

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5241493号
(P5241493)

(45) 発行日 平成25年7月17日(2013.7.17)

(24) 登録日 平成25年4月12日(2013.4.12)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12
C O 7 K	19/00 (2006.01)	C O 7 K	19/00
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19

請求項の数 11 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-521706 (P2008-521706)	(73) 特許権者	399117121
(86) (22) 出願日	平成18年7月17日(2006.7.17)		アジレント・テクノロジーズ・インク
(65) 公表番号	特表2009-501530 (P2009-501530A)		AGILENT TECHNOLOGIES, INC.
(43) 公表日	平成21年1月22日(2009.1.22)		アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタクララ スティーブンス・クリーク・ブルバード 5301
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/027739	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開番号	W02007/011891		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開日	平成19年1月25日(2007.1.25)	(74) 代理人	100096769
審査請求日	平成21年7月15日(2009.7.15)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	60/699,937	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成17年7月15日(2005.7.15)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA結合タンパク質-ポリメラーゼのキメラ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNA結合領域およびポリメラーゼ領域を含むキメラDNAポリメラーゼであって、前記DNA結合領域が配列番号2においてE13Q、I16T、T40S、V45L、L55V、Q56D、およびK63Rの変異を有し、かつ、前記ポリメラーゼ領域がPfu DNAポリメラーゼを有する、キメラDNAポリメラーゼ。

【請求項2】

前記ポリメラーゼ領域が配列番号18のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のキメラDNAポリメラーゼ。

【請求項3】

配列番号20のアミノ酸配列を有する、キメラDNAポリメラーゼ。

【請求項4】

請求項1~3のいずれか一項に記載のキメラDNAポリメラーゼを含む組成物。

【請求項5】

請求項1~3のいずれか一項に記載のキメラDNAポリメラーゼをコードする、単離された核酸。

【請求項6】

請求項5に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項7】

請求項6に記載のベクターで形質移入される、宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキメラ DNA ポリメラーゼ、およびそのための包装材料を含むキット。

【請求項 9】

a) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキメラ DNA ポリメラーゼを提供するステップと、

b) 前記キメラ DNA ポリメラーゼを核酸鋳型に接触させることで、前記酵素の DNA 合成を可能にするステップと、

を含む、DNA を合成する方法。

【請求項 10】

前記 P f u DNA ポリメラーゼが、ウラシル検知活性の低下をもたらす V 9 3 R、V 9 3 E、V 9 3 D、V 9 3 K または V 9 3 N 変異を有する、請求項 1 に記載のキメラ DNA ポリメラーゼ。

【請求項 11】

前記 P f u DNA ポリメラーゼが、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性低下をもたらす D 1 4 1 A および / または E 1 4 3 A 変異を有する、請求項 1 に記載のキメラ DNA ポリメラーゼ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は米国特許法第 119 条 (e) の下で、参照によってその全体を本明細書に援用する 2005 年 7 月 15 日に出願された米国仮特許出願第 60 / 699, 937 号明細書に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

DNA ポリメラーゼの特性を改変する 1 つの方法は、必要な活性を有する 1 つ以上のタンパク質領域と DNA ポリメラーゼが組み合わさったキメラ DNA ポリメラーゼを発生させることである。パブロフら (Pavlov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 13510 ~ 13515 頁 (2002 年)) に記載されるように、DNA ポリメラーゼは DNA トポイソメラーゼ V のヘリックス - ヘアピン - ヘリックス DNA 結合モチーフにフレーム中で結合して、キメラ DNA ポリメラーゼの伸長能、塩抵抗性、および熱安定性が増大されることが示されている。また、参照することにより全体が本明細書に含まれる国際特許出願公開第 01 / 92501 A1 号パンフレットおよび米国特許出願公開第 2004 / 0081963 A1 号明細書で開示されるように、スルホロブス・ソルファタリカス (Sulfolobus solfataricus) 由来の野生型 S s o 7 d または S a c 7 d の配列非特異的 DNA 結合タンパク質と、P f u または T a q DNA ポリメラーゼなどの DNA ポリメラーゼとの融合は、これらの DNA ポリメラーゼの伸長能を大幅に増大させることが示された。

【発明の開示】

【0003】

本発明は、第 1 の領域および第 2 の領域を含むキメラ DNA ポリメラーゼに関する。第 1 の領域は、変異型または野生型 DNA ポリメラーゼポリペプチドを含み、第 2 の領域は変異 DNA 結合ポリペプチドを含む。DNA 結合領域は完全な DNA 結合ポリペプチド配列、またはその断片を含んでもよい。同様に DNA ポリメラーゼ領域は、完全な DNA ポリメラーゼポリペプチド配列、またはその断片を含んでもよい。

【0004】

第 1 の態様において、本発明は DNA 結合領域および DNA ポリメラーゼ領域を有するキメラ DNA ポリメラーゼに関する。キメラ DNA ポリメラーゼの DNA 結合領域は、配列番号 2 の 13、16、40、41、45、55、56、61 または 63 からなる群から

10

20

30

40

50

選択される1つ以上のアミノ酸、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応する位置が変異される。

【0005】

関連する態様において、本発明はDNA結合領域およびDNAポリメラーゼ領域を有するキメラDNAポリメラーゼに関する。キメラDNAポリメラーゼのDNA結合領域は、配列番号2のアミノ酸位置13、16、40、45、55、56、および63、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応する位置が変異される。

【0006】

別の態様において、本発明はDNA結合領域およびポリメラーゼ領域を有するキメラDNAポリメラーゼを提供する。この態様では、DNA結合領域は配列番号2のアミノ酸位置13、16、40、41、45、55、56、61、および63、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応する位置が変異される。

10

【0007】

さらに別の態様において、本発明はDNA結合領域およびDNAポリメラーゼ領域を有するキメラDNAポリメラーゼに関する。この態様では、DNA結合領域は配列番号4のアミノ酸配列を含む。

【0008】

本発明のなお別の態様では、本発明はDNA結合領域が配列番号6のアミノ酸配列を含むDNA結合領域およびポリメラーゼ領域を含む、キメラDNAポリメラーゼを提供する。

20

【0009】

本発明のさらに別の態様では、本発明は、DNA結合領域およびポリメラーゼ領域を含むキメラDNAポリメラーゼを提供する。DNAポリメラーゼ領域はP f u DNAポリメラーゼポリペプチドを含み、DNA結合領域は変異S s o 7 d DNA結合ポリペプチドを含む。

【0010】

本発明のさらに別の態様では、本発明は、キメラDNAポリメラーゼが配列番号20のアミノ酸配列を含むDNA結合領域およびポリメラーゼ領域を含む、キメラDNAポリメラーゼを提供する。

【0011】

本発明の別の態様では、本発明は、本発明のキメラDNAポリメラーゼを提供するステップと、キメラDNAポリメラーゼと核酸テンプレートとを接触させるステップとを含む、DNAを合成する方法を提供する。

30

【0012】

本発明のさらに別の態様では、本発明は、ここで述べるキメラDNAポリメラーゼをコードする核酸を発現することによって、キメラDNAポリメラーゼを生成する方法を提供する。

【0013】

本発明のさらに別の態様では、本発明は、本発明のキメラDNAポリメラーゼを含む組成物およびキットを提供する。キットは上記の組成物のいずれか1つ、およびそのための包装材料を含む。別の態様において、本発明は、ここで述べるキメラDNAポリメラーゼをコードする核酸およびベクターと、そのベクターで形質転換された宿主細胞とを提供する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

定義

ここで定義される「キメラDNAポリメラーゼ」とは、変異DNA結合領域を含む第2のアミノ酸配列に結合する、本発明の野生型または変異DNAポリメラーゼ領域を含む、第1のアミノ酸配列との融合物である。本発明のキメラDNAポリメラーゼは、新しい機能性タンパク質を形成するように結合した、非関連タンパク質からの2つ以上のアミノ酸

50

配列（例えば野生型または変異DNAポリメラーゼ領域をコードする配列と、変異DNA結合領域をコードするポリペプチド）を含有する。一実施形態では、本発明のキメラDNAポリメラーゼは、Pfu DNAポリメラーゼに由来する第1のアミノ酸配列、および変異Sso7d DNA結合タンパク質に由来する第2のアミノ酸配列を含む。本発明は、DNA結合領域ポリペプチドが、ここで述べる野生型または変異DNAポリメラーゼ領域のN末端またはC末端で結合する、またはあらゆる内部位置に挿入される、キメラDNAポリメラーゼを包含する。

【0015】

「領域」とは、ポリペプチド部分配列、ポリペプチド全配列、または複数のポリペプチド配列を含む、タンパク質またはタンパク質複合体の単位を指す。

10

【0016】

ここでの用法では「ポリメラーゼ領域」という語句は、ヌクレオチド重合を触媒するタンパク質領域を指す。ポリメラーゼ領域は、ここで述べる核酸ポリメラーゼおよび当該技術分野で知られているものを含む。

【0017】

ここで「ポリメラーゼ」とは、ヌクレオチド重合を触媒する（すなわちポリメラーゼ活性）酵素を指す。一般に酵素は、ポリヌクレオチド鋳型配列にアニールされたプライマーの3'末端で合成を開始し、鋳型鎖の5'末端に向かって進行する。「DNAポリメラーゼ」は、デオキシヌクレオチドの重合を触媒する。一実施形態では、本発明のDNAポリメラーゼは熱安定性である。別の実施形態では、本発明のDNAポリメラーゼは古細菌DNAポリメラーゼである。

20

【0018】

本発明で使用される核酸ポリメラーゼは、中温性または好熱性であってもよく、好ましくは好熱性である。中温性DNAポリメラーゼとしては、T7 DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、クレノウ（Klenow）断片DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼIIIなどを含む。本発明の方法で使用する熱安定性DNAポリメラーゼとしては、Taq、Tne、Tma、Pfu、Tfl、Tth、ストッフエル（Stoffel）断片、VENT（商標）およびDeep Vent（商標）DNAポリメラーゼ、KOD、Tgo、JDF3、およびその変異体、変異型、および誘導体が挙げられる（米国特許第5,436,149号明細書；米国特許第4,889,818号明細書；米国特許第4,965,185号明細書；米国特許第5,079,352号明細書；米国特許第5,614,365号明細書；米国特許第5,374,553号明細書；米国特許第5,270,179号明細書；米国特許第5,047,342号明細書；米国特許第5,512,462号明細書；国際特許出願公開第92/06188号パンフレット；国際特許出願公開第92/06200号パンフレット；国際特許出願公開第96/10640号パンフレット；バーズ、W.M.（Barnes, W.M.）、Gene 112:29~35頁（1992年）；ローヤー、F.C.（Lawyer, F.C.）ら、PCR Meth. Appl. 2:275~287頁（1993年）；フラマン、J.-M（Flaman, J.-M）ら、Nuc. Acids Res. 22(15)、3259~3260頁（1994年）。

30

40

【0019】

ここでの用法では、「古細菌」DNAポリメラーゼとは、ファミリーB/pol I型群（例えばPfu、KOD、Pfx、Vent、Deep Vent、Tgo、Pwo）またはpol II群（例えばパイロコッカス・フリオサス（Pyrococcus furiosus）DP1/DP2 2-サブユニットDNAポリメラーゼ）のどちらかに属するDNAポリメラーゼを指す。一実施形態では「古細菌」DNAポリメラーゼとは、パイロコッカス種（フリオサス、GB-D種、ウーセイ（woesii）、アビシ（abyssi）、ホリコシ（horikoshii））と、サーモコッカス（Thermococcus）種（コダカレンシス（kodakaraensis）KOD1、リトラリス（litoralis）、ナイン・ディグリーズ・ノース（9 degrees No

50

rth) - 7種、JDF - 3種、ゴルゴナリアス(*gorgonarius*)と、ピロディクティウム・オカルタム(*Pyrodictium occultum*)と、アーケオグロブス・フルギダス(*Archaeoglobus fulgidus*)から単離されるDNAポリメラーゼを含む熱安定性古細菌DNAポリメラーゼ(PCR可能)を指すが、これらに限定されるものではない。適切な古細菌は>80 - 85の最大生育温度、または>70 - 80の最適生育温度を示すことが推定される。Pfu(ストラタジーン(*Stratagene*))、KOD(東洋紡(*Toyobo*))、Pfx(ライフ・テクノロジーズ・インコーポレーテッド(*Life Technologies, Inc.*))、Vent(ニュー・イングランド・バイオラプス(*New England Biolabs*))、Deep Vent(ニュー・イングランド・バイオラプス(*New England Biolabs*))、Tgo(ロシュ(*Roche*))、および、Pwo(ロシュ)を含む、古細菌pol I DNAポリメラーゼ群からの適切なPCR酵素が市販されている。上記に記載したものと関連するさらなる古細菌は、次の参考文献に記載される:ロブ, F.T. (Robb, F.T.)およびブレース, A.R. (Place, A.R.)編、「古細菌:実験室マニュアル(*Archaea: A Laboratory Manual*)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1995年)。

【0020】

ここで「熱安定性」とは、例えば同様の活性がある非熱安定性形態の酵素と比べて、熱に対して安定で耐熱性であって、例えば50~100などの高温で機能する酵素を指す。例えばP.フリオサス(*P. furiosus*)、M.ジャナシイ(*M. jannaschii*)、A.フルギダス(*A. fulgidus*)またはP.ホリコシ(*P. horikoshii*)などの好熱性生物に由来する熱安定性核酸ポリメラーゼは、大腸菌(*E. coli*)の核酸ポリメラーゼと比べて、高温でより安定しており活性がある。P.フリオサスから単離された代表的な熱安定性核酸ポリメラーゼ(Pfu)については、ランドバーク(*Lundberg*)ら、Gene、108:1~6頁(1991年)に記載されている。さらに別の代表的な温度安定性ポリメラーゼとしては、例えば好熱性細菌サーマス・フラバス(*Thermus flavus*)、サーマス・ルバー(*Thermus ruber*)、サーマス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*)、バシラス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*) (これは一覧の他のものよりもいくらか低い最適温度を有する)、サーマス・ラクテウス(*Thermus lacteus*)、サーマス・ルーベンス(*Thermus rubens*)、サーモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)、または好熱性古細菌サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)およびメタノサーマス・フェルビズス(*Methanothermobacter fervidus*)から抽出されたポリメラーゼを含む。

【0021】

二重鎖核酸がPCRサイクル中に高温(約95)への曝露によって変性される熱サイクル工程では、温度安定性ポリメラーゼが好ましい。

【0022】

ここで「変異DNAポリメラーゼ」とは、DNA重合活性、塩基類似体検知活性、3' - 5'または5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性、処理能力改良ヌクレオチド類似体組み込み活性、ブルーフリーディング、忠実度、効率、特異性、室温での熱安定性および内的ホットスタート能力またはDNA重合低下、トリヌクレオチド反復伸長またはホモポリマー伸長がある鋳型上の増幅スリッページ低下、増幅サイクル減少、伸長時間減少、阻害剤(例えば高塩分、核酸精製試薬)に対する感受性低下、最適反応条件の変化(例えばpH、KCL)、およびここで述べる用途に必要なポリメラーゼ量の減少を含むが、これらに限定されるものではないと定義される1つ以上のDNAポリメラーゼ活性を調節する1つ以上の変異を含む、と定義されるDNAポリメラーゼを指す。

【0023】

ここで用語「DNA結合領域」は、S s o 7 dポリペプチドまたはS s o 7 d様ポリペプチド中に1つ以上の変異を含む、核酸およびポリペプチド変異体および種間相同体を指す。S s o 7 d様ポリペプチドは、S a c 7 d、S a c 7 e、S s h 7 b、R i b o P 3、S t o 7 e、およびS a c 7 aを含む。一実施形態ではDNA結合領域は、配列番号2、4、6、8、9、10、12、14および16のアミノ酸配列中に、1またはそれ以上の変異を有する。変異は配列番号2のアミノ酸位置13、16、40、41、45、55、56、61または63、およびその相同体中の対応するアミノ酸残基に起きる。本用語は、配列非特異的二重鎖DNA結合活性を有する全長ポリペプチドとポリペプチド断片の両方を含む。DNA結合領域については、どちらも参照によってその全体が本明細書に引用される、国際特許出願公開第W O 0 1 / 9 2 5 0 1号および米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 2 1 9 5 5 8号明細書中に記載される。

10

【0024】

ここで「結合した」とは、ポリペプチド領域を機能性に結合するために当該技術分野で知られているあらゆる方法を指し、介在性領域ありまたはなしの組み換え融合、インテン媒介融合、非共有結合会合、およびジスルフィド結合を含む共有結合、水素結合、静電結合、および立体配座結合が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0025】

用語「対応する」は、タンパク質配列間または領域間の類似性または相同性の文脈で使用される場合、第1のポリペプチド中の特定位置のアミノ酸が、第1のポリペプチドと最適大域配列アラインメントにある第2のポリペプチド中の対応するアミノ酸と同一または類似であることを意味する。最適大域アラインメントは、例えばニードルマン・ブンスユ・アルゴリズム(ニードルマン(Needleman)およびブンスユ(Wunsch)、J. Mol. Biol. 48: 443~453頁(1970年))を使用して得られる。「同一性」とは、第1のポリペプチド中の特定位置のアミノ酸が第1のポリペプチドまたはポリヌクレオチドと最適大域アラインメントにある、第2のポリペプチド中の対応するアミノ酸またはヌクレオチドと同一であることを意味する。同一性とは対照的に、「類似性」は同類置換であるアミノ酸を包含する。「同類」置換とは、ブロサム62(Blosum62)置換マトリックスに正のスコアを有するあらゆる置換である(ヘンチコフ(Hentikoff)およびヘンチコフ(Hentikoff)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915~10919頁(1992年))。一般的な同類置換は、Met、Val、Leu、およびIle間、SerおよびThr間、Asp、Glu、およびAsn残基間、Gln、Lys、およびArg残基間、または芳香族残基PheおよびTyr間に見られる。

20

30

【0026】

「対応する」配列または領域を判定するのに有用な、ポリペプチドアラインメントのためのニードルマン・ブンスユ・アラインメントアルゴリズムを使用した、最適大域配列アラインメントのパラメーターの例は、次のとおりである。置換マトリックス:ブロサム62、ギャップスコア機能: $-A - B^* LG$ (式中、 $A = 11$ (ギャップペナルティ)、 $B = 1$ (ギャップ長ペナルティ)、および LG はギャップ長である)。ニードルマン・ブンスユ・アルゴリズムとこれらのパラメーターを使用して、または当該技術分野で知られているその他のアラインメントソフトウェアを使用して、当業者は特定のアミノ酸、アミノ酸配列、または例えばS s o 7 d (配列番号2)などの特定のDNA結合タンパク質の配列領域が、アミノ酸、アミノ酸の配列または例えばここで開示されるS s h 7 b (配列番号8)などのS s o 7 d様DNA結合タンパク質の配列領域に「対応する」かどうかを容易に判定できる。

40

【0027】

ここで用語「鋳型DNA分子」は、例えばプライマー伸長反応において、DNAポリメラーゼによって相補的核酸鎖がそれから合成される核酸鎖を指す。

【0028】

ここで「増幅産物」とは、PCR増幅反応の終了時の二重鎖ポリヌクレオチド集団を指

50

す。増幅産物は、元のポリヌクレオチド鋳型と、PCR反応中にポリヌクレオチド鋳型からDNAポリメラーゼによって合成されるポリヌクレオチドとを含有する。

【0029】

ここで、用語「プライマー」は、ポリヌクレオチド鋳型とハイブリダイズして、第2のポリヌクレオチド鎖の酵素的合成を刺激できる一本鎖DNAまたはRNA分子を指す。本発明に従った有用なプライマーは、10～100ヌクレオチド長、好ましくは17～50ヌクレオチド長、より好ましくは17～45ヌクレオチド長である。

【0030】

「相補的」とは、2つのポリヌクレオチド鎖領域間、または塩基対を通じた2つのヌクレオチド間の、配列相補性の幅広い概念を指す。アデニンヌクレオチドは、チミンまたはウラシルであるヌクレオチドと特異的水素結合（「塩基対」）を形成できることが知られている。同様にシトシンヌクレオチドは、グアニンヌクレオチドと塩基対合できることが知られている。

【0031】

用語「野生型」は、自然界に存在する原料から単離された際に、その遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する遺伝子または遺伝子産物を指す。対照的に、用語「改変された」または「変異」は、野生型遺伝子または遺伝子産物と比べて、変更された特徴を示す遺伝子または遺伝子産物を指す。例えば変異DNA結合領域は、野生型DNA結合領域とは異なる核酸およびアミノ酸配列を示す。

【0032】

ここで「細胞」、「細胞系」、および「細胞培養」という用語は同義的に使用でき、このような命名は全て後代を含む。したがって用語「形質転換体」または「形質転換細胞」は、転移数に関わらず初代検体細胞とそれに由来する培養物を含む。意図的または不注意な変異のために、全子孫がDNA含量において正確に同一でないかもしれないこともまた理解される。元の形質転換細胞中でのスクリーニングにより同一機能性を有する変異後代もまた含まれる。

【0033】

ここで用語「ベクターで形質転換された生物」または「ベクターで形質転換された細胞」は、組み換え遺伝子構築物を保有する生物または細胞を指す。

【0034】

ここで用語「組換え体」は、遺伝子操作によって（すなわちポリヌクレオチドまたはポリペプチドをコードする遺伝物質の改変または操作によって）、改変されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。

〔発明の詳細な説明〕

【0035】

本発明は、第1の領域および第2の領域を含むキメラDNAポリメラーゼに関する。第1の領域は変異型または野生型DNAポリメラーゼポリペプチドを含み、第2の領域は変異DNA結合ポリペプチドを含む。第1の態様では、本発明は、DNA結合領域およびDNAポリメラーゼ領域を有するキメラDNAポリメラーゼに関する。キメラDNAポリメラーゼのDNA結合領域は、S s o 7 d（配列番号2）の位置13、16、40、41、45、55、56、61または63、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応する位置の、1つ以上のアミノ酸が変異される。一実施形態では、DNA結合領域の1つ以上の変異は、配列番号2のE 1 3 Q、I 1 6 T、T 4 0 S、G 4 1 A、V 4 5 L、L 5 5 V、Q 5 6 D、Q 6 1 EまたはK 6 3 R、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応する変異を含む。アミノ酸の変更には、上記の保存的に改変された変異型が含まれる。いくつかの実施形態では、DNA結合領域はS s o 7 d様ポリペプチドを含む。S s o 7 d様ポリペプチドとしては、S s h 7 b（配列番号8）、R i b o P 3（配列番号9）、S t o 7 e（配列番号10）、S a c 7 d（配列番号12）、S a c 7 e（配列番号14）、およびS a c 7 a（配列番号16）を含む。

【0036】

関連する態様としては、本発明は、DNA結合領域およびDNAポリメラーゼ領域を有するキメラDNAポリメラーゼに関する。キメラDNAポリメラーゼのDNA結合領域は、配列番号2のアミノ酸位置13、16、40、45、55、56、および63、またはSso7d様タンパク質中の、対応する位置が変異される。この態様の一実施形態ではDNA結合領域中の変異は、配列番号2のE13Q、I16T、T40S、V45L、L55V、Q56D、およびK63R、またはSso7d様タンパク質中の対応する変異を含む。Sso7d様タンパク質は、Ribop3、Sto7e、Sac7d、Sac7eまたはSac7aでもよい。別の実施形態では、Sso7d様タンパク質は、配列番号8、9、12、12、14または16のアミノ酸配列を有する。

【0037】

別の態様では、本発明は、DNA結合領域およびポリメラーゼ領域を含むキメラDNAポリメラーゼを提供する。この態様では、DNA結合領域は配列番号2のアミノ酸位置13、16、40、41、45、55、56、61、および63、またはSso7d様タンパク質中の、対応する位置が変異される。この態様の一実施形態では、DNA結合領域中のアミノ酸変化は、配列番号2のE13Q、I16T、T40S、G41A、V45L、L55V、Q61E、およびK63R、または対応するSso7d様タンパク質中の変化を含む。Sso7d様タンパク質は、Ribop3、Sto7e、Sac7d、Sac7eまたはSac7aであってもよい。別の実施形態では、Sso7d様タンパク質は配列番号8、9、12、12、14または16のアミノ酸配列を有する。

【0038】

さらに別の態様では、本発明はDNA結合領域およびDNAポリメラーゼ領域を有するキメラDNAポリメラーゼに関する。この態様では、DNA結合領域は配列番号4のアミノ酸配列を含む。

【0039】

本発明のさらに別の態様では、本発明は、DNA結合領域が配列番号6のアミノ酸配列を含む、DNA結合領域およびポリメラーゼ領域を含むキメラDNAポリメラーゼを提供する。

【0040】

上記の態様の一実施形態では、DNAポリメラーゼ領域は古細菌DNAポリメラーゼポリペプチドを含む。さらなる実施形態では、古細菌DNAポリメラーゼポリペプチドはPfu DNAポリメラーゼポリペプチドである。さらに別の実施形態では、DNAポリメラーゼポリペプチドはTaq DNAポリメラーゼである。上記の態様のさらに別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼ領域は、配列番号18のアミノ酸配列と少なくともも95%は同一である。

【0041】

ここで述べる態様の別の実施形態では、本発明のキメラDNAポリメラーゼのポリメラーゼ領域は変異DNAポリメラーゼを含む。変異DNAポリメラーゼは、ウラシル非感受性を与える、Pfu DNAポリメラーゼ中のV93R、K、E、D変異を含んでもよい。さらなる実施形態では、変異DNAポリメラーゼはPfu DNAポリメラーゼ中のD141Aおよび/またはE143Aを有し、それは3' - 5'エキソヌクレアーゼ活性をなくす。

【0042】

本発明のさらに別の態様では、本発明は、ここで述べる本発明のキメラDNAポリメラーゼを含む組成物およびキットを提供する。キットはここで述べる組成物のいずれか1つと、そのための包装材料を含む。別の態様では、本発明はここで述べるキメラDNAポリメラーゼをコードする核酸およびベクターと、ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0043】

本発明の最後の態様では、本発明はDNAを合成する方法を提供する。本方法は、ここで述べる本発明の実施形態のいずれかのキメラDNAポリメラーゼを提供するステップと

10

20

30

40

50

、キメラDNAポリメラーゼを核酸鋳型に接触させてキメラDNAポリメラーゼがDNA合成を可能にするステップとを含む。

【0044】

I. Sso7dおよびSso7d様ポリペプチド

本発明のキメラDNAポリメラーゼは、Sso7d(配列番号2)のアミノ酸位置13、16、40、41、45、55、56、61または63、または例えばSsh7b(配列番号8)、Ribop3(配列番号9)、Sto7e(配列番号12)、Sac7d(配列番号12)、Sac7e(配列番号14)およびSac7a(配列番号16)などのSso7d様タンパク質中の対応する位置に、1つ以上の変異を有するDNA結合領域を含む。

10

【0045】

Sso7dは、超好熱性古細菌スルホロブス・ソルファタリカス由来の、小型の塩基性染色体タンパク質である。Sso7dは配列非依存様式でDNAに結合し、結合する場合、条件によってはDNA変性温度を40℃まで増大する(マッカーフィー(McAfee)ら、Biochemistry 34:10063~10077頁(1995年))。野生型タンパク質配列は、配列番号2で記載される。

【0046】

超好熱性古細菌S.アシドカルダリウス(acidocaldarius)からのSac7a、Sac7b、Sac7d、およびSac7e、スルホロブス・シバタエ(Sulfolobus shibatae)からのSsh7aおよびSsh7bをはじめとする、いくつかの既知のSso7d様タンパク質があるが、これらに限定されるものではない。これらのタンパク質は、Sso7dと78%~98%の範囲の同一性を有する。

20

【0047】

Sso7dタンパク質またはSso7d様タンパク質の変異アミノ酸位置は、配列番号2に記載されるSso7d配列を参照して判定される。ここで述べられる変異研究を通じて、本発明のキメラDNAポリメラーゼに悪影響を及ぼすことなく変異可能な残基が同定された。一実施形態では、アミノ酸残基は次の位置の1つ以上で変異される：配列番号2の位置13のグルタミン酸をグルタミン(E13Q)に、配列番号2の位置16のイソロイシンをスレオニン(I16T)に、配列番号2の位置40のスレオニンをセリン(T40S)に、配列番号2の位置41のグリシンをアラニン(G41A)に、配列番号2の位置45のバリンをロイシン(V45L)に、配列番号2の位置55のロイシンをバリン(L55V)に、配列番号2の位置56のグルタミンをアスパラギン酸(Q56D)に、配列番号2の位置61のグルタミンをグルタミン酸(Q61E)に、もしくは配列番号2の位置63のリジンをアルギニン(K63R)に、またはSso7d様タンパク質中の対応する変異。

30

【0048】

これらの命名は、請求の範囲に記載されている分子中のどのアミノ酸残基が変異するかを示す。例えばE13Qは、配列番号2のポリペプチドが配列番号2のアミノ酸位置13で変異して、グルタミン酸からグルタミンへ変更することを示す。同様にSso7d様タンパク質中の対応する位置または変異とは、例えばSsh7bなどのSso7d様タンパク質中の対応するアミノ酸が変異することを意味する。対応するアミノ酸は、配列番号2のSso7dタンパク質が、例えばSsh7bなどのSso7d様タンパク質と最大限に配列比較される場合に同定される。例えばSso7dのE13はSsh7bのE13に対応する(図1)。配列比較は、ここで述べように手動で、または配列比較アルゴリズムを使用して実施しうる。

40

【0049】

配列番号2の位置13、16、40、41、45、55、56、61または63のアミノ酸の変更は、本発明のキメラDNAポリメラーゼの性能に悪影響を及ぼさない。Sso7d様ポリペプチド間で変化する多数のアミノ酸は、Sso7d-キメラDNAポリメラーゼに悪影響を及ぼすことなく変更できないことが観察された。さらにSso7d様タン

50

パク質間で変化しないいくつかのアミノ酸は、S s o 7 d - キメラDNAポリメラーゼの機能性の損失を引き起こすことなしには変更できなかった。

【0050】

配列番号2の位置13、16、40、41、45、55、56、61または63のアミノ酸、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応するアミノ酸は、多様なアミノ酸残基で置換できる。一実施形態では、DNA結合領域の1つ以上の変異は、配列番号2のE13Q、I16T、T40S、G41A、V45L、L55V、Q56D、Q61EまたはK63Rを含む。

【0051】

一実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

10

【0052】

別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置T40S、E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

【0053】

別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置G41A、E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

20

【0054】

別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置V45L、E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質中の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

【0055】

別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置L55V、E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

【0056】

別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置Q56D、E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

30

【0057】

別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置Q56D、T40S、E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

【0058】

別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸位置T40S、V45L、L55V、Q56D、K63R、E13Q、I16T、またはS s o 7 d様タンパク質の対応するアミノ酸のDNA結合領域が変異される。

40

【0059】

一般的に、置換アミノ酸残基は、置換されたアミノ酸と共に保存されたものである。置換された残基は、天然配列中のアミノ酸残基よりも小さな容積をしばしば占める。例えばトリプトファンは、天然のアミノ酸の中で最大容積を占める。したがってトリプトファンは、よりかさばらないアミノ酸、特により小さな空間を占めるアラニン、グリシン、またはバリンなどの残基で置換できる。さらに例えばプロリンなどのポリペプチド中により大きな構造的変化を導入する残基、または例えばシステインなどのこのような変化を導入する能力がある残基は、一般的に避けられる。アミノ酸を置換する際は、電荷および疎水性もまた考慮される。

【0060】

50

その他の S s o 7 d 様部分は、S s o 7 d との配列相同性に基づいて同定できる。一般的に、S s o 7 d 様タンパク質は、S s o 7 d と約 7 8 %、8 0、8 5、9 0 または 9 5 ~ 9 8 % のアミノ酸配列同一性を有する。2 つのアミノ酸配列または 2 つの核酸配列の百分率同一性を判定するために、配列を最適比較目的のために整列させる（例えば第 2 のアミノ酸または核酸配列との最適アラインメントのために、ギャップを第 1 のアミノ酸配列または核酸配列中に導入できる）。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第 1 の配列中の位置が、第 2 の配列中の対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、分子はその位置で同一である。2 つの配列間の百分率同一性は、配列に共通する同一位置の数の関数である（すなわち、百分率同一性 = 同一位置の数 / 位置の総数（例えば重複位置） × 1 0 0）。

10

【 0 0 6 1 】

2 つの配列間の百分率同一性判定は、数学的アルゴリズムを使用して達成できる。2 つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的例は、次のアルゴリズムである：カーリン (Karlín) およびアルシュール (Altschul)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 ~ 2268 頁 (1990 年)、カーリン (Karlín) およびアルシュール (Altschul)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 ~ 5877 頁 (1993 年) により修正。このようなアルゴリズムは、アルシュール (Altschul) ら、J. Mol. Biol. 215: 403 ~ 410 頁 (1990 年) の NBLAST および XBLAST プログラムに組み込まれる。BLAST ヌクレオチド検索は、NBLAST プログラム、スコア = 100、ワード長 = 12 で実施され、本発明の核酸分子に相同的なヌクレオチド配列を得ることができる。BLAST タンパク質サーチは、XBLAST プログラム、スコア = 50、ワード長 = 3 で実施され、本発明のタンパク質分子に相同的なアミノ酸配列を得ることができる。

20

【 0 0 6 2 】

比較目的でギャップドアラインメントを得るために、および S s o 7 d 様タンパク質中のアミノ酸に対応する S s o 7 d 中のアミノ酸を同定するために、アルシュールらに記載の (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 ~ 3402 頁 (1997 年))、ギャップド BLAST を利用できる。あるいは P S I - B l a s t を使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施できる。BLAST、ギャップド BLAST、および P S I - B l a s t プログラムを用いる場合、それぞれのプログラムの初期パラメーター（例えば XBLAST および NBLAST）を使用できる。配列比較で利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的例は、マイヤーズ (Myers) およびミラー (Miller)、CABIOS 4: 11 ~ 17 頁 (1988 年) のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG 配列比較ソフトウェアパッケージの一部である ALIGN プログラム (バージョン 2.0) に組み込まれる。アミノ酸配列を比較するために ALIGN プログラムを使用する際、PAM120 重み残基表 (weight residue table)、ギャップ長ペナルティ 12、およびギャップペナルティ 4 を使用できる。局所配列類似性およびアラインメントの領域を同定するためのさらに別の有用なアルゴリズムは、ピアソン (Pearson) およびリップマン (Lipman)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 ~ 2448 頁 (1988 年) に記載の FASTA アルゴリズムである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するために FASTA アルゴリズムを使用する場合、例えば k 組値 (k-tuple value) 2 と共に PAM120 重み残基表が使用できる。

30

40

【 0 0 6 3 】

II. 発明に従った DNA ポリメラーゼ

本発明は、ポリメラーゼ領域および DNA 結合領域を含むキメラ DNA ポリメラーゼを提供する。ポリメラーゼ領域は、野生型または変異 DNA ポリメラーゼポリペプチドを含

50

むことができる。本発明の有用なDNAポリメラーゼは、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性ありまたはなし、すなわちブルーフリーディングまたは非ブルーフリーディングであり、好ましくは熱安定性である。

【0064】

本発明で有用なさらなる核酸ポリメラーゼを下に列挙する。

【0065】

A. バクテリオファージDNAポリメラーゼ(37 アッセイのために有用) :

5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性は別個のポリペプチドによってコードされるため、バクテリオファージDNAポリメラーゼはこの活性を欠いている。適切なDNAポリメラーゼの例は、T4、T7、および29 DNAポリメラーゼである。市販される酵素はT4 (例えばエピセントレ社(Epicentre)などの多くの供給元から市販される) およびT7 (例えばエピセントレからの無修飾DNAポリメラーゼ、およびUSBからの3' - 5' エキソ T7「シーケナーゼ(Sequenase)」DNAポリメラーゼなどの多くの供給元から市販される) である。

10

【0066】

B. 古細菌DNAポリメラーゼ :

古細菌中で同定されている2つの異なるDNAポリメラーゼのクラスがある: 1) ファミリーB/pol Iタイプ(パイロコッカス・フリオサスからのPfu相同体)、および2) pol IIタイプ(P. フリオサスのDP1/DP2 2-サブユニットポリメラーゼ相同体)。双方のクラスからのDNAポリメラーゼは、付随する5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を元来欠いており、3' - 5' エキソヌクレアーゼ(ブルーフリーディング)活性を有することが示されている。適切なDNAポリメラーゼ(pol Iまたはpol II)は、目的のアッセイ温度とほぼ同じ最適生育温度で、古細菌から得ることができる。

20

【0067】

熱安定性古細菌DNAポリメラーゼは、パイロコッカス種(フリオサス、GB-D種、ウーセイ、アビシ、ホリコシ)と、サーモコッカス種(コダカレンシスKOD1、リトラリス、ナイン・ディグリーズ・ノース-7種、JDF-3種、ゴルゴナリアス)と、ピロディクチウム・オカルタムと、アーケオグロブス・フルギダスとから単離された。適切な古細菌は>80~85の最大生育温度、または>70~80の最適生育温度を示すことが推定される。古細菌pol I DNAポリメラーゼ群からの適切なPCR酵素は市販されている、Pfu(ストラタジーン)、KOD(東洋紡)、Pfx(ライフ・テクノロジーズ・インコーポレーテッド)、ベント(ニュー・イングランド・バイオラプス)、ディープ・ベント(ニュー・イングランド・バイオラプス)、Tgo(ロシュ)、およびPwo(ロシュ)を含む。

30

【0068】

上に列挙したものと関連する追加的な古細菌DNAポリメラーゼは、次の参考文献に記載される: ロブ, F. T. (Robb, F. T.) およびブレース, A. R. (Place, A. R.) 編、「古細菌: 実験室マニュアル(Archaea: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1995年) およびクリスティアンソン, J. K. (Kristjansson, J. K.) 編、「好熱性細菌(Thermophilic Bacteria)」、CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1992年)。

40

【0069】

したがって本発明は、ファミリーB/pol Iタイプまたはpol IIタイプのいずれかの熱安定性古細菌DNAポリメラーゼ、ならびにその変異体または誘導体を提供する。

【0070】

本発明の一実施形態では、キメラDNAポリメラーゼのDNAポリメラーゼ領域は古細菌

50

菌DNAポリメラーゼポリペプチドを含む。さらに別の実施形態では、古細菌DNAポリメラーゼポリペプチドはPfu DNAポリメラーゼポリペプチドである。上記の態様のさらに別の実施形態では、キメラDNAポリメラーゼ領域は、配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも95%は同一である。

【0071】

(表1)

表1. クローン化ファミリーBポリメラーゼのアクセッション情報

ベント	サーモコッカス・リトラリス		
アクセッション	AAA72101		10
PID	g348689		
バージョン	AAA72101.1	GI:348689	
DBSOURCE	遺伝子座THCVDPE		
	アクセッションM74198.1		
THEST	サーモコッカス種(TY株)		
アクセッション	O33845		
PID	g3913524		
バージョン	O33845	GI:3913524	
DBSOURCE	swissprot:遺伝子座DPOL__THEST,		20
	アクセッションO33845		
Pab	パイロコッカス・アビシ		
アクセッション	P77916		
PID	g3913529		
バージョン	P77916	GI:3913529	
DBSOURCE	swissprot:遺伝子座DPOL__PYRAB,		
	アクセッションP77916		
PYRHO	パイロコッカス・ホリコシ		30
アクセッション	O59610		
PID	g3913526		
バージョン	O59610	GI:3913526	
DBSOURCE	swissprot:遺伝子座DPOL__PYRHO,		
	アクセッションO59610		
PYRSE	パイロコッカス種(GE23株)		
アクセッション	P77932		
PID	g3913530		
バージョン	P77932	GI:3913530	40
DBSOURCE	swissprot:遺伝子座DPOL__PYRSE,		
	アクセッションP77932		
ディーブ	ベント	パイロコッカス種	
アクセッション	AAA67131		
PID	g436495		
バージョン	AAA67131.1	GI:436495	
DBSOURCE	遺伝子座PSU00707		
	アクセッションU00707.1		50

P f u パイロコッカス・フリオサス

アクセッション P 8 0 0 6 1
 P I D g 3 9 9 4 0 3
 バージョン P 8 0 0 6 1 G I : 3 9 9 4 0 3
 D B S O U R C E s w i s s p r o t : 遺伝子座 D P O L _ P Y R F U ,
 アクセッション P 8 0 0 6 1

J D F - 3 サーモコッカス種

未発表

B a r o s s g i | 2 0 9 7 7 5 6 | p a t | U S | 5 6 0 2 0 1 1 | 1 2 10
 米国特許第 5 6 0 2 0 1 1 号明細書からの配列 1 2
 9 d e g N サーモコッカス種 (9 O N - 7 株)
 アクセッション Q 5 6 3 6 6
 P I D g 3 9 1 3 5 4 0
 バージョン Q 5 6 3 6 6 G I : 3 9 1 3 5 4 0
 D B S O U R C E s w i s s p r o t : 遺伝子座 D P O L _ T H E S 9 ,
 アクセッション Q 5 6 3 6 6

K O D パイロコッカス種

アクセッション B A A 0 6 1 4 2 20
 P I D g 1 6 2 0 9 1 1
 バージョン B A A 0 6 1 4 2 . 1 G I : 1 6 2 0 9 1 1
 D B S O U R C E 遺伝子座 P Y W K O D P O L
 アクセッション D 2 9 6 7 1 . 1

T g o サーモコッカス・ゴルゴナリアス

アクセッション 4 6 9 9 8 0 6
 P I D g 4 6 9 9 8 0 6
 バージョン G I : 4 6 9 9 8 0 6
 D B S O U R C E p d b : c h a i n 6 5 , 1 9 9 9 年 2 月 2 3 日 公開 30

T H E F M サーモコッカス・フミコランス (T h e r m o c o c c u s f u m i c o l a n s)

アクセッション P 7 4 9 1 8
 P I D g 3 9 1 3 5 2 8
 バージョン P 7 4 9 1 8 G I : 3 9 1 3 5 2 8
 D B S O U R C E s w i s s p r o t : 遺伝子座 D P O L _ T H E F M ,
 アクセッション P 7 4 9 1 8

M E T T H メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム (M e t h a n o b a c t e r i u m t h e r m o a u t o t r o p h i c u m) 40

アクセッション O 2 7 2 7 6
 P I D g 3 9 1 3 5 2 2
 バージョン O 2 7 2 7 6 G I : 3 9 1 3 5 2 2
 D B S O U R C E s w i s s p r o t : 遺伝子座 D P O L _ M E T T H ,
 アクセッション O 2 7 2 7 6

M e t j a メタノコッカス・ヤナシイ

アクセッション Q 5 8 2 9 5
 P I D g 3 9 1 5 6 7 9 50

バージョン Q 5 8 2 9 5 G I : 3 9 1 5 6 7 9
 DBSOURCE swissprot : 遺伝子座DPOL__METJA ,
 アクセションQ 5 8 2 9 5

POC ピロディクチウム・オカルタム
 アクセション B 5 6 2 7 7
 PID g 1 3 6 3 3 4 4
 バージョン B 5 6 2 7 7 G I : 1 3 6 3 3 4 4
 DBSOURCE pir : 遺伝子座B 5 6 2 7 7

10

ApeI アエロピラム・ペルニクス (*Aeropyrum pernix*)
 アクセション B A A 8 1 1 0 9
 PID g 5 1 0 5 7 9 7
 バージョン B A A 8 1 1 0 9 . 1 G I : 5 1 0 5 7 9 7
 DBSOURCE 遺伝子座A P 0 0 0 0 6 3
 アクセションA P 0 0 0 0 6 3 . 1

ARCFU アーケオグロブス・フルギダス
 アクセション O 2 9 7 5 3
 PID g 3 1 2 2 0 1 9
 バージョン O 2 9 7 5 3 G I : 3 1 2 2 0 1 9
 DBSOURCE swissprot : 遺伝子座DPOL__ARCFU ,
 アクセションO 2 9 7 5 3

20

デスルフコッカス (*Desulfurococcus*) 種 Tok
 アクセション 6 4 3 5 7 0 8
 PID g 6 4 3 5 7 0 8 9
 バージョン G T : 6 4 3 5 7 0 8
 DBSOURCE pdb . chain 6 5 , 1 9 9 9 年 6 月 2 日 公開
 【 0 0 7 2 】

30

C . 真正細菌 DNA ポリメラーゼ :

3つのクラスの真正細菌 DNA ポリメラーゼ pol I、II、およびIIIがある。
 Pol I DNA ポリメラーゼファミリー中の酵素は5' - 3' エキソヌクレアーゼ活
 性を有し、特定のメンバーはまた3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性も示す。Pol I
 II DNA ポリメラーゼは、5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を元来欠いているが、3
 ' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示す。Pol III DNA ポリメラーゼは細胞の
 主要な複製的 DNA ポリメラーゼに相当し、複数サブユニットから構成される。pol
 III 触媒サブユニットは5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠いているが、場合によ
 っては3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が同一ポリペプチド中に位置する。

【 0 0 7 3 】

40

様々な市販の Pol I DNA ポリメラーゼがあり、それらのいくつかは5' - 3'
 エキソヌクレアーゼ活性が低下または消滅しているように改変されている。

【 0 0 7 4 】

適切な熱安定性 pol I DNA ポリメラーゼは、サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) (Taq)、サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) (Tth) およびサーモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) (Tma UlTma) などのサーマス (*Thermus*) 種、およびサーモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) をはじめとする多様な好熱性真正細菌から単離できる。

【 0 0 7 5 】

50

上記に列挙したものと関連したさらなる真正細菌については、クリスティアンソン, J. K. (Kristjansson, J. K.) 編、「好熱性細菌 (Thermophilic Bacteria)」、CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1992年)に記載される。

【0076】

一実施形態では、キメラDNAポリメラーゼはTaq DNAポリメラーゼポリペプチドを含むポリメラーゼ領域を含む。

【0077】

本発明は、参照によってその内容全体を本明細書に援用する、米国特許第5,677,152号明細書、米国特許第6,479,264号明細書、および米国特許第6,183,998号明細書で開示される方法に従い、化学的に改変されたDNAポリメラーゼをさらに提供する。

【0078】

D. 本発明のキメラDNAポリメラーゼで使用する変異DNAポリメラーゼ

本発明のキメラDNAポリメラーゼは、任意の野生型DNAポリメラーゼ、または野生型ポリメラーゼとは異なる挙動をするようにさせる1つ以上の点変異、N-および/またはC-切断、内部欠失または挿入を含む、これらに限定されない1つ以上の変異を含有するように改変されたDNAポリメラーゼのどちらからでも作成することができる。本発明で有用なDNAポリメラーゼ変異としては、塩基類似体またはウラシル非感受性を与え、ヌクレオチド類似体組み込みを改善し、忠実度を増大させ、3'-5'エキソヌクラーゼ活性をなくしまたは5'-3'エキソヌクラーゼ活性をなくし、またはポリメラーゼ活性を低下させる変異を含むが、これらに限定されない。有用な変異または切断の特定例としては、ウラシル非感受性を与えるPfu DNAポリメラーゼ中のV93R, K, E, Dと、3'-5'エキソヌクラーゼ活性をなくすPfu DNAポリメラーゼ中のD141A/E143Aと、5'-3'エキソヌクラーゼ活性(KlenTaq)をなくすTaq DNAポリメラーゼのN末端切断を含むが、これらに限定されない。DNAポリメラーゼ変異の作成方法については以下に記載され、その他の方法については当該技術分野で知られている。

【0079】

野生型Pfu DNAポリメラーゼのアミノ酸およびDNAコード配列は、配列番号18 (ジェンバンク (Genbank) アクセション番号P80061) で示される。Pfu DNAポリメラーゼの構造および機能の詳細な説明は、例えば参照によってその全体を本明細書に援用する、米国特許第5,948,663号明細書、米国特許第5,866,395号明細書、米国特許第5,545,552号明細書、米国特許第5,556,772号明細書中の他の箇所にある。例えばウラシル検知活性が低下したPfu DNAポリメラーゼを調製するための非限定的な詳細手順は、参照によってその内容全体を本明細書に援用する、米国特許出願公開第2004/0197800号明細書(2003年11月5日出願)で提供される。

【0080】

本発明は、参照によってその内容全体を本明細書に援用する、係属中の米国特許出願公開第2004/0091873号明細書(ホグレフ (Hogrefe) ら、2002年11月18日出願)で開示される、塩基類似体検知活性を低下させる1つ以上の変異があるDNAポリメラーゼ領域を含む、キメラDNAポリメラーゼを提供する。

【0081】

一実施形態では、キメラDNAポリメラーゼは、アミノ酸位置93においてバリンからアルギニン、バリンからグルタミン酸、バリンからリジン、バリンからアスパラギン酸またはバリンからアスパラギンへの置換を含有するPfu DNAポリメラーゼポリペプチド領域を含む。

【0082】

本発明は、参照によってその内容全体を本明細書に援用する、係属中の米国特許出願第

10

20

30

40

50

10/035, 091号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2001年12月21日出願)、係属中の米国特許出願第10/079, 241号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2002年2月20日出願)、係属中の米国特許出願公開第2003/0180741号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2002年7月30日出願)、および係属中の米国特許出願公開第2003/0143577号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2002年8月23日出願)中で開示される、DNA重合を低下させる1つ以上の変異を含有するウラシル検知活性が低下したV93変異Pfu DNAポリメラーゼポリペプチドを含む、キメラDNAポリメラーゼをさらに提供する。

【0083】

一実施形態では、本発明は、G387P変異があるPfu DNAポリメラーゼ領域を含むキメラDNAポリメラーゼを提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、DNA重合活性とウラシル検知活性が低下した、V93R/G387P、V93E/G387P、V93D/G387P、V93K/G387PまたはV93N/G387P二重変異があるPfu DNAポリメラーゼ領域を含む、キメラDNAポリメラーゼを提供する。

【0084】

本発明は、係属中の米国特許出願第09/698, 341号明細書(ゾルゲ(Sorge)ら、2000年10月27日出願)中で開示される、ウラシル検知活性低下をもたらすV93R、V93E、V93D、V93KまたはV93N変異があるPfu DNAポリメラーゼ領域を含み、さらに3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を低下させるかまたはなくす1つまたは複数の変異を含有する、キメラDNAポリメラーゼをさらに提供する。

【0085】

一実施形態では、本発明は、低下した3'-5'エキソヌクレアーゼ活性およびウラシル検知活性を持つ、V93R/D141A/E143A三重変異Pfu DNAポリメラーゼを有するポリメラーゼ領域を含む、キメラDNAポリメラーゼを提供する。

【0086】

本発明のDNA重合活性が低下したPfu DNAポリメラーゼを作成するために使用される方法は、参照によってその内容全体を本明細書に援用する、係属中の米国特許出願第10/035, 091号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2001年12月21日出願)、係属中の米国特許出願第10/079, 241号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2002年2月20日出願)、係属中の米国特許出願第10/208, 508号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2002年7月30日出願)、および係属中の米国特許出願第10/227, 110号明細書(ホッグレフ(Hogrefe)ら、2002年8月23日出願)中で開示される。

【0087】

D141AおよびE143A変異を含む3'-5'エキソヌクレアーゼ欠損JDF-3 DNAポリメラーゼを作成するために使用される方法は、係属中の米国特許出願第09/698, 341号明細書(ゾルゲ(Sorge)ら、2000年10月27日出願)中で開示される。係属中の米国特許出願第09/698, 341号明細書(ゾルゲ(Sorge)ら、2000年10月27日出願)の教示を保有する当業者にとっては、係属中の米国特許出願第09/698, 341号明細書中で開示されるように、確立された部位特異的変異誘発方法を使用して、例えば非キメラV93 Pfu DNAポリメラーゼcDNAをはじめとする本発明のDNAポリメラーゼに、対応するD141AおよびE143A変異の両方またはその他の3'-5'エキソヌクレアーゼ変異を導入することは、難しくはないであろう。

【0088】

III. 本発明のキメラDNAポリメラーゼで使用するDNAポリメラーゼポリペプチド変異体およびDNA結合ポリペプチド変異体の調製

本発明のキメラDNAポリメラーゼのDNA結合領域およびポリメラーゼ領域は、多数のアミノ酸変化または変異を含有してもよい。当業者は、適切なアミノ酸変化をもたらす変異を作成する多数の方法があることを認識するであろう。このような既知の方法として

10

20

30

40

50

は、部位特異的変異誘発、縮重オリゴヌクレオチドを使用したPCR増幅、目的のオリゴヌクレオチドの化学合成（例えば大型核酸を発生させるライゲーションおよび/またはクローニングと併せて）、およびその他のよく知られている技術が挙げられる。ギルマン（Giliman）およびスミス（Smith）、Gene 8：81～97頁（1979年）、ロバーツ（Roberts）ら、Nature 328：731～734（1987年）、およびサムブルック、イニス、およびオスベル（全て前出）を参照されたい。

【0089】

例えば変異Sso7d結合領域ポリペプチドは、遺伝的改変によって（例えば野生型Sso7dポリペプチドのDNA配列を改変することで）作成することができる。DNA配列のランダム変異ならびに標的突然変異を可能にするいくつかの方法が、当該技術分野で知られている（例えばオスベルら、「分子生物学における短いプロトコル（Short Protocols in Molecular Biology）」、第3版、John Wiley & Sons, Inc.（1995年）を参照されたい）。さらに従来法およびPCR法の両方を含む、市販の部位特異的変異誘発キットがいくつかある。例としては、ストラタジーンのカイックチェンジ（QUICKCHANGE）（登録商標）部位特異的変異誘発キット（カタログ番号200518）が挙げられる。

【0090】

さらにDNA結合領域は、当業者に知られている方法に従って、挿入変異または切断（N末端、内部またはC末端）によって作成してもよい。

【0091】

当該技術分野で知られている部位特異的変異誘発の古い方法は、一本鎖DNA鋳型の単離を可能にする、M13バクテリオファージベクターなどのベクター中への変異させる配列のサブクローニングに依存する。これらの方法では、変異原プライマー（すなわち変異させる部位にアニールできるが、変異させる部位と1つ以上のミスマッチヌクレオチドを持つプライマー）を一本鎖鋳型にアニールし、次に変異原プライマーの3'末端から開始して鋳型の相補鎖を重合する。次に得られた二本鎖を宿主細菌に形質転換して、目的の変異についてブランクをスクリーニングする。

【0092】

最近、部位特異的変異誘発では、一本鎖鋳型を必要としない利点を有するPCR法が用いられている。さらにサブクローニングを必要としない方法が開発されている。PCRベースの部位特異的変異誘発を実施する際には、いくつかの問題を考慮すべきである。第一に、これらの方法ではPCRサイクル数を減少させて、ポリメラーゼによって導入される望ましくない変異の増殖を避けることが望ましい。第二に、反応中に残存する非変異型親分子の数を減らすための選択をしなければならない。第三に、単一PCRプライマーセットの使用を可能にするためには、伸長（extended-length）PCR法が好ましい。第四に、いくつかの熱安定性ポリメラーゼの非鋳型依存性末端伸長活性のため、PCRで生じた変異生成物の平滑末端ライゲーションに先だって、末端平滑化ステップを工程に組み込むことが多くの場合必要である。

【0093】

以下で述べる手順は、以下のステップを通じてこれらの考慮に対応する。第一に、使用される鋳型濃度は従来のPCR反応で使用されるものよりもおよそ1000倍高く、生成物収率を著しく低下させることなしに、25～30から5～10へのサイクル数減少を可能にする。第二に、最も一般的な大腸菌Dam株は自らのDNAを配列5-GATC-3でメチル化するので、制限エンドヌクレアーゼDpn I（認識標的配列：5-Gm6ATC-3、A残基はメチル化される）を使用して、親DNAと対して選択する。第三に、長いPCR生成物（すなわち全長プラスミド）の比率を増大させるために、PCR混合物中でTaqエクステンダーを使用する。最後に、T4DNAリガーゼを使用した分子内ライゲーションに先だって、Pfu DNAポリメラーゼを使用してPCR生成物末端を平滑化する。変異誘発手順のさらに別の例は、実施例1で述べられる。

【0094】

変異DNA結合タンパク質またはポリメラーゼ単離のための非限定的な例を以下で詳細に述べる。

【0095】

プラスミド鋳型DNA(およそ0.5 pmole)を、以下を含有するPCR混合物に添加する。1×変異誘発緩衝液(20 mM Tris-HCl、pH 7.5; 8 mM MgCl₂; 40 μg/ml BSA); 各12~20 pmoleのプライマー(塩基組成やプライマー長、意図される緩衝液塩濃度などのオリゴヌクレオチドプライマーのアニール特性に影響する要因を考慮して、必要に応じて変異原プライマーが当業者によって設計されてもよく、1つのプライマーは目的の変異を含有しなくてはならず、(同一または別の)1つのプライマーは後のライゲーションを促進するために5'リン酸を含まなくてはならない); 各250 μMのdNTP; 2.5 UのTaq DNAポリメラーゼ; および2.5 UのTaqエクステンダー(ストラタジーンから入手できる、ニールソン(Nielson)ら、Strategies 7:27頁(1994年)、および米国特許第5,556,772号明細書を参照されたい)。プライマーは、参照によって本明細書に採用するマテューシ(Matteucci)ら、J. Am. Chem. Soc. 103:3185~3191頁(1981年)のトリエステル法を使用して調製できる。あるいは、好ましくは自動化された合成で、例えばシアノエチルホスホラミダイト化学反応を使用してバイオサーチ(Biosearch) 8700 DNA合成機上で行われる。

10

【0096】

PCRサイクルは次のようにして実施される: 94 で4分、50 で2分および72 で2分が1サイクル、それに続く94 で1分、54 で2分、および72 で1分が5~10サイクル。親鋳型DNAおよび変異原プライマーを組み込んだPCR生成直鎖DNAをDpnI(10 U)およびPfu DNAポリメラーゼ(2.5 U)で処理する。これは生体内でメチル化された親鋳型およびハイブリッドDNAのDpnI消化ならびに、Pfu DNAポリメラーゼによる、直鎖PCR生成物上の非鋳型誘導Taq DNAポリメラーゼ伸長塩基の除去をもたらす。反応を37 で30分間、次に72 にしてさらに30分間温置した。0.5 mM ATPを含有する変異誘発緩衝液(115 μlの1倍希釈溶液)をDpnI消化され、Pfu DNAポリメラーゼで平滑化されたPCR生成物に添加する。溶液を混合し、10 μlを新しい微量遠心管に取って、T4 DNAリガーゼ(2~4 U)を添加する。ライゲーションを37 で60分以上温置する。最後に標準法に従って、処理溶液をコンピテント大腸菌中に形質転換する。

20

30

【0097】

ひとたび変異DNA結合またはポリメラーゼポリペプチドが作製されたら、当該技術分野で知られている評価技術およびここで述べるものを使用して、評価する。

【0098】

変異誘発によって生じた目的の変異DNA結合ポリペプチドおよび変異ポリメラーゼポリペプチドの遺伝子を配列決定して、変異部位および数を同定してもよい。1つ以上の変異を含む変異において、特定の変異によって生じた、別の変異からの単離部位特異的変異誘発によって野生型遺伝子に同定された変異を導入することで、特定変異の効果を評価してもよい。次にこのようにして生じた単一変異のスクリーニングアッセイは、変異のみの効果の判定を可能にする。

40

【0099】

一実施形態では、本発明はDNA結合領域およびポリメラーゼ領域を含むキメラDNAポリメラーゼを提供し、前記DNA結合領域は配列番号2の位置13、16、40、41、45、55、56、61または63に対応するアミノ酸に1つ以上の変異を有する。

【0100】

別の実施形態では、本発明はキメラDNAポリメラーゼを提供し、1つまたはそれ以上の変異は、E13Q、I16T、T40S、G41A、V45L、L55V、Q56D、Q61E、およびK63Rからなる群から選択される。

【0101】

50

I V . キメラDNAポリメラーゼの生成

本発明のキメラDNAポリメラーゼは、共有結合する少なくとも2つのポリペプチドを有するDNAポリメラーゼ融合ポリペプチドであり、その中の1つのポリペプチドは、例えばDNAポリメラーゼなどの1つのタンパク質配列または領域に由来し、もう1つのポリペプチドは、例えばDNA結合タンパク質などの別のタンパク質配列または領域に由来する。本発明のキメラDNAポリメラーゼのDNA結合領域およびポリメラーゼ領域は、当業者によく知られている方法によって結合できる。これらの方法には、化学的手段および組み換え手段の両方が含まれる。

【0102】

本発明のキメラDNAポリメラーゼに組み込まれる領域をコードする核酸は、組み換え遺伝子技術分野の所定の技術を使用して得ることができる。本発明で使用される一般方法を開示する基礎的な教科書としては、サムブルック(Sambrook)およびラッセル(Russell)、「分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」第3版(2001年); クリーグラー(Kriegler)、「遺伝子の導入と発現: 実験室マニュアル(Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual)」(1990年); およびオースベル(Ausubel)ら編、「分子生物学の現行プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」(1994~1999年)を含む。

【0103】

DNA結合ポリペプチドおよびポリメラーゼポリペプチドをコードする核酸配列は、多様な方法を使用して得ることができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸配列がプローブとのハイブリダイゼーションによってcDNAおよびゲノムDNAライブラリーからクローン化され、またはオリゴヌクレオチドプライマーによる増幅技術を使用して単離される。より一般には、増幅技術が、DNAまたはRNA鋳型を使用してDNA結合領域およびポリメラーゼ配列の増幅および単離に使用される(例えばディエフエンファック(Dieffenbach)およびドゥベクスラー(Dvexler)、「PCRプライマー: 実験室マニュアル(PCR Primers: A Laboratory Manual)」(1995年)を参照されたい)。あるいは、重複するオリゴヌクレオチドは合成的に生成および結合させて、1つ以上の領域を生成することが可能である。触媒性領域または二本鎖核酸結合領域をコードする核酸はまた、抗体をプローブとして使用して、発現ライブラリーからも単離できる。本発明のDNA結合領域およびポリメラーゼ領域を単離するためのその他の適切な方法については、ここで述べられる。

【0104】

ポリペプチドは、直接、または例えばポリグリシンリンカー等のアミノ酸リンカー、もしくは例えば炭水化物リンカー、脂質リンカー、脂肪酸リンカー、ポリエーテルリンカー(PEGなど)等の、別のタイプの化学リンカーなどの共有結合リンカーのいずれかを介して結合できる(例えばヘルマンソン(Hermanson)、Bioconjugate techniques(1996年)参照)。融合ポリペプチドを形成するポリペプチドは、一般的にC末端とN末端で結合するが、それらはまた、C末端とC末端、N末端とN末端またはN末端とC末端で結合してもよい。1つまたはそれ以上のポリペプチド領域が、本発明のDNAポリメラーゼ中の内部位置に挿入されてもよい。融合タンパク質のポリペプチドは、任意の順序であることができる。キメラDNAポリメラーゼは、融合タンパク質を連続的にコードする組み換えポリヌクレオチドを調製することで、例えばPfuなどの1つのタンパク質配列からのアミノ酸鎖を、例えば変異Sso7dなどの別のタンパク質配列からのアミノ酸鎖に共有結合させて、生成してもよい。融合タンパク質中の異なるアミノ酸鎖は、直接につながわせて、または化学結合基もしくは長さが1~100個のアミノ酸が一般的である、約200個以上のアミノ酸であるアミノ酸結合基を通じて、間接的につながらせてもよい。いくつかの実施形態では、リンカー中にプロリン残基が組み込まれて、リンカーによる顕著な二次的構造要素の形成を防止する。リンカー

10

20

30

40

50

は多くの場合、組み換え融合タンパク質の一部として合成される可動性のアミノ酸部分配列である。このような可動性のリンカーは当業者に知られている。

【0105】

本発明のキメラDNAポリメラーゼを調製する方法はまた、その全体を本明細書に援用する国際特許出願公開第01/92501 A1号パンフレット、米国特許出願公開第2004/0081963号明細書(2002年10月23日出願)、およびパヴロフ(Pavlov)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:13510~13515頁(2002年)にも記載されている。

【0106】

一実施形態では、本発明のキメラDNAポリメラーゼは、変異DNA結合タンパク質に結合する野生型DNAポリメラーゼを含む。

10

【0107】

別の実施形態では、本発明のキメラDNAポリメラーゼは、変異DNA結合タンパク質に結合する変異DNAポリメラーゼを含む。

【0108】

V. 本発明のキメラDNAポリメラーゼの発現

当該技術分野で知られている方法を応用して、本発明のキメラDNAポリメラーゼを発現させ単離してもよい。多くの細菌発現ベクターは、外来性配列によってコードされるタンパク質の高レベル誘導性発現を可能にする配列要素または配列要素の組み合わせを含有する。例えば組み込まれた誘導性形態T7RNAポリメラーゼ遺伝子を発現する細菌を、T7プロモーターに結合したキメラDNAポリメラーゼ構築物を有する発現ベクターで形質転換してもよい。例えばlac-誘導性プロモーターのためのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)などの適切な誘導因子の付加によるT7RNAポリメラーゼの誘導は、T7プロモーターからのキメラDNAポリメラーゼの高レベル発現を誘発する。

20

【0109】

適切な細菌宿主株は、当該技術分野で当業者が入手できるものから選択されてもよい。非限定的な例として、大腸菌株BL-21が、その他の大腸菌と比べてプロテアーゼが欠損していることから、外来性タンパク質発現のために一般に使用される。BL-21株は、WJ56およびER2566を含む誘導性T7RNAポリメラーゼ遺伝子を有する(ガードナー(Gardner)およびジャック(Jack)、1999年、前出)。特定ポリメラーゼ遺伝子のコドン使用頻度が大腸菌遺伝子で通常見られるのと異なる状況では、例えばクローン古細菌酵素遺伝子などのクローンタンパク質遺伝子の高効率発現を可能にする、より稀なアンチコドンがあるtRNAをコードするtRNA遺伝子(例えばargU、ileY、leuW、およびproL tRNA遺伝子)を運ぶように改変されたBL-21株がある(例えばレアコドンtRNAを運ぶいくつかのBL21-コドンPLUS TM細胞株は、ストラタジーンから入手できる)。

30

【0110】

本発明のキメラDNAポリメラーゼの精製に適した多くの方法が、当業者に知られている。例えばローヤー(Lawyer)ら(PCR Meth. & App. 2:275頁(1993年))の方法は、元々Taqポリメラーゼの単離用に設計されているため、大腸菌中で発現されるキメラDNAポリメラーゼの単離によく適している。あるいは、宿主タンパク質を破壊する熱変性ステップ、および2つのカラム精製ステップ(DEAE-セファロースおよびヘパリン-セファロースカラム上の)を用いて、高度に活性で純度およそ80%のDNAポリメラーゼを単離する、参照によって本明細書に援用するコン(Kong)ら(J. Biol. Chem. 268:1965頁(1993年))の方法を使用してもよい。さらにキメラDNAポリメラーゼは、硫酸アンモニウム分画とそれに続くQセファロースおよびDNAセルロースカラムによって単離してもよく、またはHiTrap Qカラム上へ夾雑物吸着と、それに続くHiTrapヘパリンカラムからの勾配溶離によって単離してもよい。

40

50

【0111】

VI. 本発明の応用

一態様では、本発明は、本発明の組成物を使用して、DNAを合成するための方法を提供する。一般的にポリヌクレオチドの合成は、合成プライマー、合成鋳型、新しく合成されたポリヌクレオチド中への組み込みのためのポリヌクレオチド前駆物質（例えばdATP、dCTP、dGTP、dTTP）などを必要とする。ポリヌクレオチド合成を実施する詳細な方法は当業者によく知られており、例えばサムブルック（Sambrook）ら、「分子クローニング（Molecular Cloning）」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.（1989年）中にある。

10

【0112】

「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」とは、特異的ポリヌクレオチド鋳型配列を増幅する試験管内方法を指す。PCR技術については、M.J.マクファーソン（McPherson）ら、「PCR：実用的なアプローチ（PCR：A Practical Approach）」、IRL Press（1991年）；イニス（Innis）ら、「PCRプロトコル：方法と応用ガイド（PCR Protocols：A Guide to Methods and Application）」、Academic Press（1990年）；およびH.A.エーリッヒ（H.A. Erlich）、「PCR技術：DNA増幅のための原理と応用（PCR Technology：Principals and Application for DNA Amplification）」、Stockton Press（1989年）をはじめとする多数の出版物に記載されている。PCRについてはまた、それぞれ参照によって本明細書に援用する、米国特許第4,683,195号明細書、米国特許第4,683,202号明細書、米国特許第4,800,159号明細書、米国特許第4,965,188号明細書、米国特許第4,889,818号明細書、米国特許第5,075,216号明細書、米国特許第5,079,352号明細書、米国特許第5,104,792号明細書、米国特許第5,023,171号明細書、米国特許第5,091,310号明細書、および米国特許第5,066,584号明細書をはじめとする多くの米国特許明細書にも記載されている。

20

【0113】

本発明によって提供される利点の理解を容易にするために、PCRの概要を提供する。PCR反応は反復される一連の温度サイクルを含み、一般的に50～100 μ lの容積で実施される。反応混合物はdNTP（それぞれdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPの4つのデオキシヌクレオチド）、プライマー、緩衝液、DNAポリメラーゼ、およびポリヌクレオチド鋳型を含む。PCRは、増幅される二本鎖標的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする2つのプライマーを必要とする。PCRではこの二本鎖標的配列が変性されて、変性標的の各鎖に1つのプライマーがアニールされる。プライマーは、互いに離れた部位で、1つのプライマー伸長生成物とその相補体と分離すると、もう一方のプライマーとハイブリダイズできるような向きで、標的ポリヌクレオチドにアニールする。ひとたび特定プライマーが標的配列にハイブリダイズしたら、プライマーはDNAポリメラーゼの作用によって伸長される。次に伸長生成物を標的配列から変性して、工程を繰り返す。

30

40

【0114】

この工程の連続サイクルにおいては、初期サイクルで生成する伸長生成物が、DNA合成のための鋳型の役割をする。第2のサイクルに始まって、増幅生成物是对数的速度で蓄積し始める。増幅生成物は、第1のプライマーの配列を含有し、第2のプライマーに相補的な配列が最終的にそれに続く第1の鎖、および第1の鎖に相補的な第2の鎖を含む分離した二本鎖DNA分子である。

【0115】

PCR工程において可能な莫大な増幅により、意図的に添加された鋳型DNA不在下でも、高DNAレベルサンプル、陽性対照鋳型または以前の増幅から持ち越された小さなレ

50

ベルのDNAから、PCR生成物をもたらすことができる。可能ならば全ての反応混合物は、PCR生成物分析およびサンプル調製とは離れた区域に配置する。RNA/DNA調製、反応混合、およびサンプル分析のための専用または使い捨て容器、溶液、およびピペット（好ましくは容積式ピペット）の使用が相互汚染を最小化する。参照によって本明細書に援用する、ヒグチ（Higuchi）およびクウォック（Kwok）、Nature、339:237~238頁（1989年）、およびイニス（Innis）ら編、「PCRプロトコル：方法と応用ガイド（PCR Protocols: A Guide to Methods and Application）」、Academic Press, Inc., San Diego, Calif（1990年）中のクウォック（Kwok）およびオレゴ（Orrego）もまた参照されたい。

10

【0116】

A．熱安定性酵素

PCR増幅のために、本発明のキメラDNAポリメラーゼは、熱安定性ポリメラーゼを含むポリメラーゼ領域を含んでもよい。ここでの用法では、「熱安定性」とは、熱に対して安定な酵素が耐熱性であり、例えば50~90の高温で機能することを指す。本発明の熱安定性酵素は、増幅反応のために効果的であるという単一基準を満たさなくてはならず、すなわち酵素は、二本鎖ポリヌクレオチドの変性をもたらすのに必要な時間の間高温に曝されたとき、不可逆的に変性（不活性化）されてはならない。これに関連して使用される「不可逆的な変性」とは、恒久的で完全な酵素の活性喪失をもたらす過程を意味する。変性に必要に加熱条件は、例えば緩衝液塩濃度および変性されるポリヌクレオチドの長さ

20

とヌクレオチド組成に依存するが、温度は一般的により短いポリヌクレオチド用の85から105の範囲であり、時間は主に温度とポリヌクレオチド長に依存し、一般的により短いポリヌクレオチド用の0.25分からより長いDNA断片用の4.0分にわたる。緩衝液塩濃度および/またはポリヌクレオチドのGC組成物を増大させると、より高い温度に耐えられる。好ましくは、酵素は90~100で不可逆的に変性されない。本発明の不可逆的に変性されない酵素は、増幅反応中に少なくとも10%、または少なくとも25%、または少なくとも50%もしくはそれ以上の機能または活性を保持する。

【0117】

B．PCR反応混合物

本発明のキメラDNAポリメラーゼに加えて、当業者はその他のPCRパラメーターを用いて、合成/増幅反応の忠実度を増大させてもよい。PCR忠実度が、dNTP濃度、反応あたりの使用酵素単位、pH、および反応中のMg²⁺とdNTPとの比率の変化などの要因によって、影響されることが報告されている（マティラ（Mattila）ら、1991年、前出）。

30

【0118】

Mg²⁺濃度は、プライマー-鋳型相互作用を安定化することでオリゴヌクレオチドプライマーの鋳型DNAへのアニールに影響し、またポリメラーゼと鋳型プライマーの複製複合体も安定化する。したがって非特異的アニールも増大させて、望ましくないPCR生成物も生じ得る（ゲル中で複数バンドを生じる）。非特異的増幅が起きると、増幅の正確さと特異性を増大させるため、Mg²⁺濃度の低減の必要があり、またはEDTAをMg²⁺をキレートするために添加してもよい。

40

【0119】

Mn²⁺またはCo²⁺などのその他の二価の陽イオンもまた、DNA重合に影響する。各DNAポリメラーゼに適した陽イオンは当該技術分野で知られている（例えば「DNA Replication」第2版、前出）。二価の陽イオンは、MgCl₂、Mg(OAc)₂、MgSO₄、MnCl₂、Mn(OAc)₂、またはMnSO₄などの塩の形態で提供される。トリス-HCl緩衝液中で使用できる陽イオン濃度は、MnCl₂で0.5~7mM、好ましくは0.5~2mMの間、およびMgCl₂では0.5~10mMである。ピシン/KOAc緩衝液中で使用できる陽イオン濃度は、Mn(OAc)₂では1~20mM、好ましくは2~5mMの間である。

50

【0120】

DNAポリメラーゼが必要とする一価の陽イオンは、塩化物または酢酸塩どちらかのカリウム、ナトリウム、アンモニウム、またはリチウム塩によって提供されてもよい。KClでは濃度は1~200mMの間、好ましくは濃度は40~100mMの間であるが、最適濃度は反応で使用されるポリメラーゼ次第で変更してもよい。

【0121】

デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)は、二ナトリウムまたはリチウム塩などのdATP、dCTP、dGTP、dUTP、およびdTTP塩の溶液として添加される。本方法では、それぞれ1μM~2mMの範囲の最終濃度が適切であり、100~600μMが好ましいが、ヌクレオチドの最適濃度は、PCR反応中の全dNTPならびに二価の金属イオン濃度、および緩衝液、塩、特定のプライマー、および鋳型次第で、変更してもよい。より長い、すなわち1500bpを超える生成物では、トリス-HCl緩衝液を使用する場合、各500μMのdNTPが好ましいかもしれない。

10

【0122】

dNTPは二価の陽イオンにキレートするので、使用する二価の陽イオンの量は、反応中のdNTP濃度に従って変化させることが必要たりうる。過剰量のdNTP(例えば1.5mM以上)はエラー率を増大させ、場合によりDNAポリメラーゼを阻害する。したがってdNTP濃度を(例えば10~50μMに)低下させることは、エラー率を低下せうる。より大きなサイズの鋳型を増幅するためのPCR反応では、より多いdNTPが必要たりうる。

20

【0123】

1つの適切な緩衝剤は、トリス-塩基/トリス-HClまたはトリス-塩基/トリス-H₂SO₄であり、好ましくはpH10であるが、pH8.0~11.5の範囲であってもよい。トリス-塩基/トリス-HClまたはトリス-塩基/トリス-H₂SO₄濃度は5~250mMであるが、10~100mMが最も好ましい。

【0124】

PCRはDNA増幅のための非常に強力なツールであり、したがって非常にわずかな鋳型DNAしか必要ない。しかしいくつかの実施形態ではエラーの可能性を低下させるためにより高いDNA濃度を使用してもよいが、過剰量の鋳型は夾雑物量を増大させて、効率を低下せうる。

30

【0125】

通常3μMまでのプライマーを使用してもよいが、高いプライマーと鋳型の濃度比率は、非特異的増幅およびプライマー二量体形成をもたらす。したがって、通常はプライマー配列をチェックしてプライマー二量体形成を避けることが必要である。

【0126】

本発明は、鋳型中のシトシン脱アミノ化の効果を最小化およびより長い変性時間と高い変性温度での使用を可能にすることで、GCに富むDNA鋳型のPCRを促進する、ウラシル検知活性が低下したPfu V93R、V93E、V93K、V93D、またはV93NDNAポリメラーゼを有するポリメラーゼ領域を含む、キメラDNAポリメラーゼを提供する。

40

【0127】

C. サイクルパラメーター

鋳型のGC含量が高い場合、変性時間を増大させてもよい。高いGC含量のプライマーまたはより長いプライマーには、より高いアニール温度が必要である。勾配PCRはアニール温度を判定するのに有用な方法である。より大きなPCR生成物増幅のためには、伸長時間を延長すべきである。しかし伸長時間は酵素の損傷を抑えるため、可能ならば常に短縮する必要がある。

【0128】

サイクル数は、鋳型DNA分子数が非常に小さい場合には増大でき、多量の鋳型DNAを使用する場合は減少できる。

50

【0129】

D. PCR促進因子

PCR促進因子もまた使用して、増幅効率を改善できる。ここで、「PCR促進因子」または「ポリメラーゼ促進因子」(PEF)とは、ポリヌクレオチドポリメラーゼ促進性を有する複合体またはタンパク質を指す(どちらも参照によって本明細書に援用する、ホッグレフ(Hogrefe)ら、Strategies 10:93~96(1997年)および米国特許第6,183,997号明細書)。Pfu DNAポリメラーゼでは、PEFは、P45を天然形態(P50とP45との複合体として)または組み換えタンパク質のいずれかとして含む。Pfu P50およびP45の天然複合体中では、P45のみがPCR促進性を示す。P50タンパク質は細菌フラボタンパク質と類似の構造である。P45タンパク質はdCTPデアミナーゼおよびdUTPaseと類似の構造であるが、dUTPをdUMPおよびピロリン酸塩に転換するdUTPaseとしてのみ機能する。本発明のPEFはまた、以下からなる群から選択することができる:古細菌源(例えばパイロコッカス・フリオサス)から得られた、単離または精製された天然型ポリメラーゼ促進タンパク質;ポリメラーゼ促進性を有するPfu P45と同一のアミノ酸配列を有する全長または部分的合成タンパク質またはその類似体;1つまたはそれ以上の前記天然または全長または部分的合成タンパク質のポリメラーゼ促進混合物;1つまたはそれ以上の前記天然または全長または部分的合成タンパク質ポリメラーゼ促進タンパク質の複合体;ならびに1つまたはそれ以上の前記天然のタンパク質を含有するポリメラーゼ促進性の部分的精製細胞抽出物(米国特許第6,183,997号明細書、前出)。PEFのPCR促進活性は、当該技術分野でよく知られている手段によって規定される。PEFの単位の定義は、dUTPからのピロリン酸塩(PPi)生成をモニタリングして判定されるPEF(P45)のdUTPase活性に基づく。例えばPEFがdUTP(1×クローンPfu PCR緩衝液中の10mM dUTP)と共にインキュベートされ、その間にPEFはdUTPをdUMPとPPiに加水分解する。シグマ(Sigma)から市販される共役酵素的アッセイシステム(#P7275)を使用して、生じたPPi量を定量化する。1活性単位は、毎時(85で)4.0nmoleのPPiを生じることと、機能的に定義される。

【0130】

その他のPCR添加剤もまた、PCR反応の正確さと特異性に影響しうる。増幅反応混合物中に0.5mM未満のEDTAが存在してもよい。トウween-20(Tween-20)(商標)およびノニデットP-40(Nonidet P-40)(商標)などの界面活性剤が酵素希釈緩衝液中に存在する。およそ0.1%以下の非イオン性洗浄剤の最終濃度が適切であるが、0.01~0.05%が好ましく、ポリメラーゼ活性を妨げない。同様に酵素調製物中にグリセロールが多くの場合存在し、一般に反応混合物中で1~20%の濃度に希釈される。GC含量が高い鋳型DNA、または長い(例えば>1kb)鋳型DNAのPCRでは、グリセロール(5~10%)、ホルムアミド(1~5%)またはDMSO(2~10%)が添加できる。これらの添加剤は、プライマーと鋳型のハイブリダイゼーション反応のTm(変性温度)およびポリメラーゼ酵素の熱安定性を変化させる。BSA(0.8μg/μlまで)は、PCR反応効率を改善できる。GC含量が高く長いDNA断片のPCRには、ベタイン(0.5~2M)もまた有用である。塩化テトラメチルアンモニウム(TMAC、>50mM)、塩化テトラエチルアンモニウム(TEAC)、およびトリメトラミンN-酸化物(TMANO)もまた使用してもよい。試験PCR反応を実施して、上述の各添加剤の最適濃度を判定してもよい。

【0131】

本発明は、抗体(ホットスタートPCR用)およびssb(一本鎖DNA結合タンパク質、より高い特異性)をはじめとする添加剤を提供するが、これらに限定されない。本発明はまた、例えば参照によってその全体を本明細書に援用する、米国特許第6,333,158号明細書、および国際特許出願公開第01/09347A2号パンフレットに記載されるような副次的要素と組み合わせた変異古細菌DNAポリメラーゼも意図する。

【0132】

様々な特異的PCR増幅用途が当該技術分野で利用できる(総説については、例えばそれぞれ参照によって本明細書に援用する、エルリッヒ(Erllich)、Rev Immunogenet. 1: 127~34頁(1999年); プレディガー(Prediger), Methods Mol. Biol. 160: 49~63頁(2001年); ジュレシク(Jurecic)ら, Curr. Opin. Microbiol. 3: 316~21頁(2000年); トリグリア(Triglia), Methods Mol. Biol. 130: 79~83頁(2000年); マッケランド(MacLelland)ら, PCR Methods Appl. 4: S66~81頁(1994年); アブラムソン(Abramson)およびメーヤーズ(Myers), Current Opinion in Biotechnology 4: 41~47頁(1993年)を参照されたい)。

10

【0133】

以下の本発明は、PCR用途で使用できるが、これに限定されるものではない: i) 非特異的増幅を低下させるホットスタートPCR; ii) 高アニール温度で開始させて、次にアニール温度を段階的に低下させて非特異的PCR生成物を低下させる、タッチダウンPCR; iii) プライマーのアウターセットおよびプライマーのインナーセットを使用して、より信頼性の高い生成物を合成するネステッドPCR; iv) 既知配列の近傍領域の増幅のためのインバースPCR。この方法では、DNAを消化して目的の断片をライゲーションによって環状化させ、次に外側に延びる既知の配列に相補的なプライマーを使用してPCRを行う; v) AP(任意刺激)-PCR/RAPD(ランダム増幅多形DNA)。これらの方法は、任意のオリゴヌクレオチドを使用した増幅によって、ほとんど分かっていない標的配列がある種からゲノムのフィンガープリントを作り出す; vi) RNA誘導DNAポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)を使用してcDNAsを合成し、次にそれをPCRのために使用する、RT-PCR; この方法は組織または細胞中の特異的配列の発現を検出するのに、極めて感受性が高い。またこれを使用してmRNA転写物を定量化してもよい; vii) RACE(cDNA末端の迅速な増幅)。これはDNA/タンパク質配列に関する情報が限られる場合に使用される。この方法はそれぞれ1つの特異的プライマーのみ(1つのアダプタプライマーを加える)で、cDNAの3'または5'末端を増幅してcDNA断片を発生させる。次に重複するRACE生成物を組み合わせて、全長cDNAを生成できる; viii) 異なる組織中の差別的に発現された遺伝子を同定するのに使用される、DD-PCR(ディファレンシャル・ディスプレイPCR); DD-PCRの最初のステップはRT-PCRを伴い、次に、短く、意図的に非特異的なプライマーを使用して増幅が実施される; ix) 同一試料中の2つ以上の独自のDNA配列標的が同時に増幅されるマルチプレックス-PCR。1つのDNA配列を対照として使用して、PCRの質を検証できる; x) 同一セットのプライマーについて標的DNA(競合的PCR)と競合する内部対照(ただし異なるサイズ)DNA配列を使用する、Q/C(定量比較的)-PCR; xi) 遺伝子を合成するのに使用されるリカーシブPCR。この方法で使用されるオリゴヌクレオチドは、遺伝子ストレッチ(>80塩基)に相補的であり、あるいは末端重複(約20塩基)して、センスおよびアンチセンス鎖に相補的である; xii) 非対称性PCR; xiii) 原位置(in situ)PCR; xiv) 部位特異的PCR変異誘発。

20

30

40

【0134】

本発明のキメラDNAポリメラーゼを使用した追加的方法は、参照によってその内容全体を本明細書に援用する、2004年3月19日に出願された米国特許出願公開報第2005/0048530号明細書に記載される。

【0135】

本発明は、いかなる特定の増幅システムにも限定されないものとする。その他のシステムが開発されれば、それらのシステムは本発明の実施によって恩恵を受けるかもしれない。

50

【 0 1 3 6 】

V I I . キット

ここで本発明はまた、本発明の組成物の1つ以上の容器を有する包装単位を含むキット形態、およびPCR中の合成を含むポリヌクレオチド合成のための様々な試薬の容器を含むいくつかの実施形態についても意図する。キットはまた、ポリヌクレオチド前駆物質、プライマー、緩衝液、使用説明書、および対照を含む、1つまたはそれ以上の物品を含有してもよい。キットは、本発明に従った方法を実施するために適切な比率で共に混合された試薬の容器を含んでもよい。試薬の容器は、好ましくは、本発明の方法を実施する際に測定ステップを不必要にする単位量の試薬を含有する。

【 0 1 3 7 】

本発明は、本発明に従ったキメラDNAポリメラーゼの組み合わせと、PCR促進試薬と、PCR増幅、DNA配列決定または変異誘発のための試薬とを含むキットを意図する。

【 0 1 3 8 】

DNAの配列決定をするためのキットは、いくつかの容器手段を含む。第1の容器手段は、例えば本発明のポリメラーゼの実質的に精製されたサンプルを含んでもよい。第2の容器手段は、DNA鋳型に相補的なDNA分子を合成するのに必要な、1つまたはいくつかのヌクレオチドを含んでもよい。第3の容器手段は、1つまたはいくつかの異なるタイプのターミネーター（ジデオキシヌクレオチド三リン酸など）を含んでもよい。第4の容器手段は、ピロホスファターゼを含んでもよい。上記の容器手段に加えて、1つまたはいくつかのプライマーおよび/または適切な配列決定緩衝液を含む、追加的な容器手段がキット中に含まれてもよい。

【 0 1 3 9 】

核酸の増幅するまたは合成のために使用されるキットは、例えば実質的に純粋な本発明のキメラDNAポリメラーゼを含む第1の容器手段と、単一タイプのヌクレオチドまたはヌクレオチド混合物を含む1つまたはいくつかの追加的な容器手段とを含む。

【 0 1 4 0 】

核酸変異誘発のために使用されるキットは、例えば実質的に純粋な本発明のキメラDNAポリメラーゼを含む、第1の容器手段を含んでもよい。第2の容器手段は、単一タイプのヌクレオチドまたはヌクレオチド混合物を含んでもよい。第3の容器手段は、適切な反応緩衝液を含んでもよい。追加的な容器手段は、コンピテント細胞を含んでもよい。

【 0 1 4 1 】

キット中に、様々なプライマー、ならびに適切な増幅または合成緩衝液が含まれてもよい。

【 0 1 4 2 】

所望ならば、本発明のキットは、核酸分子の合成または配列決定中に使用可能な、検出可能な標識ヌクレオチドを含む容器手段を含んでもよい。多数の標識の1つを使用して、このようなヌクレオチドを検出してもよい。例示的な標識としては、限定されるものではないが、放射性同位体、蛍光性標識、化学発光標識、生物発光標識、および酵素標識が挙げられる。

【 0 1 4 3 】

ここで一般に述べられる本発明について概説したが、同発明は、例示の目的で提供され、特に断りのない限り本発明を限定することを意図しない、以下の実施例を参照してより容易に理解される。

【 実施例 】

【 0 1 4 4 】

実施例1 P f u DNAポリメラーゼ領域およびS s o 7 d DNA結合領域を有するDNAキメラポリメラーゼの構築

S s o 7 dのN末端をパイロコッカス・フリオサスDNAポリメラーゼ(P f u)のC末端に結合して、P f u - S s o 7 d融合物を作り出した。6個のアミノ酸のリンカー配

10

20

30

40

50

列 (G I y - T h r - G l y - G l y - G l y - G l y) を S s o 7 d の N 末端に付加した。野生型 P f u - S s o 7 d キメラをコードする核酸およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 8 および 2 0 で示される。

【 0 1 4 5 】

製造業者の使用説明書に従って、クイックチェンジ (Q u i c k C h a n g e) 部位特異的変異誘発キット (ストラタジーン、カタログ番号 2 0 0 5 1 8) によって、P f u DNA ポリメラーゼキメラの S s o 7 d 部分に点変異を導入した。

【 0 1 4 6 】

簡単に述べると、目的変異の領域内中の、S s o 7 d 配列の逆鎖に相補的な (点変異を除く) プライマーのセットを使用して、P C R 反応により各変異を導入した。サイクル条件は、9 5 で 2 分間を 1 サイクル ; 9 5 で 3 0 秒間、5 8 で 3 0 秒間、6 8 で 1 0 分間を 1 8 サイクル ; および 6 8 で 1 0 分間を 1 サイクルであった。次に反応を D P N I で処理して、非変異プラスミドを分解した。X L - 1 0 ゴールド (G o l d) スーパーコンピテント細胞を変異プラスミドで形質転換して播種した。変異プラスミドのプラスミド調製物を配列決定して、変異の付加を確認した。

【 0 1 4 7 】

以下の変異のセットが P f u DNA ポリメラーゼキメラの S s o 7 d 部分に導入された。

- 1 . 配列番号 2 の K 4 R、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 2 . 配列番号 2 の T 2 S、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 3 . 配列番号 2 の A 1 V、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 4 . 配列番号 2 の E 1 3 Q、I 1 6 T
- 5 . 配列番号 2 の W 2 3、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 6 . 配列番号 2 の I 2 9 V、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 7 . 配列番号 2 の T 3 2 S、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 8 . 配列番号 2 の E 3 5 D、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 9 . 配列番号 2 の G 3 7 A、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 1 0 . 配列番号 2 の T 4 0 S、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 1 1 . 配列番号 2 の G 4 1 A、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 1 2 . 配列番号 2 の V 4 5 L、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 1 3 . 配列番号 2 の L 5 5 V、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 1 4 . 配列番号 2 の Q 5 6 D、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 1 5 . 配列番号 2 の Q 5 6 D、T 4 0 S、E 1 3 Q、I 1 6 T
- 1 6 . 配列番号 2 の T 4 0 S、V 4 5 L、L 5 5 V、Q 5 6 D、K 6 3 R、E 1 3 Q、I 1 6 T

【 0 1 4 8 】

実施例 2 DNA ポリメラーゼキメラの DNA 伸長能の比較

増幅産物収率に対する変異の効果を判定するため、P C R 増幅反応を実施して、各変異型 S s o 7 d - P f u DNA ポリメラーゼキメラを野生型 S s o 7 d - P f u DNA ポリメラーゼキメラと比較した。

【 0 1 4 9 】

P C R 反応物は 1 2 . 5 n g ~ 1 0 0 n g の変異型または野生型キメラ DNA ポリメラーゼ、p H 1 0 の P C R 反応緩衝液、各 2 0 0 μ M の d N T P、ヒト - 1 抗トリプシンに特異的な各 1 0 0 n g の順方向および逆方向プライマー、および 1 0 0 n g のゲノム DNA を含有した。反応をサーマルサイクラー内において、次のサイクルパラメーターの下で実施した : 9 5 で 2 分間を 1 サイクル ; 9 5 で 1 0 秒間、5 8 で 5 秒間、および 7 2 で 1 0 秒間を 3 0 サイクル。増幅生成物をアガロースゲル上で分析し、それらの相対収率を評価した。

【 0 1 5 0 】

DNA ゲルシフトアッセイを実施して、各変異型 S s o 7 d - P f u DNA ポリメ

10

20

30

40

50

ーゼキメラのDNA結合能力を野生型Sso7d-Pfu DNAポリメラーゼキメラと比較した。各Sso7d-Pfu DNAポリメラーゼキメラ(100~600ng)を別々の反応混合物中で、室温で10分間インキュベートした。反応混合物はまた、Pfu DNAポリメラーゼ反応緩衝液中の100ngのゲノムDNAも含有した。反応混合物を6%アガロースゲル上で泳動して分析し、キメラSso7d-Pfu DNAポリメラーゼのDNA結合能力を評価した。

【0151】

結果は、DNAポリメラーゼキメラ中でSso7dの機能性損失を引き起こすことなしに、限られた数のアミノ酸のみが変更できることを示唆した。さらにSso7dタンパク質の特定領域は、他の領域よりもアミノ酸変化についてより融通が利いた。

10

【0152】

DNAポリメラーゼキメラのSso7d部分のN末端に導入されたアミノ酸変化(A1V、T2K、T2S、およびK4R)は、PCR増幅およびゲノムDNAゲルシフトアッセイにおいて、野生型コンストラクトと比べてPCR収率およびDNA結合活性の低下をもたらした。E13QおよびI16Tのアミノ酸変化については、PCR収率またはDNA結合活性は観察されなかった。

【0153】

DNAポリメラーゼキメラのSso7d部分に導入されたアミノ酸変化(W23F、I29、T32S、E35D、およびG37A)は、野生型構築物に比べると、キメラのPCR収率およびDNA結合活性を低下させた。W23FおよびT32Sが保存アミノ酸であるのに対し、I29、E35、およびG37は非保存アミノ酸である。非保存アミノ酸I29をI29V、I29L、およびI29Aに変化させた。アミノ酸LおよびAは、Iと構造的に非常に類似しているにもかかわらず、全ての変化は野生型構築物と比べて、機能的に欠損したキメラをもたらした。

20

【0154】

DNAポリメラーゼキメラのSso7d部分にアミノ酸の変化T40S、G41A、およびV45Lを生じさせた場合、PCR収率およびDNA結合活性の低下は観察されなかった。非保存アミノ酸L55からVへの変異もまた、アミノ酸変化L55Vは、Sac7e中のこの部位のアミノ酸と異なるにもかかわらず、キメラの機能性に悪影響を及ぼさなかった。キメラDNAポリメラーゼ(Q56D、Q61E、およびK63R)のSso7d部分のC末端ヘリックスに生じた変異は、キメラに機能性損失を引き起こさなかった。

30

【0155】

E13Q、I16T、T40S、V45L、L55V、Q56D、およびK63Rに変異を有するSso7d領域があるキメラDNAポリメラーゼは、野生型キメラDNAポリメラーゼと同程度のDNA収率およびDNA結合活性を有した(図3)。

【0156】

ここで引用したあらゆる特許、特許出願、および公開された参考文献は、参照によってその全体を本明細書に援用する。本発明を特にその好ましい実施形態を参照して示し説明したが、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲を逸脱することなく、形態および詳細の様々な変更ができることが当業者によって理解される。

40

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】Sso7dとSso7d様ポリペプチド(Ssh7b、RiboP3、Sto7e、Sac7d、Sac7e、およびSac7a)の間のタンパク質配列比較を表す。

【図2】Pfu DNAポリメラーゼキメラのSso7d領域に生じた変異(カラム1)の同定を表す。キメラに悪影響を与えた変異はカラム2で、一方カラム3はキメラに悪影響を与えなかった変異を示す。

【図3】野生型Sso7dポリペプチドを含むキメラDNAポリメラーゼと変異Sso7dポリペプチドを含むキメラDNAポリメラーゼとを比較する、増幅反応およびゲルシフ

50

トアッセイの結果を表す。Sso7dポリペプチドの変異はE13Q、I16T、T40S、V45L、L55V、Q56D、およびK63Rである。

【図1】

Sso7d(Sso7d)Sso7d: AUYMFKYKGGEREVDISKIKKVVWVYGMBSFTYDEEGGKTKRGAVSEKDAFCHLLQWLEKIKS
 RHPFS(Sso7d)Sso7d: QMMPEFCSYENKLEDDYPI
 Sso7d: QMLEKSKK
 Sso7d: DMLAARERK
 Sso7d: M DMLAARERK
 Sso7d: ENLARGIE
 Sso7d: YDINGK
 Sso7d: D-N
 Sso7d: D-N
 Sso7d: D-N
 Sso7d: D-N
 Sso7d: (Sso7d: YDINGK)

下線・Sso7d中で自然変動が起る位置

図1

【図2】

	#	変異	悪影響を受けたキメラ	キメラに影響なし
N末端	1	A1V	X	
	2	T2K	X	
	3	T2S	X	
	4	K4R	X	
	5	E13Q		X
	6	I16T		X
	7	W23F	X	
	8	I29V	X	
	9	I29L	X	
	10	I29A	X	
	11	T32S	X	
	12	E35D	X	
	13	G37A	X	
	14	T40S		X
	15	G41A		X
	16	V45L		X
	17	L55V		X
	18	Q56D		X
	19	Q61E		X
C末端	20	K63R		X

Pfu DNAポリメラーゼキメラのSso7dサブユニットに生じた変異。

図2

【 図 3 】

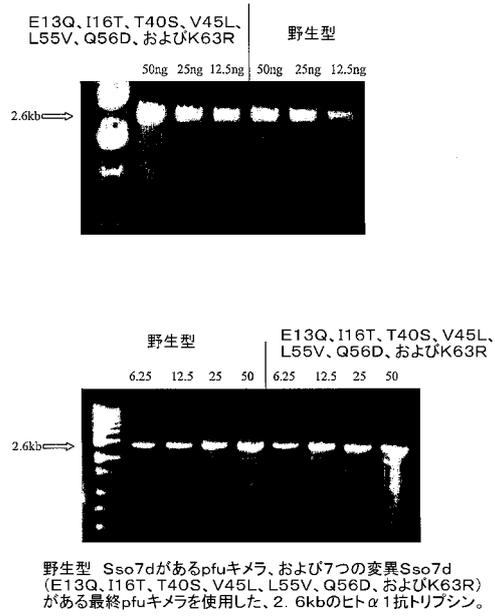


図3

【 配列表 】

0005241493000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A

(72)発明者 ボーンズ、 マイケル
アメリカ合衆国 9 2 0 2 6 カリフォルニア州 エスコンディード エディス ドライブ 1 9
0 7

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特表2003-534796(JP,A)
国際公開第2004/037979(WO,A1)
国際公開第2004/058942(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 9 / 1 2
PubMed
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq