

耐熱性DNAポリメラーゼ～PCRへの利用から現在まで～

石野 良純

DNAポリメラーゼは試験管の中でDNA鎖を合成する活性を有するので、遺伝子工学用酵素の中でも花形選手である。その反応には鋳型DNAの他にプライマーとなる短いデオキシオリゴヌクレオチドと4種のデオキシモノヌクレオチド3リン酸 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)があれば、新しくDNA鎖が合成される。その性質によって、DNAポリメラーゼは塩基配列決定やPCRをはじめとする数多くのDNA操作に利用される(図1)。そのため、多くのメーカーは競って、より優れた酵素製品の開発に力を入れている。ジデオキシ塩基配列解析法やPCRが開発された当初は、大腸菌DNAポリメラーゼI Klenow酵素が利用されていたが、耐熱性のDNAポリメラーゼによってPCRの自動化がなされ、塩基配列解析にも耐熱性DNAポリメラーゼを利用したサイクルシーケンシング法が普及した。すなわち、耐熱性DNAポリメラーゼは現在の遺伝子工学用酵素の中の大横綱といってよい。本稿では耐熱性DNAポリメラーゼの歴史と将来について述べていく。

Taqポリメラーゼから始まった

Taq DNAポリメラーゼは、耐熱性DNAポリメラーゼの中でもっとも有名であり、代表する酵素の一つである。Taqポリメラーゼはイエローストーン国立公園の温泉中に生息する *Thermus aquaticus* YT1 という好熱性真正細菌から単離された¹⁾。この論文はアメリカの Cincinnati 大学における修士研究成果として1976年に発表されている。同時期にロシアのグループからもロシア語の論文

が出ている。後にこの酵素がこれほど有名になろうとは1970年代には思いもよらなかっただろう。1985年にPCR技術が提唱され²⁾、変性ステップでも失活しないDNAポリメラーゼが必要になって以来、Taqポリメラーゼに注目が集まり、PCR酵素としての商品価値を確立した³⁾。日本で発見された高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の酵素 (Tthポリメラーゼ) もPCRに利用することができ、さらにTaqポリメラーゼと違って、この酵素には逆転写活性が強いという特徴があるので、mRNAからの逆転写とcDNAの増幅を同時に行うことができる single tube RT-PCRに利用できる酵素としてPCR時代の初期の頃から注目された。Tthポリメラーゼも三菱化成生命研で発見された時にはそれほど有用な酵素になるとは思われておらず、学会発表の要旨として記録が残っているだけであると記述されている⁴⁾。筆者は奇遇にも、大学院時代にTaqポリメラーゼを精製したChien氏(台湾、国立陽明大学)、ポスドク時代に生命研でTthポリメラーゼの研究を行った矢島氏(昭和電工)と1991-2年頃に直接お会いしている。その時はまったく別の用件であったので、今から思えばDNAポリメラーゼ研究をされていた頃の話をもっと詳しく聴きたかったと思う。

PCRが実用化された当初は、*T. aquaticus*の培養菌体からTaqポリメラーゼを精製していたが、生産効率を上げるためにシータス社の研究グループによって遺伝子がクローニングされ、大腸菌で発現させて生産した酵素⁵⁾がAmpliTaq DNA Polymeraseとして売り出された。しかし、*Thermus*属のGC含量の高い遺伝子を大腸菌で発現させると必ずしも効率はよくはなく、発表論文を見てもポリメラーゼタンパク質の生産効率はよくない⁵⁾。筆者は、我が国のPCR関連製品を独占的に取り扱う企業に研究開発職として在籍していたことにより、1989年頃から好熱性細菌に興味を持ち始めた。Taqポリメラーゼを、大腸菌を宿主として組換えタンパク質として産生させるために、アミノ酸配列を変えずに遺伝子配列を部分的に換えることによって多量産生系の構築に成功して⁶⁾、市場に乗せた。

PCR酵素の開発競争

耐熱性酵素は好熱性細菌から得られるが、好熱性細菌にもいろいろな種があり、至適増殖温度が異なると、その酵素の耐熱性も異なる。耐熱性ポリメラーゼの中でもPCRに用いることができる酵素は、より市場価値が高

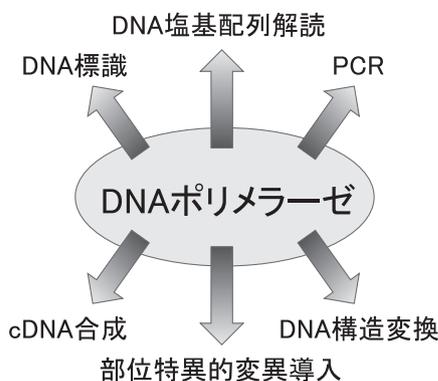


図1. DNAポリメラーゼの遺伝子工学への応用

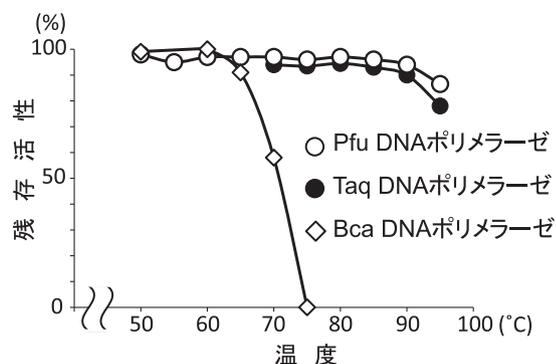


図2 好熱菌由来のDNAポリメラーゼの耐熱性. 横軸に示す温度で30分置いた後の残存活性を相対値としてプロットした. Pfu: *Pyrococcus furiosus* (超好熱菌), Taq: *T. aquaticus* (高度好熱菌), Bca: *Bacillus caldolenax* (中等度好熱菌).

い、PCRの変性ステップは90°C以上を必要とするので、PCR酵素にはこの高温で失活しない程度の耐熱性が要求される。Taqポリメラーゼや後述するPfuポリメラーゼは図2に示すようにきわめて高い熱安定性を示す。中等度好熱性の*Bacillus caldolenax*などのDNAポリメラーゼはある程度の耐熱性があり、ジデオキシ塩基配列読法には優れた性能を発揮するが⁷⁾、PCRには耐熱性が不十分である。

PCRパフォーマンスは用いる耐熱性酵素に大きく影響されるので、当然、優れたPCR酵素の開発が注目されるようになった(初期の頃は特許の関係で、AmpliQ DNA Polymeraseの独占市場であったので、公然とした開発競争は、ロシュ社が各メーカーに製造権を与え始めた後である)。筆者は、*Thermus*属以外の好熱菌から、どのようなDNAポリメラーゼが得られるのかということに強い興味を持ち、研究を進めてみた。好熱性細菌の中でも特に80°C以上を増殖至適温度とするものは超好熱菌と呼ばれる。超好熱菌はアーキア(古細菌)に属するものが多く、真正細菌とは進化系統的に明確に区別される。特に90°C以上でも生育できるものはほとんどがアーキアである。筆者らは、当時知られていた超好熱菌の中から、特に増殖温度の高い*Pyrococcus furiosus*, *Pyrodictium occultum*, *Aeropyrum pernix*などの超好熱性アーキアを選び、順次そのDNAポリメラーゼを解析した⁸⁻¹¹⁾。まずは、*P. furiosus*菌を培養し、DNAポリメラーゼ活性のあるタンパク質を精製して、N末端領域のアミノ酸配列を解読した。そのデータを基に遺伝子をクローニングした。pol遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列より、この酵素は真核生物の複製酵素と類似したものであることが分かった。アーキアが真核のPol α 様の酵素を持っていることは、それまでもいわれていたが、アーキアのDNAポリメラーゼがアミノ酸配列上、本当にPol α と同じファミリーに属することを示

すことが初めて証明された⁸⁾(筆者らが論文を書いている間に*Sulfolobus*と*Thermococcus*のpol遺伝子のクローニングの論文が出た^{12,13)}。それぞれの著者であるF. Pisani (CNR, Napoli), F. Perler (後述)とは1995年好熱菌国際学会で会って以来、今日まで親交が深い。大腸菌で産生させた組換えタンパク質としての*P. furiosus*のDNAポリメラーゼは、十分な耐熱性に加えて、正確なDNA合成を行うために必要な3'-5'エキソヌクレアーゼ活性も有しており、Taqポリメラーゼとは差別化されたPCR用酵素としての商品価値が高い。筆者らがこの酵素を商品化しようとしようとする矢先にアメリカのS社がCloned Pfu DNA Polymeraseを発売した。こうして、効率重視Taqポリメラーゼとは別に、Pfuポリメラーゼは正確性重視のPCR用酵素としての地位を確立した。また、筆者らは*P. occultum*からPol α に類似したDNAポリメラーゼ遺伝子をクローニングしようとして、二種類の遺伝子を単離した⁹⁾。真核生物は、複数のPol α 様酵素(Pol α , Pol δ , Pol ϵ)を有していることが当時すでに分かっていたので、アーキアが同様に複数のPol α 様酵素を有するという発見は筆者にとってはエキサイティングなものであった。これらの酵素はPfuポリメラーゼとの差別化ができなかったので、商品化はされなかった。その他のサーモコッカス科由来の耐熱性ポリメラーゼも他メーカーにより商品化されていたが、PCRに利用可能ではあるものの、特許の関係でPCR用酵素という代名詞は用いられなかった。それらの酵素で注目すべきは、翻訳後に切り取られるインティンを含んでいることである¹³⁾。すなわち前駆体として翻訳された後に、プロテインプライシングによってインティンが切り出され、エキステインが繋がって活性を有するDNAポリメラーゼが産生される。筆者が扱っていた*P. furiosus*の酵素にはたまたまインティンがなかったので、プロテインプライシングはまったく意識になかった。アメリカのN社で、DNAポリメラーゼの研究担当であったF. Perler主任研究員は、インティンの発見からプロテインプライシングの研究領域に移り、その反応機構について多くの業績を挙げている^{14,15)}。そのため筆者とはライバル関係がなくなって親友になり、互いに頻りに訪ね合う仲になった。N社の耐熱性アーキア由来酵素は、前述のように特許の関係でPCR酵素とうたってこなかったもので、これまでのPCR利用例がきわめて少ない。

次に登場したPCR用酵素として、今中グループ(当時阪大・工)により発見された*Thermococcus kodakarensis*(当時は*Pyrococcus kodakaraensis*と呼ばれていた)KOD1株由来のKOD DNAポリメラーゼがある¹⁶⁾。Taqポリメラーゼは、伸長性はよいが間違いが多く、またPfuポリメラーゼは正確性が高い代わりに伸長性が悪いために、短い断片の増幅にしか向かない。筆者は*T. kodakarensis*の酵素のアミノ酸配列を見た時に、高度に

バイオよもやま話

表1. DNAポリメラーゼのファミリー分けと生物における分布の違い

	A	B	C	D	E	X	Y
真正細菌	Pol I	Pol II	Pol III				Pol IV, Pol V
アーキア							
クレンアーキオタ		Pol BI PolB II PolB III			Pol E*		Dpo4, DBH (PolY1)
ユリアーキオタ		Pol BI		Pol D	Pol E*		DinB-1, DinB-2
コルアーキオタ		Pol BI PolB II		Pol D			
アイグアーキオタ		Pol BI Pol BII		Pol D			PolY
タウムアーキオタ		Pol BII		Pol D			PolY
真核生物	Pol θ Pol γ^{**}	Pol α , Pol δ Pol ϵ , Pol ζ				Pol β , Pol λ Pol μ , Pol σ	Pol η , Pol ι Pol κ

* プラスミド由来

** ミトコンドリア由来

耐熱性DNAポリメラーゼとして活性が確認されているものを太字で表している

類似している *Pfu* ポリメラーゼと性質はあまり変わらないであろうと予想した。しかし、実際にPCRに利用すると、KODポリメラーゼは至適反応条件の範囲が狭いものの、正確性を維持したまま伸長性も優れていた。結晶構造解析により立体構造も解明され、*Pfu*ポリメラーゼと比較してこの酵素がなぜ伸長性に優れているのかが推定されている¹⁷⁾。KODポリメラーゼの性能は次第に市場に広がり、現在PCR酵素としての一定の世界市場を確立している。

DNAポリメラーゼは、そのアミノ酸配列の類似性から、現時点でファミリーA, B, C, D, E, X, Yという7つのグループに分けられている(表1)。DNA鎖合成という基本的な活性はすべてに共通であるが、DNA鎖の合成様式や付随する活性などのより詳細な性質について見ると、同じファミリーの酵素は、より類似した性質を有している。真正細菌由来の *Taq* ポリメラーゼや *Tth* ポリメラーゼはファミリーAであるが、超好熱アーキア由来の酵素は、真核生物の複製酵素と共にファミリーB(前述のPol α 様酵素)に属する。塩基配列決定法には、ジデオキシヌクレオチドの基質としての認識性に依存してファミリーAがもっとも適しており、シークエンスキットとして市販されているのはすべてファミリーAの酵素である。特に真正好熱細菌由来のものがサイクルシークエンシングに使われている。一方、PCRにはファミリーA, B両方の酵素が用いられており、それぞれ伸長性重視、正確性重視の使用目的によって使い分けられている。

DNAポリメラーゼの研究者であれば誰でも一度は、ファミリーA, Bの酵素を混合してPCRを行うと、両者の優れた性質が発揮されるのではないかと期待するだろう。すなわち、ファミリーA酵素が合成し間違えて、鋳型DNAとのミスマッチが生じた際にはファミリーB酵

素に交代して、その校正機能により修復し、再度ファミリーA酵素が交代して伸長反応が続くというものである。実際に二種類の酵素を適当な比で混合して優れたPCR法が開発された¹⁸⁾。この応用により、*Taq*ポリメラーゼを用いた標準PCRと比較して、より正確且つより長鎖のDNAを増幅することができるようになった。筆者らも同様の開発を進めていたが、適した条件が見つからず断念してしまっていた。このアイデアで実験を続け、これまで増幅が不可能だった長鎖DNAの増幅を可能にしたセントルイスにあるワシントン大学のBarns教授は、この方法をLA-PCR (long and accurate PCR) と名付け¹⁸⁾、特許として権利化した。現在のPCR酵素市場は、このLA-PCR用酵素が中心で、各メーカーがそれぞれ独自に二種類の酵素の組み合わせと至適条件を整えて商品化している。PCRのユーザーは、多種類の酵素商品の性質を理解し、目的や経済性を考えて使い分けている。

超好熱性アーキアのDNAポリメラーゼ研究

筆者は、1990年代初頭より好熱菌に興味を持ち始めた。超好熱アーキアがDNAポリメラーゼを何種類持っているのかを知りたくて、*P. furiosus*の細胞抽出液を分画していったところ、ファミリーBに属する上述の*Pfu*ポリメラーゼの他にも別の酵素が存在することが分かった¹⁹⁾。そして、遺伝子をクローニングすることによって、その活性の元がそれまで知られていたどのファミリーとも異なるアミノ配列のタンパク質であることを証明した²⁰⁾。当時、アーキアとして初めて、メタン菌の一種である *Methanococcus jannaschii*の全ゲノム配列が発表され²¹⁾、その配列中、DNAポリメラーゼをコードする遺伝子は、既知のファミリーの酵素との配列上の相同性から予想して一つだけ(ファミリーB酵素)であることが

話題を呼んだ²²⁾。Nature誌もScience誌もそのことを書き立てたが、世界で唯一筆者らは、二番目のDNAポリメラーゼが存在することを*M. jannaschii*のゲノム配列上からも見つけていた。早速、遺伝子をクローニングして*M. jannaschii*の二つ目のDNAポリメラーゼを証明し²³⁾、分類上新たなファミリーDを提唱した²⁴⁾。PoIDと名付けたこの酵素はこれまでのさまざまな生物のゲノム解析の結果から、アーキア（すべてのアーキアではない）にしか存在しない独特の酵素である。これまでの研究より、おそらくこの酵素を有するアーキアの複製にとって、この酵素は必須であると考えられ、その分子進化に大きな興味を持たれる。しかし、応用を考えると、この酵素の性能はPCRに利用できるものであるが、他のPCR酵素と比較して大きな違いがないためか、商品化はされていない。

鋳型DNA鎖に損傷があると、DNAポリメラーゼは、通常その部位で相補鎖合成を止めてしまう。しかし、DNAポリメラーゼの中には損傷部位を乗り越えて合成することができるものがある。2000年頃から、そういう酵素が真核細胞、真正細菌から続々と発見され、ファミリーYが提唱された²⁵⁾。筆者は、超好熱アーキアの全ゲノム配列が解読される度に、その中のファミリーY酵素遺伝子を探索したが、初期の頃は見つからなかった。その後、ゲノム配列解析が進み、現在までに30種以上の遺伝子が見つかった²⁶⁾。しかしながら、その遺伝子産物の生化学解析が報告されている例はすくない。*Sulfolobus*由来の酵素は実際に損傷部位を乗り越える機能や、結晶構造解析による立体構造から、その機能が説明されている²⁷⁾。PoIYを有しないアーキアに損傷乗り越え修復能はあるのか筆者は大変興味を持っている。*Sulfolobus*の酵素は耐熱性PoIYとして市販されており、損傷を含んだDNAを鋳型鎖とした場合の試験管内DNA合成に利用可能であると説明されている。

DNAポリメラーゼがDNA鎖を合成する際には、プライマーを必要とするが、細胞内においては、プライマーはプライマーゼによって合成される。筆者らはアーキアで初めてプライマーゼの詳細な生化学解析を行ったが^{28,29)}、その際に、超好熱菌のプライマーゼが、他の生物のプライマーゼと異なり、鋳型DNA依存的に長鎖のDNA鎖合成を行うことを発見した。このことからこの酵素がプライマーゼであるとともに、ポリメラーゼであるとも言えることを提唱した。その後、他のアーキア由来のホモログが解析されて、アーキアのプライマーゼが細胞内において複数の機能を有する酵素であることが提唱されている。筆者らが、*P. furiosus*の細胞抽出液を分画して、DNAポリメラーゼ活性を調べた際にPoIB、PoIDとともにもう一つ存在した画分にはこの酵素が含まれており³⁰⁾、現在、筆者らはこの三種のDNAポリメラーゼが*P. furiosus*細胞の中で必要な役割を分担してい

るのではないかと考えている。このプライマーゼはPCR酵素としては特に有用ではないが、十分な耐熱性があり、プライマー非依存的な試験管内DNA鎖合成が可能なので、新たなDNA増幅技術開発への利用の可能性を秘めている。

新たな酵素開発への工夫

耐熱性DNAポリメラーゼの利用によってPCRが実用化されると、種々の改良法が考え出されるようになり、それぞれの目的に適したDNAポリメラーゼの探索やタンパク質工学による創製が行われるようになった。たとえば、初期の頃にはすでに、ホットスタートという改良PCRは開発されている³¹⁾。耐熱性ポリメラーゼの至適反応温度は70°C以上であるが、低い温度でも完全に活性がなくなるわけではない。PCRにおいて、非特異的な増幅を抑えるために開発されたホットスタート法には、低い温度ではDNAポリメラーゼが活性を示さないことが必要である。そのために、DNAポリメラーゼに対する特異的な抗体を結合させて活性を抑え、変性温度になると抗体タンパクも変性して酵素から離れるので、高温になってからDNAポリメラーゼ反応が始まるという原理である³²⁾。ホットスタートのためには、抗体法以外にも温度依存的に離れる阻害物質を結合させた化学修飾ポリメラーゼ (AmpliQ Gold) が開発された。また部位特異的な変異導入により、低温感受性*Taq*ポリメラーゼを創製したという報告もある³³⁾。

ジデオキシ法による塩基配列解析のための耐熱性酵素として、前述のようにファミリーAの*Taq*ポリメラーゼは利用可能であるが、筆者はシークエン斯拉ダーが奇麗に得られない点でキット開発には苦労した³⁴⁾。当時、Klenow酵素よりもT7ファージのポリメラーゼ (3'-5'エキソヌクレアーゼ変異体) のほうが、ジデオキシヌクレオチドを取り込む活性が強い (デオキシヌクレオチドとの見分けが弱い) ことから、バランスよくより均一にジデオキシ反応が進むため、大変奇麗なシークエン斯拉ダーが得られることが分かっていた³⁵⁾。Klenow酵素とT7ポリメラーゼを比較することによって、デオキシ、ジデオキシヌクレオチドを見分けるアミノ酸残基が特定され、Klenow酵素と相同性の高い*Taq*ポリメラーゼの中の相当する一アミノ酸を置換するだけで、バランスよくジデオキシ化反応が進む耐熱性酵素が開発されたのは見事なタンパク質工学であった³⁶⁾。現在のサイクルシーケンシングにはこの酵素が広く用いられている。

最近の代表的なPCR開発商品はPhusion DNA Polymeraseであろう。これはPfuポリメラーゼの伸長性が悪い性質を補うために、別の超好熱アーキア由来のDNA結合タンパク質Sso7dとの融合タンパク質を遺伝子工学的に作製したもので、Sso7dのDNAに対する高い親和性によって、Pfu DNAポリメラーゼがDNA鎖から滑り

落ちないようにして、連続的な合成能を向上させた³⁷⁾。このアイデアから商品化の成功までは、DNAポリメラーゼのタンパク質工学として大変エレガントな実例である。一方、筆者らはクランプ分子を利用して、*Pfu*ポリメラーゼの連続合成能を向上させることに成功し³⁸⁾、変異を導入することによって、それがPCR条件下で機能することを示した^{39,40)}。この成功例もPhusionポリメラーゼに匹敵するものである。

タンパク質の立体構造解析が進み、DNAポリメラーゼの構造が詳細に分かるにつれて、部位特異的に変異を入れて基質認識能を変化させたり、正確性をより下げるなど、目的別の変異型ポリメラーゼ開発が試みられている。

おわりに

PCRは世界中に普及し、日常的に利用されている遺伝子解析技術ではあるが、それ故に、利用者はさらに便利で使いやすく、信頼性のある酵素を求めている。すなわち、目的のDNA断片を少しでも「より早く、より長く、より正確に、より効率よく」増幅することができる酵素が望まれる。また、周辺技術の進歩により、単一分子を観察して計測する方法が発達してきており、そこには、高感度検出により適したヌクレオチド誘導体を基質にできるような、新たな性質を持ったDNAポリメラーゼの需要が生まれる。遺伝子工学の誕生以来、DNAポリメラーゼは主役を演じてきたが、PCRが実用化されて以降は耐熱性DNAポリメラーゼがほとんどの場において活躍している。筆者らは未知の環境遺伝子資源を利用することを考え、メタゲノム解析によりDNAポリメラーゼ配列データを収集してそのバリエーションを解析するとともに、それらを利用して新規酵素の創製を行っている^{41,42)}。今後の酵素開発は、新たな遺伝子増幅法、遺伝子検出法、塩基配列解析法など、目的ごとに適した性質を有するものが探索されたり、創製されていくものと思われる。耐熱性DNAポリメラーゼにとって、これからも益々活躍の場が広がるであろう。

本稿では筆者の経験に基づいて、筆者らの研究を中心に記述してきた。紙面の関係で多くの耐熱性DNAポリメラーゼ酵素に関する優れた研究を紹介しきれなかったことをお詫びしたい。

文 献

- 1) Chien, A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **127**, 1550 (1976).
- 2) Saiki, R. K. *et al.*: *Science*, **230**, 1350 (1985).
- 3) Saiki, R. K. *et al.*: *Science*, **239**, 487 (1988).
- 4) 坂口健二: 極限環境生物学会誌, **2**, 3 (2003).
- 5) Lawyer F. C. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **264**, 6427 (1989).
- 6) Ishino, Y. *et al.*: *J. Biochem.*, **116**, 1019 (1994).
- 7) Uemori, T. *et al.*: *J. Biochem.*, **113**, 401 (1993).
- 8) Uemori, T. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **21**, 259 (1993).
- 9) Uemori, T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **177**, 2164 (1995).
- 10) Cann, I. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **181**, 5984 (1999).
- 11) Komori, K. and Ishino, Y.: *Protein Eng.*, **13**, 41 (2000).
- 12) Pisani, F. M. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2711 (1992).
- 13) Perler, F. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5577 (1992).
- 14) Saleh, L. and Perler, F. B.: *Chem. Rec.*, **6**, 183 (2006).
- 15) Cheriyan, M. and Perler, F. B.: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 899 (2009).
- 16) Takagi, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504 (1997).
- 17) Hashimoto, H. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **306**, 469 (2001).
- 18) Barns, W. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2216 (1994).
- 19) Imamura, M. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1647 (1995).
- 20) Uemori, T. *et al.*: *Genes Cells*, **2**, 499 (1997).
- 21) Bult, C. J.: *Science*, **273**, 1058 (1996).
- 22) Gray, M.: *Nature*, **383**, 299 (1996).
- 23) Ishino, Y. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **180**, 2232 (1998).
- 24) Cann, I. K. O. and Ishino, Y.: *Genetics*, **152**, 1249 (1999).
- 25) Ohmori, H.: *Mol. Cell*, **8**, 7 (2001).
- 26) Lin, L.-J. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **397**, 13 (2010).
- 27) Yang, W.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 23 (2003).
- 28) Bocquier, A. A.: *Curr. Biol.*, **11**, 452 (2001).
- 29) Liu, L. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 45484 (2001).
- 30) Ishino, S. and Ishino, Y.: *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 681 (2006).
- 31) Chou, Q. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1717 (1992).
- 32) Kellogg, D. E. *et al.*: *BioTechniques*, **16**, 1134 (1994).
- 33) Kermekchiev, M. B. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6139 (2003).
- 34) 石野良純, 浅田起代蔵: 蛋白質核酸酵素, **35**, 2321 (1990).
- 35) Tabor, S. and Richardson, C. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4787 (1987).
- 36) Tabor, S. and Richardson, C. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6339 (1995).
- 37) Wang, Y., *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1197 (2004).
- 38) Cann, I. O. K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **181**, 6591 (1999).
- 39) Kawamura, A., *et al.*: *J. Jap. Soc. Extremophiles*, **11** (in press)
- 40) Ishino, S. *et al.*: *J. Jap. Soc. Extremophiles*, **11** (in press)
- 41) 石野良純ら: 環境バイオテクノロジー学会誌, **7**, 87 (2007).
- 42) Matsukawa, H. *et al.*: *Genes Genet. Syst.*, **84**, 3 (2009).