

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-508488
(P2009-508488A)

(43) 公表日 平成21年3月5日(2009.3.5)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|--------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 N 9/00 (2006.01) | C 1 2 N 9/00 Z N A | 4 B 0 5 0 |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-531333 (P2008-531333)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月15日 (2006. 9. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月12日 (2008. 5. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/035919
 (87) 国際公開番号 W02007/035439
 (87) 国際公開日 平成19年3月29日 (2007. 3. 29)
 (31) 優先権主張番号 60/717, 296
 (32) 優先日 平成17年9月15日 (2005. 9. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591021970
 ニュー・イングランド・バイオレイブス・
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
 938、イプスウィッチ、カウンティ・ロ
 ード・240
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

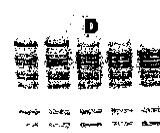
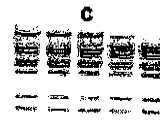
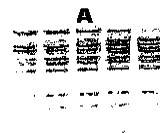
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サーモコッカス種 (9° N-7株) DNAリガーゼの発見、クローニング及び精製

(57) 【要約】

サーモコッカス (Thermococcus) 種 (9° N-7株) から単離された熱安定性DNAリガーゼを表す組成物と、その製造及び使用方法について記載する。熱安定性DNAリガーゼはライゲーション中の補因子としてATPに依存するが、NAD+には依存せず、100で活性を維持する。

1 2 3 4 5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNAリガーゼ活性をもち、配列番号 1 3 に対して少なくとも 9 1 % のアミノ酸配列一致度をもつ実質的に純粋な組換え蛋白質。

【請求項 2】

(a) 配列番号 2 と実質的に同一の配列 ;

(b) 配列番号 2 と実質的に相補的な配列 ;

(c) ストリンジェント条件下で配列番号 2 とハイブリダイズする配列 ; 及び

(d) 配列番号 1 3 をコードする配列

から構成される群から選択される DNA 配列によりコードされる DNA リガーゼ活性をもつ実質的に純粋な蛋白質。

10

【請求項 3】

約 1 0 0 の温度で 3 0 分間インキュベーション後にリガーゼ活性の少なくとも 2 5 % が維持されている請求項 1 に記載の蛋白質。

【請求項 4】

約 1 0 0 の温度で 3 0 分間インキュベーション後にリガーゼ活性の少なくとも 2 5 % が維持されている請求項 2 に記載の蛋白質。

【請求項 5】

ライゲーション中に補因子として ATP を利用することができるが、NAD⁺ は利用することができない請求項 1、2、3 又は 4 に記載の蛋白質。

20

【請求項 6】

DNA リガーゼをコードする DNA であって、DNA が、

(a) 配列番号 2 と実質的に同一の配列 ;

(b) 配列番号 2 と実質的に相補的な配列 ;

(c) ストリンジェント条件下で配列番号 2 とハイブリダイズする配列 ; 及び

(d) 配列番号 1 3 をコードする配列

から構成される群から選択される配列をもつ前記 DNA。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の蛋白質を発現することが可能な宿主細胞。

30

【請求項 9】

(a) 請求項 1 又は 2 に記載のリガーゼを選択する段階と ;

(b) 少なくとも 1 本の DNA 鎖に切れ目を含む DNA とリガーゼを混合する段階と ;

(c) 切れ目にホスホジエステル結合をライゲーションする段階を含むホスホジエステル結合のライゲーション方法。

【請求項 1 0】

リガーゼが古細菌単離株に由来する熱安定性リガーゼである請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

古細菌単離株が *Thermococcus* 種 (9 ° N - 7 株) である請求項 9 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

サーモコッカス (*Thermococcus*) は古細菌 (*Archaea*) 門の 1 属である。これらの古代生物は高温を含む極限条件下の各種環境で増殖する。これらの生物が実験室で増殖する能力は非常に限られているので、その生化学又はその代謝については殆ど分かっていない。

【0 0 0 2】

リガーゼは 2 本鎖 DNA の 1 本鎖切れ目の部位におけるホスホジエステル結合の形成を

50

触媒する酵素である。リガーゼ酵素は2本鎖DNAの一般に平滑末端同士又は付着末端同士の共有結合も触媒する。リガーゼは1種の熱安定性リガーゼである *Thermus aquaticus* (Taqリガーゼ)を含む各種細菌からクローニングされている。このリガーゼは米国特許第6,054,564号に記載されている。

【0003】

サーモコッカスはごく少数しか単離されていないので、これらの細菌に含まれるリガーゼ又はこのような蛋白質をコードする遺伝子の特性については殆ど分かっていない(例えば Nakataniら, *J. Bacteriology* 182:6424-6433(2000)参照)。別の *Archaea* 属であるパイロコッカス (*Pyrococcus*) に由来するリガーゼも例えば米国特許第5,506,137号及び5,700,672号と、Keppetipolaら, *J. Bacteriology* 187:6902-6908(2005)に記載されている。

10

【0004】

リガーゼはDNA増幅、配列決定及び一塩基多型の検出等の分子生物学の多くの技術で使用されている。高温で安定であり、迅速な反応速度と厳密な特異性をもつ改良型リガーゼを見出すことが依然として必要である。

【発明の開示】

【0005】

本発明の1態様では、DNAリガーゼ活性をもち、配列番号13に対して少なくとも91%のアミノ酸配列一致度をもつ実質的に純粋な組換え蛋白質を提供する。

20

【0006】

本発明の別の態様では、DNAリガーゼ活性をもち、DNAリガーゼが(a)配列番号2と実質的に同一の配列；(b)配列番号2と実質的に相補的な配列；(c)ストリンジент条件下で配列番号2と実質的にハイブリダイズする配列；及び(d)配列番号13をコードする配列から構成される群から選択されるDNA配列によりコードされる実質的に純粋な蛋白質を提供する。

【0007】

上記態様の蛋白質は更に約100の温度で30分間インキュベーション後にリガーゼ活性の少なくとも25%がリガーゼにより維持されていることを特徴とする。更に、リガーゼはライゲーション中に補因子としてATPを利用するが、 NAD^+ ではこの目的に検出可能な効果が得られないことも特徴とすることができる。

30

【0008】

別の態様では、(a)配列番号2と実質的に同一の配列；(b)配列番号2と実質的に相補的な配列；(c)ストリンジент条件下で配列番号2とハイブリダイズする配列；及び(d)配列番号13をコードする配列から構成される群から選択される配列をもつDNAリガーゼをコードするDNAを提供する。

【0009】

別の態様では、上記DNAを含むベクターを記載する。更に、前記ベクターからリガーゼを発現することが可能な宿主細胞を提供する。

【0010】

別の態様では、上記型のDNAリガーゼを選択する段階と；少なくとも1本のDNA鎖に切れ目を含むDNAとリガーゼを混合する段階と；切れ目にホスホジエステル結合をライゲーションする段階を含むホスホジエステル結合のライゲーション方法を提供する。

40

【0011】

前記方法の1例では、DNAリガーゼは古細菌単離株、より詳細には *Thermococcus* 種(9°N-7株)に由来する熱安定性リガーゼである。

【0012】

(態様の詳細な説明)

「熱安定性リガーゼ」なる用語は本明細書ではDNAのライゲーションを触媒し、100で30分後にその活性の少なくとも25%を維持する酵素の意味で使用する。この非

50

常に高温下での熱安定性は *Thermococcus* リガーゼ (古細菌) を *Thermus* リガーゼ (細菌) から区別する特徴である。

【0013】

Thermococcus 種 (9°N - 7株) は熱水噴出孔から単離された *Thermococcus* 種である (Southworthら, PNAS 93:5281 (1996))。

【0014】

Thermococcus 種 (9°N - 7株) DNA リガーゼの2種の公知最近縁種は *Thermococcus fumicolans* リガーゼと *Thermococcus kodakaraensis* リガーゼ (JP 2000308494 - A/1) であり、夫々アミノ酸レベルで88%と90%の一致度をもつ。これらはどちらも NAD^+ 又は ATP を補因子として利用すると報告されているので、新規類のリガーゼである。T. *fumicolans* リガーゼは NAD^+ 又は ATP を等しく良好に利用することが Nakataniら (J. Bacteriology 182:6424 - 6433 (2000)) により報告されており、T. *kodakaraensis* リガーゼは ATP の代わりに NAD^+ を使用すると活性レベルが低下し、*Thermococcus* 種 (9°N - 7株) は NAD^+ では活性を検出できなかった (実施例2)。

10

【0015】

「実質的に同一」及び「実質的に相補的」なる用語は DNA 又はアミノ酸配列が指定配列とほぼ同一もしくは一致しているか、又は相補的配列とほぼ同一もしくは一致していることを意味する。この用語は図面に示したアミノ酸又は DNA 配列に対して僅かな配列相違を含む配列も包含する。このような相違は蛋白質のライゲーション機能を有意に妨げない突然変異イベントに起因すると思われる。

20

【0016】

本発明の1態様では、ストリンジェントハイブリダイゼーションは以下の条件下で実施される。a) ハイブリダイゼーション: 0.75M NaCl, 0.15 Tris HCl, 10mM EDTA, 0.1% NaCl, 0.1% SLS, 0.03% BSA, 0.03% Ficoll 400, 0.03% PVP 及び 100 µg/ml 煮沸仔ウシ胸腺 DNA 中で50にて約12時間; b) 45にて0.1x SET, 0.1% SDS, 0.1% NaCl 及び 0.1M リン酸緩衝液で30分間3回洗浄し、ハイブリダイズした2本鎖 DNA の存在をサザンロットで検出する。

30

【0017】

本明細書に引用する全文献及び米国予備出願第60/717,296号 (出願日2005年9月15日) は参照により本明細書に組込む。

【実施例1】

【0018】

縮重プライマーを使用した *Thermococcus* 種 (9°N - 7株) DNA リガーゼ遺伝子のクローニング

まず *Thermococcus* 種 (9°N - 7株) ゲノム DNA から PCR により遺伝子を増幅した。フォワードプライマーの配列は Nakataniら, J. Bact 182 (22): 6424 - 6433 (2000) (*Thermococcus kodakaraensis*) と Rollandら, FEMS Microbiology Lett. 236 (2): 267 - 273 (2004) (*Thermococcus fumicolans*) の文献に記載のものを利用した。指定の縮重度をもつコンセンサス配列を以下のようにデザインした。

40

【0019】

【化1】

フォワードプライマー

5'CGGTGGTGCATATGRGCGAYATGMRSTACTC (配列番号:20)

【0020】

【化2】

リバースプライマー

10

5'ATAAACTCTAGATTACYTCTTCGCCTTGAACCTCTCCTGG

(配列番号:21)

【0021】

Thermococcus種(9°N-7株)のプライマーを使用してゲノムThermococcus種(9°N-7株)DNAからDNAリガーゼの遺伝子を増幅した。遺伝子をクローニングするために使用したPCR反応条件は以下の通りとした。

【0022】

20mM Tris-HCl, pH 8.8、10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄及び4mM MgSO₄、0.1% Triton X-100、各dNTP 200µM、Thermococcus種(9°N-7株)ゲノムDNA 50ng、フォワードプライマー及びリバースプライマー各500ng、Taq DNAポリメラーゼ2.5単位並びにVent(登録商標)DNAポリメラーゼ0.02単位を含有する反応混合物100µlを94℃まで1分間加熱した後、1分間で45℃とした後、3分間で72℃にした。この温度サイクルを30回繰返した。サイクリングの完了後、反応温度を室温まで下げ、大腸菌DNAポリメラーゼKlenowフラグメント5単位を加え、更に5分間室温でインキュベートした。次に反応混合物を70mM EDTAに調整した。PCR産物をフェノール抽出し、アルコール沈殿させ、CL6Bセファローススピンカラムで脱塩した。

20

30

【0023】

1700bp PCR産物を大腸菌にクローニングした。EcoRVで開裂したlitmus 28iをベクターとして使用してDNAフラグメントをクローニングした。

【0024】

T4 DNAリガーゼ緩衝液にインサート80ng、litmusベクター80ng及びT4 DNAリガーゼ(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)400単位を加えてライゲーション反応液10µlとした。ライゲーション反応液を16℃で一晩インキュベートし、大腸菌TB1細胞にエレクトロポレーションし、IPTG XGALプレートにプレーティングした。

【0025】

白色コロニーをピッキングした。9個の白色コロニーのうちの1個は1700bpインサートを含んでいた。別のエレクトロポレーションにより、1700bpインサートを含む更に1個のクローンが得られた。これらの2個のクローンのインサートを配列決定した。

40

【0026】

これらのクローンの配列から、縮重度の低い新規フォワードプライマーを次のようにデザインした。

【0027】

【化3】

9° N フォワードプライマー:

5'cggtggtgcatatgggcgayatgaggtactccgagctgg (配列番号:22)

【0028】

(2)(1)のプライマーよりも縮重度の低い第2のフォワードプライマーを使用した *Thermococcus* 種(9°N-7株)リガーゼのクローニング

5個の縮重塩基を含む上記(1)のフォワードプライマーの代わりに縮重塩基を1個しか含まない9°N-7フォワードプライマーを使用して独立したPCR反応を更に4回実施した。

10

【0029】

Phusion HF緩衝液(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)100 μ lに*Thermococcus*種(9°N-7株)ゲノムDNA50ng、フォワードプライマー及びリバースプライマー各500ng、各dNTP 200 μ M並びにPhusion DNAポリメラーゼ(New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA)1 μ lを加え、98 $^{\circ}$ まで30秒間加熱した後、98 $^{\circ}$ で10秒間 70 $^{\circ}$ で30秒間 72 $^{\circ}$ で1分間を25サイクル繰返した。次に反応混合物を72 $^{\circ}$ で5分間インキュベートした。各PCR反応の産物を最初のPCR反応と同様に処理し、上記のように*litmus 28i*にクローニングした。PCR反応からの2個の独立したクローン(A1及びA3)は他の3回のPCR反応の各々からの1個のクローン(B2、C3、D3)と同様に1700塩基対インサートを含むことがミニプレップDNAにより確認された。これらのクローンを次に増殖させ、その粗抽出液をSDS PAGEで電気泳動させた。各クローンは60kd蛋白質を発現した。

20

【0030】

クローンA1、A3、B2、C3、D3に加え、*lig 7*及び*lig 8*からのプラスミドを精製し、インサートを配列決定した。DNA配列を図1a-1~1a-5(配列番号1~7)に示す。

【0031】

理論により限定する意図はないが、観察された配列の僅かな相違は*Thermococcus*種(9°N-7株)細胞集団内のクローン変異に起因するものと思われる。配列変異は全て3位置換ないし保存アミノ酸置換である。クローンB2はリガーゼのコンセンサス配列の代表例である。このDNAリガーゼを先ず厳密に制御された発現ベクターで発現させた(図2)。

30

【0032】

(3)大腸菌におけるリガーゼ遺伝子(B2)の発現

Nde IとXba Iで開裂することによりB2フラグメントを*litmus*ベクターから切り出した。1700bpフラグメントをアガロースゲルから切り出し、ゲルスライスをアガロースで消化し、フラグメントを遊離させた。

【0033】

Nde IとXba Iで開裂することにより発現ベクターpMalC2X(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)を作製し、脱リン酸化した。T4 DNAリガーゼ緩衝液にインサート400ngとベクター100ngとT4 DNAリガーゼ200単位を加えた反応液10 μ l中、16 $^{\circ}$ で16時間インキュベートすることにより、1700塩基対の開裂PCRフラグメントをpMalC2Xベクターにライゲーションした。ライゲーション反応物を大腸菌TB1細胞にエレクトロポレーションし、1700bpフラグメントをもつクローンを単離し、*Thermococcus*種(9°N-7株)B2-1(図3)と命名した。

40

【0034】

クローンをLB培地で増殖させ、IPTGで誘導した。誘導細胞のサンプルを溶解させ

50

、SDS PAGEゲルで電気泳動させると、~60kdのサイズの蛋白質に対応するバンドが検出された。DNA配列に由来する蛋白質配列を分析した処、遺伝子は26個のレアアルギニンコドンをもつ蛋白質をコードすることが分かった。従って、より高レベルの発現が得られるようにアルギニンのレアtRNAを含む宿主細胞(大腸菌BL-2(DE3)RIL)(Stratagene, La Jolla, CA)を使用した。Thermococcus種(9°N-7株)の誘導後に、宿主サンプル中のB2-1プラスミドをSDS PAGEにより分析した処、顕著な60kdバンドが観察された。

【0035】

(4) Thermococcus種(9°N-7株)リガーゼと他の熱安定性DNAリガーゼの比較

Thermococcus種(9°N-7株)DNAリガーゼアミノ酸配列をCLUSTAL多重配列アラインメントにより4種の他の好熱性DNAリガーゼと比較した。

【0036】

CLUSTAL W(1.82)多重配列アラインメント

配列フォーマットはPearsonである。

配列1: 9°N-7-B2(配列番号15)564aa

配列2: T.kodakaraensis(配列番号16)562aa

配列3: P.abysssi(配列番号17)559aa

配列4: P.furiosus(配列番号18)561aa

配列5: T.fumicolans(配列番号19)559aa。

一致度スコア:

配列(1:2)整列。スコア:90

配列(1:3)整列。スコア:81

配列(1:4)整列。スコア:78

配列(1:5)整列。スコア:88

配列(2:3)整列。スコア:80

配列(2:4)整列。スコア:80

配列(2:5)整列。スコア:87

配列(3:4)整列。スコア:90

配列(3:5)整列。スコア:78

配列(4:5)整列。スコア:77。

【0037】

アラインメントを図4に示す。Thermococcus種(9°N-7株)DNAリガーゼに最も近縁の公知のものはThermococcus kodakaraensis DNAリガーゼであり、アミノ酸一致度90%及びヌクレオチド一致度80.9%である。

【0038】

(5) Thermococcus種(9°N-7株)DNAリガーゼの精製

Thermococcus種(9°N-7株)に由来するDNAリガーゼのB2フラグメントを含むpMalC2Xプラスミド(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)で大腸菌BL-21(DE3)-RIL(Stratagene, La Jolla, CA)を形質転換した。アンピシリン50µg/mlとクロラムフェニコール25µg/mlを添加した37°CのLB培地100ml中で細胞を増殖させた。一晚インキュベーション後、培養液を10リットル容発酵槽に移し、OD600が0.59になるまで37°Cでインキュベートし、IPTG 0.1gを加えた。培養液を更に5.75時間インキュベートし、回収した。細胞ペーストを-20°Cで保存した。

【0039】

10mM Tris HCl、pH7.5、20mM NaCl、0.1mM EDTA及び1.0mM DTTの混合物40ml中の細胞ペースト10gを解凍し、音波処理

10

20

30

40

50

により溶解させた。抽出液を0.3 mM PMSF及び200 mM NaClにした。抽出液を遠心により清澄化した。清澄化した抽出液を0.2 M NaClのDEAEセファロースカラムに通した。カラムを通過した蛋白質をプールし、100 mM NaClまで希釈した。これをホスホセルロースカラムにアプライし、吸収された蛋白質を100 mM 1.1 M NaCl勾配で溶出させた。フラクション(図5)をSDS PAGEにより分析し、主60 kDピークをプールし、75 °Cまで30分間加熱した。この溶液を遠心により清澄化し、清澄化溶液を100 mM NaClまで希釈し、ヒドロキシアパタイトカラムにアプライした。硫酸アンモニウムの0.13%勾配をカラムにアプライし、フラクションを集め、HindIII DNA 50 µg/mlを基質として各種フラクションをT4 DNAリガーゼ緩衝液(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)中でインキュベートすることにより活性をアッセイした。反応液を37 °Cで10分間インキュベートした。10% 100 mM EDTAと50%グリセロール及びブロムフェノールブルー色素を加えることにより反応を終了した。反応液を65 °Cまで加熱し、分析のために1%アガロースゲルにロードした。

【0040】

リガーゼ活性約80%を含む試験管をプールし、50%グリセロール、10 mM Tris HCl, pH 7.5、50 mM KCl、10 mM (NH₄)₂SO₄、0.1 mM EDTA及び1.0 mM DTTで透析した。精製したThermococcus種(9°N株)DNAリガーゼを-20 °Cで保存した。

【実施例2】

【0041】

Thermococcus種(9°N-7株)DNAリガーゼの特性

推奨反応条件は以下の通りである：

10 mM Tris-HCl pH 7.5

2.5 mM MgCl₂

2.5 mM DTT

300 µM ATP。

【0042】

45 °Cで活性をアッセイするための典型的な基質はDNAである。適切に消化したDNAはDNAの両末端に12塩基伸長部のライゲーションを検出することができる。一般にHindIII又はBstEIIで予め消化したDNAを使用した。ライゲーションの分析はアガロースゲル電気泳動で実施した。

【0043】

ATPのK_mは100 µM未満であると思われる。活性はTriton X-100により刺激した。

【0044】

Thermococcus fumicolans DNAリガーゼと異なり、Thermococcus種(9°N-7株)リガーゼはNAD⁺の存在下で活性を検出できなかった。

【0045】

この酵素はマグネシウムイオンを必要とする。2.5 mM MgCl₂では、10 mM MgCl₂の10倍の活性が得られた。

【0046】

酵素を約100 °Cで30分間インキュベートした後に活性の25%~50%が維持された(図6)。

【0047】

このリガーゼはニックの入ったDNAを90 °Cでシールすることができる。DNAリガーゼをBstNB Iによりニックを入れたpUC19プラスミドDNAと共にインキュベートすると、ニックの入った弛緩プラスミドを共有結合で閉じた環状DNAに変換することがアガロースゲル電気泳動により判明した。反応速度は45 °Cよりも80 °Cのほうが速

10

20

30

40

50

かった。ニックの入ったプラスミドは90 で変性したが、ニックの入ったプラスミドの全てが変性により1本鎖になる前に90 で実質的なニックのシールが生じた。

【実施例3】

【0048】

DNA修復混合物におけるThermococcus種(9°N-7株)DNAリガーゼの使用

9°N-7株DNAリガーゼを含む酵素混合物を使用して、脱プリン化により損傷したDNAの修復を行った。

【0049】

Ide, H.ら, Biochemistry 32(32):8276-83(1993)により記載されているように、実験反応のDNAを脱プリン化により損傷させた。

DNA(NEB#N3011, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)をエタノール沈殿させた。DNAを脱プリン化緩衝液(100mM NaCl, 10mMクエン酸, pH5.0)に0.5mg/mlの濃度で再懸濁し、70 で120分間インキュベートした。次にサンプルをエタノール沈殿させ、0.01M Tris, 0.001M EDTA, pH8.0の溶液に再懸濁した。緩衝液対照で校正後にDNA含有溶液のA²⁶⁰を測定することによりDNA濃度を測定した。

10

【0050】

DNA(1ng); 100μM dNTP(NEB#M0447, New England Biolabs, Ipswich, MA); 1mM ATP; Taqリガーゼ(NEB#M0208, New England Biolabs, Ipswich, MA)480単位又は9°N-7 DNAリガーゼ(NEB#M0238, New England Biolabs, Ipswich, MA)500単位; 大腸菌DNAポリメラーゼI(E.coli polI)(NEB#M0209, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)0.1単位; 大腸菌Endo IV(NEB#M0304, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)10単位; 1xThermopol緩衝液(NEB#B9004, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)で最終容量47.5μLとした酵素混合物中で、損傷したDNAを室温にて10分間インキュベートした。

20

【0051】

反応後にサンプルを氷に移した後、増幅した。陰性対照は酵素を添加しない以外は上記のように処理した。

30

【0052】

DNA増幅反応

プライマーとしてCGAACGTCGCGCAGAGAAACAGG(L72-5R)(配列番号23)とCCTGCTCTGCGCTTCACGC(L30350F)(配列番号24)を使用し、Wangら, Nucl. Acids Res. 32:1197-1207(2004)の方法に従ってのDNA増幅を実施した。

【0053】

増幅混合物2.5μLを上記修復混合物47.5mLに加えた。増幅混合物は1xThermopol緩衝液中、各dNTP 100μM、Taq DNAポリメラーゼ(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)5単位、Vent(登録商標)(exo+)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)0.1単位、プライマーL72-5R 5x10⁻¹¹M及びプライマーL30350F 5x10⁻¹¹Mとした。

40

【0054】

修復酵素を反応から除外した場合の酵素保存緩衝液作用を補正するために、適切な容量のその保存緩衝液を反応液に加えた。いずれの場合も、増幅反応液は95 で20秒間を1サイクル後に94 で5秒間、次いで72 で5分間を25サイクルというパラメーターを使用してサーマルサイクラーで処理した。増幅するアンプリコンのサイズは5kbと

50

した。

【0055】

DNA (5 kb) の増幅結果を1%アガロースゲル電気泳動により測定した。6×ローディング色素 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Sambrook and Russell編, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, pp. 5.4 - 5.17) を増幅反応液50 μlに加えた。次にサイズ標準として2-logラダー (NEB #N3200, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA) 1 μgと共にこの溶液20 μlをアガロースゲルにロードした。

10

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1a-1】図1a-1~1a-5は9°N-7 DNAリガーゼ変異体 (配列番号1~7) のDNA配列アラインメントを示す。

【図1a-2】図1a-1~1a-5は9°N-7 DNAリガーゼ変異体 (配列番号1~7) のDNA配列アラインメントを示す。

【図1a-3】図1a-1~1a-5は9°N-7 DNAリガーゼ変異体 (配列番号1~7) のDNA配列アラインメントを示す。

【図1a-4】図1a-1~1a-5は9°N-7 DNAリガーゼ変異体 (配列番号1~7) のDNA配列アラインメントを示す。

20

【図1a-5】図1a-1~1a-5は9°N-7 DNAリガーゼ変異体 (配列番号1~7) のDNA配列アラインメントを示す。

【図1b-1】図1b-1~1b-2はThermococcus種 (9°N-7株) DNAリガーゼ変異体 (配列番号8~15) の蛋白質アラインメントを示す。

【図1b-2】図1b-1~1b-2はThermococcus種 (9°N-7株) DNAリガーゼ変異体 (配列番号8~15) の蛋白質アラインメントを示す。

【図2】litmus 28iに挿入したThermococcus種 (9°N-7株) DNAリガーゼ遺伝子のプラスミドマップを示す。

【図3】pMalC2xに挿入したThermococcus種 (9°N-7株) DNAリガーゼ遺伝子のプラスミドマップを示す。

30

【図4-1】Thermococcus種 (9°N-7株) (配列番号15) とThermococcus fumicolans (配列番号16)、Thermococcus kodakaraensis (配列番号17)、Pyrococcus abyssi (配列番号18)、及びPyrococcus furiosus (配列番号19) の蛋白質アラインメントを示す。

【図4-2】Thermococcus種 (9°N-7株) (配列番号15) とThermococcus fumicolans (配列番号16)、Thermococcus kodakaraensis (配列番号17)、Pyrococcus abyssi (配列番号18)、及びPyrococcus furiosus (配列番号19) の蛋白質アラインメントを示す。

40

【図5】ホスホセルロースカラムフラクションのSDS PAGEを示す。レーンは以下の通りである: FT (カラムのフロースルー) はフラクション番号23-34である; MWは分子量標準である。矢印はゲル上のDNAリガーゼに対応するバンドの位置を示す。

【図6】9°N-7 DNAリガーゼの熱安定性を示す。10 mM Tris HCl pH 7.5、2.5 mM MgCl₂、2.5 mM DTT、300 μM ATP及び0.1% Triton X-100の混合物30 μlに精製9°N-7 DNAリガーゼの100倍希釈液3 μlを加え、10 mM Tris HCl pH 7.5、2.5 mM MgCl₂、2.5 mM DTT、300 μM ATP及び0.1% Triton X-100で更に3倍系列希釈した。4個の同一希釈液セットを30分間4、80、90又は100でインキュベートした。反応を終了するために、サンプルを氷上に置

50

き、等容量の10 mM Tris HCl, pH 7.5、2.5 mM MgCl₂、2.5 mM DTT、300 μM ATP、0.1% Triton X-100及び50 μg/ml BstEII DNAを各管に加えた。次に反応液を45 で15分間インキュベートした後、0.15倍容量の50%グリセロール、100 mM EDTA及びプロモフェノールブルーを各管に加えた。次に反応液を75 で5分間インキュベートし、1%アガロースTBEゲルで電気泳動させた。パネルAは氷上で30分間インキュベーションの結果を示す。パネルBは80 で30分間インキュベーションの結果を示す。パネルCは90 で30分間インキュベーションの結果を示す。パネルDは100 で30分間インキュベーションの結果を示す。各パネルのレーンは以下の通りである：レーン1はそれ以上希釈しない場合を示す；レーン2は3倍に希釈した；レーン3は9倍に希釈した；レーン4は27倍に希釈した；レーン5は81倍に希釈した。

【図7】大腸菌ポリメラーゼ及び大腸菌Endo IVを含む修復混合物で9°N-7ポリメラーゼをTaqポリメラーゼと比較したゲルを示す。修復混合物は脱プリン化DNAと共にインキュベートし、増幅した。レーン1は対照であり；レーン2は修復混合物の不在下のDNAであり；レーン3及び4はDNAとTaqリガーゼ480単位を加えた修復混合物の二重サンプルであり；レーン5及び6はDNAと9°N-7リガーゼ500単位を加えた修復混合物の二重サンプルである。

【 図 1 a - 1 】

Figure1a-1

A3(配列番号:1);B2(配列番号:2);lig7(配列番号:3);C3(配列番号:4);
A1(配列番号:5);lig8(配列番号:6);D3(配列番号:7)

```

A3      ATGGGCGATATGAGGTACTCCGAGCTGGCCGAACCTACCGGAGGCTTGAAGAACCCAGC 60
B2      ATGGGCGATATGAGGTACTCCGAGCTGGCCGAACCTACCGGAGGCTTGAAGAACCCAGC 60
lig7    ATGGGCGATATGAGGTACTCCGAGCTGGCCGAACCTACCGGAGGCTTGAAGAACCCAGC 60
C3      ATGGGCGATATGAGGTACTCCGAGCTGGCCGAACCTACCGGAGGCTTGAAGAACCCAGC 60
A1      ATGGGCGATATGAGGTACTCCGAGCTGGCCGAACCTACCGGAGGCTTGAAGAACCCAGC 60
lig8    ATGGGCGATATGAGGTACTCCGAGCTGGCCGAACCTACCGGAGGCTTGAAGAACCCAGC 60
D3      *****

A3      CTCAAACGCTCAAGACCAAGTTCGCGCGGACTTCCTCAAGAAAACACCCGACGATTTC 120
B2      CTCAAACGCTCAAGACCAAGTTCGCGCGGACTTCCTCAAGAAAACACCCGACGATTTC 120
lig7    CTCAAACGCTCAAGACCAAGTTCGCGCGGACTTCCTCAAGAAAACACCCGACGATTTC 120
C3      CTCAAACGCTCAAGACCAAGTTCGCGCGGACTTCCTCAAGAAAACACCCGACGATTTC 120
A1      CTCAAACGCTCAAGACCAAGTTCGCGCGGACTTCCTCAAGAAAACACCCGACGATTTC 120
lig8    CTCAAACGCTCAAGACCAAGTTCGCGCGGACTTCCTCAAGAAAACACCCGACGATTTC 120
D3      CTCAAACGCTCAAGACCAAGTTCGCGCGGACTTCCTCAAGAAAACACCCGACGATTTC 120
*****

A3      CTCGAGATAGTCCCTACCTGATTCCTCGGCAAGTCTTTCGGAAGTGGGAGGAGCGCGAG 180
B2      CTCGAGATAGTCCCTACCTGATTCCTCGGCAAGTCTTTCGGAAGTGGGAGGAGCGCGAG 180
lig7    CTCGAGATAGTCCCTACCTGATTCCTCGGCAAGTCTTTCGGAAGTGGGAGGAGCGCGAG 180
C3      CTCGAGATAGTCCCTACCTGATTCCTCGGCAAGTCTTTCGGAAGTGGGAGGAGCGCGAG 180
A1      CTCGAGATAGTCCCTACCTGATTCCTCGGCAAGTCTTTCGGAAGTGGGAGGAGCGCGAG 180
lig8    CTCGAGATAGTCCCTACCTGATTCCTCGGCAAGTCTTTCGGAAGTGGGAGGAGCGCGAG 180
D3      CTCGAGATAGTCCCTACCTGATTCCTCGGCAAGTCTTTCGGAAGTGGGAGGAGCGCGAG 180
*****

A3      CTCGGCTCGGGGAAAGTTCCTCAAAAGGCGCTTTCGATGCGCAACCGCGCTTCCCGAG 240
B2      CTCGGCTCGGGGAAAGTTCCTCAAAAGGCGCTTTCGATGCGCAACCGCGCTTCCCGAG 240
lig7    CTCGGCTCGGGGAAAGTTCCTCAAAAGGCGCTTTCGATGCGCAACCGCGCTTCCCGAG 240
C3      CTCGGCTCGGGGAAAGTTCCTCAAAAGGCGCTTTCGATGCGCAACCGCGCTTCCCGAG 240
A1      CTCGGCTCGGGGAAAGTTCCTCAAAAGGCGCTTTCGATGCGCAACCGCGCTTCCCGAG 240
lig8    CTCGGCTCGGGGAAAGTTCCTCAAAAGGCGCTTTCGATGCGCAACCGCGCTTCCCGAG 240
D3      CTCGGCTCGGGGAAAGTTCCTCAAAAGGCGCTTTCGATGCGCAACCGCGCTTCCCGAG 240
*****

A3      AGGGAATCGAGAACCTCGATTAAGGACACCGGGCGATTTGGCGGAGGCGCTGGCTCTGGCT 300
B2      AGGGAATCGAGAACCTCGATTAAGGACACCGGGCGATTTGGCGGAGGCGCTGGCTCTGGCT 300
lig7    AGGGAATCGAGAACCTCGATTAAGGACACCGGGCGATTTGGCGGAGGCGCTGGCTCTGGCT 300
C3      AGGGAATCGAGAACCTCGATTAAGGACACCGGGCGATTTGGCGGAGGCGCTGGCTCTGGCT 300
A1      AGGGAATCGAGAACCTCGATTAAGGACACCGGGCGATTTGGCGGAGGCGCTGGCTCTGGCT 300
lig8    AGGGAATCGAGAACCTCGATTAAGGACACCGGGCGATTTGGCGGAGGCGCTGGCTCTGGCT 300
D3      AGGGAATCGAGAACCTCGATTAAGGACACCGGGCGATTTGGCGGAGGCGCTGGCTCTGGCT 300
*****

A3      CTAAAGAGAGGAGGAGCAGAAGAGCTTCCTCAGCCAGCCCTCACGATAAAGCGGCTCTAC 360
B2      CTAAAGAGAGGAGGAGCAGAAGAGCTTCCTCAGCCAGCCCTCACGATAAAGCGGCTCTAC 360
lig7    CTAAAGAGAGGAGGAGCAGAAGAGCTTCCTCAGCCAGCCCTCACGATAAAGCGGCTCTAC 360
C3      CTAAAGAGAGGAGGAGCAGAAGAGCTTCCTCAGCCAGCCCTCACGATAAAGCGGCTCTAC 360
A1      CTAAAGAGAGGAGGAGCAGAAGAGCTTCCTCAGCCAGCCCTCACGATAAAGCGGCTCTAC 360
lig8    CTAAAGAGAGGAGGAGCAGAAGAGCTTCCTCAGCCAGCCCTCACGATAAAGCGGCTCTAC 360
D3      CTAAAGAGAGGAGGAGCAGAAGAGCTTCCTCAGCCAGCCCTCACGATAAAGCGGCTCTAC 360
*****

```

【 図 1 a - 2 】

Figure1a-2

```

A3      AGCACCTTCGTTAAGGTTGCCGAGGCGGAGCCGAGAGGGGAGCCAGGACGAGATCAAG 420
B2      AGCACCTTCGTTAAGGTTGCCGAGGCGGAGCCGAGAGGGGAGCCAGGACGAGATCAAG 420
lig7    AGCACCTTCGTTAAGGTTGCCGAGGCGGAGCCGAGAGGGGAGCCAGGACGAGATCAAG 420
C3      AGCACCTTCGTTAAGGTTGCCGAGGCGGAGCCGAGAGGGGAGCCAGGACGAGATCAAG 420
A1      AGCACCTTCGTTAAGGTTGCCGAGGCGGAGCCGAGAGGGGAGCCAGGACGAGATCAAG 420
lig8    AGCACCTTCGTTAAGGTTGCCGAGGCGGAGCCGAGAGGGGAGCCAGGACGAGATCAAG 420
D3      AGCACCTTCGTTAAGGTTGCCGAGGCGGAGCCGAGAGGGGAGCCAGGACGAGATCAAG 420
*****

A3      TACTTAGCAAACTCTTTCATGGATGCTCAACCCGAGGAGGGCACTACATAGCCAGAAC 480
B2      TACTTAGCAAACTCTTTCATGGATGCTCAACCCGAGGAGGGCACTACATAGCCAGAAC 480
lig7    TACTTAGCAAACTCTTTCATGGATGCTCAACCCGAGGAGGGCACTACATAGCCAGAAC 480
C3      TACTTAGCAAACTCTTTCATGGATGCTCAACCCGAGGAGGGCACTACATAGCCAGAAC 480
A1      TACTTAGCAAACTCTTTCATGGATGCTCAACCCGAGGAGGGCACTACATAGCCAGAAC 480
lig8    TACTTAGCAAACTCTTTCATGGATGCTCAACCCGAGGAGGGCACTACATAGCCAGAAC 480
D3      TACTTAGCAAACTCTTTCATGGATGCTCAACCCGAGGAGGGCACTACATAGCCAGAAC 480
*****

A3      GTCCTCGGAGCATGAGGACGGGGCTCGCCGAGGAGGATCCCTCGCGATGCCATAGCCGAG 540
B2      GTCCTCGGAGCATGAGGACGGGGCTCGCCGAGGAGGATCCCTCGCGATGCCATAGCCGAG 540
lig7    GTCCTCGGAGCATGAGGACGGGGCTCGCCGAGGAGGATCCCTCGCGATGCCATAGCCGAG 540
C3      GTCCTCGGAGCATGAGGACGGGGCTCGCCGAGGAGGATCCCTCGCGATGCCATAGCCGAG 540
A1      GTCCTCGGAGCATGAGGACGGGGCTCGCCGAGGAGGATCCCTCGCGATGCCATAGCCGAG 540
lig8    GTCCTCGGAGCATGAGGACGGGGCTCGCCGAGGAGGATCCCTCGCGATGCCATAGCCGAG 540
D3      GTCCTCGGAGCATGAGGACGGGGCTCGCCGAGGAGGATCCCTCGCGATGCCATAGCCGAG 540
*****

A3      TCCTTCAAGGTGAAGCCAGAGCTCGTCGAGAGGGCCCTACATGCTCAGCAGGCATTCGCG 600
B2      TCCTTCAAGGTGAAGCCAGAGCTCGTCGAGAGGGCCCTACATGCTCAGCAGGCATTCGCG 600
lig7    TCCTTCAAGGTGAAGCCAGAGCTCGTCGAGAGGGCCCTACATGCTCAGCAGGCATTCGCG 600
C3      TCCTTCAAGGTGAAGCCAGAGCTCGTCGAGAGGGCCCTACATGCTCAGCAGGCATTCGCG 600
A1      TCCTTCAAGGTGAAGCCAGAGCTCGTCGAGAGGGCCCTACATGCTCAGCAGGCATTCGCG 600
lig8    TCCTTCAAGGTGAAGCCAGAGCTCGTCGAGAGGGCCCTACATGCTCAGCAGGCATTCGCG 600
D3      TCCTTCAAGGTGAAGCCAGAGCTCGTCGAGAGGGCCCTACATGCTCAGCAGGCATTCGCG 600
*****

A3      TACGTGGCGAAGCTTGCAGAAAGCTCGAGGGGAAACGAGGGGCTCTCAAAAGTTCAGCATAC 660
B2      TACGTGGCGAAGCTTGCAGAAAGCTCGAGGGGAAACGAGGGGCTCTCAAAAGTTCAGCATAC 660
lig7    TACGTGGCGAAGCTTGCAGAAAGCTCGAGGGGAAACGAGGGGCTCTCAAAAGTTCAGCATAC 660
C3      TACGTGGCGAAGCTTGCAGAAAGCTCGAGGGGAAACGAGGGGCTCTCAAAAGTTCAGCATAC 660
A1      TACGTGGCGAAGCTTGCAGAAAGCTCGAGGGGAAACGAGGGGCTCTCAAAAGTTCAGCATAC 660
lig8    TACGTGGCGAAGCTTGCAGAAAGCTCGAGGGGAAACGAGGGGCTCTCAAAAGTTCAGCATAC 660
D3      TACGTGGCGAAGCTTGCAGAAAGCTCGAGGGGAAACGAGGGGCTCTCAAAAGTTCAGCATAC 660
*****

A3      ATTGGGAAGCCGATAAAGCCGATGCTAGCTCAAAACCGCCGCAAGCTCAAGGAAGCGCTTA 720
B2      ATTGGGAAGCCGATAAAGCCGATGCTAGCTCAAAACCGCCGCAAGCTCAAGGAAGCGCTTA 720
lig7    ATTGGGAAGCCGATAAAGCCGATGCTAGCTCAAAACCGCCGCAAGCTCAAGGAAGCGCTTA 720
C3      ATTGGGAAGCCGATAAAGCCGATGCTAGCTCAAAACCGCCGCAAGCTCAAGGAAGCGCTTA 720
A1      ATTGGGAAGCCGATAAAGCCGATGCTAGCTCAAAACCGCCGCAAGCTCAAGGAAGCGCTTA 720
lig8    ATTGGGAAGCCGATAAAGCCGATGCTAGCTCAAAACCGCCGCAAGCTCAAGGAAGCGCTTA 720
D3      ATTGGGAAGCCGATAAAGCCGATGCTAGCTCAAAACCGCCGCAAGCTCAAGGAAGCGCTTA 720
*****

```

【 図 1 a - 3 】

Figure1a-3

A3 ATCGAGATGGGCGGTGAGCGGCCCTTCGAGATTAAGTACGACGGCGCGCGTTCAGGTC 780
B2 ATCGAGATGGGCGGTGAGCGGCCCTTCGAGATTAAGTACGACGGCGCGCGTTCAGGTC 780
lig7 ATCGAGATGGGCGGTGAGCGGCCCTTCGAGATTAAGTACGACGGCGCGCGTTCAGGTC 780
C3 ATCGAGATGGGCGGTGAGCGGCCCTTCGAGATTAAGTACGACGGCGCGCGTTCAGGTC 780
A1 ATCGAGATGGGCGGTGAGCGGCCCTTCGAGATTAAGTACGACGGCGCGCGTTCAGGTC 780
lig8 ATCGAGATGGGCGGTGAGCGGCCCTTCGAGATTAAGTACGACGGCGCGCGTTCAGGTC 780
D3 ATCGAGATGGGCGGTGAGCGGCCCTTCGAGATTAAGTACGACGGCGCGCGTTCAGGTC 780

A3 CACCGCGATGGGACAGGGTGAATACTACTCGAGGAGGCTTGAAGACTCACCCGCTC 840
B2 CACCGCGATGGGACAGGGTGAATACTACTCGAGGAGGCTTGAAGACTCACCCGCTC 840
lig7 CACCGCGATGGGACAGGGTGAATACTACTCGAGGAGGCTTGAAGACTCACCCGCTC 840
C3 CACCGCGATGGGACAGGGTGAATACTACTCGAGGAGGCTTGAAGACTCACCCGCTC 840
A1 CACCGCGATGGGACAGGGTGAATACTACTCGAGGAGGCTTGAAGACTCACCCGCTC 840
lig8 CACCGCGATGGGACAGGGTGAATACTACTCGAGGAGGCTTGAAGACTCACCCGCTC 840
D3 CACCGCGATGGGACAGGGTGAATACTACTCGAGGAGGCTTGAAGACTCACCCGCTC 840

A3 ATTCTTGAGATTAAGTGGGCGGTAAGGCCCTCCCTGAGGCCCTTAATCTCATAGTCGAG 900
B2 ATTCTTGAGATTAAGTGGGCGGTAAGGCCCTCCCTGAGGCCCTTAATCTCATAGTCGAG 900
lig7 ATTCTTGAGATTAAGTGGGCGGTAAGGCCCTCCCTGAGGCCCTTAATCTCATAGTCGAG 900
C3 ATTCTTGAGATTAAGTGGGCGGTAAGGCCCTCCCTGAGGCCCTTAATCTCATAGTCGAG 900
A1 ATTCTTGAGATTAAGTGGGCGGTAAGGCCCTCCCTGAGGCCCTTAATCTCATAGTCGAG 900
lig8 ATTCTTGAGATTAAGTGGGCGGTAAGGCCCTCCCTGAGGCCCTTAATCTCATAGTCGAG 900
D3 ATTCTTGAGATTAAGTGGGCGGTAAGGCCCTCCCTGAGGCCCTTAATCTCATAGTCGAG 900

A3 GGGGAGCTGGTTCGCCCTGGCGAGAACGCTCGCCGAGGCCCTTCCAGTACGCTCAGG 960
B2 GGGGAGCTGGTTCGCCCTGGCGAGAACGCTCGCCGAGGCCCTTCCAGTACGCTCAGG 960
lig7 GGGGAGCTGGTTCGCCCTGGCGAGAACGCTCGCCGAGGCCCTTCCAGTACGCTCAGG 960
C3 GGGGAGCTGGTTCGCCCTGGCGAGAACGCTCGCCGAGGCCCTTCCAGTACGCTCAGG 960
A1 GGGGAGCTGGTTCGCCCTGGCGAGAACGCTCGCCGAGGCCCTTCCAGTACGCTCAGG 960
lig8 GGGGAGCTGGTTCGCCCTGGCGAGAACGCTCGCCGAGGCCCTTCCAGTACGCTCAGG 960
D3 GGGGAGCTGGTTCGCCCTGGCGAGAACGCTCGCCGAGGCCCTTCCAGTACGCTCAGG 960

A3 CGCTTTAGGAGGAAATCAACATTCAGGAGATGATTGAGAAGATTCGCTCGAGTCAAC 1020
B2 CGCTTTAGGAGGAAATCAACATTCAGGAGATGATTGAGAAGATTCGCTCGAGTCAAC 1020
lig7 CGCTTTAGGAGGAAATCAACATTCAGGAGATGATTGAGAAGATTCGCTCGAGTCAAC 1020
C3 CGCTTTAGGAGGAAATCAACATTCAGGAGATGATTGAGAAGATTCGCTCGAGTCAAC 1020
A1 CGCTTTAGGAGGAAATCAACATTCAGGAGATGATTGAGAAGATTCGCTCGAGTCAAC 1020
lig8 CGCTTTAGGAGGAAATCAACATTCAGGAGATGATTGAGAAGATTCGCTCGAGTCAAC 1020
D3 CGCTTTAGGAGGAAATCAACATTCAGGAGATGATTGAGAAGATTCGCTCGAGTCAAC 1020

A3 CTCCTCGACATCTCTACGCTTGAAGGAGAGGCTTCATCGACACGAAGTTCGAGAGAGG 1080
B2 CTCCTCGACATCTCTACGCTTGAAGGAGAGGCTTCATCGACACGAAGTTCGAGAGAGG 1080
lig7 CTCCTCGACATCTCTACGCTTGAAGGAGAGGCTTCATCGACACGAAGTTCGAGAGAGG 1080
C3 CTCCTCGACATCTCTACGCTTGAAGGAGAGGCTTCATCGACACGAAGTTCGAGAGAGG 1080
A1 CTCCTCGACATCTCTACGCTTGAAGGAGAGGCTTCATCGACACGAAGTTCGAGAGAGG 1080
lig8 CTCCTCGACATCTCTACGCTTGAAGGAGAGGCTTCATCGACACGAAGTTCGAGAGAGG 1080
D3 CTCCTCGACATCTCTACGCTTGAAGGAGAGGCTTCATCGACACGAAGTTCGAGAGAGG 1080

【 図 1 a - 5 】

Figure1a-5

A3 GAGTTCCACCAAGTCTCAAGCCCTGATTCCTCGTGAAGAGGGCAAGTTCGTCGAGATT 1500
B2 GAGTTCCACCAAGTCTCAAGCCCTGATTCCTCGTGAAGAGGGCAAGTTCGTCGAGATT 1500
lig7 GAGTTCCACCAAGTCTCAAGCCCTGATTCCTCGTGAAGAGGGCAAGTTCGTCGAGATT 1500
C3 GAGTTCCACCAAGTCTCAAGCCCTGATTCCTCGTGAAGAGGGCAAGTTCGTCGAGATT 1500
A1 GAGTTCCACCAAGTCTCAAGCCCTGATTCCTCGTGAAGAGGGCAAGTTCGTCGAGATT 1500
lig8 GAGTTCCACCAAGTCTCAAGCCCTGATTCCTCGTGAAGAGGGCAAGTTCGTCGAGATT 1500
D3 GAGTTCCACCAAGTCTCAAGCCCTGATTCCTCGTGAAGAGGGCAAGTTCGTCGAGATT 1500

A3 GAGCCCAAGGTCCTCATCGAGGTCACTTACCAGGAGATACAGAAAGAGCCCAAGTAAAG 1560
B2 GAGCCCAAGGTCCTCATCGAGGTCACTTACCAGGAGATACAGAAAGAGCCCAAGTAAAG 1560
lig7 GAGCCCAAGGTCCTCATCGAGGTCACTTACCAGGAGATACAGAAAGAGCCCAAGTAAAG 1560
C3 GAGCCCAAGGTCCTCATCGAGGTCACTTACCAGGAGATACAGAAAGAGCCCAAGTAAAG 1560
A1 GAGCCCAAGGTCCTCATCGAGGTCACTTACCAGGAGATACAGAAAGAGCCCAAGTAAAG 1560
lig8 GAGCCCAAGGTCCTCATCGAGGTCACTTACCAGGAGATACAGAAAGAGCCCAAGTAAAG 1560
D3 GAGCCCAAGGTCCTCATCGAGGTCACTTACCAGGAGATACAGAAAGAGCCCAAGTAAAG 1560

A3 AGCGGTTTCGGGCTTCGCTTCCCGGCTTACGTGGGCTGAGGGAAGATAAAGCCCGGAG 1620
B2 AGCGGTTTCGGGCTTCGCTTCCCGGCTTACGTGGGCTGAGGGAAGATAAAGCCCGGAG 1620
lig7 AGCGGTTTCGGGCTTCGCTTCCCGGCTTACGTGGGCTGAGGGAAGATAAAGCCCGGAG 1620
C3 AGCGGTTTCGGGCTTCGCTTCCCGGCTTACGTGGGCTGAGGGAAGATAAAGCCCGGAG 1620
A1 AGCGGTTTCGGGCTTCGCTTCCCGGCTTACGTGGGCTGAGGGAAGATAAAGCCCGGAG 1620
lig8 AGCGGTTTCGGGCTTCGCTTCCCGGCTTACGTGGGCTGAGGGAAGATAAAGCCCGGAG 1620
D3 AGCGGTTTCGGGCTTCGCTTCCCGGCTTACGTGGGCTGAGGGAAGATAAAGCCCGGAG 1620

A3 GAGGCTGACACCATAGAGAGGCTGCCCGAGCTTACGAGCTCCAGGAGAGGTTCAAGGCC 1680
B2 GAGGCTGACACCATAGAGAGGCTGCCCGAGCTTACGAGCTCCAGGAGAGGTTCAAGGCC 1680
lig7 GAGGCTGACACCATAGAGAGGCTGCCCGAGCTTACGAGCTCCAGGAGAGGTTCAAGGCC 1680
C3 GAGGCTGACACCATAGAGAGGCTGCCCGAGCTTACGAGCTCCAGGAGAGGTTCAAGGCC 1680
A1 GAGGCTGACACCATAGAGAGGCTGCCCGAGCTTACGAGCTCCAGGAGAGGTTCAAGGCC 1680
lig8 GAGGCTGACACCATAGAGAGGCTGCCCGAGCTTACGAGCTCCAGGAGAGGTTCAAGGCC 1680
D3 GAGGCTGACACCATAGAGAGGCTGCCCGAGCTTACGAGCTCCAGGAGAGGTTCAAGGCC 1680

A3 AAGAGTAATCTAGA 1695
B2 AAGAGTAATCTAGA 1695
lig7 AAGAGTAATCTAGA 1695
C3 AAGAGTAATCTAGA 1695
A1 AAGAGTAATCTAGA 1695
lig8 AAGAGTAATCTAGA 1695
D3 AAGAGTAATCTAGA 1695

【 図 1 a - 4 】

Figure1a-4

A3 AGCAAGAGGCTCGAGGAGAGGCTTGGAGAGGCGGTAAGATAAAGCTGCCGCAACAGCTC 1140
B2 AGCAAGAGGCTCGAGGAGAGGCTTGGAGAGGCGGTAAGATAAAGCTGCCGCAACAGCTC 1140
lig7 AGCAAGAGGCTCGAGGAGAGGCTTGGAGAGGCGGTAAGATAAAGCTGCCGCAACAGCTC 1140
C3 AGCAAGAGGCTCGAGGAGAGGCTTGGAGAGGCGGTAAGATAAAGCTGCCGCAACAGCTC 1140
A1 AGCAAGAGGCTCGAGGAGAGGCTTGGAGAGGCGGTAAGATAAAGCTGCCGCAACAGCTC 1140
lig8 AGCAAGAGGCTCGAGGAGAGGCTTGGAGAGGCGGTAAGATAAAGCTGCCGCAACAGCTC 1140
D3 AGCAAGAGGCTCGAGGAGAGGCTTGGAGAGGCGGTAAGATAAAGCTGCCGCAACAGCTC 1140

A3 GTTACGAAAGAGGTTCAAGAGGCGGAGGAGTTCACAAAGAGGCGCCTTGAGCTGCCGCAC 1200
B2 GTTACGAAAGAGGTTCAAGAGGCGGAGGAGTTCACAAAGAGGCGCCTTGAGCTGCCGCAC 1200
lig7 GTTACGAAAGAGGTTCAAGAGGCGGAGGAGTTCACAAAGAGGCGCCTTGAGCTGCCGCAC 1200
C3 GTTACGAAAGAGGTTCAAGAGGCGGAGGAGTTCACAAAGAGGCGCCTTGAGCTGCCGCAC 1200
A1 GTTACGAAAGAGGTTCAAGAGGCGGAGGAGTTCACAAAGAGGCGCCTTGAGCTGCCGCAC 1200
lig8 GTTACGAAAGAGGTTCAAGAGGCGGAGGAGTTCACAAAGAGGCGCCTTGAGCTGCCGCAC 1200
D3 GTTACGAAAGAGGTTCAAGAGGCGGAGGAGTTCACAAAGAGGCGCCTTGAGCTGCCGCAC 1200

A3 GAGGGCTGATGGCGAAGAGGCTTGACTCCATCTACGAGCCCGGAAACCCCGGTAAGAG 1260
B2 GAGGGCTGATGGCGAAGAGGCTTGACTCCATCTACGAGCCCGGAAACCCCGGTAAGAG 1260
lig7 GAGGGCTGATGGCGAAGAGGCTTGACTCCATCTACGAGCCCGGAAACCCCGGTAAGAG 1260
C3 GAGGGCTGATGGCGAAGAGGCTTGACTCCATCTACGAGCCCGGAAACCCCGGTAAGAG 1260
A1 GAGGGCTGATGGCGAAGAGGCTTGACTCCATCTACGAGCCCGGAAACCCCGGTAAGAG 1260
lig8 GAGGGCTGATGGCGAAGAGGCTTGACTCCATCTACGAGCCCGGAAACCCCGGTAAGAG 1260
D3 GAGGGCTGATGGCGAAGAGGCTTGACTCCATCTACGAGCCCGGAAACCCCGGTAAGAG 1260

A3 TGCTGAAAGATTAAAGCCACAGATGGAGAACCTTGACCCTGCTATTATCGAGCCGAAAGT 1320
B2 TGCTGAAAGATTAAAGCCACAGATGGAGAACCTTGACCCTGCTATTATCGAGCCGAAAGT 1320
lig7 TGCTGAAAGATTAAAGCCACAGATGGAGAACCTTGACCCTGCTATTATCGAGCCGAAAGT 1320
C3 TGCTGAAAGATTAAAGCCACAGATGGAGAACCTTGACCCTGCTATTATCGAGCCGAAAGT 1320
A1 TGCTGAAAGATTAAAGCCACAGATGGAGAACCTTGACCCTGCTATTATCGAGCCGAAAGT 1320
lig8 TGCTGAAAGATTAAAGCCACAGATGGAGAACCTTGACCCTGCTATTATCGAGCCGAAAGT 1320
D3 TGCTGAAAGATTAAAGCCACAGATGGAGAACCTTGACCCTGCTATTATCGAGCCGAAAGT 1320

A3 GCGAGGGCAGGCGCGCCACCTGCTCGGCTGTTTCCCTGCGGCTACGACCCCGAG 1380
B2 GCGAGGGCAGGCGCGCCACCTGCTCGGCTGTTTCCCTGCGGCTACGACCCCGAG 1380
lig7 GCGAGGGCAGGCGCGCCACCTGCTCGGCTGTTTCCCTGCGGCTACGACCCCGAG 1380
C3 GCGAGGGCAGGCGCGCCACCTGCTCGGCTGTTTCCCTGCGGCTACGACCCCGAG 1380
A1 GCGAGGGCAGGCGCGCCACCTGCTCGGCTGTTTCCCTGCGGCTACGACCCCGAG 1380
lig8 GCGAGGGCAGGCGCGCCACCTGCTCGGCTGTTTCCCTGCGGCTACGACCCCGAG 1380
D3 GCGAGGGCAGGCGCGCCACCTGCTCGGCTGTTTCCCTGCGGCTACGACCCCGAG 1380

A3 AGCGGTGAGTTCGCTCCCGTGGGCAAGTTCGGAGCGGTTTACCAGTAAAGATTGGTC 1440
B2 AGCGGTGAGTTCGCTCCCGTGGGCAAGTTCGGAGCGGTTTACCAGTAAAGATTGGTC 1440
lig7 AGCGGTGAGTTCGCTCCCGTGGGCAAGTTCGGAGCGGTTTACCAGTAAAGATTGGTC 1440
C3 AGCGGTGAGTTCGCTCCCGTGGGCAAGTTCGGAGCGGTTTACCAGTAAAGATTGGTC 1440
A1 AGCGGTGAGTTCGCTCCCGTGGGCAAGTTCGGAGCGGTTTACCAGTAAAGATTGGTC 1440
lig8 AGCGGTGAGTTCGCTCCCGTGGGCAAGTTCGGAGCGGTTTACCAGTAAAGATTGGTC 1440
D3 AGCGGTGAGTTCGCTCCCGTGGGCAAGTTCGGAGCGGTTTACCAGTAAAGATTGGTC 1440

【 図 1 b - 1 】

Figure1b-1

A1 (配列番号: 8); D3 (配列番号: 9); C3 (配列番号: 10);
lig7 (配列番号: 11); A3 (配列番号: 12); B2 (配列番号: 13);
lig8 (配列番号: 14)

A1 MGDNRVSELAELVRLRLEKTTLTKLTKKPVADFLKPPDLDLLEIVPVLILGKVPDWDERE 60
D3 MGDNRVSELAELVRLRLEKTTLTKLTKKPVADFLKPPDLDLLEIVPVLILGKVPDWDERE 60
C3 MGDNRVSELAELVRLRLEKTTLTKLTKKPVADFLKPPDLDLLEIVPVLILGKVPDWDERE 60
lig7 MGDNRVSELAELVRLRLEKTTLTKLTKKPVADFLKPPDLDLLEIVPVLILGKVPDWDERE 60
B2 MGDNRVSELAELVRLRLEKTTLTKLTKKPVADFLKPPDLDLLEIVPVLILGKVPDWDERE 60
lig8 MGDNRVSELAELVRLRLEKTTLTKLTKKPVADFLKPPDLDLLEIVPVLILGKVPDWDERE 60

A1 LGVGEKLLIRAVSMATGVPEREINISIKDGLGSEVALALKKRRKQFFSOPLTIKRVY 120
D3 LGVGEKLLIRAVSMATGVPEREINISIKDGLGSEVALALKKRRKQFFSOPLTIKRVY 120
C3 LGVGEKLLIRAVSMATGVPEREINISIKDGLGSEVALALKKRRKQFFSOPLTIKRVY 120
lig7 LGVGEKLLIRAVSMATGVPEREINISIKDGLGSEVALALKKRRKQFFSOPLTIKRVY 120
B2 LGVGEKLLIRAVSMATGVPEREINISIKDGLGSEVALALKKRRKQFFSOPLTIKRVY 120
lig8 LGVGEKLLIRAVSMATGVPEREINISIKDGLGSEVALALKKRRKQFFSOPLTIKRVY 120

A1 STFFVKVAEASGEGSDRMMKYLANLPMDAQPEBKGIARVFLGMRTVGAEILRDLAIE 180
D3 STFFVKVAEASGEGSDRMMKYLANLPMDAQPEBKGIARVFLGMRTVGAEILRDLAIE 180
C3 STFFVKVAEASGEGSDRMMKYLANLPMDAQPEBKGIARVFLGMRTVGAEILRDLAIE 180
lig7 STFFVKVAEASGEGSDRMMKYLANLPMDAQPEBKGIARVFLGMRTVGAEILRDLAIE 180
B2 STFFVKVAEASGEGSDRMMKYLANLPMDAQPEBKGIARVFLGMRTVGAEILRDLAIE 180
lig8 STFFVKVAEASGEGSDRMMKYLANLPMDAQPEBKGIARVFLGMRTVGAEILRDLAIE 180

A1 AFKFKPELVERAYMLTDFGYVAVKAKIENGLSKVSIQIGKPIRPLAQNAANVKAL 240
D3 AFKFKPELVERAYMLTDFGYVAVKAKIENGLSKVSIQIGKPIRPLAQNAANVKAL 240
C3 AFKFKPELVERAYMLTDFGYVAVKAKIENGLSKVSIQIGKPIRPLAQNAANVKAL 240
lig7 AFKFKPELVERAYMLTDFGYVAVKAKIENGLSKVSIQIGKPIRPLAQNAANVKAL 240
B2 AFKFKPELVERAYMLTDFGYVAVKAKIENGLSKVSIQIGKPIRPLAQNAANVKAL 240
lig8 AFKFKPELVERAYMLTDFGYVAVKAKIENGLSKVSIQIGKPIRPLAQNAANVKAL 240

A1 IEMGGEAAFEIKYDGARVQVHRDGRVLIYSRLENVTRSIPEIVEAVKSLKPSKIVIE 300
D3 IEMGGEAAFEIKYDGARVQVHRDGRVLIYSRLENVTRSIPEIVEAVKSLKPSKIVIE 300
C3 IEMGGEAAFEIKYDGARVQVHRDGRVLIYSRLENVTRSIPEIVEAVKSLKPSKIVIE 300
lig7 IEMGGEAAFEIKYDGARVQVHRDGRVLIYSRLENVTRSIPEIVEAVKSLKPSKIVIE 300
B2 IEMGGEAAFEIKYDGARVQVHRDGRVLIYSRLENVTRSIPEIVEAVKSLKPSKIVIE 300
lig8 IEMGGEAAFEIKYDGARVQVHRDGRVLIYSRLENVTRSIPEIVEAVKSLKPSKIVIE 300

A1 GELVAVGENRPRFFQVLRFRFRKKNIEEMLEKIPELELNDLILVDESLIDTKFAER 360
D3 GELVAVGENRPRFFQVLRFRFRKKNIEEMLEKIPELELNDLILVDESLIDTKFAER 360
C3 GELVAVGENRPRFFQVLRFRFRKKNIEEMLEKIPELELNDLILVDESLIDTKFAER 360
lig7 GELVAVGENRPRFFQVLRFRFRKKNIEEMLEKIPELELNDLILVDESLIDTKFAER 360
B2 GELVAVGENRPRFFQVLRFRFRKKNIEEMLEKIPELELNDLILVDESLIDTKFAER 360
lig8 GELVAVGENRPRFFQVLRFRFRKKNIEEMLEKIPELELNDLILVDESLIDTKFAER 360

【 図 1 b - 2 】

Figure1b-2

```

A1      RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
D3      RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
C3      RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
lig7    RKKLEESVEEGDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 419
A3      RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
B2      RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
lig8    RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
*****

A1      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGVKVSGFTDEDLV 480
D3      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGVKVSGFTDEDLV 480
C3      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGVKVSGFTDEDLV 480
lig7    WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGVKVSGFTDEDLV 479
A3      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGVKVSGFTDEDLV 480
B2      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGVKVSGFTDEDLV 480
lig8    WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGVKVSGFTDEDLV 480
*****

A1      EPTKMLKPLIVREEGKFVEIEPKVVIIEVTYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSP 540
D3      EPTKMLKPLIVREEGKFVEIEPKVVIIEVTYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSP 540
C3      EPTKMLKPLIVREEGKFVEIEPKVVIIEVTYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSP 540
lig7    EPTKMLKPLIVREEGKFVEIEPKVVIIEVTYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSP 539
A3      EPTKMLKPLIVREEGKFVEIEPKVVIIEVTYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSP 540
B2      EPTKMLKPLIVREEGKFVEIEPKVVIIEVTYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSP 540
lig8    EPTKMLKPLIVREEGKFVEIEPKVVIIEVTYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSP 540
*****

A1      EADTIERVAQLYELQERYKAKKSR 564
D3      EADTIERVAQLYELQERYKAKKSR 564
C3      EADTIERVAQLYELQERYKAKKSR 564
lig7    EADTIERVAQLYELQERYKAKKSR 563
A3      EADTIERVAQLYELQERYKAKKSR 564
B2      EADTIERVAQLYELQERYKAKKSR 564
lig8    EADTIERVAQLYELQERYKAKKSR 564
*****

```

【 図 2 】

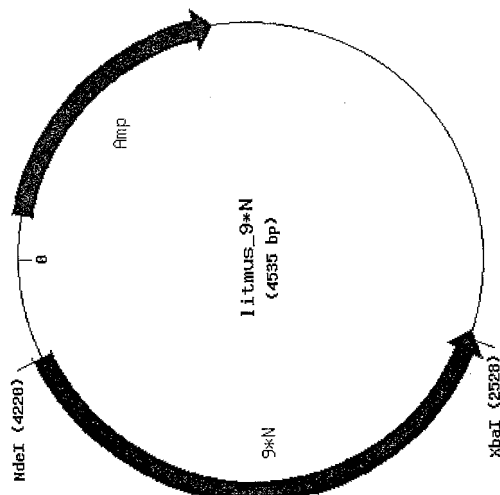


Figure 2

【 図 3 】

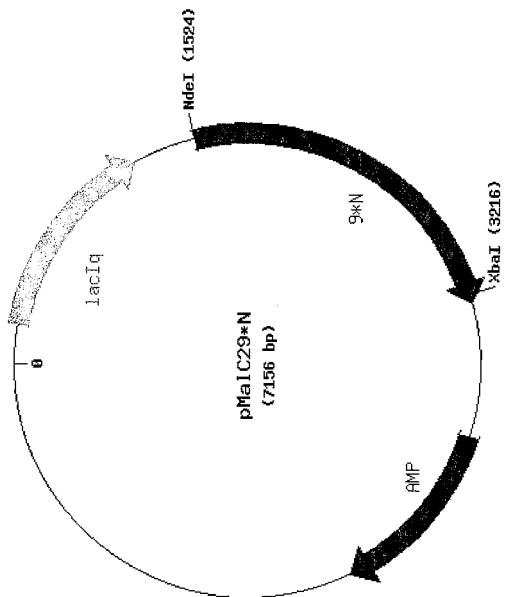


Figure3

【 図 4 - 1 】

Figure 4-1

9degNB2 (配列番号:15); Tfumicolans (配列番号:16); Tkodakaraenis (配列番号:17);
 Pabysai (配列番号:18); Pfuliosus (配列番号:19)

```

9degNB2      MGDNRVSELABLYRRLEKTYLKLITKRFVADFLKRTFDLLELIVVYLILGVFPDWDERE 60
Tfumicolans  ---NRVSELAGIYARLEKTYLKLITKRFVADFLKRTFDLLELIVVYLILGVFPDWDERE 57
Tkodakaraenis MGDNRVSELABLYRRLEKTYLKLITKRFVADFLKRTFDLLELIVVYLILGVFPDWDERE 60
Pabysai      ---NRVSELAQLYKLEKTYLKLITKRLVADFLKRVPEDELEFIVVYLILGVFPDWDERE 57
Pfuliosus    ---NRVSELAQLYKLEKTYLKLITKRLVADFLKRVPEDELEFIVVYLILGVFPDWDERE 57
*****

9degNB2      LGVGEKLLIENVSMATGVVEREIEIENSIKDGGDGLSVALAKRNRKQSFYSPQLTIRRV 120
Tfumicolans  LGVGEKLLIKVSLIACVVEEIEIENSIKDGGDGLSVALAKRNRKQSFYSPQLTIRRV 117
Tkodakaraenis LGVGEKLLIKAVSMATGVVEEIEIENSIVRDTGDLGSEVALAKRNRKQSFYSPQLTIRRV 120
Pabysai      LGVGEKLLIENVSMATGVVEREIEIENSIVRDTGDLGSEVALAKRNRKQSFYSPQLTIRRV 117
Pfuliosus    LGVGEKLLIENVSMATGVVEREIEIENSIVRDTGDLGSEVALAKRNRKQSFYSPQLTIRRV 117
*****

9degNB2      SFYVIVADAGGEGSQDRMKYLANLFDMAQFBEKVIAPTVLGTMTGTVAGSLLRDAIAR 180
Tfumicolans  DFFVIVADAGGEGSQDRMKYLANLFDMAQFBEKVIAPTVLGTMTGTVAGSLLRDAIAR 177
Tkodakaraenis DFFVIVADAGGEGSQDRMKYLANLFDMAQFBEKVIAPTVLGTMTGTVAGSLLRDAIAR 180
Pabysai      QTLVIVADAGGEGSQDRMKYLANLFDMAQFBEKVIAPTVLGTMTGTVAGSLLRDAIAR 177
Pfuliosus    QTLVIVADAGGEGSQDRMKYLANLFDMAQFBEKVIAPTVLGTMTGTVAGSLLRDAIAR 177
*****

9degNB2      SFYVIVADAGGEGSQDRMKYLANLFDMAQFBEKVIAPTVLGTMTGTVAGSLLRDAIAR 240
Tfumicolans  AFRVVAELVERAYHLTSDPGYVAKVAKLEGNELSKVSIQIKPFIPLAQNAANVKBAL 237
Tkodakaraenis AFRVVAELVERAYHLTSDPGYVAKVAKLEGNELSKVSIQIKPFIPLAQNAANVKBAL 240
Pabysai      AFRVVAELVERAYHLTSDPGYVAKVAKLEGNELSKVSIQIKPFIPLAQNAANVKBAL 237
Pfuliosus    AFRVVAELVERAYHLTSDPGYVAKVAKLEGNELSKVSIQIKPFIPLAQNAANVKBAL 237
*****

9degNB2      YEMGGAAFEIKYD GARVQVHRDGRVVIYSRRLNVTREIPEIIVAVKALKPSNVIVE 300
Tfumicolans  LEMGGAAFEIKYD GARVQVHRDGRVVIYSRRLNVTREIPEIIVAVKALKPKAIVE 297
Tkodakaraenis YEMGGAAFEIKYD GARVQVHRDGRVVIYSRRLNVTREIPEIIVAVKALKPKAIVE 300
Pabysai      LEMGGAAFEIKYD GARVQVHRDGRVVIYSRRLNVTREIPEIIVAVKALKPKAIVE 297
Pfuliosus    LEMGGAAFEIKYD GARVQVHRDGRVVIYSRRLNVTREIPEIIVAVKALKPKAIVE 297
*****

9degNB2      GELVAVGEGRFRFPQVLRFRFRKVIYIENIEKIPLLELNFILVCEGLDITDFRFR 360
Tfumicolans  GELVAVGEGRFRFPQVLRFRFRKVIYIENIEKIPLLELNFILVCEGLDITDFRFR 357
Tkodakaraenis GELVAVGEGRFRFPQVLRFRFRKVIYIENIEKIPLLELNFILVCEGLDITDFRFR 360
Pabysai      GELVAVGEGRFRFPQVLRFRFRKVIYIENIEKIPLLELNFILVCEGLDITDFRFR 357
Pfuliosus    GELVAVGEGRFRFPQVLRFRFRKVIYIENIEKIPLLELNFILVCEGLDITDFRFR 357
*****

9degNB2      RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
Tfumicolans  RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 417
Tkodakaraenis RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 420
Pabysai      RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 417
Pfuliosus    RKKLEESVEESDKIKLAEQLVTKKVEAEAEFYKRALELGHGELMAKRLDSIYEPGNRGGK 417
*****

```

【 図 4 - 2 】

Figure 4-2

```

9degNB2      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPESGEFVPGKVGSGFTDEDLV 480
Tfumicolans  WLKIKPTMEDLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDQHRGEFVPGKVGSGFTDEDLA 477
Tkodakaraenis WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPHSGEFVPGKVGSGFTDEDLV 480
Pabyssi      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPETGEFLEVGKVGSGFTDDDLV 477
Pfuriosus    WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPETGEFLEVGKVGSGFTDDDLV 477
*****:~ *:::*** * :,:* . **; *****:***

9degNB2      EFTKMLKPLIVREGKQFVEIEPKVIVIEVYQEIQKSPKYKSGFALRFRPRVALREDKSPF 540
Tfumicolans  EFTKMLKPLIVREGKQFVEIEPRVVIQVYQEIQKSPKYESGFALRFRPRVALREDKSPF 537
Tkodakaraenis EFTKMLKPLIVREGKQFVEIEPKFVIEVYQEIQKSPKYESGFALRFRPRVALREDKSPF 540
Pabyssi      EFTKMLRPLIIEEGKRVWIQPKVIVIEVYQEIQKSPKYRSGFALRFRPRVALREDKQPE 537
Pfuriosus    EFTKMLKPLIIEEGKRVWIQPKVIVIEVYQEIQKSPKYRSGFALRFRPRVALREDKQPE 537
*****:~ *:::*** * :,:* . **; *****:***

9degNB2      EADTIERVAQLVELQERFKAKKSR 564
Tfumicolans  EADTIERISLVELQERFKAKR-- 559
Tkodakaraenis EADTIERVAELVELQERFKAKK-- 562
Pabyssi      EADTIERIAQLVELQERMKGK-- 559
Pfuriosus    DADTIERIAQLVELQERMKGKVES 561
*****:~ *:::*** * :,:* . **; *****:***

```

【 図 5 】

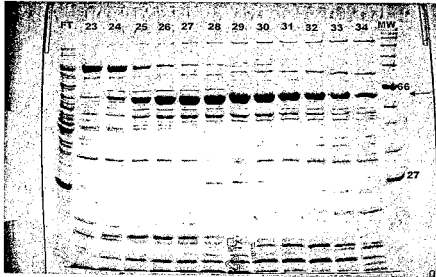


Figure 5

【 図 6 】

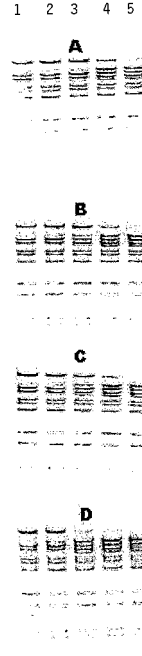


Figure 6

【 図 7 】

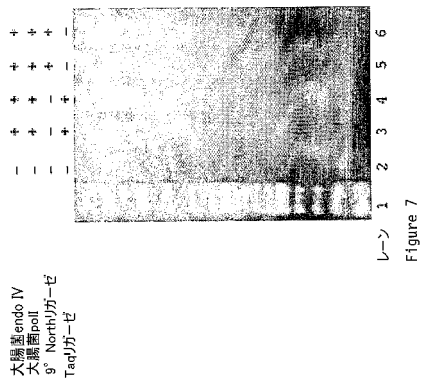


Figure 7

【配列表】

2009508488000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/035919

| | | |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | JP 2000 308494 A (IMANAKA TADAYUKI) 7 November 2000 (2000-11-07) cited in the application Claims 1-10; figure 8 | 2,4-10 |
| X | WO 94/02615 A (STRATAGENE INC [US]) 3 February 1994 (1994-02-03) Claims 1-21; figure 3; page 12 lines 5-13, p. 14 l. 16-29, p. 46 l. 12-16, p. 47 l. 32- p. 48 l. 3 | 2,4-10 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 11 January 2007 | | Date of mailing of the international search report 29/01/2007 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Kurz, Birgit |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/035919

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>ROLLAND JEAN-LUC ET AL: "Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon Thermococcus fumicolans" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 236, no. 2, 15 July 2004 (2004-07-15), pages 267-273, XP002414157 ISSN: 0378-1097 the whole document</p> | 2,4-10 |
| X | <p>-& DATABASE EMBL [Online] 6 January 2001 (2001-01-06), ROLLAND, J. L.: "Thermococcus fumicoland 5571ig gene for DNA ligase" XP002414161 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:AJ133713 Database accession no. AJ133713 the whole document</p> | 2,4-10 |
| A | <p>JEON S-J ET AL: "A novel ADP-dependent DNA ligase from Aeropyrum pernix K1" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 550, no. 1-3, 28 August 2003 (2003-08-28), pages 69-73, XP004448370 ISSN: 0014-5793 pages 69 and 72; figure 2</p> | 1-11 |
| A | <p>SRISKANDA VERL ET AL: "Characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the thermophilic archaeon Methanobacterium thermoautotrophicum" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, no. 11, 1 June 2000 (2000-06-01), pages 2221-2228, XP002414158 ISSN: 0305-1048 p. 2224</p> | 1-11 |
| A | <p>SOUTHWORTH M W ET AL: "CLONING OF THERMOSTABLE DNA POLYMERASES FROM HYPERTHERMOPHILIC MARINE ARCHEA WITH EMPHASIS ON THERMOCOCCUS SP. 9 N-7 AND MUTATIONS AFFECTING 3'-5' EXONUCLEASE ACTIVITY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 93, no. 11, 28 May 1996 (1996-05-28), pages 5281-5285, XP000652319 ISSN: 0027-8424 p. 5281, right column</p> | 1-11 |
| | -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/035919

| D(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, A | <p>KEPETIPOLA NIROSHIKA ET AL: "Characterization of a thermophilic ATP-dependent DNA ligase from the euryarchaeon <i>Pyrococcus horikoshii</i>" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 187, no. 20, October 2005 (2005-10), pages 6902-6908, XP002414159 ISSN: 0021-9193 Abstract; page 6907</p> | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/035919

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| JP 2000308494 A | 07-11-2000 | NONE | |
| WO 9402615 A | 03-02-1994 | US 5506137 A | 09-04-1996 |
| | | US 6280998 B1 | 28-08-2001 |
| | | US 5700672 A | 23-12-1997 |

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 A

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

(74)代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 シルドクラウト, アイラ
 アメリカ合衆国、ニューメキシコ・87010、シイリリヨス、ピーオー・ボックス・392

(72)発明者 シルドクラウト, エズラ
 アメリカ合衆国、ニューメキシコ・87506、サンタ・フェ、ビスタ・バエ・グランデ・3

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA07 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04 GA11
 HA08
 4B050 CC01 CC03 DD02 EE10 FF01 FF09E FF11E LL01 LL03 LL10
 4B065 AA01X AA01Y AA26X AA57X AA87X AB01 BA01 CA29 CA44 CA46
 CA60