



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

野生型 M - M L V 逆転写酵素（配列番号 2）の S 6 7、T 1 9 7、及び E 3 0 2 からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも 1 つの変異を含む、単離された変異型 M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 2】

S 6 7 R、S 6 7 N、S 6 7 K、T 1 9 7 A、T 1 9 7 S、T 1 9 7 G、E 3 0 2 K、E 3 0 2 R、及び E 3 0 2 G からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を含む、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 3】

10

野生型 M - M L V 逆転写酵素（配列番号 2）の P 5 1、E 6 9、P 1 9 6、D 2 0 0、H 2 0 4、M 2 8 9、T 3 0 6、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、E 5 6 2、D 5 8 3、H 5 9 4、L 6 0 3、D 6 5 3、及び L 6 7 1 からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも 1 つの変異をさらに含む、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 4】

P 5 1 L、E 6 9 K、P 1 9 6 S、D 2 0 0 N、H 2 0 4 R、M 2 8 9 L、T 3 0 6 K、F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、F 3 0 9 I、W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、W 3 1 3 C、T 3 3 0 P、L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、L 4 3 5 R、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、E 5 6 2 Q、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、L 6 0 3 W、D 6 5 3 N、D 6 5 3 H、及び L 6 7 1 P からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を含む、請求項 3 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

20

## 【請求項 5】

野生型 M - M L V 逆転写酵素（配列番号 2）の P 5 1、S 6 7、E 6 9、T 1 9 7、H 2 0 4、E 3 0 2、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、D 5 8 3、H 5 9 4、D 6 5 3、及び L 6 7 1 からなる群より選択される各アミノ酸位置に変異を有する、請求項 3 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 6】

以下の変異：P 5 1 L、S 6 7 R、E 6 9 K、T 1 9 7 A、H 2 0 4 R、E 3 0 2 K、F 3 0 9 N、W 3 1 3 F、T 3 3 0 P、L 4 3 5 G、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、D 6 5 3 N、及び L 6 7 1 P を含む、請求項 5 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

30

## 【請求項 7】

R N a s e H 活性を欠く、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 8】

以下の特性：

- a．熱安定性、
- b．熱反応性、
- c．逆転写酵素阻害物質に対する向上した耐性、
- d．難しい鋳型を逆転写する向上した能力、
- e．向上した速度、
- f．向上した処理能力、
- g．向上した特異性、または
- h．向上した感受性

40

のうちの 1 つ以上を有する、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 9】

熱反応性である、請求項 8 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 10】

野生型 M - M L V によって 3 7 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 5 0 % 多い逆転写酵素生成物を 6 0 で 5 分以内に合成する、請求項 1 に記載の

50

前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 1】

野生型 M - M L V によって 3 7 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 7 5 % 多い逆転写酵素生成物を 6 0 で 5 分以内に合成する、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 2】

野生型 M - M L V によって 3 7 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 1 0 0 % 多い逆転写酵素生成物を 6 0 で 5 分以内に合成する、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 3】

野生型 M - M L V によって 3 7 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 2 0 0 % 多い逆転写酵素生成物を 6 0 で 5 分以内に合成する、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 4】

前記野生型 M - M L V 逆転写酵素の逆転写酵素活性と比較して向上した 6 0 の反応温度における逆転写酵素活性を示す、請求項 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 5】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 5 0 % 高い、請求項 1 4 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 6】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 7 5 % 高い、請求項 1 4 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 7】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 1 0 0 % 高い、請求項 1 4 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 8】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 2 0 0 % 高い、請求項 1 4 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 1 9】

野生型 M - M L V ( 配列番号 2 ) の P 5 1、E 6 9、P 1 9 6、D 2 0 0、H 2 0 4、M 2 8 9、T 3 0 6、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、E 5 6 2、D 5 8 3、H 5 9 4、L 6 0 3、D 6 5 3、及び L 6 7 1 からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも 6 つの変異を含む、単離された変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 2 0】

P 5 1 L、E 6 9 K、P 1 9 6 S、D 2 0 0 N、H 2 0 4 R、M 2 8 9 L、T 3 0 6 K、F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、F 3 0 9 I、W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、W 3 1 3 C、T 3 3 0 P、L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、L 4 3 5 R、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、E 5 6 2 Q、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、L 6 0 3 W、D 6 5 3 N、D 6 5 3 H、及び L 6 7 1 P からなる群より選択される少なくとも 6 つの変異を含む、請求項 1 9 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 2 1】

野生型 M - M L V ( 配列番号 2 ) の S 6 7、T 1 9 7、及び E 3 0 2 からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも 1 つの変異をさらに含む、請求項 1 9 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 2 2】

前記逆転写酵素が、S 6 7 R、S 6 7 N、S 6 7 K、T 1 9 7 A、T 1 9 7 S、T 1 9 7 G、E 3 0 2 K、E 3 0 2 R、及び E 3 0 2 G からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を含む、請求項 2 1 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 2 3】

10

20

30

40

50

R N a s e H 活性を欠く、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 24】

前記向上した逆転写酵素活性が、

- a . 向上した熱安定性、
- b . 向上した熱反応性、
- c . 逆転写酵素阻害物質に対する向上した耐性、
- d . 難しい鋳型を逆転写する向上した能力、
- e . 向上した速度、
- f . 向上した処理能力、
- g . 向上した特異性、及び
- h . 向上した感受性、

10

のうちの 1 つ以上を含む、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 25】

熱反応性である、請求項 24 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 26】

野生型 M - M L V によって 37 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 50 % 多い逆転写酵素生成物を 60 で 5 分以内に合成する、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 27】

野生型 M - M L V によって 37 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 75 % 多い逆転写酵素生成物を 60 で 5 分以内に合成する、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

20

【請求項 28】

野生型 M - M L V によって 37 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 100 % 多い逆転写酵素生成物を 60 で 5 分以内に合成する、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 29】

野生型 M - M L V によって 37 で 5 分後に合成される逆転写酵素生成物の量よりも少なくとも 200 % 多い逆転写酵素生成物を 60 で 5 分以内に合成する、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

30

【請求項 30】

前記野生型 M - M L V 逆転写酵素の逆転写酵素活性と比較して向上した 60 の反応温度における逆転写酵素活性を示す、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 31】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 50 % 高い、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 32】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 75 % 高い、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

40

【請求項 33】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 100 % 高い、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 34】

前記向上した逆転写酵素活性が、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性と比較して少なくとも 200 % 高い、請求項 19 に記載の前記変異型 M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 35】

配列番号 4 に対して少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有する、単離された変異型逆転写酵素。

【請求項 36】

50

配列番号 4 を含む、請求項 3 5 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 3 7】

配列番号 4 からなる、請求項 3 5 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 3 8】

6 0 で熱安定性である、請求項 3 5 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 3 9】

6 0 で少なくとも 5 分間熱安定性である、請求項 3 5 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 4 0】

6 0 で少なくとも 5 分間熱反応性である、請求項 3 5 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 4 1】

6 0 で少なくとも 1 5 分間熱反応性である、請求項 4 0 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 4 2】

野生型 M - M L V 逆転写酵素と比較して熱安定性を向上させるかまたは強化するように変異している、単離された M - M L V 逆転写酵素であって、

a . S 6 7 R、

b . T 1 9 7 A、及び

c . E 3 0 2 K

からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を含む、前記単離された M - M L V 逆転写酵素。

【請求項 4 3】

a . P 5 1 L、

b . E 6 9 K、

c . H 2 0 4 R、

d . F 3 0 9 N、

e . W 3 1 3 F、

f . T 3 3 0 P、

g . L 4 3 5 G、

h . N 4 5 4 K、

i . D 5 2 4 G、

j . D 5 8 3 N、

k . H 5 9 4 Q、

l . D 6 5 3 N、及び

m . L 6 7 1 P

からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異をさらに含む、請求項 4 2 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 4 4】

4 5 に 1 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 4 2 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 4 5】

5 0 に 1 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 4 2 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 4 6】

5 5 に 1 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 4 2 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 4 7】

6 0 に 1 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 4 2 に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 48】

60 に1分間加熱した後に少なくとも70%の逆転写酵素活性を保持する、請求項42に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 49】

60 に1分間加熱した後に少なくとも80%の逆転写酵素活性を保持する、請求項42に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 50】

60 に1分間加熱した後に少なくとも90%の逆転写酵素活性を保持する、請求項42に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 51】

50 に5分間加熱した後に少なくとも50%の逆転写酵素活性を保持する、請求項42に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 52】

50 に15分間加熱した後に少なくとも50%の逆転写酵素活性を保持する、請求項42に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 53】

50 に60分間加熱した後に少なくとも50%の逆転写酵素活性を保持する、請求項42に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 54】

野生型 M - M L V 逆転写酵素と比較して熱安定性を向上させるかまたは強化するように変異している、単離された M - M L V 逆転写酵素であって、

- a . P 5 1 L、
- b . E 6 9 K、
- c . H 2 0 4 R、
- d . F 3 0 9 N、
- e . W 3 1 3 F、
- f . T 3 3 0 P、
- g . L 4 3 5 G、
- h . N 4 5 4 K、
- i . D 5 2 4 G、
- j . D 5 8 3 N、
- k . H 5 9 4 Q、
- l . D 6 5 3 N、及び
- m . L 6 7 1 P

からなる群より選択される少なくとも6つの変異を含む、前記単離された M - M L V 逆転写酵素。

## 【請求項 55】

- a . S 6 7 R、
- b . T 1 9 7 A、及び
- c . E 3 0 2 K

からなる群より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む、請求項54に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 56】

45 に1分間加熱した後に少なくとも50%の逆転写酵素活性を保持する、請求項54に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 57】

50 に1分間加熱した後に少なくとも50%の逆転写酵素活性を保持する、請求項54に記載の前記逆転写酵素。

## 【請求項 58】

55 に1分間加熱した後に少なくとも50%の逆転写酵素活性を保持する、請求項5

10

20

30

40

50

4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 5 9】

6 0 に 1 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 5 4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 6 0】

6 0 に 1 分間加熱した後に少なくとも 7 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 5 4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 6 1】

6 0 に 1 分間加熱した後に少なくとも 8 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 5 4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 6 2】

6 0 に 1 分間加熱した後に少なくとも 9 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 5 4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 6 3】

5 0 に 5 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 5 4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 6 4】

5 0 に 1 5 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 5 4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 6 5】

5 0 に 6 0 分間加熱した後に少なくとも 5 0 % の逆転写酵素活性を保持する、請求項 5 4 に記載の前記逆転写酵素。

【請求項 6 6】

6 0 で 5 分以内に少なくとも 7 . 5 k b の c D N A を生成することができる、単離された変異型逆転写酵素。

【請求項 6 7】

6 0 で 1 5 分以内に少なくとも 9 . 5 k b の c D N A を生成することができる、単離された変異型逆転写酵素。

【請求項 6 8】

6 0 で少なくとも 5 分間熱安定性である、単離された変異型逆転写酵素。

【請求項 6 9】

6 0 で少なくとも 1 5 分間熱安定性である、請求項 6 8 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 7 0】

6 0 で少なくとも 3 0 分間熱安定性である、請求項 6 8 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 7 1】

6 0 で少なくとも 5 分間熱反応性である、単離された変異型逆転写酵素。

【請求項 7 2】

6 0 で少なくとも 1 5 分間熱反応性である、請求項 7 1 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 7 3】

6 0 で少なくとも 3 0 分間熱反応性である、請求項 7 1 に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 7 4】

変異型 M - M L V 逆転写酵素である、請求項 6 6 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の前記変異型逆転写酵素。

【請求項 7 5】

変異型 M - M L V 逆転写酵素と緩衝液とを含む、核酸合成のための組成物であって、前記変異型逆転写酵素が、野生型 M - M L V 逆転写酵素 ( 配列番号 2 ) の配列に対応するア

10

20

30

40

50

ミノ酸位置に少なくとも1つの変異を含み、少なくとも1つの前記アミノ酸位置が、S 67、T 197、及びE 302からなる群より選択される、前記組成物。

【請求項76】

1つ以上のヌクレオチド、1つ以上のDNAポリメラーゼ、1つ以上の界面活性剤、1つ以上のプライマー、1つ以上のホットスタート用成分、及び1つ以上の停止剤からなる群より選択される1つ以上の構成要素をさらに含む、請求項75に記載の前記組成物。

【請求項77】

前記停止剤がジデオキシヌクレオチドである、請求項76に記載の前記組成物。

【請求項78】

変異型M - M L V逆転写酵素と緩衝液とを含む、核酸合成のための組成物であって、前記変異型逆転写酵素が、野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも6つの変異を含み、少なくとも6つの前記アミノ酸位置が、P 51、E 69、H 204、F 309、W 313、T 330、L 435、N 454、D 524、D 583、H 594、D 653、及びL 671からなる群より選択される、前記組成物。

10

【請求項79】

1つ以上のヌクレオチド、1つ以上のDNAポリメラーゼ、1つ以上の界面活性剤、1つ以上のプライマー、1つ以上のホットスタート用成分、及び1つ以上の停止剤からなる群より選択される1つ以上の構成要素をさらに含む、請求項78に記載の前記組成物。

【請求項80】

前記停止剤がジデオキシヌクレオチドである、請求項79に記載の前記組成物。

20

【請求項81】

変異型M - M L V逆転写酵素と緩衝液とを含む、核酸合成のための組成物であって、前記変異型逆転写酵素が、配列番号4に少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する、前記組成物。

【請求項82】

1つ以上のヌクレオチド、1つ以上のDNAポリメラーゼ、1つ以上の界面活性剤、1つ以上のプライマー、1つ以上のホットスタート用成分、及び1つ以上の停止剤からなる群より選択される1つ以上の構成要素をさらに含む、請求項81に記載の前記組成物。

【請求項83】

前記停止剤がジデオキシヌクレオチドである、請求項82に記載の前記組成物。

30

【請求項84】

野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも1つの変異を有する変異型M - M L V逆転写酵素の使用を含む、核酸合成のための方法であって、少なくとも1つの前記アミノ酸位置が、S 67、T 197、及びE 302からなる群より選択される、前記方法。

【請求項85】

1つ以上の核酸分子の逆転写のための方法であって、

a. 1つ以上の核酸鋳型を1つ以上の逆転写酵素とともに含む混合物を調製する工程と

40

b. 前記1つ以上の核酸鋳型の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の第1の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、前記混合物をインキュベートする工程と、を含み、前記1つ以上の逆転写酵素が、野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも1つの変異を含み、少なくとも1つの前記アミノ酸位置が、S 67、T 197、及びE 302からなる群より選択される、前記方法。

【請求項86】

前記核酸鋳型が、メッセンジャーRNA分子、またはmRNA分子の集団である、請求項85に記載の前記方法。

【請求項87】

前記1つ以上の第1の核酸分子の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の第2の核酸分

50



子を作製するのに十分な条件下で、前記１つ以上の第１の核酸分子をインキュベートする工程をさらに含む、請求項８５に記載の前記方法。

【請求項８８】

前記インキュベートする工程が約６０の温度で行われる、請求項８５に記載の前記方法。

【請求項８９】

１つ以上の核酸分子を増幅させるための方法であって、

a．１つ以上の核酸鋳型を、１つ以上の逆転写酵素及び１つ以上のＤＮＡポリメラーゼと混合する工程と、

b．前記１つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な１つ以上の核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、前記混合物をインキュベートする工程と、を含み、

前記１つ以上の逆転写酵素が、野生型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素（配列番号２）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも１つの変異を含み、少なくとも１つの前記アミノ酸位置が、Ｓ６７、Ｔ１９７、及びＥ３０２からなる群より選択される、前記方法。

【請求項９０】

前記インキュベートする工程が約６０の温度で行われる、請求項８９に記載の前記方法。

【請求項９１】

前記１つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な前記増幅された核酸分子の全てまたは一部分のヌクレオチド配列を決定する工程をさらに含む、請求項８９に記載の前記方法。

【請求項９２】

野生型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素（配列番号２）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも１つの変異を有する変異型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素の使用を含む、核酸合成のための方法であって、少なくとも６つの前記アミノ酸位置が、Ｐ５１、Ｅ６９、Ｈ２０４、Ｆ３０９、Ｗ３１３、Ｔ３３０、Ｌ４３５、Ｎ４５４、Ｄ５２４、Ｄ５８３、Ｈ５９４、Ｄ６５３、及びＬ６７１からなる群より選択される、前記方法。

【請求項９３】

１つ以上の核酸分子の逆転写のための方法であって、

a．１つ以上の核酸鋳型を１つ以上の逆転写酵素とともに含む混合物を調製する工程と、

b．前記１つ以上の核酸鋳型の全てまたは一部分に相補的な１つ以上の第１の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、前記混合物をインキュベートする工程と、を含み、前記１つ以上の逆転写酵素が、野生型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素（配列番号２）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも６つの変異を含み、少なくとも６つの前記アミノ酸位置が、Ｐ５１、Ｅ６９、Ｈ２０４、Ｆ３０９、Ｗ３１３、Ｔ３３０、Ｌ４３５、Ｎ４５４、Ｄ５２４、Ｄ５８３、Ｈ５９４、Ｄ６５３、及びＬ６７１からなる群より選択される、前記方法。

【請求項９４】

前記核酸鋳型が、メッセンジャーＲＮＡ分子、またはｍＲＮＡ分子の集団である、請求項９３に記載の前記方法。

【請求項９５】

前記１つ以上の第１の核酸分子の全てまたは一部分に相補的な１つ以上の第２の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、前記１つ以上の第１の核酸分子をインキュベートする工程をさらに含む、請求項９３に記載の前記方法。

【請求項９６】

前記インキュベートする工程が約６０の温度で行われる、請求項９３に記載の前記方法。

【請求項９７】

１つ以上の核酸分子を増幅させるための方法であって、

10

20

30

40

50

a. 1つ以上の核酸鋳型を、1つ以上の逆転写酵素及び1つ以上のDNAポリメラーゼと混合する工程と、

b. 前記1つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、前記混合物をインキュベートする工程と、を含み、

前記1つ以上の逆転写酵素が、野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも6つの変異を含み、少なくとも6つの前記アミノ酸位置が、P 5 1、E 6 9、H 2 0 4、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、D 5 8 3、H 5 9 4、D 6 5 3、及びL 6 7 1からなる群より選択される、前記方法。

【請求項98】

前記インキュベートする工程が約60の温度で行われる、請求項97に記載の前記方法。

【請求項99】

前記1つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な前記増幅された核酸分子の全てまたは一部分のヌクレオチド配列を決定する工程をさらに含む、請求項97に記載の前記方法。

【請求項100】

1つ以上のパッケージ化格納容器に変異型M - M L V逆転写酵素を含むキットであって、前記変異型逆転写酵素が、野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも1つの変異を含み、少なくとも1つの前記アミノ酸位置が、S 6 7、T 1 9 7、及びE 3 0 2からなる群より選択される、前記キット。

【請求項101】

1つ以上のパッケージ化格納容器に変異型M - M L V逆転写酵素を含むキットであって、前記変異型逆転写酵素が、野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも6つの変異を含み、少なくとも6つの前記アミノ酸位置が、P 5 1、E 6 9、H 2 0 4、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、D 5 8 3、H 5 9 4、D 6 5 3、及びL 6 7 1からなる群より選択される、前記キット。

【請求項102】

逆転写酵素活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸であって、前記ポリペプチドが、配列番号4に少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、前記単離された核酸。

【請求項103】

請求項102に記載の前記核酸を含む、ベクター。

【請求項104】

請求項102に記載の前記核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む、発現ベクター。

【請求項105】

請求項102に記載の前記核酸を含む、宿主細胞。

【請求項106】

請求項35に記載の前記変異型逆転写酵素を含む、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸分子の逆転写のための、逆転写酵素（RT）、ならびに新規な酵素を含む組成物、方法、及びキットを提供する。

【背景技術】

【0002】

逆転写酵素は、RNAをDNAに変換する、生物学における基礎的な酵素である。これらの酵素は、生物の基本的過程の多くを見出すために使用されている有益な研究ツール

10

20

30

40

50

の基礎を成している。分子診断に関して、これらの酵素は、そのような診断の重要な構成要素であり、したがって、例えば癌を含む多数の疾患の診断及び管理を容易にする新しいツールである。このように、改善された特性、例えば改善された効率を有する改善された逆転写酵素は、分子診断の向上につながるため、そのような改善された酵素が望ましい。

#### 【 0 0 0 3 】

逆転写の効率に影響を及ぼす要因は、二次構造を形成するRNAの能力である。そのような二次構造は、例えば、RNA分子の領域が、ハイブリダイズして二本鎖RNAを形成するのに十分な相補性を有する場合に、形成され得る。一般に、RNA二次構造の形成は、RNA分子を含有する溶液の温度を上昇させると低減され得る。したがって、多くの事例では、37 を超える温度でRNAを逆転写することが望ましい。しかしながら、逆転写酵素は、通常、37 を上回る温度（例えば、50 ）でインキュベートすると、失活する。

10

#### 【 0 0 0 4 】

逆転写酵素を用いる方法（そのような酵素を用いた分子診断方法を含む）の精度は、向上した熱安定性及び／または熱反応性を有する逆転写酵素の発見によって改善されるであろう。そのような酵素が利用可能となれば、精度を向上させるために他の熱安定性酵素に用いられている方法を、熱安定性逆転写酵素を用いた新しい方法の想起に用いることができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）方法の精度を向上させるために、「ホットスタート」アプローチが熱安定性ポリメラーゼとともに用いられている。一例では、米国特許第5,338,671号（特許文献1）には、熱安定性DNAポリメラーゼに特異的な抗体を用いて低温（例えば、70 未満）でのDNAポリメラーゼ活性を阻害することが記載されている。シトラコン酸無水物による化学処理は、ホットスタートPCRが達成されている別の方法である（例えば、米国特許第5,773,258号（特許文献2）及び米国特許第5,677,152号（特許文献3）を参照されたい）。そのようなホットスタートアプローチを逆転写に適用することは、困難であることが示されている。これは、例えば、多くの逆転写酵素が熱安定性でないことに起因する。

20

#### 【 0 0 0 5 】

さらに、核酸が抽出される生体試料は、逆転写に阻害性である追加の化合物を含有していることが多い。土壌、植物、及び糞便中のフミン酸、血液中のヘマチン、血清中の免疫グロブリンG、ならびにヘパリン及びクエン酸等の種々の血液抗凝固薬は、全て、そのような阻害物質の例である。そのような阻害物質は、核酸の抽出及び生成プロセス中に完全に除去することができず、そのため、逆転写の結果として生成されるcDNA生成物の減少に反映されるように、下流の核酸に負の影響を及ぼす。

30

#### 【 0 0 0 6 】

したがって、上述の欠点のうちのいくつかを克服する、改善された逆転写酵素、ならびにそのような逆転写酵素を含む組成物、キット、及び方法が、本発明によって達成される。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 0 7 】

40

【 特許文献 1 】 米国特許第 5 , 3 3 8 , 6 7 1 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 5 , 7 7 3 , 2 5 8 号

【 特許文献 3 】 米国特許第 5 , 6 7 7 , 1 5 2 号

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 0 8 】

本発明は、改善された特性を有する変異型逆転写酵素、ならびにそのような新規な酵素を含む組成物、キット、及び方法を提供する。したがって、本発明は、ある特定の実施形態において、熱安定性の向上、熱反応性の向上、及び／または速度の向上、ならびに阻害耐性の向上、例えば、ポリフェノール様化合物に対する耐性、難しいRNA鋳型によるcDNA生成の向上、及び特異性の向上といった追加の有益な特性を呈する、変異型逆転写

50

酵素を提供し、そのような逆転写酵素を使用して、核酸分子、例えば、mRNA分子を逆転写、増幅、または配列決定すること等による、生成方法を提供する。例示的な実施形態において、本発明の変異型逆転写酵素は、前述の特性のうちの2つ以上を含む。他の有益な特性を有する変異型逆転写酵素が本明細書に提供され、そのうちのいくつかには、さらなる前述の特徴のうちの1つ以上が含まれる。ある特定の実施形態において、本発明は、本明細書に提供される変異型逆転写酵素を含む、保管組成物及び反応混合物といった、キット及び組成物を提供する。

#### 【0009】

ある特定の例示的な実施形態において、変異型逆転写酵素は、特に、高い温度で行われる逆転写に関して、逆転写効率の向上をもたらす。したがって、ある特定の例示的な実施形態において、本発明は、核酸合成反応中の酵素の熱安定性及び/熱反応性を向上させる、1つ以上のアミノ酸の変化がなされた変異型逆転写酵素を提供する。

#### 【0010】

一部の実施形態では、本発明は、マロニーマウス白血病ウイルス(Maloney Murine Leukemia Virus)(M-MLV)逆転写酵素に由来する変異型逆転写酵素を対象とする。具体的には、本発明は、配列番号2で表されるM-MLV逆転写酵素の野生型アミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基と置換することによって、熱安定性が向上した逆転写酵素を提供する。一部の実施形態において、より高い熱安定性及び/熱反応性(ならびに本明細書に開示される他の特性)を得るための変異または修飾の標的となるアミノ酸位置が、表1に列举される。例えば、本発明は、P51、S67、E69、T197、H204、E302、F309、W313、T330、L435、N454、D524、D583、H594、D653、及び/またはL671からなる群より選択される野生型M-MLVに対応するアミノ酸位置に特定の変異(またはそれらの組み合わせ)を有する、M-MLV逆転写酵素を含む。本発明の好ましい実施形態において、以下の変異、P51L、S67R、E69K、T197A、H204R、E302K、F309N、W313F、T330P、L435G、N454K、D524G、D583N、H594Q、D653N、及びL671Pの全てを有する、M-MLV逆転写酵素が提供される。一部の実施形態では、本発明の逆転写酵素はまた、低減されたか、または実質的に低減された、RNase H活性を有することが好ましい。

#### 【0011】

他の種に由来する逆転写酵素の対応するアミノ酸位置の類似または同等の部位が、本明細書に開示される熱安定性及び/または熱反応性逆転写酵素を生成するように変異されてもよい。例えば、一部の実施形態において、本発明は、配列番号4に少なくとも50%(例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%等)のアミノ酸配列同一性を有する逆転写酵素を提供する。

#### 【0012】

一部の実施形態において、本発明の変異型M-MLV逆転写酵素は、野生型M-MLVと比較すると、少なくとも50%(例えば、50%、55%、60%、65%、70%、及び75%)の反応温度で、向上した逆転写酵素活性を呈する。例えば、一部の実施形態において、50~60度の向上した逆転写酵素活性は、さらに低い反応温度(例えば、37度)における野生型M-MLVと比較して、少なくとも10%、25%、50%、75%、100%、または200%高い。同様に、一部の実施形態において、本発明の逆転写酵素は、50~60度で少なくとも5分間、少なくとも50%(例えば、50%、70%、80%、90%等)の逆転写酵素活性を保持する。他の実施形態では、逆転写酵素は、少なくとも50度まで少なくとも5分間加熱した後、少なくとも50%の活性を保持する。同様に、他の実施形態において、本明細書に記載される逆転写酵素は、約7.3~8.3の範囲のpHにおいて少なくとも50度まで少なくとも10分間(例えば、10分間、15分間、60分間等)加熱した後、類似のpH条件下でさらにより低い反応温度(例えば、37度)での野生型M-MLVと比較して、少なくとも50%(例えば、50

%、70%、80%、90%等)の活性を保持する。

【0013】

一部の実施形態では、本発明の逆転写酵素は、約60の反応温度で5分以内に少なくとも7.5kbのcDNAを生成することができる。他の実施形態では、本発明の逆転写酵素は、約60の反応温度で15分以内に少なくとも9.5kbのcDNAを生成することができる。

【0014】

本発明はまた、本発明の変異型逆転写酵素をコードする遺伝子または核酸分子を含有するDNA分子(好ましくは、ベクター)、ならびにそのようなDNA分子を含有する宿主細胞を対象とする。目的の遺伝子または核酸分子を発現させるために、原核生物細胞及び真核生物細胞を含む、多数の宿主を使用することができる。好ましくは、本発明のポリメラーゼを発現させるために、原核生物細胞が使用される。本発明による好ましい原核生物宿主は、大腸菌である。

【0015】

本発明はまた、本明細書に開示される1つ以上の変異型または修飾型逆転写酵素またはポリペプチドを含む、核酸分子の逆転写に使用するための組成物及び反応混合物を提供する。そのような組成物は、1つ以上のヌクレオチド、好適な緩衝液、及び/または1つ以上のDNAポリメラーゼをさらに含んでもよい。本発明の組成物はまた、1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーまたは停止剤(例えば、ジデオキシヌクレオチド)も含み得る。そのような組成物はまた、グリセロールまたは表面活性剤といった安定化剤も含み得る。そのような組成物は、核酸合成の際に、不要な重合生成物を防止または低減させるために、ホットスタート機序を使用することをさらに含んでもよい。

【0016】

本発明は、ある特定の実施形態において、増幅反応に使用するための、1つ以上の本発明の逆転写酵素と1つ以上のDNAポリメラーゼとを含む組成物を提供する。そのような組成物は、1つ以上のヌクレオチド及び/または増幅に好適な緩衝液をさらに含んでもよい。本発明の組成物はまた、1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーも含み得る。そのような組成物はまた、グリセロールまたは表面活性剤といった安定化剤も含み得る。そのような組成物は、核酸合成の際に、不要な重合生成物を防止または低減させるために、1つ以上のホットスタート機序を使用することをさらに含んでもよい。

【0017】

本発明はさらに、本明細書に開示される1つ以上の変異型逆転写酵素またはポリペプチドを使用した核酸分子の合成のための方法を提供する。具体的には、本発明は、1つ以上の核酸分子を作製するための方法を対象とし、この方法は、1つ以上の核酸鋳型(好ましくは、1つ以上のRNA鋳型、最も好ましくは1つ以上のメッセンジャーRNA鋳型)を1つ以上の本発明の逆転写酵素と混合し、1つ以上の核酸鋳型の全てまたは一部分に相補的な第1の核酸分子(複数可)を作製するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程を含む。一部の実施形態では、第1の核酸分子は、一本鎖cDNAである。本発明のこの態様による逆転写に好適な核酸鋳型としては、任意の核酸分子または核酸分子の集団(好ましくはRNAであり、最も好ましくはmRNAである)、特に、細胞または組織に由来するものが挙げられる。一部の実施形態では、核酸鋳型の細胞源としては、細菌細胞、真菌細胞、植物細胞、及び動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0018】

ある特定の実施形態において、本発明は、1つ以上の二本鎖核酸分子を作製するための方法を提供する。そのような方法は、(a)1つ以上の核酸鋳型(好ましくはRNAまたはmRNA、より好ましくはmRNA鋳型の集団)を1つ以上の本発明の逆転写酵素と混合する工程、(b)1つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な第1の核酸分子(複数可)を作製するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程、ならびに(c)第1の核酸分子(複数可)の全てまたは一部分に相補的な第2の核酸分子(複数可)を作製するのに十分な条件下で、第1の核酸分子(複数可)をインキュベートする工程で

あって、それによって第 1 及び第 2 の核酸分子を含む 1 つ以上の二本鎖核酸分子を形成する、工程を含む。そのような方法は、1 つ以上の二本鎖核酸分子を作製するプロセスの一部として、1 つ以上の DNA ポリメラーゼの使用を含んでもよい。本発明はまた、そのような二本鎖核酸分子を作製するのに有用な組成物にも関する。そのような組成物は、1 つ以上の本発明の逆転写酵素、ならびに場合によっては 1 つ以上の DNA ポリメラーゼ、好適な緩衝液、1 つ以上のプライマー、及び / または 1 つ以上のヌクレオチドを含む。

【0019】

本発明はまた、核酸分子を増幅させるための方法も提供する。そのような増幅方法には、上述のように生成された二本鎖核酸分子（複数可）を 1 つ以上の DNA ポリメラーゼと混合し、二本鎖核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程が含まれる。第 1 の好ましい実施形態において、本発明は、核酸分子を増幅させるための方法に関し、この方法は、(a) 1 つ以上の核酸鋳型（好ましくは 1 つ以上の RNA または mRNA 鋳型であり、より好ましくは mRNA 鋳型の集団である）を 1 つ以上の本発明の逆転写酵素及び 1 つ以上の DNA ポリメラーゼと混合する工程、ならびに (b) 1 つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程を含む。

10

【0020】

本発明はまた、1 つ以上の核酸分子の逆転写のための方法も対象とし、この方法は、好ましくは RNA またはメッセンジャー RNA (mRNA) であり、より好ましくは mRNA 分子の集団である 1 つ以上の核酸鋳型を、1 つ以上の本発明の逆転写酵素と混合し、1 つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な核酸分子（複数可）を作製するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程を含む。1 つ以上の鋳型に相補的な核酸分子（複数可）を作製するために、プライマー（例えば、オリゴ(dT)プライマー）及び 1 つ以上のヌクレオチドを、5' から 3' の方向での核酸合成に使用することが好ましい。本発明のこの態様による逆転写に好適な核酸分子としては、任意の核酸分子、特に、原核生物細胞または真核生物細胞に由来するものが挙げられる。そのような細胞としては、正常細胞、疾患細胞、形質転換細胞、樹立細胞、前駆細胞、始原細胞、前駆細胞、胎児細胞、胚細胞、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞（ヒト細胞を含む）、鳥類細胞、植物細胞等、または植物もしくは動物（例えば、ヒト、ウシ、ブタ、マウス、ヒツジ、ウマ、サル、イヌ、ネコ、ラット、ウサギ、鳥、魚、昆虫等）から単離された組織を挙げることができる。逆転写に好適な核酸分子はまた、ウイルス及び / またはウイルス感染細胞から単離及び / または取得することもできる。

20

30

【0021】

本発明はさらに、核酸分子を本発明の逆転写酵素と接触させることを含む、核酸分子の増幅または配列決定のための方法を提供する。一部の実施形態において、そのような方法は、1 つ以上のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を含む。一部の実施形態において、逆転写反応は、RT-PCR のように、PCR と組み合わせられてもよい。

【0022】

本発明はまた、本発明の逆転写酵素をパッケージ化形式で含む、逆転写のためのキットも提供する。本発明の逆転写のためのキットには、例えば、逆転写酵素、逆転写に必要な任意の従来の構成要素、例えば、ヌクレオチドプライマー、少なくとも 1 つの dNTP、及び反応緩衝液、ならびに場合によっては DNA ポリメラーゼが含まれ得る。

40

【0023】

本発明はまた、本発明の方法で使用するためのキットも対象とする。そのようなキットは、核酸分子（一本鎖または二本鎖）の作製、配列決定、または増幅に使用することができる。本発明のキットは、バイアル、チューブ、瓶等といった 1 つ以上の格納容器を緊密に有する、箱または段ボール箱といった保持手段を含む。本発明のキットのある特定の実施形態において、第 1 の格納容器は、本発明の逆転写酵素のうちの 1 つ以上を格納する。本発明のキットはまた、同じかまたは異なる格納容器に、1 つ以上の DNA ポリメラーゼ（好ましくは熱安定性 DNA ポリメラーゼ）、核酸合成に好適な 1 つ以上の緩衝液、及び

50

1つ以上のヌクレオチドも含み得る。あるいは、キットの構成要素は、別個の格納容器に分割されてもよい（例えば、各酵素及び／または構成要素毎に1つの格納容器）。本発明のキットはまた、本発明の方法を実行するための説明書またはプロトコルも含み得る。本発明の好ましいキットにおいて、逆転写酵素は、cDNA合成が起こる温度が高くなるように変異されている。本発明の追加の好ましいキットにおいて、格納容器中の酵素（逆転写酵素及び／またはDNAポリメラーゼ）は、作用濃度で存在している。

#### 【0024】

したがって、上記に詳細に記載されるように、一態様において、変異型M - M L V逆転写酵素が提供される。そのような逆転写酵素は、野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも1つの変異を含み、少なくとも1つのアミノ酸位置は、S 6 7、T 1 9 7、及びE 3 0 2から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つの変異は、次のアミノ酸置換変異：（S 6 7 R、S 6 7 N、またはS 6 7 K）、（T 1 9 7 A、T 1 9 7 S、またはT 1 9 7 G）、及び（E 3 0 2 K、E 3 0 2 R、またはE 3 0 2 G）から選択される。一部の実施形態では、変異型逆転写酵素は、P 5 1、E 6 9、P 1 9 6、D 2 0 0、H 2 0 4、M 2 8 9、T 3 0 6、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、E 5 6 2、D 5 8 3、H 5 9 4、L 6 0 3、D 6 5 3、及びL 6 7 1から選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの変異をさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の変異は、以下のアミノ酸置換変異：P 5 1 L、E 6 9 K、P 1 9 6 S、D 2 0 0 N、H 2 0 4 R、M 2 8 9 L、T 3 0 6 K、（F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、またはF 3 0 9 I）、（W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、またはW 3 1 3 C）、T 3 3 0 P、（L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、またはL 4 3 5 R）、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、E 5 6 2 Q、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、L 6 0 3 W、（D 6 5 3 NまたはD 6 5 3 H）、及びL 6 7 1 Pから選択される。

#### 【0025】

別の態様において、野生型M - M L V逆転写酵素（配列番号2）の配列に対応するアミノ酸位置に少なくとも6つの変異を含む変異型M - M L V逆転写酵素が提供され、少なくとも6つのアミノ酸位置は、P 5 1、E 6 9、P 1 9 6、D 2 0 0、H 2 0 4、M 2 8 9、T 3 0 6、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、E 5 6 2、D 5 8 3、H 5 9 4、L 6 0 3、D 6 5 3、及びL 6 7 1から選択される。一部の実施形態において、少なくとも6つの変異は、以下のアミノ酸置換：P 5 1 L、E 6 9 K、P 1 9 6 S、D 2 0 0 N、H 2 0 4 R、M 2 8 9 L、T 3 0 6 K、（F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、またはF 3 0 9 I）、（W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、またはW 3 1 3 C）、T 3 3 0 P、（L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、またはL 4 3 5 R）、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、E 5 6 2 Q、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、L 6 0 3 W、（D 6 5 3 NまたはD 6 5 3 H）、及びL 6 7 1 Pから選択される。一部の実施形態において、変異型M - M L V逆転写酵素は、S 6 7、T 1 9 7、及びE 3 0 2から選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの追加の変異をさらに含む。一部の実施形態において、少なくとも1つの追加の変異は、以下のアミノ酸置換：（S 6 7 R、S 6 7 N、またはS 6 7 K）、（T 1 9 7 A、T 1 9 7 S、またはT 1 9 7 G）、及び（E 3 0 2 K、E 3 0 2 R、またはE 3 0 2 G）から選択される。

#### 【0026】

一部の実施形態において、アミノ酸位置：P 5 1、S 6 7、E 6 9、T 1 9 7、H 2 0 4、E 3 0 2、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、D 5 8 3、H 5 9 4、D 6 5 3、及びL 6 7 1のそれぞれに変異を有する、変異型M - M L V逆転写酵素が提供される。一部の実施形態において、変異型M - M L V逆転写酵素は、以下のアミノ酸置換変異：P 5 1 L、S 6 7 R、E 6 9 K、T 1 9 7 A、H 2 0 4 R、E 3 0 2 K、F 3 0 9 N、W 3 1 3 F、T 3 3 0 P、L 4 3 5 G、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、D 6 5 3 N、及びL 6 7 1 Pのそれぞれを含む。

#### 【0027】

一部の実施形態において、変異型M - M L V逆転写酵素は、R N a s e H活性を欠く。さらなる他の実施形態では、変異型M - M L V逆転写酵素は、少なくとも50 の反応

温度で、対応する野生型 M - M L V 逆転写酵素の逆転写酵素活性と比較して向上した逆転写酵素活性を呈する。一部の実施形態において、変異型 M - M L V 逆転写酵素は、野生型 M - M L V 逆転写酵素活性よりも少なくとも 10 % (例えば、10 %、25 %、50 %、75 %、80 %、90 %、100 %、200 %等) 高い、向上した逆転写酵素活性を呈する。一部の実施形態において、変異型 M - M L V 逆転写酵素は、60 で 5 分後に逆転写酵素活性を有し、これは、37 で 5 分後の野生型 M - M L V 逆転写酵素の逆転写酵素活性の少なくとも 25 % (例えば、50 %、100 %、200 %等) である。一部の実施形態において、変異型 M - M L V 逆転写酵素は、以下の特性：向上した熱安定性、向上した熱反応性、逆転写酵素阻害物質に対する向上した耐性、難しい鋳型を逆転写する向上した能力、向上した速度 / 処理能力、ならびに向上した特異性 (例えば、プライマーのない逆転写の減少) のうちの 1 つ以上を呈する。

10

#### 【0028】

別の態様において、配列番号 4 に少なくとも 50 % (例えば、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %等) のアミノ酸配列同一性を有する、変異型逆転写酵素が提供される。一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、配列番号 4 を含む。一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、配列番号 4 からなる。

#### 【0029】

一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、50 ~ 65 (例えば、50、52、55、58、60、及び 62) の温度で熱安定性である。一部の実施形態において、それらは、50 ~ 65 (例えば、55、60 等) の温度で少なくとも 1 分間 (例えば、1 分間、5 分間、15 分間、60 分間、120 分間等) 熱安定性である。一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、50 ~ 65 (例えば、50、52、55、58、60、及び 62) の温度で熱反応性である。一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、50 ~ 65 (例えば、55、60 等) の温度で少なくとも 1 分間 (例えば、1 分間、5 分間、15 分間、60 分間、120 分間等) 熱反応性である。一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、少なくとも 50 (例えば、50、55、60、62、65 等) まで少なくとも 1 分間 (例えば、1 分間、2 分間、5 分間、10 分間、15 分間等) 加熱した後、少なくとも 10 % (例えば、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び 100 %) の逆転写酵素活性を保持する。一部の実施形態において、逆転写酵素は、少なくとも 60 (例えば、60、62、65 等) まで少なくとも 1 分間 (例えば、1 分間、2 分間、5 分間、10 分間、15 分間等) 加熱した後、少なくとも 10 % (例えば、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び 100 %) の逆転写酵素活性を保持する。一部の実施形態において、逆転写酵素は、少なくとも 50 (例えば、50、55、60、62、65 等) まで少なくとも 1 分間 (例えば、1 分間、2 分間、5 分間、10 分間、15 分間等) 加熱した後、少なくとも 50 % (例えば、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び 100 %) の逆転写酵素活性を保持する。一部の実施形態において、逆転写酵素は、少なくとも 50 (例えば、50、55、60、62、65) まで少なくとも 5 分間 (例えば、5 分間、10 分間、15 分間、30 分間等) 加熱した後、少なくとも 10 % (例えば、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び 100 %) の逆転写酵素活性を保持する。

20

30

40

#### 【0030】

一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、変異型 M - M L V 逆転写酵素である。他の実施形態において、変異型逆転写酵素は、例えば、鶏痘、イノシシ、コアラ、及びヒビを含む、他の種から得られた変異型逆転写酵素である。一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、図 1 A ~ 1 D に列挙されるコンセンサス配列によって表されるもの等、アミノ酸相同性及び同一性の領域を含む。

#### 【0031】

別の態様において、核酸合成のための組成物が提供される。そのような組成物は、緩衝

50



液と、本明細書に記載される変異型逆転写酵素のうちのいずれかとを含み得る。一部の実施形態において、本組成物は、1つ以上のヌクレオチド、1つ以上のDNAポリメラーゼ、1つ以上の界面活性剤、1つ以上のプライマー、1つ以上のホットスタート用成分、及び/または1つ以上の停止剤といった、核酸合成に有用な1つ以上の構成要素をさらに含む。一部の実施形態では、停止剤は、ジデオキシヌクレオチドである。

#### 【0032】

別の態様において、核酸合成（逆転写及び増幅）のための方法が提供される。そのような方法は、本明細書に記載される変異型逆転写酵素のうちのいずれかの使用を含み得る。一部の実施形態において、本方法は、（a）1つ以上の核酸鋳型と1つ以上の本明細書に記載される逆転写酵素とを含む混合物を調製する工程、及び（b）1つ以上の核酸鋳型の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の第1の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程を含む。

10

#### 【0033】

他の実施形態では、本方法は、（a）1つ以上の核酸鋳型を、1つ以上の本明細書に記載される逆転写酵素及び1つ以上のDNAポリメラーゼと混合する工程、ならびに（b）1つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程を含む。

#### 【0034】

一部の実施形態において、核酸鋳型は、メッセンジャーRNA分子、またはmRNA分子の集団である。一部の実施形態において、本方法は、1つ以上の第1の核酸分子の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の第2の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、1つ以上の第1の核酸分子をインキュベートする工程を含む。他の実施形態では、本方法は、1つ以上の鋳型の全てまたは一部分に相補的である、増幅された核酸分子の全てまたは一部分のヌクレオチド配列を決定する工程をさらに含む。記載される方法の一部の実施形態において、インキュベートする工程は約60の温度で行われる。

20

#### 【0035】

別の態様では、1つ以上のパッケージ化格納容器に本明細書に記載される変異型M - MLV逆転写酵素を含む、キットが提供される。

#### 【0036】

なおも別の態様では、本明細書に記載される変異型逆転写酵素をコードする単離された核酸が提供される。

30

#### 【0037】

別の態様において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素をコードする核酸を含むベクターが提供される。一実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素をコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む発現ベクターが提供される。

#### 【0038】

別の態様において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素をコードする核酸を含む宿主細胞が提供される。別の態様において、本明細書に記載される逆転写酵素活性を有する変異型逆転写酵素またはポリペプチドを含む宿主細胞が提供される。

#### 【0039】

本発明の他の好ましい実施形態は、添付の図面及び本発明の説明、ならびに特許請求の範囲を踏まえると、当業者には明らかであろう。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0040】

本発明のこれら及び他の特徴、態様、及び利点は、以下の説明及び添付の特許請求の範囲、ならびに添付の図面を参照することでより良好に理解されるであろう。

#### 【0041】

【図1A】図1A～1Dは、野生型M - MLV逆転写酵素（MMLV）と他の動物種（すなわち、ヒヒ、鶏痘、コアラ、及びイノシシ）に特異的なウイルス逆転写酵素との間のアミノ酸配列アライメントを比較した表を示す。アミノ酸の類似性及び同一性の領域が、種

50

々の R T 全体にわたり確認される。種々の R T 間のコンセンサス配列も示す。

【図 1 B】図 1 A の続きを示す。

【図 1 C】図 1 B の続きを示す。

【図 1 D】図 1 C の続きを示す。

【図 2】本明細書に開示される例示的な変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「M u t D 9」、配列番号 4) の R T 活性を、野生型 M - M L V 逆転写酵素 (「W T M M L V」、配列番号 2)、ならびに他の市販入手可能な (「従来のな」) 変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「S S I I I」、*「S S I I I I」*、及び「Q - R T」) と比較して示す蛍光画像である。各レーンは、示される様々な長さの時間 (すなわち、5 分間、15 分間、または 60 分間) 及び様々な反応温度 (すなわち、37、42、50、または 60) で行われた R T 反応から得られた c D N A 生成物を示す。0.24 ~ 9.5 k b の R N A ラダーを各反応の鋳型核酸として用いた。

10

【図 3】本明細書に開示される例示的な変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「M u t D 9」、配列番号 4) の R T 活性を、野生型 M - M L V 逆転写酵素 (「W T M M L V」、配列番号 2) と比較して示す蛍光画像である。各レーンは、示される様々な長さの時間 (すなわち、10 分間、30 分間、または 60 分間) 及び 37 (W T M M L V について) または 50 (M u t D について) のいずれかで、p H 8.3 または 7.3 において行われた R T 反応から得られた c D N A 生成物を示す。0.5 ~ 10 k b の R N A ラダーを各反応の鋳型核酸として用いた。

【図 4】本明細書に開示される例示的な変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「M u t D 9」、配列番号 4) の R T 活性を、野生型 M - M L V 逆転写酵素 (「W T M M L V」、配列番号 2)、ならびに他の市販入手可能な (「従来のな」) 変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「S S I I I I」及び「C - R T」) と比較して示す蛍光画像である。各レーンは、様々な長さの時間 (すなわち、5 分間、10 分間、30 分間、または 60 分間)、60 で p H 8.3 において行われた R T 反応から得られた c D N A 生成物を示す。0.5 ~ 10 k b の R N A ラダーを各反応の鋳型核酸として用いた。

20

【図 5】本明細書に開示される例示的な変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「M u t D 9」、配列番号 4) の R T 活性を、他の市販入手可能な (「従来のな」) 変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「S S I I I I」及び「M - R T」) と比較して示す臭化エチジウム染色ゲルの写真である。各レーンは、示されるように、また実施例 4 により詳細に記載されるように、異なるプライマー: (1) プライマーなし、(2) オリゴ (d T)<sub>20</sub> プライマー、(3) オリゴ (d T)<sub>20</sub> L N A プライマー、または (4) P o l E 2.5 逆方向遺伝子特異的プライマーを用いて、様々な反応条件下 (すなわち、「N O N - H S - R T 反応」、H S = ホットスタート) 行われた R T 反応から得られた生成物 (P C R により増幅) を示す。1 k b の標的 (「H e l a R N A」) を異なる量 (すなわち、10 n g、50 n g、または 100 n g) で、各反応の鋳型核酸として使用した。

30

【図 6】本明細書に開示される例示的な変異型逆転写酵素 (「M u t D 9」、配列番号 4) の R T 活性を、野生型 M - M L V 逆転写酵素 (「W T M M L V」、配列番号 2)、ならびに他の市販入手可能な (「従来のな」) 変異型 M - M L V 逆転写酵素 (「S S I I I I」及び「C - R T」) と比較して示す蛍光画像である。各レーンは、示されるように、50 で 60 分間かつ様々な濃度の様々な阻害物質の存在下において行われた R T 反応から得られた c D N A 生成物を示す。0.5 ~ 10 k b の R N A ラダーを各反応の鋳型核酸として用いた。

40

【図 7】図 6 に示されるように、阻害物質の存在下における異なる R T の R T 活性をグラフ形式で示す。R T 活性は、阻害物質を含まない反応 (活性 100 % として示される) に対して正規化した。濃い陰影は最も低い R T 活性を表し、一方で薄い陰影は最も高い R T 活性を表す (黒から白 = 低い活性から高い活性)。

【図 8 A】野生型 M - M L V 逆転写酵素の核酸配列 (配列番号 1) を列挙する。

【図 8 B】図 8 A の続きを示す。

【図 9】野生型 M - M L V 逆転写酵素のアミノ酸配列 (配列番号 2) を列挙する。

50

【図 10 A】本発明の例示的な変異型（「Mut D9」M - M L V 逆転写酵素の核酸配列（配列番号 3））を列挙する。

【図 10 B】図 10 A の続きを示す。

【図 11】本発明の例示的な変異型（「Mut D9」）M - M L V 逆転写酵素のアミノ酸配列（配列番号 4））を列挙する。

【発明を実施するための形態】

【0042】

詳細な説明

本明細書において、熱安定性及び／または熱反応性、逆転写酵素阻害物質耐性、難しい R N A 鋳型による c D N A 生成、ならびに特異性を向上させるように変異されている逆転写酵素が提供される。ある特定の実施形態において、本発明は、対応する野生型逆転写酵素の特定のアミノ酸を変異または修飾することによって、そのような逆転写酵素を作製する方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、核酸分子、例示される実施形態では、c D N A 分子の生成、増幅、及び／または配列決定を、そのような変異型逆転写酵素を含む組成物及び／または反応混合物を使用して行う方法を提供する。例えば、本発明の逆転写酵素は、R N A の配列決定、ならびに粗製試料、難しい鋳型、及び遺伝子特異的配列の逆転写を含むがこれらに限定されない、核酸合成方法に適している。

【0043】

定義

以下の説明では、以下の意味を有する多数の用語が使用される。

【0044】

機能的に連結されている。本明細書に使用されるとき、「機能的に連結されている」とは、核酸が、構造遺伝子または他の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の開始に影響を及ぼし得るように配置されていることを意味する。

【0045】

実質的に純粋。本明細書に使用されるとき、「実質的に純粋」とは、所望される材料が、所望される材料の性質と関連する混入細胞成分を本質的に含まないことを意味する。好ましい態様において、本発明の逆転写酵素は、25%以下、好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下、なおもさらに好ましくは1%以下の混入細胞成分を有する。別の態様において、本発明の逆転写酵素は、タンパク質ゲル上に200ユニットの逆転写酵素を泳動させ（例えば、S D S - P A G E）、クマシンプルーで染色した場合に、検出可能なタンパク質混入物質を有さない。混入細胞成分としては、ホスファターゼ、エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、または不要な D N A ポリメラーゼ酵素といった、酵素活性が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の逆転写酵素は、実質的に純粋である。

【0046】

実質的に単離された。本明細書に使用されるとき、「実質的に単離された」とは、本発明のポリペプチドが、事実上及び／または組み換え宿主において、本発明のポリペプチドと関連し得る混入タンパク質を本質的に含まないことを意味する。一態様において、実質的に単離された本発明の逆転写酵素は、25%以下、好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下、なおもさらに好ましくは1%以下の混入タンパク質を有する。別の態様において、実質的に単離された本発明のポリペプチドの試料において、試料中の75%以上（好ましくは、80%、85%、90%、95%、98%、または99%以上）のタンパク質が、所望される本発明の逆転写酵素である。試料中の混入タンパク質及び／または目的のタンパク質の割合は、当該技術分野で既知の技法を使用して、例えば、タンパク質ゲル（例えば、S D S - P A G E）を使用して、タンパク質色素（例えば、クマシンプルー、銀染色、アミドブラック等）でゲルを染色することによって、判定することができる。別の態様において、本発明の逆転写酵素は、タンパク質ゲル上に200ユニットの逆転写酵素を泳動させ（例えば、S D S - P A G E）、クマシンプルーで染色した場合に、検出可能なタンパク質混入物質を有さない。

## 【0047】

停止剤。「停止塩基」と互換的に使用されることもある「停止剤」という用語は、DNAまたはRNAポリメラーゼによって伸長させることができないヌクレオチドを指す。そのようなヌクレオチドには、例えば、ジデオキシヌクレオチド（ddNTP）または種々の糖修飾ヌクレオチドを挙げることができる。

## 【0048】

逆転写酵素。本明細書に使用されるとき、「逆転写酵素」という用語は、逆転写酵素活性を呈するタンパク質、ポリペプチド、またはポリペプチドフラグメントを指す。

## 【0049】

逆転写酵素活性。本明細書に使用されるとき、「逆転写酵素活性」、「逆転写活性」、または「逆転写」という用語は、酵素が、RNAを鋳型として使用してDNA鎖（すなわち、相補的DNAまたはcDNA）を合成することができることを指す。

## 【0050】

変異。本明細書に使用されるとき、「変異」または「変異型」という用語は、野生型DNA配列または野生型アミノ酸配列に導入された変化（複数可）を示す。変化の例としては、置換、挿入、欠失、及び点変異が挙げられるが、これらに限定されない。変異は、核酸レベルまたはアミノ酸レベルのいずれかで行われ得る。

## 【0051】

熱安定性（thermostable）。本開示の目的で、「熱安定性」とは、一般に、逆転写酵素（「熱安定性逆転写酵素」）等の酵素が、同一の処理後に野生型の熱安定性を有する同じ酵素が保持するものよりも多くの割合または量の活性を保持することを指す。したがって、向上した／強化された熱安定性を有する逆転写酵素は、熱安定性が野生型である逆転写酵素の活性の低減を引き起こすのに十分な熱処理後に、熱安定性における任意の向上、好ましくは約1.2～約10,000倍、約1.5～約10,000倍、約2～約5,000倍、または約2～約2000倍（好ましくは、約5倍超、より好ましくは約10倍超、さらにより好ましくは約50倍超、なおもより好ましくは約100倍超、なおもさらに好ましくは約500倍超、最も好ましくは約1000倍超）の活性の保持を有する逆転写酵素として定義され得る。好ましくは、本発明の変異型逆転写酵素は、熱安定性の相対的な強化または向上を判定するために、対応する非変異型または野生型の逆転写酵素と比較される。例えば、60℃で5分間の熱処理後に、熱安定性逆転写酵素は、熱処理前に存在していた活性のおよそ90%を保持することができるが、熱安定性が野生型である逆転写酵素は、その元々の活性の10%しか保持できない。同様に、60℃で15分間の熱処理後に、熱安定性逆転写酵素は、その元々の活性のおよそ80%を保持することができるが、熱安定性が野生型である逆転写酵素は、測定可能な活性を有することができない。同様に、60℃で15分間の熱処理後に、熱安定性逆転写酵素は、その元々の活性のおよそ50%、およそ55%、およそ60%、およそ65%、およそ70%、およそ75%、およそ80%、およそ85%、およそ90%、またはおよそ95%を保持することができるが、熱安定性が野生型である逆転写酵素は、測定可能な活性を有することができないか、またはその元々の活性の20%、15%、10%しか有することができないか、もしくは全く有することができない。第1の事例では（すなわち、60℃で5分間の熱処理後）、熱安定性逆転写酵素は、野生型逆転写酵素よりも9倍高い熱安定性であると言える（10%と比較して90%）。逆転写酵素等の酵素の熱安定性を測定するために使用することができる条件の例は、以下及び実施例により詳細に記載されている。

## 【0052】

逆転写酵素の熱安定性は、例えば、熱処理に供した、例えば、所与の期間、例えば5分間、60℃でインキュベートした逆転写酵素の残存活性を、熱処理と同じ長さの期間室温でインキュベートした同じ逆転写酵素の対照試料と比較することによって、判定することができる。典型的に、残存活性は、相補的オリゴリボヌクレオチド鋳型を使用して、放射標識したデオキシリボヌクレオチドをオリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーに組み込んだ後に、測定することができる。例えば、ポリ（リボC）鋳型を使用して逆転写酵素

10

20

30

40

50

が [ - <sup>3</sup> <sup>2</sup> P ] - d G T P をオリゴ - d G プライマーに組み込む能力をアッセイして、逆転写酵素の残存活性を判定してもよい。標識していないヌクレオチドを蛍光標識したプライマーに組み込むことによるもの等、残存活性を測定するための他の方法は、当業者に既知である。例えば、N i k i f o r o v , T . T . , A n a l B i o c h e m . , 2 0 1 1 , 4 1 2 ( 2 ) : 2 2 9 - 3 6 を参照されたく、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 0 5 3 】

別の態様において、本発明の熱安定性逆転写酵素には、対応する野生型の非変異型逆転写酵素と比較してより高い温度で不活性化される任意の逆転写酵素が含まれ得る。好ましくは、本発明の熱安定性逆転写酵素の不活性化温度は、対応する野生型の非変異型逆転写酵素の不活性化温度よりも約 2 ~ 約 5 0 (例えば、約 2 、約 4 、約 6 、約 8 、約 1 0 、約 1 2 、約 1 4 、約 1 6 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、約 2 6 、約 2 8 、約 3 0 、約 3 2 、約 3 4 、約 3 6 、約 3 8 、約 4 0 、約 4 2 、約 4 4 、約 4 6 、約 4 8 、または約 5 0 ) 高い。より好ましくは、本発明の逆転写酵素の不活性化温度は、同じ条件下で比較すると、対応する野生型の非変異型逆転写酵素の不活性化温度よりも約 5 ~ 約 5 0 、約 5 ~ 約 4 0 、約 5 ~ 約 3 0 、または約 5 ~ 約 2 5 高い。一部の実施形態では、本発明の変異型逆転写酵素は、高い温度(例えば、5 0 、5 5 、6 0 、6 5 )で少なくとも1分(例えば、1分、2分、5分、1 0 分、1 5 分、3 0 分等)後に、低温(例えば、5 0 、4 5 、4 2 、4 0 、3 7 )で5分後の野生型逆転写酵素の逆転写酵素活性の少なくとも1 0 % (例えば、1 0 % 、2 5 % 、5 0 % 、7 5 % 、1 0 0 % 、1 5 0 % 、2 0 0 % 、3 0 0 % 等)である逆転写酵素活性を有する。

#### 【 0 0 5 4 】

本発明の逆転写酵素をその対応する野生型の非変異型逆転写酵素と比較したときの不活性化温度における相違は、そのような逆転写酵素の試料を所定の期間異なる温度で処理し、次いで、試料を処置した後に、残存する逆転写酵素活性(存在する場合)を測定することによって判定することができる。試験逆転写酵素と比較した野生型の非変異型対照との間の不活性化温度における相違または差分の判定は、各逆転写酵素が不活性化される温度の相違を比較することによって判定される(すなわち、使用した特定のアッセイにおいて残存する逆転写酵素活性が測定可能でない)。理解されるように、任意の数の逆転写酵素アッセイを使用して、試験した任意の逆転写酵素の不活性化温度の相違または差分を判定することができる。

#### 【 0 0 5 5 】

別の態様では、本発明の逆転写酵素の熱安定性は、目的の逆転写酵素の逆転写酵素活性の半減期を測定することによって判定される。そのような半減期を、対照または野生型の逆転写酵素と比較して、半減期の相違(または差分)を判定してもよい。本発明の逆転写酵素の半減期は、好ましくは、高い温度(例えば、3 7 超)、好ましくは4 0 ~ 8 0 の範囲の温度、より好ましくは4 5 ~ 7 5 、5 0 ~ 7 0 、5 5 ~ 6 5 、及び5 8 ~ 6 2 の範囲の温度で判定される。本発明の逆転写酵素の好ましい半減期は、用いられる温度に応じて、4 分間~ 1 0 時間、4 分間~ 7 . 5 時間、4 分間~ 5 時間、4 分間~ 2 . 5 時間、または4 分間~ 2 時間の範囲に及び得る。例えば、本発明の逆転写酵素の逆転写酵素活性は、4 8 、5 0 、5 2 、5 4 、5 6 、5 8 、6 0 、6 2 、6 4 、6 6 、6 8 、及び/または7 0 の温度で、少なくとも4 分間、少なくとも5 分間、少なくとも6 分間、少なくとも7 分間、少なくとも8 分間、少なくとも9 分間、少なくとも1 0 分間、少なくとも1 1 分間、少なくとも1 2 分間、少なくとも1 3 分間、少なくとも1 4 分間、少なくとも1 5 分間、少なくとも2 0 分間、少なくとも2 5 分間、少なくとも3 0 分間、少なくとも4 0 分間、少なくとも5 0 分間、少なくとも6 0 分間、少なくとも7 0 分間、少なくとも8 0 分間、少なくとも9 0 分間、少なくとも1 0 0 分間、少なくとも1 1 5 分間、少なくとも1 2 5 分間、少なくとも1 5 0 分間、少なくとも1 7 5 分間、少なくとも2 0 0 分間、少なくとも2 2 5 分間、少なくとも2 5 0 分間

、少なくとも275分間、少なくとも300分間、少なくとも400分間、少なくとも500分間の半減期を有し得る。

【0056】

熱反応性．本明細書に使用されるとき、「熱反応性 (thermoreactivity)」または「熱反応性 (thermoreactive)」は、逆転写酵素が高い温度で酵素活性を呈する能力を指す。

【0057】

熱安定性 (thermostability)．本明細書に使用されるとき、「熱安定性 (thermostability)」または「熱安定性 (thermostable)」は、高い温度への曝露に耐えるが、必ずしもそのような高い温度で活性を示すわけではない、能力を指す。

10

【0058】

処理能力．本明細書に使用されるとき、「処理能力」とは、逆転写酵素が、核酸鋳型から解離することなくプライマーを連続的に伸長させる能力を指す。酵素が複製できる鋳型の長さ (例えば、「X酵素は、9 kbの鋳型をポリメラーゼできる」または「X酵素は長さが約6000塩基であるcDNAを生成できる」) もまた、所与の酵素の処理能力を説明するために使用され得る。

【0059】

阻害物質耐性．本明細書に使用されるとき、「阻害物質耐性」とは、逆転写酵素に対して典型的に阻害性である (逆転写酵素活性を防止または阻害する) 化合物、化学物質、タンパク質、緩衝液等の存在下において、逆転写酵素が逆転写を行う能力を指す。

20

【0060】

忠実性．忠実性とは、重合の正確さ、または鋳型に相補的な核酸分子を合成する際に、逆転写酵素が正しい物質と誤った物質 (例えば、ヌクレオチド) とを区別する能力を指す。逆転写酵素の忠実性が高いほど、核酸合成中に逆転写酵素が成長している鎖内に誤ってヌクレオチドを組み込むことが少なくなる、すなわち、忠実性の向上または強化は、低下したエラー率または低下した誤組み込み率を有するより忠実な逆転写酵素をもたらす。

【0061】

約．本明細書に使用される「約」という用語は、言及される数の $\pm 10\%$ を意味する。したがって、「約100」には、90~110の範囲に含まれる値の全範囲が含まれる。

30

【0062】

逆転写酵素の供給源

本発明によると、酵素の熱安定性及び/または熱反応性を向上させるため、あるいは、例えば、向上した特異性、逆転写酵素阻害物質に対する耐性の向上、及び/または難しいRNA鋳型からcDNAを生成する能力の向上といった他の特性を酵素に与えるために、逆転写酵素活性を有する任意の逆転写酵素またはポリペプチドに、変異または修飾を行うことができる。

【0063】

本発明の組成物、方法、及びキットに使用するための逆転写酵素には、逆転写酵素活性を有する任意の酵素またはポリペプチドが含まれる。そのような酵素には、レトロウイルス逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素、B型肝炎逆転写酵素、カリフラワーモザイクウイルス逆転写酵素、最近逆転写酵素、Tth DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ (Saiki, R. K., et al., Science 239: 487-491 (1988)、米国特許第4,889,818号及び同第4,965,188号)、Tne DNAポリメラーゼ (国際公開第WO96/10640号)、Tma DNAポリメラーゼ (米国特許第5,374,553号)、及びそれらの変異型、フラグメント、変化形、または誘導体 (例えば、同一所有者の (commonly owned) 米国特許第5,948,614号及び同第6,015,668号を参照されたく、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) が挙げられるが、これらに限定されない。

40

50

## 【0064】

好適な逆転写酵素には、レトロウイルス逆転写酵素、例えば、マロニー Maus 白血病ウイルス (Maloney Murine Leukemia Virus) (M-MLV) 逆転写酵素、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 逆転写酵素、ラウス肉腫ウイルス (RSV) 逆転写酵素、トリ骨髄芽球症ウイルス (AMV) 逆転写酵素、ラウス関連肉腫ウイルス (RAV) 逆転写酵素、及び骨髄芽球症関連ウイルス (MAV) 逆転写酵素、または他のトリ肉種白血病ウイルス (ASLV) 逆転写酵素が挙げられる。本発明の逆転写酵素が作製されるように変異させることができるさらなる逆転写酵素には、細菌逆転写酵素 (例えば、大腸菌逆転写酵素) (例えば、Mao et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 227: 489-93 (1996) を参照されたい) 及び出芽酵母の逆転写酵素 (例えば、Ty1 または Ty3 レトロトランスポゾンの逆転写酵素) (例えば、Cristofari et al., Jour. Biol. Chem. 274: 36643-36648 (1999)、Mules et al., Jour. Virol. 72: 6490-6503 (1998) を参照されたい) が挙げられる。記載される発明により使用することができる他の逆転写酵素には、例えば、ヒビ、鶏痘、コアラ、及びイノシシの種から単離されたウイルスから単離された逆転写酵素が挙げられるがこれらに限定されない。

10

## 【0065】

本発明はさらに、本発明に含まれる逆転写酵素と同一であるか、または同じ機能を有する、ポリヌクレオチドを提供する。本明細書における「同一である」または「同じ機能を有する」という語句は、2つのポリヌクレオチドを詳細なコンピュータ化されたアルゴリズムにより適切に並べた場合に、それらが、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸同一性を呈することを示す。

20

## 【0066】

本発明は、野生型逆転写酵素 (例えば、M-MLV 逆転写酵素、配列番号2)、AMV 逆転写酵素、RSV 逆転写酵素、HIV 逆転写酵素等) にアミノ酸レベルで50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であり、向上した熱安定性及び/または本発明の他の所望される特性を呈する、逆転写酵素をさらに含む。以下の配列番号4に記載されるアミノ酸配列を含む逆転写酵素にアミノ酸レベルで70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であり、向上した熱安定性及び/または熱反応性を呈する逆転写酵素もまた、本発明に含まれる。

30

## 【0067】

本発明はまた、少なくとも200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、または700個のアミノ酸残基を含み、逆転写酵素と関連する1つ以上の活性を保持する、逆転写酵素のフラグメントも含む。そのようなフラグメントは、欠失変異によって、当該技術分野において日常的かつ周知の組み換え技法によって、またはいくつかの周知のタンパク質分解酵素のうちのいずれかを用いて目的の逆転写酵素 (複数可) の酵素分解を行うことによって、得ることができる。本発明の逆転写酵素のフラグメントは、上述のフラグメントのうちの1つに70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドをさらに含む。本発明はまた、任意の数のこれらのフラグメントの様々な組み合わせにも関する。

40

## 【0068】

参照アミノ酸配列に少なくとも、例えば、70%「同一である」アミノ酸配列を有するタンパク質またはタンパク質フラグメントとは、そのタンパク質のアミノ酸配列が、タンパク質配列が参照タンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸100個毎に最大30個のアミノ酸改変を含み得ることを除き、参照配列に同一であることを意図する。換言すると、参照アミノ酸配列に少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質を得るため

50

には、参照配列内のアミノ酸残基の最大30%が欠失もしくは別のアミノ酸と置換されていてもよく、または参照配列内の全アミノ酸残基の最大30%の個数のアミノ酸が参照配列に挿入されていてもよい。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノ(N)及び/もしくはカルボキシ(C)末端位、ならびに/またはそれらの末端位の間の任意の場所で、参照配列内の残基の間に個別に、及び/もしくは参照配列内の1つ以上の連続した基でのいずれかで散在して、生じ得る。実際には、所与のアミノ酸配列が、例えば、参照タンパク質のアミノ酸配列に少なくとも70%同一であるかどうかは、核酸配列同一性判定に関して上述のもの等、既知のコンピュータプログラムを使用して、またはCLUSTAL Wプログラム(Thompson, J. D., et al., Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680 (1994))を使用して、判定することができる。

10

#### 【0069】

配列同一性は、参照配列または参照配列の部分配列を試験配列と比較することによって、判定することができる。参照配列及び試験配列は、比較枠と称される任意の数の残基にわたって最適にアライメントされる。最適なアライメントを得るために、付加または欠失、例えば、ギャップが、試験配列に導入されてもよい。配列同一性パーセントは、同じ残基が両方の配列に存在する位置の数を判定し、一致する位置の数を比較枠内の配列の全長で除し、100を乗じて百分率を得ることによって判定される。一致する位置の数に加えて、ギャップの数及びサイズも、配列同一性パーセントを計算する際に考慮される。

#### 【0070】

20

配列同一性は、典型的にはコンピュータプログラムを用いて判定される。代表的なプログラムは、National Center for Biotechnology Information(NCBI、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で公的にアクセス可能なBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)プログラムである。このプログラムは、試験配列内のセグメントをデータベースの配列と比較して、一致の統計学的有意性を判定した後、閾値レベルよりも有意な一致のみを特定し、報告する。BLASTプログラムの好適なバージョンは、ギャップを許容するもの、例えば、バージョン2.Xである(Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-402, 1997)。ヌクレオチド配列(blastn)またはタンパク質(blastp)を検索するための標準的なBLASTを使用してもよい。クエリ配列が翻訳される、すなわち、ヌクレオチド配列からタンパク質に翻訳される翻訳クエリ検索(blastx)またはタンパク質から核酸配列に翻訳される翻訳クエリ検索(tbbblastn)も、ヌクレオチドクエリ配列が6つ全てのリーディングフレームにおいてタンパク質に翻訳され、次いで6つ全てのリーディングフレームが翻訳されているNCBIヌクレオチドデータベースと比較されるクエリ(tbbblastx)と同様に使用することができる。

30

#### 【0071】

本発明のタンパク質に対する配列同一性または類似性を有するタンパク質を特定するためのさらなる好適なプログラムとしては、PHI-BLAST(Pattern Hit Initiated BLAST、Zhang, et al., Nucleic Acids Res. 26(17): 3986-90, 1998)及びPSI-BLAST(Position-Specific Iterated BLAST、Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-402, 1997)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0072】

プログラムは、デフォルトの検索パラメータで 사용할 ことができる。あるいは、1つ以上の検索パラメータを調節してもよい。好適な検索パラメータ値を選択することは、当業者の技能の範囲内である。

#### 【0073】

本発明で使用するための一部の逆転写酵素には、RNase H活性が低減されたか、

50



実質的に低減されたか、またはそれを欠くものが含まれる。RNase H活性が低減されたかまたは実質的に低減されたそのような酵素には、上述の逆転写酵素のいずれかのRNase H-誘導体が挙げられ、これは、例えば、本明細書の他の箇所に記載される1つ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30個等の）点変異、1つ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30個等の）欠失変異、及び/または1つ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30個等の）挿入変異を導入することにより、例えば、目的の逆転写酵素内のRNase Hドメインを変異させることによって得ることができる。例えば、そのような変異は、米国特許第8,541,219号及び同第8,753,845号に記載され、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0074】

「RNase H活性が実質的に低減された」酵素とは、その酵素が、対応する野生型RNase H+酵素、例えば、野生型マロニー Maus 白血病ウイルス（M-MLV）、トリ骨髄芽球症ウイルス（AMV）、またはラウス肉腫ウイルス（RSV）逆転写酵素の約30%未満、約25%未満、約20%未満、好ましくは約15%未満、約10%未満、約7.5%未満、または約5%、最も好ましくは約5%未満または約2%未満のRNase H活性を有することを意味する。RNase H活性の低減は、例えば、対応する野生型または非変異型逆転写酵素と比較した、活性における任意の低減を意味する。したがって、一態様において、本発明の逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素と比較して、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%のRNase H活性を有してもよく、またはRNase H活性を全く有さない場合もある。

20

#### 【0075】

RNase H活性が低減されたか、実質的に低減されたか、検出不可能であるか、またはRNase H活性を欠く逆転写酵素は、既述されている（米国特許第5,668,005号、米国特許第6,063,608号、及びPCT国際公開第WO98/47912号を参照されたい）。いずれの酵素のRNase H活性も、例えば、米国特許第5,244,797号、Kotewicz, M. L., et al., Nucl. Acids Res. 16:265 (1988)、Gerard, G. F., et al., FOCUS 14(5):91 (1992)、PCT国際公開第WO98/47912号、及び米国特許第5,668,005号に記載のもの等、種々のアッセイによって判定することができ、これらは全て、その開示が参照により本明細書に完全に組み込まれる。

30

#### 【0076】

記載されるアッセイのうちの1つ以上によって検出可能なRNase H活性を有さないか、またはRNase H活性を欠く逆転写酵素もまた、本発明により企図される。したがって、一部の実施形態において、本発明で使用するための変異型酵素には、M-MLV H-逆転写酵素、RSV H-逆転写酵素、AMV H-逆転写酵素、RAV H-逆転写酵素、MAV H-逆転写酵素、及びHIV H-逆転写酵素が挙げられるが、これらに限定されない。しかしながら、当業者であれば、RNase H活性が低減されたか、または実質的に低減された、リボ核酸分子からDNA分子を生成することができる（すなわち、逆転写酵素活性を有する）任意の酵素を、本発明により同等に使用することができることを理解するであろう。

40

#### 【0077】

あるいは、本発明の逆転写酵素は、RNase Hドメインに、RNase H活性を低減させるいずれの修飾または変異も含まない場合がある。したがって、他の実施形態では、本発明の逆転写酵素は、100%のRNase H活性を有してもよく、これは、対応する野生型逆転写酵素に等しい。

#### 【0078】

本発明で使用するための逆転写酵素またはポリヌクレオチドには、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）活性が低減されているか、実質的に低減されているか、または排除されているものも含まれる。末端デオキシヌクレオチジルトランスフェ

50

ラーゼ活性が低減もしくは実質的に低減されたか、またはT d T活性が排除されているそのような酵素は、例えば、1つ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30個等の）点変異、1つ以上の欠失変異、及び/または1つ以上の挿入変異を導入することにより、例えば、鋳型プライマーと近接しているかまたは接触している目的の逆転写酵素内のアミノ酸残基を変異させることによって、得ることができる。減少したT d T活性を呈する逆転写酵素は、2006年6月6日に発行された米国特許第7,056,716号に記載されている（その全開示は、参照により本明細書に組み込まれる）。

#### 【0079】

本発明に使用するための酵素には、向上した忠実性を呈するものも含まれる。向上した忠実性を呈する逆転写酵素は、2000年3月15日に出版された米国出願第60/189,454号及び2006年6月6日に発行された米国特許第7,056,716号に記載されている（その全開示は、参照により本明細書に組み込まれる）。

10

#### 【0080】

したがって、特定の実施形態では、本発明は、熱安定性の向上及び/または熱反応性の向上を呈し、場合によっては、以下の特徴：（1）RNase H活性の低減または実質的な低減、（2）T d T活性の低減もしくは実質的な低減、及び/または（3）忠実性の向上のうちの1つ以上も呈する、逆転写酵素を含む。

#### 【0081】

本発明はさらに、上述の変異型逆転写酵素及び逆転写酵素フラグメントをコードする核酸分子を提供する。一部の実施形態では、変異型逆転写酵素及び逆転写酵素フラグメントをコードする核酸分子は、配列番号3に少なくとも80%（例えば、80%、85%、90%、95%、99%）同一である。一部の実施形態では、変異型逆転写酵素及び逆転写酵素フラグメントをコードする核酸分子は、配列番号3を含む。

20

#### 【0082】

当業者には理解されるように、本発明による変異型逆転写酵素は、当該技術分野において日常的かつ周知の組み換えまたは遺伝子工学技法によって得ることができる（例えば、Kotewicz, M. L., et al., Nucl. Acids Res. 16:265 (1988)、Soltis, D. A., and Skalka, A. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3372-3376 (1988)、米国特許第5,668,005号、及びPCT国際公開第WO98/47912号を参照されたい。変異型逆転写酵素は、例えば、上述のもの等、逆転写酵素活性を有する逆転写酵素またはポリヌクレオチドをコードする遺伝子（複数可）または核酸配列を、部位特異的またはランダムな変異生成によって変異させることによって得ることができる。そのような変異には、点変異、欠失変異、及び挿入変異を挙げることができる。好ましくは、1つ以上の点変異（例えば、1つ以上のアミノ酸と1つ以上の別のアミノ酸との置換）が、本発明の変異型逆転写酵素の構築に使用される。逆転写酵素のフラグメントは、欠失変異によって、当該技術分野において日常的かつ周知の組み換え技法によって、またはいくつかの周知のタンパク質分解酵素のうちのいずれかをを用いて目的の逆転写酵素（複数可）の酵素分解を行うことによって、得ることができる。

30

#### 【0083】

本発明により変異される逆転写酵素をコードする遺伝子または他の核酸分子をクローニングするために、逆転写酵素の遺伝子またはオープンリーディングフレームを含む単離されたDNAが、組み換えDNAライブラリを構築するために使用され得る。当該技術分野で周知の任意のベクターを使用して、目的の逆転写酵素をクローニングしてもよい。しかしながら、使用されるベクターは、組み換えベクターが形質転換される宿主と適合性でなければならない。

40

#### 【0084】

本発明はまた、発現ベクターによって形質転換された形質転換体も提供する。本発明の形質転換体は、該発現ベクターをランダムな原核生物細胞または真核生物細胞に挿入することによって容易に構築することができる。特定のベクターを細胞内に導入するための方

50

法は、当業者に周知である。本発明の好ましい実施形態において、本発明の変異型遺伝子またはポリヌクレオチド（±追加の無関係の配列、例えば、Hisタグ）を含むpBADベクターを、大腸菌Top10細胞に導入し、形質転換体の構築を促す。

#### 【0085】

本発明はまた、本発明の遺伝子またはポリヌクレオチドを含む発現ベクターも提供する。本発明の発現ベクターの構築に使用されるベクターは、限定されておらず、原核生物または真核生物の形質転換のための任意の従来のベクターを使用することができる。本発明の一部の実施形態において、組み換え発現ベクターは、配列番号3によって表される変異型遺伝子を挿入することによって構築される。

#### 【0086】

プラスミドライブラリを構築するための原核生物ベクターには、大腸菌での複製が可能なもの、例えば、pBR322、ColE1、pSC101、pUC-ベクター（pUC18、pUC19等：In：Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)、及び Sambrook et al., In：Molecular Cloning A Laboratory Manual (2d ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)）といった、プラスミドが含まれる。桿菌プラスミドには、pC194、pUB110、pE194、pC221、pC217等が挙げられる。そのようなプラスミドは、Glyczan, T.によりThe Molecular Biology Bacilli, Academic Press, York (1982), 307-329に開示されている。好適なストレプトマイセスプラスミドには、pIJ101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169: 4177-4183 (1987))が挙げられる。シュドモナスプラスミドは、John R (Rad. Insec. Dis. 8: 693-704 (1986))及びIgaki, (Jpn. J. Bacteriol. 33: 729-742 (1978))によって考察されている。宿主が広範囲なプラスミドまたはコスミド、例えばpCP13 (Darzins and Chakrabarty, J. Bacteriol. 159: 9-18 (1984))もまた、本発明に使用することができる。本発明の遺伝子及び核酸分子をクローニングするのに好適なベクターは、原核生物ベクターである。好ましくは、pBAD、pCP13、及びpUCベクターが、本発明の遺伝子のクローニングに使用される。他の好適なベクターは当業者に既知であり、市販入手可能である。

#### 【0087】

目的の逆転写酵素遺伝子及び核酸分子をクローニングするのに好適な宿主は、原核生物宿主である。原核生物宿主の一例は、大腸菌である。しかしながら、本発明の所望される逆転写酵素遺伝子及び核酸分子は、大腸菌属、バチルス属、ストレプトマイセス属、シュドモナス属、サルモネラ属、セラチア属、及びプロテウス属の宿主を含むがこれらに限定されない、他の原核生物宿主においてクローニングすることができる。特に興味深い細菌宿主としては、大腸菌DH10Bが挙げられ、これは、Life Technologies, Corp. (Carlsbad, Calif.)から入手可能である。

#### 【0088】

目的の逆転写酵素のクローニング及び発現のための真核生物宿主には、酵母、真菌、及び哺乳動物細胞が挙げられる。そのような真核生物細胞における所望される逆転写酵素の発現は、真核生物プロモーターを含む、真核生物制御領域の使用が必要な場合がある。真核生物細胞における逆転写酵素遺伝子または核酸分子のクローニング及び発現は、周知の真核生物ベクター系を用いて周知の技法により達成することができる。

#### 【0089】

DNAライブラリが特定のベクターに構築された後、適切な宿主が、周知の技法によって形質転換される。一部の実施形態では、形質転換した細胞は、ペトリ皿当たりおよそ2

10

20

30

40

50

00～300個の形質転換コロニーをもたらす密度で播種される。逆転写酵素の選択のために、コロニーを、次いで、当業者に周知の方法を使用して、逆転写酵素または熱安定性逆転写酵素の発現に関してスクリーニングしてもよい。例えば、一部の実施形態では、個々の形質転換体の一晚培養物を溶解させ、50で15分間加熱し、蛍光標識したステムループ鋳型（例えば、FRETアッセイ）を使用して、逆転写酵素もしくは熱安定性逆転写酵素の活性及び／または他の望ましい活性に関して、アッセイする。例えば、Nikiforov, T. T., Anal Biochem., 2011, 412(2): 229-36を参照されたい。一部の実施形態では、熱安定性逆転写酵素活性及び／または他の望ましい活性が検出され、どのアミノ酸が逆転写酵素活性を維持するかを判定するために、この変異体に配列決定を行う。本発明の逆転写酵素をコードする遺伝子または核酸分子は、当業者に既知の技法を使用してクローニングすることができる。

10

#### 【0090】

##### 変異型逆転写酵素

本発明によると、示されるいくつかの変異を逆転写酵素に行うことができ、好ましい態様では、記載されるように、熱安定性の向上、熱活性、阻害物質耐性の向上をもたらし、かつ／または逆転写酵素に他の所望される特性を与えるために、複数の変異がなされてもよい。そのような変異には、点変異、フレームシフト変異、欠失、及び挿入が挙げられる。好ましくは、1つ以上のアミノ酸置換をもたらす1つ以上の点変異を使用して、強化もしくは向上した熱安定性及び／もしくは熱反応性または向上した阻害物質耐性を有する逆転写酵素が生成される。

20

#### 【0091】

変異は、当業者に既知の任意の手法を用いて本発明の逆転写酵素に導入することができる。変異は、例えば、二価金属イオン補助因子としてマンガンの存在下でPCR反応を行うことによって、ランダムに導入することができる。あるいは、オリゴヌクレオチド指向性変異生成を用いて、コードするDNA分子の任意の決定された部位で可能性のある全てのクラスの塩基対変化を可能にする変異型ポリメラーゼを作出してもよい。一般に、この技法は、目的の逆転写酵素をコードする一本鎖ヌクレオチド配列に相補的な（1つ以上の不一致を除く）オリゴヌクレオチドをアニーリングすることを伴う。不一致のオリゴヌクレオチドを、次いで、DNAポリメラーゼによって伸長させて、一本の鎖の配列に所望される変化を有する二本鎖DNA分子を生成する。配列の変化は、例えば、アミノ酸の欠失、置換、または挿入をもたらす得る。二本鎖ポリヌクレオチドは、次いで、適切な発現ベクターに挿入することができ、このようにして変異型ポリペプチドが生成され得る。上述のオリゴヌクレオチド指向性変異生成は、例えば、PCRにより実行することができる。

30

#### 【0092】

一般に、本発明は、部分的に、逆転写酵素をその非変異型対応物と比較してより熱安定性及び／または熱反応性にする、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、18、20個等）の変異または修飾を指定されるアミノ酸部位に有する逆転写酵素を提供する。本発明はまた、逆転写酵素に対応する非変異型逆転写酵素よりも効率的（例えば、速度及び／または処理能力の向上）、特異的、逆転写酵素阻害物質に対して耐性にし、かつ／または難しいRNA鋳型からcDNAを生成する能力を高める1つ以上の指定の変異または修飾を有する逆転写酵素を提供する。

40

#### 【0093】

一部の実施形態において、本発明によって提供される逆転写酵素の変異または修飾は、向上したまたは強化された熱安定性及び／または熱反応性を有する変異型逆転写酵素を生成することができるような手段で、逆転写酵素の認識された領域（例えば、polまたはRNase H領域）に行われる。修飾または変異はまた、本発明により他の領域に行われてもよい（例えば、酵素Kd、熱安定性、忠実性、基質結合等に役割を果たすことが既知の領域等）。したがって、本発明は、本明細書の他の箇所に記載されるように、向上した熱安定性（ならびに他の特性）を呈し、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20個等）の指定される変異もしくは修飾または変異もしくは修飾の組み合わせ

50

を有する、逆転写酵素を含む。

【 0 0 9 4 】

本発明のある特定の実施形態において、以下の表 1 に列挙される野生型 M - M L V 逆転写酵素（配列番号 2）の配列に対応するアミノ酸位置のうちの 1 つ以上に、アミノ酸置換がなされる（例えば、アミノ酸位置 5 1、6 7、6 9、1 9 6、1 9 7、2 0 0、2 0 4、2 8 9、3 0 2、3 0 6、3 0 9、3 1 3、4 3 5、4 5 4、5 2 4、5 6 2、5 8 3、5 9 4、6 0 3、6 5 3、及び 6 7 1）。本発明によると、これらの位置の野生型アミノ酸は、A l a、A r g、A s n、A r g、A s p、C y s、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、及び V a l を含む任意の他のアミノ酸と置換され得る。これらの位置におけるある特定の例示的なアミノ酸は、表 1 に列挙されるものである（例えば、L / P 5 1、S / R / N / K 6 7、K / E 6 9、S / P 1 9 6、T / A / S / G 1 9 7、N / D 2 0 0、H / R 2 0 4、L / M 2 8 9、K / R / E / G 3 0 2、T / K 3 0 6、F / Y / I / N 3 0 9、F / L / C / W 3 1 3、P / T 3 3 0、L / V / R / G 4 3 5、N / K 4 5 4、D / G 5 2 4、Q / E 5 6 2、N / D 5 8 3、N / D 5 9 4、H / Q 6 0 3、H / N / D 6 5 3、及び L / P 6 7 1。したがって、向上した熱安定性及び / または熱反応性を呈する本発明による逆転写酵素の特定の例としては、（ 1 ） 5 1 位の残基がプロリン（ P ）またはリジン（ L ）である、（ 2 ） 6 7 位の残基がセリン（ S ）、アルギニン（ R ）、リジン（ K ）、またはアスパラギン（ N ）である、（ 3 ） 6 9 位の残基がグルタミン酸（ E ）またはリジン（ K ）である、（ 4 ） 1 9 6 位の残基がプロリン（ P ）またはセリン（ S ）である、（ 5 ） 1 9 7 位の残基がスレオニン（ T ）、グリシン（ G ）、セリン（ S ）、またはアラニン（ A ）である、（ 6 ） 2 0 0 位の残基がアスパラギン酸（ D ）またはアスパラギン（ N ）である、（ 7 ） 2 0 4 位の残基がヒスチジンまたはアスパラギン（ R ）である、（ 8 ） 2 8 9 位の残基がメチオニン（ M ）またはロイシン（ L ）である、（ 9 ） 3 0 2 位の残基がグルタミン酸残基（ E ）、リジン（ K ）、アルギニン（ R ）、またはグリシン（ G ）である、（ 1 0 ） 3 0 6 位の残基がスレオニン（ T ）またはリジン（ K ）である、（ 1 1 ） 3 0 9 位の残基がフェニルアラニン（ F ）、チロシン（ Y ）、イソロイシン（ I ）またはアスパラギン（ N ）である、（ 1 2 ） 3 1 3 位の残基がトリプトファン（ W ）、フェニルアラニン（ F ）、ロイシン（ L ）、またはシステイン（ C ）である、（ 1 3 ） 3 3 0 位の残基がチロシン（ Y ）またはプロリン（ P ）である、（ 1 4 ） 4 3 5 位の残基がロイシン（ L ）、バリン（ V ）、アルギニン（ R ）、またはグリシン（ G ）である、（ 1 5 ） 4 5 4 位の残基がアスパラギン（ N ）またはリジン（ K ）である、（ 1 6 ） 5 2 4 位の残基がアスパラギン酸（ D ）またはグリシン（ G ）である、（ 1 7 ） 5 6 2 位の残基がグルタミン酸（ E ）またはグルタミン（ Q ）である、（ 1 8 ） 5 8 3 位の残基がアスパラギン酸（ D ）またはアスパラギン（ N ）である、（ 1 9 ） 5 9 4 位の残基がヒスチジン（ H ）またはグルタミン（ Q ）である、（ 2 0 ） 6 0 3 位の残基がロイシン（ L ）またはトリプトファン（ W ）である、（ 2 1 ） 6 5 3 位の残基がアスパラギン酸（ D ）、ヒスチジン（ H ）、またはアスパラギン（ N ）である、及び（ 2 2 ） 6 7 1 位の残基がロイシン（ L ）またはプロリン（ P ）である、M - M L V - 逆転写酵素が挙げられる。

10

20

30

【表 1】

## 変異型逆転写酵素

アミノ酸位置	51	67	69	196	197	200	204	289	302	306	309	313	330	435	454	524	562	583	594	603	653	671
アミノ酸置換																						
(所定の位置について列挙されたいずれのアミノ酸も、任意の他の所定の位置に列挙された任意のアミノ酸と組み合わせで選択され得る)	L	S			T				K		F	F		L								
	P	R			A				R		Y	L		V							H	
	N	K	S	S	N	H	L	E	T	I	C	P	R	N	D	Q	N	H	L	N	L	
	K	E	P	G	D	R	M	G	K	N	W	T	G	K	G	E	D	Q	W	D	P	
<b>野生型</b>																						
<b>M-MLV RT</b>	P	S	E	P	T	D	H	M	E	T	F	W	T	L	N	D	E	D	H	L	D	L
<b>変異型</b>																						
<b>M-MLV RT</b>																						
A7	P	R	E	P	S	D	H	L	R	T	N	W	P	R	K	D						
D3	P	S	E	P	T	N	H	L	K	T	F	W	P	G	K	G	E	N	Q	L	H	P
D9	L	R	K	P	A	D	R	M	K	T	N	F	P	G	K	G	E	N	Q	L	N	P
E7	P	R	K	P	S	N	H	L	R	K	Y	F	T	R	K	G	E	D	H	W	D	L
P1A7	P	R	K	P	A	N	H	L	K	T	Y	F	P	G	N	G	E	N	H	W	H	P
P1E2	P	K	K	P	T	D	R	M	R	T	N	F	P	L	K	G						
P2A5	P	R	K	P	S	N	H	L	E	T	F	L/W	P	R	K	G	Q	N	H	L	H	L
P2B4	P	K	K	P	S	N	R	L	E	K	I	F	P	R	K	G	E	D	H	W	H	P
P2B6	P	S	K	P	S	D	H	L	G	K	N	F	P	R	K	D	E	N	Q	W	N	L
P2C3	P	R	K	P	A	D	R	M	R	T	N	F	P	L	K	G	E	N	Q	W	D	P
P3A8	P	S	K	S	T	D	R	L	R	T	N	W	P	G	K	G	E	N	H	W	D	P
P3H6	P	R	K	P	T	N	H	L	K	T	Y	C	P	R	K	D	E	N	Q	?	H	L

10

20

30

40

P4B4	P K K P T D R L G T N F T L N G E N Q L N P
P4F6	P K E P A D H M K T N F P G K D
C9	P R K P T D H L E K I L T L K D E D H ? H P
D8	L K K P A N H M K K I W P G N G E D Q W D P
E3	L K K P T N R L G K I L P G N D E N H W H P
F4	L K E P T N H M E K N F T R K G Q N H W H P
<b>他の可能性のある</b>	
<b>RT</b>	
ヒヒ	D S E P T D H A E T F W E I N D E D H L D P
ネコ	Q P E P T D H L E T Y W P L N D E D H L D
コアラ	E S E P T D H M E T F W E I N D E D H L D K
ニワトリ	Q T E P T D N L E T Y W G T N D E D H L D S
ヒト	E P E P T G A C K A F W W K N D E D H L D L
フクロネズミ	P P A P T S A L E T Y W E A H D E D H Y D L
イノシシ	Q S E P T D H V E T F W E I N D E D H L D M

10

20

30

40

50

## 【0095】

一部の実施形態において、逆転写酵素における熱反応性及び／または熱安定性特性を改変させる変異または修飾は、通常逆転写酵素に関連する活性（例えば、RNAse H活性、逆転写酵素もしくはポリメラーゼ活性、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdTase）活性等）に対する影響がほとんどもしくは全くないか、通常逆転写酵素に関連するこれらの活性のうちの1つ以上を実質的に改変させるかのいずれかである改変とともに存在してもよい。

## 【0096】

一部の実施形態において、野生型M-MLV（配列番号2）逆転写酵素の位置S67、T197、及びE302に相当または対応する位置における1つ以上の変異が、所望される結果（例えば、熱安定性の向上、熱反応性の向上、効率の向上（速度及び処理能力）、特異性の向上、逆転写酵素阻害物質に対する耐性の向上、及び難しいRNA鋳型からcDNAを生成する能力の向上）を得るために行われ得る。したがって、一部の実施形態において、M-MLV逆転写酵素のアミノ酸位置を参照フレームとして使用することにより、本発明の逆転写酵素は、以下の改変：（S67R、S67N、またはS67K）、（T197A、T197S、T197G）、及び（302K、E302R、またはE302G）のうちの1つ以上に位置が対応する改変を有する任意の逆転写酵素（例えば、M-MLV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、HIV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、例えば、ヒヒ、鶏痘、コアラ、及びイノシシ種から単離されたウイルスに由来する逆転写酵素）、ならびに、これらの変異型タンパク質、これらのタンパク質をコードする核酸分子、及びこれらの核酸分子を含む宿主細胞を含む、組成物、キット、及び反応混合物を含む。

## 【0097】

他の実施形態では、野生型 M - M L V (配列番号 2) 逆転写酵素の位置 P 5 1、E 6 9、P 1 9 6、D 2 0 0、H 2 0 4、M 2 8 9、T 3 0 6、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、E 5 6 2、D 5 8 3、H 5 9 4、L 6 0 3、D 6 5 3、及び L 6 7 1 に相当または対応する位置における 6 つ以上の変異が、所望される結果 (例えば、熱安定性の向上、熱反応性の向上、効率の向上 (速度及び処理能力)、特異性の向上、逆転写酵素阻害物質に対する耐性の向上、及び / または難しい R N A 鋳型から c D N A を生成する能力の向上) を得るために行われ得る。したがって、特定の実施形態において、M - M L V 逆転写酵素のアミノ酸位置を参照フレームとして使用することにより、本発明の逆転写酵素は、以下の改変: P 5 1 L、E 6 9 K、P 1 9 6 S、D 2 0 0 N、H 2 0 4 R、M 2 8 9 L、T 3 0 6 K、( F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、または F 3 0 9 I )、( W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、または W 3 1 3 C )、T 3 3 0 P、( L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、または L 4 3 5 R )、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、E 5 6 2 Q、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、L 6 0 3 W、( D 6 5 3 N または D 6 5 3 H )、及び L 6 7 1 P のうちの 6 つ以上を有する任意の逆転写酵素 (例えば、M - M L V 逆転写酵素、A M V 逆転写酵素、H I V 逆転写酵素、R S V 逆転写酵素、例えば、ヒヒ、鶏痘、コアラ、及びイノシシ種から単離されたウイルスに由来する逆転写酵素)、ならびに、これらの変異型タンパク質、これらのタンパク質をコードする核酸分子、及びこれらの核酸分子を含む宿主細胞を含む、組成物及び反応混合物を含む。

10

## 【0098】

20

他の実施形態では、野生型 M - M L V (配列番号 2) 逆転写酵素の位置 S 6 7、T 1 9 7、及び E 3 0 2 に相当または対応する位置における 1 つ以上の変異、ならびに追加として、位置 P 5 1、E 6 9、P 1 9 6、D 2 0 0、H 2 0 4、M 2 8 9、T 3 0 6、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、E 5 6 2、D 5 8 3、H 5 9 4、L 6 0 3、D 6 5 3、及び L 6 7 1 に相当または対応する位置における 1 つ以上の変異が、所望される結果 (例えば、熱安定性の向上、熱反応性の向上、効率の向上 (速度及び処理能力)、特異性の向上、逆転写酵素阻害物質に対する耐性の向上、及び / または難しい R N A 鋳型から c D N A を生成する能力の向上) を得るために行われ得る。したがって、特定の実施形態において、M - M L V 逆転写酵素のアミノ酸位置を参照フレームとして使用することにより、本発明のタンパク質は、以下の改変: ( S 6 7 R、S 6 7 N、または S 6 7 K )、( T 1 9 7 A、T 1 9 7 S、T 1 9 7 G )、及び ( 3 0 2 K、E 3 0 2 R、または E 3 0 2 G ) のうちの 1 つ以上、ならびに追加として、以下の改変: P 5 1 L、E 6 9 K、P 1 9 6 S、D 2 0 0 N、H 2 0 4 R、M 2 8 9 L、T 3 0 6 K、( F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、または F 3 0 9 I )、( W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、または W 3 1 3 C )、T 3 3 0 P、( L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、または L 4 3 5 R )、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、E 5 6 2 Q、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、L 6 0 3 W、( D 6 5 3 N または D 6 5 3 H )、及び L 6 7 1 P のうちの 1 つ以上を有する逆転写酵素 (例えば、M - M L V 逆転写酵素、A M V 逆転写酵素、H I V 逆転写酵素、R S V 逆転写酵素、例えば、ヒヒ、鶏痘、コアラ、及びイノシシ種から単離されたウイルスに由来する逆転写酵素)、ならびに、これらの変異型タンパク質、これらのタンパク質をコードする核酸分子、及びこれらの核酸分子を含む宿主細胞を含む、組成物及び反応混合物を含む。

30

40

## 【0099】

他の実施形態では、野生型 M - M L V (配列番号 2) 逆転写酵素の位置 P 5 1、E 6 9、P 1 9 6、D 2 0 0、H 2 0 4、M 2 8 9、T 3 0 6、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、E 5 6 2、D 5 8 3、H 5 9 4、L 6 0 3、D 6 5 3、及び L 6 7 1 に相当または対応する位置における 6 つ以上の変異、ならびに追加として、位置 S 6 7、T 1 9 7、及び E 3 0 2 に相当または対応する位置における 1 つ以上の変異が、所望される結果 (例えば、熱安定性の向上、熱反応性の向上、効率の向上 (速度及び処理能力)、特異性の向上、逆転写酵素阻害物質に対する耐性の向上、及び / または難しい R N A 鋳型から c D N A を生成する能力の向上) を得るために行われ得る。したがっ

50



て、特定の実施形態において、M - M L V 逆転写酵素のアミノ酸位置を参照フレームとして使用することにより、本発明のタンパク質は、以下の改変：P 5 1 L、E 6 9 K、P 1 9 6 S、D 2 0 0 N、H 2 0 4 R、M 2 8 9 L、T 3 0 6 K、( F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、または F 3 0 9 I )、( W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、または W 3 1 3 C )、T 3 3 0 P、( L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、または L 4 3 5 R )、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、E 5 6 2 Q、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、L 6 0 3 W、( D 6 5 3 N または E 3 0 2 G )、及び L 6 7 1 P のうちの 6 つ以上、ならびに追加として、以下の改変：( S 6 7 R、S 6 7 N、または S 6 7 K )、( T 1 9 7 A、T 1 9 7 S、T 1 9 7 G )、及び ( E 3 0 2 K、E 3 0 2 R、または E 3 0 2 G ) のうちの 1 つ以上を有する逆転写酵素（例えば、M - M L V 逆転写酵素、A M V 逆転写酵素、H I V 逆転写酵素、R S V 逆転写酵素、例えば、ヒビ、鶏痘、コアラ、及びイノシシ種から単離されたウイルスに由来する逆転写酵素）、ならびに、これらの変異型タンパク質、これらのタンパク質をコードする核酸分子、及びこれらの核酸分子を含む宿主細胞を含む、組成物及び反応混合物を含む。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 0 0 】

他の実施形態では、野生型 M - M L V ( 配列番号 2 ) 逆転写酵素の位置 S 6 7、T 1 9 7、及び E 3 0 2 に相当または対応する各位置における変異、ならびに追加として、位置 P 5 1、E 6 9、H 2 0 4、F 3 0 9、W 3 1 3、T 3 3 0、L 4 3 5、N 4 5 4、D 5 2 4、D 5 8 3、H 5 9 4、D 6 5 3、及び L 6 7 1 に相当または対応する各位置における 1 つ以上の変異が、所望される結果（例えば、熱安定性の向上、熱反応性の向上、効率の向上（速度及び処理能力）、特異性の向上、逆転写酵素阻害物質に対する耐性の向上、及び / または難しい R N A 鋳型から c D N A を生成する能力の向上）を得るために行われ得る。したがって、特定の実施形態において、M - M L V 逆転写酵素のアミノ酸位置を参照フレームとして使用することにより、本発明のタンパク質は、以下：( S 6 7 R、S 6 7 N、または S 6 7 K )、( T 1 9 7 A、T 1 9 7 S、T 1 9 7 G )、及び ( 3 0 2 K、E 3 0 2 R、または E 3 0 2 G )、ならびに追加として、位置 P 5 1 L、E 6 9 K、H 2 0 4 R、( F 3 0 9 N、F 3 0 9 Y、または F 3 0 9 I )、( W 3 1 3 F、W 3 1 3 L、または W 3 1 3 C )、T 3 3 0 P、( L 4 3 5 G、L 4 3 5 V、または L 4 3 5 R )、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q、( D 6 5 3 N または D 6 5 3 H )、及び L 6 7 1 P に改変を有する逆転写酵素（例えば、M - M L V 逆転写酵素、A M V 逆転写酵素、H I V 逆転写酵素、R S V 逆転写酵素、例えば、ヒビ、鶏痘、コアラ、及びイノシシ種から単離されたウイルスに由来する逆転写酵素）、ならびに、これらの変異型タンパク質、これらのタンパク質をコードする核酸分子、及びこれらの核酸分子を含む宿主細胞を含む、組成物及び反応混合物を含む。一部の実施形態において、本発明の逆転写酵素は、以下の変異：P 5 1 L、S 6 7 R、E 6 9 K、T 1 9 7 A、H 2 0 4 R、E 3 0 2 M、F 3 0 9 N、W 3 1 3 F、T 3 3 0 P、L 4 3 5 G、N 4 5 4 K、D 5 2 4 G、D 5 8 3 N、H 5 9 4 Q D 6 5 3 N、及び L 6 7 1 P を有し、「M u t D 9」（配列番号 4）とも称される。

#### 【 0 1 0 1 】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載される特性及び配列番号 4 に少なくとも 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有する、変異型逆転写酵素またはポリペプチドを提供する。例えば、一部の実施形態において、本発明の逆転写酵素は、配列番号 4 に少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である。一部の実施形態において、本発明は、配列番号 4 を含む変異型逆転写酵素またはポリペプチドを提供する。一部の好ましい実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素またはポリペプチドの特性は、次のもののうちの 1 つ以上を含む：( a ) 熱安定性の向上、( b ) 熱反応性の向上、( c ) 逆転写酵素阻害物質に対する耐性の向上、( d ) 速度の向上、( e ) プライマーのない逆転写の減少、及び ( f ) 処理能力の向上。

#### 【 0 1 0 2 】

上記で特定される M - M L V 逆転写酵素の対応する位置は、当業者によって他の逆転写

酵素に関して容易に特定することができる。したがって、本出願において記載される規定の領域及びアッセイを考慮すると、当業者であれば、熱安定性の向上、熱反応性の向上、及び/または目的の任意の逆転写酵素の他の所望される特徴をもたらすであろう指定の修飾を行うことができる。本発明により変異を受ける他の既知の逆転写酵素の特定された領域及び残基には、図1A～1Dに列挙されるものが含まれ得る。

#### 【0103】

野生型M - M L V逆転写酵素のヌクレオチド配列(配列番号1)は、当業者に周知である。例えば、Shinnick et al., 1981, Nature 293:543-548、Georgiadis et al., 1995, Structure 3:879-892)を参照されたく、この開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0104】

一部の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチド指向性変異生成を用いて、コードするDNA分子の任意の決定された部位で可能性のある全ての塩基対変化を可能にする変異型逆転写酵素が作出される。当業者であれば、一度置換されたアミノ酸が、類似の特徴を有する別のアミノ酸と再度置き換えられた場合であっても、類似の生理学的及び生化学的特性が依然として観察されることを十分に認識している。アミノ酸置換が種々のアミノ酸の特性ならびにタンパク質の構造及び機能に及ぼす影響が、当業者により十分に研究されている。

#### 【0105】

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素よりも高い熱安定性及び/または熱反応性を呈する。一部の実施形態において、以下の変異:P51L、S67R、E69K、T197A、H204R、E302K、F309N、W313F、T330P、L435G、N454K、D524G、D583N、H594Q、D653N、及びL671Pを有するM - M L V変異型逆転写酵素は、60℃で向上した熱安定性を呈する。具体的には、一部の実施形態において、本明細書に開示される変異型M - M L V逆転写酵素は、野生型M - M L V逆転写酵素と比較して、ならびに他の市販のM - M L V誘導体逆転写酵素(例えば、Q - S S、S S I I、及びS S I I I)の60℃よりも随分低い温度(すなわち、それぞれ、37℃、42℃、及び50℃)におけるものと比較して、60℃において向上した逆転写酵素活性を呈する。例えば、図2を参照されたい。

20

30

#### 【0106】

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素と比較して、向上した逆転写酵素活性を呈する。一部の好ましい実施形態において、変異型逆転写酵素は、37℃を上回る反応温度において、向上した逆転写酵素活性を呈する。例えば、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、38℃、40℃、42℃、45℃、48℃、50℃、52℃、55℃、58℃、60℃、62℃、65℃、68℃、70℃、72℃、75℃、78℃等の反応温度において、向上した逆転写酵素活性を呈する。例えば、図4を参照されたい。

#### 【0107】

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素と比較して少なくとも10%高い、向上した逆転写酵素活性を呈する。例えば、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素と比較して少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%等高い、逆転写酵素活性を呈する。一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、野生型逆転写酵素が呈する逆転写酵素活性の110%、115%、120%、125%、150%、200%、250%、300%、400%、500%等の量を呈する。一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素よりも少なくとも約1.1倍、1.5倍、1.8倍、2倍、4倍

40

50

、6倍、8倍、10倍、30倍、40倍、50倍等高く熱反応性である。一部の実施形態において、本発明の野生型逆転写酵素は、変異型逆転写酵素の反応またはインキュベーション温度が、野生型ポリメラーゼの反応またはインキュベーション温度と比較して高い温度である場合ですら、対応する野生型逆転写酵素と比較して向上した活性を呈する。

【0108】

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素と比較して、両方の逆転写酵素が同じ反応温度（例えば、37、40、42、50、52、55、58、60、62、65、70、または75）にあるとき、改善または向上した特性を呈する。一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、対応する野生型逆転写酵素がより低温（例えば、37、40、42、50）で呈する同じ特性と比較して、上昇した反応温度（例えば、52、55、58、60、62、65、70、75）において、改善または向上した特性を呈する。

10

【0109】

別の態様において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、同じpHで対応する野生型逆転写酵素が呈する活性と比較して、改善または向上した活性（例えば、熱安定性または熱反応性）をより低いpHで呈する。例えば、図3を参照されたい。

【0110】

一部の実施形態において、本発明の逆転写酵素は、類似または同じ条件下にある非変異型または従来のRTと比較して、より広範囲のpHで、向上した活性を呈する。例えば、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、約pH5.5～約pH9.0（例えば、約pH6.0、約pH6.5、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、約pH7.4、約pH7.5、約pH7.6、約pH7.7、約pH7.8、約pH7.9、約pH8.0、約pH8.1、約pH8.2、約pH8.3、約pH8.4、約pH8.5、約pH8.6、約pH8.7、約pH8.8、約pH8.9、約pH9.0、約pH6.0～約pH8.5、約pH6.5～約pH8.5、約pH7.0～約pH8.5、約pH7.5～約pH8.5、約pH6.0～約pH8.0、約pH6.0～約pH7.7、約pH6.0～約pH7.5、約pH6.0～約pH7.0、約pH7.2～約pH7.7、約pH7.3～約pH7.7、約pH7.4～約pH7.6、約pH7.0～約pH7.4、約pH7.6～約pH8.0、約pH7.6～約pH8.5、約pH7.7～約pH8.5、約pH7.9～約pH8.5、約pH8.0～約pH8.5、約pH8.2～約pH8.5、約pH8.3～約pH8.5、約pH8.4～約pH8.5、約pH8.4～約pH9.0、約pH8.5～約pH9.0等）のpH範囲で、野生型逆転写酵素と比較して向上した活性を呈する。一部の実施形態において、本発明の変異型逆転写酵素は、同じpHにおいて野生型RTと比較して、少なくとも10%（例えば、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、200%、300%、500%等）高い活性を呈する。他の実施形態では、本発明の変異型逆転写酵素は、同じpHにおいて野生型RTと比較して、少なくとも10%（例えば、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、200%、300%、500%等）高いcDNA生成物を生成する。さらなる他の実施形態では、本発明の変異型逆転写酵素は、同じpHにおいて対応する野生型RTが生成するcDNA生成物よりも少なくとも10%（例えば、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、200%、300%、500%等）長いcDNA生成物を生成する。なおも他の実施形態では、本発明の変異型逆転写酵素は、同じpHにおいて対応する野生型RTのものよりも少なくとも10%（例えば、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、200%、300%、500%等）速い速度で、cDNA生成物を生成する。例えば、本発明の変異型逆転写酵素は、同じpHにおいて対応する野生型RTよりも少なくとも2倍（例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍等）多いcDNA生成物を生成する。

20

30

40

【0111】

50

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、55～75の温度に加熱した後、少なくとも20%の逆転写酵素活性を保持する。例えば、変異型逆転写酵素は、55～75の温度に加熱した後、少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、99%、または100%の逆転写酵素活性を保持する。一部の  
実施形態では、変異型逆転写酵素は、55～75の温度まで少なくとも5分間加熱した  
後、少なくとも20%の逆転写酵素活性を保持する。例えば、変異型逆転写酵素は、5  
5～75の温度まで少なくとも5分間加熱した後、少なくとも20%、25%、30  
%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80  
%、90%、95%、99%、または100%の逆転写酵素活性を保持する。

10

**【0112】**

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、50  
～75の温度に加熱した後、少なくとも20%の逆転写酵素活性を保持する。例えば、  
変異型逆転写酵素は、50、55、58、60、62、64、68、70  
、72、または75の温度に加熱した後、少なくとも20%の逆転写酵素活性を保  
持する。一部の実施形態において、変異型逆転写酵素は、50～75の温度まで少な  
くとも5分間加熱した後、少なくとも20%の逆転写酵素活性を保持する。例えば、変異  
型逆転写酵素は、50、58、60、62、64、68、70、72、  
または75の温度まで少なくとも5分間加熱した後、少なくとも20%の逆転写酵素活  
性を保持する。

20

**【0113】**

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、50  
～75の温度まで少なくとも1分間加熱した後、少なくとも20%の逆転写酵素活性を  
保持する。例えば、変異型逆転写酵素は、50～75の温度まで少なくとも1分間、  
2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、30分間、40分間、50分間、60  
分間等加熱した後、少なくとも20%の逆転写酵素活性を保持する。一部の実施形態にお  
いて、変異型逆転写酵素は、約50、約55、約58、約60、約62、約6  
4、約68、約70、約72、または約75の温度まで少なくとも約1分間、  
約2分間、約5分間、約10分間、約15分間、約20分間、約30分間、約40分間、  
約50分間、または約60分間加熱した後、少なくとも約20%、約25%、約30%、  
約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、  
約75%、約80%、約90%、約95%、約99%、または約100%の逆転写酵素活  
性を保持する。

30

**【0114】**

本発明の一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、長さが  
少なくとも0.2kbであるcDNAを生成することができる。例えば、変異型逆転写酵  
素は、長さが0.2kb、0.5kb、1kb、1.5kb、2kb、3kb、4kb、  
5kb、6kb、7kb、7.5kb、8kb、8.5kb、9kb、9.5kb、10  
kb、15kb、または20kb等であるcDNAを生成することができる。一部の実施  
形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、長さが約0.2kb～10k  
bであるcDNAを生成することができる。一部の実施形態において、本明細書に記載さ  
れる変異型逆転写酵素は、25～75の温度で1分～60分以内に、長さが約0.2  
kb～10kbであるcDNAを生成することができる。一部の実施形態において、変異  
型逆転写酵素は、少なくとも37（例えば、37、40、45、50、55  
、60、70、または75）の温度で1分、5分、10分、15分、20分、30  
分、40分、50分、または60分以内に、長さが約0.2kb～10kbであるcDN  
Aを生成することができる。

40

**【0115】**

一部の好ましい実施形態では、本発明の変異型または変異生成した逆転写酵素は、対応  
する野生型逆転写酵素よりも高い熱安定性を呈する。具体的には、本明細書に記載される

50

変異型逆転写酵素は、向上した熱安定性及び／または向上した熱反応性を呈する。本明細書に記載の可能性がある変異型逆転写酵素の中でも、例示的な変異体「D9」（配列番号4）（図11を参照されたい）は、少なくとも50 で向上した熱安定性を呈する。一部の実施形態において、60 において、この例示的な変異型逆転写酵素は、37 の温度で野生型M - MLV逆転写酵素よりも効率的にcDNAを生成する。

#### 【0116】

別の態様において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、例えば、血液、汗、涙、土壌、糞便、唾液、尿、及び胆汁を含む、生物試料に見られる酵素阻害物質に対して耐性である。そのような阻害物質としては、フミン酸、ヘパリン、エタノール、胆汁酸塩、フルボ酸、多糖類、金属イオン、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、EDTA、グアニジウム塩、ホルムアミド、ピロリン酸ナトリウム、及びスペルミジンが挙げられるがこれらに限定されない。阻害物質耐性逆転写酵素（inhibitor-resistant reverse transcriptase）とは、本明細書に使用されるとき、反応混合物中の阻害物質（複数可）の存在下にいて、少なくとも10%の逆転写酵素活性を呈する逆転写酵素を指し得る。例えば、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、阻害物質を含まない反応と比較して、阻害物質の存在下において最大約90%（例えば、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%等）の逆転写酵素活性を呈する。任意の所与の反応混合物中における阻害物質の量は、アッセイされる核酸が抽出される生物試料内に存在する阻害性物質の種類に依存し得る。一般には、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は（高い温度のときであっても）、対応する野生型逆転写酵素と比較して、少なくとも2倍（例えば、2倍、3倍、5倍、10倍、50倍、100倍）高い濃度のこれらの阻害性物質に耐え得る。試料中の阻害性物質の濃度を判定するアッセイは、当該技術分野で既知である。阻害物質耐性は、本明細書に記載されるアッセイによって容易に判定することができる。

#### 【0117】

##### 逆転写酵素の発現

本発明の逆転写酵素の発現を最適化するためには、誘導性または構成性プロモーターが周知であり、これらを、組み換え宿主において高レベルの逆転写酵素の構造遺伝子を発現させるために用いることができる。同様に、当該技術分野で周知の高コピー数ベクターを用いて高レベルの発現を達成することもできる。誘導性高コピー数を有するベクターもまた、組み換え宿主における本発明の逆転写酵素の発現を強化するのに有用であり得る。

#### 【0118】

原核生物細胞（例えば、大腸菌、枯草菌、シュドモナス等）において所望される構造遺伝子を発現させるためには、所望される構造遺伝子を機能性原核生物プロモーターに機能的に連結させることが好ましい。しかしながら、逆転写酵素遺伝子の天然のプロモーターが、原核生物宿主において機能し、逆転写酵素遺伝子の発現を可能にさせることができる。したがって、天然のプロモーターまたは他のプロモーターを、逆転写酵素遺伝子を発現させるのに用いることができる。発現を強化するために使用することができるそのような他のプロモーターには、構成性または制御性（すなわち、誘導性または抑制解除性）プロモーターが挙げられる。構成性プロモーターの例としては、バクテリオファージのintプロモーター、及びpBR322の-lakタマーゼ遺伝子のblaプロモーターが挙げられる。誘導性原核生物プロモーターの例としては、バクテリオファージの主な右側及び左型のプロモーター（PR及びPL）、trp、recA、lacZ、lad、tet、gal、trc、araBAD（Guzman, et al., 1995, J. Bacteriol. 177(14): 4121-4130）、ならびに大腸菌のtacプロモーターが挙げられる。枯草菌プロモーターには、-アミラーゼ（Ulmanen et al., J. Bacteriol. 162: 176-182 (1985)）及び桿菌バクテリオファージプロモーター（Gryczan, T., In: The Molecular Biology Of Bacilli, Academic Press, N

ew York (1982)) が挙げられる。ストレプトマイセスプロモーターは、Ward et al., Mol. Gen. Genet. 203: 468478 (1986) によって記載されている。原核生物プロモーターはまた、Glick, J. Ind. Microbiol. 1: 277 - 282 (1987)、Cenatiempo, Y., Biochimie 68: 505 - 516 (1986)、及び Gottesman, Ann. Rev. Genet. 18: 415 - 442 (1984) によっても考察されている。原核生物細胞における発現にはまた、遺伝子コード配列の上流にリボソーム結合部位の存在を要する。そのようなリボソーム結合部位は、例えば、Gold et al., Ann. Rev. Microbiol. 35: 365404 (1981) によって開示されている。

10

#### 【0119】

真核生物細胞における本発明の逆転写酵素の発現を強化するためには、周知の真核生物プロモーター及び宿主を使用することができる。逆転写酵素の発現の強化は、原核生物宿主において達成してもよい。本発明での使用に好適な原核生物宿主の一例は、大腸菌である。

#### 【0120】

##### 逆転写酵素の単離及び精製

本発明の酵素（複数可）は、好ましくは、所望される逆転写酵素を含み、それを発現する組み換え宿主の培養での成長によって生成される。しかしながら、本発明の逆転写酵素は、本発明の逆転写酵素を生成する任意の株、生物、または組織から単離してもよい。逆転写酵素のフラグメントもまた、本発明に含まれる。そのようなフラグメントには、タンパク質分解性フラグメント及び逆転写酵素活性を有するフラグメントが挙げられる。そのようなフラグメントはまた、目的の逆転写酵素遺伝子の部分をクローニング及び発現させ、フレームシフト変異を起こすことによって、ならびに / または切断されたタンパク質もしくはポリペプチドの発現のために目的の遺伝子に1つ以上の停止コドンが付加することによって、生成することができる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、それらを発現する細胞または生物（野生型細胞もしくは生物または組み換え細胞もしくは生物であり得る）から精製及び / または単離することができる。一部の実施形態において、そのようなポリペプチドは、それらが発現される細胞または生物から実質的に単離してもよい。

20

#### 【0121】

クローニングした逆転写酵素遺伝子を含む宿主によって吸収され得る任意の栄養素が、培養培地に添加されてもよい。最適な培養条件は、使用される株及び培養培地の組成によって事例毎に選択されるはずである。また、発現される所望の遺伝子を含むベクターDNAを確実に維持するために、抗生物質を成長培地に添加してもよい。培地の調合は、DSMまたはATCCのカatalog、ならびに Sambrook et al., In: Molecular Cloning, a Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) に記載されている。

30

#### 【0122】

本発明の逆転写酵素を生成する組み換え宿主細胞は、例えば、遠心分離によって、液体培養物から分離してもよい。一般に、収集した微生物細胞を、好適な緩衝液中に分散させた後、緩衝溶液による酵素の抽出を可能にするように、超音波処理または他の周知の手順によって強制的に開ける。超遠心分離または遠心分離により細胞破壊片を除去した後、例えば、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、電気泳動等の標準的なタンパク質精製技法によって、逆転写酵素を精製することができる。精製中に逆転写酵素の存在を検出するためのアッセイが当該技術分野で周知であり、それらのアッセイを従来の生化学的精製中に用いて、これらの酵素の存在を判定することができる。

40

#### 【0123】

一部の実施形態において、本発明の逆転写酵素は、逆転写酵素の精製を促進するために、親和性タグを含むように変異させることができる。好適な親和性タグは当業者に周知で

50

あり、これらのタグとしては、6つのヒスチジン等のアミノ酸の繰り返し配列、赤血球凝集素エピトープ及びmycエピトープ等のエピトープ、ならびに逆転写酵素の単純な精製を許容する他のアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0124】

本発明はさらに、(1)逆転写酵素に関連する1つ以上の活性を有するタンパク質またはそのフラグメントと、(2)タグ(例えば、親和性タグ)とを含む、融合タンパク質を提供する。特定の実施形態において、本発明は、1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8つ等)のタグを有する、本明細書に記載される逆転写酵素(例えば、熱安定性逆転写酵素)を含む。これらのタグは、例えば、逆転写酵素に関連する1つ以上の活性を有するタンパク質またはそのフラグメントの(1)N末端、(2)C末端、または(3)N末端とC末端の両方に位置付けられ得る。タグはまた、内部(例えば、逆転写酵素に由来するかアミノ酸側鎖に付加された、アミノ酸配列の領域の間)に位置付けられてもよい。例えば、Ferguson et al., Protein Sci. 7:1636-1638(1998)は、親和性タグ(すなわち、ヘキサヒスチジン配列)が挿入された大腸菌由来のシデロフォア受容体FhuAについて記載している。このタグは、金属キレート親和性クロマトグラフィーを用いた精製プロトコルにおいて機能することが示された。内部タグを有する追加の融合タンパク質は、米国特許第6,143,524号に記載されており、その全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0125】

本発明の組成物を調製するために使用されるタグは、長さが多様であり得るが、典型的には、約5~約500個、約5~約100個、約10~約100個、約15~約100個、約20~約100個、約25~約100個、約30~約100個、約35~約100個、約40~約100個、約45~約100個、約50~約100個、約55~約100個、約60~約100個、約65~約100個、約70~約100個、約75~約100個、約80~約100個、約85~約100個、約90~約100個、約95~約100個、約5~約80個、約10~約80個、約20~約80個、約30~約80個、約40~約80個、約50~約80個、約60~約80個、約70~約80個、約5~約60個、約10~約60個、約20~約60個、約30~約60個、約40~約60個、約50~約60個、約5~約40個、約10~約40個、約20~約40個、約30~約40個、約5~約30個、約10~約30個、約20~約30個、約5~約25個、約10~約25個、または約15~約25個のアミノ酸残基の長さである。

20

30

#### 【0126】

本発明の組成物を調製するために使用されるタグには、融合タンパク質の熱安定性に寄与するものが含まれる。したがって、これらのタグは、例えば、向上した熱安定性を有する特定のタンパク質(例えば、逆転写酵素活性の1つ以上の活性を有するタンパク質)に少なくとも部分的に関与している。逆転写酵素(すなわち、M-MLV逆転写酵素)の熱安定性を強化するタグの例としては、以下のアミノ酸配列：

MGGSHHHHHHGMA<sup>SM</sup>TGGQQMGRDLYDDDDKH および MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH

を有するタグが挙げられるがこれらに限定されない。これらのタグのフラグメント(好ましくは、3個以上、5個以上、10個以上、または15個以上のアミノ酸を有するもの)もまた、本発明に従って使用することができる。したがって、本発明は、部分的に、タグを含み、強化された熱安定性を呈する逆転写酵素またはそのフラグメントを含む。周知の方法を使用して、当業者であれば、上述のタグの1つ以上を1つ以上のRT酵素または逆転写酵素活性を有するそのフラグメントに結合させて、熱安定性逆転写酵素またはそのフラグメントを生成することができる。

40

#### 【0127】

本発明の実施に使用されるタグは、任意の多数の目的を果たし得、多数のタグが、本発明の逆転写酵素に1つ以上の異なる機能を付与するために付加され得る。例えば、タグは、(1)タンパク質内部でのものと他のタンパク質分子とのものと両方のタンパク質間相互作用に寄与し得る、(2)タンパク質を特定の生成方法に適したものにし得る、(3)

50

タンパク質が組成物中に存在するかどうかを特定することを可能にし得る、または(4)タンパク質に他の機能的特徴を与え得る。

【0128】

本発明の実施で 사용할 수 있는 태그의 예としては、金属結合ドメイン(例えば、3、4、5、6、または7個のヒスチジン領域等のポリ-ヒスチジンセグメント)、免疫グロブリン結合ドメイン(例えば、(1)プロテインA、(2)プロテインG、(3)T細胞、B細胞、及び/もしくはFc受容体、ならびに/または(4)相補的タンパク質抗体結合ドメイン)、糖結合ドメイン(例えば、マルトース結合ドメイン、キチン結合ドメイン)、ならびに検出可能ドメイン(例えば、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼの少なくとも一部分)が挙げられる。融合タンパク質は、上述のもの等のタグを1つ以上含み得る。典型的には、1つを上回るタグを含む融合タンパク質は、逆転写酵素の1つの末端または両方の末端(すなわち、N末端及びC末端)にこれらのタグを含むが、1つ以上のタグは、末端に存在するものの代わりにかまたはそれに加えて、内部に位置付けられてもよい。さらに、1つを上回るタグは、逆転写酵素の一方の末端に、内部に、及び/または両方の末端に存在してもよい。例えば、3つの連続したタグが、末端と末端とで(end-to-end)逆転写酵素のN末端に連結されてもよい。本発明はさらに、上述の融合タンパク質を含む組成物及び反応混合物、ならびにこれらの融合タンパク質、これらの融合タンパク質をコードする核酸分子(例えば、ベクター)、及びこれらの核酸分子を含む組み換え宿主細胞を調製するための方法を含む。本発明はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、これらの融合タンパク質を使用する方法(例えば、核酸分子を逆転写するための方法)を含む。

10

20

【0129】

融合タンパク質が組成物中に存在するかどうかを特定することを可能にするタグには、例えば、電気泳動ゲル中のタンパク質を特定するために使用することができるタグが挙げられる。多数のそのようなタグが当該技術分野で既知であり、それらには、ウェスタンブロットで 사용할 수 있는エピトープ及び抗体結合ドメインが挙げられる。

【0130】

本発明において使用するためのタグのアミノ酸組成は、多様であり得る。一部の実施形態において、タグは、約1%~約5%の生理学的pHで正の電荷を有するアミノ酸、例えば、リジン、アルギニン、及びヒスチジン、または約5%~約10%の生理学的pHで正の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約20%の生理学的pHで正の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約30%の生理学的pHで正の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約50%の生理学的pHで正の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約75%の生理学的pHで正の電荷を有するアミノ酸を含み得る。一部の実施形態において、タグは、約1%~約5%の生理学的pHで負の電荷を有するアミノ酸、例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸、または約5%~約10%の生理学的pHで負の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約20%の生理学的pHで負の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約30%の生理学的pHで負の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約50%の生理学的pHで負の電荷を有するアミノ酸、または約10%~約75%の生理学的pHで負の電荷を有するアミノ酸を含み得る。一部の実施形態において、タグは、同じかまたは異なってもよく、同じかまたは異なる荷電のものであってもよい、2つ以上の連続した荷電アミノ酸の配列を含み得る。例えば、タグは、同じかまたは異なってもよい、一連の(例えば、2、3、4、5、6、10個等の)正に荷電したアミノ酸を含み得る。タグは、同じかまたは異なってもよい、一連の(例えば、2、3、4、5、6、10個等の)負に荷電したアミノ酸を含み得る。一部の実施形態において、タグは、同じかまたは異なってもよい、一連の(例えば、2、3、4、5、6、10個等の)正の電荷と負の電荷が交互に荷電した(例えば、正、負、正、負等)アミノ酸を含み得る。上述の一連のアミノ酸(例えば、正電荷、負電荷、または交互の電荷)のいずれも、荷電アミノ酸間に間隔をあけて1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、10個等)の中性の極性または非極性アミノ酸を含んでもよい。そのような中性アミノ酸は、一連の荷電アミノ酸全体に均等

30

40

50



に分配されてもよく（例えば、荷電、中性、荷電、中性）、または連なり全体に不規則に分配されてもよい（例えば、荷電、複数の中性、荷電、中性、複数の荷電等）。一部の実施形態において、本発明のポリペプチドに結合したタグは、生理学的 pH において全体として電荷を有してもよい（例えば、正電荷または負電荷）。全体としての電荷の大きさは多様であり得、タグは、正味の正電荷 1、2、3、4、5 等を有してもよく、または正味の負電荷 1、2、3、4、5 等を有してもよい。本発明はまた、上述のタグ配列のうちの 1 つ以上を含む逆転写酵素（例えば、熱安定性逆転写酵素）、そのような逆転写酵素をコードするベクター、そのような逆転写酵素を含む宿主細胞反応混合物、組成物、及び反応混合物、ならびにそのような逆転写酵素を格納する格納容器を含むキットを提供する。

#### 【0131】

一部の実施形態において、タグ配列及び逆転写酵素（RT）活性を有する配列を含む融合タンパク質から、タグ配列の全てまたは一部分を除去することが望ましい場合がある。この種の実施形態では、例えばプロテアーゼ酵素の切断部位を形成する 1 つ以上のアミノ酸が、融合タンパク質の一次配列に組み込まれ得る。切断部位は、その部位での切断により、融合タンパク質からタグ配列の全てまたは一部分を除去できるように、位置付けられ得る。一部の実施形態において、切断部位は、切断部位を認識するプロテアーゼ酵素でも切断によりタグ配列の全てが除去されるように、タグ配列と RT 活性を有する配列との間に位置付けられ得る。好適な切断部位の例としては、配列 Ile - Glu - Gly - Arg を有する Xa 因子切断部位（血液凝固因子 Xa によって認識され切断される）、及び配列 Leu - Val - Pro - Arg を有するトリオンピン切断部位（トリオンピンにより認識され切断される）が挙げられるがこれらに限定されない。他の好適な切断部位が当業者に既知であり、本発明と併せて使用され得る。

#### 【0132】

一部の実施形態では、本発明の逆転写酵素は、約 5 ユニット / mg を上回る、好ましくは約 50 ユニット / mg を上回る、より好ましくは約 100 ユニット / mg を上回る、250 ユニット / mg を上回る、500 ユニット / mg を上回る、1000 ユニット / mg を上回る、5000 ユニット / mg、または 10,000 ユニット / mg を上回る、最も好ましくは約 15,000 ユニット / mg を上回る、約 16,000 ユニット / mg を上回る、約 17,000 ユニット / mg を上回る、約 18,000 ユニット / mg を上回る、約 19,000 ユニット / mg を上回る、及び約 20,000 ユニット / mg を上回る、特異活性（例えば、RNA 指向性 DNA ポリメラーゼ活性及び / または RNase H 活性）を有する。一部の実施形態において、本発明の逆転写酵素は、約 50,000 ユニット / mg を上回る、約 100,000 ユニット / mg を上回る、約 150,000 ユニット / mg を上回る、約 200,000 ユニット / mg を上回る、約 250,000 ユニット / mg を上回る、及び約 300,000 ユニット / mg を上回る、特異活性を有し得る。本発明の逆転写酵素の特異活性の好ましい範囲としては、約 5 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 5 ユニット / mg ~ 約 500,000 ユニット / mg の特異活性、約 5 ユニット / mg ~ 約 300,000 ユニット / mg、約 50 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 100 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 250 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 500 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 1000 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 5000 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 10,000 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 25,000 ユニット / mg ~ 約 750,000 ユニット / mg の特異活性、約 100 ユニット / mg ~ 約 400 ユニット / mg の特異活性、及び約 200 ユニット / mg ~ 約 500 ユニット / mg の特異活性が挙げられる。他の好適な特異活性範囲としては、約 200,000 ユニット / mg ~ 約 350,000 ユニット / mg の特異活性、約 225,000 ユニット / mg ~ 約 300,000 ユニット / mg の特異活性、約 250,000 ユニット / mg ~ 約 300,000 ユニット

10

20

30

40

50

/mgの特異活性、約200,000ユニット/mg~約750,000ユニット/mgの特異活性、約200,000ユニット/mg~約500,000ユニット/mgの特異活性、約200,000ユニット/mg~約400,000ユニット/mgの特異活性、約250,000ユニット/mg~約750,000ユニット/mgの特異活性、約250,000ユニット/mg~約500,000ユニット/mgの特異活性、及び約250,000ユニット/mg~約400,000ユニット/mgの特異活性が挙げられる。好ましくは、特異活性範囲の下限は、50、100、200、300、400、500、700、900、1,000、5,000、10,000、20,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、及び80,000ユニット/mgで多様であり得、一方で範囲の上限は750,000、650,000、600,000、550,000、500,000、450,000、400,000、350,000、300,000、250,000、200,000、150,000、140,000、130,000、120,000、110,000、100,000、及び90,000ユニット/mgであり得る。特異活性は、当該技術分野で周知の酵素アッセイ及びタンパク質アッセイを用いて判定することができる。DNAポリメラーゼアッセイ及びRNase Hアッセイは、例えば、米国特許第5,244,797号及び国際公開第WO98/47912号に記載されており、これらの開示は、参照により完全に本明細書に組み込まれる。本発明の一部の実施形態において、本発明に従って調製した熱安定性逆転写酵素の特異活性は、非熱安定性(野生型)逆転写酵素の特異活性よりも高くなり得る。一部の実施形態において、熱安定性逆転写酵素の特異活性は、対応する非熱安定性逆転写酵素の特異活性よりも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれ以上高くなり得る。一部の好ましい実施形態において、本発明による熱安定性逆転写酵素の特異活性は、対応する非熱安定性逆転写酵素の特異活性よりも30%以上であり得る。本発明によると、特異活性は、反応に使用されるタンパク質または酵素の合計量に対する、タンパク質または酵素の酵素活性(ユニット単位)の測定値である。特異活性の測定値は、当業者に周知の標準的な技法により決定することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0133】

逆転写酵素を含む組成物及び反応混合物

本教示は、様々な構成要素を様々な組み合わせで含む組成物を提供する。本発明の一部の実施形態において、本組成物は、緩衝塩溶液中に1つ以上の逆転写酵素を混合することによって調合される。場合によっては、1つ以上のDNAポリメラーゼ及び/もしくは1つ以上のヌクレオチド、ならびに/または1つ以上のプライマーを添加して、本発明の組成物を作製してもよい。これらの組成物は、核酸分子の生成、分析、定量化、及びそれ以外では操作(例えば、逆転写または1工程(連結)RT-PCR手順を用いて)を行うために、本方法で使用され得る。

#### 【0134】

一部の実施形態において、酵素は、安定な緩衝塩溶液中に作業濃度(例えば、1倍)で提供される。本明細書に使用される「安定な」及び「安定性」という用語は、一般に、酵素または酵素を含有する組成物を約4の温度で約1週間、約-20の温度で約2~6ヶ月間、約-80の温度で約6ヶ月以上保管した後に、酵素組成物等の組成物により、元の酵素活性(ユニット単位)の少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%が保持されることを意味する。本明細書に使用されるとき、「作業濃度」とは、特定の機能(核酸の逆転写等)を行うための、溶液中で使用される最適濃度またはほぼ最適濃度である、酵素の濃度を意味する。

#### 【0135】

そのような組成物は、濃縮ストック溶液(例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、10倍等)として調合してもよい。一部の実施形態において、組成物を濃縮(例えば、5倍)ストック溶液として有することにより、より多量の核酸試料を添加することが可能とな

る（例えば、組成物を核酸合成に使用する場合等）。

【0136】

本発明の組成物を形成するのに使用する水は、好ましくは、蒸留水、脱イオン水、及び滅菌濾過水（0.1～0.2マイクロメートルフィルタを通したもの）であり、DNase及びRNase酵素の混入がないものである。そのような水は、例えば、Life Technologies（Carlsbad, CA）から市販されているか、または当業者に周知の方法により必要に応じて作製してもよい。

【0137】

酵素成分に加えて、本組成物は、cDNA分子等の核酸の合成に必要とされる1つ以上の緩衝液及び補助因子を含んでもよい。一部の実施形態において、本組成物を形成するのに使用するための緩衝液は、トリス-（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS（登録商標））または4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニウムエタンスルホン酸（HEPES）の酢酸塩、硫酸塩、塩酸塩、リン酸塩、または遊離酸の形態であるが、およそのイオン強度及びpKaがTRIS（登録商標）またはHEPESと同じ代替的な緩衝液を使用して同等の結果を得てもよい。例えば、記載される酵素とともに使用することができる緩衝液には、3-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕アミノプロパンスルホン酸（TAPS）、N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン（ピシン）、（ヒドロキシメチル）メチルアミン（トリス）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（トリシン）、3-〔N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（TAPSO）、4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジニウムエタンスルホン酸（HEPES）、2-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕アミノエタンスルホン酸（TES）、3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン-N,N-ビス（2-エタンスルホン酸）（PIPES）、及びジメチルアルシン酸（カコジル酸）を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0138】

緩衝塩に加えて、カリウム（好ましくは、塩化カリウムまたは酢酸カリウム）及びマグネシウム（好ましくは、塩化マグネシウムまたは酢酸マグネシウム）のもの等、補助因子の塩が、本発明の組成物での使用に企図される。

【0139】

本組成物及び／または合成反応混合物への1つ以上の炭水化物及び／または糖の添加もまた、保管時の組成物の安定性の強化及び／または合成時の反応混合物を補助するのに有利であり得る。一部の実施形態において、本発明の組成物及び／または合成反応混合物に含めるための炭水化物または糖としては、スクロース、トレハロース、グリセロール等が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、トレハロースは、0.01M～5Mの範囲の濃度（例えば、0.01M、0.05M、0.1M、0.5M、0.75M、1.0M、2.0M、3.0M、4.0M、または5.0M）で提供される。一部の実施形態において、グリセロールは、5%～60%の範囲の濃度（例えば、5%、10%、15%、25%、30%、40%、50%、60%）で提供される。さらに、そのような炭水化物及び／または糖は、本発明の酵素組成物及びキットの生成に使用される酵素の保管緩衝液に添加してもよく、液体または乾燥形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかである組成物に提供される。そのような炭水化物及び／または糖は、Sigma（St. Louis, Mo.）を含め、多数の供給業者から市販されている。

【0140】

同様に、本組成物及び／または合成反応混合物への1つ以上の表面活性剤及び／または界面活性剤の添加もまた、保管時の組成物及び／または反応混合物の安定性の強化を補助するのに有利であり得る。本発明の組成物及び／または合成反応混合物に含めるのに好ましいそのような界面活性剤には、Tween 20、Nonidet P 40（NP-40）、Brij 58、CHAPS、Big CHAPS、CHAPS等が挙げられるがこれらに限定されない。他の表面活性剤または界面活性剤、例えば、係属中の米国出願第13/492,576号及び同第61/895,876号（これらの開示は、参照により

その全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるものもまた、本発明の組成物及び/または合成反応混合物に含まれ得る。さらに、そのような界面活性剤は、本発明の酵素組成物及びキットの生成に使用される酵素の保管緩衝液に添加されてもよい。そのような界面活性剤の例は、Sigma (St. Louis, Mo.)を含め、多数の供給業者から市販されている。

#### 【0141】

まず、緩衝塩、補助因子塩、炭水化物もしくは糖、または界面活性剤を作業濃度で水中に溶解させ、酵素添加の前に溶液のpHを調節するのが好ましい場合が多い。このようにすると、pH感受性酵素が、本組成物の調合中に酸またはアルカリに媒介される不活性化を受けることが少なくなる。したがって、一部の実施形態において、緩衝塩溶液は、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS(登録商標))の塩またはその塩酸塩といった緩衝塩を、十分な量の水と合わせることによって、調合される。一部の実施形態において、この組み合わせにより、5~150ミリモル、好ましくは10~60ミリモル、最も好ましくは約20~60ミリモルのTRIS(登録商標)濃度を有する溶液が得られる。この溶液に、マグネシウムの塩(好ましくは、その塩化物塩もしくは酢酸塩のいずれか)または他の二価カチオンの塩を添加して、1~10ミリモル、好ましくは1.5~8.0ミリモル、最も好ましくは約3~7.5ミリモルの作業濃度のものを得てもよい。また、カリウムの塩(好ましくは、カリウムの塩化物塩または酢酸塩)、または他の一価カチオン(例えば、Na)の塩を、10~100ミリモル、好ましくは約75ミリモルの作業濃度で、この溶液に添加してもよい。ジチオスレイトール等の還元剤を、好ましくは、約1~100mMの最終濃度、より好ましくは約5~50mMまたは約7.5~20mMの濃度、最も好ましくは約10mMの濃度で溶液に添加してもよい。本発明の組成物に含めるのに好ましい炭水化物及び/または糖の濃度は、約5%(w/v)~約30%(w/v)、約7.5%(w/v)~約25%(w/v)、約10%(w/v)~約25%(w/v)、約10%(w/v)~約20%(w/v)、好ましくは約10%(w/v)~約15%(w/v)の範囲に及ぶ。本発明の組成物に含めるのに好ましい表面活性剤及び/または界面活性剤の濃度は、約0.001%(w/v)~約5%(w/v)、約0.002%(w/v)~約2%(w/v)、約0.004%(w/v)~約1%(w/v)、約0.01%(w/v)~約0.5%(w/v)、好ましくは約0.05%(w/v)~約0.1%(w/v)の範囲に及ぶ。少量のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)の塩、例えば、EDTA二ナトリウムもまた、添加され得る(好ましくは約0.1ミリモル)。一部の実施形態において、全ての緩衝液及び塩を添加した後、この緩衝塩溶液を、全ての塩が溶解するまで十分に混合し、当該技術分野で既知の方法を用いてpHを調節する。一部の実施形態において、最終的な緩衝液のpHは、約6.0~約9.5、約6.9~約8.7、または約7.3~約8.3の範囲に及ぶ。

#### 【0142】

これらの緩衝塩溶液に、酵素(逆転写酵素)を添加して、本発明の組成物が生成される。一部の実施形態において、逆転写酵素は、1ミリリットル当たり約1,000~約50,000ユニット、1ミリリットル当たり約2,000~約30,000ユニット、1ミリリットル当たり約2,500~約25,000ユニット、1ミリリットル当たり約3,000~約22,500ユニット、1ミリリットル当たり約4,000~約20,000ユニット、または1ミリリットル当たり約5,000~約20,000ユニットの溶液中作業濃度で添加される。一部の実施形態において、本発明の逆転写酵素(例えば、M-MLV逆転写酵素)は、第1の鎖反応混合物(例えば、mRNA分子を逆転写するための反応物)及び/またはポリメラーゼ連鎖反応を伴う逆転写反応物中に、上述の作業濃度で添加され得る。これらの反応に好適な本発明の逆転写酵素の濃度は、約5,000ユニット/ml~約50,000ユニット/ml、約5,000ユニット/ml~約40,000ユニット/ml、約5,000ユニット/ml~約30,000ユニット/ml、または約5,000ユニット/ml~約20,000ユニット/mlの逆転写酵素であり得る。反応は、20µl~50µlの量で行われてもよく、そのような反応物は、50ユニット

、１００ユニット、２００ユニット、３００ユニット、４００ユニット以上の本発明の逆転写酵素を含み得る。当業者であれば、追加の逆転写酵素を添加することにより、酵素使用量の増加に伴う第１の鎖（例えば、ｍＲＮＡ鎖に相補的なＤＮＡ鎖）の合成の増加が可能となり得ることを理解するであろう。当業者であれば、許容できる費用で所望される量の生成物を生成するために反応物に添加される本発明の逆転写酵素の量を、不要な実験を行うことなく判定することができる。

#### 【０１４３】

一部の実施形態において、本明細書に記載される変異型逆転写酵素は、１ミリリットル当たり約１００～約５０００ユニット、１ミリリットル当たり約１２５～約４０００ユニット、１ミリリットル当たり約１５０～約３０００ユニット、１ミリリットル当たり約２００～約２５００ユニット、１ミリリットル当たり約２２５～約２０００ユニットの溶液中作業濃度で、最も好ましくは１ミリリットル当たり約２５０～約１０００ユニットの作業濃度で、提供される。酵素は、任意の順序で溶液に添加してもよく、または同時に添加してもよい。

#### 【０１４４】

本発明の組成物は、好ましくはデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）またはジデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄｄＮＴＰ）である、１つ以上のヌクレオチドをさらに含み得る。本組成物のｄＮＴＰ成分は、新たに合成される核酸の「構成単位」として機能し、ポリメラーゼの作用により中に組み込まれ、ｄｄＮＴＰは、本発明による配列決定方法に使用することができる。本組成物での使用に好適なヌクレオチドの例としては、ｄＵＴＰ、ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＩＴＰ、７-デアザ-ｄＧＴＰ、-チオ-ｄＡＴＰ、-チオ-ｄＴＴＰ、-チオ-ｄＧＴＰ、-チオ-ｄＣＴＰ、ｄｄＵＴＰ、ｄｄＡＴＰ、ｄｄＴＴＰ、ｄｄＣＴＰ、ｄｄＧＴＰ、ｄｄＩＴＰ、７-デアザ-ｄｄＧＴＰ、-チオ-ｄｄＡＴＰ、-チオ-ｄｄＴＴＰ、-チオ-ｄｄＧＴＰ、-チオ-ｄｄＣＴＰ、またはそれらの誘導体が挙げられるがこれらに限定されず、これらは全て、Invitrogen Corporation (Carlsbad, Calif.)、New England Biolabs (Beverly, Mass.)、及びSigma Chemical Company (Saint Louis, Mo.)を含む供給業者から市販されている。ヌクレオチドは、標識されていなくてもよく、あるいは、それらは、当該技術分野で既知の方法によってそれらを放射性同位体（例えば、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、または<sup>35</sup>S）、ビタミン類（例えば、ビオチン）、蛍光性部分（例えば、フルオレセイン、ローダミン、Texas Red、またはフィコエリトリン）、化学発光標識（例えば、PHOTO-GENE（商標）またはACES（商標）化学発光系、Life Technologies (Carlsbad, Calif.)から市販）、ジオキシゲニン等と結合させることによって、検出可能に標識付けしてもよい。標識したヌクレオチドはまた、例えば、Life Technologies (Carlsbad, Calif.)またはSigma Chemical Company (Saint Louis, Mo.)から市販で入手することもできる。本組成物の一部の実施形態において、ヌクレオチドは、各ヌクレオチドの作業濃度が約１０～４０００ミリモル、約５０～２０００ミリモル、約１００～１５００ミリモル、または約２００～１２００ミリモル、または約１０００ミリモルとなるように添加される。

#### 【０１４５】

本教示によると、核酸の調製、単離、または精製に使用される試料中に見られることが多い様々な化合物によるＲＴ反応の阻害を克服することを補助するために、１つ以上の薬剤を本組成物に添加してもよい。そのような阻害物質には、例えば、ヘパリン（血液）、ヘマチン（血液）、ＥＤＴＡ（血液）、クエン酸（血液）、免疫グロブリンＧ（血液、血清）、フミン酸（土壌、糞便）、ラクトフェリン（乳、唾液、他の分泌液）、尿素（尿）、植物性多糖類（植物）、メラニン（皮膚、毛髪）、ミオグロビン（組織）、及びインディゴ染料（布地）が挙げることができるが、これらに限定されない。ＲＴ阻害を克服するのに使用するためのそのような薬剤には、例えば、アルブミン（例えば、ウシ血清アルブ

ミン ( B S A )、組み換え B S A、及び他の種に由来するアルブミン)、 $\gamma$ -ラクアルブミン ( $\gamma$ -lactalbumin)、 $\gamma$ -ラクトブログリン ( $\gamma$ -lactoblogulin)、カゼイン、アポトランスフェリン、スペルミン、ゼラチン (例えば、ヒト組み換えゼラチン、魚ゼラチン、及び他の種に由来するゼラチン)、ならびに DNA 結合タンパク質 (例えば、ファージ T 4 遺伝子 32 (T4gp32)) 等であるがこれらに限定されないタンパク質、またはそれらのペプチドもしくはポリペプチド変化形、フラグメント、もしくは誘導体を挙げることができる。本教示で使用するための他の非タンパク質系 PCR 阻害物質遮断剤としては、例えば、メシル酸デフェロキサミンを挙げることができる。PCR 阻害物質遮断剤として使用するためのいくつかの好ましいタンパク質としては、ウシ血清アルブミン (BSA)、魚ゼラチン、及び T4gp32 タンパク質が挙げられる。一部の実施形態において、抗 RT 阻害物質剤は、作業溶液中の最終濃度が約  $1 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ~ 約  $10,000 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ~ 約  $50 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ~ 約  $8000 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 、約  $100 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ~ 約  $6000 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 、約  $200 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ~ 約  $5000 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 、または好ましくは約  $500 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ~ 約  $3000 \text{ ng} / \mu\text{L}$  となるように、本組成物に添加される。抗 RT 阻害物質剤はまた、例えば、最終濃度約  $0.001\%$  ~ 約  $15\%$ 、約  $0.05\%$  ~ 約  $10\%$ 、約  $0.01\%$  ~ 約  $5\%$ 、または好ましくは約  $0.1\%$  ~ 約  $1\%$  として作業溶液中に添加されてもよい。これらの抗 RT 阻害物質剤の添加は、個別または組み合わせでの両方で、そのような RT 阻害物質の混入に対する耐容性を向上させ得る。したがって、本組成物は、単独または組み合わせで、例えばエタノール、胆汁酸塩、フミン酸、ヘマチン、及びヘパリンを含む様々な阻害物質に対する耐容性を向上させるように作用する薬剤をさらに含んでもよい。

#### 【0146】

一部の実施形態において、成分の劣化は、約  $-80$  の温度 (最大 2 年間) または約  $-20$  の温度 (最大 1 年間) で試薬組成物を保管することにより低減させることができる。

#### 【0147】

一部の実施形態において、本組成物は、本組成物を保持することができ、本組成物の成分と著しく相互作用しない好適な格納容器または容器にパッケージ化することができる。格納容器または容器は、個体による、または液体処理装置による剤形の容易な分注ができるように設計され得る。そのような組成物の格納容器または容器は、さらに、複数パッケージのユニットにパッケージ化され得る。

#### 【0148】

別の態様において、本発明の組成物及び逆転写酵素は、1つ以上の炭水化物、糖、または合成ポリマーの存在下で調製され、乾燥形態 (例えば、凍結乾燥) で保管され得る。乾燥組成物または逆転写酵素の調製に好ましい炭水化物、糖、またはポリマーとしては、スクロース、トレハロース、及びポリビニルピロリドン (PVP)、またはこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、米国特許第  $5,098,893$  号、同第  $4,891,319$  号、及び同第  $5,556,771$  号を参照されたく、これらの開示は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。そのような乾燥組成物及び酵素は、本発明の組成物中の酵素または成分の著しい劣化を伴うことなく、様々な温度で長期間保管することができる。一部の好ましい実施形態において、乾燥逆転写酵素または組成物は、約  $-20$  ~ 約  $25$  で保管される。

#### 【0149】

本発明はさらに、核酸分子を逆転写するための組成物、ならびにそのような組成物を用いる逆転写方法及びそのような方法を使用して生成した生成物の核酸分子を含む。多くの事例において、本発明の組成物は、以下の構成成分のうちの1つ以上を含有し得る：(1) 1つ以上の緩衝剤 (例えば、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、2-(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸 (MES)、トリス-(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris)、3-(シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸 (CAPS)、クエン酸塩、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホ

ン酸 ( H E P E S )、酢酸塩、3 - ( N - モルホリノ ) プロパンスルホン酸 ( M O P S )、N - トリス ( ヒドロキシメチル ) メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 ( a m i n o p r o p a n e s u l f o n i o a c i d ) ( T A P S ) 等)、( 2 ) 1 つ以上の一価カチオンの塩 ( 例えば、NaCl、KCl 等)、( 3 ) 1 つ以上の二価カチオンの塩 ( 例えば、MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub> 等)、( 4 ) 1 つ以上の還元剤 ( 例えば、ジチオスレイトール、-メルカプトエタノール等)、( 5 ) 1 つ以上のイオン性もしくは非イオン性界面活性剤 ( 例えば、TRITON X - 100 ( 商標)、NONIDET P40 ( 商標)、ドデシル硫酸ナトリウム等)、( 6 ) 1 つ以上のDNAポリメラーゼ阻害剤 ( 例えば、Actinomycin D 等)、( 7 ) ヌクレオチド ( 例えば、dNTP、例えば、dGTP、dATP、dCTP、dTTP 等)、( 8 ) 逆転写及び/もしくは増幅させるRNA、( 9 ) 1 つ以上のRNase阻害剤 ( 例えば、RNA SEOUT ( 商標)、Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.、カタログ番号10777-019 等)、( 10 ) 逆転写酵素 ( 例えば、本発明の逆転写酵素、ならびに/または( 11 ) 1 つ以上の希釈剤 ( 例えば、水) )。他の構成成分及び/また構成要素 ( 例えば、プライマー、DNAポリメラーゼ等) もまた、組成物中に存在し得る。ある特定の実施形態において、配列決定に使用される組成物は、以下の構成成分のうちの1 つ以上を含有し得る：( 1 ) 一本鎖RNA鋳型、( 2 ) プライマー、( 3 ) ヌクレオチド、( 4 ) ヌクレオチド塩基に接合された放射活性標識もしくはプライマーに接合された蛍光標識等の標識、及び/または( 5 ) 停止剤、例えば、ジデオキシヌクレオチド ( ddATP、ddGTP、ddCTP、もしくはddTTPを含む鎖停止塩基)。

#### 【0150】

本発明の組成物中の緩衝剤の濃度は、使用される具体的な緩衝剤に応じて多様であろう。典型的には、緩衝剤の作業濃度 ( すなわち、反応混合物中の濃度 ) は、約5 mM ~ 約500 mM ( 例えば、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約55 mM、約60 mM、約65 mM、約70 mM、約75 mM、約80 mM、約85 mM、約90 mM、約95 mM、約100 mM、約5 mM ~ 約500 mM、約10 mM ~ 約500 mM、約20 mM ~ 約500 mM、約25 mM ~ 約500 mM、約30 mM ~ 約500 mM、約40 mM ~ 約500 mM、約50 mM ~ 約500 mM、約75 mM ~ 約500 mM、約100 mM ~ 約500 mM、約25 mM ~ 約50 mM、約25 mM ~ 約75 mM、約25 mM ~ 約100 mM、約25 mM ~ 約200 mM、約25 mM ~ 約300 mM 等) となる。Tris ( 例えば、Tris - HCl ) を用いる場合、Trisの作業濃度は、典型的に、約5 mM ~ 約100 mM、約5 mM ~ 約75 mM、約10 mM ~ 約75 mM、約10 mM ~ 約60 mM、約10 mM ~ 約50 mM、約25 mM ~ 約50 mM 等となる。

#### 【0151】

本発明の溶液の最終的なpHは、一般に、本発明の組成物中に存在する緩衝剤によって決定され、維持されることになる。本発明の組成物のpH、したがって、本発明の反応混合物のpHは、具体的な用途及び存在する緩衝剤に応じて多様であり得るが、約pH5.5 ~ 約pH9.0 ( 例えば、約pH6.0、約pH6.5、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、約pH7.4、約pH7.5、約pH7.6、約pH7.7、約pH7.8、約pH7.9、約pH8.0、約pH8.1、約pH8.2、約pH8.3、約pH8.4、約pH8.5、約pH8.6、約pH8.7、約pH8.8、約pH8.9、約pH9.0、約pH6.0 ~ 約pH8.5、約pH6.5 ~ 約pH8.5、約pH7.0 ~ 約pH8.5、約pH7.5 ~ 約pH8.5、約pH6.0 ~ 約pH8.0、約pH6.0 ~ 約pH7.7、約pH6.0 ~ 約pH7.5、約pH6.0 ~ 約pH7.0、約pH7.2 ~ 約pH7.7、約pH7.3 ~ 約pH7.7、約pH7.4 ~ 約pH7.6、約pH7.0 ~ 約pH7.4、約pH7.6 ~ 約pH8.0、約pH7.6 ~ 約pH8.5、約pH7.7 ~ 約pH8.5、約pH7.9 ~ 約pH8.5、約pH8.0 ~ 約pH8.5、約pH8.2 ~ 約pH8.5、約pH8.3 ~ 約pH8.5、

約 pH 8.4 ~ 約 pH 8.5、約 pH 8.4 ~ 約 pH 9.0、約 pH 8.5 ~ 約 pH 9.0 等)となることが多い。

【0152】

示されるように、1つ以上の一価カチオンの塩(例えば、NaCl、KCl等)が、本発明の組成物中に含まれてもよい。多くの事例において、本発明の組成物に使用される塩は、溶液中で解離して、一価の種(例えば、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>等)を少なくとも1つもたらす。本発明の組成物中に含まれる場合、これらの塩は、個別または組み合わせてのいずれかで、約0.5mM~約500mM(例えば、約1mM、約2mM、約3mM、約5mM、約10mM、約12mM、約15mM、約17mM、約20mM、約22mM、約23mM、約24mM、約25mM、約27mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約64mM、約65mM、約70mM、約75mM、約80mM、約85mM、約90mM、約95mM、約100mM、約120mM、約140mM、約150mM、約175mM、約200mM、約225mM、約250mM、約275mM、約300mM、約325mM、約350mM、約375mM、約400mM、約1mM~約500mM、約5mM~約500mM、約10mM~約500mM、約20mM~約500mM、約30mM~約500mM、約40mM~約500mM、約50mM~約500mM、約60mM~約500mM、約65mM~約500mM、約75mM~約500mM、約85mM~約500mM、約90mM~約500mM、約100mM~約500mM、約125mM~約500mM、約150mM~約500mM、約200mM~約500mM、約10mM~約100mM、約10mM~約75mM、約10mM~約50mM、約20mM~約200mM、約20mM~約150mM、約20mM~約125mM、約20mM~約100mM、約20mM~約80mM、約20mM~約75mM、約20mM~約60mM、約20mM~約50mM、約30mM~約500mM、約30mM~約100mM、約30mM~約70mM、約30mM~約50mM等)の濃度で存在することが多いであろう。

10

20

【0153】

示されるように、1つ以上の二価カチオンの塩(MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>等)が、本発明の組成物中に含まれてもよい。多くの事例において、本発明の組成物に使用される塩は、溶液中で解離して、一価の種(例えば、Mg<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>等)を少なくとも1つもたらす。本発明の組成物中に含まれる場合、これらの塩は、個別または組み合わせてのいずれかで、約0.5mM~約500mM(例えば、約1mM、約2mM、約3mM、約4mM、約5mM、約6mM、約7mM、約8mM、約9mM、約10mM、約12mM、約15mM、約17mM、約20mM、約22mM、約23mM、約24mM、約25mM、約27mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約64mM、約65mM、約70mM、約75mM、約80mM、約85mM、約90mM、約95mM、約100mM、約120mM、約140mM、約150mM、約175mM、約200mM、約225mM、約250mM、約275mM、約300mM、約325mM、約350mM、約375mM、約400mM、約1mM~約500mM、約5mM~約500mM、約10mM~約500mM、約20mM~約500mM、約30mM~約500mM、約40mM~約500mM、約50mM~約500mM、約60mM~約500mM、約65mM~約500mM、約75mM~約500mM、約85mM~約500mM、約90mM~約500mM、約100mM~約500mM、約125mM~約500mM、約150mM~約500mM、約200mM~約500mM、約10mM~約100mM、約10mM~約75mM、約10mM~約50mM、約20mM~約200mM、約20mM~約150mM、約20mM~約125mM、約20mM~約100mM、約20mM~約80mM、約20mM~約75mM、約20mM~約60mM、約20mM~約50mM、約30mM~約500mM、約30mM~約100mM、約30mM~約70mM、約30mM~約50mM等)の濃度で存在することが多いであろう。

30

40

【0154】

50



本発明の組成物中に含まれる場合、還元剤（例えば、ジチオスレイトール、 $\beta$ -メルカプトエタノール等）は、個別または組み合わせてのいずれかで、約0.1 mM～約50 mM（例えば、約0.2 mM、約0.3 mM、約0.5 mM、約0.7 mM、約0.9 mM、約1 mM、約2 mM、約3 mM、約4 mM、約5 mM、約6 mM、約10 mM、約12 mM、約15 mM、約17 mM、約20 mM、約22 mM、約23 mM、約24 mM、約25 mM、約27 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約0.1 mM～約50 mM、約0.5 mM～約50 mM、約1 mM～約50 mM、約2 mM～約50 mM、約3 mM～約50 mM、約0.5 mM～約20 mM、約0.5 mM～約10 mM、約0.5 mM～約5 mM、約0.5 mM～約2.5 mM、約1 mM～約20 mM、約1 mM～約10 mM、約1 mM～約5 mM、約1 mM～約3.4 mM、約0.5 mM～約3.0 mM、約1 mM～約3.0 mM、約1.5 mM～約3.0 mM、約2 mM～約3.0 mM、約0.5 mM～約2.5 mM、約1 mM～約2.5 mM、約1.5 mM～約2.5 mM、約2 mM～約3.0 mM、約2.5 mM～約3.0 mM、約0.5 mM～約2 mM、約0.5 mM～約1.5 mM、約0.5 mM～約1.1 mM、約5.0 mM～約10 mM、約5.0 mM～約15 mM、約5.0 mM～約20 mM、約10 mM～約15 mM、約10 mM～約20 mM等）の濃度で存在することが多いであろう。

#### 【0155】

本発明の組成物はまた、1つ以上のイオン性または非イオン性界面活性剤（例えば、TRI TON X-100（商標）、NONIDET P40（商標）、Tween 20、ドデシル硫酸ナトリウム等）を含有してもよい。本発明の組成物中に含まれる場合、界面活性剤は、個別または組み合わせてのいずれかで、約0.001%～約5.0%（例えば、約0.001%、約0.002%、約0.003%、約0.004%、約0.005%、約0.006%、約0.007%、約0.008%、約0.009%、約0.01%、約0.02%、約0.05%、約0.1%、約0.5%、約1%、約2%、約5%、約0.001%～約5.0%、約0.001%～約4.0%、約0.001%～約3.0%、約0.001%～約2.0%、約0.001%～約1.0%、約0.005%～約5.0%、約0.01%～約3.0%、約0.01%～約2.0%、約0.01%～約1.0%、約0.1%～約5.0%、約0.1%～約4.0%、約0.1%～約3.0%、約0.1%～約2.0%、約0.1%～約1.0%、約0.1%～約0.5%等）の濃度で存在することが多いであろう。例えば、本発明の組成物は、約0.01%～約2.0%、約0.03%～約1.0%、約0.04%～約1.0%、約0.05%～約0.5%、約0.04%～約0.6%、約0.04%～約0.3%等の濃度で、Tween 20、NP-40、及び/またはTRI TON X100（商標）を含有し得る。

#### 【0156】

本明細書に開示されるもの以外の逆転写、増幅、または両方の反応の組み合わせを促進または強化することができる他の添加剤（例えば、RT-PCRを促進または強化する薬剤）は、当該技術分野で既知である。本組成物及び方法によると、これらの添加剤のうちの1つ以上が、リボ核酸またはデオキシリボ核酸の鋳型からの核酸の生成及び複製を最適化するために、本組成物に組み込まれてもよい。添加剤は、有機または無機化合物であり得る。本組成物、方法、及びキットにおいて有用な一部の添加剤には、ポリペプチドならびに非ポリペプチドの添加剤が含まれる。そのような添加剤としては、数例挙げるとして、例えば、RNase阻害剤タンパク質（RIP）、ウラシルDNAグリコシラーゼ（UDG）、レクチン、大腸菌一本鎖結合（SSB）タンパク質、tRNA、rRNA、7-デアザ-2'-デオキシグアノシン（dC7GTP）、硫黄含有化合物、酢酸含有化合物、ジメチルスルホキシド（DMSO）、リボヌクレアーゼ阻害剤（例えば、RNase OUT（商標））ホルムアミド、ベタイン、塩化テトラメチルアンモニウム（TMAC）、ポリエチレングリコール（PEG）、エクトイン、アジ化ナトリウム、カトン（kathon）、及びポリオールを挙げることができる。当業者であれば、本組成物、方法、及びキットより使用するためのさらなる添加剤を特定することができるであろう。

#### 【0157】

本発明の組成物はまた、1つ以上のプライマーを含有してもよい。一部の実施形態において、本発明の組成物は、オリゴ(dT)プライマーを含む。これらのプライマーは、典型的に、長さが約20塩基であり、mRNAのポリA尾部にアニーリングする。mRNAの一部を標的とすることにより、結果として得られるcDNA集団の複雑性が劇的に低減されるが、これは、rRNA及びtRNA種が、反応において鋳型として機能しないためである。オリゴ(dT)プライマーを用いる欠点としては、結果として得られるcDNA集団が、3'バイアスを有し、したがって、転写生成物の5'末端を標的とするPCRプライマーの有効性が低下することであろう。加えて、3'バイアスに起因して、ポリA尾部を欠くフラグメント化試料は、逆転写されないことになる。

【0158】

他の実施形態において、本発明の組成物は、ランダムプライマーを含む。一部の実施形態において、ランダムプライマーは、指定されるオリゴ長の4つの塩基のランダムな混合物である。ランダムヘキサマー混合物が、例えば、使用され得る。ランダムプライマーのそれぞれが、所与のRNA分子(rRNA、tRNA、mRNA、及びこれらの種の任意のフラグメントを含む)内の相補的配列が存在する場所にアニーリングされる。ランダムプライマーを用いた逆転写により、RNA二次構造、及びオリゴ(dT)プライマーを使用する際の一般的な課題であるRNAフラグメントに関する懸念が克服される。

【0159】

一部の他の実施形態では、本発明の組成物は、ロックド核酸(LNA)プライマーを含む。LNAをオリゴヌクレオチドプライマーに組み込むことにより、DNA増幅のための鋳型結合強度及び特異性が向上することが示されている。例えば、Ballantyne, K.N., et al., Genomics, 2008 Mar; 91(3): 301-5. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.10.016を参照されたい。LNAプライマーは、LNAを含まないものよりも高い融点(Tm)でポリA配列に結合する。

【0160】

他の実施形態において、本発明の組成物は、配列特異的(または遺伝子特異的)プライマーを含む。配列特異的プライマーは、典型的に、最も優れた特異性を提供し、逆転写のためのプライマーの選択肢のうち最も整合性のあるものであることが示されている。しかしながら、それらは、オリゴ(dT)及びランダムプライマーの柔軟性は提供しない、すなわち、研究がなされる各遺伝子に対して、新たなcDNA合成反応を行わなければならない。このため、配列特異的プライマーは、プロセッシングが制限される組織または細胞試料には最適ではない。一部の実施形態では、異なる種類のプライマー(例えば、オリゴ(dT)、ランダム、LNA、及び/または配列特異的プライマーの混合物)が使用される。

【0161】

本発明の組成物はまた、1つ以上のホットスタート用成分を含んでもよい。ホットスタートは、室温での核酸合成反応の組立てに起因する非特異的増幅を低減するための一般的な技法である。低温では、オリゴヌクレオチドプライマーは、完全に相補的でない鋳型配列にアニーリングすることができる。しばしば、これらの低温で、逆転写酵素等の酵素は、誤ってアニーリングしたプライマーを伸長させてしまう場合がある。この新たに合成された領域は、プライマー伸長の鋳型として作用し、所望されない核酸合成生成物が合成される。しかしながら、重合が始まる前に反応温度を(例えば、60以上の温度まで)上昇させると、プライマーがアニーリングするストリンジェンシーが高まり、所望されない核酸合成生成物の生成を回避または低減させることができる。

【0162】

核酸合成反応にホットスタート用成分を含めることによって、プライマーがアニーリングするストリンジェンシーを高めることによって合成されるプライマーダイマーの量を低減させることができる。低温では、オリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、相補性の領域を介して互いにアニーリングしてヘアピンを形成し得、逆転写酵素が、アニーリングしたプライマーを伸長させてプライマーダイマーを生成し得る。非特異的生成物の形成

10

20

30

40

50

とプライマーダイマーの形成は、所望される生成物の合成のための試薬の利用可能性に関して競合し得る。したがって、ホットスタート技法により、特異的な核酸合成生成物の収率が改善され得る。

【0163】

一部の実施形態において、ホットスタート反応は、氷上または室温で構築され、重要な成分は反応物が約60℃に加熱されるまでは省かれており、この時点で欠けていた試薬が添加される。この省略により、プライマーのアニーリングがよりストリンジेंटな高温で重要な成分が添加されるまで、逆転写酵素がプライマーを伸長させることを防止する。

【0164】

一部の他の実施形態では、逆転写酵素は、可逆的に不活性化されているか、または反応における1つ以上の重要な成分から物理的に分離している。例えば、マグネシウムがワークスピース中に隔離されていてもよく、反応が加熱されるとこれが溶融し、高温でのみ成分が放出される（例えば、Carothers et al., 1989、Krishnan et al., 1991、Clark, 1988を参照されたい）。逆転写酵素はまた、アプタマー（例えば、Lin and Jayasena, 1997、Dang and Jayasena, 1996を参照されたい）または抗体（例えば、Scalice et al., 1994、Sharkey et al., 1994を参照されたい）としても既知である、オリゴヌクレオチドへの結合により不活性状態で保つことができる。この結合は、次いで、高温で破壊され、機能的な逆転写酵素が放出され得る。

【0165】

さらに他の実施形態において、逆転写酵素は、化学修飾（例えば、Moretti, T. et al., 1998を参照されたい）により不活性状態で維持してもよい。一部の実施形態において、化学修飾は、可逆的である。したがって、一部の実施形態において、逆転写酵素は、低温（例えば、約55℃未満）では不活性状態にあり、高い温度（例えば、約55℃超）では完全に機能的/活性となるように、化学的に修飾される。

【0166】

本発明の組成物はまた、1つ以上のDNAポリメラーゼ阻害剤（例えば、アクチノマイシンD等）を含んでもよい。本発明の組成物中に含まれる場合、そのような阻害剤は、個別または組み合わせのいずれかで、約0.1 µg/ml ~ 約100 µg/ml（例えば、約0.1 µg/ml、約0.2 µg/ml、約0.3 µg/ml、約0.4 µg/ml、約0.5 µg/ml、約0.6 µg/ml、約0.7 µg/ml、約0.8 µg/ml、約0.9 µg/ml、約1.0 µg/ml、約1.1 µg/ml、約1.3 µg/ml、約1.5 µg/ml、約1.7 µg/ml、約2.0 µg/ml、約2.5 µg/ml、約3.5 µg/ml、約5.0 µg/ml、約7.5 µg/ml、約10 µg/ml、約15 µg/ml、約20 µg/ml、約25 µg/ml、約30 µg/ml、約35 µg/ml、約40 µg/ml、約50 µg/ml、約60 µg/ml、約70 µg/ml、約80 µg/ml、約90 µg/ml、約100 µg/ml、約0.5 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約0.75 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約1.0 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約2.0 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約3.0 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約4.0 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約5.0 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約7.5 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約10 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約15 µg/ml ~ 約30 µg/ml、約0.5 µg/ml ~ 約20 µg/ml、約0.5 µg/ml ~ 約10 µg/ml、約0.5 µg/ml ~ 約5 µg/ml、約0.5 µg/ml ~ 約2 µg/ml、約0.5 µg/ml ~ 約1 µg/ml、約1 µg/ml ~ 約10 µg/ml、約1 µg/ml ~ 約5 µg/ml、約1 µg/ml ~ 約2 µg/ml、約1 µg/ml ~ 約100 µg/ml、約10 µg/ml ~ 約100 µg/ml、約20 µg/ml ~ 約100 µg/ml、約40 µg/ml ~ 約100 µg/ml、約30 µg/ml ~ 約80 µg/ml、約30 µg/ml ~ 約70 µg/ml、約40 µg/ml ~ 約60 µg/ml、約40 µg/ml ~ 約70 µg/ml、約40 µg/ml ~ 約80 µg/ml等）の濃度で存在することが多いであろう。

## 【0167】

多くの事例において、ヌクレオチド（例えば、 $dNTP$ 、例として、 $dGTP$ 、 $dATP$ 、 $dCTP$ 、 $dTTP$ 等）が本発明の反応混合物中に存在するであろう。典型的には、ヌクレオチドは個々に、約 $0.05\text{ mM}$ ～約 $50\text{ mM}$ （例えば、約 $0.07\text{ mM}$ 、約 $0.1\text{ mM}$ 、約 $0.15\text{ mM}$ 、約 $0.18\text{ mM}$ 、約 $0.2\text{ mM}$ 、約 $0.3\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ 、約 $0.7\text{ mM}$ 、約 $0.9\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ 、約 $2\text{ mM}$ 、約 $3\text{ mM}$ 、約 $4\text{ mM}$ 、約 $5\text{ mM}$ 、約 $6\text{ mM}$ 、約 $10\text{ mM}$ 、約 $12\text{ mM}$ 、約 $15\text{ mM}$ 、約 $17\text{ mM}$ 、約 $20\text{ mM}$ 、約 $22\text{ mM}$ 、約 $23\text{ mM}$ 、約 $24\text{ mM}$ 、約 $25\text{ mM}$ 、約 $27\text{ mM}$ 、約 $30\text{ mM}$ 、約 $35\text{ mM}$ 、約 $40\text{ mM}$ 、約 $45\text{ mM}$ 、約 $50\text{ mM}$ 、約 $0.1\text{ mM}$ ～約 $50\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $50\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ ～約 $50\text{ mM}$ 、約 $2\text{ mM}$ ～約 $50\text{ mM}$ 、約 $3\text{ mM}$ ～約 $50\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $20\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $10\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $5\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $2.5\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ ～約 $20\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ ～約 $10\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ ～約 $5\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ ～約 $3.4\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $3.0\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ ～約 $3.0\text{ mM}$ 、約 $1.5\text{ mM}$ ～約 $3.0\text{ mM}$ 、約 $2\text{ mM}$ ～約 $3.0\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $2.5\text{ mM}$ 、約 $1\text{ mM}$ ～約 $2.5\text{ mM}$ 、約 $1.5\text{ mM}$ ～約 $2.5\text{ mM}$ 、約 $2\text{ mM}$ ～約 $3.0\text{ mM}$ 、約 $2.5\text{ mM}$ ～約 $3.0\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $2\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $1.5\text{ mM}$ 、約 $0.5\text{ mM}$ ～約 $1.1\text{ mM}$ 、約 $5.0\text{ mM}$ ～約 $10\text{ mM}$ 、約 $5.0\text{ mM}$ ～約 $15\text{ mM}$ 、約 $5.0\text{ mM}$ ～約 $20\text{ mM}$ 、約 $10\text{ mM}$ ～約 $15\text{ mM}$ 、約 $10\text{ mM}$ ～約 $20\text{ mM}$ 等）の濃度で存在するであろう。1つを上回るヌクレオチドが存在する場合、合わせたヌクレオチドの濃度は、個々のヌクレオチドの濃度を加算することによって決定することができる。1つを上回るヌクレオチドが本発明の組成物中に存在する場合、個々のヌクレオチドは、等モル量で存在しなくてもよい。したがって、組成物は、例えば、 $1\text{ mM}$ の $dGTP$ 、 $1\text{ mM}$ の $dATP$ 、 $0.5\text{ mM}$ の $dCTP$ 、及び $1\text{ mM}$ の $dTTP$ を含有してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0168】

典型的には、RNAが本発明の組成物中に存在することになる。ほとんどの事例において、RNAは、逆転写の直前に組成物に添加される。したがって、組成物は、RNAなしで提供されてもよい。これは、組成物がキットで提供される場合に典型的である。RNAは、組成物中に存在する場合、 $1\text{ ピコグラム} \sim 100\text{ }\mu\text{g}$  / 反応混合物 $20\text{ }\mu\text{l}$ （例えば、約 $1\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $50\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $100\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $200\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $500\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $800\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $1.0\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $5.0\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $25\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $50\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $75\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $100\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $150\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $250\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $400\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $500\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $750\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $1.0\text{ }\mu\text{g} / 20$ 、約 $5.0\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $20\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $30\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $40\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $50\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $70\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $85\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $100\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 100\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 100\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $100\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 100\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $1.0\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 100\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $100\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 100\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 10\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $10\text{ ピコグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 5\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $100\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 5\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $1\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 10\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $1\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 5\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $100\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 1\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 、約 $500\text{ ナノグラム} / 20\text{ }\mu\text{l} \sim 5\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{l}$ 等）の濃度で存在することが多いであろう。当業者には理解されるように、異なる逆転写反応が、 $20\text{ }\mu\text{l}$ 以外の量で行われてもよい。そのような事例では、存在するRNAの総量は、使用される量に応じて多様であろう。したがって、上述の量は、RNA / 組成物 $20\text{ }\mu\text{l}$ の例として提供される。

## 【0169】

本発明の変異型逆転写酵素は、本明細書に記載される組成物（保管組成物及び／または反応混合物）中に存在する場合、約0.01～約1,000ユニットの逆転写酵素活性/ $\mu$ l（例えば、約0.01ユニット/ $\mu$ l、約0.05ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l、約0.2ユニット/ $\mu$ l、約0.3ユニット/ $\mu$ l、約0.4ユニット/ $\mu$ l、約0.5ユニット/ $\mu$ l、約0.7ユニット/ $\mu$ l、約1.0ユニット/ $\mu$ l、約1.5ユニット/ $\mu$ l、約2.0ユニット/ $\mu$ l、約2.5ユニット/ $\mu$ l、約5.0ユニット/ $\mu$ l、約7.5ユニット/ $\mu$ l、約10ユニット/ $\mu$ l、約20ユニット/ $\mu$ l、約25ユニット/ $\mu$ l、約50ユニット/ $\mu$ l、約100ユニット/ $\mu$ l、約150ユニット/ $\mu$ l、約200ユニット/ $\mu$ l、約250ユニット/ $\mu$ l、約350ユニット/ $\mu$ l、約500ユニット/ $\mu$ l、約750ユニット/ $\mu$ l、約1,000ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約0.2ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約1.0ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約5.0ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約10ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約20ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約50ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約100ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約200ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約400ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約500ユニット/ $\mu$ l～約1,000ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約300ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約200ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約100ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約50ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約10ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約5.0ユニット/ $\mu$ l、約0.1ユニット/ $\mu$ l～約1.0ユニット/ $\mu$ l、約0.2ユニット/ $\mu$ l～約0.5ユニット/ $\mu$ l等をもたらず濃度で存在し得る。

10

20

30

40

50

#### 【0170】

本発明の組成物は、最終的な使用のために作業濃度に希釈される濃縮溶液（例えば、5倍溶液）として調製されてもよい。5倍組成物に関して、そのような5倍溶液を作業濃度にするためには、5：1希釈が必要である。本発明の組成物は、例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍等の溶液として調製されてもよい。そのような溶液の倍濃度に対する制限の1つは、化合物が特定の溶液中濃度に達したときに、沈殿が起こり得ることである。したがって、濃縮組成物は、通常、緩衝液成分の沈殿が生じないように種々の成分の濃度が十分に低くなるように調製される。当業者には理解されるように、各溶液の実行可能な濃度の上限は、具体的な溶液及び存在する成分に応じて多様であろう。

#### 【0171】

多くの事例において、本発明の組成物は、滅菌形態で提供されるであろう。滅菌は、混合の前に組成物の個々の成分に対して行われてもよく、または調製後に組成物に対して行われてもよい。そのような溶液の滅菌は、オートクレーブまたは限外濾過を含む任意の好適な手段により行うことができる。

#### 【0172】

##### 逆転写酵素を使用する方法

本発明の逆転写酵素を使用して、1つ以上の鋳型から核酸分子を作製することができる。そのような方法は、1つ以上の核酸鋳型（例えば、DNAまたはRNA、非コードRNA（ncRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA（miRNA）、及び小分子干渉RNA（siRNA）といった分子）を、本発明の逆転写酵素のうちの1つ以上と混合する工程、ならびに1つ以上の核酸鋳型の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程を含み得る。

#### 【0173】

本発明はまた、そのような方法によって生成される核酸分子（全長cDNA分子であり得る）、これらの核酸を含むベクター（特に、発現ベクター）、ならびにこれらのベクタ

ー及び核酸分子を含む宿主細胞にも関する。

【0174】

本発明を有利に用いることができるcDNA合成の他の方法は、当業者には容易に明らかであろう。

【0175】

本発明はまた、1つ以上の核酸鋳型を本発明の逆転写酵素と混合する工程、ならびに1つ以上の核酸鋳型の全てまたは一部分に相補的な1つ以上の核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程を含む、1つ以上の核酸分子の増幅のための方法も提供する。そのような増幅方法は、1つ以上のDNAポリメラーゼの使用をさらに含んでもよく、また標準的な逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)反応で用いられ得る。

10

【0176】

本発明のこの態様による核酸増幅方法は、1ステップ(例えば、1ステップRT-PCR)または2ステップ(例えば、2ステップRT-PCR)であり得る。本発明によると、1ステップRT-PCR型の反応は、1つのチューブで達成することができ、それによって混入の可能性が低下し得る。そのような1ステップ反応には、(a)核酸鋳型(例えば、mRNA)を1つ以上の本発明の逆転写酵素及び1つ以上のDNAポリメラーゼと混合する工程、ならびに(b)鋳型の全てまたは一部分に相補的な核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程が含まれる。そのような増幅は、単独でか、またはDNAポリメラーゼ活性と組み合わせて、逆転写酵素活性によって達成され得る。2ステップRT-PCRは、2つの別個の工程で達成することができる。そのような方法には、(a)核酸鋳型(例えば、mRNA)を本発明の逆転写酵素と混合する工程、(b)鋳型の全てまたは一部分に相補的な核酸分子(例えば、DNA分子)を作成するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程、(c)核酸分子を1つ以上のDNAポリメラーゼと混合する工程、ならびに(d)核酸分子を増幅させるのに十分な条件下で、工程(c)の混合物をインキュベートする工程が含まれる。長い核酸分子(すなわち、長さが約3~5kbを上回るもの)の増幅については、一方が3'エクソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼであり、もう一方が3'エクソヌクレアーゼ活性が実質的に低減されたDNAポリメラーゼであるもの等、DNAポリメラーゼの組み合わせを使用してもよい。

20

30

【0177】

本発明に従って使用することができる増幅方法としては、PCR(例えば、米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号を参照されたい)、等温増幅(1つ以上のRNAポリメラーゼを用いた(例えば、PCT公開第WO2006/081222号を参照されたい)、鎖置換増幅(SDA、例えば、米国特許第5,455,166号、欧州特許第EP0684315号を参照されたい)、及び核酸配列に基づく増幅(NASBA、例えば、米国特許第5,409,818号、欧州特許第EP0329822号を参照されたい)、ならびにより複雑なPCRに基づく核酸判別技法、例えば、ランダム増幅多型DNA(RAPD)分析(例えば、Williams, J. G. K., et al., Nucl. Acids Res. 18(22):6531-6535, 1990を参照されたい)、任意プライム型PCR(AP-PCR、例えば、Welsh, J., and McClelland, M., Nucl. Acids Res. 18(24):7213-7218, 1990を参照されたい)、DNA増幅判別法(DAF、例えば、Caetano-Anolles et al., Bio/Technology 9:553-557, 1991を参照されたい)、マイクロサテライトPCRまたはミニサテライト領域DNAの特異的増幅(Directed Amplification of Minisatellite-region DNA)(DAVID、例えば、Heath, D. D., et al., Nucl. Acids Res. 21(24):5782-5785(1993)を参照されたい、ならびにフラグメント長多型増幅(Amplification Fragment Length Polymorphism)

40

50

(AFLP)分析(例えば、欧州特許第EP 0 534 858号、Vos, P., et al. Nucleic Acids Res. 23(21):4407-4414(1995)、Lin, J. J., and Kuo, J. FOCUS 17(2):66-70(1995))を参照されたい。本組成物を用いることができる核酸配列決定技法には、米国特許第4,962,022号及び同第5,498,523号に開示されるもの等のジデオキシ配列決定方法が含まれる。一部の実施形態において、本発明は、1つ以上のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、例えば、上述のPCRに基づく方法のうちの任意のものを含む、核酸分子の増幅または配列決定の方法に使用することができる。

#### 【0178】

本発明はまた、(a)配列決定する1つ以上の核酸分子を1つ以上のプライマー核酸分子、1つ以上の本発明の逆転写酵素、1つ以上のヌクレオチド、及び1つ以上の停止剤と混合する工程、(b)配列決定する1つ以上の核酸分子の全てまたは一部分に相補的な核酸分子の集団を合成するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程、ならびに(c)配列決定する1つ以上の核酸分子の全てまたは一部分のヌクレオチド配列を決定するために、核酸分子の集団を分離する工程を含む、1つ以上の核酸分子の配列決定のための方法に関する。

#### 【0179】

本発明のこの態様による核酸配列決定方法は、サイクルシーケンシング(増幅と組み合わせた配列決定)及び標準的な配列決定反応の両方を含み得る。本発明の配列決定方法は、したがって、(a)配列決定する核酸分子を1つ以上のプライマー、1つ以上の本発明の逆転写酵素、1つ以上のヌクレオチド、及び1つ以上の停止剤と混合する工程、(b)配列決定する分子の全てまたは一部分に相補的な核酸分子の集団を合成するのに十分な条件下で、その混合物をインキュベートする工程、及び(c)配列決定する分子の全てまたは一部分のヌクレオチド配列を決定するために、その集団を分離する工程を含む。本発明によると、1つ以上のDNAポリメラーゼ(好ましくは、熱安定性DNAポリメラーゼ)を、本発明の逆転写酵素と組み合わせて、または本発明の逆転写酵素とは別個に、使用してもよい。

#### 【0180】

本発明によると、cDNA分子(一本鎖または二本鎖)は、本明細書に提供される新規な変異型逆転写酵素を用いて、種々の核酸鋳型分子から調製することができる。本発明での使用に好ましい核酸分子には、一本鎖もしくは二本鎖DNA及びRNA分子、ならびに二本鎖DNA:RNAハイブリッドが挙げられる。より好ましい核酸分子としては、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、及びリボソームRNA(rRNA)分子が挙げられるが、mRNA分子が、本発明による好ましい鋳型である。ある特定の実施形態では、遺伝子特異的プライマーが使用され得る。本明細書に提供される変異型逆転写酵素のうちの少なくともいくつかが十分に適しているある特定の他の実施形態では、オリゴdTプライマーが使用される。これらのdTプライマーは、一部の実施形態ではLNAプライマーであってもよい。さらに、例示的な実施例において、そのような反応の鋳型は、mRNAであり得る。

#### 【0181】

本発明の方法によりcDNA分子を調製するのに使用される核酸分子は、標準的な有機化学合成法により合成で調製することができ、これらの方法は、当業者には十分に知られているであろう。より好ましくは、核酸分子は、種々の細胞、組織、器官、または生物といった、天然の供給源から得ることができる。核酸分子の供給源として用いることができる細胞は、原核生物細胞(大腸菌属、バチルス属、セラチア属、サルモネラ属、ブドウ球菌属、連鎖球菌属、クロストリジウム属、クラミジア属、ナイセリア属、トレボネーマ属、マイコプラズマ属、ボレリア属、レジオネラ属、シュドモナス属、マイコバクテリウム属、ヘリコバクター属、エルウイニア属、アグロバクテリウム属、リゾビウム属、キサントモナス属、及びストレプトマイセス属を含むがこれらに限定されない、細菌細胞)、または真核生物細胞(真菌(特に酵母)、植物、原虫、及び他の寄生生物、ならびに動物

、例えば昆虫（特にショウジョウバエ細胞）、線虫（特にカエノラブリディティス・エレガンス細胞）、及び哺乳動物（特にヒト細胞）を含む）であり得る。

【0182】

核酸の供給源として用いることができる哺乳動物の体細胞としては、血液細胞（網状赤血球及び白血球）、内皮細胞、上皮細胞、神経細胞（中枢神経系または末梢神経系由来）、筋肉細胞（骨格筋、平滑筋、または心筋由来の筋細胞及び筋芽細胞を含む）、結合組織細胞（線維芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、軟骨芽細胞、骨細胞、及び骨芽細胞を含む）、ならびに他の間質細胞（例えば、マクロファージ、樹状細胞、シュワン細胞）が挙げられる。哺乳動物胚細胞（精母細胞及び卵母細胞）もまた、本発明で使用するための核酸の供給源として用いることができ、上述の体細胞及び胚細胞を生じさせる始原細胞、前駆細胞、及び幹細胞も同様であり得る。脳、腎臓、肝臓、脾臓、血液、骨髄、筋肉、神経、皮膚、尿生殖器、循環器官、リンパ系、胃腸、及び結合組織源に由来するものといった、哺乳動物組織または器官もまた、核酸供給源として使用するのに好適である。

10

【0183】

上述の原核生物または真核生物の細胞、組織、及び器官のいずれも、正常細胞、疾患細胞、形質転換細胞、株化細胞、始原細胞、前駆細胞、胎児細胞、または胚性細胞であってよい。疾患細胞としては、例えば、感染性疾患（細菌、真菌、もしくは酵母、ウイルス（AIDS、HIV、HTLV、ヘルペス、肝炎等を含む）、または寄生生物によって引き起こされる）、遺伝的もしくは生化学的病因（例えば、嚢胞性線維症、血友病、アルツハイマー病、筋ジストロフィー、もしくは多発性硬化症）、または癌進行に関与するものを挙げることができる。形質転換または株化された動物細胞系としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、VERO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、HepG2細胞、K562細胞、293細胞、L929細胞、F9細胞等を挙げることができる。本発明において核酸の供給源として使用するのに好適な他の細胞、細胞系、組織、器官、及び生物が、当業者には明らかであろう。

20

【0184】

一部の実施形態において、組成物は、ゲノム核酸を含み得る。一部の実施形態において、組成物は、母体核酸、胎児核酸、または母体核酸と胎児核酸殿混合物を含んでもよい。一部の実施形態において、組成物は、ゲノム核酸のフラグメントを含んでもよい。一部の実施形態では、組成物は、ウイルス、細菌、酵母、真菌、哺乳動物、またはそれらの混合物に由来する核酸を含んでもよい。核酸試料は、1つ以上の供給源に由来し得る。試料は、例えば、生物、鉱物、もしくは地質学的部位（例えば、土壌、岩石、鉱床、化石）、または法医学現場（例えば、犯行現場、禁制品、もしくは疑わしい禁制品）から採取され得る。したがって、供給源は、例えば、地質、農業、戦域、または土壌といった、環境上の供給源であり得る。供給源はまた、任意の種類の生物、例えば、任意の植物、真菌、原核生物、モネラ生物、ウイルス、または動物、例えば、ヒト、非ヒト哺乳動物、爬虫類、畜牛、ネコ、イヌ、ヤギ、ブタ（swine）、ブタ（pig）、サル、類人猿、ゴリラ、雄ウシ、雌ウシ、クマ、ウマ、ヒツジ、家禽、マウス、ラット、魚、イルカ、クジラ、及びサメを含むがこれらに限定されないもの、または検出可能な核酸を有し得る任意の動物または生物に由来し得る。供給源はまた、生物の別の部分、例えば、内部の部位、外部の部位、生または非生細胞、組織、流体等を指し得る。試料は、したがって、「生体試料」であってもよく、生体試料とは、生きた供給源または生きていた供給源、例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物等の動物、植物、細菌、真菌、原核生物、またはウイルスから得られた任意の材料を指す。供給源は、組織、細胞、細胞ペレット、細胞抽出物、もしくは生検といった固体材料、または尿、血液、唾液、羊水、感染もしくは炎症の領域からの浸出液、または口腔細胞を含有するマウスウォッシュ、毛髪、脳脊髄液、及び滑液等の生物学的流体、ならびに器官を含むがこれらに限定されない、任意の形態であり得る。試料はまた、別の試料と比較して異なる時点で単離されてもよく、この場合、試料のそれぞれは、同じかまたは異なる供給源に由来する。核酸は、例えば、cDNAまたはRNAライブラリ等の核酸ライブラリに由来してもよい。核酸は、試料からの核酸精製もしくは単離及びノ

30

40

50



または核酸分子の増幅の結果であってもよい。本明細書に記載される配列分析プロセスに提供される核酸は、1つの試料または2つ以上の試料（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000個以上の試料）に由来する核酸を含んでもよい。核酸は、種々の方式で処置することができる。例えば、核酸に、サイズ縮小（例えば、剪断、ヌクレアーゼもしくは制限酵素による消化、脱リン酸化、脱メチル化）、サイズ拡大（例えば、リン酸化、メチル化特異的試薬での反応、検出可能ラベルへの結合）、核酸切断阻害剤での処置等が行われてもよい。

#### 【0185】

ある特定の実施形態において、プロセッシングなしで本明細書に記載される方法を行うための核酸が提供され得る。一部の実施形態において、プロセッシング後に本明細書に記載される方法を行うための核酸が提供される。例えば、核酸は、試料から抽出、単離、精製、または増幅され得る。本明細書に使用される「単離された」という用語は、核酸がその元々の環境（例えば、天然に存在する場合は天然の環境、または外因的に発現する場合は宿主細胞）から取り出されていることを指し、したがって、その元々の環境から「人為的に」改変されている。単離された核酸は、通常、非核酸構成要素（例えば、タンパク質、脂質）の量が、供給源試料中に存在する構成要素の量よりも少ない状態で得られる。単離された核酸を含む組成物は、実質的に単離可能である（例えば、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99%以上、非核酸構成要素が含まれない）。本明細書に使用される「精製」という用語は、核酸が由来する試料源よりも少ない核酸種を有する核酸が提供されることを指す。核酸を含む組成物は、実質的に精製可能である（例えば、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99%以上、他の核酸種が含まれない）。

#### 【0186】

核酸は、ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるプロセスのための核酸を提供する前に、核酸フラグメントが生成される方法によって処理され得る。一部の実施形態において、フラグメント化または切断に供される核酸は、名目上、平均（average）、または平均（mean）の長さが、約5～約10,000塩基対、約100～約1,000塩基対、約100～約500塩基対、または約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000塩基対であり得る。フラグメントは、当該技術分野で既知の任意の好適な方法によって生成することができ、核酸フラグメントの平均（average）、平均（mean）、または名目上の長さは、適切なフラグメント生成手順を選択することによって制御することができる。ある特定の実施形態において、配列の変動性がほとんどなく、かつ/または比較的多くの既知のヌクレオチド配列情報を有する、配列を分析するためには、比較的長さが短い核酸が用いられ得る。一部の実施形態において、配列の変動性が大きく、かつ/または比較的少ない未知のヌクレオチド配列情報を有する配列を分析するためには、比較的長い核酸が用いられ得る。本明細書に使用されるとき、「標的核酸」または「標的核酸種」という用語は、試料中の目的の任意の核酸種を指す。標的核酸種には、限定することなく、(i) 2つ以上の可能性のあるアレルのうちの特定のアレル、及び(ii) 特定の変異、ヌクレオチド置換、配列の変動性、繰り返し配列、マーカー、または特徴的な配列が含まれる。

#### 【0187】

開始細胞、組織、器官、または他の試料が得られた後、核酸分子（mRNA等）を、当該技術分野で周知の方法によりそこから単離することができる（例えば、Maniatis, T., et al., Cell 15: 687-701 (1978)、Okayama, H., and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2: 161-170

10

20

30

40

50

(1982)、Gubler, U., and Hoffman, B. J., Gene 25: 263-269 (1983)を参照されたい)。核酸分子は、したがって、本発明に従ってcDNA分子またはcDNAライブラリを調製するために使用してもよい。

#### 【0188】

##### キット

別の実施形態において、本発明をまとめて、核酸分子の逆転写もしくは増幅に使用することができるキット、または核酸分子の配列決定に使用するためのキットにすることができる。本発明のこの態様によるキットは、バイアル、チューブ、アンプル、瓶等といった1つ以上の格納手段を緊密に有する、箱、段ボール、チューブ等の運搬手段を含み、ここで、第1の格納手段は、逆転写酵素活性を有する本発明の1つ以上のポリペプチドを格納する。逆転写酵素活性を有する1つを上回るポリペプチドを使用するとき、それらは、2つ以上のポリペプチドの混合物として単一の格納容器に入れられてもよく、または別個の格納容器に入れられてもよい。本発明のキットはまた、1つ以上のDNAポリメラーゼ、好適な緩衝液、1つ以上のヌクレオチド、及び/または1つ以上のプライマーも(同じかまたは別個の格納容器に)含み得る。本発明のキットはまた、核酸(例えば、ベクターを含むDNA分子)を取り込むのに適したものを含み、1つ以上の宿主または細胞も含み得る。好ましい宿主には、大腸菌(DH5、DH5<sup>+</sup>、DH10B、HB101、Top10、及び他のK-12株、ならびに大腸菌B及び大腸菌W株を含む)等の化学的に適した、または電気穿孔に適した(electrocompetent)な細菌を挙げることができる。

10

20

#### 【0189】

本発明の特定の態様において、本発明のキット(例えば、逆転写及び増幅キット)は、本発明の逆転写酵素活性を有する1つ以上のポリペプチド、核酸分子の合成に使用される1つ以上のヌクレオチド(そのうち1つ以上が、標識、例えば蛍光標識されていてもよい)、及び/または1つ以上のプライマー(例えば、逆転写のためのオリゴ(dT))を含む、1つ以上の構成要素を(混合物でかまたは別個に)含み得る。そのようなキット(逆転写及び増幅キットを含む)は、1つ以上のDNAポリメラーゼをさらに含んでもよい。本発明の配列決定キットは、本発明の逆転写酵素活性を有する1つ以上のポリペプチド、ならびに、場合によっては1つ以上のDNAポリメラーゼ、核酸分子の配列決定に使用される1つ以上の停止剤(例えば、ジデオキシヌクレオシド三リン酸分子)、1つ以上のヌクレオチド、及び/または1つ以上のプライマーを含み得る。本発明の逆転写、増幅、及び配列決定キットで使用するのに好適な逆転写酵素活性を有する好ましいポリペプチド、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド、プライマー、及び他の構成要素には、上述のものが挙げられる。本発明のこの態様に包含されるキットは、標準的な核酸の逆転写、増幅、または配列決定プロトコルを実行するために必要な追加の試薬及び化合物をさらに含んでもよい。本発明の逆転写酵素活性を有するそのようなポリペプチド、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド、プライマー、及び追加の試薬、構成要素、または化合物は、1つ以上の格納容器に格納されてもよく、また上述の構成要素のうちの2つ以上の混合物で、そのような格納容器に格納されてもよく、または別個の格納容器で本発明のキットに含まれてもよい。そのようなキットはまた、(例えば、本発明に従って核酸分子を標識するため等、本発明の方法を実行するための)説明書も含み得る。

30

40

#### 【0190】

ある特定の例示的な実施形態において、本発明のキットは、分子診断アッセイのために調製される。このキットは、ヒト診断、動物診断、環境診断、及び/または食品安全性のための診断製品の販売を規制する政府の規制機関によって承認されている場合がある。本発明の逆転写酵素は、そのようなキットにおける現在の逆転写酵素の代わりに提供され得る。さらに、本発明の新規な逆転写酵素の有益かつ驚くべき特性のため、これらの酵素はこれらの用途に特に適したものとなっている。

#### 【0191】

一部の実施形態において、本発明のキットは、内部及び/または外部の陽性対照、標的

50

遺伝子（例えば、プライマー及び／もしくはプローブ）の検出のための１組のオリゴヌクレオチド、溶解緩衝液、ウラシルDNAグリコシラーゼ（UDG）、マスターミックス、ならびに検出色素を含むがこれらに限定されない、１つ以上の構成要素を含む。

#### 【0192】

当業者であれば、本明細書に記載される方法及び用途に対する他の好適な修正及び適合が明らかであり、本発明またはその任意の実施形態の範囲から逸脱することなくなされ得ることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される節の見出しは、便宜上のものに過ぎない。本発明を詳細に記載してきたが、本発明は以下の実施例への参照によってより明確に理解され、これらの実施例は、例示目的で本明細書に含まれるに過ぎず、本発明を制限することを意図するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0193】

##### 実施例 1

種々の逆転写酵素の熱安定性及び処理能力の比較

2 µg の 0.24 ~ 9.5 kb の RNA ラダー (Invitrogen、カタログ番号 15620016) 及び 5 µM の 5' 標識オリゴ (dT)<sub>20</sub> プライマー (Alexa-647) を、10 mM の DTT、500 µM の各 dNTP (dATP、dTTP、dGTP、及び dCTP)、及び 2 U の RNase Out (Invitrogen、カタログ番号 10777-019) を補充した、最終反応体積が 19 µL の 1 倍第 1 鎖 cDNA 合成緩衝液 pH8.4 (Life Technologies、カタログ番号 Y02321) に添加し、氷上でインキュベートした。次いで、1 µL の逆転写酵素 (200 U/µl) を (最終体積 20 µL まで) 添加した後、60、37、42、または 50 (図 2 に示されるように) で種々の時間 (すなわち、5 分間、15 分間、及び 60 分間) インキュベートすることによって、反応を開始させた。各時点の終わりに、10 µl のアルカリ負荷染料 (300 mM の NaOH、2 mM の EDTA、20 % グリコール、10 % 飽和チモールブルー) の添加により反応を終了させ、30 ボルトで 2 ~ 4 時間、緩衝液 (30 mM の NaOH、2 mM の EDTA pH7.5) 中において 1 % アルカリアガロースゲル (30 mM の NaOH、2 mM の EDTA pH7.5) での電気泳動により可視化させた。次いで、ImageQuant ソフトウェアを使用して、Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Harlow Scientific) によりゲルを分析した。

#### 【0194】

図 2 に示されるように、本明細書の教示を用いて構築した例示的な変異型 M-MLV である変異型 M-MLV RT 「Mut D9」 (配列番号 4) を含む反応は、インキュベーション 5 分後程度の早期に最大 7.5 kb の cDNA を生成し、60 でのインキュベーションのたった 15 分後に最大 9.5 kb の cDNA を生成した。これは、37 でインキュベートした野生型 M-MLV RT を含む反応とは対照的であり、これは、同程度の 7.5 kb の量の cDNA を生成するのに最大 60 分間を要した。同様に、7.5 kb の cDNA は、SuperScript (商標) II (「SSII」) または SuperScript (商標) II (「SSIII」) RT のいずれかを含む反応では、それぞれ、42 または 50 でのインキュベーション後 5 分を超えるまで、検出されなかった。別の市販入手可能な RT (「Q-RT」) を試験したが、これは 37 で 60 分のインキュベーション後ですら同様の cDNA を全く生成しなかった。これにより、変異型 M-MLV (「Mut D9」) RT の処理能力が高く、60 程度の高温で行われる逆転写反応において、向上した熱安定性ならびに熱反応性を呈したことが示される。

#### 【0195】

##### 実施例 2

低 pH での変異型逆転写酵素の安定性

野生型 M-MLV RT (Invitrogen (商標)、カタログ番号 28025-013) (「WT MMLV」) と例示的な変異型 M-MLV RT (「Mut D9」

）との比較を行って、様々なpHで合成されるcDNAの速度及び長さを評価した。これらのアッセイには、0.5～10kbのRNAラダー（Ambion（登録商標）、カタログ番号15623-200）及びAlexa Fluor（登録商標）647オリゴ（dT）<sub>20</sub>が含まれており、標準的なpH8.3の緩衝液（50mMのTris-HCl pH8.3、72.5mMのKCl、及び3mMのMgCl<sub>2</sub>）またはpH7.3の緩衝液（50mMのTris-HCl pH7.3、72.5mMのKCl、及び3mMのMgCl<sub>2</sub>）を用いて行った。反応温度は、野生型M-MLVについては37℃であり、Mut D9については50℃であり、RT反応は、様々な長さの時間で行った（例えば、図3に示されるように、10分間、30分間、または60分間）。生成された第1のcDNA鎖を、アルカリアガロースゲル電気泳動によって分析し、Cy5蛍光モードに設定したMolecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager（Harlow Scientific）を用いて可視化させた。

10

20

#### 【0196】

図3に示されるように、Mut D9は、10分以内に4kbに達しているが、一方で野生型M-MLVは、同じ時間で3kbにしか達していない。pH7.3において、変異体D9は、30分以内に4kbに達し得るが、一方で野生型M-MLVは、60分間のRT反応時間後ですら、6kbを超えるcDNAを生成することができない。Mut D9は、したがって、より広範なpHで野生型M-MLVよりも活性であり、野生型M-MLVよりも高い温度であっても、pH8.3及びpH7.3の両方でより多くのcDNA及びより長いcDNAを生成する。

#### 【0197】

##### 実施例3

##### 変異型逆転写酵素の熱安定性

実施例2に記載の実験を、様々な時間（すなわち、図4に示されるように、5分間、10分間、30分間、または60分間）60℃でも行って、本明細書に記載される例示的な変異型RT（「Mut D9」）の熱安定性を、野生型M-MLV（「WT MMLV」）及び他の市販入手可能なRT（「SSII」及び「C-RT」）と比較して評価した。この温度では、標準的なオリゴ（dT）<sub>20</sub>は、融解温度が50℃付近であるため、RNA標的のポリアデニル化尾部にアニーリングできない。代わりに、50%のLNAを含むLNA（商標）オリゴ-T20（Exiqon Life Sciences）を用いた。この実験における別の相違は、緩衝液、RNA標的、及びプライマーを含む反応混合物をまず60℃に加熱した後、RT酵素を添加したことである（「手作業によるホットスタート」）。手作業によるホットスタートは、反応の構成時間中及び温度上昇中のcDNAの合成を排除するために行った。pH8.3で60℃において、Mut D9を除く全ての酵素は、機能しない。Mut D9の速度、cDNA収率、及びcDNA長さに関する性能は、50℃（図3と比較）と比較して、60℃（図4を参照されたい）で変化しないままであった。したがって、Mut D9は、熱安定性かつ熱反応性であり、高温に加熱された後にリフォールディングして活性酵素となることができ（熱安定性）、同様に、高温でcDNAを合成することができる（熱反応性）（例えば、図4を参照されたい）。

30

40

#### 【0198】

##### 実施例4

##### 逆転写の感受性及び熱安定性の評価

全ての反応について、20μLの反応につき100、50、または10ngのHeLa RNA（Life Technologies、カタログ番号AM7852、子宮頸部腺癌（HeLa-S3）全RNA）を、（1）プライマーの不在下、（2）オリゴ（dT）<sub>20</sub>プライマーの存在下、（3）LNA T20プライマー（Exiqon）の存在下、（4）遺伝子特異的プライマー（PolE 2.5kb-逆方向プライマー配列：GACCAGGTCCTGCAGGGTGAAGGC

50

の存在下において、示される温度及び時間でインキュベートした。各反応混合物は、示される量の HeLa RNA (図5に示される)、1 mMの各 dNTP (dATP、dTTP、dGTP、及び dCTP) (Life Technologies、カタログ番号 10297018)、5 mMの DTT (Life Technologies、カタログ番号 Y00147)、1 倍の第1の鎖の緩衝液 (Life Technologies、カタログ番号 Y02321)、1  $\mu$ Mのプライマー (上に記載され、図5に示されるように、1、2、3、または4)、40 Uの RNase Out (Life Technologies、カタログ番号 10777019)、及び 100 Uの他の市販入手可能な変異型 M-MLV 逆転写酵素 (「SSIII」及び「M-RT」)、または本明細書に開示される例示的な変異型 M-MLV 逆転写酵素 (「Mut D9」) を含有していた。

10

#### 【0199】

非ホットスタート (「NON-HS-RT」) 反応条件については、タンパク質 (逆転写酵素及び RNase Out) を含まない反応混合物を、65 で5分間インキュベートした後、氷上で10分間インキュベートした。RNase Out 及び逆転写酵素を各反応物に添加し、これらの反応物を、次いで、室温で10分間インキュベートした。この後に、50 で50分間さらにインキュベートし、次いで、全ての反応を95 で10分間の加熱により停止させた。

#### 【0200】

手作業によるホットスタート (「HS-RT」) 反応条件については、タンパク質 (逆転写酵素及び RNase Out) を含まない反応混合物を、65 で5分間インキュベートした後、氷上で10分間インキュベートした。RNase Out を各反応物に添加し、これらの反応物を、逆転写酵素の不在下において60 で10分間インキュベートした。逆転写酵素を、次いで、60 でインキュベートしながら反応物に直接添加し、反応を60 で50分間進行させた。全ての反応を、95 で10分間の加熱により停止させた。

20

#### 【0201】

上述の逆転写反応による cDNA 生成物を使用して、PCR 混合物を調製した。簡単に言うと、1  $\mu$ Lの上述の RT 反応物を、24  $\mu$ Lの PCR 混合物に添加した。PCR 反応物は、Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies、カタログ番号 11304102) を使用して製造業者が推奨するように構築し、30 サイクル増幅させた。pol E 遺伝子の遺伝子特異的プライマーを PCR に使用して、1 kb のフラグメントを得た。プライマー配列は次の通りであった。

30

順方向

(AGCGCCAGACATCGAGGGCGTATATGAGAC)

逆方向

(TGGTGAGACTGGAGAATGGTGTTG)

10  $\mu$ Lの各 PCR 反応物を 2% E ゲル (Life Technologies、カタログ番号 G501802) に使用して、ゲル生成物を可視化させた。

図5に示されるように、3つ全ての逆転写酵素が、室温及び50 でインキュベートした場合には (「NON-HS-RT」反応を参照) 任意のプライマーの不在下 (1) であっても、10 ~ 100 ng の鋳型 DNA を用いて転写生成物を生成し、50 ~ 100 ng の鋳型 DNA に (2) オリゴ (dT)<sub>20</sub> プライマー、(3) ロックド核酸 (LNA) T20 プライマー、及び (4) 遺伝子特異的プライマーのいずれかをを用いて同様の量の 1 kb の cDNA が生成された。「HS-RT」反応については、プライマーの不在下またはプライマーのいずれか (2、3、もしくは4) を添加して、10、50、または100 ng の鋳型 DNA について、1 kb の cDNA が SSIII によって生成されなかった。他の市販入手可能な RT (「M-RT」) もまた、プライマーの不在下ではいずれの cDNA も生成せず、LNA T20 プライマーまたは遺伝子特異的プライマーのいずれかをを用いた場合に10、50、または100 ng の鋳型 DNA についてごく少量の cDNA を生成したに過ぎなかった。変異型 M-MLV Mut D9 (配列番号4) は、一方で、L

40

50

NA T20 プライマーまたは遺伝子特異的プライマーのいずれかを用いた場合に、10 ng の鋳型 DNA について相当量の cDNA を生成し、試験した 3 つ全てのプライマー (2、3、及び 4) について 50 及び 100 ng の鋳型 DNA の cDNA を相当量で生成した。これは、Mut D9 が、60 で機能するだけでなく、非特異的 (例えば、dT または LNA) プライマー、ならびに特異的プライマー種を使用して、鋳型 DNA を逆転写することもできることを示す。たった 10 ng の RNA 投入により野生型 M - MLV 逆転写酵素または任意の他の市販入手可能な (「従来の」) 変異型 M - MLV RT よりも多く生成物を生成する Mut D9 の能力は、感受性の向上をさらに示す。

#### 【0202】

さらに、高温、例えば 60 で逆転写反応を行う能力は、「NON - HS - RT」反応で試験した全ての RT で見られたプライマーなしの cDNA 合成の防止を補助する。したがって、本明細書に開示されるもの等、60 で効率的に実行できる RT を有することにより、RT 反応中に生じる可能性が高い自己プライミング事象に起因する非特異的プライミングの量を低減させる効果が提供される。このプライマーなしの cDNA の低減は、高い温度 (例えば、50、55、60 等) で大幅に強化される。

#### 【0203】

##### 実施例 5

##### 阻害物質の存在下における変異型逆転写酵素の性能

実施例 2 に記載されたものと同様のアッセイを、種々の阻害物質の存在下において行った。RT 反応温度は、野生型 M - MLV については 37 であったが、他の市販入手可能な変異型 M - MLV RT (「SSII I」及び「C - RT」)、ならびに Mut D9 の反応温度は 50 であった。各 RT 反応を、60 分間実行した。試験した RT を阻害物質には、SDS (0.006 ~ 0.01%)、エタノール (26 ~ 30%)、フミン酸 (21 ~ 25 ng /  $\mu$ L)、胆汁酸塩 (0.16 ~ 0.2%)、ヘパリン (0.0031 ~ 0.0042 U /  $\mu$ L)、及びヘマチン (46 ~ 50  $\mu$ M) が挙げられる。図 6 に示されるように、野生型 M - MLV は、SDS、フミン酸、胆汁酸塩、及びヘマチンのあらゆる濃度で機能しない。それは、エタノール中ではわずかに機能するが、0.5 kb の全長 cDNA を合成することはできない。しかしながら、ヘパリンの存在下では、野生型 M - MLV は、0.5 kb の cDNA を合成することができる。SSII I は、SDS、フミン酸、及びヘマチンのあらゆる濃度で機能しない。それは、エタノール及び胆汁酸塩中ではわずかに機能するが、0.5 kb の全長 cDNA を合成することはできない。それは、ヘパリンが存在する場合には、最大 1.5 kb まで逆転写することができる。Mut D9 は、試験した阻害物質の全ての濃度において、野生型 M - MLV 及び SSII I のいずれよりも優れた活性を示す。他の市販入手可能な RT (すなわち、C - RT) と比較して、Mut D9 は、活性がほぼ同等であるエタノール及びヘパリンを除き、試験した全ての阻害物質濃度で優れた活性を示す。

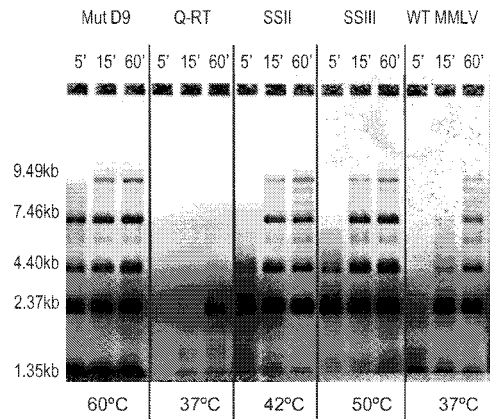
#### 【0204】

上述のように、種々の阻害物質の存在下における試験した RT の活性 % を、Total Lab TL100 ソフトウェアを使用して濃度測定法により定量化した。各バンドの体積強度を各レーンで合計した。阻害物質なしのレーンの体積強度は 100 % に設定し、阻害物質ありのレーンを、阻害物質なしに対する % として正規化して、活性 % を得た。図 7 は、図 6 に示された様々な RT の RT 活性の比較を示す。

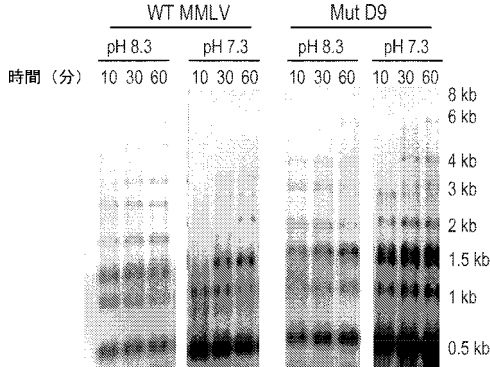
## 【図 1 A】

ヒビ内因性ウイルスの複製 鶏痘ウイルスの複製 コアラの複製 イノシシの複製 コンセンサス	ヒビ内因性ウイルスの複製 鶏痘ウイルスの複製 コアラの複製 イノシシの複製 コンセンサス	ヒビ内因性ウイルスの複製 鶏痘ウイルスの複製 コアラの複製 イノシシの複製 コンセンサス	ヒビ内因性ウイルスの複製 鶏痘ウイルスの複製 コアラの複製 イノシシの複製 コンセンサス
MMLV	MMLV	MMLV	MMLV
1 37	38 72	73 111	112 148
10 20	50 60	90 100	120 130
100 200	250 260	270 280	290 300
300 310	320 330	340 350	360 370
380 390	400 410	420 430	440 450
460 470	480 490	500 510	520 530
540 550	560 570	580 590	600 610
620 630	640 650	660 670	680 690
700 710	720 730	740 750	760 770
780 790	800 810	820 830	840 850
860 870	880 890	900 910	920 930
940 950	960 970	980 990	1000 1010
1020 1030	1040 1050	1060 1070	1080 1090
1100 1110	1120 1130	1140 1150	1160 1170
1180 1190	1200 1210	1220 1230	1240 1250
1260 1270	1280 1290	1300 1310	1320 1330
1340 1350	1360 1370	1380 1390	1400 1410
1420 1430	1440 1450	1460 1470	1480 1490
1500 1510	1520 1530	1540 1550	1560 1570
1580 1590	1600 1610	1620 1630	1640 1650
1660 1670	1680 1690	1700 1710	1720 1730
1740 1750	1760 1770	1780 1790	1800 1810
1820 1830	1840 1850	1860 1870	1880 1890
1900 1910	1920 1930	1940 1950	1960 1970
1980 1990	2000 2010	2020 2030	2040 2050
2060 2070	2080 2090	2100 2110	2120 2130
2140 2150	2160 2170	2180 2190	2200 2210
2220 2230	2240 2250	2260 2270	2280 2290
2300 2310	2320 2330	2340 2350	2360 2370
2380 2390	2400 2410	2420 2430	2440 2450
2460 2470	2480 2490	2500 2510	2520 2530
2540 2550	2560 2570	2580 2590	2600 2610
2620 2630	2640 2650	2660 2670	2680 2690
2700 2710	2720 2730	2740 2750	2760 2770
2780 2790	2800 2810	2820 2830	2840 2850
2860 2870	2880 2890	2900 2910	2920 2930
2940 2950	2960 2970	2980 2990	3000 3010
3020 3030	3040 3050	3060 3070	3080 3090
3100 3110	3120 3130	3140 3150	3160 3170
3180 3190	3200 3210	3220 3230	3240 3250
3260 3270	3280 3290	3300 3310	3320 3330
3340 3350	3360 3370	3380 3390	3400 3410
3420 3430	3440 3450	3460 3470	3480 3490
3500 3510	3520 3530	3540 3550	3560 3570
3580 3590	3600 3610	3620 3630	3640 3650
3660 3670	3680 3690	3700 3710	3720 3730
3740 3750	3760 3770	3780 3790	3800 3810
3820 3830	3840 3850	3860 3870	3880 3890
3900 3910	3920 3930	3940 3950	3960 3970
3980 3990	4000 4010	4020 4030	4040 4050
4060 4070	4080 4090	4100 4110	4120 4130
4140 4150	4160 4170	4180 4190	4200 4210
4220 4230	4240 4250	4260 4270	4280 4290
4300 4310	4320 4330	4340 4350	4360 4370
4380 4390	4400 4410	4420 4430	4440 4450
4460 4470	4480 4490	4500 4510	4520 4530
4540 4550	4560 4570	4580 4590	4600 4610
4620 4630	4640 4650	4660 4670	4680 4690
4700 4710	4720 4730	4740 4750	4760 4770
4780 4790	4800 4810	4820 4830	4840 4850
4860 4870	4880 4890	4900 4910	4920 4930
4940 4950	4960 4970	4980 4990	5000 5010
5020 5030	5040 5050	5060 5070	5080 5090
5100 5110	5120 5130	5140 5150	5160 5170
5180 5190	5200 5210	5220 5230	5240 5250
5260 5270	5280 5290	5300 5310	5320 5330
5340 5350	5360 5370	5380 5390	5400 5410
5420 5430	5440 5450	5460 5470	5480 5490
5500 5510	5520 5530	5540 5550	5560 5570
5580 5590	5600 5610	5620 5630	5640 5650
5660 5670	5680 5690	5700 5710	5720 5730
5740 5750	5760 5770	5780 5790	5800 5810
5820 5830	5840 5850	5860 5870	5880 5890
5900 5910	5920 5930	5940 5950	5960 5970
5980 5990	6000 6010	6020 6030	6040 6050
6060 6070	6080 6090	6100 6110	6120 6130
6140 6150	6160 6170	6180 6190	6200 6210
6220 6230	6240 6250	6260 6270	6280 6290
6300 6310	6320 6330	6340 6350	6360 6370
6380 6390	6400 6410	6420 6430	6440 6450
6460 6470	6480 6490	6500 6510	6520 6530
6540 6550	6560 6570	6580 6590	6600 6610
6620 6630	6640 6650	6660 6670	6680 6690
6700 6710	6720 6730	6740 6750	6760 6770
6780 6790	6800 6810	6820 6830	6840 6850
6860 6870	6880 6890	6900 6910	6920 6930
6940 6950	6960 6970	6980 6990	7000 7010
7020 7030	7040 7050	7060 7070	7080 7090
7100 7110	7120 7130	7140 7150	7160 7170
7180 7190	7200 7210	7220 7230	7240 7250
7260 7270	7280 7290	7300 7310	7320 7330
7340 7350	7360 7370	7380 7390	7400 7410
7420 7430	7440 7450	7460 7470	7480 7490
7500 7510	7520 7530	7540 7550	7560 7570
7580 7590	7600 7610	7620 7630	7640 7650
7660 7670	7680 7690	7700 7710	7720 7730
7740 7750	7760 7770	7780 7790	7800 7810
7820 7830	7840 7850	7860 7870	7880 7890
7900 7910	7920 7930	7940 7950	7960 7970
7980 7990	8000 8010	8020 8030	8040 8050
8060 8070	8080 8090	8100 8110	8120 8130
8140 8150	8160 8170	8180 8190	8200 8210
8220 8230	8240 8250	8260 8270	8280 8290
8300 8310	8320 8330	8340 8350	8360 8370
8380 8390	8400 8410	8420 8430	8440 8450
8460 8470	8480 8490	8500 8510	8520 8530
8540 8550	8560 8570	8580 8590	8600 8610
8620 8630	8640 8650	8660 8670	8680 8690
8700 8710	8720 8730	8740 8750	8760 8770
8780 8790	8800 8810	8820 8830	8840 8850
8860 8870	8880 8890	8900 8910	8920 8930
8940 8950	8960 8970	8980 8990	9000 9010
9020 9030	9040 9050	9060 9070	9080 9090
9100 9110	9120 9130	9140 9150	9160 9170
9180 9190	9200 9210	9220 9230	9240 9250
9260 9270	9280 9290	9300 9310	9320 9330
9340 9350	9360 9370	9380 9390	9400 9410
9420 9430	9440 9450	9460 9470	9480 9490
9500 9510	9520 9530	9540 9550	9560 9570
9580 9590	9600 9610	9620 9630	9640 9650
9660 9670	9680 9690	9700 9710	9720 9730
9740 9750	9760 9770	9780 9790	9800 9810
9820 9830	9840 9850	9860 9870	9880 9890
9900 9910	9920 9930	9940 9950	9960 9970
9980 9990	10000 10010	10020 10030	10040 10050
10060 10070	10080 10090	10100 10110	10120 10130
10140 10150	10160 10170	10180 10190	10200 10210
10220 10230	10240 10250	10260 10270	10280 10290
10300 10310	10320 10330	10340 10350	10360 10370
10380 10390	10400 10410	10420 10430	10440 10450
10460 10470	10480 10490	10500 10510	10520 10530
10540 10550	10560 10570	10580 10590	10600 10610
10620 10630	10640 10650	10660 10670	10680 10690
10700 10710	10720 10730	10740 10750	10760 10770
10780 10790	10800 10810	10820 10830	10840 10850
10860 10870	10880 10890	10900 10910	10920 10930
10940 10950	10960 10970	10980 10990	11000 11010
11020 11030	11040 11050	11060 11070	11080 11090
11100 11110	11120 11130	11140 11150	11160 11170
11180 11190	11200 11210	11220 11230	11240 11250
11260 11270	11280 11290	11300 11310	11320 11330
11340 11350	11360 11370	11380 11390	11400 11410
11420 11430	11440 11450	11460 11470	11480 11490
11500 11510	11520 11530	11540 11550	11560 11570
11580 11590	11600 11610	11620 11630	11640 11650
11660 11670	11680 11690	11700 11710	11720 11730
11740 11750	11760 11770	11780 11790	11800 11810
11820 11830	11840 11850	11860 11870	11880 11890
11900 11910	11920 11930	11940 11950	11960 11970
11980 11990	12000 12010	12020 12030	12040 12050
12060 12070	12080 12090	12100 12110	12120 12130
12140 12150	12160 12170	12180 12190	12200 12210
12220 12230	12240 12250	12260 12270	12280 12290
12300 12310	12320 12330	12340 12350	12360 12370
12380 12390	12400 12410	12420 12430	12440 12450
12460 12470	12480 12490	12500 12510	12520 12530
12540 12550	12560 12570	12580 12590	12600 12610
12620 12630	12640 12650	12660 12670	12680 12690
12700 12710	12720 12730	12740 12750	12760 12770
12780 12790	12800 12810	12820 12830	12840 12850
12860 12870	12880 12890	12900 12910	12920 12930
12940 12950	12960 12970	12980 12990	13000 13010
13020 13030	13040 13050	13060 13070	13080 13090
13100 13110	13120 13130	13140 13150	13160 13170
13180 13190	13200 13210	13220 13230	13240 13250
13260 13270	13280 13290	13300 13310	13320 13330
13340 13350	13360 13370	13380 13390	13400 13410
13420 13430	13440 13450	13460 13470	13480 13490
13500 13510	13520 13530	13540 13550	13560 13570
13580 13590	13600 13610	13620 13630	13640 13650
13660 13670	13680 13690	13700 13710	13720 13730
13740 13750	13760 13770	13780 13790	13800 13810
13820 13830	13840 13850	13860 13870	13880 13890
13900 13910	13920 13930	13940 13950	13960 13970
13980 13990	14000 14010	14020 14030	14040 14050
14060 14070	14080 14090	14100 14110	14120 14130
14140 14150	14160 14170	14180 14190	14200 14210
14220 14230	14240 14250	14260 14270	14280 14290
14300 14310	14320 14330	14340 14350	14360 14370
14380 14390	14400 14410	14420 14430	14440 14450
14460 14470	14480 14490	14500 14510	14520 14530
14540 14550	14560 14570	14580 14590	14600 14610
14620 14630	14640 14650	14660 14670	14680 14690
14700 14710	14720 14730	14740 14750	14760 14770
14780 14790	14800 14810	14820 14830	14840 14850
14860 14870	14880 14890	14900 14910	14920 14930
14940 14950	14960 14970	14980 14990	15000 15010
15020 15030	15040 15050	15060 15	

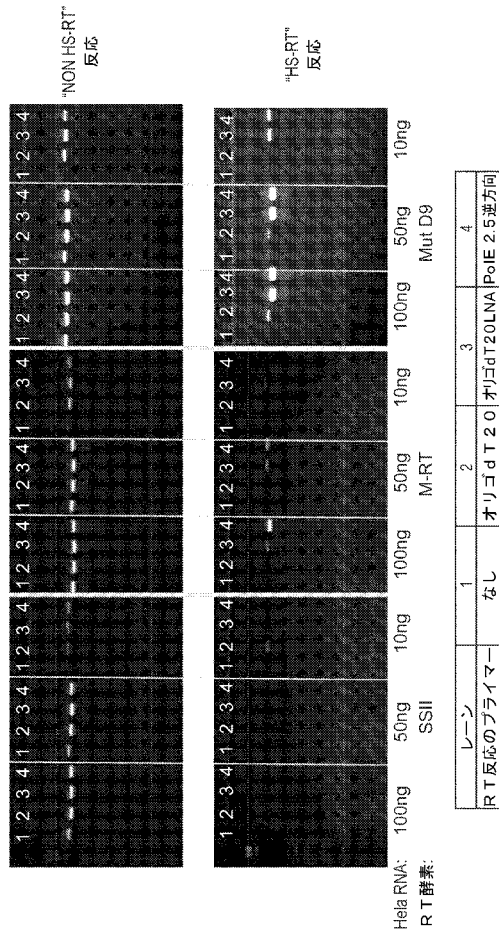
【 図 2 】



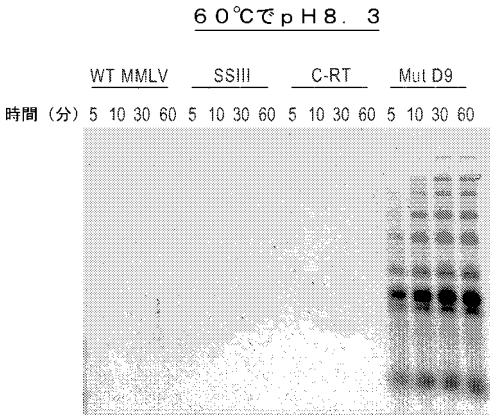
【 図 3 】



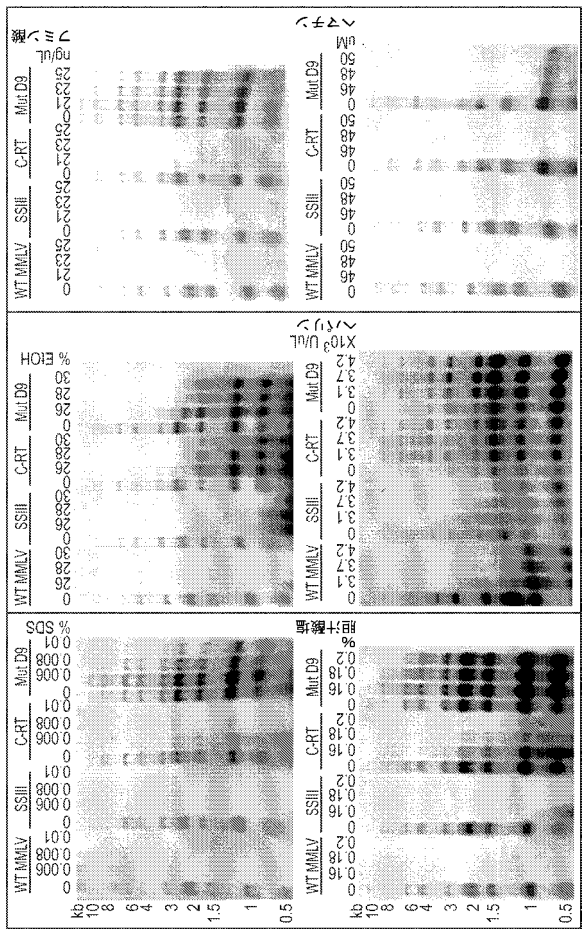
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】





【 7 】

WT MMLV	SSIII	C-RT	Mut D9
阻害物質なし	100	100	100
胆汁酸塩%			
0.16	1	17	73
0.18	0	6	65
0.20	0	3	61
エタノール%			
26	1	37	30
28	1	29	18
30	1	11	17
ヘキサリンμM			
36	0	3	60
40	0	1	40
44	0	1	23
ヘパリンU/μL			
0.0031	53	100	90
0.0037	46	100	87
0.0042	41	100	87
フミン酸n g/μL			
21	2	11	65
23	1	6	56
25	1	8	47
SDS %			
0.006	1	12	70
0.008	1	4	37
0.01	1	2	18

活性スケール

低

高

野生型M-MLV DNA

配列番号 1

【 8 A 】

1	ACCTAATA TAGAATAA GATTCGGA CATGAGAT CAAAGATC AAGATTTT CTAGAGCA CAAGCTTC TAAATTTT CAGCTTGG TGGATTTT ATCTTTAT CTAGCTAT GTATCTGA GTTTTCTG TTACAAGA GATTCAGT GTACAGAG ACTAAGA GTCTGACC
101	CGGAACCG GGCATGGA CTGCGATC CCGAAGTCC AGCTAGAT GAGCTTTC GTTGAGAT GGGACAGG TATTTGTA TGGGTTCAG GCCTTGGC CCGTACTT GACGTGAG GGTTCGAG AGCTAGAT GAGCTTTC GTTGAGAT GGGACAGG TATTTGTA TGGGTTCAG
201	ACAGAAGC AGACTGGA TAGAGCCA CTTGAGAA GTGTGAGC AGGATTTT GGTACCTTC CAGTCTTC GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG
301	GTAAAGAC CAGGACTA TGAATAGG CCGTTCAG ATCTAGAG AGGTGAG AGTCCAGC CAGCTTCC AACCTTCA CAGTCTTC GTCTTAT ACTAATTC GAGAGTTC TAGCTTCT TGAATTTT CAGTCTTC GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG
401	ACTCTGAG GGGCTTCA CCGTCCAG AGTGTGAG TGTCTTAT TAAAGATG CTTTCTTC CTTGAGAT GAGCTTTC GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG
501	CTTGCTTT GATGAGAG ATCAGATT GGAATCTA CTTGAGAG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG
601	GAGCTGAG ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT ACAGACTT
701	TAGCTGCA ACAGTAT CCGGCTCT TAAAGCTT AGGATCTT GGTATGAG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG
801	GTATCTGG TATCTTAA AGAGGTGA GAGTCTTG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG GTGAGATG
901	AGGATGTC TAGGAGAG AGGATGCT GGGCTTGA TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG TCGCTGAG
	TCCTGAGG ATCTCTGC TCGAGACA GCGAGAGT AGGAGCTA AGCTTTAC GTCTGAGG GTCTGAGG GTCTGAGG GTCTGAGG GTCTGAGG GTCTGAGG GTCTGAGG GTCTGAGG GTCTGAGG

【 8 B 】

配列番号 1 (続き)	野生型M-MLV DNA
1001	TTAATTTGG CAGACACA CAAAGGCT ATACAGAT CTTCTATG CCGAGCTT GCGTTGCA GATTACTA AGCCTTTGA
	AAATACCC GGTCTGCT GTTTCTGA TATCTTTA GTCTTGCA GAGATGAG CCGCTGGA CCGAGGCT GTATGAT TCGGAACT
1101	AACTTTTC GAGAGAGC AGGCTTAC CAAAGTTC CTATAGCA AACTGGAG TTGCTTGG CCGCTGCT ACCTTGCA AAGCTGAC
	TGAGAGAG CTCTCTTG TCGCTGAG GTTTCTGA GATTCGTT TTATAGCT AGCGGAGC GCGACGGA TGAAGTT TTGATCTG
1201	CTATAGAG CTGTTGCT CCGTTGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
1301	TTCTGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	AGAGCTGAG CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
1401	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
1501	GAGCTGAG CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
1601	GTATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
1701	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
1801	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
1901	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
2001	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT
	CGATGCTCC CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT CCGATGCT

配列番号 2

野生型M-MLV

【 9 】

1	TLNEDHRL HETSKEDPVS LGSWLSDEP QAWRETCGMS LAVRQPLII
51	PLKATSTPVS IKQYPMQSEA PLGKPHIQIR LLDQGLVLP QSPWNTPLLP
101	VKKPGINDYR PVQDLREVNK RVEDIHPTVP NPYNLLSLGP PSQWYTVLD
151	LKDAFFCLRL HPTSQPLFAF EWRDPBMGLS GGLTWRLPQ GFKNSTPLFD
201	EALHRLADF RIQHPDLILL QYVDDLILAA TSELDCQQT RALLQTLNL
251	GYPASAKQA IQQKVYKLG YLLKEQRLW TEARKETVAG QPTPKTPRL
301	REFLGTAGFC RLNTGPAEM AAPLYPLTKT QTLFNKGPQ QKAYQRIKA
351	LLTAPALGLP DLTKPFELFV DERQGYAKGV LTQKLQPMWR PVAILSKILD
401	PVAAGWPPCL RWVAIAVLIT KDAGKLTNGQ PLVIGAPHAV EALVKQPPDR
451	WLSKARNTY QALLIDTRV QFGPVVALNP ATLLPLPEEG LQHNCLDILA
501	EAGTRPDIT DQPLPDADPT WYTDGSSLIQ EGQKAGAAV TTETEVINAK
551	ALPAGTSAQR AELIALTOAL KMAEGKLLNV YTPSRVAFAT AHINGEYFR
601	RGLITSEKGE IKMKDBILAL LKALFLPKEL SITHOPGHOK GHSAEARGNR
651	MADQAAKAA ITETPDSTL LIENSSP

【☒ 1 0 A】

Mut D9 M-MLV DNA

配列番号 3

1	ACCTGACCA TCGAAGATGA ATATCTCTG CATGAAACCA GCAAGAACG GAAATGTACG CTGGGTAGCA CTGGGTGAG GAAATTTGCG GAGGCAATGGG TGGACTATCT AGCTCTTAT TATAGACAG GTATCTTGT GGTCTTTCG CTATACCTG GAACTATCT GAACTATCT GAACTATCT GAACTATCT
101	CAGAAACCG TGGATAGAT CTGCAGTTC GTCCAGCAAC GGTATATAT CTGTGAAAG CACACAGAC TGGGCAATCG ATTAACATCT ATTCGATAC GTCTTTGGC ACATATACCA GAGCTCAAG CATTCTCTG GACTGATTA GAGCACTTC GTTGCTGAG GAGCACTTC GAAATACAC TACTCTTACG
201	GGAAGAGCC GCTCTGGTA TTAACCCCA TATTCACCT CTGTGATC AGGATATCT GTTCTCTGT CAGAGCCGT GAAATACAC TACTCTTACG GCTTTTGG GAGACTCAT AATTGGGT ATAGATGCA GAGCACTAG TCCATACCA CAAAGGACA GTCTGAGCA CTTATATGG GAGAGAGCC
301	GTTAAAGAC CAGTACAAA TGAATAGT CCGTCTGAG ATCTGAGTA AGTATATA GCGTGGAG ATATATCC GAGCTTCC GATCTGAGTA CAATTTTGG GCGATATCT ACTATGCA AGGCAATCT TAACTATCT GCGCACTTC TAAATATCT GCGCACTTC TAAATATCT GCGCACTTC
401	ATCTGCTAG CCGTCTGCT CCGAGCAAC AGGATATC GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT ATCTGCTAG CCGAGCAAC AGGATATC GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT
501	GTGTTGATTT GATGCTGAG ATCCGAAAT AGGATATC GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT CAAGCTAAA CTATCCGAC TAGGCTTTA CCGATATCT GACTGTGAG AGAGGCTTC CCGATATCT GACTGTGAG AGAGGCTTC CCGATATCT
601	GAGGCTTCC GTGCTGATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT GGTATATCT CTGCGGAGC CAGCACTAG CCGTATATA GGTATATCT TAGGCTTAG CTATAGAC GATATACAC TACTAGACA GAACTATCT TGGTCTCTG
701	TGGATATCT GCGGCAAC CCGTCTGCT CCGAGCAAC AGGATATC GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT ACTATATCT GCGGCAAC CCGTCTGCT CCGAGCAAC AGGATATC GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT
801	ATATCTGAG TATCTGATCA AGAGCTTCC AGCTTCTG AGAGCTTCC AGCTTCTG AGAGCTTCC AGCTTCTG AGAGCTTCC AGCTTCTG TATAGACCG ATAGACTCT TTCTTCACT GCGCACTAG GGTATATCT TAGGCTTAG CTATAGAC GATATACAC TACTAGACA GAACTATCT
901	CTAATATCT TGGTATATCT AGGATATC GGTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GCTATATCT AGGATATC GGTATATCT AGGATATC GGTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT GTTATATCT

【☒ 1 0 B】

Mut D9 M-MLV DNA

配列番号 3 (続き)

1001	TTAATGAGG TCGGATACG CAAAGACT ATCAGAAAT TAAAGAGCA GTCTATACG CAGGCACT GAGTCTGCT GAGTCTGCT GAGTCTGCT GAGTCTGCT ATTAACCC AGGCTATCT GTTCTGGA TGTCTTCTA ATTTCTGCT GAGCTGAG GTGCGCTGA CCGAGAGCA CTGACTGCT TGGCAACT
1101	ACTGTTTGG GATGAAAC AGGCTATCT CAGGCACT ATCTGAGCT GTGCGCTCT GTGCGCTCT GTGCGCTCT GTGCGCTCT GTGCGCTCT TGAACACAG CTATTTTGG TCCATATG TTTCTGCA GACTGCTCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG
1201	CGGTTGAG CAGTCTGCT TCGTCTG CTATGCTG CAGGCACT AGGCTATCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG GCTGACTCT GTCTGAGCT AGGCACTAG CAGGCACT GCTGACTCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG
1301	TGGGCAAC GATGACTCT GAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG AACCTGCT GTGCTGCT CTTCTGCT AGGCTATCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT
1401	GATCTGCT CAGTCTGCT CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG GCTGACTCT GTCTGAGCT AGGCACTAG CAGGCACT GCTGACTCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG
1501	GAGGCACT GATGACTCT GAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CTTCTGCT GTGCTGCT CTTCTGCT AGGCTATCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT
1601	GTAACAGG TGAACAGT ACCAGGAA CCGATATCT TGGGCACT GAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT CAGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT
1701	CAGGCACT CAGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT GCTGACTCT GTCTGAGCT AGGCACTAG CAGGCACT GCTGACTCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG
1801	CTGTTTGG TGAACAGT AGGCACTAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG GAGGCACT AGGCTATCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT
1901	ATTTCTGAG TGAACAGT AGGCACTAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG TGAACAGCT AGGCTATCT CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG
2001	CAGGCACT CAGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT TGGGCACT GCTGACTCT GTCTGAGCT AGGCACTAG CAGGCACT GCTGACTCT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG CAGGCACT TGAACACAG

【☒ 1 1】

配列番号 4

変異体 D 9 M-MLV

1	TLNIEDEYRL HETSKEDPVS LGSTWLSDFP QAWAETGGMG LAVRQAPLII
51	LLKATSTPVS IKQYPMRQKA RLGIKPHIQR LLDQGLVPC QSPWNPPLP
101	VKKPGTNDYR PVQDLREVNK RVEDIHETVP NPYNLLSGLP PSHQWTVLD
151	LKDAFFCLRL HPTSQPLFAF EWRDPENGIS GQUTWTRLPQ GFKNSPALFD
201	EALRDLADF RIQHPDLILL QYVDDLILAA TSELDCQQT RALLQLGLD
251	GYRASAKKAQ ICQKQVKYIG YLLKEGQRL TEARKETVMG OPTKTPQOL
301	RKFLGTAGNC RLFIPTFAEM ABLNPLTKP GTLFNMGDPQ QKAYQBIKA
351	LLTAPALGLP DLTKPFELV DEKQYAKGV LTKLQPMWR PVAYLSKKLD
401	PVLAGHPPLC RMVAATAVLT KDAGKLTMGQ PLVIGAPHAV EALVKQPPDR
451	WLSKRWTHY QALLLTDYR QFGEVVALNP ATLLPLPERG LQHNCLDILA
501	BAHGTBPDLT DQPLPDADHT WYTGSSLLQ EGQKAGAAV TTETEVIWAK
551	ALPAGTSAQR AELIALTQAL RMABGKKLV YTNRYAFAT AHQGBEYR
601	RLLTSEKKE IKNKDELIAL LKALPLPKRL SIHCPSHQK QHSAEAKGN
651	MANQARKAA ITENPDTSTL PIENSSP

【手続補正書】

【提出日】平成28年10月14日(2016.10.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017503521000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/012534

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US2015/012534

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
 1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100(all partially)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/012534

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/22 C12N9/12  
ADD.

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)  
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 2011/081704 A1 (SMITH MICHAEL D [US] ET AL) 7 April 2011 (2011-04-07)</p> <p>see whole document and in particular paragraph [0045]. ----- -/--</p>	<p>1-5, 7-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 June 2015

Date of mailing of the international search report

02/09/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ury, Alain

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/012534

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>W0 2009/125006 A2 (FERMENTAS UAB [LT]; JANULAITIS ARVYDAS [LT]; SKIRGAILA REMIGIJUS [LT];) 15 October 2009 (2009-10-15)</p> <p>see whole document and in particular Seq. 96; page 90, line "L5 73" and page 97, "Position 67"; Seq.52; middle of page 19; middle of page 53; page 89 and 90; Seq.124 and Paragraph bridging pages 52-53.; sequences 52, 96, 124</p>	<p>1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100</p>
A	<p>W0 2007/022045 A2 (STRATAGENE CALIFORNIA [US]; HOGREFE HOLLY [US]; AREZI BAHRAM [US]; XIN) 22 February 2007 (2007-02-22)</p> <p>see whole document and in particular SEQ ID NO:35, page 5, line 26, page 6, line 16, page 30, line 13 and claim 3</p>	<p>1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100</p>
A	<p>-&amp; DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>14 June 2007 (2007-06-14), "MMLV RT mutant protein (E302R/E69K/W313F/L435G/N454K/D524N).", XP002740463, retrieved from EBI accession no. GSP:AEX83173 Database accession no. AEX83173 the whole document</p>	<p>1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100</p>
A	<p>EP 2 604 688 A1 (UNIV KYOTO [JP]) 19 June 2013 (2013-06-19)</p> <p>see whole document and in particular Test Example 3 and Table 4</p>	<p>1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100</p>
A	<p>-&amp; DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>12 April 2012 (2012-04-12), "Reverse transcriptase mutant (E286R/E302K/L435R).", XP002740464, retrieved from EBI accession no. GSP:AZT62682 Database accession no. AZT62682 the whole document</p>	<p>1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/012534

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011081704	A1	07-04-2011	NONE
WO 2009125006	A2	15-10-2009	
		AU 2009235368 A1	15-10-2009
		CA 2721117 A1	15-10-2009
		CN 102057039 A	11-05-2011
		EP 2281035 A2	09-02-2011
		EP 2639300 A2	18-09-2013
		JP 5642662 B2	17-12-2014
		JP 2011516072 A	26-05-2011
		JP 2014158473 A	04-09-2014
		KR 20110065420 A	15-06-2011
		NZ 588468 A	26-10-2012
		US 2011065606 A1	17-03-2011
		US 2012156752 A1	21-06-2012
		US 2013288925 A1	31-10-2013
		WO 2009125006 A2	15-10-2009
WO 2007022045	A2	22-02-2007	
		AT 535603 T	15-12-2011
		CA 2617790 A1	22-02-2007
		EP 1931772 A2	18-06-2008
		JP 5203200 B2	05-06-2013
		JP 2009504162 A	05-02-2009
		WO 2007022045 A2	22-02-2007
EP 2604688	A1	19-06-2013	
		EP 2604688 A1	19-06-2013
		US 2013143225 A1	06-06-2013
		WO 2012020759 A1	16-02-2012



International Application No. PCT/ US2015/ 012534

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100(all partially)

An isolated mutant M-MLV reverse transcriptase, comprising at least one mutation at amino acid position S67 of wild type M-MLV reverse transcriptase (SEQ ID NO:2), composition and method for nucleic acid synthesis comprising said mutant and kit comprising said mutant.

---

2. claims: 1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100(all partially)

An isolated mutant M-MLV reverse transcriptase, comprising at least one mutation at amino acid position T197 of wild type M-MLV reverse transcriptase (SEQ ID NO:2), composition and method for nucleic acid synthesis comprising said mutant and kit comprising said mutant.

---

3. claims: 1-18, 42-53, 75-77, 84-91, 100(all partially)

An isolated mutant M-MLV reverse transcriptase, comprising at least one mutation at amino acid position E302 of wild type M-MLV reverse transcriptase (SEQ ID NO:2), composition and method for nucleic acid synthesis comprising said mutant and kit comprising said mutant.

---

4. claims: 19-34, 54-65, 78-80, 92-99, 101

An isolated mutant M-MLV reverse transcriptase, comprising at least six mutations at an amino acid position selected from the group consisting of P51, E69, P196, D200, H204, M289, T306, F309, W313, T330, L435, N454, D524, E562, D583, H594, L603, D653, and L671 of wild type M-MLV (SEQ ID NO:2), composition for nucleic acid synthesis comprising said mutant, methods involving said mutant and kit comprising said mutant.

---

5. claims: 35-41, 81-83, 102-106

An isolated mutant reverse transcriptase, wherein said mutant reverse transcriptase comprises at least 95% amino acid sequence identity to SEQ ID NO:4, composition for nucleic acid synthesis comprising said mutant, nucleic acid encoding said mutant and vector and host cell comprising said mutant.

---

6. claims: 66(completely); 74(partially)

An isolated mutant reverse transcriptase, wherein said

International Application No. PCT/ US2015/ 012534

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

reverse transcriptase is able to produce a cDNA that is at least 7.5 kb within 5 minutes at 60°C.

---

7. claims: 67(completely); 74(partially)

An isolated mutant reverse transcriptase, wherein said reverse transcriptase is able to produce a cDNA that is at least 9.5 kb within 15 minutes at 60°C.

---

8. claims: 68-70(completely); 74(partially)

An isolated mutant reverse transcriptase, wherein said reverse transcriptase is thermostable at 60°C for at least 5 minutes.

---

9. claims: 71-73(completely); 74(partially)

An isolated mutant reverse transcriptase, wherein said reverse transcriptase is thermoreactive at 60°C for at least 5 minutes.

---

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード ( 参考 )  
**C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10**

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

(74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707  
 弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ロジャーズ ジェフリー  
 アメリカ合衆国 9 2 0 2 7 カリフォルニア州 エスコンディード ヴァレンシア グレン コート 1 8 2 0

(72) 発明者 ポッター ジェイソン  
 アメリカ合衆国 9 2 0 0 8 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5 7 9 1 ライフ テクノロジーズ コーポレーション

F ターム ( 参考 ) 4B050 CC07 LL03 LL10  
 4B065 AA01X AA57X AA87X AC14 CA27 CA46 CA60

【要約の続き】

## セクション1

	(1)	1	10	20	37
MMLV	(1)	-	TLNTEDEYRLHE	TSKEPDVSLG	STWLSDFPQAWAET
ヒヒ内因性ウイルスの翻訳	(1)	MTVSL	ODEHRLFDIP--	VTTSLP	PDVWLQDFPQAWAET
鶏痘ウイルスの翻訳	(1)	MTAPLE	ESEYRLFLEAP	TONVTL	LEQWKREIPKVAET
コアラの翻訳	(1)	MVLNLEE	EYRLHEKP--	MPPSIDPS--	WLQLEFPMVWAEK
イノシシの翻訳	(1)	MTLQLD	DEYRLYSPL--	MKPDONIQFWL	EQFPQAWAET
コンセンサス	(1)	MTLNLE	DEYRLHE	V	SL WL DFPQAWAET

## セクション2

	(38)	38	50	60	74
MMLV	(37)	GGMGL	AVRQAPLEIT	PLKATSTPVS	IKOYPM
ヒヒ内因性ウイルスの翻訳	(36)	GGLGR	AKCOAPIIID	LMPTAVPV	SIKOYPM
鶏痘ウイルスの翻訳	(38)	NPPGL	ASTOAPIHV	OLLSTALP	VRVROYPT
コアラの翻訳	(36)	AGMGL	ANQVPPV	VELKSDAS	PVAVROYPM
イノシシの翻訳	(37)	AGMGL	AKQVPP	QVIOLKAS	ATPVSVROYPL
コンセンサス	(38)	AGMGL	A	QAPIII	LKATATPVSVROYPM

## セクション3

	(75)	75	80	90	100	111
MMLV	(74)	IRPHI	QRLLDQ	GILVPC	QSPWNT	PLL
ヒヒ内因性ウイルスの翻訳	(73)	IRPHI	TKFLEL	GVLRPC	QSPWNT	PLL
鶏痘ウイルスの翻訳	(75)	LRFTI	RKFRAA	CILRPV	HSPWNT	PLL
コアラの翻訳	(73)	IRPHI	QRFLDL	GILVPC	QSPWNT	PLL
イノシシの翻訳	(74)	IRPHV	QRLLDQ	GILVPC	QSPWNT	PLL
コンセンサス	(75)	IRPHI	QRFLD	GILVPC	QSPWNT	PLL

## セクション4

	(112)	112	120	130	148
MMLV	(111)	FVQDL	REVNKR	VEDIHPT	VPNPYNLLS
ヒヒ内因性ウイルスの翻訳	(110)	FVQDL	REVNKR	TVDIHPT	VPNPYNLLS
鶏痘ウイルスの翻訳	(112)	MVQDL	REVNKR	VEDIHPT	VPNPYTLLS
コアラの翻訳	(110)	FVQDL	REVNKR	VEDIHPT	VPNPYNLLS
イノシシの翻訳	(111)	FVQDL	REVNKR	VEDIHPT	VPNPYNLLS
コンセンサス	(112)	FVQDL	REVNKR	VEDIHPT	VPNPYNLLS

## セクション5

	(149)	149	160	170	185
MMLV	(148)	VLDLK	DAFFCLRL	HPSTQPL	FAFEWRDPE
ヒヒ内因性ウイルスの翻訳	(147)	VLDLK	DAFFCLPL	APQSOL	FAFEWKDPERG
鶏痘ウイルスの翻訳	(149)	VLDLK	DAFFCLPL	APESOL	FAFEWADAE
コアラの翻訳	(147)	VLDLK	DAFFCLRL	HPNSQPL	FAFEWRDPE
イノシシの翻訳	(148)	VLDLK	DAFFCLRL	HPSTQPL	FAFEWRDPE
コンセンサス	(149)	VLDLK	DAFFCLRL	HP	SQPLFAFEWRDPE