(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6934477号
(P6934477)
(45)発行日　令和3年9月15日(2021.9.15)　(24)登録日　令和3年8月25日(2021.8.25)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N	9/12	(2006.01)	C12N	9/12	ZNA
C12P	19/34	(2006.01)	C12P	19/34	A
C12Q	1/686	(2018.01)	C12Q	1/686	Z
C12N	15/54	(2006.01)	C12N	15/54	

請求項の数 19　(全 42 頁)

(21)出願番号　特願2018-538718(P2018-538718)
(86)(22)出願日　平成29年1月19日(2017.1.19)
(65)公表番号　特表2019-509717(P2019-509717A)
(43)公表日　平成31年4月11日(2019.4.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/014082
(87)国際公開番号　WO2017/127510
(87)国際公開日　平成29年7月27日(2017.7.27)
審査請求日　令和2年1月20日(2020.1.20)
(31)優先権主張番号　62/280,451
(32)優先日　平成28年1月19日(2016.1.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　518256430
ボード　オブ　リージェンツ　ザ　ユニヴァーシティ　オブ　テキサス　システム
アメリカ合衆国　テキサス州　７８７０１　オースティン　ウェスト　セブンス　ストリート　２１０
(74)代理人　100094569
弁理士　田中　伸一郎
(74)代理人　100088694
弁理士　弟子丸　健
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田　和彦
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤

最終頁に続く

(54)【発明の名称】熱安定逆転写酵素

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含み、位置Ｙ４９３に対応する位置においてロイシン残基またはシステイン残基へのアミノ酸置換を含む、RNAである鋳型を逆転写する活性を有する、組換え古細菌ファミリーＢポリメラーゼ。
【請求項２】
配列番号１に示されるアミノ酸配列の位置Ｅ６６４に対応する位置においてアミノ酸置換をさらに含む、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項３】
配列番号１に示されるアミノ酸配列の位置Ｙ３８４、Ｖ３８９、Ｉ５２１またはＧ７１１に対応する位置において１つ以上のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置換されている、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項４】
位置Ｙ４９３に対応する位置におけるロイシン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項５】
位置Ｙ３８４に対応する位置におけるフェニルアラニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、システイン残基、セリン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、またはグルタミン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項３記載のポリメラーゼ。

【請求項６】
位置Ｙ３８４に対応する位置における、ヒスチジン残基またはイソロイシン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項５記載のポリメラーゼ。
【請求項７】
位置Ｖ３８９に対応する位置における、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、トレオニン残基、チロシン残基、グルタミン残基、アスパラギン残基、またはヒスチジン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項３記載のポリメラーゼ。
【請求項８】
位置Ｖ３８９に対応する位置における、イソロイシン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項７記載のポリメラーゼ。
【請求項９】
位置Ｉ５２１に対応する位置における、ロイシンへのアミノ酸置換を含む、請求項３記載のポリメラーゼ。
【請求項１０】
位置Ｅ６６４に対応する位置における、リジン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項２記載のポリメラーゼ。
【請求項１１】
位置Ｇ７１１に対応する位置における、ロイシン残基、システイン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、グルタミン残基、リジン残基、またはメチオニン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項３記載のポリメラーゼ。
【請求項１２】
位置Ｇ７１１に対応する位置における、バリン残基へのアミノ酸置換を含む、請求項１１記載のポリメラーゼ。
【請求項１３】
位置Ｒ９７に対応する位置における別のアミノ酸残基へのアミノ酸置換を含む、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項１４】
Ａ４９０、Ｆ５８７、Ｍ１３７、Ｋ１１８、Ｔ５１４、Ｒ３８１、Ｆ３８、Ｋ４６６、Ｅ７３４、及びＮ７３５からなる群より選択される位置の１つ以上に対応する位置における別のアミノ酸残基へのアミノ酸置換を含む、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項１５】
プルーフリーディング活性を有する、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項１６】
プルーフリーディング活性を欠いている、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項１７】
少なくとも１０のヌクレオチドをＲＮＡテンプレートから逆転写する、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項１８】
好熱性活性を有する、請求項１記載のポリメラーゼ。
【請求項１９】
２’－ＯメチルＤＮＡであるテンプレートからＤＮＡを重合する、請求項１記載のポリメラーゼ。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１６年１月１９日出願の米国仮特許出願第６２／２８０，４５１号の優先権を主張し、その全内容は、本明細書中参照として援用される。
【０００２】
連邦支援の研究または開発に関する声明
本発明は、空軍科学研究局により支給された政府支援助成金第ＦＡ９５５０－１０－１

－０１６９号及び国防総省国防高等研究事業局により支給された助成金第ＨＲ００１１－１２－２－０００１号でなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【０００３】

技術分野

本開示の実施形態は、少なくとも、分子生物学、細胞生物学、生化学、研究、医薬、及び診断の分野を包含する。

【背景技術】

【０００４】

Ｔｅｍｉｎ及びＢａｌｔｉｍｏｒｅによる逆転写酵素（ＲＴ）の発見は、分子生物学の理解を一変させた（Ｔｅｍｉｎ ａｎｄ Ｍｉｚｕｔａｎｉ，１９７０；Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９７０）。この酵素は、遺伝情報がＤＮＡからＲＮＡへ、そしてタンパク質へと一方向に流れるのではなく、ＲＮＡからＤＮＡへと戻る逆方向にも流れることが可能であることを実証した。ＲＴ酵素は、最初に、レトロウイルス（例えば、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ））で発見されたが、その後、他のＲＮＡ配列要素（例えば、グループＩＩイントロン、転移因子）でも発見されてきており（Ｂｏｅｋｅ ａｎｄ Ｓｔｏｙｅ，１９９７）、宿主染色体に組み込むためのＲＮＡゲノムからＤＮＡへの変換を主に担っている。その発見以来、ＲＴは、真核生物学の理解を一新して、ゲノムＤＮＡに存在するイントロンなしで成熟ｍＲＮＡからｃＤＮＡへ変換することを可能にした。こうした基礎研究により、ＲＴは、次世代ＲＮＡ配列決定法のような技術の実現を推し進める、分子生物学の普遍的道具となっている。

【０００５】

既知のＲＴは全て、共通の祖先に由来する（Ｘｉｏｎｇ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ，１９９０）。これらの酵素は、特徴として、中温性であり、プルーフリーディングドメイン（３’－５’エキソヌクレアーゼ）を欠いており、このことは、それらがｉｎ ｖｉｔｒｏで高いエラー率を有する原因となっていると思われる（Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．，１９８８）。この結果、適正なヌクレオチドの挿入は、全面的にＷａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ水素結合及び形状により駆動される（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，２００５）。また、温度が低いほどＲＮＡは安定的な二次構造をとるため、低い重合温度が効率的な逆転写を阻害するという、周知の問題となっている（Ｋｌａｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３）。ＲＴとは対照的に、高忠実性ＤＮＡポリメラーゼが出現してバイオ技術を革新し、前例のない忠実性及び高い熱安定性を実現した。

【０００６】

単量体古細菌ファミリーＢポリメラーゼ（ｐｏｌＢ）は、その超熱安定性、処理能力、及び忠実性のため、現代分子生物学で広く採用されている。これらの酵素は、ＲＴに勝る明らかな利点を有するが、ＲＮＡテンプレートに対してはほとんどまたは全く活性を持たない。２種の共通古細菌酵素（ＫＯＤ及びＰＦＵ）（Ｔａｋａｇｉ ｅｔ ａｌ．，１９９７；Ｌｕｎｄｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，１９９１）とＭＭＬＶ ＲＴの間の比較から、野生型古細菌ｐｏｌＢ酵素は、たった５つのＲＮＡ塩基でさえ重合するのに失敗したことが明らかとなる（図１Ａ）。これらのポリメラーゼのＤＮＡ特異性は、進化的圧力により駆動されてきたように思われる。というのも、これらのポリメラーゼは、ゲノム複製ポリメラーゼであり、基質としてＲＮＡを積極的に除外する機構を含むと推定されるからである（Ｇｒｅａｇｇ ｅｔ ａｌ．，１９９９）。

【発明の概要】

【０００７】

本開示の実施形態は、プルーフリーディング活性及び逆転写酵素活性を有する単離された酵素を包含する。本開示の実施形態はまた、プルーフリーディング活性及び逆転写酵素活性を有する組換え酵素を包含する。特定の実施形態において、本酵素は、好熱性または超好熱性である。少なくともいくつかの態様において、本酵素は、野生型酵素、例えば野生型ポリメラーゼなどの誘導体である。場合によっては、本酵素は、特定のポリメラーゼ、例えば古細菌ファミリーＢポリメラーゼと比較して、変異している。特定の実施形態に

おいて、本開示の酵素は、逆転写酵素活性を欠いた酵素の変異体型であるものの、プルーフリーディング活性及び逆転写酵素活性を有する。本開示の実施形態はまた、逆転写（ｃＤＮＡ合成）及びＰＣＲ増幅を行うことができる進化型熱安定性ポリメラーゼに関する。

【０００８】

特定の実施形態において、本酵素は、別のポリメラーゼから進化したものである。進化型ポリメラーゼは、低好熱性古細菌ＤＮＡポリメラーゼに由来する場合があり、こうしたポリメラーゼは、プルーフリーディング（エラー補正）ドメインによる高忠実性ＤＮＡ合成が可能なその能力により区別される。天然古細菌ＤＮＡポリメラーゼは、テンプレートとしてＲＮＡを利用せず、このため、逆転写酵素として使用できない。ポリメラーゼの定向進化は、本明細書中の実施形態の開発の間に、効率的な逆転写酵素活性能のある変異体をもたらした。この変異体は、その超熱安定性及びその機能的プルーフリーディングドメインにより逆転写反応の忠実性の顕著な上昇がもたらされることにより、現行の逆転写酵素とは異なる。本開示の態様は、基質としてＲＮＡを使用することを特異的に遮断する構造（複数可）または領域を有するポリメラーゼに由来するが、テンプレートとしてＲＮＡを利用することができるように操作されている（例えば、設計により）酵素に関する。

【０００９】

すなわち、本開示の実施形態は、逆転写活性を示さない酵素から、逆転写活性を示す酵素を作製する方法を含む。実施形態はまた、逆転写活性を示さない酵素に由来する、逆転写活性を示す酵素を使用する方法を包含する。

【００１０】

開示されるポリメラーゼは、初めてのプルーフリーディング逆転写酵素であり、この酵素は、忠実性において、既存の逆転写酵素よりも少なくとも３倍の改善をもたらす。開示されるポリメラーゼはまた、反応の単独酵素として長距離の逆転写ＰＣＲ（５キロ塩基を超える長さの増幅）を効率的に行う。本開示の特定の実施形態は、高温（例えば、＞５０℃、＞５５℃、＞６０℃、＞６５℃、またはそれより高温）で、ＲＮＡテンプレートからｃＤＮＡを生成する酵素を提供する。すなわち、本開示の特定の酵素は、以下の特長を有する：高い熱安定性、長ＲＮＡテンプレートを含むＲＮＡテンプレートを逆転写する能力；及びプルーフリーディング。ある特定の実施形態において、本酵素は、ポリメラーゼ連鎖反応に使用することができる。実施形態によっては、本酵素は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、修飾ＤＮＡ、修飾ＲＮＡ、または他のヌクレオチド重合体をテンプレートとして利用することができる。実施形態によっては、本酵素は、以下のような修飾を含むテンプレートを利用することができる：２’－フルオロ、２’－Ｏ－メチル、２’－アミノ、２’－アジド、ａ－Ｌ－スレオフラノシル核酸（ＴＮＡ）、１，５－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）、２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン－ｂ－Ｄリボ核酸［ロック型核酸（ＬＮＡ）］、アラビノ核酸（ＡＮＡ）、または２’－フルオロ－アラビノ核酸（ＦＡＮＡ）。実施形態によっては、本明細書の酵素は、適切な核酸テンプレート（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、修飾ＤＮＡ、修飾ＲＮＡ、他のヌクレオチド重合体など）を用いて、ＤＮＡ単量体（例えば、デオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、及びデオキシチミジン三リン酸など）からＤＮＡ重合体を生成する。実施形態によっては、本明細書の酵素は、ＤＮＡテンプレートからも、別の核酸テンプレート（例えば、ＲＮＡ、修飾ＤＮＡ、修飾ＲＮＡ、他のヌクレオチド重合体など）からも、非ＤＮＡ重合体（例えば、ＲＮＡ、修飾ＤＮＡ、修飾ＲＮＡ、他のヌクレオチド重合体など）を生成することができない。さらなる態様において、実施形態の酵素は、２’－Ｏ－メチルＤＮＡテンプレートに対して活性である。

【００１１】

特定の実施形態において、酵素は、１つ以上の追加ドメイン、例えば１つ以上の重合促進ドメインを含む。追加ドメインは、ＤＮＡクランプとしての活性を有してもよいが、本開示の場合、クランプは、その酵素が使用可能なテンプレートのいずれに対しても適用される。ある特定の実施形態において、追加ドメインは、ヌクレオチド重合体と結合できる。特定の実施形態において、追加ドメインは、１つ以上の、ＤＮＡ結合タンパク質７ｄ（

Ｓｓｏ７ｄ）、増殖細胞核抗原（ＰＣＮＡ）、ヘリカーゼ、一本鎖結合タンパク質、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、及び１つ以上の親和性タグの全部あるいは一部を含む。

【００１２】

本開示の実施形態は、本開示の酵素の作製方法にも関する。特定の実施形態において、本方法は、プルーフリーディング逆転写酵素の新規ファミリーの定向進化に関する。特定の実施形態において、プライマーが重合反応を刺激して問題のポリメラーゼ（逆転写酵素活性について試験されるもの）を転写するときに、得られるポリメラーゼ（それぞれ別個の容器に区分けされている）が、逆転写活性能がある場合に限り、ＲＮＡ含有鎖をテンプレートとして利用することができるようにして、区画化逆転写自己複製を、１つ以上のＲＮＡ塩基を含むプライマーとともに利用する。逆転写活性について試験するメンバーが含まれる変異ポリメラーゼのプールは、任意の適切な変異方法により作製できる。

【００１３】

様々な用途への本開示の酵素の使用方法が、本開示に包含される。核酸の配列決定と関連した方法を行うことができる。例えば、ｍＲＮＡをｃＤＮＡに変換する方法を、ｃＤＮＡ中間体のない直接ＲＮＡ配列決定法として、本開示の酵素を用いて行うことができる。本開示の酵素は、安定的な二次構造を含むＲＮＡの逆転写を促進する方法を可能にする。ある特定の態様において、酵素は、次世代ＤＮＡ／ＲＮＡ配列決定技術に利用可能である。

【００１４】

本開示の組成物及び方法は、任意のＲＮＡ集団からｃＤＮＡへのより大規模かつ正確なコピーを提供し、したがって、そのＲＮＡ集団中の分子のより正確な記録を提供する；このことは、ｍＲＮＡ分子に依存するプロセスを促進し、そのようなプロセスとして、ｍＲＮＡテンプレートに依存するＮｅｘｔＧｅｎ配列決定（すなわち、ＲＮＡＳｅｑ）が少なくとも挙げられる。

【００１５】

本開示の実施形態は、逆転写酵素活性を有し、組換え古細菌ファミリーＢポリメラーゼに由来する酵素を含む。酵素は、プルーフリーディング活性及び／または好熱性もしくは超好熱性活性も有していてもよい。本明細書中使用される場合、転写酵素活性は、特定のテンプレートから５、１０、１５、２０、５０、７５、１００、２００超、あるいはそれより多くのヌクレオチドを重合することができる酵素を示す。すなわち、いくつかの態様において、本実施形態の酵素は、ＲＮＡまたは２’－ＯメチルＤＮＡテンプレートから５超のヌクレオチドを重合することができる。

【００１６】

本開示の実施形態は、ＲＮＡ、修飾ＤＮＡ、または修飾ＲＮＡであるテンプレートを転写することができる組換え古細菌ファミリーＢ由来ポリメラーゼに関する。修飾ＤＮＡまたは修飾ＲＮＡは、テンプレートの構成要素の糖の２’位で修飾されていてもよい。特定の場合において、修飾ＤＮＡまたは修飾ＲＮＡは、２’－フルオロ、２’－Ｏ－メチル、２’－アミノ、２’－アジド、ａ－Ｌ－スレオフラノシル核酸（ＴＮＡ）、１，５－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）、２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン－ｂ－Ｄリボ核酸［ロック型核酸（ＬＮＡ）］、アラビノ核酸（ＡＮＡ）、及び２’－フルオロ－アラビノ核酸（ＦＡＮＡ）からなる群より選択される修飾を含む。場合によっては、ポリメラーゼは、プルーフリーディング活性を有する、及び／またはポリメラーゼは、好熱性または超好熱性活性を有する。さらなる態様において、本実施形態のポリメラーゼは、プルーフリーディング（３’－５’エキソヌクレアーゼ）活性を欠いている。

【００１７】

特定の実施形態において、本明細書の範囲内に含まれるポリメラーゼは、野生型または他の天然古細菌ファミリーＢポリメラーゼと比べて、１つ以上の変異を有する。ポリメラーゼは、野生型ＫＯＤポリメラーゼと比べて、１つ以上の変異を有していてもよい。特定の実施形態において、１つ以上の変異は、ウラシル残基での停止を誘導するポリメラーゼ

の領域にあり；１つ以上の変異は、テンプレートＲＮＡの２’ヒドロキシルを認識する領域にあり；１つ以上の変異は、テンプレート鎖に直接作用する領域にあり；１つ以上の変異は、二次殻相互作用の領域にあり；１つ以上の変異は、テンプレート認識境界領域にあり；１つ以上の変異は、後続テンプレートを認識する領域にあり；１つ以上の変異は、活性部位領域にあり；及び／または１つ以上の変異は、重合後領域にある。場合によっては、変異は、ポリメラーゼがテンプレートＲＮＡの２’ヒドロキシルを認識する領域または位置にある。少なくともいくつかの場合において、少なくとも１つの変異は、１つのアミノ酸置換であり得る。

【００１８】

ある特定の実施形態において、ポリメラーゼは、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一である、アミノ酸配列を有する。ある実施態様において、ポリメラーゼは、配列番号１に対して少なくとも１つのアミノ酸置換を含む。ある実施態様において、少なくとも１つのアミノ酸置換は、配列番号１の３８４位、３８９位、６６４位、４９３位、９７位、５２１位、７１１位、または７３５位、あるいはそれらの任意の適切な組み合わせの位置に対応するアミノ酸の置換である。ある特定の態様において、本明細書中の実施形態のポリメラーゼは、表Ａに提示するアミノ酸置換の１つ以上を含む。特定の実施形態において、アミノ酸置換は、９７位のアミノ酸の置換に対応する。場合によっては、４９０位、５８７位、１３７位、１１８位、５１４位、３８１位、３８位、４６６位、７３４位、あるいはそれらの組み合わせの位置に対応するアミノ酸に置換が存在する。ある実施態様において、３８４位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ヒスチジン残基またはイソロイシン残基への置換であり得る。ある実施態様において、３８４位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、システイン残基、セリン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、またはグルタミン残基への置換であり得る。ある実施態様において、３８９位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、イソロイシン残基またはロイシン残基あり得る。ある実施態様において、３８９位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、トレオニン残基、チロシン残基、グルタミン残基、アスパラギン残基、またはヒスチジン残基への置換であり得る。ある実施態様において、６６４位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、リジン残基またはグルタミン残基への置換であり得る。さらなる態様において、本実施形態のポリメラーゼは、６６４位に対応する位置における置換を含まない。ある実施態様において、４９３位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ロイシン残基、システイン残基、またはフェニルアラニン残基への置換であり得る。ある実施態様において、４９３位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、イソロイシン残基、バリン残基、アラニン残基、ヒスチジン残基、トレオニン残基、またはセリン残基への置換であり得る。ある実施態様において、９７位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、アルギニン以外の任意のアミノ酸残基への置換であり得る。ある実施態様において、５２１位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ロイシンへの置換であり得る。ある実施態様において、５２１位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン残基、バリン残基、メチオニン残基、またはトレオニン残基への置換であり得る。ある実施態様において、７１１位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、バリン残基、セリン残基、またはアルギニン残基への置換であり得る。ある実施態様において、７１１位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ロイシン残基、システイン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、グルタミン残基、リジン残基、またはメチオニン残基への置換であり得る。ある実施態様において、７３５位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、リジン残基への置換であり得る。ある実施態様において、７３５位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、アルギニン残基、グルタミン残基、アルギニン残基、チロシン残基、またはヒスチジン残基への置換であり得る。ある実施態様において、４９０位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、トレオニン残基への置換であり得る。ある実施態様において、４９０位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、バリン残基、セリン残基

、またはシステイン残基への置換であり得る。ある実施態様において、５８７位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ロイシン残基またはイソロイシン残基への置換であり得る。ある実施態様において、５８７位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、アラニン残基、トレオニン残基、またはバリン残基への置換であり得る。ある実施態様において、１３７位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ロイシン残基またはイソロイシン残基への置換であり得る。ある実施態様において、１３７位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、アラニン残基、トレオニン残基、またはバリン残基への置換であり得る。ある実施態様において、１１８位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、イソロイシン残基への置換であり得る。ある実施態様において、１１８位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、メチオニン残基、バリン残基、またはロイシン残基への置換であり得る。ある実施態様において、５１４位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、イソロイシン残基への置換であり得る。ある実施態様において、５１４位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、バリン残基、ロイシン残基、またはメチオニン残基への置換であり得る。ある実施態様において、３８１位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ヒスチジン残基への置換であり得る。ある実施態様において、３８１位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、セリン残基、グルタミン残基、またはリジン残基への置換であり得る。ある実施態様において、３８位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、ロイシン残基またはイソロイシン残基への置換であり得る。ある実施態様において、３８位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、バリン残基、メチオニン残基、またはセリン残基への置換であり得る。ある実施態様において、４６６位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、アルギニン残基への置換であり得る。ある実施態様において、４６６位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン残基への置換であり得る。ある実施態様において、７３４位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、リジン残基への置換であり得る。ある実施態様において、７３４位に対応する位置におけるアミノ酸置換は、アルギニン残基、グルタミン残基、またはアスパラギン残基への置換であり得る。

【００１９】

ある特定の場合において、ポリメラーゼは、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有し、このポリメラーゼは、配列番号１の以下の１つ以上の位置に対応する位置にアミノ酸置換を有する：Ｒ９７；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｙ４９３；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；及びＷ７６８。ある特定の実施形態において、ポリメラーゼは、配列番号１におけるＲ９７Ｍ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｙ４９３Ｌ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；及びＷ７６８Ｒの１つ以上に対応するアミノ酸置換を有する。

【００２０】

特定の実施形態において、ポリメラーゼは、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有し、このポリメラーゼは、配列番号１の以下の１つ以上に対応する位置にアミノ酸置換を有する：Ｆ３８；Ｒ９７；Ｋ１１８；Ｒ３８１；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｙ４９３；Ｔ５１４；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；及びＷ７６８。ある実施態様において、ポリメラーゼは、配列番号１のＦ３８Ｌ；Ｒ９７Ｍ；Ｋ１１８Ｉ；Ｒ３８１Ｈ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｙ４９３Ｌ；Ｔ５１４Ｉ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；及びＷ７６８Ｒの１つ以上に対応するアミノ酸置換を有する。

【００２１】

特定の態様において、ポリメラーゼは、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有し、このポリメラーゼは、配列番号１の以下の１つ以上の位置に対応する位置にアミノ酸置換を有する：Ｆ３８；Ｒ９７；Ｋ１１８；Ｍ１３７；Ｒ３８１；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｋ４６６；Ｙ４９３；Ｔ５１４；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；及びＷ７６８。ポリメラーゼは、配列番号１におけるＦ３８Ｌ；Ｒ９７Ｍ；Ｋ１１８Ｉ；Ｒ３

８１Ｈ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｙ４９３Ｌ；Ｔ５１４Ｉ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；及びＷ７６８Ｒの１つ以上に対応するアミノ酸置換を有してもよい。

【００２２】

ある特定の実施形態において、ポリメラーゼは、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有し、このポリメラーゼは、配列番号１における以下の１つ以上に対応する位置にアミノ酸置換を有する：Ｆ３８；Ｒ９７；Ｋ１１８；Ｍ１３７；Ｒ３８１；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｋ４６６；Ｙ４９３；Ｔ５１４；Ｉ５２１；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；Ｎ７３５；及びＷ７６８。ポリメラーゼは、配列番号１におけるＦ３８Ｌ；Ｒ９７Ｍ；Ｋ１１８Ｉ；Ｍ１３７Ｌ；Ｒ３８１Ｈ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｋ４６６Ｒ；Ｙ４９３Ｌ；Ｔ５１４Ｉ；Ｉ５２１Ｌ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；Ｎ７３５Ｋ；及びＷ７６８Ｒの１つ以上に対応するアミノ酸置換を有してもよい。

【００２３】

さらなる態様において、本実施形態のポリメラーゼは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている。エキソヌクレアーゼドメインの改変による破壊を介したエキソヌクレアーゼ活性の不活化方法は、当該分野で周知である（例えば、Ｎｉｓｈｉｏｋａ　ｅｔａｌ．，　２００１を参照、本明細書に参照として援用される）。例えば、いくつかの態様において、本実施形態のポリメラーゼは、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有し、かつ３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を排除する、Ｎ２１０に対応するアミノ酸の置換（例えば、Ｎ２１０Ｄ）を有している。さらなる態様において、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有し、かつ３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を排除する、Ｄ１４１及びＥ１４３に対応するアミノ酸の置換（例えば、Ｄ１４１Ａ及びＥ１４３Ａ）を有する。好適な態様において、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている本実施形態のポリメラーゼは、さらに、表Ａのアミノ酸置換のうち１つ以上を有する。３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を破壊する他のアミノ酸置換も、本発明の範囲内に含まれる。

【００２４】

本明細書で提供されるのは、ＲＮＡであるテンプレートを転写する古細菌ファミリーＢポリメラーゼであって、野生型古細菌ファミリーＢポリメラーゼと比べて１つ以上の遺伝子操作された変異を有し、このポリメラーゼは、配列番号１と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有し、配列中、配列番号１に示すアミノ酸配列の位置Ｙ４９３、Ｙ３８４、Ｖ３８９、Ｉ５２１、Ｅ６６４、及びＧ７１１からなる群より選択される位置またはこれらの位置のいずれかに対応する位置の１つ以上のアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基で置き換えられている。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｙ４９３に対応する位置にロイシン残基またはシステイン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｙ４９３に対応する位置にロイシン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｙ３８４に対応する位置に、フェニルアラニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、システイン残基、セリン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、またはグルタミン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｙ３８４に対応する位置に、ヒスチジン残基またはイソロイシン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｖ３８９に対応する位置に、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、トレオニン残基、チロシン残基、グルタミン残基、アスパラギン残基、またはヒスチジン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｖ３８９に対応する位置に、イソロイシン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｉ５２１に対応する位置に、ロイシンへのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｅ６６４に対応する位置に、リジン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｇ７１

１に対応する位置に、ロイシン残基、システイン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、グルタミン残基、リジン残基、またはメチオニン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、Ｇ７１１に対応する位置に、バリン残基へのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、配列番号１に示すアミノ酸配列のＲ９７位に、別のアミノ酸残基とのアミノ酸置換を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、配列番号１に示すアミノ酸配列の位置Ａ４９０、Ｆ５８７、Ｍ１３７、Ｋ１１８、Ｔ５１４、Ｒ３８１、Ｆ３８、Ｋ４６６、Ｅ７３４、及びＮ７３５からなる群より選択される位置、またはこれらの位置のいずれかに対応する位置に、別のアミノ酸残基で置換された１つ以上のアミノ酸残基を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、プルーフリーディング活性を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、プルーフリーディング活性を欠いている。場合によっては、ポリメラーゼは、好熱性活性を有する。場合によっては、ポリメラーゼは、少なくとも１０ヌクレオチドをＲＮＡテンプレートから転写することができる。場合によっては、ポリメラーゼは、２’－ＯメチルＤＮＡであるテンプレートを転写することができる。場合によっては、ポリメラーゼは、少なくとも５または少なくとも１０ヌクレオチドを２’－ＯメチルＤＮＡテンプレートから転写することができる。

【００２５】

いくつかの態様において、本明細書に記載される実施形態のいずれかに従うポリメラーゼをコードする核酸分子が、提供される。同様に、本実施形態のポリメラーゼの使用方法が提供され、本方法は、適切な条件下、ポリメラーゼを核酸テンプレートと接触させ、重合分子を生成する工程を含む。場合によっては、核酸テンプレートは、ＲＮＡ、ＤＮＡ、または２’－ＯメチルＤＮＡである。

【００２６】

ある特定の場合において、ポリメラーゼは、さらに、追加ドメイン、例えば、それ自身は重合に関与しないが、重合促進活性を有するものなどを含む。特定の実施形態において、追加ドメインは、ＤＮＡ結合タンパク質７ｄ（Ｓｓｏ７ｄ）、増殖細胞核抗原（ＰＣＮＡ）、ヘリカーゼ、一本鎖結合タンパク質、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、１種または複数の親和性タグ、標識、及びそれらの組み合わせの一部または全部を含む。

【００２７】

１つの実施形態において、本明細書で提供されるのは、本実施形態に従うポリメラーゼの使用方法であり、本方法は、適切な条件下、ポリメラーゼを核酸テンプレートと接触させて、重合分子を生成する工程を含む。テンプレートは、ＲＮＡもしくはＤＮＡまたは修飾ＲＮＡもしくは修飾ＤＮＡでもよい。特定の実施形態において、本方法は、ｃＤＮＡ分子の生成を欠いている。特定の実施形態において、本方法は、テンプレートの少なくとも一部分に関する配列情報を提供する。ある特定の場合において、重合分子は、配列決定される。核酸テンプレートは、例えば、ゲノムまたはトランスクリプトームなどの核酸分子の集団の一部であってもよい。さらなる態様において、本実施形態の方法は、本明細書に記載されるポリメラーゼをＲＮＡテンプレートと接触させてｃＤＮＡを生成させることを含む。さらなる態様において、本方法はさらに、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を行うために、ｃＤＮＡ分子の少なくとも一部分で増幅させることを含む。ある特定の態様において、本実施形態のポリメラーゼは、ｃＤＮＡの生成及びｃＤＮＡの増幅の両方に使用される。ある特定の態様において、本明細書中の方法は、２つ以上の異なるＲＮＡ分子から（例えば、１つの細胞から）ｃＤＮＡを生成させるのに使用される。例えば、本方法は、抗体のＶＨ及びＶＬ配列またはＴ細胞受容体鎖（ＴＣＲ）のｃＤＮＡを生成させる、及び任意選択で増幅されたＤＮＡコピーを生成させるのに使用することができる。ある特定の態様において、本方法は、対になった抗体ＶＨ及びＶＬコード配列または対になったＴＣＲコード配列を生成させるのに使用される。

【００２８】

１つの実施形態において、逆転写酵素活性を持つ酵素を選択する方法が存在し、この方法は、以下の工程を含む：ａ）ポリメラーゼをコードする領域を含む核酸の集団を用意す

る工程であって、前記ポリメラーゼは、逆転写酵素活性を有しても有していなくてもよく、前記ポリメラーゼをコードする領域は、核酸においてプライマーが結合する領域にフランキングされており、前記プライマーは、１つ以上のＲＮＡヌクレオチド塩基を含み；ｂ）集団の核酸メンバー及び核酸メンバーによりコードされるポリメラーゼを各容器が含むように、核酸のプールを複数の容器にさらに分割する工程；ｃ）核酸メンバー及びポリメラーゼを適切な条件に供してプライマーからの重合を可能にし、ＲＮＡ塩基含有テンプレートの生成を起こさせる工程；及びｄ）テンプレートとしてＲＮＡ塩基含有テンプレートを用いて、核酸分子の重合をアッセイする工程であって、重合が生じていた場合、前記ポリメラーゼは逆転写酵素活性を有する。場合によっては、本方法は、さらに、ポリメラーゼを用いてＲＮＡ塩基含有テンプレートを増幅する、及び／またはポリメラーゼを用いてＲＮＡ塩基含有テンプレートから重合した分子を増幅する工程を含む。ある実施態様において、本方法は、さらに、ポリメラーゼをコードする領域を含む核酸の集団を作製する工程を含む。集団は、ポリメラーゼをコードする核酸に１つ以上の変異を導入することにより作製されてもよい。特定の実施形態において、１つ以上の変異は、核酸に無作為に導入される。１つ以上の変異は、ポリメラーゼ連鎖反応により導入することができる。１つ以上の変異は、定方向様式で、核酸に導入することができる。特定の実施形態において、１つ以上の変異が導入される核酸は、逆転写酵素活性を欠いている古細菌ファミリーＢポリメラーゼをコードするものに相当し、例えば、古細菌ファミリーＢポリメラーゼは、ＫＯＤポリメラーゼである。特定の実施形態において、プライマーは、１つより多いＲＮＡヌクレオチド塩基を含み、プライマーは、全てＲＮＡヌクレオチド塩基で構成されるていてもよい。特定の実施形態において、ポリメラーゼは、逆転写酵素活性を有し、配列決定の対象である。

【００２９】

別の実施形態において、本開示のポリメラーゼを含むキットが提供される。特定の場合において、キットは、以下の１つ以上を含む：ベクター（複数可）、ヌクレオチド、緩衝剤、塩、及び説明書。

【００３０】

本明細書で使用される場合、指定された成分に関して「本質的に含まない」は、本明細書中、指定された成分がまったく、組成物に意図的に配合されなかった及び／または不純物としてまたは微量でしか存在しないことを意味するのに使用される。したがって、組成物のあらゆる意図しない汚染から生じる指定された成分の合計量は、０．０５％よりも十分に低い。最も好適であるのは、標準的な分析方法を用いて、指定された成分量がまったく検出不可能である組成物である。

【００３１】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「ａ」または「ａｎ」は、１つ以上を意味することができる。本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ（含む）」という語とともに使用される場合、「ａ」または「ａｎ」という語は、１つまたは１つより多い、を意味することができる。本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「別の」または「さらなる」は、少なくとも第二のまたはそれ以降を意味することができる。

【００３２】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「約」という用語は、ある値が、その値を求めるために使用される装置、方法に関する固有の誤差変動、あるいは検査対象内に存在する変動を含むことを示すのに使用される。

【００３３】

本発明の他の目的、特長、及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになるだろう。しかしながら、当然ながら、詳細な説明及び具体的な実施例は、本発明のある特定の実施形態を示すものの、例示としてのみ提供されるのである。なぜなら、本発明の趣旨及び範囲内での様々な変更及び修飾が、この詳細な説明から当業者に明らかとなるからである。

【図面の簡単な説明】

【００３４】
【図１Ａ】古細菌ファミリーＢポリメラーゼにおける逆転写酵素機能の定向進化を示す。プライマー伸長法により、古細菌ｐｏｌＢがテンプレート鎖のＲＮＡに感受性があり、複数のＲＮＡリピートで重合を停止することが明らかになる。
【図１Ｂ】区画化逆転写自己複製（ＲＴＣＳＲ）を用いた超熱安定性逆転写酵素の定向進化の骨組み。ポリメラーゼ変異体のライブラリーを作製し、Ｅ．ｃｏｌｉで発現させ、エマルジョンＰＣＲに供する。ポリメラーゼに隣接するプライマーは、プラスミドアニーリング部分を回収タグと分離する可変個数のＲＮＡ塩基を用いて設計されており、進化の過程にわたりストリンジェンシーを調整することを可能にする。リカバリーＰＣＲは、逆転写酵素活性を持つポリメラーゼを特異的に増幅する。
【図１Ｃ－１】ＲＴＣＳＲプロセスにわたるディープシークエンスにより明らかになった保存された残基の構造色分け図。変異した残基は、保存度が高いほど段階的に濃い色で着色される。集団の５０％超で変異していたアミノ酸残基は、標識がつけられた。図は、ＫＯＤ構造ＰＤＢ　４Ｋ８Ｚから編集した。
【図１Ｃ－２】ＲＴＣＳＲプロセスにわたるディープシークエンスにより明らかになった保存された残基の構造色分け図。変異した残基は、保存度が高いほど段階的に濃い色で着色される。集団の５０％超で変異していたアミノ酸残基は、標識がつけられた。図は、ＫＯＤ構造ＰＤＢ　４Ｋ８Ｚから編集した。
【図１Ｃ－３】ＲＴＣＳＲプロセスにわたるディープシークエンスにより明らかになった保存された残基の構造色分け図。変異した残基は、保存度が高いほど段階的に濃い色で着色される。集団の５０％超で変異していたアミノ酸残基は、標識がつけられた。図は、ＫＯＤ構造ＰＤＢ　４Ｋ８Ｚから編集した。
【図２Ａ】改変逆転写酵素が、活性プルーフリーディングドメインを含有することを示す。ＤＮＡ基質及びＲＮＡ基質両方での、ＫＯＤ及びＣＯＲＥ３ポリメラーゼならびにそれらのプルーフリーディング欠損型ポリメラーゼの単回サイクルのプライマー伸長反応。伸長反応は、マッチする３’プライマー：テンプレート（紫色）または３’ジデオキシミスマッチ（橙色）の両方で行い、ミスマッチは、プルーフリーディングにより切除されない限り、伸長の進行が可能とならない。プライマーを灰色矢印、伸長産物を緑色矢印、エキソヌクレアーゼ消化されたプライマーを赤色矢印で示す。
【図２Ｂ】ＳＳＣＳ技法を用いた、ＨＳＰＣＢ遺伝子での逆転写反応のディープシークエンス。エラー率は、塩基置換とインデル形成の合計を、配列決定した塩基の総数で除算することにより求めた。逆転写のエラープロファイルを、全ての可能な変異に対するパーセンテージで示す。
【図３】様々な遺伝子及びＲＮＡ試料対する単独酵素ＲＴＰＣＲを示す。逆転写ＰＣＲ（ＲＴＰＣＲ）を、ＫＯＤポリメラーゼ、ＣＯＲＥ３、及びＣＯＲＥ３のプルーフリーディング欠損型（ｅｘｏ－）を用いて行った。様々な遺伝子、すなわち２つのヒト遺伝子、ＰｏｌＲ２Ａ及びｐ５３２、ならびにＥ．ｃｏｌｉ由来のｒｐｏＣを増幅させた。遺伝子特異的フォワードプライマー及びリバースプライマーを用いて、様々な大きさのアンプリコンを、これらの遺伝子から増幅して、単独酵素ＲＴＰＣＲの効率を実証した。
【図４】５つの残基（Ｒ９７、Ｙ３８４、Ｖ３８９、Ｅ６６４、及びＧ７１１）が、ＮＮＳ突然変異誘発により完全に無作為化されたことを示す。ＲＴＣＳＲを３回のラウンドで行い、クローンを配列決定した。配列決定から変異を計数して、構造に標識を付けた。最初の選別で見つかった残基は緑色で標識してある。図は、ＰＤＢ　４Ｋ８Ｚから編集した。
【図５－１】５Ａ、Ｂ１１ポリメラーゼの変異（黄色）を、ＫＯＤポリメラーゼ（ＤＮＡを灰色に、プライマー：テンプレート二本鎖は青色）にマッピングした。合計で３７の変異があり、多くはエキソヌクレアーゼで見つかった。５Ｂ、Ｂ１１ポリメラーゼの活性部位の試験は、１４３位グルタミン酸からグリシンへの変異を示す（配列番号４及び５）。５Ｃ、機能アッセイは、Ｂ１１ポリメラーゼが、ＨＳＰＣＢ遺伝子の５００塩基対領域の単独酵素ＲＴＰＣＲを行うことができ、移植された野生型プルーフリーディングドメイン

を持つＢ１１でもできることを明らかにする。プルーフリーディング活性は、重合を起こすのに３’デオキシミスマッチプライマーの除去が必要な、ジデオキシミスマッチＰＣＲで定量的に測定した。
【図５－２】５Ａ、Ｂ１１ポリメラーゼの変異（黄色）を、ＫＯＤポリメラーゼ（ＤＮＡを灰色に、プライマー：テンプレート二本鎖は青色）にマッピングした。合計で３７の変異があり、多くはエキソヌクレアーゼで見つかった。５Ｂ、Ｂ１１ポリメラーゼの活性部位の試験は、１４３位グルタミン酸からグリシンへの変異を示す（配列番号４及び５）。５Ｃ、機能アッセイは、Ｂ１１ポリメラーゼが、ＨＳＰＣＢ遺伝子の５００塩基対領域の単独酵素ＲＴＰＣＲを行うことができ、移植された野生型プルーフリーディングドメインを持つＢ１１でもできることを明らかにする。プルーフリーディング活性は、重合を起こすのに３’デオキシミスマッチプライマーの除去が必要な、ジデオキシミスマッチＰＣＲで定量的に測定した。
【図６】Ｂ１１骨格及びディープシークエンス情報に基づいて設計されたポリメラーゼを構築し、ＲＴＰＣＲアッセイ（ＨＳＰＣＢ）及びプルーフリーディングアッセイで試験した。野生型ＫＯＤポリメラーゼに導入された変異を、設計された逆転写酵素のそれぞれについて示す。
【図７】ＤＮＡ重合を評価するため、２．５キロ塩基の断片に非修飾プライマーを用いてＰＣＲを行った。３’デオキシミスマッチプライマーをＰＣＲに添加することにより、プルーフリーディング（３’－５’エキソヌクレアーゼ活性）を試験した。ミスマッチを除去することができるポリメラーゼのみが、プライマーを伸長させ、ＰＣＲを行うことができる。
【図８】逆転写用ＳＳＣＳ方法は、上記に概要が記載される。工程１では、全ｍＲＮＡを単離する。工程２、バーコード化遺伝子特異的プライマーを用いて第一鎖合成を行い、ｃＤＮＡを単離する。工程３、ｃＤＮＡを増幅するプライマーを用いてｃＤＮＡを増幅させつつ、バーコードは保存する。工程４、同一の初期ｃＤＮＡの複数リードを可能にするＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）ＭＩＳＥＱ（登録商標）２×２５０シークエンサーでペアードエンドリードを行う。工程５、同一バーコードを、ビニングし、共通配列の作製に使用する。３回以上読まれたバーコードのみを配列比較に用い、シークエンサー変異を＞９９％減少させた。
【図９】ポリメラーゼ変異体の定常状態における動態。ＤＮＡまたはＲＮＡテンプレートを用い、エキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼによる単独のヌクレオチド（ｄＣＴＰ）組み込みの初速度を、ｄＣＴＰの濃度に対してプロットした。データをミカエリス・メンテンの式に当てはめることにより動態パラメーターを推定した。ＫＯＤは、ｄＣＴＰをＤＮＡ：ＲＮＡ二本鎖に組込むことができたが、データを当てはめることができなかった。
【図１０】１０Ａ、各逆転写酵素に関する、神経膠芽腫細胞由来の様々な細胞内ＲＮＡに対する相対適用範囲。１０Ｂ、ＭＭＬＶ、ＣＯＲＥ３、及びＣＯＲＥ３（ｅｘｏ－）に関して、上位５００までの最も多く発現したＲＮＡの相対発現のクラスター解析図。
【図１１】プライマー伸長反応を、転写終結ヌクレオチド（ｄｄＧＴＰ、ｄｄＡＴＰ、ｄｄＴＴＰ、ｄｄＣＴＰ）を２５：１の比（ｄｄＸＴＰ：ｄＸＴＰ）で持つ５’ＦＡＭ標識化オリゴヌクレオチドを用いて行った。反応を、ＣＯＲＥ３ｅｘｏ－を用いて行って、伸長が終結した生成物のエキソヌクレアーゼ切断を防いだ。プライマー：テンプレートＲＮＡ複合体を、標識化プライマーの３’ヒドロキシル基とともに表示する（配列番号６及び７）。転写終結領域（配列決定された塩基）を赤で示す。
【図１２】逆転写酵素の定向進化の例を模式的に示す。
【図１３】表は、従来の逆転写酵素（「Ｑｕａｎｔａ」）に対してＣＯＲＥ３酵素（「ＲＴＸ」）を用いた場合の対になったＶＨ：ＶＬコード配列増幅の結果を示す。
【図１４】ＲＮＡテンプレートを用いて、プライマー伸長活性を提供する能力について個別のアミノ酸置換を試験した。エキソヌクレアーゼ活性を欠いた（Ｄ１４１Ａ及びＥ１４３Ａ置換の導入により）基礎ＫＯＤ酵素を、ＲＮＡをテンプレートとするプライマー伸長活性の個別の置換の効果を試験するための陰性対照及びバックグラウンドとして用いた。

ＣＯＲＥ３酵素（「ＲＴＸ」）を、陽性対照として示す。試験結果は、試験した置換のそれぞれが、陰性対照と比較した場合に、ＲＮＡテンプレートでのプライマー伸長（ＲＴ）活性の向上を示したことを示す。Ｙ４９３Ｌ置換は、単独の置換で最も堅固な活性を示す。

【図１５】ＫＯＤ、ＫＯＤ　ｅｘｏ－、ＣＯＲＥ３（「ＲＴＸ」）、及びＣＯＲＥ３　ｅｘｏ－（「ＲＴＸ　ｅｘｏ－」）を用いた、ＤＮＡ及び２’Ｏ－メチルＤＮＡテンプレートに対するプライマー伸長反応。ＫＯＤポリメラーゼは、２’Ｏ－メチルＤＮＡテンプレートでプライマー伸長を行うことができなかった。ＲＴＸ酵素は、２’Ｏ－メチルテンプレートを横断して重合を行うことができたが、全長伸長生成物は、プルーフリーディング欠損ＲＴＸを用いた場合にのみ得られた。

【発明を実施するための形態】

【００３５】

Ｉ．本開示の酵素

逆転写酵素が分子生物学で果たす重要な役割にもかかわらず、既知の逆転写酵素には固有の制約が存在する－それらは、プルーフリーディングドメインが欠けているためにエラーを起こしやすいのである。本開示は、プルーフリーディング逆転写酵素に関し、それらのうち少なくともあるものは、好熱性または超好熱性である。特定の実施形態において、本開示は、高忠実性超好熱性古細菌ファミリーＢポリメラーゼ由来の逆転写酵素の新規ファミリーの定向進化に関する。本明細書中記載される進化過程にわたり、本ポリメラーゼのテンプレート境界面は、劇的に改変されて、効率的なＲＮＡ指向性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する酵素の発生を可能にした。改変ポリメラーゼの実施形態は、長いＲＮＡ（例えば、＞５ｋｂ）の、高温（例えば、６８℃）での、単独酵素逆転写ＰＣＲを可能にする。ある実施態様において、本ポリメラーゼは、活性プルーフリーディングドメインを保持し、最も高いｉｎ　ｖｉｔｒｏ忠実性を記録することに成功する。動態解析は、ＤＮＡテンプレート及びＲＮＡテンプレートの両方でほぼ等しい重合効率を実証し、親ポリメラーゼと比較して特異性において大幅な変化を示した。本ポリメラーゼはまた、現在のＲＮＡ－Ｓｅｑプラットフォームに容易に導入されること、ならびにｃＤＮＡ中間体なしで直接ＲＮＡ配列決定を可能にすることも示した。本ポリメラーゼのこの新規ファミリーの独自の性質は、トランスクリプトミクスのより深くかつより正確な理解を可能にし、将来のバイオテクノロジー革新を推進する。

【００３６】

ある実施態様において、本開示の例示の酵素は、部分的またはその全体いずれかでＲＮＡ塩基を含むテンプレートから、ＤＮＡを生成させる能力を有する。特定の実施形態において、酵素は、組換え酵素である。ある実施態様において、酵素は、それらが由来する（変異により）親酵素にそのような能力が欠けていた場合でも、ＲＮＡをテンプレートとして使用する能力を有する。特定の場合において、逆転写酵素活性を獲得した酵素は、例えば、チミンの代わりにウラシルを有し、リボース環の２’位に変異性を有するテンプレートを認識できることなどにより、テンプレート鎖の代替塩基または糖を認識することができる（テンプレートとしてＤＮＡしか認識できない酵素と比較して）。

【００３７】

特定の実施形態において、本開示の酵素は、ＲＮＡ構造を溶解させてｃＤＮＡコピーを生成することをより容易にする。中程度の熱安定性を持つ逆転写酵素は他に市販品があるものの、本開示の酵素は、それより非常に高い熱安定性（例えば、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃、６１℃、６２℃、６３℃、６４℃、６５℃、６６℃、６７℃、６８℃、６９℃、７０℃超、またはそれより高温での熱安定性）を有し、かつプルーフリーディング活性を有する。特定の実施形態において、本開示の酵素は、加工性がより高く及び／またはプライマー依存性がより高く、その結果、例えば、ｍＲＮＡ集団の正確なｃＤＮＡインプリントの生成における乱交雑が少なくなる。プルーフリーディングドメインがあることで、本開示の酵素は、他の酵素よりも変異を生じさせることが少なく、所定の集団（例えば、１つ以上の個体、環境な

どから得られる試料などが挙げられる）に存在するＲＮＡのより正確な表示をもたらす。
【００３８】
本開示の少なくとも複数の酵素が、プルーフリーディング活性を包含する。プルーフリーディング活性は、本明細書で、酵素の持つ、不正確な塩基対を認識し、その方向を反転させ、ミスマッチ塩基を切断し、続いて正しい塩基を挿入する能力と定義することができる。本開示の酵素は、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有すると示すことができる。特定の酵素をプルーフリーディング活性について試験することは、様々な方法で達成可能であるものの、特定の実施形態において、酵素は、３’末端デオキシミスマッチを用いた重合またはプライマー伸長反応が起こるために先に３’デオキシミスマッチプライマーが除去されなければならないジデオキシミスマッチＰＣＲにより、試験される。
【００３９】
本開示のある特定の酵素は、逆転写酵素として特徴付けられるものの、特定の態様において、酵素は、テンプレートとして、ＤＮＡ、ＲＮＡ、修飾ＤＮＡ、及び／または修飾ＲＮＡを利用することができる。修飾ＤＮＡ及び修飾ＲＮＡは、骨格、糖、または塩基に改変化学修飾を有する、酵素で複製可能な情報ヌクレオチド含有重合体と示すことができる。特定の場合において、修飾ＤＮＡまたは修飾ＲＮＡは、テンプレートの構成要素の糖の２’位で修飾される。特定の実施形態は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、修飾ＤＮＡ、または修飾ＲＮＡであるテンプレートを転写する組換え古細菌ファミリーＢポリメラーゼを包含する。
【００４０】
本開示の酵素は、逆転写酵素活性を欠いた出発ポリメラーゼを用いて作製することができ、特定の実施形態において、出発ポリメラーゼは、ＫＯＤポリメラーゼなどの古細菌ファミリーＢポリメラーゼである。任意の数の変異を出発ポリメラーゼから生じさせることができ、本開示の方法を用いて試験することができる。特定の実施形態において、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０、あるいはそれより多くの変異が、それら変異全体（またはそれらの部分的組み合わせ）が、逆転写酵素活性を本来欠いているポリメラーゼへの逆転写酵素活性の付与に関与しているように、逆転写酵素活性を欠いたポリメラーゼに組込まれる。変異はどのような種類のものでも可能であり、そのような変異として、アミノ酸置換（複数可）、欠失（複数可）、挿入（複数可）、逆位（複数可）などが挙げられる。特定の実施形態において、変異は、単独のアミノ酸変更であり、変更は保存的であってもなくてもよい。場合によっては、アミノ酸置換変異は、ある特定のアミノ酸に対するものでなければならないが、他の場合では、変異は任意のアミノ酸に対するものが可能である。本明細書の範囲内に含まれる実施形態は、種々の酵素を作製／設計する手段により制限されない。酵素によっては、出発ポリメラーゼに対する変異を介して設計されるものの、本明細書中の実施形態は、どのような特定の作用機序にも制限されず、作用機序の理解は、そのような実施形態を実施するのに必須ではない。
【００４１】
ある特定の実施形態において、本開示の酵素は、所定の酵素、例えば、ＫＯＤポリメラーゼなどの野生型古細菌ファミリーＢポリメラーゼ（例えば、配列番号１を含む）などと比較して、特定のアミノ酸配列同一性を有する。特定の実施形態において、酵素は、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一であるアミノ酸配列を有する。本開示の酵素は、ある特定の長さのものが可能であり、そのような長さとして、例えば、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７５５、７６０、７６５、７７０、７７５、７８０、７８１、７８２、７８３、または７８４アミノ酸長が少なくともあるかまたはそれ以下が挙げられる。酵素は、標識化されていてもいなくてもよい。酵素は、さらに修飾することができ、例えば、新たな官能基、例えば、ホスフェート基、アセテート基、アミド基、またはメチル基などを含む。酵素は、リン酸化、グリ

コシル化、脂質付加、カルボニル化、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、ファルネシル化、アルキル化、ヒドロキシル化、カルボキシル化、ユビキチン化、脱アミド化、遺伝暗号の改変による非天然アミノ酸の含有、改変合成酵素／ｔＲＮＡ対により組込まれた非天然アミノ酸の含有などが行われていてもよい。当業者には当然ながら、酵素の翻訳後修飾は、１つ以上の様々な技法により検出することができ、そのような技法として、例えば、少なくとも、質量分析法、イースタンブロット法、ウエスタンブロット法、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【００４２】

本開示の酵素の具体例として、少なくとも以下が挙げられる：

【００４３】

Ｂ１１逆転写酵素（超好熱性逆転写酵素である、ＫＯＤポリメラーゼ誘導体の例）：

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYLYALLKDDSAIEEVKKITAERHSTVVTVKRVEKVQKKFLGRSV
EVWKLYFTHPQDVPAIMDKIREHPAVIDIYEYDIPFAIRYLIDKGLVPMEGDEELKLLALDIGTPCHEGEVFAEGPILMI
SYADEEGTRVITWRNVDLPYVDVLSTEREMIQRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEKLGINFTLGREGSEPK
IQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTVNLPIYTLEAVYEAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVTY
ELGKEFMPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEKELARRHQSHEGGYIKEPERGLWENI
VYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGHRFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKRMKATIDPIERKLLD
YRQRAIKILANSLYGYYGYARARWYCKECAESVIAWGREYITMTIKEIEEKYGFKLIYSDTDGFFATIPGAEAETVKKKA
MEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGLFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKAV
RIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHKQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIVDRAIPFDEF
DPTKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAYGYRKEDLWYQKTRQVGLSARLKPKGT（配列番号２）

【００４４】

ＣＯＲＥ３逆転写酵素（超好熱性プルーフリーディング逆転写酵素である、ＫＯＤポリメラーゼ誘導体の例）：

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYLYALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRPV
EVWKLYFTHPQDVPAIMDKIREHPAVIDIYEYDIPFAIRYLIDKGLVPMEGDEELKLLAFDIETLYHEGEEFAEGPILMI
SYADEEGARVITWKNVDLPYVDVVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEPK
IQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVTY
ELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEKELARRHQSHEGGYIKEPERGLWENI
VYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGHRFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKRMKATIDPIERKLLD
YRQRAIKILANSLYGYYGYARARWYCKECAESVIAWGREYLTMTIKEIEEKYGFKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKKA
MEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGLFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKAV
RIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHKQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIVDRAIPFDEF
DPTKHKYDAEYYIEKQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSARLKPKGT（配列番号３）

【００４５】

特定の態様において、本開示の酵素は、特定のポリメラーゼの以下の領域（ここでは、配列番号１における対応する領域）のうち少なくとも１箇所に、１つ以上の変異を有する：（１～１３０位及び３３８～３７２位は、Ｎ末端ドメインである）；（１３１～３３８位は、エキソヌクレアーゼドメインである）；（４４８～４９９位は、フィンガードメインである）；（５９１～７７４位は、親指ドメインである）；（３７４～４４７位及び５００～５９０位は、手のひらドメインである）。

【００４６】

ある特定の実施形態において、本開示の酵素は、特定のアミノ酸（ある特定の例において、その位置は配列番号１における対応する位置）において変異を有し、ある場合には、特定の残基は、その位置で置換されたアミノ酸である。以下の表は、本開示に存在する可能性がある特定の変異の一覧の例であり、特定の実施形態において、変異の組み合わせが、酵素に使用される。

【００４７】

表Ａ－実施形態のポリメラーゼ酵素に関するアミノ酸置換

ＫＯＤでの位置	ＲＴ活性に関する変異	可能な他の変異
Ｙ３８４	Ｈ、Ｉ	Ｆ、Ｌ、ＡＣ、Ｓ、Ｈ、Ｉ、Ｍ、Ｎ、Ｑ
Ｖ３８９	Ｉ、Ｌ	Ｍ、Ｆ、Ｔ、Ｙ、Ｑ、Ｎ、Ｈ
Ｅ６６４	Ｋ、Ｑ	
Ｙ４９３	Ｌ、Ｃ、Ｆ	Ｉ、Ｖ、Ａ、Ｈ、Ｔ、Ｓ
Ｒ９７	任意の変異	
Ｉ５２１	Ｌ	Ｆ、Ｖ、Ｍ、Ｔ
Ｇ７１１	Ｖ、Ｓ、Ｒ	Ｌ、Ｃ、Ｔ、Ｎ、Ｈ、Ｑ、Ｋ、Ｍ
Ｎ７３５	Ｋ	Ｒ、Ｑ、Ｎ、Ｙ、Ｈ
Ａ４９０	Ｔ	Ｖ、Ｓ、Ｃ
Ｆ５８７	Ｌ、Ｉ	Ａ、Ｔ、Ｖ
Ｍ１３７	Ｌ、Ｉ	Ａ、Ｔ、Ｖ
Ｋ１１８	Ｉ	Ｍ、Ｖ、Ｌ
Ｔ５１４	Ｉ	Ｖ、Ｌ、Ｍ
Ｒ３８１	Ｈ	Ｓ、Ｑ、Ｋ
Ｆ３８	Ｌ、Ｉ	Ｖ、Ｍ、Ｓ
Ｋ４６６	Ｒ	Ｅ、Ｄ、Ｑ
Ｅ７３４	Ｋ	Ｒ、Ｑ、Ｎ

【００４８】

少なくともいくつかの場合において、酵素は、配列番号１のＲ９７に対応する位置に変異を有する。場合によっては、この表にある２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上、６つ以上、７つ以上、８つ以上、９つ以上、１０以上、１１以上、１２以上、１３以上、１４以上、１５以上、１６以上の変異が、本開示の酵素に存在する。特定の実施形態において、以下の組み合わせが、単独で、あるいは上記に列挙されたまたはされていない１つ以上の他の変異とともに含まれる：

【００４９】

Ｙ３８４とＶ３８９；Ｙ３８４とＥ６６４；Ｙ３８４とＹ４９３；Ｙ３８４とＲ９７；Ｙ３８４とＩ５２１；Ｙ３８４とＧ７１１；Ｙ３８４とＮ７３５；Ｙ３８４とＡ４９０；Ｖ３８９とＥ６６４；Ｖ３８９とＹ４９３；Ｖ３８９とＲ９７；Ｖ３８９とＩ５２１；Ｖ３８９とＧ７１１；Ｖ３８９とＮ７３５；Ｖ３８９とＡ４９０；Ｅ６６４とＹ４９３；Ｅ６６４とＲ９７；Ｅ６６４とＩ５２１；Ｅ６６４とＧ７１１；Ｅ６６４とＮ７３５；Ｅ６６４とＡ４９０；Ｙ４９３とＲ９７；Ｙ４９３とＩ５２１；Ｙ４９３とＧ７１１；Ｙ４９３とＮ７３５；Ｙ４９３とＡ４９０；Ｒ９７とＩ５２１；Ｒ９７とＩ５２１；Ｒ９７とＧ７１１；Ｒ９７とＮ７３５；Ｒ９７とＡ４９０；Ｉ５２１とＧ７１１；Ｉ５２１とＮ７３５；Ｉ５２１とＡ４９０；Ｇ７１１とＮ７３５；またはＧ７１１とＡ４９０。少なくともいくつかの場合において、１つ以上の他の変異が、これらの特定の組み合わせと組み合わせられる。

【００５０】

特定の実施形態において、本ポリメラーゼは、配列番号１における以下の位置の１箇所以上に対応する位置にアミノ酸置換を有する：

ａ）Ｒ９７；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｙ４９３；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；及びＷ７６８；

ｂ）Ｆ３８；Ｒ９７；Ｋ１１８；Ｒ３８１；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｙ４９３；Ｔ５１４；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；及びＷ７６８；

ｃ）Ｆ３８；Ｒ９７；Ｋ１１８；Ｍ１３７；Ｒ３８１；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｋ４６６；Ｙ４９３；Ｔ５１４；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；及びＷ７６８；または

ｄ）Ｆ３８；Ｒ９７；Ｋ１１８；Ｍ１３７；Ｒ３８１；Ｙ３８４；Ｖ３８９；Ｋ４６６；Ｙ４９３；Ｔ５１４；Ｉ５２１；Ｆ５８７；Ｅ６６４；Ｇ７１１；Ｎ７３５；及びＷ７６

８。
【００５１】
ａ）、ｂ）、ｃ）、またはｄ）の組み合わせのどれであっても、Ａ４９０、Ｆ５８７、Ｍ１３７、Ｋ１１８、Ｔ５１４、Ｒ３８１、Ｆ３８、Ｋ４６６、及び／またはＥ７３４を含むことができる。特定の実施形態において、本ポリメラーゼは、配列番号１における以下に対応する特定のアミノ酸置換のうち１つ以上を有する：
ａ）Ｒ９７Ｍ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｙ４９３Ｌ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；及びＷ７６８Ｒ；
ｂ）Ｆ３８Ｌ；Ｒ９７Ｍ；Ｋ１１８Ｉ；Ｒ３８１Ｈ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｙ４９３Ｌ；Ｔ５１４Ｉ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；及びＷ７６８Ｒ；
ｃ）Ｆ３８Ｌ；Ｒ９７Ｍ；Ｋ１１８Ｉ；Ｍ１３７Ｌ；Ｒ３８１Ｈ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｋ４６６Ｒ；Ｙ４９３Ｌ；Ｔ５１４Ｉ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；及びＷ７６８Ｒ；または
ｄ）Ｆ３８Ｌ；Ｒ９７Ｍ；Ｋ１１８Ｉ；Ｍ１３７Ｌ；Ｒ３８１Ｈ；Ｙ３８４Ｈ；Ｖ３８９Ｉ；Ｋ４６６Ｒ；Ｙ４９３Ｌ；Ｔ５１４Ｉ；Ｉ５２１Ｌ；Ｆ５８７Ｌ；Ｅ６６４Ｋ；Ｇ７１１Ｖ；Ｎ７３５Ｋ；及びＷ７６８Ｒ。
【００５２】
ａ）、ｂ）、ｃ）、またはｄ）の組み合わせのどれであっても、Ａ４９０、Ｆ５８７、Ｍ１３７、Ｋ１１８、Ｔ５１４、Ｒ３８１、Ｆ３８、Ｋ４６６、及び／またはＥ７３４を含むことができる。
【００５３】
ＩＩ．組換え酵素の作製
本開示の方法は、逆転写活性及びプルーフリーディング活性を有し、少なくともいくつかの場合において、好熱性または超好熱性である酵素（例えば、組換え酵素）の作製を提供する。酵素の作製は、少なくとも逆転写活性を欠いている親ポリメラーゼの操作で生じる。この目的を達成するために様々な方法が利用可能であるものの、特定の実施形態において、本方法は、親ポリメラーゼの変異型を得るハイスループット戦略を採用し、これにより、得られる酵素に新たな特性（複数可）を導入する。特定の実施形態において、通常は逆転写酵素活性を欠いているＤＮＡポリメラーゼから逆転写酵素活性を持つ組換え酵素への発展をもたらすために、定向進化戦略が採用される。組換え酵素と親ＤＮＡポリメラーゼの間のそのような違いは、組換え酵素が、例えば、テンプレート鎖の代替塩基または糖を認識できるようになる（例えば、チミンの代わりにウラシルを含むテンプレートを認識できるようになること、及びリボース環の２’位の変異性を許容すること）ことにより、テンプレートとしてＲＮＡを使用する能力を発達させることを含む。
【００５４】
特定の実施形態において、本開示の酵素は、以下の１つ以上と関連した領域、部位、または残基（複数可）で、無作為に（または代替実施形態において定方向様式で）ポリメラーゼを変異させることにより、通常は逆転写酵素活性を欠いているＤＮＡポリメラーゼの操作から作製される：（１）酵素へのテンプレートエントリー；（２）活性部位における重合；及び（３）新生二本鎖の形成及び／または維持。
【００５５】
変異酵素の作製は、任意の適切な手段により起こすことができ、それらの発生に続いて、それらを、１つ以上の試験テンプレートを逆転写する能力について試験することができる。無作為（例えば）変異導入の例として、エラープローンＰＣＲ、または遺伝子シャッフリングによるものが挙げられる。定方向変異は、例えば、部位特異的突然変異誘発により起こすことができる。
【００５６】
特定の実施形態において、新規酵素を試験するための定向進化戦略は、区画化逆転写自己複製（ＲＴ－ＣＳＲ）を採用する。本明細書に記載されるとおり、ポリメラーゼをコードする核酸のみが複製を許容される環境でポリメラーゼを含むフィードバックループを利

用する方法が採用される。本発明の場合、発現したポリメラーゼがＲＮＡヌクレオチドを含むテンプレートを認識することができる場合にのみ、そのポリメラーゼを抽出することができるように、１つ以上のＲＮＡ塩基を含むプライマーを利用する（例えば、図１２を参照）。逆転写酵素活性を有するかどうかわからない候補ポリメラーゼのプールを、ＲＴ－ＣＳＲで試験することができ、各区画（または容器）に異なる候補ポリメラーゼが入っている。

【００５７】

逆転写酵素活性を持つ候補ポリメラーゼを試験する方法は、候補ポリメラーゼの作製方法の中の１工程であることも可能である。ある実施態様において、逆転写酵素活性を有するかどうかわからない候補ポリメラーゼは、逆転写酵素活性を欠いている既知ポリメラーゼの変異を通じて作製される。変異は、逆転写酵素活性を持つ候補ポリメラーゼを作製するための任意の適切な方法により、ポリメラーゼをコードする核酸分子に組込むことができる。

【００５８】

特定の実施形態において、逆転写酵素活性を欠いており、変異のために使用される親ポリメラーゼは、古細菌ファミリーＢポリメラーゼである。具体例として、Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｇｏｒｇｏｎａｒｉｕｓ；Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆｕｒｉｏｓｕｓ；Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｋｏｎｄａｋａｒａｅｎｓｉｓ（Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｋｏｄａｋａｒｅｎｓｉｓとしても知られる）；ＤｅｓｕｌｆｕｒｏｃｏｃｃｕｓのＴｏｋ株；Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．９°Ｎ－７；Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｌｉｔｏｒａｌｉｓ；Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ ｖｏｌｔａｅ；Ｐｙｒｏｂａｃｕｌｕｍ ｉｓｌａｎｄｉｃｕｍ；Ａｒｃｈａｅｏｇｌｏｂｕｓ ｆｕｌｇｉｄｕｓ；Ｃｅｎａｒｃｈａｅａｕｍ ｓｙｍｂｉｏｓｕｍ；Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ；Ｓｕｌｆｕｒｉｓｐｈａｅｒａ ｏｈｗａｋｕｅｎｓｉｓ；Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ；Ｐｙｄｒｏｄｉｃｔｉｕｍ ｏｃｃｕｌｔｕｍ；及びＡｅｒｏｐｙｒｕｍ ｐｅｒｎｉｘ由来のＤＮＡポリメラーゼが少なくとも挙げられる。本開示の酵素は、上記の生物の１種由来のポリメラーゼのアミノ酸配列と少なくとも７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一性を有する可能性がある。任意のＤＮＡポリメラーゼが、プルーフリーディング逆転写酵素を得るために変異を加える親酵素として使用可能であるものの、場合によっては、修飾に使用される酵素は、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｋｏｄａｋａｒａｅｎｓｉｓ由来のＫＯＤポリメラーゼである。野生型酵素のタンパク質配列は、以下のとおりである：

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRPV
EVWKLYFTHPQDVPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILMI
SYADEEGARVITWKNVDLPYVDVVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEPK
IQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVTY
ELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENI
VYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGHRFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLLD
YRQRAIKILANSYYGYYGYARARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKKA
MEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKAV
RIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDEF
DPTKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT（配列番号１）。

【００５９】

ＩＩＩ．酵素の使用方法

所望の特性（複数可）を持つ酵素がいったん同定されたら、その酵素を、逆転写酵素活性を必要とするまたは必要とする可能性があるポリメラーゼ活性の様々な用途に利用することができる。場合によっては、本実施形態の酵素は、標準の逆転写酵素が採用される状況で使用され、そのような状況として、少なくとも次世代配列決定用途（数百万の配列読

み取りを並行して処理する能力をもつ用途、例えば、ＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）（Ｓｏｌｅｘａ）シークエンス；Ｒｏｃｈｅ　４５４シークエンス；Ｉｏｎ　ｔｏｒｒｅｎｔ：Ｐｒｏｔｏｎ／ＰＧＭシークエンス；Ｐａｃｂｉｏ　ＳＭＲＴシークエンス、及びＳＯＬｉＤシークエンスなど）が挙げられる。本酵素（複数可）は、特に、高い忠実性が必要とされるまたは必要とされる可能性がある場合に、採用することができる。この場合、プルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を持つポリメラーゼ酵素が好ましいと思われる。ある特定の実施形態において、本酵素は、診断（生体試料の核酸または生体試料の核酸に由来する核酸の分析など）；ｃＤＮＡライブラリークローニング、及び次世代ＲＮＡ配列決定法などの分子生物学的用途に少なくとも採用される。

【００６０】

ある特定の実施形態において、ｃＤＮＡ中間体を最初に生成させることのない直接的なＲＮＡ配列決定に１種または複数の本開示の酵素を利用することができる。酵素（複数可）（及び他のもの）を応用する本開示のそのような方法は、ｃＤＮＡ集団の生成及びそれに続く増幅における偏りの有益な回避を可能にする。ある特定の実施形態において、本開示の酵素は、有向性ＲＮＡ配列決定を行う能力を有し、これは、例えばｄＵＴＰを第一または第二鎖合成に組込むことにより、鎖の方向に関する情報を保存する。そのうえさらに、態様によっては、本実施形態の酵素は、逆転写及びそれに続くポリメラーゼ連鎖反応による増幅ｃＤＮＡの両方に使用することができる。すなわち、態様によっては、逆転写－ＰＣＲを、同一ポリメラーゼ酵素を用いて単独反応で行うことができる。

【００６１】

本実施形態の酵素を好適に採用することができるさらなる方法として、特に制限なく、以下が挙げられる：

逆転写の前に、ＰＣＲ阻害剤など（例えば、タンパク質または感熱性分子）、構成要素の熱変性を必要とする方法。

油中水乳濁液などの区画中での改善された逆転写酵素及び／または核酸種の重合。そのような方法は、個々の細胞または組織試料をはじめとする試料の配列を増幅させるために使用することができ、重複伸長ＲＴ－ＰＣＲで２つ以上のＲＮＡ配列を対形成させることを含む。例えば、これらの増幅は、デジタルＰＣＲなどの技法を含むことができる。

本実施形態のポリメラーゼ（例えば、ＣＯＲＥ３）の３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を用いて、プライマーミスマッチ伸長アッセイでＲＮＡまたはＤＮＡ配列中に存在する一塩基遺伝子多型（ＳＮＰ）を検出することができる。これらの増幅産物は、配列決定及び／または直接可視化を用いて読み出すことができる。

本実施形態のポリメラーゼ（例えば、ＣＯＲＥ３）を他の既知のＲＴ（ＭＭＬＶ、ＡＭＶ、Ｔｔｈ、及び他の操作改変体、例えばＴａｑポリメラーゼなど）とともに用いるポリメラーゼブレンドは、合成が困難な核酸配列の検出性能のさらなる上昇をもたらすことができる。

本実施形態のポリメラーゼは、複数テンプレート組成物（ＤＮＡ、ＲＮＡ、及び２’Ｃ－Ｏメチル）とともに働くことが実証されており、さらなる非天然核酸組成物を逆転写するはずであるので、さらなる治療用途、診断用途、または配列決定用途に応用可能である。

本実施形態のポリメラーゼは、ポリメラーゼが逆転写酵素の役割を果たし、ＤＮＡ／ＲＮＡポリメラーゼをはじめとする他のポリメラーゼは増幅を助ける増幅スキームで利用可能であり、そのようなスキームとは、例えば：ＲＴ－Ｌａｍｐ、３ＳＲ（ＮＡＳＢＡ）、転写介在増幅法（ＴＭＡ）、ＲＣＡ、ＲＰＡ、ＨＤＡ、鎖置換増幅法である。

ＳＬＩＣ、またはギブソンアッセンブリーなどの分子クローニング法も、ＲＮＡまたはＲＮＡ含有プライマーを直接使用できるように、本実施形態のポリメラーゼを利用することができる。

ポリメラーゼは、高忠実性ｃＤＮＡライブラリー作製に使用することができる

免疫ＰＣＲ増幅技法は、本実施形態のポリメラーゼを使用して、小分子またはタンパク質代謝産物を検出することができる。

本実施形態のポリメラーゼは、同様に、ＲＮＡ修飾アプタマーをはじめとするＲＮＡアプタマー配列のｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ選択に使用することができる。

本実施形態のポリメラーゼのｉｎ　ｖｉｖｏ発現は、細胞中のＲＮＡをＤＮＡに変換するのに使用することができる。これは、例えば、核酸情報のプログラムされた組換え（例えば、レトロン、レトロエレメント）または保存に利用することができる。

ポリメラーゼは、区画化対形成複製または協同ＣＳＲ定向進化技法をはじめとする定向進化のための選択技法にも使用することができる。

【００６２】

ＩＶ．本開示のキット

本開示の酵素を作製、試験、及び／または使用するのに必要とされる必須の材料及び試薬の全てまたは一部を、キットで提供することができる。キットは、ＲＮＡ塩基含有プライマー、ベクター、ポリメラーゼをコードする核酸、緩衝剤、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、塩、ならびに酵素の作製、特性決定、及び／または使用の実施形態の少なくとも幾つかに該当するものなどの１つ以上を含むことができる。キットの実施形態は、例えば、対照核酸または酵素の検出及び／または使用のための試薬を含むことができる。キットは、説明書、対照物、試薬、容器、及び／または本開示の酵素を用いて様々なアッセイまたは他の方法（例えば、本明細書中記載されるもの）を行うための他の材料を提供することができる。

【００６３】

キットは、一般に、適切な手段で、個々の試薬、プライマー、及び／または酵素それぞれ用の個別容器を含むことができる。特定の実施形態において、キットは、さらに、本開示の酵素を作製、試験、及び／または使用するための説明書を含む。

【００６４】

実施例

以下の実施例は、本発明の好適な実施形態を実証するために挙げられている。当業者には当然だろうが、実施例に開示される技法は本発明の技法に従うものであり、本発明を実施する上で上手く機能することが本発明者らにより見出されているので、本発明を実施する好適な様式を構成するものと見なすことができる。しかしながら、本開示に照らして、当業者には当然ながら、開示される具体的な実施形態に多くの変更を加えることが可能であり、それでもなお、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、同様なまたは類似の結果を得ることができる。

【実施例１】

【００６５】

ハイスループット様式でポリメラーゼの定向進化を可能にする戦略が開発されており、この戦略は、改変された特異性及び特性を持つポリメラーゼをもたらすことに成功している（Ｐｉｎｈｅｉｒｏ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２；　Ｇｈａｄｅｓｓｙ　ｅｔ　ａｌ．，　２００１）。本開示では、定向進化の枠組みを適応させてテンプレート鎖の代替塩基または糖の進化を可能にした、すなわち区画化逆転写自己複製（ＲＴ－ＣＳＲ）と呼ばれる戦略である（図１Ｂ）。簡単に述べると、ポリメラーゼ変異体のライブラリーを、Ｅ．ｃｏｌｉで発現させ、続いてエマルジョンＰＣＲに供し、細胞は物理的に個別の区画に分離され、コードされるポリメラーゼが細菌内で増幅することを可能とする。エマルジョンＰＣＲでポリメラーゼをフランキングするプライマーは、捕獲配列とプラスミド結合配列を分離するＲＮＡ塩基を持つように設計される。第二鎖合成に際して、ポリメラーゼは、最初に伸長したプライマーに由来するＲＮＡテンプレートで試される。介在ＲＮＡ塩基の個数を増加させてストリンジェンシーを高め、ポリメラーゼが進化するにつれてテンプレートのハードルが高くなっていくようにする（表１）。

【００６６】

表１．ｐｏｌＢ逆転写酵素の進化中に使用したＲＴＣＳＲ選択パラメーター。ＲＴＣＳＲでのＲＮＡ塩基の個数は、フォワードプライマー及びリバースプライマーにおいて示す。

初期ライブラリー					
ラウンド回数	変異誘発性	ＲＴＣＳＲプライマー	トータルＲＮＡ	プラスミド骨格	導入ａＴｃ [nM]
0	エラープローン			colE1 (-rop)	
1	エラープローン	RTCSR.F / RTCSR.R	0	colE1 (-rop)	200
2	エラープローン	RTCSR.F / RTCSR.R	0	colE1 (-rop)	200
3	N/A	RTCSR.F / RTCSR.R	0	colE1 (-rop)	200
4	N/A	RTCSR.RNA5.F / RTCSR.RNA5.R	10	colE1 (-rop)	200
5	エラープローン	RTCSR.RNA5.F / RTCSR.RNA5.R	10	colE1 (-rop)	200
6	N/A	RTCSR.RNA5.F / RTCSR.RNA5.R	10	colE1 (-rop)	200
7	エラープローン	RTCSR.RNA10.F / RTCSR.RNA5.R	15	colE1 (-rop)	200
8	N/A	RTCSR.RNA10.F / RTCSR.RNA5.R	15	colE1 (-rop)	200

ＫＯＤ９７ライブラリー					
ラウンド回数	変異誘発性	ＲＴＣＳＲプライマー	トータルＲＮＡ	プラスミド骨格	導入ａＴｃ [nM]
0	エラープローン（Ｒ９７ＮＮＳ）			colE1 (-rop)	
1	N/A	RTCSR.RNA5.F / RTCSR.RNA5.R	10	colE1 (-rop)	200
2	エラープローン	RTCSR.RNA5.F / RTCSR.RNA5.R	10	colE1 (-rop)	200
3	N/A	RTCSR.RNA10.F / RTCSR.RNA5.R	15	colE1 (-rop)	200
4	エラープローン	RTCSR.RNA10.F / RTCSR.RNA5.R	15	colE1 (-rop)	200
5	N/A	RTCSR.RNA10.F2 / RTCSR.RNA10.R2	20	colE1 (-rop)	200
6	エラープローン	RTCSR.RNA10.F2 / RTCSR.RNA10.R2	20	colE1 (-rop)	200
7	N/A	RTCSR.RNA15.F2 / RTCSR.RNA10.R2	25	colE1 (-rop)	200
8	エラープローン	RTCSR.RNA15.F2 / RTCSR.RNA10.R2	25	colE1 (-rop)	200
9	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA10.R2	62	colE1 (-rop)	200
10	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA10.R2	62	colE1 (-rop)	200
11	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA48.R3	100	colE1 (-rop)	200
12	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA48.R3	100	colE1 (-rop)	200
13	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA48.R3	100	p15A	20
14	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA48.R3	100	p15A	20
15	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA48.R3	100	p15A	20
16	N/A	RTCSR.RNA52.F2 / RTCSR.RNA48.R3	100	p15A	20
17	N/A	RTCSR.RNA88.F2 / RTCSR.RNA88.R3	176	colE1 (-rop)	200
18	N/A	RTCSR.RNA88.F2 / RTCSR.RNA88.R3	176	colE1 (-rop)	200

【００６７】

標的指向型アプローチは、ポリメラーゼとテンプレート鎖の間の広範囲の相互作用故に非実用的であるように思われたため、エラープローンＰＣＲによりＫＯＤポリメラーゼ全体に均等に変異を分配することにより、進化を開始させた。最初に、合計で１０のＲＮＡ塩基（各プライミングオリゴヌクレオチドあたり５）を含む中程度の淘汰圧を用いた。というのも、この条件は、野生型ＫＯＤが重合可能なテンプレートＲＮＡ塩基の個数を超えていたからである。８回のラウンド後にプールを配列決定した際、Ｒ９７位での変異は、変異体の９０％超で観察された。ポリメラーゼのこの一般領域は、ウラシル残基での停止を誘導することが知られている（Ｋｉｌｌｅｌｅａ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｆｉｒｂａｎｋ ｅｔ ａｌ．，２００８）が、この機能を不活性化するより一般的な変異（Ｖ９３Ｑ）（Ｆｏｇｇ ｅｔ ａｌ．，２００２）とは異なっており、本明細書中の実施形態の開発中に行われた分析から、Ｒ９７が、テンプレートＲＮＡの２’ヒドロキシルを認識するように位置していることが明らかとなる。次いで、この位置での完全無作為化を行ってから、選択を続けた。

【００６８】

ポリメラーゼプールに対して選択をさらに１８回行って、必要に応じて多様性を導入した。選択中のプライマーが完全にＲＮＡで構成されるまで淘汰圧を徐々に高めたが、エマルジョンＰＣＲでの指数関数的増加を維持するために、毎回の熱サイクルで逆転写が起こることを必要とした。ポリメラーゼプールのディープシークエンスから逆転写酵素能力の適応に極めて重要な変異が同定された（図１Ｃ及び表２）。

【００６９】

表２．ＲＴＣＳＲライブラリーのディープシークエンス。集団の１０％で生じた変異を有するアミノ酸残基を、頻度順に示す。位置によっては、複数のアミノ酸の可能性が含まれていた。同義変異は表示しない。

初期選択			
アミノ酸位置	変異発生頻度	アミノ酸の変化	変異型頻度
97	94.2%	R -> H	58.70%
		R -> S	22.30%
		R -> C	13.20%
687	27.9%	F -> L	15.10%
		F -> L	12.80%
119		R -> H	10.90%

ラウンド１０			
アミノ酸位置	変異発生頻度	アミノ酸の変化	変異型頻度
97	97.9%	R -> F	17.70%
		R -> A	11.80%
		その他	68.40%
384		Y -> H	81.20%
210		N -> D	63.70%
389		V -> I	50.20%
687	37.3%	F -> I	14.00%
		F -> L	23.30%
711		G -> S	29.30%
664		E -> K	29.20%
168		A -> T	25.70%
521		I -> L	24.20%
454		G -> D	22.20%
480		A -> T	17.40%
634		G -> D	16.00%
526		I -> L	14.50%
734		E -> K	14.10%
493		Y -> C	13.90%
311		Y -> C	12.10%
292		A -> T	11.80%
137		M -> I	11.30%
677		G -> S	10.90%
440		R -> H	10.80%
144		T -> A	10.60%
171		I -> V	10.60%
748		F -> Y	10.00%

ラウンド１８			
アミノ酸位置	変異発生頻度	アミノ酸の変化	変異型頻度
384		Y -> H	96.00%
97	93.3%	R -> A	20.80%
		R -> F	18.00%
		その他	54.50%
389		V -> I	91.90%
210		N -> D	84.90%
493	83.3%	Y -> C	59.00%
		Y -> L	13.20%
		Y -> F	11.10%
664	82.7%	E -> K	60.40%
		E -> Q	22.30%
711	75.0%	G -> S	46.80%
		G -> V	28.20%
521		I -> L	59.40%
480		A -> T	58.50%
587	55.1%	F -> L	36.80%
		F -> I	18.30%
168		A -> T	36.70%
734		E -> K	34.50%
137	33.9%	M -> I	20.30%
		M -> L	13.60%
748		F -> Y	22.40%
735		N -> K	18.80%
593		K -> N	18.80%
590		T -> A	15.80%
605		T -> I	13.20%
143		E -> G	13.00%
501		R -> H	12.90%
144		T -> A	12.50%
150		E -> D	12.20%
145		L -> P	11.50%
741		V -> A	11.30%
692		K -> R	11.20%
454		G -> D	11.10%

【００７０】

保存された変異の大部分は、テンプレート鎖と直接相互作用する、二次殻相互作用である、またはプルーフリーディング活性を不活性化することが知られている（Ｎ２１０Ｄ）。これらの変異はテンプレート認識境界面の長さにまたがり、後続テンプレート（Ｒ９７）、活性部位（Ｙ３８４）、または重合後－新生ＲＮＡ／ＤＮＡ二本鎖（Ｖ３８９、Ｉ５２１、Ｅ６６４、Ｇ７１１）を認識する領域に位置している（Ｂｅｒｇｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１３）。

【００７１】

１回の定向進化実験に基づくだけでは、保存された変異が、厳密なＤＮＡ特異性を消失させるように働くかどうか、すなわちＲＮＡ特異性を促進するかどうか不明であった。この疑問に答えるために、ＲＴＣＳＲプロセスを再度行ったが、今回は、親ポリメラーゼ中の重要残基と疑われるものを完全に無作為化した。これにより、２本柱の進化プロセス、すなわち多くの実行可能な解決策に基づくある特定位置（例えば、Ｒ９７）での機能喪失、及び進化的アミノ酸優先傾向によるＲＮＡ利用を促進する可能性がある変異（例えばＹ３８４Ｈ、Ｅ６６４Ｋ）の可能性が明らかとなった（図４）。野生型ポリメラーゼの状況

的視点から、（１）効率的逆転写能力のためには多くの変異が必要であったこと、及び（２）変異はテンプレート境界面全体にわたり分散していたことという観察は、野生型ポリメラーゼが、ＤＮＡをＲＮＡから識別するために一連のチェックポイントを利用することを示唆している：というのも、テンプレートは、活性部位で及び新生二本鎖で重合が進むにつれて、酵素に入っていくからである。

【００７２】

活性ポリメラーゼについてプールをスクリーニングし、３７の変異を持つ変異体Ｂ１１を得た。このポリメラーゼは、少なくとも５００塩基対の逆転写を行うことができることがわかった。配列決定から、このポリメラーゼは、プルーフリーディングドメインが不活性化していることが明らかとなった。このことは、機能アッセイで確認された（図５）。野生型プルーフリーディングドメインを移植することでこの活性が回復する可能性が考えられた。ハイブリッド体は、活性を回復させたが、検出可能なレベルにすぎなかった。プルーフリーディングドメインが活性を回復するにもかかわらず、Ｂ１１ポリメラーゼのＲＴ活性は、依然として堅固であったことから、ＲＴ活性は３’－５’エキソヌクレアーゼ活性と両立することが示された。これらの結果に後押しされて、ある特定の態様において、ＲＴＣＳＲプロセスにおいて導入されやすい外来性変異らしいものを最小限に抑えるように複数のポリメラーゼを設計して構築した。

【００７３】

Ｂ１１骨格、ならびにプールの配列決定データに基づいて、ポリメラーゼを設計した。テンプレートに近接する高度に保存された変異及び残基により同定されるとおりに、変異の中核セットと思われるものを中心に一連のポリメラーゼを構築した。試験から、各ポリメラーゼは、活性であったが、さらに変異があると逆転写酵素活性が向上したことが明らかとなった（図６）。中核ポリメラーゼ設計のそれぞれで、プルーフリーディング活性が実証されたが、より野生型に近いポリメラーゼを構築することがプルーフリーディングを向上させたことが示された。これらのポリメラーゼの活性に基づいて、もっとも充実した逆転写酵素活性を持ちつつ、プルーフリーディング能力も維持しているということで、ＣＯＲＥ３ポリメラーゼを選択してさらに特性決定を行った。

【００７４】

スクリーニング測定に基づくと、ＣＯＲＥ３ポリメラーゼは、ＤＮＡテンプレートでプルーフリーディング活性を有した（図７）が、プルーフリーディング機構が、逆転写中に起こり得るのかどうかは不明であった。というのも、ＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖は、ＤＮＡのみの二本鎖では見られない代替立体構造をとるからである（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９８２）。これを解決するため、３’末端が正規の３’ヒドロキシルマッチ塩基対または３’デオキシミスマッチ対（新たにミスマッチが導入されたヌクレオチドと同様）いずれかを形成するようにオリゴヌクレオチドを合成した。ミスマッチにより、プルーフリーディング活性を刺激することができる。ＤＮＡテンプレートを用いてプライマー伸長法を行った場合、親ＫＯＤ及びＣＯＲＥ３は、両方とも、１回の伸長でミスマッチプライマーを伸長することができたが、それらのエキソヌクレアーゼ欠損型プライマーは、できなかった。ＲＮＡテンプレートを用いてこのアッセイを繰り返したところ、ＣＯＲＥ３ポリメラーゼは、プルーフリーディング活性を失っておらず、その活性は、ＤＮＡテンプレートで重合していた間のプルーフリーディング活性に匹敵するものだった（図２Ａ）。

【００７５】

ＣＯＲＥ３が、逆転写の間プルーフリーディングを維持することを考慮して、プルーフリーディングが逆転写の忠実性に対して与える可能性がある影響を検討した。バーコードをアダプター配列に組込むことによりＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）シークエンスのエラーを大幅に減少させた最近の進歩（Ｓｃｈｍｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）に基づき、従来の遺伝子に基づくアッセイとは異なり一義的にエラーを正確に検出することを可能にする戦略が考案された。独自バーコードを設計して、ヒトＨＳＰＣＢ及びＰｏｌＲ２Ａ遺伝子の逆転写プライマーに導入した。ＲＴ後、続くｃＤＮＡのＰＣＲはこれらのバーコードをコピーし、ディープシークエンスの間に複数のリードを可能にする（図８）。同

一バーコードをビニングし（Ｎ≧３）共通配列を作製することにより、数桁レベルでバックグラウンドエラーを低下させる。遺伝子の配列決定から、ＭＭＬＶ、ＣＯＲＥ３、及びプルーフリーディング欠損ＣＯＲＥ３（ｅｘｏ－）の変異スペクトルが明らかとなった（図２Ｂ及び表３）。

【００７６】

表３．ａ、ＳＳＣＳ技法を用いた、２種のヒト遺伝子、ＨＳＰＣＢ及びＰｏｌＲ２Ａに対する逆転写の忠実性プロファイル。エラー率は、全変異（ミスマッチ＋インデル）を、配列決定した塩基の総数で除算することにより計算する。可能な変異それぞれの頻度を、全変異に対する割合で列挙する。ｂ、クローン化ＨＳＰＣＢを用いた、ＤＮＡテンプレート（クローン化プラスミドＤＮＡ）重合の忠実性プロファイル。

a

HSPCB逆転写	ポリメラーゼ	CORE3	MMLV	CORE3 exo-	B11
	マッチ合計	1.44E+07	1.20E+06	1.10E+06	1.33E+07
	ミスマッチ合計	520	124	102	3136
	インデル合計	15	7	11	416
	エラー率	3.71E-05	1.10E-04	1.03E-04	2.66E-04
	塩基変異	変異頻度			
	TからAへ	1.92%	2.42%	20.59%	23.62%
	GからAへ	27.69%	29.03%	13.73%	0.12%
	TからCへ	5.58%	22.58%	1.96%	2.68%
	GからCへ	0.38%	0.00%	0.00%	0.00%
	TからGへ	3.27%	0.00%	6.86%	6.16%
	CからGへ	0.38%	0.81%	0.98%	2.36%
	CからAへ	3.46%	3.23%	10.78%	6.02%
	AからTへ	1.54%	9.68%	0.98%	1.66%
	GからTへ	31.73%	1.61%	0.98%	4.11%
	CからTへ	11.35%	13.71%	11.76%	10.01%
	AからCへ	0.19%	8.06%	0.98%	0.70%
	AからGへ	12.50%	0.67%	30.39%	33.45%

PolR2A逆転写	ポリメラーゼ	POLR2A	MMLV	CORE3 exo-
	マッチ合計	1.96E+07	1.12E+06	1.26E+07
	ミスマッチ合計	537	536	4175
	インデル合計	54	7	985
	エラー率	3.56E-05	4.86E-04	4.08E-04
	塩基変異	変異頻度		
	TからAへ	2.61%	0.56%	35.52%
	GからAへ	14.34%	1.68%	2.18%
	TからCへ	13.04%	88.25%	2.88%
	GからCへ	0.74%	0.37%	0.05%
	TからGへ	1.49%	0.00%	1.51%
	CからGへ	0.37%	0.19%	2.35%
	CからAへ	6.89%	0.00%	5.27%
	AからTへ	1.12%	0.19%	2.75%
	GからTへ	34.08%	2.05%	3.83%
	CからTへ	12.66%	2.80%	8.02%
	AからCへ	0.56%	0.75%	1.20%
	AからGへ	12.10%	3.17%	34.63%

b

HSPCB（DNAテンプレート）	ポリメラーゼ	CORE3	MMLV	CORE3 exo-	B11	POLR2A
	マッチ合計	1.84E+07	2.23E+06	4.65E+06	2.33E+07	1.49E+07
	ミスマッチ合計	1521	297	795	5607	627
	インデル合計	305	17	92	852	5
	エラー率	0.83E-05	1.41E-04	1.91E-04	2.80E-04	4.23E-05
	塩基変異	変異頻度				
	TからAへ	4.67%	5.39%	15.47%	10.88%	2.71%
	GからAへ	13.41%	14.14%	14.97%	9.60%	26.16%
	TからCへ	3.35%	7.74%	3.40%	3.48%	5.74%
	GからCへ	0.13%	0.34%	1.13%	2.42%	0.00%
	TからGへ	0.66%	0.34%	2.14%	3.39%	0.90%
	CからGへ	5.85%	1.35%	11.45%	11.01%	0.32%
	CからAへ	14.73%	10.10%	16.48%	10.88%	34.13%
	AからTへ	1.58%	12.46%	2.52%	0.96%	0.48%
	GからTへ	6.36%	7.41%	2.64%	2.98%	0.54%
	CからTへ	12.29%	8.08%	9.06%	10.87%	8.29%
	AからCへ	0.72%	12.79%	0.75%	1.79%	0.80%
	AからGへ	36.23%	19.87%	28.66%	16.98%	14.83%

【００７７】

ＭＭＬＶ対照酵素は、エラー率が１．１×１０$^{-4}$であったが、一方ＣＯＲＥ３酵素は、エラーが３．７１×１０$^{-5}$（約３倍の改善）であった。ＣＯＲＥ３のプルーフリーディングを不活性化すると、観察される忠実性は約３倍低下する。このことは、ＣＯＲＥ３が、逆転写している間、活発にプルーフリーディングも行っていることをさらに支持する。特定の実施形態において、ＳＳＣＳ技法が、ＣＯＲＥ３で観察されるエラー率（人為現象による）とほぼ同一の検出限界を有することを考慮すると、ＣＯＲＥ３の真のエラー率は、さらに低く、このことは、野生型ＫＯＤをＤＮＡで測定する実験により確認された（表３）（Ｓｃｈｍｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。また、転写に由来するエラーは不明であり、他の実験では、活性プルーフリーディングドメインが忠実性を約３０倍上昇させることができると実証されている（Ｎｉｓｈｉｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．，　２００１）。

【００７８】

短いテンプレートでは堅固な逆転写がみられたので、ＣＯＲＥ３ポリメラーゼを、もっと長いテンプレートについて、単独酵素ＲＴ－ＰＣＲ（このＰＣＲでは、ＣＯＲＥ３ポリメラーゼは、第一鎖逆転写ならびにＰＣＲ増幅の両方を行う）で試験した。複数の独立したＲＮＡ源及び遺伝子座を選択して、ＤＮＡ混入の可能性を軽減させた。ＤＮＡ混入は、イントロンの保持故に独特のサイズプロファイルを作製すると思われることから、試験では真核生物ｍＲＮＡに重点を置いた。３つの独自ＲＮＡ試料及び遺伝子にまたがって、ＣＯＲＥ３ポリメラーゼは、単独酵素ＲＴＰＣＲを行う能力が高く、５キロ塩基より長いアンプリコンを生成することに成功した（図３）。この実験は、ＣＯＲＥ３のプルーフリーディングの不活性化（Ｎ２１０Ｄ変異）が、概して産物収量を増加させるものの、こうした巨大アンプリコンを得るためには必要ではなかったことを示す。

【００７９】

ＣＯＲＥ３ポリメラーゼが、プルーフリーディング能力を持ちながら長いＲＮＡを逆転写できることが示されたので、進化プロセスが、どのようにして、機能のそのような根本的変化を可能にするのかを検討した。祖先及び進化したポリメラーゼの放射標識化ｄＣＴＰの組込みの定常状態分析から、ＲＮＡでのK_mが、検出不能な基質結合（親ＫＯＤ酵素において）からＤＮＡテンプレートでの野生型ＫＯＤ結合に匹敵する親和性へと、劇的に低下したことが明らかとなる（表４及び図９）。

【００８０】

表４．ポリメラーゼ変異体のＤＮＡ及びＲＮＡテンプレートでの定常状態動態。（ｎ．ｄ．は、不活性を理由とする未測定）

	DNA			RNA		
酵素	kcat	Km	kcat/Km	kcat	Km	kcat/Km
ＫＯＤ	160.4	39.7	4.0	n.d.	n.d.	n.d.
Ｂ１１	48.2	7.9	6.1	54.5	23.1	2.4
ＣＯＲＥ３	49.1	15.7	3.1	52.3	51.5	1.0
ＣＯＲＥ３ｅｘｏ－	56.8	12.1	4.7	55.2	31.1	1.8

【００８１】

進化したポリメラーゼのK_mは、ＤＮＡテンプレートについても低下したように見えたが、これはＣＳＲを用いてＤＮＡポリメラーゼを進化させている間に起こる一般的現象であり（データは示さず）、おそらくエマルジョンＰＣＲ反応での生成物収量を増加させる。ＣＯＲＥ３における各変異の正確な役割は不明であるものの、親和性の上昇は、部分的には、Ｅ６６４Ｋ変異によるものである。この変異は、進化実験全体を通じて高い頻度で観察されたもので、ＤＮＡ／ＲＮＡヘテロ二本鎖との結合を大幅に増加させることが実証されている（Ｃｏｚｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。

【００８２】

高忠実性ＲＴの利点は、トランスクリプトミクスの理解を深める大きな可能性を秘めており、次世代ＲＮＡ－Ｓｅｑの逆転写工程で導入される偏り及びエラーを減少させる。直接の実用性を実証するため、ＣＯＲＥ３ポリメラーゼを、指向性ＲＮＡシークエンシング（ＮＥＢＮＥＸＴ（登録商標）ｌｉｂｒａｒｙ　ｐｒｅｐ）で一般的に使用されるワークフローに組み入れた。ワークフローは、逆転写工程で緩衝剤及びポリメラーゼをＣＯＲＥ３に変更した以外は、変更しなかった。分析から、ほぼ同一のカバー範囲及び発現プロファイルが明らかとなり（図１０）、ＣＯＲＥ３のプルーフリーディング活性が、ｍＲＮＡ発現レベルの系統的偏りを導入しないことを示した。

【００８３】

ＣＯＲＥ３ポリメラーゼを用いて、ある特定の実施形態において、ｃＤＮＡライブラリーを同時に作製する必要性を回避することが可能であるかどうかを検討した。ｃＤＮＡ合成及びＰＣＲ増幅のプロセスは、増幅を通じて多くの偏りを導入することが、長い間知られてきている（Ｈａｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１０；Ａｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１）。従来のサンガー配列決定アプローチを用いて、ＣＯＲＥ３を、ＲＮＡ配列決

定に直接使用した。転写終結が、各該当する塩基で部分的に起こるように、単独のジデオキシ転写終結ヌクレオチドを、正常ｄＮＴＰと混合した。混合物は、その後、配列決定ゲルまたはキャピラリーで泳動させることができる。概念の実証として、$GATC_5$ＲＮＡリピートの２０のヌクレオチドを配列決定した（図１１）。転写終結は、該当する位置それぞれで明らかであり、配列を決定することができた。サンガー配列決定法の制約を考えた場合、ＣＯＲＥ３のプルーフリーディング型は使用できないが、しかしながら、直接的なＲＮＡ配列決定は、単独分子配列決定プラットフォーム（ＰａｃｂｉｏのＳＭＲＴ配列決定システムなど）に適応可能なはずであり、これは、ＲＮＡのプルーフリーディングを可能にし、ｃＤＮＡ合成及び続く増幅で作製される偏りを除去する。

【００８４】

ＲＴＣＳＲアプローチを利用することにより、古細菌ファミリーＢポリメラーゼを逆転写酵素に変身させた。すなわち、天然ＲＴから全く分岐していない逆転写酵素のファミリーを確立させた。改変ポリメラーゼは、高温でも、長いＲＮＡテンプレートにわたり、高い正確性を持って重合を行うことができる。高忠実性逆転写は、多くのＲＮＡプロセスをより正確に理解することを可能にするだろう。ＲＮＡでの変異は、癌をはじめとする多くの疾患状態で検出されてきた。組織中の稀な体細胞変異を正確に同定することは、疾患過程及び診断ツールをより深く理解させると思われる。ＲＮＡ配列決定ツールが洗練されていくにつれて、高忠実性逆転写酵素は、大きな役割を果たすようになる。ファミリーＢ逆転写酵素の持つ、ｃＤＮＡサイブラリーを最初に作製することを必要とせずにＲＮＡ配列決定を行う能力は、より深いレベルでトランスクリプトームを理解するためのかけがえのないツールとなる可能性がある。

【００８５】

ＣＯＲＥ３ポリメラーゼは、高忠実性逆転写が可能であることを明らかにし、さらに、それらが免疫応答などの淘汰圧に反応して進化する大きな可能性を秘めていることを示している（Ｗｅｉ ｅｔ ａｌ．， １９９５）ことを考えると、低忠実性逆転写が、レトロウイルスに適応した態様になり得ることを支持する。このことは、準種とよく称されるものを形成する、ウイルス感染の莫大な多様性に、大きくは起因する（Ｌａｕｒｉｎｇ ｅｔ ａｌ．， ２０１０；Ｅｉｇｅｎ， １９７１）。これは、低忠実性逆転写が適応性を有する、またはレトロウイルス集団にとっては必須でさえある可能性があるという概念を裏付けることができる。高忠実性逆転写酵素をレトロウイルスに導入することは、おそらく、変異率を低下させることにより、利用可能な遺伝的多様性を制限するので、弱毒ワクチンをより安全にする機構として役立つ可能性がある。

【実施例２】

【００８６】

熱安定性ＤＮＡポリメラーゼの定向進化の実施形態

本開示は、親酵素から誘導体酵素を作製する方法を提供し、誘導体は、親酵素には欠けている１つ以上の活性を有する。本方法は、無作為及び／または作為的修飾手段により、親酵素を修飾する工程を利用することができる。本開示の実施形態は、逆転写酵素活性を欠いた親ＤＮＡポリメラーゼに対する修飾を含む。

【００８７】

特定の実施形態において、酵素誘導体の作製方法は、区画化自己複製（ＣＳＲ）方法の変法を採用する（Ｇｈａｄｅｓｓｙ ｅｔ ａｌ．（２００１）；ＥＰ １３１７５３９Ｂ）。ＣＳＲ法は、熱安定性ＤＮＡポリメラーゼの定向進化を中心として設計されている。ＣＳＲでは、プライマーはポリメラーゼ遺伝子をフランキングするように設計される。熱サイクル（ＰＣＲ）に際して、ポリメラーゼ酵素は、それら自身の遺伝子をコピーすることになる。本開示では、この方法を適応させて、テンプレート鎖の代替塩基または糖の進化を可能にした。具体的には、ＣＳＲの本発明の変法は、プライマー設計は、逆転写酵素の定向進化を可能にするように、既知のＣＳＲ方法から修飾されている。プライマーは、可変数のＲＮＡ塩基がプライマーに存在するように設計される。１回目のＰＣＲサイクル後、プライマーは、その後のサイクル用のテンプレートとなる。本方法は、逆転写を

行うことができるポリメラーゼのみが回収されるように設計される。プライマーのＲＮＡ塩基の個数が増えるほど、逆転写酵素活性のストリンジェンシーが高まる。プライマーは、最大のストリンジェンシーを可能にするように、完全にＲＮＡで構成することが可能である（図１２を参照）。

【実施例３】

【００８８】

例示の材料及び方法

本実施例は、本開示の実施形態のための材料及び方法の例を提供する。

【００８９】

ポリメラーゼの初期逆転写試験－３０ｐｍｏｌの５’フルオレセイン標識化プライマー（２５ＦＡＭ）を、３０ｐｍｏｌのテンプレート（ＴＥＭＰ．Ａ．ＤＮＡ／１ＲＮＡ／５ＲＮＡ）及び０．４μｇのポリメラーゼを用いて、９０℃で１分間、熱変性し、室温に冷却することにより、アニールした。５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．４）、１０ｍＭの$(NH_4)_2SO_4$、１０ｍＭのＫＣｌ、２ｍＭの$MgSO_4$、及び２００μＭのｄＮＴＰを含有する「開始」混合物を加えることにより、反応を開始した。ＭＭＬＶポリメラーゼを、製造元の推奨（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）に従って処理した。反応物を、６８℃で２分間インキュベートしてから、ＥＤＴＡを最終濃度が２５ｍＭになるまで加えて終了させた。１×色素（４７．５％ホルムアミド、０．０１％ＳＤＳ）及び１ｎｍｏｌの未標識ＢＬＯＣＫＥＲオリゴヌクレオチド（テンプレート鎖と競合的に結合させるため）中、７５℃で５分間、試料を加熱することにより、標識化プライマーを、テンプレート鎖から除去した。試料を、２０％（７Ｍの尿素）アクリルアミドゲル上で泳動させた。

【００９０】

逆転写ＣＳＲ（ＲＴＣＳＲ）－ＫＯＤポリメラーゼライブラリーは、特に記載がないかぎり、エラープローンＰＣＲを通じて、１遺伝子あたり約１～２アミノ酸変異の変異率を有するように作製した。ライブラリーを、テトラサイクリン誘導ベクターにクローン導入し、ＤＨ１０Ｂ　Ｅ．ｃｏｌｉに電気穿孔で導入した。ライブラリーの大きさは、少なくとも10^6、より典型的には10^7～10^8の形質転換効率に維持した。ライブラリーの一晩培養物を、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを補充した新鮮な２×ＹＴ培地に、１：２０の比で播種し、３７℃で１時間生育させた。続いて細胞を、アンヒドロテトラサイクリン（典型的には、最終濃度２００ｎｇ／ｍＬで）を加えることにより誘導して、３７℃で４時間インキュベートした。誘導された細胞（合計２００μＬ）を、卓上遠心機にて、３，０００×ｇで８分間遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットを、ＲＴＣＳＲ混合液：１×選択緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．４）、１０ｍＭの$(NH_4)_2SO_4$、１０ｍＭのＫＣｌ、２ｍＭの$MgSO_4$）、２６０μＭのｄＮＴＰ、５３０ｎＭのフォワード及びリバースＲＮＡ含有プライマー（詳細は補足表１に記載）に再懸濁させた。再懸濁細胞を、１ｍＬゴム製シリンジプランジャーを備え、６００μＬの混合油（７３％Ｔｅｇｏｓｏｆｔ　ＤＥＣ、７％　ＡｂｉｌＷＥ０９（Ｅｖｏｎｉｋ）、及び２０％鉱物油（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ））が入った２ｍＬチューブに入れた。細胞及び混合油をＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ　ＬＴ（Ｑｉａｇｅｎ）に乗せ、４２Ｈｚで４分間のプログラムを用いて、乳濁液を作製した。乳化細胞を、９５℃－３分、２０×（９５℃－３０秒、６２℃－３０秒、６８℃－２分）のプログラムの熱サイクルに供した。反応物を遠心し（１０，０００×ｇ－５分）、上部油相を除去し、１５０μＬのH_2O及び７５０μＬのクロロホルムを加え、激しくボルテックスし、最後にフェーズロックチューブ（５Ｐｒｉｍｅ）中、相を分離することにより、乳濁液を脱乳化させた。水相を、ＰＣＲ精製カラムを用いて清澄させて、ＰＣＲ産物ならびにプラスミドＤＮＡを含む精製ＤＮＡを得た。相当する入れ子の外側になる（ｏｕｔｎｅｓｔｅｄ）回収プライマー（ｒｅｃｏｖｅｒｙ　ｐｒｉｍｅｒ）を用いた副次増幅により、逆転写されたポリメラーゼのみがＰＣＲ増幅されることを確実にする。典型的には、これは、２０回のＰＣＲサイクルで、Ａｃｃｕｐｒｉｍｅ　Ｐｆｘ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して、全精製乳濁液の１／１０を加える

ことにより達成されるが、しかしながら、選択のチャレンジラウンドでは、所望の増幅を達成するために、インプットＤＮＡまたはサイクル回数を増やす必要がでてくる可能性がある。

【００９１】

ポリメラーゼ変異体のクローニング及び精製－Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉのＤＨ１０Ｂ株及びＢＬ２１（ＤＥ３）株を、それぞれ、クローニング及び発現に使用した。これらの株は、Ｓｕｐｅｒｉｏｒまたは２ＸＹＴいずれかの増殖培地で維持した。ポリメラーゼを、ＮｄｅＩ部位及びＢａｍＨＩ部位を用いて、修飾ｐＥＴ２１ベクターにクローン導入した。各変異体を抱えるＢＬ２１（ＤＥ３）の一晩培養物を、Ｓｕｐｅｒｉｏｒブロス中３７℃で一晩生育させた。次いで、細胞を、１：２５０に希釈し、タンパク質産生を、対数増殖中期の間１８℃で２０時間、１ｍＭのＩＰＴＧで誘導した。回収した細胞を、急速凍結させ、１０ｍＭのリン酸、１００ｍＭのＮａＣｌ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのＤＴＴ、１０％グリセロール、ｐＨ７（緩衝液Ａ）中で超音波により溶解させた。清澄化細胞溶解液を、８５℃で２５分間加熱し、氷上で２０分間冷却し、濾過した（０．２μｍ）。次いで、濾液をＤＥＡＥカラムに通し、直ちに平衡化ヘパリンカラムに添加し、塩化ナトリウム勾配に合わせて溶出させた。ポリメラーゼ画分を回収し、緩衝液Ａ中に透析した。酵素を、さらに、ＳＰカラムを用い、再度塩勾配に合わせて溶出させることで精製した。次いで、プールした画分を、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（登録商標）１６／６０サイズ排除カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に添加し、濃縮し、保存緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、５０ｍＭのＫＣｌ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのＤＴＴ、０．１％のＮｏｎ－ｉｄｅｔ Ｐ４０、０．１％のＴｗｅｅｎ２０、５０％のグリセロール、ｐＨ８．０）中に透析した。作業原液は、０．２ｍｇ／ｍＬで作製した。

【００９２】

ＰＣＲプルーフリーディングアッセイ－５０μＬのＰＣＲ反応物を、１×アッセイ緩衝液（６０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．４）、２５ｍＭの$(NH_4)_2SO_4$、１０ｍＭのＫＣｌ）、２００μＭのｄＮＴＰ、２ｍＭの$MgSO_4$、４００ｎＭの（ＰＣＲＴｅｓｔ．Ｆ／ＰＣＲＴｅｓｔ．Ｒ）または（ＰＣＲＴｅｓｔ．ＤｉＤｅ．Ｆ／ＰＣＲＴｅｓｔ．ＤｉＤｅ．Ｒ）フォワード及びリバースプライマー、２０ｎｇのｐＴＥＴ．ＫＯＤプラスミド、及び０．２μｇポリメラーゼという最終濃度で構成した。反応物を、以下のプログラムを用いて熱サイクルに供した：９５℃－１分、２５×（９５℃－３０秒、５５℃－３０秒、６８℃－２分３０秒）。

【００９３】

プライマー伸長アッセイ－１０ｐｍｏｌの５’フルオレセイン標識化プライマー（ＲＴ．ＰｒｏｂｅまたはＲＴ．Ｐｒｏｂｅ．３ｄｄｃ）を、５０ｐｍｏｌのテンプレートＲＮＡまたはＤＮＡ（それぞれ、ＲＴ．ＲＮＡ．ＴＥＭＰ及びＲＴ．ＤＮＡ．ＴＥＭＰ）及び０．４μｇのポリメラーゼを用いて、８０℃で１分間熱変性させ、室温に冷却することにより、アニールした。１×アッセイ緩衝液、２ｍＭの$MgSO_4$、及び２００μＭのｄＮＴＰを含有する「開始」混合物を加えることにより、反応を開始した。反応物を、６８℃で１０分間インキュベートしてから、ＥＤＴＡを最終濃度が２５ｍＭになるまで加えて終了させた。１×色素（４７．５％ホルムアミド、０．０１％ＳＤＳ）及び１ｎｍｏｌの未標識ＲＴ．ｂｉｇＢｌｏｃｋｅｒオリゴヌクレオチド（テンプレート鎖と競合的に結合させるため）中、７５℃で５分間、試料を加熱することにより、標識化プライマーを、テンプレート鎖から除去した。試料を、２０％（７Ｍの尿素）アクリルアミドゲル上で泳動させた。

【００９４】

逆転写酵素忠実性（ＳＳＣＳ）－バーコードプライマーを用いた第一鎖逆転写またはプライマー伸長（プラスミドＤＮＡテンプレート）により、ＳＳＣＳ用テンプレートを用意した。重合反応は、組換えＭＭＬＶに関する製造元推奨（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）に従って行った。実験ポリメラーゼの場合、逆転写またはプライマー伸長は、１×アッセイ緩衝液、２００μＭのｄＮＴＰ、１ｍＭの$MgSO_4$、４００ｎＭのバー

コードリバースプライマー（ＨＳＰ．ｓｅｑＢＡＲ．Ｒまたはｐｏｌ２．ＳｅｑＢａｒ．Ｒ）、４０単位のＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ、０．２μｇのポリメラーゼ、及びテンプレート（１μｇのヒト心臓トータルＲＮＡまたは１ｎｇのプラスミド）中で行った。反応物を、６８℃で３０分間（ｃＤＮＡ合成）またはＤＮＡプライマー伸長の場合は２分間、インキュベートした。一本鎖産物を、Ａｃｃｕｐｒｉｍｅ　Ｐｆｘポリメラーゼ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）にｎｅｘｔＳｅｑ．Ｒ及び該当する指標付フォワードプライマーをともに用いて、ＰＣＲ増幅させた。試料を、ＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）ＭＩＳＥＱ（登録商標）ＰＥ　２×２５０シークエンサーに供した。

【００９５】

標的ＤＮＡシークエンシングリードを、アラインし、個別の逆転写事象にタグを付ける独自の分子バーコードに基づいて、ｕｓｔａｃｋｓ（ｖ１．３５）を用いてグループ分けした。一本鎖共通配列決定プログラム（ＳＳＣＳ）の改変版を用いて（Ｓｃｈｍｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）、３つ以上のリードを含むグループのみを分析した。これらのリードから、各位置で塩基の６６％超が一致したならば共通配列を築き、そうでなければ、塩基をＮと称して残りの解析では無視した。次いで、共通リードを、ＢＷＡ－ＭＥＭ（ｖ０．７．７）（Ｌｉ，　２０１３）を用いて、参照配列に対してアラインし、単独ヌクレオチド変異体及びインデルを同定した。ポリメラーゼ忠実性を、アラインした塩基の合計数に対する割合としてのインデル及び誤り塩基の合計として計算した。

【００９６】

ＲＴＰＣＲアッセイ－５０μＬの逆転写ＰＣＲ（ＲＴＰＣＲ）反応物を、以下の反応条件で、氷上で構成した：１×アッセイ緩衝液、１ｍＭのＭｇＳＯ$_4$、１Ｍのベタイン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、２００μＭのｄＮＴＰ、４００ｎＭのリバースプライマー、４００ｎＭのフォワードプライマー、４０単位のＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、０．２μｇのポリメラーゼ、及びＪｕｒｋａｔ、ヒト脾臓、またはＥ．ｃｏｌｉ（Ａｍｂｉｏｎ）由来の１μｇのトータルＲＮＡ。使用したプライマーセット：ＰｏｌＲ２Ａ（ＰｏｌＩＩ．Ｒ、ＰｏｌＩＩ．Ｆ１／Ｆ２／Ｆ４）、ｐ５３２（ｐ５３２．Ｒ、ｐ５３２．Ｆ１／Ｆ２／Ｆ５）、ｒｐｏＣ（ｒｐｏＣ．Ｒ、ｒｐｏＣ．Ｆ１／Ｆ２／Ｆ４）。反応物を、以下のパラメーターに従って熱サイクルに供した：６８℃－３０分、２５×（９５℃－３０秒、６８℃（ｒｐｏＣの場合６３℃）－３０秒、６８℃－３０ｓ／ｋｂ）。

【００９７】

単独ヌクレオチド組込み動態－等モル量の、ＤＮＡ　２５－ｍｅｒ（５’－ＣＣＣＴＣＧＣＡＧＣＣＧＴＣＣＡＡＣＣＡＡＣＴＣＡ－３’）（配列番号８）と、ＤＮＡまたはＲＮＡ　３６－ｍｅｒ（３’－ＧＧＧＡＧＣＧＴＣＧＧＣＡＧＧＴＴＧＧＴＴＧＡＧＴＧＣＣＴＣＴＴＧＴＴＴ－５’）（配列番号９）とを、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）中で混合することにより、二本鎖（ＤＮＡ：ＤＮＡまたはＤＮＡ：ＲＮＡ）を組み立てた。溶液を９５℃で５分間加熱し、１０分間ゆっくりと冷却して６０℃にし、ついで１５分間室温に冷却した。アッセイ緩衝液、１ｍＭのＭｇＳＯ４、及び５００ｎＭの二本鎖からなる反応物（１００μＬ）に、様々な量のα－Ｐ３２－ｄＣＴＰ（０．００３～４００μＭ）を加えて反応を開始させた。α－Ｐ３２－ｄＣＴＰは、未標識のｄＣＴＰに１：４００で希釈した。反応を、３～１４分進行させた。１５～１２０秒の間隔で１０μＬの分取試料に、ＥＤＴＡ（０．２５Ｍの最終濃度）を加えることにより反応停止した。分取試料（２μＬ）をＤＥ８１濾紙にスポットし、５％ＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$（ｐＨ７）中で６回洗い、ｄｄＨ$_2$Ｏ中で２回洗い、最後に９５％ＥｔＯＨ中で洗った。乾燥させた濾紙を、２４時間露光させて、ＳＴＯＲＭスキャナーで撮像した。ＦｉＪｉ（ＩｍａｇｅＪ）を用いて分析することにより、初期速度を得た。速度パラメーターは、ＳｉｇｍａＰｌｏｔ１０を用いて非線形回帰により求めた。

【００９８】

ＲＮＡ配列決定及び分析－Ｕ８７ＭＧ神経膠芽腫細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）ＨＴＢ－１４）のＲＮＡを、ｔｒｉｚｏｌ　ＬＳを用い、取扱説明書（１０２９６－０２８、Ｔｈ

ｅｒｍｏ ｆｉｓｈｅｒ ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に従って回収した。次いで、リボソームＲＮＡを、ＲＩＢＯ－ＺＥＲＯ（登録商標）ｒＲＮＡ除去キット（ＭＲＺＨ１１１２４、Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を用いてＲＮＡ試料から除去し、ＲＮＥＡＳＹ（登録商標）ＭＩＮＥＬＵＴＥ（登録商標）クリーンアップキット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて清澄化した。ｒＲＮＡ欠損ＲＮＡを、ＮＥＢＮＥＸＴ（登録商標）マグネシウムＲＮＡ断片化モジュール（Ｅ６１５０Ｓ、ＮＥＢ）を用いて、２００～３００ｂｐサイズ範囲に断片化し、続いてキナーゼ処理して、アダプターライゲーション用に調製した。ＮＥＢＮＥＸＴ（登録商標）Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ Ｓｍａｌｌ ＲＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐ ｋｉｔ（Ｅ７５８０、ＮＥＢ）を用いてＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）ライブラリーを調製し、ＡＭＰＵＲＥ（登録商標）ＸＰビーズを用いてサイズを選別して、アダプター二量体を除去した。実験の逆転写酵素及びライブラリー調製キットのＰＲＯＴＯＳＣＲＩＰＴ（登録商標）ＩＩ逆転写酵素を用いて、同一のＲＮＡプールから６つのＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）ライブラリーを調製した。ＲＮＡＳｅｑライブラリーを、Ａｕｓｔｉｎのテキサス大学のゲノム配列決定及び分析施設により、ＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）ＨＩＳＥＱ（登録商標）２０００シークエンサー、２×１００ｂｐで配列決定した。

【００９９】

ＲＮＡ－ｓｅｑ品質管理基準の評価を、ＲＮＡ－ＳｅＱＣ（ｖ１．１．８）を介して行った（ＤｅＬｕｃａ ｅｔ ａｌ．， ２０１２）。転写物量分析のため、ｃｕｆｆｌｉｎｋｓ／ｃｕｆｆｎｏｒｍパイプライン（ｖ２．２．１）（Ｔｒａｐｎｅｌｌ ｅｔ ａｌ．， ２０１２）を通じてｆｐｋｍ値を生成させ、両者をｌｏｇ２に変換して、範囲［－３，３］に当てはめた。

【０１００】

ＲＮＡサンガー配列決定－１×アッセイ緩衝液、１ｍＭの$MgSO_4$、１０ｐｍｏｌのＲＴ．Ｐｒｏｂｅ、５０ｐｍｏｌのサンガーＧＡＴＣテンプレート、０．４ｕｇのＣｏｒｅ３ｅｘｏ－、及び５０μＭのｄＮＴＰを用意することにより、サンガー配列決定反応を設定した。指示転写終結ヌクレオチドの場合、３’ジデオキシ転写終結対未修飾ＮＴＰを２５：１比で用いた。反応物を、６×（６８℃－２０秒、８５℃－５秒）の熱サイクルに供した。ＥＤＴＡを最終濃度２５ｍＭになるように加えて反応を終結させた。試料を、１×色素（４７．５％ホルムアミド、０．０１％ＳＤＳ）及び１ｎｍｏｌの未標識サンガーブロッカーオリゴヌクレオチド中、７５℃で５分間加熱することにより、標識化プライマーを除去した。

【実施例４】

【０１０１】

Ｂ細胞由来のペアVH及びVL配列の配列決定

全Ｂ細胞の単離－凍結ＰＢＭＣ（１ｍＬ中、１０００万の細胞）を、３７℃で解凍し、１０％ウシ胎児血清、１×非必須アミノ酸、１×ピルビン酸ナトリウム、１×グルタミン、１×ペニシリン／ストレプトマイシン、及び２０Ｕ／ｍＬのＤＮＡアーゼＩを補充したＲＰＭＩ１６４０（Ｌｏｎｚａ）５０ｍＬに再懸濁させ、遠心（３００ｇ、２０℃で１０分間）を介して回収した。次いで、細胞を４ｍＬのＲＰＭＩに再懸濁させ、３７℃にて３０分間で回収した。細胞を、１０ｍＬの冷ＭＡＣＳ緩衝液（０．５％ＢＳＡ及び２ｍＭのＥＤＴＡを補充したＰＢＳ）で希釈し、遠心（３００ｇ、４℃で１０分間）により回収し、Ｈｕｍａｎ Ｍｅｍｏｒｙ Ｂ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ＫｉｔにＬＤカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いて、取扱説明書とおりに、非Ｂ細胞を減少させた。これにより、１バイアルあたり、４００，０００～５００，０００のＢ細胞を得た。

【０１０２】

対になったＶＨ：ＶＬレパートリーの増幅－対になったＶＨ及びＶＬ配列を、注文設計した軸対称流路収束型装置（ａｘｉｓｙｍｍｅｔｒｉｃ ｆｌｏｗ ｆｏｃｕｓｉｎｇ ｄｅｖｉｃｅ）（ＤｅＫｏｓｋｙ ｅｔ ａｌ．， ２０１６）を用いて明らかにした。この装置は、３つの同心円状管を含む。全Ｂ細胞を６ｍＬの冷ＰＢＳに懸濁させ、最も内

側の管に０．５ｍＬ／分の速度で通した。Ｏｌｉｇｏ　ｄ（Ｔ）$_{25}$磁気ビーズ（径１μｍ、ビーズ４５μＬ／溶液ｍＬの濃度；ＮＥＢ）を洗浄し、集中型超音波処理（Ｃｏｖａｒｉｓ）に供してあらゆる凝集体を分離させ、６ｍＬの溶解緩衝液（１００ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５００ｍＭのＬｉＣｌ、１０ｍＭのＥＤＴＡ、１％ドデシル硫酸リチウム（ＬｉＤＳ）、５ｍＭのＤＴＴ）に再懸濁させ、中間の管に０．５ｍＬ／分の速度で通した。最も外側の管には、油相（４．５％Ｓｐａｎ－８０、０．４％Ｔｗｅｅｎ－８０、及び０．０５％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含有する鉱物油；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）が入っており、３ｍＬ／分で流れていた。細胞、ビーズ、及び溶解緩衝液は、注文設計した１２０μｍ径のオリフィスを通過するうちに乳化され、続いて、２ｍＬのマイクロ遠心チューブに収集された。各チューブを、数回、転回させ、２０℃で３分間インキュベートし、次いで氷上に置いた。収集段階に続いて、乳濁液を５０ｍＬ三角フラスコにプールし、遠心した（４，０００ｇ、４℃で５分間）。鉱物油（上相）をデカントし、乳濁液（下相）に、水飽和冷ジエチルエーテル（Ｆｉｓｃｈｅｒ）を加えて脱乳化させた。２回目の遠心分離工程（４，０００ｇ、４℃で５分間）後に磁気ビーズを回収し、１ｍＬの冷緩衝液１（１００ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ７．５）、５００ｍＭのＬｉＣｌ、１０ｍＭのＥＤＴＡ、１％のＬｉＤＳ、５ｍＭのＤＴＴ）に再懸濁させた。次いで、ビーズを、磁気棚を用いて系列的にペレット化し、以下の緩衝液で洗った：１ｍＬの溶解緩衝液、１ｍＬの緩衝液１、及び０．５ｍＬの緩衝液２（２０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ７．５）、５０ｍＭのＫＣｌ、３ｍＭのＭｇＣｌ）。ビーズを２等分し、次いで、それぞれを最後に１回ペレット化し、ＲＴ－ＰＣＲ混合物に再懸濁させた（ＤｅＫｏｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。ＲＴ－ＰＣＲ混合物には、ＶＨ及びＶＬフレームワーク領域１（ＦＲ１）リンケージプライマー（ｌｉｎｋａｇｅ　ｐｒｉｍｅｒ）またはＶＨ及びＶＬリーダーペプチド（ＬＰ）リンケージプライマーと、及びＣＯＲＥ３酵素「ＲＴＸ」または従来の逆転写酵素「Ｑｕａｎｔａ」いずれかが含まれていた。次いで、ＲＴ－ＰＣＲ混合物を、ＩＫＡ分散管（ＤＴ－２０、ＶＷＲ）に入った９ｍＬの冷却油相に滴下し、乳化分散装置（ＵＬＴＲＡ－ＴＵＲＲＡＸ（登録商標）ＴｕｂｅＤｒｉｖｅ；ＩＫＡ）を用いて、５分間乳化させた。乳濁液を、９６ウェルＰＣＲプレートに等分割して入れ（１００ｕＬ／ウェル）、以下の条件下でＲＴ－ＰＣＲに供した：５５℃で３０分、続いて９４℃で２分；９４℃で３０秒、５０℃で３０秒、７２℃で２分のサイクルを４回；９４℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で２分のサイクルを４回；９４℃で３０秒、６０℃で３０秒、７２℃で２分のサイクルを３２回；７２℃で７分；４℃で保持。

【０１０３】

ＲＴ－ＰＣＲ後、乳濁液を２ｍＬのマイクロ遠心チューブに収集して、遠心した（１６０００ｇ、２０℃で１０分間）。鉱物油（上相）をデカントし、水飽和エーテルを用いて、乳濁液を脱乳化させた。水相（ＤＮＡを含有する）に、順次エーテルを加え、試料を遠心し（１６０００ｇ、２０℃で３０秒間）、上部のエーテル相を除去することにより、水相を３回抽出した。微量のエーテルは、ＳｐｅｅｄＶａｃを用いて２０℃で３０分間除去した。ＤＮＡアンプリコンを、シリカスピンカラム（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を取扱説明書に従って用いることで精製し、４０μＬのH_2Oに溶出させた。次いで、２つの試料を、以下の条件下でＰｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いてネステッドＰＣＲで増幅させた：（ＦＲ１プライマー由来試料）９４℃で２分；９４℃で３０秒、６２℃で３０秒、７２℃で２０秒のサイクルを３２回；７２℃で７分；４℃で保持；（ＬＰプライマー由来試料）９４℃で２分；９４℃で３０秒、６２℃で３０秒、７２℃で２０秒のサイクルを２７回；７２℃で７分；４℃で保持。アンプリコンは、長さが約８５０ｂｐであるが、これを、ゲル抽出キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を取扱説明書に従って用いることで１％アガロースからゲル精製し、２０μＬのH_2Oに溶出させた。

【０１０４】

抗体発現試験のための全長ＶＨ及びＶＬリードを求めるため、対になったアンプリコンを、ＮＥＢＮＥＸＴ（登録商標）高忠実性ポリメラーゼ（ＮＥＢ）を用いて、さらなるＰ

ＣＲに供し、対になった鎖の他に全ＶＨ鎖及び全ＶＬ鎖を別々に特異的に増幅させた（注：対になったリードは、完全Ｊ領域及びＤ領域、ならびにＦＲ２からＣＤＲ３にわたるＶ領域の断片を、配列決定する）。各試料を５つの反応物に分割し、以下のＰＣＲ条件に供した：９８℃で３０秒；９８℃で１０秒、６２℃で３０秒、７２℃でＹ秒のサイクルをＸ回；７２℃で７分間；４℃で保持。最後に、これらの配列を、に示されるプロトコルに従って最後に１回ＴＳＢＣ適合性バーコード化プライマーを用いて増幅させ、ゲル精製キットを取扱説明書に従って用いることで１％アガロースからゲル精製し、ペアードエンドＩＬＬＵＭＩＮＡ（登録商標）次世代シークエンスに供した。得られるＶＨ：ＶＬペアを、ＣＯＲＥ３酵素を用いて得られたもの対従来のＲＴ酵素を用いて得られたものでクラスター化して図１３に示す。

【実施例５】

【０１０５】

逆転写酵素及び２’Ｏ－メチルＤＮＡ活性

プライマー伸長アッセイ－５ｐｍｏｌの５’フルオレセイン標識化プライマー（ＲＴ．ＮｏＵ．Ｐｒｏｂｅ）を、１２．５ｐｍｏｌのテンプレートＲＮＡ（ＲＴ．ＮｏＵ．Ｔｅｍｐｌａｔｅ）及び０．４μｇのポリメラーゼを用いて、８０℃で１分間熱変性させ、室温に冷却することにより、アニールした。これらの試験のため、テンプレートＲＮＡは、「Ｕ」位置を欠くように設計された。１×アッセイ緩衝液、１ｍＭのＭｇＳＯ４、及び２００μＭのｄＮＴＰを含有する「開始」混合物を加えることにより、反応を開始した。反応物を、６８℃で３０分間インキュベートした。試料を、１×色素（４７．５％ホルムアミド、０．０１％ＳＤＳ）及び１ｎｍｏｌの未標識ブロッカーオリゴヌクレオチド（テンプレート鎖と競合的に結合させるため）中、７５℃で５分間、加熱することにより、標識化プライマーを、テンプレート鎖から除去した。試料を、１５％（７Ｍの尿素）アクリルアミドゲル上で泳動させた。

【０１０６】

ＤＮＡ配列

RT. NoU. テンプレート　ACGCAAGGAGGCAAACGGAAAACAACGAGCAGGAGGGACGGCAGCGAGGG（配列番号１０）

RT. NoU. プローブ　CCCTCGCTGCCGTCCCTCCTG（配列番号１１）

【０１０７】

試験で調べたポリメラーゼ酵素は、ＫＯＤ酵素に基づいており、エキソヌクレアーゼ活性を欠いていた（Ｄ１４１Ａ及びＥ１４３Ａ置換の導入により）。この酵素は、ＲＮＡをテンプレートとするプライマー伸長活性に対する個別の置換の効果を試験するための陰性対照及びバックグラウンドの両方として機能した。ＣＯＲＥ３酵素（「ＲＴＸ」）は、陽性対照として用いた。試験した個別の置換は、Ｙ３８４Ｈ、Ｙ３８４Ｉ、Ｖ３８９Ｉ、Ｙ４９３Ｃ、Ｙ４９３Ｌ、Ｉ５２１Ｌ、Ｅ６６４Ｋ、及びＧ７１１Ｖであった。図１４の試験結果は、試験した置換のそれぞれが、陰性対照に比べて、ＲＮＡテンプレートでのプライマー伸長（ＲＴ）活性の向上を示したことを示し、Ｙ４９３Ｌ置換が、最も堅固な活性を示したことを示す。

【０１０８】

ポリメラーゼ酵素を、２’Ｏ－メチルＤＮＡテンプレートから重合させる能力についても試験した。プライマー伸長反応をリボース糖類似体［２’Ｏ－メチル（Ｍｅ）ＤＮＡ］で行ったところ、ＣＯＲＥ３（「ＲＴＸ」）逆転写活性が、効率は低くなるもの、代替テンプレートを伸長させることが可能であることを示し、ＲＮＡ基質の優先性を示した（図１５）。しかしながら、ＣＯＲＥ３酵素「ＲＴＸ」は、２’－ＯＭｅＤＮＡの使用において、依然として親の野生型よりはるかに効率的であった。

＊＊＊

【０１０９】

本開示及びその利点を詳細に説明してきたものの、当然ながら、添付の特許請求の範囲により定義されるとおりの本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変更、置換、及び代替を、本明細書に行うことができる。さらに、本出願の範囲は、本明細書に記載される、過程、機械、製造、組成物、手段、方法、及び工程の特定の実施形態に限定されることを意図しない。当業者なら、本発明の開示から容易にわかるだろうが、本明細書に記載される該当の実施形態と実質的に同じ機能を行うまたは実質的に同じ結果をもたらす既存のあるいは後に開発される過程、機械、製造、組成物、手段、方法、または工程を、本発明に従って利用することができる。したがって、添付の特許請求の範囲は、そのような過程、機械、製造、組成物、手段、方法、または工程を、その範囲内に含めるものとする。

【０１１０】

参照

本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、本発明が関連する当該分野の当業者のレベルを示す。全ての特許及び刊行物は、個々の刊行物がそれぞれ具体的かつ個別に参照として援用されると記載されたのと同程度に、そのまま全体が本明細書中に参照として援用される。

特許及び特許出願

ＥＰ１３１７５３９Ｂ

【０１１１】

文献

Aird, D. et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in ILLUMINA sequencing libraries. Genome Biol. 12, R18 (2011).

Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature 226, 1209-1211 (1970).

Bergen, K., Betz, K., Welte, W., Diederichs, K. & Marx, A. Structures of KOD and 9°N DNA Polymerases Complexed with Primer Template Duplex. ChemBioChem 14, 1058-1062 (2013).

Boeke, J. D. & Stoye, J. P. in Retroviruses (eds. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997). at available on the world wide web at ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19468/>

Cozens, C., Pinheiro, V. B., Vaisman, A., Woodgate, R. & Holliger, P. A short adaptive path from DNA to RNA polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 8067-8072 (2012).

DeKosky et al., Large-scale sequence and structural comparisons of human naive and antigen-experienced antibody repertoires. Proc. Nat. Acad. Sci. (2016).

DeLuca, D. S. et al. RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. Bioinforma. Oxf. Engl. 28, 1530-1532 (2012).

Eigen, M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. Naturwissenschaften 58, 465-523 (1971).

Firbank, S. J., Wardle, J., Heslop, P., Lewis, R. J. & Connolly, B. A. Uracil Recognition in Archaeal DNA Polymerases Captured by X-ray Crystallography. J. Mol. Biol. 381, 529-539 (2008).

Fogg, M. J., Pearl, L. H. & Connolly, B. A. Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. Nat. Struct. Biol. 9, 922-927 (2002).

Ghadessy, F. J., Ong, J. L. & Holliger, P. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 4552-4557 (2001).

Greagg, M. A. et al. A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 9045-9050 (1999).

Hansen, K. D., Brenner, S. E. & Dudoit, S. Biases in ILLUMINA(R) transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. Nucleic Acids Res. 38, e131-e131 (2010).

Killelea, T. et al. Probing the Interaction of Archaeal DNA Polymerases with Deaminated Bases Using X-ray Crystallography and Non-Hydrogen Bonding Isosteric Base Analogues. Biochemistry (Mosc.) 49, 5772-5781 (2010).

Kim, T. W., Delaney, J. C., Essigmann, J. M. & Kool, E. T. Probing the active site tightness of DNA polymerase in subangstrom increments. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 15803-15808 (2005).

Klarmann, G. J., Schauber, C. A. & Preston, B. D. Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in vitro. J. Biol. Chem. 268, 9793-9802 (1993).

Lauring, A. S. & Andino, R. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. PLoS Pathog. 6, e1001005 (2010).

Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM; alignment algorithm online at the arXiv website of Cornell University Library. (2013).

Lundberg, K. S. et al. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus. Gene 108, 1-6 (1991).

Nishioka, M. et al. Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. J. Biotechnol. 88, 141-149 (2001).

Pinheiro, V. B. et al. Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution. Science 336, 341-344 (2012).

Roberts, J. D., Bebenek, K. & Kunkel, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. Science 242, 1171-1173 (1988).

Schmitt, M. W. et al. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 14508-14513 (2012).

Takagi, M. et al. Characterization of DNA polymerase from Pyrococcus sp. strain KOD1 and its application to PCR. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4504-4510 (1997).

Temin, H. M. & Mizutani, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213 (1970).

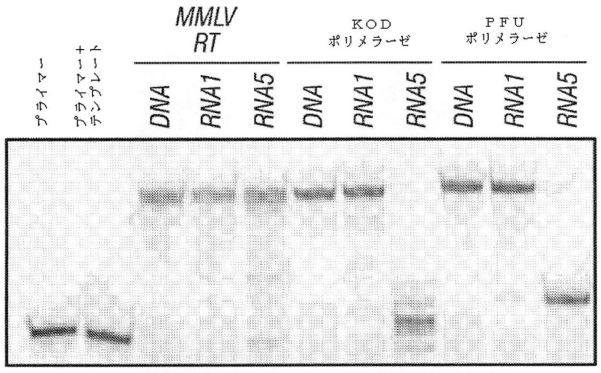
Trapnell, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nat. Protoc. 7, 562-578 (2012).

Wang, A. H.-J. et al. Molecular structure of r(GCG)d(TATACGC): a DNA-RNA hybrid helix joined to double helical DNA. Nature 299, 601-604 (1982).

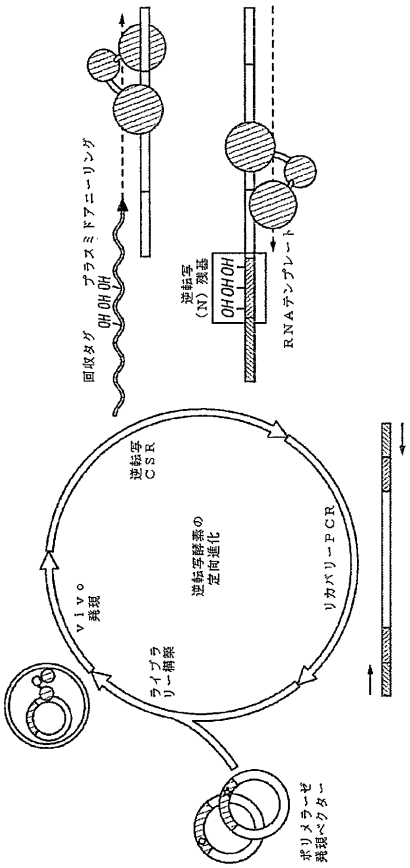
Wei, X. et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 373, 117-122 (1995).

Xiong, Y. & Eickbush, T. H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. EMBO J. 9, 3353-3362 (1990).

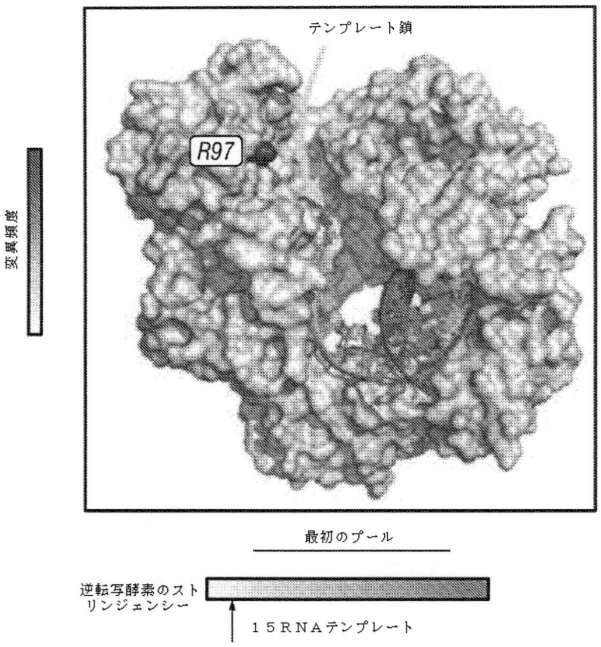
【図１Ａ】



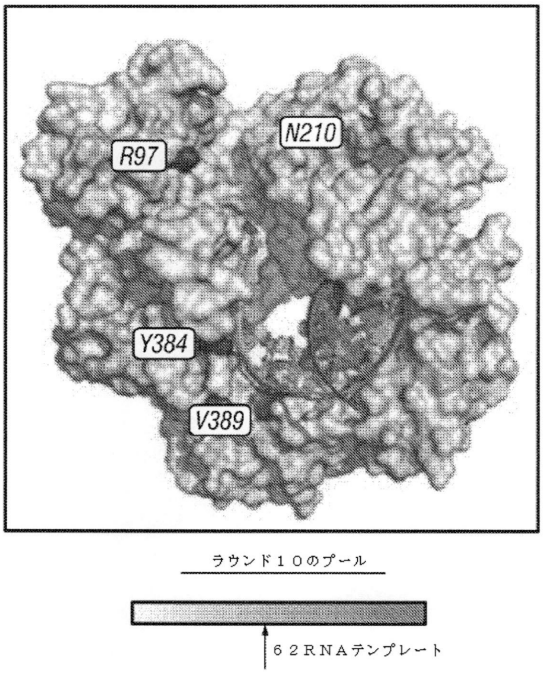
【図１Ｂ】



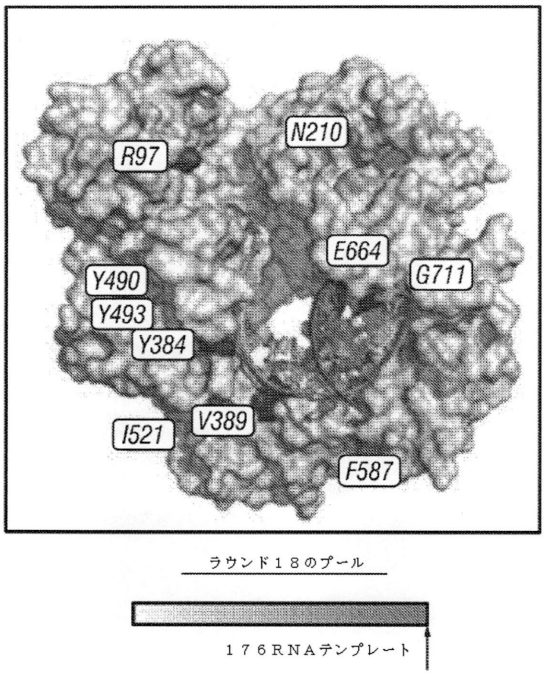
【図１Ｃ－１】



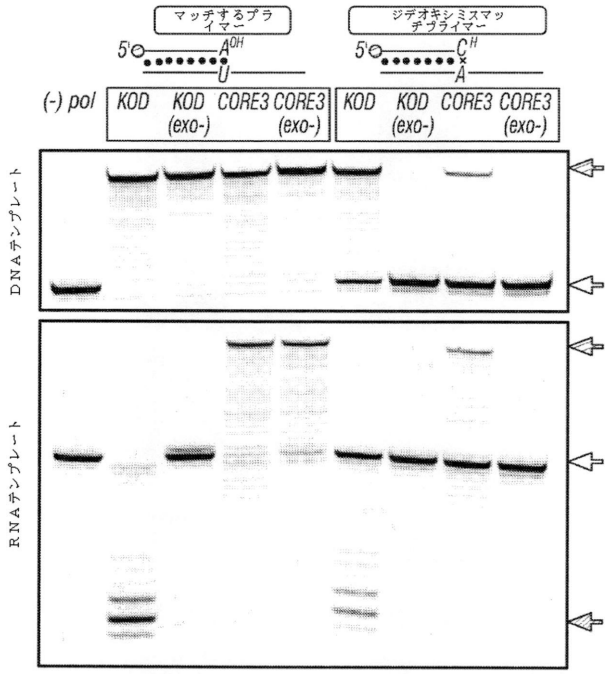
【図１Ｃ－２】



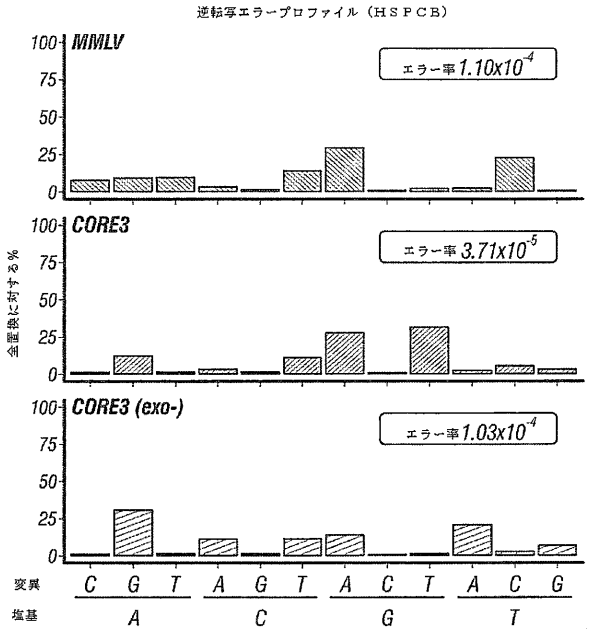
【図１Ｃ－３】



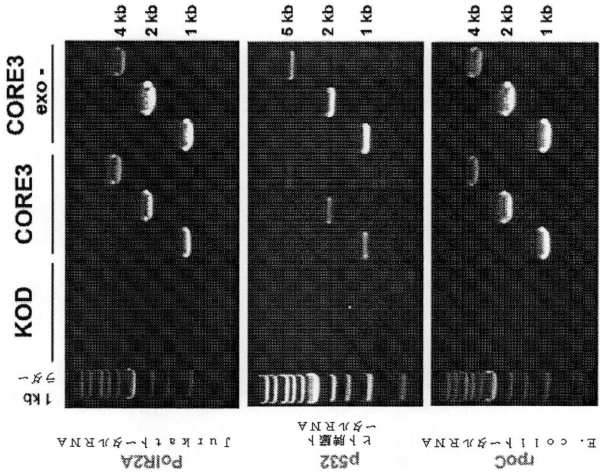
【図２Ａ】



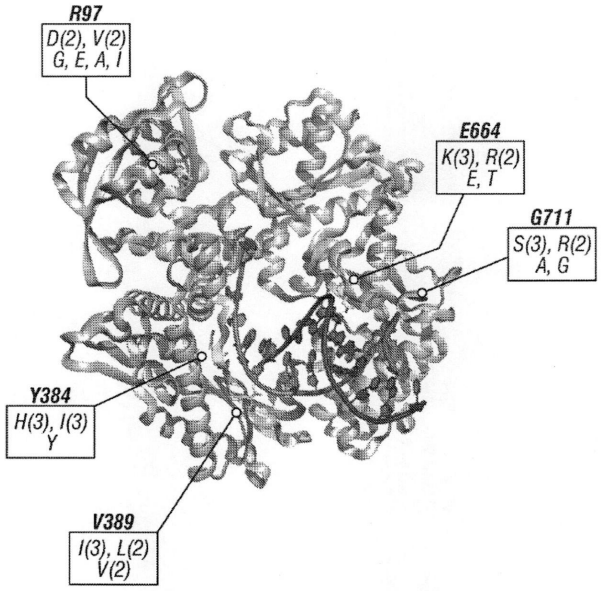
【図２Ｂ】


逆転写エラープロファイル（ＨＳＰＣＢ）
MMLV
エラー率 1.10x10-4
CORE3
エラー率 3.71x10-5
CORE3 (exo-)
エラー率 1.03x10-4
全置換に対する%
100
75
50
25
0
変異
塩基
C G T A G T A C T A C G
A C G T

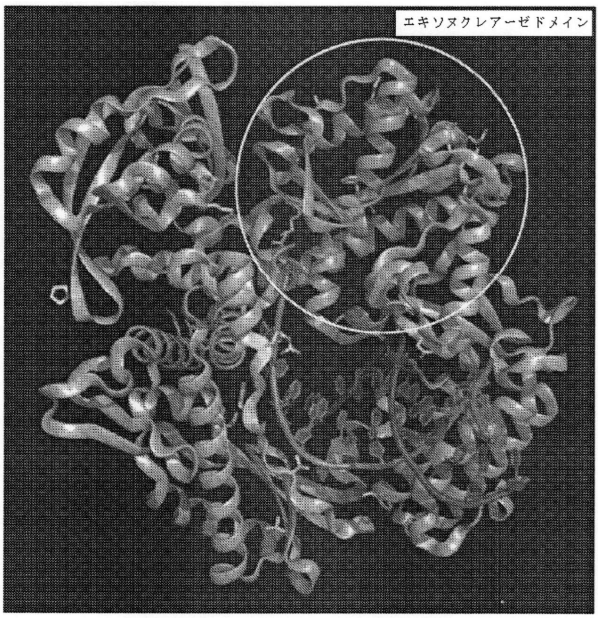
【図３】


CORE3 exo -
CORE3
KOD
ラダー
1 kb
4 kb
2 kb
1 kb
5 kb
2 kb
1 kb
4 kb
2 kb
1 kb
E. coli リボソームRNA
ヒト胎盤トランスファーRNA
Jurkat リボソームRNA
rpoC
p532
PolR2A

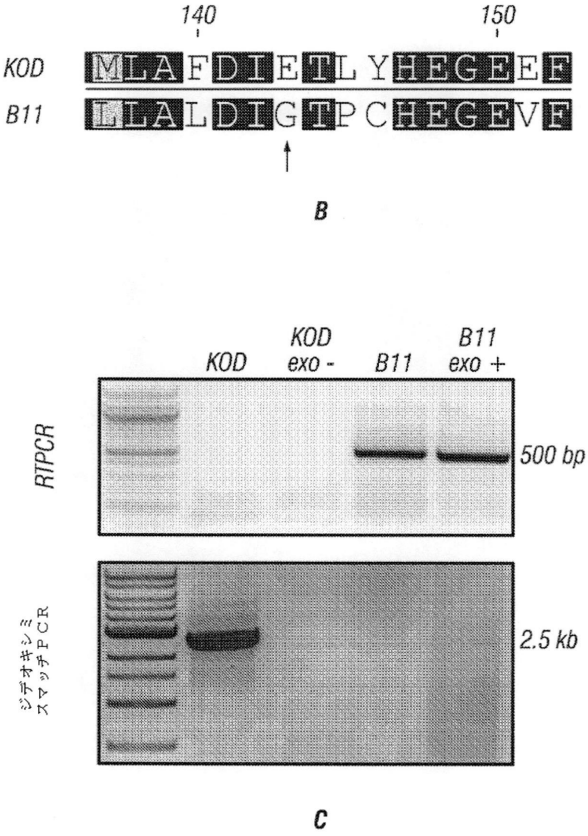
【図４】


R97
D(2), V(2)
G, E, A, I
E664
K(3), R(2)
E, T
G711
S(3), R(2)
A, G
Y384
H(3), I(3)
Y
V389
I(3), L(2)
V(2)

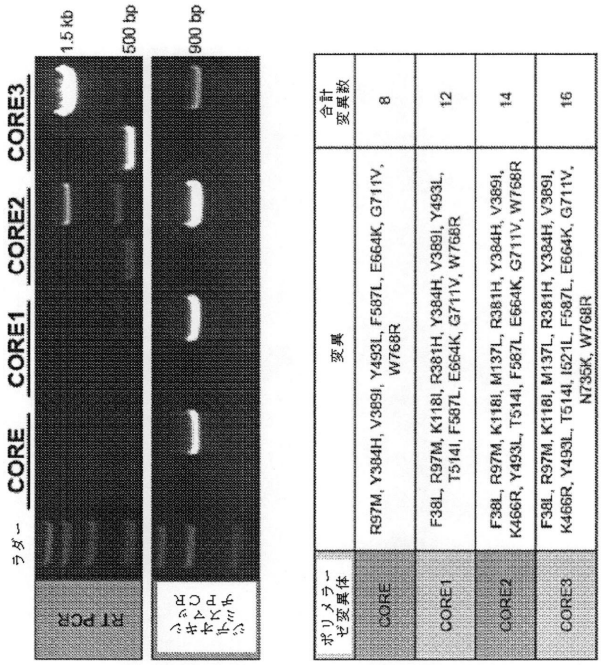
【図５－１】


エキソヌクレアーゼドメイン
A

【図５－２】

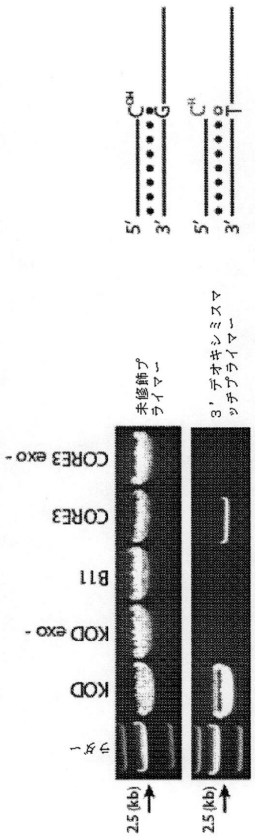


【図６】

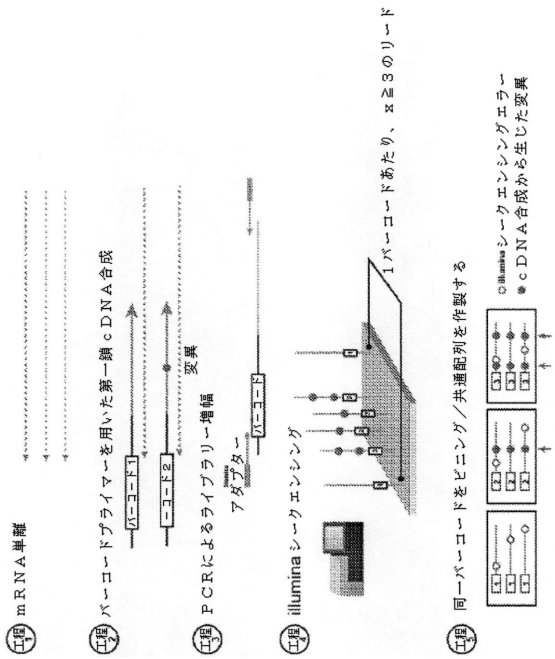


ポリメラーゼ変異体	変異	合計変異数
CORE	R97M, Y384H, V389I, Y493L, F587L, E664K, G711V, W768R	8
CORE1	F38L, R97M, K118I, R381H, Y384H, V389I, Y493L, T514I, F587L, E664K, G711V, W768R	12
CORE2	F38L, R97M, K118I, M137L, R381H, Y384H, V389I, K466R, Y493L, T514I, F587L, E664K, G711V, W768R	14
CORE3	F38L, R97M, K118I, M137L, R381H, Y384H, V389I, K466R, Y493L, T514I, I521L, F587L, E664K, G711V, N735K, W768R	16

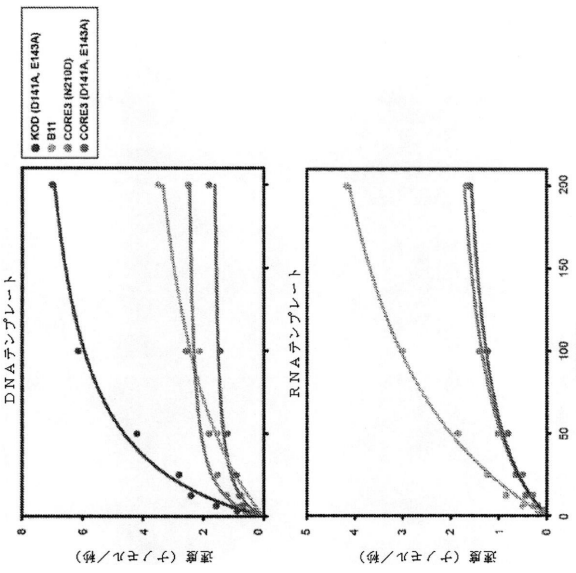
【図７】



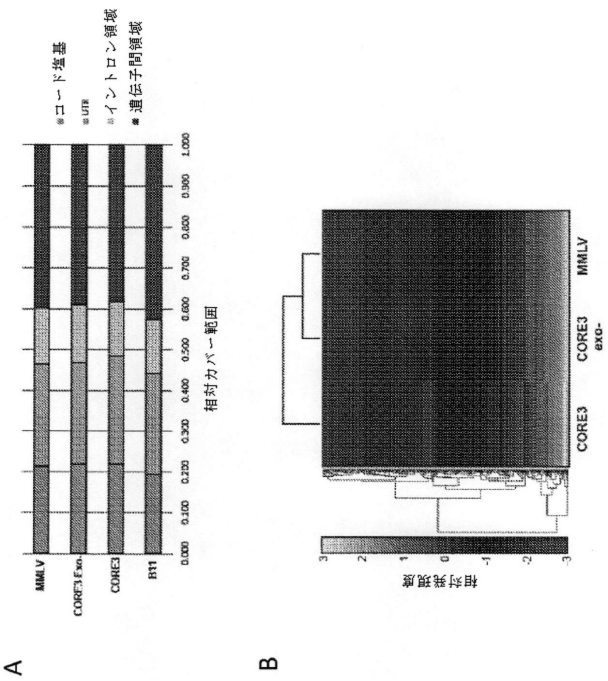
【図８】



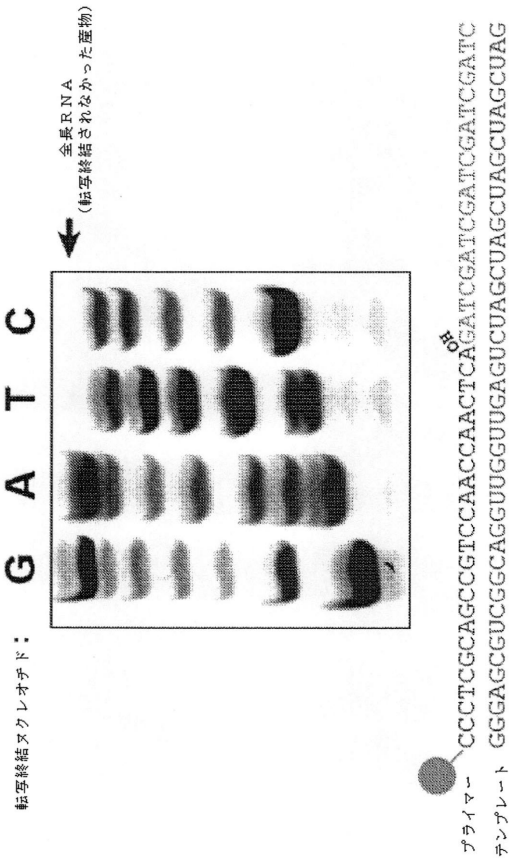
【図９】



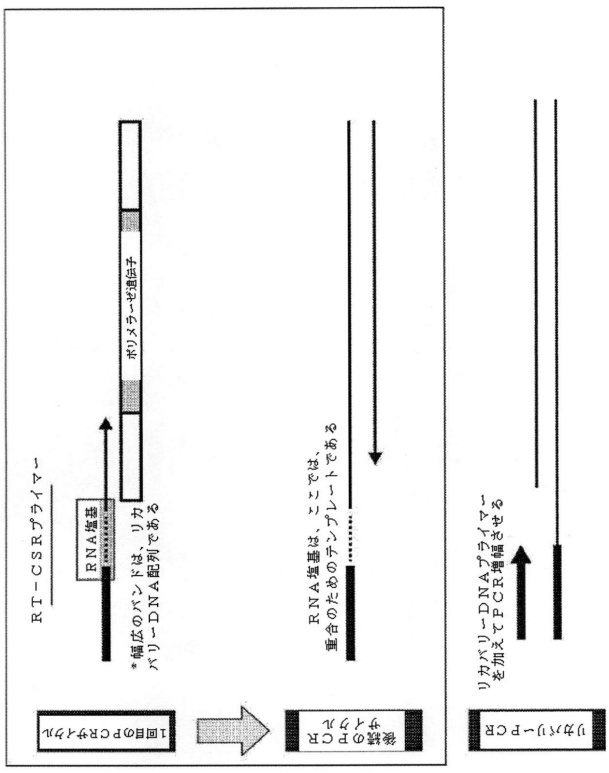
【図１０】



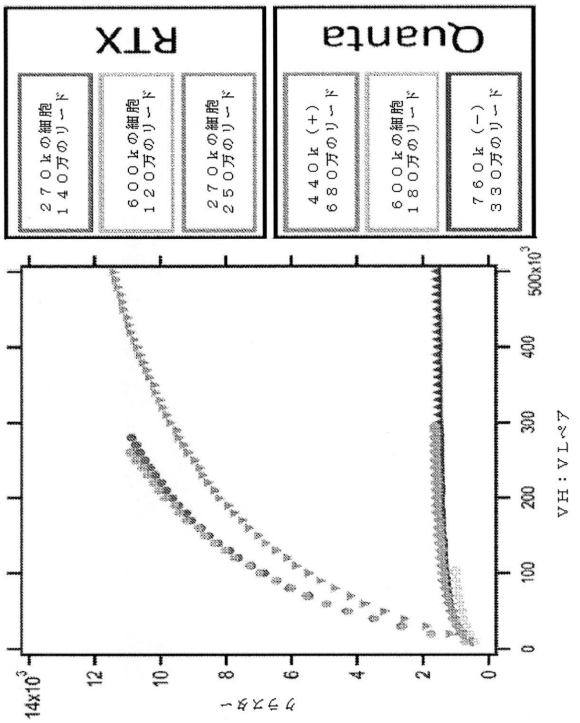
【図１１】



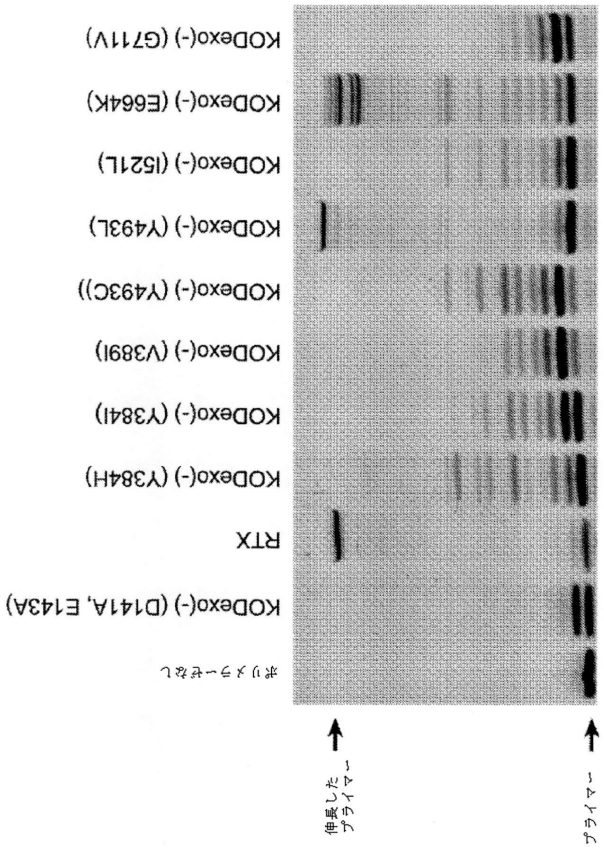
【図１２】



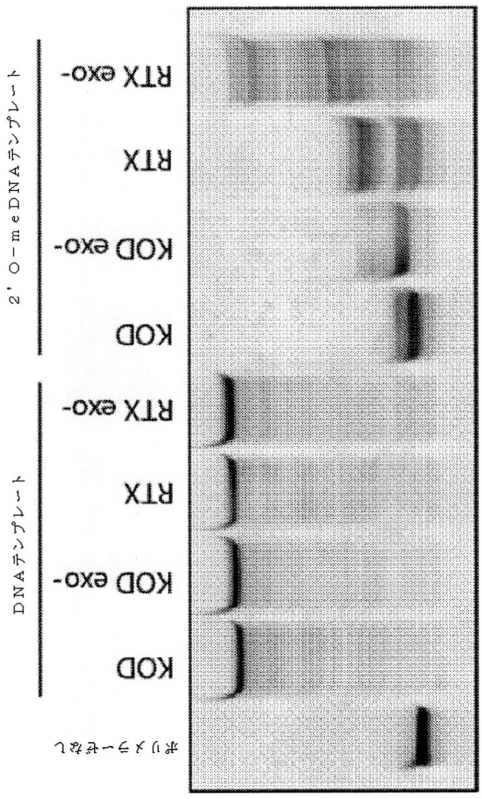
【図１３】


RTX
Quanta
２７０ｋの細胞
１４０万のリード
６００ｋの細胞
１２０万のリード
２７０ｋの細胞
２５０万のリード
４４０ｋ（＋）
６８０万のリード
６００ｋの細胞
１８０万のリード
７６０ｋ（－）
３３０万のリード
カウント
VH：VL比

【図１４】


未リクエスト
KODexo(-) (D141A, E143A)
RTX
KODexo(-) (Y384H)
KODexo(-) (Y384I)
KODexo(-) (V389I)
KODexo(-) (Y493C))
KODexo(-) (Y493L)
KODexo(-) (I521L)
KODexo(-) (E664K)
KODexo(-) (G711V)
伸長したプライマー
プライマー

【図１５】


未リクエスト
DNAテンプレート
KOD
KOD exo-
RTX
RTX exo-
2'-O-meDNAテンプレート
KOD
KOD exo-
RTX
RTX exo-

【配列表】
0006934477000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
(72)発明者 エリントン アンドリュー
アメリカ合衆国 テキサス州 ７８７０５ オースティン エルトン レーン ２１０６
(72)発明者 エレフソン ジャレッド
アメリカ合衆国 アリゾナ州 ８５７４９ ツーソン ノース ビダホチ ドライヴ ４３９１
(72)発明者 ゴリハー ジミー ディー
アメリカ合衆国 テキサス州 ７８７４５ オースティン イースト スタスニー レーン ６２５ アパートメント ８１０３

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００３／０２２８６１６（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１２－５０７９８６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００６／０３７０６４（WO，Ａ２）
ELLEFSON J. W. et al., Science, Vol.352 Issue 6293 (2016 Jun 24), p.1590-1593

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／０９－１５／９０
Ｃ１２Ｎ ９／００－９／９９
Ｃ１２Ｐ １９／３４
Ｃ１２Ｑ １／６８６
ＧｅｎＢａｎｋ／EMBL／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）