

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 9/12

請求項の数9 (全16頁)

(21)出願番号 特願平9-332100  
 (22)出願日 平成9年12月2日(1997.12.2)  
 (65)公開番号 特開平11-155578  
 (43)公開日 平成11年6月15日(1999.6.15)  
 審査請求日 平成16年6月1日(2004.6.1)

微生物の受託番号 FERM BP-6189  
 微生物の受託番号 FERM BP-6190

(73)特許権者 503360115  
 独立行政法人科学技術振興機構  
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
 (73)特許権者 500520628  
 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式  
 会社  
 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕  
 張テクノガーデンD17  
 (74)代理人 100093230  
 弁理士 西澤 利夫  
 (72)発明者 土居 洋文  
 千葉県船橋市夏見5-29-4-515  
 (72)発明者 金井 昭夫  
 茨城県つくば市松代3-17-13  
 ヴィラ松代301  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】DNA合成酵素

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

1本鎖DNAに相補的なDNA鎖の合成を触媒するに際して合成DNAがより長く伸長するようにアミノ酸配列を人為的に改変したPfuDNA合成酵素であって、野生型PfuDNA合成酵素のアミノ酸配列における第2位IleをValに、第717位LeuをProにそれぞれ置換した、配列番号2のアミノ酸配列からなる改変型PfuDNA合成酵素。

【請求項2】

さらに、第710位ProをArgに、第712位SerをArgに、第713位LeuをProにそれぞれ置換した、配列番号1のアミノ酸配列からなる請求項1の改変型PfuDNA合成酵素。

【請求項3】

配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項4】

配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項5】

請求項3のDNAを含む組換え体ベクター。

【請求項6】

請求項4のDNAを含む組換え体ベクター。

【請求項7】

大腸菌HMS174(DE3)/pDP5C4 (FERM BP-6190) が保有する組換え体プラスミドpDP5C4である請求項5の組換え体ベクター。

## 【請求項 8】

大腸菌HMS174(DE3)/pDP5b17 (FERM BP-6189) が保有する組換え体プラスミドpDP5b17である請求項 6 の組換え体ベクター。

## 【請求項 9】

請求項 3 または 4 に記載の DNA を含む発現ベクターにより形質転換した細胞を培養し、培地中に生産された目的酵素を単離・精製することを特徴とする 改変型 Pfu DNA 合成酵素 の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

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

10

## 【0002】

## 【従来技術とその課題】

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

## 【0003】

このような耐熱性 DNA 合成酵素としては、Taq、Pfu、KOD等が知られており、それぞれの特性に応じて使い分けられている。特に、Pfu DNA 合成酵素は DNA 鎖合成時における読み違いが極めて少ない (忠実性が高い) 酵素として知られている。

20

しかしながら、この Pfu DNA 合成酵素は、合成量が少なく、また合成鎖に対する伸長活性が不十分であるために、ゲノム DNA 等の高分子 DNA を増幅するには不適當であった。

## 【0004】

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、DNA 鎖を PCR 等により合成、増幅するに際して、Pfu DNA 合成酵素の特徴である高忠実性を維持しつつ、鋳型 DNA 鎖をより長く効率的に増幅することのできる新規な耐熱性 DNA 合成酵素を提供

30

することを目的としている。またこの発明は、この DNA 合成酵素をコードする DNA 配列と、この DNA 配列の発現産物として上記 DNA 合成酵素を製造する方法を提供することを目的としている。

## 【0005】

## 【課題を解決するための手段】

この発明は、上記の課題を解決するものとして、1 本鎖 DNA に相補的な DNA 鎖の合成を触媒するに際して合成 DNA 鎖がより長く伸長するように Pfu DNA 合成酵素のアミノ酸配列を人為的に改変したことを特徴とする DNA 合成酵素を提供する。

## 【0006】

この DNA 合成酵素は、具体的には、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列からなる酵素である。

40

またこの発明は、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列と、これらの DNA 配列を含む組換え体ベクターを提供する。このようなベクターとしては、大腸菌 HMS174(DE3)/pDP5b17 (FERM BP-6189) が保有する組換え体プラスミド pDP5b17 (配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を保有するベクター)、および大腸菌 HMS174(DE3)/pDP5C4 (FERM BP-6190) が保有する組換え体プラスミド pDP5C4 (配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を保有するベクター) をも提供する。

## 【0007】

さらにまた、この発明は、上記 DNA 配列を含む発現ベクターにより形質転換した細胞を

50

培養し、培地中に産生された目的酵素を単離・精製することを特徴とするDNA合成酵素の製造方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

【 発明の実施の形態 】

この発明のDNA合成酵素は、具体的には、ピロコッカスフリオサス (Pyrococcus furiosus) 由来の耐熱性PfuDNA合成酵素を公知の変異遺伝子作成法 (Strategies, vol 9, p3-4, 1996) によって遺伝子工学的に改変した酵素である (以下、この発明の耐熱性DNA合成酵素を「改変型PfuDNA合成酵素」と記載することがある)。この酵素の作成は以下のとおりに行なった。すなわち、PfuDNA合成酵素の遺伝子は塩基配列が公知 (Nucleic Acids Research, vol.21, p259-265, 1993) であるため、その両端に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして、上記細菌のゲノムDNAを鋳型とするPCR法によりPfuDNA合成酵素の遺伝子を調製した。この遺伝子DNA断片をベクターにクローニングし、上記文献に記載の方法により変異させた。遺伝子の変異は、PfuDNA合成酵素のアミノ酸配列の一部がKODDNA合成酵素のアミノ酸配列に置き変わるように塩基を置換させた。PfuDNA合成酵素とKODDNA合成酵素は、アミノ酸配列が約80%相同であり、PCRの際に同様の合成停止を生じさせるが (図1)、KODDNA合成酵素の伸長速度はPfuDNA合成酵素の約6倍である。そこで、PfuDNA合成酵素のアミノ酸残基をKODDNA合成酵素のアミノ酸残基に置換することによって、伸長速度が速く、従って合成DNA鎖をより長く伸長させることのできる酵素が得られる可能性があるからである。そして、このようにして変異させた遺伝子を大腸菌で発現させ、その発現産物を回収し、精製することによってこの発明の改変型PfuDNA合成酵素を得た。

【 0 0 0 9 】

実際には、この発明の発明者等は、上記の方法により数多くの改変型PfuDNA合成酵素を作成し、それぞれについてDNA合成実験をおこない、伸長したDNA鎖を電気泳動的に解析することによって、従来酵素に比べて合成量を高め、合成鎖の伸長を促進させることのできるDNA合成酵素を得、この発明を完成させた。

【 0 0 1 0 】

この発明の耐熱性DNA合成酵素 (改変型PfuDNA合成酵素) は、具体的には、配列番号1または2のアミノ酸配列を有する酵素である (以下、これらを改変型PfuDNA合成酵素IおよびIIと記載することがある)。これらのアミノ酸配列は、従来公知のPfuDNA合成酵素のアミノ酸配列のうち、表1に示すアミノ酸残基がそれぞれ置換された新規な配列である。そして、これらの新規酵素を用いてPCR等のDNA合成を行なった場合には、下記の実施例に示すように、大量かつ高分子の合成産物を得ることが可能となる。

【 0 0 1 1 】

【 表 1 】

改変型DNA合成酵素	位置	野生型アミノ酸	⇒	改変型アミノ酸
I	2	Ile		Val
	710	Pro		Arg
	712	Ser		Arg
	713	Asn		Asp
	717	Leu		Pro
II	2	Ile		Val
	717	Leu		Pro

【 0 0 1 2 】

これらの改変型PfuDNA合成酵素をコードするDNA配列としては、上記の酵素作成過

程で得られた PfuDNA 合成酵素遺伝子の変異遺伝子を例示することができる。これらの変異遺伝子は、例えば配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列については、それぞれ組換え体プラスミド pDP5b17 および pDP5C4 にクローニングされており、これらの組換え体プラスミドは大腸菌 HMS174(DE3) に導入され、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（各々、寄託番号 FERM BP-6189 および FERM BP-6190）。

#### 【 0 0 1 3 】

また、この発明の DNA 配列は、例えば配列番号 1 または 2 の各アミノ酸残基に対応する塩基コドンをつなぎ合わせた DNA 配列として適宜にデザインすることもできる。

この発明の耐熱性 DNA 合成酵素は、大腸菌などの微生物で発現させて得ることができる。例えば、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、上記 DNA 配列を挿入結合して発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養してやれば、DNA 配列にコードされている酵素を微生物内で大量生産することができる。

#### 【 0 0 1 4 】

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

#### 【 0 0 1 5 】

##### 【実施例】

実施例 1：PfuDNA 合成酵素遺伝子のクローニング

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

#### 【 0 0 1 6 】

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

#### 【 0 0 1 7 】

次いで、目的の DNA 合成酵素遺伝子を PCR 増幅するために、既知の配列データをもとに配列番号 3 および 4 に示す 2 種のプライマ - DNA を合成した。すなわち、フォワードプライマー配列中には目的遺伝子の開始コドン ATG および制限酵素 NcoI 配列 (5'-CCATGG-3') を導入し、リバースプライマーは終止コドンの下流の適当な位置に結合するように設計した。PCR は、*P. furiosus* DNA 2 μg とプライマー各 10pmol を用い、LATAq (宝酒造) と添付のバッファー条件で、50 μl の反応系で行った。サイクル条件は、酵素を加える前に 93 °C / 3 分を行い、94 °C / 0.5 分、55 °C / 0.5 分、72 °C / 1.0 分を 30 サイクルした。増幅した DNA 断片を精製し、NcoI で処理した後、同じく NcoI で切断後に平滑末端化し、さらに NcoI 処理した発現ベクター pET15-b の T7 プロモーター下流に組み込んだ。この発現ベクターを pDPWT100 とし、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

実施例 2：改変型 PfuDNA 合成酵素 I 遺伝子の作成

クローン化した PfuDNA 合成酵素遺伝子を組み込んだ発現ベクター pDPWT100 に対

10

20

30

40

50

して、期待する変異を含んだオリゴヌクレオチド（配列番号 5 および 6）とプロメガ社の突然変異導入キットを用い、公知の方法（Strategies, vol 9, p3-4, 1996）に従って改変型 PfuDNA 合成酵素 I の遺伝子を、発現ベクター pDPWT100 上で作成し、発現ベクター pDP5b17 を構築した。なお、この改変型遺伝子の塩基配列を決定することにより、改変型 PfuDNA 合成酵素 I のアミノ酸配列（配列番号 1）を確認した。

実施例 3：改変型 PfuDNA 合成酵素 II 遺伝子の作成

配列番号 7 および 8 のオリゴヌクレオチドを用いたことを除き、実施例 2 と同一の方法により、改変型 PfuDNA 合成酵素 II の遺伝子を作成し、発現ベクター pDP5C4 を構築した。この改変型遺伝子の塩基配列を決定することにより、改変型 PfuDNA 合成酵素 II のアミノ酸配列（配列番号 2）を確認した。

10

実施例 4：改変型 PfuDNA 合成酵素 I の大腸菌での発現と精製

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

【0018】

改変型 PfuDNA 合成酵素 I 遺伝子をもつ発現ベクター pDP5b17 を大腸菌 HMS174 (DE3) 株に導入し、終濃度 0.1mM の IPTG を含んだ LB 培地で 14 時間培養し、酵素を大腸菌体内に発現誘導した。遠心して菌体を集めた後、150mM Tris/HCl (pH7.5)、2mM EDTA、0.24mM APMSF および 0.2% の Tween20 を含む緩衝液で超音波処理を行いながら、改変型 PfuDNA 合成酵素 I を抽出した。この粗抽出液を 80℃、15 分の熱処理を行うことで大腸菌由来の DNA 合成酵素を失活させると共に、改変型 PfuDNA 合成酵素 I の部分精製を行なった。部分精製画分は 50mM Tris/HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.2% Tween20、7mM 2-mercaptoethanol および 10% glycerol の緩衝液に対し透析した。この段階で改変型 PfuDNA 合成酵素 I に特異的な DNA 合成活性を検出した。

20

実施例 5：改変型 PfuDNA 合成酵素 II の大腸菌での発現と精製

実施例 3 で構築した発現ベクター pDP5C4 を用い、実施例 4 と同様の方法により改変型 PfuDNA 合成酵素 II を抽出し、部分精製した。

実施例 6：改変型 PfuDNA 合成酵素 I および II によるプライマー伸長反応

実施例 4 および 5 でそれぞれ部分精製した改変型 PfuDNA 合成酵素 I および II を用い、鋳型 DNA に相補的な DNA 鎖のプライマー伸長反応を試験した。

【0019】

20mM Tris/HCl (pH8.0)、2mM MgCl<sub>2</sub>、50μg/ml BSA、0.1% Triton X-100、1mM の各 cold dNTPs (0.1mM for dCTP)、[<sup>-32</sup>P] dCTP の 10μCi と M13(-21) のプライマーをアニールさせた 0.63μg の pBLUESCRIPT プラスミドを含む反応液 20μl に、上記の部分精製酵素画分 1μg を入れ、75℃ で 1 分および 3 分間反応させた。伸長した DNA 鎖を 8M urea を含んだポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、イメージアナライザによりそのパターンを解析した。また対照として、従来型の野性型 PfuDNA 合成酵素を用いて同様の DNA 合成を行なった。

30

【0020】

結果は図 2 に示したとおりである。従来型の野性型 PfuDNA 合成酵素を用いた場合には、約 1000 ベースに大きな合成停止領域が存在し、このことによる不完全な DNA 鎖の存在を示すバンドが観察された。一方、この発明の改変型 PfuDNA 合成酵素 I および II による DNA 合成では、約 1000 ベースのバンドも含めて合成量が増大し、しかもより高分子の（すなわち、より伸長した）PCR 産物の存在を示すバンドも観察された。

40

【0021】

以上の結果から、この発明の DNA 合成酵素は、PCR 法による DNA 合成において、合成 DNA 鎖のより長い伸長が可能であることが確認された。

【0022】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、高分子 DNA を PCR 等によって増幅する場合であっても、その全長を効率よく合成、増幅することのできる新規な耐熱性 DNA

50

合成酵素が提供される。これによって、DNA鎖の試験管内での合成や増幅、塩基配列の決定等を簡便かつ高精度で行なうことが可能となる。

【 0 0 2 3 】

【 配列表 】

配列番号： 1

配列の長さ： 775

配列の型： アミノ酸

配列の種類： タンパク質

配列

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

10

20

30

40

Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr	
195	200 205
Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu	
210	215 220
Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys	
225	230 235 240
Met Gln Arg Ile Gly Asp Met Thr Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile	10
	245 250 255
His Phe Asp Leu Tyr His Val Ile Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr	
	260 265 270
Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu	
	275 280 285
Lys Val Tyr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Trp Glu Ser Gly Glu Asn	
290	295 300
Leu Glu Arg Val Ala Lys Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Ala Thr Tyr	20
305	310 315 320
Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ile Gln Leu Ser Arg Leu	
	325 330 335
Val Gly Gln Pro Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu	
	340 345 350
Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Val Ala	30
	355 360 365
Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser	
370	375 380
Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn	
385	390 395 400
Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr	
	405 410 415
His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Leu Glu Gly Cys Lys Asn Tyr	40





Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His  
 660 665 670

Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala  
 675 680 685

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val  
 690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Arg Ile Arg Asp Arg Ala Ile Pro Ala Glu Glu  
 705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn  
 725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg  
 740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser  
 755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser  
 770 775

10

20

配列番号 : 2

配列の長さ : 775

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列

30

Met Val Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile  
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg  
 20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile  
 35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg  
 50 55 60

40

Ile Val Asp Val Glu Lys Val Glu Lys Lys Phe Leu Gly Lys Pro Ile	
65	70 75 80
Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile	
	85 90 95
Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr	
	100 105 110
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro	10
	115 120 125
Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr	
	130 135 140
Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile	
145	150 155 160
Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile	
	165 170 175
	20
Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys	
	180 185 190
Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr	
	195 200 205
Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu	
	210 215 220
Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys	30
225	230 235 240
Met Gln Arg Ile Gly Asp Met Thr Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile	
	245 250 255
His Phe Asp Leu Tyr His Val Ile Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr	
	260 265 270
Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu	
	275 280 285
	40
Lys Val Tyr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Trp Glu Ser Gly Glu Asn	

290	295	300	
Leu Glu Arg Val Ala Lys Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Ala Thr Tyr			
305	310	315	320
Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ile Gln Leu Ser Arg Leu			
	325	330	335
Val Gly Gln Pro Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu			
	340	345	350
Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Val Ala			10
	355	360	365
Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser			
	370	375	380
Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn			
385	390	395	400
Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr			20
	405	410	415
His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Leu Glu Gly Cys Lys Asn Tyr			
	420	425	430
Asp Ile Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Ile Pro Gly			
	435	440	445
Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile			30
	450	455	460
Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Lys Ile Leu Leu			
465	470	475	480
Asp Tyr Arg Gln Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly			
	485	490	495
Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu			
	500	505	510
Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Ile Glu Leu Val Trp Lys Glu			40
	515	520	525

Leu	Glu	Glu	Lys	Phe	Gly	Phe	Lys	Val	Leu	Tyr	Ile	Asp	Thr	Asp	Gly	
530									535						540	
Leu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Pro	Gly	Gly	Glu	Ser	Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Lys	
545															560	
Ala	Leu	Glu	Phe	Val	Lys	Tyr	Ile	Asn	Ser	Lys	Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	
					565					570					575	
Glu	Leu	Glu	Tyr	Glu	Gly	Phe	Tyr	Lys	Arg	Gly	Phe	Phe	Val	Thr	Lys	10
				580						585					590	
Lys	Arg	Tyr	Ala	Val	Ile	Asp	Glu	Glu	Gly	Lys	Val	Ile	Thr	Arg	Gly	
		595							600						605	
Leu	Glu	Ile	Val	Arg	Arg	Asp	Trp	Ser	Glu	Ile	Ala	Lys	Glu	Thr	Gln	
		610													620	
Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Thr	Ile	Leu	Lys	His	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Ala	
625						630									640	20
Val	Arg	Ile	Val	Lys	Glu	Val	Ile	Gln	Lys	Leu	Ala	Asn	Tyr	Glu	Ile	
						645									655	
Pro	Pro	Glu	Lys	Leu	Ala	Ile	Tyr	Glu	Gln	Ile	Thr	Arg	Pro	Leu	His	
						660									670	
Glu	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gly	Pro	His	Val	Ala	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	
															685	
Ala	Lys	Gly	Val	Lys	Ile	Lys	Pro	Gly	Met	Val	Ile	Gly	Tyr	Ile	Val	30
															700	
Leu	Arg	Gly	Asp	Gly	Pro	Ile	Ser	Asn	Arg	Ala	Ile	Pro	Ala	Glu	Glu	
705															720	
Tyr	Asp	Pro	Lys	Lys	His	Lys	Tyr	Asp	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Asn	
															735	
Gln	Val	Leu	Pro	Ala	Val	Leu	Arg	Ile	Leu	Glu	Gly	Phe	Gly	Tyr	Arg	
															750	40
Lys	Glu	Asp	Leu	Arg	Tyr	Gln	Lys	Thr	Arg	Gln	Val	Gly	Leu	Thr	Ser	



配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CGTATTCCTC AGCTGGAATT GCCCTATCGC GAATTCGACC ATCGCCTCT 49

配列番号：7

10

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CCAATTAGCA ATAGGGCAAT TCCAGCTGAG GAATACGATC 40

20

配列番号：8

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

GATCGTATTC CTCAGCTGGA ATTGCCCTAT TGCTAATTGG 40

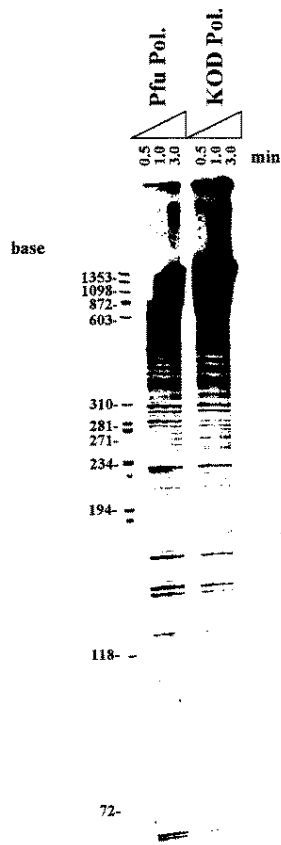
30

【図面の簡単な説明】

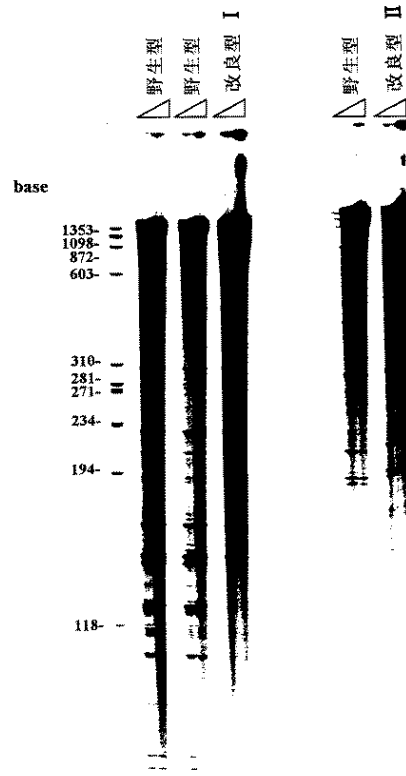
【図1】従来のPfuDNA合成酵素とKODDNA合成酵素のプライマー伸長活性を示す電気泳動の結果である。

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

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 石野 良純

大阪府高槻市富田町1 - 19 - 14

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 特開平5 - 328969 (JP, A)

特開平7 - 298879 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

JSTPlus(JDream2)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq