

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I		
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
9/10		9/10		
//(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:19)				
(C12N 9/10				

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平9 - 332100	(71)出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
(22)出願日	平成 9 年(1997)12月 2 日	(71)出願人	597014682 土居 洋文 千葉県船橋市夏見 5 - 29 - 4 - 515
		(71)出願人	597014693 金井 昭夫 茨城県つくば市松代 3 - 17 - 13 ヴィラ松 代301
		(72)発明者	土居 洋文 千葉県船橋市夏見 5 - 29 - 4 - 515
		(74)代理人	弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA合成酵素

(57) 【要約】

【課題】 DNA鎖をPCR等により増幅するに際して、鋳型DNA鎖の全長を効率よく増幅することのできる新規なDNA合成酵素と、この酵素の製造方法を提供する。

【解決手段】 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PfuDNA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合成酵素と、配列番号1または2のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む発現ベクターにより形質転換した細胞を培養し、培地中に産生された目的酵素を単離・精製することを特徴とするDNA合成酵素の製造方法。

【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 鎖がより長く伸長するように PfuDNA 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。

【請求項 2】 配列番号 1 のアミノ酸配列からなる請求項 1 の DNA 合成酵素。

【請求項 3】 配列番号 2 のアミノ酸配列からなる請求項 1 の DNA 合成酵素。

【請求項 4】 配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列。 10

【請求項 5】 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列。

【請求項 6】 請求項 4 の DNA 配列を含む組換え体ベクター。

【請求項 7】 請求項 5 の DNA 配列を含む組換え体ベクター。

【請求項 8】 大腸菌 H M S 174 (D E 3) / p D P 5 b 17 (F E R M B P - 6 1 8 9) が保有する組換え体プラスミド p D P 5 b 17 である請求項 6 の組換え体ベクター。 20

【請求項 9】 大腸菌 H M S 174 (D E 3) / p D P 5 C 4 (F I R M B P - 6 1 9 0) が保有する組換え体プラスミド p D P 5 C 4 である請求項 7 の組換え体ベクター。

【請求項 10】 請求項 4 または 5 の DNA 配列を含む発現ベクターにより形質転換した細胞を培養し、培地中に産生された目的酵素を単離・精製することを特徴とする DNA 合成酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【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。 30

【 0 0 0 2 】

【従来の技術とその課題】DNA 合成酵素 (DNA polymerase) は 1 本鎖 DNA に相補的な DNA 鎖の合成を触媒する酵素の総称である。DNA の塩基配列決定や試験管内での DNA 増幅などには必須の酵素であるが、特に PCR (Polymerase chain reaction) においては、その一連の反応サイクルを自動化する上で「耐熱性 DNA 合成酵素」は不可欠である。 40

【 0 0 0 3 】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、PfuDNA 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。しかしながら、この PfuDNA 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 50

た。

【 0 0 0 4 】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、PfuDNA 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。

【 0 0 0 5 】

【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 PfuDNA 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。

【 0 0 0 6 】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。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 H M S 174 (D E 3) / p D P 5 b 17 (F E R M B P - 6 1 8 9) が保有する組換え体プラスミド p D P 5 b 17 (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 H M S 174 (D E 3) / p D P 5 C 4 (F E R M B P - 6 1 9 0) が保有する組換え体プラスミド p D P 5 C 4 (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。

【 0 0 0 7 】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, p 259-265, 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 KOD DNA 合成酵素のアミ 50

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。

【0009】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。

【0010】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。

【0011】

【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
II	2	Ile		Val
	717	Leu		Pro

【0012】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)。

【0013】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。

【0014】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。

【0015】

10

30

40

50

【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。

【0016】P.furiosus DSM3638を上記文献に記載された方法で培養した。先ず、文献記載の培地を調製し、高温加圧滅菌ののち、蜜素ガスを吹き込み、植菌して95で15時間静置培養した。200mlの培養液から遠心分離により約0.5mgの菌体を得た。集菌体を緩衝液A(10mMトリス-HCL, pH8.0, 1mMEDTA, 100mM NaCl)に懸濁し、10% SDSを1ml加え、攪拌の後、プロテイナーゼKを0.5mg加えて55で60分反応させた。反応液を順次フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出し、エタノールを加えてDNAを不溶化し、回収した。得られたDNAを1mlのTEバッファ(10mMトリス-HCL, pH8.0, 1mMEDTA)に溶解し、0.5mgのRNase Aを加えて37で60分反応させたのち、再度フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出し、エタノール沈殿でDNAを回収してTEバッファに溶解させ、約0.3mgのDNAを得た。

【 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 Nco I 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 10 pmol を用い、LA Taq (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 / 3 分を行い、94 / 0.5 分、55 / 0.5 分、72 / 1.0 分を 30 サイクルした。増幅した DNA 断片を精製し、Nco I で処理した後、同じく Nco I で切断後に平滑末端化し、さらに Nco I 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, vol9, 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。

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大腸菌で発現させ、精製した。

【 0 0 1 8 】 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 0.1 mM 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、150 mM Tris/HCl (pH7.5)、2 mM EDTA、0.24 mM 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 50 mM Tris/HCl (pH

7.5)、1 mM EDTA、0.2% Tween20、7 mM 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。

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。

10 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。

【 0 0 1 9 】 20 mM Tris/HCl (pH8.0)、2 mM MgCl₂、50 μg/ml BSA、0.1% Triton X-100、1 mM の各 cold dNTPs (0.1 mM for dCTP)、[⁻³²P] dCTP の 10 μCi と M13 (-21) のプライマーをアニールさせた 0.63 μg の pBLUESCR IPT プラスミドを含む反応液 20 μl に、上記の部分精製酵素画分 1 μg を入れ、75 °C で 1 分および 3 分間反応させた。伸長した DNA 鎖を 8 M urea を含んだポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、イメージアナライザによりそのパターンを解析した。また対照として、従来の野性型 PfuDNA 合成酵素を用いて同様の DNA 合成を行なった。

【 0 0 2 0 】 結果は図 2 に示したとおりである。従来の野性型 PfuDNA 合成酵素を用いた場合には、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。

【 0 0 2 1 】 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。

【 0 0 2 2 】

【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 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

50 配列の種類 : タンパク質

9 10
 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
 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
 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
 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
 545 550 555 560
 Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu
 565 570 575
 Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys
 580 585 590
 Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly
 595 600 605
 Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln
 610 615 620
 Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
 625 630 635 640
 Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
 645 650 655
 Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
 660 665 670
 Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
 675 680 685
 Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
 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

11

12

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
 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
 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
 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
 355 360 365
 Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser
 370 375 380

13		14
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		
	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		
	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		
	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	550	555 560
Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu		
	565	570 575
Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys		
	580	585 590
Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly		
	595	600 605
Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln		
	610	615 620
Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala		
625	630	635 640
Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile		
	645	650 655
Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His		
	660	665 670
Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala		
	675	680 685
Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val		
	690	695 700
Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn 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	

15

16

配列番号 : 3
配列の長さ : 35
配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

GTGGGGAGCA CCATGGTTTT AGATGTGGAT TACAT 35

配列番号 : 4
配列の長さ : 35
配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

GATGCAGAT AGACCATTTT TAACGAAGGC GTTTG 35

配列番号 : 5
配列の長さ : 49
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

AGAGGCGATG GTCGAATTCG CGATAGGGCA ATTCCAGCTG AGGAATACG 49

配列番号 : 6
配列の長さ : 49
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
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

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

【図面の簡単な説明】

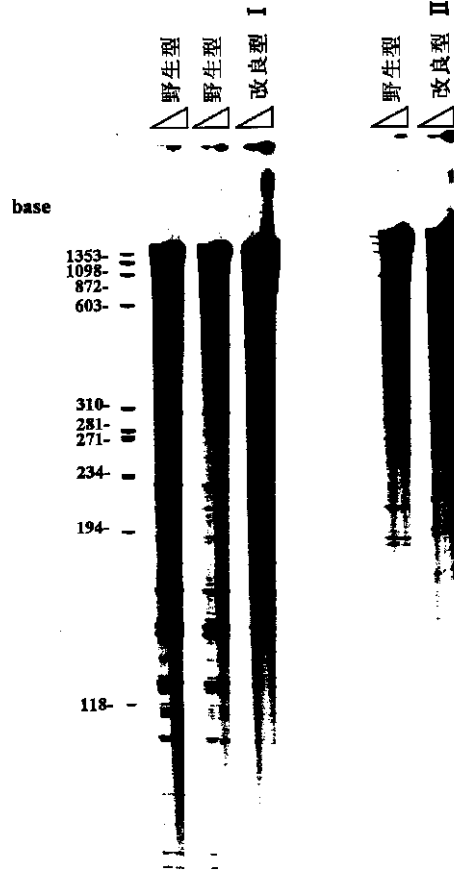
【図 1】従来の PfuDNA 合成酵素と KODDNA 合成酵素のプライマー伸長活性を示す電気泳動の結果である。

【図 2】従来の PfuDNA 合成酵素 (野性型) 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

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 R 1:19)

識別記号

F I

(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

(72)発明者 石野 良純
大阪府高槻市富田町 1 - 19 - 14