

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3679536号
(P3679536)

(45) 発行日 平成17年8月3日(2005.8.3)

(24) 登録日 平成17年5月20日(2005.5.20)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/00

C 0 7 K 14/00

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 9/12

請求項の数 5 (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平9-19248 (22) 出願日 平成9年1月31日(1997.1.31) (65) 公開番号 特開平10-210979 (43) 公開日 平成10年8月11日(1998.8.11) 審査請求日 平成15年2月21日(2003.2.21)</p> <p>微生物の受託番号 FERM P-16052</p>	<p>(73) 特許権者 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号</p> <p>(73) 特許権者 597014682 土居 洋文 千葉県船橋市夏見5-29-4-515</p> <p>(73) 特許権者 500520628 セレスター・レキシコ・サイエンス株式 会社 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕 張テクノガーデンD17</p> <p>(74) 代理人 100093230 弁理士 西澤 利夫</p> <p>(72) 発明者 土居 洋文 千葉県船橋市夏見5-29-4-515 最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 耐熱性DNA合成酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列からなる耐熱性DNA合成酵素。

【請求項2】

配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項3】

請求項2のDNAを含むクローニングベクター。

【請求項4】

大腸菌HMS174(DE3)/pDP320(FERM P-16052)が保有する組換え体プラスミドpDP320。

【請求項5】

請求項2のDNAを含む発現ベクターにより形質転換した細胞を培養し、培地中に産生された目的酵素を単離・精製することを特徴とする耐熱性DNA合成酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、DNA鎖の試験管内での合成や増幅、塩基配列の決定等に用いる新規な耐熱性DNA合成酵素と、この酵素をコードするDNA配列、並びにこのDNA合成酵素の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】

DNA合成酵素(DNA polymerase)は1本鎖DNAに相補的なDNA鎖の合成を触媒する酵素の総称である。DNAの塩基配列決定や試験管内でのDNA増幅などには必須の酵素であるが、特にPCR(Polymerase chain reaction)においては、その一連の反応サイクルを自動化する上で「耐熱性DNA合成酵素」は不可欠である。

【0003】

このような耐熱性DNA合成酵素としてはTaq、Pfu、KOD等が知られており、それぞれの特性に応じて使い分けられている。しかしながら、これら既存の耐熱性DNA合成酵素を用いたPCR等のDNA合成の場合には、鋳型となるDNA鎖によっては、合成されるDNA鎖の伸長が途中で停止してしまい、鋳型DNA鎖の全領域の増幅や、その塩基配列の決定が困難もしくは不可能となるという問題を有していた。また、合成停止による不完全なDNA断片がPCR産物中に混入する場合には、目的とする増幅断片を精製しなければならないという不都合も存在した。

10

【0004】

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、DNA鎖をPCR等により合成、増幅するに際して、合成鎖の伸長を途中で停止させることなく、鋳型DNA鎖の全長を効率よく増幅することのできる新規な耐熱性DNA合成酵素を提供することを目的としている。

またこの発明は、この耐熱性DNA合成酵素をコードするDNA配列と、このDNA配列の発現産物として耐熱性DNA合成酵素を製造する方法を提供することを目的としてもい

20

【0005】**【課題を解決するための手段】**

この発明は、上記の課題を解決するものとして、配列番号1のアミノ酸配列からなる耐熱性DNA合成酵素(請求項1)を提供する。

またこの発明は、配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA(請求項2)と、このDNAを含むクローニングベクター(請求項3)を提供する。このようなクローニングベクターとしては、大腸菌HMS174(DE3)/pDP320(FERM P-16052)が保有する組換え体プラスミドpDP320(請求項4)をも提供する。

【0006】

さらにまた、この発明は、上記請求項2のDNAを含む発現ベクターにより形質転換した細胞を培養し、培地中に産生された目的酵素を単離・精製することを特徴とする耐熱性DNA合成酵素の製造方法(請求項5)を提供する。

30

【0007】**【発明の実施の形態】**

この発明の耐熱性DNA合成酵素は、具体的には、ピロコッカスフリオサス(Pyrococcus furiosus)由来のPfuDNA合成酵素を公知の変異遺伝子作成法(Strategies, vol 9, p3-4, 1996)によって遺伝子工学的に改変した酵素である(以下、この発明の耐熱性DNA合成酵素を「改変型PfuDNA合成酵素」と記載することがある)。この酵素の作成は以下のとおりに行なった。すなわち、PfuDNA合成酵素の遺伝子は塩基配列が公知であるため、その両端に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして、上記細菌のゲノムDNAを鋳型とするPCR法によりPfuDNA合成酵素の遺伝子を調製した。この遺伝子DNA断片をベクターにクローニングし、上記文献に記載の方法により変異させた。遺伝子の変異は、PfuDNA合成酵素のアミノ酸配列の一部がKODDNA合成酵素のアミノ酸配列に置き変わるように塩基を置換させた。PfuDNA合成酵素とKODDNA合成酵素は、アミノ酸配列が約80%相同であり、PCRの際に同様の合成停止を生じさせるが(図1)、KODDNA合成酵素の伸長速度はPfuDNA合成酵素のその6~10倍である。そこで、PfuDNA合成酵素のアミノ酸残基をKODDNA合成酵素のアミノ酸残基に置換することによって、合成鎖の伸長停止が改善され、しかも伸長速度の速い酵素が得られる可能性があるからである。そして、このようにして変異させた遺伝子を大腸

40

50

菌で発現させ、その発現産物を回収し、精製することによってこの発明の改変型 PfuDNA 合成酵素を得た。

【0008】

実際には、この発明の発明者等は、上記の方法により数多くの改変型 PfuDNA 合成酵素を作成し、それぞれについて DNA 合成実験をおこない、伸長した DNA 鎖を電気泳動的に解析することによって、従来酵素に比べて合成鎖の伸長停止が著しく改善された DNA 合成酵素を得、この発明を完成させた。

この DNA 合成酵素は、配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有しており、このアミノ酸配列は、従来公知の PfuDNA 合成酵素のアミノ酸配列のうち、表 1 に示すアミノ酸残基が置換された新規な配列である。そして、この新規酵素を用いて PCR 等の DNA 合成を行なった場合には、下記の実施例に示すように、従来の DNA 合成酵素を用いた場合に生じる合成停止がほぼ完全に解消される。もちろん従来酵素によって効率よく増幅される DNA 鎖は同様に効率良く増幅することができる。

【0009】

【表 1】

位置	野生型 アミノ酸		改良型 アミノ酸
2	Ile	→	Val
533	Phe		Tyr
538	Leu		Ile
540	Ile		Ser
545	Leu		Phe
546	Tyr		Phe

【0010】

また、この改変型 PfuDNA 合成酵素をコードする DNA 配列としては、上記の酵素作成過程で得られた PfuDNA 合成酵素遺伝子の変異遺伝子を例示することができる。この変異遺伝子は組換え体プラスミド pDP320 にクローニングされており、この pDP320 は大腸菌 HMS174(DE3) に導入され、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（寄託番号 FERM P-16052）。ただし、この発明の DNA 合成酵素はそのアミノ酸配列が配列番号 1 であることを必要かつ十分な要件とするものであり、そのような酵素をコードする遺伝子は、配列番号 1 の各アミノ酸残基に対応する塩基コドンをつなぎ合わせた DNA 配列として適宜にデザインすることができる。

【0011】

以下、実施例を示し、この発明の DNA 合成酵素についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0012】

【実施例】

実施例 1：改変型 PfuDNA 合成酵素遺伝子の作成

(1) PfuDNA 合成酵素遺伝子のクローニング

PfuDNA 合成酵素遺伝子の塩基配列 (Nucleic Acids Research, vol.21, p259-265, 1993) に従って PCR プライマーを合成し、ピロコッカスフリオサス (*P. furiosus*) のゲノム DNA を鋳型とする PCR によって目的遺伝子を増幅し、これを大腸菌用の発現ベクターにクローニングした。詳細は以下のとおりである。

【0013】

P. furiosus DSM3638を上記文献に記載された方法で培養した。先ず、文献記載の培地を調製し、高温加圧滅菌ののち、蜜素ガスを吹き込み、植菌して95 °Cで15時間静置培養した。200mlの培養液から遠心分離により約0.5mgの菌体を得た。集菌体を緩衝液A (10mMトリス-HCl, pH8.0, 1mMEDTA, 100mM NaCl)に懸濁し、10% SDSを1ml加え、攪拌の後、プロテイナーゼKを0.5mg加えて55 °Cで60分反応させた。反応液を順次フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出し、エタノールを加えてDNAを不溶化し、回収した。得られたDNAを1mlのTEバッファ (10mMトリス-HCl, pH8.0, 1mMEDTA)に溶解し、0.5mgのRNase Aを加えて37 °Cで60分反応させたのち、再度フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出し、エタノール沈殿でDNAを回収してTEバッファに溶解させ、約0.3mgのDNAを得た。

10

【0014】

次いで、目的のDNA合成酵素遺伝子をPCR増幅するために、既知の配列データをもとに配列番号2および3に示す2種のプライマ-DNAを合成した。すなわち、フォワードプライマー配列中には目的遺伝子の開始コドンATGおよび制限酵素NcoI配列(5'-CCATGG-3')を導入し、リバースプライマーは終止コドンの下流の適当な位置に結合するように設計した。PCRは、*P. furiosus* DNA 2 µgとプライマー各10pmolを用い、LA Taq (宝酒造)と添付のバッファ条件で、50 µlの反応系で行った。サイクル条件は、酵素を加える前に93 °C/3分を行い、94 °C/0.5分、55 °C/0.5分、72 °C/1.0分を30サイクルした。増幅したDNA断片を精製し、NcoIで処理した後、同じくNcoIで切断後に平滑末端化し、さらにNcoI処理した発現ベクターpET15-bのT7プロモーター下流に組み込んだ。この発現ベクターをpDPWT100とし、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

20

(2) PfuDNA合成酵素遺伝子の改変

クローン化したPfuDNA合成酵素遺伝子を組み込んだ発現ベクターpDPWT100に対して、期待する変異を含んだオリゴヌクレオチド(配列番号4および5)とプロメガ社の突然変異導入キットを用い、公知の方法(Strategies, vol 9, p3-4, 1996)に従って改変型PfuDNA合成酵素の遺伝子を、発現ベクターpDPWT100上で作成し、発現ベクターpDP320を構築した。なお、この改変型遺伝子の塩基配列を決定することにより、改変型PfuDNA合成酵素のアミノ酸配列(配列番号1)を確認した。

実施例2: 改変型PfuDNA合成酵素の大腸菌での発現と精製

30

実施例1(2)で作成した改変型PfuDNA合成酵素の遺伝子を次のとおりに大腸菌で発現させ、精製した。

【0015】

実施例1(2)で作成した改変型PfuDNA合成酵素遺伝子をもつ発現ベクターpDP320を大腸菌HMS173(DE3)株に導入し、終濃度0.1mMのIPTGを含んだLB培地で14時間培養し、酵素を大腸菌体内に発現誘導した。遠心して菌体を集めた後、150mM Tris/HCl(pH7.5)、2mMEDTA、0.24mMAPMSFおよび0.2%のTween20を含む緩衝液で超音波処理を行いながら、改変型PfuDNA合成酵素を抽出した。この粗抽出液を80 °C、15分の熱処理を行うことで大腸菌由来のDNA合成酵素を失活させると共に、この発明のDNA合成酵素の部分精製を行なった。部分精製画分は50mM Tris/HCl(pH7.5)、1mMEDTA、0.2% Tween20、7mM 2-mercaptoethanol および10% glycerolの緩衝液に対し透析した。この段階で改変型PfuDNA合成酵素に特異的なDNA合成活性を検出した。

40

実施例3: 改変型PfuDNA合成酵素によるプライマー伸長反応

実施例2で部分精製した改変型PfuDNA合成酵素を用い、鋳型DNAに相補的なDNA鎖のプライマー伸長反応を試験した。

【0016】

20mM Tris/HCl(pH8.0)、2mM MgCl₂、50 µg/ml BSA、0.1% Triton X-100、1mMの各cold dNTPs(0.1mM for dCTP)、[³²P] dCTPの10 µCiとM13(-21)のプライマーをアニールさせた0.63 µgのpBLUESCRIPTプラスミドを含む反応液20 µlに、上記の部分精製酵素

50

画分 1 μ g を入れ、75 で 1 分および 3 分間反応させた。伸長した DNA 鎖を 8 M urea を含んだポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、イメージアナライザ - によりそのパターンを解析した。また、対照として、従来の野性型 PfuDNA 合成酵素を用いて、同様の DNA 合成を行なった。

【 0 0 1 7 】

結果は図 2 に示したとおりである。従来の野性型 PfuDNA 合成酵素を用いた場合には、合成停止による不完全な DNA 鎖の存在を示すバンドが少なくとも 10 個観察されたが、この発明の改変型 PfuDNA 合成酵素による DNA 合成では、これらのバンドは消失した。一方、1000 ベース近傍の良く伸長した DNA 鎖の蓄積には差は見られなかった。

【 0 0 1 8 】

【 発明の効果 】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、DNA 鎖を PCR 等によって増幅するに際して、合成鎖の伸長を途中で停止させることなく、鋳型 DNA 鎖の全長を効率よく合成、増幅することのできる新規な耐熱性合成酵素が提供される。これによって、DNA 鎖の試験管内での合成や増幅、塩基配列の決定等を簡便かつ高精度で行なうことが可能となる。

【 0 0 1 9 】

【 配列表 】

配列番号： 1

配列の長さ： 775

配列の型： アミノ酸

配列の種類： タンパク質

配列

10

20

Met Val Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile	
1 5 10 15	
Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg	
20 25 30	
Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile	
35 40 45	
Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg	10
50 55 60	
Ile Val Asp Val Glu Lys Val Glu Lys Lys Phe Leu Gly Lys Pro Ile	
65 70 75 80	
Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile	
85 90 95	
Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr	
100 105 110	20
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro	
115 120 125	
Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr	
130 135 140	
Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile	
145 150 155 160	
Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile	30
165 170 175	
Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys	
180 185 190	
Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr	
195 200 205	
Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu	
210 215 220	40
Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys	

Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Lys Ile Leu Leu	
465	470 475 480
Asp Tyr Arg Gln Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly	
	485 490 495
Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu	
	500 505 510
Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Ile Glu Leu Val Trp Lys Glu	10
	515 520 525
Leu Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly	
	530 535 540
Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly Gly Glu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Lys	
545	550 555 560
Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu	
	565 570 575
Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys	20
	580 585 590
Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly	
	595 600 605
Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln	
	610 615 620
Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala	30
625	630 635 640
Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile	
	645 650 655
Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His	
	660 665 670
Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala	
	675 680 685
Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val	40

690	695	700		
Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu				
705	710	715	720	
Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn				
	725	730	735	
Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg				
	740	745	750	10
Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser				
	755	760	765	
Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser				
770	775			

配列番号：2

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

GTGGGGAGCA CCATGGTTTT AGATGTGGAT TACAT 35

配列番号：3

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

GCATGCAGAT AGACCATTTT TAACGAAGGC GTTTG 35

配列番号：4

配列の長さ：66

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CTCGAAGAAA AGTATGGATT TAAAGTCATC TACAGTGACA CTGATGGTTT CTTTGCAACT 60
ATCCCA 66

配列番号：5

配列の長さ：66

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

10

20

30

40

50

配列

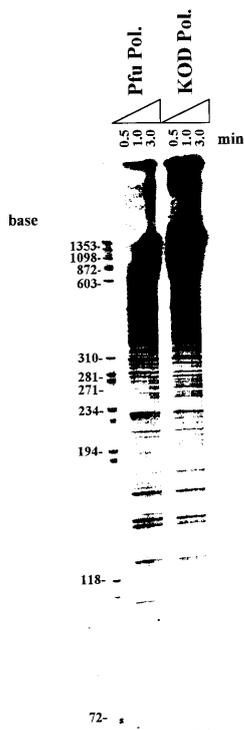
TGGGATAGTT GCAAAGAAAC CATCAGTGTC ACTGTAGATG ACTTTAAATC CATACTTTTC 60
TTCGAG 66

【図面の簡単な説明】

【図1】従来の PfuDNA 合成酵素と KOD DNA 合成酵素のプライマー伸長活性を示す電気泳動の結果である。

【図2】従来の PfuDNA 合成酵素（野生型）とこの発明の改変型 PfuDNA 合成酵素のプライマー伸長活性を示す電気泳動の結果である。

【図1】



【図2】



