

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/054510

発行日 平成23年3月10日 (2011. 3. 10)

(43) 国際公開日 平成21年4月30日 (2009. 4. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 9/12 (2006. 01)	C 1 2 N 9/12	4 B O 5 0
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 55 頁)

出願番号 特願2009-503353 (P2009-503353)	(71) 出願人 503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2008/069371	
(22) 国際出願日 平成20年10月24日 (2008. 10. 24)	
(11) 特許番号 特許第4450867号 (P4450867)	(71) 出願人 501293666 株式会社ダナフォーム 神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 - 1
(45) 特許公報発行日 平成22年4月14日 (2010. 4. 14)	
(31) 優先権主張番号 特願2007-277496 (P2007-277496)	(74) 代理人 100115255 弁理士 辻丸 光一郎
(32) 優先日 平成19年10月25日 (2007. 10. 25)	(74) 代理人 100129137 弁理士 中山 ゆみ
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100146064 弁理士 吉田 玲子
	(74) 代理人 100154081 弁理士 伊佐治 創

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 等温増幅方法およびそれに用いる等温増幅用キット

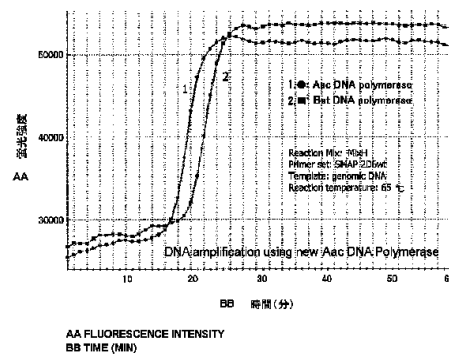
(57) 【要約】

特定の等温増幅方法に適したDNAポリメラーゼならびにそれを用いた等温増幅方法を提供する。下記(a)または(b)のタンパク質からなるDNAポリメラーゼの存在下、等温で、下記(X)に示す第一のプライマーを用いて核酸試料中の標的核酸配列の増幅反応を行う。前記DNAポリメラーゼの使用により、前記プライマーを用いる増幅反応を、従来よりも短時間で行うことが可能となる。

(a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b) 配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(X) 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含み且つ前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含むプライマー

【図4】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸試料中の標的核酸配列を等温で増幅する等温増幅方法であって、

下記 (a) ~ (d) のいずれかのタンパク質からなる DNA ポリメラーゼの存在下、等温で、下記 (X) に示す第一のプライマーを用いて、前記標的核酸配列の増幅反応を行うことを特徴とする等温増幅方法。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 25 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、N 末端から、1 ~ 334 個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記 (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNA ポリメラーゼ活性を有するタンパク質

(X) 標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (A c') を 3' 末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (B c) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (A c') の 5' 側に含むプライマー

【請求項 2】

前記 DNA ポリメラーゼが、25 ~ 75 の範囲における少なくともいずれかの温度において、DNA ポリメラーゼ活性を有する、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 3】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記 DNA ポリメラーゼ活性として、相補鎖置換複製酵素活性を有する、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 4】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記 DNA ポリメラーゼ活性として、逆転写酵素活性を有する、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 5】

前記 DNA ポリメラーゼが、5' ~ 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 6】

前記 DNA ポリメラーゼが、3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼである、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 7】

前記 DNA ポリメラーゼが、3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 8】

前記増幅反応において、第二のプライマーを併用し、

前記第一のプライマーと第二のプライマーとが、形態が異なる非対称型の一对のプライマーである、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 9】

前記第二のプライマーが、前記標的核酸配列の相補配列の 3' 末端部分の配列 (C) にハイブリダイズする配列 (C c') を 3' 末端部分に含み、且つ、相互にハイブリダイズする 2 つの核酸配列を同一鎖上に含む折返し配列 (D - D c') を前記配列 (C c') の 5' 側に含むものである、請求の範囲 8 記載の等温増幅方法。

【請求項 10】

前記増幅反応において、さらに、第三のプライマーを併用し、

前記第三のプライマーは、前記標的核酸配列またはその相補配列にハイブリダイズし、且つ、標的核酸配列またはその相補配列へのハイブリダイゼーションについて他のプライマーと競合しないプライマーであり、

前記第三のプライマーは、前記第一のプライマーまたは第二のプライマーの増幅産物が

10

20

30

40

50

部分的に一本鎖の状態になった時に、その一本鎖部分に存在する標的核酸配列にアニーリングすることができ、これにより前記増幅産物中の標的核酸配列に新たな相補鎖合成起点が提供されるプライマーである、請求の範囲 8 記載の等温増幅方法。

【請求項 1 1】

前記増幅反応において、さらに、第二のプライマーを併用し、

前記第一のプライマーと第二のプライマーとが、形態が同じである対称型の一对のプライマーである、請求の範囲 1 記載の等温増幅方法。

【請求項 1 2】

前記プライマーセットが、LAMP法に使用するプライマーセットである、請求の範囲 1 1 記載の等温増幅方法。

10

【請求項 1 3】

請求の範囲 1 記載の等温増幅方法に使用するためのDNAポリメラーゼであって、

下記 (a) ~ (d) のいずれかのタンパク質からなることを特徴とするDNAポリメラーゼ。

(a) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1 ~ 3 3 4 個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記 (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

20

【請求項 1 4】

前記DNAポリメラーゼが、25 ~ 75 の範囲における少なくともいずれかの温度において、DNAポリメラーゼ活性を有するポリメラーゼである、請求の範囲 1 3 記載の等温増幅用DNAポリメラーゼ。

【請求項 1 5】

前記DNAポリメラーゼが、前記DNAポリメラーゼ活性として、相補鎖置換複製酵素活性を有するポリメラーゼである、請求の範囲 1 3 記載の等温増幅用DNAポリメラーゼ。

【請求項 1 6】

前記DNAポリメラーゼが、前記DNAポリメラーゼ活性として、逆転写酵素活性を有するポリメラーゼである、請求の範囲 1 3 記載の等温増幅用DNAポリメラーゼ。

30

【請求項 1 7】

前記DNAポリメラーゼが、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求の範囲 1 3 記載の等温増幅用DNAポリメラーゼ。

【請求項 1 8】

前記DNAポリメラーゼが、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼである、請求の範囲 1 3 記載の等温増幅用DNAポリメラーゼ。

【請求項 1 9】

前記DNAポリメラーゼが、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求の範囲 1 3 記載の等温増幅用DNAポリメラーゼ。

40

【請求項 2 0】

請求の範囲 1 記載の等温増幅方法に使用するための等温増幅用キットであって、請求の範囲 1 3 記載の等温増幅用DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする等温増幅用キット。

【請求項 2 1】

さらに、下記 (X) に示す第一のプライマーを含む、請求の範囲 2 0 記載の等温増幅用キット。

(X) 標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (A c')

50

に存在する配列 (B) の相補配列 (B c) にハイブリダイズする配列 (B ') を前記配列 (A c ') の 5 ' 側に含むプライマー

【請求項 2 2】

さらに、第二のプライマーを含み、

前記第一のプライマーと前記第二のプライマーとが、形態が異なる非対称型の一对のプライマーである、請求の範囲 2 1 記載の等温増幅用キット。

【請求項 2 3】

さらに、第二のプライマーを含み、

前記第一のプライマーと前記第二のプライマーとが、形態が同じである対称型の一对のプライマーである、請求の範囲 2 1 記載の等温増幅用キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、等温増幅方法およびそれに用いる DNA ポリメラーゼに関する。

【背景技術】

【0002】

DNA ポリメラーゼは、ライフサイエンスの分野で最も汎用的な酵素の一つであり、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法をはじめとして、種々の技術に必須の酵素である。このような DNA ポリメラーゼは、数多くの種類が販売され、それぞれのポリメラーゼは、例えば、反応条件、酵素活性について特徴を持っている。最もよく知られている大腸菌の DNA ポリメラーゼ I は、鋳型 DNA とプライマーとから、鋳型と相補的な配列を合成する 5 ' 3 ' ポリメラーゼ活性と共に、5 ' 3 ' エキソヌクレアーゼ活性および 3 ' 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有する。これら 3 つの酵素活性は、各々異なる構造ドメインと関連することが知られている。すなわち、N 末端側の 5 ' 3 ' エキソヌクレアーゼドメイン、中央部の 3 ' 5 ' エキソヌクレアーゼドメインおよび C 末端側のポリメラーゼドメインである (例えば、非特許文献 1 参照)。前記 DNA ポリメラーゼ I をズブチリンで処理して得られる 75 k D の大断片 (ラージフラグメント) は、クレノウフラグメントとも呼ばれ、前記 3 つの活性のうち 5 ' 3 ' エキソヌクレアーゼ活性を欠失している。このため、クレノウフラグメントは、ジデオキシ法シーケンズ反応や、5 ' 突出末端の平滑化反応等に有用であり、現在では、DNA ポリメラーゼ I の N 末端側小断片を含まない組換えタンパク質として発現、精製されて、市販されている。

20

30

【0003】

DNA の増幅技術としては、一般的に PCR 法が利用されているが、複雑な温度制御が必要であること、これらの複雑な温度制御を行うためのサーマルサイクラーが必要であること、反応時間が数時間かかること等の問題点がある。そこで、PCR 法に代わる DNA の増幅技術として、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法 (例えば、非特許文献 2 参照)、SDA (Strand Displacement Amplification) 法 (例えば、特許文献 1 参照)、三谷らの方法 (例えば、特許文献 4、特許文献 5、特許文献 6、非特許文献 3 参照) 等が開発されている。これらの反応は、等温での増幅反応が可能であることから、等温増幅法と呼ばれており、PCR のような複雑な温度制御や、それを実行するサーマルサイクラーが不要である。他方、等温での増幅反応のためには、相補鎖置換複製活性を持った DNA ポリメラーゼ (例えば、特許文献 2、特許文献 3 参照) が必須である。この相補鎖置換複製活性を持った DNA ポリメラーゼは、現在、市場で入手できる種類は少なく、至適温度等の反応条件が限られており、あるいは、反応時間が長いという点等が指摘されている。このため、これらの DNA 増幅方法を用いる検査・診断薬などの開発にも制限となっている。

40

【特許文献 1】特開平 10 - 313900 号公報

【特許文献 2】特許第 2978001 号公報

【特許文献 3】特開平 09 - 224681 号公報

50

【特許文献4】国際公開W O 2 0 0 4 / 0 4 0 0 1 9号パンフレット

【特許文献5】国際公開W O 2 0 0 5 / 0 6 3 9 7 7号パンフレット

【特許文献6】国際公開W O 2 0 0 1 / 0 3 0 9 9 3号パンフレット

【非特許文献1】Kornberg, A., Baker TA. DNA Replication, W.H. Freeman and Company, New York, 1992.

【非特許文献2】Notomi, T. et al., Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 12, e63

【非特許文献3】Mitani, Y. et al., Nature Methods, 2007, Vol. 4, No. 3, 257-262

【発明の開示】

10

【0004】

現在、等温増幅法に用いられているDNAポリメラーゼは、比較的低温で作用するため、前記増幅反応において、鋳型DNAとプライマーとのアニーリングの特異性が低い。このため、増幅反応の特異性が低下して副反応物が生じることや、比較的長い目的配列の増幅が難しい等の問題点が指摘されている。また、同じDNAポリメラーゼであっても、適用する等温増幅法の種類によって、例えば、増幅効率が異なるため、それぞれの等温増幅法に適したDNAポリメラーゼが求められている。

【0005】

そこで、本発明は、特定の等温増幅方法に適したDNAポリメラーゼならびにそれを用いた等温増幅方法を提供することを目的とする。

20

【0006】

本発明の等温増幅方法は、核酸試料中の標的核酸配列を等温で増幅する等温増幅方法であって、下記(a)~(d)のいずれかのタンパク質からなるDNAポリメラーゼの存在下、等温で、下記(X)に示す第一のプライマーを用いて、前記標的核酸配列を増幅することを特徴とする。

(a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1~334個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記(a)~(c)のいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

30

(X) 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含むプライマー

【0007】

本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼは、本発明の等温増幅方法に使用するためのDNAポリメラーゼであって、前記(a)~(d)のいずれかのタンパク質からなることを特徴とする。

40

【0008】

本発明の等温増幅キットは、本発明の等温増幅方法に使用するための等温増幅用キットであって、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする。

【0009】

本発明者は、DNA複製酵素活性および相補鎖置換複製活性を有する熱安定性のアリシクロパチルス・アシドカルダリウス(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)由来DNAポリメラーゼ(以下、「Aacポリメラーゼ」という)が、等温増幅法の中でも後述する特定の方法に適していることを見出し、本発明を完成した。本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼによれば、等温増幅法に使用されている従来のDNAポリメラーゼと比較して、後述する特定の等温増幅法の増幅効率を向上できるため、結果的に、従来よりも短時間で

50

核酸増幅を行うことが可能となる。核酸増幅に要する時間を短縮化できれば、例えば、核酸増幅を利用する一塩基多型 (SNP) 等の解析をより迅速に行うことができ、また、大量の検体であっても、より効率的に解析することが可能である。したがって、本発明は、核酸増幅を利用する核酸解析や臨床検査等の分野に極めて有用である。なお、AacDNAポリメラーゼが、特定の等温増幅法に適していることは、本発明者らがはじめて見出したことである。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】DNAポリメラーゼ活性の測定に用いた標準曲線を示すグラフである。

【図2】本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、60～68の温度における相補鎖置換複製酵素活性を測定した結果を示す電気泳動写真である。

【図3】本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、68～74の温度における相補鎖置換複製酵素活性を測定した結果を示す電気泳動写真である。

【図4】本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフである。

【図5】本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフである。

【図6】本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフである。

【図7】本発明の一実施形態であるSMA P法における、第一のプライマーによる核酸合成の作用機序を示す模式図である。

【図8】本発明の一実施形態であるSMA P法における、第二のプライマーの一例を示す模式図である。

【図9】本発明の一実施形態であるSMA P法の作用機序の一例を示す模式図である。

【図10】本発明の一実施形態であるSMA P法の作用機序の一例を示す模式図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

<等温増幅用DNAポリメラーゼ>

本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼは、前述のように、本発明の等温増幅法に使用するためのDNAポリメラーゼであり、下記(a)～(d)のいずれかのタンパク質からなることを特徴とする。なお、本発明のDNAポリメラーゼを適用する本発明の等温増幅法については、後述する。

(a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1～334個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記(a)～(c)のいずれかのタンパク質の有するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

【0012】

本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼは、例えば、アリシクロバチルス(*Alicyclobacillus*)属の微生物から単離することができ、好ましくは、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス(*A. acidocaldarius*)から、さらに好ましくは、*A. acidocaldarius* JCM5260株から単離することができる。本菌株(JCM5260株)は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より分譲可能である(http://www.jcm.riken.jp/JCM/Ordering_J.shtml)。本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼは、以下、「本発明のDNAポリメラーゼ」、「本発明のDNAポリメラーゼI」、「本発明のAacポリメラーゼ」または「本発明のタンパク質」という場合もある。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

前記 (a) の配列番号 2 3 で表される D N A ポリメラーゼは、例えば、A . acidocaldarius JCM5260株から完全長 D N A ポリメラーゼとして単離できる。前記 (b) の配列番号 2 5 で表される D N A ポリメラーゼは、前記 (a) の配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列において、N 末端 1 個目から 3 3 4 個目までのアミノ酸残基が欠失したタンパク質である。このように、配列番号 2 3 のアミノ酸配列において、1 ~ 3 3 4 番目のアミノ酸からなる N 末端領域を欠失したタンパク質であっても、D N A ポリメラーゼ活性を有している。また、前記 (c) のタンパク質は、配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列において、N 末端から、1 個 ~ 3 3 4 個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したタンパク質である。このように前記 N 末端領域において、任意のアミノ酸残基が欠失したタンパク質であっても、D N A ポリメラーゼ活性を有している。欠失するアミノ酸残基の個数は、特に制限されず、例えば、1 個 ~ 3 3 4 個の範囲である。また、前記 N 末端領域において、アミノ酸残基は、連続して欠失してもよいし、不連続で欠失してもよい。

10

【 0 0 1 4 】

また、本発明の D N A ポリメラーゼは、前記 (d) に示すように、D N A ポリメラーゼ活性を有する限り、前記 (a) ~ (c) のアミノ酸配列において、1 個または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。「1 個または数個のアミノ酸」とは、例えば、前記 (a) ~ (c) のアミノ酸残基数の 5 ~ 1 0 % 程度をいい、例えば、1 ~ 5 0 個程度、好ましくは 1 ~ 2 0 個程度、より好ましくは 1 ~ 1 0 個程度、最も好ましくは 1 ~ 5 個程度である。

20

【 0 0 1 5 】

また、本発明の D N A ポリメラーゼは、下記 (e) に示すように、D N A ポリメラーゼ活性を有する限りにおいて、前記 (a) ~ (c) のアミノ酸配列との相同性が、例えば、5 0 % 以上のタンパク質であってもよい。前記相同性は、好ましくは、7 0 % 以上、8 0 % 以上、8 5 % 以上、9 0 % 以上、9 7 % 以上、9 8 % 以上である。

(e) 前記 (a) ~ (c) のいずれか記載のタンパク質の有するアミノ酸配列との相同性が、例えば、5 0 % 以上のアミノ酸配列からなり、且つ、D N A ポリメラーゼ活性を有するタンパク質

【 0 0 1 6 】

タンパク質の相同性 (ホモロジー) の程度は、通常、2 つのタンパク質のアミノ酸配列同士を適切に整列 (アライメント) したときの同一性のパーセント値で表わすことができ、前記両アミノ酸配列間の正確な一致の出現率を意味する。同一性比較のための配列間での適切な整列は、種々のアルゴリズム、例えば、B L A S T アルゴリズムを用いて決定できる (Altschul , S.F. et al., J. Mol. Biol., 1990, Vol. 215, No.3, 403-410) 。

30

【 0 0 1 7 】

本発明の D N A ポリメラーゼは、ポリメラーゼ活性として、通常の鋳型依存性の D N A 複製酵素活性および相補鎖置換複製酵素活性を有し、例えば、さらに、逆転写酵素活性を有する。また、本発明の D N A ポリメラーゼは、さらに、3 ' 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有していてもよい。本発明の D N A ポリメラーゼが 3 ' 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有すれば、例えば、基質を取り込む際のエラーをより減少することが可能である。本発明の D N A ポリメラーゼは、例えば、2 5 ~ 7 5 のいずれかの温度で活性を示すことが好ましく、より好ましくは 3 7 ~ 7 2 のいずれかの温度、さらに好ましくは 5 0 ~ 7 0 のいずれかの温度、特に好ましくは 5 5 ~ 6 5 のいずれかの温度である。本発明の D N A ポリメラーゼの至適温度は、例えば、公知の相補鎖置換複製酵素活性を有する D N A ポリメラーゼの至適温度 (例えば、2 0 ~ 3 7) より高温である。具体的には、例えば、2 5 ~ 7 5 のいずれかの温度で活性を有することが好ましく、より好ましくは、3 7 ~ 7 2 のいずれかの温度、さらに好ましくは、5 0 ~ 7 0 のいずれかの温度、特に好ましくは、5 5 ~ 6 5 のいずれかの温度である。従って、本発明の D N A ポリメラーゼは、例えば、相補鎖置換複製酵素活性を有する従来の D N A ポリメラーゼよりも

40

50

高温度の反応条件で用いることができる。このため、後述するSMA P法やLAMP法等を含む本発明における特定の等温増幅法において、鋳型DNAとプライマーとのより厳密なアニーリング条件下で使用することが可能である。また、本発明のDNAポリメラーゼが逆転写酵素活性を有する場合、例えば、RNAを鋳型としてDNAを合成することができ、従来のRT-PCRの代替法にも利用できる。

【0018】

さらに、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼは、例えば、前述のように、N末端側アミノ酸残基を欠失させたN末端欠失DNAポリメラーゼを含む。欠失させるN末端側のアミノ酸残基数は、前述のように、例えば、得られるN末端欠失DNAポリメラーゼが相補鎖置換複製酵素活性を有していればよく、特に限定されない。具体例としては、前記N末端欠失DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しており、例えば、大腸菌のDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントに対応する活性を有するものが好ましい。このようなDNAポリメラーゼとしては、例えば、前記(b)または前記(c)に示すように、配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質において、N末端から1~334個の任意の個数の連続したアミノ酸残基が欠失したタンパク質があげられる。N末端から連続的に欠失するアミノ酸の残基数が相対的に多い場合に、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失する可能性が相対的に高いと考えられる。また、DNAポリメラーゼは、N末端側から、5' 3'エキソヌクレアーゼ、3' 5'エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼの順でそれぞれのドメインが配置されている。したがって、5' 3'エキソヌクレアーゼを欠失させる場合は、例えば、配列番号23のアミノ酸配列において、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を示さなくなるまで、N末端側より任意の個数のアミノ酸残基を欠失させることで、前記活性を欠失することができる。なお、配列番号23のアミノ酸配列においては、62~306番目の領域が5' 3'エキソヌクレアーゼドメイン、392~536番目の領域が3' 5'エキソヌクレアーゼドメインと考えられるが、本発明は、これに限定されるものではない。本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼとして、大腸菌のクレノウフラグメントに対応する、DNAポリメラーゼ活性と3' 5'エキソヌクレアーゼ活性とを有し、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失したN末端欠失DNAポリメラーゼのアミノ酸配列の具体例を配列番号25に示す。このように、本発明のDNAポリメラーゼが5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失する場合、例えば、遺伝子増幅を行う際に、得られた増幅産物の分解を防止できるという利点を有する。

【0019】

さらに、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼは、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失していてもよい。種々のDNAポリメラーゼIについて、各アミノ酸配列を比較すると、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素には、酵素タンパク質の中央部に3つの共通配列モチーフが存在することが知られている。これらのモチーフを除去した酵素を作製することができる。例えば、市販の好熱性細菌由来のBst DNAポリメラーゼは、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失している(Aliotta, J.M. et al., Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, Vol. 12, pp. 185-195, 1996)。3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しているDNAポリメラーゼは、例えば、等温増幅反応に用いた際、プライマーの3'末端を分解することがない。このため、プライマー濃度の低下が十分に防止されることによって、核酸増幅速度がより速くなるという利点がある。また、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しているDNAポリメラーゼは、例えば、点突然変異の検出への使用に適している。3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しているDNAポリメラーゼによれば、例えば、プライマーが3'側から分解されることを十分に防止できる。このため、プライマーは、鋳型DNAの変異箇所を十分に識別でき、例えば、誤って伸長反応が進むことが抑制され、伸長反応の停止による点突然変異の検出がより正確に行うことができる。前述のように、DNAポリメラーゼは、N末端側から、5' 3'エキソヌクレアーゼ、3' 5'エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼの順でそれぞれのドメインが配置されている。したがって、3' 5'エキソヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼを欠失させる場合は、例えば、配列番号23または配列番号25のアミノ酸配列において、DNAポリメラーゼ活性を有し、且つ、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を示さなくなるまで、任意の個数のアミノ酸残基を欠失させることで、前記活性を欠失することができる。また、配列番号23のアミノ酸配列においては、392~536番目の領域が3' 5'エキソヌクレアーゼドメインと考えられるため、例えば、この領域を欠失させてもよい。

【0020】

一方、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性の発現には、例えば、活性中心のアミノ酸側鎖のカルボキシル基に配位する2つの金属イオンが重要であることが示唆されている。そこで、例えば、側鎖にカルボキシル基を持つアミノ酸を活性中心に導入することにより、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性の低いDNAポリメラーゼについて、前記酵素活性を増強することも可能である(Park, Y. et al., Mol Cells. Vol. 7, No.3, pp.419-424, 1997)。

10

【0021】

DNAポリメラーゼの活性測定方法は、制限されず、当業者に周知の種々の方法により測定することができる。DNAポリメラーゼ活性のうち鑄型依存性のDNA複製酵素活性は、例えば、文献(Seville M. et al. Biotechniques Vol.21, pp.664-668 (1996))等に記載されている蛍光定量的な測定方法を用いることができる。また、DNAポリメラーゼ活性のうち相補鎖置換複製酵素活性は、例えば、前述の非特許文献1(Kornberg, A. and Baker TA. DNA Replication, W.H. Freeman and Company, New York, 1992.)等に記載されている測定方法を用いることができる。また、DNAポリメラーゼ活性のうち逆転写酵素活性は、例えば、市販キット(例えば、EnzChek(商標) Reverse Transcriptase Assay Kit (E-22064) Molecular Probes (Invitrogen社製))を使用し、そのプロトコールに従って測定できる。

20

【0022】

<等温増幅法>

本発明の等温増幅方法は、核酸試料中の標的核酸配列を等温で増幅する等温増幅方法であって、前記(a)~(d)のいずれかのタンパク質からなる本発明のDNAポリメラーゼの存在下、等温で、下記(X)に示す第一のプライマーを用いて、前記標的核酸配列を増幅することを特徴とする。

30

(X)標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含むプライマー

【0023】

本発明は、前記(X)に示す第一のプライマーを使用する等温増幅方法であって、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼを使用することが特徴である。したがって、前記(X)に示す第一のプライマーと本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼとを使用する以外は、その他の構成や工程、条件等は制限されない。また、前記(X)に示す第一のプライマーを用いた等温増幅反応によると、例えば、電気泳動解析時にラダー状の増幅産物が得られることから、本発明のDNAポリメラーゼを適用する等温増幅反応は、例えば、ラダー状の増幅産物を生成する等温増幅反応ということもできる。

40

【0024】

等温増幅法は、一般に、等温で核酸増幅反応を行う方法である。増幅反応の条件は、特に制限されず、当業者であれば適宜決定できる。反応温度は、例えば、プライマーの融解温度(Tm)付近の温度、または、それ以下に設定することが好ましく、さらには、プライマーの融解温度(Tm)を考慮し、ストリンジェンシーのレベルを設定することが好ましい。反応温度の具体例としては、例えば、約20~約75であり、好ましくは、約37~約72、より好ましくは、約50~70であり、さらに好ましくは約55~65である。

50

【 0 0 2 5 】

また、増幅反応の際には、例えば、特異性を向上できることから、さらに、ミスマッチ結合タンパク質を共存させることが好ましい。前記ミスマッチ結合タンパク質（「ミスマッチ認識タンパク質」ともいう）としては、例えば、二重鎖核酸におけるミスマッチを認識し、そのミスマッチの部位に結合することが可能なタンパク質であればよく、例えば、当業者に公知のタンパク質が使用できる。また、前記ミスマッチ結合タンパク質は、例えば、二重鎖核酸におけるミスマッチを認識しうる限り、野生型タンパク質のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質（変異体）であってもよい。前記ミスマッチ結合タンパク質としては、例えば、MutSタンパク質（例えば、特表平9-504699号公報）、MutMタンパク質（例えば、特開2000-300265号公報）、GFP（Green Fluorescence Protein）に結合したMutSタンパク質（国際公開第99/06591号パンフレット）、Taq MutS、これらの類似体等、多くのものが知られている（Radman, M. and Wagner, R., Annu. Rev. Genet. 20:523-538(1986); Radman, M. and Wagner, R., Sci. Amer., 1988, pp40-46; Modrich, P., J. Biol. Chem. 264:6597-6600(1989); Lahue, R.S. et al., Science 245:160-164(1988); Jiricny, J. et al., Nucl. Acids Res. 16:7843-7853(1988); Su, S.S. et al., J. Biol. Chem. 263:6829-6835(1988); Lahue, R.S. et al., Mutat. Res. 198:37-43(1988); Dohet, C. et al., Mol. Gen. Genet. 206:181-184(1987); Jones, M. et al., Genetics 115:605-610(1987); Salmonella typhimuriumのMutS (Lu, A.L., Genetics 118:593-600(1988); Haber L.T. et al., J. Bacteriol. 170:197-202(1988); Pang, P.P. et al., J. Bacteriol. 163:1007-1015(1985)); および Priebe S.D. et al., J. Bacteriol. 170:190-196(1988) 等)。本発明においては、例えば、MutS、MSH2、MSH6、MutH、MutL、酵母由来ミスマッチ結合質が好ましい。

10

20

【 0 0 2 6 】

また、前記ミスマッチ結合タンパク質は、例えば、ミスマッチを含まない二重鎖核酸への結合を防ぐため、活性化剤により活性化されていることが好ましい。前記活性化剤は、特に限定されないが、例えば、ATP（アデノシン5'-三リン酸）、ADP（アデノシン5'-二リン酸）、ATP-S（アデノシン5'-O-(3-チオ三リン酸)）、AMP-PNP（アデノシン5'-[, -イミド]三リン酸）等があげられ、この他に、ミスマッチ結合タンパク質に結合できるヌクレオチドの一つであってもよい。活性化は、例えば、前記ミスマッチ結合タンパク質と前記活性化剤とを、室温で数秒間から数分間インキュベートすることにより行うことができる。

30

【 0 0 2 7 】

前記ミスマッチ結合タンパク質を使用する場合、例えば、前記ミスマッチ結合タンパク質の一本鎖核酸への結合を防ぐため、さらに、一本鎖結合タンパク質（SSB）を併用することが好ましい。前記SSBとしては、特に制限されず、従来公知のタンパク質が使用できる。SSBの具体例としては、例えば、大腸菌、ショウジョウバエ、およびアフリカツメガエルに由来する一本鎖結合タンパク質、T4バクテリオファージ由来の遺伝子32タンパク質、この他に、他の種に由来するこれらのタンパク質があげられる。この場合、前記ミスマッチ結合タンパク質としては、MutS、MutH、MutL、HexA、MSH1~6、Rep3、RNaseA、ウラシル-DNAグリコシダーゼ、T4エンドヌクレアーゼVII、レゾルパーゼなどがあげられ、好ましくは、MutS、MSH2、MSH6、または、これらの2種以上の混合物であり、より好ましくは、MutSである。

40

【 0 0 2 8 】

前記(X)に示す第一のプライマーを使用する等温増幅方法としては、例えば、国際公開第00/28082号パンフレット、Notomi, T et al., Nucleic Acids Research (2000), Vol.28, e63. 等に関示されているLAMPA法（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法、日本国特許第3867926号公報、特許第3897805号公報、特許第3942627号公報およびNATURE METHODS (Vol.4, No.3, March 2007, pp. 257-262)、Mitani Y., Lezhava A., Kawai Y., Kikuchi T., Oguchi-Katayama

50

A., Kogo Y., Itoh M., Miyagi T. et al. 2007. "Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology." Nat. Methods 4(3): 257-262.等に掲載されている方法(以下、「SMart Amplification Process法」という)等があげられる。

【0029】

本発明の等温増幅方法では、前記(X)に示す第一のプライマーに加えて、さらに、第二のプライマーを併用してもよい。前記第一のプライマーと第二のプライマーとは一対のプライマーであることが好ましい。前記一対のプライマーは、例えば、第一のプライマーの形態と第二のプライマーの形態とが異なる非対称型と、第一のプライマーの形態と第二のプライマーの形態とが同じである対称型とがあげられる。以下、前記非対称型の一対のプライマーを含むプライマーセットを、非対称型プライマーセット、前記対称型の一対のプライマーを含むプライマーセットを、対称型プライマーセットともいう。前記非対称型プライマーセットは、例えば、前記SMart Amplification Process法に適しており、前記対称型プライマーセットは、例えば、前記LAMP法に適している。

10

【0030】

本発明の等温増幅方法について、前述のような、非対称型プライマーセットを用いる方法と、対称型プライマーセットを用いる方法とを例にあげて説明する。なお、本発明は、これらに制限されない。

【0031】

SMart Amplification Process法

等温増幅方法の中でもSMart Amplification Process法は、例えば、優れた特異性で標的核酸配列を増幅できることから、遺伝増幅によって、例えば、遺伝子中における変異、特に一塩基変異の有無や、塩基の欠失または挿入の有無等を判断することが可能である。

20

【0032】

前記非対称型プライマーセットは、前述のように、第一のプライマーの形態と第二のプライマーの形態とが異なる非対称型の一対のプライマーを有するプライマーセットであり、中でも、前記SMart Amplification Process法に適用することが好ましい。このプライマーセットを、以下、「SMart Amplification Process用プライマーセット」ともいう。

30

【0033】

第一のプライマーによる核酸合成の作用機序を図7に模式的に示す。まず、鋳型となる核酸中の標的核酸配列を決定し、その標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)、および配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)を決定する。第一のプライマーは、配列(Ac')を含み、さらにその5'側に配列(B')を含む。配列(Ac')は、配列(A)にハイブリダイズするものであり、配列(B')は、配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズするものである。ここで、第一のプライマーは、前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に、反応に影響を与えない介在配列を含んでいてもよい。このようなプライマーを鋳型核酸にアニリングさせると、プライマー中の配列(Ac')が標的核酸配列の配列(A)にハイブリダイズした状態となる(図7(a))。この状態でプライマー伸長反応が起こると、標的核酸配列の相補配列を含む核酸が合成される。そして、合成された核酸の5'末端側に存在する配列(B')が、同核酸中に存在する配列(Bc)にハイブリダイズし、これにより、合成された核酸の5'末端部分においてステム-ループ構造が形成される。その結果、鋳型核酸上の配列(A)が一本鎖となり、この部分に先の第一のプライマーと同一の配列を有する他のプライマーがハイブリダイズする(図7(b))。その後、鎖置換反応により、新たにハイブリダイズした第一のプライマーからの伸長反応が起こると同時に、先に合成された核酸が鋳型核酸から分離される(図7(c))。

40

【0034】

上記の作用機序において、配列(B')が配列(Bc)にハイブリダイズする現象は、典型的には、同一鎖上に相補領域が存在することにより起こる。一般に、二本鎖核酸が一本鎖

50

に解離するときは、その末端あるいはそれ以外の比較的不安定な部分から部分的な解離が始まる。上記第一のプライマーによる伸長反応で生成した二本鎖核酸は、比較的高温では末端部分の塩基対は解離と結合の平衡状態にあり、全体としては二本鎖を保っている。そのような状態で末端の解離した部分に相補的な配列が同一鎖上に存在すると、準安定な状態としてステム・ループ構造を形成することができる。このステムループ構造は安定的には存在しないが、その構造の形成により剥き出しとなった相補鎖部分（鑄型核酸上の配列（A））に同一の他のプライマーが結合し、すぐさまポリメラーゼが伸長反応を行うことにより、先に合成された鎖が置換されて遊離すると同時に、新たな二本鎖核酸を生成することができる。

【0035】

10

本発明の好ましい態様における第一のプライマーの設計基準は、例えば、次のとおりである。まず、プライマーの伸長により鑄型核酸の相補鎖が合成された後に新たなプライマーが効率よく同鑄型核酸にアニーリングするためには、合成された相補鎖の5'末端におけるステム・ループ構造形成により、鑄型核酸上の前記配列（A）の部分一本鎖とする必要がある。そのためには、配列（Ac'）の塩基数Xと、標的核酸配列中における前記配列（A）と前記配列（B）とに挟まれた領域の塩基数Yとの差（X - Y）の、Xに対する割合（X - Y）/ Xが重要となる。ただし、鑄型核酸上において配列（A）よりも5'側に存在する、プライマーのハイブリダイズとは関係無い部分まで一本鎖とする必要はない。また、新たなプライマーが効率よく鑄型核酸にアニーリングするためには、上述のステム・ループ構造形成を効率よく行なうことも必要となる。そして、効率の良いステム・ループ構造形成、すなわち、効率の良い配列（B'）と配列（Bc）とのハイブリダイゼーションには、前記配列（B'）と前記配列（Bc）との間の距離（X + Y）が重要となる。一般に、プライマー伸長反応のための最適温度は最高でも72℃付近であり、そのような低い温度では、伸長鎖が長い領域にわたって解離することは困難である。従って、配列（B'）が配列（Bc）に効率よくハイブリダイズするためには、両配列の間の塩基数は少ないほうが好ましいと考えられる。一方で、配列（B'）が配列（Bc）にハイブリダイズして鑄型核酸上の前記配列（A）の部分一本鎖とするためには、配列（B'）の塩基数は多い方が好ましいと考えられる。

20

【0036】

以上のような観点から、本発明の好ましい実施態様による前記第一のプライマーは、プライマーを構成する配列（Ac'）と配列（B'）の間に介在配列が存在しない場合において、例えば、（X - Y）/ Xが-1.00以上、好ましくは0.00以上、さらに好ましくは0.05以上、さらに好ましくは0.10以上となり、また、例えば、1.00以下、好ましくは0.75以下、さらに好ましくは0.50以下、さらに好ましくは0.25以下となるように設計される。さらに、（X + Y）は、好ましくは15以上、さらに好ましくは20以上、さらに好ましくは30以上とされ、また、好ましくは50以下、さらに好ましくは48以下、さらに好ましくは42以下とされる。

30

【0037】

また、プライマーを構成する配列（Ac'）と配列（B'）の間に介在配列（塩基数はY'）が存在する場合には、本発明の好ましい実施態様による前記第一のプライマーは、例えば、{ X - (Y - Y') } / Xが-1.00以上であり、好ましくは0.00以上、より好ましくは0.05以上、さらに好ましくは0.10以上となり、また、例えば、1.00以下、好ましくは0.75以下、さらに好ましくは0.50以下、さらに好ましくは0.25以下となるように設計される。さらに、（X + Y + Y'）は、例えば、15以上であり、より好ましくは20以上、さらに好ましくは30以上であり、また、例えば、100以下であり、好ましくは75以下、より好ましくは50以下とされる。

40

【0038】

前記第一のプライマーは、例えば、与えられた条件下で必要な特異性を維持しながら標的核酸との塩基対結合を行うことができる程度の鎖長を有するものであることが好ましい。このプライマーの鎖長は、好ましくは15～100ヌクレオチド、より好ましくは20

50

～60ヌクレオチドとする。また、前記第一のプライマーを構成する配列(Ac')と配列(B')の長さは、それぞれ、好ましくは5～50ヌクレオチド、より好ましくは7～30ヌクレオチドである。また、必要に応じて、配列(Ac')と配列(B')の間に、反応に影響を与えない介在配列を挿入してもよい。

【0039】

本発明によるプライマーセットに含まれる前記第二のプライマーは、上述のように、例えば、前記標的核酸配列の相補配列(第一のプライマーがハイブリダイズする鎖に対して反対側の鎖)の3'末端部分の配列(C)にハイブリダイズする配列(Cc')を3'末端部分に含み、且つ、相互にハイブリダイズする2つの核酸配列を同一鎖上に含む折返し配列(D-Dc')を前記配列(Cc')の5'側に含むプライマーである。このような第二のプライマーの構造は、例えば、図8に示すようなものであるが、図8に示される配列やヌクレオチド数に限定されるものではない。第二のプライマーを構成する配列(Cc')の長さは、好ましくは5～50ヌクレオチド、より好ましくは10～30ヌクレオチドである。また、前記折返し配列(D-Dc')の長さは、好ましくは2～1000ヌクレオチド、より好ましくは2～100ヌクレオチド、さらに好ましくは4～60ヌクレオチド、さらに好ましくは6～40ヌクレオチドであり、折返し配列の内部におけるハイブリダイゼーションによって形成される塩基対のヌクレオチド数は、好ましくは2～500bp、より好ましくは2～50bp、さらに好ましくは2～30bp、さらに好ましくは3～20bpである。折返し配列(D-Dc')のヌクレオチド配列はいかなる配列であってもよく、特に限定されるものではないが、好ましくは標的核酸配列にハイブリダイズしない配列とされる。また、必要に応じて、配列(Cc')と折返し配列(D-Dc')の間に、反応に影響を与えない介在配列を挿入してもよい。

【0040】

これら第一のプライマーおよび第二のプライマーによる等温増幅反応について考えられる作用機序の一例を、図9および図10を用いて説明する。なお、図9および図10では、説明を簡略化するため、ハイブリダイズする2つの配列を相互に相補的な配列としているが、これにより本発明が限定されるものではない。まず、第一のプライマーが標的核酸のセンス鎖にハイブリダイズし、該プライマーの伸長反応が起きる(図9(a))。次いで、伸長鎖(-)上においてステム-ループ構造が形成され、これにより一本鎖となった標的核酸センス鎖上の配列(A)に新たな第一のプライマーがハイブリダイズし(図9(b))、該プライマーの伸長反応が起きて、先に合成された伸長鎖(-)が脱離する。次に、脱離した伸長鎖(-)上の配列(C)に第二のプライマーがハイブリダイズし(図9(c))、該プライマーの伸長反応が起き、伸長鎖(+)が合成される(図9(d))。生成した伸長鎖(+)の3'末端と伸長鎖(-)の5'末端ではステム-ループ構造が形成され(図9(e))、遊離型の3'末端である伸長鎖(+)のループ先端から伸長反応が起こると同時に、前記伸長鎖(-)が脱離する(図9(f))。ループ先端からの前記伸長反応により、伸長鎖(+)の3'側に配列(A)および配列(Bc)を介して伸長鎖(-)が結合したヘアピン型の二本鎖核酸が生成し、その配列(A)および配列(Bc)に第一のプライマーがハイブリダイズし(図9(g))、その伸長反応により伸長鎖(-)が生成する(図9(h)および(i))。また、前記ヘアピン型二本鎖核酸の3'末端に存在する折返し配列によって遊離型の3'末端が提供され(図9(h))、そこからの伸長反応により(図10(i))、両端に折返し配列を有し、第一および第二のプライマーに由来する配列を介して伸長鎖(+)と伸長鎖(-)とを交互に含む一本鎖核酸が生成する(図10(j))。この一本鎖核酸では、その3'末端に存在する折返し配列により遊離型の3'末端(相補鎖合成起点)が提供されるため(図10(k))、同様の伸長反応が繰り返され、1回の伸長反応あたり2倍の鎖長となる(図10(l)および(m))。また、図10(i)において脱離した第一のプライマーからの伸長鎖(-)では、その3'末端に存在する折返し配列により遊離型の3'末端(相補鎖合成起点)が提供されるため(図10(n))、そこからの伸長反応により、両端にステム-ループ構造が形成され、プライマーに由来する配列を介して伸長鎖(+)と伸長鎖(-)とを交互に含む一本鎖核酸が生成する(図10(o))。この一本鎖核酸に

おいても、3'末端におけるループ形成によって相補鎖合成起点が順次提供されるため、そこからの伸長反応が次々に起こる。このようにして自動的に延長される一本鎖核酸には、第一のプライマーおよび第二のプライマーに由来する配列が伸長鎖(+)と伸長鎖(-)との間に含まれているため、各プライマーがハイブリダイズして伸長反応を起こすことが可能であり、これにより標的核酸のセンス鎖およびアンチセンス鎖が顕著に増幅される。

【0041】

また、前記SMart Amplification Process用プライマーセットは、第一のプライマーおよび第二のプライマー以外に、第三のプライマーを含んでもよい。前記第三のプライマーは、例えば、前記標的核酸配列またはその相補配列にハイブリダイズするものであって、標的核酸配列またはその相補配列へのハイブリダイゼーションについて他のプライマーと競合しないプライマーである。本発明において「競合しない」とは、そのプライマーが標的核酸にハイブリダイズすることによって他のプライマーによる相補鎖合成起点の付与が妨げられないことを意味する。

10

【0042】

第一のプライマーおよび第二のプライマーにより標的核酸配列が増幅された場合には、前述のように、増幅産物は標的核酸配列とその相補配列とを交互に有するものとなる。その増幅産物の3'末端には折返し配列またはループ構造が存在し、これにより提供される相補鎖合成起点から次々に伸長反応が起こっている。第三のプライマーは、このような増幅産物が部分的に一本鎖の状態になった時に、その一本鎖部分に存在する標的配列にアニ

20

【0043】

前記第三のプライマーは、制限されず、1種類でもよいし、例えば、等温増幅反応の迅速性および特異性を向上させるため、2種類以上の第三のプライマーを同時に用いてもよい。これらの第三のプライマーは、例えば、典型的には第一のプライマーおよび第二のプライマーとは異なる配列からなるが、これらのプライマーと競合しない限りにおいて、部分的に重なる領域にハイブリダイズするものとしてもよい。第三のプライマーの鎖長は、好ましくは2~100ヌクレオチド、より好ましくは5~50ヌクレオチド、さらに好ましくは7~30ヌクレオチドである。

30

【0044】

前記第三のプライマーは、例えば、第一のプライマーおよび第二のプライマーによる等温増幅反応をより迅速に進めるための補助的な働きをその主目的とする。従って、前記第三のプライマーは、第一のプライマーおよび第二のプライマーの各3'末端のT_mよりも低いT_mを有するものとするのが好ましい。また、第三のプライマーの増幅反応液への添加量は、例えば、第一のプライマーおよび第二のプライマーのそれぞれの添加量よりも少ない方が好ましい。

【0045】

前記第三のプライマーとしては、例えば、国際公開第02/24902号パンフレットに記載のような、ループを形成できる構造をもつものを鋳型として、そのループ部分に相補鎖合成の起点を与えるものをあげることができるが、これに限定されるものではない。すなわち、例えば、標的核酸配列内であれば、いかなる部位に相補鎖合成起点を提供するものであってもよい。

40

【0046】

前記SMart Amplification Process用プライマーセットにおいては、例えば、前記第一のプライマーおよび前記第二のプライマーのいずれか一方、または、前記両方のプライマーが、例えば、蛍光色素等で標識化された標識核酸であってもよいし、前記第三のプライマーが前記標識核酸であってもよい。また、第一のプライマーおよび第二のプライマーのいずれか一方もしくは両方と、第三のプライマーとが、全て前記標識核酸であってもよ

50

い。

【0047】

また、本発明の等温増幅方法を、例えば、変異検出方法に適用する場合は、前記Smart Amplification Process用プライマーを以下のように設計することが好ましい。すなわち、前記Smart Amplification Process用プライマーセットは、目的の部位に変異を有する核酸配列（以下、「変異型核酸配列」という）または前記目的の部位に変異を有さない核酸配列（以下、「野生型核酸配列」という）を、標的核酸配列とし、目的の変異を生じる部位が、配列（A）、配列（B）もしくは配列（C）に含まれるか、または、配列（A）と配列（B）との間もしくは配列（A）と配列（C）との間に配置されるようにプライマーセットを設計することが好ましい。

10

【0048】

前記プライマーセットとして、目的の部位に変異を有する核酸配列（変異型配列）を標的核酸配列として設計したプライマーセットを用いる場合、例えば、等温増幅反応後における増幅産物の存在が、変異型配列の存在を示し、増幅産物の不在または減少が、変異型配列の不在を示す。一方、目的の部位に変異を有さない核酸配列（野生型配列）を標的核酸配列として設計したプライマーセットを用いる場合、例えば、等温増幅反応後における増幅産物の存在が、変異型配列の不在を示し、増幅産物の不在または減少が、変異型配列の存在を示す。ここで、「増幅産物の減少」とは、得られた増幅産物の量が、核酸試料中に標的核酸配列が存在する場合に得られる増幅産物の量と比較して、減少していることを意味する。

20

【0049】

前記プライマーセットとしては、例えば、前記目的の部位が、前記配列（A）に含まれるように設計されたプライマーセットが好ましい。このようなプライマーセットであれば、例えば、核酸試料中に標的核酸配列（例えば、野生型配列）が含まれる場合、等温増幅反応において第一のプライマーが配列（A）にアニーリングするため、増幅産物が得られる。一方、核酸試料中に前記標的核酸配列とは異なる核酸配列（例えば、変異型配列）が含まれている場合、等温増幅反応において第一のプライマーが配列（A）にアニーリングし難いため、増幅産物が得られないか、または、得られる増幅産物の量が著しく減少する。第一のプライマーに含まれる配列（Ac'）は、前記配列（A）に相補的な配列とすることが好ましい。

30

【0050】

また、前記プライマーセットとしては、例えば、前記目的部位が、前記配列（C）に含まれるように設計されたプライマーセットが好ましい。このようなプライマーセットであれば、例えば、核酸試料中に標的核酸配列（例えば、野生型配列）が含まれている場合、等温増幅反応において第二のプライマーが配列（C）にアニーリングするため、増幅産物が得られる。一方、核酸試料中に、前記標的核酸配列とは異なる核酸配列（例えば、変異型配列）が含まれている場合、等温増幅反応において第二のプライマーが配列（C）にアニーリングし難いため、増幅産物が得られないか、または得られる増幅産物の量が著しく減少する。第二のプライマーに含まれる配列（Cc'）は、前記配列（C）に相補的な配列とすることが好ましい。

40

【0051】

また、前記プライマーとしては、例えば、前記目的部位が、前記配列（B）に含まれるように設計されたプライマーセットであることが好ましい。このようなプライマーセットであれば、例えば、核酸試料中に標的核酸配列（例えば、野生型配列）が含まれている場合、等温増幅反応において、第一のプライマーが配列（A）にアニーリングして伸長反応が行なわれた後、前記プライマーに含まれる配列（B'）が伸長鎖上の配列（Bc）にハイブリダイズする。このため、ステム・ループ構造が効率的に形成される。この効率的なステム・ループ構造の形成により、他の第一のプライマーが鑄型にアニーリングすることが可能となり、前述の図7に示した作用機序が効率的に進行するため、増幅産物が得られる。一方、核酸試料中に前記標的核酸配列とは異なる核酸配列（例えば、変異型配列）が含ま

50

れている場合、等温増幅反応における前記ステム・ループ構造の形成が困難となるため、前記図7に示される作用機序が妨げられ、増幅産物が得られないか、または得られる増幅産物の量が著しく減少する。また、第一のプライマーに含まれる配列(B')は、前記配列(B)と同一の配列とすることが好ましい。

【0052】

また、前記プライマーセットとしては、例えば、前記目的部位が、前記配列(A)と前記配列(B)との間に配置されるように設計されたプライマーセットが好ましい。このようなプライマーセットによれば、核酸試料中に標的核酸配列(例えば、野生型配列)が含まれている場合、等温増幅反応において、第一のプライマーが配列(A)にアニーリングして伸長反応が行われた後、前記プライマーに含まれる配列(B')が伸長鎖上の配列(Bc)にハイブリダイズするため、ステム・ループ構造が効率的に形成される。この効率的なステム・ループ構造の形成により、他の第一のプライマーが鋳型にアニーリングすることが可能となり、前記図7に示される作用機序が効率的に進行するため、増幅産物が得られる。一方、核酸試料中に、前記標的核酸配列とは異なる核酸配列(例えば、変異型配列)が含まれている場合、第一のプライマーに含まれる配列(B')と伸長鎖上の配列(Bc)とが適切な距離を維持していないため、等温増幅反応における上記ステム・ループ構造の形成が困難となる。配列(A)と配列(B)との間に、長い配列の挿入や欠失がある場合等である。従って、この場合、前記図7に示される作用機序が妨げられ、増幅産物が得られないか、または得られる増幅産物の量が著しく減少する。

10

20

【0053】

また、前記プライマーセットとしては、前記目的部位が、前記配列(A)と前記配列(C)との間に配置されるように設計されたプライマーセットが好ましい。このようなプライマーセットによれば、核酸試料中に標的核酸配列が含まれている場合(例えば、野生型配列)、等温増幅反応において、第一のプライマーが配列(A)にアニーリングして伸長反応が行われた後、前記プライマーに含まれる配列(B')が伸長鎖上の配列(Bc)にハイブリダイズするため、ステム・ループ構造が効率的に形成される。この効率的なステム・ループ構造の形成により、他の第一のプライマーが鋳型にアニーリングすることが可能となり、前記図7、図9、図10に示される作用機序が効率的に進行するため、増幅産物が得られる。一方、核酸試料中に、前記標的核酸配列とは異なる核酸配列(例えば、変異型配列)が含まれている場合、増幅産物が得られないか、または得られる増幅産物の量が著しく減少する。例えば、配列(A)と配列(C)との間における長い配列の挿入により、標的核酸配列とは異なる核酸配列が核酸試料中に含まれている場合、等温増幅の速度(効率)が著しく低減されるため、増幅産物が得られないか、または得られる増幅産物の量が著しく減少する。また、配列(A)と配列(C)との間における配列の欠失により、標的核酸配列とは異なる核酸配列が核酸試料中に含まれており、且つ、この欠失により配列(B)の一部または全部が失われている場合、第一のプライマーに含まれる配列(B')が伸長鎖上にハイブリダイズできないため、ステム・ループ構造の形成が不可能となるか、または困難となる。このため、前記図7、図9、図10に示される作用機序が妨げられ、増幅産物が得られないか、または得られる増幅産物の量が著しく減少する。さらに、配列(A)と配列(C)との間における配列の欠失により、標的核酸配列とは異なる核酸配列が核酸試料中に含まれており、且つ、この欠失による配列(B)の部分的欠失が生じない場合にも、等温増幅の速度(効率)が低減されるため、増幅産物が得られないか、または得られる増幅産物の量が著しく減少する。

30

40

【0054】

LAMP法

前記対称型のプライマーセットは、前述のように、第一のプライマーの形態と第二のプライマーの形態とが同じである対称型の一对のプライマーを有するプライマーセットであり、中でも、前記LAMP法に適用することが好ましい。このプライマーセットを、以下、「LAMP用プライマーセット」ともいう。

【0055】

50

前記第一のプライマーが、例えば、アンチセンス鎖にアニーリングするよう設計される場合、前記第二のプライマーは、センス鎖にアニーリングするよう設計され、前記第一のプライマーが、例えば、センス鎖にアニーリングするよう設計される場合、前記第二のプライマーは、アンチセンス鎖にアニーリングするよう設計される。第一のプライマーが、例えば、アンチセンス鎖の標的核酸配列にアニーリングした場合、第二のプライマーは、前記一方のプライマーのアンチセンス鎖におけるアニーリング部位よりも5'側の領域に対応する、センス鎖の領域にアニーリングすることが好ましい。

【0056】

LAMP法は、例えば、4種類のプライマーが必要とされ、それらが6個所の領域を認識することにより、目的遺伝子の増幅が可能となる。すなわち、この方法では、例えば、まず、第一のプライマーが鋳型鎖にアニーリングして伸長反応が起こる。次に、第一のプライマーよりも上流側に設計された第二のプライマーによる鎖置換反応によって、第一のプライマーによる伸長鎖が鋳型鎖から分離する。この時、剥ぎ取られた第一のプライマー伸長産物の構成に起因して伸長鎖の5'末端部分でステム-ループ構造が形成される。これと同様の反応が二本鎖核酸のもう一方の鎖、もしくは、剥ぎ取られた第一のプライマー伸長産物の3'末端側についても行われる。そして、これらの反応が繰り返されることにより、標的核酸が増幅される。LAMP法における鋳型は、例えば、3'末端と5'末端において、それぞれ末端領域に相補的な塩基配列からなる領域を同一鎖上に備え、この互いに相補的な塩基配列がアニーリングしたときに両者の間に塩基対結合が可能となるループが形成される鋳型である(「ダンベル型鋳型核酸」ともいう)。LAMP法は、例えば、国際公開第00/28082号パンフレット、国際公開第01/034838号パンフレット等に従って行うことができる。

【0057】

<等温増幅用キット>

本発明の等温増幅用キットは、本発明の等温増幅方法に使用するためのキットであって、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする。本発明によれば、例えば、容易且つ簡便に、前述の本発明の等温増幅方法を行うことができる。本発明の等温増幅キットは、本発明のDNAポリメラーゼを含んでいればよく、その他の構成等は制限されない。その他の構成等は、前述の等温増幅方法に応じて適宜決定できる。本発明の等温増幅キットは、本発明のDNAポリメラーゼの他に、例えば、プライマーやプライマーセット、使用説明書を含んでもよい。前記プライマーやプライマーセットは、前述のものがあげられる。また、本発明の等温増幅用キットは、さらに、例えば、dNTP mix (dATP、dTTP、dCTPおよびdGTP)等の基質、トリス塩酸バッファー、トリスリン酸バッファー、リン酸ナトリウムバッファー、リン酸カリウムバッファー等の緩衝液；塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム等の触媒；ジメチルスルホキシド(DMSO)やベタイン(N,N,N-trimethylglycine)等の添加物；国際公開第99/54455号パンフレットに記載の酸性物質、陽イオン錯体；酵素安定剤等を含んでもよい。前記酵素安定剤としては、制限されないが、例えば、グリセロール、ウシ血清アルブミン、糖類等があげられ、中でも、糖類が好ましく、より好ましくは単糖またはオリゴ糖、より好ましくは、トレハロース、ソルビトールもしくはマンニトール、またはこれらの2種以上の混合物である。また、本発明の等温増幅用キットは、さらに、融解温度調整剤を含んでもよい。前記融解温度調整剤としては、例えば、DMSO、ベタイン、ホルムアミドもしくはグリセロール、またはこれらの任意の組合せ等があげられ、好ましくは、DMSOである。また、等温増幅方法に供する核酸試料がRNAを含み、これを鋳型とする場合は、例えば、さらに、逆転写酵素を含むことが好ましい。なお、本発明の等温増幅用キットにおいて、これらの試薬の割合等は、制限されず、当業者であれば適宜決定できる。

【0058】

本発明の等温増幅用キットは、さらに、前述のミスマッチ結合タンパク質を含むことが好ましく、あわせて、前記一本鎖結合タンパク質(SSB)を含むことが好ましい。

【 0 0 5 9 】

本発明の等温増幅用キットにおいて、DNAポリメラーゼやプライマー等の各試薬は、それぞれ別個に容器に収容されてもよいし、同じ容器に収容されてもよい。また、本発明の等温増幅用キットは、例えば、本発明の等温増幅方法に使用するための、等温増幅用試薬ということもできる。

【 0 0 6 0 】

< 等温増幅用DNAポリメラーゼをコードするDNA >

近縁のバチルス属微生物では、一般に、DNAポリメラーゼIをコードする遺伝子（p o l A 遺伝子）の上流に p h o R 遺伝子が、下流に m u t M 遺伝子が保存されている。そこで、例えば、保存されている遺伝子の塩基配列を決定し、これに基づいて p o l A クロ

10

【 0 0 6 1 】

まず、バチルス属微生物の p h o R 遺伝子および m u t M 遺伝子の保存領域から、これらの遺伝子を増幅するためのプライマー、または、一対もしくは複数対のプライマーを設計する。これらのプライマーセットを用いて、目的の細菌（例えば、アリシクロバチルス属微生物）のゲノムDNAを鋳型として、それぞれの遺伝子の増幅を行う。そして、得られた増幅産物の塩基配列の決定を行う。

【 0 0 6 2 】

種々のバチルス属のゲノム構造から、p h o R 遺伝子、p o l A 遺伝子および m u t M 遺伝子は、いずれも同一方向に転写される。そこで、決定した塩基配列情報に基づいて、p o l A クロニング用の特異的なプライマーとして、p h o R 遺伝子のセンス鎖と相同的（アンチセンス鎖に相補的）なプライマー（フォワードプライマー）、m u t M 遺伝子のアンチセンス鎖に相同的（センス鎖に相補的）なプライマー（リバースプライマー）とを設計する。そして、これらを用いて、前記細菌のゲノムDNAの鋳型として、p o l A 遺伝子を含むDNAを増幅させる。得られた増幅物をクローン化することで、目的の細菌由来のp o l A 遺伝子を含むDNAを得ることができる。プライマーの長さは、制限されず、種々の実験条件によって適宜調節可能であるが、例えば、15～50塩基長、好ましくは18～40塩基長、最も好ましくは25～35塩基長である。

20

30

【 0 0 6 3 】

このようなプライマーを用いて、アリシクロバチルス属やその近縁の細菌からDNAポリメラーゼ遺伝子を単離する方法は、例えば、下記（A）～（D）の工程を含むことを特徴とし、さらに下記（E）工程を有してもよい。

（A） 配列番号1および2のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーと配列番号3～5のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーとを用い、前記細菌から抽出したゲノムDNAを鋳型として、p h o R 遺伝子のDNA断片を増幅する工程

（B） 配列番号6～8のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーと配列番号9～11のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーとを用い、前記細菌から抽出したゲノムDNAを鋳型として、m u t M 遺伝子のDNA断片を増幅する工程

40

（C） 前記（A）工程および（B）工程で増幅した各DNA断片の塩基配列を決定する工程

（D） 前記工程（C）で決定した塩基配列に基づいて設計した、前記p h o R 遺伝子のセンス鎖の部分配列からなるプライマーと、前記m u t M 遺伝子のアンチセンス鎖の部分配列からなるプライマーとを用い、前記細菌から抽出したゲノムDNAを鋳型としてp o l A 遺伝子を含むDNA断片を増幅する工程

（E） 前記工程（D）で増幅されたDNA断片をクローン化する工程

【 0 0 6 4 】

プライマーの長さは、制限されず、種々の実験条件によって適宜調節可能であるが、例えば、15～50塩基長、好ましくは18～40塩基長、最も好ましくは25～35塩基

50

長である。前記(A)工程において、配列番号1および2のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーは、正方向プライマーであり、配列番号3~5のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーは、逆方向プライマーである。また、前記(B)工程において、配列番号6~8のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーは、正方向プライマーであり、配列番号9~11のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーは、逆方向プライマーである。

【0065】

また、前記(D)工程におけるプライマーセットとしては、例えば、後述する配列番号12~17のいずれかで表される塩基配列からなるフォワードプライマーと、配列番号18で表される塩基配列からなるリバースプライマーとを組み合わせることができる。また、完全長の翻訳領域を増幅するためのプライマーセットとしては、例えば、後述する配列番号19で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと、配列番号21で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせが、N末端領域を欠失するDNAポリメラーゼのコード配列を増幅するためのプライマーセットとしては、例えば、後述する配列番号20で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと、配列番号21で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせがあげられる。

10

【0066】

本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼをコードするDNAとしては、例えば、前述の(a)~(d)に示すDNAポリメラーゼをコードする、下記(a')~(d')に示すDNAを含む。

20

(a') 配列番号22で表される塩基配列からなるDNA

(b') 配列番号24で表される塩基配列からなるDNA

(c') 配列番号22で表される塩基配列において、5'N末端から、1個~334個の任意の個数の連続するコドンが欠失した塩基配列からなるDNA

(d') 前記(a')~(c')のいずれか記載の塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【0067】

配列番号22で表される塩基配列は、例えば、配列番号23で表されるアミノ酸配列をコードするDNA配列である。また、配列番号24で表される塩基配列は、例えば、配列番号25で表されるN末端欠失DNAポリメラーゼをコードするDNA配列である。なお、本発明は、これらの配列に限定されない。

30

【0068】

また、本発明におけるDNAは、例えば、コードするDNAポリメラーゼがDNAポリメラーゼ活性を有する限り、前述の(e)に示すDNAポリメラーゼをコードする下記(e')に示すDNAであってもよい。

(e') 前記(a')~(c')のいずれかで表される塩基配列との相同性が、例えば、80%以上の塩基配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【0069】

前記相同性は、例えば、BLAST等を用いてデフォルトの条件で計算することができる。前記相同性は、例えば、少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。また、配列番号24で表される塩基配列からなるDNAと、BLAST等を用いてデフォルトの条件で計算したときに、例えば、少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAであって、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するが、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しているタンパク質をコードする塩基配列からなるDNAも含む。さらに、本発明は、前記DNAに対するRNA、例えば、前記DNAから転写されたmRNA、もしくは、アンチセンスRNA等も含む。

40

【0070】

50

また、本発明におけるDNAは、例えば、コードするDNAポリメラーゼがDNAポリメラーゼ活性を有する限り、下記(f')に示すDNAであってもよい。

(f') 前記(a')~(c')のいずれかで表される塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【0071】

前記(f')において、「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、当該技術分野の当業者において、周知のハイブリダイゼーションの実験条件である。具体的には、「ストリンジントな条件」とは、例えば、0.7~1mol/LのNaCl存在下、60~68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍のSSC溶液を用い、65~68℃で洗浄することにより同定することができる条件をいう。なお、1×SSCとは、150mmol/LのNaCl、15mmol/Lクエン酸ナトリウムからなる。ストリンジエンシーの選択のため、例えば、洗浄工程における塩濃度や温度を適宜最適化することができる。また、当業者であれば、ストリンジエンシーを上げるために、例えば、ホルムアミドやSDS等を添加することも技術常識である。

10

【0072】

さらに、本発明におけるDNAは、例えば、配列番号22または24で表される塩基配列の縮重変異体も含む。また、本発明は、前述のDNAの相補的な配列からなるDNAも含む。

【0073】

遺伝子に変異を導入する方法は、制限されないが、例えば、Kunkel法またはギャップ二重鎖(Gapped duplex)法等の公知手法またはこれに準ずる方法によって行うことができる。また、例えば、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えば、Mutant-K(TAKARA社製)、Mutant-G(TAKARA社製)等)、LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキット(TAKARA社)等を利用することもできる。

20

【0074】

<DNA単離用のプライマーおよびプローブ>

つぎに、生物からDNAポリメラーゼを単離するために用いるプライマーおよびプローブについて説明する。前記プライマーおよび前記プローブは、例えば、前述の本発明におけるDNAの断片であり、塩基の数は、例えば、5~50である。塩基数の下限は、例えば、5以上であり、好ましくは10以上、より好ましくは15以上であり、塩基数の上限は、例えば、50以下であり、好ましくは30以下であり、より好ましくは25以下である。また、好ましい範囲の具体例としては、例えば、10~50であり、より好ましくは10~30、より好ましくは15~25である。増幅させる塩基配列の長さは、特に制限されない。本発明のプライマーの具体例としては、例えば、配列番号1~21のいずれかで表されるプライマーがあげられ、いずれか1種類でもよいし、2種類以上を併用してもよい。中でも、配列番号12~17で表される少なくとも1つのプライマーをフォワードプライマーとして、配列番号18で表されるプライマーをリバースプライマーとして、それぞれ組み合わせて使用することが好ましい。polA遺伝子の完全長翻訳領域(ORF)を単離する際には、例えば、配列番号19で表されるフォワードプライマーと、配列番号21で表されるリバースプライマーとを組み合わせて使用することが好ましい。さらに、polA遺伝子において、大腸菌のクレノウフラグメントに相当する領域を単離する際には、例えば、配列番号20で表されるフォワードプライマーと、配列番号21で表されるリバースプライマーとを組み合わせて使用することが好ましい。

30

40

【0075】

(組換えベクター)

つぎに、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼの発現に使用できる組換えベクターについて説明する。前記組換えベクターは、本発明における前述のDNAを含むことを特徴とする。前記組換えベクターは、例えば、適当なベクターに本発明のDNAを連結(挿入)することにより得られる。前記DNAを挿入するためのベクターは、例えば、宿主中で複

50

製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、例えば、大腸菌由来のプラスミド（例えば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119等）、枯草菌由来のプラスミド（例えば、pUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えば、YEp13、YEp24、Ycp50等）等が挙げられる。ファージDNAとしては、例えば、ファージ（例えば、Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、gt10、gt11、ZAP等）等が挙げられる。さらに、レトロウイルスまたはワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクター等を用いることもできる。

【0076】

ベクターに前記DNAを挿入する方法としては、特に制限されず、従来公知の方法が採用できる。具体例としては、例えば、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位またはマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法等があげられる。本発明のDNAは、例えば、それがコードするタンパク質が発現されるように、前記ベクターに組み込まれることが好ましい。そこで、本発明におけるベクターには、例えば、プロモーター（例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、tacプロモーター等）の他に、所望により、エンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列、KOZAK配列等）等を連結することもできる。前記選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0077】

（形質転換体）

本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼの製造に使用できる形質転換体について説明する。前記形質転換体は、前記組換えベクターを含むことを特徴とする。前記形質転換体は、例えば、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼを発現し得るように、前述のDNAを宿主に導入することにより得られ、具体的には、本発明の組換えベクターを導入することが好ましい。形質転換は、例えば、簡便で効率が良いことから、多くの場合ベクターを用いて行われる。ここで、宿主としては、本発明のタンパク質を発現できるものであれば、特に限定されるものではない。前記宿主としては、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)等のエッシェリヒア属、バシラス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバシラス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ(*Rhizobium meliloti*)等のリゾビウム属に属する細菌等が挙げられる。また、この他に、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等の酵母、さらに、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞等も挙げられる。あるいは、例えば、Sf9、Sf21等の昆虫細胞を用いることもできる。

【0078】

形質転換方法としては、制限されず、従来公知の方法が採用できる。具体例としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法(Cohen, S.N. et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69, 2110-2114)、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法等があげられる。

【0079】

<等温増幅用DNAポリメラーゼの製造方法>

本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼは、例えば、前記形質転換体を培養し、得られた培養物からタンパク質(DNAポリメラーゼ)を採取することにより製造できる。「培養物」とは、例えば、培養上清の他、培養細胞若しくは培養菌体、または、細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味する。また、「本発明の形質転換体を培養する方法」は、例えば、宿主の培養に適用される通常の方法に従って行われ、その条件等は、例えば、宿主の種類等に応じて適宜決定できる。

【 0 0 8 0 】

培養後、本発明のタンパク質（DNAポリメラーゼ）が、菌体内または細胞内に生産される場合には、例えば、菌体または細胞を破砕することにより前記タンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質（DNAポリメラーゼ）が、菌体外または細胞外に生産される場合には、例えば、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により前記培養液から菌体または細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法を、単独で、または、適宜組み合わせる用いることによって、前記培養物から本発明のタンパク質（DNAポリメラーゼ）を精製することができる。前記単離精製の方法としては、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等があげられる。また、例えば、精製のために、発現するタンパク質にタグ配列を付加している場合には、前記精製工程の間または後に、プロテアーゼ処理等により、前記タグ配列を除去することもできる。

10

【 0 0 8 1 】

< 抗体 >

さらに、本発明のDNAポリメラーゼに対する抗体について説明する。前記「抗体」には、例えば、好適な任意のフラグメントまたは誘導体も含まれる。このような広義の抗体としては、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、二重特異性抗体(diabody)（融合した同一のFvフラグメントの2つのコピー）、単鎖抗体、および、2以上の抗体フラグメントから形成される多重特異性(multi-specific)抗体等が含まれる。前記抗体は、例えば、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼの精製に用いることができる。前記抗体の製造方法は、制限されず、例えば、従来公知の方法により製造できる。

20

【 0 0 8 2 】

なお、本発明において、例えば、分子生物学、微生物学および組換えDNA技術等の一般的な方法は、当該分野の標準的な参考書籍を参照して実施することができる。これらには、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版(Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、John Wiley & Sons, 1987); Methods in Enzymologyシリーズ(Academic Press); PCR Protocols: Methods in Molecular Biology (Bartlett & Stirling編、Humana Press, 2003); Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow & Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987)等が含まれる。また、本明細書において参照される試薬およびキット類等は、例えば、Sigma社、Aldrich社、Invitrogen/GIBCO社、Clontech社、Stratagene社、Qiagen社、Promega社、Roche Diagnostics社、Becton-Dickinson社、TaKaRa社（タカラバイオ株式会社）等の市販業者から入手可能である。

30

【 0 0 8 3 】

本発明を以下の実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【 実施例 1 】

40

【 0 0 8 4 】

[アリシクロパチルス・アシドカルダリウス(*A. acidocaldarius*) DNAポリメラーゼ I 遺伝子 (p o l A) のクローニング]

A. acidocaldarius subsp. *Acidocaldarius* JCM5260培養菌体より、定法にてゲノムDNAを調製した。次いで、パチルス属の他種のp o l Aの遺伝子構造では、p o l Aの上流にp h o R、p o l Aの下流にm u t Mが保存されていることから、各々の遺伝子の保存領域より、以下に示すプライマーを合成した。

【 0 0 8 5 】

p h o Rクローニング用PCRプライマー

phoRFwd1(x6144) : 5' -AARMARYTWGARSARRTKMGVAA-3' (配列番号 1)

50

phoRFwd2(x576) : 5'-GTHTCYCATGARYTRAARACDCC-3' (配列番号 2)
 phoRRev1(x1296) : 5'-HCKRTARAAVCGTTTCRAADATVC-3' (配列番号 3)
 phoRRev2(x1728) : 5'-GTHCCDCCHGWRRTTKCKRCTYCT-3' (配列番号 4)
 phoRRev3(x6912) : 5'-RYHARRTGCTTBACRATYGMHAR-3' (配列番号 5)

【 0 0 8 6 】

mutMクローニング用PCRプライマー

mutMFwd1(x96) : 5'-TGCCDGAATTACCRGARGTNGAR-3' (配列番号 6)
 mutMFwd2(x3072) : 5'-GMMGRGGMAARTTYTDYTKTTW-3' (配列番号 7)
 mutMFwd3(x1728) : 5'-GTBWSHCAYYTKMGDATGGAAGG-3' (配列番号 8)
 mutMRev1(x288) : 5'-AAAGAGGTGCATCGTTCRAAYT-3' (配列番号 9)
 mutMRev2(x324) : 5'-TCBACATADATRTTBCCVAGYCC-3' (配列番号 10)
 mutMRev3(x864) : 5'-CCBCKYCCBCCAACRACHRTYTT-3' (配列番号 11)

【 0 0 8 7 】

なお、前記配列において、Rは、グアニンまたはアデニンのプリン塩基を、Yは、チミンまたはシトシンのピリミジン塩基を、Mは、アデニンまたはシトシンを、Kは、グアニンまたはチミンを、Sは、グアニンまたはシトシンを、Wは、アデニンまたはチミンを、Dは、アデニン、グアニンまたはチミンを、Hは、アデニン、シトシンまたはチミンを、Vは、アデニン、グアニンまたはシトシンを、Nは、4種類(グアニン、アデニン、シトシン、チミン)のいずれかの塩基をそれぞれ表す。括弧内の数字は組み合わせによる種類数を表す。また、Fwdは、正方向(フォワード)プライマー、Revは、逆方向(リバーズ)プライマーを示す。なお、以下の配列についても同様である。

【 0 0 8 8 】

調製したゲノムDNAを鋳型として、正方向(Fwd)プライマーおよび逆方向(Rev)プライマーの各組み合わせによりPCRを行って、DNAを増幅させた。増幅したDNA断片を、プラスミドpGEM-T(商品名、プロメガ社製)にクローン化した。具体的には、正方向プライマーとして、phoRFwd1およびphoRFwd2のいずれかを、逆方向プライマーとして、phoRRev1、phoRRev2およびphoRRev3のいずれかを、それぞれ用いてphoR遺伝子のDNA断片を増幅した。また、mutM遺伝子についても、正方向プライマーとして、mutMRev1、mutMRev2およびmutMRev3のいずれかを、逆方向プライマーとして、mutMRev1、mutMRev2およびmutMRev3のいずれかを、それぞれ用いて、DNA断片を増幅した。そして、得られたそれぞれのDNA断片をプラスミドにクローニングし、その内部塩基配列を決定した。

【 0 0 8 9 】

決定した塩基配列に基づいて、polA遺伝子をクローン化するための以下のプライマーを合成した。

【 0 0 9 0 】

Aac cloning F1 : TTTATCCACCTTGAGCGGCACAGACCAGTT (配列番号 12)
 Aac cloning F2 : TTCGCACCTTCCACTGGCTCTCTGCACCGC (配列番号 13)
 Aac cloning F3 : GACGTACTCTCTCCTTCATGGCCTTCGCTC (配列番号 14)
 Aac cloning F4 : AATTTTGTGAACATCATAATCAATTCGTTG (配列番号 15)
 Aac cloning F5 : CCACAAGACGACGCGGGCCGACAAGGGGAA (配列番号 16)
 Aac cloning F6 : TGGCCTTCGCTCGATGAATTTTGTGAACAT (配列番号 17)
 Aac cloning R1 : GGTGAATGCCCTGCTCCCTCAGCCGCTCGG (配列番号 18)

【 0 0 9 1 】

調製したゲノムDNAを鋳型として、Aac cloning F1~F6のいずれかの正方向プライマーと、Aac cloning R1の逆方向プライマーとを組み合わせ、PCRによりDNAを増幅させた。増幅したDNA断片を、プラスミドpGEM-T(商品名、プロメガ社製)にクローン化した。そして、プラスミドにクローニングした前記増幅DNA断片の塩基配列を決定した。続いて、決定した塩基配列と、アリシクロパチルス・アシドカルダリウスDNAポリメラーゼ(Aac DNAポリメラーゼI)遺伝子(polA)と推測される塩

基配列とに基づいて、以下のプライマー対を設計し、これを用いて、完全長の翻訳領域 (ORF) 部分をPCRにより増幅した。

【0092】

Aac polA NdeI:5'-CTTCATGGCCTTCGCcatATGAATTTTGTG-3' (配列番号19)

Aac term KpnI:5'-TCCGGCAGCCGgtaCCCCCTCACTTGGC-3' (配列番号21)

【0093】

得られたPCRの増幅産物およびプラスミドpYSNを、制限酵素NdeIおよびKpnIで消化し、混合して連結することによりAacDNAポリメラーゼ発現プラスミドpAacを構築した。

【0094】

さらに、得られたAacDNAポリメラーゼ発現プラスミドpAacから、polA遺伝子の塩基配列を決定した。そして、大腸菌のクレノウフラグメントのN末端に相当するDNA断片を、以下のプライマー対を用いてPCRで増幅した。

【0095】

Aac Klenow NdeI:5'-CGCGCCATCGCCTGGcatatgGAGCTCGAC-3' (配列番号20)

Aac term KpnI:5'-TCCGGCAGCCGgtaCCCCCTCACTTGGC-3' (配列番号21)

【0096】

得られたPCRの増幅産物およびプラスミドpYSNを、制限酵素NdeIおよびKpnIで消化し、混合して連結することにより、N末端欠失型AacDNAポリメラーゼ(以下、「NAacDNAポリメラーゼ」、「AacDNAポリメラーゼラージフラグメント」または「AacDNAポリメラーゼI」ともいう)の発現プラスミドpdNacを構築した。

【実施例2】

【0097】

[AacDNAポリメラーゼIおよびN末端欠失型AacDNAポリメラーゼの発現および精製]

(1) 培養、発現、及び粗抽出液調製

pAacまたはpdNacを有する大腸菌XL1-Blueを、100µg/mlアンピシリンを含むLB培地5mlにて、37℃一晩培養し、これを前培養液とした。この前培養液5mlを、100µg/mlアンピシリンを含むLB培地500mlに植菌し、37℃、200rpmで振盪培養(Orbital Shaking Incubator, FIRSTEK OSI-502LD)を行った。培養液のOD600nm値が0.5付近となった時点で、終濃度1mmol/LとなるようにIPTGを添加した。さらに、37℃、200rpmで1~2時間振盪培養した。続いて、培養液を遠沈管に移し、4,000×g、10分間の遠心分離を行い、沈殿を得た。この沈殿を1×PBS 30mlに懸濁し、再度、4,000×g、10分間の遠心分離を行い、菌体を洗浄した。沈殿を1×PBS 25mlに懸濁し、一回あたり10秒間として合計6回、超音波による細胞の破碎を行った(MISONIX Astrason Ultrasonic processor XL)。超音波破碎後の試料を、15,000×g、30分間の遠心分離を行い、上清を得た。この上清に、30%ポリエチレンイミン溶液を終濃度0.1%となるように添加して混合し、水中で30分間放置した後、15,000×g、30分間の遠心分離を行い、上清を得た。得られた上清を粗抽出液とした。

【0098】

(2) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

GEヘルスケア社製AKTA Prime高速液体クロマトグラフィーシステムとGEヘルスケア社製強陰イオン交換カラムHiTrapQを用いて、イオン交換クロマトグラフィーを行った。ランニングバッファーとして、10mmol/L 2-メルカプトエタノールを含む50mmol/L Tris-HCl(pH7.6)を用いた。流速1ml/分でカラムを平衡化し、前述の粗抽出液をアプライした後、非吸着画分を前記ランニングバッファーで洗浄した。約15カラム容量の0~1mol/L塩化ナトリウム濃度勾配により吸着画分を溶出した。溶出画分は、1mlごとに分画し、それぞれをSDS-PAGE

10

20

30

40

50

GEに供してタンパク質バンドを確認した。そして、該当する分子量のタンパク質バンドを有する画分を回収した。回収画分を、限外濾過膜を用いて濃縮・脱塩し、これを陰イオン交換画分とした。

【0099】

(3) ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィー

GEヘルスケア社製AKTA Prime高速液体クロマトグラフィーシステムとGEヘルスケア社製ヘパリンアフィニティーカラムHiTrap Heparinを用いて、ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行った。ランニングバッファーとして、前記陰イオン交換カラムクロマトグラフィーと同じ溶液を用いた。流速1ml/分でカラムを平衡化し、前述の陰イオン交換画分をアプライした後、非吸着画分を前記ランニングバッファーで洗浄した。約22カラム容量の0~1mol/L塩化ナトリウム濃度勾配により吸着画分を溶出した。溶出画分は、1mlごとに分画し、それぞれSDS-PAGEに供してタンパク質バンドを確認した。そして、該当する分子量のタンパク質バンドを有する画分を回収した。前記回収画分を限外濾過膜を用いて、0.2mol/L塩化ナトリウム含有の50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)にバッファー置換を行い、さらに濃縮して、これをヘパリン画分とした。

10

【0100】

(4) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

GEヘルスケア社製AKTA 10XT高速液体クロマトグラフィーシステムとGEヘルスケア社製ゲルろ過カラムHiLoad 16/60 Superdex 200 prep gradeを用いて、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。ランニングバッファーとして、0.2mol/L塩化ナトリウム含有の50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)を用いた。流速1ml/分でカラムを平衡化し、前述のヘパリン画分をアプライした後、前記ランニングバッファーで溶出した。溶出画分は1mlごとに分画し、それぞれをSDS-PAGEに供してタンパク質バンドを確認した後、該当する分子量のタンパク質バンドを有する画分を回収した。回収画分を限外濾過膜を用いて濃縮し、保存バッファーにバッファー交換を行った。これを精製酵素標品とした。なお、前記保存バッファーの組成は、50mmol/L塩化カリウム、10mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、1mmol/L DTT、0.1mmol/L EDTA、0.1% Triton X-100、50%グリセロールとした。

20

30

【実施例3】

【0101】

[DNAポリメラーゼ活性測定]

インビトロジェン社製Picogreen dsDNA定量試薬を用いて、Seville M. et al. Biotechniques Vol.21, pp.664-668 (1996)を参考に、前記精製酵素標品(AacDNAポリメラーゼラジフラグメント)のDNAポリメラーゼ活性を測定した。具体的には、前記Picogreen dsDNA定量試薬とTE緩衝液とを、体積比1:345となるように混合した。そして、この混合液173μlを、M13mp18一本鎖DNA、プライマー、dNTPおよび前記精製酵素標品の混合物27μlに添加した。この反応液を室温(37℃)で5分間放置した後、励起波長480nm、測定波長520nmにて蛍光を測定した。この際、単位(unit:65/30分間に10nmolのdNTPを取り込む酵素量)が既知である市販のクレノウフラグメント(市販のBstDNAポリメラーゼ;NEB社製)についても同様に蛍光測定を行い、その測定値より、相対値としての酵素単位を算出した。以下に測定の一例を示す。なお、標準曲線は、測定ごとに作成し、反応温度は37℃とした。市販のBstDNAポリメラーゼ(NEB社製、以下同様)を標準として、Picogreen dsDNA定量試薬により、各希釈倍での蛍光強度を測定した。この結果を表1に示す。

40

【0102】

【表 1】

Bst DNA polymerase	Measurement 1 (rfu)	Measurement 2 (rfu)
0.5 unit	59.252	57.995
1.0 unit	61.232	62.425
2.0 unit	74.589	75.559
4.0 unit	91.235	93.357
6.0 unit	95.987	102.00
8.0 unit	120.60	129.25

rfu: relative fluorescence units

10

【0103】

これらの結果をプロットし、1次直線に回帰したところ、次の式を得た。回帰曲線を図1に示す。下記式において、xは、ポリメラーゼ活性のユニット、yは、蛍光強度を示す。また、DNAポリメラーゼ活性は、65において30分間に10nmolのdNTPを酸不溶性画分に取り込む酵素量を1unitとする。

$$y = 8.3717x + 55.292 \quad (R^2 = 0.9671)$$

【0104】

また、測定した精製酵素標品(AacDNAポリメラーゼラジフラグメント)は、反応温度(室温37)における蛍光強度が、平均98.03(1回目97.789、2回目98.262)を示した。このため、前記回帰直線式より、前記反応温度では、約5.10unitと算出された。この結果から、実施例2で得られた精製酵素標品は、DNAポリメラーゼであることが確認できた。

20

【実施例4】

【0105】

[相補鎖置換型複製活性測定]

前述の非特許文献2(Notomi, T. et al., Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 12, e63)に記載された方法に従って、活性測定を行った。まず、M13mp18一本鎖DNA、0.8μmol/L FIP、0.8μmol/L BIP、0.2μmol/L F3、0.2μmol/L B3の各合成DNA、1mol/Lベタイン、20mmol/Lトリス塩酸緩衝液(pH8.8)、10mmol/L塩化カリウム、10mmol/L硫酸アンモニウム、0.1% Triton X-100、2-4mmol/L硫酸マグネシウムの混合物20μlを調製した。これを95で5分間放置し、次いで、氷上で5分間放置した。これに前述の精製酵素標品5μlを加えて所定の反応温度(60~74)で1時間放置した後、アガロースゲル電気泳動に供した。この際、単位が既知であるBstDNAポリメラーゼ(ラジフラグメント)を同様にして電気泳動に供した。そして、精製酵素表品の電気泳動後の精製物のバンドの濃さと、単位が既知のBstDNAポリメラーゼの電気泳動後の精製物のバンドの濃さとを比較することにより、相対値としての酵素単位を算出した。なお、ブランクとして、前記精製酵素標品(AacDNAポリメラーゼラジフラグメント)に代えて、前記トリス塩酸緩衝液を添加したものについても電気泳動を行った。これらの結果を、図2および図3に示す。

30

40

【0106】

図2および図3は、所定の温度で増幅させた遺伝子増幅産物の電気泳動写真である。両図において、レーン1は分子量マーカー(-StyI)である。図2のレーン2は、ブランク(DNAポリメラーゼ無添加)の結果を示す。図2の奇数レーン(3、5、7、9、11、13)は、BstDNAポリメラーゼラジフラグメントを、偶数レーン(4、6、8、10、12、14)は、前記精製酵素標品(AacDNAポリメラーゼラジフラグメント)用いて、60~68の各温度で反応を行った結果である。図3の偶数レーン

50

ン(2、4、6、8、10、12)は、B s t D N Aポリメラーゼラージフラグメントを、奇数レーン(3、5、7、9、11、13)は、前記精製酵素標品(A a c D N Aポリメラーゼラージフラグメント)を添加し、68~74の各温度で反応を行った結果である。なお、図中に、各レーンにおける反応温度()を記載する。

【0107】

図2および図3に示すように、精製酵素標品、すなわち、実施例2で得られたA a c D N Aポリメラーゼラージフラグメントは、相補鎖置換型複製活性を有することが確認された。また、64以下の温度で、B s t D N Aポリメラーゼラージフラグメントと同等の活性を示した。さらに、66以上、特に68以上の温度では、B s t D N Aポリメラーゼラージフラグメントを用いた場合、増幅量が著しく減少するのに対して、A a c D N Aポリメラーゼラージフラグメントを用いた場合、72まで十分な活性が認められた。この結果より、A a c D N Aポリメラーゼラージフラグメントは、高温で安定な酵素であることが示された。

10

【実施例5】

【0108】

[SMart Amplification Process法]

SMart Amplification Process法(三谷らの方法。例えば、特許文献4(特許第3867926)、特許文献5参照)に従い、核酸の等温増幅を行った。下記組成を有する反応液10 μ lを調製し、これを65で60分間反応させた。この反応を、M x 3000 P(商品名、Stratagene社製)を用いて、リアルタイムでモニタリングした。比較例としては、A a c D N Aポリメラーゼラージフラグメントに代えて、市販のB s t D N Aポリメラーゼ(ラージフラグメント)を、下記反応液において終濃度0.32ユニット/ μ lとなるように添加し、同様にしてリアルタイムでモニタリングを行った。これらの結果を図4に示す。

20

【0109】

【表2】

反応組成

Tris-HCl (pH8.8)	20 mmol/L	
KCl	10 mmol/L	30
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mmol/L	
硫酸マグネシウム	6 mmol/L	
Tween 20	0.1%	
ベタイン	0.8 mol/L	
dNTPs	1.4 mmol/L	
SYBR(登録商標)Green I*	0.01 μ l	
ゲノムDNA**	1.6 ng/l	
プライマー5種類		
TP	2.16 μ mol/L	40
FP	2.16 μ mol/L	
BP	1.08 μ mol/L	
OP1	0.135 μ mol/L	
OP2	0.315 μ mol/L	
DNAポリメラーゼ	0.64ユニット/ μ l	
	25 μ l	

* : Molecular Probes, Inc.

** : Promega, Human Genomic DNA, Male

50

【 0 1 1 0 】

プライマー

SMart Amplification Process用プライマーセットとして、以下に示す5種類のプライマーを準備した。第一のプライマーが、Turn-back Primer (TP)、第二のプライマーが、Folding Primer (FP)、第三のプライマーが、野生型検出用のBoost Primer (BPw)、Outer Primer1 (OP1)およびOuter Primer2 (OP2)である。

TP 5'-CGCTGCACATGGCCTGGGGCCTCCTGCTCA-3' (配列番号26)

FP 5'-tttatatatataaaaCCCCTGCACTGTTTCCAGAG-3' (配列番号27)

BP 5'-ATCCGGATGTAGGATC-3' (配列番号28)

OP1 5'-GATGGTGACCACCTCGAC-3' (配列番号29)

OP2 5'-TGACCCTTCTCCCTCG-3' (配列番号30)

10

【 0 1 1 1 】

図4は、等温増幅をリアルタイムでモニタリングした、サイクル数と蛍光強度との関係を示すグラフである。同図において、 \square が、AacDNAポリメラーゼラジフラグメントを用いた実施例の結果、 \triangle が、市販BstDNAポリメラーゼラジフラグメントを用いた比較例の結果である。同図に示すように、AacDNAポリメラーゼラジフラグメントを用いた実施例(\square)によれば、市販のBstDNAポリメラーゼラジフラグメントを用いた比較例(\triangle)よりも速く目的配列が増幅された。なお、増幅物の塩基配列を決定したところ、目的配列が増幅されていることが確認できた。核酸増幅の分野においては、分刻みで増幅時間を短縮することが望まれている。したがって、本発明のAacDNAポリメラーゼによれば、従来のDNAポリメラーゼを用いた等温増幅法よりも、十分な短縮化を図ることができるといえる。

20

【 実施例 6 】

【 0 1 1 2 】

AacDNAポリメラーゼラジフラグメントを用いたSMart Amplification Process法により、ヒトALDH2野生型の検出を行った。

【 0 1 1 3 】

(1) 核酸試料

ヒトALDH2 Hetero型を含む血液15 μ lに、50mmol/L NaOHを30 μ l添加した。これを、98 $^{\circ}$ Cで3分間、加熱処理を行った後、氷冷したものを、核酸試料とした。

30

【 0 1 1 4 】

(2) プライマー

SMart Amplification Process用プライマーセットとして、以下に示す5種類のプライマーを準備した。第一のプライマーが、Turn-back Primer (TP)、第二のプライマーが、Folding Primer (FP)、第三のプライマーが、野生型検出用のBoost Primer (BPw)、Outer Primer1 (OP1)およびOuter Primer2 (OP2)である。

TP 5'-CGAGTACGGGCCACACTCACAGTTTTTCAC-3' (配列番号31)

FP 5'-TTTATATATATATAAACCGGGAGTTGGGCGAG-3' (配列番号32)

BPw 5'-GCAGGCATACACTGA-3' (配列番号33)

OP1 5'-CCTGAGCCCCCAGCAGGT-3' (配列番号34)

OP2 5'-ACAAGATGTCGGGGAGTG-3' (配列番号35)

40

【 0 1 1 5 】

(3) SMart Amplification Process反応

下記組成(25 μ l当たりの組成)の反応液合計75 μ lを調製し、これを60 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。前記反応中、60 $^{\circ}$ Cの等温状態を維持しながら、Mx3000P(商品名、Stratagene社製)により、反応液の蛍光強度をリアルタイムでモニタリングした。なお、比較例としては、AacDNAポリメラーゼラジフラグメントに代えて、市販のBstDNAポリメラーゼ(ラジフラグメント)6Uを下記反応液に添加し、同様にしてリアルタイムでモニタリングを行った。なお、反応測定は、前記反応液75 μ lを25 μ

50

1 ずつ 3 つにわけ、それぞれについて行った。これらの結果を図 5 に示す。同図は、Smart Amplification Process 法による等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフであり、 が、A a c D N A ポリメラーゼラージフラグメントを使用した結果、 が、市販の B s t D N A ポリメラーゼラージフラグメントを使用した結果である。

【 0 1 1 6 】

【表 3】

反応組成

Tris-HCl (pH 9.0、25°C)	20 mmol/L	
KCl	10 mmol/L	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mmol/L	
硫酸マグネシウム	8 mmol/L	
Tween 20	0.1%	
dNTPs	1.4 mmol/L	
DMSO	5%	
SYBR (登録商標) Green I*	1/100,000 希釈	
核酸試料**	1 μl	
プライマー 5 種類	FP	20
	TP	2.0 μmol/L
	BP	2.0 μmol/L
	OP1	1.0 μmol/L
	OP2	0.25 μmol/L
DNAポリメラーゼ	6 ユニット	
	25 μl	

* : Molecular Probes, Inc.

** : 反応系あたり 6000 コピーとなるように添加

30

【 0 1 1 7 】

図 5 に示すように、A a c D N A ポリメラーゼラージフラグメントを使用した場合、市販の B s t D N A ポリメラーゼラージフラグメントを使用した場合と比べて、速く目的配列が増幅された。具体的には、約 8 ~ 12 分程度速くプラトーに達することが確認された。具体的には、A a c D N A ポリメラーゼラージフラグメントを用いた反応系では、30 分以内に増幅が確認された()。一方、B s t D N A ポリメラーゼラージフラグメントを用いた反応系では、30 分以降に増幅が確認された()。このことから、A a c D N A ポリメラーゼは、B s t D N A ポリメラーゼと比較して、Smart Amplification Process 法に非常に適した酵素であるといえる。

【実施例 7】

40

【 0 1 1 8 】

A a c D N A ポリメラーゼラージフラグメントを用いた LAMP 法により、ヒト DIO 2 野生型の検出を行った。

【 0 1 1 9 】

(1) 核酸試料

ヒト DIO 2 Hetero 型を含む血液 15 μl に、50 mmol/L NaOH を 30 μl 添加した。これを、98 °C で 3 分間、加熱処理を行った後、氷冷したものを、核酸試料とした。

【 0 1 2 0 】

(2) プライマー

50

LAMP用プライマーセットとして、以下に示す5種類のプライマーを準備した。なお、TPwおよびTRFs2が、非対称型の一对のプライマーである。

TPw 5' -tactggagacGTGAAATTGGGTGAGGATGC-3' (配列番号36)

TPFs2 5' -AGAAGGAGGTgtaccattgccactgtt-3' (配列番号37)

BP 5' -cacactggaattggggg-3' (配列番号38)

OP1 5' -tcagctatcttctcctgg-3' (配列番号39)

OP2 5' -TGTGATATTCTCACCTTC-3' (配列番号40)

【0121】

(3) LAMP反応

下記組成(25 μ l当たりの組成)の反応液合計75 μ lを調製し、これを60で2時間反応させた。前記反応中、60の等温状態を維持しながら、Mx3000P(商品名、Stratagene社製)により、反応液の蛍光強度をリアルタイムでモニタリングした。なお、比較例としては、AacDNAポリメラーゼラジフラグメントに代えて、市販のBstDNAポリメラーゼ(ラジフラグメント)6Uを下記反応液に添加し、同様にしてリアルタイムでモニタリングを行った。なお、反応測定は、前記反応液75 μ lを25 μ lずつ3つにわけ、それぞれについて行った。これらの結果を図6に示す。同図は、LAMP法による等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフであり、が、AacDNAポリメラーゼラジフラグメントを使用した結果、が、市販のBstDNAポリメラーゼラジフラグメントを使用した結果である。

10

【0122】

20

【表4】

反応組成

MOPS (pH7.4、25 $^{\circ}$ C)	20mmol/L	
KCl	25mmol/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	10mmol/L	
硫酸マグネシウム	8mmol/L	
Tween20	0.1%	
dNTPs	1.4mmol/L	30
DMSO	5%	
SYBR(登録商標)GreenI*	1/100,000希釈	
核酸試料**	1 μ l	
プライマー5種類		
FP	2.0 μ mol/L	
TP	2.0 μ mol/L	
BP	1.0 μ mol/L	
OP1	0.25 μ mol/L	
OP2	0.25 μ mol/L	
DNAポリメラーゼ	6ユニット	40
	25 μ l	

* : Molecular Probes, Inc.

** : 反応系あたり6000コピーとなるように添加

【0123】

図6に示すように、AacDNAポリメラーゼラジフラグメントを使用した場合、市販のBstDNAポリメラーゼラジフラグメントを使用した場合と比べて、増幅速度が速くなることが確認された。具体的には、AacDNAポリメラーゼラジフラグメントを用いた反応系では、30分以内に増幅が確認された()。一方、BstDNAポリメラ

50

ーゼラージフラグメントを用いた反応系では、A a cよりも遅い時間に増幅が確認され、中には、80分以降で増幅が確認されたものもあった()。このことから、A a c DNAポリメラーゼは、B s t DNAポリメラーゼと比較して、安定性に優れ、L A M P法に非常に適した酵素であるといえる。

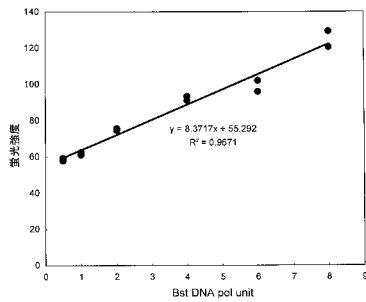
【産業上の利用可能性】

【0124】

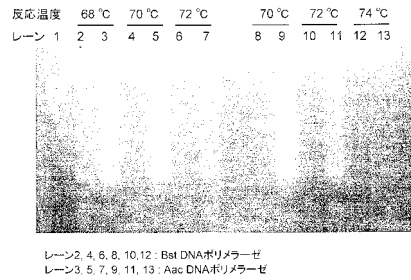
以上のように、本発明の等温増幅用DNAポリメラーゼによれば、等温増幅法に使用されている従来のDNAポリメラーゼと比較して、Smart Amplification Process法やLAMP法等の特定の等温増幅法の増幅効率を向上できる。このため、従来よりも短時間で核酸増幅を行うことが可能となる。また、核酸増幅に要する時間を短縮化できることから、例えば、核酸増幅を利用する一塩基多型(SNP)等の解析をより迅速に行うことができ、また、大量の検体であっても、より効率的に解析することが可能である。したがって、本発明は、核酸増幅を利用する核酸解析や臨床検査等の分野に極めて有用である。

10

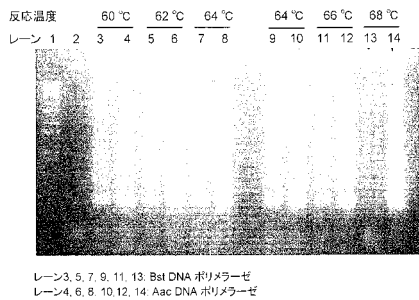
【図1】



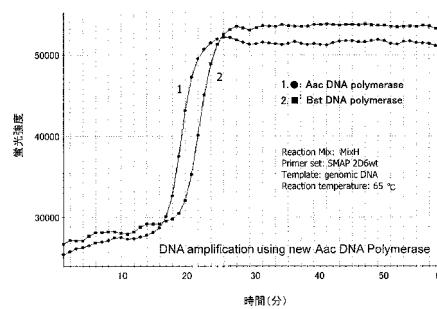
【図3】



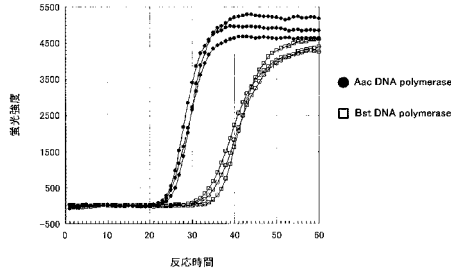
【図2】



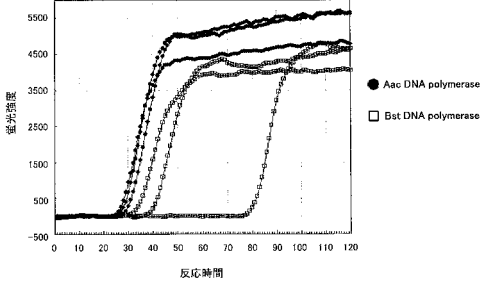
【図4】



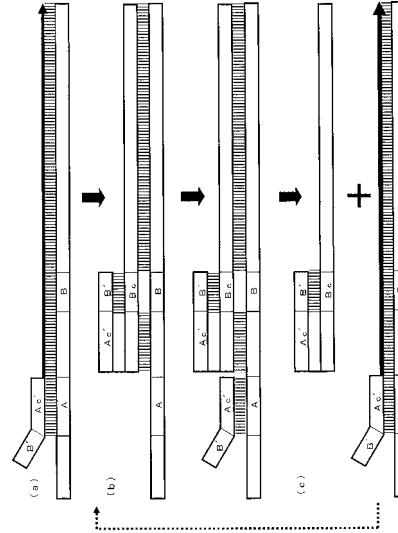
【 図 5 】



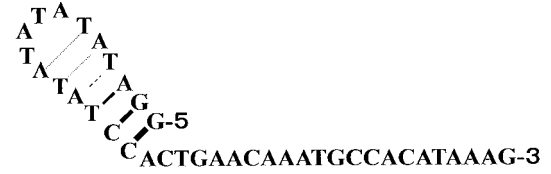
【 図 6 】



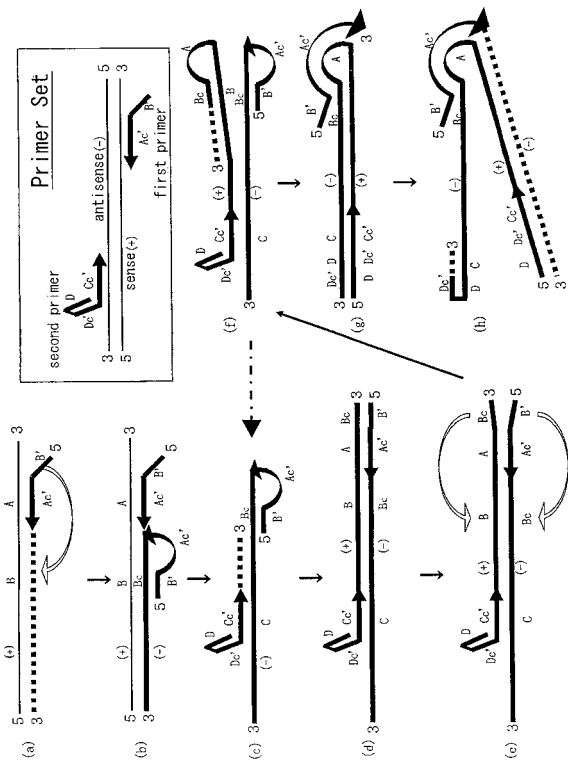
【 図 7 】



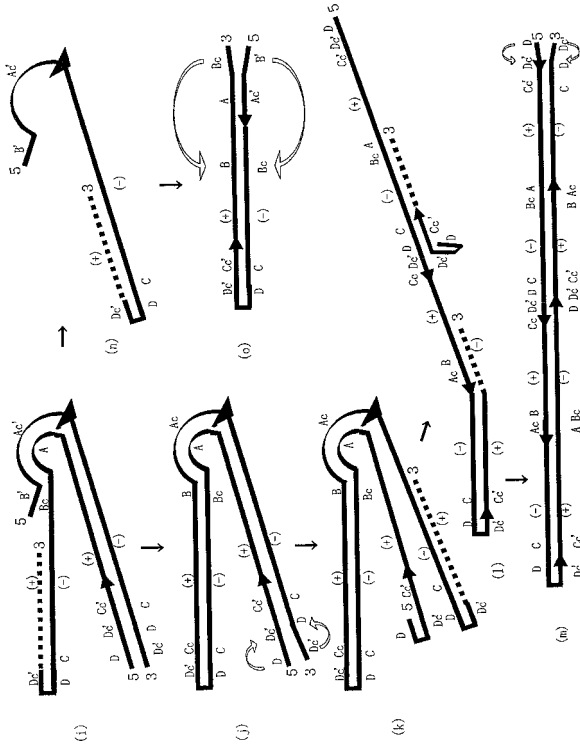
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【配列表】

2009054510000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年7月17日(2009.7.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸試料中の標的核酸配列を等温で増幅する等温増幅方法であって、

下記(a)~(d)のいずれかのタンパク質からなるDNAポリメラーゼの存在下、等温で、下記(X)に示す第一のプライマーを用いて、前記標的核酸配列の増幅反応を行うことを特徴とする等温増幅方法。

(a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1~334個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記(a)~(c)のいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

(X) 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含むプライマー

【請求項2】

前記DNAポリメラーゼが、25~75の範囲における少なくともいずれかの温度において、DNAポリメラーゼ活性を有する、請求項1記載の等温増幅方法。

【請求項3】

前記DNAポリメラーゼが、前記DNAポリメラーゼ活性として、相補鎖置換複製酵素活性を有する、請求項1または2記載の等温増幅方法。

【請求項4】

前記DNAポリメラーゼが、前記DNAポリメラーゼ活性として、逆転写酵素活性を有する、請求項1から3のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項5】

前記DNAポリメラーゼが、5'3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求項1から4のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項6】

前記DNAポリメラーゼが、3'5'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼである、請求項1から5のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項7】

前記DNAポリメラーゼが、3'5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求項1から5のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項8】

前記増幅反応において、第二のプライマーを併用し、

前記第一のプライマーと第二のプライマーとが、形態が異なる非対称型の一对のプライマーである、請求項1から7のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項9】

前記第二のプライマーが、前記標的核酸配列の相補配列の3'末端部分の配列(C)に

ハイブリダイズする配列 (C c ') を 3 ' 末端部分に含み、且つ、相互にハイブリダイズする 2 つの核酸配列を同一鎖上に含む折返し配列 (D - D c ') を前記配列 (C c ') の 5 ' 側に含むものである、請求項 8 記載の等温増幅方法。

【請求項 10】

前記増幅反応において、さらに、第三のプライマーを併用し、

前記第三のプライマーは、前記標的核酸配列またはその相補配列にハイブリダイズし、且つ、標的核酸配列またはその相補配列へのハイブリダイゼーションについて他のプライマーと競合しないプライマーであり、

前記第三のプライマーは、前記第一のプライマーまたは第二のプライマーの増幅産物が部分的に一本鎖の状態になった時に、その一本鎖部分に存在する標的核酸配列にアニーリングすることができ、これにより前記増幅産物中の標的核酸配列に新たな相補鎖合成起点が提供されるプライマーである、請求項 8 または 9 記載の等温増幅方法。

【請求項 11】

前記増幅反応において、さらに、第二のプライマーを併用し、

前記第一のプライマーと第二のプライマーとが、形態が同じである対称型の一対のプライマーである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項 12】

前記プライマーセットが、LAMP法に使用するプライマーセットである、請求項 11 記載の等温増幅方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の等温増幅方法に使用するための DNA ポリメラーゼであって、

下記 (a) ~ (d) のいずれかのタンパク質からなることを特徴とする等温増幅用 DNA ポリメラーゼ。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 25 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1 ~ 334 個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記 (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNA ポリメラーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 14】

前記 DNA ポリメラーゼが、25 ~ 75 の範囲における少なくともいずれかの温度において、DNA ポリメラーゼ活性を有するポリメラーゼである、請求項 13 記載の等温増幅用 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 15】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記 DNA ポリメラーゼ活性として、相補鎖置換複製酵素活性を有するポリメラーゼである、請求項 13 または 14 記載の等温増幅用 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 16】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記 DNA ポリメラーゼ活性として、逆転写酵素活性を有するポリメラーゼである、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の等温増幅用 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 17】

前記 DNA ポリメラーゼが、5 ' 3 ' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求項 13 から 16 のいずれか一項に記載の等温増幅用 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 18】

前記 DNA ポリメラーゼが、3 ' 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼである、請求項 13 から 17 のいずれか一項に記載の等温増幅用 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 19】

前記DNAポリメラーゼが、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求項13から17のいずれか一項に記載の等温増幅用DNAポリメラーゼ。

【請求項20】

請求項1から12のいずれか一項に記載の等温増幅方法に使用するための等温増幅用キットであって、請求項13から19のいずれか一項に記載の等温増幅用DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする等温増幅用キット。

【請求項21】

さらに、下記(X)に示す第一のプライマーを含む、請求項20記載の等温増幅用キット。

(X) 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含むプライマー

【請求項22】

さらに、第二のプライマーを含み、

前記第一のプライマーと前記第二のプライマーとが、形態が異なる非対称型の一对のプライマーである、請求項21記載の等温増幅用キット。

【請求項23】

さらに、第二のプライマーを含み、

前記第一のプライマーと前記第二のプライマーとが、形態が同じである対称型の一对のプライマーである、請求項21記載の等温増幅用キット。

【手続補正書】

【提出日】平成21年12月3日(2009.12.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸試料中の標的核酸配列を等温で増幅する等温増幅方法であって、

下記(a)~(d)のいずれかのタンパク質からなるDNAポリメラーゼの存在下、等温で、下記(X)に示す第一のプライマーを用いて、前記標的核酸配列の増幅反応を行うことを特徴とする等温増幅方法。

(a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1~334個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記(a)~(c)のいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

(X) 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含むプライマー

【請求項2】

前記DNAポリメラーゼが、25~75の範囲における少なくともいずれかの温度において、DNAポリメラーゼ活性を有する、請求項1記載の等温増幅方法。

【請求項3】

前記DNAポリメラーゼが、前記DNAポリメラーゼ活性として、相補鎖置換複製酵素

活性を有する、請求項 1 または 2 記載の等温増幅方法。

【請求項 4】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記 DNA ポリメラーゼ活性として、逆転写酵素活性を有する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項 5】

前記 DNA ポリメラーゼが、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項 6】

前記 DNA ポリメラーゼが、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項 7】

前記 DNA ポリメラーゼが、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したポリメラーゼである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項 8】

前記増幅反応において、第二のプライマーを併用し、

前記第一のプライマーと第二のプライマーとが、形態が異なる非対称型の一对のプライマーである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項 9】

前記第二のプライマーが、前記標的核酸配列の相補配列の 3' 末端部分の配列 (C) にハイブリダイズする配列 (C c') を 3' 末端部分に含み、且つ、相互にハイブリダイズする 2 つの核酸配列を同一鎖上に含む折返し配列 (D - D c') を前記配列 (C c') の 5' 側に含むものである、請求項 8 記載の等温増幅方法。

【請求項 10】

前記増幅反応において、さらに、第三のプライマーを併用し、

前記第三のプライマーは、前記標的核酸配列またはその相補配列にハイブリダイズし、且つ、標的核酸配列またはその相補配列へのハイブリダイゼーションについて他のプライマーと競合しないプライマーであり、

前記第三のプライマーは、前記第一のプライマーまたは第二のプライマーの増幅産物が部分的に一本鎖の状態になった時に、その一本鎖部分に存在する標的核酸配列にアニーリングすることができ、これにより前記増幅産物中の標的核酸配列に新たな相補鎖合成起点が提供されるプライマーである、請求項 8 または 9 記載の等温増幅方法。

【請求項 11】

前記増幅反応において、さらに、第二のプライマーを併用し、

前記第一のプライマーと第二のプライマーとが、形態が同じである対称型の一对のプライマーである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の等温増幅方法。

【請求項 12】

前記プライマーセットが、LAMP法に使用するプライマーセットである、請求項 11 記載の等温増幅方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の等温増幅方法に使用するための等温増幅用キットであって、

DNA ポリメラーゼを含み、

前記 DNA ポリメラーゼが、下記 (a) ~ (d) のいずれかのタンパク質からなる等温増幅用 DNA ポリメラーゼであることを特徴とする等温増幅用キット。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 25 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1 ~ 334 個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記 (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNA ポリメラー

ゼ活性を有するタンパク質

【請求項 14】

前記 DNA ポリメラーゼが、25 ~ 75 の範囲における少なくともいずれかの温度において、DNA ポリメラーゼ活性を有する等温増幅用 DNA ポリメラーゼである、請求項 13 記載の等温増幅用キット。

【請求項 15】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記 DNA ポリメラーゼ活性として、相補鎖置換複製酵素活性を有する等温増幅用 DNA ポリメラーゼである、請求項 13 または 14 記載の等温増幅用キット。

【請求項 16】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記 DNA ポリメラーゼ活性として、逆転写酵素活性を有する等温増幅用 DNA ポリメラーゼである、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の等温増幅用キット。

【請求項 17】

前記 DNA ポリメラーゼが、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した等温増幅用 DNA ポリメラーゼである、請求項 13 から 16 のいずれか一項に記載の等温増幅用キット。

【請求項 18】

前記 DNA ポリメラーゼが、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する等温増幅用 DNA ポリメラーゼである、請求項 13 から 17 のいずれか一項に記載の等温増幅用キット。

【請求項 19】

前記 DNA ポリメラーゼが、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した等温増幅用 DNA ポリメラーゼである、請求項 13 から 17 のいずれか一項に記載の等温増幅用キット。

【請求項 20】

さらに、下記 (X) に示す第一のプライマーを含む、請求項 13 から 19 のいずれか一項に記載の等温増幅用キット。

(X) 標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (A c')

) を 3' 末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (B c) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (A c') の 5' 側に含むプライマー

【請求項 21】

さらに、第二のプライマーを含み、
前記第一のプライマーと前記第二のプライマーとが、形態が異なる非対称型の一对のプライマーである、請求項 20 記載の等温増幅用キット。

【請求項 22】

さらに、第二のプライマーを含み、
前記第一のプライマーと前記第二のプライマーとが、形態が同じである対称型の一对のプライマーである、請求項 20 記載の等温増幅用キット。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本発明は、等温増幅方法およびそれに用いる等温増幅用キットに関する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

そこで、本発明は、特定の等温増幅方法に適したDNAポリメラーゼを用いた等温増幅方法、ならびにそれに用いる等温増幅用キットを提供することを目的とする。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼは、本発明の等温増幅方法に使用するためのDNAポリメラーゼであって、前記(a)～(d)のいずれかのタンパク質からなることを特徴とする。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

本発明の等温増幅キットは、本発明の等温増幅方法に使用するための等温増幅用キットであって、DNAポリメラーゼを含み、前記DNAポリメラーゼが、下記(a)～(d)のいずれかのタンパク質からなる等温増幅用DNAポリメラーゼであることを特徴とする。

。

(a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1～334個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記(a)～(c)のいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

本発明者らは、DNA複製酵素活性および相補鎖置換複製活性を有する熱安定性のアリシクロバチルス・アシドカルダリウス(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)由来DNAポリメラーゼ(以下、「Aacポリメラーゼ」という)が、等温増幅法の中でも後述する特定の方法に適していることを見出し、本発明を完成した。前記等温増幅用DNAポリメラーゼを用いた本発明の等温増幅方法および等温増幅用キットによれば、等温増幅法に使用されている従来のDNAポリメラーゼと比較して、後述する特定の等温増幅法の増幅効率を向上できるため、結果的に、従来よりも短時間で核酸増幅を行うことが可能となる。核酸増幅に要する時間を短縮化できれば、例えば、核酸増幅を利用する一塩基多型(SNP)等の解析をより迅速に行うことができ、また、大量の検体であっても、より効率的に解析することが可能である。したがって、本発明は、核酸増幅を利用する核酸解析や臨床検査等の分野に極めて有用である。なお、AacDNAポリメラーゼが、特定の等温増幅法に適していることは、本発明者らがはじめて見出したことである。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

【図1】DNAポリメラーゼ活性の測定に用いた標準曲線を示すグラフである。

【図2】本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、60～68の温度における相補鎖置換複製酵素活性を測定した結果を示す電気泳動写真である。

【図3】本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、68～74の温度における相補鎖置換複製酵素活性を測定した結果を示す電気泳動写真である。

【図4】本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフである。

【図5】本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフである。

【図6】本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼおよび市販のDNAポリメラーゼを用いて、等温増幅反応を行った際の増幅プロフィールを示すグラフである。

【図7】本発明の一実施形態であるSMA P法における、第一のプライマーによる核酸合成の作用機序を示す模式図である。

【図8】本発明の一実施形態であるSMA P法における、第二のプライマーの一例を示す模式図である。

【図9】本発明の一実施形態であるSMA P法の作用機序の一例を示す模式図である。

【図10】本発明の一実施形態であるSMA P法の作用機序の一例を示す模式図である。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

<等温増幅用DNAポリメラーゼ>

本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼは、前述のように、本発明の等温増幅法に使用するためのDNAポリメラーゼであり、下記(a)～(d)のいずれかのタンパク質からなることを特徴とする。なお、本発明に用いるDNAポリメラーゼを適用する本発明の等温増幅法については、後述する。

(a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、N末端から、1～334個の任意の個数の連続するアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 前記(a)～(c)のいずれかのタンパク質の有するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼは、例えば、アリシクロバチルス(*Alicyclobacillus*)属の微生物から単離することができ、好ましくは、アリシクロバチルス・ア

シドカルダリウス(*A. acidocaldarius*)から、さらに好ましくは、*A. acidocaldarius* JC M5260株から単離することができる。本菌株(JCM5260株)は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より分譲可能である(http://www.jcm.riken.jp/JCM/Ordering_J.shtml)。本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼは、以下、「本発明に用いるDNAポリメラーゼ」、「本発明に用いるDNAポリメラーゼI」、「本発明に用いるAacポリメラーゼ」または「本発明に用いるタンパク質」という場合もある。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

また、本発明に用いるDNAポリメラーゼは、前記(d)に示すように、DNAポリメラーゼ活性を有する限り、前記(a)~(c)のアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。「1または数個のアミノ酸」とは、例えば、前記(a)~(c)のアミノ酸残基数の5~10%程度をいい、例えば、1~50個程度、好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、最も好ましくは1~5個程度である。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

また、本発明に用いるDNAポリメラーゼは、下記(e)に示すように、DNAポリメラーゼ活性を有する限りにおいて、前記(a)~(c)のアミノ酸配列との相同性が、例えば、50%以上のタンパク質であってもよい。前記相同性は、好ましくは、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、97%以上、98%以上である。

(e)前記(a)~(c)のいずれかが記載のタンパク質の有するアミノ酸配列との相同性が、例えば、50%以上のアミノ酸配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

本発明に用いるDNAポリメラーゼは、ポリメラーゼ活性として、通常の鋳型依存性のDNA複製酵素活性および相補鎖置換複製酵素活性を有し、例えば、さらに、逆転写酵素活性を有する。また、本発明に用いるDNAポリメラーゼは、さらに、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有していてもよい。本発明に用いるDNAポリメラーゼが3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有すれば、例えば、基質を取り込む際のエラーをより減少することが可能である。本発明に用いるDNAポリメラーゼは、例えば、25~75のいずれかの温度で活性を示すことが好ましく、より好ましくは37~72のいずれかの温度、さらに好ましくは50~70のいずれかの温度、特に好ましくは55~65のいずれかの温度である。本発明に用いるDNAポリメラーゼの至適温度は、例えば、公知の相補鎖置換複製酵素活性を有するDNAポリメラーゼの至適温度(例えば、20~37)より高温である。具体的には、例えば、25~75のいずれかの温度で活性を有することが好ましく、より好ましくは、37~72のいずれかの温度、さらに好ましくは、

50 ~ 70 のいずれかの温度、特に好ましくは、55 ~ 65 のいずれかの温度である。従って、本発明に用いるDNAポリメラーゼは、例えば、相補鎖置換複製酵素活性を有する従来のDNAポリメラーゼよりも高温度の反応条件で用いることができる。このため、後述するSMA P法やLAMP法等を含む本発明における特定の等温増幅法において、鑄型DNAとプライマーとのより厳密なアニーリング条件下で使用することが可能である。また、本発明に用いるDNAポリメラーゼが逆転写酵素活性を有する場合、例えば、RNAを鑄型としてDNAを合成することができ、従来のRT-PCRの代替法にも利用できる。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

さらに、本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼは、例えば、前述のように、N末端側アミノ酸残基を欠失させたN末端欠失DNAポリメラーゼを含む。欠失させるN末端側のアミノ酸残基数は、前述のように、例えば、得られるN末端欠失DNAポリメラーゼが相補鎖置換複製酵素活性を有していればよく、特に限定されない。具体例としては、前記N末端欠失DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しており、例えば、大腸菌のDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントに対応する活性を有するものが好ましい。このようなDNAポリメラーゼとしては、例えば、前記(b)または前記(c)に示すように、配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質において、N末端から1~334個の任意の個数の連続したアミノ酸残基が欠失したタンパク質があげられる。N末端から連続的に欠失するアミノ酸の残基数が相対的に多い場合に、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失する可能性が相対的に高いと考えられる。また、DNAポリメラーゼは、N末端側から、5' 3'エキソヌクレアーゼ、3' 5'エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼの順でそれぞれのドメインが配置されている。したがって、5' 3'エキソヌクレアーゼを欠失させる場合は、例えば、配列番号23のアミノ酸配列において、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を示さなくなるまで、N末端側より任意の個数のアミノ酸残基を欠失させることで、前記活性を欠失することができる。なお、配列番号23のアミノ酸配列においては、62~306番目の領域が5' 3'エキソヌクレアーゼドメイン、392~536番目の領域が3' 5'エキソヌクレアーゼドメインと考えられるが、本発明は、これに限定されるものではない。本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼとして、大腸菌のクレノウフラグメントに対応する、DNAポリメラーゼ活性と3' 5'エキソヌクレアーゼ活性とを有し、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失したN末端欠失DNAポリメラーゼのアミノ酸配列の具体例を配列番号25に示す。このように、本発明に用いるDNAポリメラーゼが5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失する場合、例えば、遺伝子増幅を行う際に、得られた増幅産物の分解を防止できるという利点を有する。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

さらに、本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼは、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失していてもよい。種々のDNAポリメラーゼIについて、各アミノ酸配列を比較すると、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素には、酵素タンパク質の中央部に3つの共通配列モチーフが存在することが知られている。これらのモチーフを除去した酵素を作製することができる。例えば、市販の好熱性細菌由来のBst DNAポリ

メラゼは、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失している (Aliotta, J.M. et al., Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, Vol. 12, pp. 185-195, 1996)。3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しているDNAポリメラーゼは、例えば、等温増幅反応に用いた際、プライマーの3'末端を分解することがない。このため、プライマー濃度の低下が十分に防止されることによって、核酸増幅速度がより速くなるという利点がある。また、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しているDNAポリメラーゼは、例えば、点突然変異の検出への使用に適している。3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失しているDNAポリメラーゼによれば、例えば、プライマーが3'側から分解されることを十分に防止できる。このため、プライマーは、鋳型DNAの変異箇所を十分に識別でき、例えば、誤って伸長反応が進むことが抑制され、伸長反応の停止による点突然変異の検出がより正確に行うことができる。前述のように、DNAポリメラーゼは、N末端側から、5' 3'エキソヌクレアーゼ、3' 5'エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼの順でそれぞれのドメインが配置されている。したがって、3' 5'エキソヌクレアーゼを欠失させる場合は、例えば、配列番号23または配列番号25のアミノ酸配列において、DNAポリメラーゼ活性を有し、且つ、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を示さなくなるまで、任意の個数のアミノ酸残基を欠失させることで、前記活性を欠失することができる。また、配列番号23のアミノ酸配列においては、392~536番目の領域が3' 5'エキソヌクレアーゼドメインと考えられるため、例えば、この領域を欠失させてもよい。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

<等温増幅法>

本発明の等温増幅方法は、核酸試料中の標的核酸配列を等温で増幅する等温増幅方法であって、前記(a)~(d)のいずれかのタンパク質からなる本発明に用いるDNAポリメラーゼの存在下、等温で、下記(X)に示す第一のプライマーを用いて、前記標的核酸配列を増幅することを特徴とする。

(X)標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含み、且つ、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含むプライマー

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

本発明は、前記(X)に示す第一のプライマーを使用する等温増幅方法であって、本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼを使用することが特徴である。したがって、前記(X)に示す第一のプライマーと本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼとを使用する以外は、その他の構成や工程、条件等は制限されない。また、前記(X)に示す第一のプライマーを用いた等温増幅反応によると、例えば、電気泳動解析時にラダー状の増幅産物が得られることから、本発明に用いるDNAポリメラーゼを適用する等温増幅反応は、例えば、ラダー状の増幅産物を生成する等温増幅反応ということもできる。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

<等温増幅用キット>

本発明の等温増幅用キットは、本発明の等温増幅方法に使用するためのキットであって、本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする。本発明によれば、例えば、容易且つ簡便に、前述の本発明の等温増幅方法を行うことができる。本発明の等温増幅キットは、本発明に用いるDNAポリメラーゼを含んでいればよく、その他の構成等は制限されない。その他の構成等は、前述の等温増幅方法に応じて適宜決定できる。本発明の等温増幅キットは、本発明に用いるDNAポリメラーゼの他に、例えば、プライマーやプライマーセット、使用説明書を含んでもよい。前記プライマーやプライマーセットは、前述のものがあげられる。また、本発明の等温増幅用キットは、さらに、例えば、dNTP mix (dATP、dTTP、dCTPおよびdGTP)等の基質、トリス塩酸バッファー、トリスリン酸バッファー、リン酸ナトリウムバッファー、リン酸カリウムバッファー等の緩衝液；塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム等の触媒；ジメチルスルホキシド(DMSO)やベタイン(N,N,N-trimethylglycine)等の添加物；国際公開第99/54455号パンフレットに記載の酸性物質、陽イオン錯体；酵素安定剤等を含んでもよい。前記酵素安定剤としては、制限されないが、例えば、グリセロール、ウシ血清アルブミン、糖類等があげられ、中でも、糖類が好ましく、より好ましくは単糖またはオリゴ糖、より好ましくは、トレハロース、ソルビトールもしくはマンニトール、またはこれらの2種以上の混合物である。また、本発明の等温増幅用キットは、さらに、融解温度調整剤を含んでもよい。前記融解温度調整剤としては、例えば、DMSO、ベタイン、ホルムアミドもしくはグリセロール、またはこれらの任意の組合せ等があげられ、好ましくは、DMSOである。また、等温増幅方法に供する核酸試料がRNAを含み、これを鋳型とする場合は、例えば、さらに、逆転写酵素を含むことが好ましい。なお、本発明の等温増幅用キットにおいて、これらの試薬の割合等は、制限されず、当業者であれば適宜決定できる。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0066】

本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼをコードするDNAとしては、例えば、前述の(a)~(d)に示すDNAポリメラーゼをコードする、下記(a')~(d')に示すDNAを含む。

(a') 配列番号22で表される塩基配列からなるDNA

(b') 配列番号24で表される塩基配列からなるDNA

(c') 配列番号22で表される塩基配列において、5'末端から、1個~334個の任意の個数の連続するコドンが欠失した塩基配列からなるDNA

(d') 前記(a')~(c')のいずれか記載の塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなり、且つ、DNAポリメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

(組換えベクター)

つぎに、本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼの発現に使用できる組換えベクターについて説明する。前記組換えベクターは、本発明における前述のDNAを含むことを特徴とする。前記組換えベクターは、例えば、適当なベクターに本発明のDNAを連結(挿入)することにより得られる。前記DNAを挿入するためのベクターは、例えば、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、例えば、大腸菌由来のプラスミド(例えば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119等)、枯草菌由来のプラスミド(例えば、pUB110、pTP5等)、酵母由来のプラスミド(例えば、YEp13、YEp24、Ycp50等)等が挙げられる。ファージDNAとしては、例えば、ファージ(例えば、Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、gt10、gt11、ZAP等)等が挙げられる。さらに、レトロウイルスまたはワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクター等を用いることもできる。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0077

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0077】

(形質転換体)

本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼの製造に使用できる形質転換体について説明する。前記形質転換体は、前記組換えベクターを含むことを特徴とする。前記形質転換体は、例えば、本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼを発現し得るように、前述のDNAを宿主に導入することにより得られ、具体的には、本発明の組換えベクターを導入することが好ましい。形質転換は、例えば、簡便で効率が良いことから、多くの場合ベクターを用いて行われる。ここで、宿主としては、本発明に用いるタンパク質を発現できるものであれば、特に限定されるものではない。前記宿主としては、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)等のエッシェリヒア属、バシラス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバシラス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ(*Rhizobium meliloti*)等のリゾビウム属に属する細菌等が挙げられる。また、この他に、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等の酵母、さらに、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞等も挙げられる。あるいは、例えば、Sf9、Sf21等の昆虫細胞を用いることもできる。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

<等温増幅用DNAポリメラーゼの製造方法>

本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼは、例えば、前記形質転換体を培養し、得られた培養物からタンパク質(DNAポリメラーゼ)を採取することにより製造できる。「培養物」とは、例えば、培養上清の他、培養細胞若しくは培養菌体、または、細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味する。また、「本発明の形質転換体を培養する方法」は、例えば、宿主の培養に適用される通常の方法に従って行われ、その条件等は、例えば、宿主の種類等に応じて適宜決定できる。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

培養後、本発明に用いるタンパク質（DNAポリメラーゼ）が、菌体内または細胞内に生産される場合には、例えば、菌体または細胞を破碎することにより前記タンパク質を抽出する。また、本発明に用いるタンパク質（DNAポリメラーゼ）が、菌体外または細胞外に生産される場合には、例えば、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により前記培養液から菌体または細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法を、単独で、または、適宜組み合わせる用いることによって、前記培養物から本発明に用いるタンパク質（DNAポリメラーゼ）を精製することができる。前記単離精製の方法としては、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等があげられる。また、例えば、精製のために、発現するタンパク質にタグ配列を付加している場合には、前記精製工程の間または後に、プロテアーゼ処理等により、前記タグ配列を除去することもできる。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

<抗体>

さらに、本発明に用いるDNAポリメラーゼに対する抗体について説明する。前記「抗体」には、例えば、好適な任意のフラグメントまたは誘導体も含まれる。このような広義の抗体としては、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、二重特異性抗体(diabody)（融合した同一のFvフラグメントの2つのコピー）、単鎖抗体、および、2以上の抗体フラグメントから形成される多重特異性(multi-specific)抗体等が含まれる。前記抗体は、例えば、本発明に用いる等温増幅用DNAポリメラーゼの精製に用いることができる。前記抗体の製造方法は、制限されず、例えば、従来公知の方法により製造できる。

【手続補正25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

(2)陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

GEヘルスケア社製AKTA Prime(商標)高速液体クロマトグラフィーシステムとGEヘルスケア社製強陰イオン交換カラムHiTrap(商標)Qを用いて、イオン交換クロマトグラフィーを行った。ランニングバッファーとして、10mmol/L 2-メルカプトエタノールを含む50mmol/L Tris-HCl(pH7.6)を用いた。流速1ml/分でカラムを平衡化し、前述の粗抽出液をアブライした後、非吸着画分を前記ランニングバッファーで洗浄した。約15カラム容量の0~1mol/L塩化ナトリウム濃度勾配により吸着画分を溶出した。溶出画分は、1mlごとに分画し、それぞれをSDS-PAGEに供してタンパク質バンドを確認した。そして、該当する分子量のタンパク質バンドを有する画分を回収した。回収画分を、限外濾過膜を用いて濃縮・脱塩し、これを陰イオン交換画分とした。

【手続補正26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

(3) ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィー

GEヘルスケア社製AKTA Prime (商標)高速液体クロマトグラフィーシステムとGEヘルスケア社製ヘパリンアフィニティーカラムHiTrap (商標)Heparinを用いて、ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行った。ランニングバッファーとして、前記陰イオン交換カラムクロマトグラフィーと同じ溶液を用いた。流速1ml/分でカラムを平衡化し、前述の陰イオン交換画分をアプライした後、非吸着画分を前記ランニングバッファーで洗浄した。約22カラム容量の0~1mol/L塩化ナトリウム濃度勾配により吸着画分を溶出した。溶出画分は、1mlごとに分画し、それぞれSDS-PAGEに供してタンパク質バンドを確認した。そして、該当する分子量のタンパク質バンドを有する画分を回収した。前記回収画分を限外濾過膜を用いて、0.2mol/L塩化ナトリウム含有の50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)にバッファー置換を行い、さらに濃縮して、これをヘパリン画分とした。

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

(4) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

GEヘルスケア社製AKTA 10XT高速液体クロマトグラフィーシステムとGEヘルスケア社製ゲルろ過カラムHiLoad (商標)16/60 Superdex (商標)200 prep gradeを用いて、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。ランニングバッファーとして、0.2mol/L塩化ナトリウム含有の50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)を用いた。流速1ml/分でカラムを平衡化し、前述のヘパリン画分をアプライした後、前記ランニングバッファーで溶出した。溶出画分は1mlごとに分画し、それぞれをSDS-PAGEに供してタンパク質バンドを確認した後、該当する分子量のタンパク質バンドを有する画分を回収した。回収画分を限外濾過膜を用いて濃縮し、保存バッファーにバッファー交換を行った。これを精製酵素標品とした。なお、前記保存バッファーの組成は、50mmol/L塩化カリウム、10mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、1mmol/L DTT、0.1mmol/L EDTA、0.1% Triton (登録商標) X-100、50%グリセロールとした。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0101】

[DNAポリメラーゼ活性測定]

インビトロジェン社製Picogreen (登録商標) dsDNA定量試薬を用いて、Seville M. et al. Biotechniques Vol.21, pp.664-668 (1996)を参考に、前記精製酵素標品 (Aac DNAポリメラーゼラジフラグメント) のDNAポリメラーゼ活性を測定した。具体的には、前記Picogreen (登録商標) dsDNA定量試薬とTE緩衝液とを、体積比1:345となるように混合した。そして、この混合液173μlを、M13mp18一本鎖DNA、プライマー、dNTPおよび前記精製酵素標品の混合物27μlに添加した。この反応液を室温(37℃)で5分間放置した後、励起波長480nm、測定波長520nmにて蛍光を測定した。この際、単位(unit: 65 30分間に10nmolのdNTP

を取り込む酵素量)が既知である市販のクレノウフラグメント(市販のB s t D N Aポリメラーゼ; N E B社製)についても同様に蛍光測定を行い、その測定値より、相対値としての酵素単位を算出した。以下に測定の一例を示す。なお、標準曲線は、測定ごとに作成し、反応温度は37とした。市販のB s t D N Aポリメラーゼ(N E B社製、以下同様)を標準として、Picogreen(登録商標)dsDNA定量試薬により、各希釈倍での蛍光強度を測定した。この結果を表1に示す。

【手続補正29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0103】

これらの結果をプロットし、1次直線に回帰したところ、次の式を得た。回帰曲線を図1に示す。下記式において、xは、ポリメラーゼ活性のユニット、yは、蛍光強度を示す。また、DNAポリメラーゼ活性は、65において30分間に10nmolのdNTPを酸不溶性画分に取り込む酵素量を1unitとする。

$$y = 8.3717x + 55.292 \quad (R^2 = 0.9671)$$

【手続補正30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0105

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0105】

[相補鎖置換型複製活性測定]

前述の非特許文献2(Notomi, T. et al., Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 12, e63)に記載された方法に従って、活性測定を行った。まず、M13mp18一本鎖DNA、0.8μmol/L FIP、0.8μmol/L BIP、0.2μmol/L F3、0.2μmol/L B3の各合成DNA、1mol/Lベタイン、20mmol/Lトリス塩酸緩衝液(pH8.8)、10mmol/L塩化カリウム、10mmol/L硫酸アンモニウム、0.1% Triton(登録商標)X-100、2-4mmol/L硫酸マグネシウムの混合物20μlを調製した。これを95で5分間放置し、次いで、氷上で5分間放置した。これに前述の精製酵素標品5μlを加えて所定の反応温度(60~74)で1時間放置した後、アガロースゲル電気泳動に供した。この際、単位が既知であるB s t D N Aポリメラーゼ(ラージフラグメント)を同様にして電気泳動に供した。そして、精製酵素表品の電気泳動後の精製物のバンドの濃さと、単位が既知のB s t D N Aポリメラーゼの電気泳動後の精製物のバンドの濃さとを比較することにより、相対値としての酵素単位を算出した。なお、ブランクとして、前記精製酵素標品(AacDNAポリメラーゼラージフラグメント)に代えて、前記トリス塩酸緩衝液を添加したものについても電気泳動を行った。これらの結果を、図2および図3に示す。

【手続補正31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0109

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0109】

【表 2】

反応組成		
Tris-HCl (pH 8.8)		20 mmol/L
KCl		10 mmol/L
(NH ₄) ₂ SO ₄		10 mmol/L
硫酸マグネシウム		6 mmol/L
Tween (登録商標) 20		0.1%
ベタイン		0.8 mol/L
dNTPs		1.4 mmol/L
SYBR (登録商標) Green I*		0.01 μl
ゲノムDNA**		1.6 ng/l
プライマー5種類	TP	2.16 μmol/L
	FP	2.16 μmol/L
	BP	1.08 μmol/L
	OP1	0.135 μmol/L
	OP2	0.315 μmol/L
DNAポリメラーゼ		0.64 ユニット/μl
		25 μl

* : Molecular Probes, Inc.

** : Promega, Human Genomic DNA, Male

【手続補正 32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0111

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0111】

図4は、等温増幅をリアルタイムでモニタリングした、サイクル数と蛍光強度との関係を示すグラフである。同図において、 が、AacDNAポリメラーゼラージフラグメントを用いた実施例の結果、 が、市販BstDNAポリメラーゼラージフラグメントを用いた比較例の結果である。同図に示すように、AacDNAポリメラーゼラージフラグメントを用いた実施例()によれば、市販のBstDNAポリメラーゼラージフラグメントを用いた比較例()よりも速く目的配列が増幅された。なお、増幅物の塩基配列を決定したところ、目的配列が増幅されていることが確認できた。核酸増幅の分野においては、分刻みで増幅時間を短縮することが望まれている。したがって、本発明に用いるAacDNAポリメラーゼによれば、従来のDNAポリメラーゼを用いた等温増幅法よりも、十分な短縮化を図ることができるといえる。

【手続補正 33】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0116】

【表 3】

反応組成		
Tris-HCl (pH 9.0、25°C)		20 mmol/L
KCl		10 mmol/L
(NH ₄) ₂ SO ₄		10 mmol/L
硫酸マグネシウム		8 mmol/L
Tween (登録商標) 20		0.1%
dNTPs		1.4 mmol/L
DMSO		5%
SYBR (登録商標) Green I*		1/100,000 希釈
核酸試料**		1 μl
プライマー 5種類	FP	2.0 μmol/L
	TP	2.0 μmol/L
	BP	1.0 μmol/L
	OP1	0.25 μmol/L
	OP2	0.25 μmol/L
DNAポリメラーゼ		6ユニット
		25 μl

* : Molecular Probes, Inc.

** : 反応系あたり6000コピーとなるように添加

【手続補正34】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0122

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0122】

【表 4】

反応組成		
MOPS (pH 7.4、25°C)		20 mmol/L
KCl		25 mmol/L
(NH ₄) ₂ SO ₄		10 mmol/L
硫酸マグネシウム		8 mmol/L
Tween (登録商標) 20		0.1%
dNTPs		1.4 mmol/L
DMSO		5%
SYBR (登録商標) Green I*		1/100,000 希釈
核酸試料**		1 μl
プライマー 5種類	FP	2.0 μmol/L
	TP	2.0 μmol/L
	BP	1.0 μmol/L
	OP1	0.25 μmol/L
	OP2	0.25 μmol/L
DNAポリメラーゼ		6 ユニット
		25 μl

* : Molecular Probes, Inc.

** : 反応系あたり6000コピーとなるように添加

【手続補正 35】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0124】

以上のように、前記等温増幅用DNAポリメラーゼを用いた本発明の等温増幅方法および等温増幅用キットによれば、等温増幅法に使用されている従来のDNAポリメラーゼと比較して、Smart Amplification Process法やLAMP法等の特定の等温増幅法の増幅効率を向上できる。このため、従来よりも短時間で核酸増幅を行うことが可能となる。また、核酸増幅に要する時間を短縮化できることから、例えば、核酸増幅を利用する一塩基多型(SNP)等の解析をより迅速に行うことができ、また、大量の検体であっても、より効率的に解析することが可能である。したがって、本発明は、核酸増幅を利用する核酸解析や臨床検査等の分野に極めて有用である。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/069371
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N9/12(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C12N9/12, C12Q1/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2003-274962 A (Nippon Genetech Co., Ltd.), 30 September, 2003 (30.09.03), Sequence No.1 (Family: none)	13-19/1-12, 20-23
Y	WO 2005/063977 A1 (Riken, Japan), 14 July, 2005 (14.07.05), Claims 1, 20 & JP 2007-44054 A & US 2007/0190531 A1 & EP 1712618 A1	1-12, 20-23
Y	JP 10-313900 A (Becton, Dickinson and Co.), 02 December, 1998 (02.12.98), Full text & US 5916779 A & EP 0878553 A2	1-12, 20-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 January, 2009 (05.01.09)		Date of mailing of the international search report 13 January, 2009 (13.01.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/069371

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOTOMI T. et al., Loop-mediated isothermal amplification of DNA., Nucleic. Acids Res., 2000, Vol.28, No.12, e63, i-vii	1-12, 20-23
X/Y	Database swissprot [online], Accession No. Q08IE5, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=122301301 >, 31-Oct-2006 uploaded, [retrieved on 2008-12-24] MITANI Y. et al., Definition: DNA polymerase I.	13-19/1-12, 20-23

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 6 9 3 7 1									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N9/12(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N9/12, C12Q1/68											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2008年	日本国実用新案登録公報	1996-2008年	日本国登録実用新案公報	1994-2008年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2008年										
日本国実用新案登録公報	1996-2008年										
日本国登録実用新案公報	1994-2008年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X/ Y	JP 2003-274962 A (株式会社ニッポンジーンテック) 2003.09.30, 配列番号1 (ファミリーなし)	13-19/ 1-12, 20-23									
Y	WO 2005/063977 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2005.07.14, 請求項1、20 & JP 2007-44054 A & US 2007/0190531 A1 & EP 1712618 A1	1-12, 20-23									
Y	JP 10-313900 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 1998.12.02, 全文 & US 5916779 A & EP 0878553 A2	1-12, 20-23									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 05.01.2009		国際調査報告の発送日 13.01.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり	4 B 9 1 5 2								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/069371

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	NOTOMI T. et al., Loop-mediated isothermal amplification of DNA., Nucleic. Acids Res., 2000, Vol.28, No.12, e63, i-vii	1-12, 20-23
X/ Y	Database swissprot [online], Accession No.Q08IE5, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&iid=122301301 >, 31-Oct-2006 uploaded, [retrieved on 2008-12-24] MITANI Y. et al., Definition: DNA polymerase I.	13-19/ 1-12, 20-23

フロントページの続き

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

(72)発明者 林崎 良英
神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72)発明者 伊藤 昌可
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内

(72)発明者 レジャバ アレキサンダー
神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72)発明者 辨野 義己
茨城県つくば市高野台 3 丁目 1 番地 1 独立行政法人理化学研究所 筑波研究所内

(72)発明者 三谷 康正
神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 - 1 株式会社ダナフォーム内

(72)発明者 金森 基
神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 - 1 株式会社ダナフォーム内

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA10 CA05 CA20 DA06 EA04 HA14
4B050 CC03 DD02 FF11E FF12E FF14E LL03
4B063 QA01 QQ42 QR32 QR56 QR62 QS24 QS25 QS34

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。