナマーおよび上面図から個別に分析した。精製 C s g E に関して、全体で 2,452 個の粒子を分析した。三次元モデルを、以下の C s g G - C s g E のクライオ - EM 分析に関して記述されたように得て、数ラウンドの多重参照配列アライメント (MRA)、多重統計分析 (MSA)、およびアンカーセット精密化によって精密化した。全ての場合において、標準化および中心化後、クライオ - EM の章で記述したように IMAGIC - 4D を使用して画像を分類した。特徴的な図に対応する最善のクラスを各組の粒子に関して選択した。C s g G 上面図の対称性の決定は、クラスあたりおおよそ 20 個の画像の最善のクラス平均を使用して行った。回転方向の自己相関関数は IMAGIC を使用して計算してプロットした。

【実施例 10】

【0608】

C s g G - C s g E 複合体の形成

C s g G - C s g E 複合体形成に関して、C s g G (0.5 % C8E4、4 mM LDAO、25 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、1 mM DTT 中で $24 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ タンパク質) 120 ml を洗浄剤脱安定化リポソーム ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC) および 0.4 % LDAO) 300 ml に添加して氷中で 5 分間インキュベートした後、A8-35 amphipols の $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 保存液 90 ml を添加することによって、精製 C s g G 中の可溶化洗浄剤を、Amphipols A8-35 (Anatracs) に交換した。氷中でさらに 15 分間インキュベートした後、試料を Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) カラムにロードして、200 mM NaCl、2.5 % キシリトール、25 mM Tris-HCl、pH 8.0、2 mM D

T T中でゲルろ過を実施した。200 mM NaCl、2.5%キシリトール、25 mM Tris-HCl、pH 8、0.2 mM DTT中の精製モノマーCs g Eの等量を、Cs g EおよびCs g Gに関してそれぞれ15および5 mMのタンパク質最終濃度でamphipol可溶性Cs g Gに添加して、試料を0.5×TBE緩衝液中で4.5%ネイティブPAGEにおいて18、125 Vで泳動させた。第二の変性寸法に関して、Cs g G - Cs g E複合体に対応するバンドを、同じゲル上で同時に泳動させた未染色レーンから切り出して、Laemmli緩衝液(60 mM Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、10%グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール、0.01%ブロモフェノールブルー)中で5分間沸騰させて、4~20%SDS-PAGEにおいて泳動させた。精製Cs g EおよびCs g Gを対照試料としての複合体と共に泳動させた。ゲルを、肉眼による可視化のためにInstant Blue Coomassie、またはSDS-PAGEにおいてCs g EおよびCs g Gバンドの蛍光検出(Typhoon FLA 9000)によるCs g G - Cs g E複合体の化学量論的評価のためにSYPROオレンジによって染色し、Cs g G / Cs g E比0.97を生じた。

【実施例11】

【0609】

Cs g G - Cs g Eのクライオ-EM

クライオ電子顕微鏡を使用して、Cs g G - Cs g E複合体の溶液中の構造を決定した。上記のように調製したCs g G - Cs g E複合体は、HisTrap FF (GE Healthcare)に結合させて溶出させ、非結合Cs g Gを除去して、これを溶出させ、20 mAで30秒間グロー放電させたQuantifoil R2/2カーボンコーティンググリッド(Quantifoil Micro Tools GmbH)に直ちに適用した。試料を、自動システム(Leica)を使用して液体窒素中で急速凍結して、電圧200 kVで作動するFEI F20顕微鏡下で、低用量条件で50,000倍の名目上の倍率、および1.4~3 mmのデフォーカス範囲で観察した。画像フレームをFalcon II検出器で記録した。標本レベルのピクセルサイズは、1.9 /ピクセルであった。CTFパラメータを、CTFFIND3 (Mindell, J. A. & Grigorieff, N., J. Struct. Biol. 2003, 142, 334-347)を使用して評価し、位相フリッピングをSPIDER (Shaikh, T. R. et al., Nature Protocols, 2008, 3, 1941-1974)で行った。粒子を、BOXER (EMAN2; Tang, G. et al., J. Struct. Biol., 2007, 157, 38-46)を使用してCTF補正顕微鏡写真から自動的に選択した。10%を超える非点収差を有する画像を破棄した。全体で1,221個の粒子を75個の顕微鏡写真から選択して128ピクセル×128ピクセルのボックスにウィンドウ化した。画像を同じ平均値および標準偏差に標準化して、約200の低分解能カットオフでハイパスフィルターを通過させた。それらを中心化した後MSAの第一ラウンドに供した。IMAGIC-4D (Image Science Software)の参照画像を使用しない分類を使用して、最初の参照セットを得た。Cs g G円柱状粒子の特徴的な側面図に対応する最善のクラスをMRAの参照として使用した。Cs g G - Cs g E複合体に関して、最初の三次元モデルを、角度の再構成(Image Science Software)によって決定した方向を有する複合体の1,221個の粒子を包含する最善の125個の特徴的な図(良好なコントラストおよび明確な特徴を有する)から計算した。三次元マップをMRA、MSA、およびアンカーセット精密化の繰り返しラウンドによって精密化した。分解能は、0.5の基準レベルに従ってフーリエシエル相関(FSC)によって2.4であると推定された(図5)。

【0610】

マップおよび図面の可視化は、UCSF Chimera (Pettersen, E. F. et al., J. Comput. Chem., 2004, 25, 1605-1612)で実施した。

【実施例12】

【0611】

Cs g GおよびCs g G + Cs g Eポアの単一チャネル電流分析

陰性電場電位において、C s g G ポアは2つのコンダクタンス状態を示す。図5は、通常 (+50、0、および -50 mV で測定)、および低コンダクタンス型 (0、+50、および -50 mV で測定) それぞれの代表的な単一チャネル電流トレースを示す。全観察時間 (n = 22) の間に、2つの状態の間での変換は観察されず、コンダクタンス状態が、長い寿命 (数秒から数分の時間尺度) を有することを示している。左下のパネルは、+50 mV および -50 mV で獲得した C s g G ポアの通常および低コンダクタンス型の電流ヒストグラムを示す (n = 33)。通常および低コンダクタンス型を有する C s g G ポアの I - V 曲線を右下のパネルに示す。データは、少なくとも4回の独立した記録からの平均値および標準偏差を表す。低コンダクタンス型の性質または生理的存在は不明である。

【0612】

10

図6は、アクセサリ因子 C s g E で滴定した C s g G チャネルの電気生理学の結果を示す。プロットは、C s g E 濃度の関数として、開、中間、および閉状態のチャネルの分画を示す。C s g G の開状態および閉状態を図6に図示する (それぞれ、0 nM および 100 nM C s g E)。C s g E の濃度を 10 nM 超に増加させると、C s g G ポアは閉鎖する。この効果は +50 mV (左) および -50 mV (右) で起こり、ポアの遮断が C s g G ポアへの C s g E (計算 pI 4.7) の電気泳動によって引き起こされる可能性を除外する。頻度の低い (< 5%) 中間状態は、開状態のチャネルコンダクタンスのほぼ半分を有する。これは C s g E によって誘導される C s g G チャネルの不完全な閉鎖を表しうる; あるいは、これは電解質溶液の残留 C s g モノマーが膜に埋もれたポアに結合することによって引き起こされる C s g G ダイマーの一時的な形成を表しうる。3つの状態の分画を、単一チャネル電流トレースの全ての時点のヒストグラム分析から得た。ヒストグラムは、最大3つの状態のピーク面積を生じ、所定の状態の分画は、対応するピーク面積を記録における他の全ての状態の合計で除することによって得た。陰性電場電位では、2つの開コンダクタンス状態が識別され、これは C s g G に関する知見と類似である (a を参照されたい)。開状態のチャネルの変化形はいずれもより高濃度の C s g E で遮断されたことから、図6における「開状態」トレース (0 nM) は、両方のコンダクタンス型を組み合わせている。プロットにおけるデータは、3回の独立した記録の平均値および標準偏差を表す。

20

【0613】

結晶構造、サイズ排除クロマトグラフィー、および EM は、洗浄剤抽出 C s g G ポアが、より高いタンパク質濃度で非ネイティブのテール-テールスタックダイマーを形成することを示している (例えば、D9 粒子としての2つのノナマー、図7)。これらのダイマーはまた、単一チャネル記録でも観察することができる。上のパネルは、+50、0、および -50 mV (左から右に) でのスタックされた C s g G ポアの単一チャネル電流トレースを示す。左下のパネルは、+50 および -50 mV で記録されたダイマー C s g G ポアの電流ヒストグラムを示す。+50 および -50 mV での実験的コンダクタンス、それぞれ、 $+16.2 \pm 1.8$ および -16.0 ± 3.0 pA (n = 15) は、23 pA という理論的計算値に近い。右下のパネルは、スタックされた C s g G ポアの I - V 曲線を示す。データは、6回の独立した記録の平均値および標準偏差を表す。

30

【0614】

C s g E がスタックされた C s g G ポアに結合して遮断する能力を、電気生理学によって試験した。10 または 100 nM C s g E の存在下で +50 mV (上) または -50 mV (下) でのスタックされた C s g G ポアの単一チャネル電流トレースを示す。電流トレースは、そうでなければ飽和濃度の C s g E がスタックされた C s g G ダイマーに関してポア閉鎖を引き起こさないことを示している。これらの知見は、EM および部位特異的変異誘発によって識別されるように、C s g G - C s g E 接触域がヘリックス2および C s g G 周辺質キャビティの口部分にマッピングされることと良好に一致する (図5および6)。

40

【実施例13】

【0615】

50

胆汁酸塩毒性アッセイ

外膜の透過性を、胆汁酸塩を含有するアガープレートでの増殖の減少によって調べた。p L R 4 2 (Nenninger, A. A. et al., Mol. Microbiol., 2011, 81, 486-499) および p M C 2 (Robinson, L. S. et al., Mol. Microbiol., 2006, 59, 870-881) の両方を有する大腸菌 (E.coli) L S R 1 2 (Chapman, M. R. et al., Science, 2002, 295, 851-855) 細胞 (または誘導されたヘリックス 2 変異体) の 1 0 倍連続希釈液 (5 m l) を、0 . 2 % (重量 / 容量) L - アラビノースを含むまたは含まない、1 0 0 m g ・ l⁻¹ アンピシリン、2 5 m g ・ l⁻¹ クロラムフェニコール、1 m M I P T G を含有する M c C o n k e y アガープレートにスポットした。3 7 ° で一晩インキュベートした後、コロニーの増殖を調べた。

10

【実施例 1 4】

【0 6 1 6】

単一チャネル電流記録

単一チャネル電流記録は、N a n i o n の O r b i t 1 6 キットによって同時の高分解能電氣的記録を使用して実施した。簡単に説明すると、1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (A v a n t i P o l a r L i p i d s) の水平二重層を、1 6 チャネルのマルチ電極キャピティアレイ (M E C A) チップ (l o n e r a) (del Rio Martinez, J. M., ACS NanoSmall, 2014, 5, 8080-8088) において (ピコリットル容積以下の) マイクロキャピティの上に形成した。二重層の上または下のシスおよびトランスキャピティはいずれも 1 . 0 M K C l 、2 5 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 を含有した。チャネルを膜に挿入するために、2 5 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 、5 0 0 m M N a C l 、1 m M D T T 、0 . 5 % C 8 E 4 、5 m M L D A O に溶解した C s g G を、最終濃度 9 0 ~ 3 0 0 n M となるようにシス区画に添加した。C s g G チャネルと C s g E との相互作用を試験するために、2 5 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 、1 5 0 m M N a C l 中に溶解した後者のタンパク質溶液を最終濃度 0 . 1 、1 、1 0 および 1 0 0 n M となるようにシス区画に添加した。+ 5 0 m V および - 5 0 m V の保持電圧で (シス側を接地)、T e c e l l a T r i t o n 1 6 - チャネル増幅器を使用してロウパスフィルタリング周波数 3 k H z およびサンプリング周波数 1 0 k H z で膜通過電流を記録した。電流のトレースを p C l a m p スイートの C l a m p f i t (M o l e c u l a r D e v i c e s) を使用して分析した。O r i g i n 8 . 6 (M i c r o c a l) (Movileanu, L, Nature Biotechnol., 2000, 18, 1091-1095) を使用してプロットを作製した。

20

30

【0 6 1 7】

測定された電流を、3 つのセグメント、すなわち膜貫通区画、周辺質前庭、および両者を接続する内部チャネル狭窄で構成されるようにモデル化した C s g G の X 線構造のポア寸法に基づいて計算された電流と比較した。最初の 2 つのセグメントは、円錐形状のセグメントとなるようにモデル化されたが、狭窄は円柱状として表された。対応する抵抗 R₁、R₂、および R₃ はそれぞれ、以下のように計算された：

$$R_1 = L_1 / (\pi D_1 d_1)$$

$$R_2 = L_2 / (\pi D_2 d_2)$$

$$R_3 = L_3 / (\pi D_1 d_2)$$

40

式中、L₁、L₂、および L₃ はセグメントの軸方向の長さであり、それぞれ、3 . 5、4 . 0、および 2 . 0 n m であると測定され、D₁、d₁、D₂、および d₂ は、セグメント 1 および 2 の最大および最小直径であり、それぞれ 4 . 0、0 . 8、3 . 4、および 0 . 8 n m であると測定された。導電率は、1 0 . 6 S ・ m⁻¹ の値を有する。電流は、R₁、R₂、および R₃ ならびに電圧 V = 5 0 m V を

$$I = V / (R_1 + R_2 + R_3)$$

に代入することによって計算した。

【0 6 1 8】

アクセス抵抗は、予想される電流を有意に変化させないことが見出された。

50

【 0 6 1 9 】

上記の記録のような単一チャネル電流記録を、分析物の存在下で行ってもよく、それによってチャネルはバイオセンサーの役割を引き受けることができる。

【実施例 1 5】

【 0 6 2 0 】

モデルポリアラニン鎖による C s g G 狭窄の分子動力学シミュレーション

C s g G 狭窄は、図 9 に示されるように C 末端から N 末端方向に細長いコンフォメーションでチャネルの中を貫通するポリアラニン鎖によってモデル化されている。C s g G トランスポーターの中の基質の通過はそれ自身、配列特異的ではない (Nenninger, A. A. et al., Mol. Microbiol., 2011, 81, 486-499; Van Gerven, N. et al, Mol. Microbiol. 2014, 91, 1022-1035 2014)。明確にするために、通過するポリペプチド鎖の推定の相互作用をモデル化するためにポリアラニン鎖を使用した。モデル領域は、それぞれが残基 47 ~ 58 個を含む 9 個の同心円の C s g G C - ループで構成される。狭窄内部の側鎖を、A s n 55 および P h e 56 と表示するスティック表示で示す。狭窄内部のポリアラニン残基 (+1 から +5 と表示される残基) の 10 以内の溶媒分子 (水) を点で示す。図 9 c は、図 9 b に示されるように位置するポリアラニン鎖のモデル化溶媒和を示し、明確にするために C - ループを除去している (ポリアラニン鎖全体の 10 以内の溶媒分子を示す)。A s n 55 および P h e 56 の環の最高点では、ポリアラニン鎖の溶媒和は、ペプチド骨格とアミドクランプ側鎖とをつなぐ単一の水シェルに低減される。T y r 51 環におけるほとんどの側鎖は、C s g G (および C s g G c i s) X 線構造で観察されたその内向きの中心を向く位置と比較して溶媒に向かって回転している。モデルは、A M B E R 9 9 S B - I L D N (Lindorff-Larsen, K. et al., Proteins 2010, 78, 1950-1958) 力場を使用し、C - ループ末端の残基 (G l n 47 および T h r 58) の C a 原子の位置が制限されている、G R O M A C S (Pronk, S. et al., Bioinformatics, 2013, 29, 845-854) による 40 ナノ秒の全原子の明白な溶媒分子動力学シミュレーションの結果である。

【実施例 1 6】

【 0 6 2 1 】

核酸シーケンシングのための C s g G ナノポアの使用

P h i 29 DNA ポリメラーゼ (D N A P) は、膜内に位置する変異体または野生型 C s g G ナノポアがポアの中でのオリゴマープローブ DNA 鎖の制御された運動を可能にするために分子モーターとして使用されうる。ポアに電圧を印加すると、ナノポアのいずれかの側の塩溶液中のイオンの運動により電流が生じうる。プローブ DNA がポアの中を移動すると、ポアの中のイオン流は DNA によって変化する。この情報は、配列依存적であることが示されており、実施例 14 における上記の測定などの電流測定から正確にプローブの配列を読み取ることができる。

【実施例 1 7】

【 0 6 2 2 】

本実施例は、C s g G 内の DNA の挙動を調べるために実行されるシミュレーションを記述する。

【 0 6 2 3 】

材料および方法

DNA 転位に対する C s g G - E c o および様々な変異体のエネルギー障壁の程度を調べるために操舵分子動力学シミュレーションを実施した。シミュレーションは、G R O M A C S パッケージバージョン 4.0.5 を使用して、G R O M O S 53a6 力場および S P C 水モデルによって実施した。C s g G - E c o (配列番号 390) の構造を、タンパク質データバンクから受託コード 4UV3 として得た。C s g G - E c o 変異体のモデルを作成するために、野生型のタンパク質構造を P y M O L を使用して変異させた。調べた変異体は、C s g G - E c o - (F 56 A) (変異 F 56 A を有する配列番号 390)、C s g G - E c o - (F 56 A - N 55 S) (変異 F 56 A / N 55 S を有する配列番

10

20

30

40

50

号 3 9 0)、および C s g G - E c o - (F 5 6 A - N 5 5 S - Y 5 1 A) (変異 F 5 6 A / N 5 5 S / Y 5 1 A を有する配列番号 3 9 0) であった。

【 0 6 2 4 】

次に、DNA をポアに入れた。異なる 2 つの系を設定した：

i . ポアに、狭窄領域の真上 (残基 5 6 環の上およそ 5 ~ 1 0) に 1 つのグアニンヌクレオチドを入れた。

ii . DNA の一本鎖 (s s DNA) を、5 ' 末端がポアのベータ - バレル側に向かうようにポアの軸に沿って入れた。この設定において、s s DNA は、ポアの全長にわたって予めその中を貫通していた。

【 0 6 2 5 】

次に、シミュレーションボックスを溶媒和して、最急降下アルゴリズムを使用してエネルギーを最小限にした。

【 0 6 2 6 】

それぞれのシステムを、Berendsen サーモスタットおよび Berendsen バロスタットを 3 0 0 K となるように使用して N P T アンサンブルにおいてシミュレートした。シミュレーションを通して、ポアの骨格に制限を適用した。

【 0 6 2 7 】

DNA をポアの中から引き抜くために、1 グアニンシミュレーションにおいてリン原子に引き抜き力を適用した。s s DNA シミュレーションでは、引き抜き力を鎖の 5 ' 末端のリン原子に適用した。引き抜き力は、上記の DNA リン原子と、ポア軸に対して平行に定速で移動する想像上の点との間にばねをつなぐことによって、定速で適用した。ばねはいかなる形状も有しないか、またはいかなる流体力学的抗力も受けないことに注意されたい。ばね定数は $5 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ に等しかった。

【 0 6 2 8 】

結果

1 G 転位

図 1 2 に示すように、引き抜き力の時間に対するプロットは、ヌクレオチドが、野生型 C s g E - E c o ポアにおけるフェニルアラニン残基 F 5 6 の環の中に入るには大きい障壁が存在することを示している。調べた C s g G - E c o 変異体に関してグアニン転位に対する有意な障壁は観察されなかった。

【 0 6 2 9 】

s s DNA 転位

s s DNA 転位に関して、それぞれの実行が異なる引き抜き速度 (1 0 0 / ナノ秒および 1 0 / ナノ秒) を適用する 2 つのシミュレーションをポア毎に実行した。より速い引き抜き速度シミュレーションを図示する図 1 3 に示すように、野生型 C s g G ポアは、s s DNA の転位を可能にするために最大の引き抜き力を必要とした。より遅い引き抜き速度シミュレーションを図示する図 1 4 に示すように、C s g G - E c o (野生型、配列番号 3 9 0) および C s g G - E c o - (F 5 6 A) ポアはいずれも、s s DNA 転位を可能にするためには最大の力を適用する必要があった。s s DNA 転位にとって必要な引き抜き力を C s g G と M s p A ベースラインポアの間で比較すると、類似のレベルの s s DNA 転位を許容するためには C s g G ポアの変異が必要であることを示唆している。

【 実施例 1 8 】

【 0 6 3 0 】

本実施例は、いくつかの C s g G 変異体の特徴づけを記述する。

【 0 6 3 1 】

材料および方法

実験を設定する前に、DNA 構築物 X (最終濃度 0 . 1 n M、構築物 X の概略図および説明に関しては図 2 2 を参照されたい) を、T 4 D d a - E 9 4 C / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C (変異 E 9 4 C / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C を有する配列番号 4 1 2、緩衝液 (1 5 1 . 5 m M K C l、2 5 m M リン酸カリウム、5 % グリセロ

10

20

30

40

50

ール、pH 7.0、1 mM EDTA) 中で提供されるナノポア系に最終濃度 10 nM で添加) で、室温で 5 分間ブレインキュベートした。5 分後、TMAD (100 μM) をプレミクスに添加して、混合物をさらに 5 分間インキュベートした。最後に、MgCl₂ (ナノポア系に添加して最終濃度 1.5 mM)、ATP (ナノポア系に添加して最終濃度 1.5 mM)、KCl (ナノポア系に添加して最終濃度 500 mM)、およびリン酸カリウム緩衝液 (ナノポア系に添加して最終濃度 25 mM) をプレミクスに添加した。

【0632】

緩衝液 (25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (I I)、150 mM フェリシアン化カリウム (I I I)、pH 8.0) 中のブロックコポリマーに挿入した多種の Cs g G ナノポア 1 つから、電氣的測定を得た。ブロックコポリマーに挿入した 1 つのポアが得られた後、緩衝液 (2 mL、25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (I I)、150 mM フェリシアン化カリウム (I I I)、pH 8.0) を系の中に流して過剰量のいかなる Cs g G ナノポアも除去した。500 mM KCl、25 mM リン酸カリウム、1.5 mM MgCl₂、1.5 mM ATP、pH 8.0 の 150 μl を系に流した。10 分後、500 mM KCl、25 mM リン酸カリウム、1.5 mM MgCl₂、1.5 mM ATP、pH 8.0 の 150 μl を系に流して、次いで、酵素 (T4 Dda - E94C / C109A / C136A / A360C、最終濃度 10 nM)、DNA 構築物 X (最終濃度 0.1 nM)、燃料 (MgCl₂、最終濃度 1.5 mM、ATP、最終濃度 1.5 mM) プレミックス (全体で 150 μl) をナノポア 1 つの実験系に流した。実験を -120 mV で実行して、ヘリカーゼ制御 DNA 運動をモニターした。

【0633】

結果

範囲の増加を示すポア (図 15 ~ 17、および 27 ~ 39)

Cs g G - Eco - (Strep II (C)) (Strep II (C)) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は、約 10 pA の範囲を有する (図 15 (a) を参照されたい) が、以下の Cs g G - Eco ポア変異体は、電流範囲の増加を示した -

1 - Cs g G - Eco - (Y51N - F56A - D149N - E185R - E201N - E203N - Strep II (C)) 9 (変異 Y51N / F56A / D149N / E185R / E201N / E203N を有し、Strep II (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 15 (b) を参照されたい)。

2 - Cs g G - Eco - (N55A - Strep II (C)) 9 (変異 N55A を有し、Strep II (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 35 pA の範囲を示した (図 15 (c) を参照されたい)。

3 - Cs g G - Eco - (N55S - Strep II (C)) 9 (変異 N55S を有し、Strep II (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 40 pA の範囲を示した (図 16 (a) を参照されたい)。

4 - Cs g G - Eco - (Y51N - Strep II (C)) 9 (変異 Y51N を有し、Strep II (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 40 pA の範囲を示した (図 16 (b) を参照されたい)。

5 - Cs g G - Eco - (Y51A - F56A - Strep II (C)) 9 (変異 Y51A / F56A を有し、Strep II (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 16 (c) を参照されたい)。

6 - Cs g G - Eco - (Y51A - F56N - Strep II (C)) 9 (変異 Y51A / F56N を有し、Strep II (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 20 pA の範囲を示した (図 17 (a) を参照されたい)。

7 - Cs g G - Eco - (Y51A - N55S - F56A - Strep II (C)) 9 (変異 Y51A / N55S / F56A を有し、Strep II (C) が配列番号 435 で

あり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 17 (b) を参照されたい)。

8 - C s g G - E c o - (Y 5 1 A - N 5 5 S - F 5 6 N - S t r e p I I (C)) 9 (変異 Y 5 1 A / N 5 5 S / F 5 6 N を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 17 (c) を参照されたい)。

13 - C s g G - E c o - (F 5 6 H - S t r e p I I (C)) 9 (変異 F 5 6 H を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 35 pA の範囲を示した (図 27 を参照されたい)。

14 - C s g G - E c o - (F 5 6 Q - S t r e p I I (C)) 9 (変異 F 5 6 Q を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 40 pA の範囲を示した (図 28 を参照されたい)。

10

15 - C s g G - E c o - (F 5 6 T - S t r e p I I (C)) 9 (変異 F 5 6 T を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 35 pA の範囲を示した (図 29 を参照されたい)。

16 - C s g G - E c o - (S 5 4 P / F 5 6 A - S t r e p I I (C)) 9 (変異 S 5 4 P / F 5 6 A を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 35 pA の範囲を示した (図 30 を参照されたい)。

17 - C s g G - E c o - (Y 5 1 T / F 5 6 A - S t r e p I I (C)) 9 (変異 Y 5 1 T / F 5 6 A を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 31 を参照されたい)。

20

18 - C s g G - E c o - (F 5 6 P - S t r e p I I (C)) 9 (変異 F 5 6 P を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 32 を参照されたい)。

19 - C s g G - E c o - (F 5 6 A - S t r e p I I (C)) 9 (変異 F 5 6 A を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 40 pA の範囲を示した (図 33 を参照されたい)。

20 - C s g G - E c o - (Y 5 1 T / F 5 6 Q - S t r e p I I (C)) 9 (変異 Y 5 1 T / F 5 6 Q を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 34 を参照されたい)。

30

21 - C s g G - E c o - (N 5 5 S / F 5 6 Q - S t r e p I I (C)) 9 (変異 N 5 5 S / F 5 6 Q を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 35 pA の範囲を示した (図 35 を参照されたい)。

22 - C s g G - E c o - (Y 5 1 T / N 5 5 S / F 5 6 Q - S t r e p I I (C)) 9 (変異 Y 5 1 T / N 5 5 S / F 5 6 Q を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 35 pA の範囲を示した (図 36 を参照されたい)。

23 - C s g G - E c o - (F 5 6 Q / N 1 0 2 R - S t r e p I I (C)) 9 (変異 F 5 6 Q / N 1 0 2 R を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 30 pA の範囲を示した (図 37 を参照されたい)。

40

24 - C s g G - E c o - (Y 5 1 Q / F 5 6 Q - S t r e p I I (C)) 9 (変異 Y 5 1 Q / F 5 6 Q を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 40 pA の範囲を示した (図 38 を参照されたい)。

25 - C s g G - E c o - (Y 5 1 A / F 5 6 Q - S t r e p I I (C)) 9 (変異 Y 5 1 A / F 5 6 Q を有し、S t r e p I I (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) は約 35 pA の範囲を示した (図 39 を参照されたい)。

【0634】

スループットの増加を示すポア (図 18 および 19)

図 18 および 19 から認められうるように、以下の変異体ポア (以下の 9 ~ 12) は、4 時間でチャネルあたり多数のヘリカーゼ制御 DNA 運動 (図 18 および 19 において X

50

と表示)を示したのに対し、図18(a)に示すCsgG-Eco-(StrepII(C))9(StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している配列番号390)は、4時間でチャネルあたりわずか1または2のヘリカーゼ制御DNA運動(図18(a)においてXと表示)をしばしば示し、その代わりに延長したブロック領域(図18(a)においてYと表示)を示した。

9 - CsgG-Eco-(D149N-E185N-E203N-StrepII(C))9(変異D149N/E185N/E203Nを有し、StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している配列番号390)(図18(b))。

10 - CsgG-Eco-(D149N-E185N-E201N-E203N-StrepII(C))9(変異D149N/E185N/E201N/E203Nを有し、StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している配列番号390)(図18(c))。

10

11 - CsgG-Eco-(D149N-E185R-D195N-E201N-E203N-StrepII(C))9(変異D149N/E185R/D195N/E201N/E203Nを有し、StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している配列番号390)(図19(a))。

12 - CsgG-Eco-(D149N-E185R-D195N-E201R-E203N-StrepII(C))9(変異D149N/E185R/D195N/E201R/E203Nを有し、StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している配列番号390)(図19(b))。

20

【0635】

挿入の増加を示すポア(図20および21)

図20および21の比較によってわかるように、図21に示される変異体ポアCsgG-Eco-(T150I-StrepII(C))9(変異T150Iを有し、StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している配列番号390)は、CsgG-Eco-(StrepII(C))(StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している配列番号390)ポア(図20を参照されたい)と比較して増加したポア数(約4~5倍)で膜に存在した。図20および21の矢印は、4時間の実験でブロックコポリマーに挿入されたCsgG-Ecoナノポアの数を図示した(図20の130~140個、および図21の1~11個は、それぞれ個別のナノポア実験に対応した)。CsgG-Eco-(StrepII(C))(StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合している、配列番号390)に関して、3つの実験は、1つのナノポアの挿入を示したが、変異体ポア(CsgG-Eco-(T159I-StrepII(C))9)に関して、それぞれの実験は、少なくとも1つのナノポアの挿入を示し、いくつかの実験は多数のポア挿入を示した。

30

【実施例19】

【0636】

本実施例は、CsgGポアを精製するために開発された大腸菌(E.coli)精製法を記述する。

【0637】

40

材料および方法

ポリペプチドPro-CsgG-Eco-(StrepII(C))(StrepII(C))が配列番号435であり、C-末端に結合しており、Proが配列番号436であり、N-末端に結合している配列番号390)をコードするDNAをGenScript USA Inc. が合成し、アンピシリン耐性遺伝子を含むpT7ベクターにクローニングした。pT7ベクターのタンパク質発現を、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)によって誘導した。DNA溶液の濃度を400ng/μlに調節した。DNA(1μl)を使用してLemo21(DE3)コンピテント大腸菌(E.coli)細胞(50μl、NEB、カタログ番号C2528H)を形質転換した。形質転換の前に、Lemo21(DE3)細胞(Gene Bridges GmbH, Germany)

50

から C s g G 遺伝子をノックアウトした。次に、細胞を、アンピシリン (0 . 1 m g / m l) を含む L B 寒天に播種して、37 で約 16 時間インキュベートした。

【0638】

アンピシリンを含有する L B プレート上で増殖させた細菌コロニーは、C s g G プラスミドを取り込んだ。そのような 1 つのコロニーを使用して、カルベニシリン (0 . 1 m g / m l) を含有する L B 培地 (100 m l) の開始培養物に接種した。開始培養物を、O D 600 が 1 . 0 ~ 1 . 2 に達するまで攪拌しながら 37 で増殖させた。開始培養物を使用して、カルベニシリン (0 . 1 m g / m l) およびラムノース (500 μ M) を含有する新しい L B 培地 500 m l に O . D . 600 が 0 . 1 となるように接種した。培養物を、O D 600 が 0 . 6 に達するまで、37 で攪拌しながら増殖させた。次に、培養物の温度を 18 に調節して、IPTG (最終濃度 0 . 2 m M) を添加して誘導を開始した。誘導は、攪拌しながら 18 で約 18 時間行った。

10

【0639】

誘導後、培養物を 6 , 000 g で 30 分間の遠心分離によりペレットにした。ペレットを、プロテアーゼ阻害剤 (Merck Millipore、539138)、ベンゾナーゼヌクレアーゼ (Sigma、E1014)、および 1 × バグバスター (Merck Millipore、70921) pH 8 . 0 を含む 50 m M Tris、300 m M NaCl に懸濁させた (ペレット 1 グラムあたり緩衝液約 10 m l)。懸濁液を、完全に均一になるまで十分に混合した後、試料を 4 のローラーミキサーに約 5 時間移した。溶解物を 20 , 000 g で 45 分間の遠心分離によりペレットにして、上清を 0 . 22 μ m の PES シリンジフィルターを通してろ過した。C s g G を含有する上清 (試料 1 として知られる) を、カラムクロマトグラフィーによる精製のために残した。

20

【0640】

試料 1 を 5 m l Strep Trep カラム (GE Healthcare) に適用した。カラムを、10 カラム容積の安定なベースラインが維持されるまで 25 m M Tris、150 m M NaCl、2 m M EDTA、0 . 01 % DDM、pH 8 によって洗浄した。次いで、カラムを 25 m M Tris、2 M NaCl、2 m M EDTA、0 . 01 % DDM、pH 8 によって洗浄後、150 n M 緩衝液に戻した。10 m M デスチオビオチンによって溶出を行った。C s g G タンパク質の Strep trap (GE Healthcare) 精製のクロマトグラフィートレースの一例を図 23 に示す。溶出ピーク 1 を E 1 と表示する。図 24 は、初回 Strep 精製後の C s g G - Eco タンパク質の典型的な SDS - PAGE 可視化の例を示す。レーン 1 ~ 3 は、矢印で示されるように C s g G タンパク質を含有する主要な溶出ピーク (図 23 において E 1 と表示) を示す。レーン 4 ~ 6 は、混入物を含有する主要な溶出ピーク (図 23 において E 1 と表示) のテール部の溶出分画に対応した。

30

【0641】

溶出ピークをプールして、65 で 15 分間加熱し、熱に不安定な混入タンパク質を除去した。加熱した溶液を 20 , 000 g で 10 分間の遠心分離に供して、ペレットを破棄した。上清を、25 m M Tris、150 m M NaCl、2 m M EDTA、0 . 01 % DDM、0 . 1 % SDS、pH 8 中で 120 m l Sephadex S200 カラム (GE Healthcare) によるゲルろ過に供した。タンパク質のトリプトファン成分が少ないために 220 n m でモニタリングを行った。試料は約 55 m l の容積で溶出した (図 25 は、サイズ排除カラムトレースを示し、55 m l の試料ピークを星印で表示する)。溶出ピークを 4 ~ 20 % TGX (図 26、Bio Rad) で泳動させて、目的のポア C s g G - Eco - (Strep II (C)) (Strep II (C) が配列番号 435 であり、C - 末端に結合している配列番号 390) の存在を確認した。同定された分画をプールして 50 k D Amicon スピンカラムによって濃縮した。

40

【実施例 20】

【0642】

本実施例は、C s g G - Eco - (Y51T / F56Q) - (Strep II (C))

50

9 (Y 5 1 T / F 5 6 Q 変異を有し、 S t r e p I I (C) が配列番号 4 3 5 であり、 C - 末端ポア変異体 2 0 に結合している配列番号 3 9 0) と T 4 D d a - (E 9 4 C / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C) (変異 E 9 4 C / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C を有し、次いで (M 1) G 1 G 2 である配列番号 4 1 2) との相互作用を調べるために実行するシミュレーションを記述する。

【 0 6 4 3 】

シミュレーション方法

G R O M A C S パッケージバージョン 4 . 0 . 5 を使用して、G R O M O S 5 3 a 6 カ場および S P C 水モデルによってシミュレーションを実施した。

【 0 6 4 4 】

C s g G - E c o (Y 5 1 T / F 5 6 Q) - (S t r e p I I (C)) 9 (Y 5 1 T / F 5 6 Q 変異を有し、 S t r e p I I (C) が配列番号 4 3 5 であり、 C - 末端ポア変異体 2 0 に結合している配列番号 3 9 0) モデルは、タンパク質データバンクの受託コード 4 U V 3 および 4 Q 7 9 で見出される C s g G の結晶構造に基づいた。関連する変異を、P y M O L を使用して作製した。得られたポアモデルを、次に最急降下アルゴリズムを使用してエネルギーを最小限にした。T 4 D d a - (E 9 4 C / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C) (変異 E 9 4 C / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C を有し、(M 1) G 1 G 2 である配列番号 4 1 2) モデルは、タンパク質データバンクの受託コード 3 U P U に見出される D d a 1 9 9 3 構造に基づいた。この場合も、関連する変異を、P y M O L を使用して作製し、モデルを最急降下アルゴリズムを使用してエネルギーを最小限にした。

【 0 6 4 5 】

T 4 D d a - (E 9 4 C / C 1 0 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C) (変異 E 9 4 C / C 1 0 9 A / C 1 3 6 A / A 3 6 0 C を有し、(M 1) G 1 G 2 である配列番号 4 1 2) モデルを次に、C s g G - E c o (Y 5 1 T / F 5 6 Q) - (S t r e p I I (C)) 9 (変異 Y 5 1 T / F 5 6 Q を有し、 S t r e p I I (C) が配列番号 4 3 5 であり、 C - 末端ポア変異体 2 0 に結合している配列番号 3 9 0) の上に置いた。異なる初回酵素コンフォメーション (実行 1 ~ 3 (0 n s) 、図 4 0 を参照されたい) について、3 つのシミュレーションを実施した。

【 0 6 4 6 】

全ての酵素コンフォメーションにおいて、DNA の 5 ' 末端がポアの方を向くように酵素を配置したところ、酵素はシミュレーションを通して制限を受けなかった。ポアの骨格は制限され、シミュレーションボックスは溶媒和された。系を、B e r e n d s e n サーモスタットおよび B e r e n d s e n バロスタットを 3 0 0 K で使用して N P T アンサンブルにおいて 4 0 ナノ秒間シミュレートした。

【 0 6 4 7 】

酵素とポアとの間の接触を、G R O M A C S 分析ソフトウェアとローカルな手書きコード (locally written code) の両方を使用して分析した。以下の表は、ポアおよび酵素アミノ酸の両方について観察された接触数を示す。表 6 ~ 8 は、酵素上のアミノ酸接点と相互作用するポア上のアミノ酸接点を示す。3 つのシミュレーションのうち 2 つにおいて、酵素はポアの上部で傾斜する (実行 2 および 3 (2 0 、 3 0 、および 4 0 ナノ秒) 、図 4 0 および 4 1 を参照されたい) 。実行 1 は、酵素が傾斜せずそのため、表 6 において高い相互作用を有することが示された点を、ポアキャップ上の酵素安定性を増加させるために最適化できることを示している。

【 0 6 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

ポア	酵素	接触数
ASN 102	ASP 198	8200
ASN 102	TYR 438	8130
GLN 100	ASP 212	7369
GLU 101	TRP 195	5979
ARG 97	TYR 350	4873
GLU 101	LEU 215	4851
ASN 102	TRP 195	3988
ARG 97	TYR 415	3798
GLU 101	TYR 350	3759

10

【 0 6 4 9 】

20

30

40

50

【表 6 - 2】

ポア	酵素	接触数
LEU 113	ASP 212	3718
ASN 102	LYS 358	3124
ARG 97	GLY 211	2765
GLU 101	CYS 412	2715
ARG 97	GLY 193	2708
ASN 102	ILE 196	2342
GLU 101	TYR 415	2268
GLU 101	ARG 216	2158
ARG 110	THR 213	2094
ARG 110	ASP 212	2066
GLY 103	ARG 216	1456
GLU 101	TYR 318	1333
ASN 102	GLU 347	1316
GLU 101	LYS 194	1310
ARG 97	PRO 411	1203
GLU 101	LYS 358	1161
ASN 102	ARG 216	1132
ARG 97	TRP 195	888
LYS 94	TYR 415	793
ASN 102	PRO 315	696
ASN 102	LYS 247	541
GLU 101	ALA 214	449
ASN 102	ASP 346	440
ARG 97	ALA 214	366
ARG 97	LYS 194	336
GLU 101	ASP 212	302
ARG 97	VAL 439	267
ARG 110	THR 210	263
ARG 97	THR 210	259
ARG 97	GLN 422	257
GLU 101	TYR 409	228
ALA 98	TRP 195	207
GLU 101	LYS 247	201
ASN 102	GLU 317	179
ARG 110	ARG 216	147

10

20

30

40

【 0 6 5 0 】

【表 6 - 3】

ポア	酵素	接触数
ARG 97	ASP 212	108
ASN 102	VAL 314	87
GLU 101	THR 213	72
ASN 102	LYS 255	70
VAL 105	ARG 216	69
ASN 102	LEU 215	59
ASN 102	THR 210	55
ILE 111	ASP 212	48
ARG 97	HIS 414	48
THR 104	ARG 216	36
ASN 102	TYR 197	32
GLN 100	THR 213	30
ASN 102	GLU 361	28
ARG 97	VAL 418	28
ALA 98	TYR 415	27
GLU 101	LEU 354	17
GLU 101	TYR 197	16
ASN 102	GLY 316	16
ARG 97	GLU 361	16
ARG 97	GLU 347	14
ILE 107	ARG 216	12
ASN 102	GLY 208	12
ARG 97	TYR 409	11
ARG 97	LYS 247	11
GLU 101	LYS 364	8
ARG 97	PHE 209	7
LYS 94	GLU 419	6
GLU 101	PRO 411	5
GLU 101	GLU 317	5
ASN 102	ILE 251	5
ARG 97	LEU 354	5
LYS 94	VAL 418	3
ASN 102	ARG 321	3
ARG 97	LYS 243	3
LYS 94	CYS 412	2

10

20

30

40

【 0 6 5 1 】

50

【表 6 - 4】

ポア	酵素	接触数
LEU 113	THR 210	2
GLY 103	GLU 317	2
GLU 101	LYS 351	2
ASN 102	TYR 318	2
ASN 102	MET 219	2
ASN 102	LYS 194	2
ARG 97	VAL 314	2
ARG 97	LYS 364	2
THR 104	PRO 315	1
GLY 103	THR 213	1
GLU 101	PRO 315	1

表 6=実行 1 酵素とポアの接触相互作用

【 0 6 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

ポア	酵素	接触数
GLU 101	THR 210	14155
SER 115	ASP 202	9477
ARG 97	THR 210	9064
ASN 102	VAL 200	5323
THR 104	ASP 202	4476
ASN 102	ASN 221	3422
GLU 101	PHE 437	3171
ARG 97	ASP 217	2698
GLU 101	ARG 216	2198
ARG 97	GLY 208	1730
GLU 101	LYS 199	1710
SER 115	SER 224	1440
ASN 102	LYS 199	1351
ASN 102	ASP 212	1298
ASN 102	ARG 405	1219
GLU 101	ARG 207	1180
ASN 102	SER 224	1150
ASN 102	LYS 255	1114
ARG 97	ASP 198	946
GLU 101	PHE 209	931
ARG 97	THR 213	791

10

20

30

【 0 6 5 3 】

40

50

【表 7 - 2】

ポア	酵素	接触数
ARG 97	ARG 216	599
ASN 102	THR 210	589
GLN 114	ASP 202	530
ASN 102	ASP 202	492
ARG 97	ASP 212	490
GLY 103	ARG 405	474
THR 104	SER 224	451
GLU 101	LYS 255	429
ASN 102	ASP 198	405
ASN 102	PHE 209	400
ASN 102	ARG 178	316
ARG 110	GLU 258	309
ASN 102	ASN 180	257
GLN 100	PHE 223	256
GLU 101	TYR 197	220
GLN 114	SER 228	212
LEU 113	PHE 223	210
ASN 102	ILE 225	204
GLN 114	LYS 227	194
GLU 101	GLY 211	189
GLU 101	ASP 212	174
LEU 113	SER 224	159
LEU 113	GLY 203	145
ARG 97	VAL 220	134
GLU 101	THR 213	133
THR 104	SER 228	125
ARG 97	TYR 197	123
LYS 94	ASP 212	118
ASN 102	ARG 216	110
ASN 102	ASN 235	108
ASN 102	GLY 211	104
GLU 101	ARG 405	79
GLN 114	SER 224	69
ASN 102	VAL 220	63
LEU 113	LYS 227	49

10

20

30

40

【 0 6 5 4 】

50

【表 7 - 3】

ホア	酵素	接触数
ASN 102	VAL 201	42
ARG 97	PHE 209	42
GLU 101	ASN 180	40
ARG 97	TYR 438	38
ARG 97	ARG 207	32
ASN 102	PHE 407	28
SER 115	ASN 221	23
ARG 110	HIS 204	22
GLU 101	PHE 223	21
ARG 97	ASP 189	19
ARG 110	PHE 223	16
THR 104	ILE 225	13
GLY 103	ASN 180	11
ARG 97	LYS 194	11
GLU 101	PHE 407	10
ARG 97	MET 219	9
THR 104	ASN 235	8
ARG 110	ARG 405	8
ARG 97	TRP 195	7
ILE 111	PHE 223	6
GLU 101	GLY 208	6
LEU 113	ASP 202	5
GLU 101	ARG 178	5
ASN 102	THR 213	5
ALA 98	ARG 216	5
ASN 102	ASP 217	4
ARG 97	LYS 199	4
THR 104	LEU 229	3
THR 104	ARG 405	3
GLU 101	VAL 201	3
GLU 101	MET 219	3
ARG 110	ASP 202	3
ARG 110	ARG 207	2
THR 104	VAL 201	1
GLY 103	SER 224	1

10

20

30

40

【 0 6 5 5 】

【表 7 - 4】

ポア	酵素	接触数
GLY 103	LYS 255	1
GLY 103	GLU 258	1
GLY 103	ASN 235	1
GLU 101	ASP 198	1
ASN 102	PHE 437	1
ARG 97	PHE 437	1
ARG 110	LYS 227	1

表 7=実行 2 酵素とポアの接触相互作用

【 0 6 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

ポア	酵素	接触数
ARG 97	THR 174	15557
GLN 100	ASP 5	10353
GLU 101	LYS 177	9238
ARG 97	SER 179	6630
LEU 116	ASP 202	6545
GLU 101	TYR 434	6524
SER 115	ASP 202	5693
GLU 101	HIS 204	5457
ARG 97	GLN 10	5106
ARG 93	ASP 202	4646
ARG 93	GLU 8	4446
SER 115	LYS 11	4342
LEU 113	ASP 5	3871
ASN 102	SER 224	3605
GLU 101	ASN 12	3344
GLU 101	GLN 10	3327
ARG 97	GLU 175	3096
GLU 101	SER 224	3028
LEU 116	GLU 8	2936
LYS 94	ASP 185	2708
ARG 97	ASN 180	2700
GLU 101	PHE 3	2500
THR 104	LYS 11	2352
SER 115	GLU 8	2323
ARG 93	ASN 180	1912

10

20

30

【 0 6 5 7 】

40

50

【表 8 - 2】

ポア	酵素	接触数
ASN 102	LYS 177	1838
LYS 94	ASP 198	1828
ARG 110	ASP 5	1714
ALA 98	GLY 203	1701
ASN 102	ASN 12	1695
GLU 101	TYR 169	1691
ARG 97	THR 7	1593
ARG 110	ASP 4	1404
ARG 97	ASP 212	1381
ASN 102	HIS 204	1226
ASN 102	ASN 15	1173
ARG 97	VAL 176	1096
ALA 98	HIS 204	998
ARG 97	ASP 202	875
ASN 102	TYR 434	850
ALA 98	ASN 12	716
GLU 101	THR 213	702
GLU 101	ARG 178	642
GLU 101	ASN 221	600
ASN 102	LYS 11	588
ARG 97	ASP 217	585
ARG 97	ARG 207	537
GLU 101	ARG 207	525
ARG 97	PHE 437	511
GLU 101	ARG 216	510
ASN 102	LYS 19	482
ARG 97	HIS 204	473
LEU 113	LYS 11	409
ARG 97	THR 213	358
ARG 93	ASP 212	354
ARG 97	TYR 169	316
ARG 97	GLY 203	308
ARG 97	ASP 435	300
GLN 87	LYS 199	249
THR 104	ASN 15	221

10

20

30

40

【 0 6 5 8 】

50

【表 8 - 3】

ポア	酵素	接触数
ARG 97	ALA 181	220
ASN 102	LYS 227	198
LYS 94	ARG 178	184
ASN 102	GLU 8	183
LEU 113	LEU 6	182
ARG 93	SER 179	179
LEU 90	ASN 180	172
LEU 90	ASP 202	144
ARG 97	ILE 225	138
GLU 101	ASN 15	135
GLU 101	LYS 19	113
LYS 94	ASN 180	109
LYS 94	GLU 175	105
ARG 93	THR 7	81
LYS 94	ARG 207	77
GLN 100	PHE 3	72
ASN 102	ARG 216	66
ARG 97	LYS 177	62
GLU 101	THR 210	59
ARG 97	ARG 178	56
LYS 94	ASP 212	55
ARG 97	GLU 172	53
GLU 101	VAL 176	51
ALA 98	ARG 207	49
ARG 110	PHE 3	48
ALA 98	ASP 202	47
ARG 97	VAL 200	40
ALA 98	VAL 201	36
LYS 94	THR 210	35
ILE 111	ASP 5	32
ARG 97	ARG 405	27
LEU 90	VAL 200	26
ARG 97	THR 210	26
GLY 103	PHE 3	25
GLU 101	PHE 209	25

10

20

30

40

【 0 6 5 9 】

50

【表 8 - 4】

ポア	酵素	接触数
ARG 97	ARG 216	22
ASN 102	VAL 220	21
LYS 94	GLY 211	19
ARG 97	PHE 209	17
GLU 101	LYS 227	15
GLN 114	LYS 11	15
GLY 103	LYS 19	13
ARG 97	PHE 3	13
GLU 101	THR 2	12
GLU 101	ILE 225	12
ARG 97	ILE 184	12
ALA 98	GLU 8	12
ALA 98	ARG 178	12
ASN 102	ILE 225	11
LYS 94	LYS 199	10
GLU 101	ARG 433	8
ARG 97	ASN 221	8
LYS 94	VAL 200	7
ASN 102	ASP 202	7
ASN 102	ASN 221	7
ARG 97	LEU 173	7
SER 115	HIS 204	6
ASN 102	GLY 203	6
GLU 101	CYS 171	5
ARG 97	ASN 12	5
ASN 102	PHE 223	4
ASN 102	LYS 166	4
ARG 97	GLY 211	4
ARG 97	GLN 170	4
GLU 101	ARG 405	3
ASN 102	PHE 3	3
GLU 101	GLU 175	2
ARG 97	VAL 220	2
ARG 93	GLY 203	2
LYS 94	THR 174	1

10

20

30

40

【 0 6 6 0 】

50

【表 8 - 5】

ポア	酵素	接触数
LEU 90	LYS 199	1
LEU 116	ASN 180	1
LEU 113	ASP 212	1
LEU 113	ASP 202	1
GLY 103	ASN 15	1
GLU 101	THR 7	1
GLU 101	PHE 437	1
GLN 114	ASP 202	1
ASN 102	ARG 405	1
ARG 97	TYR 434	1
ARG 97	PRO 182	1
ARG 97	GLY 9	1
ARG 97	GLU 8	1
ALA 99	ASP 202	1

10

20

表 8=実行 3 酵素とポアの接触相互作用

【実施例 2 1】

【0661】

チャネル狭窄において C s g G ナノポアが核酸を捕捉する能力

核酸シーケンシングのためのナノポアの使用は、ナノポアによる一本鎖 DNA の捕捉および貫通を必要とする。本実施例において、C s g G W T タンパク質の単一チャネル電流トレースを、一本鎖 DNA オーバーハングを有する DNA ヘアピンの存在下で追跡した。図 5 6 に示す本実施例のトレースは、+ 5 0 m V または - 5 0 m V の間隔（矢印で示す）で測定される電位にตอบสนองして変化する電流を示す。最後の + 5 0 m V セグメントにおける下向き電流の遮断は、内部ポア構築の中への一本鎖ヘアピンの末端が貫通していることを表し、ほぼ完全な電流の遮断が起こる。電場を - 5 0 m V に逆転させると、ポアの電気泳動の遮断解除が起こる。新たな + 5 0 m V エピソードによって、再度 DNA ヘアピン結合およびポア遮断が起こる。+ 5 0 m V セグメントにおいて、ヘアピン構造のアンフォールディングによって、電流遮断の逆転によって示される電流遮断の終了が起こりうる。

配列 3' G C G G G G A G C G T A T T A G A G T T G G A T C G G A T G C A G C T G G C T A C T G A C G T C A T G A C G T C A G T A G C C A G C A T G C A T C C G A T C - 5'（配列番号 4 4 1）を有するヘアピンを最終濃度 1 0 n M で小室のシス側に添加した。

30

40

【実施例 2 2】

【0662】

本実施例は、変化した内部狭窄を有する変異体 C s g G ポアの生成を記述する。

【0663】

本実施例において、狭窄ループにおける配列 P Y P A（残基 5 0 ~ 5 3）が G G に置換されている変異体 C s g G ポアである C s g G - P Y P A に関して、安定性およびチャネル特性を証明する。この変異体に関して 3 8 ~ 6 3 位の狭窄モチーフは、配列番号 3 5 4 に対応する。この変異は、ポアの読み取りヘッド、すなわちセンシング用途の際に測定

50

される導電率が基質の結合またはポアの貫通の性質に対して最も感受性があるポアの最も狭い部分、の複雑さを低減するために、ポア狭窄からY51の除去および狭窄ループの短縮を予見している。PYP A配列の置換は、C s g Gノナマーの安定性を保持し、図57に示されるように導電率の増加を有するポアが得られる。

【0664】

C s g G - PYP Aポア変異体を、Nanion (Munich, Germany) のOrbit 16キットによる同時の高分解能電氣的記録を使用する単一チャンネル電流記録によって分析した。簡単に説明すると、1,2-ジフタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (Avanti Polar Lipids) の水平二重層を、16-チャンネルマルチ電極キャピティアレイ (MECA) チップ (lonera, Freiburg, Germany) 51においてマイクロキャピティ (ピコリットル容積以下の) の上に形成した。二重層の上および下のシスおよびトランスキャピティの両方が、1.0 M KCl、25 mM Tris-HCl、pH 8.0を含有した。チャンネルを膜に挿入するために、25 mM Tris、pH 8.0、500 mM NaCl、1 mM DTT、0.5 % C8E4、5 mM LDAOに溶解したC s g Gを、最終濃度100 nMでシス区画に添加した。H膜通過電流を、Tecella Triton 16チャンネル増幅器を使用して、ロウパスフィルタリング周波数3 kHzおよびサンプリング周波数10 kHzで+50 mVおよび-50 mV (シス側を接地) の保持電位で記録した。電流のトレースをpClampスイート (Molecular Devices, USA) のClampfitを使用して分析した。

【実施例23】

【0665】

本実施例は、細菌アミロイド分泌チャンネルC s g Gに対する構造的および力学的洞察を記述する。

【0666】

C u r l iは、バクテロイデス属 (Bacteroidetes) およびプロテオバクテリア (Proteobacteria) (主にaおよびc綱) ¹⁻³によって形成される菌膜バイオフィームにおける細胞外マトリクスの主要なタンパク質成分を構成する機能的アミロイド線維である。これらは、病原性の株において適応度の利点をもたらし、細菌血症の際に強い炎症促進性応答を誘導する^{1,4,5}。C u r l iの形成は、外膜リポタンパク質C s g Gおよび2つの可溶性アクセサリタンパク質であるC s g EおよびC s g F^{6,7}を含む専用のタンパク質分泌機構を必要とする。本明細書において、本発明者らは、非脂質化可溶性型ならびにそのネイティブな膜抽出コンフォメーションの大腸菌 (Escherichia coli) C s g GのX線構造を報告する。C s g Gは、二重層を横切る36ストランドの α -バレルを生じて、周辺質のケージ様の前庭に接続される9個のアンチコドン結合ドメイン様単位で構成されるオリゴマー輸送複合体を形成する。膜貫通ドメインと周辺質ドメインとは、分泌ポアの中に細長いポリペプチド基質を誘導しうる、3つのスタックされた同心円のフェニルアラニン、アスパラギン、およびチロシン環で構成される0.9 nmのチャンネル狭窄によって隔てられている。特異性因子C s g Eは、分泌チャンネルの周辺質面に結合して閉じるノナマーアダプターを形成し、24,000³の狭窄前小室を作製する。本発明者らの構造、機能、および電気生理学分析は、C s g Gが、拡散に基づくエントロピー駆動性の輸送機構を用いると予想される無ゲートの非選択的タンパク質分泌チャンネルであることを暗示している。

【0667】

C u r l iは、アミロイド原線維の構造および物理的特徴を有する細菌表面付属器であり、ヒトの変性性疾患⁷⁻⁹由来のものが最もよく知られている。しかし、c u r l iなどの細菌アミロイドの役割は、バイオフィーム形成を促進することである^{4,10}。タンパク質ミスフォールディングの産物である病原性のアミロイドとは異なり、c u r l iの形成は、2つの専用のオペロン、大腸菌 (Escherichia coli) におけるc s g B A C (c u r l i特異的遺伝子B A C) およびc s g D E F G (図46)^{6,7}においてコードされるタン

パク質によって調整されている。分泌後、C s g Bは、C s g Aサブユニットの核を形成してc u r l i線維となる^{7, 11, 12}。C s g AおよびC s g Bの分泌および細胞外沈着はそれぞれ、2つの可溶性アクセサリ因子であるC s g EおよびC s g F、ならびに外膜に位置する262残基のリポタンパク質であるC s g Gに依存する^{13 ~ 16}。加水分解可能なエネルギー源または外膜でのイオン勾配がないために、C s g Gは、代替のエネルギー賦活輸送機構を通して作動しなければならないタンパク質転位因子の特殊なクラスに分類される。構造モデルが不在であるため、C s g Gが生体膜を超えて調節された様式で非常に安定なアミロイド様の線維の分泌および集合をどのように促進するのかに関する動力学的研究はこれまで、不可解なままであった。

【0668】

外膜に挿入する前に、リポタンパク質は、リポタンパク質局在(L o l)経路¹⁷によって周辺質を超えて誘導される。本発明者らは、ポア形成タンパク質および毒素で観察されるプレポア形態¹⁸と類似の、可溶性の周辺質中間体として、非脂質化C s g G (C s g G c 1 s)を単離できることを観察した。C s g G c 1 sは、別個のオリゴマー複合体の小さい分画に加えて、モノマーとして主に見出された(図47)¹⁹。可溶性のC s g G c 1 sオリゴマーは、結晶化され、その構造は2.8 Åであると決定され、テール-テール相互作用で結合した2つの環状オクタマー複合体(C8)からなる8回二平面对称性(D8)を有するヘキサデカマー粒子であることが判明した(図47および図46)。C s g G c 1 sプロトマーは、アミノおよびカルボキシ末端(それぞれ、NおよびC、図42および図48a ~ c)で2つの α -ヘリックスと共に伸長するアンチコドン結合ドメイン(ABD)様の折り畳みを示す。さらなるC s g G特異的エレメントは、1と1とを連結する細長いループであり、ループにおける2つの挿入は、3-4および5-3と、隣接するモノマー間でのパッキングによってC s g Gオリゴマー化に係る細長い2ヘリックスを接続する(図42b)。さらに、3-5シートの背部と細長い1-1ループの間にプロトマー間の接点形成される(図48d、e)。

【0669】

C s g G c 1 sの構造において、1をN-末端脂質アンカーに連結させる残基1 ~ 17は、無秩序であり、明白な膜貫通(TM)ドメインを識別することができない(図42)。C s g G c 1 sおよびネイティブの膜抽出C s g Gの全反射測定フーリエ変換赤外分光法(ATR-FTIR)は、膜抽出C s g Gがシート領域(1,625 ~ 1,630 cm⁻¹)においてより高い吸収を有すること、ならびにランダムコイルおよび α -ヘリカル領域(それぞれ、1,645 ~ 1,650 cm⁻¹および1,656 cm⁻¹、図43a)で同時に低減することを明らかにし、膜会合C s g Gが β -バレルドメインを含有することを示唆している。鎖形成の候補となる一連の配列は、3-4(残基134 ~ 154)と5-3(残基184 ~ 204)とを接続する秩序化が不良な細長いループに見出された；これらが欠失すると、c u r l i形成が失われた(図43b)。洗浄剤抽出C s g Gの結晶構造は、両方の領域のコンフォメーションの再配列により2つの隣接する α -ヘアピンが形成され、3-4(TM1)および5-3(TM2)によって形成されるシートを伸長させることを確認した(図43c)。C s g Gオリゴマーにおいてそれらが近接位置にあることにより、複雑な36ストランドの β -バレルを生じた(図43d)。結晶化されたC s g G c 1 sオリゴマーはD8対称性を示したが、C s g G構造はD9対称性を示し、C s g Gプロトマーは、中心軸に対して5°回転し、放射軸に沿って4の並進を除き、同等のプロトマー間接触を保持した(図47)。この知見は、膜抽出C s g Gに関してC9およびD9対称性のみを見出した単粒子電子顕微鏡によって明らかとなった溶液中のオリゴマー状態と一致する(図47)。非脂質化試料中にモノマーが主に存在すること、および膜結合タンパク質との対称性のミスマッチは、膜挿入の前に、C s g GがモノマーのL o l A-結合型で外膜を標的とすること、ならびにC8およびD8粒子がC s g G c 1 sの高濃度溶液のアーチファクトであることを主張する。さらに、本発明者らは、単離された大腸菌(E.coli)外膜において、観察されたテール-テールダイマー形成に閉じ込められる残基をシステインに置換すると、マレイミドポリエチレングリコ

ール (P E G、5 k D a ; 図 4 9) による標識に対してアクセス可能であることから、D 9 複合体ではなくて C 9 ノナマーが生理的に重要な粒子を形成することを示している。

【 0 6 7 0 】

このため、C s g G は、幅 1 2 0 で高さ 8 5 のノナマー輸送複合体を形成する。複合体は、内径 4 0 の 3 6 ストランドの バレルを通して外膜を横切る (図 4 3 e)。N - 末端脂質アンカーは、隣接するプロトマーを包む 1 8 残基のリンカーによってコアドメインから隔てられている (図 4 8 d)。N - 末端 C y s におけるジアシルグリセロールおよびアミド連結アシル鎖は、電子密度マップでは分解されていないが、L e u 2 の位置に基づいて、脂質アンカーは、 - バレルの外壁に隣接すると予想される。周辺質側では、トランスポーターは、ヘリックス 2 によって形成された 5 0 の開口部を周辺質に開く、内径 3 5 で高さ 4 0 の溶媒アクセス可能な大きいキャビティを形成する (図 4 3 e)。その頂点において、この周辺質前庭は、1 と 1 とを接続する保存された 1 2 残基のループ (C - ループ ; 図 4 3 e および 4 4 a、b) によって T M チャンネルから隔てられており、これは分泌導管を 9 . 0 の溶媒除外直径へと狭窄する (図 4 4 a、c)。これらのボアの寸法は、残基 5 個が狭窄の高さに及ぶ 1 または 2 個の (例えば、ループ構造の) 細長いポリペプチドセグメントの存在と適合する (図 5 0)。狭窄の管腔内層は、残基 T y r 5 1、A s n 5 5、および P h e 5 6 の側鎖によって形成された 3 つのスタックされた同心円の環で構成される (図 4 4 a、b)。炭疽菌 P A 6 3 毒素において、位相学的に同等の同心円の P h e 環 (- クランプと呼ばれる) は、転位チャンネルの入口に存在し、ポリペプチドの捕捉および通過を触媒する^{2 0 ~ 2 2}。C s g G 様転位因子の多重配列アライメントは、P h e 5 6 の絶対的な保存および A s n 5 5 の S e r または T h r への保存的变化を示す (図 5 1)。P h e 5 6 または A s n 5 5 から A l a への変異によって、c u r l i 産生がほぼ失われるが (図 4 4 d)、A s n 5 5 から S e r への置換は、野生型の分泌レベルを保持し、- クランプのスタックされた立体配置の後に、C s g G 狭窄に水素結合ドナー / アクセプターが続く必要性を共に暗に示す (図 4 4 b および 図 5 1)。

【 0 6 7 1 】

平面リン脂質二重層に再構成された C s g G の単一チャンネル電流記録によって、標準的な電解質条件および + 5 0 m V または - 5 0 m V の電位を使用して、それぞれ $4 3 . 1 \pm 4 . 5$ p A (n = 3 3) または $- 4 5 . 1 \pm 4 . 0$ p A (n = 1 3) の定常電流が得られた (図 4 4 e、f および 図 5 2)。観察された電流は、単純な 3 セグメントボアモデルおよび X 線構造で見られる中心狭窄の寸法に基づいて計算された $4 6 . 6$ p A という予想される値と良好に一致した (図 4 4 c)。第二の低コンダクタンスコンフォメーションもまた、陰性電場電位で観察することができた ($- 2 6 . 2 \pm 3 . 6$ p A (n = 1 3) ; 図 5 2)。しかし、この化学種が生理的条件下で存在するか否かは不明である。

【 0 6 7 2 】

本発明者らの構造データおよび単一チャンネル記録は、C s g G が無ゲートのペプチド拡散チャンネルを形成することを暗示している。モデルペプチド拡散チャンネルである P A 6 3 において、ポリペプチドの通過は、転位チャンネルにおける拡散ステップを調整する p H 駆動性のブラウンラチェットに依存する^{2 0 ~ 2 2}。しかし、そのようなプロトン勾配は、外膜には存在せず、代替の駆動力を必要とする。高濃度の C s g G は周辺質ポリペプチドの非選択的拡散的漏出を促進するが、分泌はネイティブ条件では C s g A に特異的であり、周辺質因子 C s g E を必要とする^{1 6 , 2 3}。過剰量の C s g E の存在下では、精製 C s g G は、ネイティブ P A G E においてより遅く移動する化学種を形成する (図 4 5 a)。S D S - P A G E 分析は、この新しい化学種が、1 : 1 の化学量論で存在する C s g G - C s g E 複合体からなることを示している (図 4 5 b)。プルダウンアフィニティ精製により単離された C s g G - C s g E のクライオ電子顕微鏡 (クライオ - E M) による可視化により、C s g G ノナマーに対応する 9 回対称粒子、ならびに単粒子 E M およびサイズ排除クロマトグラフィーによっても同様に観察された C 9 C s g E オリゴマーとサイズおよび形状が類似の、周辺質前庭の入口部でさらなるキャッピング密度が明らかとなった (図 4 5 c ~ e、および 図 5 3)。観察された C s g G - C s g E 接触界面の位置は、C

s g Gヘリックス2における点突然変異を遮断することによって裏付けられた(図53)。キャッピング機能と一致して、単一チャンネル記録により、転位因子に対するC s g Eの結合がそのイオンコンダクタンスの特異的サイレンシングを引き起こすことが示された(図45fおよび図52)。このC s g Eによるチャンネルのキャッピングは、C s g Eノナー結合の関数において全が無かの応答であるように思われた。飽和すると、C s g E結合はチャンネルの完全な遮断を誘導したが、約10 nMでは、C s g E結合と解離事象との間の平衡によって、転位因子は、間欠的に遮断されるかまたは完全に開状態となった。1 nMまたはそれ未満では、モノマーC s g Eとの短時間の遭遇により、一過性の(<1ミリ秒)部分的遮断事象が起こりうる。

【0673】

このため、C s g GおよびC s g Eは、GroELシャペロニンおよびGroESコシャペロニン²⁴で見出される、見たところ基質結合キャビティおよびカプセル化蓋構造を想起させる、約24,000 Å³の中心キャビティを閉じ込めるケージ化複合体を形成するように思われる。C s g G - C s g Eの閉じ込めは、129残基のC s g Aの完全なまたは部分的捕捉と適合性であろう。転位基質のケージ化は、最近、ABC毒素で観察されている²⁵。アンフォールドされたポリペプチドの空間的拘束によって、そのコンフォメーション空間の減少が起こり、シャペロニンの場合のポリペプチドフォールディングによって都合がよいことが示されているエントロピー電位を生じる^{24, 26}。同様に、本発明者らは、curlinの輸送において、C s g G前庭におけるcurlinサブユニットの局所的高濃度およびコンフォメーションの拘束によって、転位チャンネルの上でエントロピー自由エネルギー勾配が生成されるであろうと推測する(図45g)。狭窄の中に捕捉されると、ポリペプチド鎖は、C s g E媒介拘束および/または分泌チャンネル近傍の基質捕捉により生成されるエントロピー電位によって調整されるブラウン拡散によって、次第に外側へと移動すると予想される。プレ狭窄キャビティ内で完全に拘束されるためには、アンフォールドされた129残基のポリペプチドのバルク溶媒への逃避は、最大約80 kcal・mol⁻¹(約340 kJ・mol⁻¹; 参考文献27)のエントロピー自由エネルギー放出に対応するであろう。基質のドッキングおよび拘束に関する初回のエントロピーコストは、C s g G - C s g E - C s g A複合体の集合の際に放出される結合エネルギー、および周辺質ですでに低下したC s g Aエントロピーによって少なくとも部分的に代償される可能性がある。理論的見地から、C s g Aの分泌複合体への動員に関して可能性がある3つの経路を想定することができる(図54)。

【0674】

Curlin誘導バイオフィームは、病原性の腸内細菌科(Enterobacteriaceae)において適応度およびビルレンス因子を形成する^{4, 5}。その独自の分泌および集合特性はまた、(生物)工学応用に関する関心が急速に得つつある^{23, 28, 29}。2つの重要な分泌成分に関する本発明者らの構造の特徴づけおよび生化学試験は、加水分解可能なエネルギー源、膜電位またはイオン勾配の不在下でのアンフォールドされたタンパク質基質の膜転位のための反復機構の暫定モデルを提供する(図45eおよび図54)。提唱される分泌モデルに関与する要因の完全なバリデーションおよび脱構築は、輸送の動力学を正確に1分子レベルで追跡するために転位因子のインビトロ再構成を必要とするであろう。

【0675】

方法

クローニングおよび株。外膜局在C-末端StreptII-タグC s g G(pPG1)および周辺質のC-末端StreptIIタグC s g Gc1s(pPG2)を産生するための発現構築物は、参考文献19に記述されている。セレノメチオンin標識の場合、収量を増加させるために、StreptIIタグC s g Gc1sを細胞質で発現させた。したがって、プライマー5'-TCTTTTAAACCGCCCGCCTAAAG-3'(フォワード)および5'-CATTTTGTCCCTCTGTTATC-3'(リバース)(pPG3)による逆転写PCRを使用してN-末端シグナルペプチドを除去するようにpPG2を変化させた。表現型アッセイの場合、大腸菌(E.coli)BW25141(大腸菌(E.coli)NV

10

20

30

40

50

G2) の *csgG* 欠失変異体を、参考文献30に記載される方法によって構築した(プライマー5'-AATAACTCAACC GAT TTT TAA GCC CCA GCT TCA TAA GGA AAA TAA TCG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C-3'および5'-CGC TTA AAC AGT AAA ATG CCG GAT GAT AAT TCC GGC TTT TTT ATC TGC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G-3'によって)。Cysアクセス可能性アッセイおよびチャネル狭窄の表現型プロービングのために使用する様々なCsgG置換変異体を、*trc*プロモーターの制御下で*csgG*を含むpTRC99aベクター¹⁴であるpMC2から開始する部位特異的変異誘発(QuickChangeプロトコル; Stratagene)によって構築した。

10

【0676】

タンパク質発現および精製。CsgGおよびCsgG_{C15}を、記述のように発現させて精製した¹⁹。簡単に説明すると、CsgGを、pPG1で形質転換した大腸菌(*E. coli*) BL21(DE3)において組み換えにより産生させ、単離された外膜から、緩衝液A(50mM Tris-HCl pH8.0、500mM NaCl、1mM EDTA、1mMジチオスレイトール(DTT))中で1% *n*-ドデシル- β -D-マルトシド(DDM)を使用して抽出した。StrepIIタグCsgGを5ml Strep-Tactin Sepharoseカラム(Iba GmbH)にロードして、0.5%テトラエチレングリコールモノオクチルエーテル(C8E4; Affymetrix)および4mM ラウリルジメチルアミン-N-オキシド(LDAO; Affymetrix)を補充した緩衝液Aの20カラム容積で洗浄することによって洗浄剤を交換した。2.5mM D-デスチオピオチンを添加してタンパク質を溶出させて、結晶化実験のために5mg \cdot ml⁻¹に濃縮した。セレノメチオニン標識に関して、CsgG_{C15}を、pPG3で形質転換したMet栄養素要求株B834(DE3)において産生させて、40mg \cdot l⁻¹ L-セレノメチオニンを補充したM9最少培地で増殖させた。細胞ペレットを、completeプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche)を補充した50mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl、1mM EDTA、5mM DTTに懸濁させて、20 \times 10³ lb \cdot in⁻²で作動するTSシリーズ細胞破碎装置(Constant Systems Ltd)の中を通過させて破碎した。標識されたCsgG_{C15}を、記述されるように精製した¹⁹。セレノメチオニンの酸化を防止するために、精製手順を通してDTT(5mM)を添加した。

20

30

【0677】

CsgEを、pNH27を有する大腸菌(*E. coli*) NEB2566細胞において産生させた(参考文献16)。25mM Tris-HCl、pH8.0、150mM NaCl、25mMイミダゾール、5%(容量/容量)グリセロール中の細胞溶解物をHiTrap FF(GE Healthcare)にロードした。CsgE-hisを、20mM Tris-HCl、pH8.0、150mM NaCl、5%(容量/容量)グリセロール緩衝液中で500mMイミダゾールへの直線勾配によって溶出した。CsgEを含む分画に250mM (NH₄)₂SO₄を補充して、20mM Tris-HCl、pH8.0、100mM NaCl、250mM (NH₄)₂SO₄、5%(容量/容量)グリセロールで平衡にした5ml HiTrap Phenyl HPカラム(GE Healthcare)に適用した。20mM Tris-HCl、pH8.0、10mM NaCl、5%(容量/容量)グリセロールへの直線勾配を、溶出のために適用した。CsgE含有分画を、20mM Tris-HCl、pH8.0、100mM NaCl、5容量%グリセロールで平衡にしたSuperose 6 Prep Grade 10/600(GE Healthcare)カラムにロードした。

40

【0678】

溶液中のオリゴマー化状態の評価。洗浄剤可溶性CsgG(0.5% C8E4、4mM LDAO)およびCsgG_{C15}のそれぞれ約0.5mgを、25mM Tris-HCl pH8.0、500mM NaCl、1mM DTT、4mM LDAO、および0.5%

50

C 8 E 4 (C s g G) または 25 mM Tris - HCl pH 8.0、200 mM NaCl (C s g G c 1 s) によって平衡にした Superdex 200 10 / 300 GL 分析的ゲルろ過カラム (GE Healthcare) に適用して、0.7 ml・分⁻¹ で実験した。カラムの溶出体積をウシサイログロブリン、ウシ - グロブリン、ニワトリ卵アルブミン、ウマミオグロビンおよびビタミン B 12 (Bio - Rad) によって校正した (図 47)。膜抽出 C s g G、洗浄剤可溶性タンパク質 20 mg も同様に、参考文献 31 に記述される手順を使用して 3 ~ 10 % ブルーネイティブ PAGE で泳動させた (図 47)。NativeMark (Life Technologies) 未染色タンパク質標準物質 (7 ml) を分子量推定のために使用した。

【0679】

結晶化、データ収集、および構造の決定。セレノメチオニン標識 C s g G c 1 s を 3.8 mg・ml⁻¹ に濃縮して、100 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.2、8 % PEG 4000、および 100 mM マロン酸ナトリウム pH 7.0 を含有する溶液に対して、シッティングドロップ蒸気拡散によって結晶化した。結晶を、15 % グリセロールを補充した結晶化緩衝液中でインキュベートして、液体窒素中で急速凍結した。洗浄剤可溶性 C s g G を 5 mg・ml⁻¹ に濃縮して、100 mM Tris - HCl pH 8.0、8 % PEG 4000、100 mM NaCl および 500 mM MgCl₂ を含有する溶液に対してハンギングドロップ蒸気拡散によって結晶化した。結晶を液体窒素中で急速凍結して、結晶化溶液中に存在する洗浄剤によって凍結保護した。結晶条件の最適化および良好な回折品質を有する結晶に関するスクリーニングのために、結晶を beamlines Proxima - 1 および Proxima - 2a (Soleil, France)、PX - I (Swiss Light Source, Switzerland)、I02、I03、I04、および I24 (Diamond Light Source, UK)、ならびに ID14eh2、ID23eh1、および ID23eh2 (ESRF, France) で分析した。C s g G c 1 s および C s g G の構造決定のために使用する最終的な回折データをそれぞれ、beamlines I04 および I03 で収集した (データ収集および精密化統計値に関しては図 55a を参照されたい)。C s g G c 1 s の回折データを Xia2 および XDS パッケージを使用して処理した^{32, 33}。C s g G c 1 s の結晶は、非対称単位にタンパク質 16 コピーを含有する、単位格子寸法 $a = 101.3$ 、 $b = 103.6$ 、 $c = 141.7$ 、 $\alpha = 111.3^\circ$ 、 $\beta = 90.5^\circ$ 、 $\gamma = 118.2^\circ$ の空間群 P1 に属した。構造の決定および精密化のために、波長 0.9795 Å で収集したデータを、最高分解能シェルにおいて 2 の | / | カットオフに基づいて 2.8 Å で切り捨てた。単波長異常分散 (SAD) 実験から計算した実験的位相を使用して構造を分解した。全体で 92 個のセレン部位が、Shellx C および Shellx D³⁴ を使用して非対称単位に位置づけられ、これを精密化して、Sharp³⁵ による位相計算 (フェーシングパワー 0.79、性能指数 (FOM) 0.25) のために使用した。実験的位相を密度修正して、Parrot³⁶ (図 55; FOM 0.85) を使用して非結晶学的対称性 (NCS) によって平均した。最初のモデルは、Buccaneer³⁷ が構築して、Phoenix refine³⁸ による最尤推定精密化の数ラウンドおよび手動精査、ならびに Coot³⁹ におけるモデル (再) 構築によって精密化した。最終構造は、16 C s g G c 1 s 鎖に属する 3,700 個の残基中に原子 28,853 個を含有し (図 47)、molprobity⁴⁰ スコアは 1.34 であった; 残基の 98 % が Ramachandran プロットの好ましい領域 (許容領域の 99.7 %) に存在する。電子密度マップは、可能な溶媒分子に対応する明白な密度を示さず、したがって水分子またはイオンは含まれなかった。精密化の初期および後期ステージでそれぞれ、厳密およびローカル NCS 制限を使用して、精密化を通して 16 回の NCS 平均化を維持した。

【0680】

C s g G の回折データを、波長 0.9763 Å で単結晶から収集して、XDS パッケージ^{32, 33} を使用して、非対称単位に C s g G 18 コピーおよび 72 % 溶媒含有量を包含する、単位格子寸法 $a = 161.7$ 、 $b = 372.3$ 、 $c = 161.8$ 、および

= 92.9°の空間群C2に指数化およびスケーリングした。構造決定および精密化のための回折データを、逆格子方向 a^* 、 b^* 、および c^* に沿って3.6、3.7、および3.8の分解能限界となるように楕円形に切り捨てて、Diffraction Anisotropy Server⁴¹によって異方性にスケーリングした。CsGGc1sモノマーを使用する分子置換は成功しなかった。自己回転関数の分析により、非対称単位におけるD₉対称性が明らかとなった(示していない)。CsGGc1sの構造に基づいて、C₈からC₉オリゴマーに移行した後、粒子周囲でのプロトマー間アークは、45°から40°まで変化したプロトマー間角とほぼ同じままであり、半径が計算上約4増加すると仮定して、ノナマー検索モデルを作成した。検索モデルとして計算されたノナマーを使用して、2コピーを含有する分子置換の解が、Phaser⁴²によって見出された。密度修正およびNC S平均電子密度マップの精査(Parr³⁶、図55)により、TM1およびTM2の手動での構築ならびにタンパク質コアにおける隣接残基のリモデリング、ならびにCsGGc1sモデルでは失われており、N-末端脂質アンカーに1ヘリックスを結合させる残基2~18の構築が可能となった。CsGGモデルの精密化を、初回および最終精密化ラウンドにおいてそれぞれ、Buster-TNT⁴³およびRefmac5(参考文献44)によって行った。精密化を通して18回のローカルNC S制限を適用し、Refmac5を、シグマ0.01によるゼリーボディ精密化およびProsmart⁴⁵によって生成された水素結合制限を用いて実行した。最終構造は、18CsGG鎖に属する4,451個の残基中に34,165個の原子を含有し(図47)、m_{ol}probityスコアは2.79であり、残基の93.0%がRamachandranプロットの好ましい領域(許容領域の99.3%)に存在する。N-末端脂質アンカーに対応する明白な電子密度は識別できなかった。

【0681】

コンゴレッドアッセイ。コンゴレッド結合の分析に関して、Lysogenyプロス(LB)中、37で増殖させた細菌の一晚培養物を、D₆₀₀が0.5に達するまでLB培地で希釈した。試料5μlを、アンピシリン(100mg・l⁻¹)、コンゴレッド(100mg・l⁻¹)、および0.1%(重量/容量)イソプロピル-D-チオガラクトシド(IPTG)を補充したLBアガープレートにスポットした。プレートを室温(20~22)で48時間インキュベートして、curl_i発現を誘導した。コロニー形態の発生および色素結合を48時間観察した。

【0682】

システインアクセス可能性アッセイ。システイン変異体を、部位特異的変異誘発を使用してpMC2において作製し、大腸菌(E.coli)LSR12において発現させた(参考文献7)。一晚増殖させた細菌培養物を、1mM IPTGおよび100mg・l⁻¹アンピシリンを含有するLBアガープレートにスポットした。プレートを室温でインキュベートして、細胞を48時間後に擦り取り、PBS 1mlに懸濁させて、D₆₀₀を使用して標準化した。細胞を超音波処理によって溶解して、4、3,000gで20秒間遠心分離して、非破碎細胞を細胞溶解物から除去して、膜を懸濁させた。上清中のタンパク質を15mMメトキシボリエチレングリコール-マレイミド(MAL-PEG、5kDa)によって室温で1時間標識した。100mM DTTによって反応を停止させて、50.4Tiローターにおいて4、40,000r.p.m.(約100,000g)で20分間遠心分離して、全ての膜をペレットにした。ペレットを1%ラウロイルサルコシン酸ナトリウムで洗浄して、細胞膜を可溶化し、再度遠心分離した。得られた外膜を、1%DDMを含有するPBSを使用して再懸濁させて可溶化した。ニッケルビーズによる金属親和性プルダウンをSDS-PAGEおよび抗Hisウェスタンブロットのために使用した。空のpMC2ベクターを有する大腸菌(E.coli)LSR12細胞を、陰性対照として使用した。

【0683】

ATR-FTIR分光法。ATR-FTIR測定を、液体窒素冷蔵テルル化カドミウム水銀検出器およびGolden Gate反射測定用アクセサリ(Specac)を備え

たEquinox 55赤外線分光光度計(Bruker)において、乾燥空気ですべてパージながら実施した。内部反射測定用元素はダイヤモンド結晶(2mm×2mm)であり、ビーム入射角は45°であった。各精製タンパク質試料(1μl)を結晶表面に広げて気体室素流下で乾燥させて被膜を形成させた。分解能2cm⁻¹で記録された各スペクトルは、シグナル対ノイズ比を改善するための積算処理が平均で128回であった。スペクトルは全て水蒸気の関与を差し引いて処理し、アポダイゼーションによって最終分解能4cm⁻¹で平滑化して、アミドIバンド(1,700~1,600cm⁻¹)の領域で標準化して、その比較を行った⁴⁶。

【0684】

ネガティブ染色EMおよび対称性の決定。ネガティブ染色EMを使用して、Cs g G、Cs g G c 1 sおよびCs g Eの溶液中のオリゴマー化状態をモニターした。Cs g E、Cs g G c 1 s、およびamphipol結合Cs g Gを0.05mg・ml⁻¹の濃度に調節して、グロー放電カーボンコーティング銅グリッド(CF-400;Electron Microscopy Sciences)に適用した。1分間インキュベートした後、試料をプロットして、次いで洗浄および2%酢酸ウラニルで染色した。画像を、電圧120kVで作動するTecna i T12 BioTWIN Lab6顕微鏡で、倍率49,000倍および800~2,000nmの間のデフォーカスにより収集した。コントラスト伝達関数(CTF)、位相フリッピングおよび粒子選択を、クライオ-EMに関して記述したように実施した。膜抽出Cs g Gに関して、オクタデカマー粒子(全体で1,780個)を、ノナマーおよび上面図から個別に分析した。精製Cs g Eに関して、全体で2,452個の粒子を分析した。以下のCs g G-Cs g Eクライオ-EM分析に記述されるように三次元モデルを得て、数ラウンドの多重参照配列アライメント(MRA)、多重統計分析(MSA)、およびアンカーセット精密化によって精密化した。全ての場合において、標準化および中心化後、クライオ-EM選択に記述されるようにIMAGIC-4Dを使用して画像を分類した。特徴的な図面に対応する最善のクラスを各セットの粒子に関して選択した。Cs g G上面図の対称性の決定は、クラスあたりほぼ20個の画像を使用して最善のクラス平均を使用して実施した。回転方向の自己相関関数を、IMAGICを使用して計算し、プロットした。

【0685】

Cs g G-Cs g E複合体の形成。Cs g G-Cs g E複合体形成に関して、精製Cs g G中の可溶化洗浄剤を、Cs g G(0.5%CE4、4mM LDAO、25mM Tris-HCl pH8.0、500mM NaCl、1mM DTT中に24mg・ml⁻¹タンパク質)120μlを洗浄剤脱安定化リポソーム(1mg・ml⁻¹の1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)および0.4%LDAO)300μlに添加し、氷上で5分間インキュベートした後、100mg・ml⁻¹保存液にA8-35 amphipols 90mlを添加することによって、Amphipols A8-35(Anatrace)に交換した。氷上でさらに15分間インキュベートした後、試料をSuperose 6 10/300 GL(GE Healthcare)カラムにロードして、200mM NaCl、2.5%キシリトール、25mM Tris-HCl pH8.0、2mM DTT中でゲルろ過を行った。200mM NaCl、2.5%キシリトール、25mM Tris-HCl pH8.0、2mM DTT中での精製モノマーCs g Eの等量を、amphipol可溶化Cs g Gに、Cs g EおよびCs g Gに関してそれぞれ最終タンパク質濃度15および5μMで添加して、試料を4.5%ネイティブPAGEにおいて0.5×TBE緩衝液中で125V、18で泳動させた。二次元変性の場合、Cs g G-Cs g E複合体に対応するバンドを、同じゲルで同時に泳動させた未染色レーンから切り出して、Laemmli緩衝液(60mM Tris-HCl pH6.8、2%SDS、10%グリセロール、5%2-メルカプトエタノール、0.01%ブロモフェノールブルー)中で5分間沸騰させて、4~20%SDS-PAGEで泳動させた。精製Cs g EおよびCs g Gを対照試料として複合体と共に泳動させた。ゲルを視覚的に調べるためにInstant Blue Coomassieによ

って、または SDS - PAGE 上の C s g E および C s g G バンドの蛍光検出 (T y p h o o n F L A 9 0 0 0) による C s g G - C s g E 複合体の化学量論的評価のために S Y P R O オレンジによって染色し、C s g G / C s g E 比 0 . 9 7 を得た。

【 0 6 8 6 】

C s g G - C s g E クライオ - EM。クライオ電子顕微鏡を使用して、C₉ C s g G - C s g E 複合体の溶液中の構造を決定した。上記のように調製した C s g G - C s g E 複合体を、H i s T r a p F F (G E H e a l t h c a r e) に結合させて溶出し、未結合 C s g G を除去して、溶出後直ちに、2 0 m A で 3 0 秒間グロー放電されている Q u a n t i f o i l R 2 / 2 カーボンコーティンググリッド (Q u a n t i f o i l M i c r o T o o l s G m b H) に適用した。試料を、自動システム (L e i c a) を使用して液体窒素中で瞬間凍結し、電圧 2 0 0 k V で作動する F E I F 2 0 顕微鏡下で、低用量条件下で名目上の倍率 5 0 , 0 0 0 倍、および 1 . 4 ~ 3 μ m のデフォーカス範囲で観察した。画像フレームを F a l c o n I I 検出器で記録した。標本レベルのピクセルサイズはピクセルあたり 1 . 9 であった。CTF パラメータを、C T F F I N D 3 (参考文献 4 7) を使用して評価して、位相フリッピングを S P I D E R ^{4 8} で実施した。粒子を、B O X E R (E M A N 2、参考文献 4 9) を使用して C T F 補正顕微鏡写真から自動的に選択した。1 0 % を超える非点収差を有する画像を破棄した。全体で 1 , 2 2 1 個の粒子を 7 5 個の顕微鏡写真から選択して、1 2 8 ピクセル × 1 2 8 ピクセルのボックスにウィンドウ化した。画像を同じ平均値および標準偏差に標準化して、約 2 0 0 の低分解能カットオフでハイパスフィルターを通過させた。これらを中心化した後、第一ラウンドの M S A に供した。最初の参照物質の組を、I M A G I C - 4 D (I m a g e S c i e n c e S o f t w a r e) における参照物質なしの分類を使用して得た。C₉ 円柱粒子の特徴的な側面図に対応する最善のクラスを M R A の参照物質として使用した。C s g G - C s g E 複合体に関して、最初の三次元モデルを、複合体粒子 1 , 2 2 1 個を包含する最善の 1 2 5 個の特徴的な図面 (良好なコントラストおよび良好に定義された特徴を有する) から計算して、角度の再構成によって方向を決定した (I m a g e S c i e n c e S o f t w a r e) 。M R A、M S A、およびアンカーセット精密化の繰り返しラウンドによって三次元マップを精密化した。分解能は、0 . 5 基準レベルに従ってフーリエシェルの相関 (F S C) によって 2 4 であると推定された (図 5 2) 。マップおよび図面の可視化は、U C S F C h i m e r a ^{5 0} において実施した。

【 0 6 8 7 】

胆汁酸塩毒性アッセイ。胆汁酸塩を含有するアガープレートでの増殖の減少によって外膜透過性を調べた。p L R 4 2 (参考文献 1 6) および p M C 2 (参考文献 1 4) (または誘導されたヘリックス 2 変異体) の両方を有する大腸菌 (E . c o l i) L S R 1 2 (参考文献 7) 細胞の 1 0 倍連続希釈液 (5 μ l) を、1 0 0 μ g · l⁻¹ アンピシリン、2 5 μ g · l⁻¹ クロラムフェニコール、1 m M I P T G を含有し、0 . 2 % (重量 / 容量) L - アラビノースを含むまたは含まない M c C o n k e y アガープレートにスポットした。3 7 ° で一晩インキュベートした後、コロニーの増殖を調べた。

【 0 6 8 8 】

単一チャネル電流記録。単一チャネル電流記録を、N a n i o n の O r b i t 1 6 キットによる平行高解像電気的記録を使用して行った。簡単に説明すると、1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (A v a n t i P o l a r L i p i d s) の水平二重層を、1 6 チャネルマルチ電極キャピティアレイ (M E C A) チップ (l o n e r a) ^{5 1} の (ピコリットル容積以下の) マイクロキャピティ上に形成した。二重層の上および下のシスおよびトランスキャピティはいずれも、1 . 0 M K C l 、2 5 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 を含有した。チャネルを膜に挿入するために、2 5 m M T r i s - H C l p H 8 . 0、5 0 0 m M N a C l、1 m M D T T、0 . 5 % C 8 E 4、5 m M L D A O に溶解した C s g G をシス区画に最終濃度 9 0 ~ 3 0 0 n M となるように添加した。C s g G チャネルと C s g E との相互作用を試験するために、2 5 m M T r i s - H C l p H 8 . 0、1 5 0 m M N a C l に溶解した C s g E タンパク質溶液

をシス区画に最終濃度 0.1、1、10、および 100 nM で添加した。膜通過電流を、Tecella Triton 16 - チャネル増幅器を使用して、ロウパスフィルタリング周波数 3 kHz およびサンプリング周波数 10 kHz で +50 mV および -50 mV (シス側を接地した) の保持電位で記録した。電流のトレースを pClamp スイートの Clampfit (Molecular Devices) を使用して分析した。プロットを Origin 8.6 (Microcal) ⁵² を使用して作製した。

【0689】

測定された電流を、3つのセグメント、膜貫通区分、周辺質前庭、および両者を接続する内部チャネル狭窄で構成されるようにモデル化した Cs g G の X 線構造のポア寸法に基づいて計算された電流と比較した。最初の2つのセグメントは円錐形状のセグメントとなるようにモデル化された。狭窄を円柱として表した。対応する抵抗 R₁、R₂、および R₃ をそれぞれ、以下のように計算した：

$$R_1 = L_1 / (D_1 d_1)$$

$$R_2 = L_2 / (D_2 d_2)$$

$$R_3 = L_3 / (D_1 d_2)$$

式中、L₁、L₂、および L₃ はセグメントの軸方向の長さであり、それぞれ、3.5、4.0、および 2.0 nm であると測定され、D₁、d₁、D₂、および d₃ は、セグメント 1 および 2 の最大および最小直径であり、それぞれ 4.0、0.8、3.4、および 0.8 nm であると測定された。導電率は、10.6 S m⁻¹ の値を有する。電流は、R₁、R₂、および R₃ ならびに電圧 V = 50 mV を

$$I = V / (R_1 + R_2 + R_3)$$

に代入することによって計算された。

アクセス抵抗性は予想電流を有意に変化させないことが見出された。

【0690】

本発明は、以下の態様も包含する。

[1]

位置 Tyr 51、Asn 55 および Phe 56 のうちの1つまたは複数に修飾を含む、少なくとも1つの修飾 Cs g G モノマー。

[2]

[1] に記載の少なくとも1つの Cs g G モノマーを含む修飾生体ポア。

[3]

少なくとも1つの Cs g G モノマーを含む修飾 Cs g G 生体ポアであって、0.5 nm ~ 1.5 nm の範囲の直径を有するチャネル狭窄を1つしか有さない修飾 Cs g G 生体ポア。

[4]

前記修飾が、前記 Cs g G モノマーのポリペプチド配列の 38 ~ 63 位にある、[3] に記載の修飾ポア。

[5]

前記修飾が、Tyr 51、Asn 55 および Phe 56 から選択される位置にある、[4] に記載の修飾ポア。

[6]

前記修飾が、位置 Tyr 51 に、または位置 Asn 55 および Phe 56 の両方にある、[5] に記載の修飾ポア。

[7]

前記 Cs g G モノマーに対する修飾が、天然に存在するアミノ酸の置換、天然に存在するアミノ酸の欠失、および天然に存在するアミノ酸側鎖の修飾からなる群から選択される、[3] から [6] のいずれかに記載の修飾ポア。

[8]

前記修飾が、未修飾アミノ酸の立体障害を低減または除去する、[3] から [7] に記載の修飾ポア。

[9]

前記修飾ポアの前記少なくとも1つのC s g Gモノマーが、配列番号4 ~ 3 8 8による3 8 ~ 6 3位のポリペプチド配列を有する、[3]から[8]のいずれかに記載の修飾ポア

[1 0]

[3]から[9]のいずれかに記載の修飾C s g G生体ポアの少なくとも1つのC s g Gモノマーをコードする単離されたポリペプチド。

[1 1]

[1 0]に記載の単離されたポリペプチドをコードする単離された核酸。

[1 2]

a) 絶縁層と、
b) 前記絶縁層内のC s g G生体ポアと、
c) 前記生体ポアを通る電流を測定するための装置とを含むバイオセンサー。

[1 3]

前記C s g G生体ポアが、[3]から[9]のいずれかに記載の修飾C s g G生体ポアである、[1 2]に記載のバイオセンサー。

[1 4]

分析物検出または核酸シーケンシングである生体センシング用途のための、C s g G生体ポアの使用。

[1 5]

前記核酸シーケンシングが、DNAシーケンシングまたはRNAシーケンシングである、[1 4]に記載の使用。

[1 6]

分子センシングのための方法であって、
a) 少なくとも1つのC s g Gモノマーで形成されるC s g G生体ポアを絶縁層内に設けるステップ、
b) 前記C s g G生体ポアを試験基質と相互作用させるステップ、および
c) 前記相互作用中に1回または複数回の測定を行うステップを含む方法。

[1 7]

a) 少なくとも1つのC s g Gモノマーで形成されるC s g G生体ポアを絶縁層内に設けるステップ、
b) 前記絶縁層を介して電氣的電位を印加し、それによって前記生体ポアを通る電流の流れを確立するステップ、
c) 前記C s g G生体ポアを試験基質と接触させるステップ、および
d) 前記生体ポアを通る電流の流れを測定するステップを含む、[1 6]に記載の方法。

[1 8]

前記絶縁層が膜である、[1 6]または[1 7]に記載の方法。

[1 9]

前記膜が、脂質二重層である、[1 8]に記載の方法。

[2 0]

前記ポアを通る電流が、前記絶縁層の第1の側面から前記絶縁層の第2の側面への可溶性イオンの流れによって搬送される、[1 7]から[1 9]のいずれか一項に記載の方法。

[2 1]

前記分子センシングが、分析物検出である、[1 6]から[2 0]に記載の方法。

[2 2]

ステップ(d)の後に、前記試験基質が不在である場合の前記生体ポアを通る電流と比較して前記生体ポアを通る電流が低減することによって前記試験基質の存在を判定するさ

10

20

30

40

50

らなるステップを含む、[1 7] から [2 1] に記載の方法。

[2 3]

前記分子センシングが、核酸シーケンシングである、[1 6] から [2 2] に記載の方法。

[2 4]

前記方法によってシーケンシングされる核酸のタイプがDNAまたはRNAである、[2 3] に記載の方法。

[2 5]

前記 C s g G 生体ポアが、さらなるアクセサリタンパク質に順応するように適合される、[2 3] または [2 4] に記載の方法。

[2 6]

前記さらなるアクセサリタンパク質が、DNAまたはRNAポリメラーゼ、イソメラーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、テロメラーゼ、エキソヌクレアーゼ、およびヘリカーゼからなる群から選択される核酸プロセスング酵素である、[2 5] に記載の方法。

[2 7]

前記 C s g G 生体ポアが、修飾 C s g G ポアであり、前記修飾 C s g G ポアが、前記 C s g G ポアを形成する前記 C s g G モノマーの少なくとも 1 つにおいてモノマー野生型大腸菌 (E-coli) C s g G ポリペプチド配列に少なくとも 1 つの修飾を有する、[1 6] から [2 6] のいずれかに記載の方法。

[2 8]

同じ修飾が、前記 C s g G ポアを形成する前記 C s g G モノマーすべてに施される、[2 7] に記載の方法。

[2 9]

前記修飾 C s g G モノマーが、配列番号 4 ~ 3 8 8 による 3 8 ~ 6 3 位のポリペプチド配列を有する、[2 7] または [2 8] に記載の方法。

[3 0]

配列番号 3 9 0 で示される配列のバリエーションを含む変異体 C s g G モノマーであって、前記バリエーションが、位置 Y 5 1、N 5 5 および F 5 6 のうちの 1 つまたは複数に変異を含む、変異体 C s g G モノマー。

[3 1]

配列番号 3 9 0 で示される配列のバリエーションを含む変異体 C s g G モノマーであって、前記バリエーションが、(i) 位置 N 4 0、D 4 3、E 4 4、S 5 4、S 5 7、Q 6 2、R 9 7、E 1 0 1、E 1 2 4、E 1 3 1、R 1 4 2、T 1 5 0 および R 1 9 2 における 1 つまたは複数の変異、(i i) Y 5 1 / N 5 5、Y 5 1 / F 5 6、N 5 5 / F 5 6 または Y 5 1 / N 5 5 / F 5 6 における変異、(i i i) Q 4 2 R または Q 4 2 K、(i v) K 4 9 R、(v) N 1 0 2 R、N 1 0 2 F、N 1 0 2 Y または N 1 0 2 W、(v i) D 1 4 9 N、D 1 4 9 Q または D 1 4 9 R、(v i i) E 1 8 5 N、E 1 8 5 Q または E 1 8 5 R、(v i i i) D 1 9 5 N、D 1 9 5 Q または D 1 9 5 R、(i x) E 2 0 1 N、E 2 0 1 Q または E 2 0 1 R、(x) E 2 0 3 N、E 2 0 3 Q または E 2 0 3 R、ならびに (x i) 位置 F 4 8、K 4 9、P 5 0、Y 5 1、P 5 2、A 5 3、S 5 4、N 5 5、F 5 6 および S 5 7 のうちの 1 つまたは複数の欠失のうちの 1 つまたは複数を含む、変異体 C s g G モノマー。

[3 2]

(a) 前記バリエーションが、(i) において、置換 N 4 0 R、N 4 0 K、D 4 3 N、D 4 3 Q、D 4 3 R、D 4 3 K、E 4 4 N、E 4 4 Q、E 4 4 R、E 4 4 K、S 5 4 P、S 5 7 P、Q 6 2 R、Q 6 2 K、R 9 7 N、R 9 7 G、R 9 7 L、E 1 0 1 N、E 1 0 1 Q、E 1 0 1 R、E 1 0 1 K、E 1 0 1 F、E 1 0 1 Y、E 1 0 1 W、E 1 2 4 N、E 1 2 4 Q、E 1 2 4 R、E 1 2 4 K、E 1 2 4 F、E 1 2 4 Y、E 1 2 4 W、E 1 3 1 D、R 1 4 2 E、R 1 4 2 N、T 1 5 0 I、R 1 9 2 E および R 1 9 2 N のうちの 1 つもしくは複

10

20

30

40

50

数を含む、

(b) 前記バリエーションが、(ii)において、

【化 7 - 1】

F56N/N55Q, F56N/N55R, F56N/N55K, F56N/N55S, F56N/N55G,
F56N/N55A, F56N/N55T, F56Q/N55Q, F56Q/N55R, F56Q /N55K, F56Q/N55S, F56Q/N55G,
F56Q/N55A, F56Q/N55T, F56R/N55Q, F56R/N55R, F56R/N55K, F56R/N55S, F56R/N55G, F56R/N55A,
F56R/N55T, F56S/N55Q, F56S/N55R, F56S/N55K, F56S/N55S, F56S/N55G, F56S/N55A, F56S/N55T,
F56G/N55Q, F56G/N55R, F56G/N55K, F56G/N55S, F56G/N55G, F56G/N55A, F56G/N55T, F56A/N55Q,
F56A/N55R, F56A/N55K, F56A/N55S, F56A/N55G, F56A/N55A, F56A/N55T, F56K/N55Q,
F56K/N55R, F56K/N55K, F56K/N55S, F56K/N55G, F56K/N55A, F56K/N55T, F56N/Y51L, F56N/Y51V,
F56N/Y51A, F56N/Y51N, F56N/Y51Q, F56N/Y51S, F56N/Y51G, F56Q/Y51L, F56Q/Y51V, F56Q/Y51A,

10

20

30

40

50

【化 7 - 2】

F56Q/Y51N, F56Q/Y51Q, F56Q/Y51S, F56Q/Y51G, F56R/Y51L, F56R/Y51V, F56R/Y51A, F56R/Y51N,
 F56R/Y51Q, F56R/Y51S, F56R/Y51G, F56S/Y51L, F56S/Y51V, F56S/Y51A, F56S/Y51N, F56S/Y51Q,
 F56S/Y51S, F56S/Y51G, F56G/Y51L, F56G/Y51V, F56G/Y51A, F56G/Y51N, F56G/Y51Q, F56G/Y51S,
 F56G/Y51G, F56A/Y51L, F56A/Y51V, F56A/Y51A, F56A/Y51N, F56A/Y51Q, F56A/Y51S, F56A/Y51G,
 F56K/Y51L, F56K/Y51V, F56K/Y51A, F56K/Y51N, F56K/Y51Q, F56K/Y51S, F56K/Y51G, N55Q/Y51L,
 N55Q/Y51V, N55Q/Y51A, N55Q/Y51N, N55Q/Y51Q, N55Q/Y51S, N55Q/Y51G, N55R/Y51L,
 N55R/Y51V, N55R/Y51A, N55R/Y51N, N55R/Y51Q, N55R/Y51S, N55R/Y51G, N55K/Y51L, N55K/Y51V,
 N55K/Y51A, N55K/Y51N, N55K/Y51Q, N55K/Y51S, N55K/Y51G, N55S/Y51L, N55S/Y51V, N55S/Y51A,
 N55S/Y51N, N55S/Y51Q, N55S/Y51S, N55S/Y51G, N55G/Y51L, N55G/Y51V, N55G/Y51A, N55G/Y51N,
 N55G/Y51Q, N55G/Y51S, N55G/Y51G, N55A/Y51L, N55A/Y51V, N55A/Y51A, N55A/Y51N, N55A/Y51Q,
 N55A/Y51S, N55A/Y51G, N55T/Y51L, N55T/Y51V, N55T/Y51A, N55T/Y51N, N55T/Y51Q, N55T/Y51S,
 N55T/Y51G, F56N/N55Q/Y51L, F56N/N55Q/Y51V, F56N/N55Q/Y51A, F56N/N55Q/Y51N,
 F56N/N55Q/Y51Q, F56N/N55Q/Y51S, F56N/N55Q/Y51G, F56N/N55R/Y51L, F56N/N55R/Y51V,
 F56N/N55R/Y51A, F56N/N55R/Y51N, F56N/N55R/Y51Q, F56N/N55R/Y51S, F56N/N55R/Y51G,
 F56N/N55K/Y51L, F56N/N55K/Y51V, F56N/N55K/Y51A, F56N/N55K/Y51N, F56N/N55K/Y51Q,
 F56N/N55K/Y51S, F56N/N55K/Y51G, F56N/N55S/Y51L, F56N/N55S/Y51V, F56N/N55S/Y51A,
 F56N/N55S/Y51N, F56N/N55S/Y51Q, F56N/N55S/Y51S, F56N/N55S/Y51G, F56N/N55G/Y51L,
 F56N/N55G/Y51V, F56N/N55G/Y51A, F56N/N55G/Y51N, F56N/N55G/Y51Q, F56N/N55G/Y51S,
 F56N/N55G/Y51G, F56N/N55A/Y51L, F56N/N55A/Y51V, F56N/N55A/Y51A, F56N/N55A/Y51N,
 F56N/N55A/Y51Q, F56N/N55A/Y51S, F56N/N55A/Y51G, F56N/N55T/Y51L, F56N/N55T/Y51V,
 F56N/N55T/Y51A, F56N/N55T/Y51N, F56N/N55T/Y51Q, F56N/N55T/Y51S, F56N/N55T/Y51G,
 F56Q/N55Q/Y51L, F56Q/N55Q/Y51V, F56Q/N55Q/Y51A, F56Q/N55Q/Y51N, F56Q/N55Q/Y51Q,
 F56Q/N55Q/Y51S, F56Q/N55Q/Y51G, F56Q/N55R/Y51L, F56Q/N55R/Y51V, F56Q/N55R/Y51A,
 F56Q/N55R/Y51N, F56Q/N55R/Y51Q, F56Q/N55R/Y51S, F56Q/N55R/Y51G, F56Q/N55K/Y51L, F56Q
 /N55K/Y51V, F56Q/N55K/Y51A, F56Q /N55K/Y51N, F56Q/N55K/Y51Q, F56Q /N55K/Y51S, F56Q
 /N55K/Y51G, F56Q/N55S/Y51L, F56Q/N55S/Y51V, F56Q/N55S/Y51A, F56Q/N55S/Y51N,
 F56Q/N55S/Y51Q, F56Q/N55S/Y51S, F56Q/N55S/Y51G, F56Q/N55G/Y51L, F56Q/N55G/Y51V,
 F56Q/N55G/Y51A, F56Q/N55G/Y51N, F56Q/N55G/Y51Q, F56Q/N55G/Y51S, F56Q/N55G/Y51G,
 F56Q/N55A/Y51L, F56Q/N55A/Y51V, F56Q/N55A/Y51A, F56Q/N55A/Y51N, F56Q/N55A/Y51Q,
 F56Q/N55A/Y51S, F56Q/N55A/Y51G, F56Q/N55T/Y51L, F56Q/N55T/Y51V, F56Q/N55T/Y51A,
 F56Q/N55T/Y51N, F56Q/N55T/Y51Q, F56Q/N55T/Y51S, F56Q/N55T/Y51G, F56R/N55Q/Y51L,
 F56R/N55Q/Y51V, F56R/N55Q/Y51A, F56R/N55Q/Y51N, F56R/N55Q/Y51Q, F56R/N55Q/Y51S,
 F56R/N55Q/Y51G, F56R/N55R/Y51L, F56R/N55R/Y51V, F56R/N55R/Y51A, F56R/N55R/Y51N,
 F56R/N55R/Y51Q, F56R/N55R/Y51S, F56R/N55R/Y51G, F56R/N55K/Y51L, F56R/N55K/Y51V,
 F56R/N55K/Y51A, F56R/N55K/Y51N, F56R/N55K/Y51Q, F56R/N55K/Y51S, F56R/N55K/Y51G,
 F56R/N55S/Y51L, F56R/N55S/Y51V, F56R/N55S/Y51A, F56R/N55S/Y51N, F56R/N55S/Y51Q,
 F56R/N55S/Y51S, F56R/N55S/Y51G, F56R/N55G/Y51L, F56R/N55G/Y51V, F56R/N55G/Y51A,
 F56R/N55G/Y51N, F56R/N55G/Y51Q, F56R/N55G/Y51S, F56R/N55G/Y51G, F56R/N55A/Y51L,
 F56R/N55A/Y51V, F56R/N55A/Y51A, F56R/N55A/Y51N, F56R/N55A/Y51Q, F56R/N55A/Y51S,
 F56R/N55A/Y51G, F56R/N55T/Y51L, F56R/N55T/Y51V, F56R/N55T/Y51A, F56R/N55T/Y51N,
 F56R/N55T/Y51Q, F56R/N55T/Y51S, F56R/N55T/Y51G, F56S/N55Q/Y51L, F56S/N55Q/Y51V,
 F56S/N55Q/Y51A, F56S/N55Q/Y51N, F56S/N55Q/Y51Q, F56S/N55Q/Y51S, F56S/N55Q/Y51G,

10

20

30

40

50

【化 7 - 3】

F56S/N55R/Y51L, F56S/N55R/Y51V, F56S/N55R/Y51A, F56S/N55R/Y51N, F56S/N55R/Y51Q,
 F56S/N55R/Y51S, F56S/N55R/Y51G, F56S/N55K/Y51L, F56S/N55K/Y51V, F56S/N55K/Y51A,
 F56S/N55K/Y51N, F56S/N55K/Y51Q, F56S/N55K/Y51S, F56S/N55K/Y51G, F56S/N55S/Y51L,
 F56S/N55S/Y51V, F56S/N55S/Y51A, F56S/N55S/Y51N, F56S/N55S/Y51Q, F56S/N55S/Y51S,
 F56S/N55S/Y51G, F56S/N55G/Y51L, F56S/N55G/Y51V, F56S/N55G/Y51A, F56S/N55G/Y51N,
 F56S/N55G/Y51Q, F56S/N55G/Y51S, F56S/N55G/Y51G, F56S/N55A/Y51L, F56S/N55A/Y51V,
 F56S/N55A/Y51A, F56S/N55A/Y51N, F56S/N55A/Y51Q, F56S/N55A/Y51S, F56S/N55A/Y51G,
 F56S/N55T/Y51L, F56S/N55T/Y51V, F56S/N55T/Y51A, F56S/N55T/Y51N, F56S/N55T/Y51Q,
 F56S/N55T/Y51S, F56S/N55T/Y51G, F56G/N55Q/Y51L, F56G/N55Q/Y51V, F56G/N55Q/Y51A, 10
 F56G/N55Q/Y51N, F56G/N55Q/Y51Q, F56G/N55Q/Y51S, F56G/N55Q/Y51G, F56G/N55R/Y51L,
 F56G/N55R/Y51V, F56G/N55R/Y51A, F56G/N55R/Y51N, F56G/N55R/Y51Q, F56G/N55R/Y51S,
 F56G/N55R/Y51G, F56G/N55K/Y51L, F56G/N55K/Y51V, F56G/N55K/Y51A, F56G/N55K/Y51N,
 F56G/N55K/Y51Q, F56G/N55K/Y51S, F56G/N55K/Y51G, F56G/N55S/Y51L, F56G/N55S/Y51V,
 F56G/N55S/Y51A, F56G/N55S/Y51N, F56G/N55S/Y51Q, F56G/N55S/Y51S, F56G/N55S/Y51G,
 F56G/N55G/Y51L, F56G/N55G/Y51V, F56G/N55G/Y51A, F56G/N55G/Y51N, F56G/N55G/Y51Q,
 F56G/N55G/Y51S, F56G/N55G/Y51G, F56G/N55A/Y51L, F56G/N55A/Y51V, F56G/N55A/Y51A,
 F56G/N55A/Y51N, F56G/N55A/Y51Q, F56G/N55A/Y51S, F56G/N55A/Y51G, F56G/N55T/Y51L,
 F56G/N55T/Y51V, F56G/N55T/Y51A, F56G/N55T/Y51N, F56G/N55T/Y51Q, F56G/N55T/Y51S,
 F56G/N55T/Y51G, F56A/N55Q/Y51L, F56A/N55Q/Y51V, F56A/N55Q/Y51A, F56A/N55Q/Y51N, 20
 F56A/N55Q/Y51Q, F56A/N55Q/Y51S, F56A/N55Q/Y51G, F56A/N55R/Y51L, F56A/N55R/Y51V,
 F56A/N55R/Y51A, F56A/N55R/Y51N, F56A/N55R/Y51Q, F56A/N55R/Y51S, F56A/N55R/Y51G,
 F56A/N55K/Y51L, F56A/N55K/Y51V, F56A/N55K/Y51A, F56A/N55K/Y51N, F56A/N55K/Y51Q,
 F56A/N55K/Y51S, F56A/N55K/Y51G, F56A/N55S/Y51L, F56A/N55S/Y51V, F56A/N55S/Y51A,
 F56A/N55S/Y51N, F56A/N55S/Y51Q, F56A/N55S/Y51S, F56A/N55S/Y51G, F56A/N55G/Y51L,
 F56A/N55G/Y51V, F56A/N55G/Y51A, F56A/N55G/Y51N, F56A/N55G/Y51Q, F56A/N55G/Y51S,
 F56A/N55G/Y51G, F56A/N55A/Y51L, F56A/N55A/Y51V, F56A/N55A/Y51A, F56A/N55A/Y51N,
 F56A/N55A/Y51Q, F56A/N55A/Y51S, F56A/N55A/Y51G, F56A/N55T/Y51L, F56A/N55T/Y51V,
 F56A/N55T/Y51A, F56A/N55T/Y51N, F56A/N55T/Y51Q, F56A/N55T/Y51S, F56A/N55T/Y51G,
 F56K/N55Q/Y51L, F56K/N55Q/Y51V, F56K/N55Q/Y51A, F56K/N55Q/Y51N, F56K/N55Q/Y51Q, 30
 F56K/N55Q/Y51S, F56K/N55Q/Y51G, F56K/N55R/Y51L, F56K/N55R/Y51V, F56K/N55R/Y51A,
 F56K/N55R/Y51N, F56K/N55R/Y51Q, F56K/N55R/Y51S, F56K/N55R/Y51G, F56K/N55K/Y51L,
 F56K/N55K/Y51V, F56K/N55K/Y51A, F56K/N55K/Y51N, F56K/N55K/Y51Q, F56K/N55K/Y51S,
 F56K/N55K/Y51G, F56K/N55S/Y51L, F56K/N55S/Y51V, F56K/N55S/Y51A, F56K/N55S/Y51N,
 F56K/N55S/Y51Q, F56K/N55S/Y51S, F56K/N55S/Y51G, F56K/N55G/Y51L, F56K/N55G/Y51V,
 F56K/N55G/Y51A, F56K/N55G/Y51N, F56K/N55G/Y51Q, F56K/N55G/Y51S, F56K/N55G/Y51G,
 F56K/N55A/Y51L, F56K/N55A/Y51V, F56K/N55A/Y51A, F56K/N55A/Y51N, F56K/N55A/Y51Q,
 F56K/N55A/Y51S, F56K/N55A/Y51G, F56K/N55T/Y51L, F56K/N55T/Y51V, F56K/N55T/Y51A,
 F56K/N55T/Y51N, F56K/N55T/Y51Q, F56K/N55T/Y51S, F56K/N55T/Y51G, F56E/N55R, F56E/N55K,
 F56D/N55R, F56D/N55K, F56R/N55E, F56R/N55D, F56K/N55E または F56K/N55D; 40

を含む、ならびに／または

(c) 前記バリエーションが、(xi)において、Y51/P52の欠失、Y51/P52/
 A53の欠失、P50~P52の欠失、P50~A53の欠失、K49~Y51の欠失、
 K49~A53の欠失および単一のプロリン(P)での置換、K49~S54の欠失お
 よび単一のPでの置換、Y51~A53の欠失、Y51~S54の欠失、N55/F56
 の欠失、N55~S57の欠失、N55/F56の欠失および単一のPでの置換、N55/
 F56の欠失および単一のグリシン(G)での置換、N55/F56の欠失および単
 一のアラニン(A)での置換、N55/F56の欠失および単一のPでの置換およびY51
 N、N55/F56の欠失および単一のPでの置換およびY51Q、N55/F56の欠

10

20

30

40

50

[3 3]

【化 8 - 1】

10

20

30

40

【化 8 - 2】

D149Q/E185R/ E201N/E203Q, D149N/E185R/ E201Q/E203Q, D149Q/E185R/ E201Q/E203Q,
 D149R/E185N/ E201N/E203N, D149R/E185Q/ E201N/E203N, D149R/E185N/ E201Q/E203N,
 D149R/E185N/ E201N/E203Q, D149R/E185Q/ E201Q/E203N, D149R/E185Q/ E201N/E203Q,
 D149R/E185N/ E201Q/E203Q, D149R/E185Q/ E201Q/E203Q, D149R/E185N/D195N/E201N/E203N,
 D149R/E185Q/D195N/E201N/E203N, D149R/E185N/D195Q/E201N/E203N,
 D149R/E185N/D195N/E201Q/E203N, D149R/E185Q/D195N/E201N/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201N/E203N, D149R/E185Q/D195N/E201Q/E203N,
 D149R/E185Q/D195N/E201N/E203Q, D149R/E185N/D195Q/E201Q/E203N,
 D149R/E185N/D195Q/E201N/E203Q, D149R/E185N/D195N/E201Q/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201Q/E203N, D149R/E185Q/D195Q/E201N/E203Q,
 D149R/E185Q/D195N/E201Q/E203Q, D149R/E185N/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149R/E185Q/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201N/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201N/E203N, D149N/E185R/D195Q/E201N/E203N,
 D149N/E185R/D195N/E201Q/E203N, D149N/E185R/D195N/E201N/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201N/E203N, D149Q/E185R/D195N/E201Q/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201N/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201Q/E203N,
 D149N/E185R/D195Q/E201N/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201Q/E203N, D149Q/E185R/D195Q/E201N/E203Q,
 D149Q/E185R/D195N/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195Q/E201Q/E203Q,
 D149Q/E185R/D195Q/E201Q/E203Q, D149N/E185R/D195N/E201R/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201R/E203N, D149N/E185R/D195Q/E201R/E203N,
 D149Q/E185R/D195N/E201R/E203Q, D149Q/E185R/D195Q/E201R/E203N,
 D149Q/E185R/D195Q/E201R/E203Q, E131D/K49R, E101N/N102F, E101N/N102Y, E101N/N102W,
 E101F/N102F, E101F/N102Y, E101F/N102W, E101Y/N102F, E101Y/N102Y, E101Y/N102W,
 E101W/N102F, E101W/N102Y, E101W/N102W, E101N/N102R, E101F/N102R, E101Y/N102Rまたは
 E101W/N102F.

10

20

30

を含む、[3 1] または [3 2] に記載の変異体。

[3 4]

前記バリエーションが、T 1 5 0 に変異を含む、[3 1] に記載の変異体モノマー。

[3 5]

2 つ以上の共有結合 C s g G モノマーを含む構築物であって、前記モノマーの少なくとも 1 つが、前記のいずれか一項に記載の変異体モノマーである、構築物。

[3 6]

前記 2 つ以上の変異体モノマーが同じである、または異なる、[3 5] に記載の構築物。

40

[3 7]

前記 2 つ以上の変異体モノマーが、遺伝子的に融合されている、[3 5] または [3 6] に記載の構築物。

[3 8]

前記 2 つ以上の変異体モノマーが、1 つまたは複数のリンカーによって結合されている、[3 5] から [3 7] のいずれか一項に記載の構築物。

[3 9]

[3 1] から [3 4] のいずれか一項に記載の 2 つの変異体モノマーを含む、[3 5] から [3 8] のいずれか一項に記載の構築物。

[4 0]

50

〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 のいずれか一項に記載の変異体モノマーまたは〔 3 7 〕に記載の構築物をコードするポリヌクレオチド。

〔 4 1 〕

〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 のいずれか一項に記載の同一の変異体モノマーまたは〔 3 5 〕 から 〔 3 9 〕 のいずれか一項に記載の同一の構築物を含む、C s g G に由来するホモオリゴマーポア。

〔 4 2 〕

〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 のいずれか一項に記載の 9 つの同一の変異体モノマーを含む、〔 4 1 〕に記載のホモオリゴマーポア。

〔 4 3 〕

〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの変異体モノマーまたは〔 3 5 〕 から 〔 3 9 〕 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの構築物を含む、C s g G に由来するヘテロオリゴマーポア。

〔 4 4 〕

(a) 〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 のいずれか一項に記載の 9 つの変異体モノマーを含み、それらの少なくとも 1 つが他と異なる、または (b) 〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 のいずれか一項に記載の 1 つもしくは複数の変異体モノマーと配列番号 3 9 0 を含む十分なさらなるモノマーとを含む、〔 4 3 〕に記載のヘテロオリゴマーポア。

〔 4 5 〕

標的分析物の存在、不在または 1 つもしくは複数の特徴を判定する方法であって、

a . 前記標的分析物を C s g G ポアまたはその変異体と、前記標的分析物が前記ポアに対して移動するように接触させるステップ、および

b . 前記分析物が前記ポアに対して移動しているときに 1 回または複数回の測定を行い、それによって前記分析物の存在、不在または 1 つもしくは複数の特徴を判定するステップ

を含む方法。

〔 4 6 〕

前記 C s g G 変異体が 9 つのモノマーを含み、前記モノマーの少なくとも 1 つが配列番号 3 9 0 のバリエーションであり、前記バリエーションが、(a) 位置 N 4 0 、 Q 4 2 、 D 4 3 、 E 4 4 、 K 4 9 、 Y 5 1 、 S 5 4 、 N 5 5 、 F 5 6 、 S 5 7 、 Q 6 2 、 E 1 0 1 、 N 1 0 2 、 E 1 2 4 、 E 1 3 1 、 R 1 4 2 、 D 1 4 9 、 T 1 5 0 、 E 1 8 5 、 R 1 9 2 、 D 1 9 5 、 E 2 0 1 および E 2 0 3 のうちの 1 つもしくは複数のにおける変異、ならびに / または (b) 位置 F 4 8 、 K 4 9 、 P 5 0 、 Y 5 1 、 P 5 2 、 A 5 3 、 S 5 4 、 N 5 5 、 F 5 6 および S 5 7 のうちの 1 つもしくは複数の欠失を含む、〔 4 5 〕に記載の方法。

〔 4 7 〕

前記バリエーションが、置換 (a) F 5 6 N 、 F 5 6 Q 、 F 5 6 R 、 F 5 6 S 、 F 5 6 G 、 F 5 6 A または F 5 6 K または F 5 6 A 、 F 5 6 P 、 F 5 6 R 、 F 5 6 H 、 F 5 6 S 、 F 5 6 Q 、 F 5 6 I 、 F 5 6 L 、 F 5 6 T または F 5 6 G 、 (b) N 5 5 Q 、 N 5 5 R 、 N 5 5 K 、 N 5 5 S 、 N 5 5 G 、 N 5 5 A または N 5 5 T 、 (c) Y 5 1 L 、 Y 5 1 V 、 Y 5 1 A 、 Y 5 1 N 、 Y 5 1 Q 、 Y 5 1 S または Y 5 1 G 、 (d) T 1 5 0 I 、 (e) S 5 4 P 、 および (f) S 5 7 P のうちの 1 つまたは複数を含む、〔 4 6 〕に記載の方法。

〔 4 8 〕

前記バリエーションが、〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 に記載の変異 / 置換の組合せのいずれかを含む、〔 4 6 〕または〔 4 7 〕に記載の方法。

〔 4 9 〕

前記ポアが、〔 3 1 〕 から 〔 3 4 〕 のいずれか一項に記載のポアである、〔 4 8 〕に記載の方法。

〔 5 0 〕

前記標的分析物が、金属イオン、無機塩、ポリマー、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチ

10

20

30

40

50

ド、タンパク質、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、色素、漂白剤、医薬品、診断剤、レクリエーションドラッグ、爆発物または環境汚染物質である、[4 5] から [4 9] のいずれか一項に記載の方法。

[5 1]

前記標的分析物が、標的ポリヌクレオチドである、[5 0] に記載の方法。

[5 2]

標的ポリヌクレオチドを特徴づけるための方法であって、

a) 前記ポリヌクレオチドを前記ポアと、前記ポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動するように接触させるステップ、および

b) 前記ポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動しているときに 1 回または複数回の測定を行い、前記測定が前記ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特徴を示し、それによって前記標的ポリヌクレオチドを特徴づけるステップ

を含む、[5 1] に記載の方法。

[5 3]

前記 1 つまたは複数の特徴が、(i) 前記ポリヌクレオチドの長さ、(i i) 前記ポリヌクレオチドの同一性、(i i i) 前記ポリヌクレオチドの配列、(i v) 前記ポリヌクレオチドの二次構造、および(v) 前記ポリヌクレオチドが修飾されているか否かから選択される、[5 2] に記載の方法。

[5 4]

前記ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特徴が、電気的測定および / または光学的測定によって測定される、[5 2] または [5 3] に記載の方法。

[5 5]

前記電気的測定が、電流測定、インピーダンス測定、トンネル効果測定または電界効果トランジスタ(F E T) 測定である、[5 4] に記載の方法。

[5 6]

ステップ a) が、前記ポリヌクレオチドをポリヌクレオチド結合タンパク質と、前記タンパク質が前記ポアを通る前記ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させることをさらに含む、[5 2] から [5 5] のいずれか一項に記載の方法。

[5 7]

a) 前記ポリヌクレオチドを前記ポアおよび前記ポリヌクレオチド結合タンパク質と、前記タンパク質が前記ポアに対する前記ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させるステップ、ならびに

b) 前記ポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動しているときに前記ポアを通過する電流を測定し、前記電流が前記ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特徴を示し、それによって前記標的ポリヌクレオチドを特徴づけるステップ

を含む、[5 6] に記載の方法。

[5 8]

前記ポリヌクレオチド結合タンパク質がヘリカーゼである、またはヘリカーゼに由来する、[5 6] または [5 7] に記載の方法。

[5 9]

標的ポリヌクレオチドを特徴づけるための方法であって、

a) 前記ポリヌクレオチドを C s g G ポアまたはその変異体およびエキソヌクレアーゼと、前記エキソヌクレアーゼが前記標的ポリヌクレオチドの一方の末端から個々のヌクレオチドを消化し、前記個々のヌクレオチドが前記ポアに対して移動するように接触させるステップ、ならびに

b) 前記個々のヌクレオチドが前記ポアに対して移動しているときに 1 回または複数回の測定を行い、前記測定が前記個々のヌクレオチドの 1 つまたは複数の特徴を示し、それによって前記標的ポリヌクレオチドを特徴づけるステップ

を含む、[5 1] に記載の方法。

[6 0]

10

20

30

40

50

前記ポアが、膜内にある、[4 5] から [4 9] のいずれか一項に記載の方法。

[6 1]

前記膜が、両親媒性層である、または固体層を含む、[6 0] に記載の方法。

[6 2]

前記標的分析物を、前記ポアと接触させる前に前記膜とカップリングさせる、[6 0] または [6 1] に記載の方法。

[6 3]

前記標的分析物を、前記分析物を前記膜の方に送達する微粒子に結合させる、[6 0] から [6 2] のいずれか一項に記載の方法。

[6 4]

標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーを形成する方法であって、C s g G ポアまたはその変異体とポリヌクレオチド結合タンパク質との複合体を形成し、それによって前記標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーを形成するステップを含む方法。

[6 5]

前記複合体が、(a) 前記標的ポリヌクレオチドの存在下で前記ポアを前記ポリヌクレオチド結合タンパク質と接触させること、および (a) 前記ポアを介して電位を印加することによって形成される、[6 4] に記載の方法。

[6 6]

前記電位が、電圧電位または化学的電位である、[6 5] に記載の方法。

[6 7]

前記複合体が、前記ポアを前記タンパク質に共有結合させることによって形成される、[6 4] に記載の方法。

[6 8]

標的ポリヌクレオチドを特徴づけるためのセンサーであって、C s g G ポアまたはその変異体とポリヌクレオチド結合タンパク質との複合体を含むセンサー。

[6 9]

標的分析物の存在、不在または1つもしくは複数の特徴を判定するための、C s g G ポアまたはその変異体の使用。

[7 0]

標的分析物を特徴づけるためのキットであって、(a) C s g G ポアまたはその変異体と (b) 膜の成分とを含むキット。

[7 1]

試料中の標的分析物を特徴づけるための装置であって、(a) 複数のC s g G ポアまたはそれらの変異体と (b) 複数の膜とを含む装置。

[7 2]

前記複数のポアおよび膜を支持することができるセンサーデバイスであって、前記ポアおよび膜を使用して分析物の特徴づけを行うために操作可能であるセンサーデバイスと、

前記特徴づけを行うための材料を送達するための少なくとも1つのポートとを含む、[7 1] に記載の装置。

[7 3]

前記複数のポアおよび膜を支持することができるセンサーデバイスであって、前記ポアおよび膜を使用して分析物の特徴づけを行うために操作可能であるセンサーデバイスと、

前記特徴づけを行うための材料を保持するための少なくとも1つのリザーバーとを含む、[7 2] に記載の装置。

[7 4]

材料を前記少なくとも1つのリザーバーから前記センサーデバイスに制御可能に供給するように構成されている流体力学システムと、

それぞれの試料を受けるための複数の容器と

をさらに含み、前記流体力学システムが、前記試料を前記容器から前記センサーデバイス

10

20

30

40

50

に選択的に供給するように構成されている、[7 2] または [7 3] に記載の装置。
[7 5]

標的ポリヌクレオチドを特徴づける方法であって、

a) 前記ポリヌクレオチドを C s g G ポアまたはその変異体、ポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドと、各ヌクレオチドに特異的な標識を含有するリン酸標識分子種が前記ポリメラーゼによって前記標的ポリヌクレオチドに逐次的に付加されるように接触させるステップ、ならびに

b) 前記ポアを使用して前記リン酸標識分子種を検出し、それによって前記ポリヌクレオチドを特徴づけるステップ

を含む方法。

10

[7 6]

[3 1] から [3 4] のいずれか一項に記載の変異体モノマーまたは [3 7] に記載の構築物を産生する方法であって、好適な宿主細胞において [4 0] に記載のポリヌクレオチドを発現させ、それによって [3 1] から [3 4] のいずれか一項に記載の変異体モノマーまたは [3 7] に記載の構築物を産生するステップを含む方法。

参考文献

【 0 6 9 1 】

20

30

40

50

【表 9 - 1】

1. Olsen, A., Jonsson, A. & Normark, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652–655 (1989).
2. Collinson, S. K. et al. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* 175, 12–18 (1993).
3. Dueholm, M. S., Albertsen, M., Otzen, D. & Nielsen, P. H. Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure. *PLoS ONE* 7, e51274 (2012).
4. Cegelski, L. et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chem. Biol.* 5, 913–919 (2009).
5. Herwald, H. et al. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces—a clue to serious complications in infectious diseases. *Nature Med.* 4, 298–302 (1998). 10
6. Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A. & Normark, S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 18, 661–670 (1995).
7. Chapman, M. R. et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851–855 (2002).
8. Wang, X., Smith, D. R., Jones, J. W. & Chapman, M. R. In vitro polymerization of a functional *Escherichia coli* amyloid protein. *J. Biol. Chem.* 282, 3713–3719 (2007).
9. Dueholm, M. S. et al. Fibrillation of the major curli subunit CsgA under a wide range of conditions implies a robust design of aggregation. *Biochemistry* 50, 8281–8290 (2011).
10. Hung, C. et al. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *MBio* 4, e00645–13 (2013).
11. Hammar, M., Bian, Z. & Normark, S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 6562–6566 (1996). 20
12. Bian, Z. & Normark, S. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 16, 5827–5836 (1997).
13. Loferer, H., Hammar, M. & Normark, S. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol. Microbiol.* 26, 11–23 (1997).
14. Robinson, L. S., Ashman, E. M., Hultgren, S. J. & Chapman, M. R. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol. Microbiol.* 59, 870–881 (2006).
15. Nenninger, A. A., Robinson, L. S. & Hultgren, S. J. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 900–905 (2009).
16. Nenninger, A. A. et al. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. *Mol. Microbiol.* 81, 486–499 (2011). 30
17. Okuda, S. & Tokuda, H. Lipoprotein sorting in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 239–259 (2011).
18. Iacovache, I., Bischofberger, M. & van der Goot, F. G. Structure and assembly of pore-forming proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 241–246 (2010).
19. Goyal, P., Van Gerven, N., Jonckheere, W. & Remaut, H. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the curli transporter CsgG. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69, 1349–1353 (2013).
20. Krantz, B. A. et al. A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science* 309, 777–781 (2005).
21. Janowiak, B. E., Fischer, A. & Collier, R. J. Effects of introducing a single charged residue into the phenylalanine clamp of multimeric anthrax protective antigen. *J. Biol. Chem.* 285, 8130–8137 (2010). 40

【 0 6 9 2 】

【表 9 - 2】

22. Feld, G. K., Brown, M. J. & Krantz, B. A. Ratcheting up protein translocation with anthrax toxin. *Protein Sci.* 21, 606–624 (2012).
23. Van Gerven, N. et al. Secretion and functional display of fusion proteins through the curli biogenesis pathway. *Mol. Microbiol.* 91, 1022–1035 (2014).
24. Brinker, A. et al. Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding. *Cell* 107, 223–233 (2001).
25. Busby, J. N., Panjikar, S., Landsberg, M. J., Hurst, M. R. & Lott, J. S. The BC component of ABC toxins is an RHS-repeat-containing protein encapsulation device. *Nature* 501, 547–550 (2013).
26. Takagi, F., Koga, N. & Takada, S. How protein thermodynamics and folding mechanisms are altered by the chaperonin cage: molecular simulations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 11367–11372 (2003). 10
27. Zhou, H. X. Protein folding in confined and crowded environments. *Arch. Biochem. Biophys.* 469, 76–82 (2008).
28. Chen, A. Y. et al. Synthesis and patterning of tunable multiscale materials with engineered cells. *Nature Mater.* 13, 515–523 (2014).
29. Sivanathan, V. & Hochschild, A. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates. *Nature Protocols* 8, 1381–1390 (2013).
30. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 6640–6645 (2000).
31. Swamy, M., Siegers, G. M., Minguet, S., Wollscheid, B. & Schamel, W. W. A. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. *Sci. STKE* 2006, pl4, <http://dx.doi.org/10.1126/stke.3452006pl4> (2006).
32. Winter, G. xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. *J. Appl. Cryst.* 43, 186–190 (2010). 20
33. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132 (2010).
34. Sheldrick, G. M. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 479–485 (2010).
35. Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M. & Paciorek, W. Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 2023–2030 (2003).
36. Cowtan, K. Recent developments in classical density modification. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 470–478 (2010).
37. Cowtan, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 1002–1011 (2006).
38. Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221 (2010).
39. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501 (2010). 30
40. Davis, I. W. et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 35 (Suppl 2), W375–W383 (2007).
41. Strong, M. et al. Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 8060–8065 (2006).
42. McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* 40, 658–674 (2007).
43. Smart, O. S. et al. Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68, 368–380 (2012).
44. Murshudov, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 355–367 (2011).
45. Nicholls, R. A., Long, F. & Murshudov, G. N. Low-resolution refinement tools in REFMAC5. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68, 404–417 (2012). 40

【 0 6 9 3 】

【表 9 - 3】

46. Goormaghtigh, E. & Ruyschaert, J. M. Subtraction of atmospheric water contribution in Fourier transform infrared spectroscopy of biological membranes and proteins. *Spectrochim. Acta* 50A, 2137–2144 (1994).
47. Mindell, J. A. & Grigorieff, N. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 142, 334–347 (2003).
48. Shaikh, T. R. et al. SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nature Protocols* 3, 1941–1974 (2008).
49. Tang, G. et al. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 157, 38–46 (2007).
50. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612 (2004). 10
51. Del Rio Martinez, J. M., Zaitseva, E., Petersen, S., Baaken, G. & Behrends, J. C. Automated formation of lipid membrane microarrays for ionic single molecule sensing with protein nanopores. *Small* <http://dx.doi.org/10.1002/sml.201402016> (13 August 2014).
52. Movileanu, L., Howorka, S., Braha, O. & Bayley, H. Detecting protein analytes that modulate transmembrane movement of a polymer chain within a single protein pore. *Nature Biotechnol.* 18, 1091–1095 (2000).
53. Pronk, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 29, 845–854 (2013).
54. Lindorff-Larsen, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78, 1950–1958 (2010).
55. Capra, J. A. & Singh, M. Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics* 23, 1875–1882 (2007). 20

30

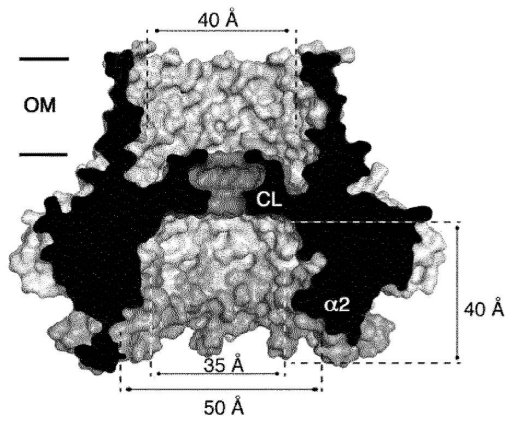
40

50

【図面】

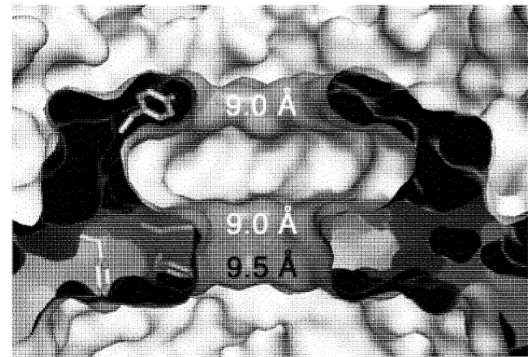
【図 1】

図 1



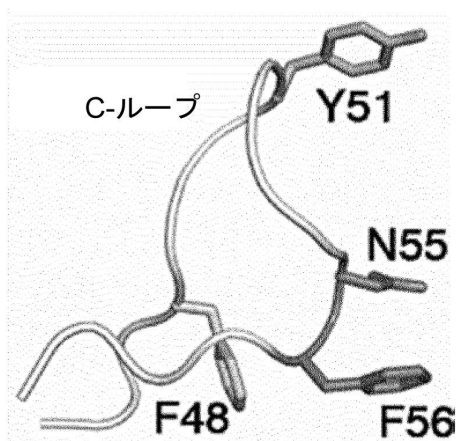
【図 2】

図 2



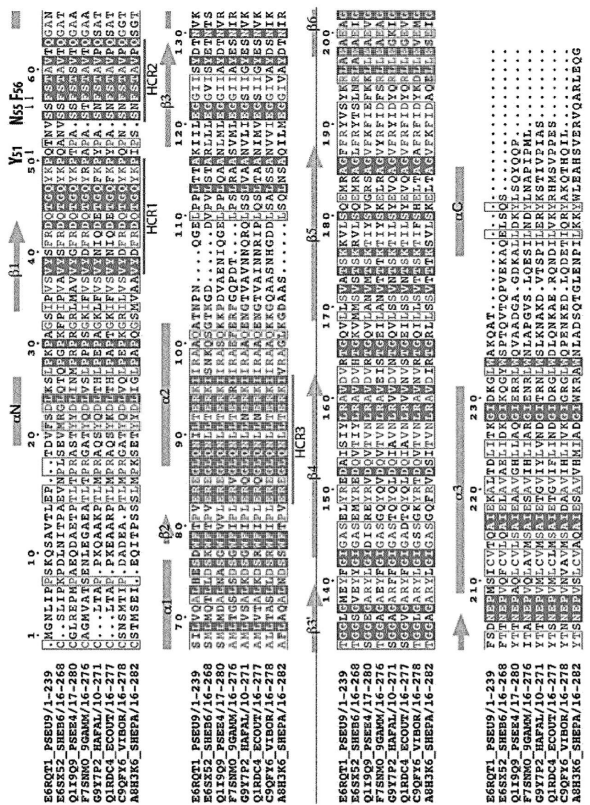
【図 3】

図 3



【図 4】

図 4



10

20

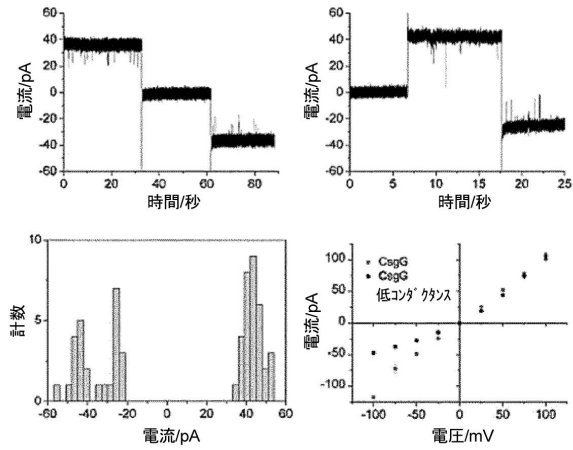
30

40

50

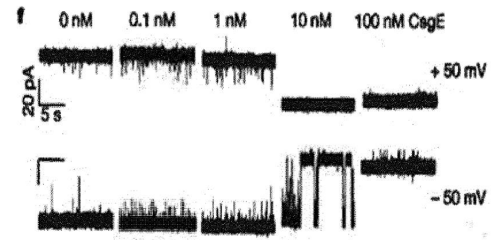
【図 5】

図 5



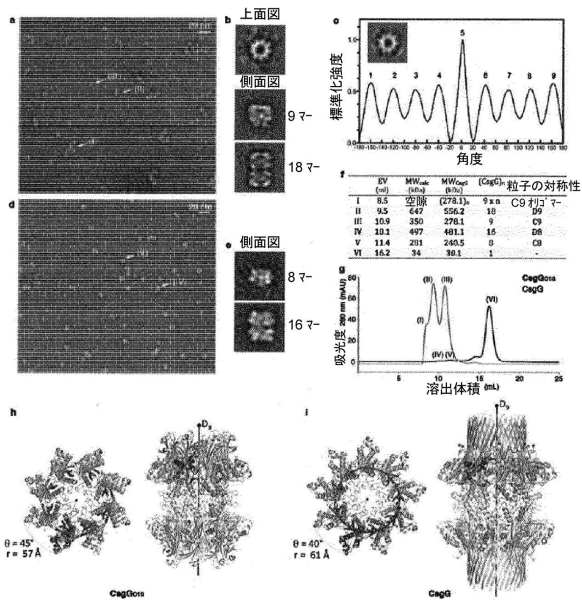
【図 6】

図 6



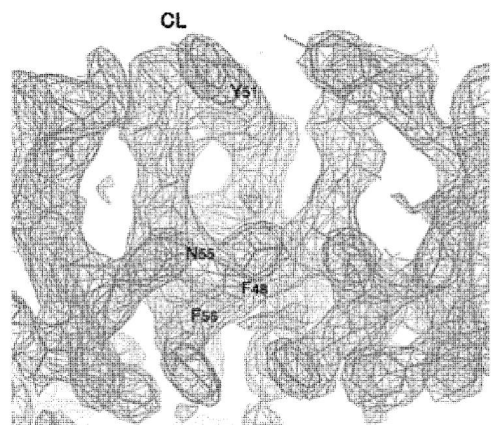
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8



10

20

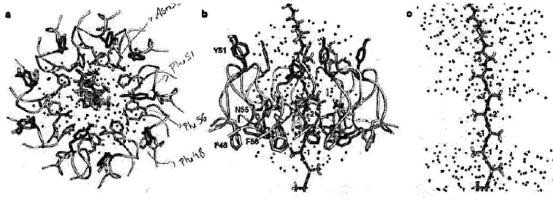
30

40

50

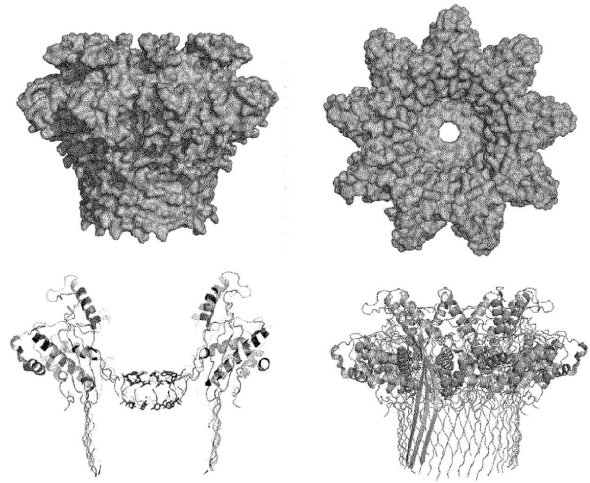
【図 9】

図 9



【図 10】

図 10

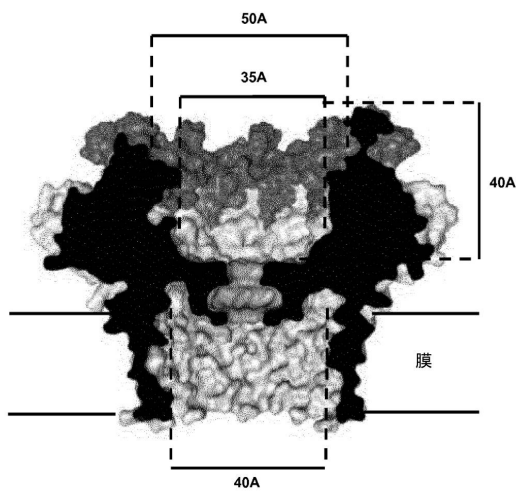


10

20

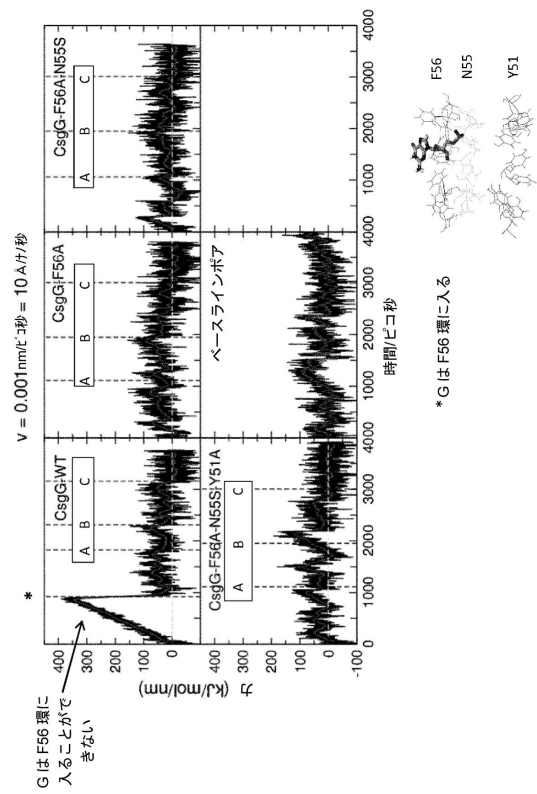
【図 11】

図 11



【図 12】

図 12

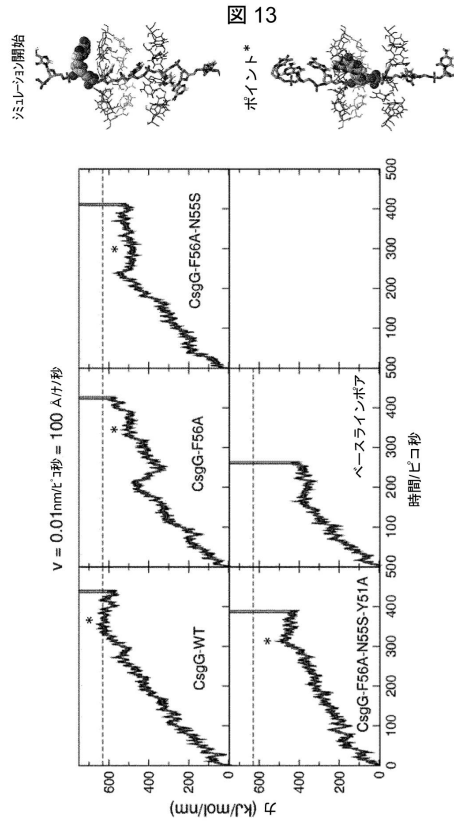


30

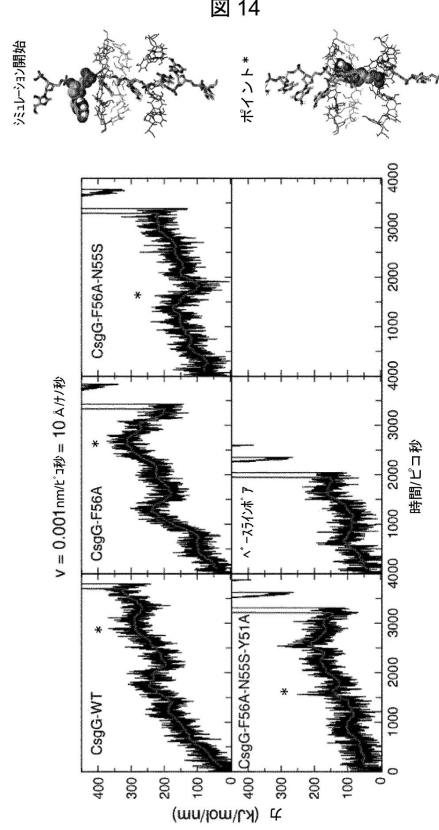
40

50

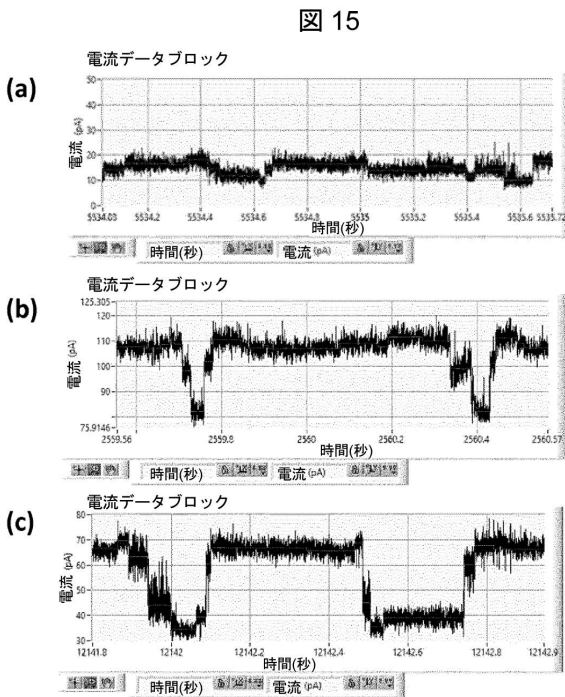
【図 13】



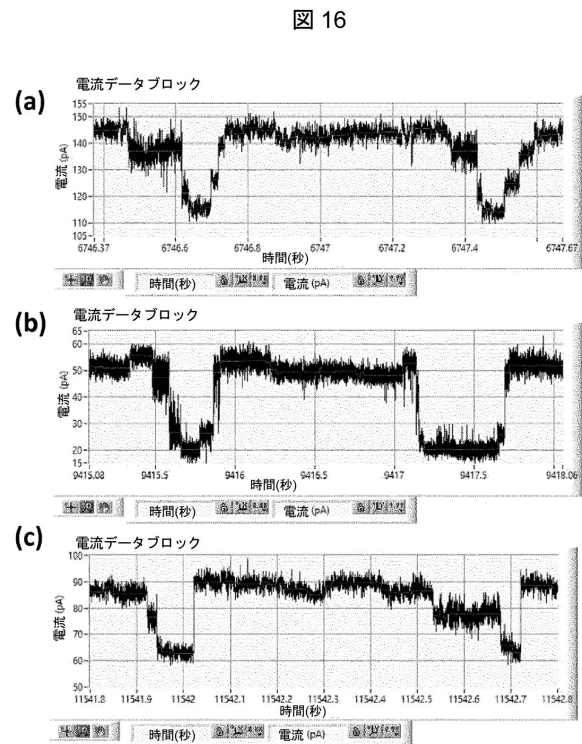
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

20

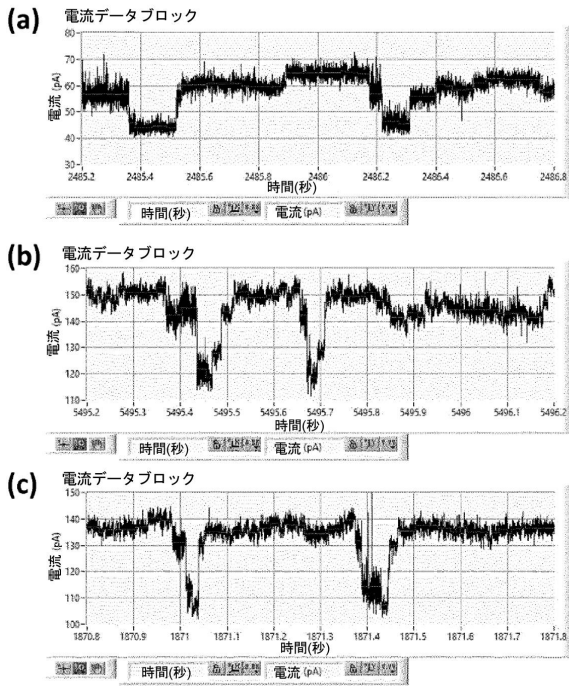
30

40

50

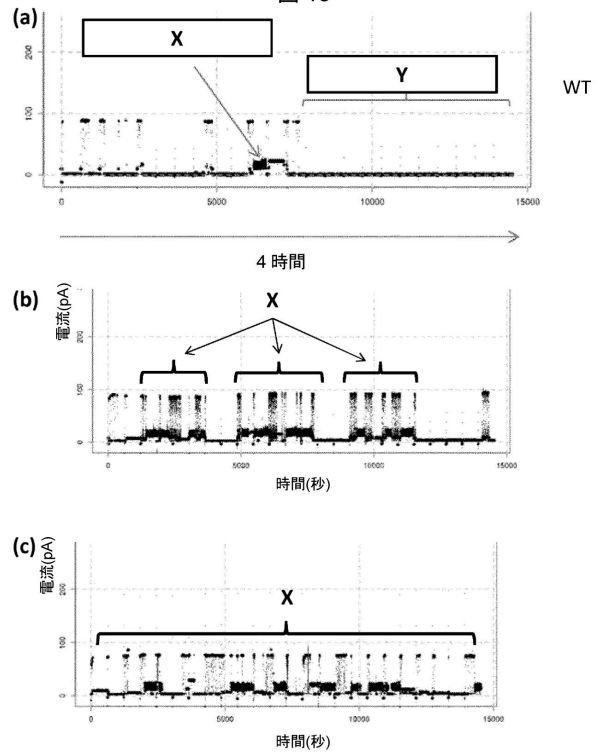
【図 17】

図 17



【図 18】

図 18

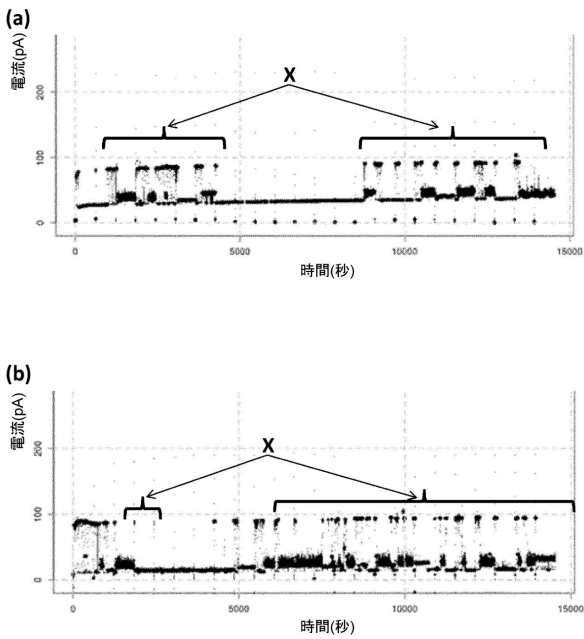


10

20

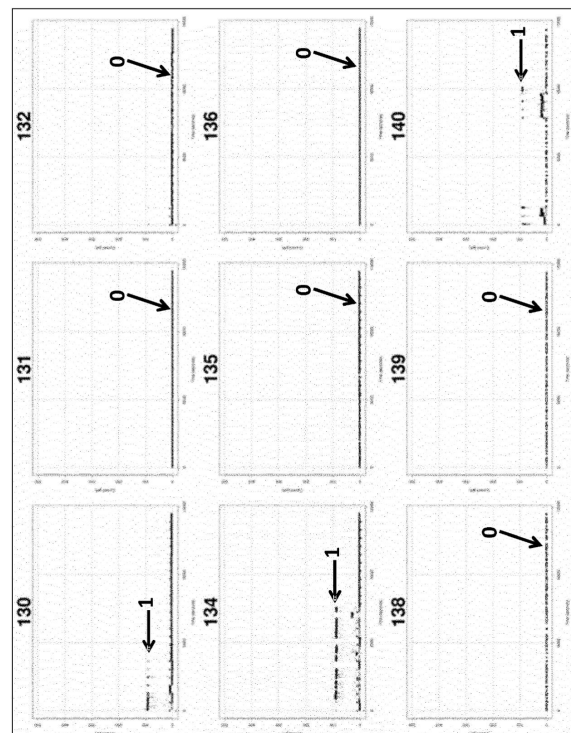
【図 19】

図 19



【図 20】

図 20



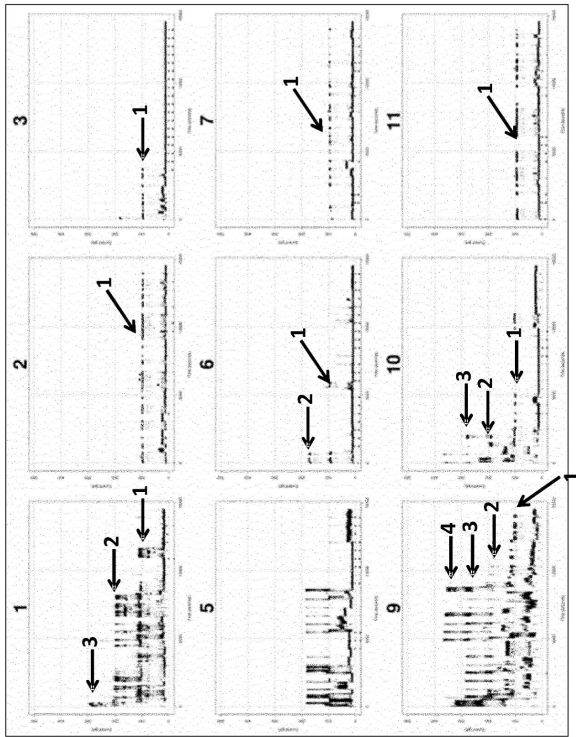
30

40

50

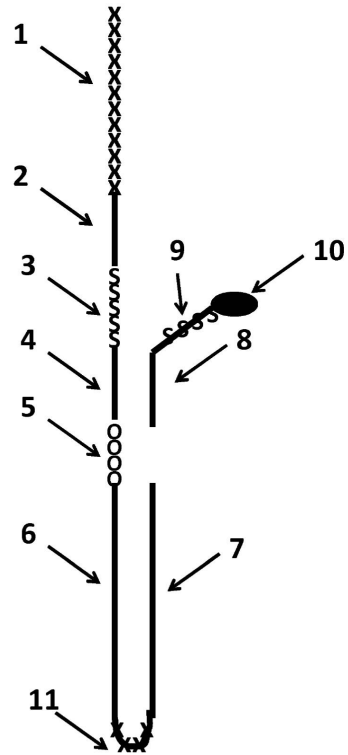
【図 2 1】

図 21



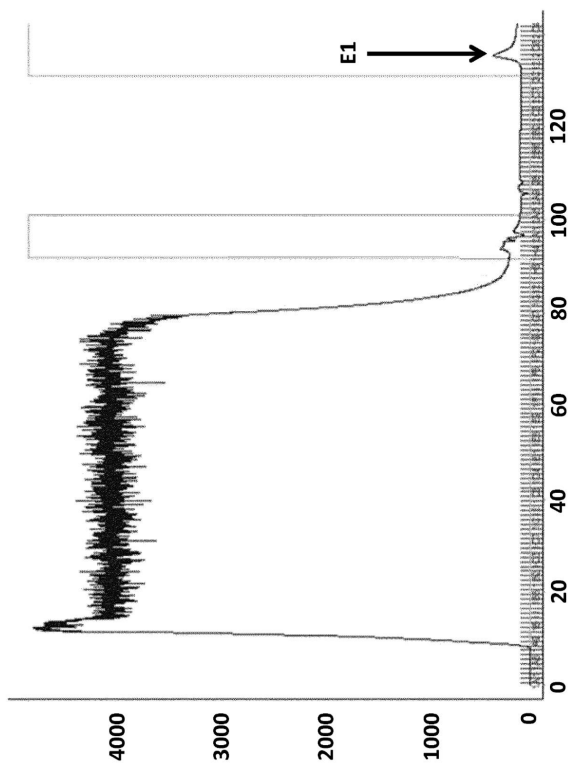
【図 2 2】

図 22



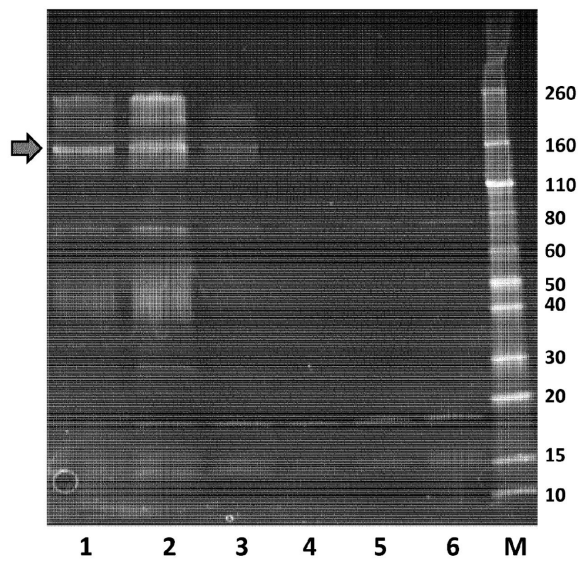
【図 2 3】

図 23



【図 2 4】

図 24



10

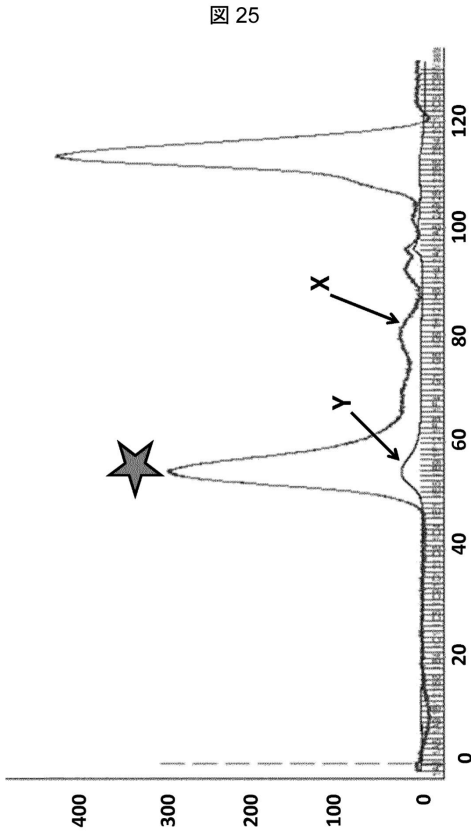
20

30

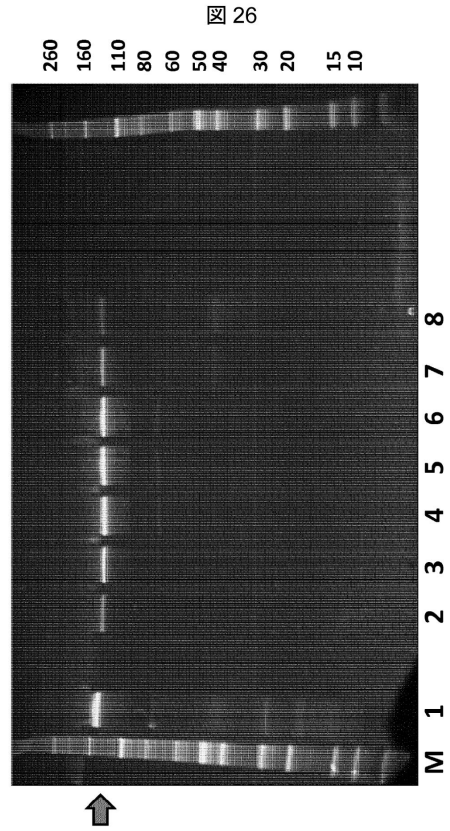
40

50

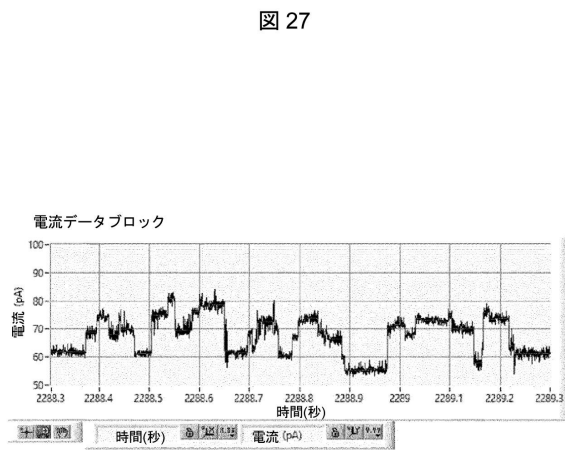
【図 25】



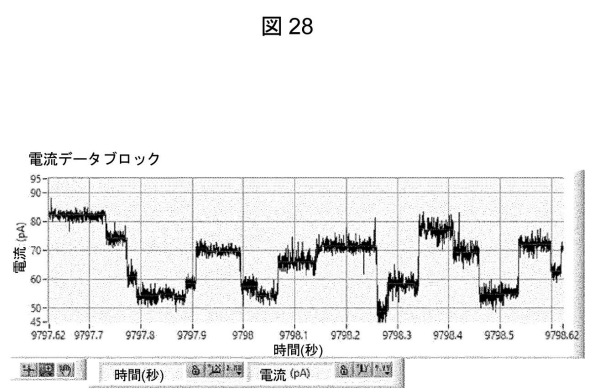
【図 26】



【図 27】



【図 28】



10

20

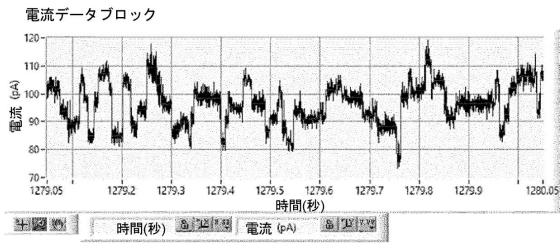
30

40

50

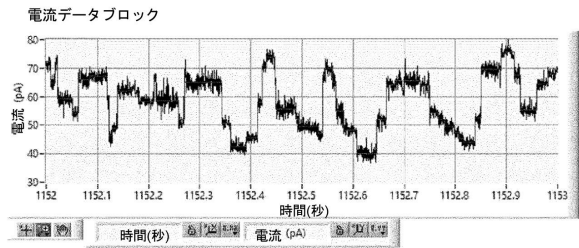
【図 29】

図 29



【図 30】

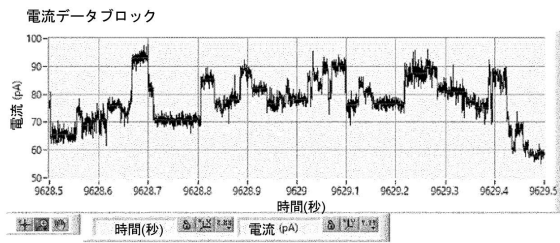
図 30



10

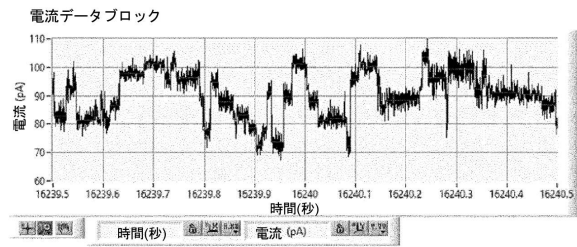
【図 31】

図 31



【図 32】

図 32



20

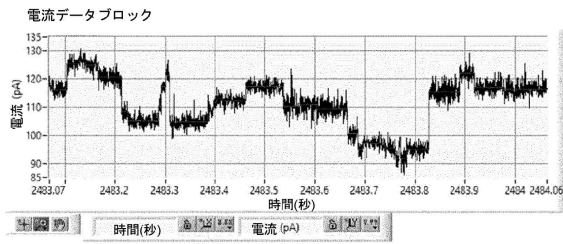
30

40

50

【図 3 3】

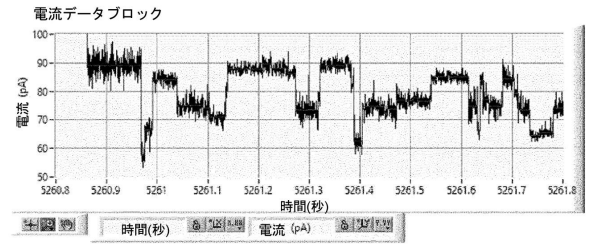
図 33



【図 3 4】

図 34

CsgG-Eco-(Y51T/F56Q-StreptII(C))9

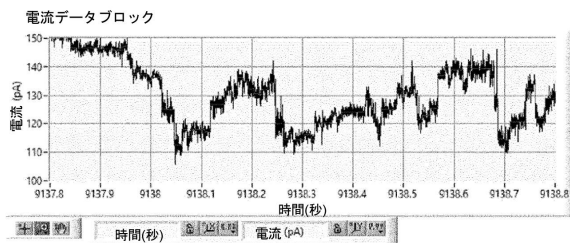


10

【図 3 5】

図 35

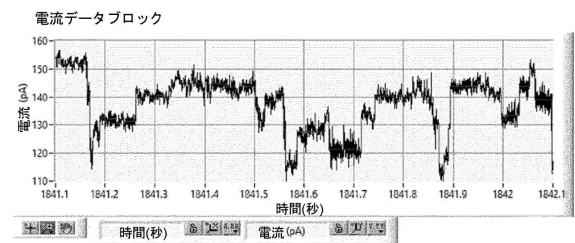
CsgG-Eco-(N55S/F56Q-StreptII(C))9



【図 3 6】

図 36

CsgG-Eco-(Y51T/N55S/F56Q-StreptII(C))9



20

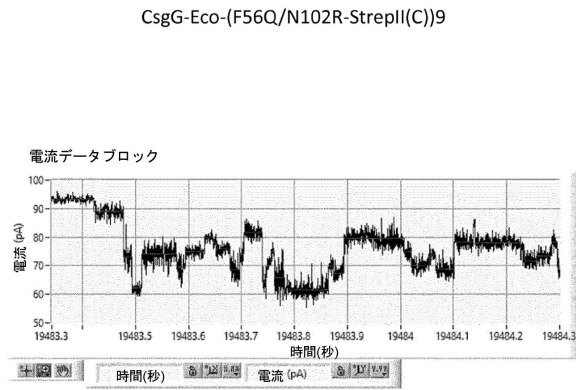
30

40

50

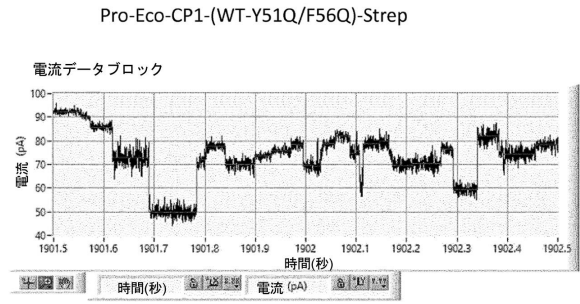
【図 37】

図 37



【図 38】

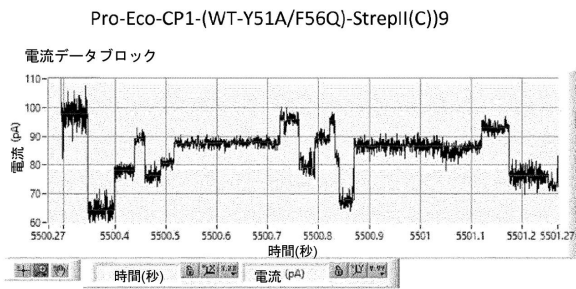
図 38



10

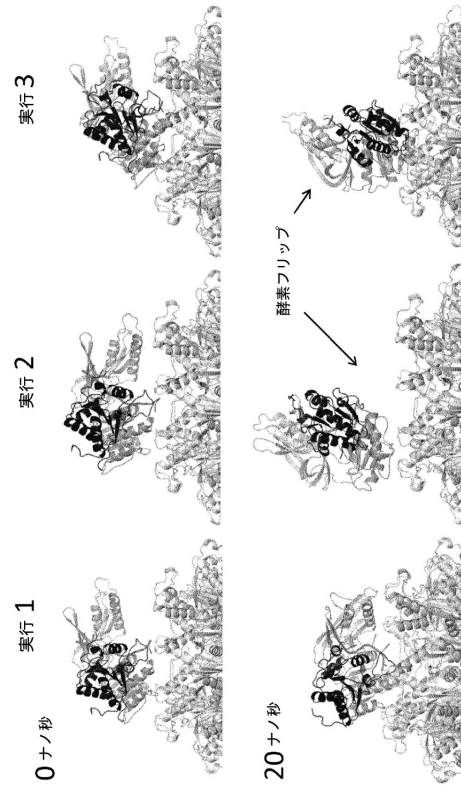
【図 39】

図 39



【図 40】

図 40



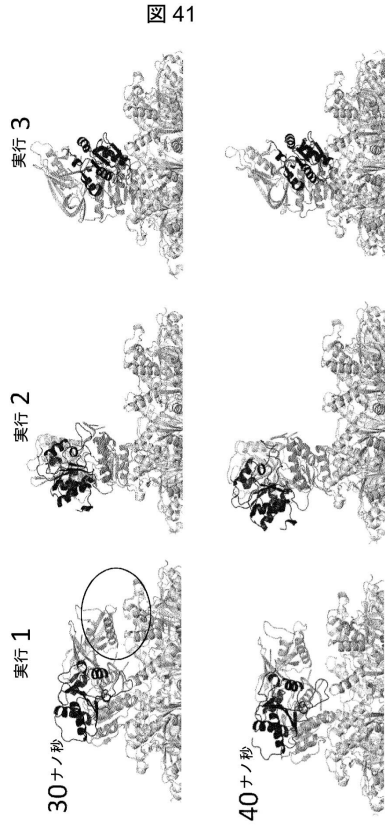
20

30

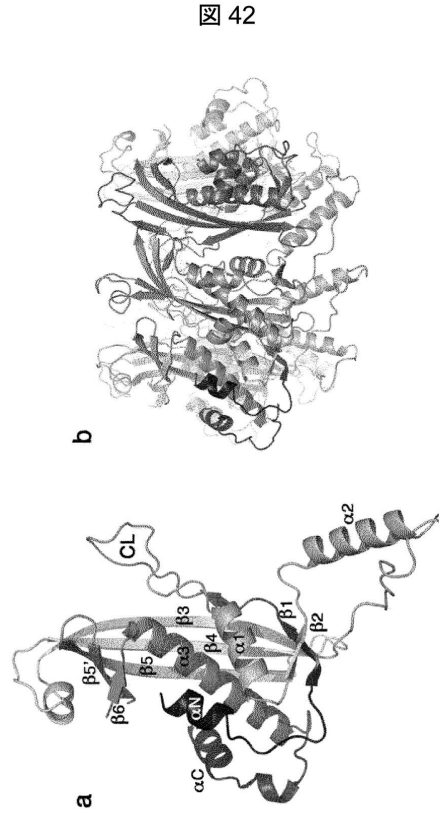
40

50

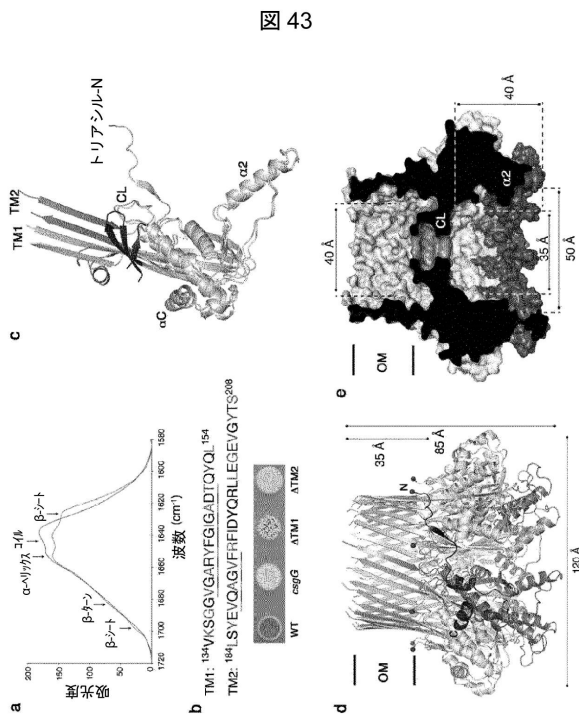
【図 4 1】



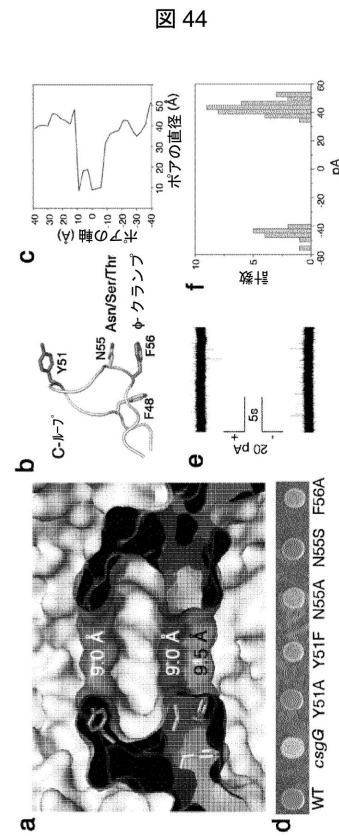
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



10

20

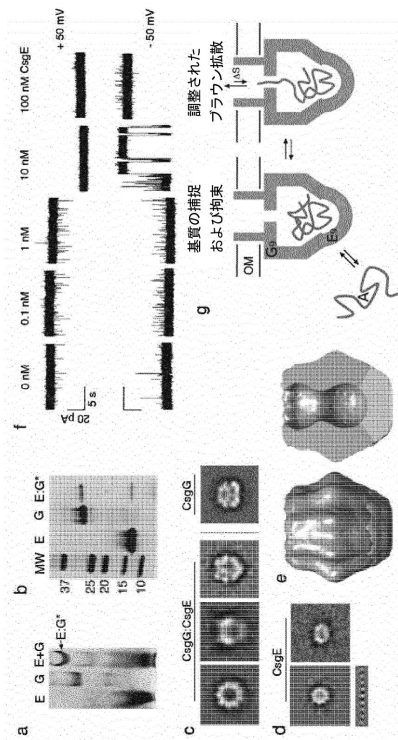
30

40

50

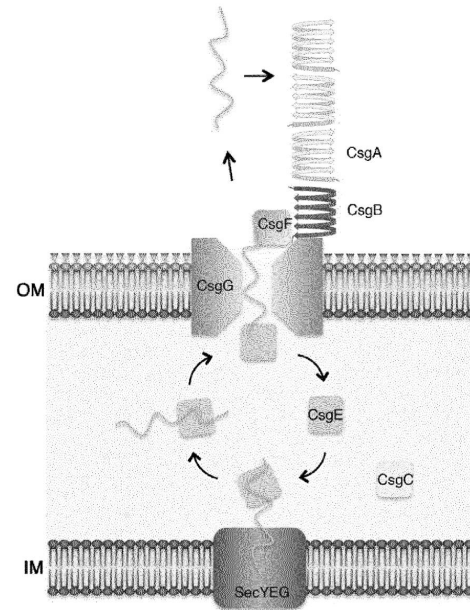
【図 4 5】

図 45



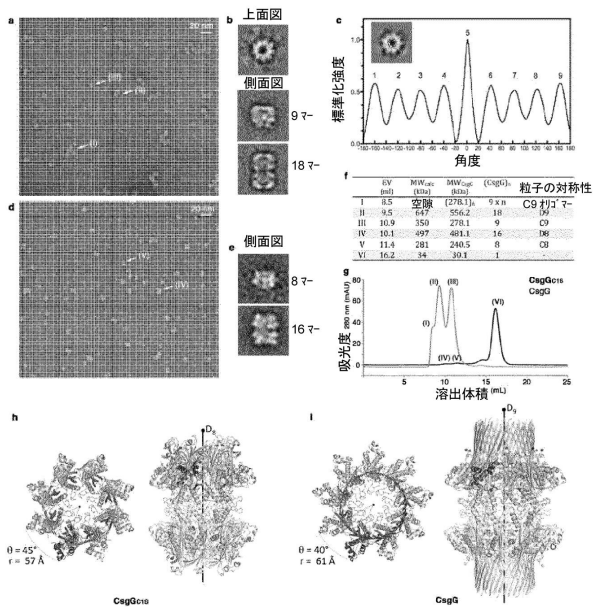
【図 4 6】

図 46



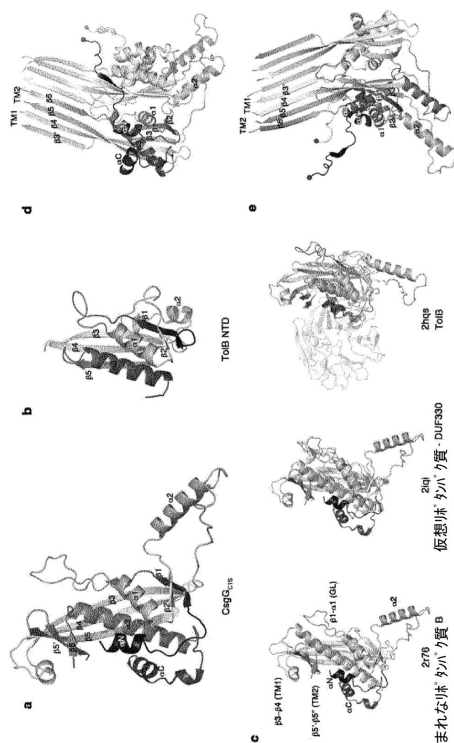
【図 4 7】

図 47



【図 4 8】

図 48



10

20

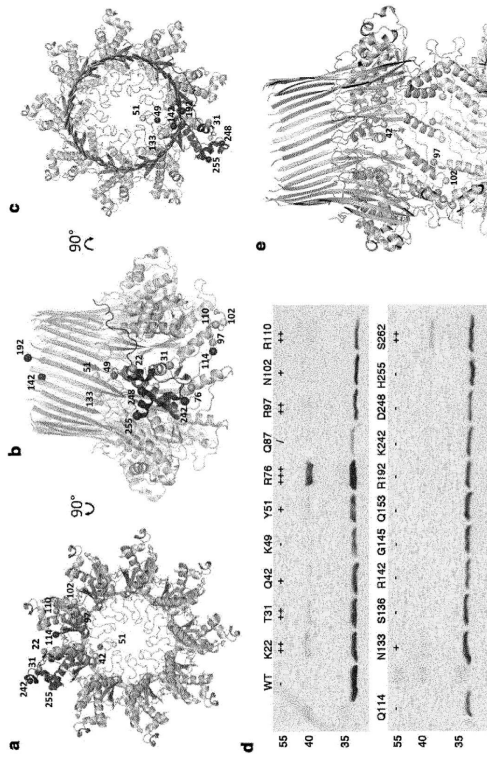
30

40

50

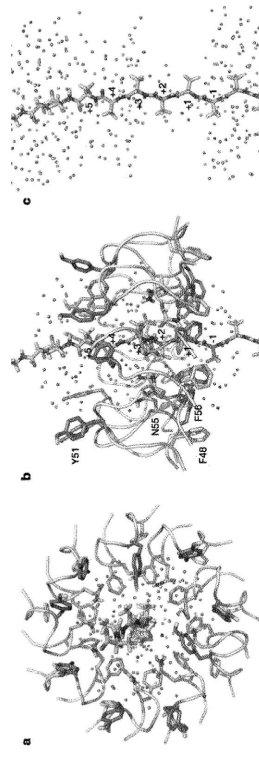
【図 49】

図 49



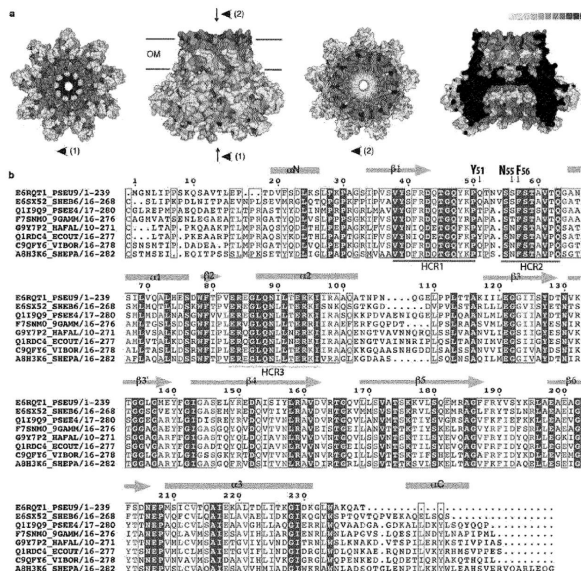
【図 50】

図 50



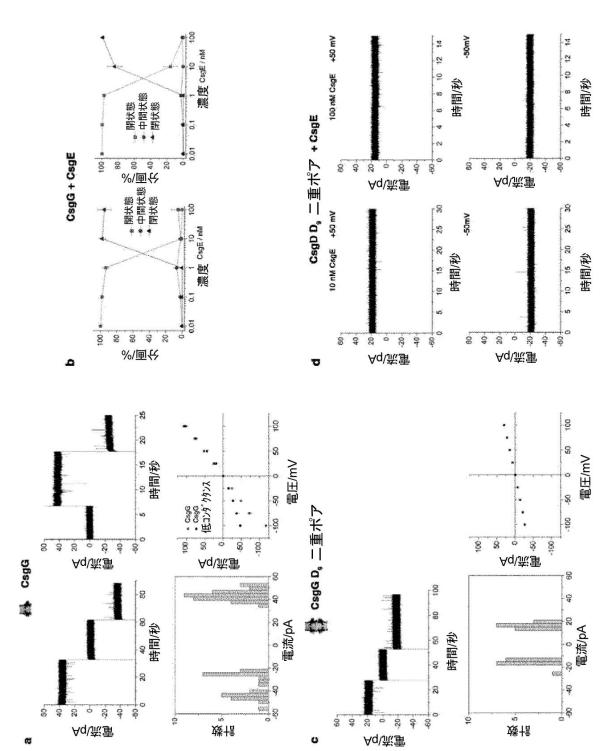
【図 51】

図 51



【図 52】

図 52



【図 53】

図 53



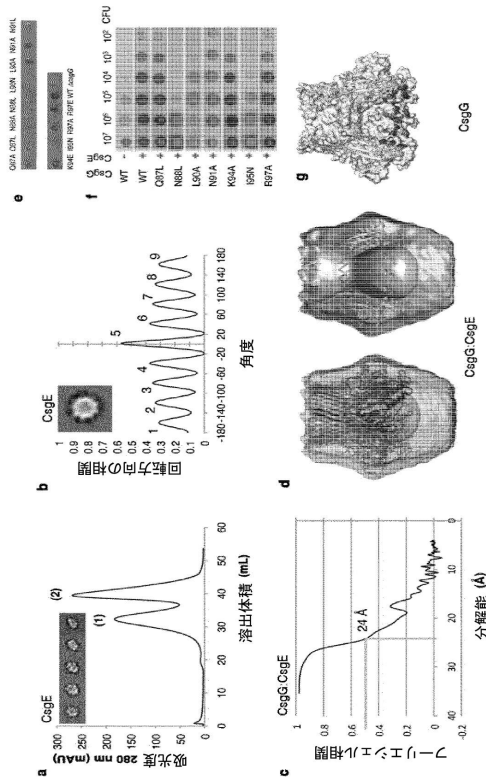
【図 54】

図 54



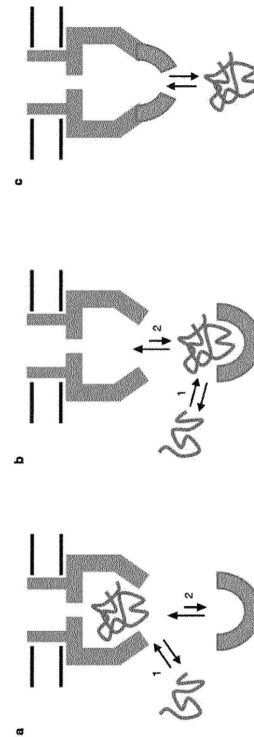
【図 5 3】

図 53



【図 5 4】

図 54

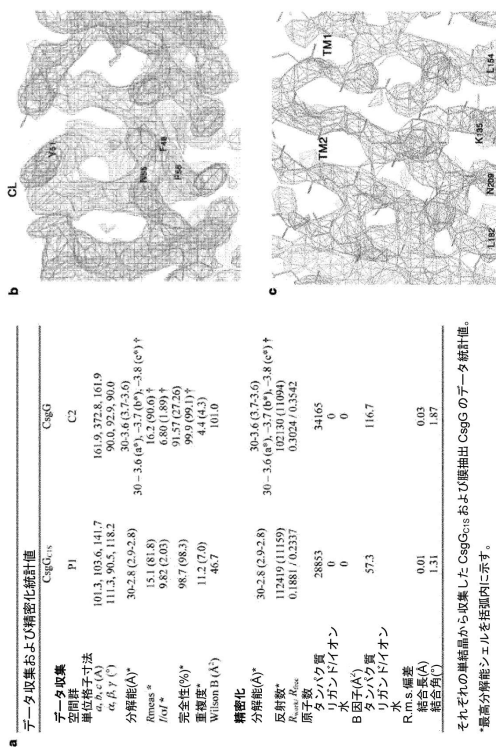


10

20

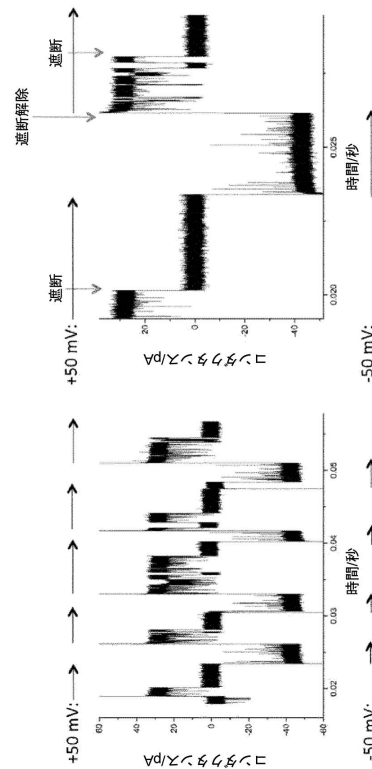
【図 5 5】

図 55



【図 5 6】

図 56

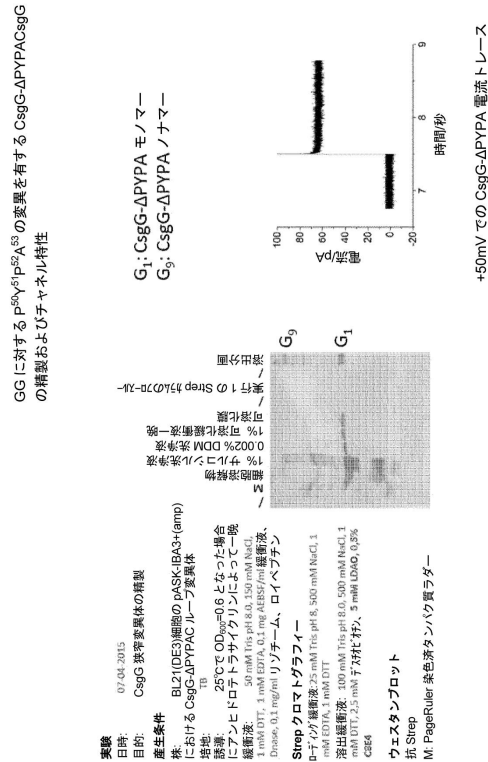


30

40

50

【図 57】



【配列表】

0007161291000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N	27/02	(2006.01)	G 0 1 N	27/00	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	27/02	D
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 2 5 U
			G 0 1 N	33/566	
			C 1 2 N	9/00	

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1422079.2

(32)優先日 平成26年12月11日(2014.12.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1506489.2

(32)優先日 平成27年4月16日(2015.4.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1506754.9

(32)優先日 平成27年4月21日(2015.4.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1508287.8

(32)優先日 平成27年5月14日(2015.5.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1511203.0

(32)優先日 平成27年6月25日(2015.6.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1515240.8

(32)優先日 平成27年8月27日(2015.8.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

早期審理対象出願

(73)特許権者 511252899

オックスフォード ナノボール テクノロジーズ ピーエルシー

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャイヤー オーエックス4 4ディーキュー オックスフォード サイエンス パーク エドモンド ハレー ロード ゴズリング ビルディング

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100196966

弁理士 植田 渉

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ホウォルカ, ステファン

イギリス国 ダブリュシー 1 エイチ 0 エージェイ ロンドン, ゴードン ストリート 2 0

(72)発明者 リモート, ハン

- ベルギー国 ベー - 3 3 7 0 ロースベーク カステールストラート 1 0 エー
- (72)発明者 ジャヤシンゲ, ラクマル
- イギリス国 オーエックス4 4 ジーエー, オックスフォード, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソンアベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド内
- (72)発明者 ウォレス エリザベス, ジェーン
- イギリス国 オーエックス4 4 ジーエー, オックスフォード, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソンアベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド内
- (72)発明者 クラーク, ジェームス アンソニー
- イギリス国 オーエックス4 4 ジーエー, オックスフォード, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソンアベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド内
- (72)発明者 ハンプリー, リチャード ジョージ
- イギリス国 オーエックス4 4 ジーエー, オックスフォード, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソンアベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド内
- (72)発明者 ピュー, ジョナサン パンクス
- イギリス国 オーエックス4 4 ジーエー, オックスフォード, オックスフォード サイエンス パーク, ロバート ロビンソンアベニュー 4, エドモンド カートライト ハウス, オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド内
- 合議体
- 審判長 上條 肇
- 審判官 伊藤 良子
- 審判官 福井 悟
- (56)参考文献 Epstein, Elisabeth Ashman, "Assembly, Spatial Distribution, and Secretion Activity of the Curlin Secretion Lipoprotein, CsgG.", Deep Blue Repositories[online], 2008年, The University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA. [retrieved on 1 June 2022], Retrieved from the Internet:<URL:https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/61667/ema shman__1.pdf>, ISBN: 9780549984856
- PNAS, 2014年12月1日, Vol. 111, No. 50, pp. E5439 - E5444
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
- UniProt/GeneSeq
- JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
- CAPLUS/WPIDS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN)
- C12N 15/00-15/90
- C12Q 1/00-3/00
- C12M 1/00-3/10