

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6522496号
(P6522496)

(45) 発行日 令和1年5月29日(2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/10	(2006.01)
C 12 N 9/10	(2006.01)
C 12 Q 1/686	(2018.01)
C 12 P 19/30	(2006.01)
C 12 P 21/02	(2006.01)
C 12 N 15/10	Z N A Z
C 12 N 9/10	9/10
C 12 Q 1/686	1/686
C 12 P 19/30	19/30
C 12 P 21/02	21/02

請求項の数 37 (全 75 頁)

(21) 出願番号	特願2015-511949 (P2015-511949)
(86) (22) 出願日	平成25年5月16日 (2013.5.16)
(65) 公表番号	特表2015-516165 (P2015-516165A)
(43) 公表日	平成27年6月11日 (2015.6.11)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/001458
(87) 國際公開番号	W02013/170963
(87) 國際公開日	平成25年11月21日 (2013.11.21)
審査請求日	平成28年5月13日 (2016.5.13)
(31) 優先権主張番号	12003887.2
(32) 優先日	平成24年5月16日 (2012.5.16)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

(73) 特許権者	511085275 ノクソン ファーマ エージー ドイツ国, 10589 ベルリン, マック スードーン-シュトラーセ 8-10
(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元
(72) 発明者	ペフ, アンドリアス ドイツ国, 06114 ハレ, ウィリー ローマン シュトラーセ 12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-核酸の酵素性合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一の L-核酸の 3' 末端に 1 以上の L-ヌクレオチドを付加するための方法であって、ポリメラーゼ活性提示部分を含むタンパク質の存在下で 1 以上の L-ヌクレオチドを第一の L-核酸と反応させる段階を含み、前記ポリメラーゼ活性が前記第一の L-核酸の 3' 末端に 1 以上の L-ヌクレオチドを付加することができ、前記ポリメラーゼ活性提示部分はアミノ酸配列からなり、前記アミノ酸配列のアミノ酸は D-アミノ酸である、方法。

【請求項 2】

前記ポリメラーゼ活性が温度安定性のポリメラーゼ活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列が少なくとも 300 個のアミノ酸を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼ X、サーマス・サーモフィラス (Thermus thermophilus) ポリメラーゼ X コアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4 DNA ポリメラーゼ、Phi 29 DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、SP6 ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼ I、およびポリメラーゼ、並びにそれらのそれぞれおよび何れかの変異体の群から選択され、前記変異体が、アフリカ

ブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Ph129DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、およびポリメラーゼの群から選択されるそれぞれのポリメラーゼのアミノ酸配列に対して少なくとも90 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である、請求項4に記載の方法。
10

【請求項6】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tf1ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、およびStopfle断片、並びにそれらの変異体の群から選択され、前記変異体が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tf1ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、およびStopfle断片の群から選択されるそれぞれのポリメラーゼのアミノ酸配列に対して少なくとも90 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1から3の何れか1項に記載の方法。
20
30

【請求項7】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号15に記載のアミノ酸配列、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、Dpo4ポリメラーゼまたはその変異体である、請求項6に記載の方法。
40

【請求項8】

前記反応が、第二のL-核酸をさらに含み、前記第一のL-核酸の1つの分子が、前記第二のL-核酸の1つの分子とハイブリッド形成する、請求項1から7の何れか1項に記載の方法。

【請求項9】

50

50

L-ヌクレオチドおよびポリメラーゼ活性提示部分を含むタンパク質の存在下で標的L-核酸を増幅するための方法であって、前記ポリメラーゼ活性が前記標的L-核酸を増幅させることができ、前記ポリメラーゼ活性提示部分はアミノ酸配列からなり、前記アミノ酸配列のアミノ酸はD-アミノ酸である、方法。

【請求項10】

前記ポリメラーゼ活性が温度安定性のポリメラーゼ活性である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列が少なくとも300個のアミノ酸を含む、請求項9または10に記載の方法。

10

【請求項12】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi29DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、およびポリメラーゼ、並びにそれらのそれおおよび何れかの変異体の群から選択され、前記変異体が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi29DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、およびポリメラーゼの群から選択されるそれおのポリメラーゼのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項9に記載の方法。

20

【請求項13】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である、請求項12に記載の方法。

30

【請求項14】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus littoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phiポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tf1ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、およびStoffel断片、並びにそれらの変異体の群から選択され、前記変異体が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus littoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、

40

50

M t h ポリメラーゼ、Ph o ポリメラーゼ、E S 4 ポリメラーゼ、T b r ポリメラーゼ、T f 1 ポリメラーゼ、T r u ポリメラーゼ、T a c ポリメラーゼ、T n e ポリメラーゼ、T m a ポリメラーゼ、T i h ポリメラーゼ、T f i ポリメラーゼ、およびS t o f f e l 断片の群から選択されるそれぞれのポリメラーゼのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項9から11の何れか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号15に記載のアミノ酸配列、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、D p o 4 ポリメラーゼまたはその変異体である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

少なくとも1つのプライマーを利用し、前記少なくとも1つのプライマーが、L-ヌクレオチドからなる、請求項9から14の何れか1項に記載の方法。

【請求項17】

ポリメラーゼ活性提示部分を含むタンパク質であって、前記ポリメラーゼ活性提示部分が、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなり、前記ポリメラーゼ活性が第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加することができる、タンパク質。

【請求項18】

前記ポリメラーゼ活性が温度安定性のポリメラーゼ活性である、請求項17に記載のタンパク質。

【請求項19】

前記ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列が少なくとも300個のアミノ酸を含む、請求項17または18に記載のタンパク質。

【請求項20】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi 29DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、およびポリメラーゼ、並びにそれらのそれおおよび何れかの変異体の群から選択され、前記変異体が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi 29DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、およびポリメラーゼの群から選択されるそれぞれのポリメラーゼのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項17に記載のタンパク質。

【請求項21】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である、請求項20に記載のタンパク質。

【請求項22】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)DNAポリメラーゼ、バイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、バイロコッカス・フリオス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、スルホロブス・

10

20

30

40

50

ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス (*Thermococcus gorgonarius*) DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tf1ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、Amp1iTaq、およびStoffel断片、並びにそれらの変異体の群から選択され、前記変異体が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus littoralis*) DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属 (*Pyrococcus sp.*) DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) DNAポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス (*Thermococcus gorgonarius*) DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tf1ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、Amp1iTaq、およびStoffel断片の群から選択されるそれぞれのポリメラーゼのアミノ酸配列に対して少なくとも90 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 17 から 19 の何れか 1 項に記載のタンパク質。
10

【請求項 23】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号 15 に記載のアミノ酸配列、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列、配列番号 17 に記載のアミノ酸配列、配列番号 18 に記載のアミノ酸配列、配列番号 19 に記載のアミノ酸配列、配列番号 20 に記載のアミノ酸配列、配列番号 21 に記載のアミノ酸配列および配列番号 22 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、DPO4ポリメラーゼまたはその変異体である、請求項 22 に記載のタンパク質。
20

【請求項 24】

配列番号 15 に記載のアミノ酸配列を含むポリメラーゼであって、前記アミノ酸配列のアミノ酸が D - アミノ酸である、ポリメラーゼ。
30

【請求項 25】

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含むポリメラーゼであって、前記アミノ酸配列のアミノ酸が D - アミノ酸である、ポリメラーゼ。
40

【請求項 26】

野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体であって、前記野生型ポリメラーゼが配列番号 15 に記載のアミノ酸配列からなり、前記ポリメラーゼ変異体が、ポリメラーゼ活性を有し、前記ポリメラーゼ変異体が L - 核酸の 3' 末端に 1 以上の L - ヌクレオチドを付加することができ、前記ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸は、D - アミノ酸であり、前記変異体が、配列番号 15 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体。
40

【請求項 27】

前記ポリメラーゼ活性が、温度安定性のポリメラーゼ活性である、請求項 26 に記載のポリメラーゼ変異体。
50

【請求項 28】

前記ポリメラーゼ変異体がアミノ酸配列を含み、前記ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列が、少なくとも 1 つのアミノ酸位置で野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なる、請求項 26 または 27 に記載のポリメラーゼ変異体。

【請求項 29】

野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体であって、前記野生型ポリメラーゼが、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなり、前記ポリメラーゼ変異体がポリメラーゼ活性を有し、前記ポリメラーゼ変異体がL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加することができ、前記ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸は、D-アミノ酸であり、前記変異体が、配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体。

【請求項30】

前記ポリメラーゼ変異体がアミノ酸配列を含み、前記ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列が、少なくとも1つのアミノ酸位置で野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なる、請求項29に記載のポリメラーゼ変異体。

10

【請求項31】

L-核酸の3'末端に対して1以上のL-ヌクレオチドを付加するための方法における、ポリメラーゼ活性提示部分を含むタンパク質の使用であって、前記タンパク質がアミノ酸配列からなり、かつ前記アミノ酸配列のアミノ酸がD-アミノ酸である、タンパク質の使用。

【請求項32】

L-ヌクレオチドの存在下で標的L-核酸を増幅するための方法における、ポリメラーゼ活性提示部分を含むタンパク質の使用であって、前記タンパク質がアミノ酸配列からなり、かつ前記アミノ酸配列のアミノ酸がD-アミノ酸である、タンパク質の使用。

【請求項33】

標的L-核酸を増幅するための方法がポリメラーゼ連鎖反応である、請求項32に記載の使用。

20

【請求項34】

前記タンパク質が、請求項17から30の何れか1項に記載のタンパク質である、請求項31から33の何れか1項に記載の使用。

【請求項35】

標的分子結合L-核酸分子の同定のための方法であって、次の段階：

- (a) L-核酸分子の不均一集団を作製すること；
- (b) 段階(a)の前記L-核酸分子の不均一集団を前記標的分子と接触させること；
- (c) 前記標的分子が結合しないL-核酸分子を分離すること；
- (d) 前記標的分子が結合するL-核酸分子を増幅させること

30

を含み、前記増幅段階が請求項17から30の何れか1項に記載のタンパク質を使用する、方法。

【請求項36】

請求項17から30の何れかに記載のタンパク質を作製するための方法であって、

a) 請求項17から30の何れかに記載のタンパク質の2以上の断片が化学的に合成され、それによって、前記断片が全体として前記タンパク質のアミノ酸配列を形成し、

b) 段階a)の断片が、セグメント縮合、ネイティブ化学ライゲーション、酵素性ライゲーションまたはそれらの組み合わせにより互いに對して連結され、

前記タンパク質が、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、方法。

40

【請求項37】

前記断片が固相ペプチド合成によって合成される、請求項36に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加するための方法、標的L-核酸を増幅するための方法、酵素活性提示部分を含むタンパク質、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼ、配列番号15に記載のアミノ酸配列からなる野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体、1以上のL-ヌクレオチドを付加

50

するための方法における酵素活性提示部分を含むタンパク質の使用、標的 L - 核酸を増幅するための方法における酵素活性提示部分を含むタンパク質の使用、標的分子結合 L - 核酸分子の同定のための方法、タンパク質およびポリメラーゼをそれぞれ作製するための方法および第一の D - ペプチドまたは第一の D - タンパク質および第二の D - ペプチドまたは第二の D - タンパク質を互いにに対して連結するための方法に関する。

【 0 0 0 2 】

より広い意味での遺伝子技術の使用は、医学および診断の分野において、ならびに基礎研究においてこの数十年にわたりなされた進歩に大いに貢献した。遺伝子技術によりもたらされる合成能力は、1つの化学合成を上回るものである。遺伝子技術および遺伝子工学によって、特に、原核および真核細胞の酵素機構を利用する事実上無制限量の L - ペプチドおよび L - タンパク質の產生が可能である。酵素およびポリメラーゼは特に、野生型であれ、またはこのような野生型の変異体であれ、理論的収率でないにせよ、化学合成によって達成可能である長さまでこのような D - 核酸の基本単位、すなわち D - ヌクレオチドを連結する、D - 核酸の合成が可能である。

10

【 0 0 0 3 】

遺伝子技術において使用される酵素は、それぞれ、キラル特異性ゆえに、そのキラリティーがそれら自身のキラリティーに適合する基本単位および基質しか利用できない。キラリティーが逆である基本単位および基質は、それぞれ、酵素の活性に対する対象になり得ない。キラル相反性の原理のため、逆キラリティーの基本単位および基質それぞれのプロセシングには、酵素が逆キラリティーを有することも必要とされる。

20

【 0 0 0 4 】

このキラル相反性の原理は、例えば、シュピーゲルマーとしても知られ、このように呼ばれる標的結合 L - 核酸の作製において集中的に使用される。現在のところ、シュピーゲルマーは、D - ペプチドまたは D - タンパク質などの標的分子または標的構造の鏡像異性型に対するインビトロ選択のために第一段階で D - 核酸ライブラリを使用する過程によって同定される。第二段階において、標的分子または標的構造の鏡像異性型に結合する、このように同定された D - 核酸を、対応する L - 核酸として調製する。キラル相反性の原理の結果として、これらの L - 核酸、すなわちシュピーゲルマーは、L - ペプチドまたは L - タンパク質などの真のまたは現実の標的分子に結合でき、選択過程に対して使用される D - ペプチドまたは D - タンパク質などのその鏡像異性型には結合できない。好ましくは、このような真のまたは現実の標的分子または標的構造は、ヒトまたは動物体などの生体系で存在するような標的分子または標的構造である。このようなシュピーゲルマーの調製のための方法は、例えば「The Aptamer Handbook」(eds. K. Lüssmann, 2006) に記載されている。

30

【 0 0 0 5 】

シュピーゲルマーを同定する過程をより容易するある方法は、真のまたは現実の標的分子または標的構造により示される鏡像異性型において標的分子または標的構造を用いて L - 核酸ライブラリから L - 核酸が直接選択されるように過程を再設計することであり得る。この過程の一部は、標的分子および標的構造それぞれに最初に結合する L - 核酸の増幅なので、ポリメラーゼが、L - プライマーに少なくとも1つのヌクレオチドを付加することが必要である。現在まで、このようなことが可能な L - アミノ酸からなるポリメラーゼは知られていない。このため、D - アミノ酸からなるポリメラーゼおよび同様の酵素が必要とされている。遺伝子技術は、D - アミノ酸からなるこのような機能的に活性のあるポリメラーゼを提供できないので、化学合成が必要である。しかし、D - タンパク質または D - ポリペプチドの合成は、比較的低分子に限定される。今までのところ合成された最大の D - タンパク質は、102個の D - アミノ酸からなる血管由来タンパク質血管内皮増殖因子（略称 VEGF - A）の D - タンパク質型であるが（Mandal, 2012）、ポリメラーゼは一般に300個を超えるアミノ酸からなる。

40

【 0 0 0 6 】

したがって、本発明の根本となる問題は、プライマーなどの L - 核酸への少なくとも 1

50

個のヌクレオチドの付加を可能にする方法の提供である。本発明の根本となるさらなる問題は、L-ヌクレオチドを利用する標的L-核酸を増幅するための方法の提供である。本発明の根本となるまたさらなる問題は、このような方法の実施を可能にする手段の提供である。

【0007】

本発明の根本となるこれらおよび他の問題は、添付される独立した特許請求の範囲の対象により解決される。好ましい実施形態は、添付される独立した特許請求の範囲から導かれ得る。

【0008】

本願の根本となる問題はまた、第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加するための方法であって、酵素活性提示部分を含むタンパク質の存在下で1以上のL-ヌクレオチドを第一のL-核酸と反応させる段階を含み、その酵素活性が、第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加できるという方法によって、第一の態様の第一の実施形態でもある第一の態様において解決される。

【0009】

第一の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第二の実施形態において、酵素活性提示部分は、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなる。

【0010】

第一の態様の第一および第二の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第三の実施形態において、酵素活性提示部分はポリメラーゼ活性提示部分である。

【0011】

第一の態様の第一の、第二の、および第一の態様の第三の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第四の実施形態において、酵素活性は、ポリメラーゼ活性である。

【0012】

第一の態様の第四の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第五の実施形態において、ポリメラーゼ活性は温度安定性のポリメラーゼ活性である。

【0013】

第一の態様の第三の、第四のおよび第五の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第六の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列は、少なくとも300個のアミノ酸を含む。

【0014】

第一の態様の第六の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第七の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列は、300から900個の間のアミノ酸、好ましくは300から600個の間のアミノ酸、より好ましくは300から360個の間のアミノ酸、最も好ましくは340から360個のアミノ酸を含む。

【0015】

第一の態様の第四の、第五の、第六のおよび第七の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第八の実施形態において、ポリメラーゼ活性は、DNA-ポリメラーゼ活性である。

【0016】

第一の態様の第八の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第九の実施形態において、DNA-ポリメラーゼ活性は、DNA依存性DNA-ポリメラーゼ活性である。

【0017】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八のおよび第九の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十の実施形態において、酵素活性提示部分は、酵素である。

【0018】

第一の態様の第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八のおよび第九の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十一の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、ポリメラーゼである。

10

20

30

40

50

【0019】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第八の、第九の、第十のおよび第十一の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十二の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、*Phi 29*DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、ポリメラーゼおよびそれらのそれぞれおよび何れかの変異体の群から選択され、

好ましくはポリメラーゼ活性提示部分は、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である。

【0020】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十のおよび第十一の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十三の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus sp.*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、*Pfurbo*ポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、*Taq*ポリメラーゼ、*Tth*ポリメラーゼ、*Pyrobest*ポリメラーゼ、*Pwo*ポリメラーゼ、*Sac*ポリメラーゼ、*Bst*ポリメラーゼ、*Poc*ポリメラーゼ、*Pab*ポリメラーゼ、*Mth*ポリメラーゼ、*Pho*ポリメラーゼ、*ES4*ポリメラーゼ、*EX-Taq*ポリメラーゼ、*LA-Taq*ポリメラーゼ、*Expand*ポリメラーゼ、*Platinum Taq*ポリメラーゼ、*Hi-Fi*ポリメラーゼ、*Tbr*ポリメラーゼ、*Tfl*ポリメラーゼ、*Tru*ポリメラーゼ、*Tac*ポリメラーゼ、*Tne*ポリルネラーゼ(*polynucleotidyl transferase*)、*Tma*ポリメラーゼ、*Tih*ポリメラーゼ、*Tfi*ポリメラーゼ、*AmpliTaq*、*Stoffel*断片、9°Nm DNAポリメラーゼ、*Therminator*、*Terminator II*、*Phusion High Fidelity*ポリメラーゼ、*Paq5000*、*Pfx-50*、*Proofstart*、*Fidelity Taq*、エロンガーゼおよびそれらの変異体の群から選択され、

好ましくはポリメラーゼ活性提示部分は、配列番号15に記載のアミノ酸配列、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、DPO4ポリメラーゼまたはその変異体である。

【0021】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二のおよび第十三の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十四の実施形態において、反応させる段階は、第一のL-核酸への少なくとも1以上のL-ヌクレオチドの付加を可能にする、好ましくは5から20,000個のL-ヌクレオチド、好ましくは10から2,000個のL-ヌクレオチド、より好ましくは50から500個のL-ヌクレオチド、最も好ましくは50から100個のL-ヌクレオチドの付加を可能にする条件下で行われる。

【0022】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第

10

20

30

40

50

九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三のおよび第十四の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十五の実施形態において、少なくとも1以上のL-ヌクレオチドの第一のL-核酸への付加は、好ましくは第一のL-核酸の3'OHと少なくとも1以上のL-ヌクレオチドの1つの5'リン酸との間で3'-5'ホスホジエステル結合を形成させることによる、第一のL-核酸への少なくとも1以上のL-ヌクレオチドの共有結合である。

【0023】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四のおよび第十五の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十六の実施形態において、第一のL-核酸は、DNA、RNA、修飾DNA、修飾RNAまたはそれらの組み合わせからなるプライマーである。

10

【0024】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四の、第十五のおよび第十六の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十七の実施形態において、第一のL-核酸は、L-ヌクレオチドおよび場合によっては修飾からなる。

【0025】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四の、第十五のおよび第十六のおよび第十七の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十八の実施形態において、第一のL-核酸は、L-ヌクレオチドからなる。

20

【0026】

第一の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四の、第十五のおよび第十六のおよび第十七の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第十九の実施形態において、反応は第二のL-核酸をさらに含み、第一のL-核酸の1個の分子が好ましくはワトソン-クリック塩基対形成を通じて第二のL-核酸の1個の分子とハイブリッド形成する。

【0027】

第一の態様の第十九の実施形態の実施形態でもある第一の態様の第二十の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、第二のL-核酸と相補的である第三のL-核酸を合成し、この第三のL-核酸は、第一のL-核酸を含み、第一のL-核酸の3'末端にL-ヌクレオチドが付加される。

30

【0028】

本願の根本となる問題はまた、L-ヌクレオチドおよび酵素活性提示部分を含むタンパク質の存在下で標的L-核酸を增幅するための方法であって、この酵素活性が標的L-核酸を増幅することができる方法によって、第二の態様の第一の実施形態でもある第二の態様においても解決される。

【0029】

第二の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第二の実施形態において、酵素活性提示部分は、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなる。

40

【0030】

第二の態様の第一および第二の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第三の実施形態において、酵素活性提示部分は、ポリメラーゼ活性提示部分である。

【0031】

第二の態様の第一の、第二の、および第三の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第四の実施形態において、酵素活性は、ポリメラーゼ活性である。

【0032】

第二の態様の第四の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第五の実施形態において、ポリメラーゼ活性は、温度安定性のポリメラーゼ活性である。

50

【0033】

第二の態様の第三の、第四のおよび第五の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第六の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列は、少なくとも300個のアミノ酸を含む。

【0034】

第二の態様の第六の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第七の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列は、300から900個の間のアミノ酸、好ましくは300から600個の間のアミノ酸、より好ましくは300から360個の間のアミノ酸、最も好ましくは340から360個の間のアミノ酸を含む。

【0035】

第二の態様の第四の、第五のおよび第六の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第八の実施形態において、ポリメラーゼ活性は、DNA - ポリメラーゼ活性である。

10

【0036】

第二の態様の第八の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第九の実施形態において、DNA - ポリメラーゼ活性は、DNA依存性DNA - ポリメラーゼ活性である。

【0037】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八のおよび第九の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十の実施形態において、酵素活性提示部分は、酵素である。

【0038】

第二の態様の第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八のおよび第九の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十一の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、ポリメラーゼである。

20

【0039】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第八の、第九の、第十のおよび第十一の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十二の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(Thermus thermophilus)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物オリメラーゼ(olymerase)、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi29DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、ポリメラーゼおよびそれらのそれらおよび何れかの変異体の群から選択され、

30

好ましくはポリメラーゼ活性提示部分は、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である。

【0040】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十のおよび第十一の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十三の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(Thermococcus littoralis)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(Pyrococcus sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)DNAポリメラーゼ、Pfuturobacterポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(Thermococcus gorgonarius)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pyrobestポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、EX-Taqポリメラーゼ、LA-Taqポリメラーゼ、ExpanDポリメラーゼ、Pla

40

50

tinum Taq ポリメラーゼ、Hi-Fi ポリメラーゼ、Tbr ポリメラーゼ、Tfl ポリメラーゼ、Tru ポリメラーゼ、Taq ポリメラーゼ、Tne ポリルネラーゼ (polynucleotide kinase)、Tma ポリメラーゼ、Tih ポリメラーゼ、Tfi ポリメラーゼ、AmpliTaq、Stoffel 断片、9 °Nm DNA ポリメラーゼ、Thermal DNA polymerase、Thermal DNA polymerase II、Phusion High Fidelity ポリメラーゼ、Paq5000、Pfx-50、Proofstart、Fidelity Taq、エロンガーゼおよびそれらの変異体の群から選択され、

好ましくはポリメラーゼ活性提示部分は、配列番号 15 に記載のアミノ酸配列、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列、配列番号 17 に記載のアミノ酸配列、配列番号 18 に記載のアミノ酸配列、配列番号 19 に記載のアミノ酸配列、配列番号 20 に記載のアミノ酸配列、配列番号 21 に記載のアミノ酸配列および配列番号 22 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、Dpo4 ポリメラーゼまたはその変異体である。

【0041】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二のおよび第十三の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十四の実施形態において、反応させる段階は、標的 L - 核酸の増幅を可能にする条件下で行われる。

【0042】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三のおよび第十四の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十五の実施形態において、本方法は、少なくとも 1 つのプライマー、好ましくは 2 つのプライマーを利用し、この少なくとも 1 つのプライマーは、L - ヌクレオチドおよび場合によっては修飾からなる。

【0043】

第二の態様の第十五の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十六の実施形態において、プライマーは L - ヌクレオチドからなる。

【0044】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四の、第十五のおよび第十六の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十七の実施形態において、標的 L - 核酸は L - ヌクレオチドからなる。

【0045】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四の、第十五の、第十六のおよび第十七の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十八の実施形態において、本方法はポリメラーゼ連鎖反応である。

【0046】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四の、第十五の、第十六の、第十七のおよび第十八の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十九の実施形態において、標的 L - 核酸は L - DNA からなる。

【0047】

第二の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、第十の、第十一の、第十二の、第十三の、第十四の、第十五の、第十六の、第十七の、第十八のおよび第十九の実施形態の実施形態でもある第二の態様の第十の実施形態において、標的 L - 核酸は、20 から 20,000 個の L - ヌクレオチド、好ましくは 30 から 2,000 個の L - ヌクレオチド、より好ましくは 40 から 500 個の L - ヌクレオチド、最も好ましくは 50 から 100 個の L - ヌクレオチドからなる。

【0048】

10

20

30

40

50

本願の根本となる問題はまた、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなり、酵素活性が、第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加することができる、酵素活性提示部分を含むタンパク質によって、第三の態様の第一の実施形態でもある第三の態様においても解決される。

【0049】

第三の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第二の実施形態において、酵素活性提示部分は、ポリメラーゼ活性提示部分である。

【0050】

第三の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第三の実施形態において、酵素活性は、ポリメラーゼ活性である。

10

【0051】

第三の態様の第三の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第四の実施形態において、ポリメラーゼ活性は、温度安定性のポリメラーゼ活性である。

【0052】

第三の態様の第二の、第三のおよび第四の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第五の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列は、少なくとも300個のアミノ酸を含む。

【0053】

第三の態様の第五の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第六の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列は、300から900個の間のアミノ酸、好ましくは300から600個の間のアミノ酸、より好ましくは300から360個の間のアミノ酸、最も好ましくは340から360個の間のアミノ酸を含む。

20

【0054】

第三の態様の第三の、第四の、第五の、および第六の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第七の実施形態において、ポリメラーゼ活性は、DNA-ポリメラーゼ活性である。

【0055】

第三の態様の第七の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第八の実施形態において、DNA-ポリメラーゼ活性は、DNA依存性DNA-ポリメラーゼ活性である。

【0056】

30

第三の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七のおよび第八の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第九の実施形態において、酵素活性提示部分は、酵素である。

【0057】

第三の態様の第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七のおよび第八の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第十の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、ポリメラーゼである。

【0058】

第三の態様の第一の、第二の、第三の、第七の、第八の、第九のおよび第十の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第十一の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi 29DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、ポリメラーゼおよびそれらのそれぞれおよび何れかの変異体の群から選択され、

40

好ましくはポリメラーゼ活性提示部分は、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である。

50

【0059】

第三の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、第六の、第七の、第八の、第九の、および第十の実施形態の実施形態でもある第三の態様の第十二の実施形態において、ポリメラーゼ活性提示部分は、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus littoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、*P futurbo*ポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、*Taq*ポリメラーゼ、*Tth*ポリメラーゼ、*Pyrobest*ポリメラーゼ、*Pwo*ポリメラーゼ、*Sac*ポリメラーゼ、*Bst*ポリメラーゼ、*Poc*ポリメラーゼ、*Pab*ポリメラーゼ、*Mth*ポリメラーゼ、*Pho*ポリメラーゼ、*ES4*ポリメラーゼ、*EX-Taq*ポリメラーゼ、*LA-Taq*ポリメラーゼ、*Expand*ポリメラーゼ、*Platinum Taq*ポリメラーゼ、*Hi-Fi*ポリメラーゼ、*Tbr*ポリメラーゼ、*Tfl*ポリメラーゼ、*Tru*ポリメラーゼ、*Tac*ポリメラーゼ、*Tne*ポリルネラーゼ(*polyrnerase*)、*Tma*ポリメラーゼ、*Tih*ポリメラーゼ、*Tfi*ポリメラーゼ、*AmpliconTaq*、*Stoffel*断片、9°Nm DNAポリメラーゼ、*Therminator*、*Therminator II*、*Phusion High Fidelity*ポリメラーゼ、*Paq5000*、*Pfx-50*、*Proofstart*、*FidelityTaq*、エロンガーゼおよびそれらの変異体の群から選択され、

好ましくはポリメラーゼ活性提示部分は、配列番号15に記載のアミノ酸配列、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、DPO4ポリメラーゼまたはその変異体である。

【0060】

本願の根本となる問題はまた、アミノ酸がD-アミノ酸である配列番号15に記載のアミノ酸配列を含むポリメラーゼによって、第四の態様の第一の実施形態でもある第四の態様においても解決される。

【0061】

本願の根本となる問題はまた、アミノ酸がD-アミノ酸である配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むポリメラーゼによって、第五の態様の第一の実施形態でもある第五の態様においても解決される。

【0062】

本願の根本となる問題はまた、配列番号15に記載のアミノ酸配列からなる野生型ポリメラーゼの、ポリメラーゼ活性、好ましくは温度安定性のポリメラーゼ活性を有するポリメラーゼ変異体によって、第六の態様の第一の実施形態でもある第六の態様においても解決される。

【0063】

第六の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第六の態様の第二の実施形態において、ポリメラーゼ変異体は、少なくとも1つのアミノ酸位置で野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。

【0064】

第六の態様の第一および第二の実施形態の実施形態でもある第六の態様の第三の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列は、野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列と1または2つのアミノ酸位置で異なる。

【0065】

第六の態様の第一の、第二の、および第三の実施形態の実施形態でもある第六の態様の

10

20

30

40

50

第四の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列は、配列番号15に記載のアミノ酸配列のアミノ酸位置155および/または203で、またはそれに対応するアミノ酸位置で、野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なり、好ましくは位置155および/または203のアミノ酸がシステインにより置換されている。

【0066】

第六の態様の第一の、第二の、第三のおよび第四の実施形態の実施形態でもある第六の態様の第五の実施形態において、ポリメラーゼ変異体は、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列および配列番号18に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【0067】

第六の態様の第一の、第二の、および第三の実施形態の実施形態でもある第六の態様の第六の実施形態において、ポリメラーゼ変異体は、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【0068】

第六の態様の第一の、第二の、第三の、第四の第五のおよび第六の実施形態の実施形態でもある第六の態様の第七の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸は、D-アミノ酸である。

【0069】

第六の態様の第一の、第二の、第三の、第四の第五のおよび第六の実施形態の実施形態でもある第六の態様の第八の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸は、L-アミノ酸である。

【0070】

本願の根本となる問題はまた、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる野生型ポリメラーゼの、ポリメラーゼ活性を有するポリメラーゼ変異体によって、第七の態様の第一の実施形態でもある第七の態様においても解決される。

【0071】

第七の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第七の態様の第二の実施形態において、ポリメラーゼ変異体は、少なくとも1つのアミノ酸位置で野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。

【0072】

第七の態様の第一および第二の実施形態の実施形態でもある第七の態様の第三の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列は、1つのアミノ酸位置で野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なる。

【0073】

第七の態様の第一の、第二の、および第三の実施形態の実施形態でもある第七の態様の第四の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1に記載のアミノ酸配列の、アミノ酸位置80、アミノ酸位置86およびアミノ酸位置124から選択される少なくとも1つのアミノ酸位置またはそれに対応するアミノ酸位置で、野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なる。

【0074】

第七の態様の第一の、第二の、第三のおよび第四の実施形態の実施形態でもある第七の態様の第五の実施形態において、ポリメラーゼ変異体は、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【0075】

第七の態様の第一の、第二の、第三の、第四のおよび第五の実施形態の実施形態でもある第七の態様の第六の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸は、D-アミノ酸である。

【0076】

10

20

30

40

50

第七の態様の第一の、第二の、第三の、第四の、第五のおよび第六の実施形態の実施形態でもある第七の態様の第七の実施形態において、ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸は、L-アミノ酸である。

【0077】

本願の根本となる問題はまた、L-核酸の3'末端への1以上のL-ヌクレオチドを付加するための方法において酵素活性提示部分を含むタンパク質を使用することによって、第八の態様の第一の実施形態でもある第八の態様においても解決される。

【0078】

本願の根本となる問題はまた、L-ヌクレオチドの存在下で標的L-核酸を増幅するための方法において酵素活性提示部分を含むタンパク質を使用することによって、第九の態様の第一の実施形態でもある第九の態様においても解決される。

10

【0079】

第九の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第九の態様の第二の実施形態において、標的L-核酸を増幅するための方法は、ポリメラーゼ連鎖反応である。

【0080】

第八の態様の第一の実施形態および第九の態様の第三の実施形態の実施形態でもある第八の態様の第二の実施形態において、タンパクは、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、第三の、第四の、第五の、第六のおよび第七の態様の何れかの実施形態によるタンパク質である。

【0081】

20

本願の根本となる問題はまた、次の段階：

- (a) L-核酸分子の不均一集団を作製し；
- (b) 段階(a)のL-核酸分子の不均一集団を標的分子と接触させ；
- (c) 標的分子が結合しないL-核酸分子を分離し；
- (d) 標的分子が結合するL-核酸分子を増幅させることを含み、

増幅の段階が、第三の、第四の、第五の、第六のおよび第七の態様の何れかの実施形態によるタンパク質を使用し、

このタンパク質が、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、

標的分子結合L-核酸分子の同定のための方法によって、第十の態様の第一の実施形態でもある第十の態様においても解決される。

30

【0082】

第十の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第十の態様の第二の実施形態において、本方法は、

- (e) 標的分子が結合するL-核酸分子の配列決定を行い；
- (f) 核酸分子、段階(e)で配列決定したL-核酸分子のヌクレオチド配列と同一であるヌクレオチド配列を合成する、段階をさらに含む。

【0083】

第十の態様の第一および第二の実施形態の実施形態でもある第十の態様の第三の実施形態において、段階(a)のL-核酸分子の不均一集団の核酸分子は、それらの5'末端およびそれらの3'末端においてプライマー結合部位および、それぞれ、ポリメラーゼ連鎖反応によって段階(d)で得られるL-核酸分子の増幅を可能とするプライマー結合部位に相補的である配列を含み、ポリメラーゼ連鎖反応で使用されるポリメラーゼは、第三の、第四の、第五の、第六のおよび第七の態様の何れかの実施形態によるタンパク質であり、ポリメラーゼ連鎖反応で使用されるプライマーは、L-ヌクレオチドからなり、ポリメラーゼ連鎖反応で使用されるヌクレオチドはL-ヌクレオチドである。

40

【0084】

第十の態様の第一の、第二の、および第三の実施形態の実施形態でもある第十の態様の第四の実施形態において、段階(d)の後、次の段階：

- (d a) 増幅された核酸分子を標的分子と接触させる段階

50

が導入され、

ここで、段階 (b) および場合によっては段階 (c) および / または (d) が段階 (e) の前に行われ、段階 (d a) 、 (b) 、 (c) および場合によっては (d) は、この順序で 1 回または数回行われる。

【 0 0 8 5 】

第十の態様の第一の、第二の、第三のおよび第四の実施形態の実施形態でもある第十の態様の第五の実施形態において、標的分子結合 L - 核酸は、DNA である。

【 0 0 8 6 】

第十の態様の第一の、第二の、第三の、第四のおよび第五の実施形態の実施形態でもある第十の態様の第六の実施形態において、標的分子結合 L - 核酸分子は、L - ヌクレオチドからなる。

【 0 0 8 7 】

本願の根本となる問題はまた、第三の、第四の、第五の、第六のおよび第七の態様の何れかの実施形態によるタンパク質を作製するための方法であって、

a) 第三の、第四の、第五の、第六のおよび第七の態様の何れかの実施形態によるタンパク質の 2 以上の断片が化学的に合成され、それによって断片がそれらの全体としてタンパク質のアミノ酸配列を形成し、好ましくはこの断片が固相ペプチド合成により合成され、

b) 段階 a) の断片が、セグメント縮合、ネイティブ化学ライゲーション、酵素性ライゲーションまたはそれらの組み合わせによって互いに對して連結され、

このタンパク質が、アミノ酸が D - アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、

方法によって、第十一の態様の第一の実施形態でもある第十一の態様においても解決される。

【 0 0 8 8 】

第十一の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第十一の態様の第二の実施形態において、酵素性ライゲーションで使用される酵素は、クロストリパインである。

【 0 0 8 9 】

本願の根本となる問題はまた、第一の D - ペプチドまたは第一の D - タンパク質および第二の D - ペプチドまたは第二の D - タンパク質を酵素性ライゲーションによって互いに對して連結させるための方法であって、

この第一の D - ペプチドまたは第一の D - タンパク質が、その N - 末端で保護基によって保護され、その C - 末端で 4 - グアニジノフェニルエステル基によって保護され、

この第二の D - ペプチドまたは第二の D - タンパク質が、自由 N - 末端および、その C - 末端でチオアルキルエステルまたはチオアリールエステル基を含む、

方法によって、第十二の態様の第一の実施形態でもある第十二の態様においても解決される。

【 0 0 9 0 】

第十二の態様の第一の実施形態の実施形態でもある第十二の態様の第二の実施形態において、酵素性ライゲーションで使用される酵素はクロストリパインである。

【 0 0 9 1 】

発明者らは、驚くべきことに、機能的に活性のある D - アミノ酸からなるタンパク質を化学的に合成することが可能であり、それによって、このようなタンパク質が一般的にはポリメラーゼにより示されるようなサイズを有するようになることを見出した。より具体的には、発明者らは、このような D - タンパク質および D - ポリメラーゼ、すなわちポリメラーゼとして活性のある D - アミノ酸からなるポリメラーゼの合成を可能にする方法に気付いた。この驚くべき知見に基づき、L - 核酸および L - 核酸分子の酵素性合成に必要とされるタンパク質および酵素活性が今や利用可能である。L - 核酸および L - 核酸分子のこのような酵素性合成は、第一の L - 核酸の 3' 末端に 1 以上の L - ヌクレオチドを付加するための方法および、L - 核酸としての L - ヌクレオチドの存在下で標的 L - 核酸を増幅するための、すなわち増幅産物が L - 核酸である方法を含むが、これらに限定されな

10

20

30

40

50

い。

【0092】

これらの方針および酵素活性は、利用するシュピーゲルマーを同定する代替的過程の一部であるので、シュピーゲルマーを同定するこのような代替的過程が現在、実現できる。

【0093】

発明者らは、酵素活性が、第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加することができる酵素活性提示部分を含むタンパク質の存在下で、1以上のL-ヌクレオチドを第一のL-核酸と反応させる段階を含む、第一のL-核酸の3'末端に対して1以上のL-ヌクレオチドを付加するための方法を開発した。

【0094】

好ましい実施形態において、酵素活性は、第一のL-核酸の3'末端に5から20,000個のL-ヌクレオチド、好ましくは10から2,000個のL-ヌクレオチド、より好ましくは50から500個のL-ヌクレオチド、最も好ましくは50から100個のL-ヌクレオチドを付加することができる。

【0095】

「付加する」という用語は、本明細書中で好ましく使用される場合、好ましくは第一のL-核酸の3'OHと少なくとも1以上のL-ヌクレオチドの1つの5'リン酸との間に3' - 5'ホスホジエステル結合を形成させることによる、本発明による、分子間の共有結合、L-核酸の共有結合およびL-核酸への少なくとも1以上のL-ヌクレオチドの共有結合である。本発明によると、L-核酸に付加されるL-ヌクレオチドは、L-ヌクレオチドにより延長されるL-核酸の3'末端を形成する。

【0096】

好ましい実施形態において、第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加するための方法は、第二のL-核酸を含み、ここで、好ましくはワトソン-クリック塩基対形成を通じて、第一のL-核酸の1つの分子が第二のL-核酸の1つの分子とハイブリッド形成する。より好ましい実施形態において、本方法によって、第二のL-核酸と相補的である第三のL-核酸の合成が可能となり、この第三のL-核酸は、第一のL-核酸と、第一のL-核酸の3'末端、すなわち第一のL-核酸に付加されるL-ヌクレオチドと、を含み、1以上のL-ヌクレオチドが第一のL-核酸の3'末端に付加され、その結果、第三のL-核酸が得られる。

【0097】

本発明による酵素活性提示部分を含むタンパク質は、酵素活性提示部分のみを有するタンパク質および酵素活性提示部分と他の残基または部分とを有するタンパク質を含み、ここでタンパク質の他の残基または部分には酵素活性がない。本発明によると、酵素活性提示部分のアミノ酸配列は、300から900個の間のアミノ酸、好ましくは300から600個の間のアミノ酸、より好ましくは300から360個の間のアミノ酸、最も好ましくは340から360個のアミノ酸を含む。

【0098】

本発明による酵素活性提示部分を含むタンパク質は、好ましくはポリメラーゼ活性提示部分である。本発明によるポリメラーゼ活性提示部分を含むタンパク質は、ポリメラーゼ活性提示部分のみを有するポリメラーゼおよびポリメラーゼ活性提示部分と他の残基または部分とを有するポリメラーゼを含み、ここでポリメラーゼの他の残基または部分にはポリメラーゼ活性がない。本発明によると、ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列は、300から900個の間のアミノ酸、好ましくは300から600個の間のアミノ酸、より好ましくは300から360個の間のアミノ酸、最も好ましくは340から360個のアミノ酸を含む。

【0099】

本発明によるポリメラーゼ活性提示部分は、好ましくは温度安定性のポリメラーゼ活性提示部分、より好ましくは温度安定性のDNAポリメラーゼ活性提示部分および最も好ましくは温度安定性のDNA依存性DNA-ポリメラーゼ活性提示部分である。

10

20

30

40

50

【0100】

本発明によるポリメラーゼ活性提示部分は、好ましくは、DNA - ポリメラーゼ活性提示部分、より好ましくはDNA依存性DNA - ポリメラーゼ活性提示部分または温度安定性のDNA - ポリメラーゼ活性提示部分、最も好ましくは温度安定性のDNA依存性DNA - ポリメラーゼ活性提示部分である。

【0101】

酵素活性という用語は、本明細書中で使用される場合、特異的な反応の触媒であり、好ましくは1以上のヌクレオチドを核酸の3'末端に付加すること、核酸および/またはポリメラーゼ活性のアンプリケーション(*amplification*)、より好ましくは1以上のL - ヌクレオチドをL - 核酸の3'末端に付加すること、L - 核酸のアンプリケーション(*amplification*)である。

10

【0102】

本発明によるポリメラーゼ活性という用語は、L - ヌクレオチドの重合および/またはL - 核酸へのL - ヌクレオチドの重合の、酵素の性能であり、ここで好ましくはL - ヌクレオチドはL - ヌクレオシド三リン酸である。

【0103】

本発明によるポリメラーゼ活性は、好ましくは温度安定性のポリメラーゼ活性、より好ましくは温度安定性のDNAポリメラーゼ活性および最も好ましくは温度安定性のDNA依存性DNA - ポリメラーゼ活性である。

【0104】

20

本発明によるポリメラーゼ活性は、好ましくはDNA - ポリメラーゼ活性、より好ましくはDNA依存性DNA - ポリメラーゼまたは温度安定性のDNA - ポリメラーゼ活性、最も好ましくは温度安定性のDNA依存性DNA - ポリメラーゼ活性である。

【0105】

既知のポリメラーゼは、天然源由来であるかまたは天然源からのポリメラーゼの最適化もしくは突然変異誘導された変異体である。ポリメラーゼは、キラルな基本単位、すなわちL - アミノ酸からなる。結果的に、ポリメラーゼの構造は、本質的にキラルでもあり、その結果、立体特異的な基質認識が起こる。ゆえに、これらの酵素は、適正な、すなわち対応するキラル立体配置の基質分子のみを受容する。したがって、既知のポリメラーゼは、D - ヌクレオチドまたはD - ヌクレオシド三リン酸を重合させ、ここで、これらは、D - ヌクレオチドからなる相補的D - 核酸鎖を合成するために、鑄型鎖として、D - ヌクレオチドからなるD - 核酸を使用する。さらに、鑄型鎖に対して、ポリメラーゼは、場合によっては、鑄型鎖とハイブリッド形成し、D - ヌクレオチドからなるプライマーを使用する。天然の核酸は、D - ヌクレオチドから構成され、特にL - アミノ酸からなるタンパク質および酵素によって、処理、例えば増幅され得るので、それぞれL - アミノ酸からなるこのようなタンパク質および酵素によってL - 核酸は認識されない。したがって、標的分子または標的構造に結合するL - 核酸は、シュピーゲルマーとも呼ばれ、このような標的分子または標的構造の天然型を用いてインピトロ選択過程によって直接得ることができない。

30

【0106】

40

発明者らは、驚くべきことに、L - 核酸鑄型鎖とハイブリッド形成するL - ヌクレオチドからなるプライマーにL - 核酸ヌクレオチドを付加し得るポリメラーゼを作製することができることを見出した。さらに、発明者らは、驚くべきことに、好ましくはポリメラーゼ - 連鎖反応(略称PCR)として知られる過程においてL - 核酸の増幅のために使用され得るポリメラーゼを作製することが可能であることを見出した。

【0107】

ポリメラーゼは、ヌクレオシド三リン酸を重合させる酵素である。ポリメラーゼは、鑄型核酸鎖に相補的である核酸鎖鎖を合成するために、鑄型核酸鎖を使用する。鑄型核酸鎖に加えて、ポリメラーゼは、場合によっては、鑄型核酸鎖に対して塩基相補性に基づきハイブリッド形成するプライマーを使用する。鑄型核酸鎖、プライマーおよびポリメラーゼ

50

により合成される核酸鎖は、独立にDNAまたはRNAの何れかであり得る。ポリメラーゼは、本明細書中で好ましく使用される場合、DNAポルメラーゼ(p o l m e r a s e)およびRNA-ポリメラーゼ、好ましくはDNA依存性DNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ、例えば逆転写酵素など、RNA依存性RNAポリメラーゼおよびRNA依存性DNAポリメラーゼを含む。より好ましくは、ポリメラーゼは温度安定性のポリメラーゼである。ポリメラーゼは、対応するネイティブまたは野生型酵素で見出されるアミノ酸の全てを含有する必要はないが、ポリメラーゼが所望の触媒活性を遂行するのを可能にするのに十分であるもののみ必要である。ある実施形態において、ポリメラーゼ活性は、例えば、5'-3'重合化、5'-3'エキソヌクレアーゼおよび3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を含む触媒活性を含む群から選択される触媒活性である。

10

【0108】

本発明によるポリメラーゼは、D-アミノ酸からなり、L-ヌクレオチドまたはL-ヌクレオシド三リン酸を重合化し、この本発明によるポリメラーゼは、L-ヌクレオチドからなる相補的L-核酸鎖を合成するために、鋳型鎖としてL-ヌクレオチドからなるL-核酸を使用する。さらに、鋳型鎖に対して、本発明によるポリメラーゼは、場合によっては鋳型鎖とハイブリッド形成し、L-ヌクレオチドからなるプライマーを使用する。鋳型鎖、プライマーおよび合成核酸鎖は独立にL-DNAまたはL-RNAの何れかであり得る。本発明によるポリメラーゼは、D-アミノ酸からなるDNAポルメラーゼ(p o l m e r a s e)およびD-アミノ酸からなるRNA-ポリメラーゼ、好ましくはD-アミノ酸からなるDNA依存性DNAポリメラーゼ、D-アミノ酸からなる逆転写酵素などのRNA依存性DNAポリメラーゼ、D-アミノ酸からなるRNA依存性RNAポリメラーゼおよびD-アミノ酸からなるRNA依存性DNAポリメラーゼを含む。より好ましくは、本発明によるポリメラーゼは、D-アミノ酸からなる温度安定性のポリメラーゼである。本発明によるポリメラーゼは、ネイティブ酵素で見出されるアミノ酸の全てを含有する必要はないが、本発明によるポリメラーゼが所望の触媒活性を遂行するのを可能にするのに十分であるもののみ必要である。触媒活性としては、例えば、5'-3'重合化、5'-3'エキソヌクレアーゼおよび3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が挙げられる。

20

【0109】

L-アミノ酸のみからなるポリメラーゼは、好ましくは本明細書中で「全L-ポリメラーゼ」と呼ばれる。

30

【0110】

D-アミノ酸のみからなるポリメラーゼは、好ましくは本明細書中で「全-Dポリメラーゼ」と呼ばれる。

【0111】

好ましい実施形態において、本発明によるポリメラーゼは、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(Th e r m u s t h e r m o p h i l u s)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi 29DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、ポリメラーゼ、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(Th e r m o c o c c u s l i t o r a l i s)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(Pyrococcus sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(Pyrococcus f u r i o s u s)DNAポリメラーゼ、P f u t u r b o(商標)ポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus s o l f a t a r i c u s)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(Th e r m o c o c c u s g o r g o n a r i u s)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pyrobestポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、EX-Taq(商標)ポリメラーゼ、LA-Taq(商標)ポリメラーゼ、Expand(商標)ポ

40

50

リメラーゼ、Platinum (商標) Taqポリメラーゼ、Hi-Fi (商標) ポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tf1ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tneポリルネラーゼ (polymerase)、Tmaポリメラーゼ、Thiポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、AmpliTaq (商標)、Stoffel断片、9°Nm (商標) DNAポリメラーゼ、Therminator (商標)、Therminator II (商標)、Phusion High Fidelity (商標) ポリメラーゼ、Paq5000 (商標)、Pfx-50 (商標)、Proofstart (商標)、FideliTaq (商標)、エロンガーゼ (商標) およびそれらのそれぞれおよび何れかの変異体の群から選択される。

【0112】

10

より好ましい実施形態において、本発明によるポリメラーゼは、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるアフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXである。別のより好ましい実施形態において、本発明によるポリメラーゼは、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXの変異体、最も好ましくは、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列のアフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXの変異体である。

【0113】

より好ましい実施形態において、本発明によるポリメラーゼは、配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるポリメラーゼDpo4である。別のより好ましい実施形態において、本発明によるポリメラーゼは、ポリメラーゼDpo4の変異体、最も好ましくは配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなるポリメラーゼDpo4の変異体である。

20

【0114】

ポリメラーゼの変異体は、1以上のアミノ酸位置でこのポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なるポリメラーゼである。アミノ酸配列中のアミノ酸の位置は、好ましくはポリメラーゼのN-末端およびC-末端に対するその位置および/またはそのアミノ酸の周囲のアミノ酸に対するその位置により決定され、

30

a) ポリメラーゼがN-末端で短縮される場合、アミノ酸の位置は、ポリメラーゼのC-末端に対するその位置により、およびそのアミノ酸の周囲のアミノ酸に対して決定され、

b) ポリメラーゼがC-末端で短縮される場合、アミノ酸の位置は、ポリメラーゼのN-末端に対するその位置により、およびそのアミノ酸の周囲のアミノ酸に対して決定され、

b) ポリメラーゼがN-末端およびC-末端で短縮される場合、アミノ酸の位置は、そのアミノ酸の周囲のアミノ酸に対するその位置によって決定されるようになる。

【0115】

40

温度安定性である本発明によるポリメラーゼは、温度上昇によって比較的影響を受けにくい。ある具体的な非限定例において、温度安定性であるポリメラーゼは、少なくとも50、例えば、50の温度、60、75、80、82、85、88、90、92、95以上の温度により影響を受けない。

【0116】

50

L-ヌクレオシド三リン酸のポリメルセーション (polymerization) の過程内で、本ポリメラーゼは、1個のヌクレオシド三リン酸を別のヌクレオシド三リン酸に付加し、好ましくはその結果、核酸とも呼ばれるオリゴヌクレオチドが得られる。好ましい実施形態において、本ポリメラーゼは、1個のヌクレオシド三リン酸のみを1個のヌクレオシド三リン酸にまたは、例えばヌクレオチドが連鎖停止剤ヌクレオチド、例えばジデオキシヌクレオチドである場合、核酸の末端ヌクレオチドに付加する。このような連鎖停

止剤ヌクレオチドは、核酸の配列決定を行うために使用され、当業者により知られている。

【0117】

L-核酸、好ましくは標的L-核酸を増幅するために、L-ヌクレオシド三リン酸のポリメルセーション (polymerisation) の過程が使用され得る。

【0118】

増幅は、核酸、好ましくは標的L-核酸のコピー数を増加させる何らかの過程である。

【0119】

好ましい実施形態において、標的L-核酸は、20から20,000個のL-ヌクレオチド、好ましくは30から2,000個のL-ヌクレオチド、より好ましくは40から500個のL-ヌクレオチド、最も好ましくは50から100個のL-ヌクレオチドからなる。

【0120】

増幅の例は、核酸錠型に対するプライマーのハイブリッド形成を可能にする条件下で、核酸をプライマー対と接触させるものである。適切な条件下でプライマーに1以上のヌクレオシド三リン酸を附加することによってポリメラーゼによりプライマーを伸長させ、核酸錠型から解離させ、次いで再アニーリングさせ、伸長させ、解離させて核酸分子のコピー数を増幅させる。インピトロ増幅の産物は、標準的技術を用いて、電気泳動、制限エンドヌクレアーゼ切断パターン、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成またはライゲーションおよび/または核酸配列決定によって特徴を調べることができる。

【0121】

代替的なインピトロ増幅技術は当業者にとって公知であり、転写フリー等温性増幅、鎖置換増幅およびNASBA(商標)RNA転写フリー増幅を含む。

【0122】

増幅方法の一部は、核酸、好ましくは2本鎖核酸を融解させるための反応の加熱および冷却の反復のサイクルからなる温度サイクリングおよび核酸の酵素性複製に依存する。これらの温度サイクリング段階は、核酸融解と呼ばれる過程において高温で2本鎖核酸の2本の鎖を最初に物理的に分離させるために必要である。次に、より低い温度で、標的核酸を選択的に増幅させるためのポリメラーゼによる核酸合成において、各鎖が錠型として使用される。ポリメラーゼとともに標的領域に相補的な配列を含有するプライマー(この後この方法を示す。)は、選択的および反復性の増幅を可能にする重要な構成要素である。温度サイクリング進行に基づく増幅方法として、作製される核酸はそれ自身、複製のための錠型として使用され、核酸錠型が指数関数的に増幅される連鎖反応を引き起こす。

【0123】

温度性の増幅による最も著名な増幅方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(略称PCR)である。

【0124】

プライマーは、DNAもしくはRNAまたはそれらの組み合わせ、好ましくは、長さが10ヌクレオチド以上のDNAオリゴヌクレオチドからなる短い核酸分子である。より好ましくは、より長いプライマーは、長さが約15、20または25ヌクレオチド以上であり得る。核酸ハイブリッド形成によって相補的標的核酸鎖とプライマーをアニーリングさせ、プライマーと標的核酸鎖との間でハイブリッドを形成させることができ、次いで、ポリメラーゼプライマー対によって標的核酸鎖に沿って伸長させたプライマーを、例えばPCRまたは当技術分野で公知の他の核酸増幅方法による核酸の増幅のために使用し得る。

【0125】

D-アミノ酸からなる本発明のポリメラーゼの使用によって、プライマーおよび相補的標的核酸鎖がL-ヌクレオチドからなるようにする必要となる。好ましくは少なくとも1つのプライマーは、L-ヌクレオチドおよび場合によっては修飾からなる。

【0126】

核酸プライマーおよびプローブを調製し、使用するための方法は、例えばSambro

10

20

30

40

50

o k ら (S a m b r o c k ら、 1 9 8 9) に記載されている。 P C R プライマー対は、例えばプライマーなど、その目的を対象としたコンピュータプログラムを用いることにより、既知の配列由来となることがある。当業者にとって当然のことながら、特定のプローブまたはプライマーの特異性は、その長さに伴い向上する。

【 0 1 2 7 】

そのため、本発明によるポリメラーゼは D - アミノ酸からなる。 D - アミノ酸からなる本発明によるポリメラーゼは、天然源から単離することができず、細菌、酵母、真菌、ウイルスまたは動物細胞を用いた組み換え発現により作製できず、化学的過程、好ましくはライゲーション法と組み合わせた固相ペプチド合成 (略称 S P P S) などによって作製しなければならない。

10

【 0 1 2 8 】

固相ペプチド合成は、ペプチドまたはタンパク質断片の合成に対する最新の技術であり：不溶性であるが多孔性の小型の固形ビーズをペプチド鎖が構築され得る機能的単位 (「 リンカー 」) で処理する。ペプチドは、無水フッ化水素またはトリフルオロ酢酸などの試薬によりビーズから切断されるまで、ビーズに共有結合したままである。したがって、ペプチドは固相上に「 固定化 」されており、ろ過過程中に保持され得、一方で、液相試薬および合成の副産物が除去される。 S P P S の全般的な原理は、カップリング - 洗浄 - 脱保護 - 洗浄の 1 反復サイクルである。固相連結ペプチドの自由 N 末端アミンを 1 個の N - 保護アミノ酸単位にカップリングさせる (下記参照) 。次に、この単位を脱保護し、これにより、さらなるアミノ酸が連結され得る新しい N 末端アミンが現れる。この技術の優位性は、一部には、関心のある伸長中のペプチドが全て不溶性樹脂に共有結合されたまま、過剰な試薬を除去する各反応後の洗浄サイクルを行うことができるることにある。 S P P S の主要な使用形態は 2 種類、 F m o c および B o c がある。アミノ酸単量体の N 末端は、これらの 2 つの基の何れかにより保護され、脱保護されたアミノ酸鎖上に付加される。 S P P S は収率により限定され、一般的には 7 0 個のアミノ酸の範囲のペプチドおよびタンパク質が合成の利用能の限界となっている。合成の困難性は配列にも依存する。 2 個のペプチドを一緒にカップリングするために、断片縮合、ネイティブ化学ライゲーションまたは酵素性ライゲーションなどのライゲーション法を用いることによって、より大きな合成オリゴペプチドおよびタンパク質が得られるようになり得る。しかし、今までに合成された最大の D - タンパク質は、 1 0 2 個の D - アミノ酸からなる血管由来タンパク質血管内皮増殖因子 (略称 V E G F - A) の D - タンパク質型である (M a n d a l ら、 2 0 1 2) 。

20

断片縮合は、ペプチドのアミノ酸のその鎖が化学基で完全に保護されているペプチドを使用し、そのペプチドは溶液中でカップリングされる。

30

【 0 1 2 9 】

ネイティブ化学ライゲーションは水溶液中で行われる。必要な非保護ペプチド - チオエステル基本単位の調製は難関である。ネイティブ化学ライゲーションにおいて、非保護ペプチド 2 の N 末端システイン残基のチオレート基は、 p H 7 . 0 、 2 0 < T < 3 7 の水性緩衝液中で第二の非保護ペプチド 1 の C 末端チオエステルを攻撃する。この可逆的トランスクチオエステル化段階は、化学選択的であり、位置選択的であり、チオエステル中間体 3 の形成につながる。この中間体は、分子内 S , N - アシルシフトにより再編成し、その結果、ライゲーション部位でネイティブアミド (「 ペプチド 」) 結合 4 が形成される。

40

【 0 1 3 0 】

実施例で示されるように、驚くべきことに、発明者らは、ネイティブ化学ライゲーションに必要な C 末端チオエステルが、酵素性ライゲーション条件下で安定であるので、ネイティブ化学ライゲーションおよび酵素性ライゲーションを組み合わせて使用し得ることを示すことができた。

【 0 1 3 1 】

D - ペプチドの酵素性ライゲーションは、次の段階を含むプロテアーゼの使用により作用する： (a) 独自に D - ペプチドであるアミノ構成要素の調製、 (b) 脱離基を含み、

50

独自にD-ペプチドであるカルボキシ構成要素の調製および(c)独自にD-ポリペプチドを与えるための、脱離基の切断によりアミノ構成要素とカルボキシ構成要素との間でペプチド結合を形成させるためのプロテアーゼ存在下でのアミノ構成要素およびカルボキシ構成要素の反応(WO2003047743参照)。好ましくはプロテアーゼはクロストリパインである。

【0132】

本発明のポリメラーゼはまた、本発明のポリメラーゼ、および特に本明細書中で開示される特定の配列と基本的に相同であるポリメラーゼも含む。実質的に相同である、という用語は、相同性が少なくとも75%、好ましくは85%、より好ましくは90%および最も好ましくは95%、96%、97%、98%または99%を超えるものなどと理解されたい。

10

【0133】

本発明のポリメラーゼ活性提示部分はまた、本発明のポリメラーゼ活性提示部分および特に本明細書中で開示される特定の配列と基本的に相同であるポリメラーゼ活性提示部分も含む。実質的に相同である、という用語は、相同性が少なくとも75%、好ましくは85%、より好ましくは90%および最も好ましくは95%、96%、97%、98%または99%を超えるものなどと理解されたい。

【0134】

本発明のポリメラーゼまたは本発明発明のポリメラーゼ活性提示部分に存在する相同アミノ酸の実際のパーセンテージは、ポリメラーゼまたはポリメラーゼ活性提示部分に存在するアミノ酸の総数に依存する。%修飾は、ポリメラーゼまたはポリメラーゼ活性提示部分に存在するアミノ酸の総数に基づき得る。

20

【0135】

2つのポリメラーゼまたは2つのポリメラーゼ活性提示部分間の相同性は、当業者にとって公知のように決定され得る。より具体的には、指定のプログラムパラメーターに基づき、参照配列に対する試験配列についてのパーセント配列相同性を計算するために配列比較アルゴリズムを使用し得る。試験配列は、好ましくは、相同であると言われるかまたは相同であるか否か、相同である場合は、異なるポリメラーゼまたはポリメラーゼ活性提示部分に対してどの程度相同であるかを試験しようとするポリメラーゼまたはポリメラーゼ活性提示部分であり、そのため、このような異なるポリメラーゼまたはポリメラーゼ活性提示部分は相同性参照配列とも呼ばれる。例えばSmithおよびWatermanのローカル相同性アルゴリズム(Smith & Waterman, 1981)によって、NeedlemanおよびWunschの相同性アラインメントアルゴリズム(Needleman & Wunsch, 1970)によって、PearsonおよびLipmanの類似度法に対する検索(Pearson & Lipman, 1988)によって、これらのアルゴリズムのコンピュータでの実行によって(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.における、GAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)または目視によって、比較のためのポリメラーゼのアミノ酸配列の最適アラインメントを行い得る。

30

【0136】

パーセント配列同一性を決定するために適切であるアルゴリズムの一例は、ベーシック・ローカル・アラインメント検索ツール(本明細書中で以後、「BLAST」)において使用されるアルゴリズムであり、例えばAltschulら(Altschulら, 1990およびAltschulら, 1997)参照。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(本明細書中で以後「NCBI」)を通じて公開されている。NCBIから入手可能なソフトウェア、例えば、BLASTN(ヌクレオチド配列用)およびBLASTP(アミノ酸配列用)を用いて配列同一性を決定する際に使用される初期設定パラメーターは、McGinnisら(McGinnisら, 2004)に記載されている

40

50

。

【0137】

本発明のポリメラーゼはまた、本発明のポリメラーゼおよび特に本明細書中で開示される本発明の特定のポリメラーゼに対してある一定の同一性を有し、それらのアミノ酸配列によって定められるポリメラーゼも含む。より好ましくは、本発明はまた、本発明のポリメラーゼおよび特に本明細書中で開示され、それらのアミノ酸配列またはその一部により定められる本発明の特定のポリメラーゼに対して少なくとも75%、好ましくは85%、より好ましくは90%および最も好ましくは95%、96%、97%、98%または99%を超える同一性を有し、それらのアミノ酸配列またはそれらの一部により定められるポリメラーゼも含む。

10

【0138】

本発明のポリメラーゼ活性提示部分は、本発明のポリメラーゼ活性提示部分および特に本明細書中で開示され、それらのアミノ酸配列により定められる本発明の特定のポリメラーゼ活性提示部分に対してある一定の同一性を有するポリメラーゼ活性提示部分も含む。より好ましくは、本発明はまた、本発明のポリメラーゼ活性提示部分および特に本明細書中で開示され、それらのアミノ酸配列またはそれらの一部により定められる本発明の特定のポリメラーゼ活性提示部に対して、少なくとも75%、好ましくは85%、より好ましくは90%および最も好ましくは95%、96%、97%、98%または99%を超える同一性を有するポリメラーゼ活性提示部分も含む。

【0139】

20

本願に関連して、核酸分子および核酸という用語は、別段の断りが明確に示されない場合は交換可能に使用される。

【0140】

好ましく本明細書中で使用される場合、「核酸 (nucleic acid および nucleic acids)」は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、例えばデオキシリボ核酸（略称DNA）およびリボ核酸（略称RNA）などを指す。さらに「核酸」という用語は複数の核酸を含む。「核酸 (nucleic acid および nucleic acids)」という用語はまた、ヌクレオチド類似体、1本鎖（センスまたはアンチセンス）および2本鎖のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドからなるRNAまたはDNAの何れかの同等物、変異体および類似体を含むとも理解されたい。デオキシリボヌクレオチドには、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシンおよびデオキシチミジンが含まれる。リボヌクレオチドには、アデノシン、シチジン、グアノシンおよびウリジンが含まれる。「ポリヌクレオチド」としての核酸分子への言及は、1本鎖のまたは2本鎖の分子を含む、共有結合により連結される2以上のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を意味するためにその広義の意味で使用される。「オリゴヌクレオチド」という用語はまた、共有結合によって連結される2以上のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を意味するためにも本明細書中で使用されるが、本明細書中で定義されるように、オリゴヌクレオチドは、100ヌクレオチド未満を含む。

30

【0141】

40

核酸は、核酸を形成する連続ヌクレオチド全てが互いに1以上の共有結合により連結または結合されることを特徴とする。より具体的には、このようなヌクレオチドのそれぞれは、2個の他のヌクレオチドに、好ましくはホスホジエステル結合または他の結合を通じて連結または結合され、一続きの連続ヌクレオチドを形成する。しかし、このような配置において、このような配置が直鎖状であり、環状配置でなく、したがって環状分子でなく直鎖状であるという前提下で、2つの末端ヌクレオチド、すなわち好ましくは5'末端および3'末端のヌクレオチドは、それぞれ1個のヌクレオチドにのみ連結される。

【0142】

50

本願の別の実施形態において、核酸は少なくとも2つの連続ヌクレオチド群を含み、それにより連続ヌクレオチドの各群内で、各ヌクレオチドが2個の他のヌクレオチドに、好ましくはホスホジエステル結合または他の結合を通じて連結または結合され、一続きの連

続ヌクレオチドが形成される。しかし、このような配置において、2個の末端ヌクレオチド、すなわち好ましくは5'末端および3'末端のヌクレオチドは、それぞれ1個のヌクレオチドにのみ連結される。しかし、このような実施形態において、連続ヌクレオチドの2つの群は、共有結合を通じて互いに連結または結合されず、共有結合、好ましくはこの2つのヌクレオチドの一方の糖部分とこの2つのヌクレオチドまたはヌクレオシドの他のホスホール部分との間で形成される共有結合を通じて、一方の群の1ヌクレオチドおよび別のまたは他方の群の1ヌクレオチドを連結する。しかし、代替的な実施形態において、連続ヌクレオチドの2つの群は、共有結合、好ましくはこの2つのヌクレオチドの一方の糖部分とこの2つのヌクレオチドまたはヌクレオシドの他方のホスホール部分との間で形成される共有結合を通じて1つの群の1ヌクレオチドおよび別のまたは他方の群の1ヌクレオチドを連結する共有結合を通じて互いに對して連結または結合される。好ましくは、連続ヌクレオチドの少なくとも2群は共有結合を通じて連結されることはない。別の好ましい実施形態において、ホスホジエステル結合とは異なる共有結合を通じて少なくとも2群が連結される。

【0143】

核酸という用語は、好ましくはD-核酸またはL-核酸の何れかも包含する。好ましくは、核酸はL-核酸である。さらに、核酸の1または数個の部分がD-核酸として存在し、核酸の少なくとも1または数個の部分がL-核酸であり得る。核酸の「一部分」という用語は、1ヌクレオチドのような小さいものを意味する。このような核酸は、一般に本明細書中でそれぞれD-およびL-核酸と呼ばれる。したがって、好ましい実施形態において、本発明による核酸は、L-ヌクレオチドからなり、少なくとも1つのD-ヌクレオチドを含む。好ましくは、このようなD-ヌクレオチドは、一続きの何れかおよび何れかの核酸の末端に連結される。

【0144】

L-核酸は、本明細書中で使用される場合、L-ヌクレオチドからなる、好ましくは完全にL-ヌクレオチドからなる核酸である。

【0145】

D-核酸は、本明細書中で使用される場合、D-ヌクレオチドからなる、好ましくは完全にD-ヌクレオチドからなる核酸である。

【0146】

また、別段の指示がない場合、何れのヌクレオチド配列も、本明細書中で5'、3'方向に示される。

【0147】

核酸が、D-ヌクレオチド、L-ヌクレオチドまたは、例えば無作為である両者の組み合わせまたは少なくとも1つのL-ヌクレオチドおよび少なくとも1つのD-核酸からなる一続きの定められた配列からなるか否かに関わりなく、核酸分子は、デスオキシリボヌクレオチド(desoxyribonucleotide)、リボヌクレオチドまたはそれらの組み合わせからなり得る。

【0148】

核酸が、D-ヌクレオチド、L-ヌクレオチド、これらの混合物、DNAまたはRNAまたはそれおおよび何らかのそれらの組み合わせであるか否かにかかわらず、核酸という用語は、本明細書中で好ましく使用される場合、1本鎖核酸および2本鎖核酸も包含し、それにより好ましくは本発明による方法に供される場合の核酸分子は1本鎖核酸である。

【0149】

核酸という用語は、本明細書中で好ましく使用される場合、修飾核酸も包含する。修飾核酸は、ヌクレオチド-修飾RNAまたはヌクレオチド-修飾DNA分子であり得、それにより、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2'-アミノ、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-H(概説についてはUssman & Cedergren, 1992参照)での修飾により安定性を促進するために、RNAまたはDNA分子は個

10

20

30

40

50

々のヌクレオチドにおいて大規模に修飾される。

【0150】

核酸という用語は、本明細書中で好ましく使用される場合、完全に閉じた核酸も包含する。核酸に対する、完全に閉じた、すなわち環状構造は、ヌクレオチド配列が本発明により決定されるべきである核酸が、好ましくは共有結合を通じて閉じている場合に認められ、それによって、より好ましくはこのような共有結合は、本明細書中で開示されるように、核酸分子配列の5'末端と3'末端との間で形成される。

【0151】

核酸という用語は、好ましく使用される場合、非核酸分子部分を含むあらゆる核酸分子も包含する。このような非核酸分子部分は、次でより詳細に概説するように、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、様々な基を含む群から選択され得る。したがって、核酸という用語は、少なくとも1つの核酸部分および、細胞など、生体系への核酸分子の送達を促進するために使用され得る少なくとも1つのさらなる部分を含む複合物および/または複合体も包含する。提供される複合物および複合体は、細胞膜を横切って治療化合物を移送し、薬物動態を変化させ、および/または本発明の核酸の局在性を調節することによって治療活性を付与し得る。これらの種類の複合物および複合体は、好ましくは、細胞膜を横切る、低分子、脂質、リン脂質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、抗体、毒素、負電荷ポリマーおよび他のポリマー、例えばタンパク質、ペプチド、ホルモン、炭水化物、ポリエチレングリコールまたはポリアミンを含むがこれらに限定されない分子の送達に適切である。一般に、記載される輸送体は、分解性リンカーありまたはなしで、個別にまたは多構成要素系の一部としての何れかで使用されるように設計される。これらの化合物は、血清の存在下または非存在下で、異なる組織由来の多くの細胞タイプへの核酸分子の送達および/または局在を向上させると予想される（米国特許第U.S. 854,038号参照）。本明細書中に記載の分子の複合物は、生体分解性核酸リンカー分子など、生体分解性であるリンカーを介して生物学的活性分子に結合させ得る。

【0152】

配列を決定しようとする核酸に関する次の記述で詳述されるように、非核酸部分は、PEG部分、すなわちポリ(エチレングリコール)部分またはHES部分、すなわちヒドロキシエチルデンプン部分であり得る。

【0153】

直接的にまたはリンカーを通じて、の何れかで、非核酸部分および好ましくはPEGおよび/またはHES部分を核酸分子に結合させ得る。核酸分子が1以上の修飾、好ましくは1以上のPEGおよび/またはHES部分を含むことも本発明の範囲内である。実施形態において、個別のリンカー分子によって、複数のPEG部分またはHES部分が核酸分子に結合される。本発明に関連して使用されるリンカーは、それ自身、直鎖状または分岐状の何れかであり得る。これらの種類のリンカーは、当業者にとって公知であり、特許出願WO2005/074993およびWO2003/035665にさらに記載されている。

【0154】

好ましい実施形態において、リンカーは生体分解性リンカーである。生体分解性リンカーによって、とりわけ、動物の身体、核酸分子からの修飾物の放出ゆえに、好ましくはヒトの身体における、滞留時間に関して、核酸分子の特徴を改変することが可能となる。生体分解性リンカーの使用によって、核酸分子の滞留時間をより良好に制御できるようになり得る。このような生体分解性リンカーの好ましい実施形態は、国際特許出願WO2006/052790、WO2008/034122、WO2004/092191およびWO2005/099768に記載のものなどであるがそれらに限定されない生体分解性リンカーであり、したがって、国際特許出願WO2004/092191およびWO2005/099768において、リンカーは、本明細書中で記載のような1または2個の修飾物、核酸分子およびその間の生体分解性リンカーからなる、ポリマー性オリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドプロドラッグの一部である。

【0155】

本明細書中で好ましく使用される場合、「ヌクレオチド」は、天然のDNAヌクレオシド-、二-および三リン酸：デオキシアデノシン-、二-および三リン酸；デオキシグアノシン-、二-および三リン酸；デオキシチミジン-、二-および三リン酸；およびデオキシシチジン-、二-および三リン酸を含むがこれらに限定されない。（本明細書中で、それぞれdA、dG、dTおよびdCまたはA、G、TおよびCと呼ぶ。）。ヌクレオチドという用語はまた、天然のRNAヌクレオシド-、二-および三リン酸：アデノシン-、二-および三リン酸；グアニン-、二-および三リン酸；ウリジン-、二-および三リン酸；シチジン-、二-および三リン酸（本明細書中でそれぞれA、G、UおよびCと呼ぶ。）も含み；核酸分子、すなわちDNA分子およびRNA分子の単量体の単位である塩基-糖-リン酸の組み合わせを指す。しかし、言い換えると、「ヌクレオチド」という用語は、環状フラノシド型糖（RNA中のp-D/L-リボースおよびDNA中のP-D/L-2'-デオキシリボース）を含有する何らかの化合物を指し、これは、5'位置でリン酸化されており、-グリコシルC1'-N結合を介してC-1'糖位置に連結されるプリンまたはピリミジン型塩基の何れかを有する。ヌクレオチドは、とりわけ修飾塩基（例えば5'-メチルシトシン）および修飾糖基（例えば2'-O-メチルリボシリル、2'-O-メトキシエチルリボシリル、2'-フルオロリボシリル、2'-アミノリボシリルなど）による修飾ヌクレオチドを有するヌクレオチドを含むマス修飾ヌクレオチドを含め、天然または合成であり得る。

【0156】

「核酸塩基」という用語は、天然の核酸塩基アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）およびウラシル（U）ならびに非天然の核酸塩基、例えばキサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ-N6-メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、N4,N4-エタノシトシン、N6,N6-エタノ-2',6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、5-(C3-C6)-アルキニル-シトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、シュードイソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシンなど、およびFreier & Altmann (Freier & Altmann, 1997)の刊行物における米国特許U.S.5,432,272号に記載の「非天然の」核酸塩基を包含する。したがって、「核酸塩基」という用語は、既知のプリンおよびピリミジン複素環だけでなく、複素環類似体およびその互変異性体も含む。

【0157】

1本鎖核酸が個別および安定な三次元構造を形成し得、抗体のような標的分子に特異的に結合し得ることは本発明の範囲内である。D-ヌクレオチドから構成されるこのような核酸分子はアプタマーと呼ばれる。アプタマーは、いくつかの標的分子、例えば低分子、タンパク質、核酸に対して、および細胞、組織および生物に対しても同定され得、特異的な標的分子のインビトロおよび/またはインビオ機能を阻害し得る。アプタマーは通常、インビトロ選択と呼ばれる標的にに対する選択過程または指數関数的進化によるリガンドの系統的進化 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment、略称SELEX) (Bockら、1992; Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990) によって同定される。主に、ヌクレアーゼ分解および腎臓による身体からのクリアランスゆえに、非修飾アプタマーは血量から迅速に排除され、半減期は分単位から時間単位であるが、これはアプタマーが本質的に低分子量であるからである。それゆえに、アプタマーを治療に使用するためには、糖の2'位（例えばリボース）骨格でこれらが修飾されねばならない (Burmesterら、2006)。

【0158】

アプタマーの不安定性の主因である偏在ヌクレアーゼは、キラル基本単位、すなわちL-アミノ酸からなる。結果的に、ヌクレアーゼの構造は、本質的にキラルでもあり、その

10

20

30

40

50

結果、立体特異的な基質認識が起こる。それゆえに、これらの酵素は、適正なキラル立体配置の基質分子のみを受容する。アプタマーおよび天然の核酸分子はD-ヌクレオチドから構成されるので、L-オリゴヌクレオチドは、酵素的認識および続く分解から逃れるはずである。残念ながら、同じ原理ゆえに、この場合には、このような鏡像核酸を増幅するための酵素活性が自然には得られなかった。したがって、S E L E X過程を使用して、L-核酸アプタマーを直接得ることができない。とはいえ、立体化学の原理から、所望の機能的L-核酸アプタマーへと最終的につながる迂回路が明らかとなる。

【0159】

インビトロで選択された(D-)アプタマーがその天然の標的に結合する場合、このアプタマーの構造鏡像は、天然標的の鏡像と同じ特徴により結合する。ここで、両相互作用パートナーは、同じ(非天然)キラリティーを有する。生命体および殆どの生化学的化合物のホモキラリティーゆえに、このようなエナンチオ-RNAリガンドは、当然ではあるが、実際の使用には制限がある。一方で、(非天然)鏡像標的に対してS E L E X過程が行われる場合、この(非天然)標的を認識するアプタマーが得られる。このアプタマー-所望のL-アプタマーの対応する鏡像立体配置は、同様に天然標的を認識する。生体安定性核酸分子の生成のためのこの鏡像選択過程は、最初に1996年(Klussmannら、1996; Nolteら、1996)に公開され、これにより、ある標的分子に対する高い親和性および特異性だけでなく、同時に生体安定性も示す、機能性の鏡像核酸分子リガンドが生成される。1本鎖核酸分子が、「シュピーゲルマー」(ドイツ語の「Spiegel」鏡より)と呼ばれるこのようなリガンド-結合L-核酸であることは本発明の範囲内である(「The Aptamer Handbook」; eds. Klussmann, 2006参照)。

【0160】

とりわけ、本発明による核酸は、好ましくは本発明による核酸の検出を可能にする修飾を含み得る。このような修飾は、好ましくは放射性、酵素性および蛍光標識を含む群から選択される。このような修飾はまた、それ自身、放射性、酵素性および蛍光標識を含む群から選択される修飾により修飾され得るD-ヌクレオチドからも選択される。

【0161】

本明細書中で使用される場合の、核酸、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質の様々な配列番号、化学的性質、その実際の配列および内部参照番号を次の表でまとめる。

表1(A) 本願において参照される配列

10

20

30

【表 1】

配列番号	タイプ	配列	内部参照
1	タンパク質	MLTLIQGKKIVNHLRSRLA EYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDV DLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVK VCGERKCVLFIEWEK KTYQLD LFTALAE EKPYAIFHFTGPVSYLIRIR AALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVP LKITTE KELE KGFTYRIPKKRL	Pol-X、ポリメラーゼ X
2	タンパク質	MLTLIQGKKIVNHLRSRLA EYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDV DLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVK CGERKCVLFIEWEK KTYQLD LFTALAE EKPYAIFHFTGPVSYLIRIR AALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVP LKITTE KELE KGFTYRIPKKRL	Pol-X V80G、 ポリメラーゼ X 変異体 V80G
3	タンパク質	MLTLIQGKKIVNHLRSRLA EYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDV DLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVK ACGERKCVLFIEWEK KTYQLD LFTALAE EKPYAIFHFTGPVSYL <u>G</u> RIRAAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVP LKITTE KELE KGFTYRIPKKRL	Pol-X V80A、 ポリメラーゼ X 変異体 V80A
4	タンパク質	MLTLIQGKKIVNHLRSRLA EYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDV DLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVK VCGERKCVLFIEWEK KTYQLD LFTALAE EKPYAIFHFTGPVSYL <u>G</u> RIRAAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVP LKITTE KELE KGFTYRIPKKRL	Pol-X I124G、 ポリメラーゼ X 変異体 I124G
5	タンパク質	MLTLIQGKKIVNHLRSRLA EYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDV DLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVK VCGERKSVLFIEWEK KTYQLD LFTALAE EKPYAIFHFTGPVSYLIRIR AALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVP LKITTE KELE KGFTYRIPKKRL	Pol-X C86S、 ポリメラーゼ X 変異体 C86S
6	D/L-DN	D(GG)-L(GATCACAGTGAGTAC)	MJ_1_58_MD

10

20

配列番号	タイプ	配列	内部参照
	A		
7	L-DNA	リノ酸-GTAAAACGACGGCCAGT	MJ_1_143_LD
8	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>AGT</u> TACTCACTGTGATC	MJ_1_145_LD
9	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>GT</u> TACTCACTGTGATC	MJ_1_146_LD
10	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>GT</u> TACTCACTGTGATC	MJ_1_147_LD
11	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>TG</u> TACTCACTGTGATC	MJ_1_144_LD
12	D/L-DNA	D(GG)-L (GATCACAGTGAGTAC)	MJ_1_58_MD
13	L-DNA	リノ酸-ACGACGGCCAGT	MJ_1_59_LD
14	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC	MJ_1_57_LD
15	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGIN KLVDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKIEAIGLDKFF DT	Dpo4、ポリメラーゼ Dpo4
16	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIA <u>CD</u> MAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGIN KLVDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKIEAIGLDKFF DT	Dpo44 A155C、 ポリメラーゼ Dpo4 変異体 A155C
17	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGIN KL <u>CD</u> TLISIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKIEAIGLDKFF DT	Dpo4 V203C、 ポリメラーゼ Dpo4 変異体 V203C、
18	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIA <u>CD</u> MAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGIN KL <u>CD</u> TLISIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKIEAIGLDKFF DT	Dpo4 A155C/V203C 、 ポリメラーゼ Dpo4 変異体 A155C/V203C
19	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIE	Dpo4 C31S、 ポリメラーゼ

10

20

30

40

配列番号	タイプ	配列	内部参照
		IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGIN KLVDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIKPKAHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFF DT	ゼ Dpo4 変異 体 C31S、
20	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQV <u>C</u> RIMNLLREYSEKIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGIN KLVDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIKPKAHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFF DT	Dpo4 S85C、 ポリメラーゼ Dpo4 変異 体 S85C
21	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQV <u>S</u> RIMNLLREYSEKIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGIN KLVDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIKPKAHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFF DT	Dpo4 S86C、 ポリメラーゼ Dpo4 変異 体 S86C
22	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQV <u>S</u> RIMNLLREY <u>E</u> KIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF AKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGIN KLVDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIKPKAHVVAVTEDLDIVSRGR TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFF DT	Dpo4 S96C、 ポリメラーゼ Dpo4 変異 体 S96C、
23	L-DNA	GTGGAACCGACAACTTGTGCTGCGTCAGCATAAGAAAGGAGCTCCCTCA GAAGAACGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC	MJ_1_105_LD
24	L-DNA	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCACGC	MJ_oligo_18 7_LD
25	L-DNA	GTGGAACCGACAACTTGTGC	MJ_oligo_18 9_LD
26	D-DNA	ATGCTGACCTGATTCAAGGGCAAAAAATCGTAACCATCTGCGTAGCCG TCTGGCCTTGAATATAACGGCCAGCTGATTAAATTCTGAGCAAAACA TTGTGGCGGTGGCAGCCTGCGTCGTGAAGAAAAATGCTGAACGATGTG GATCTGCTGATTATTGTGCCGAAAAAAACTGCTGAAACATGTGCTGCC GAACATTCTGATTAAAGGCCCTGAGCTTAGCGTGAAGTGTGCGGCGAAC GTAATGCGTGTGTTATCGAATGGAAAAAAACCTACCAAGCTGGAC CTGTTACCGCGCTGGCCGAAGAAAACCGTATGCGATTTCATTTAC CGGTCCGGTGAGCTATCTGATTGCTTACGCTGGCGCTGAAAAAA	ASFV Pol-X ORF E. コリ (E. coli) コ ドン最適化

配列番号	タイプ	配列	内部参照
		ACTACAAACTGAACCAGTATGGCTGTTAAAAACCAGACCCCTGGTGCCTGAAATTACCAACGAAAAGAACTGATTAAAGAACTGGCTTACCTATCGCATTCCGAAAAACGCCGTATAA	
27	タンパク質	MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSMLTLIQGKKIVNHLRSRLAHEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVVKCGERKCVLFIWEKKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRALA KKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKEGLFTYRIPKKRL	pMJ14 中でコードされる場合の His-タグ付加 Pol-X タンパク質配列
28	D-DNA	TCCGGTGAGCTATCTGGCTGTATCGTGCAGCG	QC10_up
29	D-DNA	CGCCGCACGAATACGACCCAGATACTCACCGA	QC10_low
30	D-DNA	TGAGCTTAGCGTGAAGGGTGCAGCGAACG	QC26_up
31	D-DNA	CGTCGCCGACCCCTTCACGCTAAAGCTCA	QC26_low
32	D-DNA	TGAGCTTAGCGTGAAGCGTGCAGCGAACG	QC27_up
33	D-DNA	CGTCGCCGACGCTTCACGCTAAAGCTCA	QC27_low
34	D-DNA	TGAAAGTGTGCGCGAACGTAAGCGTGCCTTTA	QC31_up
35	D-DNA	TAAACAGCACGCTTTACGTTCGCCGACACTTCA	QC31_low
36	D-DNA	GATCACAGTGAGTAC	SP-1
37	D-DNA	リノ酸-GTAAAACGACGCCAGT	D(g1)P
38	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>AGT</u> ACTCACTGTGATC	MJ_1_140_DD
39	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>CGT</u> ACTCACTGTGATC	MJ_1_141_DD
40	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>GT</u> ACTCACTGTGATC	MJ_1_142_DD
41	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTAC <u>TG</u> ACTCACTGTGATC	SP1c+18(g1)
42	D-DNA	リノ酸-ACGACGCCAGT	D(g6)P
43	タンパク質	AcMLTLIQGKKIVNHLRSRLAHEYNGQLIKILSKNIVAVGSL-0gp	実施例 3 生成物(1)
44	タンパク質	H-RREEKLNDVDLLIIVPEKKL LKHVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe	実施例 3 生成物(2)
45	タンパク質	H-CGERKCVLFIEWEKKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRALA KKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELI KELGFTYRIPKKRL-OH	実施例 3 生成物(3)
46	タンパク質	Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAHEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKA-Sme	実施例 4 生成物(4)
47	D-DNA	Atto532-GGAGCTCAGACTGGCACGC	MJ_1_33_DD
48	D-DNA	GTGGAACCGACAACCTGTGCTGCGTCAGCATAAGAAAGGAGCTCCCTCA GAAGAAGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC	MJ_1_1_DD
49	D/L-DNA	D(GG)-L(GGAGCTCAGACTGGCACGC)	MJ_1_109_MD
50	D-DNA	ATGATTGTGCTGTTGTGGATTTGATTATTTATGCCAGGTGGAAGAAGTTCTGAATCCGAGCTGAAAGGTAAACCGGTTGTTGTGTTTA GCGGTCGCTTGAAGATAGCGGTGCAGTTGCAACCGCCAATTATGAAGCCCGTAAATTGGTGTAAAGCCGGTATTCCGATTGTTGAAGCCAAAAAT TCTGCCGAATGCAGTTATCTGCCGATGCGCAAAGAAGTTATCAGCAGGTTAGCAGCGTATTATGAATCTGCTGCGCAATATAGCGAAAAAATTGAA	Sso Dpo4 ORF E. コリ (E. coli) コドン最適化

配列番号	タイプ	配列	内部参照
		ATTGCCAGCATTGATGAAGCCTATCTGGATATTAGCGATAAAGTGGCGA TTATCGCGAAGCATATAATCTGGGCCTGGAAATTAAAAATAAAATCCTGG AAAAAGAAAAAAATTACCGTGACCGTGGCATTAGCAAAAATAAAAGTGT GCCAAAATTGCAGCAGATATGGCAAAACCGAATGGCATTAAAGTGATTGA TGATGAAGAAGTGAACCGTCTGATTCGCAACTGGATATTGCAGATGTT CGGGTATTGCAATATTACCGCAGAAAAACTGAAAAACTGGCATTAAAT AAACTGGTTGATACCCGTAGCATTGAATTGATAAAACTGAAAGGCATGAT TGGTGAAGCGAAAGCAAATATCTGATTAGCCTGGCACGTGATGAATATA ATGAACCGATTCTGACCCGTGTTGTAAGCATTGGTCGATTGTGACC ATGAAACGCAATAGCGTAATCTGGAAGAAATTAAACCGTACCTGTTCG TGCATTGAAAGAAAGCTATTATAAACTGGATAAACGCAATTCCGAAAGCCA TTCATGTTGTCAGTTACCGAAGATCTGGATATTGTTAGCCGTGGTCGT ACCTTCCGCATGGTATTAGCAAAGAAACCGCCTATAGCGAAAGCGTTAA ACTGCTGCAGAAAATCCTGGAAGAAGATGAACGTAACATTGTCGTATTG GTGTGCGCTTAGCAAATTATTGAAGCCATTGCCCTGGATAAAATTTTT GATACC	10
51	タンパク質	MASAWSHPQFEKSGMIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGR FEDSGAVATANYEARFKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSS RIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKE KITVTVGISKNKVFAKIADMAKPNGIKVIDEEVKRLIRELDIADVPGI GNITAEKLLKGINKLVDTLSIEFDKLKGMIGEAKAKYLISLARDEYN IRTRVRKSIGRIVTMKRSRNLEEIKPYLFRAIEEYYKLDKRIKPA VAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIG FSKFIEAIGLDKFFDTGS	pMJ343 中に コードされ る場 合の Strep-タグ 付加 Dpo4 タ ンパク質配 列 20
52	D-DNA	CAAAAATAAAGTGTGCAAAATTGCATGCGATATGGCAAAACCG AATGGCATTAAAG	QC_28_up
53	D-DNA	CTTAATGCCATTGGTTGCCATATCGCATGCAATTGGCAAA CACTTATTGG	QC_28_low 30
54	D-DNA	TGAAAAAAACTGGCATTAAATAAACTGTGTGATACCCGTAGCATTGAATT G	QC_29_up
55	D-DNA	CAAATTCAATGCTCAGGGTATCACACAGTTATTAAATGCCAGTTTC A	QC_29_low
56	D-DNA	TGAAAGTAAACCGGTTGTTCTGTTAGCGGTC	QC_30_up
57	D-DNA	GACCGCTAAAACAGAAACAACAAACCGTTACCTTC	QC_30_low
58	D-DNA	ATGCGCAAAGAGTTATCAGCAGGTTGAGCGTATTATGAATC	QC_38_up
59	D-DNA	GATTCTATAACGGCTACAAACCTGCTGATAAAACTCTTGC GCAT	QC_38_low
60	D-DNA	AAGTTTATCAGCAGGTTAGCTGCGTATTATGAATCTGCTGC G	QC_39_up 40
61	D-DNA	CGCAGCAGATTCTAAACGACAGCTAACCTGCTGATAAACTT	QC_39_low
62	D-DNA	ATTATGAATCTGCTGCGCAATTGAAATTGCCAGCAT T	QC_40_up
63	D-DNA	AATGCTGGCAATTCAATTTCACAATATTGCGCAGCAGATT T	QC_40_low
64	D-DNA	リシン酸-AGCGGCTTCGATGATTGCTGTTGGATT TT	MJ_1_90_DD
65	D-DNA	リシン酸-AGCGGCTTCGCGATGCAATTGGCAAACACTT TT	MJ_1_91_DD

配列番号	タイプ	配列	内部参照
66	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGTCATCACGGGAGAT	MJ_1_72_DD
67	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGCCCTGAAAGCTGCCACAAGGCAGGAACGTT	MJ_1_73_DD
68	タンパク質	MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEA RKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIE IASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKEKEKITVTVGISKNKVF AKIA-チオエステル	Dpo4 断片 1-154
69	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGATGGGAGGGAAATCAAACGGGAA	MJ_1_99_DD
70	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGGCACAAAGCTTGAAGAGCTTC	MJ_1_100_DD
71	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGTGCATATGGCAAAACCGAATGGCATTAAA	MJ_1_96_DD
72	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGCCCTAGGTATCAAAAAATTATCCAGG	MJ_1_97_DD
73	タンパク質	ADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGINKL TLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVTMKRN SRNLEEKPYLFRAIEEESYYKLDKRIKPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTFPH GISKETAYSESVKLLQKILEEDEKERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFFDT	Dpo4 A155C 断片 155-352
74	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGTGTGATACCCCTGAGCATTGAATT	MJ_1_98_DD
75	タンパク質	ADTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVTMK RNSRNLEEKPYLFRAIEEESYYKLDKRIKPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTFPH PHGISKETAYSESVKLLQKILEEDEKERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFFDT	Dpo4 V203C 断片 203-352
76	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGATGGCAGATATGGCAAAACCGAAT	MJ_1_101_DD
77	D-DNA	リン酸-AGCGGCTCTCGGCACAGTTATTAAATGCCAGTT	MJ_1_102_DD
78	タンパク質	ADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGINKL- チオエステル	Dpo4 断片 155-202
79	D-DNA	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCACGC	DE4. 40T7
80	D-DNA	GTGGAACCGACAACTTGTGC	DE4. 40R
81	タンパク質	H-RTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDEKERKIRRIGVRFSKFIEAIGLD KFFDT-NH ₂	実施例 10 生成物(1)
82	タンパク質	Boc-VDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRI VTMKNRNSRNLEEKPYLFRAIEEESYYKLDKRIKPKAIHVVAVTEDLDIVSR G-OH	実施例 10 生成物(2)
83	タンパク質	H-VDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVT MKNRNSRNLEEKPYLFRAIEEESYYKLDKRIKPKAIHVVAVTEDLDIVSRG TFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDEKERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFF DT-NH ₂	実施例 10 生成物(3)
84	タンパク質	Z-CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGINKL- ベンジル-チオエステル	実施例 10 生成物(4)
85	タンパク質	H-RKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNL GLEIKNKEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-Sme	実施例 10 生成物(7)
86	タンパク質	Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATAN YEARKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPM-0Gp	実施例 10 生成物(6)
87	タンパク質	H-CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKLGINKL CDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVTMK RNSRNLEEKPYLFRAIEEESYYKLDKRIKPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTFPH PHGISKETAYSESVKLLQKILEEDEKERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFFDT-OH	実施例 10 生成物(5)

配列番号	タイプ	配列	内部参照
88	タンパク質	Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe	実施例 10 生成物 (8)

【0162】

上記のものは、それらが本発明と関連して使用された場合、分子の代表であることを理解されたい。添付の配列リストは、単にアミノ酸またはそのヌクレオチド配列を反映するだけのものであり、上記の表で示されるようなその分子のさらなる特性を何ら反映するものではない。

【0163】

本発明は、さらなる特性、実施形態および長所が汲み取られ得る、図面、実施例および配列表によりさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0164】

【図1A】図1Aは、L-ポリメラーゼXの活性試験のための1-ギャップD-DNA鑄型の組成を示す。

20

【図1B】図1Bは、L-ポリメラーゼXの活性試験のための6-ギャップD-DNA鑄型の組成を示す。

【図2A-B】図2A-Bは、UPLC(A)および質量分析(B)による、合成D-ポリペプチド生成物Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSL-OGp(1)の分析を示す。

20

【図3A-B】図3A-Bは、UPLC(A)および質量分析(B)による、合成D-ポリペプチド生成物H-RREEKLNVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSF SVKA-SMe(2)の分析を示す。

【図4A-B】図4A-Bは、UPLC(A)および質量分析(B)による、合成D-ポリペプチド生成物H-CGERKCVLFIEWEKKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL-OH(3)の分析を示す。

30

【図5A-B】図5A-Bは、UPLC(A)および質量分析(B)による、合成D-ポリペプチド生成物Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDV DLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSF SVKACGERKCVLFIEWEKKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL-OH(4)の分析を示す。

【図6A-B】図6A-Bは、SDS-PAGE(A)および質量分析(B)による、ネイティブ化学ライゲーションD-ポリペプチド生成物Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDV DLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSF SVKACGERKCVLFIEWEKKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL-OH(5)の分析を示す。

40

【図7】図7は、D-ポリメラーゼXの活性試験のための1-ギャップL-DNA鑄型の組成を示す。

【図8】図8は、1-ギャップ基質におけるD-ポリメラーゼXのL-DNA伸長活性アッセイのゲル電気泳動を示す。

【図9A】図9Aは、D-ポリメラーゼXの活性試験のための6-ギャップL-DNA鑄型の組成を示す。

【図9B】図9Bは、6-ギャップ基質におけるD-ポリメラーゼXのL-DNA伸長活

50

性アッセイのゲル電気泳動を示す。

【図10A】図10Aは、L-ポリメラーゼXの活性アッセイのためのプライマー-鑄型複合D-DNA基質を示す。

【図10B】図10Bは、一定温度で行われたL-ポリメラーゼXのD-DNA伸長活性アッセイのゲル電気泳動を示す。

【図10C】図10Cは、温度サイクリング用いて行われたL-ポリメラーゼXのD-DNA伸長活性アッセイのゲル電気泳動を示す。

【図11A-B】図11A-Bは、SDS-PAGE(A)およびLC-ESI質量分析(B)による合成全-L-ポリメラーゼdpo4変異体A155Cの分析を示す。

【図12A】図12Aは、L-ポリメラーゼdpo4変異体A155C、V203C、C31SおよびA155C/V203CのD-DNA PCR活性アッセイのゲル電気泳動を示す。

【図12B】図12Bは、組み換えおよび合成L-ポリメラーゼdpo4のD-DNA PCR活性アッセイのゲル電気泳動を示す。

【図13】図13は、質量分析による合成D-ポリペプチド生成物H-RTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVVRFSKFIGLDKFFDT-NH₂(1)の分析を示す。

【図14】図14は、質量分析による合成D-ポリペプチド生成物Boc-VDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISSLARDEYNEPIRTVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFRAIEEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRG-OH(2)の分析を示す。

【図15】図15は、質量分析による断片縮合D-ポリペプチド生成物H-VDTLSIEFDKLKGMIKEAKAKYLISSLARDEYNEPIRTVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFRAIEEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVVRFSKFIGLDKFFDT-NH₂(3)の分析を示す。

【図16A-B】図16A-Bは、RP-HPLC(A)および質量分析(B)による合成D-ポリペプチド生成物Z-CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGINKL-ベンジル-チオエステル(4)の分析を示す。

【図17A-B】図17A-Bは、UPLC(A)および質量分析(B)による合成D-ポリペプチド生成物H-RKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe(7)の分析を示す。

【図18A-B】図18A-Bは、UPLC(A)および質量分析(B)による合成D-ポリペプチド生成物Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKEFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe(6)の分析を示す。

【図19A-B】図19A-Bは、SDS-PAGE(A)およびESI質量分析(B)によるクロストリパインが介在するD-ポリペプチドライゲーション生成物Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKEFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe(8)の分析を示す。

【図20A-B】図20A-Bは、SDS-PAGE(A)およびLC-ESI質量分析(B)による、全-L-ポリメラーゼdpo4断片155-352(V203C)のネイティブ化学ライゲーション生成物の分析を示す。

【0165】

(実施例)

10

20

30

40

50

実施例で使用される場合の略語

A C N	アセトニトリル (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
D C M	ジクロロメタン (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
D I P E A	N, N-ジイソプロピルアミン (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
E D T	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
F m o c	9-フルオレニル-メトキシカルボニル -	10
H A T U	(2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート) (Creosalus, Louisvillle KY, USA)	
H F I P	1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロホスフェート (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー (高圧液体クロマトグラフィーと呼ばれることがある。)	
M e I m	メチルイミダゾール (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	20
M e O H	メタノール (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
M S N T	1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)	
N M P	N-メチル-ピロリドン (Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland)	
P y B O P	(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (Merck KGAA, DARMSTADT, GERMANY)	
S D S	ドデシル硫酸ナトリウム (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	30
T B T U	O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)	
t B u	(tert.-ブチル-)	
T F A	トリフルオロ酢酸 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
T F E	1,1,1-トリフルオロエタノール (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
T H F	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	40
T I S	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
T L C	薄層クロマトグラフィー	
T r i s	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)	
U P L C	超高速液体クロマトグラフィー	
【0166】		
(実施例1) - ポリメラーゼXの野生型および変異体の組み換え発現および精製 アフリカブタ熱ウイルス(略称ASFV)からのポリメラーゼXは、1997年にO1		50

iverossらにより記載され、特徴が調べられた。ポリメラーゼXの野生型遺伝子は、開始コドンおよび終止コドンを含む、僅か525塩基対のオープンリーディングフレーム（略称ORF）を有する（Oliverossら、1997）。コードされるタンパク質の長さは僅か174アミノ酸である。この例は、どのようにポリメラーゼXならびにそれらの変異体がE.コリ（*E. coli*）で発現され、*His₆-Tag*を用いて精製されたかを説明する。

【0167】

1.1 発現コンストラクト

ASFVのコドン使用はE.コリ（*E. coli*）と異なるので、ポリメラーゼXに対するE.コリ（*E. coli*）-コドン最適化合成遺伝子をGeneArt AG（Regensburg, Germany）から購入した。本合成遺伝子配列は、pCR4-Blunt-TOPOベクター（元の会社：Invitrogen, Karlsruhe, Germany）中で提供された。開始コドンおよび2つの終止コドンを含むコドン最適化オープンリーディングフレームは、次の配列：ATGCTGACCCCTGATTCAAGGGCAAAAAAAATCGTGAACCATCTGCGTAGCCGTCTGGCCTTTGAATATAACGGCCAGCTGATTAAAATTCTGAGCAAAAAATTGTGGCGGTGGGCAGCCTGCGTCGTGAAGAAAAATGCTGAACGATGTGGATCTGCTGATTATTGTGCCGGAAACATTCTGATTAAAGGCCTGAGCTTTAGCGTGAAAGTGTGCGGCGAACGTAAATGCGTGTGCTGTTATCGAATGGGAAAAAAACCTACCAAGCTGGACCTGGTACCTGTTTACCGCGCTGGCCGAAGAAAAACCGTATGCGATCTTCACTTTACCGGGTCCGGTGAGCTATCTGATTCTGATTCTGCGGCGCTGAAAAAAACTACAAACTGAACCCAGTATGGCCTGTTAACCGAAGAACTGATTAAAGAACTGGGCTTACCTATCGCATTCCGAAAAAACGCCCTGTAATAAを有した。

【0168】

全-LポリメラーゼXとも呼ばれるポリメラーゼXに対する発現コンストラクトを得るために、BamHIおよびPstIによってポリメラーゼXの遺伝子をpCR4-Blunt-TOPOから切り出し、pRESET-Aベクター（Invitrogen, Karlsruhe, Germany）中でサブクローニングした。付加した*His₆-Tag*をN-末端にサブクローニングし、この遺伝子をT7プロモーターの調節下に置いた。コンストラクトをpMJ14と名付け、E.コリ（*E. coli*）での全-LポリメラーゼXの発現のために使用した。pMJ14から発現されたタンパク質ポリメラーゼXは210個のアミノ酸の次の配列：MRGSHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSMLTLIQGKKIVNHLRSRLAFYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGERKCVLFIEWEKKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAAALKKKNYKLQNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRLを有した。

【0169】

最初の36個のアミノ酸は、数個のスペーサーアミノ酸およびいくつかの他の配列タグを含む*His₆-Tag*に相当した（T7遺伝子10リーダー、抗発現エピトープ）。最後の174個のアミノ酸部分は、ASFVで見られるようなポリメラーゼXタンパク質配列と同一であった。

【0170】

製造者のプロトコールに従い、市販のQuickChangeキット（Stratagene GmbH, Waldbronn, Germany）を用いて、全-LポリメラーゼXの変異体に対する発現コンストラクトを作製した。プラスミドpMJ14を鋳型とした

10

20

30

40

50

。QuikChangeに必要なオリゴヌクレオチドは、NOXXONの施設で合成したか(QC10_up、QC10_low)、またはPurimex(Grebenstein, Germany)から購入したか(QC26_up、QC26_low、QC27_up、QC27_low、QC31_up、QC31_low)の何れかであった。次の変異体発現コンストラクトを作製し、E.コリ(E. coli)での全-Lポリメラーゼの変異体の発現のために使用した。

【表2】

変異体	発現コンストラクト	QuikChange 突然変異誘発手順のために使用したオリゴヌクレオチド
I124G	pMJ130	QC10_up (5' - TCCGGTGAGCTATCTGGTCGTATCGTGCGCG-3') QC10_low (5' - CGCCGCACGAATAACGACCCAGATAGCTCACCGGA-3')
V80G	pMJ356	QC26_up (5' - TGAGCTTAGCGTAAAGGGTGCAGCGAACG-3') QC26_low (5' - CGTCGCCGCACCCCTTCACGCTAAAGCTCA-3')
V80A	pMJ357	QC27_up (5' - TGAGCTTAGCGTAAAGCGTGCAGCGAACG-3') QC27_low (5' - CGTCGCCGCACGCTTCACGCTAAAGCTCA-3')
C86S	pMJ412	QC31_up (5' - TGAAAGTGTGCAGCGAACGTAAGCGTGCTGTTA-3') QC31_low (5' - TAAACAGCACGCTTTACGTTGCCGCACACTTCA-3')

【0171】

1.2 E.コリ(E. coli)におけるタンパク質発現

発現コンストラクトpMJ14を用いてE.コリ(E. coli)で全-L-ポリメラーゼXを発現させた。pMJ130、pMJ356、pMJ357またはpMJ412から全-L-ポリメラーゼXの変異体を発現させた。発現のために、コンピーテントE.コリ(E. coli)株の「BL-21(DE3)pLysS」(Novagen/VWR、Dresden, Germany)において適切な発現コンストラクトを形質転換し、抗生物質アンピシリンを用いて維持した。600nmでの光学密度がおよそ0.6に到達するまで、2YT培地内で培養物を37℃で増殖させた。次いで、0.4mMの最終濃度まで、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(略称IPTG)を添加することによって、タンパク質発現を誘導した。30℃で発現を4時間行った。遠心によって細胞を回収し、-80℃で保存するか、またはすぐに処理した。

【0172】

1.3 タンパク質精製

「溶解および結合(lyse and bind)緩衝液」(50mM Na-リン酸、pH7.5、500mM NaCl、40mMイミダゾール)中、新鮮または凍結E.コリ(E. coli)細胞を氷上で再懸濁し、「フレンチプレス」(G. Heinemann, Schwabisch Gmünd, Germany)細胞破壊装置を用いて溶解させた。「Ni-NTA Superflow」材料(Qiagen, Hilden, Germany)を用いて4℃で精製を行った。溶出緩衝液(50mM Na-リン酸、pH7.5、500mM NaCl、200mMイミダゾール)を用いて、段階溶出を行った。SDS-PAGE(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)を用いて分画を分析し、プールし、必要に応じて「Q Sepharose fast flow」材料(GE healthcare, Freiburg, Germany)を

10

20

30

40

50

用いて「AKTA purifier」システム上で陰イオン-イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製した。MALDI質量分析によってタンパク質同一性を確認し、的確な分画をプールし、濃縮し、再緩衝化した。25 mM Na-リン酸、pH 7.5、250 mM NaCl、50%グリセロールからなる緩衝液中で精製タンパク質を-20で保存した。ウシ血清アルブミン(略称BSA)標準物質を用いてBCA-タンパク質アッセイ(Pierce/Perbio Science, Bonn, Germany)によってタンパク質濃度を評価した。

【0173】

実施例2-ポリメラーゼXおよびポリメラーゼXの変異体の活性確認

オリゴヌクレオチドにより形成される様々なタイプの基質複合体を用いて、全-L-ポリメラーゼXおよび全-L-ポリメラーゼXの変異体(実施例1参照)に対する活性アッセイを行ったが、この基質およびオリゴヌクレオチドはD-DNA-ヌクレオチドからなる。

【0174】

2.1.1-ヌクレオチドギャップを有する基質における活性アッセイ

1-ギャップ基質に対するオリゴヌクレオチドのリスト:

【表3】

名称	長さ、nt	配列(5'→3')
SP-1	15	GATCACAGTGAGTAC
D(g1)P	17	リン酸-GTAAACGACGGCCAGT
MJ_1_140_DD	33	ACTGGCCGTCGTTTACAGTACTCACTGTGATC
MJ_1_141_DD	33	ACTGGCCGTCGTTTACCGTACTCACTGTGATC
MJ_1_142_DD	33	ACTGGCCGTCGTTTACGGTACTCACTGTGATC
SP1c+18(g1)	33	ACTGGCCGTCGTTTACTGTACTCACTGTGATC

【0175】

33個のヌクレオチドからなるDNAオリゴヌクレオチドの鋳型鎖(lower strand)とも呼ばれる。)をそれぞれ15および17個のヌクレオチドからなる2つの異なるDNAオリゴヌクレオチドとアニーリングさせ、それぞれその5'-末端および3'末端で鋳型鎖とハイブリッド形成させ、その結果、上鎖(upper strand)において1つのヌクレオチドのギャップを生じさせることによって、基質複合体を作製した。この複合体は、ギャップ内の鋳型位置でA、C、GまたはTの何れかを含有した。アニーリング前に、Gamma-³²P-アデノシン-三リン酸(ATP)およびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いた標準的なキナーゼ反応によって、15個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドSP-1をその5'-末端で³²Pにより放射性標識した。65度10分間加熱し、ゆっくりと冷却することによって、10 mM Tris-HCl、5 mM MgCl₂、pH 8.0中でアニーリングを行った。NAP-カラム(GE health care)での精製によって、組み込まれなかったgamma-³²P-ATPを除去した。

【0176】

活性アッセイにおいて、全-L-ポリメラーゼXおよびそれらの変異体をD-立体配置1-ギャップ基質複合体と合わせた(図1A参照)。陰性対照として、各基質を全-L-ポリメラーゼXおよびそれらの変異体およびD-デスオキシ-ヌクレオチド-三リン酸(dNTP's)なしでも温置した。1-ギャップ複合体の鋳型塩基によって、アッセイ中に対応するD-dNTPのみを添加した。典型的な6 μLアッセイは、50 nM基質複合体、1.7 ng/μL L-全-L-ポリメラーゼXまたはそれらの変異体、8 μMの1つのD-dNTPおよび緩衝液(50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、4%グリセロール、0.1 mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)、pH 7.5)を含有した。Rovalab(Teltow, Germany)からD-dNTPを購入した。温置時間は、37度30分間であった。アッセイ体積全体を試料緩衝液/色素と混

10

20

30

30

40

50

合し、変性配列決定ゲル上に載せ、4時間分離した。このゲルをKodak Kスクリーンに-80で一晩曝露し、BioRad FXホスホイメージヤーシステムを用いて読み取った。

【0177】

全-L-ポリメラーゼXおよび変異体I124G、V80AおよびV80Gは、これらの条件下で活性があり、2本の上鎖(upper strand)DNAオリゴヌクレオチド間の1つのヌクレオチドギャップが充填された。

【0178】

2.2.6-ヌクレオチドギャップを有する基質における活性アッセイ

6-ギャップ基質に対するオリゴヌクレオチドのリスト：

10

【表4】

名称	長さ、nt	配列(5'→3')
SP-1	15	GATCACAGTGAGTAC
D(g6)P	12	リン酸-ACGACGGCCAGT
SP1c+18(g6)	33	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC

【0179】

33個のヌクレオチドからなるDNAオリゴヌクレオチドの鋳型鎖(下鎖(lower strand)と呼ばれる。)をそれぞれ15および12個のヌクレオチドからなる2つの異なるDNAオリゴヌクレオチドとアニーリングさせ、それぞれその5'-末端および3'末端で鋳型鎖とハイブリッド形成させ、その結果、上鎖(upper strand)の6個のヌクレオチドのギャップを生じさせることによって、基質複合体を作製した。アニーリング前に、Gamma-³²P-アデノシン-三リン酸(ATP)およびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いた標準的なキナーゼ反応によって、15個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドSP-1をその5'-末端で³²Pにより放射性標識した。65で10分間加熱し、ゆっくりと冷却することによって、10mM Tris-HCl、5mM MgCl₂、pH 8.0中でアニーリングを行った。NAP-カラム(GE healthcare, Freiburg, Germany)での精製によって、組み込まれなかったgamma-³²P-ATPを除去した。

20

【0180】

30

活性アッセイにおいて、全-L-ポリメラーゼXおよびそれらの変異体をD-立体配置6-ギャップ基質複合体と合わせた(図1B)。陰性対照として、基質を全-L-ポリメラーゼXまたはそれらの変異体およびデスオキシ-ヌクレオチド-三リン酸塩(D-dNTP's)なしでも温置した。典型的な6μLアッセイは、50nM基質複合体、1.3ng/μL以下の全-L-ポリメラーゼXまたはそれらの変異体、8μMの各D-dNTPおよび緩衝液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、4%グリセロール、0.1mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)、pH 7.5)を含有した。Rovalab(Teltow, Germany)からD-dNTPを購入した。典型的な温置時間は、37で30分間であった。アッセイ体積全体を試料緩衝液/色素と混合し、変性配列決定ゲル上に載せ、4時間分離した。このゲルをKodak Kスクリーンに-80で一晩曝露し、BioRad FXホスホイメージヤーシステムを用いて読み取った。

40

【0181】

全-L-ポリメラーゼXおよび変異体(C86Sを除く。)はこれらの条件下で活性があり、2本の上鎖(upper strand)DNAオリゴヌクレオチド間の6ヌクレオチドギャップが充填された。

【0182】

実施例3-D-アミノ酸からなるポリメラーゼPolXの変異体の合成

【0183】

本実施例内で、全-DポリメラーゼX変異体V80Aの合成を記載する。全-DポリメラーゼX変異体V80Aのアミノ酸配列は、Ac-MLTLIQGKKIVNHLSR

50

L A F E Y N G Q L I K I L S K N I V A V G S L R R E E K M L N D V D L L I I V P
E K K L L K H V L P N I R I K G L S F S V K A C G E R K C V L F I E W E K K T Y
Q L D L F T A L A E E K P Y A I F H F T G P V S Y L I R I R A A L K K K N Y K L
N Q Y G L F K N Q T L V P L K I T T E K E L I K E L G F T Y R I P K K R L - O H
であった。

【0184】

固相ペプチド合成 Fmoc / tBu - ストラテジーの必須要件に従い (Eric Athertonら、1981) 使用する全アミノ酸を保護する。使用される全アミノ酸がD - アミノ酸である (Bachem, Bubendorf, Switzerland)。

【0185】

3.1 HO - Gp (Boc) ₂ の合成

Sekizakiら (Sekizakiら、1996) と同様に、tert - プチルオキシカルボニル - 保護 4 - グアニジノフェノールを合成した。これに従い、40 mmole N,N' - Bis - (tert - プチルオキシカルボニル) - S - メチルイソチオウレア (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland) および 60 mmole 4 - アミノフェノール (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland) を 500 mL 丸底フラスコ中、250 mL THF 中で溶解させた。この後、溶液にアルゴンを 10 分間吹き付け、CaCl₂ チューブで密封しながら 120 時間攪拌し続けた。

【0186】

溶媒を蒸発させた後、氷冷メタノールを用いて残渣を沈殿させた。P₄O₁₀ 上で沈殿物を真空下で乾燥させた。最後に、DCMとともにフラッシュクロマトグラフィーを用いて生成物を精製した。生成物含有分画を合わせ、溶媒を減圧下で蒸発させた。TLC、逆相HPLC、質量分析およびNMRを分析のために使用した。実験により決定された質量は、351 Da の計算質量に対応する。

【0187】

3.2 H - D - Leu - OGp (Boc) ₂ の合成

1 mmole Z - D - Leu - OH (Bachem, Bubendorf, Switzerland)、0.9 eq. TBTU および 0.9 eq. HO - Gp (Boc) ₂ を 10 mL DMF 中で溶解させた。2 eq. DIPEA の添加後、溶液を 2 時間攪拌した。溶媒を蒸発させた後、DCM を用いて粗生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した。Z - D - Leu - OGp (Boc) ₂ の純粋な分画を合わせ、溶媒を蒸発させた。

【0188】

Z - D - Leu - OGp (Boc) ₂ を 10 mL MeOH 中で溶解させ、アルゴンを吹き付けた。2 時間で、Pd / C触媒およびH₂ の添加によって、N末端 Z - 基の加水分解性切断を達成した。H - D - Leu - OGp (Boc) ₂ をろ別した後、MeOH を減圧下で蒸発させた。逆相HPLC および質量分析を用いて分析を行った。生成物に対する 465 Da の正確な質量が見いだされ、計算質量と対応した。

【0189】

3.3 全 - D - ペプチド AcMLTLIQGKKIVNHLSRSLA F E Y N G Q L I K I L S K N I V A V G S L - OGp (1) の合成

Barlosら (Barlosら、1989) により記載のよう、0.10 mmole TentaGel - R - Trinity レジン (Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland) を Fmoc - D - Ser (tBu) - OH (Bachem, Bubendorf, Switzerland) とともに載せた。したがって、0.10 mmole レジンを 0.6 mmole 塩化チオニルとともに、30 分間、2 回温置し、その後 DCM で洗浄した。この後、6 mL DCM 中で、0.6 mmole Fmoc - D - Ser (tBu) - OH、2.4 mmole DIPEA とともに 90 分間レジンを温置した。その後、DCM 中の 10% MeOH (v/v)、10% DIPEA (v/v)

10

20

30

40

50

) の溶液を用いて、レジンを 10 分間、3 回プロッキング処理し、DCM で洗浄した。FASTmoc プロトコールとともに ABI 433 (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて、自動化合成を行った。NMP 中 9 eq. HATU および 20 eq. DIPEA を用いて 10 eq. アミノ酸を活性化した。カッティング時間は 45 分間であり、NMP 中 20 % (v/v) ピペリジン (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland) を用いて Fmoc-脱保護化を 7 分間、3 回行った。

【0190】

2 時間にわたり、10 mL の DCM 中 30 % (v/v) HFIP 中でペプチジルレジンを 2 回温置することによって、完全保護化ペプチド酸の切断を達成した。ペプチドをろ別した後、溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させた。沈殿ペプチドを単離し、乾燥させた。

【0191】

6 mL NMP 中で、0.01 mmole 完全保護化ペプチド、4 eq. PyBOP および 5 eq. H-D-Leu-OGp (Boc)₂ を溶解させた。10 eq. DIPEA の添加後、混合物を 4 時間攪拌した。この後、溶媒を還元気化 (reduced evaporated) させ、氷冷ジエチルエーテルによって残渣を沈殿させた。沈殿ペプチドエステルを乾燥させ、その後、2 時間にわたり、TFA 中、2.5 % EDT、2.5 % 水、2.5 % TIS を用いて保護基を切り離した。TFA の蒸発後、氷冷ジエチルエーテルを用いてペプチドを沈殿させた。ACN / 水勾配を用いて、C18 カラム (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) 上でペプチドエステルの逆相 HPLC 精製を行った。生成物を含有する分画を合わせ、凍結乾燥させた。

【0192】

HPLC / UPLC (図 2A) および質量分析 (図 2B) によって最終生成物の特徴を調べた。4654, 7 Da の生成物に対する測定質量は、4652, 7 Da の理論質量と一致した。

【0193】

3.4 全 - D - ペプチド H - R R E E K L N D V D L L I I V P E K K L L K H V L P N I R I K G L S F S V K A - S Me (2) の合成

6 mL NMP 中で 45 分間にわたり、5 eq. アミノ酸、eq. 4.9 eq. HATU および 10 eq. DIPEA を用いて、Fmoc-D-Ala-OH を 0.10 mmole TentaGel-R-NH₂ レジン (Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland) に充填した。その後に、レジンを THF で洗浄した。80 で 2 時間、THF 中の 4 eq. Lawesson 試薬と温置することによって、Fmoc-D-Ala-[CS-NH]-R-TentaGel への変換を達成した。この後、レジンを NMP で洗浄した。その後、既に記載のとおり (実施例 1.3 参照)、そのように調製したレジンを自動化ペプチド合成において使用した。この後、Sharma (Sharma, 2011) に従い、DMF 中ヨウ化メチルと一晩温置することによって、対応するチオエステルを生成させた。レジンのろ過後、ペプチドチオエステルを含有する溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させた。TFA 中 2.5 % EDT、2.5 % 水、2.5 % TIS を用いて 2 時間にわたり、側鎖保護基の切断を行った。TFA の蒸発後、氷冷ジエチルエーテルでペプチドを沈殿させた。ACN / 水勾配を用いて、C18 カラム (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) 上でペプチドチオエステルの逆相 HPLC 精製を行った。生成物を含有する分画を合わせ、凍結乾燥させた。

【0194】

HPLC / UPLC (図 3A) および質量分析 (図 3B) によって最終生成物の特徴を調べた。生成物に対して実験により決定された質量 (4683, 8 Da) は、4681, 7 Da の理論値と一致する。

【0195】

10

20

30

40

50

3.5 全-D-ペプチドH-C G E R K C V L F I E W E K K T Y Q L D L F T A L
A E E K P Y A I F H F T G P V S Y L I R I R A A L K K K N Y K L N Q Y G L F K N
Q T L V P L K I T T E K E L I K E L G F T Y R I P K K R L - O H (3)の合成

DCM中6eq. アミノ酸、6eq. MSNTおよび4.5eq. MeImを用いて、0.10mmole Tentagel-R-PHBレジン(Rapp Polymer, Tübingen, Deutschland)にFmoc-D-Leu-OHを充填した。FASTmocプロトコールとともにABI433を用いて自動化合成を行った。NMP中9eq. HATUおよび20eq. DIPEAを用いて10eq. アミノ酸を活性化した。カップリング時間は45分間であり、NMP中20%(v/v)ピペリジンを用いて7分間にわたりFmoc-脱保護化を3回行った。42アミノ酸後、二重カップリング段階を行った。TFA中2.5%EDT、2.5%水、2.5%TISを用いて2時間にわたり、N末端Fmoc-保護化ペプチドの切断を達成した。TFAの蒸発後、氷冷ジエチルエーテルによりペプチドを沈殿させた。C18カラム上でACN/水勾配を用いて、粗製N末端保護化ペプチドの逆相HPLC精製を行った。生成物含有分画を合わせ、凍結乾燥させた。その後、Fmoc-保護化ペプチドを溶解させ、N末端Fmoc-基を切り離すために、DMF中20%ピペリン中で搅拌した。20分後、溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させた。その後に、ACN/水勾配とともにC18カラムにより逆相HPLCを用いて、沈殿粗製ペプチドを精製した。生成物含有分画を合わせ、凍結乾燥させた。

【0196】

HPLC/UPLC(図4A)および質量分析(図4B)によって最終生成物の特徴を調べた。生成物の決定質量(11184, 3Da)は、11178, 2Daの理論質量と一致する。

【0197】

3.6 ペプチド2とのペプチド1のプロテアーゼ触媒ライゲーションによる、全-D-ペプチドAc-MLTLIQGKKIVNHLRSRLA FEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe(4)の合成

2%Triton X100(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schneidorf, Germany)を含有するリン酸ナトリウム緩衝液(100mM、pH8.5、100mM NaCl入り)中で、ペプチド1を0.2mMに、ペプチド2を0.6mMに溶解させた。20μMクロストリパイン(Endoprotease Arg-C, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, N.J., USA)の添加後、反応混合物を37℃で一晩振盪した。沈殿ペプチドを遠心し、H₂O/ACN/ギ酸60/40/0.5中で溶解させ、30分内の30%から60%の水中ACNの勾配でRP-18カラム(Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)を用いて、逆相HPLCによって精製した。生成物含有分画を合わせ、凍結乾燥させた。

【0198】

逆相UPLC(図5A)およびESI-質量分析(図5B)によって最終ペプチドを分析した。理論分子量(M_{theor}=9199.3Da)は、実測分子量(M_{obs}=9199.4Da)と一致する。

【0199】

3.7 ペプチド3とのペプチド4のネイティブ化学ライゲーションによる全-DポリメラーゼX変異体V80Aの合成

【0200】

6MグアニジンHCl(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schneidorf, Germany)、200mMメルカプトフェニル-酢酸(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schneidorf, Germany)および5mm Tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(Sigma

10

20

30

40

50

Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Germany)を含有するTRIS-緩衝液(pH 8.6)中でペプチド3および4の両方を0.2M溶解させた。反応混合物を室温で72時間振盪した。その後、30分内で30%から60%の水中ACNの勾配でRP-8-カラム(Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)を用いて、逆相HPLCによって混合物を精製した。ライゲーション生成物を含有した分画をプールし、乾燥させた。乾燥粉末を水中で溶解させ、溶出液としてのリン酸ナトリウム緩衝液(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Germany)(50mM, pH 6.8, 0.5% SDS)とともにSEC3000-カラム(Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。生成物含有分画を合わせ、凍結乾燥させた。 10

【0201】

最終生成物をSDS-PAGE(図6A)およびESI-質量分析(図6B)により分析した。レーン7で14.4kDaと21.5kDaとの間で明確なバンドが見られ、このことから、純粋な全長ポリメラーゼが示唆された。理論分子量($M_{theor} = 20342\text{Da}$)は、ESI-MSにより示されるような実測分子量($M_{obs} = 20361\text{Da}$)と一致する。

【0202】

実施例4-D-アミノ酸からなる合成ポリメラーゼX変異体の活性確認

6Mグアニジウム塩酸塩中で実施例3による乾燥全-DポリメラーゼX変異体V80Aを溶解させ、3,500分子量カットオフの市販の透析装置(Pierce/PerBio, Bonn, Germany)中での段階的な透析によって4で再折り畳みを行った。最終緩衝液は、50mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH 7.5であった。プレキャストゲル(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)上で標準的な一連の既知のタンパク質濃度を用いてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を行い、続いてSYPRO-RED染色(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)およびBiorad FXスキャナー機器上での密度バンド分析を行うことによってタンパク質濃度を推定した。

【0203】

2種類の異なる基質タイプを用いて、全-DポリメラーゼX変異体V80Aに対する活性アッセイを行った。

【0204】

4.1.1-スクレオチドギャップがある基質における活性アッセイ

33マー下鎖(lower strand)DNAオリゴスクレオチドを2本の17マー上鎖(upper strand)DNAオリゴスクレオチドとアニーリングさせ、その結果、上鎖(upper strand)で1スクレオチドギャップを生じさせることによって、基質を作製した。L-立体配置でオリゴスクレオチドを合成した。アニーリング前に、Gamma-³²P-アデノシン-三リン酸(Gamma-³²P-ATP)およびT4ポリスクレオチドキナーゼを用いた標準的キナーゼ反応によって、³²Pにより17マーの上鎖(upper strand)オリゴスクレオチドMJ_1_58_MDをその5'-末端で放射性標識した。L-オリゴスクレオチドMJ_1_58_MDのキナーゼ反応を促進するために、オリゴスクレオチド合成中に、2つのD-立体配置グアノシン塩基を5'末端に付加した。65で10分間加熱し、ゆっくりと冷却することによって、10mM Tris-HCl、5mM MgCl₂、pH 8.0中でアニーリングを行った。NAP-カラム(GE healthcare, Freiburg, Germany)上での精製によって、組み込まれなかったgamma-³²P-ATPを除去した。この複合体は、ギャップ内の鋳型位置でA、C、GまたはTの何れかを含有した。基質複合体の仕組みについては、図7参照。

【0205】

10

20

30

40

50

活性アッセイにおいて、合成全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A を L - 立体配置 1 - ギャップ基質複合体と合わせた。陰性対照として、各基質を全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A および L - デスオキシ - ヌクレオチド - 三リン酸 (d N T P ' s) なしでも温置した。1 - ギャップ複合体内の錆型塩基に依存して、アッセイ中に対応する L - d N T P のみが付加された。典型的な 6 μ L アッセイは、50 nM 基質複合体、1.7 ng / μ L 全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A 、8 μ M の 1 つの L - d N T P および緩衝液 (50 mM Tris - HCl 、10 mM MgCl₂ 、4 % グリセロール、0.1 mg / mL ウシ血清アルブミン (BSA) 、pH 7.5) を含有した。L - d N T P を R as ayan, Inc. (Encinitas, CA, USA) によるカスタム合成として購入した。温置時間は 37 で 30 分間であった。アッセイ体積全体を試料緩衝液 / 色素と混合し、変性配列決定ゲル上に載せ、4 時間分離した。ゲルを -80 で一晩 Kodak Kスクリーンに曝露し、BioRad FX ホスホイメージングシステムを用いて読み取った。

【 0206 】

図 8 から見られ得るように、全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A により、L - DNA 1 - ギャップ基質上で伸長生成物がもたらされ、したがって、合成タンパク質の活性を確認した。特筆すべきことに、L - 基質および L - d N T P と組み合わせた全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A のみが何らかの伸長生成物をもたらした。また、それらの錆型塩基に対応する L - d N T P を含有する試料のみが伸長生成物をもたらした。これは、A - 複合体上で d TTP ヌクレオチド、C - 複合体での d GTP ヌクレオチド、G - 複合体での d CTP ヌクレオチドおよび T - 複合体での d ATP ヌクレオチドが何らかの伸長生成物を与えるために存在しなければならなかつたことを意味する。

【 0207 】

4.2.6 - ヌクレオチドギャップがある基質における活性アッセイ
33 マー下鎖 (lower strand) DNA オリゴヌクレオチドを 2 つの 17 マーおよび 12 - マー上鎖 (upper strand) DNA オリゴヌクレオチドとアニーリングさせ、その結果上鎖 (upper strand) において 6 ヌクレオチドのギャップを生じさせることによって、基質を作製した。L - 立体配置でオリゴヌクレオチドを合成した。アニーリング前に、Gamma - ³²P - アデノシン - 三リン酸 (ATP) および T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いた標準的なキナーゼ反応によって、17 マー上鎖 (upper strand) オリゴヌクレオチド MJ_1_58_MD (L - 立体配置) をその 5' - 末端で ³²P により放射性標識した。L - オリゴヌクレオチド MJ_1_58_MD のキナーゼ反応を促進するために、オリゴヌクレオチド合成中に 2 つの D - 立体配置グアノシン塩基を 5' 末端に付加した。65 で 10 分間加熱し、ゆっくりと冷却することによって、10 mM Tris - HCl 、5 mM MgCl₂ 、pH 8.0 中で、アニーリングを行った。NAP - カラム (GE healthcare, Freiburg, Germany) 上での精製によって、組み込まれなかつた gamma - ³²P - ATP を除去した。基質複合体の仕組みについては、図 9 A を参照。

【 0208 】

活性アッセイにおいて、合成全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A を L - 立体配置 6 - ギャップ基質複合体と合わせた。陰性対照として、基質を全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A およびデスオキシ - ヌクレオチド - 三リン酸 (L - d N T P) なしでも温置した。典型的な 6 μ L アッセイは、50 nM 基質複合体、1.3 ng / μ L 以下の全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80 A 、8 μ M の各 L - d N T P および緩衝液 (50 mM Tris - HCl 、10 mM MgCl₂ 、4 % グリセロール、0.1 mg / mL ウシ血清アルブミン (BSA) 、pH 7.5) を含有した。R as ayan, Inc. (Encinitas, CA, USA) によるカスタム合成として L - d N T P を購入した。典型的な温置時間は 37 で 30 分間であったが、そのバッチの活性に依存して、より長時間、温置を行つた。アッセイ体積全体を試料緩衝液 / 色素と混合し、変性配列決定ゲル上に載せ、4 時間分離した。ゲルを -80 で一晩、Kodak Kスクリーンに曝露し、BioRad

F x ホスホイメージーシステムを用いて読み取った。

【0209】

図9 B から見られ得るように、合成全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80A により、L - D N A 6 - ギャップ基質上で N + 6 伸長生成物がもたらされ、したがって、合成タンパク質の活性を確認した。しかし、N + 6 伸長生成物の合成は、同じ 6 - ギャップ複合体での N + 1 伸長生成物よりも明確ではなかった。また、6 - ギャップを充填するために温置時間の延長が必要であった。特筆すべきことに、何らかの伸長生成物を与えたのは、L - 基質 + L - d N T P と合わせた全 - D ポリメラーゼ X 変異体 V 80A のみであった。

【0210】

実施例 5 - ポリメラーゼ X およびポリメラーゼ X の変異体による D N A 合成

10

アフリカブタ熱ウイルス（略称 A S F V ）からのポリメラーゼ X は、ギャップ修復機能がある非常に離散性の高い酵素として文献（ O l i v e r o s , 1 9 9 7 ）に記載されている。実施例 2 で示されるように、全 - L - ポリメラーゼ X およびそれらの変異体は、ギャップのある基質上でのそれぞれの開始後、非常に僅かなヌクレオチドのみの組み込みを触媒することが示された。ここで、発明者らは、全 - L - ポリメラーゼ X および変異体を用いてより長い D N A を合成することを可能にする方法を開示し、83マー鎖の完全な重合化を示す。

【0211】

5.1 プライマー - 鑄型基質

全 - L - ポリメラーゼ X およびそれらの変異体の活性を試験するために、プライマー - 鑄型複合体を使用した。全 - L - ポリメラーゼ X の変異体 V 80G および V 80A を試験するためにも同じ複合体を使用した。

20

【0212】

gap のないプライマー - 鑄型複合体に対する D - オリゴヌクレオチドのリスト：

【表5】

名称	長さ、nt	立体配置	配列 (5' → 3')
MJ_1_33_DD	19	D	Atto532-GGAGCTCAGACTGGCACGC
MJ_1_1_DD	83	D	GTGGAACCGACAACCTTGTGCTGCGTCCAGCATAAGAAAGGAGCTCCC TCAGAAGAAGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC

30

【0213】

19 個のヌクレオチドからなる D N A オリゴヌクレオチドと 83 個のヌクレオチドからなる 鑄型鎖 D N A オリゴヌクレオチド (M J _ 1 _ 1 _ D D) をアニーリングさせることによって、基質を作製した。 N O X X O N でオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチド M J _ 1 _ 3 3 _ D D は、蛍光色素 A t t o - 5 3 2 (A t t o T e c , S i e g e n , G e r m a n y) を有する。 65 ° で 10 分間加熱し、ゆっくりと冷却することによって、 1 0 m M T r i s - H C l 、 5 m M M g C l 2 、 p H 8 . 0 中でアニーリングを行った。プライマー - 鑄型複合体を図 10A で示す。

【0214】

5.2 一定温度での反応

40

活性アッセイにおいて、全 - L - ポリメラーゼ X または全 - L - ポリメラーゼ X の変異体 V 80G または V 80A を D - 立体配置プライマー - 鑄型複合体と合わせた。典型的な 6 μ L アッセイは、 5 0 n M 基質複合体、 1 . 3 n g / μ L 以下の全 - L - ポリメラーゼ X または全 - L - ポリメラーゼ X の変異体 V 80G もしくは V 80A 、 8 μ M の各 D - d N T P および緩衝液 (5 0 m M T r i s - H C l 、 1 0 m M M g C l 2 、 4 % グリセロール、 0 . 1 m g / m L ウシ血清アルブミン (B S A) 、 p H 7 . 5) を含有した。 R o v a l a b (T e l t o w , G e r m a n y) から D - d N T P を購入した。 P o l - X 試料に対して、温置時間は 37 ° で 30 分間であった。陰性対照として、基質を全 - L - ポリメラーゼ X または全 - L - ポリメラーゼ X の変異体 V 80G もしくは V 80A なし、およびデスオキシ - ヌクレオチド - 三リン酸 (D - d N T P) なしでも温置した。製造

50

者により供給された T a q 緩衝液中 0 . 0 8 3 U / μ L の最終濃度で T a q ポリメラーゼ (I n v i t r o g e n , K a r l s r u h e , G e r m a n y) を用いて陽性対照を遂行した。 T a q 試料を 6 0 で 3 0 分間温置した。アッセイ体積全体を試料緩衝液 / 色素と混合し、変性ゲル上で分離した。ゲルを B i o R a d F x ホスホイメージヤーシステムを用いて読み取った。

【 0 2 1 5 】

全 - L - ポリメラーゼ X または変異体 V 8 0 G または V 8 0 A 全 - L - ポリメラーゼ X は、活性があったが、全長 8 3 マー 鑄型の重合化を完遂することはできなかった。 T a q ポリメラーゼ陽性対照は、 8 3 マー 鑄型の完全な重合化を示し、図 1 0 B を参照のこと。

【 0 2 1 6 】

5 . 3 温度サイクリング条件下での反応

開始後の全 - L - ポリメラーゼ X が僅か 1 個のスクレオチドの組み込みを触媒し、次いで D N A 基質上に留まりながら停止するという仮定のもと、発明者らは、全 - L - ポリメラーゼ X が 鑄型から解離し、 鑄型に再会合できるように、加熱パルス (5 0 、 2 分間) を繰り返し行った。この温度サイクリング手順を繰り返して、発明者らは、全 - L - ポリメラーゼ X を用いて、 8 3 マー の完全な重合化を行うことができた。全 - L - ポリメラーゼ X 試料に対する温度プロファイルを次のように行なったことを除き、一定温度に対して上に記載のように反応および対照を設定した：

5 から 2 5 サイクルの (2 0 で 3 0 分間 / / 5 0 で 2 分間)

次いで 2 0 で 3 0 分間の最終段階。

【 0 2 1 7 】

1 5 サイクルを超えてから、全 - L - ポリメラーゼ X は、陽性対照と同様に、全長 8 3 マー 鑄型鎖を重合化することができたことが観察されたが、図 1 0 C を参照のこと。

【 0 2 1 8 】

実施例 6 - D - アミノ酸からなる合成ポリメラーゼ X 変異体を用いたプライマー伸長 この実施例で開示される方法は、全 - D 立体配置ポリメラーゼを試験するために L - 立体配置基質を使用する。

【 0 2 1 9 】

6 . 1 プライマー - 鑄型基質

ギャップのないプライマー - 鑄型複合体に対する L - オリゴスクレオチドのリスト：

【表 6 】

名称	長さ、 nt	立体配置	配列 (5' → 3')
MJ_1_109_MD	21	最初の 2 個 = D 、その他の L	D(GG)-L(GGAGCTCAGACTGGCACGC)
MJ_1_105_LD	83	L	GTGGAACCGACAACCTTGTGCTGCGTCCAGCATAAGAAAGGAGCTCCC TCAGAAGAAGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC

【 0 2 2 0 】

1 9 マー 上鎖 (u p p e r s t r a n d) D N A オリゴスクレオチドと 8 3 マー 下鎖 (l o w e r s t r a n d) D N A オリゴスクレオチドをアニーリングすることによって基質を作製する。 L - 立体配置で、社内施設の N O X X O N でオリゴスクレオチドを合成する。アニーリング前に、 G a m m a - 32 P - アデノシン - 三リン酸 (A T P) および T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いた標準的なキナーゼ反応によって、 2 1 マー 上鎖 (u p p e r s t r a n d) オリゴスクレオチド M J _ 1 _ 1 0 9 _ M D をその 5 ' - 末端で 32 P により放射性標識する。 L - オリゴスクレオチド M J _ 1 _ 1 0 9 _ M D のキナーゼ反応を促進するために、オリゴスクレオチド合成中、 2 個の D - 立体配置グアノシン塩基を 5 ' 末端に付加する。 6 5 で 1 0 分間加熱し、ゆっくりと冷却することによって、 1 0 mM T r i s - H C l 、 5 mM M g C l ₂ 、 p H 8 . 0 中でアニーリングを行う。 N A P - カラム (G E h e a l t h c a r e , F r e i b u r g , G e r m a n y) での精製によって、組み込まれない G a m m a - 32 P - A T P を除去する。

10

20

30

40

50

【0221】

6.2 一定温度での反応

活性アッセイにおいて、合成全-DポリメラーゼX変異体V80AをL-立体配置プライマー-鑄型複合体と合わせる。典型的な6μLアッセイは、50nM基質複合体、1.3ng/μL以下の全-DポリメラーゼX変異体、8μMの各L-dNTPおよび緩衝液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、4%グリセロール、0.1mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)、pH 7.5)を含有する。L-dNTPをRasayan, Inc. (Encinitas, CA, USA)から購入した。温置時間は37で少なくとも30分間である。陰性対照として、基質をまた、ポリメラーゼなし、およびデスオキシ-ヌクレオチド-三リン酸(L-dNTP)なしでも温置する。アッセイ体積全体を試料緩衝液/色素と混合し、変性ゲル上で分離する。ゲルはBioRad Fxホスホイメージャーシステムを用いて読み取る。

【0222】

全-LポリメラーゼXの場合と同じように、合成全-DポリメラーゼX変異体V80Aは、この状態で活性があるが、全83個のヌクレオチド鑄型鎖を重合化できない。

【0223】

6.3 温度サイクリング条件下での反応

実施例5と同様に、全-DポリメラーゼX変異体V80Aによる83マーL-基質の全長全重合化を可能にするために温度サイクリング手順を繰り返す。温度プロファイルを次のように行ったことを除き、一定温度に対して上で記載されるように反応および対照を設定する：

5から25サイクルの(20で30分間//50で2分間)

次いで20で30分間の最終段階。

【0224】

温度サイクル伸長を用いる場合、全-LポリメラーゼXの場合と同じように、全-DポリメラーゼX変異体V80Aが全83マー鑄型鎖を重合化できることが観察される。

【0225】

実施例7-ポリメラーゼDpo4および全てL-アミノ酸からなるポリメラーゼDpo4の変異体の組み換え発現および精製

ポリメラーゼDpo4は元来、スルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)(略称Sso)(Boudsocq, 2001)で発見された。この野生型遺伝子は、開始コドンおよび終止コドンを含む1,059塩基対のオープンリーディングフレーム(略称ORF)を有する。コードされるタンパク質の長さは、352アミノ酸である。この例は、ポリメラーゼDpo4およびポリメラーゼDpo4の変異体がどのようにE.コリ(E. coli)において発現されて、Strep-Tagを用いて精製されたかを説明する。

【0226】

7.1 発現コンストラクト

Ssoのコドン使用はE.コリ(E. coli)とは異なるので、野生型SsoポリメラーゼDpo4に対するE.コリ(E. coli)-コドン最適化合成遺伝子をGeneArt AG(Regensburg, Germany)から購入した。合成遺伝子配列は、pENTRY-IBA10ベクター(元の会社:IBA GmbH, Göttingen, Germany)において提供された。開始コドンを含むが終止コドンを含まないコドン最適化オープンリーディングフレームは、次の配列を有した: ATGATTG TGCTGTTGGATTGGATTATTTTATGCCAGGTGGAAAGAGTTCTGAATCCGAGCCTGAAAGGTAAACCGGTTGTTGT TTGTTGTTAGCGGTCGCTTGAAGATAAGCGGTGCAAGTTGCAACCGCCAATTATGAAGGCCAAAAAAATTCTGCCGAA CGGGTATTCCGATTGTTGAAGGCCAAAAAAATTCTGCCGAA TGCAGTTATCTGCCGATGCGCAAAGAAGTTATCAGCAG

10

20

30

40

50

GTTAGCAGCCGTATTATGAATCTGCTGCGCGAATATAAGCG
 AAAAATGAAATTGCCAGCATTGATGAAGCCTATCTGGA
 TATTAGCGATAAAGTGCAGCGATTATCGCGAAGCATAAAT
 CTGGGCCTGGAAATTAAAAATAAAATCCTGGAAAAAGAAA
 AAATTACCGTGACCGTGGGCATTAGCAAAAATAAAGTGT
 TGCCAAAATTGCAGCAGATATGGCAAAACCGAATGGCATT
 AAAGTGATTGATGATGAAGAAGTGAACACGTCTGATTGCG
 AACTGGATATTGCAGATGTTCCGGTATTGGCAATATTAC
 CGCAGAAAAACTGAAAAACTGGCATTAAATAAACTGGTT
 GATACCCCTGAGCATTGAAATTGATAAAACTGAAAGGCATGA 10
 TTGGTGAAGCGAAAGCCAATATCTGATTAGCCTGGCAGC
 TGATGAATATAATGAACCGATTGTCACCCGTGTTGTA
 AGCATTGGTCGTATTGTGACCATGAAACGCAATAGCCGTA
 ATCTGGAAGAAATTAAACCGTACCTGTTGTCGCAATTGA
 AGAAAGCTATTATAAACTGGATAAACGCATTCCGAAAGCC
 ATTTCATGTTGTCAGTTACCGAAGAGATCTGGATATTGTTA
 GCCGTTGGTCGTACCTTCCGCATGGTATTAGCAAAAGAAC
 CGCCTATAGCGAAAGCGTTAAACTGCTGCAAGAAAATCCTG
 GAAGAAGATGAACGTAAAATTGTCGTATTGGTGTGCGCT
 TTAGCAAATTATTGAAGCCATTGGCCTGGATAAAATTTT 20
 TGATACC。

【0227】

全 - L - ポリメラーゼD p o 4 とも呼ばれるポリメラーゼD p o 4 に対する発現コンストラクトを得るために、市販のStarGateクローニングキット(I B A G m b H)を用いて、p ENTRY - I B A 1 0 からp A S G - I B A 5ベクター(I B A G m b H , G o t t i n g e n , G e r m a n y)に遺伝子をサブクローニングした。サブクローニングによって、Strep - Tag IIがN - 末端に付加され、終止コドンがC - 末端に付加され、遺伝子がtetプロモーターの制御下となった。本コンストラクトをp M J 3 4 3と名付け、E . コリ(E . c o l i)での全 - L - ポリメラーゼD p o 4 の発現のために使用した。p M J 3 4 3から発現された全 - L - ポリメラーゼD p o 4 は、368個のアミノ酸の次の配列を有した：M A S A W S H P Q F E K S G M I V L F V D 30
 F D Y F Y A Q V E E V L N P S L K G K P V V V C V F S G R F E D S G A V A T A N
 Y E A R K F G V K A G I P I V E A K K I L P N A V Y L P M R K E V Y Q Q V S S R
 I M N L L R E Y S E K I E I A S I D E A Y L D I S D K V R D Y R E A Y N L G L E
 I K N K I L E K E K I T V T V G I S K N K V F A K I A A D M A K P N G I K V I D
 D E E V K R L I R E L D I A D V P G I G N I T A E K L K K L G I N K L V D T L S
 I E F D K L K G M I G E A K A K Y L I S L A R D E Y N E P I R T R V R K S I G R 40
 I V T M K R N S R N L E E I K P Y L F R A I E E S Y Y K L D K R I P K A I H V V
 A V T E D L D I V S R G R T F P H G I S K E T A Y S E S V K L L Q K I L E E D E
 R K I R R I G V R F S K F I E A I G L D K F F D T G S 。

【0228】

最初の14個のアミノ酸は、数個のスペーサーアミノ酸を含むStrep - Tag IIに相当し、最後の2個のアミノ酸はスペーサーアミノ酸に相当し、中間部の352個のアミノ酸部分は、Ssoで見られるポリメラーゼD p o 4 配列と同一であった。

【0229】

製造者のプロトコールにしたがって、市販のQuikChangeキット(Stratagene G m b H , W a l d b r o n n , G e r m a n y)を用いて、全 - L - ポリメラーゼD p o 4 の変異体に対する発現コンストラクトを作製した。プラスミドp M J 3 4 3を鑄型とした。QuikChangeに必要なオリゴヌクレオチドは、N O X X O N で合成したか(Q C _ 3 8 _ u p 、 Q C _ 3 8 _ l o w 、 Q C _ 3 9 _ u p 、 Q C _ 3 9 50

— low、QC_40_up、QC_40_low) または Purimedex から購入した (Grebenstein, Germany) (QC_28_up、QC_28_low、QC_29_up、QC_29_low、QC_30_up、QC_30_low)。

【0230】

次の変異体発現コンストラクトを作製し、E.コリ (E. coli) での全-L-ポリメラーゼDpo4の変異体の発現のために使用した。

【表7】

変異体	コンストラクト	QuikChange 突然変異誘発手順に対して使用したオリゴヌクレオチド
A155C	pMJ361	QC_28_up. (5' CAAAAATAAAGTGGTGCCTAAATTGCATGCGATATGGCAAAACCG AATGGCATTAAAG 3') QC_28_low (5' CTTAATGCCATTGGTTGCATATCGCATGCAATTGGCAAA CACTTATTTTG 3')
V203C	pMJ362	QC_29_up (5' TGAAAAAAACTGGCATTAAATAACTGTGTGATACCTGAGCATTGAATTG 3') QC_29_low (5' CAAATTCAATGCTCAGGTATCACACAGTTATTAAATGCCAGTTTTCA 3')
C31S	pMJ363	QC_30_up (5' TGAAAGGTAAACCGGTTGTTCTGTTAGCGTC 3') QC_30_low (5' GACCGCTAAAAACAGAAACAACAAACCGGTTACCTTCA 3')
A155C + V203C	pMJ365	QC_28_up QC_28_low QC_29_up QC_29_low
S85C	pMJ502	QC_38_up (5' ATGCGCAAAGAAGTTATCAGCAGGTTGAGCCGTATTATGAATC 3') QC_38_low (5' GATTCATAATACGGCTACAAACCTGCTGATAAACTTCTTGCACAT-3')
S86C	pMJ503	QC_39_up (5' AAGTTTATCAGCAGGTTAGCTGTCGTATTATGAATCTGCTGCG 3') QC_39_low (5' CGCAGCAGATTCTATAATACGACAGCTAACCTGCTGATAAACTT 3')
S96C	pMJ504	QC_40_up (5' ATTATGAATCTGCTGCGCAATATTGTGAAAAATTGAAATTGCCAGCATT 3') QC_40_low (5' AATGCTGGCAATTCAATTTCACAATATTGGCGCAGCAGATTCTAAAT 3')

【0231】

7.2 E.コリ (E. coli) でのタンパク質発現

発現コンストラクト pMJ343 を用いて、E.コリ (E. coli) において全-L-ポリメラーゼDpo4を発現させた。pMJ361、pMJ362、pMJ363、pMJ365、pMJ502、pMJ503 または pMJ504 から、全-L-ポリメラーゼDpo4の突然変異の変異体を発現させた。発現のために、「Transformation and Storage Solution」(Epicentre/Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany) を用いて、E.コリ (E. coli) 株「NEB express」(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) において適切な発現コンストラクトを形質転換し、抗生素質アンピシリンを用いて維持した。誘導因子として 200 ng/mL アンヒドロテトラサイクリン (IBA GmbH, Göttingen, Ge

10

20

30

40

50

rmay) を用いて、培地「EnBase Flo」または「EnPresso」(BioSilta, Oulu, Finland) 中で 30 にて 48 時間、発現を行った。遠心によって細胞を回収し、-80 で保存するかまたはすぐに処理した。

【0232】

7.3 タンパク質精製

「緩衝液W」(100 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、1 mM EDTA) 中で新鮮または凍結 E. コリ (E. coli) 細胞を氷上で再懸濁し、「フレンチプレス」(G. Heinemann, Schwabisch Gmund, Germany) 細胞破壊装置を用いて溶解させた。5 mL StrepTrap HP カラム (GE healthcare, Freiburg, Germany) を備えた「AKTA express」システム上で 4 で精製を行った。2.5 mM デスチオビオチン (IBA GmbH, Göttingen, Germany) を含む緩衝液Wを用いて段階溶出を行った。SDS-PAGE (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) を用いて分画を分析し、プールし、必要に応じて、「Q HP」カラム (GE healthcare, Freiburg, Germany) を備えた「AKTA 精製装置」システム上で陰イオン-イオン交換クロマトグラフィーでさらに精製した。LC-MS 質量分析によってタンパク質同一性を確認し、的確な分画をプールし、濃縮し、10,000 分子量カットオフ (MWCO) の VivaSpin 15 R 濃縮装置 (VivaSciences/Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) を用いて再緩衝化した。100 mM KCl、10 mM Tris-HCl pH 7.4、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、50% グリセロールからなる緩衝液中で、精製タンパク質を -20 で保存した。SDS-PAGE 上でウシ血清アルブミン (略称 BSA) 標準物質を用い、SYPRO Red (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) で染色して、ゲル密度測定によって、タンパク質濃度を推定した。

【0233】

実施例 8 - 2 つの断片からなる合成ポリメラーゼ Dpo4 の產生

全 - L ポリメラーゼ Dpo4 の長さは 352 アミノ酸である。全 - L ポリメラーゼ Dpo4 を化学的に作製するため、固相ペプチド合成により合成され得るより短い断片から、このような合成全 - L ポリメラーゼ Dpo4 を組み立てなければならず、このより短い断片は、ネイティブ化学ライゲーションなどのペプチドライゲーション法によってライゲーションしなければならなかつた。この例は、合成全 - L - ポリメラーゼ Dpo4 を得るためにネイティブ化学ライゲーションによって、Dpo4 のライゲーション断片 1 - 154、155 - 352、155 - 202 および 203 - 352 が、E. コリ (E. coli) でどのように発現され、精製され、互いに対してもライゲーションされているかを説明する。

【0234】

8.1 発現コンストラクト

実施例 7 で開示されるように、市販ソースから合成遺伝子コンストラクトとして全 - L - ポリメラーゼ Dpo4 に対する遺伝子を得た (GeneArt, Regensburg, Germany)。そのコドン最適化配列に基づいてこの実施例の全ての断片をクローニングした。全 - L - ポリメラーゼ Dpo4 変異体 A155C の断片 1 - 154、155 - 352、155 - 202 および 203 - 352 に対する次の発現コンストラクトを作製した：

【表8】

Dpo4の断片(アミノ酸範囲)	発現コンストラクト
1-154-チオエステル	pMJ370
155-352 A155C 突然変異を含有	pMJ384
203-352 A155C 突然変異を含有	pMJ385
155-202 チオエステル	pMJ388

【0235】

10

8.1.1 全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片1-154-チオエステル-発現コンストラクトpMJ370

このコンストラクトは、全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片1-154、続いてMxe Gyr Aインテインを含有し、チオエステルおよびキチン-結合ドメイン(CBD)を生成させるためにこれを使用した。2つのPCR生成物からコンストラクトを組み立てた。全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片1-154を増幅するために鋳型としてのpMJ343およびプライマー-MJ_1_90_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTTCGATGATTGTCGTTGTTGGATT TT-3')およびMJ_1_91_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTTCGGCATGCAATTGGCAACACATT -3')を用いて、PCR生成物1を作製した。Mxe Gyr AインテインおよびCBDを増幅するために鋳型としてのpTWIN1(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)およびプライマー-MJ_1_72_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTTCGTGCATCACGGGAGAT-3')およびMJ_1_73_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTTCGCCCTTGAAGCTGCCACAA GGCAAGAACGTT-3')を用いて、PCR生成物2を作製した。プライマー-MJ_1_90_DDおよびMJ_1_91_DDは、Purimex(Grebenstein, Germany)由来であり、一方でプライマー-MJ_1_72_DDおよびMJ_1_73_DDは、IBA GmbH(Göttingen, Germany)由来であった。フラッシュゲル系(LONZA, Basel, Switzerland)上で2つのPCR生成物をゲル精製し、StarGate Mutagenesis ENTRYクローニングキット(IBA GmbH, Göttingen, Germany)を用いてpENTRY-IBA20において一緒にクローニングし、その結果、pMJ366が得られた。StarGate Transferクローニングキット(IBA GmbH, Göttingen, Germany)を用いたpASG-IBAw1t1(IBA GmbH, Göttingen, Germany)におけるpMJ366からのサブクローニングによって、pMJ370が得られた。コンストラクトpMJ370は、(インテイン切断/チオエステル産生後)154アミノ酸長の次のタンパク質配列とともに、全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片1-154-チオエステルをコードする: MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRF EDSGAVATANYEARFKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMR KEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-チオエステル。

20

【0236】

30

8.1.2 全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片155-352-発現コンストラクトpMJ384

40

このコンストラクトは、「Profinity exact」タグと、それに続く全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片155-352を含有する。「Profinity exact」タグを精製およびタンパク質分解性切断のために使用した。

50

2つのPCR生成物からコンストラクトを組み立てた。「Pro finity eXact」タグを増幅するために鋳型としてのpPAL7 (Bio-Rad, Munchen, Germany) およびプライマー-MJ_1_99_DD (5' - リン酸 - AGCGGCC
TCTTCGATGGGAGGGAAATCAAACGGGGAA - 3') およびMJ_1_100_DD (5' - リン酸 - AGCGGCTCTTCGGCACAAAGCTTT
GAAGAGCTTGTC - 3') を用いて、PCR生成物1を作製した。A155C突然変異を含有するdpo4断片155-352を増幅するために鋳型としてのpMJ36
1 およびプライマー-MJ_1_96_DD (5' - リン酸 - AGCGGCTCTTCGT
GCGATATGGCAAAACCGAATGGCATTAAA - 3') およびMJ_1_97_DD (5' - リン酸 - AGCGGCTCTTCGCCCTTAGGTATCAA
AAAATTATCCAGG - 3') を用いて、PCR生成物2を作製した。プライマー-MJ_1_96_DD、MJ_1_97_DD、MJ_1_99_DD およびMJ_1_100_DD は全て、Purimex (Grebenstein, Germany) 由来であった。フラッシュゲルシステム (LONZA, Basel, Switzerland) 上で2つのPCR生成物をゲル精製し、StarGate Mutagenesis ENTRYクローニングキット (IBA GmbH, Göttingen, Germany) を用いてpENTRY-IBA20と一緒にクローニングし、pMJ382が得られた。StarGate Transferクローニングキット (IBA GmbH, Göttingen, Germany) を用いたpASG-IBA5 (IBA GmbH, Göttingen, Germany) 中のpMJ382からのサブクローニングによって、pMJ384が得られた。コンストラクトpMJ384は、(タンパク質分解性切断後) 198アミノ酸長の次のタンパク質配列とともに突然変異A155Cを含有する全-L-ポリメラーゼDpo4の断片155-352をコードする : CDMAKPNGIKV
IDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGINKLVDT
LSIEFDKLKGMIKEAKAKYLIISLARDEYNEPIRTVRKSI
GRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEEESYYKLDKRIPKAIH
VVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEE
DERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFFDT。

【0237】

8.1.3 全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片203-352-発現コンストラクトpMJ385

このコンストラクトは、「Pro finity eXact」タグとそれに続く、突然変異V203Cを含有するdpo4断片203-352を含有する。「Pro finity eXact」タグを精製およびタンパク質分解性切断のために使用した。2つのPCR生成物からコンストラクトを組み立てた。「Pro finity eXact」タグを増幅するために鋳型としてのpPAL7 (Bio-Rad, Munchen, Germany) およびプライマー-MJ_1_99_DD (5' - リン酸 - AGCGGCTCTTC
GATGGGAGGGAAATCAAACGGGGAA - 3') およびMJ_1_100_DD (5' - リン酸 - AGCGGCTCTTCGGCACAAAGCTTTGAAGA
GCCTTGAGCATTGAATT - 3') を用いてPCR生成物1を作製した。V203C突然変異を含有するdpo4断片203-352を増幅するために鋳型としてのpMJ362 およびプライマー-MJ_1_98_DD (5' - リン酸 - AGCGGCTCTTCGTGATAC
CCCTGAGCATTGAATT - 3') およびMJ_1_97_DD (5' - リン酸 - AGCGGCTCTTCGCCCTTAGGTATCAAAAAATTATCCA
GG - 3') を用いてPCR生成物2を作製した。プライマー-MJ_1_97_DD、MJ_1_98_DD、MJ_1_99_DD およびMJ_1_100_DD は全てPurimex (Grebenstein, Germany) 由来であった。フラッシュゲルシステム (LONZA, Basel, Switzerland) 上で2つのPCR生成物をゲル精製し、StarGate Mutagenesis ENTRYクローニングキット (IBA GmbH, Göttingen, Germany) を用いてpENTRY- 50

IBA 20 中で一緒にクローニングし、その結果、pMJ383が得られた。StarGate Transferクローニングキット(IBA GmbH, Göttingen, Germany)を用いたpASG-IBA5(IBA GmbH, Göttingen, Germany)中のpMJ383からのサブクローニングによって、pMJ385が得られた。コンストラクトpMJ385は、(タンパク質分解性切断後)150アミノ酸長の次のタンパク質配列とともにdpo4断片203-352 V203Cをコードする: C D T L S I E F D K L K G M I G E A K A K Y L I S L A R D E Y N E P I R T R V R K S I G R I V T M K R N S R N L E E I K P Y L F R A I E E S Y Y K L D K R I P K A I H V V A V T E D L D I V S R G R T F P H G I S K E T A Y S E S V K L L Q K I L E E D E R K I R R I G V R F S K F I E A I G L D K F F D T.

10

【0238】

8.1.4. 全-L-ポリメラーゼDpo4の断片155-202-発現コンストラクトpMJ388

このコンストラクトは、dpo4断片155-202とそれに続く、チオエステルを生成させるために使用したMxe GyrAインテインおよびキチン-結合ドメイン(CBD)を含有する。2つのPCR生成物からコンストラクトを組み立てた。dpo4 155-202断片を増幅するために鋳型としてのpMJ343およびプライマーMJ_1_101_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTCGATGGCAGATATGGC AAAACCGAAT-3')およびMJ_1_102_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTCGTGCATCACGGGAGAT-3')およびMJ_1_72_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTCGTGCATCACGGGAGAT-3')およびMJ_1_73_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTCGGCCCTTGAAGCTGCCACAAGGCAGGAACGTT-3')を用いてPCR生成物1を構築した。Mxe GyrAインテインおよびCBDを増幅させるために鋳型としてのpTWIN1(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)およびプライマーMJ_1_72_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTCGTGCATCACGGGAGAT-3')およびMJ_1_73_DD(5'-リン酸-AGCGGCTCTCGGCCCTTGAAGCTGCCACAAGGCAGGAACGTT-3')を用いてPCR生成物2を作製した。プライマーMJ_1_101_DDおよびMJ_1_102_DDは、Purime x(Grebenstein, Germany)由来であり、一方、プライマーMJ_1_72_DDおよびMJ_1_73_DDはIBA GmbH(Göttingen, Germany)由来であった。フランシュゲルシステム(LONZA, Basel, Switzerland)上で2つのPCR生成物をゲル精製し、StarGate Mutagenesis ENTRYクローニングキット(IBA GmbH, Göttingen, Germany)を用いてpENTRY-IBA20中で一緒にクローニングし、その結果、pMJ386が得られた。StarGate Transferクローニングキット(IBA GmbH, Göttingen, Germany)を用いたpASG-IBAw1(IBA GmbH, Göttingen, Germany)中のpMJ386からのサブクローニングによって、pMJ388が得られた。コンストラクトpMJ388は、dpo4断片155-202とそれに続く(最初のメチオニンのE.コリ(E. coli)介在切断後およびインテイン切断/チオエステル产生後)48アミノ酸長のタンパク質配列をコードする: ADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELD IADVPGIGNITAEKLKKLGINKL-チオエステル。

20

30

40

【0239】

8.2 E.コリ(E. coli)におけるタンパク質発現

発現のために、「Transformation and Storage Solution」(Epicentre/Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany)を用いてE.コリ(E. coli)株「NEB EXPRESS」(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)中で適切な発現コンストラクトを形質転換し、抗生物質アンピシリンを用いて維持した。誘導因子として200ng/mLアンヒドロテトラサイクリン(IBA GmbH, Göttingen, Germany)を用いて、一晩、周囲温度で培地「E

50

n Base Flo」または「En Presso」(BioSilta, Oulu, Finland) 中で発現を行った。遠心によって細胞を回収し、-80°で保存するかまたはすぐに処理した。

【0240】

8.3 Mxe Gyr Aインテインを用いたコンストラクトpMJ370およびpMJ388からのチオエステルの精製および生成

「カラム緩衝液」(20 mM HEPES、pH 8.5、500 mM NaCl) 中で新鮮または凍結 E. コリ (E. coli) 細胞を氷上で再懸濁し、「フレンチプレス」(G. Heinemann, Schwabisch Gmund, Germany) 細胞破壊装置を用いて溶解させた。キチン結合ビーズを含有するカラム (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) を備えた「AKTA express」システム (GE healthcare, Freiburg, Germany) 上で4で精製を行った。細胞溶解液を適用し、ベースラインまでカラム緩衝液で洗浄した後、インテイン介在性タンパク質切断およびチオエステル形成を誘導するために、カラム緩衝液中の 50 mM 2-メルカプトエタンスルホネート(略称MESNA)とともにカラムを4で20時間温置した。チオエステルを担う切断タンパク質をカラム緩衝液でカラムから洗い流し、濃縮し、5 mM Bis-Tris、pH 6.5、250 mM NaCl からなる緩衝液中で Biogel P60 媒体材料 (BioRad, Munchen, Germany) を用いてゲルろ過に供した。SDS-PAGE 上でウシ血清アルブミン (BSA) 標準物質を用い、SYPRO Red (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) で染色して、ゲル密度測定によってタンパク質濃度を推定した。LC-MS 質量分析によって、タンパク質の正体およびチオエステルの存在を確認した。

【0241】

8.4 「Profinity exact」タグによるコンストラクトpMJ384からの精製およびタンパク質分解性切断

次のとおり、pMJ384からの全-L-ポリメラーゼDpo4変異体A155Cの断片155-352の精製を行った：「緩衝液W」(100 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、1 mM EDTA) 中で新鮮または凍結 E. コリ (E. coli) 細胞を氷上で再懸濁し、「フレンチプレス」(G. Heinemann, Schwabisch Gmund, Germany) 細胞破壊装置を用いて溶解させた。5 mL StrepTrap HP カラム (GE healthcare, Freiburg, Germany) を備えた「AKTA express」システム上で4で精製を行った。2.5 mM デスチオビオチン (IBA GmbH, Göttingen, Germany) を含む緩衝液Wを用いて段階溶出を行った。HiPrep 26/10 脱塩カラム (GE healthcare, Freiburg, Germany) を用いた「Profinity exact 溶出緩衝液」(0.1 M Na-リン酸、pH 7.2、0.1 M NaF) 中での緩衝液交換に、溶出タンパク質を供し、次いでゆっくりとProfinity exact カラムに注入した。試料を濃縮し、1 mM の最終濃度になるまで Tris (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) を供給し、5 mM Bis-Tris、pH 6.5、250 mM NaCl からなる緩衝液で展開される HiLoad 16/60 Superdex 75 調製グレードカラム (GE healthcare, Freiburg, Germany) を用いてゲルろ過に適用した。タンパク質を濃縮し、-80°で保存した。SDS-PAGE 上でウシ血清アルブミン (BSA) 標準物質を用い、SYPRO Red (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) で染色して、ゲル密度測定によってタンパク質濃度を推定した。LC-MS 質量分析によってタンパク質同一性を確認した。

【0242】

8.5 「Profinity exact」タグによるコンストラクトpMJ385からの精製およびタンパク質分解性切断

10

20

30

40

50

次のとおり p M J 3 8 5 からの d p o 4 断片 2 0 3 - 3 5 2 V 2 0 3 C の精製を行った：封入体を調製し、「i - F O L D タンパク質再折り畳み系」マニュアル (N o v a g e n / M e r c k - M i l l i p o r e , D a r m s t a d t , G e r m a n y) に記載のとおり変性させた。S e p h a d e x G - 2 5 微細物質 (G E h e a l t h c a r e , F r e i b u r g , G e r m a n y) を用いて、可溶化タンパク質を「緩衝液W」(1 0 0 mM T r i s - H C l 、p H 8 . 0 、1 5 0 mM N a C l 、1 mM E D T A) への緩衝液交換に供し、S t r e p T r a p H P カラム (G E h e a l t h c a r e , F r e i b u r g , G e r m a n y) を備えた「A K T A e x p r e s s」システム上で 4 で精製した。2 . 5 mM デスチオビオチン (I B A G m b H , G o t t i n g e n , G e r m a n y) を含む緩衝液Wで段階溶出を行った。0 . 1 M の最終濃度まで溶出タンパク質溶液に N a F を供給し、1 mM の最終濃度になるように T r i s (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) を供給し、次いで P r o f i n i t y e x a c t カラム中にゆっくりと注入した。脱イオン化水でフロースルーパンチを 1 : 3 希釈し、H C l を用いてp H を 7 . 2 に調整した。「緩衝液A」(5 0 mM N a - リン酸、p H 7 . 2 、1 mM 2 - メルカプトエタノール) 中で平衡化した H i T r a p S P H P カラム (G E h e a l t h c a r e , F r e i b u r g , G e r m a n y) を用いて陽イオン交換 - クロマトグラフィーによって試料をさらに精製した。1 7 % 、2 5 % および 1 0 0 % の「緩衝液B」(5 0 mM N a - リン酸、p H 7 . 2 、1 M N a C l 、1 mM 2 - メルカプトエタノール) を用いて段階溶出を行った。分画をプールし、濃縮し、脱イオン化水中で展開させる H i L o a d 1 6 / 6 0 S u p e r d e x 7 5 調製グレードカラム (G E h e a l t h c a r e , F r e i b u r g , G e r m a n y) を用いてゲルろ過に適用した。液体窒素中でタンパク質を瞬間凍結し、凍結乾燥させた。S D S - P A G E 上でのウシ血清アルブミン (B S A) 標準物質を用い、S Y P R O R e d (I n v i t r o g e n , K a r l s r u h e , G e r m a n y) で染色して、ゲル密度測定によってタンパク質濃度を推定した。L C - M S 質量分析によってタンパク質同一性を確認した。

【 0 2 4 3 】

8 . 6 断片 1 - 1 5 4 - チオエステルおよび 1 5 5 - 3 5 2 のネイティブ化学ライゲーションによる合成全 - L - ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C の合成

2 % T r i t o n X 1 0 0 、1 % チオフェノールおよび 5 mM T R I S (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩を含有する T R I S - 緩衝液 (p H 8 . 6) 中で全 - L - ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C の断片 1 - 1 5 4 - チオエステルおよび 1 5 5 - 3 5 2 を 5 0 μ M で溶解させた。反応混合物を室温により 7 2 時間振盪した。その後、ライゲーションの成功を S D S - P A G E (図 1 1 A) および L C - E S I - 質量分析 (R P 1 8 - カラム、2 0 分間の 0 . 1 % T F A 5 - 9 5 % の水中 0 . 1 % T F A による A C N 勾配、図 1 1 B) により分析した。4 1 k D a 前後でレーンにおいて明確なバンドが見出され、このことから、全長ポリメラーゼが示された。理論分子量 (M_{theor} = 4 0 2 2 3 D a) は、E S I - M S により示される場合の、実測分子量 (M_{obs} = 4 0 2 6 5 D a) と一致する。

【 0 2 4 4 】

8 . 7 断片 1 5 5 - 2 0 2 - チオエステルおよび 2 0 3 - 3 5 2 のネイティブ化学ライゲーションによる断片 1 5 5 - 3 5 2 の合成

2 % S D S 、1 % チオフェノールおよび 5 mM トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩を含有する T R I S - 緩衝液 (p H 8 . 6) 中で、全 - L - ポリメラーゼ D p o 4 の断片 1 5 5 - 2 0 2 - チオエステルおよび 2 0 3 - 3 5 2 V 2 0 3 C を 0 . 2 M で溶解させた。室温によって反応混合物を 7 2 時間振盪した。S D S - P A G E (図 2 0 A) および L C - E S I - 質量分析 (R P 1 8 - カラム、2 0 分間の 0 . 1 % T F A 5 - 9 5 % の水中 0 . 1 % T F A による A C N 勾配、図 2 0 B) によって、ライゲーションの成功の分析を行った。レーン 7 で 2 1 . 5 k D a 前後で明確なバンドが見出され、これによりライゲーション生成物が示された。理論分子量 (M_{theor} = 2 2 7 4 9 D a)

)は、E S I - M S によって示される場合の、実測分子量 (M_{obs} = 22769 Da) と一致する。

【0245】

実施例9 - ポリメラーゼD p o 4 およびL - アミノ酸からなるポリメラーゼD p o 4 の変異体の活性確認

この実施例は、全 - L - ポリメラーゼD p o 4 および実施例7による全 - L - ポリメラーゼD p o 4 の変異体に対する、および実施例8による合成全 - L - ポリメラーゼD p o 4 に対するP C R 活性試験を記載する。

【0246】

9.1 P C R 活性アッセイのための鑄型

P C R 反応のための鑄型は、83マー1本鎖D - D N A オリゴヌクレオチド (M J _ 1 _ 1 _ D D) であり、これにより第一の温度サイクルにおいて逆の鎖が生成する。その後、両鎖を指數関数的増幅のための鑄型とする。D - 立体配置で、N O X X O N において、鑄型D N A オリゴヌクレオチドおよびD N A プライマーを合成する。

【0247】

P C R 活性アッセイに対するオリゴヌクレオチドのリスト :

【表9】

名称	長さ、nt	配列(5' → 3')
MJ_1_1_DD	83	GTGGAACCGACAACTTGTGCTGCGTCCAGCATAAGAAAGGAGCTCCCTCA GAAGAAGCTGCGCAGCGTGCAGTCTGAGCTCC
DE4. 40T7	38	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCACGC
DE4. 40R	20	GTGGAACCGACAACTTGTGTC

【0248】

9.2 P C R 反応

15 μ L P C R 反応は、各0.2 mMの4種類のD - d N T P、10 nM 83マー1本鎖D N A (M J _ 1 _ 1 _ D D) 鑄型、1 μ Mのフォワードおよびリバースプライマー、1 x Thermo P o l 緩衝液 (Invitrogen、20 mMトリス - H C l 、10 mM K C l 、10 mM (N H₄)₂ S O₄、2 mM M g S O₄、0.1% Triton X - 100、p H 8.8 @ 25) および少なくとも0.67 ng / μ Lの全 - L - ポリメラーゼD p o 4 または全 - L - ポリメラーゼD p o 4 の変異体または合成全 - L - ポリメラーゼD p o 4 を含有した。フォワードプライマーはD E 4 . 4 0 T 7 であり、リバースプライマーはD E 4 . 4 0 R であり、102塩基対長のP C R 生成物が得られる。R o v a l a b (T e l t o w , G e r m a n y) からD - d N T P を購入した。全 - L - ポリメラーゼD p o 4 または全 - L - ポリメラーゼD p o 4 の変異体または合成全 - L - ポリメラーゼD p o 4 を省くことによって陰性対照を遂行した。市販の全 - L - d p o 4 (New England Biolabs, Frankfurt am Main, G e r m a n y) を用いて陽性対照を遂行した。

【0249】

温度サイクリングプログラムは、1サイクル(85、3分)、次に少なくとも7サイクル(85、30秒 / 56、1分 / 60、4分)、次いで4で保持から構成された。P C R 反応物の4 μ L アリコートを試料ローディング緩衝液と混合し、T B E - P A G E またはアガロースゲル (L O N Z A 、C o l o g n e , G e r m a n y) 上で分析した。とりわけ100 bp バンドを含有するD N A 標準物質ラダーをこのゲル上に適用した。

【0250】

9.3 活性確認

全 - L - ポリメラーゼD p o 4 、全 - L - ポリメラーゼD p o 4 の変異体A 1 5 5 C 、V 2 0 3 C 、C 3 1 S 、A 1 5 5 C / V 2 0 3 C 、S 8 5 C 、S 8 6 C 、S 9 6 C および合成全 - L - ポリメラーゼD p o 4 を試験した。試験したポリメラーゼは全て、P C R 反

10

20

30

40

50

応において錫型鎖を増幅することができた。図12Aは、全-L-ポリメラーゼDpo4の変異体A155C、V203C、C31S、A155C/V203Cを用いて行ったPCR反応の分析を示し、これら全てが、DNA標準物質ラダーと比較した場合に約100bpの範囲となるバンドを示した。予想されたPCR生成物サイズは102塩基対であった。このバンドはポリメラーゼがない陰性対照では現れない。またこの102bpバンドは、83マー錫型より高く移動する。図12Bは、組み換え全-L-ポリメラーゼdpo4を用い、断片のライゲーションにより作製された合成全-L-ポリメラーゼdpo4を使用して行ったPCR反応の分析を示す。ゲルは、DNA標準物質ラダーと比較した場合に約100bpの範囲となるバンドを示した。予想されたPCR生成物サイズは102塩基対であった。ポリメラーゼがない陰性対照においてこのバンドは非常に弱い。図12Bからのレーン2および3を比較した場合に見ることができるように、組み換え全-L-ポリメラーゼdpo4および合成全-L-ポリメラーゼdpo4は、同一の活性を示す。
10

【0251】

実施例10-D-アミノ酸からなるポリメラーゼDpo4の変異体の合成

本実施例中では、全-DポリメラーゼDpo変異体A155C/V203Cの合成を記載する。全-DポリメラーゼDpo変異体A155C/V203Cのアミノ酸配列は、
A
c - M I V L F V D F D Y F Y A Q V E E V L N P S L K G K P V V V C V F S G R F E
D S G A V A T A N Y E A R K F G V K A G I P I V E A K K I L P N A V Y L P M R K
E V Y Q Q V S S R I M N L L R E Y S E K I E I A S I D E A Y L D I S D K V R D Y
R E A Y N L G L E I K N K I L E K E K I T V T V G I S K N K V F A K I A C D M A
K P N G I K V I D D E E V K R L I R E L D I A D V P G I G N I T A E K L K K L G
I N K L C D T L S I E F D K L K G M I G E A K A K Y L I S L A R D E Y N E P I R
T R V R K S I G R I V T M K R N S R N L E E I K P Y L F R A I E E S Y Y K L D K
R I P K A I H V V A V T E D L D I V S R G R T F P H G I S K E T A Y S E S V K L
L Q K I L E E D E R K I R R I G V R F S K F I E A I G L D K F F D T - O H である。
20

【0252】

固相ペプチド合成Fmoc/tBu-ストラテジーの要件(Eric Athertonら、1981)に従い、使用する全アミノ酸を保護する。使用するアミノ酸は全てD-アミノ酸である(Bachem, Bubendorf, Switzerland)。
30

【0253】

10.1 H-D-Met-OGp(Boc)₂の合成
1mmole Z-D-Met-OH、0.9eq. TBTUおよび0.9mmol HO-Gp(Boc)₂を10mL DMF中で溶解させた。2eq. DIPEAの添加後、溶液を2時間攪拌した。溶媒を蒸発させた後、DCMを用いてフラッショクロマトグラフィーにより粗生成物を精製した。Z-D-Met-OGp(Boc)₂の純粋な分画を合わせ、溶媒を蒸発させた。

【0254】

Z-D-Met-OGp(Boc)₂を10mL MeOH中で溶解させ、アルゴンを吹き付けた。2時間のPd/C触媒およびH₂の添加によって、N末端Z-基の加水分解性切断を達成した。ろ別後、H-D-Met-OGp(Boc)₂ MeOHを減圧下で蒸発させた。逆相HPLCおよび質量分析を用いて分析を行った。482Daの計算質量は、483Daの決定質量と一致する。
40

【0255】

10.2 完全保護化全-D-ペプチドH-RTFPHGISKETAYSESVKL
LQKILEEDERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFDT-NH₂(1)
の合成
6mL NMP中で45分間、5eq. アミノ酸、eq. 4.9eq. HATUおよび
10eq. DIPEAを用いて、Fmoc-脱保護後に、Fmoc-D-Thr(tBu)
-OHを0.1mmole Fmoc-Sieber rink アミドNovaSy
50

n T G レジンに充填した。

【 0 2 5 6 】

F A S T m o c プロトコールにより A B I 4 3 3 を用いて自動化合成を行った。 N M P 中で 9 e q . H A T U および 2 0 e q . D I P E A 用いて、 1 0 e q . アミノ酸を活性化した。 カップリング時間は 4 5 分間であり、 N M P 中 2 0 % (v / v) ピペリジンを用いて 7 分間にわたり F m o c - 脱保護化を 3 回行った。 4 2 アミノ酸のカップリング後、 二重カップリングを行った。

【 0 2 5 7 】

2 時間にわたり、 1 0 m L の D C M 中 1 % (v / v) T F A 中でペプチジルレジンを 2 回温置することによって、完全保護化ペプチド酸の切断を達成した。ペプチドをろ別した後、溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させた。沈殿させたペプチドを単離し、乾燥させた。

【 0 2 5 8 】

H P L C および質量分析 (図 1 3) によって最終生成物の特徴を調べた。生成物に対する計算質量 (6 2 4 4 D a) は、測定質量 (6 2 4 9 D a) と一致する。

【 0 2 5 9 】

1 0 . 3 完全保護化全 - D - ペプチド B o c - V D T L S I E F D K L K G M I G E A K A K Y L I S L A R D E Y N E P I R T R V R K S I G R I V T M K R N S R N L E E I K P Y L F R A I E E S Y Y K L D K R I P K A I H V V A V T E D L D I V S R G - O H (2) の合成

Barl os ら (Barl os ら、 1 9 8 9) により記載されるように、 0 . 1 0 m m o l e T e n t a G e l - R - T r i t y 1 レジンに F m o c - D - G l y - O H を充填した。したがって、 0 . 6 m m o l e の塩化チオニルとともに 0 . 1 0 m m o l レジンを 3 0 分間、 2 回温置し、その後に D C M で洗浄した。この後、 6 m L D C M 中の 0 . 6 m m o l e F m o c - G l y - O H 、 2 . 4 m m o l D I P E A とともにレジンを 9 0 分間温置した。その後、 D C M 中 1 0 % M e O H (v / v) 、 1 0 % D I P E A (v / v) の溶液を用いて、レジンを 1 0 分間、 3 回プロッキング処理し、 D C M で洗浄した。 F A S T m o c プロトコールにより A B I 4 3 3 を用いて自動化合成を行った。 N M P 中 9 e q . H A T U および 2 0 e q . D I P E A を用いて 1 0 e q . アミノ酸を活性化した。カップリング時間は 4 5 分間であり、 N M P 中 2 0 % (v / v) ピペリジンを用いて F m o c - 脱保護化を 7 分間、 3 回行った。 3 9 アミノ酸のカップリング後、二重カップリングを行った。

【 0 2 6 0 】

D C M 中の 1 0 m L 3 0 % (v / v) H F I P 中でペプチジルレジンを 2 時間、 2 回温置することによって、完全保護化ペプチド酸の切断を達成した。ペプチドをろ別した後、溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させた。沈殿させたペプチドを単離し、乾燥させた。 H P L C および質量分析によって最終生成物の特徴を調べた (図 1 4)。実験により決定された生成物の質量 (1 1 2 8 9 D a) は理論値 (1 1 2 8 6 D a) のとおりであった。

【 0 2 6 1 】

1 0 . 4 ペプチド 2 とペプチド 1 の断片縮合による全 - D - ペプチド H - V D T L S I E F D K L K G M I G E A K A K Y L I S L A R D E Y N E P I R T R V R K S I G R I V T M K R N S R N L E E I K P Y L F R A I E E S Y Y K L D K R I P K A I H V V A V T E D L D I V S R G R T F P H G I S K E T A Y S E S V K L L Q K I L E E D E R K I R R I G V R F S K F I E A I G L D K F F D T - N H ₂ (3) の合成

【 0 2 6 2 】

D C M 中 2 5 % (v / v) T F E 中で 5 μ m o l e (2) および 1 e q . (1) を溶解させた。 5 e q . P y B O P および 1 0 e q . D I P E A の添加後、混合物を一晩攪拌した。溶媒を蒸発させた後、氷冷ジエチルエーテルを用いてペプチドを沈殿させ、ろ別した。

10

20

30

40

50

【0263】

2時間にわたり、TFA中2.5%EDT、2.5%水、2.5%TISによってペプチドの側鎖保護基の切断を行った。TFAの蒸発後、氷冷ジエチルエーテルを用いてペプチドを沈殿させた。ACN／水勾配を用いてC18カラムにおいて、N末端Fmoc-保護化ペプチドの逆相HPLC精製を行った。生成物を含有する分画を合わせ、凍結乾燥させた。

【0264】

HPLCおよび質量分析によって最終生成物の特徴を調べた(図15)。実験により決定された質量(17531Da)は理論分子質量(17512Da)と一致する。

【0265】

10.5 全-D-ペプチドZ-CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGINKL-ベンジル-チオエステル(4)の合成

Barlorsら(Barlorsら、1989)に記載のように、Fmoc-D-Leu-OHを0.10mmole Tentagel-R-Triitylレジンに充填した。したがって、0.6mmole 塩化チオニルとともに0.10mmoleレジンを30分間、2回温置し、その後にDCMで洗浄した。この後、6mL DCM中の0.6mmole Fmoc-D-Leu-OH、2.4mmol DIPEAとともにレジンを90分間温置した。その後、DCM中10%MeOH(v/v)、10%DIPEA(v/v)の溶液を用いて、レジンを10分間、3回ブロッキング処理し、DCMで洗浄した。FASTmocプロトコールによりABI433を用いて自動化合成を行った。NMP中9eq. HATUおよび20eq. DIPEAを用いて、10eq. アミノ酸を活性化した。カップリング時間は45分間であり、NMP中20%(v/v)ピペリジンを用いてFmoc-脱保護化を7分間、3回行った。

【0266】

2時間にわたり、10mLのDCM中30%(v/v)HFIP中でペプチジルレジンを2回温置することによって、完全保護化ペプチド酸の切断を達成した。ペプチドのろ別後、溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させた。沈殿ペプチドを単離し、乾燥させた。

【0267】

DMF中でN末端Z-および完全に側鎖保護されたペプチド4を1mMに溶解させた。5eq. PyBOP、10eq. DIPEAおよび30eq. ベンジルメルカプタンの添加後、混合物を4時間攪拌した。次に、DMFを蒸発させ、ペプチドを沈殿させ、氷冷ジエチルエーテルで洗浄した。2時間にわたるTFA中2.5%EDT、2.5%水、2.5%TISでの処理により、側鎖保護基を除去した。TFAの蒸発後、ペプチドを沈殿させ、氷冷ジエチルエーテルで洗浄した。次に、逆相HPLCによってペプチド-ベンジル-チオエステルを精製し、逆相HPLC(図16A)およびESI-MS(図16B)によって分析した。理論分子量(M_{theor} = 5527Da)は、ESI-MSにより示されるように実測分子量(M_{obs} = 5533Da)と一致する。

【0268】

10.6 全-D-ペプチドH-RKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe(7)の合成

6mL NMP中で、45分間、5eq. アミノ酸、eq. 4.9eq. HATUおよび10eq. DIPEAを用いて、0.10mmole Tentagel-R-NH₂レジンにFmoc-D-Ala-OHを充填した。その後に、レジンをTHFで洗浄した。2時間にわたり、80℃でTHF中4eq. Lawesson試薬との温置によって、Fmoc-D-Ala-[CS-NH]-R-Tentagelへの変換を達成した。この後、レジンをNMPで洗浄した。その後に、このように調製したレジンを既に記載のように自動化ペプチド合成において使用した(ABI433、FASTmocプロトコ-

10

20

30

40

50

ル、NMP中9eq. HATUおよび20eq. DIPEAを用いて10eq. アミノ酸を活性化し；カップリング時間は45分間であり、NMP中20% (v/v) ピペリジンによって7分間、Fmoc-脱保護化を3回行った。)。44カップリングアミノ酸の後、二重カップリング段階を行った。

【0269】

この後、Sharmaら (Sharmaら、2011) に従い、DMF中ヨウ化メチルと一晩温置することによって、対応するチオエステルを生成させた。レジンのろ過後、ペプチドチオエステル含有溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させた。2時間にわたり、TFA中2.5%EDT、2.5%水、2.5%TISを用いて、側鎖保護基の切断を行った。TFAの蒸発後、氷冷ジエチルエーテルによりペプチドを沈殿させた。ACN / 水勾配を用いて、C18カラム上で、ペプチドチオエステルの逆相HPLC精製を行った。生成物を含有する分画を合わせ、凍結乾燥させた。

10

【0270】

HPLC (図17A) および質量分析 (図17B) によって、最終生成物の特徴を調べた。質量分析によって決定された生成物の分子量 (9155Da) は、計算質量 (9150Da) と一致した。

【0271】

10.7 Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARFKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMDOGp (6) の合成

20

0.10mmole Tentagel-R-Tritylレジンに、Barlolsら (Barlolsら、1989) に記載のよう Fmoc-D-Pro-OHを充填した。したがって、0.6mmole 塩化チオニルとともに30分間、2回、0.10mmole レジンを温置し、その後に、DCMで洗浄した。この後、6mL DCM中0.6mmole Fmoc-D-Pro-OH、2.4mmole DIPEAとともに、レジンを90分間温置した。その後、DCM中10%MeOH (v/v)、10%DIPEA (v/v) の溶液を用いて、レジンを10分間、3回プロッキング処理し、DCMで洗浄した。FASTmocプロトコールによってABI433を用いて自動化合成を行った。NMP中9eq. HATUおよび20eq. DIPEAを用いて10eq. アミノ酸を活性化した。カップリング時間は45分間であり、NMP中20% (v/v) ピペリジンによって、7分間、3回、Fmoc-脱保護化を行った。46アミノ酸のカップリング後、二重カップリングを行った。DMF中10% (v/v) 無水酢酸および10% (v/v) DIPEAを用いてN-末端のアセチル化を10分間、3回行った。

30

【0272】

2時間にわたり、10mLのDCM中30% (v/v) HFIP中でペプチジルレジンを2回温置することによって、完全保護化ペプチド酸の切断を達成した。ペプチドのろ別後、溶媒を蒸発させ、氷冷ジエチルエーテルを用いて残渣を沈殿させ。沈殿ペプチドを単離し、乾燥させた。

【0273】

0.01mmole 完全保護化ペプチド、4eq. PyBOP および5eq. H-D-Met-OGp (Boc)₂を6mL NMP中で溶解させた。10eq. DIPEAの添加後、混合物を4時間攪拌した。この後、溶媒を還元気化 (reduced evaporation) させ、氷冷ジエチルエーテルによって残渣を沈殿させた。沈殿ペプチドエステルを乾燥させ、その後、2時間にわたり、TFA中2.5%EDT、2.5%水、2.5%TISを用いて保護基を切り出した。TFAの蒸発後、氷冷ジエチルエーテルによりペプチドを沈殿させた。ACN / 水勾配を用いて、C18カラム上でペプチドエステルの逆相HPLC精製を行った。生成物を含有する分画を合わせ、凍結乾燥させた。

40

【0274】

HPLC (図18A) および質量分析 (図18B) によって最終生成物の特徴を調べた。実験により決定された質量 (8547Da) は、理論分子量 (8541Da) と一致す

50

る。

【0275】

10.8 ペプチド3とペプチド4のネイティブ化学ライゲーションによる、全-D-ペプチド、H-CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGINKLCDTLSIEFDKLGMIKEAKAKYLISSLARDEYNEPIRTVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFR AIEESYYKLDKRIPKAIHVAVATEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIG VRFSKFI EAIGL DKFFDT-OH(5)の合成

【0276】

2% SDS、1%チオフェノールおよび5mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩を含有するトリス-緩衝液(pH 8.6)中でペプチド3および4の両方を0.2Mに溶解させる。反応混合物を室温により72時間振盪する。その後、逆相HPLCによって混合物を精製する。N末端Z-保護基の除去のために、270eq.TFAおよび50eq.チオアニソールでペプチドを溶解させ、室温で6時間振盪した(Yoshiaki Kisoら、1980)。TFAの蒸発後、ペプチドを沈殿させ、氷冷ジエチルエーテルにより洗浄し、逆相HPLC(Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)によって再び精製した。SDS-PAGE、逆相UPLCおよびESI-質量分析によって、遊離ペプチド5の分析を行う。生成物の正確な質量が分かる。

【0277】

10.9 全-D-ペプチドの合成

ペプチド7とのペプチド6のプロテアーゼ-触媒ライゲーションによる、全-D-ペプチド、Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFS GRFEDSGAVATANYEARFKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYL PMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDK VRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe(8)の合成

4M尿素を含有するリン酸ナトリウム緩衝液(100mM、pH 8.5、100mM NaCl入り)中で、ペプチド6を0.2mMに溶解させ、ペプチド7を0.6mMに溶解させた。20μMクロストリパイン(エンドプロテアーゼArg-C、Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, N.J., USA)の添加後、反応混合物を37℃で一晩振盪した。沈殿ペプチドを遠心し、H₂O/ギ酸80/20中で溶解させ、30分内で5%から95%の水中ACN勾配でRP-18カラム(Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)を用い、逆相HPLCによって精製する。最終ペプチドをSDS-PAGE(図19A)およびESI-質量分析(図19B)により分析した。レーン1で14, 4kDaと21.5kDaとの間でバンドが見られ、ライゲーション生成物が示された。ライゲーション生成物の理論分子量(M_{theor} = 17476Da)は、ESI-MSにより示されるように実測分子量(M_{obs} = 17486Da)と一致する。

【0278】

10.10 ペプチド5とのペプチド8のネイティブ化学ライゲーションによる全-DポリメラーゼDpo変異体A115C/V203Cの合成

2% Triton X100、1%チオフェノールおよび5mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩を含有するトリス-緩衝液(pH 8.6)中で、ペプチド5および8の両方を0.2Mに溶解させる。反応混合物を室温により72時間振盪する。その後、逆相HPLCにより混合物を精製し、SDS-PAGE、逆相UPLCおよびESI-質量分析により分析する。ライゲーション生成物の正確な質量が分かる。

【0279】

実施例11-D-アミノ酸からなる合成ポリメラーゼdpo4の活性確認

10

20

30

40

50

この実施例は、実施例 10 による全 - D ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C / V 2 0 3 C に対する P C R 活性試験を記載する。

驚くべきことに、合成全 - D ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C / V 2 0 3 C は、余分な再折り畳みを行うことなく活性であり、したがって、さらなる再折り畳み手順なく使用される。プレキャストゲル (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 上でのドデシル硫酸ナトリウム (略称 SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (略称 PAGE) により、標準的な一連の既知のタンパク質濃度を用い、その後 S Y P R O - R E D 染色 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) および BioRad F x スキャナー機器上での密度バンド分析を行うことによって、タンパク質濃度を推定する。

10

【 0 2 8 0 】

1 1 . 1 P C R 活性アッセイに対する鋳型

P C R 反応に対する鋳型は、83マー1本鎖 L - D N A オリゴヌクレオチド (M J _ 1 _ 1 0 5 _ L D) であり、そこから、第一の温度サイクルにおいて逆鎖が生成される。その後、両鎖を指数関数的増幅に対する鋳型とする。N O X X O N において L - 立体配置で鋳型 D N A オリゴヌクレオチドおよび D N A プライマーを合成する。

【 0 2 8 1 】

P C R 活性アッセイに対するオリゴヌクレオチドのリスト :

【表 1 0 】

名称	長さ、 nt	立体配置	配列 (5' → 3')
MJ_1_105_LD	83	L	GTGGAACCGACAACTTGTGCTGCGTCCAGCATAAGAAAGGAGCTCCCTCAGAAGAAGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC
MJ_oligo_187_LD	38	L	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCACGC
MJ_oligo_189_LD	20	L	GTGGAACCGACAACTTGTGC

20

【 0 2 8 2 】

1 1 . 2 P C R 反応

15 μ L P C R 反応は、各 0 . 2 m M の 4 種類の L - d N T P 、 1 0 n M 83マー - s s D N A (M J _ 1 _ 1 0 5 _ L D) 鋳型、 1 μ M のフォワードおよびリバースプライマー、 1 x Thermopol 緩衝液 (Invitrogen, 20 m M トリス - H C l 、 10 m M K C l 、 10 m M (N H 4) 2 S O 4 、 2 m M M g S O 4 、 0 . 1 % Triton X - 1 0 0 、 p H 8 . 8 @ 2 5) および少なくとも 0 . 6 7 n g / μ L の全 - D ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C / V 2 0 3 C を含有する。フォワードプライマーは、 M J _ o l i g o _ 1 8 7 _ L D であり、 1 0 2 b p の P C R 生成物が得られ、これは 83マー鋳型とは区別されるものである。リバースプライマーは、 M J _ o l i g o _ 1 8 9 _ L D である。L - d N T P は、 R a s a y a n , I n c . (E n c i n i t a s , C A , U S A) によるカスタム合成として購入する。

30

【 0 2 8 3 】

全 - D ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C / V 2 0 3 C を省くことによって陰性対照を遂行する。

40

【 0 2 8 4 】

温度サイクリングプログラムは、1サイクル (85 、 3 分) 、次いで少なくとも 7 サイクルの (85 、 30 秒 / 56 、 1 分 / 60 、 4 分) 、次いで 4 で保持からなる。P C R 反応物の 4 μ L アリコートを試料ローディング緩衝液と混合し、 T B E ゲル上で分析する。とりわけ 1 0 0 b p バンドを含有する D N A 標準物質ラダーをこのゲルに適用する。

【 0 2 8 5 】

1 1 . 3 活性確認

全 - D ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C / V 2 0 3 C および L - D N A 基質およ

50

び L - ヌクレオチドを用いた P C R 反応によって、 D N A 標準物質ラダーと比較した場合に約 1 0 0 b p の範囲となるバンドが得られる。このバンドは、ポリメラーゼがない陰性対照では出現しない。また、この 1 0 2 b p バンドは、 8 3 マー鑄型より高く移動する。全 - D ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C / V 2 0 3 C は L - D N A 増幅の出現に依存するので、温度増幅過程での合成全 - D ポリメラーゼ D p o 4 変異体 A 1 5 5 C / V 2 0 3 C の活性が確認される。

【 0 2 8 6 】

実施例 1 2 - D - または L - 核酸の合成

標準的な環外アミン保護基とともに (D a m h a および O g i l v i e , 1 9 9 3) 2 ' T B D M S D N A ホスホラミダイト化学を用いて、 A B I 3 9 4 合成装置 (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A , U S A) による固相合成によって、 L - D N A 核酸または D - D N A 核酸を作製した。 D N A 合成のために、 D - および L - 立体配置の d A (N - B z) - 、 d C (N - A c) - 、 d G (N - i b u) - および d T を適用した。 C h e m G e n e s , W i l m i n g t o n , M A から全ホスホルアミダイトを購入した。合成および脱保護後、ゲル電気泳動によって L - D N A 核酸または D - D N A 核酸を精製した。

【 0 2 8 7 】

参考文献

次のような、本明細書中で引用する書類の完全な文献データは、別段の断りがない場合、それによってその参考文献の開示が参照により本明細書中に組み込まれる。

Altschul S. F. , Gish W. , et al. (1 9 9 0) B a s i c l o c a l a l i g n m e n t s e a r c h t o o l . J M o l B i o l . 2 1 5 (3) : 4 0 3 - 1 0 .

Altschul S. F. , Madden T. L. , et al. (1 9 9 7) G a p p e d B L A S T a n d P S I - B L A S T : a n e w g e n e r a t i o n o f p r o t e i n d a t a b a s e s e a r c h p r o g r a m s . N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 (1 7) : 3 3 8 9 - 4 0 2 . Atherton E. , Logan C. J. and Sheppard R. C . (1 9 8 1) P e p t i d e s y n t h e s i s . P a r t 2 . P r o c e d u r e s f o r s o l i d - p h a s e s y n t h e s i s u s i n g N - f l u o r e n y l m e t h o x y c a r b o n y l a m i n o - a c i d s o n p o l y a m i d e s u p p o r t s . S y n t h e s i s o f s u b s t a n c e P a n d o f a c y l c a r r i e r p r o t e i n 6 5 7 4 d e c a p e p t i d e J . C h e m . S o c . , P e r k i n T r a n s . 1 , 5 3 8 - 5 4 6

Barlos , K. , Gatos , D. , Kallitsis , J. , Papaphotiu , G. , Sotiriou , P. , Yao , W. Q. and Schafer , W. (1 9 8 9) D a r s t e l l u n g g e s c h u t z t e r P e p t i d - F r a g m e n t e u n t e r E i n s a t z s u b s t i t u i e r t e r T r i p h e n y l m e t h y l - H a r z e . T e t r a h e d r o n L e t t e r s . 3 0 (3 0) : 3 9 4 3 - 3 9 4 6

B o c k L. C. , G r i f f i n L. C. , L a t h a m J. A. , V e r m a a s E. H. and T o o l e J. J. (1 9 9 2) S e l e c t i o n o f s i n g l e - s t r a n d e d D N A m o l e c u l e s t h a t b i n d a n d i n h i b i t h u m a n t h r o m b i n . N a t u r e . 3 5 5 (6 3 6 0) : 5 6 4 - 6 .

Boudsocq , F. , S. Iwai , et al. (2 0 0 1) . " S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s P 2 D N A p o l y m e r a s e I V (D p o 4) : a n a r c h a e a l D i n B - l i k e D N A p o l y m e r a s e w i t h l e s i o n - b y p a s s p r o p e r t i e s

10

20

30

40

50

akin to eukaryotic polenta." Nucleic Acids Res. 29(22): 4607-16. Burmeister P.E. et al (2006) 2'-Deoxy purine, 2'-O-methyl pyrimidine (dRmY) aptamers as candidate therapeutics. Oligonucleotides. 16(4):337-51.

Damha MJ, Ogilvie KK. (1993) Oligoribonucleotide synthesis. The silyl-phosphoramidite method. Methods Mol Biol. 20:81-114

10

Ellington A.D. and Szostak J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 346(6287):818-22.

Freier S.M. and Altman K.H. (1997) The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. Nucleic Acids Res. 25(22):4429-43.

Klussmann S. (2006). The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and their Applications. Edited by S. Klussmann. WILEY-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31059-2

20

Klussmann S., Nolte A., Bald R., Erdmann V.A. and Furste J.P. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. Nat Biotechnol. 14(9):1112-5.

Kusser W. (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. J Biotechnol 74(1): 27-38.

30

Mairal T., Ozalp V.C., Lozano Sanchez P., et al. (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications. Anal Bioanal Chem. 390(4):989-1007

Mandal K., Uppalapati M., Ault-Riche D., Kenney J., Lowitz J., Sidhu S.S. and Kent S.B.H. (2012) Chemical synthesis and X-ray structure of a heterochiral {D-protein antagonist plus vascular endothelial growth factor} protein complex by academic crystallography. PNAS. 109(37)

40

McGinnis S., Madden T.L. et al. (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res. 32(Web Server issue):W20-5.

Needleman and Wunsch (1970) A general method applicable to the search for simil

50

- arities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48(3):443-53.
- Nolte A., Klussmann S., Bald R., Erdmann V.A. and Furste J.P. (1996) Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat Biotechnol.* 14(9):1116-9.
- Oliveros, M., R. J. Yanez, et al. (1997). "Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair." *J Biol Chem* 272(49): 30899-910.
- Pearson and Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444
- Sambrook et al. (ed.), (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. and Tanizawa, K. (1996) Synthesis and tryptic hydrolysis of p-guanidinophenyl esters derived from amino acids and peptides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 44(8):1577-9
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. and Tanizawa, K. (1996) Trypsin-catalyzed peptide synthesis and various p-guanidinophenyl esters as acyl donors. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 44(8):1585-7
- Sharma, I. and Crich, D. (2011) Direct Fmoc-Chemistry-Based Solid-Phase Synthesis of Peptidyl Thioesters. *Journal of Organic Chemistry.* 76(16):6518-24
- Smith and Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482
- Tuerk C. and Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249(4968):505-10.
- Usman N. and Cedergren R. (1992) Exploiting the chemical synthesis of RNA. *Trends Biochem Sci.* 17(9):334-9
- Venkatesan N., Kim S.J., et al. (2003) Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides. *Curr Med Chem* 10(19): 1973-91
- Wincott F, DiRenzo A, et al. (1995). Sy

ynthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res.; 23 (14): 2677-84.

【0288】

本明細書、特許請求の範囲および/または図面中で開示される本発明の特徴は、両者とも個別に、および何らかのそれらの組み合わせで、その様々な形態で本発明を実現するための材料であり得る。

【図1A】

複合体1-ギャップ-A SP-1 (15 ←) D(g1)P (17 ←)
(D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAAACGACGGCCAGT-3'
3'-CTAGTGTCACTCATG~~C~~ATTTCGCTGCCGGTCA-5'
MJ_1_140_DD (33 ←)

複合体1-ギャップ-C SP-1 (15 ←) D(g1)P (17 ←)
(D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAAACGACGGCCAGT-3'
3'-CTAGTGTCACTCATG~~C~~ATTTCGCTGCCGGTCA-5'
MJ_1_141_DD (33 ←)

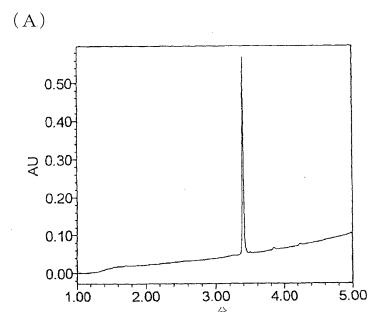
複合体1-ギャップ-G SP-1 (15 ←) D(g1)P (17 ←)
(D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAAACGACGGCCAGT-3'
3'-CTAGTGTCACTCATG~~G~~ATTTCGCTGCCGGTCA-5'
MJ_1_142_DD (33 ←)

複合体1-ギャップ-T SP-1 (15 ←) D(g1)P (17 ←)
(D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAAACGACGGCCAGT-3'
3'-CTAGTGTCACTCATG~~T~~ATTTCGCTGCCGGTCA-5'
SP1c+18(g1) (33 ←)

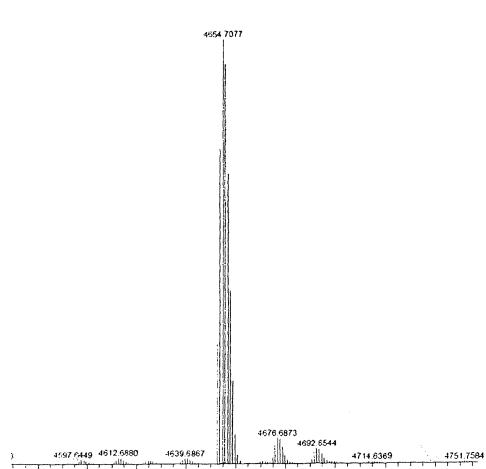
【図1B】

複合体6-ギャップ(D) : SP-1 (15 ←) D(g6)P (12 ←)
5'-GATCACAGTGAGTAC ACGACGGCCAGT-3'
3'-CTAGTGTCACTCATGTTATCTTGCTGCCGGTCA-5'
SP1c+18(g6) (33 ←)

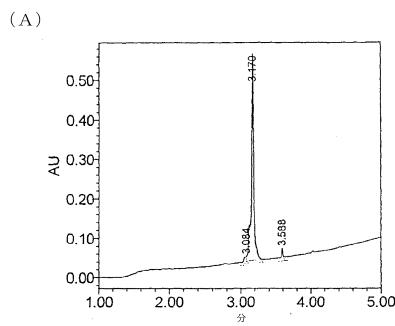
【図2A-B】



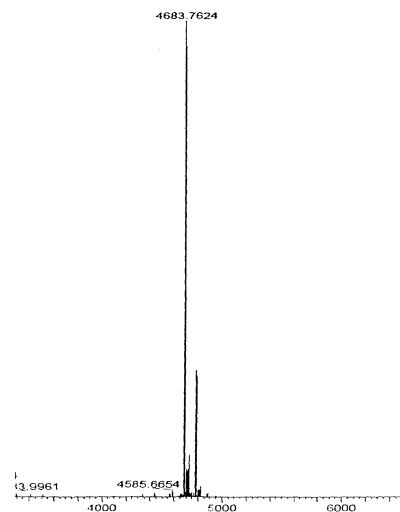
(B)



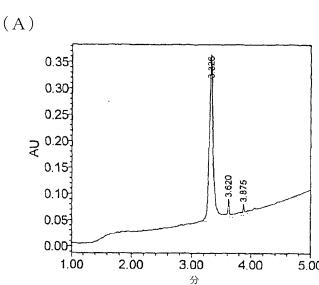
【図3 A - B】



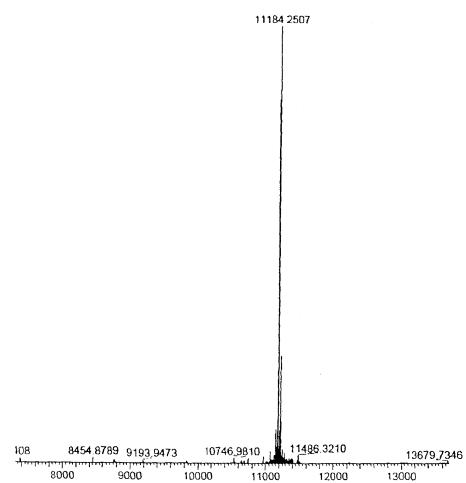
(B)



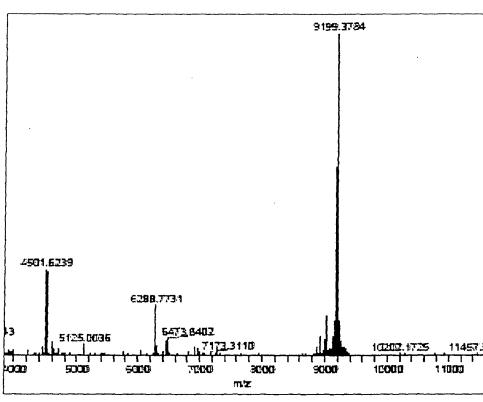
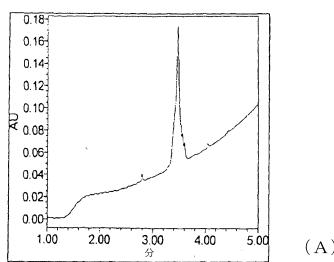
【図4 A - B】



(B)

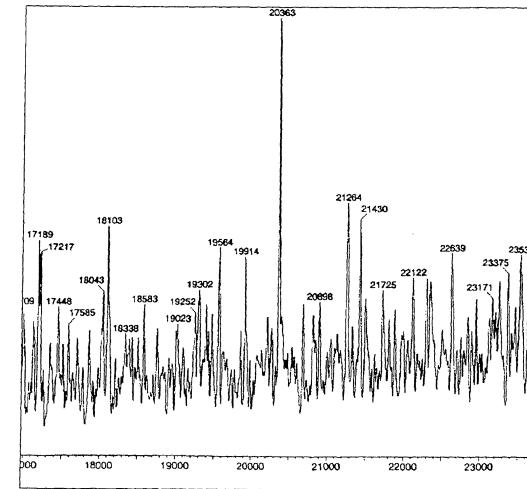
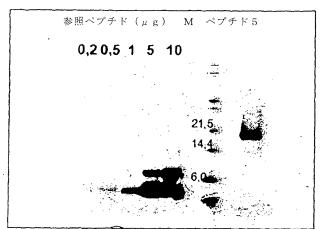


【図5 A - B】



(B)

【図6 A - B】



(B)

【図7】

複合体1-ギャップ-A

MJ_1_58_MD (17 ←) MJ_1_143_LD (17 ←)
(L) 5'-GG-GATCACAGTGAGTAC GTAAACGAGGCCAGT-3'
3'- CTAGTGTCACTCATGACATTTCGTCGGGTCA-5'
MJ_1_145_LD (33 ←)

複合体1-ギャップ-C

MJ_1_58_MD (17 ←) MJ_1_143_LD (17 ←)
(L) 5'-GG-GATCACAGTGAGTAC GTAAACGAGGCCAGT-3'
3'- CTAGTGTCACTCATGACATTTCGTCGGGTCA-5'
MJ_1_146_LD (33 ←)

複合体1-ギャップ-G

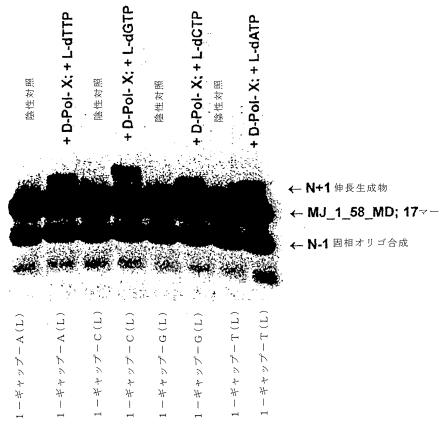
MJ_1_58_MD (17 ←) MJ_1_143_LD (17 ←)
(L) 5'-GG-GATCACAGTGAGTAC GTAAACGAGGCCAGT-3'
3'- CTAGTGTCACTCATGACATTTCGTCGGGTCA-5'
MJ_1_147_LD (33 ←)

複合体1-ギャップ-T

MJ_1_58_MD (17 ←) MJ_1_143_LD (17 ←)
(L) 5'-GG-GATCACAGTGAGTAC GTAAACGAGGCCAGT-3'
3'- CTAGTGTCACTCATGACATTTCGTCGGGTCA-5'
MJ_1_144_LD (33 ←)

1-ギャップ基質に対するオリゴヌクレオチドのリスト：			
名称	nt	立体配置	配列 (5'→3')
MJ_1_58_MD	17	最初の2個のG = D, 残りの部分 = L	GG-GATCACAGTGAGTAC
MJ_1_143_LD	17	L	リソ酸 -
MJ_1_145_LD	33	L	GTAAACGAGGCCAGT
MJ_1_146_LD	33	L	ACTGGCCGTCTTTACGACTC ACTGTGATC
MJ_1_147_LD	33	L	ACTGGCCGTCTTTACGACTC ACTGTGATC
MJ_1_144_LD	33	L	ACTGGCCGTCTTTACGACTC ACTGTGATC

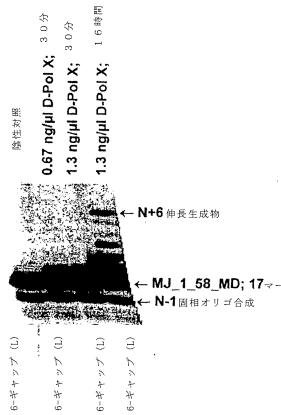
【図8】



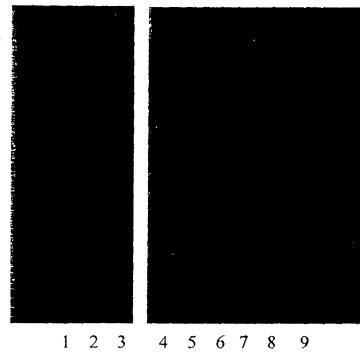
【図9 A】

マーカー			
複合体 6-ギャップ (L) : 5'-GG-GATCACAGTGAGTAC ACCACGGCCAGT-3' 3' - CTAGTGTCACTCATGACATTTCGTCGGGTCA-5' MJ_1_59_LD (12 ←)			
6-ギャップ基質に対するオリゴヌクレオチドのリスト：			
MJ_1_58_MD	17	最初の2個のG = D, 残りの部分 = L	GG-GATCACAGTGAGTAC
MJ_1_59_LD	12	L	リソ酸 -ACGACGCCAGT
MJ_1_57_LD	33	L	ACTGGCCGTCTTTACGACTC

【図9 B】



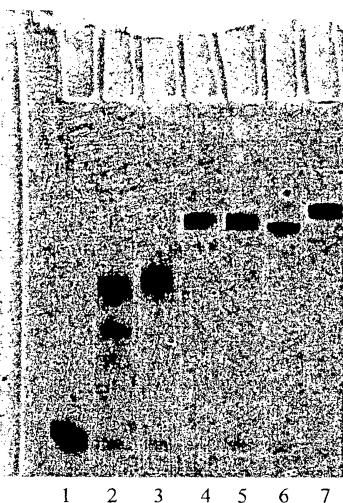
【図10 B】



【図10 A】

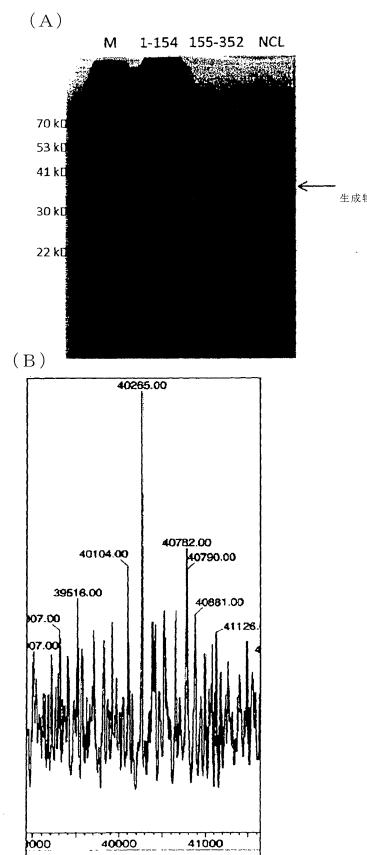
(A)
Atto532-MJ_1_33_DD_19nt
MJ_1_1_DD_83nt

【図10C】

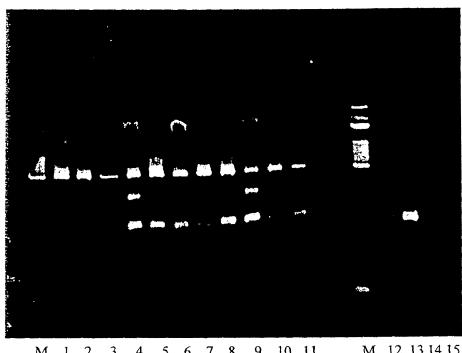


- 1:陰性対照 (ポリメラーゼなし)
 2:野生型L-ボリメラーゼX、5回の温度サイクル
 3:野生型L-ボリメラーゼX、10回の温度サイクル
 4:野生型L-ボリメラーゼX、15回の温度サイクル
 5:野生型L-ボリメラーゼX、20回の温度サイクル
 6:野生型L-ボリメラーゼX、25回の温度サイクル
 7:陽性対照 (Taq)

【図11A-B】

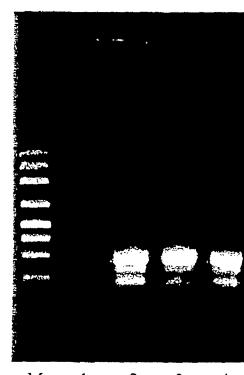


【図12A】



- M : 1.0 bp DNA ラダー (最小の可視バンド : 20 bp ; 100 bp バンドはより強度大)
 1 : 陰性対照、New England Biolabs からの全-L-dpo4 (100 ng)
 2 : 陽性対照、New England Biolabs からの全-L-dpo4 (50 ng)
 3 : 試料添加せず
 4 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体A155C (100 ng)
 5 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体A155C (50 ng)
 6 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体V203C (100 ng)
 7 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体V203C (50 ng)
 8 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体C31S (100 ng)
 9 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体C31S (50 ng)
 10 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体A155C/V203C (100 ng)
 11 : 全-L-ボリメラーゼdpo4変異体A155C/V203C (50 ng)
 12 : 陰性対照 (鉛型、fwd-およびrev-プライマー)
 13 : fw d-、-プライマーのみ
 14 : rev-、-プライマーのみ
 15 : 陰性対照 (鉛型なし、プライマーなし)

【図12B】



- M : 50 bp DNA ラダー (最小バンド : 50 bp、次に100 bp)
 1 : 陰性対照 (ポリメラーゼなし)
 2 : 陽性対照、全-L-ボリメラーゼdpo4 (組み換え)、10 ng
 3 : 全-L-ボリメラーゼdpo4 (合成)、10 ng
 4 : 全-L-ボリメラーゼdpo4 (合成)、20 ng

(図12続き)

【図13】

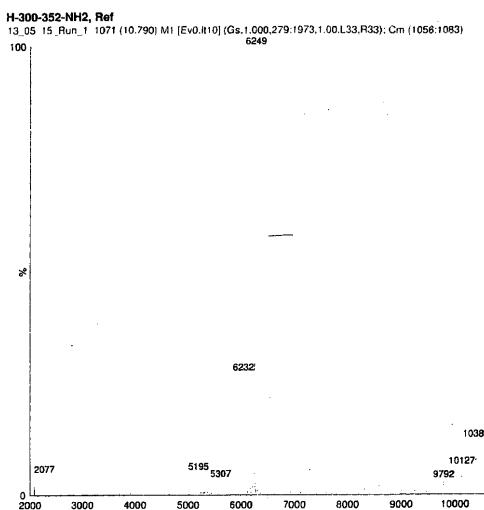


Fig.13

【図14】

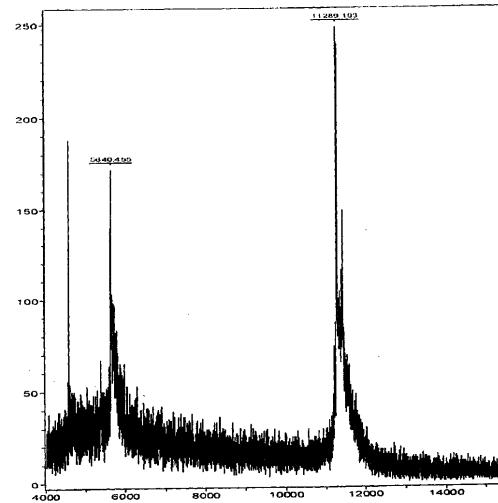


Fig.14

【図15】

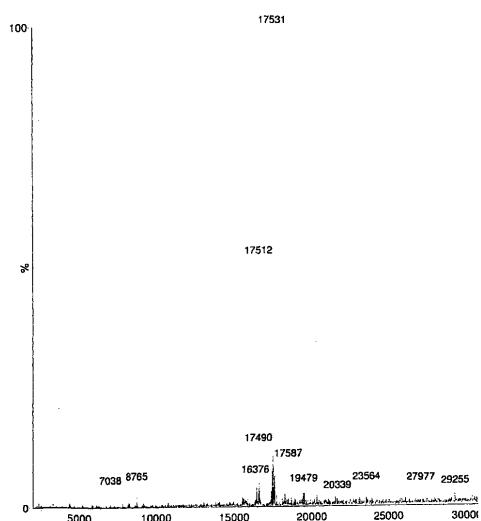
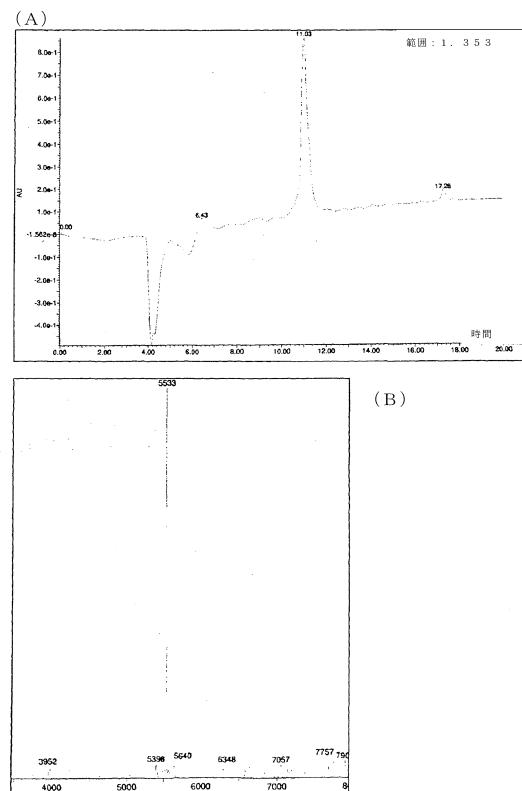
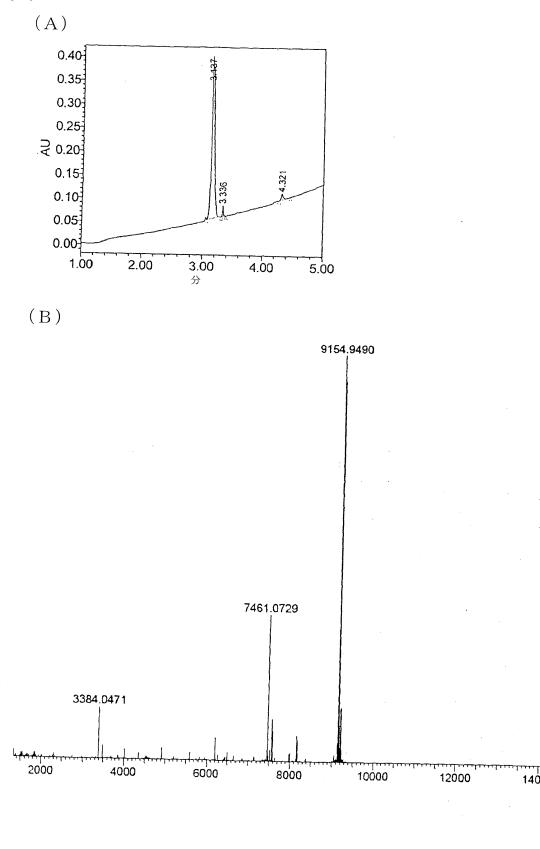


Fig.15

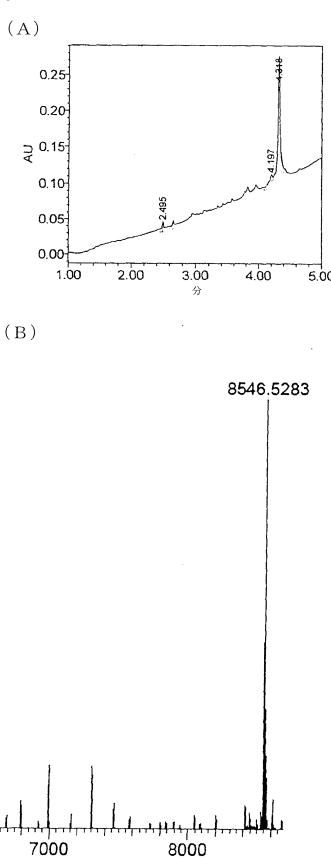
【図16A-B】



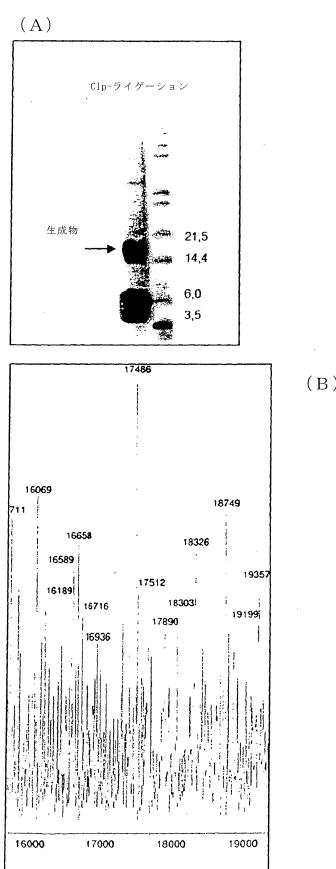
【図 17 A - B】



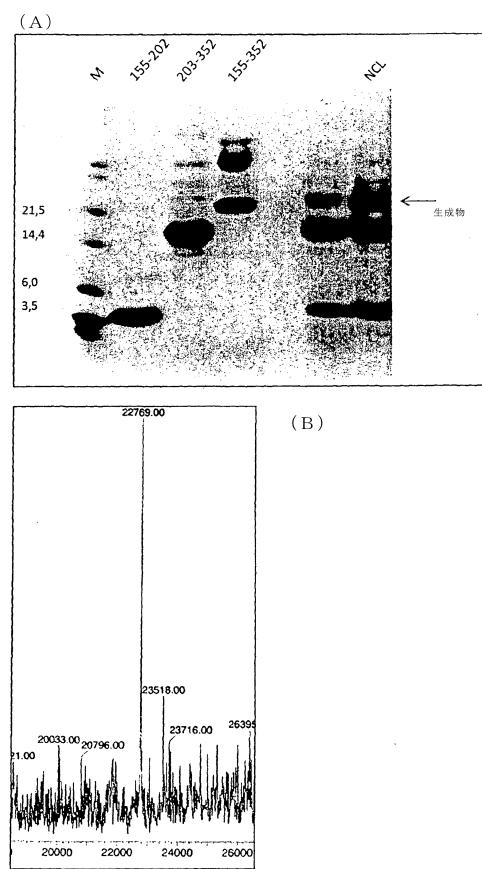
【図 18 A - B】



【図 19 A - B】



【図 20 A - B】



フロントページの続き

(72)発明者 デイビッド , ラルフ
ドイツ国 , 0 4 1 0 7 ライブツィヒ , コーレンシュトラーセ 18
(72)発明者 ジャロシュク , フロリアン
ドイツ国 , 1 3 4 6 9 ベルリン , ダスターハウプシュトラーセ 42
(72)発明者 ヤンツ , マイケル
ドイツ国 , 1 3 4 3 9 ベルリン , クイックボーナー シュトラーセ 81
(72)発明者 クラスマン , スヴェン
ドイツ国 , 1 0 5 8 5 ベルリン , スラソルシュトラーセ 1

審査官 金田 康平

(56)参考文献 國際公開第98/008856 (WO , A2)
國際公開第03/047743 (WO , A2)
國際公開第03/035665 (WO , A1)
國際公開第03/020969 (WO , A2)
國際公開第2006/028496 (WO , A2)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12N 15/00 - 15/90
C 12P 1/00 - 41/00
C 07K 1/00 - 19/00
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)