

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4245084号  
(P4245084)

(45) 発行日 平成21年3月25日(2009.3.25)

(24) 登録日 平成21年1月16日(2009.1.16)

(51) Int. Cl.	F 1		
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
<b>C 0 7 K</b> 14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	
<b>C 0 7 K</b> 1/16 (2006.01)	C 0 7 K	1/16	
<b>C 0 7 K</b> 16/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/12	
<b>C 1 2 P</b> 21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
請求項の数 39 (全 92 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-545828  
(86) (22) 出願日 平成10年3月20日(1998.3.20)  
(65) 公表番号 特表2002-505572(P2002-505572A)  
(43) 公表日 平成14年2月19日(2002.2.19)  
(86) 国際出願番号 PCT/US1998/005497  
(87) 国際公開番号 W01998/042860  
(87) 国際公開日 平成10年10月1日(1998.10.1)  
審査請求日 平成17年3月18日(2005.3.18)  
(31) 優先権主張番号 08/822,774  
(32) 優先日 平成9年3月21日(1997.3.21)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 08/957,709  
(32) 優先日 平成9年10月24日(1997.10.24)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者  
ストラタジーン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 920  
37, ラ ジョーラ, ノース トーリー  
パインズ ロード 11011  
(74) 代理人  
弁理士 奥山 尚一  
(74) 代理人  
弁理士 有原 幸一  
(74) 代理人  
弁理士 松島 鉄男  
(72) 発明者  
ホグリーフェ, ホーリー  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 921  
22, サンディエゴ, ディラック ストリ  
ート 6045

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリメラーゼ増強因子(PEF)抽出物、PEFタンパク質複合体、単離されたPEFタンパク質、並びに精製及び単離方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

核酸ポリメラーゼ増強活性を有する少なくとも1つのタンパク質を含む少なくとも1つの成分を含み、前記タンパク質が、配列番号71のアミノ酸配列、又は配列番号70の核酸配列を有する核酸の相補体に対して高ストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされるアミノ酸配列を有する、天然に存在しない組成物。

## 【請求項2】

前記タンパク質が細胞抽出物である請求の範囲第1項記載の組成物。

## 【請求項3】

前記細胞抽出物が原生物(archaeal)源からである請求の範囲第2項記載の組成物。 10

## 【請求項4】

前記細胞抽出物がピロコーカス・フリオサス(Pyrococcs furiosus)からである請求の範囲第3項記載の組成物。

## 【請求項5】

前記核酸ポリメラーゼ増強活性を有する少なくとも1つのタンパク質を含む少なくとも1つの成分がタンパク質複合体である請求の範囲第1項記載の組成物。

## 【請求項6】

前記タンパク質複合体が原生物源からである請求の範囲第5項記載の組成物。

## 【請求項7】

前記タンパク質複合体がピロコーカス・フリサオスからである請求の範囲第6項記載の組 20

成物。

【請求項 8】

配列番号18のヌクレオチド配列、その縮重変異体、又は配列番号18の相補体に対して高ストリンジентな条件下でハイブリダイズできる配列を含んで成るDNAによりコードされるサブユニットをさらに含んで成る請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項 9】

前記核酸ポリメラーゼ増強活性を有する少なくとも1つのタンパク質を含む少なくとも1つの成分が、完全に又は部分的に合成のタンパク質である請求の範囲第1項記載の物質の組成物。

【請求項 10】

前記核酸ポリメラーゼ増強活性を有する少なくとも1つのタンパク質を含む少なくとも1つの成分がタンパク質の混合物である請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項 11】

単離され又は精製されたDNAであって、核酸ポリメラーゼ増強活性を有するタンパク質をコードする配列を含み、該配列が配列番号71のアミノ酸配列をコードするか、又は該配列が配列番号70の核酸配列を有する核酸の相補体に対して高ストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項 12】

ベクター又は発現ベクターである請求の範囲第11項記載のDNA。

【請求項 13】

請求の範囲第11項記載のDNAの相補体に対して高ストリンジентな条件下でハイブリダイズできる単離され又は精製されたDNA。

【請求項 14】

請求の範囲第13項記載のDNAによりコードされるポリメラーゼ増強タンパク質を含んで成る組成物。

【請求項 15】

請求の範囲第1項記載の組成物及び1又は複数のDNAポリメラーゼを含んで成る天然に存在しない組成物。

【請求項 16】

前記ポリメラーゼの少なくとも1つが熱安定性DNAポリメラーゼである請求の範囲第15項記載の組成物。

【請求項 17】

前記ポリメラーゼの少なくとも1つが原生生物 (archaeal) 源に由来する請求の範囲第15項記載の組成物。

【請求項 18】

前記ポリメラーゼの少なくとも1つが、ピロコーカス (Pyrococcus) の種又はサーモコーカス (Thermococcus) の種に由来する請求の範囲第16項記載の組成物。

【請求項 19】

前記ポリメラーゼの少なくとも1つが、ピロコーカス・フリオサス、ピロコーカス sp. JDF 3、ピロコーカス sp. GBD、ピロコーカス sp. KOD、サーモコーカス・リトラリス (Thermococcus litoralis) 又はピロコーカス・ウオエセイ (Pyrococcus woessii) のDNAポリメラーゼである請求の範囲第16項記載の組成物。

【請求項 20】

請求の範囲第1項記載の組成物及び少なくとも1つの核酸ポリメラーゼを含んで成る核酸を複製するためのキット。

【請求項 21】

少なくとも1つの組換え核酸ポリメラーゼを含んで成る請求の範囲第20項記載のキット。

【請求項 22】

部位特定突然変異誘発方法に使用され得る請求の範囲第20又は21項記載のキット。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

核酸配列決定方法に使用され得る請求の範囲第20又は21項記載のキット。

【請求項 2 4】

増幅反応に使用され得る請求の範囲第20又は21項記載のキット。

【請求項 2 5】

いずれか適切な順序で、(a)核酸ポリメラーゼのための核酸配列鋳型、(b)少なくとも1つの核酸ポリメラーゼ、及び(c)請求の範囲第1項記載のポリメラーゼ増強組成物を組合すことを含んで成る核酸ポリメラーゼ反応を増強するための方法。

【請求項 2 6】

前記反応が複製反応である請求の範囲第25項記載の方法。

【請求項 2 7】

前記反応が増幅反応を含んで成る請求の範囲第25項記載の方法。

【請求項 2 8】

前記反応がPCR方法又はRT-PCR方法を含んで成る請求の範囲第25項記載の方法。

【請求項 2 9】

部位特定突然変異誘発方法、サイクル配列決定方法又はクローニング方法をさらに含んで成る請求の範囲第26, 27又は28項記載の方法。

【請求項 3 0】

請求の範囲第1項記載の核酸ポリメラーゼ増強活性を有するタンパク質に対して結合する抗体。

【請求項 3 1】

請求の範囲第1項記載の核酸ポリメラーゼ-増強タンパク質を精製するための方法であって、(a)タンパク質：タンパク質相互作用を実質的に維持しながら、原生生物(archaeal)細胞からのタンパク質を溶解し；(b)上記(a)の生成物に対してヘパリンセファローズクロマトグラフィー処理を実施し；(c)上記(b)の生成物に対してサイズ排除クロマトグラフィー処理を実施し；そして(d)ポリメラーゼ増強活性を同定する；ことを含んで成る方法。

【請求項 3 2】

請求の範囲第1項記載のタンパク質の存在又は不在を同定するための方法であって、核酸重合反応に細胞からのタンパク質抽出物を添加し、そして対照反応における生成物の数に比較して、前記重合反応において生成される生成物の数を測定することを含んで成る方法。

【請求項 3 3】

前記核酸重合反応に使用されるポリメラーゼ活性が、生来の又はクローン化された細菌DNAポリメラーゼ、生来の又はクローン化された原生生物DNAポリメラーゼ、ピロコーカスの種又はサーモコーカスの種からの生来の又はクローン化されたポリメラーゼ、ピロコーカス・フリオサスDNAポリメラーゼ、生来の又はクローン化された逆転写酵素、あるいは生来の又はクローン化されたRNAポリメラーゼの少なくとも1つの活性を含んで成る請求の範囲第32項記載の方法。

【請求項 3 4】

前記重合反応がPCR方法又はRT-PCR方法の1つを含んで成る請求の範囲第32項記載の方法。

【請求項 3 5】

前記重合反応がPCR方法又はRT-PCR方法の1つを含んで成る請求の範囲第33項記載の方法。

【請求項 3 6】

サンプル中のポリメラーゼ増強活性をコードするDNAを同定するための方法であって、配列番号70又はその相補体からのヌクレオチドの配列のすべて又は一部を含んで成り、あるいは配列番号71又はその相補体のアミノ酸配列のすべて又は一部をコードするヌクレオチドの配列を含んで成る核酸プローブを、前記サンプル中の核酸に接触せしめ、そして前記プローブにハイブリダイズすることができる核酸を単離することを含んで成る方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 37】

0.45 M の NaCl、0.045 M のクエン酸三ナトリウム、及び 0.1% の SDS を含んで成る溶液による低ストリンジェント洗浄を含んで成るハイブリダイゼーション条件が使用され、そして洗浄温度が 37 ~ 42 である請求の範囲第 36 項記載の方法。

## 【請求項 38】

0.75 M の NaCl、0.075 M のクエン酸三ナトリウム、及び 50% のホルムアミドを含んで成るハイブリダイゼーション緩衝液が使用され、そして 0.1 M のリン酸塩、0.1 倍の SES、0.1% のピロリン酸ナトリウム、及び 0.1% の SDS を含んで成るハイブリダイゼーション洗浄が 45 で使用される請求の範囲第 37 項記載の方法。

## 【請求項 39】

サンプル中のポリメラーゼ - 増強活性を同定するための方法であって、請求の範囲第 30 項記載の抗体と、前記サンプルとを接触せしめ、そして前記抗体に結合するタンパク質を検出することを含んで成る方法。

## 【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明は、核酸ポリメラーゼ及び核酸重合反応の分野に関する。

序説

核酸重合反応の効率は、多くのアッセイ及び技法のために密接な関係を有する。たとえば、PCR 工程におけるポリメラーゼ活性を増強する能力は、PCR に基づくアッセイの感度を高める。本発明者は、核酸ポリメラーゼの重合活性を改良する新規抽出物、タンパク質及び複合体を同定し、生成し、精製し、そして分析している。ポリメラーゼ活性を有する組成物の同定方法、それらの組成物を精製し、そして使用する方法、及びポリメラーゼ活性を増強するよう機能する特定の抽出物、タンパク質及び複合体は、本発明の観点内に含まれる。

関連技術の記載

重合反応による核酸の操作は、生物学 - 関連研究の基本的要素である。それらの反応は、特定の核酸又は核酸グループのクローニング又は増幅を可能にする、研究者によるインピット口での DNA 又は RNA の複製を可能にする。特定の技法、たとえば核酸の配列決定、核酸配列の突然変異誘発、及びハイブリダイゼーションのための核酸プローブの生成において、核酸重合反応又は核酸重合酵素の決定的性質を詳述する多くの他の例が存在する。特に現在、興味あるものは、研究者が核酸関連実験を実施できる速度で非常に高められた増幅反応、たとえば PCR がである。非常に少ない核酸が、現在、核酸ポリメラーゼを必ず包含するそれらの技法を用いて、増幅され、そして操作され得る。

増幅段階を包含する技法の使用は、使用されるポリメラーゼの効率、適合度、及び感度に関する関心を余儀なくして来た。これは、種々の用途のための重合条件を分析し、そして最適化するための努力をもたらして来た (Lundberg など、Gene 108 : 1-6 (1991) ; Eckert and Kunkel, PCR Methods Applic. 1 : 17-24 (1991) ; Ling など、PCR Methods Applic. 1 : 63-69 (1991) ; Brail など、Mutat. Res. 303 : 75-82 (1994) ; Garrity and Wold, P. N. A. S. 89 : 1021-1025 (1992) ; Taylor and Logan, Curr. Opin. Biotechnol. 6 : 24-29 (1995) )。特に、定量的な増幅に基く反応は、サンプルに存在する個々の核酸種を効率よく増幅する能力に依存する (Ausubel など、Chapter 15, in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1992) and supplements through 1995 を参照のこと)。従って、増幅に基く核酸技法の性能を増強するための新規方法の必要性及び精度に関する関心が当業界において存在する。

それらの関心及び必要性が取り扱われて来た 1 つの手段は、増幅反応への添加剤の使用を通してである。異なった添加剤が、増幅工程における異なった点で作用する。たとえば、ホルムアミドが、プライマーとのハイブリダイゼーションを妨げることができる分子内ハイブリダイゼーションに対して特に敏感である、GC に富む標的配列の PCR の特異性を高めるために使用されて来た (Sarkar, G. など、Nucl. Acids Res. 18 : 7465 (1990) )。

10

20

30

40

50

テトラメチルアンモニウムクロリドがPCR反応の収率及び特異性を高めることがまた報告されている (Chevet, E., など., Nucleic Acids Res. 23: 3343-3334 (1995)). Hungなどは、ジメチルスルホキシド (DMSO) が添加される場合、増幅する複合体DNAからの複数のサテライトバンドの削減を報告する (Hung, T., など., Nucl. Acid Res. 18: 4953 (1990)). それらの複数のサテライトバンドは、しばしば、存在する他のDNAからの所望の増幅生成物の精製において問題を提供する。

一定のタンパク質が、複製の間、ハイブリダイズされた核酸を安定化するために使用されて来た。たとえば、E. コリ一本鎖DNA結合タンパク質が、プライマー延長反応及びPCR反応の収率及び特異性を高めるために使用されて来た (アメリカ特許第5, 449, 603号及び第5, 534, 407号)。ファージT 4の遺伝子32タンパク質 (一本鎖DNA結合タンパク質) は、より大きなDNAフラグメントを増幅する能力を明らかに改良し (Schwartz, など., Nucl. Acids Res. 18: 1079 (1990)), そしてDNAポリメラーゼ適合度を増強する (Huang, DNA Cell. Biol. 15: 589-594 (1996)). さらに、T 7 DNAポリメラーゼと組合せられる細菌チオレドキシシン (Sequenase<sup>TM</sup>; Amersham-USB) が加工性を高めるために使用されて来たが、しかしその組合せは、高温、たとえばPCRに使用される温度で活性でない。

増幅に基づくアッセイ及び技法が改良されて来たもう1つの手段は、修飾されたポリメラーゼの開発又はポリメラーゼの組合せの使用を通してである (アメリカ特許第5, 566, 772号)。たとえば、TaKaRa Long PCRキットは2種のポリメラーゼを使用し (Takara Shuzo Co., Ltd; Japan)、そして多くのポリメラーゼの組合せがまた、Bamesにより試験されている (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 2216-2220 (1994)). PCRにおける高められた熱安定性及び適合性を明らかに示す、末端が切除されたTaq及びT. フラバス (T. flavus) DNAポリメラーゼがまた、示されている。 (アメリカ特許第5, 436, 149号)。5' 3' エキソヌクレアーゼ又は3' 5' プルーフリーディング活性とポリメラーゼの組合せ及び単なるポリメラーゼもまた、使用されている。 (アメリカ特許第5, 489, 523号)。

さらに、増幅に基づくアッセイ及び技法は、特定の酵素との重合反応を最適化するために、条件、試薬及び試薬濃度の経験的試験を通して改良されて来た。増幅サイクルの温度及び長さ、プライマーの長さ、及びpHが、最適化され得るすべての条件である (Bames, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 2216-2220 (1994)). )。

しかしながら、補助タンパク質 (accessory protein) は、ポリメラーゼ活性及び/又はポリメラーゼのプロセッシング性 (processivity) の改良においてさらにより有用であり得る。この状況における“プロセッシング性”とは、酵素がその基質に結合するそれぞれの時点で生じる酵素反応の数を意味する。核酸複製反応の場合、“プロセッシング性”とは、ポリメラーゼがプライミング部位に結合する場合に複製され得る塩基の数を意味する。プロセッシング性の増強は、より長い複製生成物に直接的に関連する。

E. コリ、ヒト及びファージT 4系において特徴づけられるように、補助タンパク質が細胞内複製に関与することが示されている。補助タンパク質は、活性を改良するためにポリメラーゼと相互作用し、そして許容できない突然変異割合を回避しながら、ゲノムDNAを効率良く複製するために必要な高いプロセッシング性を提供する。補助タンパク質は、上記に示される他の改良点と組合せて使用され得るので、補助タンパク質の改良及び適用は、核酸複製に基づく反応の結果を増強するための特定の見込みを保持する。

補助タンパク質は、真核生物、E. コリ及びバクテリオファージ-T 4において同定されており、そして“スライディングクランプ (sliding clamp)”構造を形成すると思われる (Kelman and O' Donnell, Nucl. Acids. Res. 23 (18): 3613-3620 (1995)). それらの構造は、DNAにポリメラーゼを連結し、それによりプロセッシング性を高めると考えられる。しかしながら、スライディングクランプ構造は、インビトロモデル系において、すでに多く研究されて来た。T 4ポリメラーゼの場合においてのみ、そのような補助タンパク質の活性の知識が、当業者により使用される重合に基づく技法を改良するために使用されて来た。たとえば、T 4ホロ酵素の補助タンパク質は、T 4ポリメラーゼを用いる重合系に添加される場合、プロセッシング性を改良することが報告されている (Youngなど

10

20

30

40

50

., Biochem. 31 (37) : 8675-8690 (1992) ; Oncor Fidelity™ Sequencing System, On cor ; Gaithersburg, MD. )。しかしながら、T4補助タンパク質はバクテリオファージに起因するので、それらは、おそらく、細菌、原生動物又は真核生物からのポリメラーゼを増強できない。従って、T4補助タンパク質の使用は、T4ポリメラーゼが使用される技法に制限されて来たと思われる。

重合反応におけるdUTP (デオキシウラシル三リン酸) の存在 ; 及びDNA合成に対するデオキシウリジン - 含有DNAの効果がまた、試験されて来た。特に、DNA鎖におけるデオキシウリジンは、原生動物 (archaeal) DNAポリメラーゼによる重合を阻害することが示された (Lasken, など., (1996) J. Biol. Chem. 271 : 17692-17696. )。Laskenなどは、原生動物 (archaeal) DNAポリメラーゼ、たとえばVentが、デオキシウリジン含有DNAにより阻害されることを報告しているが、彼らは組み込み (incorporation) を阻害するために反応からウラシル含有ヌクレオシド又はヌクレオシド三リン酸を除去する効果を論じていない。さらに、彼らは、反応においてdUTPに作用するか又はそれをターンオーバーするいずれの酵素も論じていない。彼らはいずれのdUTPアーゼ活性も、又は重合反応に対するdUTPアーゼ活性の可能な効果も言及していない。さらに、Laskenなどは、dUTPがdCTPの脱アミノ反応により、通常のPCR反応の間、生成される事実を理解していない。脱アミノ反応の結果として、dUTPが存在し、そして増幅された核酸中に組み込まれ、ポリメラーゼ活性が阻害される。従って、当業者は、複製反応の増強におけるdUTPアーゼ活性及びタンパク質の可能性を理解していない。

従って、補助タンパク質の現在の知識及び使用は複製に基づく技法において制限された用途を導びいて来たので、ポリメラーゼ酵素活性を増強するための新規で且つより広範に有用な組成物についての連続した必要性が当業界において存在する。本発明は、この必要性を満たす。

#### 発明の要約

本発明は、当業界において知られている種々の複製反応において有用な核酸ポリメラーゼ増強活性を有する、抽出物、タンパク質複合体及び関連するタンパク質を含んで成る。従って、本発明の抽出物、タンパク質複合体、及び関連するタンパク質は、中でも、卓越した長さの、適合性の又は両者の複製生成物を高い収率で提供することによって、広範囲のインビトロ核酸複製反応を増強するよう機能する。本明細書及び請求の範囲に使用される場合、“ポリメラーゼ増強活性”とは、核酸ポリメラーゼにより介在される核酸重合反応の速度、適合性及び/又は収率を高める能力、あるいはそのような反応が進行し、又は進行できる条件の範囲を拡張し、又は変更する能力を意味する。

本発明の1つの観点において、ピロコーカスフリオサス (Pyrococcus furiosus) (Pfu) DNAポリメラーゼの活性を増強するPfu細胞の抽出物が提供される。前記抽出物はかなり広範囲の濃度にわたって、核酸複製生成物収率を増強し、そして少なくとも1つのポリメラーゼ増強因子を含む。本明細書及び請求の範囲に使用される場合、用語“PEF”とは、精製された天然のポリメラーゼ増強因子及び完全に又は部分的に合成したコピー又はその活性類似体を意味する。本発明によれば、そのような抽出物はさらに、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、続いてセファロースゲル精製により精製され得る。さらに、PEFは、下記に論じられる本発明の抗体を用いて、同定され、そして精製され得る。Pfu細胞サンプルが使用され、そして下記に特別に例示されるが、当業者は、他の細胞サンプルがPEFを同定し、そして精製するために使用され得ることを理解するであろう。たとえば、古細菌ピロコーカス (Pyrococcus) 又はサーモコーカス (Thermococcus) の他の種が同様に、好細菌細胞及び他の細菌細胞として使用され得る。さらに、ヒトdUTPアーゼのクローニング及び発現により示されるように、真核細胞及び組織は、セレゴポリメラーゼ活性を増強するPEFのための源として使用され得る。従って、本発明はまた、dUTPをターンオーバーするdUTPアーゼ又はいずれかの活性が核酸重合反応を増強するよう作用することができる組成物及び方法を含んで成る。

本発明のもう1つの観点においては、PEF複合体が提供される。本発明のPEF複合体は、ポリメラーゼ増強活性を有し、そして一般的には、加熱されていないPEFサンプルのSDS - PA

10

20

30

40

50

GE分析及びゲル濾過により決定されるように、約250kD又はそれ以上の組合された分子量を有する複数のタンパク質サブユニットを含んで成る。1つのPEF複合体の例(P300)がPfu細胞サンプル抽出物から精製された。前記複合体の主たる成分は、50kDのタンパク質(P50)及び45kDのタンパク質(P45)である。2%SDS及び1%TCAを伴うPfu P45の熱処理は、十分に変性された形を表わす17~18kDのタンパク質を生成する。しかしながら、Pfu PEF複合体は、150, 100, 85, 60, 55, 42及び37kDのおおよその見掛け分子量を有する他のマイナー成分を含む。少なくとも2種の成分(150及び100)は、P50のダイマー又はポリマー形であることが示された。従って、本発明のPEF複合体はタンパク質成分を含んで成り、そしてポリメラーゼの活性を増強するよう機能する。

本発明のもう1つの観点においては、ポリメラーゼ増強活性を有するPfuタンパク質が提供される。それらのタンパク質は、部分的に変性する条件下でのSDS PAGE分析によれば、約42~60kDの分子量を有する。42~60kDのタンパク質が、ポリメラーゼ活性を増強するために単独で又は組合して使用され得る。それらのタンパク質を精製するための方法、及びそれらが単離されたPEF抽出物及びPEF複合体がまた提供される。

本発明はまた、PEF複合体(P300)の有力な成分である2種の特定のタンパク質、Pfu P50及びP45を包含する。Pfu P45及びP50タンパク質に対する詳細な構造及び機能情報が開示される。P50タンパク質は、構造的に、細菌フラビンタンパク質に類似する。P45タンパク質は、構造的に、dCTPデアミナーゼに類似し、dUTPアーゼとして機能し、そしてポリメラーゼ増強活性を有する。本明細書における構造情報は、PEF複合体又は他の種からのサンプルからの関連するタンパク質の一部であり、又はPEF活性を有するタンパク質をコードする核酸の存在を検出する特異的ハイブリダイゼーションプローブを生成するために使用され得る。さらに、その構造情報は、当業界において知られている発現系からのタンパク質、合成タンパク質、部分的合成タンパク質、又は天然のタンパク質の組合せから製造されたタンパク質、発現されたタンパク質及び合成タンパク質を生成するために使用され得る。ポリメラーゼ増強活性及び/又はdUTPアーゼ活性の存在又は不在を検出するための方法がまた、本発明に包含され、そして種々の活性PEFタンパク質又は類似体を同定するために使用され得る。さらに、PEF成分に結合するポリクローナル又はモノクローナル抗体が、たとえば本発明の精製されたP45又はP50、精製されたPEF複合体(P300)、又は他のPEFから生成され得る。次に、それらの抗体は、PEFの存在又は不在を同定するために、当業界においてよく知られているアッセイ及びキットに使用され得る。

PEF、及び特にP45タンパク質の触媒活性の理解は、ポリメラーゼ増強タンパク質、及びPEFとしてdUTPアーゼ活性又はdUTPアーゼタンパク質を含む方法、キット及び組成物に向けられる本発明の観点を提供する。従って、dUTPアーゼ活性又はdUTPアーゼタンパク質、又は組成物は、本発明の核酸複製、重合又はPCR反応を増強するために使用され得る。実際、dUTPをターンオーバーするように機能するいずれかの活性が、本発明のポリメラーゼ増強活性として使用され得る。原生生物及び系統分類可能性の末端に存在するヒト源の両者から存在することが示されるように、dUTPアーゼ活性、タンパク質又は組成物のための広範囲の源が存在する。従って、いずれの細胞又は種も、ポリメラーゼ増強活性又はPEFのための源として使用され得る。

核酸を複製するためのキット、及びPEF複合体、前記複合体の特定のタンパク質及びPEFを含む抽出物の使用方法が提供される。さらに、複合体、タンパク質及び抽出物が、ポリメラーゼを含んで成る組成物に使用され得る。理想的には、ポリメラーゼは、複合体、タンパク質又はPEFにより増強されるものであろう。本発明のPEF抽出物、複合体及びタンパク質は特に、核酸ポリメラーゼ、たとえば生来のポリメラーゼとの混合物、組換えDNA技法により生成されるそれらのもの、及びそのようなポリメラーゼを含むキットにおいて有用である。

核酸ポリメラーゼに影響を及ぼすタンパク質又は複合体を同定するための方法がまた、本発明において提供される。タンパク質源は、いずれかの細菌、原生生物又は真核生物種であり得る。一定の様相が、増幅方法に使用されるポリメラーゼ、たとえば - 型DNAポリメラーゼ、たとえばピロコカス(Pyrococcus)及びサーモフィリス(Thermophilis)の

10

20

30

40

50

種からのDNAポリメラーゼに影響を及ぼすタンパク質を同定するための方法を包含する。他の態様は、dUTPアーゼ活性の分析、及びPEFを同定するためのコンピューター実施されるスクリーニング方法を包含する。

#### 図面の説明

図1．ヘパリンセファロースカラム画分におけるPCR増強活性。PCR増強活性が例1に記載される6.2kbのシステムを用いて測定された。カラム画分SCS #36 H.S.#78(調製物2)が、1×クローン化されたPfu PCR緩衝液により希釈され、そして次のものの1μアリコートが100μlのPCRに添加された。図1：レーン1、緩衝液；レーン2及び4、1：10に希釈されたカラム画分；レーン3及び5、1：100に希釈されたカラム画分。図1のレーン4及び5においては、AA742鋳型DNAが反応から削除されている。

図2．ヘパリンセファロースカラム画分におけるPCR増強活性。図2：レーン、緩衝液；レーン2及び5、希釈されていないカラム画分；レーン3及び6、1：10に希釈されたカラム画分；レーン4及び7、1：100に希釈されたカラム画分。図2のレーン5～7においては、クローン化されたPfu DNAポリメラーゼがPCRから削除された。

図3．ヘパリンセファロース画分SCS #36 H.S.#78(調製物2)からのSDS-PAGEゲル精製されたサンプルのPCR増強活性。図3は、SDS-PAGEゲルスライス1～7(生来のPfu DNAポリメラーゼ；レーン1～7)及び9～20(H.S.#78；図4からのレーン9～20)から溶出されたタンパク質のPCR増強活性を示す。タンパク質は、例2に記載のようにして溶出された。クローン化されたPfu PCR緩衝液により1：100に希釈された個々のゲルスライス1μlが、例1に記載のようにして、クローン化されたPfu PCRに添加された(6.2kbのプライマー鋳型システム)。ゲルの左側レーンにおいては、1μlの緩衝液(-)又は1：1000(0.001μl)、1：10,000(0.0001μl)又は1：100,000(0.00001μl)に希釈されたH.S.#78の存在下でのPCR生成物合成が示される。DNAマーカーは、レーン“m”において電気泳動された。

図4．図4は、ゲルスライスが切除されるマスターSDS-PAGEゲルのダブリケートを示す。次のタンパク質が両ゲル上で電気泳動された：レーンA、8μlの生来のPfu DNAポリメラーゼ(ロット#24)；レーンB、予備染色された分子量マーカー(Novex)；レーンC、ヘパリンセファロース画分SCS #36 H.S.#78 4μl(=160ngのPEF)。サンプルは負荷の前、予備加熱されず、そしてここに示されるダブリケートゲルは銀染色された。ゲルスライス1～7がマスターゲル上のレーンAから回収され、そしてスライス8～25がマスターゲルのレーンCから回収された。

図5．SDS-PAGEゲル精製されたサンプルにおけるDNAポリメラーゼ活性。ゲルスライス溶出物(1μl)におけるDNAポリメラーゼ活性のレベル(組込まれるcpm)が、例14に記載のようにして測定された。生来のPfu DNAポリメラーゼ調製物(図4；レーンA)における番号1～7のゲル精製されたタンパク質により示されるポリメラーゼ活性が、実線により示される(Y軸の左側)。画分H.S.#78(図4、レーンC)における番号8～25のゲル精製されたタンパク質のポリメラーゼ活性が点線により示される(Y軸の右側)。試験されるタンパク質の見掛け分子量がX軸上に示され(上部で)、そして予備染色された分子量マーカーに対して、ゲルスライスが回収された位置から推定される。ゲルスライス#11及び18は、最高のPCR増強活性を示した。

図6．ゲル精製されたP.フリオサスPEFのSDS-PAGE分析。次のサンプルが1%SDSの存在下で4～20%アクリルアミドゲル上で電気泳動された：レーン2及び3、SCS #37 H.S.画分#75(調製物4；10μlのMicrocon 30濃縮画分；約100ngのPEF)、レーン4及び5、SCS #37 H.S.画分#75(250kDのタンパク質マーカーより上0～4mm移動した)から回収された10μlのSDS-PAGEゲルスライス溶出物。レーン3及び5のサンプルは、SDS-PAGEゲル上への負荷の前、3分間、煮沸された。完結されたゲルは銀染色された。予備染色された分子量マーカーの移動は、レーン1に示される。

図7．S200-精製されたP.フリオサスPEFのSDS-PAGE分析。10μl(2.25μg)のS200-精製されたPEF(調製物1)がレーン上に示されるように、室温(RT)、75、85、又は100(煮沸)で3分間、2%SDSの存在下でインキュベートされ、そして次に、例2

10

20

30

40

50



に記載のようにして電気泳動にゆだねられる。タンパク質が銀 - 染色により検出される。タンパク質分子量マーカーは、レーン “ m ” において実施された。

図 8 . S200 - 精製された P . フリオサス PEF の調製物 ( 調製物 1 ) からの SDS - PAGE ゲル精製されたサンプルの PCR 増強活性。精製された PEF ( 約 4 . 5  $\mu$  g ) が、電気泳動の前、室温 ( RT ) 又は 85 で 3 分間、2 % SDS において予備インキュベートされた。タンパク質は、例 2 に記載のようにして、SDS - PAGE ゲルスライス 1 ~ 13 ( ゲル RT ) 及び 14 ~ 26 ( ゲル 85 ) から溶出された。クローン化された Pfu PCR 緩衝液により 1 : 100 に希釈された 1  $\mu$  l の個々のゲルスライスが、例 1 に記載のようにして、クローン化された Pfu PCR に添加された ( 6 . 2 kb のプライマー - 鋳型システム ) 。 SDS - PAGE ゲル精製されたタンパク質のおおよその分子量が、ゲルの上部に示されている。DNA サイズマーカーがレーン “ m ” において実施された。

10

図 9 . S200 - 精製された PEF ( 1 . 4  $\mu$  g の完全なタンパク質 ) が、電気泳動の前、85 又は 100 で加熱された。4 種のスライスが、60 kD ( スライス 1 ) ~ 42 kD ( スライス 4 ) マーカー間のゲルから切除された。タンパク質を 50  $\mu$  l の緩衝液に溶出し、そして 10  $\mu$  l のアリコートが SDS - BME 負荷染料の存在下で煮沸され、そして 4 ~ 20 % PAGE ゲル上で実施された。レーン 1 : Novex 予備染色されたマーカー ; レーン 2 : 0 . 28 ng の PEF ; レーン 3 ~ 6 : 85 で加熱された、S200 - 精製された PEF から単離されたゲル精製されたタンパク質 - スライス 1 ( レーン 3 ) 、スライス 2 ( レーン 4 ) 、スライス 3 ( レーン 5 ) 及びスライス 4 ( レーン 6 ) ; レーン 7 ~ 10 : 100 で加熱された、S200 - 精製された PEF から単離されたゲル精製されたタンパク質 - スライス 1 ( レーン 7 ) 、スライス 2 ( レーン 8 ) 、スライス 3 ( レーン 9 ) 及びスライス 4 ( レーン 10 ) 。

20

図 10 . P . フリオサス PEF 調製物の SDS - PAGE 分析。左側のパネルにおいては、次のサンプルが、記載のようにして実施される SDS - PAGE 銀染色分析にゆだねられた : クローン化された Pfu DNA ポリメラーゼ ロット #24A ( 56 ng /  $\mu$  l ) [ レーン 1 - 3 , 1  $\mu$  l , 2  $\mu$  l , 4  $\mu$  l ] ; S200 精製された P . フリオサス PEF 画分 #46 ( SCS #38 からの調製物 1 ) [ レーン 4 - 2  $\mu$  l ] ; S200 精製された P . フリオサス PEF プール画分 #47 - 48 ( 550 ng / ml ; SCS #38 からの調製物 3 ) [ レーン 5 ~ 8 , 0 . 1  $\mu$  l , 0 . 2  $\mu$  l , 0 . 4  $\mu$  l , 1  $\mu$  l ] 。右側のパネルにおいては、次のサンプルが実施された : クローン化された Pfu DNA ポリメラーゼ ロット #24A ( 56 ng / ml ) [ レーン 1 ~ 3 , 1  $\mu$  l , 2  $\mu$  l , 4  $\mu$  l ] ; Microcon 30 - 濃縮された SCS #36 ヘパリンセファロース画分 #78 ( 調製物 2 ) [ レーン 4 ~ 6 , 1  $\mu$  l , 2  $\mu$  l , 0 . 4  $\mu$  l ] ; SCS #37 ヘパリンセファロース画分 #75 ( 調製物 4 ) [ レーン 7 ~ 8 , 1  $\mu$  l , 5  $\mu$  l ] 。

30

図 11 . P . フリオサス PEF の PDVF プロット。PEF - 含有ヘパリンセファロース画分 ( SCS #37 Pfu 精製からの ) が濃縮され、そしてアリコートが記載のようにして 4 ~ 20 % SDS - PAGE ゲル上で 8 又は 9 レーンにおいて電気泳動された。サンプルは、50 kD のモノマー PEF を回収するために負荷する前、3 分間、煮沸され ( 上部 ) 、又は 250 kD 以上の凝集体を回収するために熱処理の不在下で負荷された ( 低部 ) 。タンパク質は、PDVF フィルター ( BioRad ) に移され、そして Amido ブラックにより染色された。

図 12 . S200 - 精製された P . フリオサス PEF の PVDF プロット。約 20  $\mu$  g の全タンパク質が、12 % PAGE ゲル上で 7 個のレーンの個々において電気泳動された。サンプルは、負荷の前、5 分間 85 で加熱された。タンパク質は PVDF フィルターに移され、そして図 11 におけるようにして染色された。

40

図 13 . S - 200 精製された P . フリオサス PEF の吸光度スペクトル。次のスペクトルが、Shimadzu UV160U 分光光度計上で得られた : 0 . 7 mg / ml の P . フリオサス PEF , 9 . 6  $\mu$  M 及び 4 . 8  $\mu$  M のリボフラビン、及び PEF 最終貯蔵緩衝液 ( ブランク ) 。

図 14 . 5 . 2 kb フラグメントの組換え P45 ( rP45 ) 増幅増強。PEF 及び rP45 サンプルによる 5 . 2 kb の “ ON / OFF ” アッセイにおいて、7 , 0 . 7 又は 0 . 2 ng の生来の PEF タンパク質、又は rP45 タンパク質 ( 20 ng / ml ) 5  $\mu$  l 又は 1  $\mu$  l 、又はその 1 / 10 希釈溶液 1  $\mu$  l が ON / OFF アッセイに添加された。

図 15 . 十分に変性された生来の PEF 及び rP45 の SDS - PAGE 分析。次のタンパク質サンプルが

50

、記載のようにして、4～20% SDS - PAGEゲル上で電気泳動された：1% TCAを伴わないで（レーン1）又は1% TCAと共に（レーン2）、2% SDS中で煮沸された100ngの生来のPEF；2% SDS中で煮沸された（レーン3）又は熱処理の不在下で負荷された（レーン5）、200ngの組換えP45クローン1；2% SDSにおいて煮沸された（レーン4）又は熱処理の不在下で負荷された（レーン6）、200ngの組換えP45クローン23。分子量マーカの移動がレーン7（右側）に示される。ゲルが、5% 酢酸において1：5000に希釈されたSYPROオレンジ染料（Molecular Probes）により染色された。

図16．PEF及びrP45によるdUTP転換の逆相HPLC分析。パネルA、1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中で72で加熱されたdUTP（負の対照）；パネルB、700ngの生来のPEFと共に1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中で加熱されたdUTP；パネルC、5µlのrP45（クローン1）と共に1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中で加熱されたdUTP；パネルD、1×のクローン化されたPfu緩衝液中で加熱されたdUMP標準；パネルE、パネルB及びパネルDに示される生成物が混合され、そしてdUMPがPEF副生成物と同一に移動することを、単一ピークの生成を通して示すために同時に注入された。

図17．PEF及びrP45によるdCTP転換の逆相HPLC分析。パネルA、添加剤を伴わないで1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中で加熱されたdCTP（負の対照）；パネルB、700ngのPEFと共に1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中で加熱されたdCTP；パネルC、5µlのrP45と共に1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中で加熱されたdCTP；パネルD、700ngのPEFと共に1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中で加熱されたdUTP及びdCTP。パネルA、B及びDのクロマトグラムが、同じシリーズにおいて実施され、そしてクロマトグラムCは、異なったC-18カラムを用いて、異なった実験において実施された。第2の実験においては、dCTP標準が、9.6分で溶出することが示された（データは示されていない）。

図18．dCTPの熱処理により生成された生成物の逆相HPLC分析。dCTP（クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCT緩衝液中で10mM）が、Robo Cycler 40温度グラジエントブロックにおける薄壁管中で95で加熱された。インキュベーションは、次の長さの時間、実施された：0（パネルA）、1時間（パネルB）、又は4時間（パネルC）。10µlの反応混合物が、50mMのトリエチルアンモニウムアセテート（pH7.0）（A）により平衡化されたWaters Delta-pack C-18カラム（300オングストローム/15µm）上に負荷された。生成物が、次のグラジエントを用いて、2ml/分でアセトニトリル（B）により溶出された：5分間、0%のB、20分間、0～10%のB、溶出物の吸光度が、フォトダイオードアレイ検出器によりモニターされ、そしてピーク領域が260nmで積分された。パネルA及びCの右側に、より高い感度で再統合される同じクロマトグラムが示される。パネルDにおいては、10mMのdUTP（クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR緩衝液における）10µlがクロマトグラフィー処理された。

図19．dCTP、dUTP、及びdCTPを加熱することから生成される生成物の吸光度スペクトルの比較。次の吸光度スペクトル（200～300nm）が重複された（uperimpored）：（1）図18におけるクロマトグラムAからのピーク9.283（加熱されていないdCTP）；（2）図18におけるクロマトグラムCからのピーク12.383（加熱されたdCTP生成物）；（3）図18におけるクロマトグラムDからのピーク12.100（加熱されていないdUTP）。3種のスペクトルが、最大吸収ピーク（ $\lambda_{max}$ ）の高さが等しいように標準化される。

図20．PCRサイクリングdCTPにより生成される生成物の逆相HPLC分析。dCTP（クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR緩衝液中10mM）が、単独で（パネルA）、又は0.5ng/µlのPEF（パネルB）もしくは1.25U/µlのPfu DNAポリメラーゼ（パネルC）の存在下でサイクリングされた。サイクリングは、Robo Cycler 40において、次の条件を用いて実施された：95で1分間/95で1分間、60で1分間、72で10、24分間の30サイクル/72で10分間。反応混合物10µlが、図18に記載のようにしてクロマトグラフィー処理された。パネルDにおいては、dCTP、dUTP、及びPCRサイクリングdCTPから生成された生成物の吸光度スペクトルが比較される。次の吸光度スペクトル（200～300nm）がスーパ

10

20

30

40

50

ーインポーズ：(1) 加熱されていないdCTP+Pfuのクロマトグラムからの8.3~8.8分での主要ピーク；(2) 加熱されていない緩衝液中のdUTPのクロマトグラムからの11.867分でのピーク；(3) サイクリングされたdCTP+Pfuを示すクロマトグラムC(図20)からのピーク12.150。

図21. PEF及びrP45によるdUTP阻害及び可逆性阻害。次の成分が、クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR反応(例1の5.2kbの“ON/off”アッセイ)に添加された：レーン1, 2 µMのdUTP+7ngの生来のPEF；レーン2, 2 µMのdUTP；レーン3, 2 µMのPEF生成されたdUMP；レーン4, 20 µMのPEF生成されたdUTP；レーン5, 2 µMのdUTP+180ngのrP45クローン1；レーン6, 2 µMのdUTP+20ngのrP45クローン1；レーン7, 2 µMのdUTP+2ngのrP45クローン1；レーン8, 2 µMのdUTP+180ngのrP45クローン23；レーン9, 2 µMのdUTP+20ngのrP45クローン23；レーン10, 0.2 µMのdUTP；レーン11, 0.2 µMのdUTP+7ngの生来のPEF；レーン12, 0.2 µMのdUTP+20ngのrP45クローン1；レーン13, 0.2 µMのdUTP+20ngのrP45クローン23。右レーンMにおいて、1 kbのDNAマーカーが実施された。

図22. 関連のないdU含有オリゴヌクレオチドによるPCRの阻害。0.9kbの標的物がヒトゲノムDNAから増幅された。レーン2及び3は、第3オリゴヌクレオチドの添加を伴わないPCR増幅を示す。レーン3におけるサンプルは、7ngのPEFの存在下で増幅された。レーン4~8及び10~11は、対照(dUよりもむしろ3dT)オリゴヌクレオチド(40マー)のタイトレーションを示す。レーン13~32は、dUオリゴヌクレオチド(40マー)の存在下で増幅されたサンプルを示す。レーン13~19は、Pfu DNAポリメラーゼのみにより増幅されたレーン14~26は、7ngのPEFの存在下でPfu DNAポリメラーゼにより増幅された。レーン27~32は、Taq DNAポリメラーゼにより増幅された。

図23. ヒトdUTPアーゼは、PEF/P45活性を模倣する。PEF活性が、例1に記載される5.2kbプライマー鑄型アッセイを用いて測定された。PEF反応の個々のアニーリング段階で、0.5 µlの次のものが添加された：dUTPアーゼ貯蔵緩衝液(負の対照)、組換えP45(2ng/µlで)(正の対照)、希釈されていないヒトdUTPアーゼ調製物(二重反復反応)、又は1:10に希釈されたヒトdUTPアーゼ調製物(二重反復反応)。

図24. P. フリオサスDNAポリメラーゼ調製物におけるPEF(P300)の存在。SDS-PAGE分析が、存在する種々のレベルのPEFを有する、生来のPfu DNAポリメラーゼの6種の調製物について示される。負荷される個々のロットの体積が示される(µl)。タンパク質サンプルは、電気泳動の前、煮沸されず、そしてゲルが銀染色された。

図25. P. フリオサスPEF-特異的IgGを用いての粗抽出物のウェスタンブロット分析。抽出物は、P. フリオサスの5種の異なる発酵から調製され(レーン1~5)、3種の部分的に精製された画分はT. アクアチカス(T. aquaticus)からであり(レーン6~8)、そして1つの抽出物はE. コリからである(レーン9)。精製されたPEF(550ng)及び予備染色された分子量マーカーが、それぞれレーン10及び11において実施された。但し、すべてのサンプルは、負荷の前、SDS/BME染料中で煮沸された。

図26. 抗-組換えP45抗体を用いての生来のPEFサンプルのウェスタンブロット分析。生来のPfu PEFの3種のサンプル(それぞれ700ng)は次の通りに調製された：加熱されていない/2%SDS負荷染料(レーン1)；加熱された/2%SDS負荷染料(レーン2)；及び加熱された/1%TCA/2%SDS負荷染料(レーン3)。加熱は、95 °Cで5分間行なわれた。サンプルは、4~20%グラジエントゲル上で電気泳動され、そしてニトロセルロース上に移された。ブロットが、ウサギ抗-rP45血清により、記載のようにしてプローブされた。Novex予備染色された分子量マーカー(See Blue™)が、レーン4においてPEFサンプルに隣接して実施された。

図27. 異なる種からのCBP-rP45及び細胞溶解物に対する抗体を用いてのウェスタンブロット。レーン2~7に示される溶解物は音波処理により調製された。サンプルは、負荷の前、95 °Cで加熱されたが、但しレーン10において負荷されたサンプルは、室温で放置された。レーン1、See Blue™ Markers(Novex)；レーン2、特徴づけられていないパシラス種(Magenta)；レーン3、サーマス・アクアチカス；レーン4、特徴づけられてい

10

20

30

40

50

ない種；レーン5、ピロコーカス・フリオサス；レーン6、メタノバクテリウム・サーモアウトトロピカム (Methanobacterium thermoautotrophicum)；レーン7、ヒトリンパ腫HL80細胞；レーン8、精製されたピロコーカス・フリオサスPEF；レーン9、精製された融合CBP - rP45；レーン10、精製された融合CBP - rP45。

図28, 29及び30. クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCRにおけるP. フリオサスPEFのPCR増幅活性。PCR増幅が、次の追加の注解を伴って、例14に記載のようにして実施された。図28. 19kbのlac I - laZ 標的物がプラスミドDNAから増幅された。100 µ lのPCRが、50pgのpRRIAZ, 100ngのプライマー (5' CAT AGC GAA TTC GCA AAA CCT TTC GCG GTA TG G 3' (配列番号20)；5' ACT ACG GAA TTC CAC GGA AAA TGC CGC TCA TCC 3' (配列番号21))、及び5 Uのクローン化されたPfu DNAポリメラーゼにより、0.5 µ lのPEF - 含有ヘパリンセファロース画分 (H. S. #75；調製物4；約10ng / µ lのPEF)の不在 (二重反復サンプル#18)又は存在 (二重反復レーン#19)下で実施された。PCRサイクルが、次の条件を用いて、Gene Amp PCR System 9500 (Perkin Elmer Cetus)上で実施された：95

で30秒 (1サイクル) / 95 で5秒；55 で1分；72 で2.5分 (30サイクル)。図29. DNAからの10kbの標的物が増幅された。100 µ lのPCRが、250ngの DNA (Sigma), 250ngのプライマー (F51-20 5' GGC-GTT-TCC-GTT-CTT-CTT-CG 3' (配列番号22)；R10163-20 5' CCA-TCT-CAC-GCG-CCA-GTT-TC 3' (配列番号23))、及び5 Uのクローン化されたPfu DNAポリメラーゼにより、1：500 (レーン2)、1：50 (レーン3)又は1：5 (レーン4)に希釈された1 µ lのS200 - 精製されたPEF (調製物3；550ng / µ lのPEF)の不在 (レーン1)又は存在下で行なわれた。PCRサイクルが、次の条件を用いて、Robocycler 40 (Stratagene)上で行なわれた：95 で1分間 (1サイクル) / 95 で1分間；62

で1分間；72 で10分間 (30サイクル)。図30. レーン1～5、ヒト 1抗トリプシン遺伝子の5.2kb部分がゲノムDNAから増幅された。26 µ lのPCRが、62.5ngのヒトゲノムDNA (Promega), 50ngのプライマー (F91-23 5' GAG GAG AGC AGG AAA GGT GGA AC (配列番号24)；R5271-21 5' GCT GGG AGA AGA CTT CAC TGG) (配列番号25)、及び0.6 Uのクローン化されたPfu DNAポリメラーゼにより、1：1000 (レーン2)、1：10,000 (レーン3)、1：100,000 (レーン4)又は1：1,000,000に希釈された1 µ lのS200精製されたPEF (SCS #52；0.7 µ g / µ l)の存在下又は不存在下 (レーン1)で行なわれた。PCRサイクルが次の条件を用いてRobo Cyclor 96 (Stratagene)上で行なわれた：96

で45秒 (1サイクル) / 96 で45秒；60 で45秒；72 で14分 (35サイクル) / 72 で10分 (1サイクル)。

図31. クローン化されたPfu DNAポリメラーゼ及びP. フリオサスPEFにより行なわれたPCRの特異性に対するStratageneのPerfect Match (E. コリ:ssb)の効果。PCRが、100 µ lの反応体積において、6.2kbの試験系 (例1)を用いて行なわれた。1 µ lの次のものがPCRに添加された：レーン1及び5 - 希釈緩衝液；レーン2及び6 - 希釈されていないPEF - 含有ヘパリンセファロース画分 (Microcon 30 - 濃縮されたSCS #36 H. S. #78、調製物2；約40ng / µ lのPEF)；レーン3及び7 - 1：10に希釈されたPEF画分；レーン4及び8 - 1：100に希釈されたPEF画分。1 µ lのPerfect Matchがレーン5～8において行なわれるPCRに添加された。DNAサンプルは、レーン3と4との間、4と5との間、及び7と8との間のレーンにおいては、負荷されなかった。

図32. ヘパリンセファロース (H. S.) カラム画分のSDS - PAGE分析。SCS生来のPfu DNAポリメラーゼ調製物#37 (SCS #37)からの示される (上部での番号)ヘパリンセファロース画分が、4～20%のSDS - PAGEゲル (4 µ l / レーン)上で分析された。予備染色された分子量マーカーが、“m”として示されるレーンにおいて試験され、そして4 µ lのSCS #36 H. S. #78 (PEF調製物2)が、“A”として示されるレーンにおいて試験された。DNAポリメラーゼ (95kD)活性のピークが、画分50と61との間で溶出した。

図33, 34, 35及び36. Pwo (図33)、JDF - 3 (図34及び35)、ES4及びVent (図35)、並びにDeep Vent (図36)のDNAポリメラーゼにより行なわれたPCRにおけるP. フリオサスPEFの活性増強。図33においては、25 µ lのPCRが、25 U / mlのPwo DNAポリメラーゼ及び1 ×のクローン化されたPfu PCR緩衝液と共に6.2kbの試験系 (例1)を用いて行なわれた

図33. クローン化されたPfu DNAポリメラーゼ及びP. フリオサスPEFにより行なわれたPCRの特異性に対するStratageneのPerfect Match (E. コリ:ssb)の効果。PCRが、100 µ lの反応体積において、6.2kbの試験系 (例1)を用いて行なわれた。1 µ lの次のものがPCRに添加された：レーン1及び5 - 希釈緩衝液；レーン2及び6 - 希釈されていないPEF - 含有ヘパリンセファロース画分 (Microcon 30 - 濃縮されたSCS #36 H. S. #78、調製物2；約40ng / µ lのPEF)；レーン3及び7 - 1：10に希釈されたPEF画分；レーン4及び8 - 1：100に希釈されたPEF画分。1 µ lのPerfect Matchがレーン5～8において行なわれるPCRに添加された。DNAサンプルは、レーン3と4との間、4と5との間、及び7と8との間のレーンにおいては、負荷されなかった。

図32. ヘパリンセファロース (H. S.) カラム画分のSDS - PAGE分析。SCS生来のPfu DNAポリメラーゼ調製物#37 (SCS #37)からの示される (上部での番号)ヘパリンセファロース画分が、4～20%のSDS - PAGEゲル (4 µ l / レーン)上で分析された。予備染色された分子量マーカーが、“m”として示されるレーンにおいて試験され、そして4 µ lのSCS #36 H. S. #78 (PEF調製物2)が、“A”として示されるレーンにおいて試験された。DNAポリメラーゼ (95kD)活性のピークが、画分50と61との間で溶出した。

図33, 34, 35及び36. Pwo (図33)、JDF - 3 (図34及び35)、ES4及びVent (図35)、並びにDeep Vent (図36)のDNAポリメラーゼにより行なわれたPCRにおけるP. フリオサスPEFの活性増強。図33においては、25 µ lのPCRが、25 U / mlのPwo DNAポリメラーゼ及び1 ×のクローン化されたPfu PCR緩衝液と共に6.2kbの試験系 (例1)を用いて行なわれた

10

20

30

40

50

。1  $\mu$  l のS200 - 精製された P . フリオサスPEF ( 調製物 1 ; 225ng /  $\mu$  l ) が、希釈されず ( レーン 1 ) 、又は 1 : 10 ( レーン 2 ) 、 1 : 1000 ( レーン 3 ) 、 1 : 100 , 000 ( レーン 4 ) に希釈された。1  $\mu$  l の希釈緩衝液が負の対照として添加された ( レーン 5 ) 。図 34 においては、10kb の DNA 標的物が、DNA トランスジーン の 40 のコピー ( レーン 8 ~ 10 ) 又は 1 つのコピー ( レーン 14 ~ 16 ) を含む、DNA ( レーン 1 ~ 4 ; 5 ~ 7 ; 11 ~ 13 ) 又はマウスゲノムDNAから増幅された。100  $\mu$  l のPCRが、250ng の DNA ( Sigma ) 、又はマウスゲノムDNA及び250ng のプライマー ( F51-20 5 ' GGC-GTT-TCC-GTT-CTT-CTT-CG ( 配列番号 22 ) ; R10163-20 5 ' CCA-TCT-CAC-GCG-CCA-GTT-TC ) ( 配列番号 23 ) により行なわれた。PCRが、5 U のTaq DNAポリメラーゼ ( レーン 1 ~ 4 ) 又は 1 U のJDF3 DNAポリメラーゼ ( レーン 5 ~ 16 ) を用いて、Taq PCR緩衝液において行なわれた。1  $\mu$  l の次のものがPCR に添加された : 1 : 500 ( レーン 2 , 12 , 15 ) 、 1 : 100 ( レーン 6 , 9 ) 、 1 : 50 ( レーン 3 ) 、 1 : 10 ( レーン 7 , 10 , 13 , 16 ) 又は 1 : 5 ( レーン 4 ) に希釈されたS200 - 精製されたPEF ( 調製物 3 ; 550ng /  $\mu$  l のPEF ) 。1  $\mu$  l の希釈緩衝液が、負の対照 ( レーン 1 , 5 , 8 , 11 , 14 ) として添加された。PCRサイクルが、次の条件を用いて、Robocycler 40 ( Stratagene ) 上で行なわれた : 95 で 1 分 ( 1 サイクル ) / 95 で 1 分 ; 62 で 1 分 ; Taq のために 72 で 10 分又は JDF3 のために 10 分 ( 30 サイクル ) 。図 35 においては、1.9kb のリガーゼ遺伝子が P . フリオサスゲノムDNAから増幅された。100  $\mu$  l のPCRが、250ng のDNA及び250ng のプライマー ( 5 ' GAG CTT GCT CAA CTT TATC ( 配列番号 26 ) ; 5 ' GAT AGA GAT AGT TTC TGG AGA CG ) ( 配列番号 27 ) により行なわれた。PCRが、Pfu PCR緩衝液中、10 U のES 4 DNAポリメラーゼ ( レーン 1 , 2 ) 、Taq PCR緩衝液中、1.5 U のJDF3 DNAポリメラーゼ ( レーン 3 , 4 ) 、クローン化されたPfu PCR緩衝液中、4 U のPfu DNAポリメラーゼ ( レーン 5 , 6 ) 、Vent PCR緩衝液中、1 U のVent DNAポリメラーゼ、又はTaq PCR緩衝液中、1 U のTaq DNAポリメラーゼにより行なわれた。1  $\mu$  l の次のものがPCRに添加された : 希釈緩衝液 ( レーン 1 , 3 , 5 , 7 , 9 ) 、又は 1 : 100 に希釈されたS200 - 精製されたPEF ( 調製物 3 ; 550ng /  $\mu$  l のPEF ) ( レーン 2 , 4 , 6 , 8 , 10 ) 。PCRサイクルが、次の条件を用いて、DNA Thermal Cyclers 480 ( Perkin Elmer Cetus ) 上で行なわれた : 95 で 1 分 ; 46 で 1 分 ; 72 で 2 分 ( 30 サイクル ) 。図 36 においては、2 kb のDNA標的物がトランスジェニックマウスDNAから増幅された。100  $\mu$  l のPCRが、250ng のDNA及び250ng のプライマー ( F51-20 5 ' GGC GTT TCC GTT CTT CTT CG ( 配列番号 22 ) ; R2092-23 5 ' CGG GAT ATC GAC ATT TCT GCA CC ) ( 配列番号 28 ) により行なわれた。PCRが、Deep Vent PCR緩衝液中、0.75 U のDeep Vent DNAポリメラーゼにより行なわれた ( レーン 1 ~ 4 ) 。1  $\mu$  l の次のものが添加された : 希釈緩衝液 ( レーン 1 ) 、又は 1 : 500 ( レーン 2 ) 、 1 : 100 ( レーン 3 ) 、 1 : 50 ( レーン 4 ) に希釈されたS200 - 精製されたPEF ( 調製物 3 ; 550ng /  $\mu$  l のPEF ) 。PCRサイクルが、次の条件を用いて、Robocycler 40 ( Stratagene ) 上で行なわれた : 95 で 1 分 ( 1 サイクル ) / 95 で 1 分 ; 62 で 1 分 ; 72 で 2 分 ( 30 サイクル ) 。

図 37 . P . フリオサスPEF による RT - PCR の増強。EGF 受容体配列の一部が、次の添加により記載される 2 - 段階 RT - PCR プロトコールを用いて、Hep G<sub>2</sub> 全RNAから増幅された。1  $\mu$  l のcDNA合成反応物が、5 U のPfu DNAポリメラーゼ、1  $\mu$  M のアンチセンスプライマー ( 5 ' GAG-TTA-AAT-GCC-TAC-ACT-GTA-TCT ) ( 配列番号 29 ) 、1  $\mu$  M のセンスプライマー ( 5 ' CAG-GAC-TCA-GAA-GCT-GCT-ATC-GAA ) ( 配列番号 30 ) ( 1 kb の生成物 ) 又は 5 ' CTG-CAC-GTG-CCC-TGT-AGG-ATT-TGT ( 配列番号 31 ) ( 3 kb の生成物 ) を含む 50  $\mu$  l のPCR反応物に添加された。1  $\mu$  l の緩衝液 ( 0 ) 、又は 1  $\mu$  l のPEF - 含有ヘパリンセファロース画分 ( SCS #37 H . S . #75 ; 調製物 4 ; 約 10ng /  $\mu$  l のPEF ) が、希釈されないまま ( UD ) 又は 1 : 10 ~ 1 : 10<sup>8</sup> ( 示されるような ) に希釈されて添加された。PCRが、3 mM のMgSO<sub>4</sub> を含む、クローン化されたPfu PCR緩衝液において行なわれた。

図 38 . P . フリオサスPEF による Pfu DNAポリメラーゼに基づく Seamless Cloning の増強。20ng のプラスミドが、1 : 100 に希釈されたS200 - 精製された P . フリオサスPEF ( 調製物 3 : 550ng /  $\mu$  l ) の不在 ( レーン 2 , 4 , 6 , 8 , 10 , 12 ) 又は存在 ( 重複 レーン 1 , 3 , 5 , 7 , 9 , 11 ) 下で、Seamless Cloning キットプロトコールに記載のようにして増

幅された。7.2kbの標的物が、6種の異なったプライマーにより増幅された(3レーンの個々の組)。7.5分の延長時間がPEF-含有反応のために使用され、そして15分の延長時間がPEFを欠いている反応のために使用された。

図39. P. フリオサスPEFによるPfu DNAポリメラーゼに基づくQuik Change突然変異誘発の増強。Quik Change突然変異誘発が、生来の又はクローン化されたPfu DNAポリメラーゼのいずれかと共に、キット対照プライマー及びプラスミド鋳型を用いて実施された。反応に、1  $\mu$  lの希釈緩衝液、又は示されるように希釈された、1  $\mu$  lのPEF-含有ヘパリンセファロース画分(SCS #36 H.S.#78; 調製物2、約40ng /  $\mu$  l)が添加された。線状増幅生成物の相対量が、アガロースゲル上の臭化エチジウム染色された生成物バンドの強さにより評価された。超コンピテントE. コリ細胞が、消化された増幅生成物により形質転換された。amp耐性コロニーの数及び突然変異頻度が得られた。

図40及び41. S200 - 精製されたP. フリオサスPEFのPCR増強活性。PCR増強活性が、例1に記載される6.2kbの試験系を用いて二重反復アッセイにおいて測定された。図40においては、精製されたPEF(225ng /  $\mu$  l; 調製物1)が、1  $\times$ のクローン化されたPfu PCR緩衝液に希釈され、そして次のものの1  $\mu$  lアリコートが24  $\mu$  lのPCRに添加された - レーン1、緩衝液; レーン2、希釈されていないPEF; レーン3 ~ 6、それぞれ、1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10,000に希釈されたPEF。図41においては、次の量の精製されたPEFが添加された: レーン1, 1  $\mu$  lの緩衝液; レーン2, 1  $\mu$  lの純粋なPEF; レーン3 ~ 8, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10,000, 1 : 100,000及び1,000,000に希釈された1  $\mu$  lのPEF。

図42及び43. ヘパリンセファロース - 精製されたP. フリオサスPEFのPCR増強活性。PCR増強活性が、記載される6.2kbの試験システムを用いて測定された。PEF画分(約40ng /  $\mu$  l; 調製物2)が、1  $\times$ のクローン化されたPfu PCR緩衝液に希釈された。図42においては、次のものの1  $\mu$  lアリコートが50  $\mu$  lのPCRに添加された - レーン1、緩衝液; レーン2 ~ 5、それぞれ、1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10,000に希釈されたPEF。図43においては、次のものの1  $\mu$  lアリコートが24  $\mu$  lのPCRに添加された - レーン1、緩衝液; レーン2、希釈されていないPEF; レーン3 ~ 6、それぞれ1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10,000に希釈されたPEF。DNAマーカーは、レーン“m”において電気泳動された。

図44. ヘパリンセファロースカラム画分のPCR増強活性。1  $\mu$  lの個々のカラム画分(図32からの画分1 ~ 93; 上部に番号付けされている)に含まれるPCR増強活性が、例1に記載される6.2kbのプライマー鋳型PCRアッセイを用いて測定された。画分50 ~ 61は、Pfu DNAポリメラーゼ活性のピークを含み、そして分析から排除された。

本発明の特定の態様の詳細な記載

次の記載は、本発明の範囲を、いずれか特別に記載される態様に限定するために構成されるべきではない。本発明の種々の観点及び態様は、当業者の知識に関連して、全体としての開示から明らかであろう。さらに、当業者に知られているか又は入手できる情報と組合して、本明細書における記載は、次の請求の範囲により包含される要旨の実施を可能にする。

本発明のためには、核酸複製反応は、多くの核酸増幅、プライマー延長、逆転写、又は当業界において知られている他の核酸重合反応のいずれかを意味することができる。さらに、本発明の複製反応は、第1の核酸と相互作用し、そして第2の実質的に相補的な核酸配列を生成する酵素の能力が包含されるいずれかの反応を包含する。本発明の増幅反応は、本発明においては特に有用であるが、PCR工程又はいずれか特定のPCRに基づくアッセイに限定されず、そして特に、RT-PCR工程を包含する。本発明のタンパク質、調製物、組成物、混合物、キット及び方法は、いずれかの適切に企画された核酸複製反応と共に使用され得る。

本明細書において使用される場合、用語“PEF”とは、ポリメラーゼ増強活性を有する、細菌、真核生物又は原生生物(archael)源に由来する天然に存在するタンパク質(又は完全に又は部分的に合成のコピー又はその類似体)、1又は複数のそのようなタンパク質

10

20

30

40

50

の混合物、1又は複数のそのようなタンパク質を含むタンパク質複合体、又は1又は複数のそのようなタンパク質、混合物又は複合体を含む抽出物を意味する。天然に存在するタンパク質の完全に合成のコピーとしての組換えPEFタンパク質、及び少なくとも1つの組換えPEFタンパク質との複合体がまた、本発明の“PEF”である。本発明のPfu P45及びP50タンパク質は、約45kD及び50kDの見掛け分子量を示し、そしてPfuに由来することができるPEF複合体の主要成分であるPEFタンパク質の実例である。P45及びP50タンパク質の両者に関するデータは本明細書に示されており、そして特定の構造情報を詳述する。SDS-PAGE上で、P45及びP50、並びにマイナーな追加の成分を含む熱処理されていないPEF複合体は、250kD以上の見掛け分子量に移動する。本発明のPEF複合体の1つの種は、ピロコーカス・フリオサスからのP300複合体である。

10

しかしながら、本発明は、次の例により提供される技術に類似する技法、又は本明細書に記載され、又は本明細書に記載されるタンパク質に由来できるPEFタンパク質に対する構造情報の使用により同定されるPfu以外の生物に由来する他のPEFタンパク質、混合物、複合体、組成物及び抽出物を包含する。さらに具体的には、本発明は、本明細書に記載されるPEFのすべて又は一部に対する配列相同性、たとえば本明細書に記載されるタンパク質をコードするDNA配列、又は本明細書に記載されるDNA配列のすべて又は一部に対する核酸相同性に基づいて同定されるPEFを包含する。当業界において知られている方法と共に、適切なコンピューター読取り媒体上に記憶された、本明細書における配列情報を用いてのコンピューター実施される相同性研究が、それらの相同PEFを生成することができる。また、本明細書に開示されるタンパク質、複合体又は抽出物に対する抗体との反応性が、相同PEFを生成するために、当業界において知られている方法により使用され得る。

20

当業者は、タンパク質の類似体を生成する方法に関しては良く知っている。当業界における出版物からの種々の技法が、タンパク質のアミノ酸配列を突然変異誘発し、修飾し、切断し、又は他方では、変更し、そして機能的活性を保持するために使用され得る。PEFとしてのdUTPアーゼ活性の場合、dUTPアーゼ、たとえばE・コリdUTPアーゼの既知結晶構造は、PEF活性をまだ保持しながら、多くの手段のいづれかにおいて突然変異誘発され得るdUTPアーゼの領域に対する特定の情報を提供する(Hokari, S., など., Arch. Biochem. Biophys. 253: 350 (1987)における哺乳類dUTPアーゼに対する類似性をまた示す、Cedergren-Zeppezauer, E. S., など., Nature 355: 740 (1992)を参照のこと)。同様に、完全に又は部分的に合成の又は組換え的に発現されたタンパク質はまた、当業者による情報から生成され得る。(たとえば、Ausubelなど.(1989) Current Protocols in Molecular Biology、及び1997年2月までの増刊号)。

30

さらに、PEFはまた、本明細書に示されるように、dUTPアーゼ活性を示すタンパク質でもあり得る。特に、ヒト、ピロコーカス・フリオサス及びサーマス・サーモフィリスのdUTPアーゼ活性は、PEFとしての重合反応を増強するために使用され得る。他の真核生物、細菌及び原生生物(archaeal)源が同様に、dUTPアーゼタンパク質としてPEFを誘導するために使用され得る。PEFはまた、dUTPをターンオーバーし、又はdUTPの濃度を低めるために機能するいづれかのタンパク質でもあり得る。同様に、本発明は、dUTP濃度を低め又は複製され又は増幅された生成物中へのdUTPの組込みを妨げることによって複製又は増幅反応を増強するための方法、及びその組込みを妨げることができる組成物を含んで成る。

40

本発明のPEFのポリメラーゼ増強活性は、多くの異なった手段により決定され得る。下記の記載は、当業者がPEF活性が存在するかどうかを決定するために使用することができる、アッセイ及び技法の少数の例を詳述する。それらのアッセイ及び技法は、単独で又は組合して使用され得る。

例1は特に、スクリーニングアッセイ及び“ON/Off”アッセイを詳述する。このタイプのPCRアッセイは、サンプルにおけるポリメラーゼ増強活性の存在の同定を可能にする。より一般的には、ポリメラーゼ増強活性を含むと思われるサンプルが添加される場合、負の対照レベルよりもPCR生成物収率の上昇を示すいづれかのアッセイが、ポリメラーゼ増強活性を同定するために使用され得る。また、ポリメラーゼ増強活性を含むと思われるサンプルが添加される場合に生成されるPCR生成物の長くされた長さにより示される、対照

50

レベルよりもプロセッシング性の上昇を示すいずれかのアッセイが使用される。PCR生成物収率及び高められたプロセッシング性の組合せがまた、ポリメラーゼ増強活性が存在するか又は否かを決定するために使用され得る。

ポリメラーゼ増強活性はまた、組込まれたdUTPのPCR阻害作用の低下を示すアッセイにより同定され得る。たとえば、PCR反応は、dUTP、及びポリメラーゼ増強活性を含むと思われるサンプルの存在下で実施され得る。dUTPの存在下で重合を可能にするそれらの反応は、dUTPアーゼ活性の形でポリメラーゼ増強活性を示す。従って、dUTPアーゼ活性は、ポリメラーゼ増強活性であり得る。

また、特に好熱性反応又はPCR反応条件下でdUTPをターンオーバーするよう機能する組成物は、dUTPアーゼとしてのポリメラーゼ増強活性を有する。dUTPが新しく重合された鎖中に組込まれないようそのdUTPに対して作用する酵素又は活性は、dUTPをターンオーバーするよう機能する。dUTPのターンオーバーはまた、たとえばHPLCにより反応生成物を分析することによって検出されるように、dUTPのdUMPへの転換についてのアッセイによっても検出され得る。dUTPのdUMPへの転換、又は他のヌクレオシドリン酸又は代謝誘導体又は生成物を検出する生化学アッセイが考察され得、又は当業界において知られており、そしてdUTPアーゼ活性としてポリメラーゼ増強活性を同定するために使用され得る。

ポリメラーゼ増強活性はまた、コンセンサスウリジン - 結合配列モチーフ (配列番号72) を有するdUTPアーゼ酵素でもあり得る。多くのそれらの酵素は下記に同定されている。しかしながら、多くの他のものが存在し、又は当業界において知られているコンピューター実施されるか又は他の配列分析方法を通して同定され得る。従って、コンセンサスウリジン - 結合モチーフ又は本明細書に示される関連配列の存在はまた、PEFである酵素又はタンパク質、たとえば配列番号72、もしくは配列番号72~81のいずれか1つ、又はそれらの配列の組合せを含んで成るタンパク質を定義するためにも使用され得る。

当業界において知られている配列同一性比較を通して同定されるタンパク質は、PEFの存在を確かめるために使用され得る。たとえば、約18%又はそれ以上の配列同一性を有する1つの種からのタンパク質は、もう1つの種の既知タンパク質に関連し、又は類似することが、当業界において示されている。下記例においては、約39%の配列類似性が、PEFとして作用することができるdUTPアーゼ活性を明確に同定するのに十分である。

本明細書に記載されるPEFに対する抗体はまた、ポリメラーゼ増強活性を有するタンパク質を同定することもできる。たとえば、種々の原生生物、細菌、好熱性細菌、又は真核生物サンプルからの組成物のウェスタンブロット分析は、ポリメラーゼ増強活性を有するタンパク質を同定することができる。さらに、本発明のPEFタンパク質及び複合体は免疫原として示されるので、PEFに対する種々の他の抗体は、本明細書における情報を用いて、当業界において知られている技法により生成され得る。それらの他の抗体はまた、PEFを同定するためにも使用され得る。

#### 例1 . PEF活性についてのスクリーニング

多くの異なった源からのタンパク質 - 含有抽出物を、PEF活性について試験することができる。抽出物は、当業界において知られている多くの手段で調製され得る。

1つの方法は、Pfu DSM 3638細胞により示された。細胞を増殖し、細胞ペーストを遠心分離により集め、そして次に、-80 で凍結した。ペーストを、溶解緩衝液〔50mMのトリス - HCl (pH8.2), 1mMのEDTA, 10mMのβ-メルカプトエタノール、0.5mMのPMSF及び2µg/mlのアプロチニン〕により取り、そしてその後、細胞をFronchプレスにおいて溶解し、そして次に、音波処理した。音波処理に続いて、溶解物を遠心分離し、そして可能性あるPEFを含む上清液をアッセイのために集めた。

PEFを生成するいずれかの細胞、たとえばPEFの発現を方向づける組換えベクターにより形質転換された細胞からの抽出物をまたアッセイすることができる。それらの細胞の抽出物を製造する方法は、当業界において知られており、そして下記に例示される。

#### 1 . PCR - 増強活性についてのスクリーニングアッセイ

熱安定性PEFを検出するための1つの方法は、PCR増強活性について好熱性原生生物又は細菌抽出物からの部分的に精製された画分をスクリーニングすることによってである。PCR

10

20

30

40

50



増強活性は、カラム - 精製された画分、均質タンパク質、及びSDS - PAGEゲルスライス（下記参照のこと）からの溶出により回収されるタンパク質から成るサンプルにおいて検出され得る。サンプルを、DNAポリメラーゼ、緩衝液、dNTP、プライマー及びDNA鋳型を含むPCR増幅反応に添加する。PCR増強活性を、添加されるサンプルの不在（DNAポリメラーゼのみ）下で実施される増幅に比較して、特定のサンプル（DNAポリメラーゼ + PEF）の存在下で実施される増幅についてPCR生成物収率の上昇により同定する。

内因性DNAポリメラーゼ活性を含むと思われるサンプル、たとえばタンパク質抽出物、をスクリーニングする場合、外因性DNAポリメラーゼがPCR増幅から排除される負の対照が実施され得る。さらに、DNAにより汚染されているサンプルをスクリーニングする場合、外因性DNA鋳型がPCR増幅から排除される負の対照が実施され得る。

PCR増強アッセイの感度は、使用されるDNA標的物の複雑さに依存する。PCR反応パラメーター（標的物複雑性、DNA鋳型濃度、ポリメラーゼ濃度、PCRサイクル数又は延長時間）は、PCR生成物の収率が通常の条件下でかろうじて検出されるよう調節され得る。さらに、試験のためのサンプルは、PEFの濃度がPCR増強活性アッセイの検出できる範囲内になるよう適切に希釈され得る。

## 2. Pfu - 由来のサンプルを用いてのPCR - 増強活性についてのスクリーニングアッセイ

多くの増幅アッセイが、PEF活性の存在又は不存在を検出し、そして / 又はサンプル間のPEF活性を比較するよう企画され得る。一般的に、それらの試験は、増幅されるべきまれな配列を含むサンプルを使用する。配列は非常にまれであるので、通常の状況下での増幅は、かろうじて検出できるか、又はまったく検出できない増幅された生成物をもたらす。推定上のPEF活性を有するサンプルを添加することによって、形成される増幅された生成物の量に対するいずれかの効果が検出され得る。

1つの特定のスクリーニングアッセイは、PEFの存在又は不存在を検出する“On / Off”アッセイと呼ばれる。“On / Off”アッセイは、PEF活性が存在する場合のみ、適切な増幅された生成物をもたらす、又はPEF活性が存在する場合とPEFが存在しない場合とが比較される場合の増幅された生成物の検出できる差異をもたらす。増幅された生成物の量を検出するための方法は、当業界において知られており、そして電気泳動及びハイブリダイゼーションを用いる方法を包含する。

ピロコーカス・フリオサスからのPEFについてスクリーンするために使用されるアッセイの1つの態様は、トランスジェニックマウスDNAからの6.2kbの標的物の増幅を包含した（6.2kbのプライマー鋳型アッセイ）。次のものから成るマスターPCRカクテルを調製した：200  $\mu$  Mの個々のdNTP、2  $\mu$  g / mlのプライマーF432-21（5' -CTA-TTG-AGT-ACG-AAC-GCC-ATC）（配列番号62）、2  $\mu$  g / mlのプライマーR6656-20（GTC-ACG-CTT-GCT-CCA-CTC-CG）（配列番号63）、2.5  $\mu$  g / mlのAA742 DNA（40コピーのファージDNAシャトルベクターを有するトランスジェニックマウスDNA）、1  $\times$ のクローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR緩衝液（10mMのKCl、10mMの（NH<sub>4</sub>）<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20mMのトリス - HCl（pH8.8）、2 mMのMgSO<sub>4</sub>、0.1%（v / v）のTriton X-100、及び100  $\mu$  g / mlのBSA）、及び25 U / mlのクローン化されたPfu DNAポリメラーゼ。サンプルを1  $\times$ のクローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR緩衝液に希釈し、そして1  $\mu$  lの個々の希釈されたサンプルを、前記PCRカクテル24  $\mu$  lに添加した。PCR増幅を、次の条件を用いて、Robo Cycler 96 Temperature Cycler（Stratagene）上で行なった：96 で45秒（1サイクル） / 96 で45秒；60 で45秒；72 で14分（35サイクル） / 72 で10分（1サイクル）。PCR生成物（10  $\mu$  l / レーン）を、1%アガロースゲル上で試験し、そしてPCR生成物バンドを、臭化エチジウム染色により可視化した。PCR増強活性を有するサンプルは、DNAポリメラーゼのみの存在下で得られるよりも高い収率の予測される6.2kbのPCR生成物を示す。PCR増強が汚染性内因性DNAポリメラーゼ活性よりもむしろ、PEFの存在による場合、外因性DNAポリメラーゼ（たとえば、Pfu DNAポリメラーゼ）の不在下で実施される増幅は、PCR生成物を生成しない。さらに、外因性DNA鋳型の不在下で実施されるPCR増幅は、PEFサンプルが汚染性標的物DNAを欠いている場合、PCR生成物を生成すべきではない。

PEFについてスクリーンするためのアッセイの第2態様は、PCR増幅において5.2kbのヒト

10

20

30

40

50

1 - 抗トリプシン遺伝子を用いる。このプライマー / 鋳型システムのPCR増幅は非常に限定されるので、PEFの不在下で、いずれのPCR生成物をも検出することは困難であった。PEF活性を付加する場合、5.2kbの生成物が容易に検出された。次の条件を、この“On / Off”アッセイのために使用した：100  $\mu$  l - 1 x のクローン化されたPfu DNAポリメラーゼ緩衝液中、200  $\mu$  Mの個々のdNTP、下記200ngのプライマー F - 91 - 23、下記200ngのプライマー R5271-21、125ngのヒトゲノムDNA、2.5単位のクローン化されたPfu DNAポリメラーゼ、+ / - PEF又は組換えP45 (rP45)。

プライマー F91-23 5' GAGGAGAGCAGGAAAGGTGGAAC 3' (配列番号 64)。

10

プライマー 5271-21 5' GCTGGGAGAAGACTTCACTGG 3' (配列番号 65)。

PCRサイクリング条件は次の通りであった：95 で1分 (1サイクル)、95 で1分 - 60 で1分 - 72 で10分 (30サイクル)。完結の後、反応を電気泳動ゲル上で試験し、そして反応生成物の量を当業界において知られている多くの方法のいずれかにより決定した。

### 3. 核酸複製増強活性についてのスクリーニングアッセイ

抽出物をまた、PEF活性を決定するために、いずれかの核酸複製反応に添加することができる。多くのそれらの反応、たとえばプライマー延長反応、DNA配列決定反応、特定部位の突然変異誘発反応、及び多くのPCRに基づく反応は、当業界において知られている (Ausubel, F. M., など. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Greens Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; Sambrook, J., など. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)。添加される生成物を含む核酸複製反応及び前記生成物を含まないその反応において生成される結果を比較することによって、PEFの存在を同定することができる。

20

#### 例 2. P. フリオサスからのPEFの精製

PCR増強活性が原性 (archael) 生物又は細菌源から検出されると、多量の精製されたPEFをカラムクロマトグラフィーにより得ることができる。次のプロトコールが、P. フリオサス (Pfu) からPEFを精製するために開発された。しかしながら、当業者は、他の細胞又は種が同様に使用され得ることを理解するであろう。

30

#### 1. 細胞増殖及び溶菌

P. フリオサスDSM3638細胞を、確立されたプロトコールに従って400lの発酵器において増殖せしめた。(引用により本明細書において特別に組込まれるアメリカ特許第5,545,552号)。細胞ペーストを、約20時間後 (A600 = 0.5)、Sharplesイン - ライン遠心分離機を用いて集め、そして次に、すぐに液体窒素において凍結し、そして - 80 で、使用まで貯蔵した。次に、500gの凍結細胞ペーストを、氷上の4lのステンレス鋼ビーターに移した。細胞を、50mMのトリス - HCl (pH8.2)、1mMのEDTA、10mMのB - メルカプトエタノール、0.5mMのPMSF及び2  $\mu$  g / mlのアプロチニンから成る2lの溶菌緩衝液により再懸濁した。細胞を、KのPSIでFronchプレスにおいて溶解し、そして次に、溶解物を10分間、音波処理した。音波処理の後、溶解物を400mlのボトルに移し、Sorvall GS3ローターを用いて、Sorvall RC - 2 B遠心分離機において9Krpmで1時間、回転せしめ、そして上清液を集めた。

40

#### 2. カラムクロマトグラフィーによる精製

上清液を、50mMのトリス - HCl (pH8.2)、1mMのEDTA及び10mMのB - メルカプトエタノールから成る緩衝液により予備平衡化された、10 x 5 cmのQ-Sepharose Fast Flow<sup>TM</sup> (Pharmacia) カラム (約392ml) 上に、5 ml / 分の流速で負荷した。カラムを2カラム体積の緩衝液により洗浄し、そして通過物及びカラム洗浄物を集め、そしてプールした。そのプールされた画分を、1NのHClを用いてpH7.5に調節した。

50

次に、Q - Sepharose通過物を、50mMのトリス - HCl (pH7.5) , 1 mMのEDTA , 1 mMのDTT , 10% ( v / v ) のグリセロール、0.1% ( v / v ) のIgepal CA-530及び0.1% ( v / v ) のTween 20から成る緩衝液により平衡化された、5 × 11.5cm ( 約225ml ) のSP Sepharose Big Bead™ ( Pharmacia ) カラム上に、5 ml / 分の流速で負荷した。カラムを、吸光度 ( OD<sub>280</sub> ) が基線に達するまで、平衡化緩衝液により洗浄した。カラムを、0 ~ 250mMのKCl ( 平衡化緩衝液における ) のグラジエント 2 l により溶出した。20mlの画分を集め、そしてアリコートをし、SDS - PAGE分析のために3番目の管ごとに取り除いた。

SDS - PAGEによる分析された画分のいくつかは、サンプルが電気泳動の前に加熱されなかった場合、250kD以上のバンドを示した ( 約300kD ) 。300kDのバンドを含む画分をプールし、そして2 × 4 lの緩衝液 A [ 50mMのトリス - HCl ( pH8.2 ) , 1 mMのEDTA , 1 mMのDTT , 10% ( v / v ) のグリセロール、0.1% ( v / v ) のIgepal CA - 630及び0.1% ( v / v ) のTween 20 ] に対して一晩、透析した。透析されたプールを、緩衝液 A により平衡化された2.6 × 29cm ( 約154ml ) のHeparin Sepharose CL - 6 B™ ( Pharmacia ) カラム上に、2 ml / 分の流速で負荷した。カラムを1 lの緩衝液 A により洗浄し、そして0 ~ 300mMのKCl / 緩衝液 A のグラジエント1.5 l により溶出した。10mlの画分を集め、そしてアリコートを、SDS - PAGE分析のために3番目の管ごとに取り除いた。300kDのバンドを含む画分をプールし、そして2 × 4 lの緩衝液 A に対して一晩、透析した。

ヘパリンセファローズ - 精製されたプールを、100mMのKClを含む緩衝液 A により平衡化された、1.6 × 95cm ( 約191ml ) のSephacryl S-200 High Resolution™ ( Pharmacia ) カラム上に、0.5 ml / 分の流速で負荷した。次に、2 mlの画分を集め、そしてアリコートをSDS - PAGE分析のために第3番目の管ごとに取り除いた。300kDのバンドを含む画分をプールし、そして50mMのトリス - HCl ( pH8.2 ) , 0.1 mMのEDTA , 1 mMのDTT , 50% ( v / v ) のグリセロール、0.1% ( v / v ) のIgepal CA - 630及び0.1% ( v / v ) のTween 20を含む緩衝液 1 l に対して一晩、透析した。精製されたタンパク質を - 20 °C で貯蔵した。上記精製プロトコールは、500 g の細胞ペーストから約 1 mgの比較的均質の P 300バンドを生成した。

### 3 . SDS - PAGEゲルからのPEFの精製

非均質サンプル中のPEFを、SDS - PAGEゲルスライスからの精製されたタンパク質を溶出し、そしてPCR増強活性について再スクリーニングすることによって同定することができる。この方法は、特定サンプルにおけるPEPタンパク質の数の急速な評価及びそれらの見掛け分子量の同定を可能にする。

PCR増強活性を有する P . フリオサスのタンパク質サンプルを、予備染色された分子量マーカーと共に、4 ~ 20%のアクリルアミド / 2.6%のビス - アクリルアミド トリス - グリシンゲル ( Novex ) 上で電気泳動した。サンプルは2 % SDSの存在下で負荷されたが、しかしPEF複合体の解離を防ぐために煮沸されなかった。ゲルを1 % SDSを含むトリス - グリシン緩衝液において走行せしめ、そして電気泳動の後、20mMのトリス - HCl ( pH8.0 ) / 1 mMのEDTAによりすばやく洗浄した。次に、2 ~ 3 mmのゲルスライスを、ガイドとしての予備染色された分子量マーカーを用いて、注目のレーンから切除した。個々のゲルスライスを、レーザー刃により切除し、そしてその断片を50 µ l の溶出緩衝液 ( 20mMのトリス - HCl ( pH8.0 ) / 1 mMのEDTA / 0.1%のTween-20 ) に移した。そのスラリーを72 °C で30分間インキュベートした。

PEFを含むゲルスライスを、PCR増強活性についてその溶出物を試験することによって同定した。次に、0.1 ng / µ l 以上のPEFを含む溶出物を、銀 - 染色されたSDS - PAGEゲル上で再分析し、有力なタンパク質成分の見掛け分子量を確かめた。ゲルスライス溶出物を、負荷の前、2 % SDSの存在下で煮沸し、そしてPEFタンパク質の見掛け分子量をタンパク質標準に対して決定した。本明細書に記載されるゲルスライス溶出方法は、1 ~ 10%の注目のタンパク質の回収を可能にする。

### 例 3 . P . フリオサス部分精製されたカラム画分におけるPCR増強活性の同定

ヘパリンセファローズクロマトグラフィー処理の後、集められた画分を、PCRスクリーニングアッセイ ( 例 1 ) を用いて、PEF活性について分析した。希釈されたヘパリンセファ

ローズ画分の添加は、クローン化されたPfu DNAポリメラーゼにより生成されるPCR生成物の収率を劇的に高めた。画分のPCR増強活性は、外因性DNA鋳型（図1）及びPfu DNAポリメラーゼ（図2）の存在に依存することが示された。従って、高められたPCR生成物収率は、汚染性DNA鋳型又は生来のPfu DNAポリメラーゼの存在に依存せず、むしろPEFの存在に依存した。

因子又は応答因子をさらに特徴づけるために、次のことを実施した。ヘパリンセファロースクロマトグラフィー処理の後のPEFを、上記例2において論じられたように、PCR増強活性についてSDS-PAGEゲル-精製されたサンプルをスクリーニングすることによって同定した。タンパク質サンプルが、予備煮沸しないで、SDS-PAGEゲル上に負荷される場合、PCR増強活性（図3）が、図4のゲルからの2つのゲルスライスにおいて回収された。1つのゲルスライス（ゲルスライス#1）を、42kDマーカーと60kDマーカーとの間の位置から切り出し、そして第2ゲルスライス（スライス#2）を、250kDのマーカーのすぐ上部の部位から回収した（図4）。

ゲルスライスから溶出されたタンパク質をまた、PCR増強活性が汚染性DNAポリメラーゼ活性に関係しなかったことを示すために、DNAポリメラーゼ活性についてスクリーンした（図5）。その結果は、PCR増強活性を有する、SDS-PAGE精製されたタンパク質が有意なDNAポリメラーゼ活性を欠いていることを示した。さらに、SDS-PAGE精製されたPfu DNAポリメラーゼは、ゲル精製されたPEFの濃度に相当するか又はそれ以上のタンパク質濃度で試験される場合、PCR増強活性を欠いている。

P・フリオサスPEFタンパク質が銀染色されたSDS-PAGEゲル上でPCR増強活性を有する再分析ゲル精製されたサンプルにより結論的に同定された。予備煮沸の不在下で、ゲルスライス#2における有力なバンドが、250kDの分子量マーカーよりも幾分遅く移動し、これは、ゲルスライスが回収される部位と一致する（図6）。このバンドは、P300又はPEF複合体と呼ばれる。さらに、マイナーなバンドが、P50と呼ばれる、50kDで明白である。ゲルスライス#1は、50kDで主要バンド及び45kDでマイナーなバンドを含んだ。

しかしながら、ゲルスライス#2から溶出されるタンパク質が、負荷の前、SDSにおいて煮沸される場合、有力な成分は、50kDの見掛け分子量を伴って移動する（図6）。約45kDのマイナーな又は不十分に染色する成分もまた見える。それらの結果は、300kDで別々のバンドとして移動する複合体を生成するためにSDSの存在下で低温で凝集する、50kD及び45kDの見掛け分子量を有する2種は個別のタンパク質から成るP・フリオサスPEFと一致する。

#### 例4 . PEF複合体及び前記複合体中のタンパク質成分の特徴化

S200クロマトグラフィー処理に続くP・フリオサスPEF画分は、タンパク質の混合物を含んで成る。SDS-PAGEにおける別々のバンドが、サンプルが、電気泳動の前、加熱されない場合、250kDのマーカー以上に移動する。このタンパク質は、P300又はPEF複合体と呼ばれる。前記条件がPEF複合体が実質的に解離するよう変えられる場合、PEF複合体のサブユニットタンパク質成分がSDS-PAGEに可視化される。

##### 1 . PEF複合体の温度 - 依存性解離

PEF複合体をその成分タンパク質に解離する1つの方法は、熱処理である。加熱の不在下で、PEFの大部分は複合体として移動し、250kDの分子量マーカーよりもわずかに遅く移動する。解離されたP50及びP45のマイナーな量が加熱されていないサンプルに見える。しかしながら、約85 又はそれ以上の温度での熱処理の後、PEF複合体は、SDS-PAGEにより300kDバンドの不在により示されるように、完全に解離される。銀染色により可視化されるように、PEF複合体の有力なタンパク質成分は、SDS-PAGEにおいて約50kDの見掛け分子量を示す。P50バンドは図7のゲルに示されており、ここでタンパク質は、負荷の前、2%のSDS及びBMEの存在下で85 以上に加熱されている。さらに、ゲル-精製されたPEF複合体に存在することが示されているP45タンパク質（図6）はまた、熱処理され、S200-精製されたPEFサンプルにおいても明らかである（図7）。さらに、約37, 42, 55, 60, 85, 100及び150kDの見掛け分子量を有するマイナーな成分がまた、85~100 の温度で処理されたPEF複合体のSDS-PAGE分析において検出される。それらのマイナー成分は、熱

10

20

30

40

50

処理により生成される P 50及び P 45の追加の形（たとえば、ダイマー、トリマー、フラグメント）、又はマイナーな無関係な種を表わすことができる。

## 2 . PEF複合体、及び成分タンパク質及び混合物のポリメラーゼ増強活性

S 200 - 精製されたPEFのタンパク質成分を、SDS - PAGEにより精製し、そしてPCR増強力価を、クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR反応と共にPCR反応に個々のゲルスライス溶出物の一連の希釈溶液を添加することによって決定した。最高レベルのポリメラーゼ増強活性を示したタンパク質又はタンパク質混合物を、銀染色されたSDS - PAGEゲル上での溶出物の移動により同定した。SDS - PAGEゲルスライス溶出物の分析は、S 200 - 精製された P . フリオサスPEFのPCR増強活性が45kDの種及び50kDの種に単独で帰因することを示す。S 200 - 精製された調製物が加熱の不在下で負荷される場合（図 7、調製物 1 ）、PCR増強活性は、250kDのマーカのすぐ上部で及び42kDのマーカと60kDのマーカとの間で回収されたゲルスライスに存在した。負荷の前、85 に加熱される場合、PCR増強活性は、42kDのマーカと60kDのマーカとの間に移動した（図 8 ）。

タイトレーション実験は、42kD ~ 60kDの見掛け質量を伴って移動するゲル精製されたタンパク質のPCR増強力価は、ゲル - 精製されたPEF複合体（300kDのバンド）の力価と有意に異ならなかったことを示した。148及び60kDマーカ間を移動するPCR増強活性のレベルは無意味であり、それにより、85kD、100kD及び150kDのバンドがPEF複合体（P 300）の十分なPCR増強活性に実質的に帰因しないことを示す。さらに、それらの成分は、PEFの活性をさらに増強するようには見えない。

図 9 は、2 種の加熱処理されたPEFサンプルからの42及び64kDマーカ間の 4 種のゲルスライスから回収されたタンパク質を示す。最高のPCR増強は、レーン 5 , 9 及び10において移動したタンパク質サンプルに関して観察された。それらのレーンは、最高量の P 45、さらに、低いが、しかし検出できる量の P 50を含んだ。レーン 4 において移動したタンパク質（22では、P 50のみが見える）は、レーン 5 におけるタンパク質混合物（同じ量の P 50及び P 45）よりも低い力価を示したので、相対的な P 50濃度は、最高のPCR増強力価と必ずしも相互関係しなかった。さらに、レーン 9 及び10におけるサンプルは、同様に高いPCR増強力価及び P 45レベルを示したが、しかしレーン 9 におけるサンプルはレーン10におけるサンプルよりも10 ~ 1000倍以上の P 50を含んだ。それらの結果は、PEF複合体の最も活性的な成分である P 45と一致する。ゲル精製された、単離された P 45のすべてのサンプルは種々の濃度の P 50を含むので、十分なPEF活性又は安定性を達成する上で、低濃度の P 50が有する正確な生物学的役割は、この方法によっては決定され得なかった。

## 例 5 . PEF複合体、及び P 50及び P 45成分のアミノ酸分析

Pfuからの複合体、及び主たる50kD成分（P 50）及び45kD成分（P 45）の N - 末端の配列を決定した。さらに、N - 末端配列分析は、加熱解離に基づいて分析されたマイナーな100及び150kD成分に対して行なわれた。次の2種の分析を実施した。第1の研究においては、ヘパリンセファロース - 精製されたPEFサンプル（約20%の均質性；図10における調製物 4 ）を電気泳動し、そしてPDVFフィルター上に電気プロットした。サンプルを、室温で又は熱処理の後、4 ~ 20%のSDS - PAGEゲル上に負荷し、50kDのタンパク質及び250kD以上の複合体の両者の回収を可能にした（図11）。プロットを、分析のためにWistar Sequencing Facility（Philadelphia, PA）に送った。N - 末端配列分析を、50kDのタンパク質（P 50）（加熱されたSDS - PAGEサンプル）及び250kD以上のPEF複合体（加熱されていないSDS - PAGEサンプル）の両者に対して実施した。

PEF複合体（P 300）及び50kD成分（Pfu P 50）の N - 末端アミノ酸配列は、実質的に同一であることが見出された（表 A ）。このデータは、Pfu P 50がPEF複合体の有力な成分であることを確認した。2種の明確な配列が P 300及び P 50の両者（1 ° 及び 2 ° ）に見出され、このことは、Pfu PEFが同時移動する2種の異なった50kD種を含み、又は50kD種を含むPVDFストリップが45kD種又はSDS - PAGEにより見える他の種により汚染されたことを示唆する。

N - 末端配列決定の他に、50kDのタンパク質をまた、現場トリプシン消化及び微小内腔（microbore）逆HPLCにかけた。サブセットのトリプシン分解ペプチドを、質量分析計によ

10

20

30

40

50

り分析した。単一の質量を有する2種のペプチド(#107, #112)及び2つの質量を有する1つのペプチド(#108)を、配列分析のために選択した。Pfu P50からの2つの内部ペプチド配列を回収した(表A;トリプシン分解ペプチド)。ペプチド#112は24個の長さのアミノ酸であり、そしてエドマン配列の計算された質量(2530.8)は、観察されたペプチド質量(2531.7)と非常に良好に一致した。ペプチド#107及び#108は、エドマン配列決定のみによっては区別され得ない複数の配列を含んだ。しかしながら、それらのペプチド画分は、微小内腔HPLC上で、非常に接近して一緒に溶出し、そして通常、いくつかの残基を含んだ。共有された配列及び質量分析に基づいて、仮の配列を割り当てた(107/108;表A)。

### 表A - 分析1.

10

### N - 末端配列

ペプチド	質量 (Da)	配列 / (配列番号 : )
サンプル	観察	
PEF 複合体	=50,000	1° <u>X</u> LLHH VKLIY ATXXR (1) 2° XXXPD WXXRX EXLXX (2)
P50	=50,000	1° MLLHH VKLIY ATKSR (3) RLVGK <u>K</u> IVLA IPGXI <u>AAVEP</u> 2° XXXPD WXXRX EXLGE <u>KFY</u> (4)

20

### トリプシンペプチド

ペプチド	質量 (Da)	配列 / (配列番号 : )
------	---------	----------------

### 注解

	観察	計算	
107	1389.59	N/A	
複数の配列	108	1659.1, 1910.63	N/A
	107/108	1910.3	KYDAV IMAAA VVDFR PK (5)
	107/108 に共通するAA (アミノ酸)		
112	2531.73	2530.8	ADLVV GNTLE AFGSE (6) ENQVV LIGR

30

“ X ” はいづれかのアミノ酸を表わす。

下線の残基は、欠失され得るか又はいづれかのアミノ酸により置換され得るが、しかし示されるように試験的に割り当てられたアミノ酸を表わす。

Pfu P50のN - 末端から回収された35個のアミノ酸配列(配列番号3)、及び17及び24個のアミノ酸の2種の内部ペプチド(配列番号5及び6)は、50kDの見掛け分子量及び約454個の長さのアミノ酸を仮定すれば、Pfu P50の全アミノ酸配列の約16%を表わす。

40

第2の分析においては、150, 100, 50, 45及び42kD種のN - 末端配列を、加熱されたS200 - 精製されたPEFのPVDFプロットから決定した(図12及び表B)。この分析は、Beckman Research Institute of the City of Hope (Duarte, CA)により行なわれた。150及び100kD種のN - 末端配列は、50kDバンドにおける主要配列と同じであり、且つ同一であり(N - 末端での不明瞭性を除く)、そして45kDのバンドにおけるマイナーな配列に類似した。さらに、配列は、Wistar配列分析により決定されるPEF複合体及び50kDバンドにおける主要配列にひじょうに類似した。データは、50kD種の他の形(たとえば、ダイマー、トリマー、又は凝集体)である150及び100kD種と一致した。45kDバンドの主要N - 末端配列(2プロットセクションが分析された; “上方”及び“下方”)は、P50配列とは異なり、そ

50

してWistar及びBeckmanの両者により分析された50kDバンド及びWistarにより分析されたPEF複合体に見出されるマイナー配列にひじょうに類似した。N - 末端配列は、42kD種に関しては回収されなかった。全体的に、それらのデータは、2種の異なったタンパク質成分、すなわちP50及びP45から成るPEF複合体と一致した。

### 表 B - 分析 2 .

タンパク質サンプル	配列	
(配列番号)		
(MW)		10
150kD	(GAM)LHHV KLIYA <u>T</u> KLRK (7)	
100kD	(GAM)LHHV KLIYA TK( <u>KL</u> )RK (8)	
50	1° M LHHV KLIYA TKL (9)	
	2° <u>GL</u> ( <u>KL</u> )PD W( <u>WK</u> )( <u>KF</u> )RK EES (10)	
45 (上方)	1° ( <u>GAI</u> )LLPD WKIRK EILIE (11)	
	2° XMHH(VI) KLXYA TXSRK (12)	
45 (下方)	1° M(LY) (LV) (RP)D WKRRK EILIE (13)	
42	配列なし	20
“ X ” はいづれかのアミノ酸を表わし ;		
下線の残基は、いづれかのアミノ酸に置換され得るが、しかし示されるように割り当てられたアミノ酸を表わし ;		
括弧内のアミノ酸は、包含されるアミノ酸の1つがその部位で存在することを示す。		
コンピューター読み取り媒体に記憶される配列情報を用いて、当業者はコンピューター - 実施される相同性調査を実施することができる。非冗長性Gen Bank (DS翻訳 + PPB + Swiss Prot + SPupolate + PIRタンパク質データベースは、BLASTpを用いれば、Pfu P50及びP45の一部のアミノ酸配列がそれらのデータベースにおけるいづれのタンパク質に対しても同一性を示さないことを示した。		
<u>例 6 . P50のヌクレオチド及び予測されるアミノ酸配列</u>		
P50タンパク質成分のヌクレオチド配列を、標準の技法を用いて、Pfu P50をクローニングすることによって得た。		
1 . <u>ライブラリーのスクリーニング</u>		
ピロコーカス・フリオサスのゲノムライブラリーを、プレート当たり約2000プラークの密度でXL1 - Blue MRF E . コリ上にプレートした。Duraloseフィルター (ナイロン裏材上、ニトロセルロース) が、個々のプレートから複製物リストを取るために使用された。第1フィルターがプレート上に存在する間、位置づけマーカートを、針をフィルターを通し、そしてプレート中に突き刺すことによって製造した。その位置づけマーカートを、フィルターが除去される前、プレートの裏上をペンでしるしを付けた。フィルターリフトを次の通りにして処理した :		
1 . 5 ~ 2 . 0分	1 . 5 M の NaCl , 0 . 5 M の NaOH	40
2分	0 . 5 M の トリス ( pH8 . 0 ) , 1 . 5 M の NaCl	
30秒	2 × SSC , 0 . 2 M の トリス ( pH7 . 5 )	
処理の後、フィルターを、それらがまだ湿気がある状態まで、部分的に乾燥せしめたが、しかし定常水は見えなかった。フィルター上のDNAを、“ Antolink形式に設置されたStratalinkerによるUV架橋により固定した。		
フィルターを、次の成分の溶液15mlにおいてプレハイブリダイズした :		
5 × SSC ,		
40mMのNaPO <sub>4</sub> ( pH6 . 5 )		
5 × Denhardt ' s		
		50

5% 硫酸デキストラン

50% ホルムアミド

0.1mg/mlのサケ精子DNA(別々に煮沸し、そして使用の直前に添加された)。

プレハイブリダイゼーションを約2時間、42℃で実施した。

プローブを、次の縮重プライマーによりPfuゲノムDNAから増幅された900bpのPCR生成物から成した:

オリゴペプチド # 50:           CAT CAT GAA AAA CTA ATT TAC GC  
                                  C    C    C    G T C  
  T            T            (配列番号: 14)

オリゴペプチド # 61:           GC CAT AAT TAC TGC ATC GTA TTT           10  
                                  G    C    G    G  
                                  T    G    A            (配列番号: 15)  
  A

オリゴペプチド # 50を、P 50のN - 末端で、配列番号11におけるHHVKLIYA(配列番号66)をコードするDNAにハイブリダイズするよう企画し、そしてオリゴペプチド # 61を、配列番号5におけるペプチドKYDAVIMA(配列番号67)をコードするアンチセンスDNA鎖にハイブリダイズするよう企画した。

PCR生成物を、遊離プライマー、緩衝液及びヌクレオチドから精製し、そしてその50ngを、Stratagene Drime-it II Random Primer Labellingキットを用いて、<sup>32</sup>P - dATPによりラベルした。プローブを、5分間、煮沸する前、遊離ヌクレオチドから精製し、そして  
20 プレハイブリダイゼーション反応に添加した。全プローブを、80,000,000cpmであるよう大まかに計算した。

ハイブリダイゼーションを、ハイブリダイゼーション溶液が除去される前、42℃で一晩、続け、そしてフィルターを、0.1×SSC, 0.1%SDSにより60℃(緊縮条件)で4度洗浄した。

フィルターをX - 線フィルムに一時、照射し、そして両複製物フィルター上で強いシグナルを有する20個のプライマー単離物を採取した。

6個の主要単離物を希釈し、プレートし、そして上記と同じ方法を用いて再びスクリーンした。6個のうち、3個のフィルターが単離されるクローンを生成した。クローンを、縮重プライマーを用いてPCR増幅により確かめた。すべてのクローンは、プローブとして  
30 使用されたオリゴペプチド # 50及び # 51により900bpの増幅された生成物を生成することができた。オリゴペプチド # 54を、配列番号1におけるHHVKLIYA(配列番号66)ペプチドをコードするDNAにハイブリダイズするよう企画し、そしてオリゴペプチド # 58を、配列番号6のEENQVVL(配列番号68)ペプチドをコードするアンチセンスDNA鎖にハイブリダイズするよう企画した。クローン6Dのみが、900bpの増幅された生成物を生成した。

オリゴペプチド # 54:           CAT CAT GAA AAA CTA ATA TAC GC  
                                  C    C    C    G T C  
  T            T            (配列番号16)

オリゴペプチド # 58:           AG TAC TAC TTG ATT TTC TTC           40  
                                  A G    G    C    G  
                                  A    A            (配列番号17)

Bluescriptプラスミドを、SOLR細胞におけるクローンから切除し、そして挿入体の存在を、1200×は900bpの生成物のPCR増幅により再び確かめた。

## 2. DNA配列決定

配列決定を、精製されたPCR生成物及び切除された細胞から製造されたプラスミドmin - pncpsに対して実施した。ヌクレオチド配列は、予測されるタンパク質翻訳と共に下記に列挙される。プローブを生成するために使用されるペプチド配列は、下線により示される。

“ N ” はいづれかの塩基を表わし、そして“ X ” はいづれかのアミノ酸を表わす。

(配列番号18)



ATGCTTCACCACGTCAAGCTAATCTACGCCACAAAAGTCGAAAGCTAGT  
 TGAAAAAAGATAGTCNNNNNNNNCCAGGGAGTATTGCGGCTTTGGATG  
 TGAAAGCTTGTGAGGGACTAATTAGGCATGGGGCCGAAGTTCATGCAGTG  
 ATGAGTGAGGCAGCCACCAAGATAATTCATCCTTATGCATGGAATTTGCC  
 CACGGGAAATCCAGTCATAACTGAGATCACTGGATTTATCGAGCATGTTG  
 AGTTAGCAGGGGAACATGAGAATAAAGCAGATTTAATTTTGGTTTGTCTT  
 GCCACTGCCAACACAATTAGTAAGATTGCATGTGGAATAGATGATACTCC  
 AGTAACTACAGTCGTGACCACAGCATTTCACACATTCCAATTATGATAG  
 CCCCAGCAATGCATGAGACAATGTACAGGCATCCCATAGTAAGGGAGAAC  
 ATTGAAAGGTTAAAGAAGCTTGGCGTTGAGTTTATAGGACCAAGAATTGA  
 GGAGGGAAAGGCAAAAGTTGCAAGCATTGATGAAATAGTTTACAGAGTTA  
 TAAAAAGCTCCACAAAAAACATTGGAAGGGAAGAGAGTCCTAGTAACG  
 GCGGGAGCAACAAGAGAGTACATAGATCCAATAAGATTTCATAACAAATGC  
 CAGCAGTGGAAAAATGGGAGTAGCGTTGGCTGAAGAAGCAGATTTTAGAG  
 GAGCTGTTACCTCATAAGAACAAAGGGAAAGTGTAAAGGCTTTTAGAATC  
 AGAAAAATCAAATTGAAGGTTGAGACAGTGAAGAAATGCTTTCAGCGAT  
 TGAAAATGAGTTGAGGAGTAAAAAGTATGACGTAGTTATTATGGCAGCTG  
 CTGTAAGCGATTTTAGGCCAAAAATTAAGCAGAGGGAAAAATTAAGC  
 GGAAGATCAATAACGATAGAGCTCGTTCCNNNNAATCCCAAATCATTGA  
 TAGAATAAAGGAAATCAACCAAATGTCTTCTTGTGGATTTAAGCAG  
 AAATTCAAAAGAAAAGCTTATAGAAGAAGGTAAAAGGCAGATTGAGAGG  
 GCCAAGGCTGACTTAGTCGTTGGTAACACATTGGAAGCCTTTGGAAGCGA  
 GGAAAACCAAGTAGTATTAATTGGCAGAGATTTACAAAAGAACTTCCAA  
 AATGAAAAGAGAGAGTTAGCAGAGAGAATTTGGGATGAGATAGAGAAA  
 TTNCTGTCC

10

20

ピロコーカス・フリオサス P50の予測されるアミノ酸配列：

(配列番号19)

MLHHVKLIYATKSRKLVGKKIVXXXPGSIAALDVKACEGLIRHGAEVHAV  
 MSEATKI IHPYAWNLP TGNPVI TEITGFIEHVELAGEHENKADLILVCP  
 ATANTISKIACGIDDPVTTVVTTAFPHIPI MIAPAMHETMYRHP I VREN  
 IERLKKLGVEFIGPRIEEGKAKVASIDEIVYRVIKKLHKKTLEGKRVLVT  
 AGATREYIDPIRFITNASSGKMGVALAEEDFRGAVTLIRTKGSVKAFRI  
 RKIKLVETVEEMLSAIENELRSKKYDVVIMAAAVSDFRPKIKAEGKIKS  
 GRSITIELVPXNPKIIDRIKEIQPNVFLVGFKAETSKEKLIIEGKRQIER  
AKADLVVGNTLEAFGSEENQVVLIGRDFTELKELPKMKKRELAERIWDEIEK  
 XLS

30

化学的に決定されたN - 末端配列に対応する翻訳された配列 (配列番号3) :

MLHHVKLIYATKSRKLVGKKIVXXXPGSIAA

(配列番号46)

化学的に決定された内部ペプチド配列に対応する翻訳された配列 (配列番号5及び6) :

KYDVVIMAAAVSDFRPK

(配列番号47)

ADLVVGNTLEAFGSEENQVVLIGR

(配列番号48)

タンパク質は、6.36の理論的pI及び44801.29の理論的MWを有する。

P50の化学的に決定されたアミノ酸配列と、P.フリオサスP50ゲノムクローンに由来するアミノ酸配列との間に不一致が存在する。当業者は、このタイプの不一致のための多くの理由を知っている。たとえば、下記不一致は、大部分、使用される方法に共通する既知の限界により説明され得る。それらの限界は、タンパク質又は核酸の構造知識を制限するように作用しない。代わりに、それらは単に、限定された数によるアミノ酸又は核酸の配列中の可能な変動を示す。

40

不一致及び説明のいくつかは下記の通りである：

MLLHHVKLIYA TKSRK LVGKK IVLAI PGXIA AVEP (表 A ; 配列番号 1 及び 3 )

MLHHV KLIYA TKL

(表 B ; 配列番号 9 )

MLHHV KLIYA TKSRK LVGKK IVLAI PGSIA ALDV (配列番号 19 からの予測される配列)

サイクル 2 での表 A 配列における不一致 (アミノ酸 1 とアミノ酸 2 との間の余分なアミノ酸) は、P 45 による汚染のためであり、これは位置 2 及び 3 で L を有すると思われる。さらに、配列番号 1 におけるサイクル 2 での L は、仮に割り当てられた。表 A の配列と予測される配列との間の不一致は、AA15 ( R 対 K ) 及び AA32 - 34 ( VEP 対 LDV ) で生じる。

表 B の配列と予測される配列との間の不一致は、AA13 で見出された。S の代わりに L とした AA13 の同定は、化学的配列決定における S の良好でない回収、及びその位置で L を有する、低い量の P 45 による P 50 の汚染により説明される。

ADLVV GNTLE AFGSE ENQVV LIGR (表 A ; 配列番号 6 )  
 ADLVV GNTLE AFGSE ENQVV LIGR (配列番号 19 からの予測される配列)  
 KYDAV IMAAA VVDFR PK (表 A ; 配列番号 5 )  
 KYDVV IMAAA VSDFR PK (配列番号 19 からの予測される配列)

P 50 トリプシンペプチドから化学的に決定された配列番号 6 は、P 50 DNA 配列から翻訳された 24AA 配列と同一であった。配列番号 5 に関しては、化学的配列と DNA 配列との間に 2 つの不一致が見出された。A が V の代わりにサイクル 4 で回収され、そして V が S の代わりにサイクル 12 で回収された。それらの不一致は、絶対的には純粋でないサンプルからの配列の解釈に関連する困難性のためであり得る。

例 7 . P 50 に関連するタンパク質の同定 : E . コリDFPフラビントタンパク質に対する類似性

1 . 原生生物 (archaeal) 及び細菌タンパク質に対する Pfu P 50 タンパク質の DNA 配列類似性

P 50 クローンの DNA 配列は、フラビントタンパク質、すなわち DNA 合成及びパントテン酸代謝において役割を演じるような E . コリにおいて同定されるタンパク質に対して非常に強い相同性を示す (Spitzer and Weiss , J . Bacteriol . 164 : 994-1003 ( 1985 ) 及び Spitzer , Jimenz-Billini , and Weiss , J . Bacteriol . 170 : 872-876 ( 1988 ) ) 。DFP は DNA 複製のための必須遺伝子であることが見出されているが、それらの著者は、DNA 複製におけるその役割を解明できていない。表 1 ( N - 末端 1 ° 配列、トリプシンペプチド 107 / 108 及び 112 ) における配列が、DFP に対して非常に高い類似性を示す翻訳された P 50 クローンにおいてすべて見出される。従って、P 50 アミノ酸及び DNA 配列情報は、他の源、たとえば細菌、真核生物及び原生生物からの PEF 複合体に関連するタンパク質を同定するために使用され得る。

メタノコーカス・ジャナスキ (Methanococcus jannaschii) (Mja) 及び E . コリdfp タンパク質のアミノ酸配列は、タンパク質の dfp ファミリーのメンバーとしての P 50 (Pfu) と称するタンパク質の同定を支持する。3 種のタンパク質配列が Clustal W1 . 6 を用いて比較され、そしてその比較データは下記に示される。

1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
	-----HLHH	VKLIYATKSRKLVGK	KIVXXPGSIAALDV	-KACEGLIRHGAEVH	AVHSEAAIKIHFYA	WNLFTGNPVIITEITG					78
	-----MISEIHP	TKLLGKSKLLENK	KILVAVTSSIAAIEI	PKLRELIHRGAEVY	CIITEETKIIIGKEA	LKFGCCNEVFEETG					83
	-----MKAROOKYCDKIANF	WCHFTGKIIMSLAGK	KIVLGVSGSIAAVKT	PELVRLRDRGADV	VANTEAAKAFITPLS	LOAVSGYVPSDSLDD					90
	Page 2.1										
	1	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166
	-----FIEHVELAGE	HENKADLILVCPATA	NTIISKIACGIDOTPV	ITVVTAFPHIPIMI	APAMHETHYRHPIVR	ENIERLK-KLGVFEFI					180
	2	-----DIEHILLY--	--RECDCLLIYPATA	NIISKINLGLADNIV	NTTALMFFGKPIFI	VPAMHENMFM--AIK	RHIDKLEKDKTYI				162
	3	-----PAAEAARHGHIELG--	--KPADLVILAPATA	DLIARVAAGHANDLV	STICLATP--APVAV	LPAHQOQYRAAATO	HNLEVLA-SRGLLIW				173
	Page 3.1										
	1	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256
	-----GPRIEE--	-----GKA	KVASIDEIVYRVIKK	LHKKTLE-GKRVLT	AGATREYIDPIRFFIT	NASSGKHGVALAEFA	DFRGAVTLIRTKGSV				270
	2	-----SPKTEE--	-----GKA	KVANIEDVYKAVIEK	IGNNLKKEGNRVLIL	NGGTVEFIDKVRVIS	NLSSGKHGVALAEFA	CRKGFYVEVITAMGL			245
	3	-----GPDSSGOACGDIGPG	RXXDPLTIIVDMAVAH	FSPVNDLKHNLNINHT	AGPTREPLDPVRYIS	NHSSGKHGFALAAAA	ARRGANVTLVSGPVS				246
	Page 4.1										
	1	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346
	-----KAFRIKIKIKVETV	EEHLSAIENELRSKK	YOVVIMAAVSDFRP	KIKAEKIKSGRS--	--ITIELVXPKII	DRIKEIOPN-VFLVG					360
	2	-----EPPYIIRKHKVLTAK	EMLNKAE--L-AKD	FDIISSAALSDFTV	ES-FEGKLSSEE--	--LJLKLKR-NPKVL	EELRRIYKD-KVIIG				330
	3	-----LPTPPFVRRVDVMTA	LEHEAAVN--ASVOQ	ONIFIGCAAVADYRA	ATVAPEKIXKOATOG	DELTIKIVK-NPDI	AGVAALKDRHPYVVG				326
	Page 5.1										
	1	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436
	-----FKAETSK-EK-LIEE	GKROIERNKADLVYG	NTL----EAFGSEEN	QVVLIGRDFTKELPK	MKRELAERIWEIE	KXLS-----					450
	2	-----FKAEYNLDEKELINR	AKERLNKYNLNMIIA	NDLSK--HYFGDDYI	EYIITKYEVEKISG	SKK-EISERIVEKVK	KLKVS-----				403
	3	-----FAAETINN-----	VEEY	AROKRIRKQILDICA	NDVSPQTOGFNSDNN	ALHLFWQDGDVKVLP	ERKELLGOLLDEIV	TRYDEKVR			403
											430

上記比較から、他の種からの関連するタンパク質が当業界において知られている方法により同定され、そして単離され得ることが当業者に明らかであろう。上記例は、緊縮スクリーニング条件を使用した。当業界において知られているような、ハイブリダイゼーション又は洗浄の間、塩の濃度、界面活性剤又は温度を変えるより少ない緊縮条件が、多くの種のいずれかの配列を含むライブラリーから関連するクローンを誘導する。たとえば、上記条件の他に、次のハイブリダイゼーション条件が、P50又はP45配列に関連するDNA配列を単離するための方法において、いずれか組合して使用され得る：

約0.45MのNaCl、約0.045Mのクエン酸三ナトリウム、及び約0.1%のSDSを含んで成る溶液による約37 ~ 42 での低い緊縮性洗浄；

約0.75MのNaCl、約0.15Mのトリス、約10mMのピロリン酸ナトリウム、約0.075Mのク

10  
20  
30  
40  
50

エン酸三リン酸、及び約50%ホルムアミドを含んで成るハイブリダイゼーション緩衝液；  
 約5 × SSC、約5 × Denhardt's、約5%硫酸デキストラン、約50%ホルムアミド及び約0  
 .1mg/mlのssDNAを含んで成るハイブリダイゼーション緩衝液；  
 約0.1Mのリン酸塩、約0.1 × SET、約0.1%のピロリン酸ナトリウム、及び約0.1%SDS  
 を含んで成る溶液による約45 でのハイブリダイゼーション洗浄。

## 2. 精製されたP. フリオサスPEF複合体の吸光度スペクトル

精製されたP. フリオサスPEF複合体の吸光度スペクトルは、370及び450nmで2種の吸光  
 度ピークを示す。図13は、S-200精製されたP. フリオサスPEFの吸光度スペクトルを示  
 す。それらのデータは、少なくとも1つのフラビンタンパク質を含んで成るPEF複合体を  
 示し、且つその複合体と一致する。配列決定データはまた、E. コリDFPタンパク質の相  
 同体としてのP. フリオサスP50の同定を確かめる。E. コリDFPは非共有的に関連するF  
 MN成分を含むフラビンタンパク質である。

この点まで、フラビンタンパク質は、複製機構の一部として、直接的には包含されていな  
 い。PCR増強におけるフラビンタンパク質の可能性ある包含は、レドックス反応のための  
 役割を示す。DNA合成に關与する唯一のレドックス反応は、リボヌクレオチドニリン酸レ  
 ダクターゼにより触媒される、リボヌクレオチドからのデオキシリボヌクレオチドの形成  
 である。インピトロにおいて、リボヌクレオチドニリン酸レダクターゼ酵素は、FAD-含  
 有オキシレダクターゼを包含する2種の既知の経路を通してNADPHに結合され得る (Pig  
 iet and Conley, J. Biol. Chem. 252: 6367-72 (1997); Thelander and Reichard, Ann  
 . Rev. Biochem, 48: 133-158 (1979))。1つの経路は、チオレドキシシン及びチオレド  
 キシンレダクターゼを包含する。興味あることには、E. コリ チオレドキシシンは補助タ  
 ンパク質として作用し、そしてT7DNAポリメラーゼに対して処理性を付与することが示  
 されている。PCR増強におけるフラビンタンパク質の可能性ある役割のためのもう1つの  
 仮説は、フラビンタンパク質が核酸複製のために必要とされる他のタンパク質又は補因子  
 の連続したプロセッシング又は活性化のために必要とされることである。

## 例8. P45のヌクレオチド及びアミノ酸配列

Pfu P45タンパク質成分のヌクレオチド配列を下記のようにして得た。

### 1. P45配列の合成

精製されたP45タンパク質のアミノ末端ペプチド配列決定は、配列番号11のPDWKIRKE (配  
 列番号69) ペプチドをコードするDNAにハイブリダイズするよう企画された次のような4  
 種の変性オリゴヌクレオチドの生成を可能にする：

#743: CCA GAC TGG AAA ATA AGG AAA GA (配列番号32)

T G TGG

C

T

#744: CCA GAC TGG AAA ATA AGA AAA GA (配列番号33)

T G TGG

C

T

#745: CCA GAC TGG AAA ATA AGG AAG GA (配列番号34)

T G TGG

C

T

#746: CCA GAC TGG AAA ATA AGA AAG GA (配列番号35)

T G TGG

C

T

ファージ P. フリオサスのゲノムライブラリーを、P45配列のPCR増幅のための鋳型  
 として使用した。前記4種の変性オリゴヌクレオチドを、ベクターのゲノム挿入を境界  
 に有するプライマー (-20プライマー及び逆方向プライマー) の1つと組合して、1つの  
 方向に鋳型をプライムするために別々の反応において使用した。PCR反応は、下記に特定  
 されるような成分を用いて実施された：

10 µ l の10 × Stratageneクローン化Pfu緩衝液；

10

20

30

40

50

5  $\mu$  l の変性 P 45 プライマー ( # 743 , 744 , 745 又は 746 のいずれか ) ( 100ng /  $\mu$  l ) ;  
 2.0  $\mu$  l の逆方向プライマー又は - 20 プライマー ( 100ng /  $\mu$  l ) ;  
 0.8  $\mu$  l の 100mM の dNT ( 全 dNTP ) ;  
 0.5  $\mu$  l の Taq DNA ポリメラーゼ ( Stratagene , 5 U /  $\mu$  l ) ;  
 0.5  $\mu$  l の Taq 延長剤 ( Stratagene , 5 U /  $\mu$  l ) ;  
 3.0  $\mu$  l の Pfu ゲノムライブラリー ( 約  $1.2 \times 10^{10}$  個のプラーク形成単位 / ml ) ;  
 78.2  $\mu$  l の H<sub>2</sub>O。

PCR サイクルを次のようにして、RoboGradient 温度サイクラーにおいて実施した : 95 で 3 分間の 1 サイクル、約 72 , 95 で 1 分間 ; 51 ~ 65 のグラジエントで 2 分間 ; 72 で 6 分間の 30 サイクル。

PCR 生成物を、1 % アガロース、1  $\times$  TBE - ゲル上で分離した。すべてのプライマーの組合せが、複数のバンドを生成した。4 種のバンドのパターンが、- 20 プライマーと共に、プライマー 743 , 744 及び 746 と一致しているように見えた。- 20 プライマーと共に 4 種のバンドパターンと一致して形成される 3 種の変性プライマーが、56 でそのパターンを生成できた。プライマー 743 のみが 58 でパターンを生じさせることができた。逆方向プライマーと組合して変性プライマーにより生成されるバンドパターンは、ほとんど明確ではなく、そして - 20 プライマーにより生成される生成物よりも低いアニーリング温度でのみ形成された。

## 2. クローニング方法

2 種の方法が、P 45 クローンを単離するために使用された。1 つの方法は、オリジナルの 20 高い複合体のライブラリーの単純化された副 - ライブラリーを製造し、そして - 20 及び 74 3 プライマーにより挿入体をスクリーンすることであった。陽性の副 - ライブラリーを希釈し、そして適切な挿入体を含む個々のプラークが同定されるまで再スクリーニングすることができる。他の技法は、DNA フラグメントの一端のみの配列が知られている場合、PCR 増幅を可能にする、Vectorette™ 技法 ( Genosys Biotechnologies ) を使用することであった。Vectorette システムにおいては、ゲノム DNA を、特定の制限エンドヌクレアーゼの選択により消化する。消化の後、ゲノム DNA の末端を、ゲノム DNA 消化と同じ付着端を有する特定の Vectorette 単位に連結した。連結された Vectorette 単位は、供給される Vectorette PCR プライマーに対して相補的な配列を含む ( Arnold and Hodgson , PCR Methods and Applications 1 : 39-42 ( 1991 ) ) 。

## 3. Vectorette 反応

100ng の P . フリオサスのゲノム DNA を含む反応物 50  $\mu$  l を、37 で 1 時間、推薦される緩衝液において、EcoRI , HindIII 及び Bsp1061 ( CluI のためのイソシゾマー ) により消化した。いずれの反応後の処理もなしに、1  $\mu$  l の適切な Vectorette 単位 ( 3 p モル /  $\mu$  l での HindIII , ( ClaI 又は EcoRI ) を、10mM の ATP 6  $\mu$  l , 100mM の DTT 1  $\mu$  l 及び 1 単位の T 4 DNA リガーゼ ( Stratagene 4 U /  $\mu$  l ) と共に添加した。反応を次の温度で循環した : 20 で 60 分間、続いて 37 で 30 分間、3 サイクル。

連結された DNA を、次のような成分を用いて増幅した :

10  $\mu$  l のクローン化された 10  $\times$  Stratagene Pfu 緩衝液 ;  
 変性 P 45 プライマー - 8.3  $\mu$  l ( 100ng /  $\mu$  l ) ;  
 50 P モル /  $\mu$  l の Vectorette プライマー - 2.0  $\mu$  l ;  
 100mM ( 全体 ) dNTP 0.8  $\mu$  l ;  
 0.5  $\mu$  l の Taq DNA ポリメラーゼ ( Stratagene , 5 U /  $\mu$  l ) ;  
 0.5  $\mu$  l の Taq 延長剤 ( Stratagene , 5 U /  $\mu$  l ) ;  
 1.0  $\mu$  l の Vectorette ライブラリー ;  
 76.9  $\mu$  l の H<sub>2</sub>O。

PCR サイクルを、次の通りにして実施した : 95 で 1 分間の 1 サイクル、続く、95 で 1 分間 ; 56 で 2 分間 ; 及び 72 で 3 分間の 30 サイクル。

10  $\mu$  l を 1 % アガロース、1  $\times$  TBE ゲル上に負荷した。複数のバンドが、745 を除くすべてのプライマーにより生成された。すべての 3 種の vectorette ライブラリー生成物が、非特

10

20

30

40

50

異的PCR反応により生成されるよりもむしろ、同じ標的物DNA ( P 45配列 ) から正しくプライムされたかどうかを決定するために、生成物をMnI Iにより消化した。MnI Iは頻繁な4塩基対認識配列で切断し、そして消化される鋳型に対して特異的なバンドの有用なパターンを生成する。6%アクリルアミドゲル上でのCla I / 743, HindIII / 744及びEcoRI / 744 PCR生成物のMnI I消化フラグメントの電気泳動により生成されるパターンは、同じ変動を示したが、しかしバンドの大部分が3種のサンプルにおいて同定され、このことは、それらが同一の配列の大きなセグメントを共有することを示す。

#### 4. スクリーニング

Cla I / 743及びHindIII / 744の組合せからのPCR生成物を、52,000,000cpmの<sup>32</sup>Pラベルされたプローブの生成のための鋳型として使用される前、混合し、そして遊離ヌクレオチド及び使用されなかったプライマーから精製した。プローブ合成及びライブラリースクリーニングについての詳細は、例6に引用されている。

60より多くのC7陽性クローンが、混合されたvectoretteプローブによるスクリーニングから得られた。いくつかの陽性クローンは、隣接するブランクからの有意な汚染を伴わないで、採集のために十分な状態にあった。それらのブランクの12のブランクを、前記のようにして(但し、56のアニーリング温度が温度グラジエントの代わりに用いられた)、743及び-20プライマーによるPCR増幅にゆだねられた。同じ増幅アッセイにおいては、11の副-ライブラリーを同じ態様でアッセイした。

一次放射性ラベルスクリーンから回収された12のクローンのうち3個のクローンは、強い単一のバンドを生成した。クローン1は約5kbのバンドを生成し、クローン3は約3.5kbのバンドを生成し、そしてクローン9は約2.7kbのバンドを生成した。副-ライブラリーの1つはまた、約6.5kbのクローンを生成した。

#### 5. 配列決定

P45クローンの配列決定を、精製されたPCR生成物、及び切除された細胞から製造されたプラスミドミニ-調製物に対して実施した。P45のヌクレオチド配列は、その予測されるアミノ酸翻訳と共に下記に列挙される。変性PCRプライマー(配列番号32~35)を生成するために使用される、P45の化学的に決定されたN-末端配列(配列番号11)は下線により示される。

##### P45ヌクレオチド配列 (配列番号70)

ATGCTACTTC CAGACTGGAA AATCAGAAAA GAAATACTTA TAGAGCCATT  
 TTCTGAAGAA TCGCTCCAAC CAGCAGGTTA TGACCTCAGA GTGGGCAGAG  
 AGGCTTTTGT TAAGGGGAAA TTAATCGACG TGGAAAAGGA AGGAAAAGTC  
 GTTATTCCTC CAAGGGAATA CGCCTTAATC CTAACCCTCG AGAGGATAAA  
 GTTGCCCGAC GATGTTATGG GGGATATGAA GATAAGGAGC AGTTTAGCAA  
 GAGAAGGGGT TATTGGTTCT TTTGCTTGGG TTGACCCAGG ATGGGATGGA  
 AACTTAACAC TAATGCTCTA CAATGCCTCA AATGAACCTG TCGAATTAAG  
 ATATGGAGAG AGATTTGTGC AGATCGCATT TATAAGGCTA GAGGGTCCGG  
 CAAGAAACCC TTACAGAGGA AACTATCAGG GGAGCACAAG GTTAGCGTTT  
 TCAAAGAGAA AGAAACTCTA G

##### P45アミノ酸配列 (配列番号71)

MLLPDWKIRK EILIEPFSEE SLQPAGYDLR VGREAFVKGK LIDVEKEGKV  
 VIPPREYALI LTLERIKLPD DVMGDMKIRS SLAREGVIGS FAWVDPGWDG  
 NLTMLLYNAS NEPVELRYGE RFVQIAFIRL EGPARNPYRG NYQGSTRLAF  
 SKRKKL\*

翻訳されたP45タンパク質は、9.12の理論的pI及び17888.76の計算された分子量を有する。P45の翻訳されたN-末端配列(下線が引かれている)は、実験的に決定された配列(配列番号11)に対応し、そして変性PCRプライマーを企画するために使用される正確な配列(配列番号60)に適合する。

P45 DNA配列がすべての6種のフレームで翻訳され、そしてコンピューター関与のプログラムBlastxを用いて複数の配列データベースに比較される場合、Desulfurolobus ambivalensのdCTPデアミナーゼ遺伝子は類似性を有することが見出された。ピスナ及びマエダノピスナ ウィルスからのポリタンパク質をコード

するもう1つの完全に異なった遺伝子がまた同定されたが、しかし低い有意なレベルの配列類似性で存在した。それらの類似する遺伝子の個々、及び下記に論じられるそれらは、P45に関連する配列を表わすことができる。従って、コンピューター読取り媒体に記憶される配列情報が、下記例9に示されるように、本発明に従って、P45及びPEFコードのDNA配列をさらに開発するためにデータベースにおける相同、類似、又は同一配列を調べるためにコンピューターに基づく方法により使用され得る。

#### 例9．P45に関連するタンパク質の同定

##### 1．dCTPデアミナーゼ及びdUTPアーゼに対するP．フリオサスP45タンパク質のDNA配列相同性

P45 DNA配列がプログラムBlastxを用いて複数のデータベースに比較される場合、デスルフロロバス・アンピバレンスの可能性あるデオキシチジン三リン酸デアミナーゼ (dCTPデアミナーゼ) 遺伝子 (dcd) が、最高の程度の類似性を示すことが見出された。dCTPデアミナーゼの生化学的性質及び生理学的役割はE．コリにおいて研究されており、ここでdCTPデアミナーゼは、dCTPからのdUTP及びNH<sub>3</sub>の形成を触媒するホモテトラマーである。

E．コリdcd遺伝子に対する類似性を有するDNA配列が他の細菌 (サルモネラ・チピムリウム (Salmonella typhimurium)、ハエモフィラス・インフルエンザエ (Haemophilus influenzae)) 及び原生生物において発見されている (Quzounis, C., Kyrpides, N., and Sander, C. Nucl. Acids Res. 23: 565-570 (1995); Balt, C. J. など. Science 273: 1058-1073 (1996); Beck, C. J., Eisenhardt, A. R. and Neuhardt, J., J. Biol. Chem. 250: 609-616 (1975); Fleischmann, R. D. など., Science 269: 496-512 (1995))。P．フリオサスP45とデスルフロロバス・アンピバレンス (“A”) (アシジアヌス・アンピバレンス (Acidianus ambivalens)、スルホロバス・アンピバレンス (Sulfolobus ambivalens) としても知られている)、E．コリ (“E”) 及びハエモフィラス・インフルエンザエからのdCTPデアミナーゼとの間のアミノ酸配列比較が下記に示されており、約39.1% ~ 約71.2%の配列類似性範囲を示す。

10

20

MAP 複数配列の - 1 列配列結果

Page 1.1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
1 P45	MLLPDKIRK-----	-LLIEPSE-ENLOP	AGYDLRVGX	XRVGR	-----EAXVKGK----	-LIDVEK-----	--EGKVIIPREYAL
65							
2 A.	MILGDRDLKYYLEKG	WIVISPLTO-DTIRE	NGYDLRVGS--	ELAR	FRKTDIYEDGKDP	SFYEIEK-----	---GGEFIIYPNEHVL
3 E.	MRLCDRIEAWLDEG	RLSINRPPVERING	ATVDRLGNKFRFR	GHTAAFIDLSGPKDE	VSAALDRVMSDEIVL	DEGEAFYLHPGELAL	90
4	HAEIN	MRLCDRIEAWLDDG	IISLTPRPNNDKING	ATIDVRLGNSFRVFR	EHSAPFIDLSGPKKE	VSAQLESVMSDEIII	PEGEAFYLHPGTAL
90							
Page 2.1	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180	
1 P45	ILTLERIKLDDWNG	DKIRSSLAREGVIG	SFAW--	VDPGWDGNL	TLGLYNASNEPVELR	YGERFVOIAFIRLEG	PARNPYR-----
2 A.	LVTIEYKCPNDWNA	FYNLSSFARLGLFV	PPTI--	VDAGIEGOL	TIEVLG-SAPFVKIK	RGTRFLHLIFARTLT	PVENPYH-----
3 E.	AVTLESVTLPADLVG	MLDGRSSLARLGLAV	HVTAHRIDPGWSCI	VLEFVNSGKLPALR	PGMLICALSFEPLSG	PAVRPYNRREDAKYR	180
4	HAEIN	ATILESVKLPANIIG	MLDGRSSLARLGLAV	HVTAHRIDPGWEGKI	VLEFVNSGKLPALR	PNTVIGALSFEVLG	EXKRPYSSRDANKYK
180							
Page 3.1	181	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270
1 P45	GSTRLAFSRKQD--	162					
2 A.	GOOGVTLPKFKFR--	173					
3 E.	NOOGAVASRIDKD--	193					
4	HAEIN	NOOGAVASRIDEDKE	195				

10  
20  
30

E . コリDCDは21 . 2kDの見掛け分子量を示し (Wang , L . and Weiss , B . J . Bacteriol . 174 : 5647-5653 (1992) )、そしてM . ジャナスキ (M . jannaschii) DCDの予測される分子量は約22kD (204個のアミノ酸) である。それらの分子量は、P . フリオサス P 45の見掛け分子量のおよそ半分であり、そしてP 45の加熱 - 解離された形 (45kDの見掛け分子量) が実際にダイマーであり得ることを示す。

40

dCTPデアミナーゼの他に、P . フリオサス P 45は、ウリジン三リン酸 (dUTPアーゼ) に対して、有意ではあるが、しかし低い程度の配列類似性を示す。dUTPアーゼ、すなわちdut遺伝子によりコードされる酵素は、dUTPをピロリン酸及びdUMPに転換する。いくつかのdUTPアーゼに対するP 45の配列を比較するアミノ酸配列の1列配列が下記に示される。同一性の領域は黒のボックスで示されており、そして類似性の領域は灰色のボックスで示されている。



```

1 -----MLLDWKIRKEILLIEPFFHEWLOP
1 Phage1 -----STRGPKINEMITLIDIAV
1 E. コリ -----MKKIDGLDPVGGKEFFPQYVA
1 RAEIN -----MKKIDKGLDSEIAGNEFFPQYVA
1 Scerevisiae -----MTATSDKYVNIQLRQASTYIPVNS
1 アタ -----MSYTKVKNYNNITLINSM
1 トマト -----TEPSPKVOKLDHPENGVPFRVKN
1 天然痘 -----MFMNINSPPRFVDENRKSLIC
1 ORFN2 -----HEFCHTETQVVYVONITLIDIAV
1 ヒト -----PAISPSKRARPAEVGCGQRFAD
1 ラット -----DASRFVYVYEHITATLIG
1 EIAV -----ICGNQADEAALKEEITLQAYGSI
1 コンセンサス -----m i kls a lptras

```

```

25 -----STVQDITKUSGCAQGGDEVILNYD
23 Phage1 -----SNPVYCAINSVYV
28 E. コリ -----PCHAIPADPSLAAHILFESGQICVNLV
28 RAEIN -----YIADPNLQAILFESGQICVNLV
29 Scerevisiae -----IPFAMGQOISSTFTVGT
25 アタ -----YKIKYNRIRKICMDKCA
52 トマト -----TQARGNAPVLSAVQGTAFIL
30 天然痘 -----YRILCRCKIKLISLQKFC
29 ORFN2 -----CVISHCSPFVAILKPSGCGFI
46 ヒト -----YRILKAVKQIQALISGCGFV
85 ラット -----YRILSKAKQIQALISGCGFV
34 EIAV -----IMVSTKIPVSKQVFNSE
101 コンセンサス -----d tipp e lv Tdl i lp ygrma prsglavkr ldlgg gvid dyrgn lgvvlyN g e

```

```

120 VELEYEFVYTAETI
101 Phage1 -----NDDANGRITFIEV
108 E. コリ -----FNL EDELADEEFKRSR
108 RAEIN -----FNI EDFOCBEGRHAK
104 Scerevisiae -----DSTIEVAIRPISKAN
100 アタ -----VEE KCDDEKNSHGSN
127 トマト -----VLSFHGSV
104 天然痘 -----DQJFGSTG
104 ORFN2 -----DQJFGSTG
121 ヒト -----DQJFGSTG
160 ラット -----DQJFGSTG
108 EIAV -----DQJFGSTG
201 コンセンサス -----v ld tdrg g9fgstg

```

10  
20  
30  
40

P 45とdUTPアーゼとの間の配列類似性の領域の1つは、推定上のウリジン - 結合モチーフである。このモチーフは、P. フリオサス P45の翻訳されたアミノ酸配列に保存され、これは シンセターゼ、dCTPデアミナーゼ、及びdUTPアーゼに保存される推定上のウリジン - 結合配列の存在を表わす (Koonin, E. V. Nucl. Acids Res. 24: 2411-2415 (1996))。次の比較においては、Uは巨大な疎水性残基、たとえば I, L, V, M, F, Y又はWを表わし、そして太字の残基はコンセンサス配列の G, D又はU残基と適合する。コンセンサス ウリジン - 結合モチーフ:

	.GUUD..U.G.U.U	(配列番号72)
P. フリオサス P45 :	FAWVDPGWDGNTLM	(配列番号73)
M. ジャナスキ DCD :	AGWIDAGFKGKITL	(配列番号74)
M. ジャナスキ推定 DCD :	SAVHDPGYEGRPEY	(配列番号75)
D. スルホロバス DCD :	PTIVDAGFEGQLTI	(配列番号76)
E. コリ DCD :	AHRIDPGWSGCIVL	(配列番号77)
E. コリ DUT :	VGLIDSDYQGQLMI	(配列番号78)
酵母 DUT :	AGVVDRDYTGVEVKV	(配列番号79)
ヒト DUT :	AGVIDEDYRGNVGV	(配列番号80)
ヘルペスウィルス DUT :	TGLIDPGFQGLKLL	(配列番号81)

これらのタンパク質の各々は、ポリメラーゼ増強活性又はPEFとして使用され得る活性、  
たとえばdUTPアーゼを表わす。当業者は、この開示及び他のデータベースにおける類似する  
調査方法から、適切なコンピュータ読取り媒体における記憶された配列情報を用いて多  
くの他のタンパク質を同定することができる。次の種の各々に対するデータベース情報が  
、PEFを、本明細書において同定される1又は複数の配列又はその一部を用いて同定する  
ために特別に使用され得る：ピロコーカス・フリオサス；ピロコーカス・ホリコシ（*Pyro*  
*coccus horikoshii*）；ピロバキュラム・アエロフィラム（*Pyrobaculum aerophilum*）；  
スルホロバス・ソルファタリカス（*Sulfolobus solfataricus*）；アルカエオグロバス・  
フルギダス（*Archaeoglobus fulgidus*）；アクイフェクス・ピロフィラス（*Aquifex pyro*  
*philus*）；メタノコーカス・ジャナスキ（*Methanococcus jannaschii*）；サーモトガ・マ  
リチマ（*Thermotoga maritima*）；メタノバクテリウム・サーモオートトロピカム（*Metha*  
*nobacterium thermoautotrophicum*）；及びサーマス・サーモフィリス（*Thermus thermop*  
*hilis*）。

dCTPデアミナーゼの生理学的機能は、E. コリにおいてのみ研究されており、ここでそれ  
はデオキシリボヌクレオチド代謝において必須の役割を演じる。dCTPデアミナーゼはdCTP  
をdUTPに転換し、これは細菌におけるチミジレートの新たな合成における必須の段階であ  
る（Taylor, A. F., and Weiss, B. J. *Bacteriol.* 151: 351-357 (1982)）。ウリジン  
トリホスファターゼ（*dut*遺伝子によりコードされるdUTPアーゼ）、すなわち細菌、真核  
生物及び真核ウィルスに見出される偏在する酵素は、dUTPをピロリン酸及びdUMP、すなわ  
ちチミジン酸シンセターゼ基質に分解する。従って、dCTPデアミナーゼ及びdUTPアーゼは  
、*dut*突然変異を抑制する*dod*遺伝子における突然変異と機能的に関連する（Wang, L. and  
Weiss, B. J. *Bacteriol.* 174: 5647-5653 (1992)）。

dUTPアーゼは、それがDNA中へのdUTP組込みを妨げるようインビボにおいて機能するので  
、E. コリ及び酵母において必須の遺伝子であることが示されている（El-Haji, H. H.  
、Zhang, H., and Weiss, B. J. *Bacteriol.* 170: 1069-1075 (1988)；Gadsden, M. H.  
、など。EMBO J. 12: 4425-4431 (1993)）。E. コリの*dut*変異体においては、dUTPプ  
ールが非常に増強され、複製の間、DNAにおけるチミジンとウラシルとの高められた置換  
をもたらす。ウラシル-DNAグリコシラーゼ及びエキソヌクラーゼIIIは、E. コリ*dut*  
変異体におけるウラシル-含有DNAの修復において必須の役割を演じる（Taylor, A. F. a  
nd Weiss, B. J. *Bacteriol.* 151: 351-357 (1982)）。

dCTPデアミナーゼ及びdUTPアーゼの基質特異性、酵素活性及び生理学的役割は、この開示  
の前、原生生物においては、特徴づけられていなかった。

#### 例10. 組換えP45の発現クローニング及び特徴化

##### 1. 連結無関係クローニング (LIC) の方法によるP45の発現クローニング

組換えP45を、P45ゲノムクローン（クローン#9）の一部のPCR増幅により生成した。  
プライマー（下記オリゴペプチド#1及び2）を、連結無関係クローニング（Ligntion I  
ndependent Cloning）（LIC）を用いる、親和性タンパク質発現及び精製系（Stratagene  
；La Jolla, CA）と共に機能するよう企画した：

オリゴペプチド # 1 : 5' GACGACGACAAGATGCTACTTCCAGACTGGAAA 3'

(配列番号82)

オリゴペプチド # 2 : 5' GGAACAAGACCCGTCCCACCTTTCACAGATGAAGAG 3'

(配列番号83)

太字のセグメントは、クローニングベクターに対して特異的な配列を表わし、そして隣接する配列は、クローン # 9 の配列に対して特異的である。オリゴペプチド # 1 における下線を引かれたATGは、P45遺伝子の5'末端に対して正確に対応し、他方オリゴペプチド # 2 における太字の後の配列はゲノム挿入体の末端に対応する。

PCR増幅を、次の成分を含む溶液100  $\mu$  l の体積において実施した：1 x のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液；0.2mMのdNTP（それぞれ）；200ngのプライマーオリゴペプチド # 1 ；200ngのプライマーオリゴペプチド # 2 ；SM緩衝液500  $\mu$  l における3  $\mu$  l のゲノムクローン # 9 プラークJP（約2000の粒子）；2.5単位のクローン化されたPfu DNAポリメラーゼ；及び7ngの生来のPEF（ここで、10 x のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液は次のものを含む：100mMのKCl；100mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；200mMのトリス - Cl (pH8.75)；20mMのMgSO<sub>4</sub>；1%のTriton<sup>R</sup> X - 100；及び1000  $\mu$  g / mlのBSA)。

熱サイクルのパラメーターは次の通りであった：95 で1分間（1サイクル）；95 で1分間 - 56 で1分間 - 72 で5分間（30サイクル）。

2.5kbの増幅された生成物を精製し、そして次に、dATPの存在下での制限されたヌクレオチド切除にゆだねた。この方法は、アデニン残基に達するまで、PCR生成物の3'末端でのヌクレオチドの除去を促進する。切除混合物（次の成分から成る：1 x のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液；0.5mMのdATP；43.5  $\mu$  l のPCR生成物（8.7ng /  $\mu$  l）；1.25単位のクローン化されたPfu DNAポリメラーゼ）を、72 で10分間インキュベートした。

20  $\mu$  l のエキソヌクラーゼ処理されたPCR生成物を、40ngの消化されたpCAL - n - EKベクター（PCR生成物において暴露された配列に対して相補的な末端を生成するためにエキソヌクラーゼ処理されている）により室温で45分間、アニーリングした。ベクターに対してのモル過剰の挿入体の量は、約9倍であった。pCAL - n - EKベクターは、N - 末端融合タンパク質のカルモジュリンアガロース（CAMアガロース）上での容易な精製を可能にする、上流の整合カルモジュリン結合ペプチド標識を含む。融合タンパク質を生成できるか又はできない種々の他の発現ベクターは、当業界において知られており、そしてP45タンパク質又はそのフラグメントを発現し、又はP45タンパク質又はそのフラグメントをコードする配列を有するDNA構造体を生成するために使用され得る。発現ベクターは、適切に連結された核酸からの転写を可能にし、又は転写を制御するよう作用するDNA配列を単に含む必要がある。制御のタイプ、可能にされる転写の程度、及びベクター及び核酸が適切に連結される態様は変化することができる。一般的に、発現ベクターはまた、宿主中のベクターの複製を可能にするために複製制御配列を含む。しかしながら、複製制御配列は、宿主の複製が発現に対して決定的でない場合、必要とされない。

## 2. 組換え P45 の精製

5  $\mu$  l のアニーリングされたベクター / 挿入体DNAを用いて、XL2 - Blueコンピテント細胞を形質転換した。10の得られるコロニーを、2.5kbの挿入体についてPCRによりスクリーニングし、そして9個のコロニーが正しいサイズの挿入体を含むことが見出された。プラスミドDNAを3種のクローンから調製し、そして次に、BL21 (DE3) 細胞を形質転換するために使用した。6個のBL21 (DE3) コロニーを、5 ml の 1 x LB, 125  $\mu$  l / ml のアンピシリンの溶液において37 で約10時間、増殖せしめた。それらの培養物を用いて、250ml の 1 x LB及び125  $\mu$  g / ml のアンピシリンを含む6個のフラスコを接種した。培養物の光学密度 (OD<sub>600</sub> 値) が1.1~1.3に達する場合、IPTGを添加し、約1mMの最終濃度にした。細胞を37 で一晩、増殖せしめた。細胞を遠心分離により集め、そしてペレットは0.4~

10

20

30

40

50

0.5 g の範囲であることが評価された（可視的に）。ペレットを、次の成分を含むカルシウム結合緩衝液2.5mlに再懸濁した：50mMのトリス - HCl (pH8.0) ; 150mMのNaCl ; 10mMの - ME ; 10mMの酢酸マグネシウム ; 2 mMのCaCl<sub>2</sub>。

10mg/mlのリゾチーム250 μ l を細胞に添加し、そして反応を氷上で1時間、インキュベートせしめた。わずかに溶解されたサンプルを、50%の使用サイクル及び4の設定で、マイクロチップを有するBranson Sonifier 250により2度、音波処理した。溶解物を超高速遠心分離により透明にした。透明にされた溶解物を、700 μ l の洗浄されたStratageneカルモジュリンアガロース（50体積%のCAMアガロース）に添加し、そして4で1時間、軽く揺り動かしながら結合せしめた。樹脂を10mlのCaCl<sub>2</sub>結合緩衝液により3度、及び5mlの同じ溶液（但し、CaCl<sub>2</sub>の濃度は0.1mMに低められた）により2度、洗浄した。洗浄を遠心分離により達成し、上清液を除き、そして新しい緩衝液に再懸濁した。CAM樹脂5 μ l を集め、SDS - PAGE電気泳動上で試験した。洗浄されたマトリックスを900 μ l の溶出緩衝液〔50mMのトリス - HCl (pH8.0) ; 150mMのNaCl ; 10mMの - ME ; 2 mMのEGTA〕に再懸濁し、そしてアガロース樹脂のペレット化の前、1分間、静置した。P45を含む溶出緩衝液を分離管に除き、そしてCAMアガロースを再び900 μ l の溶出緩衝液に再懸濁した。次に、高い塩溶出緩衝液〔50mMのトリス - HCl , (pH8.0) ; 1000mMのNaCl ; 10mMの - ME ; 10mMの酢酸マグネシウム ; 2 mMのEGTA〕を用いて、CAMアガロースから残るP45タンパク質を溶出した。

続くSDS - PAGE分析は、高い塩溶出緩衝液がカラムマトリックスから組換えP. フリオサスP45タンパク質の大部分を開放することを示した。いくらかの残留タンパク質は、カルモジュリンアガロースに結合されたまま存続した。

P45タンパク質を生成するための本明細書に記載される方法は、当業界において知られている方法により、多くの手段で変性され得る（Ausubel, F. M., など., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; Sambrook, J., など. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）。1つの可能な変法においては、P45類似体タンパク質が生成され得る。いづれのタイプの突然変異、たとえば特定部位の点突然変異、欠失突然変異、挿入突然変異、及びそれらの突然変異の組合せでも使用され得る。この変異体コード領域が、宿主細胞中に移行される適切なベクター中に挿入される。次に、宿主細胞は、P45類似体を発現する。P45類似体タンパク質は、本明細書に記載される1又は複数のPEF活性、又はdUTP又はdCTP代謝活性を実質的に保持する。従って、本明細書に記載される融合タンパク質及び親和性標識発現及び精製システムは、組換えPEFタンパク質、たとえば組換えP45を生成するための多くの手段の中のわずか1つの手段である。

類似体を、たとえば、残基又は配列の種々の置換を行ない、又は生物学的活性のために必要とされない末端又は内部残基又は配列を欠失することによって構成することができる。たとえば、システイン残基は、再生に基づいての不必要な又は正しくない内部分子ジスルフィド架橋の形成を妨げるために、欠失され得、又は他のアミノ酸により置換され得る。突然変異誘発のための他のアプローチは、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母システムにおける発現を増強するために隣接する二塩基性アミノ酸残基の修飾を包含する。種々の宿主細胞における発現を好む他の突然変異が行なわれ得る。

典型的には、置換は保存的に行なわれ得る。たとえば、置換されるべき残基の特徴に類似する物理化学特徴を有するアミノ酸を置換することができる。同様に、欠失又は挿入方法が採用される場合、生物学的活性に対する欠失又は挿入の可能性ある効果が考慮されるべきである。生物学的活性を保存するために、欠失及び置換は好ましくは、相同の又は保存的に置換された配列をもたらし、このことは、与えられる残基が生物学的に類似する残基により置換されることを意味する。保存性置換の例は、もう1つの脂肪族残基による1つの脂肪族残基の置換、たとえばお互いによるIle, Val, Leu、又はAlaの置換、又はもう1つの極性残基による1つの極性残基の置換、たとえばLysとArgとの；GluとAspとの；又はGluとAsnとの間の置換を包含するが、但しそれらだけには限定されない。本明細書の観点

10

20

30

40

50

においては、当業者は、他のそのような保存性置換、たとえば類似する疎水性特徴を有する全領域の置換を行なうことができるであろう。

類似体の発現のために構成されるヌクレオチド配列における突然変異は、ほとんどの場合、コード配列の読取り枠を保存すべきであり、そして好ましくは、二次mRNA構造、たとえば受容体mRNAの翻訳に悪影響を及ぼすループ又はヘアピン構造を生成するためにハイブリダイズする相補的領域を創造しないであろう。突然変異は予定され得るけれども、突然変異自体の性質は予定される必要はない。たとえば、所定の部位での突然変異の最適な特徴を選択するためには、ランダム突然変異誘発が、標的コドン、及び所望する活性についてスクリーンされる発現された変異体又は類似体で実施され得る。

タンパク質をコードするヌクレオチド配列におけるすべての突然変異が最終生成物において発現されるとは限らないであろう。たとえば、ヌクレオチド置換は、発現を増強するために、主に、転写されるmRNAにおける二次構造ループを回避するために（引用により本明細書に組込まれるEPA 75, 444Aを参照のこと）、又は選択された宿主によりより容易に翻訳されるコドン、たとえばE . コリ発現のための良く知られているE . コリ選択コドンを供給するために行なわれ得る。

突然変異は、生来の配列のフラグメントへの連結を可能にする制限部位を端に有する、変異配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することによって、特定の遺伝子座で導入され得る。連結に続いて、その得られる再構成された配列は、所望するアミノ酸挿入、置換又は欠失を有する類似体をコードする。

あるいは、オリゴヌクレオチドにより指令された部位特異的突然変異方法が、必要とされる置換、欠失又は挿入に従って変更される特定のコドンを有する変更された遺伝子を供給するために使用され得る。上記に示される変更を行なうための典型的な方法は、適切な技法を開示する、Walderなど（Gene 42 : 133 , 1986 ） ; Bauerなど . （ Gene 37 : 73 , 1985 ） ; Craih（ BioTechniques , Jan . 12-19 , 1985 ） ; Smithなど . （ Genetic Engineering : Principles and Methods , Plenum Press , 1981 ） ; 及びアメリカ特許第4 , 518 , 584号及び第4 , 737 , 462号により開示されており、そしてそれらは引用により本明細書中に組込まれる。

### 3 . 組換え P 45及び生来のPEF PCR増強活性の比較

例 1 に記載される5 . 2kbの “ On / Off ” アッセイを用いて、組換え P 45（ r P 45 ） が天然のPEFに比較できるPEF活性を有することを示した。その結果は、図14に示される。PEF活性が付加される場合、5 . 2kbの増幅生成物は、図14のラベルされた “ ナシ（ none ） ” のレーンに示されるように、生成されない。 P 45の組換えクローン（ それらのプラスミド図から “ 1 ” 又は “ 23 ” と呼ばれる ） から生成されるタンパク質が5  $\mu$  l , 1  $\mu$  l , 又は1 / 10希釈溶液 1  $\mu$  l （ それぞれ、約100 , 20及び 2 ng ） の量で添加される場合、それらは2種の生来のPEF調製物に比較できるPCR生成物収率の増強をすべて示した。興味あることには、5  $\mu$  l は、1  $\mu$  l よりも十分には作用しなかった。 “ 過剰用量 ” の現象がまた、生来のPEFにより示された（ 例16 ） 。

4 . 生来のPEF複合体及び前記複合体のタンパク質成分に比較される組換え P 45の分子量  
翻訳された r P 45 DNA配列の予測される分子量は、18 . 6kDaであった。しかしながら、生来の P 45成分は、加熱変性を伴わないで、300kDaで、及び加熱変性（ 99 で 5 分間、部分的に変性された ） を伴って45kDaでPEF複合体の一部として移動する。高好熱菌におけるタンパク質発現は通常、安定しており、そして時々、解離が生じる前、極端な条件を必要とする。本発明者は、 P 45が、生来のPEF複合体が 2 % SDS及び 1 % トリクロロ酢酸（ TCA ） の存在下で煮沸される場合（ 十分な変性条件 ） 、 45kDの代わりに、約18kD又は約17 ~ 18kDで移動することを見出した（ 図15 ） 。加熱変性しない場合、組換え P 45の半分以上が約50 kDaで移動し（ 45 + 4 kDのカルモジュリン結合標識 ） 、そして残るサンプルは26kDaに接近して移動した（ 図15 ） 。加熱変性によれば、サンプルのすべては約26kDaで移動し、このことは、組換え体とその変性されていない状態でダイマーであることを示唆する。トリクロロ酢酸加熱処理は、組換えサンプルにおいていづれかの追加のバンドの生成をも失敗した。

10

20

30

40

50

生来 (18kD) の及び組換え (26kD) の P 45 の十分に変性された形間の移動差異は、P・フリオサスと E・コリ宿主との間の翻訳後修飾の差異により、又は r P 45 融合タンパク質の折りたたみ又は移動に対する 4 kD の CBP (カルモジュリン結合タンパク質) 標識の効果により説明される。

#### 例 11 . P 45 による PCR 増強の可能性ある機構

##### 1 . PEF / P 45 により触媒される反応の同定

dCTP デアミナーゼに対する P 45 の類似性は、dCTP 又は他のヌクレオチド三リン酸が PEF / P 45 の基質であるかどうかの試験を可能にした。PEF を dCTP 又は dUTP と共にインキュベートし、そして反応生成物を逆相 HPLC により分離した。1 × のクローン化された Pfu ポリメラーゼ緩衝液、10mM の dCTP 又は dUTP、及び 700ng の PEF (又は 5 μ l のクローン化された P 45 (約 100ng) 又は何もなし (負の対照)) を含む反応混合物 (50 μ l) を、72 °C で 1 時間インキュベートした。サンプルを、50mM のトリエチルアンモニウムアセテート (pH 7.0) (A) により平衡化された 3.9 × 250cm の Watrrs Delta-pak C - 18 カラム (300 / 15 μ m) 上に注入した。生成物を、次のグラジエントを用いて、アセトニトリル (B) により 2 ml / 分で溶出した: 0 % の B, 5 分間、0 ~ 10 % の B, 20 分間。溶出物の吸光度を、光ダイオードアレイ検出機によりモニターし、そしてピーク領域を 260nm で積分した。

図 16 におけるデータは、生来の PEF 複合体及び精製された組換え P 45 の両者が基質として dUTP を使用することを示す。クローン化された Pfu DNA ポリメラーゼ PCR 緩衝液の存在下で、dUTP は 10.517 分で移動する。PEF 又は組換え P 45 (クローン 1 又は 23 から精製された) と共に 1 時間インキュベートした後、dUTP ピークは消出し (0.1 % の合計ピーク領域)、そして 4.400 分で溶出する新しいピークが出現した (98 % の合計ピーク領域)。PEF + dUTP 反応の生成物は、dUDP, dCMP, dCDP 及び dCTP の保持時間とは異なる、dUMP 標準と同じ保持時間を伴って移動した。生成物が dUMP であることを確かめるために、dUMP 標準及び PEF + dUTP 生成物を、一緒に混合し、そして再注入した。その混合されたサンプルは、わずか 1 つのピークを生成した。

dUTP の他に、dCTP はまた、PEF のための基質として作用することが見出された (図 17)。PEF + dCTP 反応の生成物は、その保持時間及び吸光度最大に基づけば、dCMP であるように思えた。PEF は dCTP を用いるが、dUTP は、PEF / P 45 の好ましい基質である。示される例においては、dCTP のわずか 16.6 % が、100 % の dUTP を転換する同じ条件下で 1 時間で転換された (図 17、パネル B)。さらに、dCTP 及び dUTP が PEF と共にインキュベートされる場合、dUMP (パネル C における 4.2 分のピーク) のみが生成された。PEF との反応性は、次のヌクレオチドに関しては、使用される前記条件下で検出されなかった: dGTP, dATP, dTTP, dCMP, dUMP 及び rUTP。

PEF / P 45 により触媒される基質選択及び反応は、dCTP デアミナーゼに対するアミノ酸類似性に基づいて予測されるそれとは有意に異なった。両酵素は dCTP 及び dUTP を結合するが、dCTP デアミナーゼにより触媒される前方向反応は、dUTP + NH<sub>3</sub> を生成するために dCTP の脱アミノ反応であり、他方では、PEF / P 45 は dUTP を選択的に利用し、そしてピロリン酸 (PPi) の開放を触媒する。P・フリオサス PEF 又は P 45 による dCTP の脱アミノ反応は、その使用される条件下で観察されなかった。

##### 2 . dUTP から PEF により生成される無機ピロリン酸 (PPi) の酵素的検出

本発明者は、無機ピロリン酸 (PPi) 又は無機リン酸 (Pi) が、dUMP への dUTP の PEF - 触媒された転換の間に生成されるかどうかを試験した (図 16)。Pi が生成されるかどうかを評価するために、900 又は 1600ng の PEF を、1 × のクローン化されたポリメラーゼ緩衝液中、5 mM の dUTP の存在下で 72 °C で 1 時間インキュベートした。続いて、反応混合物を、Heinonen and Lahti (Heinonen, J. K. and Lahti, R. J. (1981) Anal. Biochem. 113: 313-317) の方法を用いて、Pi の存在について分析した。前記結果 (HPLC) は、上記反応条件下で、dUTP の 100 % が生成物に転換されるべきであることを示した。100 % の転換率は、Pi が反応の生成物である場合、500 n モルの Pi の生成に対応する。しかしながら、Pi はそれらのアッセイにおいて検出されなかった。Pi についてのアッセイは、約 50 n モルほどの Pi を検出するほど敏感であった。それらの観察は、Pi が PEF と dUTP との反応の間、形成されな

かったことを示す。

PPiが前記反応の間に形成されるかどうかを調べるための実験において、900又は1800ngのPEFが、1×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液中、10mMのdUTPと共に、72で1時間インキュベートした。次に、反応混合物におけるPPiの存在を、Sigmaの“ピロリン酸の酵素的決定”キット(Sigma製品番号P7275)を用いて定量化した。前記キットは結合された酵素システムを利用し、それにより、2モルのNADHが反応混合物に存在する個々のモルのPPiのためにNAD<sup>+</sup>に酸化される。NADHの酸化を340nmで、分光光学的にモニターした。このアッセイシステムを用いて、PPiの生成を、PEF及びdUTPを含む反応において明確に確立した。PPiは、PEFを欠いているか又はPEF及びdATP(dUTPの代わりに)を含む対照反応においては検出されなかった。1800ngのPEFを含む反応は、900ngのPEFを含む反応の2

10

倍のPPiを生成した。dUTPからのPPiの生成のための温度最適条件(Topt)を、dUTP及び生来のPEFの混合物を、73~99の範囲の温度でインキュベートすることによって測定した。生来のPEFによるPPi生成は、この温度範囲にわたって確実に上昇し、そして99で最高であった。生来のPEFのためのToptは99以上であることが見出されたが、組換えP45は、同じ酵素濃度(dUTPターンオーバー)であるが、しかしより低い全体のタンパク質濃度で試験される場合、85~93で最大活性を示した。従って、特定の温度範囲、たとえば約70~約100、約85~約93、又は約70以上の温度が、本発明のPEF又はポリメラーゼ増強活性に関して使用され得る。

S200-精製された生来のPEFの3種の異なった調製物の酵素活性を85で測定した。タンパク質濃度を、Bradford及びアミノ酸分析の両者により決定した。S200-精製された生来のPEFの酵素活性及び比活性(Bradford又はAAAにより示されるようにして、決定されたタンパク質濃度)の要約が下記に示される。それらの活性を、例1に記載される“On/Off”アッセイにおいて5.2kbの標的物を増幅するために必要とされる最少量の精製されたPEFと比較した(100µlのPCR)。

20

調製物	PPi生成 (µモルのPPi/時/ µl)	比活性 (µモルのPPi/時/ µg) (Bradford)	比活性 (µモルのPPi/時/ µg) (AAA)	5.2kbのPCRのために 必要とされる最少量の dUTPアーゼ (nモルのPPi/時)
1	1.23	1.76	4.03	0.11
2	0.27	0.59	3.13	0.11
3	0.14	na	1.37	0.22~0.44

30

データは、精製されたPEF調製物1及び2に関して、dUTPアーゼ活性とPCR増強活性との間に卓越した一致が存在することを示す。しかしながら、生来のPEF調製物3は、たぶん、その低い比活性のために、2~4倍に低いPCR増強活性を示した。調製物3は、PCR増強を妨害する汚染物を含む。

dCTPからのPPi形成をまた、dUTPによりdCTPを置換することによって測定した。生来のPEF調製物1に関しては、dCTPアーゼ活性のレベルは、85で0.097(µモルのPPi/時/µl)であることが見出され、これはdUTPからのPPi生成の割合よりも12倍低い。さらに、組換えP45調製物がまた試験され、そしてdUTP及びdCTPの両者からPPiを生成することを見出した。生来のPEF及び組換えP45は、dCTPと比較される場合、dUTPのための類似する選択の程度を示した。

40

従って、組換えP45及び構造的に類似するP45タンパク質は、PEF複合体のいずれかの他の成分の不在下でこの反応を触媒する。従って、PPi検出について本明細書において記載される方法は、生来のPEF、PEF類似体タンパク質、組換え又は合成PEFタンパク質、PEF複合体及びrP45の活性を分析し、又は存在を決定するための有用な手段である。

### 3. 質量分光測定法によるPEF/dUTP生成物の特徴化

50

エレクトロスプレー質量スペクトル分析を実施し、PEF及びdUTPを用いての反応の副生成物を特徴づけた。負のイオン化状態における分析は、307及び615 m/e でピークを示す比較的鮮明なスペクトルを生成した。それらの質量は、dUMP [ M - H ]<sup>+</sup>及びその非共有ダイマー [ 2 M - H ]<sup>+</sup>の質量と一致する。陽性状態における分析は、複合アレイのピークを与えた。

#### 4 . PCRの間、dUTP蓄積の排除におけるPEF / P 45の役割

PEF / P 45の触媒活性の理解は、PCR増強が生じる機構の洞察を提供した。Laskonなどは、原生生物DNAポリメラーゼ、たとえばVentが、TTPの速度の約40%でdUTPを組み込むことを報告している ( Roger S . Lasken , David M . Schuster , and Ayoub Rashtchian , ( 1996 ) J . Biol . Chem . 271 : 17692-17696 ) 。しかしながら、原生生物DNAポリメラーゼによるさらなるDNA合成は、dU - 含有DNAにより阻害されると思われる。阻害は、dT - 含有DNAと比較して、dU - 含有部位に対するVentの6500倍高い親和性に関連しているように見える。それらの観察に基づいて、Laskenは、原生生物DNAポリメラーゼがdU - 含有DNAのインビボでの修復において役割を演じることができることを報告している。

PEF / P 45のPCR増強活性のための1つの可能な機構は、その関連するdUTPアーゼ活性が、PCRの間に存在するいずれかのdUTPをdUMPに転換することができ、その副生成物がDNAポリメラーゼ活性を妨害すべきでないことである。そのようにすることにより、dUTPがPCR生成物中への組み込みのために利用できず、そして従って、DNAポリメラーゼのdU - DNA阻害は生じないであろう。そのような機構は、PEF / P 45の存在下で原生生物DNAポリメラーゼにより生成される高められたPCR生成物収率と一致する。

しかしながら、dUTPは、PCR反応に計画的に添加されないが、しかしPCRサイクリングに使用される高温の間、dCTPの自発的脱アミノ反応により生成され得る ( Jens-Peter Horst and Hans-Joadrim Fritz . ( 1996 ) The EMBO Journal 15 ; 5459-5469 ) 。PCRの間、dUTPへのdCTP脱アミノ反応の程度を評価するために、本発明者は、クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR緩衝液の存在下で、dCTP ( 10mM ) を、95 ( PCR変性温度 ) でインキュベートした。熱処理の生成物を逆相HPLCにより分析し ( 上記のようにして ) 、そしてピークの割り当てを、標準の保持時間にその保持時間を比較することによって行なった。図18は、dCTPが95 で1時間 ( パネル B ) 又は4時間 ( パネル C ) 加熱される場合に得られる結果を示す。dCTPは、2種の有力種、すなわちdCDP ( 22% / 1時間 ; 41% / 4時間 ) 及びdCMP ( 2.8% / 1時間 ; 25% / 4時間 ) に分解する。12.38分でのマイナーピークをまた生成し ( 0.049% / 1時間 ; 0.116% / 4時間 ) 、これは、その保持時間 ( dUTP標準 = R . 10分 ; パネル D ) 及び吸光度最大値に基づいて、dUTPとして同定された。図19に示されるように、dCTP ( スペクトル 2 ) を加熱することによって生成される12.38分のピークは、dUTP標準 ( スペクトル 3 ) のように、約260nmで最大吸光度を示し、そしてdCTPは約270nm ( スペクトル 1 ) で最大に吸収する。

dUTP生成をまた、PCRサイクルの間、測定した。dCTP溶液 ( クローン化されたPfu DNAポリメラーゼPCR緩衝液における10mMのdCTP ) は、5.2kbの " On / OFF " システム ( 例 1 ) について記載されるサイクリング条件を用いて、Robo Cycler 40におけるPCRサイクルを受けた。PCRの間に生成される生成物を、上記のようにして、HPLCにより分析した。30サイクルの後、次の生成物が明らかであった : 79% dCTP , 19% dCDP , 1.8% dCMP 及び 0.064% dUTP ( 図20、パネル A ) 。dCTPのPCRサイクルの間に生成されるdUTPは、dUTP標準 ( 11.9分 ; 263nm ) の保持時間及び吸光度最大にひじょうに接近する保持時間 ( 12.1分 ) 及び吸光度最大 ( 263nm ) を示した。dCTPがPfu DNAポリメラーゼの存在下でサイクルされる場合 ( 50 x PCR条件 ; 10mMのdCTP及び1.25 U の Pfu / μ l の反応混合物 ) 、生成されるdCDP , dCMP 又はdUTPの量に差異は存在しなかった ( 図20、パネル C ) 。しかしながら、dCTPがPEFの存在下でサイクルされる場合 ( 50 x PCR条件、10mMのdCTP、及び0.5ngのPEF / μ l の反応混合物 ) 、次の生成物が生成された : 73% dCTP , 19% dCDP 及び 8% dCMP ( 図20、パネル B ) 。dCTPがPEFの存在下でサイクルされる場合に生成される検出できるdUTPは存在せず、これは、PEFの関連するdUTPアーゼ活性と一致する。

dCTP ± Pfu サンプル ( 1.7 ~ 1.8% ) に比較しての、dCTP + PEF サンプル ( 80% ) における

10

20

30

40

50



dCMP生成の上昇は、PCRの間のマイナーなdUTP脱アミノ反応生成物の排除の他に、PEFがまた、dCTPをdCMPに転換するであろうことを示す。この実験（50×PCR条件）においては、PCR後の最終dCTP濃度は、PEF含有反応において73%であり、そしてPEFを欠いている反応においては79%であった。dCTPプールにおけるこのわずかな低下は、PCR生成物収率又はDNAポリメラーゼ複製適合度に有意に影響を及ぼさないことが予想される。しかしながら、PCRにおけるより高い量のPEF（100 μ lの反応当たり1 ng以上）の使用はdCTP反応性のために有害であろうことが予想される。高い量のPEFが使用される場合、dCTPプールは最大の収率及び最低の誤った挿入割合のために必要とされるレベル以下に低下することが可能である。他の場所に記載されるように、本発明者は、過度の量のPEFの使用による、複製又は増幅、及び生成物のスミアの阻害を観察した。

10

#### 5. PEFは増幅反応においてdUTPの阻害作用を逆転する

Laskenは、新生短鎖DNAにおけるdUTPの組込みが原生生物ポリメラーゼを40%、単に阻害することを報告しているが（Lasken, など, (1996) J. Biol. Chem. 271: 17692-17696）、本発明者は、少量のdUTPのPCR反応への添加又は存在が、下記に示されるように、より劇的な阻害結果を有することを意外には見出した。

ヒト 1 - 抗トリプシン遺伝子の比較的小さな（0.9 kb）フラグメントを、dUTPの不在又は存在下で増幅した。PCR反応混合物は、次のものを含んだ（100 μ lの体積において）：1 ×のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液；200 μ Mの個々のdCTP, dGTP, dATP；200 ngの下記のオリゴ F 91 - 23（100 ng / μ l）；200 ngの下記オリゴ R 980 - 23（100 ng / μ l）；125 ngのヒトゲノムDNA；2.5単位のPfu DNAポリメラーゼ；200 μ Mの全（dTTP及びdUTP）又は（dTTP + PEF生成されたdUMP）：

20

**F91-23**      5' GAGGAGAGCAGGAAAGGTGGAAC 3'      (配列番号84)

**R980-23**     5' CTCATGTCCTCAACTCCGATCAC 3'      (配列番号85)

PEF生成されたdUMPを、例11、セクション1に記載のようにして調製し、そして逆相HPLCにより精製した。

PCRサイクルを次の通りに実施した：95 で1分間（1サイクル）；95 で1分間 - 58 で1分間 - 72 で2分間（30サイクル）。

PCR生成物を、図21に示されるように、1%アガロース、1×TBEゲル上で試験した。ヒトゲノムDNAからの900bpの生成物の増幅を、2 mM（dTTP + dUTPプールにおいて1%）などの低いdUTP濃度により完全に阻害し、そして0.2 μ M（0.1%）で部分的に阻害した。標準PCR反応における個々のヌクレオチドの濃度は約200 μ Mである。dUTP阻害は、PEF又は組換え P 45タンパク質（r P 45）がdUTPを含むPCR反応に添加される場合、完全に防止され得る。7 ngのPEFは、20 μ MほどのdUTPにより引き起こされる阻害を逆転することができる（データは示されていない）。特定の反応に使用されるPEF又はP 45の好ましい量は、本明細書に提供される原生基に従って、又は当業界において知られている増幅反応を定量化するための方法により最適化され得る。

30

dUTPとは異なって、PEF生成された副生成物、すなわちdUMPは、20 μ Mの濃度で存在する場合でさえ、Pfuポリメラーゼ - 基材のPCR反応において阻害性ではなかった。図21においては、精製されたdUMPを含む増幅が、ゲル上の他のバンドよりも強くないように思える。そのゲル上の他のPCR生成物が、PEF / r P 45の不在下で行なわれる増幅に比較して、PCR生成物収率を増強するために使用されたPEF又はr P 45の存在下でPfuにより生成されたことが注目されるべきである。それらの結果は、dUTPアーゼ活性の結果である、PEF又はr P 45の増強活性と一致する。dUTPアーゼ活性がdUTPを加水分解し、そしてそれにより、DNA中へのdUTPの組込みを妨げることができる。図21に示されるように、PCRの間、Pfu DNAポリメラーゼによるdUTP組込みは、PCR生成物収率を有意に低めることができる。従って、本発明は、dUTP濃度を低め、又は複製された又は増幅された生成物中へのdUTPの組込みを妨げることによって、核酸複製又は増幅反応を増強するための方法、及びその組込みを妨げることができる組成物を含んで成る。

40

本発明者はまた、PEF / r P 45がウラシル - 含有DNAにより引き起こされる阻害を逆転できるかどうかを試験した。PCR増幅を、dT（下記dUオリゴ）の代わりに9個のdUを含む、第

50

3の関連のないプライマーの存在下で実施した。M13 DNAに対して相補的なプライマーを合成した。

対照オリゴ 5'GGTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT 3'(配列番号86)

dUオリゴ 5'GGUUUCCCAGUCACGACGUUGUAAAACGACGGCCAGU 3'(配列番号87)

900bpの 1 - 抗トリプシンフラグメントを、100 μ l の反応当たり200ng (16 p モル) ~ 0.2ng (0.016 p モル) の範囲のレベルで添加されるオリゴの存在下で増幅した。さらに、類似する反応を、Pfu DNAポリメラーゼの代わりにTaq - DNAポリメラーゼを用いて実施した。図22においては、対照オリゴヌクレオチドが、高濃度(16及び18 p モル)での、Pfu - 基材のPCR反応の阻害を示す。対照的に、dUオリゴによる阻害は、0.8 p モルほどの低い濃度で容易に観察された。両オリゴヌクレオチドはPCRプライマー及びゲノムDNAから離れてPfu DNAポリメラーゼを封鎖するが、しかしdUオリゴは低い濃度で阻害することができると思われる。それらの結果は、Pfu DNAポリメラーゼが、dU含有基質により強く結合され得ることを示す。PEFの添加により、少量の増幅生成物が、0.8 p モルのdU含有プライマーを含む反応において観察される。

dUオリゴ - 阻害された反応におけるPEFによる増強は、少なくとも2つの可能な経路を通して達成され得る。最っとも適切な説明は、PEFがdU含有オリゴヌクレオチドに対して効果を有さず、そしてdCTPの熱 - 又は化学的に - 誘発された脱アミノ反応によりPCRの間に生成されるdUTPをスキヤベンジすることによってPfu DNAポリメラーゼの活性を単純に高める(たとえば、図22のレーン2及び3)ことである。又は、PEFは、修復経路を通してオリゴヌクレオチドからウラシル成分を除去するためにPfu DNAポリメラーゼと共に作用することができる。従って、PEFはまた、適切なポリメラーゼ活性を有する修復反応にも使用され得る。修復反応は、当業者に知られており、そしてそれらの反応中へのPEFの使用を採用するための方法は、当業者により考案され得る。

本明細書に記載される作用の可能性あるPEF機構の知識は、増強ポリメラーゼ反応における当業者による他のdUTP修飾酵素の使用を可能にする。それらの他の修飾酵素の定義又はそれらの酵素の1つは、ポリメラーゼによりdUTPを組み込む能力を低め、又はdUTP組み込みを少なくとも部分的に阻害する酵素であり得る。本明細書に記載されるようなPEFを同定し、そして特徴づけるために使用されるアッセイはまた、他のdUTP修飾酵素を示すことができる。それらの他の修飾酵素はまた、PEF、又は特定のタンパク質、たとえばP45又はrP45の増強特性を模倣することができた。この種類の酵素の例は、dUTPピロホスファターゼ(EC 3.6.1.23)、たとえばデオキシウリジン5 - 三リン酸ヌクレオチドヒドロラーゼ、及びdUTP代謝、異化又は合成に関与する他の酵素であり得る。それらの他の酵素は、単独で、又はPEF又は他のタンパク質又は増強添加剤と組合して使用され得る。

さらに、本明細書に示される、コンセンサスウリジン - 結合モチーフ又は関連する配列の存在がまた、PEFである酵素又はタンパク質を定義するために使用され得る。従って、タンパク質は配列番号72を含んで成り、又は配列番号72~81のいずれか1つ、又はそれらの配列の組合せは本発明のPEFであり得る。

#### 例12. ポリメラーゼ活性を増強するための他のタンパク質の同定

アミノ酸及びヌクレオチド配列における構造情報、及び本明細書に記載される機能的情報は、種々の源からのポリメラーゼ増強及び/又はdUTPアーゼ活性の当業者による同定を可能にする。たとえば、本発明者は、P50及びP45のアミノ酸配列から製造される変性プロープがポリメラーゼ増強及びdUTPアーゼ活性、又はPEFをコードするヌクレオチド配列をクローン化するためにいかにして使用され得るかを上記に示している。本発明者はポリメラーゼ反応、たとえばPCRの制御又は増強におけるdUTPアーゼ活性の重要性を同定しているので、いずれかのdUTPアーゼについて入手できる構造情報は、重合反応を増強するためのタンパク質の同定及び生成に都合良く使用され得る。さらに、記載されるアッセイは、いずれかの源からのdUTPアーゼ活性の存在を同定するために使用され得る。

#### 1. 重合反応を増強するための代表的な真核生物タンパク質としてのヒトdUTPアーゼのクローニング

dUTPアーゼ活性を有する他の酵素がまた、ポリメラーゼ増強活性を生成することができる

かどうかを決定するために、本発明者は代表的な真核生物タンパク質、すなわちdUTPアーゼをクローン化した。全RNAをヒト胎盤から単離し、そして次の成分を用いてcDNAに転換した：5  $\mu$  lの全ヒトRNA、5  $\mu$  lのオリゴdT (0.1  $\mu$  g /  $\mu$  l)、1  $\mu$  lのMoloneyネズミ白血病ウイルス逆転写酵素 (40 U /  $\mu$  l)、1  $\mu$  lの100mMのdNTP、5  $\mu$  lの10 $\times$ 第1鎖緩衝液、33  $\mu$  lのDEPC - 処理された水 (ここで、1 $\times$ 第1鎖緩衝液は50mMのトリス - HCl (pH8.3)、75mMのKCl、10mMのDTT、及び3 mMのMgCl<sub>2</sub>の溶液である)。反応物を37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。逆転写酵素を含まない負の対照を同時に実施した。

ヒトdUTPアーゼ遺伝子の1つの5' 及び3' 末端に対して特異的な配列を含むプライマーを合成し、そして下記に示す。ヒトデオキシウリジントリホスファターゼ (DUT) のcDNA配列についての受託番号は、gi | 1421817 | gb | U62891 | HSU6289 | である。それらのプライマーはまた、例10に記載されるように、増幅された生成物の連結無関係クローニング (LIC) を可能にするベクターpCAL - n - EK (下記太字での) と配列を共有した。

プライマー285 **GACGACGACAAGATGCCCTGCTCTGAAGAGACACC** (配列番号88)

プライマー286 **GGAACAAGACCCGTTTAAATTCTTCCAGTGGAACC** (配列番号89)

PCRの前、逆転写酵素を、80 $^{\circ}$ Cで5分間、反応物をインキュベートすることによって加熱不活性化した。dUTPアーゼ配列を、次の成分を含む反応物100  $\mu$  lにおいて増幅した：1 $\times$ のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液、200ngの個々のプライマー、200  $\mu$  MのdNTP、2.5単位のPfu DNAポリメラーゼ、3 ngのPEF複合体及び前セクションからのヒト胎盤cDNA 3  $\mu$  l。

反応を次の条件下で増幅した：95 $^{\circ}$ Cで3分間 (1サイクル) ; 95 $^{\circ}$ Cで1分間 - 50 $^{\circ}$ Cで1分間 - 72 $^{\circ}$ Cで2分間 (30サイクル)。増幅された反応を、1%アガロースゲル上で試験し、生成物が、精製の前、正しいサイズを示したことを確かめた。精製された生成物を、例10に記載のようにして、発現ベクターpCAL - n - EK中にクローン化し、そしてXL1 - Blue細胞を形質転換した。それらのクローンを、最初の500個の塩基の配列決定によりヒトdUTPアーゼを含むことを確かめた。形質転換体がPCR増幅によりdUTPアーゼ配列を含むことが示された後、それらのプラスミドを収穫し、そしてそれを用いて、E. コリ株BL21 (DE3) を形質転換した。

## 2. ヒトdUTPアーゼ発現及び活性分析

BL21 / dUTPアーゼクローンをIPTGにより誘発し、そして発現されたタンパク質を、dUTPアーゼ配列のアミノ末端で融合タンパク質として発現されるカルモジュリン結合タンパク質 (CBP) 標識により精製した。融合タンパク質を、例10に記載のようにして、カルモジュリンアガロース上で精製した。タンパク質生成物をSDS - PAGEにより分析し、そして正しい分子量のものであることを見出した。

dUTPアーゼクローンが活性的であることを確かめるために、Sigmaピロリン酸アッセイ (例11を参照のこと) を利用した。このアッセイは、試験されるクローンのすべてがdUTPをdUMP + ピロリン酸に転換したことを示した。ヒトdUTPアーゼ酵素は好熱性であり、そして70 $^{\circ}$ Cでの1分間のプレインキュベーションの後、完全に不活性化した。

ポリメラーゼ増強をまた、5.2kbのon / offアッセイにより検出した。アッセイを例1に記載のプロトコールから変性し、好熱性PEF活性の検出を可能にした。PCRカクテルを混合し、すべてのサンプルのための同一の開始点を付与した。99  $\mu$  lのカクテルを、6個の薄壁の0.5ml管中にアリコートした。反応は次の成分を含んだ：278ngのヒトゲノムDNA、200ngの個々のプライマー (例1を参照のこと)、200  $\mu$  Mの個々のdNTP、1 $\times$ のクローン化されたPfuポリメラーゼ緩衝液、2.5単位のPfu DNAポリメラーゼ。それぞれ60 $^{\circ}$ Cのアニーリング段階で、次の1つの成分0.5  $\mu$  lを添加した：ヒトdUTPアーゼ調製物、ヒトdUTPアーゼ調製物の1 / 10希釈溶液、2 ng /  $\mu$  lのr P45 (陽性対照)、又はdUTPアーゼ貯蔵緩衝液 (負の対照)。両ヒトdUTPアーゼ反応を二重反復して実施した。サンプルを次の通りに循環した：95 $^{\circ}$ Cで1分間 (1サイクル) ; 95 $^{\circ}$ Cで1分間 - 60 $^{\circ}$ Cで1分間 - 72 $^{\circ}$ Cで5.2分間 (30サイクル)。

10  $\mu$  lの個々のPCR反応を、1%アガロース、1 $\times$ TBEゲル上で、臭化エチジウム染色により可視化した (図23を参照のこと)。希釈されていないヒトdUTPアーゼ調製物は、5.2kb

のバンドを生成するために、ポリメラーゼ活性を増強することができた。負の対照により示されるように、いづれかの増強因子の欠失は、失敗したPCRをもたらした。この実験のための陽性対照、すなわち r P 45は、たぶん過度の量（全体的に30ng）が添加されたので、この実験においては作動しなかった。

### 例13．PEFに対する抗体の生成及びウェスタンブロット分析

#### 1．抗 - PEF及び抗 - r P 45 IgGの生成

PEF - 特異的IgGを、多くの生来のPfu DNAポリメラーゼ含有PEFに対して前もって免疫化されたウサギ血清から、イムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製した（精製された生来のPfuポリメラーゼ調製物のゲルを示す図24を参照のこと）。S - 200 - 精製されたPfu PEFを、20mMのHEPES、1 mMのDTT、50mMのKCl、0.05%のTween 20、1 mMのEDTA、及び10%のグリセロールの存在下で、製造業者のプロトコールに従って、AttiGel 10 (BioRad : Hercules, CA) に共有結合した。ウサギ血清（2.4ml）を、10mMのトリス（pH7.5）の存在下で、0.2mlのカラム上に負荷した。カラムを広範に洗浄し、そして特異的IgGを、0.1Mのグリシン - HCl（pH2.5）により、続いて0.1Mのメリエチルアミン（pH11.5）により溶出した。Centricon - 30を用いて、IgGを濃縮し、そして溶出緩衝液をPBSにより交換した。

さらに、r P 45 - 特異的IgGを含む血清を、例10、セクション2に記載のようにして、標識された融合タンパク質として調製された組換えP 45によりウサギを免疫化することによって得た。精製された酵素（0.177mg/ml）が、続く免疫化スケジュールを用いて2匹のNew Zealand白毛ウサギを免疫化するために使用された：完全フロイトアジュバント（CFA）中、90µg/ウサギ；18日後、不完全フロイトアジュバント（IFA）中、45µg/ウサギによる追加免疫化；39日後、第2の追加免疫化；45日後、ウェスタンブロットのための血清サンプルの獲得。

#### 2．抗 - PEF抗体を用いてのウェスタンブロット分析

細胞抽出物を、4 × 50mMのトリス（pH8.2）、10mMのBME、1 mMのEDTA及び10%のグリセロールの溶液への細胞の懸濁、続く、音波処理により調製した。次に、2.5mMのPMSFを添加し、そして細胞残骸を、14,000rpmでの15分間の遠心分離により除去した。PEIを上清液に添加し、0.9%の最終濃度にし、そしてその混合物を再び遠心分離した。上清液（10µl）を、4 ~ 20% SDS - PAGEゲル上で電気泳動し、そしてタンパク質をエレクトロブロットによりニトロセルロースに移した。ブロットを、室温で1時間、1% Blotto / PBSによりブロックし、そして次に、PEF - 特異的IgGと共に4℃で一晩インキュベートした。ブロットを、PBS - 0.05% Tween 20により洗浄し、そして次に、アルカリホスファターゼ - 接合されたヤギ抗 - ウサギIgGと共にインキュベートした。ブロットを洗浄し、そして次に、色彩進行溶液（100mMのトリス - HCl、pH9.5、100mMのNaCl、5 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.3mg/mlのNBT、及び0.15mg/mlのB（IP）において約1 ~ 2分間インキュベートした。酵素反応を停止し、そして膜を脱イオン水により5度、洗浄した。

図25は、ウェスタンブロットの結果を示す。抽出物を、P・フリオサスの5種の異なる発酵から調製した（レーン1 ~ 5）。さらに、T・アクアチカスからの3種の抽出物又は部分的に精製されたカラム画分（レーン6 ~ 8）、及びE・コリからの1つの抽出物（レーン9）をまた実施した。精製されたPEF（550ng）及び予備染色された分子量マーカーを、それぞれ、レーン10及び11において実施した。マーカーを除いて、すべてのサンプルを、負荷の前、SDS / BME染料において煮沸した。その結果は、PEF - 特異的IgGが、P 50及びP 45成分を包含する粗Pfu抽出物におけるPEF複合体の成分に結合し、そしてその成分と交差反応することを示す。対照的に、交差反応は、T・アクアチカス又はE・コリからの抽出物に関しては、観察されなかった。

#### 3．抗 - r P 45血清を用いての生来のPEF及び組換えP 45のウェスタンブロット検出

生来のPEFサンプルを、4 ~ 20%のグラジエントのトリス - グリシンSDSゲル上で電気泳動した。サンプルを変性しないで（P 300形）、又は部分的（2% SDSにおける煮沸；P 45形）又は完全な（2% SDS + 1% TCAにおける煮沸）変性の後、負荷した。サンプルをニトロセルロースに移し、そしてブロットを上記のようにして進行せしめ、但し、組換えP 45に

より免疫化されたウサギからの血清を用いた（1：1000で希釈された）。

図26においては、組換えP45に対して特異的な抗体が、生来のPEFの変性され、部分的に変性され、そして十分に変性されたサンプルにおけるバンドと交差反応する。有力なバンドは、加熱されていないレーンに存在するP300凝集体（P45/P50）、煮沸された/SDSサンプルに存在する45kD（部分的に変性された）形、及びたぶん、十分に変性されたモノマーを表わす、煮沸された/2%SDSレーンに存在する17kD（十分に変性された）形である。生来のP45のそれらの異なった凝集状態の他に、P45の追加の形、又は組換えP45調製物に存在するE.コリ汚染物と通常のエピトープを共有するピロコーカスタンパク質に対する抗体の交差反応を表わすことができる、ウェスタンブロットに存在するマイナーなバンドもまた存在する。

10

上記からのPEF-特異的IgGに関しては、抗-rP45血清がまた、他の種からの免疫化学的に関連するタンパク質を同定するために使用され得る。図27においては、rP45-特異的IgGが、細菌（バシラス種、T.アクアチカス）、原生生物（P.フリオサス、M.サーモアウトトロピカム（M.thermoautotropccum）、及び特徴化されていない種）及びヒト細胞（HL60リンパ腫）からの細胞抽出物を含むブロットをプローブするために使用された。その得られる結果は、抗体が、精製された生来のPEFと同じ見掛け分子量を伴って移動する、P.フリオサス、特徴化されていない種、及びヒト細胞系からのタンパク質に結合することを示す。抗体はまた、バシラス及びM.サーモアウトトロピカム抽出物におけるタンパク質と弱く結合するが、但し、それらのバンドはP.フリオサスPEF種よりも異なった見掛け分子量を伴って移動する。PEF-特異的IgGに関しては、T.アクアチカス抽出物との交差反応性は検出されなかった。

20

別のウェスタンブロットにおいては、サーマス・サーモフィリスからのサンプルを、SDS-PAGEゲル上で実施し、rP45抗血清によりプローブした。rP45抗体は約24kDのバンド（16kD及び30kDのマーカー間）、及び推定できるダイマー又はマルチマー形のサイズの約2倍のもう一つのバンドに結合する。これは、PEF活性又はタンパク質が、T.サーモフィリスのサンプルに存在することを示す。それらのサンプルにおけるdUTPアーゼ活性としてのPEFをさらに、逆相HPLCを用いてのdUTP転換アッセイにより確かめた。そのアッセイは、T.サーモフィリスサンプルによるdUTPのターンオーバーを検出するが、しかし対照サンプルは、存在するdUTPの検出できるターンオーバーを示さなかった。

30

#### 例14. 核酸複製反応へのPEF複合体の使用

最初に、そして使用されるDNAポリメラーゼの活性を確かめるための対照として、ギャップのある複合ウシ胸腺DNA（Pharmacia）アッセイを行なった。ポリメラーゼカクテルは次の成分を含んだ：50mMのトリス-HCl, pH8.0, 5mMのMgCl<sub>2</sub>, 1mMのDTT, 50µg/mlのBSA, 4%のグリセロール、200µMの個々のdNTP、[<sup>3</sup>H]TTP（0.5mCi/µモルの最終濃度）、及び250µg/mlの活性化されたウシ胸腺DNA（Pharmacia）。Pfu DNAポリメラーゼ又はP.フリオサスPEFを含むサンプルを、Pfu DNAポリメラーゼ貯蔵緩衝液（50mMのトリス-HCl, pH8.2, 0.1%のNP-40, 0.1%のTween-20, 0.1mMのEDTA, 1mMのDTT, 50%のグリセロール）により連続的に希釈し、そして次に、個々の希釈溶液1µlを、ポリメラーゼカクテル10µlアリコートに添加した。重合反応を、72°Cで30分間、三重反復して実施した。延長反応を氷上で停止し、そして次に、5µlのアリコートを、DE81フィルター（Whatman）上にすぐにスポットした。組込まれなかった[<sup>3</sup>H]TTPを、2×SSC（0.3MのNaCl, 30mMのクエン酸ナトリウム、pH7.0）による6回の洗浄、続いて、100%エタノールによる1回の洗浄により除去した。組込まれた放射能を、シンチレーションカウンターにより測定した。アッセイを、DE-81フィルター上の既知量の[<sup>3</sup>H]TTPを計数することによって検量し、洗浄段階を排除する。1単位のポリメラーゼ活性は、72°Cで30分間、ポリマー形（DE-81紙に結合する）中への10nモルの全dNTPの組込みを触媒する酵素の量として定義される。ポリメラーゼ濃度（U/ml）は、単位-対-酵素体積のプロットの直線部分の傾斜から推定される。

40

試験されるPEFサンプルは有意なDNAポリメラーゼ活性を示さず、そしてPfu DNAポリメラーゼは2~4×10<sup>4</sup>U/mgの比活性を示した。

50

### 1. クローン化されたPfu DNAポリメラーゼのPfu PEFによる増強

P. フリオサスPEFは、プラスミド、及びゲノムDNA鋳型を用いて組換えPfu DNAポリメラーゼにより生成されるPCR生成物の収率を高めることが示されている(図28~30)。その結果は、P. フリオサスPEFの添加が標的物複合性の範囲の種々のPCRシステムについてのPCR生成物を高めることを示す。比較的容易な標的物、たとえばプラスミドDNAがPfu DNAポリメラーゼにより都合良く増幅され得、そしてPEFの添加はさらに、生成物収率を高める(図28)。本発明者は、より少ないPCRサイクル又はより低い鋳型濃度がPEF-含有反応に使用され得ることを見出しており、これは、記載されるタンパク質及び組成物、及びそれらを使用する方法の好都合な性質を示す。

最も劇的な増強は、長く(図29)且つ/又は高い(図30)複合標的物が増幅される場合に観察された。PEFの存在は、単一の酵素PCR反応により、しばしば不良に増幅されるそれらの標的物の増幅を、意外に及び有意に改良する。図29においては、5 UのPfu DNAポリメラーゼを含む100 µlのPCR反応への1~100ngのPEF(S 200-精製されたPEF;調製物3)の添加が、10kbのPCR生成物の収率を有意に高めた。図30においては、5.2kbの標的物が、1 kbの延長時間当たり1.9分の使用にかかわらず、100 µlのPCR当たり0.3~280ngのPEF(SCS # 52のS 200精製された)の存在下でヒトゲノムDNAかつ都合良く増幅されたが、しかしPEFの不在下では増幅されなかった。

P. フリオサスPEFは、増幅が1つよりも多くの標的物にハイブリダイズするPCRプライマーにより低い緊縮PCR条件下で実施される場合、特異的及び非特異的PCR生成物の収率を高めることが見出された。E. コリssb(一本鎖結合タンパク質;StratageneのPerfect Match)は、たぶん、適合のよくないプライマー鋳型複合体の形成を最少にすることによって、プライマー延長反応の特異性を高めることが前に示されている。E. コリssbと共に使用される場合、P. フリオサスPEFは、特異的PCR生成物の収率を高めることが見出されている(図31)。Pfu PEFはまた、エキソ-Pfu、及びTaq及びPfuポリメラーゼの混合物(たとえば、TaqPlus Long™, Stratagene; La Jolla, CA)により得られるPCR生成物の収率を高める。従って、Pfu PEFは、ポリメラーゼ変異体、ポリメラーゼの切断されたバージョン、ポリメラーゼの混合物、及びポリメラーゼ-添加剤の組合せ(たとえば、Perfect Match<sup>R</sup>, Stratagene)に関して有用である。

### 2. Pfu PEFによる生来のPfu DNAポリメラーゼの増強

P. フリオサスからのPEFの同定に続いて、本発明者は、生来のPfu DNAポリメラーゼ調製物の一定ロットが、PEFを含むことを認識した。種々の量の250kD以上の凝集体が銀-染色されたSDS-PAGEゲル上に検出された(たとえば、図24におけるロット38及び46)。試験された23の調製物のうち11の調製物は、低レベル(8/11のロット;0.1~1%の合計タンパク質)~高レベル(3/11のロット;10~30%の合計タンパク質)のPEFを可視的に含むことが見出された。PEFは、Pfu DNAポリメラーゼ精製における初期日-及びSP-Sepharoseカラム処理の間、Pfu DNAポリメラーゼと共に同時移動し、そしてHeparin Sepharoseカラム上で、Pfu DNAポリメラーゼ活性の主要ピークの直後で溶出する(図32)。Heparin Sepharose段階の後にプールされたPfu DNAポリメラーゼ画分は典型的には、使用されるカラム効率及びプーリング手段に依存して、種々の量のPEFにより汚染される。

種々の量のPEFによる生来のPfu DNAポリメラーゼの汚染は、PCRにおける生来のPfu DNAポリメラーゼの性能におけるロット間変動に実質的に寄与する。2.5 UのPfu DNAポリメラーゼ当たり約1~100ngのPEFを含むロットは、クローン化されたPfu DNAポリメラーゼ、又は2.5 UのPfu DNAポリメラーゼ当たり10pg以下(合計タンパク質の0.02%以下)のPEFにより汚染された生来のPfu DNAポリメラーゼロットにより実施される増幅よりも高いPCR生成物収率を生ぜしめるであろうことが予測される。理論的には、一定のPEF濃度を含むロットは、下記に論じられる高濃度(100 µlのPCRにおける2.5 UのPfu DNAポリメラーゼ当たり900ng以上)でのPEFの明らかな障害に基づいて、低められたPfu DNAポリメラーゼ性能を示すであろう。

生来のPfu DNAポリメラーゼPCR増幅にPEFを添加する場合、生来のPfuの特定ロットに含まれるPEFのレベルは、スミア、合成の障害、又は最適状態に及ばない増強を回避するため

10

20

30

40

50

に考慮されるべきであることが予測される。

#### 例15．増幅反応へのPEFの使用

##### 1．標準PCRプロトコールにおけるPfu PEFの活性

PCR生成物の収率を増強するために、P．フリオサスPEFは、標準のPCR増幅に、別々に添加され、又はDNAポリメラーゼと共に予備混合される。PCR増幅反応は一般的に、次の成分から成る：0.01~0.05 U /  $\mu$  l のDNAポリメラーゼ、2.5pg /  $\mu$  l ~ 1 ng /  $\mu$  l のP．フリオサスPEF、1 ~ 5 ng /  $\mu$  l の個々のプライマー、0.5~10ng /  $\mu$  l のゲノムDNA鋳型、及び適切な緩衝液中、0.2mMの個々のdNTP（ここで、クローン化されたPfu DNAポリメラーゼ緩衝液は次の成分から成る：10mMのKCl, 10mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20mMのトリス-HCl (pH8.8), 2mMのMgSO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) のTriton X-100、及び100ng /  $\mu$  l のBSA) 10  
。低複合性鋳型（たとえば 又はプラスミドDNA）からの増幅は、典型的には、0.1~100 pg /  $\mu$  l のDNAにより好結果をもたらす。PCRに典型的には使用される生来のPEFの最少量は、100  $\mu$  l のPCR反応当たり0.1~0.4 nモルのPPi / 時の開放を触媒するのに十分な酵素の量に対応する（例11、セクション2を参照のこと）。PCR増幅は、次の標準条件下で行なわれる：たとえば、94~96 で0.5~2分間（1サイクル）/ 94~96 で0.5~2分間；50~65 で0.5~2分間；68~72 で0.5~3分間（増幅される標的物の1 kb当たり）（30~40サイクル）/ 72 で0~10分間（1サイクル）。

##### 2．Pfu DNAポリメラーゼ以外のDNAポリメラーゼを用いてのPCR増幅反応の増強

P．フリオサスPEFは、好熱性原生物からの他の - 型（ファミリーB - 関連の）DNAポリメラーゼの性能を増強することが見出されている。増強されたPCR生成物収率は、P．フリオサスPEFが、ピロコーカス及びサーモコーカスの種の両者からのDNAポリメラーゼにより行なわれる増幅に添加される場合に観察された。P．フリオサスPEFにより機能することが示されたDNAポリメラーゼは次のものを包含する：Pwo DNAポリメラーゼ（Boehringer Mannheim；P．ウオエセイ（P. woesei）からクローン化された）、Deep Vent DNAポリメラーゼ（New England Biolabs；P. sp. GBDからクローン化された）、JDF3 DNAポリメラーゼ（Stratagene；P. sp. JDF3からクローン化された）、ES4 DNAポリメラーゼ（Stratagene；P. エンテアポリ（P. endeavori）として改含されたP. sp. ES4から精製された）、及びVent DNAポリメラーゼ（New England Biolabs；T. リトラリス（T. litoralis）からクローン化された）。 20

図33においては、S200 - 精製されたPfu PEF（調製物1）が、2.5 UのPwo DNAポリメラーゼにより得られる6.2kbのPCR生成物の収率を高めた。図34においては、JDF3 DNAポリメラーゼPCRへのS200 - 精製されたPEF（調製物3）の添加が、DNA（レーン5~7；11~13）、及び DNAトランスジーンの40コピー（レーン8~10）又は1コピー（レーン14~16）を含むマウスゲノムDNAから増幅された10kb生成物の収率を高めた。JDF3 DNAポリメラーゼに基づくPCRにおいては、増幅は典型的には、1 Uの酵素及び0.5分/kb標的物の延長時間により実施される。図35においては、ES4, JDF3, Pfu、及びVent DNAポリメラーゼPCRへの5 ngのS200 - 精製されたPEF（調製物3）の添加が、P．フリオサスゲノムDNAから増幅された1.9kbの生成物の収率を高めた。図36においては、P．フリオサスPEFの添加はまた、トランスジェニックマウスゲノムDNAからのDeep Vent DNAポリメラーゼにより増幅された2 kbのPCR生成物の収率を高めることが見出された。 30 40

P．フリオサスPEFの添加は、Taq DNAポリメラーゼにより生成されるPCR生成物の収率を増強することはできない（図34、レーン1~4、及び図23、レーン9~10）。Taq DNAポリメラーゼは、好熱性真正細菌サーマスアクアチカスから始め単離されたPol I - 様（ファミリーA - 関連の）DNAポリメラーゼである。

##### 3．RT-PCR反応の増強

P．フリオサスPEFはまた、当業界においてRT-PCRとして知られている方法において逆転写されたRNA（cDNA）から増幅されたPCR生成物の収率を高めることが示されている。増強は、2 - 段階（図37）及び1 - 管RT-PCRプロトコール（データは示されていない）の両者において観察された。前者の方法においては、cDNA合成反応のアリコートが、好熱性DNAポリメラーゼ（たとえば、Pfu DNAポリメラーゼ）及びP．フリオサスPEFを含むPCR反応 50

に添加される。後者のアプローチにおいては、RNAが、熱不安定性RT、dNTP、プライマー、熱安定性DNAポリメラーゼ（Pfu DNAポリメラーゼ）及びP・フリオサスPEFを含む反応混合物に添加される。cDNA合成及びPCR増幅が、cDNA合成を37～42℃で実施し、続いて高温でPCR増幅を実施することによって、同じ管において連続的に生じる。

2 - 段階RT - PCR方法においては、cDNA合成がまず、次の試薬を組合すことによって実施される（50 µlの最終体積）：300ngのプライマー（オリゴdT、ランダムヘキサマー、又は遺伝子特異的プライマー）にブレイアニールされた5 µgの全RNA；4 mMの個々のdNTP、20 UのRNアーゼブロック（任意）、及び緩衝液（50mMのトリス - HCl（pH8.3）、75mMのKCl、3 mMのMgCl<sub>2</sub>及びBEPC - 処理された水を含む）中、50 UのMMLV RT（又は他のRT）。cDNA合成を、37～42℃で1時間、進行せしめたる。RTの熱不活性化の後、1 µlのcDNAを、次の成分を含む50 µlのPCR反応に添加する：5 UのPfu DNAポリメラーゼ、0.01～50ngのP・フリオサスPEF、1 µMの個々のプライマー及び緩衝液（10mMのKCl、10mMの（NH<sub>4</sub>）<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20mMのトリス - HCl（pH8.8）、3 mMのMgSO<sub>4</sub>、0.1%（v/v）のTriton X-100及び100 µg/mlのBSAから成る）中、0.2mMの個々のdNTP。PCRを次のサイクル条件を用いて行なうことができる：94℃で2分間；60℃で2分間；68℃で1分間（kb当たり）（1サイクル）、及び次に、94℃で1分間；60℃で1分間；68℃で1分間（kb当たり）（40サイクル）。

P・フリオサスPEFによるRT - PCRの増強を、EGF受容体遺伝子において少なくとも1つのイレトマン - エキソン連結部をつなぐよう企画されたPCRプライマーを用いて評価した。2種のプライマー組が使用され（アンチセンス：5' GAG-TTA-AAT-GCC-TAC-ACT-GTA-TCT（配列番号29）；センス：5' CAG-GAC-TCA-GAA-GCT-GCT-ATC-GAA（配列番号30）（1 kb）又は5' CTG-CAC-GTG-CCC-TGT-AGG-ATT-TGT（配列番号31）（3 kb））、それらは、増幅が汚染性DNAよりもむしろスプライスされたRNAから生じる場合、示されるように、1 kb又は3 kbのPCR生成物を生成する。

最適性能を付与するPEF濃度を、本明細書に記載される2 - 段階RT - PCR方法におけるPEF調製物3（S - 200精製された）及び調製物4（ヘパリンセファロース画分）を指摘することによって決定した。PEF調製物4に関しては、1 kbの生成物の収率の有意な上昇が、0.001～1 µlが添加される場合（10pg～10ngのPEF）、観察された。3 kbの生成物の合成は、0.1～1 µl（1～10ngのPEF）の調製物4が添加される場合、有意に増強された。PEF調製物3に関しては、0.6kb及び3 kbの生成物の両収率の有意な上昇が、0.002～0.1 µl（1～50ng）の範囲で試験されたすべての量で観察された。

#### 4. Seamless™クローニングプロトコールの増強

Seamlessクローニングを、StratageneのSeamless™クローニングキット（Stratagene；La Jolla, CA, 1977/1998 Stratagens Catalog、引用により本明細書中に特別に組込まれる）を用いて、推薦されるプロトコールに従って実施した。Seamlessクローニングの効率に対するP・フリオサスPEFの効果が図38に示される。7.2kbのPCR生成物の高められた収率が、5 ngのS - 200精製されたPEF（調製物1）が、2.5 UのPfu DNAポリメラーゼ及びメチル-dCTPを含む50 µlのPCR反応に添加される場合に観察された。PEFの存在下で行なわれる増幅は、kbの延長時間当たり1分を利用した。PEFの不在下で、長い2分/kb延長時間の使用にかかわらず、ひじょうに少ないPCR生成物が生成された。

#### 5. 線状増幅反応の増強：Quik Change™突然変異誘発プロトコール

部位特異的突然変異誘発を、Pfu DNAポリメラーゼを用いる線状増幅に基づく方法を用いて二本鎖DNA鋳型により効果的に達成することができる（Quik Change™部位特異的突然変異誘発キット；Stratagene；La Jolla, CA, 1997/1998 Stratagene Catalog、引用により本明細書に特別に組込まれる）。所望する突然変異を含むPCRプライマーを、対立する鎖上の同じ部位にアニールするよう企画する。プライマー延長反応を、鎖置換活性の不在下で効果的な合成を可能にする温度（68℃）で、熱安定性DNAポリメラーゼ（たとえば、Pfu DNAポリメラーゼ）により行なった。増幅生成物をDpn Iにより処理し、メチル化された親プラスミドDNAを消化し、そして次に、得られる、ギャップのある二本鎖DNAを用いて、コンピテントE. コリ細胞を形質転換した。変異体クローンを、DNA配列決定により同定



する。

P・フリオサスPEFを評価する場合、突然変異誘発を、StratageneのQuik Change突然変異誘発キットを用いて行なったが、但し、組換え及び生来のPfu DNAポリメラーゼがキット - 供給された反応緩衝液において使用された。Quik Change突然変異誘発に対するP・フリオサスPEFの効果が図39に示される。50  $\mu$  lの反応へのPEF調製物2（ヘパリンセファロース画分ロット36 H.S.#78；40ng /  $\mu$  l）のPEF 0.04 ~ 4 ngの添加が生来の及びクローン化されたPfu DNAポリメラーゼにより生成される形質転換体の数を高め、そして90 ~ 97%の突然変異頻度を保持する。最適な効果が、0.4ngのPEFにより得られ、これは、それぞれ、生来の及びクローン化されたPfu DNAポリメラーゼにより生成される変異体コロニーの数の7.5倍及び5.3倍の上昇性を付与した。

Quik Change™突然変異誘発プロトコールへのPEFの使用は、当業界において知られている他の線状増幅反応、たとえばサイクル配列決定反応、プライマー延長反応及び同様の反応へのPEFの使用に対応する。PEFは、使用されるポリメラーゼの活性を増強するために、いづれの線状増幅方法にも使用され得る。たとえば、サイクル配列決定に対するPfu PEFの効果が、PEFの不在及び存在下で、ポリメラーゼ、たとえばエキソ-Pfu DNAポリメラーゼにより生成される配列決定ラダーの性質及び長さを比較することによって評価され得る。当業者に知られている多くの異なったサイクル配列決定反応は、ポリメラーゼ活性を増強するために、本発明のPEF複合体及びタンパク質と組合して使用され得る。さらに、プライマー延長反応はまた、PEFの使用により増強され得る。多くのプライマー延長反応が当業界において知られている。

#### 例16 . PEFの増強力価

Pfu PEFのいくつかの異なった調製物の核酸複製増強活性は、PCR、PCR - 関連応用法、線状増幅に基づく応用法、突然変異誘発応用法、サイクル配列決定応用法、及びプライマー延長応用法において評価され得る。当業者は、いづれかのPEFの使用を最適化するための類似する方法、たとえば本明細書に特別に論じられる方法が本明細における開示から明らかであることを理解するであろう。実質的に均質のPEF（たとえば、S200 - 精製された）のサンプルは、10,000倍の範囲に及び濃度（0.09 ~ 900ng / 100  $\mu$  l）で添加される場合、PCR増幅反応においてPfu DNAポリメラーゼの性能を増強する。増幅された生成物の最高収率は、約1 ~ 100ngのP50の存在下で観察される。過剰のPEF（2900ng / 100  $\mu$  l、ここでタンパク質濃度は、既知のタンパク質標準に比較して、P50バンドの銀 - 染色強度により決定された）又はひじょうに低いPEF濃度（< 9 pg / 100  $\mu$  l）のPCR反応への添加は、低いPCR生成物の収率をもたらした。

4種の調製物の相対純度及びPEF含有率を、SDS - PAGE分析により試験した（図10）。調製物1及び3は、95%以上の均質性のS200 - 精製されたPEFから成り、そして調製物2及び4は10 ~ 20%の均質性の濃縮されたヘパリンセファロース画分から成る。

S200 - 精製されたP・フリオサスPEF（調製物1；図40及び41）のPCR増強力価を、例1に記載されるF432 - 21 / R6656 - 20 / AA742プライマー - 鋳型システムを用いて決定した。この調製物は、約95%の純度であり、< 0.001 U /  $\mu$  lのDNAポリメラーゼ活性及び約225ng /  $\mu$  l PEFを含む。PCR増強活性は、0.004 ~ 0.4  $\mu$  l（0.9 ~ 90ng）の均質P・フリオサスPEFが、2.5UのPfu DNAポリメラーゼを含む100  $\mu$  lのPCR反応に添加される場合に最適であることが見出された。低められているが、しかし有意なPCR生成物収率が、4  $\mu$  l（900ng）又は0.0004  $\mu$  l（0.09ng）のS200 - 精製されたタンパク質が添加される場合に観察された（図40）。第2の同一の実験においては、有意な増強が、0.004 ~ 4  $\mu$  lが添加される場合に示され、そしてひじょうに低い改良点が、0.0004  $\mu$  lに関して示された（図41）。

PEF調製物2のPCR増強力価をまた決定した（図42 ~ 43）。調製物2は、濃縮された（Microcon - 30）ヘパリンセファロース画分から成り、ここでP・フリオサスPEFは約10%の全タンパク質から製造され、そして約40ng /  $\mu$  lで存在した。増強されたPCR生成物収率は、0.0002 ~ 0.2  $\mu$  l（0.008 ~ 8 ng）のカラム画分が、2.5UのPfu DNAポリメラーゼを含む100  $\mu$  lのPCR反応に添加される場合に観察され、そして最高の増強が0.002 ~ 0.2  $\mu$

10

20

30

40

50

1 (0.08 ~ 8 ng) の範囲で観察された (図42)。第2の同一の実験においては、増強されたPCR生成物収率が、0.004 ~ 0.04  $\mu$  l (0.16 ~ 1.6ng) のPEF調製物2が100  $\mu$  lのPCR反応当たり2.5UのDNAポリメラーゼに添加される場合に観察された (図43)。PCR生成物は、4  $\mu$  l (160ng) 又は0.0004  $\mu$  l (0.016ng) のカラム画分の存在下で観察されたが、ところがスミアは、0.4  $\mu$  l (16ng) のカラム画分がPCRに添加される場合に生成された。スミア性PCR生成物がまた、最高濃度のPEFを含む1  $\mu$  lのヘパリンセファロース画分がPCRに添加される場合、以前に示されている (たとえば、図44におけるロット37 H.S. 画分69 ~ 81 ; 図31におけるPEF調製物2)。

要約すれば、実質的に均質なP. フリオサスPEFは、10,000倍範囲に及び濃度 (0.09 ~ 900ng / 100  $\mu$  l) で添加される場合、試験PCR増幅においてPfu DNAポリメラーゼの性能を増強する。最高の収率が、約1 ~ 100ngのPEFの存在下で観察される。PCR反応への過剰のPEF (2900ng / 100  $\mu$  l) 又は9 pg / 100  $\mu$  l以下のPEFの添加は、低められた性能 (低いPCR生成物収率) を付与することが見出された。部分的に精製されたPEFサンプル (ヘパリンセファロースカラム画分) はまた、かなり広い範囲のPEF濃度にわたって、PCR生成物収率を増強すると思われる。本明細書において分析されるカラム画分によれば、PCRの最高の収率が0.08ng ~ 8 ngの範囲で得られた。より高い量のカラム画分の添加は、スミア (smear) (16 ~ 40ng) 又は増強の欠失 (160ng) をもたらした。

高濃度のPEFでのPCR増強の障害は、PEFサンプルの純度にかかわらず生じるとされる。より高い濃度の均質PEF (2900ng) の添加は、< 900ngのPEFにより得られるよりもPCR生成物のより低い収率をもたらした。10 ~ 20%の純度のヘパリンセファロース画分はまた、高い量のPEFが添加される場合、低められたPCR生成物収率を付与した。調製物2における8 ngまでのPEF (H.S. #78画分) が、スミア又は障害が生じる前、添加され得る。部分的に精製されたカラム画分 (> 16ng) と比較して、均質調製物 (900ng) において障害性であるPEFの量間の矛盾は、追加のタンパク質又はDNA汚染物がヘパリンセファロース画分に存在することを示唆する。

ヘパリンセファロース画分の試験は、P. フリオサスPEFが、Pfu DNAポリメラーゼ活性の主要ピークの直後に溶出することを示した (たとえば、図32における画分50 ~ 61)。SDS-PAGE分析は、最高レベルの> 250kD PEFが生来のPfu DNAポリメラーゼ精製からの画分63 ~ 78に出現したことを示した (図32)。PCR増強活性が画分37 ~ 90において観察された (図44)。別々のPCR生成物バンドが、ひじょうに低いレベルのPEFを含む画分37 ~ 48及び87 ~ 90により生成された。興味あることには、DNAスミアが、最高レベルのPEFを含むか又は検出できるPfu DNAポリメラーゼを含まない画分69 ~ 81により生成された (図44)。それらの結果は、P. フリオサスPEFが、高濃度で存在する場合、障害物質として作用する仮説と一致する。しかしながら、重合及びPCR反応に悪影響を及ぼすのに十分な高さの濃度が、本明細書に記載される方法及びアッセイを通して容易に決定され得る。従って、当業者は、ポリメラーゼ活性又はPCR反応を、不適當な実験を伴わないで、障害するPEFの濃度を回避することができる。

PCRにより観察されるように、線状増幅プロトコール間の障害が、高濃度のPEF - 含有ヘパリンセファロース画分により示された (図39)。Quick Change<sup>TM</sup>への40ngのPEF (1  $\mu$  lの調製物#2) の添加は、アガロースゲル上のDNAバンドの臭化エチジウム - 染色強度に低下により可視化されるように、増幅された生成物の低められた収率をもたらした。低められた収率は、形質転換体の数の1.8 ~ 2.8倍の低下、及びわずかであるが、しかし再生できる、突然変異頻度の低下を伴う。

均質PEF調製物による障害についての可能且つ最も本當らしい説明は、dCTPの消耗である。例11、セクション1において、本発明者は、PEFが、dUTPよりも効率的ではないが、基質としてdCTPを使用できることを示した。高いPEF濃度で、十分なdCTPが、最適なDNA合成のために必要とされるレベル以下にdCTPレベルを低めるためにPEFにより加水分解されることが可能である。中位 ~ 高レベルのPEFが、DNAポリメラーゼの誤った組込み速度に影響を及ぼすのに十分にdCTPレベルを変更することが可能である。他方では、実質的に均質なPEF調製物における汚染物がまた、障害を引き起こし、そして高濃度のPEFが使用される

10

20

30

40

50

場合、十分な濃度で存在することができる。

本明細書に言及される個々の引例は、本発明の態様を製造し、そして使用する当業者に依存する。さらに、個々の引例は、全体としてこの開示中に特別に組込まれる。

次の配列列挙情報は、引例により本明細書に組込まれる従来のアメリカ特許出願第08/822,744号における配列を組込む。いずれか1つの配列又はいずれかの配列の組合せからの配列情報は、当業者によりコンピューター読取り媒体中に翻訳され得る。さらに、本明細書に記載され、又は同定される特定のクローン又はプラスミドの配列は、当業者により、容易に決定され得、そしてコンピューター読取り媒体に使用され得る。

#### 配列表

(1) 一般情報:

(i) 出願人: HOGREFE, Holly HANSEN, Connis J

(ii) 発明の名称: ポリメラーゼ増強因子 (PEF) 抽出物、PEFタンパク質複合体、単離されたPEFタンパク質、及び精製及び単離方法

(iii) 配列の数: 89

(2) 配列番号1についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 15個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未知

(D) トポロジー: 未知

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: N - 末端

(Xi) 配列: 配列番号1:

Xaa	Xaa	Leu	His	His	Val	Lys	Leu	Ile	Tyr	Ala	Thr	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15

(2) 配列番号2についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 15個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 未知

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: N - 末端

(Xi) 配列: 配列番号2:

Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Asp	Trp	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Glu	Xaa	Leu	Xaa	Xaa
1				5				10						15

(2) 配列番号3についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 35個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 未知

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: N - 末端

(Xi) 配列: 配列番号3:

10

20

30

40

Xaa Leu Leu His His Val Lys Leu Ile Tyr Ala Thr Lys Xaa Arg Xaa  
 1 5 10 15  
 Leu Val Gly Lys Xaa Ile Val Leu Ala Ile Pro Gly Xaa Xaa Ala Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa  
 35

( 2 ) 配列番号 4 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 18個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

10

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : N - 末端

( X i ) 配列 : 配列番号 4 :

Xaa Xaa Xaa Pro Asp Trp Xaa Xaa Arg Xaa Glu Xaa Leu Xaa Glu Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa

( 2 ) 配列番号 5 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

20

( A ) 長さ : 17個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

( X i ) 配列 : 配列番号 5 :

Xaa Tyr Asp Ala Val Ile Met Ala Ala Ala Val Val Asp Phe Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Lys

30

( 2 ) 配列番号 6 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

40

( X i ) 配列 : 配列番号 6 :

Ala Asp Leu Val Val Gly Asn Thr Leu Glu Ala Phe Gly Ser Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Asn Gln Val Val Leu Ile Gly Arg  
 20

( 2 ) 配列番号 7 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 17個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

50

- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイボセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : N - 末端
- ( X i ) 配列 : 配列番号 7 :

Gly Ala Met Leu His His Val Lys Leu Ile Tyr Ala Xaa Lys Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Lys

( 2 ) 配列番号 8 についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 : 10
- ( A ) 長さ : 18個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイボセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : N - 末端
- ( X i ) 配列 : 配列番号 8 :

Gly Ala Met Leu His His Val Lys Leu Ile Tyr Ala Thr Lys Xaa Xaa  
 1 5 10 15 20  
 Arg Lys

( 2 ) 配列番号 9 についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 13個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイボセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : N - 末端 30
- ( X i ) 配列 : 配列番号 9 :

Met Leu His His Val Lys Leu Ile Tyr Ala Thr Lys Leu  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号 10 についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 16個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイボセティカル : NO 40
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : N - 末端
- ( X i ) 配列 : 配列番号 10 :

Gly Xaa Xaa Xaa Pro Asp Trp Xaa Xaa Lys Phe Arg Lys Glu Glu Ser  
 1 5 10 15

( 2 ) 配列番号 11 についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 17個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸 50

( D ) トポロジー : 未知  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド  
 ( iii ) ハイポセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : NO  
 ( v ) フラグメント型 : N - 末端  
 ( X i ) 配列 : 配列番号11 :  
**Gly Ala Ile Leu Leu Pro Asp Trp Lys Ile Arg Lys Glu Ile Leu Ile**  
**1 5 10 15**  
**Glu**

( 2 ) 配列番号12についての情報 : 10  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 16個のアミノ酸  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 未知  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド  
 ( iii ) ハイポセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : NO  
 ( v ) フラグメント型 : N - 末端  
 ( X i ) 配列 : 配列番号12 :  
**Xaa Met His His Val Ile Lys Leu Xaa Tyr Ala Thr Xaa Ser Arg Lys**  
**1 5 10 15**

( 2 ) 配列番号13についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 18個のアミノ酸  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( D ) トポロジー : 未知  
 ( ii ) 配列の種類 : ペプチド  
 ( iii ) ハイポセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : NO  
 ( v ) フラグメント型 : N - 末端 30  
 ( X i ) 配列 : 配列番号13 :  
**Met Leu Tyr Leu Val Arg Pro Asp Trp Lys Arg Arg Lys Glu Ile Leu**  
**1 5 10 15**  
**Ile Glu**

( 2 ) 配列番号14についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 23個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 未知 40  
 ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイポセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : NO  
 ( X i ) 配列 : 配列番号14 :  
**CAYCAYGAHA ARYTHATTTA CGC** 23

( 2 ) 配列番号15についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 23個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖 50

- ( D ) トポロジー : 未知  
 ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : NO  
 ( X i ) 配列 : 配列番号15 :  
**GCCATDATNA CDGCRTC GTA TTT** 23
- ( 2 ) 配列番号16についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 23個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸 10  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 未知  
 ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : NO  
 ( X i ) 配列 : 配列番号16 :  
**CAYCAYGAHA ARYTHATATA CGC** 23
- ( 2 ) 配列番号17についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 :  
 ( A ) 長さ : 20個の塩基対 20  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 未知  
 ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : YES  
 ( X i ) 配列 : 配列番号17 :  
**ARDACDACYT GRITTTTCTTC** 20
- ( 2 ) 配列番号18についての情報 :  
 ( i ) 配列の特徴 : 30  
 ( A ) 長さ : 1209個の塩基対  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 未知  
 ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル : NO  
 ( iv ) アンチセンス : NO  
 ( X i ) 配列 : 配列番号18 :

ATGCTTCACC	ACGTCAAGCT	AATCTACGCC	ACAAAAAGTC	GAAAGCTAGT	TGAAAAAAG	60
ATAGTCNNNN	NNNNNCCAGG	GAGTATTGCG	GCTTTGGATG	TGAAAGCTTG	TGAGGGACTA	120
ATTAGGCATG	GGGCCGAAGT	TCATGCAGTG	ATGAGTGAGG	CAGCCACCAA	GATAATTCAT	180
CCTTATGCAT	GGAATTTGCC	CACGGGAAAT	CCAGTCATAA	CTGAGATCAC	TGGATTTATC	240
GAGCATGTTG	AGTTAGCAGG	GGAACATGAG	AATAAAGCAG	ATTTAATTTT	GGTTTGTCTT	300
GCCACTGCCA	ACACAATTAG	TAAGATTGCA	TGTGGAATAG	ATGATACTCC	AGTAACTACA	360
GTCGTGACCA	CAGCATTTC	CCACATTCCA	ATTATGATAG	CCCCAGCAAT	GCATGAGACA	420
ATGTACAGGC	ATCCCATAGT	AAGGGAGAAC	ATTGAAAGGT	TAAAGAAGCT	TGGCGTTGAG	480
TTTATAGGAC	CAAGAATTGA	GGAGGGAAAAG	GCAAAAGTTG	CAAGCATTGA	TGAAATAGTT	540
TACAGAGTTA	TTAAAAAGCT	CCACAAAAAA	ACATTGGAAG	GGAAGAGAGT	CCTAGTAACG	600
GCGGGAGCAA	CAAGAGAGTA	CATAGATCCA	ATAAGATTCA	TAACAAATGC	CAGCAGTGGA	660
AAAATGGGAG	TAGCGTTGGC	TGAAGAAGCA	GATTTTAGAG	GAGCTGTTAC	CCTCATAAGA	720
ACAAAGGGAA	GTGTAAAGGC	TTTTAGAATC	AGAAAAATCA	AATTGAAGGT	TGAGACAGTG	780
GAAGAAATGC	TTTCAGCGAT	TGAAAATGAG	TTGAGGAGTA	AAAAGTATGA	CGTAGTTATT	840
ATGGCAGCTG	CTGTAAGCGA	TTTTAGGCCA	AAAATTAAAG	CAGAGGGAAA	AATTTAAAAGC	900
GGAAGATCAA	TAACGATAGA	GCTCGTTCCN	NNNAATCCCA	AAATCATTGA	TAGAATAAAG	960
GAAATTCAAC	CAAATGTCTT	TCTTGTTGGA	TTTAAAGCAG	AACTTCAA	AGAAAAGCTT	1020
ATAGAAGAAG	GTAAAAGGCA	GATTGAGAGG	GCCAAGGCTG	ACTTAGTCGT	TGGTAACACA	1080
TTGGAAGCCT	TTGGAAGCGA	GGAAAACCAA	GTAGTATTAA	TTGGCAGAGA	TTTCACAAA	1140
GAACTTCCAA	AAATGAAAAA	GAGAGAGTTA	GCAGAGAGAA	TTTGGGATGA	GATAGAGAAA	1200
TTNCTGTCC						1209

10

( 2 ) 配列番号19についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 403個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iii ) ハイポセティカル : NO

( X i ) 配列 : 配列番号19 :

20



Met Leu His His Val Lys Leu Ile Tyr Ala Thr Lys Ser Arg Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Val Gly Lys Lys Ile Val Xaa Xaa Xaa Pro Gly Ser Ile Ala Ala Leu  
 20 25 30  
 Asp Val Lys Ala Cys Glu Gly Leu Ile Arg His Gly Ala Glu Val His  
 35 40 45  
 Ala Val Met Ser Glu Ala Ala Thr Lys Ile Ile His Pro Tyr Ala Trp  
 50 55 60  
 Asn Leu Pro Thr Gly Asn Pro Val Ile Thr Glu Ile Thr Gly Phe Ile  
 65 70 75 80

Glu His Val Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Asn Lys Ala Asp Leu Ile  
 85 90 95  
 Leu Val Cys Pro Ala Thr Ala Asn Thr Ile Ser Lys Ile Ala Cys Gly  
 100 105 110  
 Ile Asp Asp Thr Pro Val Thr Thr Val Val Thr Thr Ala Phe Pro His  
 115 120 125  
 Ile Pro Ile Met Ile Ala Pro Ala Met His Glu Thr Met Tyr Arg His  
 130 135 140  
 Pro Ile Val Arg Glu Asn Ile Glu Arg Leu Lys Lys Leu Gly Val Glu  
 145 150 155 160  
 Phe Ile Gly Pro Arg Ile Glu Glu Gly Arg Ala Lys Val Ala Ser Ile  
 165 170 175  
 Asp Glu Ile Val Tyr Arg Val Ile Lys Lys Leu His Lys Lys Thr Leu  
 180 185 190  
 Glu Gly Lys Arg Val Leu Val Thr Ala Gly Ala Thr Arg Glu Tyr Ile  
 195 200 205  
 Asp Pro Ile Arg Phe Ile Thr Asn Ala Ser Ser Gly Lys Met Gly Val  
 210 215 220  
 Ala Leu Ala Glu Glu Ala Asp Phe Arg Gly Ala Val Thr Leu Ile Arg  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Gly Ser Val Lys Ala Phe Arg Ile Arg Lys Ile Lys Leu Lys  
 245 250 255  
 Val Glu Thr Val Glu Glu Met Leu Ser Ala Ile Glu Asn Glu Leu Arg  
 260 265 270  
 Ser Lys Lys Tyr Asp Val Val Ile Met Ala Ala Ala Val Ser Asp Phe  
 275 280 285  
 Arg Pro Lys Ile Lys Ala Glu Gly Lys Ile Lys Ser Gly Arg Ser Ile  
 290 295 300  
 Thr Ile Glu Leu Val Pro Xaa Asn Pro Lys Ile Ile Asp Arg Ile Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Ile Gln Pro Asn Val Phe Leu Val Gly Phe Lys Ala Glu Thr Ser  
 325 330 335  
 Lys Glu Lys Leu Ile Glu Glu Gly Lys Arg Gln Ile Glu Arg Ala Lys  
 340 345 350  
 Ala Asp Leu Val Val Gly Asn Thr Leu Glu Ala Phe Gly Ser Glu Glu  
 355 360 365

Asn Gln Val Val Leu Ile Gly Arg Asp Phe Thr Lys Glu Leu Pro Lys  
 370 375 380  
 Met Lys Lys Arg Glu Leu Ala Glu Arg Ile Trp Asp Glu Ile Glu Lys  
 385 390 395 400  
 Xaa Leu Ser

( 2 ) 配列番号20についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 33個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

- ( D ) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
(iii) ハイボセティカル : NO  
(iv) アンチセンス : NO  
( X i ) 配列 : 配列番号20 :  
**CATAGCGAAT TCGCAAACC TTTCGCGGTA TGG** 33
- ( 2 ) 配列番号21についての情報 :  
(i) 配列の特徴 :  
(A) 長さ : 33個の塩基対  
(B) 型 : 核酸 10  
(C) 鎖の数 : 一本鎖  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
(iii) ハイボセティカル : NO  
(iv) アンチセンス : YES  
( X i ) 配列 : 配列番号21 :  
**ACTACGGAAT TCCACGGAAA ATGCCGCTCA TCC** 33
- ( 2 ) 配列番号22についての情報 :  
(i) 配列の特徴 :  
(A) 長さ : 20個の塩基対 20  
(B) 型 : 核酸  
(C) 鎖の数 : 一本鎖  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
(iii) ハイボセティカル : NO  
(iv) アンチセンス : NO  
( X i ) 配列 : 配列番号22 :  
**GGCGTTTCCG TTCTTCTTCG** 20
- ( 2 ) 配列番号23についての情報 :  
(i) 配列の特徴 : 30  
(A) 長さ : 20個の塩基対  
(B) 型 : 核酸  
(C) 鎖の数 : 一本鎖  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
(iii) ハイボセティカル : NO  
(iv) アンチセンス : YES  
( X i ) 配列 : 配列番号23 :  
**CCATCTCACG CGCCAGTTTC** 20
- ( 2 ) 配列番号24についての情報 : 40  
(i) 配列の特徴 :  
(A) 長さ : 23個の塩基対  
(B) 型 : 核酸  
(C) 鎖の数 : 一本鎖  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )  
(iii) ハイボセティカル : NO  
(iv) アンチセンス : NO  
( X i ) 配列 : 配列番号24 :

<b>GAGGAGAGCA GGAAAGGTGG AAC</b>	<b>23</b>	
( 2 ) 配列番号25についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 21個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイボセティカル : NO		10
( iv ) アンチセンス : YES		
( X i ) 配列 : 配列番号25 :		
<b>GCTGGGAGAA GACTTCACTG G</b>	<b>21</b>	
( 2 ) 配列番号26についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 19個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		20
( iii ) ハイボセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号26 :		
<b>GAGCTTGCTC AACTTTATC</b>	<b>19</b>	
( 2 ) 配列番号27についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 23個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		30
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイボセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : YES		
( X i ) 配列 : 配列番号27 :		
<b>GATAGAGATA GTTCTGGAG ACG</b>	<b>23</b>	
( 2 ) 配列番号28についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 23個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		40
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイボセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : YES		
( X i ) 配列 : 配列番号28 :		
<b>CGGGATATCG ACATTCTGC ACC</b>	<b>23</b>	
( 2 ) 配列番号29についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 24個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		50

( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : YES		
( X i ) 配列 : 配列番号29 :		
<b>GAGTTAAATG CCTACACTGT ATCT</b>	24	
( 2 ) 配列番号30についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 24個の塩基対		10
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号30 :		
<b>CAGGACTCAG AAGCTGCTAT CGAA</b>	24	
( 2 ) 配列番号31についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		20
( A ) 長さ : 24個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号31 :		
<b>CTGCACGTGC CCTGTAGGAT TTGT</b>	24	
( 2 ) 配列番号32についての情報 :		30
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 23個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号32 :		
<b>CCAGAYTGGA ARWKNAGGAA AGA</b>	23	40
( 2 ) 配列番号33についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 23個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号33 :		50

<b>CCAGAYTGGA ARWKNAGAAA AGA</b>	<b>23</b>	
( 2 ) 配列番号34についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 23個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		10
( X i ) 配列 : 配列番号34 :		
<b>CCAGAYTGGA ARWKNAGGAA GGA</b>	<b>23</b>	
( 2 ) 配列番号35についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 23個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		20
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号35 :		
<b>CCAGAYTGGA ARWKNAGAAA GGA</b>	<b>23</b>	
( 2 ) 配列番号36についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 84個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		30
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号36 :		
<b>CAGAGTGGGC AGAGAGGCTN TTGTTAAGGG GAAATTAATC GACGTGGAAA</b>		
<b>AGGAAGGAAA</b>	<b>60</b>	
<b>AGTCGNTATT CCTCCAAGGG AATA</b>	<b>84</b>	
( 2 ) 配列番号37についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 27個のアミノ酸		40
( B ) 型 : アミノ酸		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド		
( iii ) ハイポセティカル : YES		
( iv ) アンチセンス : NO		
( v ) フラグメント型 : 内部		
( X i ) 配列 : 配列番号37 :		

Glu Trp Ala Glu Arg Leu Leu Leu Arg Gly Asn Xaa Ser Lys Trp Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Glu Lys Ser Xaa Phe Leu Gln Gly Asn  
 20 25

( 2 ) 配列番号38についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 27個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : YES

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

( X i ) 配列 : 配列番号38 :

Arg Val Gly Arg Glu Ala Xaa Val Lys Gly Lys Leu Ile Glu Val Glu  
 1 5 10 15

Lys Glu Gly Lys Val Xaa Ile Pro Pro Arg Glu  
 20 25

( 2 ) 配列番号39についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 28個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : YES

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

( X i ) 配列 : 配列番号39 :

Gln Ser Gly Gln Arg Gly Xaa Cys Xaa Gly Glu Ile Asn Arg Ser Gly  
 1 5 10 15

Lys Gly Arg Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Lys Gly Leu  
 20 25

( 2 ) 配列番号40についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 129個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号40 :

CTGCCCACTC TGAGGTCATA ACCTGCTGGT TGGAGCCATT CTTTCAGAAAA TGGCTCTATA 60  
 AGTATTTCIT TTCTGATTTT CCAGTCTGGA AGTAGCATT TACCACCGAA ACCTTTATTT 120  
 TTAATTTAA 129

( 2 ) 配列番号41についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 42個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイボセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : N - 末端
- ( X i ) 配列 : 配列番号41 :

Xaa Ile Lys Asn Lys Gly Phe Gly Gly Lys Met Leu Leu Pro Asp Trp

```

1           5           10           15
Lys Ile Arg Lys Glu Ile Leu Ile Glu Pro Phe Ser Glu Glu Trp Leu
          20           25           30
Gln Pro Ala Gly Tyr Asp Leu Arg Val Gly
          35           40

```

10

- ( 2 ) 配列番号42についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 740個の塩基対
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジ : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )
- ( iii ) ハイボセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( X i ) 配列 : 配列番号42 :

20

```

TCCTCCAAGG GAATACGCCT TAATCCTAAC CCTCGAGAGG ATAAAGTTGC CCGACGATGT 60
TATGGGGGAT ATGAAGATAA GGAGCAGTTT AGCAAGAGAA GGGGTTATTG GTTCTTTTGC 120
TTGGGTTGAC CCAGGATGGG ATGGAAACTT AACACTAATG CTCTACAATG CCTCAAATGA 180
ACCTGTCGAA TTAAGATATG GAGAGAGATT TGTGCAGATC GCATTTATAA GGCTAGAGGG 240
TCCGGCAAGA AACCCTTACA GAGGAAACTA TCAGGGGAGC ACAAGGTTAG CGTTTTCAAA 300
GAGAAAGAAA CTCTAGCGTC TTTTCAATAG CATCCTCAAT ATCTCGTGTG AAGTAATCAA 360
TGTAATAACT TGCTGGGTGG GTTTTTAGGG ATTCAAATC GTAAGATGGG CCTGTATAGC 420
AGAAAATAT TTTTGCCTCT TCTTCATTTA TCTTTCTGTG AATAAAAAAT CCAACATCCA 480
CACTAGTTCC AAAAGATATT GTTTGCGTGA TTACCAACAA GATCTTGGCA TTATTTTTGA 540
TCTTATACTC TATTCTCCTT TCTCCCTCCA ATTTGCCCAA AATAAACCTG GGTAGTATAC 600
ATTCACTCCT CTCTTTTAAA TTCCTATAAA TTCGTACATA GTTTAGAAAA ATGTCAAATT 660
CTTTNTTCCC TGTTAAATTA ACCNCNAAAT CTTTATNANN AANCTTTTTA TAATTCCTAA 720
AACCCCTAAT TTTCCCCTTN

```

30

- ( 2 ) 配列番号43についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 246個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジ : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイボセティカル : YES
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : N - 末端
- ( X i ) 配列 : 配列番号43 :

40

Leu Gln Gly Asn Thr Pro Xaa Ser Xaa Pro Ser Arg Gly Xaa Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Pro Thr Met Leu Trp Gly Ile Xaa Arg Xaa Gly Ala Val Xaa Gln Glu  
 20 25 30  
 Lys Gly Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly Leu Thr Gln Asp Gly Met Glu  
 35 40 45  
 Thr Xaa His Xaa Cys Ser Thr Met Pro Gln Met Asn Leu Ser Asn Xaa  
 50 55 60  
 Asp Met Glu Arg Asp Leu Cys Arg Ser His Leu Xaa Gly Xaa Arg Val  
 65 70 75 80  
 Arg Gln Glu Thr Leu Thr Glu Glu Thr Ile Arg Gly Ala Gln Gly Xaa  
 85 90 95  
 Arg Phe Gln Arg Glu Arg Asn Ser Ser Val Phe Ser Ile Ala Ser Ser  
 100 105 110  
 Ile Ser Arg Val Lys Xaa Ser Met Xaa Ile Leu Ala Gly Trp Val Phe  
 115 120 125  
 Arg Asp Ser Asn Ser Xaa Asp Gly Pro Val Xaa Gln Lys Thr Ile Phe  
 130 135 140  
 Ala Ser Ser Ser Phe Ile Phe Leu Xaa Ile Lys Asn Pro Thr Ser Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Val Pro Lys Asp Ile Val Cys Val Ile Thr Asn Lys Ile Leu Ala  
 165 170 175  
 Leu Phe Leu Ile Leu Tyr Ser Ile Leu Leu Ser Pro Ser Asn Leu Pro  
 180 185 190  
 Lys Ile Asn Leu Gly Ser Ile His Ser Leu Leu Ser Phe Lys Phe Leu  
 195 200 205  
 Xaa Ile Arg Thr Xaa Phe Arg Lys Met Ser Asn Ser Xaa Phe Pro Val  
 210 215 220  
 Lys Leu Thr Xaa Lys Ser Leu Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Phe Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Leu Ile Phe Pro Xaa  
 245

10

20

( 2 ) 配列番号44についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 246個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイボセティカル : YES

( X i ) 配列 : 配列番号44 :

30



Pro Pro Arg Glu Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Leu Glu Arg Ile Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Asn Asn Val Met Gly Asp Met Lys Ile Arg Ser Ser Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 Glu Gly Val Ile Gly Ser Phe Ala Trp Val Asp Pro Gly Trp Asp Gly  
 35 40 45  
 Asn Leu Thr Leu Met Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Glu Pro Val Glu Leu  
 50 55 60  
 Arg Tyr Gly Glu Arg Phe Val Gln Ile Ala Phe Ile Arg Leu Glu Gly  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Arg Asn Pro Tyr Arg Gly Asn Tyr Gln Gly Ser Thr Arg Leu  
 85 90 95  
 Ala Phe Ser Lys Arg Lys Lys Leu Xaa Arg Leu Phe Asn Ser Ile Leu  
 100 105 110  
 Asn Ile Ser Cys Glu Val Ile Asn Val Asn Thr Cys Trp Val Gly Phe  
 115 120 125  
 Xaa Gly Phe Lys Leu Val Arg Trp Ala Cys Ile Ala Glu Asn Tyr Phe  
 130 135 140  
 Cys Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Ser Val Asn Lys Lys Ser Asn Ile His  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Ser Lys Arg Tyr Cys Leu Arg Asp Tyr Gln Gln Asp Leu Gly  
 165 170 175  
 Ile Ile Phe Asp Leu Ile Leu Tyr Ser Pro Phe Ser Leu Gln Phe Ala  
 180 185 190  
 Gln Asn Lys Pro Gly Xaa Tyr Thr Phe Thr Pro Leu Phe Xaa Ile Pro  
 195 200 205  
 Ile Asn Ser Tyr Ile Val Xaa Lys Asn Val Lys Phe Phe Xaa Pro Cys  
 210 215 220  
 Xaa Ile Asn Xaa Xaa Ile Phe Xaa Xaa Xaa Leu Phe Ile Ile Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Thr Pro Asn Phe Pro Leu  
 245

10

20

( 2 ) 配列番号45についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 246個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイボセティカル : YES

( X i ) 配列 : 配列番号45 :

30

Ser Ser Lys Gly Ile Arg Leu Asn Pro Asn Pro Arg Glu Asp Lys Val  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Arg Cys Tyr Gly Gly Tyr Glu Asp Lys Glu Gln Phe Ser Lys  
 20 25 30  
 Arg Arg Gly Tyr Trp Phe Phe Cys Leu Gly Xaa Pro Arg Met Gly Trp  
 35 40 45  
 Lys Leu Asn Thr Asn Ala Leu Gln Cys Leu Lys Xaa Thr Cys Arg Ile  
 50 55 60  
 Lys Ile Trp Arg Glu Ile Cys Ala Asp Arg Ile Tyr Lys Ala Arg Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Lys Lys Pro Leu Gln Arg Lys Leu Ser Gly Glu His Lys Val  
 85 90 95  
 Ser Val Phe Lys Glu Lys Glu Thr Leu Ala Ser Phe Gln Xaa His Pro  
 100 105 110  
 Gln Tyr Leu Val Xaa Ser Asn Gln Cys Lys Tyr Leu Leu Gly Gly Phe  
 115 120 125  
 Leu Gly Ile Gln Thr Arg Lys Met Gly Leu Tyr Ser Arg Lys Leu Phe  
 130 135 140  
 Leu Pro Leu Leu His Leu Ser Phe Cys Glu Xaa Lys Ile Gln His Pro  
 145 150 155 160  
 His Xaa Phe Gln Lys Ile Leu Phe Ala Xaa Leu Pro Thr Arg Ser Trp  
 165 170 175  
 His Tyr Phe Xaa Ser Tyr Thr Leu Phe Ser Phe Leu Pro Pro Ile Cys  
 180 185 190  
 Pro Lys Xaa Thr Trp Val Val Tyr Ile His Ser Ser Leu Leu Asn Ser  
 195 200 205  
 Tyr Lys Phe Val His Ser Leu Glu Lys Cys Gln Ile Leu Xaa Ser Leu  
 210 215 220  
 Leu Asn Xaa Pro Xaa Asn Leu Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Tyr Asn Ser Gln  
 225 230 235 240  
 Asn Pro Xaa Phe Ser Pro  
 245

10

20

( 2 ) 配列番号46についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 31個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : N - 末端

( X i ) 配列 : 配列番号46 :

Met Leu His His Val Lys Leu Ile Tyr Ala Thr Lys Ser Arg Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Val Gly Lys Lys Ile Val Xaa Xaa Xaa Pro Gly Ser Ile Ala Ala  
 20 25 30

40

( 2 ) 配列番号47についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 17個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

50

(iv) アンチセンス : NO  
(v) フラグメント型 : 内部  
(Xi) 配列 : 配列番号47 :  
Lys Tyr Asp Val Val Ile Met Ala Ala Ala Val Ser Asp Phe Arg Phe  
1 5 10 15  
**Lys**

(2) 配列番号48についての情報 :  
(i) 配列の特徴 :  
(A) 長さ : 24個のアミノ酸  
(B) 型 : アミノ酸 10  
(C) 鎖の数 : 未知  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : ペプチド  
(iii) ハイポセティカル : NO  
(iv) アンチセンス : NO  
(v) フラグメント型 : 内部  
(Xi) 配列 : 配列番号48 :  
Ala Asp Leu Val Val Gly Asn Thr Leu Glu Ala Phe Gly Ser Glu Glu  
1 5 10 15  
Asn Gln Val Val Leu Ile Gly Arg 20 20

(2) 配列番号49についての情報 :  
(i) 配列の特徴 :  
(A) 長さ : 21個の塩基対  
(B) 型 : 核酸  
(C) 鎖の数 : 一本鎖  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : DNA (ゲノム)  
(iii) ハイポセティカル : NO  
(iv) アンチセンス : NO 30  
(Xi) 配列 : 配列番号49 :  
**CTATTGAGTA CGAACGCCAT C** 21

(2) 配列番号50についての情報 :  
(i) 配列の特徴 :  
(A) 長さ : 20個の塩基対  
(B) 型 : 核酸  
(C) 鎖の数 : 一本鎖  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : DNA (ゲノム)  
(iii) ハイポセティカル : NO 40  
(iv) アンチセンス : NO  
(Xi) 配列 : 配列番号50 :  
**GTCACGCTTG CTCCACTCCG** 20

(2) 配列番号51についての情報 :  
(i) 配列の特徴 :  
(A) 長さ : 437個のアミノ酸  
(B) 型 : アミノ酸  
(D) トポロジー : 未知  
(ii) 配列の種類 : タンパク質  
(iii) ハイポセティカル : NO 50

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 起源 :

(A) 生物名 : メタノコーカスジャナスキ

(Xi) 配列 : 配列番号51 :

Met Ile Ser Glu Ile Met His Pro Thr Lys Leu Leu Lys Gly Thr Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Leu Leu Glu Asn Lys Lys Ile Leu Val Ala Val Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Ile Ala Ala Ile Glu Thr Pro Lys Leu Met Arg Glu Leu Ile Arg His  
 35 40 45  
 Gly Ala Glu Val Tyr Cys Ile Ile Thr Glu Glu Thr Lys Lys Ile Ile  
 50 55 60  
 Gly Lys Glu Ala Leu Lys Phe Gly Cys Gly Asn Glu Val Tyr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ile Glu His Ile Leu Leu Tyr  
 85 90 95  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Glu Cys Asp Cys Leu Leu Ile Tyr Pro Ala Thr  
 100 105 110  
 Ala Asn Ile Ile Ser Lys Ile Asn Leu Gly Ile Ala Asp Asn Ile Val  
 115 120 125  
 Asn Thr Thr Ala Leu Met Phe Phe Gly Asn Lys Pro Ile Phe Ile Val  
 130 135 140  
 Pro Ala Met His Glu Asn Met Phe Asn Xaa Xaa Ala Ile Lys Arg His  
 145 150 155 160  
 Ile Asp Lys Leu Lys Glu Lys Asp Lys Ile Tyr Ile Ile Ser Pro Lys  
 165 170 175  
 Phe Glu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Lys Ala Lys Val Ala Asn  
 180 185 190  
 Ile Glu Asp Val Val Lys Ala Val Ile Glu Lys Ile Gly Asn Asn Leu  
 195 200 205  
 Lys Lys Glu Gly Asn Arg Val Leu Ile Leu Asn Gly Gly Thr Val Glu  
 210 215 220  
 Phe Ile Asp Lys Val Arg Val Ile Ser Asn Leu Ser Ser Gly Lys Met  
 225 230 235 240  
 Gly Val Ala Leu Ala Glu Ala Phe Cys Lys Glu Gly Phe Tyr Val Glu  
 245 250 255  
 Val Ile Thr Ala Met Gly Leu Glu Pro Pro Tyr Tyr Ile Lys Asn His  
 260 265 270  
 Lys Val Leu Thr Ala Lys Glu Met Leu Asn Lys Ala Ile Glu Xaa Xaa  
 275 280 285  
 Leu Xaa Ala Lys Asp Phe Asp Ile Ile Ile Ser Ser Ala Ala Ile Ser  
 290 295 300  
 Asp Phe Thr Val Glu Ser Xaa Phe Glu Gly Lys Leu Ser Ser Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Leu Lys Leu Lys Arg Xaa Asn Pro Lys  
 325 330 335  
 Val Leu Glu Glu Leu Arg Arg Ile Tyr Lys Asp Xaa Lys Val Ile Ile  
 340 345 350  
 Gly Phe Lys Ala Glu Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Glu Leu Ile Asn Arg  
 355 360 365  
 Ala Lys Glu Arg Leu Asn Lys Tyr Asn Leu Asn Met Ile Ile Ala Asn  
 370 375 380  
 Asp Leu Ser Lys Xaa Xaa His Tyr Phe Gly Asp Asp Tyr Ile Glu Val  
 385 390 395 400  
 Tyr Ile Ile Thr Lys Tyr Glu Val Glu Lys Ile Ser Gly Ser Lys Lys  
 405 410 415  
 Xaa Glu Ile Ser Glu Arg Ile Val Glu Lys Val Lys Lys Leu Val Lys  
 420 425 430  
 Ser Xaa Xaa Xaa Xaa  
 435

10

20

30

40

( 2 ) 配列番号52についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

50

- ( A ) 長さ : 444個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : タンパク質
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( vi ) 起源 :
- ( A ) 生物名 : E . コリ
- ( X i ) 配列 : 配列番号52 :

Met	Lys	Ala	Arg	Gln	Gln	Lys	Tyr	Cys	Asp	Lys	Ile	Ala	Asn	Phe	Trp
1				5					10					15	
Cys	His	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	Ile	Met	Ser	Leu	Ala	Gly	Lys	Lys	Ile
			20					25						30	
Val	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Thr	Pro	Glu	Leu
		35					40					45			
Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Asp	Arg	Gly	Ala	Asp	Val	Arg	Val	Ala	Met	Thr
		50					55				60				
Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Gln	Ala	Val	Ser
65					70					75					80
Gly	Tyr	Pro	Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala
				85					90					95	
Met	Gly	His	Ile	Glu	Leu	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Trp	Ala	Asp	Leu
			100					105						110	
Val	Ile	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Ala	Asp	Leu	Ile	Ala	Arg	Val	Ala	Ala
		115						120					125		
Gly	Met	Ala	Asn	Asp	Leu	Val	Ser	Thr	Ile	Cys	Leu	Ala	Thr	Pro	Xaa
	130					135					140				
Xaa	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Ala	Met	Asn	Gln	Gln	Met	Tyr	Arg
145					150					155					160
Ala	Ala	Ala	Thr	Gln	His	Asn	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Xaa	Ser	Arg	Gly
				165					170						175
Leu	Leu	Ile	Trp	Gly	Pro	Asp	Ser	Gly	Ser	Gln	Ala	Cys	Gly	Asp	Ile
			180					185						190	
Gly	Pro	Gly	Arg	Xaa	Xaa	Asp	Pro	Leu	Thr	Ile	Val	Asp	Met	Ala	Val
		195				200						205			
Ala	His	Phe	Ser	Pro	Val	Asn	Asp	Leu	Lys	His	Leu	Asn	Ile	Met	Ile
		210				215						220			
Thr	Ala	Gly	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Leu	Asp	Pro	Val	Arg	Tyr	Ile	Ser
225					230					235					240
Asn	His	Ser	Ser	Gly	Lys	Met	Gly	Phe	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
				245					250						255
Arg	Arg	Gly	Ala	Asn	Val	Thr	Leu	Val	Ser	Gly	Pro	Val	Ser	Leu	Pro
			260					265						270	
Thr	Pro	Pro	Phe	Val	Lys	Arg	Val	Asp	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Glu	Met
		275					280					285			
Glu	Ala	Ala	Val	Asn	Xaa	Xaa	Ala	Ser	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Ile	Phe
		290				295						300			
Ile	Gly	Cys	Ala	Ala	Val	Ala	Asp	Tyr	Arg	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Pro
305					310					315					320
Glu	Lys	Ile	Lys	Lys	Gln	Ala	Thr	Gln	Gly	Asp	Glu	Leu	Thr	Ile	Lys
				325					330					335	
Met	Val	Lys	Xaa	Asn	Pro	Asp	Ile	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Lys
			340					345						350	
Asp	His	Arg	Pro	Tyr	Val	Val	Gly	Phe	Ala	Ala	Glu	Thr	Asn	Asn	Xaa
		355					360					365			
Xaa	Xaa	Xaa	Val	Glu	Glu	Tyr	Ala	Arg	Gln	Lys	Arg	Ile	Arg	Lys	Asn
		370				375					380				
Leu	Asp	Leu	Ile	Cys	Ala	Asn	Asp	Val	Ser	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Phe
385					390					395					400
Asn	Ser	Asp	Asn	Asn	Ala	Leu	His	Leu	Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Asp	Lys
				405					410					415	
Val	Leu	Pro	Leu	Glu	Arg	Lys	Glu	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Leu	Leu	Asp
			420					425						430	
Glu	Ile	Val	Thr	Arg	Tyr	Asp	Glu	Lys	Asn	Arg	Arg				
		435					440								

( 2 ) 配列番号53についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 14個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

10

20

30

40

50

- (iii) ハイポセティカル：YES  
 (iv) アンチセンス：NO  
 (v) フラグメント型：内部  
 (Xi) 配列：配列番号53：  
**Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5 10
- (2) 配列番号54についての情報：  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：14個のアミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸 10  
 (D) トポロジー：未知  
 (ii) 配列の種類：ペプチド  
 (iii) ハイポセティカル：NO  
 (iv) アンチセンス：NO  
 (v) フラグメント型：内部  
 (Xi) 配列：配列番号54：  
**Phe Ala Trp Val Asp Pro Gly Trp Asp Gly Asn Thr Leu Met**  
 1 5 10
- (2) 配列番号55についての情報：  
 (i) 配列の特徴： 20  
 (A) 長さ：14個のアミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) トポロジー：未知  
 (ii) 配列の種類：ペプチド  
 (iii) ハイポセティカル：NO  
 (iv) アンチセンス：NO  
 (v) フラグメント型：内部  
 (Xi) 配列：配列番号55：  
**Ala Gly Trp Ile Asp Ala Gly Phe Lys Gly Lys Ile Thr Leu**  
 1 5 10 30
- (2) 配列番号56についての情報：  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：14個のアミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) トポロジー：未知  
 (ii) 配列の種類：ペプチド  
 (iii) ハイポセティカル：NO  
 (iv) アンチセンス：NO  
 (Xi) 配列：配列番号56：  
**Ser Ala Val His Asp Pro Gly Tyr Glu Gly Arg Pro Glu Tyr**  
 1 5 10 40
- (2) 配列番号57についての情報：  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：14個のアミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) トポロジー：未知  
 (ii) 配列の種類：ペプチド  
 (iii) ハイポセティカル：NO  
 (iv) アンチセンス：NO  
 (Xi) 配列：配列番号57： 50



Pro Thr Ile Val Asp Ala Gly Phe Glu Gly Gln Leu Thr Ile  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号58についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 14個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

10

( X i ) 配列 : 配列番号58 :

Ala His Arg Ile Asp Pro Gly Trp Ser Gly Cys Ile Val Leu  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号59についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

20

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : YES

( X i ) 配列 : 配列番号59 :

**GAGTTAAATG CCTACACTGT ATCT**

24

( 2 ) 配列番号60についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 未知

30

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号60 :

**CAGGACTCAG AAGCTGCTAT CGAA**

24

( 2 ) 配列番号61についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

40

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号61 :

**CTGCACGTGC CCTGTAGGAT TTGT**

24

( 2 ) 配列番号62についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 21個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

50

( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号62 :		
<b>CTATTGAGTA CGAACGCCAT C</b>	<b>21</b>	
( 2 ) 配列番号63についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 20個の塩基対		10
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : YES		
( X i ) 配列 : 配列番号63 :		
<b>GTCACGCTTG CTCCACTCCG</b>	<b>20</b>	
( 2 ) 配列番号64についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		20
( A ) 長さ : 23個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( X i ) 配列 : 配列番号64 :		
<b>GAGGAGAGCA GGAAAGGTGG AAC</b>	<b>23</b>	
( 2 ) 配列番号65についての情報 :		30
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 21個の塩基対		
( B ) 型 : 核酸		
( C ) 鎖の数 : 一本鎖		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : YES		
( X i ) 配列 : 配列番号65 :		
<b>GCTGGGAGAA GACTTCACTG G</b>	<b>21</b>	40
( 2 ) 配列番号66についての情報 :		
( i ) 配列の特徴 :		
( A ) 長さ : 8個のアミノ酸		
( B ) 型 : アミノ酸		
( C ) 鎖の数 : 未知		
( D ) トポロジー : 未知		
( ii ) 配列の種類 : ペプチド		
( iii ) ハイポセティカル : NO		
( iv ) アンチセンス : NO		
( v ) フラグメント型 : 内部		50

( X i ) 配列 : 配列番号66 :  
**His His Val Lys Leu Ile Tyr Ala**  
 1 5

( 2 ) 配列番号67についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

10

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

( X i ) 配列 : 配列番号67 :

**Lys Tyr Asp Ala Val Ile Met Ala**  
 1 5

( 2 ) 配列番号68についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 7 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

20

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

( X i ) 配列 : 配列番号68 :

**Glu Glu Asn Gln Val Val Leu**  
 1 5

( 2 ) 配列番号69についての情報 :

30

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 8 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

( X i ) 配列 : 配列番号69 :

40

**Pro Asp Trp Lys Ile Arg Lys Glu**  
 1 5

( 2 ) 配列番号70についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 47 個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( iii ) ハイポセティカル : NO

50

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号70 :

```

ATGCTACTTC CAGACTGGAA AATCAGAAAA GAAATACTTA TAGAGCCATT TTCTGAAGAA 60
TCGCTCCAAC CAGCAGGTTA TGACCTCAGA GTGGGCAGAG AGGCTTTTGT TAAGGGGAAA 120
TTAATCGACG TGGAAAAGGA AGGAAAAGTC GTTATTCCTC CAAGGGAATA CGCCTTAATC 180
CTAACCCCTCG AGAGGATAAA GTTGCCCGAC GATGTTATGG GGGATATGAA GATAAGGAGC 240
AGTTTAGCAA GAGAAGGGGT TATTGGTTCT TTTGCTTGGG TTGACCCAGG ATGGGATGGA 300
AACTTAACAC TAATGCTCTA CAATGCCTCA AATGAACCTG TCGAATTAAG ATATGGAGAG 360
AGATTTGTGC AGATCGCATT TATAAGGCTA GAGGGTCCGG CAAGAAACCC TTACAGAGGA 420
AACTATCAGG GGAGCACAAG GTTAGCGTTT TCAAAGAGAA AGAAACTCTA G 471

```

( 2 ) 配列番号71についての情報 :

10

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 156個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号71 :

```

Met Leu Leu Pro Asp Trp Lys Ile Arg Lys Glu Ile Leu Ile Glu Pro 20
1          5          10          15
Phe Ser Glu Glu Ser Leu Gln Pro Ala Gly Tyr Asp Leu Arg Val Gly
          20          25          30
Arg Glu Ala Phe Val Lys Gly Lys Leu Ile Asp Val Glu Lys Glu Gly
          35          40          45
Lys Val Val Ile Pro Pro Arg Glu Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Leu Glu
          50          55          60
Arg Ile Lys Leu Pro Asp Asp Val Met Gly Asp Met Lys Ile Arg Ser
65          70          75          80
Ser Leu Ala Arg Glu Gly Val Ile Gly Ser Phe Ala Trp Val Asp Pro
          85          90          95
Gly Trp Asp Gly Asn Leu Thr Leu Met Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Glu 30
          100          105          110
Pro Val Glu Leu Arg Tyr Gly Glu Arg Phe Val Gln Ile Ala Phe Ile
          115          120          125
Arg Leu Glu Gly Pro Ala Arg Asn Pro Tyr Arg Gly Asn Tyr Gln Gly
          130          135          140
Ser Thr Arg Leu Ala Phe Ser Lys Arg Lys Lys Leu
145          150          155

```

20

30

( 2 ) 配列番号72についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 13個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : YES

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号72 :

```

Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5          10

```

40

( 2 ) 配列番号73についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

50

- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号73 :

Phe Ala Trp Val Asp Pro Gly Trp Asp Gly Asn Thr Leu Met 10  
 1 5 10

- ( 2 ) 配列番号74についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO 20
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号74 :

Ala Gly Trp Ile Asp Ala Gly Phe Lys Gly Lys Ile Thr Leu  
 1 5 10

- ( 2 ) 配列番号75についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知 30
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号75 :

Ser Ala Val His Asp Pro Gly Tyr Glu Gly Arg Pro Glu Tyr  
 1 5 10

- ( 2 ) 配列番号76についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸 40
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号76 :

Pro Thr Ile Val Asp Ala Gly Phe Glu Gly Gln Leu Thr Ile  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号77についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号77 :

Ala His Arg Ile Asp Pro Gly Trp Ser Gly Cys Ile Val Leu  
1                      5                      10

10

( 2 ) 配列番号78についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号78 :

Val Gly Leu Ile Asp Ser Asp Tyr Gln Gly Gln Leu Met Ile  
1                      5                      10

20

( 2 ) 配列番号79についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号79 :

Ala Gly Val Val Asp Arg Asp Tyr Thr Gly Glu Val Lys Val  
1                      5                      10

30

( 2 ) 配列番号80についての情報 :

- ( i ) 配列の特徴 :
- ( A ) 長さ : 14個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 未知
- ( D ) トポロジー : 未知
- ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
- ( iii ) ハイポセティカル : NO
- ( iv ) アンチセンス : NO
- ( v ) フラグメント型 : 内部
- ( X i ) 配列 : 配列番号80 :

40

50

Ala Gly Val Ile Asp Glu Asp Tyr Arg Gly Asn Val Gly Val  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号81についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 14個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未知

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iii ) ハイポセティカル : NO

10

( iv ) アンチセンス : NO

( v ) フラグメント型 : 内部

( X i ) 配列 : 配列番号81 :

Thr Gly Leu Ile Asp Pro Gly Phe Gln Gly Glu Leu Lys Leu  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号82についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 33個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

20

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号82 :

**GACGACGACA AGATGCTACT TCCAGACTGG AAA** 33

( 2 ) 配列番号83についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 35個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

30

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号83 :

**GGAACAAGAC CCGTCCCACT TTCACAGATG AAGAG** 35

( 2 ) 配列番号84についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 23個の塩基対

40

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 未知

( ii ) 配列の種類 : DNA ( ゲノム )

( iii ) ハイポセティカル : NO

( iv ) アンチセンス : NO

( X i ) 配列 : 配列番号84 :

**GAGGAGAGCA GGAAAGGTGG AAC** 23

( 2 ) 配列番号85についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

50

- ( A ) 長さ：23個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：未知  
 ( ii ) 配列の種類：DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル：NO  
 ( iv ) アンチセンス：YES  
 ( X i ) 配列：配列番号85：  
**CTCCATGTCC CAACTCCGAT CAC** 23 10
- ( 2 ) 配列番号86についての情報：  
 ( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：38個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：未知  
 ( ii ) 配列の種類：DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル：NO  
 ( iv ) アンチセンス：NO  
 ( X i ) 配列：配列番号86：  
**GGTTTTCCCA GTCACGACGT TGTA AACGA CGGCCAGT** 38 20
- ( 2 ) 配列番号87についての情報：  
 ( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：38個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：未知  
 ( ii ) 配列の種類：DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル：NO  
 ( iv ) アンチセンス：NO  
 ( X i ) 配列：配列番号87：  
**GGUUUUCCCA GUCACGACGU UGUAAAACGA CGGCCAGU** 38 30
- ( 2 ) 配列番号88についての情報：  
 ( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：15個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：未知  
 ( ii ) 配列の種類：DNA ( ゲノム )  
 ( iii ) ハイボセティカル：NO 40  
 ( iv ) アンチセンス：NO  
 ( X i ) 配列：配列番号88：  
**GACGACGACA AGATGCCCTG CTCTGAAGAG ACACC** 35
- ( 2 ) 配列番号89についての情報：  
 ( i ) 配列の特徴：  
 ( A ) 長さ：35個の塩基対  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：未知  
 ( ii ) 配列の種類：DNA ( ゲノム ) 50



(iii) ハイポセティカル : NO

(iv) アンチセンス : YES

(Xi) 配列 : 配列番号89 :

GGAACAAGAC CCGTTTAATT CTTTCCAGTG GAACC

【 図 1 】

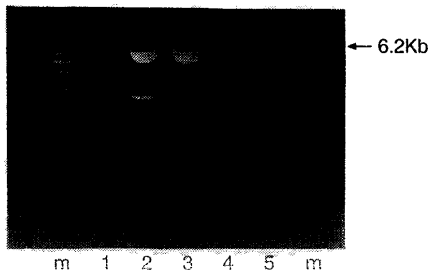


FIG. 1

【 図 2 】

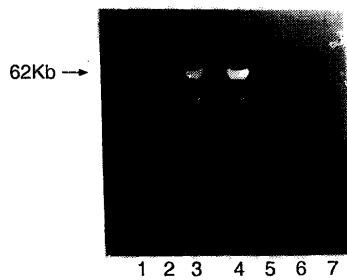


FIG. 2

【 図 3 】

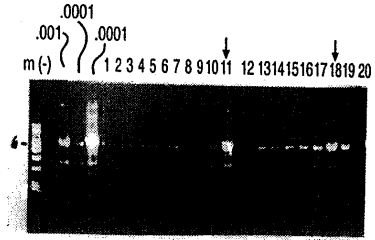


FIG. 3

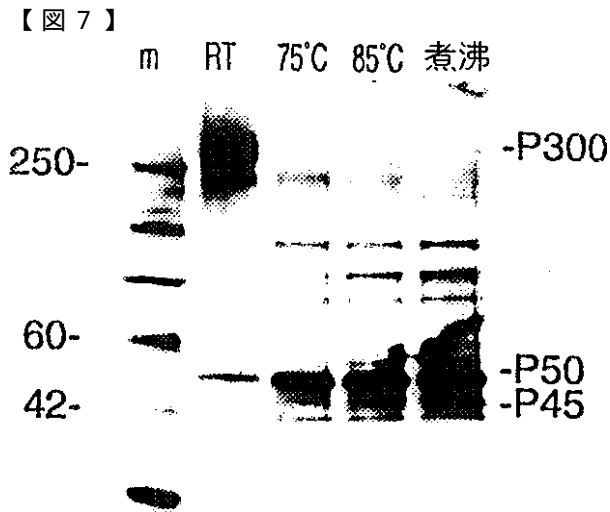


FIG. 7

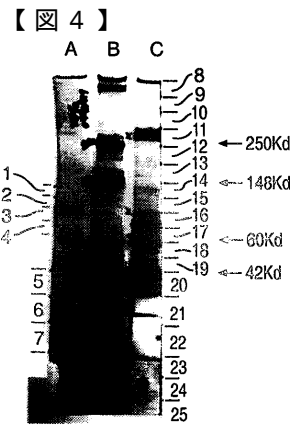


FIG. 4

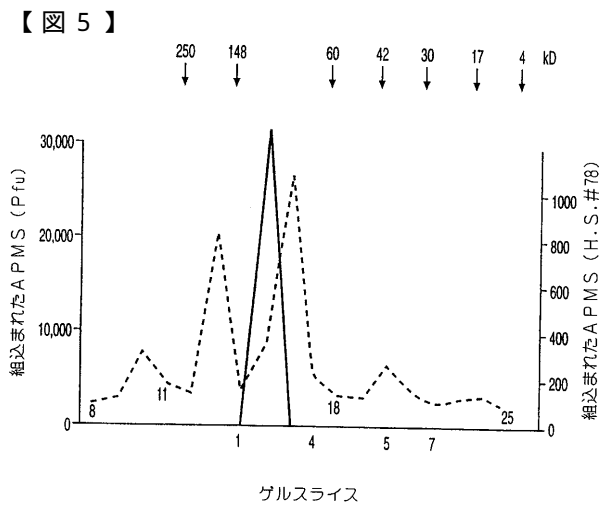


FIG. 5

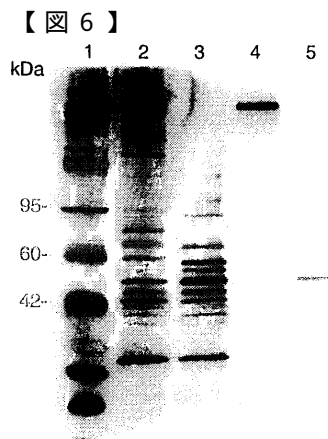


FIG. 6

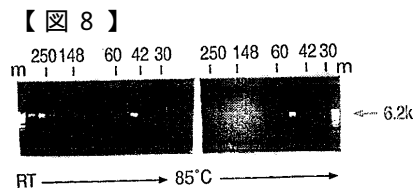


FIG. 8

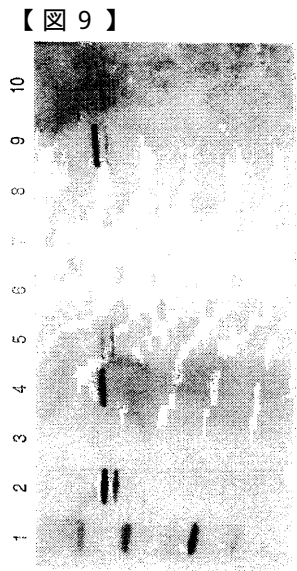


FIG. 9

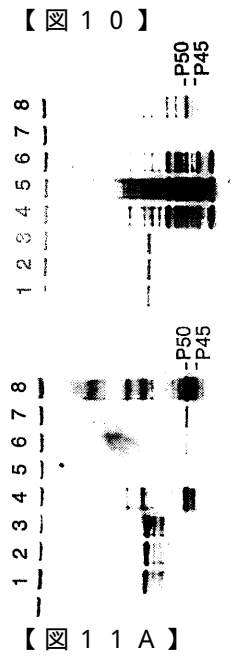


FIG. 10

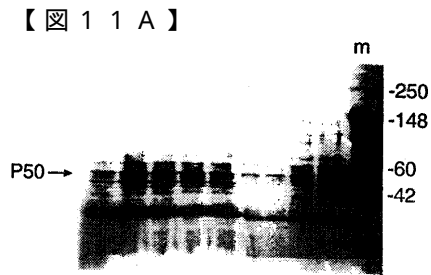


FIG. 11A

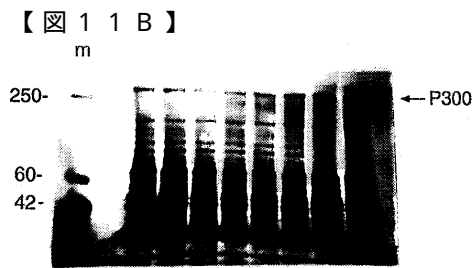


FIG. 11B

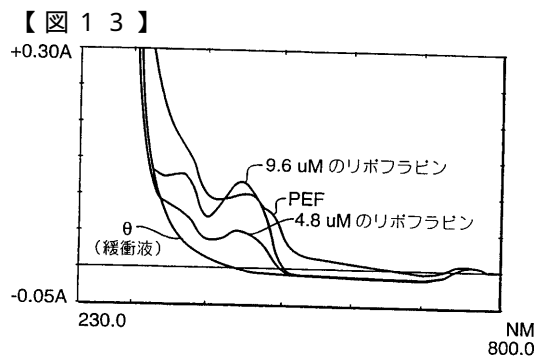


FIG. 13

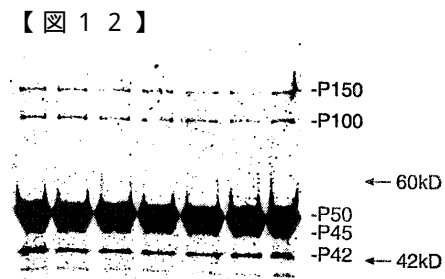


FIG. 12

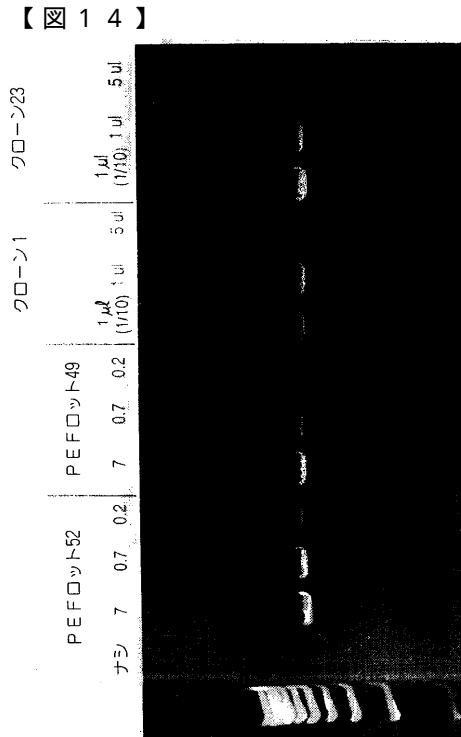


FIG. 14

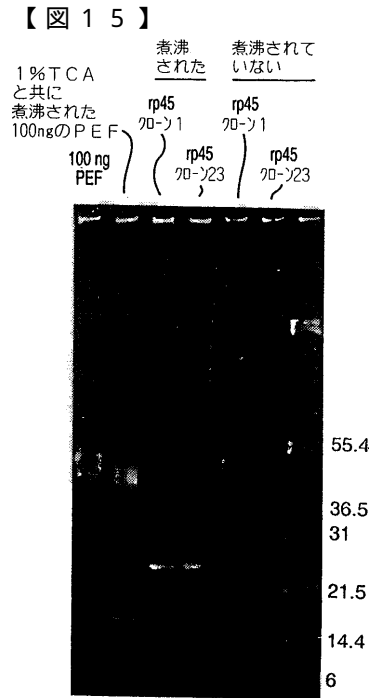


FIG. 15

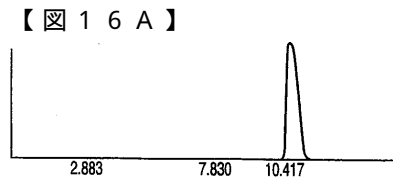


FIG. 16A

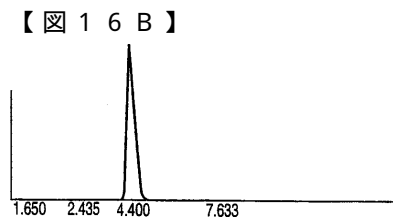


FIG. 16B

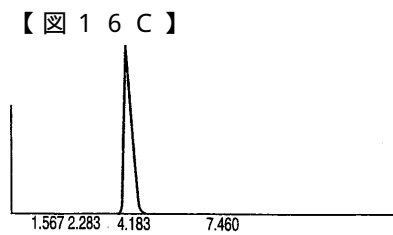


FIG. 16C

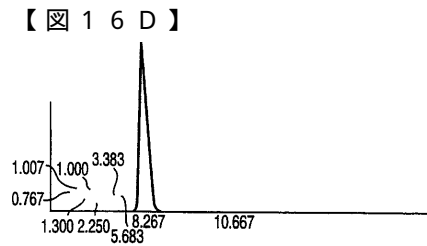


FIG. 16D

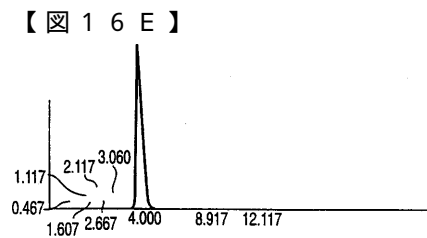


FIG. 16E

【 17 】

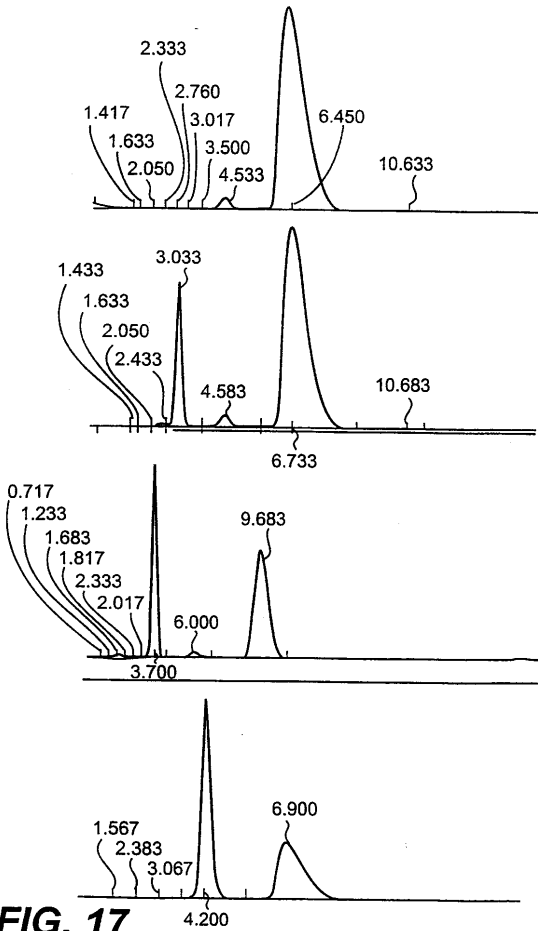


FIG. 17

【 18 A 】

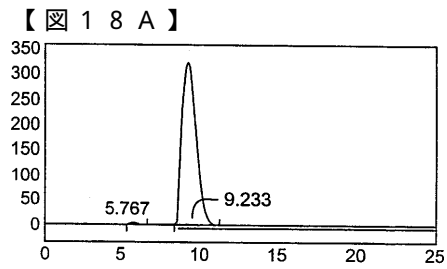


FIG. 18A

【 18 B 】

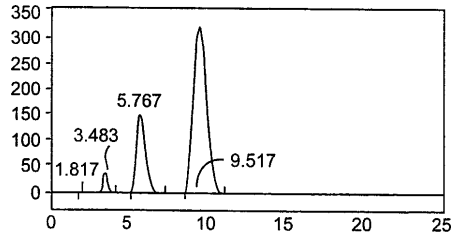


FIG. 18B

【 18 C 】

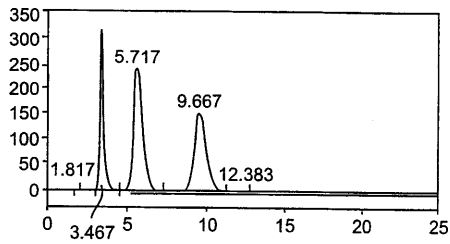


FIG. 18C

【 18 D 】

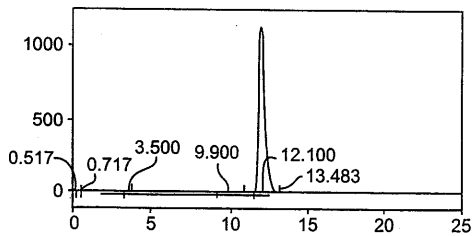


FIG. 18D

【 19 】

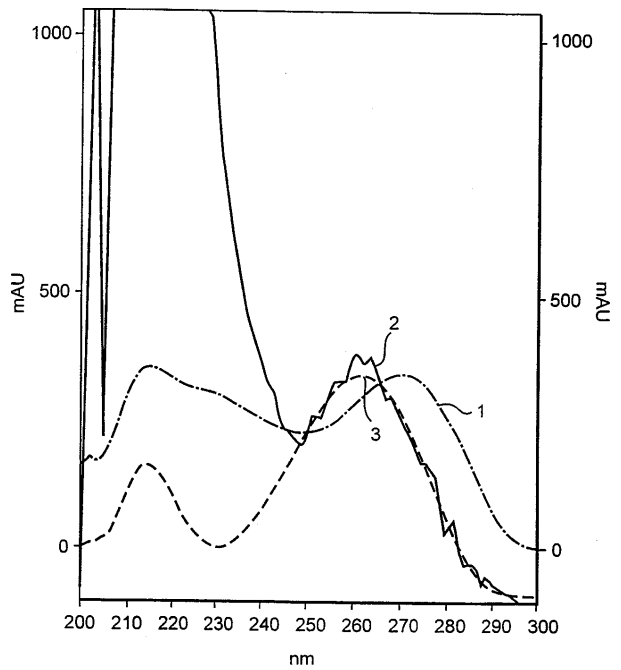


FIG. 19

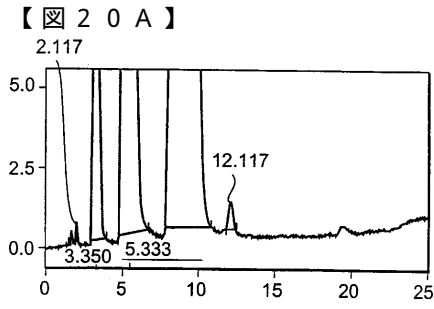


FIG. 20A

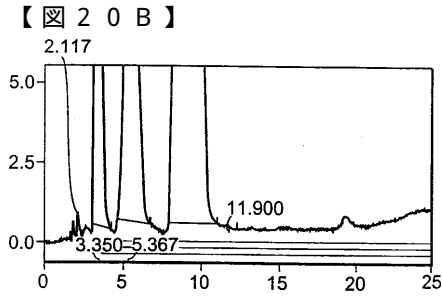


FIG. 20B

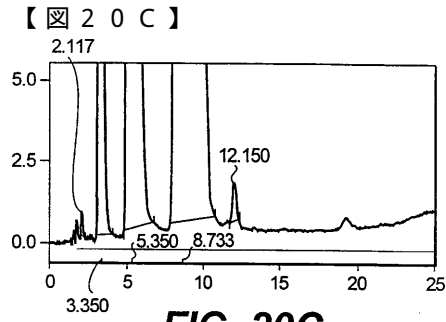


FIG. 20C

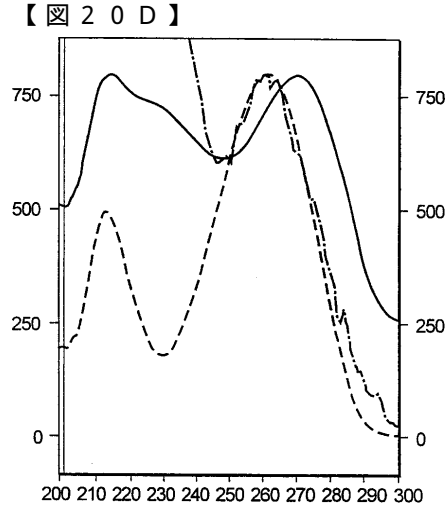


FIG. 20D

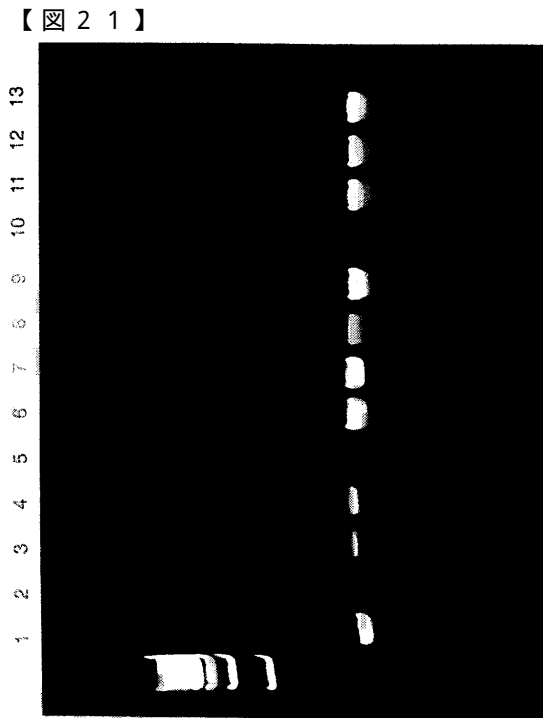


FIG. 21

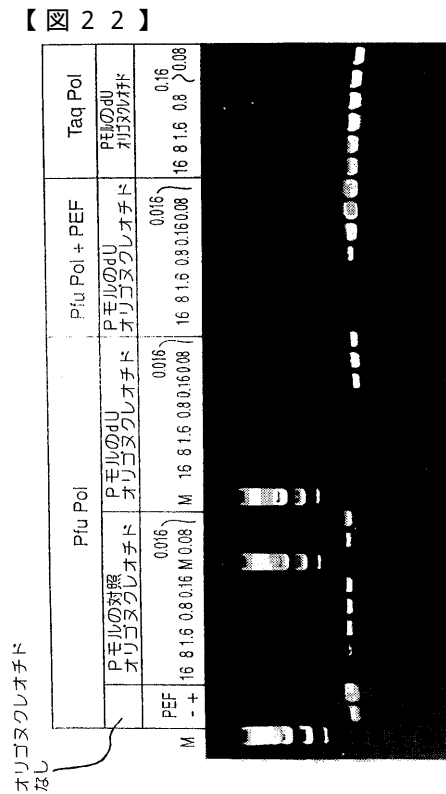


FIG. 22

【図 23】

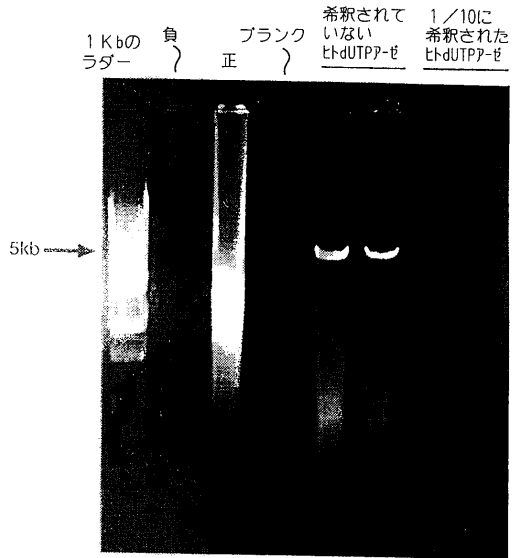


FIG. 23

【図 24】

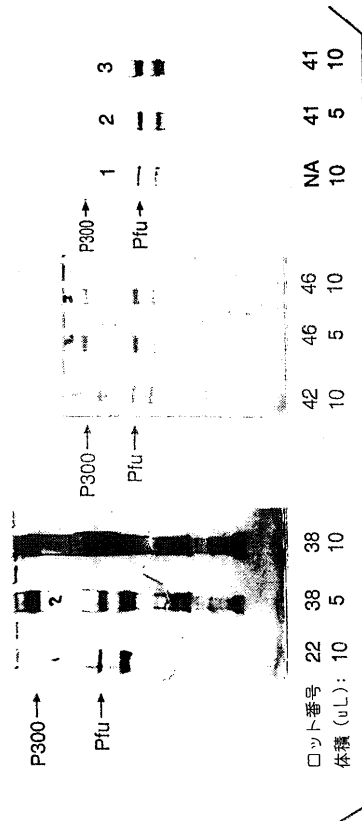


FIG. 24

【図 25】

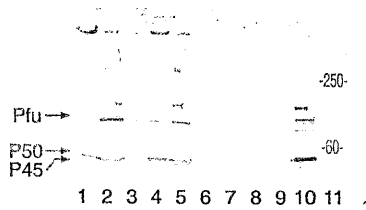


FIG. 25

【図 26】

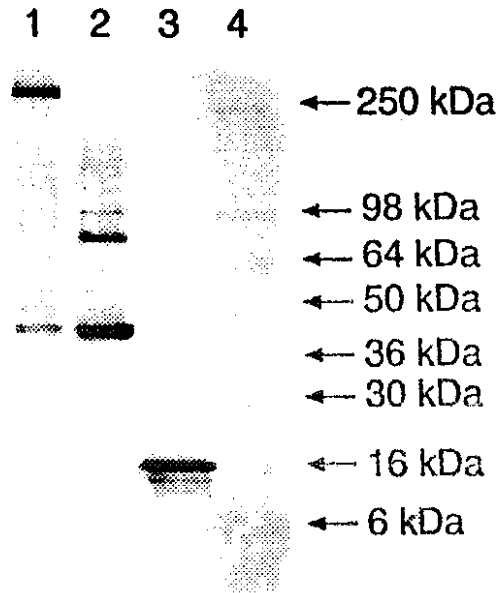


FIG. 26

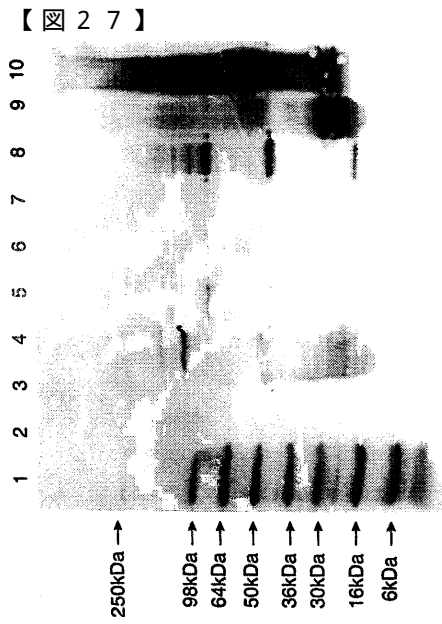


FIG. 27

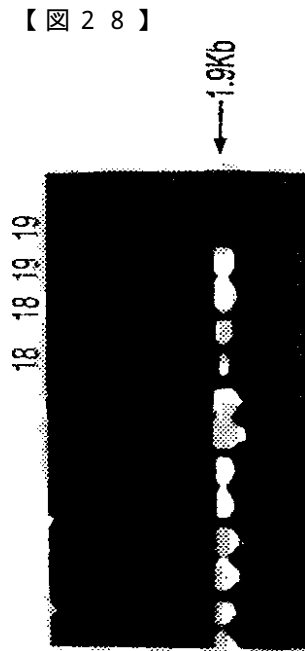


FIG. 28

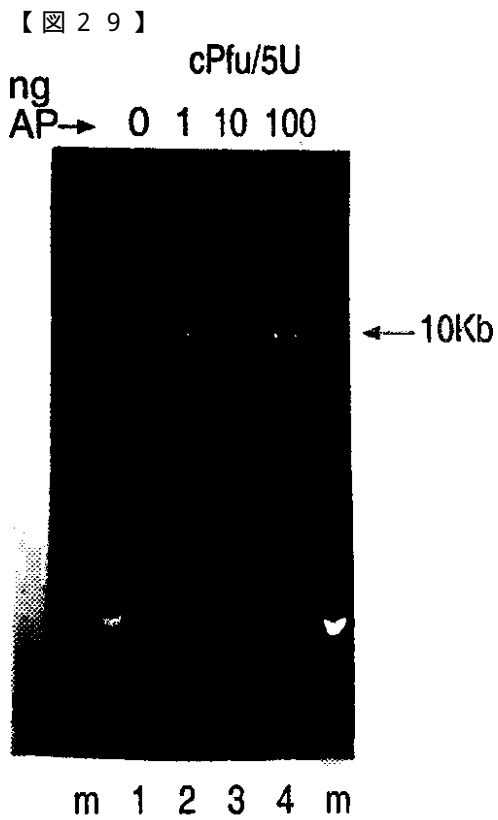


FIG. 29

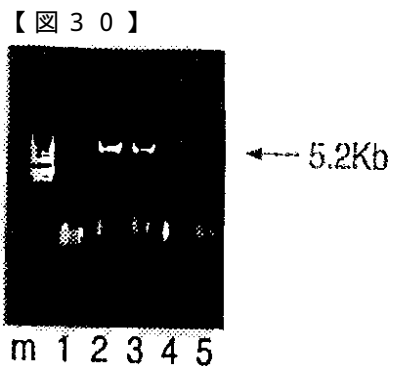
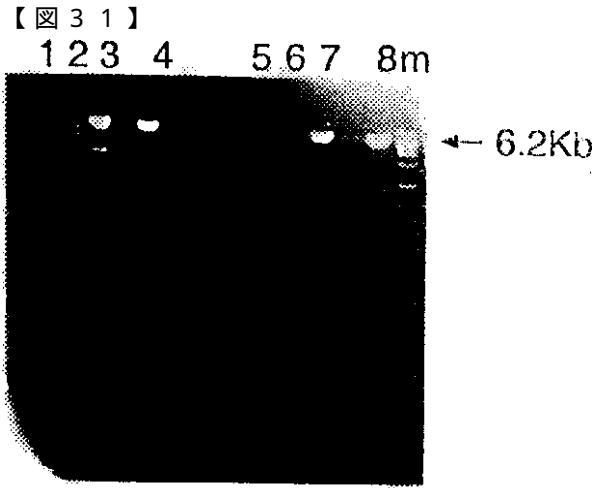
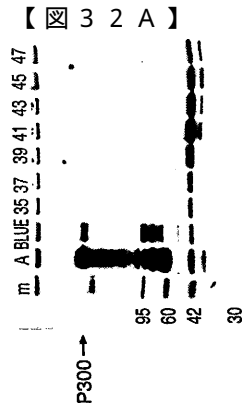


FIG. 30

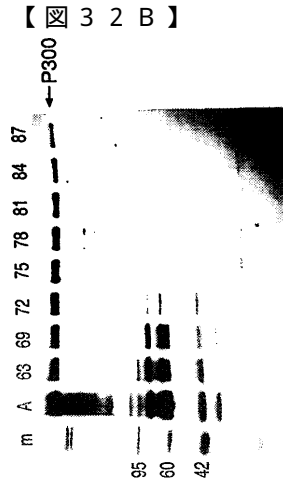




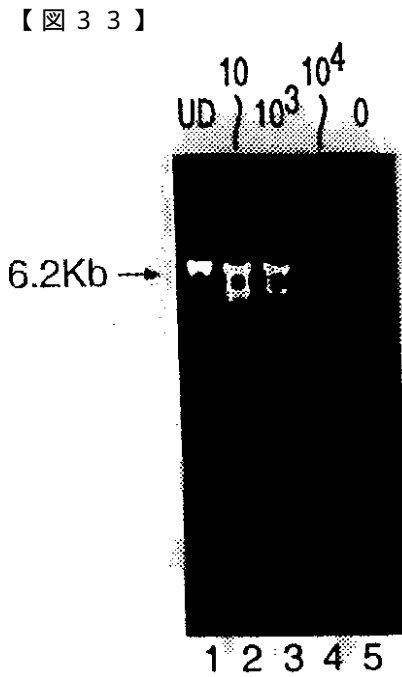
**FIG. 31**



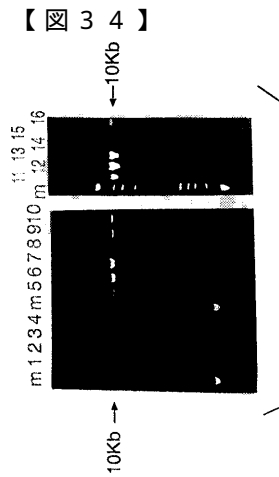
**FIG. 32A**



**FIG. 32B**



**FIG. 33**



**FIG. 34**

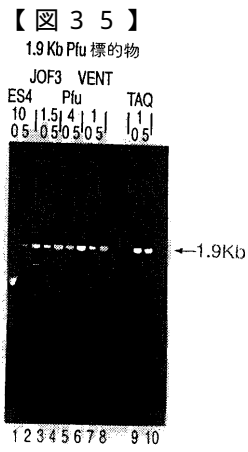


FIG. 35

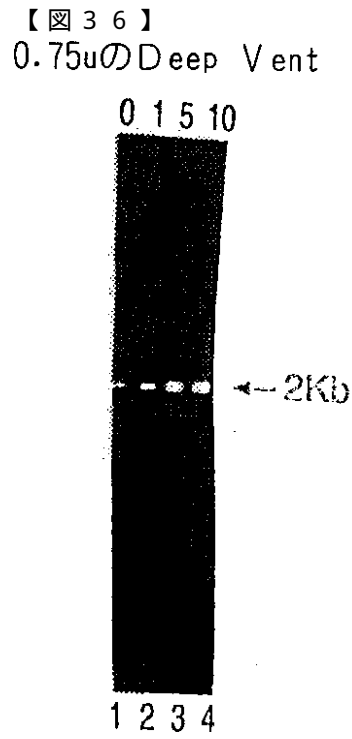


FIG. 36

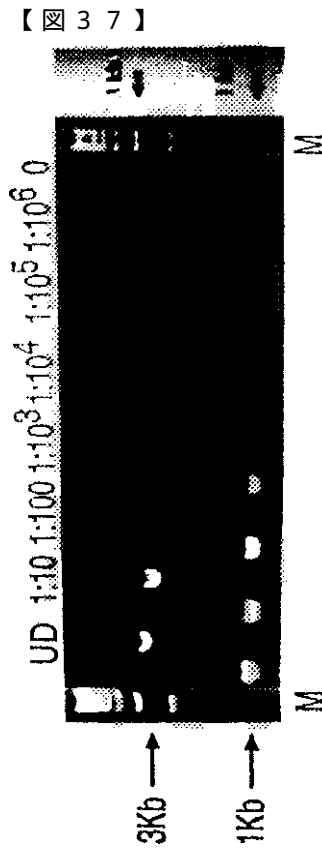


FIG. 37

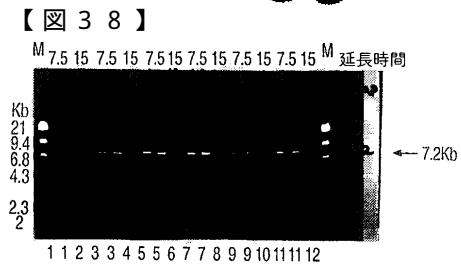


FIG. 38

【 図 39 】

Quick Change 突然変異誘発における“PCTエンハンサー”Pfu

利メーゼ	線状増幅条件			形質転換結果	
	緩衝液	H.S. #75	増幅生成物	#cfu	%変異体
nPfu (#38)	nPfu	0	+	84	95
		1 $\mu$ l	$\pm$	47	87
		.1 $\mu$ l	+	154	97
		.01 $\mu$ l	++	632	95
		.001 $\mu$ l	+	484	94
nPfu (#24A)	nPfu	0	+	94	89
		1 $\mu$ l	+	34	85
		.1 $\mu$ l	+	173	91
		.01 $\mu$ l	++	468	96
		.001 $\mu$ l	+	230	90

FIG. 39

【 図 40 】



FIG. 40

【 図 41 】

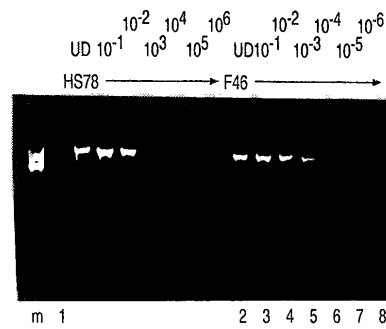


FIG. 41

【 図 42 】

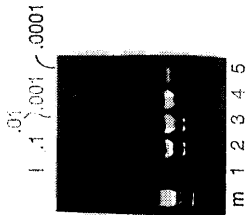


FIG. 42

【 図 44 A 】



FIG. 44A

【 図 43 】

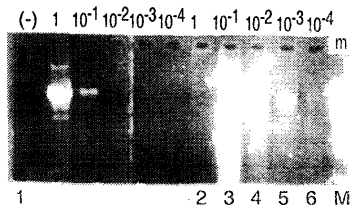


FIG. 43

【 図 44 B 】

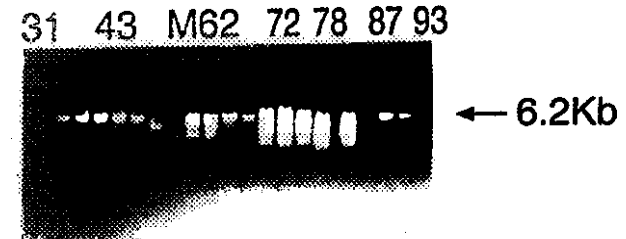


FIG. 44B

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 R	1/01	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			C 1 2 R	1:01	

(72)発明者 ハンセン, コニー ジェイ.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 1 5, サンディエゴ, ゲイル ストリート 3 6 4 5

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 国際公開第 9 4 / 0 0 5 7 9 7 (WO, A 1)  
 Nucl. Acids Res., vol. 18, p. 1079 (1990)  
 DNA Cell Biol., vol. 15, pp. 589-594 (1996)  
 Nucl. Acids Res., vol. 20, p. 4371 (1992)  
 Anal. Biochem., vol. 211, pp. 164-169 (1993)  
 J. Mol. Biol., vol. 272, pp. 178-189 (Sep. 1997)  
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 99, pp. 596-601 (2002)  
 Protein Expr. Purif., vol. 31, pp. 72-78 (2003)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/09  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)