

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4634799号  
(P4634799)

(45) 発行日 平成23年2月16日(2011.2.16)

(24) 登録日 平成22年11月26日(2010.11.26)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 9/96 (2006.01)

C 1 2 N 9/96

請求項の数 12 (全 122 頁)

(21) 出願番号 特願2004-536265 (P2004-536265)  
 (86) (22) 出願日 平成15年9月15日(2003.9.15)  
 (65) 公表番号 特表2005-538719 (P2005-538719A)  
 (43) 公表日 平成17年12月22日(2005.12.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/028802  
 (87) 国際公開番号 W02004/024749  
 (87) 国際公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)  
 審査請求日 平成18年9月15日(2006.9.15)  
 (31) 優先権主張番号 60/410,283  
 (32) 優先日 平成14年9月13日(2002.9.13)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502221282  
 ライフ テクノロジーズ コーポレーショ  
 ン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920  
 08, カールスバッド, バン アレン  
 ウェイ 5791  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (72) 発明者 ポーター ロバート ジェイソン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン  
 マルコス アミスタッド アベニュー  
 1246

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性逆転写酵素およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のアミノ酸に対応する位置に改変または変異を有する変異M-MLV逆転写酵素であって、50 で、40 で合成される量の少なくとも50%の全長cDNAを合成する逆転写酵素:

- (a)M-MLV逆転写酵素のヒスチジン204の、アルギニンへの置換;  
 (b)M-MLV逆転写酵素のメチオニン289の、ロイシンへの置換;  
 (c)M-MLV逆転写酵素のスレオニン306の、リジンへの置換;および  
 (d)M-MLV逆転写酵素のフェニルアラニン309の、アスパラギンへの置換。

【請求項 2】

40 で合成される量の少なくとも70%の全長cDNAを50 で合成する、請求項1記載の逆転写酵素。 10

【請求項 3】

40 で合成される量の少なくとも80%の全長cDNAを50 で合成する、請求項1記載の逆転写酵素。

【請求項 4】

40 で合成される量の少なくとも90%の全長cDNAを50 で合成する、請求項1記載の逆転写酵素。

【請求項 5】

以下のアミノ酸に対応する位置に改変または変異を有する変異M-MLV逆転写酵素であって、52.5 で、40 で合成される量の少なくとも20%の全長cDNAを合成する逆転写酵素: 20

- (a)M-MLV逆転写酵素のヒスチジン204の、アルギニンへの置換；
- (b)M-MLV逆転写酵素のメチオニン289の、ロイシンへの置換；
- (c)M-MLV逆転写酵素のスレオニン306の、リジンへの置換；および
- (d)M-MLV逆転写酵素のフェニルアラニン309の、アスパラギンへの置換。

【請求項 6】

40 で合成される量の少なくとも40%の全長cDNAを52.5 で合成する、請求項5記載の逆転写酵素。

【請求項 7】

40 で合成される量の少なくとも50%の全長cDNAを52.5 で合成する、請求項5記載の逆転写酵素。

【請求項 8】

40 で合成される量の少なくとも60%の全長cDNAを52.5 で合成する、請求項5記載の逆転写酵素。

【請求項 9】

以下のアミノ酸に対応する位置に改変または変異を有する変異M-MLV逆転写酵素であって、55 で、40 で合成される量の少なくとも1%の全長cDNAを合成する逆転写酵素：

- (a)M-MLV逆転写酵素のヒスチジン204の、アルギニンへの置換；
- (b)M-MLV逆転写酵素のメチオニン289の、ロイシンへの置換；
- (c)M-MLV逆転写酵素のスレオニン306の、リジンへの置換；および
- (d)M-MLV逆転写酵素のフェニルアラニン309の、アスパラギンへの置換。

【請求項 10】

40 で合成される量の少なくとも5%の全長cDNAを55 で合成する、請求項9記載の逆転写酵素。

【請求項 11】

40 で合成される量の少なくとも10%の全長cDNAを55 で合成する、請求項9記載の逆転写酵素。

【請求項 12】

40 で合成される量の少なくとも20%の全長cDNAを55 で合成する、請求項9記載の逆転写酵素。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

従来の技術

発明の属する技術分野

本発明は、分子生物学および細胞生物学の分野である。本発明は、一般的に、逆転写酵素、および核酸分子(特に、メッセンジャーRNA分子)を逆転写する方法に関する。特に、本発明は、耐熱性を増大させ、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性を減少させ、および/または忠実度(fidelity)を増大させるように変異または改変されている逆転写酵素、ならびにこれらの逆転写酵素または組成物を用いて核酸分子(特に、cDNA分子)を生成、増幅、または配列決定する方法に関する。本発明はまた、これらの方法によって生成された核酸分子および望ましいポリペプチドを生成するためのこのような核酸分子の使用に関する。本発明はまた、本発明の逆転写酵素をコードする核酸分子、このような核酸分子を含むベクター、およびこのような核酸分子を含む宿主細胞に関する。また、本発明はこのような酵素を含むキットまたは組成物に関する。

【0002】

関連技術

cDNAおよびcDNAライブラリー

生物、組織、または細胞の構造および生理学を調べる際に、多くの場合、その遺伝的な内容を決定することが望ましい。生物の遺伝的な枠組みは、生物の体細胞および生殖細胞に含まれるデオキシリボ核酸(DNA)のヌクレオチド塩基の二本鎖配列にコードされている

10

20

30

40

50

。DNAの特定のセグメントすなわち遺伝子の遺伝的な内容は、一般的に、その遺伝子がコードするタンパク質が産生されると明らかになる。タンパク質を産生するために、DNA二重らせんの一方の鎖の相補的コピーがRNAポリメラーゼ酵素によって生成され、特殊なりボ核酸(RNA)配列が生じる。この特殊なタイプのRNAは、タンパク質産生のためのDNAからの遺伝的メッセージを含むのでメッセンジャーRNA(mRNA)と呼ばれる。

#### 【 0 0 0 3 】

ある特定の細胞、組織、または生物には、無数のmRNA種が存在し、それぞれが別々の、かつ特定のタンパク質をコードする。この事は、組織または細胞における遺伝子発現の研究に関心を持つ研究者に強力なツールをもたらす。mRNA分子は単離し、さらに、様々な分子生物学的技法によって操作することができ、それによって、細胞、組織、または生物の完全な機能的な遺伝的内容の解明が可能になる。

10

#### 【 0 0 0 4 】

遺伝子発現研究の1つの一般的なアプローチは、相補的DNA(cDNA)クローンの作製である。この技法では、生物に由来するmRNA分子を、その生物の細胞または組織の抽出物から単離する。この単離では、多くの場合、チミジン(T)オリゴマーが複合体化している固形のクロマトグラフィーマトリックス(例えば、セルロースまたはアガロース)を使用する。ほとんどの真核生物mRNA分子の3'末端はアデノシン(A)塩基の連なりを含み、AはTと塩基対を形成するので、mRNA分子は、組織または細胞抽出物中の他の分子および物質から迅速に精製することができる。これらの精製されたmRNA分子から、一本鎖cDNA分子を生成する逆転写酵素(RT)を用いてcDNAコピーを作製することができる。この反応は一般的に第1鎖反応と呼ばれる。次いで、DNAポリメラーゼの働きによって、一本鎖cDNAを元のmRNA(従って、生物ゲノムに含まれる、このmRNAをコードする元の二本鎖DNA配列)の完全な二本鎖DNAコピー(すなわち、二本鎖cDNA)に変換することができる。次いで、このタンパク質特異的な二本鎖cDNAをプラスミドまたはウイルスベクターに挿入することができ、次いで、宿主である細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、または植物細胞に導入する。次いで、宿主細胞を培養培地中で増殖させ、関心対象の遺伝子を含む(または、多くの場合、関心対象の遺伝子を発現する)宿主細胞の集団が得られる。

20

#### 【 0 0 0 5 】

供給源の生物または組織からのmRNAの単離から、プラスミドまたはベクターへのcDNAの挿入、単離された遺伝子を含む宿主細胞集団の増殖までの、この全プロセスは「cDNAクローニング」と呼ばれる。ある特定のmRNA供給源から調製されたcDNAセットは「cDNAライブラリー」と呼ばれる。cDNAライブラリーのcDNAクローンは、供給源の組織において転写される遺伝子に対応する。cDNAライブラリーを分析すると、cDNAライブラリーが得られた生物または組織における遺伝子発現パターンに関する多くの情報を得ることができる。

30

#### 【 0 0 0 6 】

##### レトロウイルス逆転写酵素

レトロウイルス逆転写酵素の3つのプロトタイプ形態が徹底的に研究されている。モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLV)逆転写酵素は、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性およびRNaseH活性を有する78kDaのシングルサブユニットを含む。この酵素はクローニングされ、大腸菌において完全に活性を有する形態で発現されている(プラサド(Prasad), V.R., 「逆転写酵素(Reverse Transcriptase)」, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 135頁(1993)に概説される)。ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)逆転写酵素はp66およびp51サブユニットからなるヘテロ二量体であり、ここで小さな方のサブユニットは大きな方のサブユニットからタンパク質分解によって得られる。p66サブユニットはRNA依存性DNAポリメラーゼドメインおよびRNaseHドメインの両方を有するのに対して、p51サブユニットはDNAポリメラーゼドメインのみを有する。活性型HIV p66/p51逆転写酵素がクローニングされ、大腸菌を含む多数の発現宿主において首尾よく発現されている(レグリス(Le Grice), S.F.J., 「逆転写酵素(Reverse Transcriptase)」, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 163頁(1993)に概説される)。HIV p66/p51ヘテロ二量体内で、51kDサブユニットは触媒的に不活性であり、66kDサブユニット

40

50

はDNAポリメラーゼ活性およびRNaseH活性を両方とも有する(レグリス, S.F.J. ら, EMBO Journal 10:3905(1991); ホストムスキー(Hostomsky), Z. ら, J.Virol. 66:3179(1992))。鳥類肉腫白血病ウイルス(ASLV)逆転写酵素(これにはラウス肉腫ウイルス(RSV)逆転写酵素、鳥類骨髓芽球症ウイルス(AMV)逆転写酵素、鳥類赤芽球症ウイルス(AEV)ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、鳥類骨髓球腫症ウイルスMC29ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、鳥類細網内皮症ウイルス(REV-T)ヘルパーウイルスREV-A逆転写酵素、鳥類肉腫ウイルスUR2ヘルパーウイルスUR2AV逆転写酵素、鳥類肉腫ウイルスY73ヘルパーウイルスYAV逆転写酵素、ラウス関連ウイルス(RAV)逆転写酵素、および骨髓芽球症関連ウイルス(MAV)逆転写酵素が挙げられるが、これらに限定されない)もまた、2つのサブユニット (約62kDa)および (約94kDa)からなるヘテロ二量体であり、ここで、 はタンパク質切断によって から得られる (プラサド, V.R., 「逆転写酵素」, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press(1993), 135頁に概説される)。ASLV逆転写酵素は、2つのさらなる触媒的に活性な構造形態 および で存在することがある(ハイジ(Hizi), A. およびジョクリック(Joklik), W.K., J.Biol.Chem. 252:2281(1977))。沈降分析は、 および が二量体であり、 形態が単量体形態と二量体形態との平衡状態で存在することを示唆している(グランゲネット(Grandgenett), D.P. ら, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70:230(1973); ハイジ, A. およびジョクリック, W.K., J.Biol.Chem. 252:2281(1977); ならびにソルティス(Soltis), D.A. およびスカルカ(Skalka), A.M., Proc.Nat.Acad.Sci. USA 85:3372(1988))。ASLV および 逆転写酵素は、同じタンパク質複合体に3つの異なる活性: DNAポリメラーゼ活性、RNAseH活性、およびDNAエンドヌクレアーゼ(インテグラーゼ)活性を含むレトロウイルス逆転写酵素の唯一知られている例である(スカルカ, A.M., 「逆転写酵素」, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press(1993), 193頁に概説される)。 形態はインテグラーゼドメインおよび活性を欠いている。

#### 【 0 0 0 7 】

ASLV逆転写酵素の個々のサブユニットの様々な形態がクローニングおよび発現されている。これらの形態として、通常、タンパク質分解によって に処理される98kDa前駆体ポリペプチドおよび カルボキシ末端から除去される4kDaポリペプチド(アレクサンダー(Alexander), F. ら, J.Virol. 61:534(1987)およびアンダーソン(Anderson), D. ら, Focus 17:53(1995))、成熟 サブユニット(ウェイス(Weis), J.H. およびサルストロム(Salstrom), J. S., 米国特許第4,663,290号(1987)、ソルティス, D.A. およびスカルカ, A.M., Proc.Nat.Acad.Sci. USA 85:3372(1988))が挙げられる。(ウェルナー(Werner)S. およびウォール(Wohrl)B.M., Eur.J.Biochem. 267:4740-4744(2000); ウェルナーS. およびウォールB.M., J.Virol. 74:3245-3252(2000); ウェルナーS. およびウォールB.M., J.Biol.Chem. 274:26329-26336(1999)も参照のこと)。ヘテロ二量体RSV 逆転写酵素はまた、クローニングされたRSV 遺伝子を発現する大腸菌細胞から精製されている(ケルノフ(Chernov), A.P. ら, Biomed.Sci. 2:49(1991))。

#### 【 0 0 0 8 】

##### 逆転写の効率

前述のように、逆転写酵素を介した逆転写によるmRNAからcDNAの変換は、クローニングされた遺伝子から発現されるタンパク質の研究において必須の段階である。しかしながら、逆転写を触媒するために、改変されていない逆転写酵素を使用することは多くの理由から非効率である。第一に、時として、逆転写酵素は、主として、逆転写酵素に存在する本来備わっているRNaseH活性のために、第1鎖反応が開始または完了する前にRNA鋳型を分解する。さらに、mRNA鋳型分子のミスプライミング(mis-priming)がcDNA第1鎖への誤りの導入につながることもあり、その一方で、mRNA分子自体の二次構造が一部のmRNAに第1鎖合成を行えなくすることがある。

#### 【 0 0 0 9 】

逆転写酵素のRNaseH活性を除去すると第1の問題が無くなり、逆転写の効率が改善される(ジェラルド(Gerard), G.F. ら, FOCUS 11(4):60(1989); ジェラルド, G.F. ら, FOCUS 14(3):91(1992))。しかしながら、このような逆転写酵素s(「RNaseH-」形態)は、ミスプライミ

ングおよびmRNA二次構造のさらなる問題に対処しない。

【0010】

逆転写の効率に影響を及ぼす別の要因はRNAが二次構造を形成する能力である。例えば、RNA分子の領域がハイブリダイズするのに十分な相補性を有し、二本鎖RNAを形成する場合に、このような二次構造が形成することがある。一般的に、RNA分子を含む溶液の温度を上げることによって、RNAの二次構造の形成を減らすことができる。従って、多くの場合、37 °C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、当技術分野で既知の逆転写酵素は、37 °Cよりかなり上の温度(例えば、50 °C)でインキュベートされると一般的に活性を失う。

【発明の開示】

10

【0011】

発明の概要

本発明は、前記の逆転写の制限を乗り越えるのに有用な逆転写酵素、このような酵素を含む組成物、および方法を一部提供する。一般的に、本発明は、少なくとも1つの逆転写酵素活性を有する1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、15など)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を提供する。このような組成物は、さらに、1つもしくはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5など)ヌクレオチド(例えば1つまたはそれ以上の蛍光標識されたヌクレオチド、1つまたはそれ以上の放射標識したヌクレオチドなど)、適切な緩衝液、および/または1つもしくはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、15など)DNAポリメラーゼを含んでもよい。本発明の組成物はまた、1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、15など)オリゴヌクレオチドプライマー、および/または1つもしくはそれ以上の鋳型、および/または1つもしくはそれ以上の核酸分子(これらはこのような鋳型の全てまたは一部に相補的である)を含んでもよい。

20

【0012】

本発明の逆転写酵素は、好ましくは、酵素の耐熱性が増大もしくは向上するように、および/または酵素の忠実度が増大もしくは向上するように改変または変異されている。特定の態様において、本発明の逆転写酵素は一本鎖(シングルサブユニット)でもよく、複数の鎖(マルチサブユニット)でもよく、RNaseH活性が低下もしくは実質的に低下していてもよく、または検出可能なRNaseH活性を有さないか活性を欠いていてもよい。好ましくは、本発明の酵素は、モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLV)RNaseH-逆転写酵素、ラウス肉腫ウイルス(RSV)RNaseH-逆転写酵素、鳥類骨髄芽球症ウイルス(AMV)RNaseH-逆転写酵素、ラウス関連ウイルス(RAV)RNaseH-逆転写酵素、骨髄芽球症関連ウイルス(MAV)RNaseH-逆転写酵素または他のASLV RNaseH-逆転写酵素、およびヒト免疫不全症ウイルス(HIV)RNaseH-逆転写酵素、ならびにその変異体からなる群より選択される酵素である。好ましい組成物において、逆転写酵素は作用濃度で存在する。

30

【0013】

ある局面において、本発明は、耐熱性を増大させるか、または向上するように改変または変異されている逆転写酵素を含む。このような逆転写酵素の例として、以下からなる群より選択されるアミノ酸に対応する位置で1つまたはそれ以上の改変または変異を含む酵素が挙げられる：

40

- (a)M-MLV逆転写酵素のロイシン52;
- (b)M-MLV逆転写酵素のチロシン64;
- (c)M-MLV逆転写酵素のリジン152;
- (d)M-MLV逆転写酵素のヒスチジン204;
- (e)M-MLV逆転写酵素のメチオニン289;
- (f)M-MLV逆転写酵素のスレオニン306;および
- (g)M-MLV逆転写酵素のフェニルアラニン309。

【0014】

特定の態様において、本発明は、ロイシン52がプロリンで置換され、チロシン64がアルギニンで置換され、リジン152がメチオニンで置換され、ヒスチジン204がアルギニンで置

50

換され、メチオニン289がロイシンで置換され、スレオニン306がリジンもしくはアルギニンのいずれかで置換され、および/またはフェニルアラニン309がアスパラギンもしくはセリンで置換されているM-MLV逆転写酵素に関する。さらに、前記のアミノ酸置換に対応する変化を含む、M-MLV逆転写酵素以外の逆転写酵素が本発明の範囲内に含まれる。

【0015】

さらなる局面において、本発明はまた、5分間50 に加熱した後に、逆転写酵素活性の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約85%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%を保持する耐熱性逆転写酵素を含む。

10

【0016】

前述のように、本発明の酵素は、多量体(例えば、二量体)を形成すると、または個々のタンパク質分子として(すなわち、単量体の形で)逆転写酵素活性を示す逆転写酵素を含む。多量体を形成すると逆転写酵素活性を示す逆転写酵素の例として、AMV、RSV、およびHIV逆転写酵素が挙げられる。別々の個々のタンパク質として(すなわち、単量体の形で)逆転写酵素活性を示す逆転写酵素の一例はM-MLV逆転写酵素である。

【0017】

本発明の多量体逆転写酵素は、ホモ多量体を形成してもよくヘテロ多量体を形成してもよい。言い換えると、多量体タンパク質複合体のサブユニットは同一でもよく異なってもよい。ヘテロ二量体逆転写酵素の一例は、一次アミノ酸配列が異なる2つのサブユニットからなるAMV逆転写酵素である。より詳細には、既に述べたように、AMV逆転写酵素は、これらのサブユニットの一方が他方のサブユニットのタンパク質分解処理によって生成される2つのサブユニットからなってもよい。従って、二量体AMV逆転写酵素は、アミノ酸配列同一性の領域を共有するサイズが異なるサブユニットからなってもよい。

20

【0018】

本発明は、特に、変異も改変もされていない逆転写酵素と比較して核酸合成において酵素を耐熱性にする1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20など)アミノ酸変化が加えられている、逆転写酵素変異体または改変された逆転写酵素に関する。表1に、本発明の耐熱性逆転写酵素および/または他の特徴(例えば、忠実度の増大、TdT活性の減少など)を示す逆転写酵素を生成するための変異または改変の部位を一部の逆転写酵素について列挙する。当業者に理解されるように、同定される1つまたはそれ以上のアミノ酸は、1つまたは多数のアミノ酸残基で欠失および/または置換されてもよい。好ましい局面において、表1において同定される任意の1つまたはそれ以上のアミノ酸は、任意の1つまたはそれ以上のアミノ酸(例えば、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、および/またはVal)で置換されてもよい。表1に示した改変は、好ましくは、本発明の耐熱性逆転写酵素を生じる。さらなる耐熱性逆転写酵素ならびに他の特徴(例えば、忠実度の増大、TdT活性の減少など)を示す逆転写酵素を生成するために、他の逆転写酵素における類似部位もしくは等価な部位または対応する部位を変異または改変することができる。このように、本発明の逆転写酵素は、以下の特性の1つまたはそれ以上を有してもよい：(a)高い温度での耐熱性の増大および半減期の増大；(b)低下したか、実質的に低下したか、または検出可能でないRNaseH活性、(c)低下したか、実質的に低下したか、または検出可能でないターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性、および/または(d)増大した忠実度。ある態様において、本発明の逆転写酵素は、上記に列挙した複数の特性を有してもよい(例えば、逆転写酵素は、耐熱性の増大、RNaseH活性の低下、および忠実度の増大を有してもよい)。

30

40

【0019】

(表1)

<i>RT</i>	アミノ酸
M-MLV	L52, Y64, L135, H143, K152, Q165, G181, H204, I218, N249, M289, T306, F309, A517, D524, T544, V546, W548, E562, H577, D583, L604, S606, G608, F625, L626, H629, H631, H638, G641
AMV	V2, L4, W12, P14, H16, T17, W20, I21, Q23, W24, L26, P27, G29, V32, Q36, L42, Q43, L44, G45, H46, I47, P49, S50, L51, S52, C53, W54, F59, I61, A64, S65, G66, S67, Y68, L70, L71, A76, A79, P83, A86, V87, Q88, Q89, G90, A91, W101, P102, L108, Q120, S131, V132, N133, N134, Q135, P137, A138, Q142, Q148, T151, Y180, M181, S190, H191, G193, A196, I201, S202, P214, V217, Q218, P221, G222, Q224, L226, G227, Y228, G231, T233, Y234, A236, P237, G239, L240, P244, I246, T248, W250, Q252, G257, Q260, W261, P264, L266, G267, L272, Y277, Q279, L280, G282, S283, P285, N286, A288, N292, L293, M297, I302, V303, L305, S306, T308, L311, L320, I332, G333, V334, G336, Q337, G338, P345, W348, L349, F350, S351, P354, A357, F358, A360, W361, L362, V364, L365, T366, T370, A374, V377, G381, C392, P400, G402, L405, G412, I414, F423, I425, A426, P428, L433, H440, P441, V443, G444, P445, A451, S453, S454, T455, H456, G458, V459, V460, W462, W468, I470, I473, A474, L476, G477, A478, S479, V480, Q481, Q482, L483, A491, W495, P496, T497, T498, P499, T500, A507, F508, M512, L513, G520, V521, P522, S523, T524, A525, A527, F528, L534, S535, Q536, S538, V543, S548, H549, S550, V552, P553, F556, T557, N560, A562
RSV	V2, L4, W12, P14, H16, T17, W20, I21, Q23, W24, L26, P27, G29, V32, Q36, L42, Q43, L44, G45, H46, I47, P49, S50, L51, S52, C53, W54, F59, I61, A64, S65, G66, S67, Y68, L70, L71, A76, A79, P83, A86, V87, Q88, Q89, G90, A91, W101, P102, L108, Q120, S131, V132, N133, N134, Q135, P137, A138, Q142, Q148, T151, Y180, M181, S190, H191, G193, A196, I201, S202, P214, V217, Q218, P221, G222, Q224, L226, G227, Y228, G231, T233, Y234, A236, P237, G239, L240, P244, I246, T248, W250, Q252, G257, Q260, W261, P264, L266, G267, L272, Y277, Q279, L280, G282, S283, P285, N286, A288, N292, L293, M297, I302, V303, L305, S306, T308, L311, L320, I332, G333, V334, G336, Q337, G338, P345, W348, L349, F350, S351, P354, A357, F358, A360, W361, L362, V364, L365, T366, T370, A374, V377, G381, C392, P400, G402, L405, G412, I414, F423, I425, A426, P428, L433, H440, P441, V443, G444, P445, A451, S453, S454, T455, H456, G458, V459, V460, W462, W468, I470, I473, A474, L476, G477, A478, S479, V480, Q481, Q482, L483, A491, W495, P496, T497, T498, P499, T500, A507, F508, M512, L513, G520, V521, P522, S523, T524, A525, A527, F528, L534, S535, Q536, S538, V543, S548, H549, S550, V552, P553, F556, T557, N560, A562

10

20

30

40

<i>RT</i>	アミノ酸
HIV	I1, P3, L11, P13, G14, M15, Q22, W23, L25, T26, T38, G44, I46, S47, G50, P51, N53, P54, Y55, F60, I62, S67, T68, W70, L73, V89, Q90L91, G92, I93, S104, V110, G111, S133, I134, N135, N136, P139, G140, I141, Q144, N146, Q150,, Y182, M183, I194, G195, Q196, T199, Q206, L209, P216, Q221, P224, P225, L227, M229, G230, Y231, H234, Q241, P242, V244, L245, S250, T252, N254, Q257, G261, N264, W265, Q268, P271, G272, Q277, C279, L281, L282, G284, T285, A287, L288, T289, V291, P293, L294, T295, L300, A303, I308, L309, P312, H314, Y317, L324, I328, Q329, G332, Q333, G334, Y341, P344, F345, Y353, M356, G358, A359, H360, T361, Q372, T376, V380, Q392, W405, Q406, A407, F415, V416, N417, T418, P419, P420, L424, W425, P432, V434, G435, A436, A444, A445, N446, T449, L451, N459, G461, Q463, V465, V466, P467, L468, T469, N470, T471, T472, N473, Q474, Y482, Q486, S488, G489, L490, Q499, Y500, G503, I504, S512, S514, L516, N518, Q519, Q523, I525, W534, P536, A537, H538, G540, I541, G542, Q546, L550, S552, A553, V554, I555

10

## 【 0 0 2 0 】

20

前記で特定された位置で異なるアミノ酸を有する逆転写酵素を、異なるウイルス分離株がコードし得ることを当業者は理解するだろう。このような分離株は、本発明の逆転写酵素（例えば耐熱性逆転写酵素）を生成するように改変することができる。

## 【 0 0 2 1 】

本発明の逆転写酵素は、以下の1つまたはそれ以上の以下の特性を有してもよい：(a)上昇した温度における増加した耐熱性もしくは増加した半減期、(b)低下した、実質的に低下した、もしくは検出不能なRNaseH活性、(c)低下した、もしくは実質的に低下したターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性、および/または(d)増大した忠実度。

## 【 0 0 2 2 】

30

低下した、または実質的に低下したターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性を有する本発明の酵素は、以下からなる群より選択されるアミノ酸に対応する位置に1つまたはそれ以上の改変または変異を含んでもよい：

- (a)M-MLV逆転写酵素のチロシン133；
- (b)M-MLV逆転写酵素のスレオニン197；および
- (c)M-MLV逆転写酵素のフェニルアラニン309。

## 【 0 0 2 3 】

特定の態様において、本発明は、チロシン133がアラニンで置換され、スレオニン197がグルタミン酸で置換され、および/またはフェニルアラニン309がアスパラギンで置換されているM-MLV逆転写酵素に関する。理解されるように、1つまたはそれ以上の同定されたアミノ酸は欠失および/または1つもしくは複数のアミノ酸残基により置換されてもよい。さらに、前記のアミノ酸置換に対応する変化を含む、M-MLV逆転写酵素以外の逆転写酵素が本発明の範囲内に含まれる。

40

## 【 0 0 2 4 】

さらに、増大した忠実度を示す酵素は、以下からなる群より選択されるアミノ酸に対応する位置に1つまたはそれ以上の改変または変異を有してもよい：

- (a)M-MLV逆転写酵素のチロシン64；
- (b)M-MLV逆転写酵素のアルギニン116；
- (c)M-MLV逆転写酵素のグルタミン190；および
- (d)M-MLV逆転写酵素のパリン223。

50



## 【0025】

理解されるように、同定された1つまたはそれ以上のアミノ酸は、欠失され、および/または任意の1つまたは多数のアミノ酸残基で置換されてもよい。さらに、上記に示されたものに対応する代替物を含むM-MLV逆転写酵素以外の逆転写酵素が本発明に含まれる。

## 【0026】

ある態様において、本発明は、高い温度で、すなわち、37より高い温度で、改変または変異されていない逆転写酵素よりも長い半減期を伴う逆転写酵素活性を有する改変または変異された逆転写酵素（例えば、好ましくは、改変または変異されたレトロウイルス逆転写酵素）を提供する。ある態様において、本発明の逆転写酵素の半減期は、50で5分間よりも長く、好ましくは10分間より長くであり得る。ある態様において、本発明の逆転写酵素は、（例えば、50において）約25分間以上の半減期、好ましくは約50分間以上、より好ましくは約100分間以上、および最も好ましくは約200分間以上の半減期を有し得る。

10

## 【0027】

ある態様において、本発明の逆転写酵素は、約10分間から約200分間まで、約10分間から約150分間まで、約10分間から約100分間まで、約10分間から約75分間まで、約10分間から約50分間まで、約10分間から約40分間まで、約10分間から約30分間まで、または約10分間から約20分間までの50における半減期を有し得る。

## 【0028】

本発明の改変または変異された逆転写酵素（例えば、上記のような50における半減期を有するもの）は、改変または変異されたレトロウイルス逆転写酵素であってもよい。本発明に従う逆転写酵素は、M-MLV逆転写酵素、ASV逆転写酵素、HIV逆転写酵素、トリ肉腫-白血病ウイルス（ASLV）逆転写酵素、ラウス肉腫ウイルス（RSV）逆転写酵素、トリ骨髓芽球症ウイルス（AMV）逆転写酵素、トリ赤芽球症ウイルス（AEV）ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ骨髓球腫症ウイルスMC29ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ細網内皮症ウイルス（REV-T）ヘルパーウイルスREV-A逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスUR2ヘルパーウイルスUR2AV逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスY73ヘルパーウイルスYAV逆転写酵素、ラウス関連ウイルス（RAV）逆転写酵素、骨髓芽球腫関連ウイルス（MAV）逆転写酵素、および逆転写酵素を有する上記の任意の断片からなる群より選択され得る。

20

## 【0029】

本発明の改変または変異された逆転写酵素は、対応する改変または変異されていない逆転写酵素の逆転写活性よりも長い、55における半減期を伴う逆転写活性（例えば、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性）を有し得る。例えば、His<sub>6</sub>-H<sup>-</sup>RTへのH204R、M289R、T306K、およびF309Nの変異の導入は、55での半減期を1.6分間から8.1分間に増大する（表9を参照されたい）。55においては、本発明の改変または変異された逆転写酵素の逆転写活性の半減期は、約2分間より長く、約3分間より長く、約4分間より長く、約5分間より長く、約6分間より長く、約7分間より長く、約8分間より長く、約10分間より長く、約15分間より長く、約20分間より長く、または約30分間より長くであり得る。55においては、本発明の改変または変異された逆転写酵素の逆転写活性の半減期は、

30

約 2 分～約 60 分、約 2 分～約 45 分、約 2 分～約 30 分、  
約 2 分～約 20 分、約 2 分～約 15 分、約 2 分～約 10 分、  
約 2 分～約 8 分、約 2 分～約 7 分、約 2 分～約 6 分、  
約 2 分～約 5 分、約 2 分～約 4 分、または約 2 分～約 3 分。

10

であり得る。このような逆転写酵素は、改変または変異されたレトロウイルス逆転写酵素であり得る。

#### 【0030】

本発明の改変または変異された逆転写酵素（例えば、上記のような55 における半減期を有するもの）は、改変または変異されたレトロウイルス逆転写酵素であってもよい。本発明に従う変異された逆転写酵素は、M-MLV逆転写酵素、ASV逆転写酵素、HIV逆転写酵素、トリ肉腫-白血病ウイルス（ASLV）逆転写酵素、ラウス肉腫ウイルス（RSV）逆転写酵素、トリ骨髓芽球症ウイルス（AMV）逆転写酵素、トリ赤芽球症ウイルス（AEV）ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ骨髓球腫症ウイルスMC29ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ細網内皮症ウイルス（REV-T）ヘルパーウイルスREV-A逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスUR2ヘルパーウイルスUR2AV逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスY73ヘルパーウイルスYAV逆転写酵素、ラウス関連ウイルス（RAV）逆転写酵素、骨髓芽球腫関連ウイルス（MAV）逆転写酵素、および逆転写酵素を有する上記の任意の断片からなる群より選択され得る。

20

#### 【0031】

本発明の逆転写酵素は、高い温度において他の逆転写酵素よりもより多くの産物（例えば、全長産物）を産生し得る。1つの局面において、全長産物合成の比較は、他の反応条件を同様にまたは同じに保持しながら、異なる温度（例えば、1つのより低い温度（例えば、37 と50 の間）、および1つのより高い温度（例えば、50 と78 との間））においてなされる。産生された全長産物の量は、当技術分野において周知の技術を使用して、例えば、第1の温度（例えば、37 、38 、39 、40 など）において逆転写反応を実行すること、産生された全長転写物の量を決定すること、第1の温度よりも高い温度（例えば、45 、50 、52.5 、55 など）において第2の逆転写反応を実行すること、および2つの温度において産生された量を比較することによって、決定され得る。便利な型の比較は、第2の（すなわち、上昇した）温度において産生される第1の温度において産生される全長産物のパーセンテージを決定することである。2つの反応のために使用される反応条件（例えば、塩濃度、緩衝液濃度、pH、二価金属イオン濃度、ヌクレオシド三リン酸濃度、鋳型濃度、逆転写酵素濃度、プライマー濃度、反応が行われる時間の長さなど）は、好ましくは両方の反応について同じである。適切な反応条件には、約1nM～約1μM、約100nM～約1μM、約300nM～約750nM、または約400nM～約600nMの鋳型濃度、および約1nM～約1μM、約10nM～約500nM、約50nM～約250nM、または約75nM～約125nMの逆転写酵素が含まれるがこれらに限定されない。逆転写酵素濃度に対する鋳型濃度の比率は、約100:1～約1:1、約50:1～約1:1、約25:1～約1:1、約10:1～約1:1、約5:1～約1:1、または約2.5:1～約1:1であり得る。反応は、約5分間から約5時間、約10分間から約2.5時間、約30分間から約2時間、約45分間から約1.5時間、または約45分間から約1時間実行され得る。適切な反応時間は約1時間である。他の適切な反応条件は、日常的な技術を使用して当業者によって決定され得、このような条件の例は以下に提供される。

30

40

#### 【0032】

上昇した温度において本発明の逆転写酵素によって産生された全長産物の量が、より低

50

い温度において同じ逆転写酵素によって産生された全長産物の量と比較される場合、本発明の逆転写酵素は、より低い温度において産生される全長産物の量の25%、35%、45%、55%、65%、75%、85%、95%、100%以上を産生し得る。ある場合において、本発明の逆転写酵素は、より低い温度において逆転写酵素によって産生される全長産物の量よりも、より高い温度において多くの全長産物の量（例えば、1%～約100%多くの量）を産生し得る。1つの局面において、本発明の逆転写酵素は、より高い温度において作られる全長産物の量と比較してより低い温度においてほぼ同じ量の全長産物（例えば、25%以下の違い）を産生する。

#### 【0033】

本発明の逆転写酵素は、一定量の全長産物を合成するものであり得、ここで、50 において合成される全長産物の量は、40 においてそれが合成する全長産物の10%以上（例えば、約10%～約95%、約10%～約80%、約10%～約70%、約10%～約60%、約10%～約50%、約10%～約40%、約10%～約30%、または約10%～約20%）である。ある態様において、本発明の逆転写酵素は、50 において合成される全長産物の量が、40 においてそれが合成する全長産物の量の50%以上（例えば、約50%～約95%、約50%～約80%、約50%～約70%、または約50%～約60%）であるものである。ある態様において、本発明の逆転写酵素は、50 において合成される全長産物の量が、40 においてそれが合成する全長産物の量の75%以上（例えば、約75%～約95%、約75%～約90%、約75%～約85%、または約75%～約80%）であるものである。他の態様において、本発明の逆転写酵素は、50 において合成される全長産物の量が、40 においてそれが合成する全長産物の量の85%以上（例えば、約85%～約95%または約85%～約90%）であるものである。

#### 【0034】

本発明の逆転写酵素は、一定量の全長産物を合成するものであり得、ここで、52.5 において合成される全長産物の量は、40 においてそれが合成する全長産物の10%以上

（例えば、約10%～約30%、

約10%～約25%、約10%～約20%、

約10%～約15%、約20%～約60%、約20%～約40%、

約20%～約30%、約30%～約80%、

約30%～約60%、約30%～約45%、

約40%～約90%、約40%～約80%、約40%～約60%、

約40%～約50% 約50%～約90%、または

約50%～約70%)、

である。ある態様において、52.5 において合成される全長産物の量は、40 においてそれが合成する全長産物の量の30%以上（例えば、約30%～約70%、約30%～約60%、約30%～約50%、または約30%～約40%）である。ある態様において、52.5 において合成される全長産物の量は、40 においてそれが合成する全長産物の量の50%以上（例えば、約50%～約70%、約50%～約65%、約50%～約60%、または約50%～約55%）である。

#### 【0035】

本発明の逆転写酵素は、一定量の全長産物を合成するものであり得、ここで、55 において合成される全長産物の量は、40 においてそれが合成する全長産物の1%以上（例えば、約1%～約30%、約1%～約25%、約1%～約20%、約1%～約15%、約1%～約10%、または約1%～約5%）である。ある態様において、55 において合成される全長産物の量は、40 においてそれが合成する全長産物の量の5%以上（例えば、約5%～約30%、約5%～約25%、約5%～約20%、約5%～約15%、または約5%～約10%）である。ある態様において、55 において合成される全長産物の量は、40 においてそれが合成する全長産物の量の10%以上

(例えば、約10%～約30%、

約10%～約25%、約10%～約20%、

約10%～約15%、約20%～約60%、約20%～約40%、

約20%～約30%、約30%～約80%、

約30%～約60%、約30%～約45%、

約40%～約90%、約40%～約80%、約40%～約60%、

約40%～約50%、約50%～約90%、または

約50%～約70%)、

10

である。

#### 【0036】

別の局面において、本発明の逆転写酵素は対応する変異または改変されていない逆転写酵素（例えば、対照逆転写酵素）と比較して、1つまたは多数の上昇した温度において、より多くの核酸産物（例えば、cDNA）および好ましくは、より多くの全長産物を産生することができる。このような比較は、典型的には、同様のまたは同じ反応条件下でなされ、対照逆転写酵素によって合成される産物の量は、本発明の逆転写酵素によって合成される産物の量と比較される。好ましくは、本発明の逆転写酵素は、同じ反応条件および温度の下で対応する対照逆転写酵素と比較して、少なくとも約5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、または少なくとも200%多い産物または全長産物を産生する。本発明の逆転写酵素は、好ましくは、同じ反応条件およびインキュベーション温度の下で、対照逆転写酵素と比較して、約10%～約200%、約25%～約200%、または約100%～約200%多い産物または全長産物を産生する。本発明の逆転写酵素は、好ましくは、同じ反応条件および温度の下で対照逆転写酵素（例えば、対応する変異または改変されていない逆転写酵素）と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも75倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも5,000倍、または少なくとも10,000倍多くの産物または全長産物を産生する。本発明の逆転写酵素は、同じ反応条件および温度の下で対照逆転写酵素よりも、2～10,000、5～10,000、10～5,000、50～5,000、50～500、2～500、5～500、5～200、5～100、または5～75倍多くの産物または全長産物を産生する。

20

30

#### 【0037】

1つの局面において、50において本発明の逆転写酵素は対照逆転写酵素（これは好ましくは対応する野生型逆転写酵素である）よりも、少なくとも25%多く、好ましくは少なくとも50%多く、およびより好ましくは少なくとも100%多くの核酸産物または全長産物を産生する。別の局面において、52.5において、本発明の逆転写酵素は、対照逆転写酵素と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍の量の核酸産物または全長産物を産生する。別の局面において、55において、本発明の逆転写酵素は、対照逆転写酵素と比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも75倍、少なくとも100倍の量の核酸産物または全長産物を産生する。このような比較は、好ましくは、同じ反応条件および温度の下でなされる。

40

#### 【0038】

本発明の改変または変異された逆転写酵素は、対応する改変または変異されていない逆

50

転写酵素と比較して、上昇した温度において耐熱性の増大を有し得る。それらはRNA鋳型の存在下または非存在下において耐熱性の増大を示し得る。ある例において、本発明の逆転写酵素は、RNA鋳型の存在下と非存在下の両方で耐熱性の増大を示し得る。当業者は、逆転写酵素が典型的にはRNA鋳型の存在下でより耐熱性であることを認識する。耐熱性の増大は、本発明の改変または変異された逆転写酵素の適切なパラメーターを、対応する改変または変異されていない逆転写酵素のそれらと比較することによって測定され得る。比較するための適切なパラメーターには、同じ温度において対応する改変または変異されていない逆転写酵素によって合成された産物および/または全長産物の量と比較した、上昇した温度において改変または変異された逆転写酵素によって合成された産物および/または全長産物の量、ならびに/あるいは、対応する改変または変異されていない逆転写酵素のそれと比較した、上昇した温度における改変または変異された逆転写酵素の上昇した温度における逆転写酵素活性の半減期が含まれるがこれらに限定されない。

10

#### 【0039】

本発明の改変または変異された逆転写酵素は、例えば、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、少なくとも約1.5倍（例えば、約1.5倍～約100倍、約1.5倍～約50倍、約1.5倍～約25倍、または約1.5倍～約10倍）の50における耐熱性の増大を有し得る。本発明の逆転写酵素は、例えば、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、少なくとも約10倍（例えば、約10倍～約100倍、約10倍～約50倍、約10倍～約25倍、または約10倍～約15倍）の50における耐熱性の増大を有し得る。本発明の逆転写酵素は、例えば、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、少なくとも約25倍（例えば、約25倍～約100倍、約25倍～約75倍、約25倍～約50倍、または約25倍～約35倍）の50における耐熱性の増大を有し得る。

20

#### 【0040】

本発明はまた、改変または変異された耐熱性逆転写酵素を意図し、ここで、この逆転写酵素は、例えば、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、52.2において約1.5倍より高い（例えば、約1.5倍～約100倍、約1.5倍～約50倍、約1.5倍～約25倍、または約1.5倍～約10倍）の耐熱性の増大を有する。本発明の逆転写酵素は、例えば、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、52.2において少なくとも約10倍（例えば、約10倍～約100倍、約10倍～約50倍、約10倍～約25倍、または約10倍～約15倍）の耐熱性の増大を有し得る。本発明の逆転写酵素は、例えば、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、52.2において少なくとも約25倍（例えば、約25倍～約100倍、約25倍～約75倍、約25倍～約50倍、または約25倍～約35倍）の耐熱性の増大を有し得る。

30

#### 【0041】

他の態様において、本発明は、耐熱性逆転写酵素を提供し、ここで、この逆転写酵素は、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、55において約1.5倍より高い（例えば、約1.5倍～約100倍、約1.5倍～約50倍、約1.5倍～約25倍、または約1.5倍～約10倍）の耐熱性の増大を有する。ある態様において、本発明の逆転写酵素は、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、55において少なくとも約10倍（例えば、約10倍～約100倍、約10倍～約50倍、約10倍～約25倍、または約10倍～約15倍）の耐熱性の増大を有し得る。ある態様において、本発明の逆転写酵素は、対応する変異または改変されていない逆転写酵素と比較して、55において少なくとも約25倍（例えば、約25倍～約100倍、約25倍～約75倍、約25倍～約50倍、または約25倍～約35倍）の耐熱性の増大を有し得る。

40

#### 【0042】

本発明は、逆転写酵素、このような酵素を含む組成物およびキット、ならびに逆転写酵素によって標識される核酸を調製する際に有用な方法を提供する。一般的に、本発明は、合成される標識される核酸分子への本発明のポリペプチド（例えば、上記に同定した1つまたはそれ以上の変異を有する逆転写酵素）の使用に関する。ある態様において、本発明のポリペプチドはヘテロ二量体であり得、より詳細には、HIV RTおよびASLV RTのような2

50

つのサブユニットの酵素（例えば、二量体）であり得る。ある態様において、本発明のポリペプチドは、シングルサブユニットの酵素（例えば、M-MLV逆転写酵素）であり得る。好ましくは、このような標識は、改変されたヌクレオチド（例えば、標識されたヌクレオチド、特に蛍光標識されたヌクレオチド、ヌクレオチドアナログなど）および1つまたはそれ以上の核酸鑄型（好ましくは、RNAおよび最も好ましくはmRNA）を含む。本発明に従って、1種またはそれ以上の鑄型のすべてまたは一部に相補的な1つまたはそれ以上の標識された核酸分子が合成される。標識された核酸分子は、好ましくは、合成される分子に取り込まれた1つまたはそれ以上の標識されたヌクレオチドを有し、および好ましい局面において、その標識は1つまたはそれ以上の蛍光標識である（これは同じかまたは異なり得る）。別の局面において、ヌクレオチドは、本発明の逆転写酵素を使用する核酸合成の間に使用されて、1つまたはそれ以上の鑄型のすべてまたは一部に相補的な1つまたはそれ以上の核酸分子を産生する。このような局面において、合成される核酸分子に取り込まれるこのようなヌクレオチドは、1種またはそれ以上の標識を含むように改変され得（取り込みの前または後で）、次いでこれが検出され得る。

#### 【0043】

本発明はまた、本発明における使用のための組成物に関し、このような組成物は、本発明の1つまたはそれ以上のポリペプチド（例えば、M-MLV RTのようなシングルサブユニットおよび/またはHIVおよびASLV RTのようなマルチサブユニット）を含み得る。このような組成物は、1種またはそれ以上のヌクレオチド、適切な緩衝液、および/または1種またはそれ以上のDNAポリメラーゼをさらに含み得る。本発明の組成物はまた、1種またはそれ以上のプライマーを含み得る。これらの組成物中の逆転写酵素は、好ましくはRNase H活性を有するか、またはRNase H活性が減少するかもしくは実質的に減少しており、および最も好ましくは、モロニー Maus 白血病ウイルス（M-MLV）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、ラウス関連ウイルス（RAV）逆転写酵素、骨髄芽球腫関連ウイルス（MAV）逆転写酵素、およびヒト免疫不全ウイルス（HIV）逆転写酵素、または他のASLV逆転写酵素からなる群より選択される酵素である。本発明の逆転写酵素は、1つまたはそれ以上のサブユニットから構成され得る（これらは同じかまたは異なり得る）。2つのサブユニットのRTが本発明の実施において使用される場合、このような酵素は、このようなサブユニットの種々の形態および組み合わせ（例えば、  
、  
、  
など）、およびこれらの変異体、改変体、または誘導体を含み得る。好ましい組成物において、逆転写酵素は、作用する濃度で存在する。

#### 【0044】

本発明はまた、1種またはそれ以上の核酸分子および/または標識された核酸分子を作製するための方法に関する。1種またはそれ以上の核酸鑄型（好ましくは1種またはそれ以上のRNA、および最も好ましくは1種またはそれ以上のメッセンジャーRNA鑄型）を、逆転写酵素活性を有する本発明の1種またはそれ以上のポリペプチドと混合する段階、およびその混合物を、1種またはそれ以上の核酸鑄型のすべてまたは一部に相補的な第1の核酸分子を合成するのに十分な条件下でインキュベートする段階を含み、ここで、上記少なくとも1つの上記合成された分子は任意に標識され、および/または1つまたはそれ以上の標識されたヌクレオチドを含み、ならびに/あるいは、ここで上記合成された分子は任意に1つまたはそれ以上の標識を含むように改変され得る。好ましい態様において、1つまたはそれ以上の核酸分子は、一本鎖cDNA分子である。本発明のこの局面に従う逆転写酵素のために適切な核酸鑄型には、任意の核酸分子または核酸分子の集団（好ましくはRNA、および最も好ましくはmRNA）、特に細胞または組織由来のものが含まれる。好ましい局面において、mRNA分子の集団（典型的には細胞または組織から得られる、多数の異なるmRNA分子）は、本発明に従って、標識されたcDNAを作製するために使用される。核酸鑄型の好ましい供給源には、ウイルス、ウイルス感染した細胞、細菌細胞、真菌細胞、植物細胞、および動物細胞が含まれる。

#### 【0045】

本発明はまた、1つまたはそれ以上の二本鎖核酸分子（これらは任意に選択され得る）

を作製するための方法に関する。このような方法は、以下の段階を含む：(a)1種またはそれ以上の核酸鋳型（好ましくは、RNAまたはmRNA、およびより好ましくはmRNA鋳型の集団）を、逆転写酵素活性を有する本発明の1種またはそれ以上のポリペプチドと混合する段階；(b)その1種またはそれ以上の鋳型のすべてまたは一部に相補的である1種またはそれ以上の第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段階；および(c)1種またはそれ以上の第1の核酸分子に相補的な1種またはそれ以上の第2の核酸分子を作製するのに十分な条件下でその1種またはそれ以上の第1の核酸分子をインキュベートし、それによって第1の核酸分子および第2の核酸分子を含む1種またはそれ以上の二本鎖核酸分子を形成する段階。本発明に従って、第1の核酸分子および/または第2の核酸分子は標識されてもよい（例えば、1つもしくはそれ以上の同じかもしくは異なる標識されたヌクレオチドを含んでもよく、および/または同じかもしくは異なる標識を含むように改変されてもよい）。このように、標識されたヌクレオチドは、一方または両方の合成段階の使用を含んでもよい。このような方法は、1種またはそれ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種またはそれ以上のDNAポリメラーゼの使用を含んでもよい。本発明はまた、このような二本鎖核酸分子を作製するために有用な組成物に関する。このような組成物は、1種またはそれ以上の本発明の逆転写酵素、および任意に、1種またはそれ以上のDNAポリメラーゼ、適切な緩衝液、および/または1種またはそれ以上のヌクレオチド（好ましくは標識されたヌクレオチドを含む）を含む。

10

## 【0046】

本発明はまた、上記の方法に従って産生された核酸分子および/または標識された核酸分子（好ましくは、一本鎖または二本鎖のcDNA分子）、ならびにこれらの核酸分子を含むキットに関する。このような分子またはキットは、核酸分子を検出するために（例えば、ハイブリダイゼーションによって）または診断目的のために使用され得る。

20

## 【0047】

本発明はまた、本発明の方法における使用のためのキットに関する。このようなキットは、核酸分子および/または標識された核酸分子（一本鎖または二本鎖）を作製するために使用され得る。本発明のキットは、厳重な密封でそこに1つまたはそれ以上の容器（例えば、バイアル、チューブ、ボトルなど）を有するキャリア（例えば、ボックスまたはカートン）を含み得る。本発明のキットにおいて、第1の容器は、1種もしくはそれ以上の本発明の逆転写酵素、または本発明の1つもしくはそれ以上の組成物を含み得る。本発明のキットはまた、同じかまたは異なる容器中に、1種またはそれ以上のDNAポリメラーゼ（好ましくは、耐熱性DNAポリメラーゼ）、核酸合成のために適切な緩衝液、および1種またはそれ以上のヌクレオチドから選択される少なくとも1つの成分を含み得る。代替として、キットの成分は、別々の容器に分けられてもよい。1つの局面において、本発明のキットは、RNase H活性を有するか、またはRNase活性が低下しているかもしくはRNase H活性が実質的に低下している（すなわち、RNase H活性を欠くかまたは検出可能なRNase H活性を有しない）逆転写酵素を含む。このようなRTは、好ましくは、M-MLV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、RAV逆転写酵素、MAV逆転写酵素、およびHIV逆転写酵素からなる群より選択される。本発明のさらに好ましいキットにおいて、容器中の酵素（例えば、逆転写酵素および/またはDNAポリメラーゼ）は作用する濃度で存在する。

30

40

## 【0048】

特定の態様において、本発明の逆転写酵素は、M-MLV逆転写酵素、HIV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、および/またはRSV逆転写酵素を含まない可能性がある。従って、例えば、ある態様において、本発明は、HIV逆転写酵素でない、耐熱性が増大した逆転写酵素に関する。他の態様において、本発明は、M-MLV逆転写酵素でない、耐熱性が増大した逆転写酵素に関する。さらに他の態様において、本発明は、AMV逆転写酵素でない、耐熱性が増大した逆転写酵素に関する。さらに他の態様において、本発明は、RSV逆転写酵素でない、耐熱性が増大した逆転写酵素に関する。

## 【0049】

本発明はまた、本発明の逆転写酵素変異体または改変された逆転写酵素をコードする遺

50

伝子または核酸分子を含む核酸分子(例えば、ベクター)(またはポリメラーゼ活性を有する断片を含むこれらの断片)およびこのようなDNAまたは他の核酸分子を含む宿主細胞に関する。関心対象の遺伝子または核酸分子を発現するために、原核細胞および真核細胞を含む任意の数の宿主細胞を使用することができる。特定の態様において、本発明の逆転写酵素を発現するために原核細胞が用いられる。本発明との使用に適した原核生物宿主の一例は、大腸菌である。本発明との使用に適した真核生物宿主の例として、菌類細胞(例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)細胞、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)細胞など)、植物細胞、および動物細胞(例えば、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)細胞、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)Sf9およびSf21細胞、トリコプルサハイファイブ(*Trichoplusia High-Five*)細胞、線虫(*C.elegans*)細胞、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)細胞、CHO細胞、COS細胞、VERO細胞、BHK細胞など)が挙げられる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、野生型の細胞もしくは生物または組換え細胞もしくは生物でもよいこれらが発現する細胞または生物から精製および/または単離してもよい。いくつかの態様において、こ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されうる。

10

**【 0 0 5 0 】**

本発明はまた、本発明の逆転写酵素を生成する方法であり、以下の段階を含む方法に関する：

- (a)本発明の逆転写酵素をコードする遺伝子または他の核酸分子を含む宿主細胞を培養する段階(好ましくは、このような逆転写酵素の遺伝子または他の核酸分子は宿主細胞内においてベクターに含まれる)；
- (b)該遺伝子または該核酸分子を発現させる段階；および
- (c)該逆転写酵素を単離または精製する段階。

20

**【 0 0 5 1 】**

本発明はまた、1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など)核酸分子を作製する方法であり、以下の段階を含む方法に関する：1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など)核酸鋳型(好ましくは、1つまたはそれ以上のRNA鋳型、最も好ましくは、1つまたはそれ以上のメッセンジャーRNA鋳型もしくはメッセンジャーRNA鋳型の集団)と1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、15など)本発明の逆転写酵素を混合する段階；および1つまたはそれ以上の核酸鋳型の全てまたは一部と相補的な1つまたはそれ以上の第1の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階。ある態様において、混合物は高温、すなわち37℃を上回る温度でインキュベートされる。特定の態様において、高温は、約40℃以上、約45℃以上、約50℃以上、約51℃以上、約52℃以上、約53℃以上、約54℃以上、約55℃以上、約56℃以上、約57℃以上、約58℃以上、約59℃以上、約60℃以上、約61℃以上、約62℃以上、約63℃以上、約64℃以上、約65℃以上、約66℃以上、約67℃以上、約68℃以上、約69℃以上、約70℃以上、約71℃以上、約72℃以上、約73℃以上、約74℃以上、約75℃以上、約76℃以上、約77℃以上、または約78℃以上からの温度でもよい。高温は、

30



約 40°C ~ 約 45°C, 約

40°C ~ 約 48°C, 約 40°C ~ 約 50°C, 約 40°C ~

約 52°C, 約 40°C ~ 約 55°C, 約 40°C ~ 約 58°C,

約 40°C ~ 約 60°C, 約 40°C ~ 約 65°C, 約

42°C ~ 約 45°C, 約 42°C ~ 約 48°C, 約 42°C ~

約 50°C, 約 42°C ~ 約 52°C, 約 42°C ~ 約 55°C,

約 42°C ~ 約 58°C, 約 42°C ~ 約 60°C, 約

42°C ~ 約 65°C, 約 45°C ~ 約 48°C, 約 45°C ~

約 50°C, 約 45°C ~ 約 52°C, 約 45°C ~ 約 55°C,

約 45°C ~ 約 58°C, 約 45°C ~ 約 60°C, 約

45°C ~ 約 65°C, 約 48°C ~ 約 50°C, 約 48°C ~

約 52°C, 約 48°C ~ 約 55°C, 約 48°C ~ 約 58°C,

約 48°C ~ 約 60°C, 約 48°C ~ 約 65°C, 約

50°C ~ 約 52°C, 約 50°C ~ 約 55°C, 約 50°C ~

約 58°C, 約 50°C ~ 約 60°C, 約 50°C ~ 約 65°C,

約 52°C ~ 約 55°C, 約 52°C ~ 約 58°C, 約

52°C ~ 約 60°C, 約 52°C ~ 約 65°C, 約 55°C ~

約 58°C, 約 55°C ~ 約 60°C, 約 55°C ~ 約 65°C,

約 55°C ~ 約 70°C, 約 58°C ~ 約 60°C, 約

58°C ~ 約 65°C, 約 58°C ~ 約 70°C

10

20

30

の範囲内の温度でもよい。高温は、約37 ~ 約75、約40 ~ 約75、約45 ~ 約75、約50 ~ 約75、約51 ~ 約75、約52 ~ 約75、約53 ~ 約75、約54 ~ 約75、約55 ~ 約75の温度範囲でもよい。他の態様において、高温は、約50 ~ 約70、約51 ~ 約70、約52 ~ 約70、約53 ~ 約70、約54 ~ 約70、約55 ~ 約70、約56 ~ 約65、約56 ~ 約64、または約56 ~ 約62の範囲内でもよい。他の態様において、高温は、約46 ~ 約60、約47 ~ 約60、約49 ~ 約60、約51 ~ 約60、約53 ~ 約60、または約54 ~ 約60の範囲内でもよい。さらなる特定の態様において、第1の核酸分子は一本鎖cDNAである。本発明はさらに、上記の方法によって調製された核酸分子、ならびにこのような方法において使用され、およびこのような方法によって形成された反応混合物をさらに含む。インキュベーションのためのこのような条件には、1つもしくはそれ以上の緩衝液もしくは緩衝剤の塩、1つもしくはそれ以上のプライマー（例えば、オリゴdTプライマー）、および/または1つもしくはそれ以上のオリゴヌクレオチド（例えば、1つまたはそれ以上のヌクレオシド三リン酸）が含まれてもよい。本発明はまた、1つまたはそれ以上のプライマー、1つまたはそれ以上のヌクレオチド、および1つまたはそれ以上の適切な緩衝液からなる群より選択される1つまたはそれ以上の成分を含む1つまたはそれ以上の核酸分子を作製するための組成物に関する。

40

【 0 0 5 2 】

本発明のこの局面による逆転写に適した核酸鋳型として、任意の核酸分子または核酸分子の集団（好ましくはRNA、最も好ましくはmRNA）、特に、細胞または組織に由来する核酸分子が挙げられる。特定の局面において、本発明に従ってcDNAライブラリーを作製するた

50

めにmRNA分子の集団(多数の異なるmRNA分子、一般的に、特定の細胞または組織タイプから得られる)が用いられる。核酸鋳型の細胞供給源の例として、細菌細胞、菌類細胞、植物細胞、および動物細胞が挙げられる。

# 【 0 0 5 3 】

本発明はまた、1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など)二本鎖核酸分子を作製する方法に関する。このような方法は、以下の段階を含む:(a)1つまたはそれ以上の核酸鋳型(好ましくは、RNAまたはmRNA、より好ましくは、mRNA鋳型の集団)と1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、15など)本発明の逆転写酵素を混合する段階;(b)1つまたはそれ以上の鋳型の全てまたは一部と相補的な1つまたはそれ以上の第1の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階;および(c)1つまたはそれ以上の第1の核酸分子の全てまたは一部と相補的な1つまたはそれ以上の第2の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、1つまたはそれ以上の第1の核酸分子をインキュベートし、それによって第1の核酸分子および第2の核酸分子を含む1つまたはそれ以上の二本鎖核酸分子を形成する段階。ある態様において、段階(b)のインキュベーションは高温で行われる。いくつかの態様においては、条件は標識されたヌクレオチド使用を含んでも良く、二重鎖核酸分子を標識してもよい。特定の態様において、高温は、約40 以上、約45 以上、約50 以上、約51 以上、約52 以上、約53 以上、約54 以上、約55 以上、約56 以上、約57 以上、約58 以上、約59 以上、約60 以上、約61 以上、約62 以上、約63 以上、約64 以上、約65 以上、約66 以上、約67 以上、約68 以上、約69 以上、約70 以上、約71 以上、約72 以上、約73 以上、約74 以上、約75 以上、約76 以上、約77 以上、または約78 以上からの温度でもよい。高温は、

約 40°C ~ 約 45°C, 約

40°C ~ 約 48°C, 約 40°C ~ 約 50°C, 約 40°C ~

約 52°C, 約 40°C ~ 約 55°C, 約 40°C ~ 約 58°C,

約 40°C ~ 約 60°C, 約 40°C ~ 約 65°C, 約

42°C ~ 約 45°C, 約 42°C ~ 約 48°C, 約 42°C ~

約 50°C, 約 42°C ~ 約 52°C, 約 42°C ~ 約 55°C,

約 42°C ~ 約 58°C, 約 42°C ~ 約 60°C, 約

42°C ~ 約 65°C, 約 45°C ~ 約 48°C, 約 45°C ~

約 50°C, 約 45°C ~ 約 52°C, 約 45°C ~ 約 55°C,

約 45°C ~ 約 58°C, 約 45°C ~ 約 60°C, 約

45°C ~ 約 65°C, 約 48°C ~ 約 50°C, 約 48°C ~

約 52°C, 約 48°C ~ 約 55°C, 約 48°C ~ 約 58°C,

約 48°C ~ 約 60°C, 約 48°C ~ 約 65°C, 約

50°C ~ 約 52°C, 約 50°C ~ 約 55°C, 約 50°C ~

約 58°C, 約 50°C ~ 約 60°C, 約 50°C ~ 約 65°C,

約 52°C ~ 約 55°C, 約 52°C ~ 約 58°C, 約

52°C ~ 約 60°C, 約 52°C ~ 約 65°C, 約 55°C ~

約 58°C, 約 55°C ~ 約 60°C, 約 55°C ~ 約 65°C,

約 55°C ~ 約 70°C, 約 58°C ~ 約 60°C, 約

58°C ~ 約 65°C, 約 58°C ~ 約 70°C

10

20

30

40

50

の範囲内の温度でもよい。高温は、約37 ~ 約75、約40 ~ 約75、約45 ~ 約75、約50 ~ 約75、約51 ~ 約75、約52 ~ 約75、約53 ~ 約75、約54 ~ 約75、約55 ~ 約75の温度範囲でもよい。他の態様において、高温は、約50 ~ 約70、約51 ~ 約70、約52 ~ 約70、約53 ~ 約70、約54 ~ 約70、約55 ~ 約70、約56 ~ 約65、約56 ~ 約64、または約56 ~ 約62の範囲内でもよい。他の態様において、高温は、約46 ~ 約60、約47 ~ 約60、約49 ~ 約60、約51 ~ 約60、約53 ~ 約60、または約54 ~ 約60の範囲内でもよい。このような条件は1つまたはそれ以上の適した緩衝液または緩衝塩、1つまたはそれ以上のプライマー（オリゴdTプライマーなど）、および1つまたはそれ以上のヌクレオチドの使用を含んでもよい。このような方法は、1つまたはそれ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つまたはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など）DNAポリメラーゼの使用を含んでもよい。このようなDNAポリメラーゼは、好ましくは、耐熱性DNAポリメラーゼであり、最も好ましくは、DNAポリメラーゼを用いて達成される核酸合成は高温（すなわち、37を超える温度）で行われる。本発明はまた、このような二本鎖核酸分子の作製に有用な組成物に関する。このような組成物は、1つもしくはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20など）本発明の逆転写酵素、選択的に、1つもしくはそれ以上のDNAポリメラーゼ、適切な緩衝液、1つもしくはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など）プライマー、および/または1つもしくはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5など）ヌクレオチドを含む。本発明は上記の方法によって調整された核酸分子、およびこのような方法で生成されたまたは生成された反応混合物をさらに含む。

#### 【0054】

本発明はまた核酸分子を増幅する方法に関する。このような増幅方法は、前記のように生成された1つまたはそれ以上の二本鎖核酸分子と1つまたはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など）DNAポリメラーゼ（好ましくは、耐熱性DNAポリメラーゼ）を混合する段階、および二本鎖核酸分子を増幅するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階を含む。第1の態様において、本発明は核酸分子を増幅する方法であり、以下の段階を含む方法に関する：(a) 1つまたはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20など）核酸鋳型（好ましくは、1つまたはそれ以上のRNAまたはmRNA鋳型、最も好ましくは、mRNA鋳型の集団）と、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素と、1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼを混合する段階、および(b) 1つまたはそれ以上の鋳型の全てまたは一部と相補的な核酸分子を増幅するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階。ある態様において、段階(b)のインキュベーションは高温で行われる。特定の態様において、高温は、約40以上、約45以上、約50以上、約51以上、約52以上、約53以上、約54以上、約55以上、約56以上、約57以上、約58以上、約59以上、約60以上、約61以上、約62以上、約63以上、約64以上、約65以上、約66以上、約67以上、約68以上、約69以上、約70以上、約71以上、約72以上、約73以上、約74以上、約75以上、約76以上、約77以上、または約78以上からの温度でもよい。高温は、

約 40°C ~ 約 45°C, 約  
 40°C ~ 約 48°C, 約 40°C ~ 約 50°C, 約 40°C ~  
 約 52°C, 約 40°C ~ 約 55°C, 約 40°C ~ 約 58°C,  
 約 40°C ~ 約 60°C, 約 40°C ~ 約 65°C, 約  
 42°C ~ 約 45°C, 約 42°C ~ 約 48°C, 約 42°C ~  
 約 50°C, 約 42°C ~ 約 52°C, 約 42°C ~ 約 55°C,  
 約 42°C ~ 約 58°C, 約 42°C ~ 約 60°C, 約  
 42°C ~ 約 65°C, 約 45°C ~ 約 48°C, 約 45°C ~  
 約 50°C, 約 45°C ~ 約 52°C, 約 45°C ~ 約 55°C,  
 約 45°C ~ 約 58°C, 約 45°C ~ 約 60°C, 約  
 45°C ~ 約 65°C, 約 48°C ~ 約 50°C, 約 48°C ~  
 約 52°C, 約 48°C ~ 約 55°C, 約 48°C ~ 約 58°C,  
 約 48°C ~ 約 60°C, 約 48°C ~ 約 65°C, 約  
 50°C ~ 約 52°C, 約 50°C ~ 約 55°C, 約 50°C ~  
 約 58°C, 約 50°C ~ 約 60°C, 約 50°C ~ 約 65°C,  
 約 52°C ~ 約 55°C, 約 52°C ~ 約 58°C, 約  
 52°C ~ 約 60°C, 約 52°C ~ 約 65°C, 約 55°C ~  
 約 58°C, 約 55°C ~ 約 60°C, 約 55°C ~ 約 65°C,  
 約 55°C ~ 約 70°C, 約 58°C ~ 約 60°C, 約  
 58°C ~ 約 65°C, 約 58°C ~ 約 70°C

10

20

30

の範囲内の温度でもよい。高温は、約37 ~ 約75、約40 ~ 約75、約45 ~ 約75、約50 ~ 約75、約51 ~ 約75、約52 ~ 約75、約53 ~ 約75、約54 ~ 約75、約55 ~ 約75 の範囲内でもよい。他の態様において、高温は、約50 ~ 約70、約51 ~ 約70、約52 ~ 約70、約53 ~ 約70、約54 ~ 約70、約55 ~ 約70、約56 ~ 約65、約56 ~ 約64、または約56 ~ 約62 の範囲内でもよい。他の態様において、高温は、約46 ~ 約60、約47 ~ 約60、約49 ~ 約60、約51 ~ 約60、約53 ~ 約60、または約54 ~ 約60 の範囲内でもよい。

#### 【 0 0 5 5 】

好ましくは、本発明の、本発明の方法で使用される、および/または本発明の組成物中に存在する逆転写酵素は、(1)RNaseH活性が低下しているか、もしくは実質的に低下している、(2)TdT活性が低下しているか、もしくは実質的に低下している、および/または(3)増大した忠実度を示す。好ましくは、本発明で使用されるDNAポリメラーゼは、3'エキソヌクレアーゼ活性を有する第1のDNAポリメラーゼ、および実質的に低下した3'エキソヌクレアーゼ活性を有する第2のDNAポリメラーゼを含んでもよい。本発明は上記の方法で調整された核酸分子をおよびそのような方法で使用または作製された反応混合物をさらに含む。

40

#### 【 0 0 5 6 】

本発明はまた、増幅反応に使用するための1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素および1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼを含む組成物に関する。このような組成物は、さらに、1つもしくはそれ以上のヌクレオチドおよび/または増幅に適した緩衝液を含んで

50

もよい。本発明の組成物はまた、1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含んでもよい。本発明の組成物は上記の方法で調整された核酸分子およびそのような方法で使用または作製された反応混合物をさらに含んでもよい。

【0057】

本発明はまた、前記の方法に従って生成された核酸分子(特に、一本鎖もしくは二本鎖cDNA分子)または増幅された核酸分子、およびこれらの核酸分子または増幅された核酸分子を含むベクター(特に、発現ベクター)に関する。

【0058】

本発明は、さらに、前記の核酸分子、増幅された核酸分子、またはベクターを含む組換え宿主細胞に関する。このような宿主細胞の例として、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、  
10 ならびに動物細胞(昆虫細胞および哺乳動物細胞を含む)が挙げられる。

【0059】

本発明は、さらに、本発明の方法によって生成される核酸分子によりコードされるポリペプチドを生成する方法を目的とする。このような方法は、前記の組換え宿主細胞を培養する段階およびコードされるポリペプチドを単離する段階を含む方法を含む。本発明はさらに、このような方法によって生成されたポリペプチドを含む。

【0060】

本発明はまた、本発明の組成物または酵素を用いて1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など)核酸分子を配列決定する方法に関する。このような方法は、(a)配列決定しようとする1つまたはそれ以上の核酸分子(例えば、1つまたはそれ以上のRN  
20 AまたはDNA分子)と、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素、および任意で1つまたはそれ以上のヌクレオチド、および1つまたはそれ以上の反応停止薬剤(例えば、1つまたはそれ以上のジデオキシヌクレオシド三リン酸および1つまたはそれ以上のプライマー)を混合する段階;(b)配列決定しようとする1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30、50、100、200など)核酸分子の全てまたは一部と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、混合物をインキュベートする段階;および(c)核酸分子の集団を分離して、配列決定しようとする1つまたはそれ以上の核酸分子の全てまたは一部のヌクレオチド配列を決定する段階。このような方法はまた、(a)配列決定しようとする核酸分子(例えば、1つまたはそれ以上のRNAまたはDNA分子)と、1つまたはそれ以上のプライマー、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素、1つまたはそれ以上のヌクレ  
30 オチド、および1つまたはそれ以上の反応停止薬剤(例えば、1つまたはそれ以上のジデオキシヌクレオシド三リン酸)を混合する段階;(b)配列決定しようとする核酸分子の全てまたは一部と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、混合物をインキュベートする段階;および(c)核酸分子の集団の一員を分離して、配列決定しようとする核酸分子の全てまたは一部のヌクレオチド配列を決定する段階を含んでもよい。ある態様において、このようなインキュベーションは、本明細書に記載のように高温で行うことができる。本発明はさらに上記の方法によって作成された配列データを含み、またそのような配列データを作成する方法、ならびにそのような方法で使用および作製される反応混合物を含む。

【0061】

本発明はまた、本発明の方法において使用するためのキットに関する。このようなキットは、好ましくは本明細書に記載の高温で、核酸分子(一本鎖または二本鎖)を作製、配列決定、または増幅するのに使用することができる。本発明のキットは、1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など)容器(例えば、バイアル、チューブ、瓶など)が密に閉じ込められている運搬装置(例えば、ボックスまたはカートン)を含んでもよい。本発明のキットにおいて、第1の容器は、本発明の逆転写酵素の1つまたはそれ以上を含む。本発明のキットはまた、同じ容器または異なる容器に、1つまたはそれ以上のDNAポリ  
40 メラーゼ(好ましくは、耐熱性DNAポリメラーゼ)、核酸合成のための1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など)適切な緩衝液、1つまたはそれ以上のヌクレ  
50 オチド、および1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15など)オリゴヌ

クレオチドプライマーを含んでもよい。または、キットの成分を別々の容器に分けてもよい(例えば、それぞれの酵素および/または成分について1つの容器)。本発明のキットはまた、本発明の方法を実施するための説明書またはプロトコールを含んでもよい。本発明の好ましいキットにおいて、逆転写酵素はRNaseH活性が低下しているか、または実質的に低下しており(またはRNase H活性を欠いているもしくはRNase H活性の検出が不可能である)、最も好ましくは、M-MLV RNaseH-逆転写酵素、RSV RNaseH-逆転写酵素、AMV RNaseH-逆転写酵素、RAV RNaseH-逆転写酵素、MAV RNaseH-逆転写酵素、およびHIV RNaseH-逆転写酵素からなる群より選択される。本発明の他の好ましいキットにおいて、逆転写酵素は、本明細書の他の場所に記載のようにTdT活性が低下しているか、もしくは実質的に低下しており、および/または増大した忠実度を示す。

10

**【0062】**

本発明のさらなる好ましいキットにおいて、容器内の酵素(逆転写酵素および/またはDNAポリメラーゼ)は作用濃度で存在する。

**【0063】**

従って、本発明は、さらに、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素を含む、核酸分子の逆転写、増幅、または配列決定に使用するためのキットに関する。

**【0064】**

上記に示されるように、本発明のキットは、本発明の方法を実施するための任意の数の種々の成分を含み得る。このような成分の1つの例は、本発明の方法を実行するための説明書である。このような説明書の例には、キットを使用して、1種またはそれ以上の本発明の逆転写酵素を使用して核酸分子を増幅するための方法を実行するように個人に指示するものが含まれる。

20

**【0065】**

当業者は、これらの説明書の全文がキットとともに含まれる必要はないことを認識している。本発明のキットがこのような全長の説明書を含んでいない状況の1つの例は、キットを使用するための説明書をどこで得るべきかをキットを使用する個人に情報を与える指針が提供される場合である。このように、本発明の方法を実行するための説明書は、インターネットウェブページから、別個に販売されるかまたは配布されるマニュアルまたは他の製品文献などから入手されてもよい。このように、本発明は、キットのユーザーに、彼らが直接的にパッケージされていない、および/またはキットとともに配布されていない説明書を見い出すことができる場所に方向付けるキットを含む。これらの説明書は、電子的形態または印刷された形態を含むがこれらに限定されない、任意の形態であり得る。

30

**【0066】**

特定の態様において、本発明のキットの逆転写酵素は、以下からなる群より選択されるアミノ酸に対応する位置に1つまたはそれ以上の改変または変異を有してもよい:

- (a)M-MLV逆転写酵素のロイシン52;
- (b)M-MLV逆転写酵素のチロシン64;
- (c)M-MLV逆転写酵素のリジン152;
- (d)M-MLV逆転写酵素のアルギニン204;
- (e)M-MLV逆転写酵素のメチオニン289;
- (f)M-MLV逆転写酵素のスレオニン306;および
- (g)M-MLV逆転写酵素のフェニルアラニン309。

40

**【0067】**

本発明の逆転写酵素は、本明細書記載の特性を1つまたは組み合わせて有する任意の逆転写酵素を含む。このような特性には向上した耐熱性、減少もしくは消失したRNase H活性、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性、および/または増大した忠実度が含まれるがこれらに限定されない。このような逆転写酵素として、レトロウイルス逆転写酵素、細菌逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素(例えば、Ty1および/またはTy3レトロトランスポゾンの逆転写酵素)、ならびに逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼが挙げられる。好ましい本発明の逆転写酵素として、シングルサブユニットお

50

よびマルチサブユニット逆転写酵素、好ましくは、レトロウイルス逆転写酵素が挙げられる。特に、本発明は、M-MLV-逆転写酵素ならびにASLV-逆転写酵素(例えば、AMV-RTおよびRSV-RT)に関する。このような本発明の逆転写酵素は、好ましくは、低下した、実質的に低下した、または検出不能なRNaseH活性を有する。

【0068】

本発明の以下の図面および説明ならびに特許請求の範囲を考慮すれば、本発明の他の態様は当業者に明らであろう。

【0069】

発明の詳細な説明

以下の説明では、組換えDNA、ウイルス学、および免疫学において用いられる多くの用語が用いられる。このような用語に与えられる範囲を含めて、明細書および特許請求の範囲をはっきりとかつ首尾一貫して理解できるようにするために、以下の定義が示される。

【0070】

クローニングベクター

本明細書で使用する「クローニングベクター」は、宿主細胞内で自律複製することができ、1つまたは少数の認識配列(例えば制限エンドヌクレアーゼ認識部位、組換え部位、トポイソメラーゼ認識部位など)によって特徴付けられる核酸分子(例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、または他の核酸分子)を意味する。認識部位で、このような核酸配列は決まったやり方で操作することができ、関心対象の核酸セグメントを複製およびクローニングするために、これにDNAを挿入することができる。クローニングベクターは、さらに、クローニングベクターで形質転換された細胞の同定での使用に適したマーカーを含んでもよい。マーカーは、例えば、認識可能な表現型を、このようなマーカーが発現される宿主細胞に付与する遺伝子である。一般的に用いられるマーカーとして、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性などの抗生物質耐性遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

発現ベクター

本明細書で使用する「発現ベクター」は、クローニングベクターに似ているが、宿主細胞への形質転換後に、クローニングされた遺伝子または他の核酸分子の発現を増強および/または制御することができる核酸配列をさらに含み得る核酸分子を意味する。さらなる核酸配列は、プロモーター配列、リプレッサー結合配列などを含んでもよい。クローニングされた遺伝子または核酸分子は、通常、このような制御配列(例えば、プロモーター配列)の1つまたはそれ以上(例えば、1、2、3、4など)に機能的に連結されている。

【0072】

組換え宿主

本明細書で使用する「組換え」は、例えば、発現ベクター、クローニングベクター、または任意の核酸分子に、望ましいクローニングされた遺伝子または核酸分子を含む任意の原核生物または真核生物または微生物を意味する。用語「組換え宿主」はまた、宿主染色体またはゲノムに、望ましい遺伝子または他の核酸分子を含むように遺伝子操作されている宿主細胞を含むことが意図される。

【0073】

宿主

本明細書で使用する「宿主」は、複製可能な発現ベクター、クローニングベクター、または任意の核酸分子のレシピエントである任意の原核生物または真核生物を意味する。核酸分子は、構造遺伝子、プロモーターおよび/または複製起点を含んでもよいが、これらに限定されない。

【0074】

プロモーター

本明細書で使用する「プロモーター」は、一般的に遺伝子の5'領域と呼ばれ、遺伝子または他の核酸配列の転写を指向することができる開始コドンに近接して位置する核酸配列

10

20

30

40

50

を意味する。プロモーター領域で、隣接する1つまたはそれ以上の遺伝子または核酸の転写が開始する。

【0075】

遺伝子

本明細書で使用する「遺伝子」は、ポリペプチドまたはタンパク質の発現に必要な情報を含む核酸配列を意味する。遺伝子は、プロモーターおよび構造遺伝子ならびにタンパク質発現に関与する他の配列を含む。

【0076】

構造遺伝子

本明細書で使用する「構造遺伝子」は、メッセンジャーRNAに転写され、次いで、特定のポリペプチドの特徴を示すアミノ酸配列に翻訳されるDNAまたは他の核酸配列を意味する。

【0077】

機能的に連結された

本明細書で使用する「機能的に連結された」は、構造遺伝子または他の核酸分子によりコードされるポリペプチドの発現の開始に影響を及ぼすように核酸エレメントが配置されていることを意味する。

【0078】

発現

本明細書で使用する「発現」は、遺伝子または他の核酸分子がポリペプチドを生じるプロセスを意味する。これは、遺伝子または核酸分子のメッセンジャーRNA(mRNA)への転写およびこのようなmRNAの1またはそれ以上のポリペプチドへの翻訳を含む。

【0079】

実質的に純粋な

本明細書で使用する「実質的に純粋な」は、望ましい物質が、自然状態では望ましい物質に結合している汚染細胞成分を本質的に含まないことを意味する。好ましい局面において、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、より好ましくは5%以下、およびさらにより好ましくは1%以下の汚染細胞成分を有する。別の局面において、本発明の逆転写酵素は、200単位の逆転写酵素がタンパク質ゲル（例えば、SDS-PAGE）上で泳動され、Comassie blueで染色されたときに検出可能なタンパク質汚染成分を有さない。汚染細胞成分として、ホスファターゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、または望ましくないDNAポリメラーゼ酵素などの酵素活性を挙げることができるが、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。

【0080】

実質的に単離された

本明細書で使用する「実質的に単離された」は、本発明のポリペプチドが、自然状態で、および/または組換え宿主中で本発明のポリペプチドに結合しているかもしれない汚染タンパク質を本質的に含まないことを意味する。1つの局面において、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、より好ましくは5%以下、およびさらにより好ましくは1%以下の汚染タンパク質を有する。別の局面において、本発明の実質的に単離されたポリペプチドの試料中で、試料中のタンパク質の75%以上（好ましくは、80%、85%、90%、95%、98%、または99%以上）が、本発明の望ましい逆転写酵素である。試料中の汚染タンパク質および/または関心対象のタンパク質のパーセンテージは、当技術分野において公知の技術を使用して、例えば、タンパク質ゲル（例えば、SDS-PAGE）を使用すること、およびそのゲルをタンパク質色素（例えば、Comassie blue、銀染色、アミドブラックなど）で染色することによって決定してもよい。別の局面において、本発明の逆転写酵素は、200単位の逆転写酵素がタンパク質ゲル（例えば、SDS-PAGE）上で泳動され、Comassie blueで染色されたときに検出可能なタンパク質汚染成分を有さない。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 8 1 】

## プライマー

本明細書で使用する「プライマー」は、DNA分子の増幅または重合の間にヌクレオチドモノマーの共有結合によって伸長される一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。

## 【 0 0 8 2 】

## 鋳型

本明細書で使用する用語「鋳型」は、増幅、コピー、または配列決定しようとする二本鎖または一本鎖の核酸分子を意味する。二本鎖DNA分子の場合、これらの分子を増幅、コピー、または配列決定する前に、一本鎖である第1鎖および第2鎖を形成するために二本鎖の変性を行ってもよい。核酸鋳型の一部と相補的なプライマーを適切な条件下でハイブリダイズさせ、次いで、本発明の逆転写酵素などの核酸ポリメラーゼがヌクレオチドモノマーをプライマーに付加し、それによって鋳型またはその一部と相補的な核酸分子が合成される。本発明によって新たに合成された核酸分子は元の鋳型と同じでもよく、それより短くてもよい。新たに合成された核酸分子の合成または伸長の間のミスマッチ取り込みは、1つまたは多数のミスマッチ塩基対をもたらすことがある。従って、合成された核酸分子は鋳型に正確に相補的である必要はない。

## 【 0 0 8 3 】

## 取り込み

本明細書で使用する用語「取り込む」は、核酸分子またはプライマーの一部になることを意味する。

## 【 0 0 8 4 】

## オリゴヌクレオチド

「オリゴヌクレオチド」は、あるヌクレオチドの五単糖の3'位と隣接するヌクレオチドの五単糖の5'位との間のホスホジエステル結合によって結合されたヌクレオチドの共有結合配列を含む合成または天然の分子を意味する。

## 【 0 0 8 5 】

## ヌクレオチド

本明細書で使用する「ヌクレオチド」は、塩基-糖-リン酸の組み合わせを意味する。ヌクレオチドは核酸配列(DNAおよびRNA)のモノマー単位である。用語ヌクレオチドは、リボヌクレオチド三リン酸ATP、UTP、CTG、GTP、およびデオキシリボヌクレオチド三リン酸(例えば、dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、またはその誘導体)を含む。このような誘導体として、例えば、[ S]dATP、7-デアザ-dGTPおよび7-デアザ-dATP、ならびにこれらを含む核酸分子にヌクレアーゼ耐性を与えるヌクレオチド誘導体が挙げられる。本明細書で使用する用語ヌクレオチドはまた、ジデオキシリボヌクレオチド三リン酸(ddNTP)およびその誘導体を意味する。ジデオキシリボヌクレオチド三リン酸の例示の例として、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、およびddTTPが挙げられるが、これらに限定されない。本発明によれば、「ヌクレオチド」は標識されなくてもよく、周知の技法によって検出可能に標識されてもよい。検出可能となるように標識として、例えば、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、および酵素標識が挙げられる。ヌクレオチドの蛍光標識には、以下が含まれ得るがこれらに限定されない：フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、ローダミン、6-カルボキシローダミン(R6G)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、4-(4'ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸(DABCYL)、カスケードブルー、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアニン、および5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)。蛍光標識ヌクレオチドの特定の例には以下が挙げられる：Perkin Elmer, Foster City, CAから市販されている

[R6G]dUTP,  
 [TAMRA]dUTP, [R110]dCTP, [R6G]dCTP, [TAMRA]dCTP, [JOE]ddATP,  
 [R6G]ddATP, [FAM]ddCTP, [R110]ddCTP, [TAMRA]ddGTP,  
 [ROX]ddTTP, [dR6G]ddATP, [dR110]ddCTP, [dTAMRA]ddGTP, および  
 [dROX]ddTTP

; Amersham Arlington Heights, ILから市販されているFluoroLinkデオキシヌクレオチド、FluoroLink Cy3-dCTP, FluoroLink Cy5-dCTP, FluoroLink FluorX-dCTP, FluoroLink Cy3-dUTP, およびFluoroLink Cy5-dUTP; Boehringer Mannheim Indianapolis, INから市販されているフルオレセイン-15-dATP, フルオレセイン-12-dUTP, テトラメチル-ローダミン-6-dUTP, IR<sub>770</sub>-9-dATP, フルオレセイン-12-ddUTP, フルオレセイン-12-UTP, およびフルオレセイン-15-2'-dATP; ならびにMolecular Probes, Eugene, ORから市販されているChromaTide Labeled Nucleotides, BODIPY-FL-14-UTP, BODIPY-FL-4-UTP, BODIPY-TMR-14-UTP, BODIPY-TMR-14-dUTP, BODIPY-TR-14-UTP, BODIPY-TR-14-dUTP, カスケードブルー-7-UTP, カスケードブルー-7-dUTP, フルオレセイン-12-UTP, フルオレセイン-12-dUTP, オレゴングリーン488-5-dUTP, ローダミンググリーン-5-UTP, ローダミンググリーン-5-dUTP, テトラメチルローダミン-6-UTP, テトラメチルローダミン-6-dUTP, テキサスレッド-5-UTP, テキサスレッド-5-dUTP, およびテキサスレッド-12-dUTP.

【 0 0 8 6 】

#### プローブ

用語プローブは、1つまたはそれ以上の検出可能なマーカ―または標識によって検出可能に標識される一本鎖または二本鎖の核酸分子またはオリゴヌクレオチドをいう。このような標識またはマーカ―は、同じであってもまたは異なってもよく、放射活性標識および酵素標識を含んでもよいが、1つまたはそれ以上の蛍光標識（これは同じであるかまたは異なる）が、本発明に従って好ましい。プローブは、ハイブリダイゼーションによる核酸分子の検出において特定の有用性を有し、従って、診断アッセイにおいて使用され得る。

【 0 0 8 7 】

#### ハイブリダイゼーション

本明細書で使用するハイブリダイゼーション(ハイブリダイズする)は、二本鎖分子を生じるための2つの相補的な一本鎖核酸分子(RNAおよび/またはDNA)の対形成を意味する。当業者が理解するように、2つの核酸分子は塩基対形成が完全に相補的でなくてもハイブリダイズすることができる。従って、当技術分野において周知の適切な条件が用いられれば、ミスマッチ塩基は2つの核酸分子のハイブリダイゼーションを妨げない。

【 0 0 8 8 】

#### 耐熱性逆転写酵素

本開示のために、耐熱性逆転写酵素は、熱処理後に、野生型の耐熱性を有する逆転写酵素が同一の処理後に保持するより大きな割合または量の活性を保持する逆転写酵素を含む。従って、耐熱性が増大/向上した逆転写酵素は、耐熱性について野生型である逆転写酵素の活性を低下させるのに十分な熱処理後の耐熱性が増大した(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倍を超える、より好ましくは約10倍を超える、さらにより好ましくは約50倍を超える、さらにより好ましくは約100倍を超える、さらにより好ましくは約500倍を超える、最も好ましくは約1000倍を超える)活性を保持する)逆転写酵素として定義してもよい。好ましくは、耐熱性の相対的な向上または増大を確かめるために、本発明の逆転写酵素変異体または改変された逆転写酵素は、対応する改変されていない逆転写酵素または野生型逆転写酵素と比較される。例えば、52 で5分間の熱処理後に、耐熱性逆転写酵素は、熱処理前に存在していた活性の約90%を保持してもよいが、耐熱性について野生型である逆転写酵素は

最初の活性の10%を保持してもよい。同様に、53 で5分間の熱処理後に、耐熱性逆転写酵素は最初の活性の約80%を保持してもよいが、耐熱性について野生型である逆転写酵素の活性は測定不可能であってもよい。同様に、50 で5分間の熱処理後に、耐熱性逆転写酵素は、最初の活性の約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%を保持してもよいが、耐熱性について野生型である逆転写酵素の活性は測定不可能であってもよく、最初の活性の10%、15%、または20%を保持してもよい。最初の例において(すなわち、52 で5分間の熱処理後)、耐熱性逆転写酵素は、野生型逆転写酵素より耐熱性が9倍であると言われる。逆転写酵素の耐熱性を測定するのに使用することができる条件の例を以下、例えば実施例に示す。

【0089】

10

逆転写酵素の耐熱性は、熱処理に供された(すなわち、52 で、ある特定の時間(例えば、5分間)インキュベートされた)逆転写酵素試料の残留活性と、室温で、熱処理と同じ時間の長さでインキュベートされた同じ逆転写酵素の対照試料を比較することによって決定することができる。一般的に、残留活性は、相補的なオリゴヌクレオチド鋳型を用いた、オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーへの放射性標識デオキシリボヌクレオチドの取り込みを追跡することによって測定することができる。例えば、逆転写酵素の残留活性を確かめるために、ポリ(リボC)鋳型を用いて逆転写酵素が[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-dGTPをオリゴdGプライマーに取り込む能力をアッセイしてもよい。

【0090】

20

別の局面において、本発明の耐熱性逆転写酵素は、対応する野生型の、変異されていない、または改変されていない逆転写酵素と比較して高い温度で不活化される任意の逆転写酵素を含む。好ましくは、本発明の耐熱性逆転写酵素の不活化温度は、対応する野生型の、変異されていない、または改変されていない逆転写酵素の不活化温度より約2 ~ 約50 (例えば、約2 、約4 、約5 、約8 、約10 、約12 、約14 、約16 、約18 、約20 、約24 、約26 、約28 、約30 、約33 、約35 、約38 、約40 、約42 、約44 、約46 、約48 、または約50 )高い。より好ましくは、本発明の逆転写酵素の不活化温度は、同じ条件下で比較した場合、対応する野生型の、変異されていない、または改変されていない逆転写酵素の不活化温度より約5 ~ 約50 、約5 ~ 約40 、約5 ~ 約30 、または約5 ~ 約25 高い。

【0091】

30

対応する野生型の、変異されていない、または改変されていない逆転写酵素と比較した本発明の逆転写酵素の不活化温度の差は、このような逆転写酵素の試料をある特定の時間、異なる温度で処理し、次いで、試料が熱処理された後に、残留逆転写酵素活性をもしあれば測定することによって決定することができる。試験逆転写酵素と野生型の、変異されていない、または改変されていない対照と比較した不活化温度の差すなわち は、それぞれの逆転写酵素が不活化される(すなわち、残留逆転写酵素活性が、使用された特定のアッセイにおいて測定することができない)温度の差を比較することによって決まる。認知されているように、試験される任意の逆転写酵素の不活化温度の差すなわち を決定するために、任意の数の逆転写酵素アッセイを使用することができる。

【0092】

40

別の局面において、本発明の逆転写酵素の耐熱性は、関心対象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決定され得る。このような半減期は、半減期の違い(すなわち、デルタ)を決定するために対照または野生型逆転写酵素と比較され得る。本発明の逆転写酵素の半減期は、好ましくは、高温で(例えば、37 より高温で)、好ましくは、40 ~ 80 の範囲、より好ましくは45 ~ 75 、50 ~ 70 、50 ~ 65 、および50 ~ 60 の範囲の温度で決定される。本発明の逆転写酵素の好ましい半減期は、使用される温度に依存して、4分間~10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時間の範囲であり得る。例えば、本発明の逆転写酵素の逆転写酵素活性は、48 、50 、52 、52.5 、55 、57 、60 、62 、65 、68 、および/または70 の温度において、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

50

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10分間、少なくとも11分間、少なくとも12分間、少なくとも13分間、少なくとも14分間、少なくとも15分間、少なくとも20分間、少なくとも25分間、少なくとも30分間、少なくとも40分間、少なくとも50分間、少なくとも60分間、少なくとも70分間、少なくとも80分間、少なくとも90分間、少なくとも100分間、少なくとも115分間、少なくとも125分間、少なくとも150分間、少なくとも175分間、少なくとも200分間、少なくとも225分間、少なくとも250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。

#### 【0093】

末端伸長活性

10

本明細書で使用する末端伸長活性は、逆転写酵素(RT)が、DNAまたはmRNA鋳型の5'末端を越えて、新たに合成されたcDNA鎖の3'末端にさらなる塩基を付与する能力を意味する。末端伸長活性は(ヌクレオチドの偏りによって)特異的に塩基を付加してもよく、ランダムに塩基を付加してもよい。

#### 【0094】

末端伸長活性はまた、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)活性とも知られる。TdT活性が低下した逆転写酵素は、対応する野生型の、変異されていない、または改変されていない酵素のTdT比活性より低いTdT比活性(例えば、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約90%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約85%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約80%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約75%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約50%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約25%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約15%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約10%未満、対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約5%未満、または対応する野生型の、変異されていない、もしくは改変されていない酵素のTdT比活性の約1%未満)を有する任意の逆転写酵素と定義される。実質的に低下したTdT活性を有する本発明の逆転写酵素は、対応する野生型またはTdT<sup>+</sup>逆転写酵素の比活性と比較したTdT比活性のレベルが30%またはそれよりも低い逆転写酵素を意味する。TdT活性が無いことは、本明細書の実施例3に示されるアッセイ法によって検出することができない活性レベルと定義される。

20

30

#### 【0095】

以下の実施例3に示すように、鋳型(例えば、RNAまたはDNA鋳型)の末端を過ぎて核酸分子を2~3ヌクレオチド伸長する逆転写酵素が当技術分野において周知である。さらに、逆転写が起こるどれか1つの反応混合物において、鋳型末端を越えて伸長した異なる数のヌクレオチドを含む、分子の混合物が存在してもよい。本明細書では、TdT活性は、鋳型末端を越えて伸長した1つまたはそれ以上のヌクレオチドを含む分子の数または割合(%)に関して決定してもよい。例えば、野生型逆転写酵素が、逆転写の間に生成された分子の90%まで、鋳型末端を越えて1つまたはそれ以上のヌクレオチドを付加し、改変された逆転写酵素が、同じまたは類似する条件下で分子の45%まで、鋳型末端を越えて1つまたはそれ以上のヌクレオチドを付加した場合、改変された逆転写酵素は、野生型酵素と比較してTdT活性が50%減少したと言われる。さらに、DNAを鋳型として使用した場合に、SUPERScript(商標)IIによって示されたTdT活性の約0%を示し、RNAを鋳型として使用した場合に、SUPERScript(商標)IIによって示されたTdT活性の約10~20%を示す、M-MLV SUPERScript(商標)IIのF309N、T306K、H204R変異体が作製されている。

40

#### 【0096】

忠実度(fidelity)

忠実度は、重合の正確さ、すなわち、逆転写酵素が鋳型に相補的な核酸分子を合成する

50

時に、正しい基質(例えば、ヌクレオチド)と誤った基質を区別する能力を意味する。逆転写酵素の忠実度が高ければ高いほど、逆転写酵素が核酸合成間に成長鎖にヌクレオチドを誤って取り込む数は少なくなる。すなわち、忠実度の増大または向上は、誤り率が減少したか、または誤って取り込む率が減少した、より忠実な逆転写酵素をもたらす。

【0097】

増大した/向上した/より高い忠実度を有する逆転写酵素は、忠実度が増加した(好ましくは、所定の長さの任意の所定の核酸分子の合成の間に誤って取り込まれるヌクレオチドの数が、対照逆転写酵素と比較して、約1/10,000~約1/1.2、約1/10,000~約1/1.5、約1/5,000~約1/2、または約1/2000~約1/2に(好ましくは約1/5以下、より好ましくは約1/10以下、さらにより好ましくは約1/50以下、さらにより好ましくは約1/100以下、さらにより好ましくは約1/500以下、最も好ましくは約1/100以下に)減少した)ポリメラーゼと定義される。好ましくは、忠実度の相対的な向上または増加を確かめるために、本発明の逆転写酵素変異体または改変された逆転写酵素は、対応する改変されていない、または野生型の逆転写酵素と比較される。例えば、1000塩基の核酸分子セグメントの合成において、同じサイズのセグメントに10個のヌクレオチドを誤って取り込む変異されていない逆転写酵素と比較して、変異された逆転写酵素は1個のヌクレオチドを誤って取り込むことがある。このような逆転写酵素変異体は忠実度が10倍に増加したと言われる。

10

【0098】

忠実度はまた、以下の実施例5に記載のように、フレームシフトの発生の減少によって測定することができる。忠実度が増大した逆転写酵素は、対照逆転写酵素(例えば、対応する野生型および/または対応する非変異型もしくは未変性の逆転写酵素)と比較して、フレームシフトに関して忠実度が増大したポリメラーゼまたは逆転写酵素(例えば、フレームシフトに関して約1.2倍を超えて忠実度が増大した、フレームシフトに関して約1.5倍を超えて忠実度が増大した、フレームシフトに関して約5倍を超えて忠実度が増大した、フレームシフトに関して約10倍を超えて忠実度が増大した、フレームシフトに関して約20倍を超えて忠実度が増大した、フレームシフトに関して約30倍を超えて忠実度が増大した、またはフレームシフトに関して約40倍を超えて忠実度が増大した、逆転写酵素)と定義してもよい。

20

【0099】

フレームシフトに関して増大した/向上した/より高い忠実度を有する逆転写酵素はまた、忠実度が増大した(例えば、フレームシフトに関して忠実度が約1.5~約10,000倍、約2~約5,000倍、約2~約2000倍、約1.5~約40倍、約5~約40倍、約10~約40倍、約20~約40倍、約30~約40倍、約5~約30倍、約10~約30倍、約15~約30倍、約20~約30倍、約5~約20倍、約10~約20倍、約15~約20倍、約10~約100倍、約15~約100倍、約20~約100倍、約30~約100倍、または約50~約100倍増大した)逆転写酵素またはポリメラーゼと定義することができる。

30

【0100】

誤った取り込みが低下した逆転写酵素は、本明細書では、相対的な誤った取り込みが、対応する野生型の、変異されていない、または改変されていない酵素と比較して、約90%もしくは90%未満、約85%もしくは85%未満、約75%もしくは75%未満、約70%もしくは70%未満、約60%もしくは60%未満、または、好ましくは約50%もしくは50%未満、好ましくは約25%もしくは25%未満、より好ましくは約10%もしくは10%未満、最も好ましくは約1%もしくは1%未満である、変異または改変された逆転写酵素と定義される。

40

【0101】

逆転写酵素の忠実度または誤って取り込む率は、配列決定または当技術分野において周知の他の方法によって決定することができる(エッカー(Eckert)およびクンケル(Kunkel), 1990, Nucl. Acids Res. 18:3739-3744)。一例では、変異されていない逆転写酵素および変異された逆転写酵素によって合成されたDNA分子の配列を予想(既知)配列と比較することができる。このように、誤り(誤った取り込みまたはフレームシフト)の数を各酵素について決定し、比較することができる。別の例では、既知配列を有するDNA分子を配列決定

50

するために、変異されていない逆転写酵素および変異された逆転写酵素を使用してもよい。酵素の忠実度または誤った取り込みの率を決定するために、配列決定の誤り(誤った取り込みまたはフレームシフト)の数を比較することができる。忠実度または誤った取り込みの率を決定する他の手段として、以下で説明され、およびボイヤー(Boyer)J.C.ら, Methods Enzymol. 275:523(1996)に以前に述べられたような、RNA鋳型を用いたフォワード相補アッセイ(forward complementation assay)が挙げられ、実施例に示される。忠実度または誤った取り込みの率を決定する他の方法は当業者に理解されるだろう。

#### 【0102】

ストランドジャンピング(strand jumping)

本明細書で使用するストランドジャンピングは、逆転写酵素がmRNA鋳型上で1を超える(例えば、2、5、10、15、100など)ヌクレオチドを「飛ばして進む」ことによって引き起こされるランダム変異の一種を意味し、これによって、結果として生じるcDNAにおいて対応するヌクレオチドが欠失する。合成した核酸分子の配列決定および期待した配列との比較は、本発明の逆転写酵素のためのストランドジャンピングのレベルまたは量の決定を可能とする。このレベルまたは量はその後、対応する野生型および/または未変性もしくは非変異型の逆転写酵素により引き起こされるストランドジャンピングのレベルまたは量と比較しても良い。

#### 【0103】

ハンドドメイン

本明細書で使用するハンドドメインは、逆転写酵素の鋳型、プライマー、またはヌクレオチドの相互作用を制御する1つまたはそれ以上の領域にあるアミノ酸を意味する。このドメインは、さらに、逆転写酵素における二次構造の一群の3領域である、サム領域、フィンガー領域、パーム領域によって特徴付けられる。サム領域は、HIV逆転写酵素のアミノ酸240～315またはM-MLV逆転写酵素のアミノ酸280～355に存在すると定義される。フィンガー領域は、HIV逆転写酵素のアミノ酸1～85および120～154またはM-MLV逆転写酵素の1～124および161～193に存在すると定義される。パーム領域は、HIV逆転写酵素のアミノ酸86～199および155～239またはM-MLV逆転写酵素のアミノ酸126～160および193～279に存在すると定義される。これらの領域はおおまかに定義されており、N末端およびC末端を定義するアミノ酸はおおよそである。他の逆転写酵素についても、対応する領域を定義することができる。好ましい本発明の逆転写酵素は、ハンドドメイン内に1つまたはそれ以上の改変または変異を有する。より詳細には、本発明の逆転写酵素は、サム領域、フィンガー領域、およびパーム領域を含む1つまたはそれ以上の領域に1つまたはそれ以上の変異または改変を含む。

#### 【0104】

全長

本明細書で使用する全長は、産物分子、例えば、cDNA分子を記載するために使用される場合、産物分子が鋳型分子(例えば、本発明のポリペプチドの活性によってそこから産生されたmRNA分子)と同じ長さまたは実質的に同じ長さであることを示す。cDNA分子は、鋳型を逆転写するために使用されたプライマーの最も3'のヌクレオチドに対して3'に位置する鋳型の部分の長さの約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上である場合に、そこからコピーされた鋳型と同じ長さであり得る。このように、プライマーが鋳型の中心にアニールする場合、全長産物は鋳型の半分のcDNAコピーを含むものである。鋳型分子は、約100塩基～約50kb長、約200塩基～約50kb長、約300塩基～約50kb長、約400塩基～約50kb長、約500塩基～約50kb長、約600塩基～約50kb長、約700塩基～約50kb長、約800塩基～約50kb長、約900塩基～約50kb長、および約1kb～約50kb長であり得る。ある態様において、鋳型分子は、約500塩基～約10kb長、約600塩基～約10kb長、約700塩基～約10kb長、約800塩基～約10kb長、約900塩基～約10kb長、約1000塩基～約10kb長、約1100塩基～約10kb長、および/または約1200塩基～約10kb長であり得る。ある態様において、鋳型分子は、約250塩基～約5kb長、約300塩基～約5kb長、約350塩基～約5kb長、約400塩基～約5kb長、約450塩基～約5kb長、約500塩基～約5kb長、約550塩基～約5kb長

、約600塩基～約5kb長、約650塩基～約5kb長、約700塩基～約5kb長、約750塩基～約5kb長、約800塩基～約5kb長、および約850塩基～約5kb長であり得る。

【0105】

ある態様において、全長産物を合成する逆転写酵素の能力は、規定された鋳型およびプライマー（例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子に対応するポリアデニル化された鋳型およびオリゴ(dT)プライマー）を使用して、規定された反応条件（例えば、pH、塩濃度、二価金属濃度、鋳型濃度、温度など）の下で決定され得る。ある態様において、鋳型分子は、約500塩基対長よりも大きく、合成される全長産物の量は、切断された産物から全長産物を分離すること（例えば、ゲル電気泳動によって）、および全長産物を定量すること（例えば、産物に放射活性を取り込むことおよびシンチレーションカウンターを使用することによって）によって決定され得る。

10

【0106】

概要

一般的に、本発明は、逆転写酵素を耐熱性にする1つまたはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30など）変異または改変を有する逆転写酵素を含む、核酸分子の逆転写において使用するための組成物を一部提供する。本発明はまた、核酸分子の逆転写において使用するための組成物を提供し、本組成物は逆転写酵素を効率的にする1つもしくはそれ以上の変異または改変を有する、高い忠実度を有する、および/または対応する非変異型のもしくは未変性の逆転写酵素よりも低いTdT活性を有する逆転写酵素を含む。本発明は、さらに、逆転写酵素を耐熱性および/または対応する非変異型もしくは未変性の逆転写酵素よりも効率的にする1つまたはそれ以上の変異または改変を有する逆転写酵素を含む組成物を提供する。

20

【0107】

これらの組成物における酵素は、好ましくは、作用濃度で存在し、好ましくは、RNaseH活性も低下している、実質的に低下している、または消失している。または、本発明の組成物において用いられる逆転写酵素はRNaseH活性を有してもよい。好ましい逆転写酵素として、M-MLV逆転写酵素、HIV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、RAV逆転写酵素、およびMAV逆転写酵素、もしくは他のASLV逆転写酵素、またはこれらの対応するRNaseH-誘導体などのレトロウイルス逆転写酵素が挙げられる。本発明の組成物を調製するために使用することができるさらなる逆転写酵素として、細菌逆転写酵素（例えば、大腸菌逆転写酵素）（例えば、マオ(Mao)ら、Biochem.Biophys.Res.Commun.227:489-93(1996)を参照のこと）およびサッカロマイセス・セレビシエ逆転写酵素（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、クリストファリ(Cristofari)ら、Jour.Biol.Chem.274:36643-36648(1999)；ムレス(Mules)ら、Jour.Virol.72:6490-6503(1998)を参照のこと）が挙げられる。

30

【0108】

本発明によれば、任意の数の変異を逆転写酵素に生じさせることができ、好ましい局面において、耐熱性を増大させる、および/または本発明の逆転写酵素に他の所望の特性を与えるために複数の変異を生じさせることができる。このような変異としては、点変異、フレームシフト変異、欠失および挿入が挙げられ、1つまたはそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30など）点変異が好ましい。本発明の逆転写酵素への変異の導入は、当業者に周知の任意の方法を用いて行うことができる。変異は、例えば、二価金属イオン補助因子として用いられる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。または、ポリメラーゼ変異体を作製するために、コードDNA分子に沿って任意の決定された部位で塩基対変化の可能な全てのクラスを可能にするという効果がオリゴヌクレオチド特異的変異誘発を使用することができる。一般的に、この技法は、関心対象の逆転写酵素をコードする一本鎖ヌクレオチド配列に（1つまたはそれ以上のミスマッチを除く）相補的なオリゴヌクレオチドのアニーリングを伴う。次いで、ミスマッチオリゴヌクレオチドはDNAポリメラーゼによって伸長され、一方の鎖に望ましい配列変化を含む二本鎖DNA分子を生じる。配列変化は、例えば、アミノ酸の欠失、置換、ま

40

50

たは挿入をもたらすことができる。次いで、二本鎖ポリヌクレオチドを適切な発現ベクターに挿入し、従って、変異体ポリペプチドまたは改変されたポリペプチドを生成することができる。前記のオリゴヌクレオチド特異的変異誘発は、例えば、PCRを介して行うことができる。

#### 【0109】

本発明はまた、1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20など)核酸分子を逆転写する方法であり、以下の段階を含む方法に関する:1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20など)核酸鋳型(好ましくはRNA、またはメッセンジャーRNA(mRNA)、より好ましくはmRNA分子の集団)と、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素を混合する段階、および1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30など)鋳型の全てまたは一部と相補的な1つまたはそれ以上の核酸分子を作製するのに十分な条件下で混合物をインキュベートする段階。1つまたはそれ以上の鋳型に相補的な1つまたはそれ以上の核酸分子を作製するために、好ましくは、プライマー(例えば、オリゴ(dT)プライマー)および1つまたはそれ以上のヌクレオチドが5'から3'方向の核酸合成に用いられる。本発明のこの局面による逆転写に適した核酸分子として、任意の核酸分子(特に、原核細胞または真核細胞に由来する核酸分子)が挙げられる。このような細胞は、正常細胞、罹患細胞、形質転換細胞、株化細胞、始原細胞、前駆細胞、胎児細胞、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、植物細胞など、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、鳥類、魚類、昆虫など)から単離された組織を含んでもよい。逆転写に適した核酸分子はウイルスおよび/または様々な感染細胞から単離および/または得ることもできる。

#### 【0110】

本発明は、さらに、核酸分子と本発明の逆転写酵素を接触させる段階を含む、核酸分子を増幅または配列決定する方法を提供する。好ましいこのような方法は、1つまたはそれ以上のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む。

#### 【0111】

##### 逆転写酵素の供給源

本発明の組成物、方法、およびキットに使用するための酵素として、逆転写酵素活性を有する任意の酵素が挙げられる。このような酵素として、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、細菌逆転写酵素、Tth DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ(サイキ(Saiki), R.K.ら, Science 239:487-491(1988); 米国特許第4,889,818号および同第4,965,188号)、Tne DNAポリメラーゼ(PCT国際公開公報第96/10640号)、Tma DNAポリメラーゼ(米国特許第5,374,553号)、およびその変異体、断片、変種、または誘導体(例えば、その全体が参照として本明細書に引用される、権利者が同一の米国特許第5,948,614号および同第6,015,668号を参照のこと)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において使用するための逆転写酵素として、好ましくはM-MLV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、RAV逆転写酵素、MAV逆転写酵素、一般的に、ASLV逆転写酵素などのレトロウイルス逆転写酵素が挙げられる。当業者に理解されるように、改変された逆転写酵素は、かつ当技術分野において日常的かつ周知の組換えまたは遺伝子操作法によって得ることができる。逆転写酵素変異体は、例えば、部位特異的変異誘発またはランダム変異誘発によって、関心対象の逆転写酵素をコードする1つまたはそれ以上の遺伝子を変異させることによって得ることができる。このような変異は、点変異、欠失変異、および挿入変異を含んでもよい。例えば、本発明の逆転写酵素変異体を構築するために、1つまたはそれ以上の点変異(例えば、1つまたはそれ以上の異なるアミノ酸による1つまたはそれ以上のアミノ酸の置換)を使用することができる。

#### 【0112】

本発明は、さらに、野生型逆転写酵素(例えば、M-MLV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、HIV逆転写酵素など)とアミノ酸レベルで70%、75%、80%、85%、90%、95%、96



%、97%、98%、または99%同一であり、耐熱性が増大した、および/または本発明の所望の特性を示す逆転写酵素を含む。本発明は以下の表3に示したアミノ酸配列(配列番号:2)を含む逆転写酵素とアミノ酸レベルで70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であり、耐熱性が増大した、ならびに/またはより効率的な(例えば、忠実度が高いおよび/もしくはTdT活性が低い)逆転写酵素も含む。本発明はまた、前記の逆転写酵素をコードする核酸分子を含む。

#### 【0113】

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のアミノ酸残基を含み、逆転写酵素に関連する1つまたはそれ以上の活性を保持する逆転写酵素断片を含む。このような断片は、欠失変異によって、当技術分野において日常

10

#### 【0114】

本発明の逆転写酵素断片はまた、M-MLV逆転写酵素のアミノ酸1~10番目、11~20番目、21~30番目、31~40番目、41~50番目、51~60番目、61~70番目、71~80番目、81~90番目、91~100番目、101~110番目、111~120番目、121~130番目、131~140番目、141~150番目、151~160番目、161~170番目、171~180番目、181~190番目、191~200番目、201~210番目、211~220番目、221~230番目、231~240番目、241~250番目、251~260番目、261~270番目、271~280番目、281~290番目、291~300番目、301~310番目、311~320番目、321~330番目、331~340番目、341~350番目、351~360番目、361~370番目、371~380番目、381~390番目、391~400番目、401~410番目、411~420番目、421~430番目、431~440番目、441~450番目、451~460番目、461~470番目、471~480番目、481~490番目、491~500番目、501~510番目、511~520番目、521~530番目、531~540番目、および/または541~550番目、ならびにアミノ酸1番目~355番目、1番目~498番目、1番目~500番目、および/または1番目~550番目(およびより好ましくは、1つまたはそれ以上の本明細書記載の改変または変異を含みうる表3に示される配列)、ならびに他の逆転写酵素の対応する断片を含む。本発明の逆転写酵素断片は、さらに、前記の断片の1つまたはそれ以上と70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のポリペプチドを含む。本発明は、これらの断片の任意の数の様々な組み合わせにさらに関する。

20

30

#### 【0115】

例えば、参照アミノ酸配列と少なくとも70%「同一の」アミノ酸配列を有するタンパク質またはタンパク質断片によって、このタンパク質のアミノ酸配列は、参照タンパク質のアミノ酸配列の100アミノ酸ごとに30アミノ酸まで変化を含むことを除いて、参照配列と同一であることを意味する。言い換えれば、参照アミノ酸配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有するタンパク質を得るためには、参照配列のアミノ酸配列の30%までが欠失されてもよく、別のアミノ酸で置換されてもよく、または参照配列の総アミノ酸残基の30%までの多数のアミノ酸が参照配列に挿入されてもよい。参照配列のこれらの変化は、参照アミノ酸配列のアミノ(N)末端および/もしくはカルボキシ(C)末端の位置で、ならびに/またはこれらの末端の間の任意の位置で起こってもよく、また参照配列の残基間で個々におよび/もしくは参照配列内の1つまたはそれ以上の連続グループに点在してもよい。実際に、所定のアミノ酸配列が、例えば、参照タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラム(例えば、核酸配列同一性の決定について前述されたプログラム)を従来通りに用いて、またはCLUSTAL Wプログラム(トンブソン(Thompson), J.D.ら, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680(1994))を用いて確認することができる。

40

#### 【0116】

配列同一性は、参照配列または参照配列のサブ配列を試験配列に対して比較することによって決定され得る。参照配列および試験配列は、比較ウィンドウと呼ばれる任意の数の残基にわたって最適に整列される。最適なアラインメントを得るために、付加または欠失

50

(例えば、ギャップ)が試験配列に導入され得る。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決定すること、および比較ウィンドウ中の配列の全体の長さで一致する位置の数を除算し、100を掛けてパーセンテージを与えることによって決定される。一致する位置の数に加えて、ギャップの数およびサイズもまた、配列同一性パーセントを計算する際に考慮される。

#### 【0117】

配列同一性は、典型的には、コンピュータプログラムを使用して決定される。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であるBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラムである。このプログラムは、試験配列中のセグメントをデータベース中の配列に対して比較して、一致の統計学的な有意性を決定し、次いで、閾値レベルよりも有意な一致のみを同定および報告する。BLASTプログラムの適切なバージョンは、ギャップを可能にするもの(例えば、バージョン2.X)である(Altschul, ら, 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プログラムが使用され得る。問い合わせ配列が翻訳される、翻訳された問い合わせ検索、すなわち、ヌクレオチド配列からタンパク質(blastx)またはタンパク質から核酸配列(tblastn)もまた、ヌクレオチド問い合わせ配列が6つすべてのリーディングフレームにおけるタンパク質配列に翻訳され、次いで6つすべてのリーディングフレームにおいて翻訳されたNCBIヌクレオチドデータベースに対して比較される問い合わせ(tblastx)と同様に使用され得る。

#### 【0118】

本発明のタンパク質に対して配列同一性を有するタンパク質を同定するためのさらなる適切なプログラムには、PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST, Zhang, ら, Nucleic Acids Res. 26(17):3986-90, 1998) およびPSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST, Altschul, ら, 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。

#### 【0119】

プログラムはデフォルト検索パラメーターを用いて使用され得る。代替として、1つまたはそれ以上の検索パラメーターが調整され得る。適切な検索パラメーター値を選択することは、当業者の能力の範囲内である。

#### 【0120】

本発明において使用するための好ましい酵素として、RNase H活性が低下した、実質的に低下した、またはRNase H活性を欠いた酵素が挙げられる。RNase H活性が低下した、または実質的に低下した、このような酵素は、例えば、関心対象の逆転写酵素内のRNase Hドメインを変異させることによって(例えば、前記のような1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30など)点変異、1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30など)欠失変異、および/または1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30など)挿入変異を導入することによって)得ることができる。いくつかの態様において、本発明の逆転写酵素はRNase Hドメインの改変または変異を含まず、好ましくはRNase H活性を低下させる改変を含まない。ある局面において、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90%、95%、または100%のRNase H活性を有する。

#### 【0121】

「RNase H活性が実質的に低下した」酵素とは、この酵素が、対応する野生型またはRNase H<sup>+</sup>酵素(例えば、野生型モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLV)、鳥類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RNase H活性の約30%未満、約25%未満、約20%未満、より好ましくは約15%未満、約10%未満、約7.5%未満、または約5%未満、最も好ましくは約5%未満または約2%未満を有することを意味する。RNase H活性の低下は、例えば対応する野生型または非変性型もしくは未変性の逆転写酵素と比較した、活性における任意の低下を意味する。

## 【 0 1 2 2 】

RNase H活性が低下した、実質的に低下した、またはRNase H活性が検出できないもしくはRNase H活性を欠いている逆転写酵素は既に記述されている(米国特許第5,668,005号、米国特許第6,063,608号、およびPCT国際公開公報第98/47912号を参照のこと)。任意の酵素のRNase H活性が、様々なアッセイ(例えば、米国特許第5,244,797号、コテウィクツ(Kotewicz), M.L.ら, Nucl. Acids Res. 16:265(1988)、ジェラルド(Gerard), G.F.ら, FOCUS 14(5):91(1992)、PCT国際公開公報第98/47912号、および米国特許第5,668,005号に記載のアッセイ(これらの全ての開示を参照として本明細書に完全に引用する))によって決定することができる。1つまたはそれ以上の本記載のアッセイ法により検出可能なRNase H活性を有さないか、またはRNase H活性を欠いている逆転写酵素が特に好ましい。

10

## 【 0 1 2 3 】

本発明において使用するための特に好ましい酵素として、M-MLV RNaseH-逆転写酵素、R SV RNaseH-逆転写酵素、AMV RNaseH-逆転写酵素、RAV RNaseH-逆転写酵素、MAV RNaseH-逆転写酵素、およびHIV RNaseH-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、RNaseH活性が低下した、実質的に低下した、またはRNase H活性を欠いているリボ核酸分子から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酵素)任意の酵素を、本発明の組成物、方法、およびキットにおいて等しく使用できることは当業者に理解されると思われる。

## 【 0 1 2 4 】

本発明において使用するための酵素としては、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)活性が低下した、実質的に低下した、または無くなった酵素も挙げられる。ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性が低下した、もしくは実質的に低下した、またはTdT活性が無くなった、このような酵素は、例えば、鑄型-プライマーに近接する、または鑄型-プライマーと接触する、関心対象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(例えば、1つもしくはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30など)点変異、1つもしくはそれ以上の欠失変異、および/または1つもしくはそれ以上の挿入変異を導入することによって)得ることができる。減少したTdT活性を示す逆転写酵素は、2001年3月15日に出願された米国特許出願第09/808,124号(この全開示を参照として本明細書に引用する)に記載されており、M-MLV逆転写酵素のY64、M289、F309、T197、および/またはY133に等価な、またはこれらに対応するアミノ酸位置に1つまたはそれ以上の変化を有する逆転写酵素を含む。

20

30

## 【 0 1 2 5 】

1つの局面において、アミノ酸置換は、前記で特定された位置の1つまたはそれ以上で行われる(すなわち、M-MLV逆転写酵素のY64、M289、F309、T197、またはY133に等価な、またはこれらに対応するアミノ酸位置)。従って、これらの位置のアミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValを含む他の任意のアミノ酸で置換することができる。低下した、実質的に低下した、または消失したTdT活性を示す逆転写酵素の特定の例として、(1)位置309のフェニルアラニン残基がアスパラギンで置換されている、(2)位置197のスレオニン残基がアラニンもしくはグルタミン酸のいずれかで置換されている、および/または(3)位置133のチロシン残基がアラニンで置換されている、M-MLV逆転写酵素(例えば、SUPERScript(商標)II)が挙げられる。

40

## 【 0 1 2 6 】

本発明において使用するための酵素として、忠実度が増大した酵素も挙げられる。忠実度が増大した逆転写酵素は、2000年3月15日に出願された米国特許出願第60/189,454号および2001年3月15日に出願された米国特許出願第09/808,124号(これらそれぞれの全開示を参照として本明細書に引用する)に記載されており、以下の表2に示した位置に等価な、またはこれらに対応する位置での1つまたはそれ以上の変化を有する逆転写酵素を含む。

## 【 0 1 2 7 】

(表2)

50

RT	アミノ酸
M-MLV	Y64 ( <i>e.g.</i> , Y64W, Y64R), R116 ( <i>e.g.</i> , R116M), K152 ( <i>e.g.</i> , K152R), Q190 ( <i>e.g.</i> , Q190F), T197 ( <i>e.g.</i> , T197A, T197E), V223 ( <i>e.g.</i> , V223H, V223I, V223F), D124, H126, Y133 ( <i>e.g.</i> , Y133A, Y133H), F309 ( <i>e.g.</i> , F309N, F309R)
AMV	W25, R76, K110, Q149, T156, M182
RSV	W25, R76, K110, Q149, T156, M182
HIV	W24, R78, G112, Q151, A158, M184

10

## 【 0 1 2 8 】

本発明のある態様において、アミノ酸置換は、前記で特定された位置の1つまたはそれ以上で行われる。従って、これらの位置のアミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Arg、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValを含む他の任意のアミノ酸で置換することができる。忠実度が増大した逆転写酵素の特定の例としては、(1)223位のバリン残基がヒスチジン、フェニルアラニン、もしくはイソロイシンで置換されている、(2)116位のアルギニン残基がメチオニンで置換されている、(3)位置152のリジン残基がアルギニンで置換されている、(4)190位のグルタミン酸残基がフェニルアラニンで置換されている、(5)197位のスレオニン残基がアラニンもしくはグルタミン酸で置換されている、(6)309位のフェニルアラニン残基がアスパラギンもしくはアルギニンで置換されている、(7)133位のチロシン残基がヒスチジンもしくはアラニンで置換されている、および/または(8)64位のチロシン残基がトリプトファンもしくはアルギニンで置換されている、M-MLV逆転写酵素が挙げられる。

20

## 【 0 1 2 9 】

従って、特定の態様において、本発明は、耐熱性が増大し、選択的に、以下の特徴：(1) RNaseH活性が低下した、もしくは実質的に低下した、(2)TdT活性が低下した、もしくは実質的に低下した、および/または(3)忠実度が増大した1つまたはそれ以上も示す逆転写酵素を含む。

## 【 0 1 3 0 】

本発明はまた、逆転写酵素の認められた領域において変異または置換が行われている逆転写酵素変異体に関する。このような領域として、フィンガー領域、パーム領域、サム領域、ヘリックスH領域、シート10領域、および/またはシート11領域が挙げられるが、これらに限定されない。従って、本発明は、本明細書の他の場所に記載されるように増大した耐熱性(ならびに他の特性)を示し、ハンドドメインにおいて、より詳細にはフィンガー領域、パーム領域、および/またはサム領域を含む1つまたはそれ以上の領域において1つまたはそれ以上の(例えば、1、2、3、4、5、10、15など)変異または改変を有する逆転写酵素を含む。

30

## 【 0 1 3 1 】

本発明において使用するための逆転写酵素活性を有するポリペプチドは、天然タンパク質を単離および精製するための当業者に周知の標準的な手順に従って天然のウイルス供給源または細菌供給源から単離することができる(例えば、Houts, G.E. ら, J. Virol. 29:517(1979); 米国特許第5,668,005号; およびPCT国際公開公報第98/47912号を参照のこと)。さらに、逆転写酵素活性を有するポリペプチドは、当業者によく知られている組換えDNA技法によって調製することができる(例えば、(コテウィクツ(Kotewicz), M.L. ら, Nucl. Acids Res. 16:265(1988); ソルティス(Soltis), D.A., およびスカルカ(Skalka), A.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3372-3376(1988); 米国特許第5,668,005号; およびPCT国際公開公報第98/47912号を参照のこと)。

40

## 【 0 1 3 2 】

本発明の1つの局面において、逆転写酵素変異体または改変された逆転写酵素は組換え技法によって作製される。多くのクローニングされた逆転写酵素遺伝子が入手可能であり

50

、または標準的な組換え技法を用いて得ることができる(米国特許第5,668,005号およびPCT国際公開公報第98/47912を参照のこと)。

【0133】

本発明によって改変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を使用して、組換えDNAライブラリーを構築することができる。関心対象の逆転写酵素をクローニングするために、当技術分野において周知の任意のベクターを使用することができる。しかしながら、使用されるベクターは、組換えベクターが形質転換される宿主と適合しなければならない。

【0134】

プラスミドライブラリーを構築するための原核生物ベクターとしては、例えば、pBR322、ColE1、pSC101、pUCベクター(pUC18、pUC19など:「分子クローニング,実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1982);およびサンプルック(Sambrook)ら,「分子クローニング,実験マニュアル(第2版)」Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989))などの、大腸菌内で複製することができるプラスミドが挙げられる。パチルス属(*Bacillus*)プラスミドとしては、pC194、pUB110、pE194、pC221、pC217などが挙げられる。このようなプラスミドは、グリクザン(*Glyczan*), T. 分子生物学パチルス(*The Molecular Biology Bacilli*), Academic Press, York(1982), 307-329によって開示されている。適切なストレプトマイセス属(*Streptomyces*)プラスミドとしては、pIJ101(ケンダル(*Kendall*)ら, *J. Bacteriol.* 169:4177-4183(1987))が挙げられる。シュードモナス属(*Pseudomonas*)プラスミドは、ジョン(*John*)ら(*Rad. Insec. Dis.* 8:693-704(1986))およびイガキ(*Igaki*)(*Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742(1978))に概説されている。pCP13(ダージンズ(*Darzens*)およびチャクラバティ(*Chakrabarty*), *J. Bacteriol.* 159:9-18(1984))などの、広い宿主域のプラスミドまたはコスミドも本発明に使用することができる。本発明の遺伝子および核酸分子をクローニングするための好ましいベクターは原核生物ベクターである。好ましくは、本発明の遺伝子をクローニングするのにpBAD、pCP13およびpUCベクターが用いられる。他の適切なベクターは当業者には公知であり、例えばInvitrogen Corporation, Carlsbad, CAより市販されている。

【0135】

関心対象の逆転写酵素遺伝子および核酸分子をクローニングするための適切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、本発明の望ましい逆転写酵素遺伝子および核酸分子は、エシェリキア属(*Escherichia*)、パチルス属、ストレプトマイセス属、シュードモナス属、サルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)、およびプロテウス属(*Proteus*)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クローニングすることができる。特に関心のある細菌宿主としては、インビトロゲンコーポレーション(*Invitrogen Corporation.*)(Carlsbad, CA)から入手することができる大腸菌DH10Bが挙げられる。

【0136】

関心対象の逆転写酵素をクローニングおよび発現するための真核生物宿主としては、酵母細胞、菌類細胞、および哺乳動物細胞が挙げられる。このような真核細胞における望ましい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調節領域の使用を必要とする場合がある。周知の真核生物ベクター系を用いて周知の技法によって、真核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および発現を達成することができる。

【0137】

一旦、DNAライブラリーが特定のベクターに構築されたら、周知の技法によって適切な宿主を形質転換する。ペトリ皿一枚につき約200~300個の形質転換コロニーを生じる密度で、形質転換細胞をプレートする。次いで、逆転写酵素の選択のために、以下の実施例に記載のように、逆転写酵素または耐熱性逆転写酵素が発現しているかどうかコロニーをス

10

20

30

40

50

クリーニングする。簡単に述べると、個々の形質転換コロニーの一晩培養物を、標識デオキシヌクレオチドを用いて逆転写酵素もしくは耐熱性逆転写酵素活性および/または他の所望の活性について直接アッセイし、標識産物が存在するかどうか分析する。耐熱性逆転写酵素活性および/または他の所望の活性が検出されたら、どのアミノ酸が逆転写酵素活性を維持したかを確かめるために、変異体を配列決定する。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、当業者に周知の技法を用いてクローニングすることができる。

#### 【0138】

ポリメラーゼの改変または変異

本発明によれば、本発明に従って酵素の耐熱性を増大させるために、または本明細書に記載の他の特性を酵素に付与するために、任意の逆転写酵素において1つまたはそれ以上の変異を生じさせることができる。このような変異としては、点変異、フレームシフト変異、欠失、および挿入が挙げられる。好ましくは、耐熱性が向上または増大した逆転写酵素を生成するために、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換をもたらす1つまたはそれ以上の点変異が用いられる。本発明の好ましい局面において、関心対象の他の逆転写酵素において望ましい結果を生じるために、M-MLV逆転写酵素の位置H204(例えば、H204R)および/またはT306(例えば、T306KもしくはT306R)に等価な、またはこれらに対応する位置で1つまたはそれ以上の変異を生じさせることができる。

#### 【0139】

特定の態様において、望ましい結果(例えば、耐熱性の増大、忠実度の増大、TdT活性の減少など)を生じるために、M-MLV逆転写酵素の位置L52、Y64、R116、Y133、K152、Q190、T197、H204、V223、M289、T306および/またはF309に等価な、またはこれらに対応する位置で1つまたはそれ以上の変異を生じさせることができる。従って、特定の態様において、基準系としてM-MLV逆転写酵素のアミノ酸位置を用いて、本発明のタンパク質は、以下の変化:L52P、Y64S、Y64W、Y64R、R116M、Y133A、Y133H、K152R、K152M、Q190F、T197R、T197E、T197A、T197K、H204R、V223H、V223F、V223I、M289L、T306K、T306R、F309R、および/またはF309Nの1つまたはそれ以上を有する逆転写酵素(例えば、M-MLV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、HIV逆転写酵素、RSV逆転写酵素など)、ならびにこれらのタンパク質を含む組成物、これらのタンパク質をコードする核酸分子、ならびにこれらの核酸分子を含む宿主細胞を含む。

#### 【0140】

これらのタンパク質の耐熱性を変える、逆転写酵素における変異は、逆転写酵素に通常関連する活性(例えば、RNaseH活性、逆転写酵素活性またはポリメラーゼ活性、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdTase)活性など)にほとんど、もしくは全く影響を及ぼさない変化または逆転写酵素に通常関連する1つまたはそれ以上の活性を実質的に変える変化と共に存在してもよい。このような変異の組み合わせを有する逆転写酵素の一例は、以下の変化:K152M、V223Hを有するM-MLV逆転写酵素である。

#### 【0141】

SUPERSCRIPT(商標)II(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad, CA)カタログ番号18064-022)の忠実度を向上することが示されている1つの変異はV223Hである(2000年3月15日に出願された米国特許出願第60/189,454号、2001年3月15日に出願された米国特許出願第09/808,124号、およびPCT国際公開公報第01/68895号を参照のこと。これらのそれぞれの全開示を参照として本明細書に引用する)。しかしながら、V223H変化は、この酵素の耐熱性を減少させる。V223H変異を有する酵素の不安定作用を抑制する、1つの変異体K152Mが特定された。従って、本発明は位置K152およびV223に変化を含むM-MLV逆転写酵素を含み、忠実度と耐熱性の両方の増大を示す。このような逆転写酵素の特定の例は、K152がメチオニンで置換され、V223がヒスチジンで置換されている逆転写酵素である。対応する変化を有する他の逆転写酵素(例えば、AMV逆転写酵素、HIV逆転写酵素、RSV逆転写酵素など)もまた本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0142】

SUPERScript(商標)IIは、以下の置換:D524G、E562Q、およびD583Nを有するM-MLV由来RNaseH-逆転写酵素である(米国特許第5,017,492号、米国特許第5,244,797号、米国特許第5,405,776号、米国特許第5,668,005号、および米国特許第6,063,608号を参照のこと。これらの全開示を参照として本明細書に引用する)。本発明は、これらの参照位置(すなわち524、562、および/または583位)または等価位置のような変更を含む逆転写酵素を含む。

【0143】

関心対象の任意の逆転写酵素について1つまたはそれ以上のアミノ酸置換が1つまたはそれ以上の選択された位置で行われる。従って、選択された位置でのアミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValを含む他の任意のアミノ酸で置換することができる。ある好ましい態様において、選択されたアミノ酸は非荷電表面残基であり、荷電残基によって置換される。ある好ましい態様において、非荷電表面残基は、正に荷電したアミノ酸(例えば、リジンまたはアルギニン)で置換することができる。一つの局面において、変化した残基は変化していない残基により置き換えられる。他の局面において負に荷電した残基は正に荷電した残基により置き換えられ、および/または正に荷電した残基は負に荷電した残基により置き換えられる。

【0144】

他の逆転写酵素について、前記で特定されたM-MLV逆転写酵素の対応する位置は当業者によって容易に特定することができる。従って、本明細書に記載の特定された領域およびアッセイがあれば、当業者は、関心対象の任意の逆転写酵素の耐熱性を増大させる、および/または他の所望の特性をもたらす1つまたは多数の改変を加えることができる。本発明に従って改変される残基として、前記の表1に列挙された残基を挙げることができる。

【0145】

M-MLV逆転写酵素のヌクレオチド配列(シニック(Shinnick)ら,1981,Nature 293:543-548;ゲオルギアディス(Georgiadis)ら,1995,Structure 3:879-892)、AMV逆転写酵素のヌクレオチド配列(ジョリオット(Joliot)ら,1993,Virology 195:812-819)、RSV逆転写酵素のヌクレオチド配列(シュワルツ(Schwartz)ら,1983,Cell 32:853-859)、およびHIV逆転写酵素のヌクレオチド配列(ウォングスタール(Wong-Staal)ら,1985,Nature 313:277-284)が公知であり、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0146】

好ましくは、逆転写酵素変異体を作製するために、コードDNA分子に沿って任意の決定された部位で塩基対変化の全てのクラスを可能にするという効果があるオリゴヌクレオチド特異的変異誘発が用いられる。

【0147】

逆転写酵素の発現の向上

本発明の逆転写酵素の発現を最適化するために、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターが周知であり、組換え宿主において高レベルの逆転写酵素構造遺伝子を発現するのに使用することができる。同様に、高レベルの発現を達成するのに、当技術分野において周知の高コピー数ベクターを使用してもよい。誘導性の高コピー数を有するベクターもまた、組換え宿主において本発明の逆転写酵素の発現を向上させるのに有用な場合がある。

【0148】

望ましい構造遺伝子を原核細胞(例えば、大腸菌、枯草菌、シュドモナス属など)において発現させるためには、望ましい構造遺伝子を機能的な原核生物プロモーターに機能的に連結することが好ましい。しかしながら、逆転写酵素遺伝子の発現を可能にする、逆転写酵素遺伝子の天然プロモーターが原核生物宿主において機能する場合がある。従って、逆転写酵素遺伝子を発現させるために、天然プロモーターまたは他のプロモーターを使用してもよい。発現を向上させるのに使用することができる、このような他のプロモーターとしては、構成的または調節的(すなわち、誘導性の、もしくは活性化の)プロモーターが挙げられる。構成的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

ーおよびpBR322の $\phi$ -ラクタマーゼ遺伝子の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要な右および左プロモーター( $P_R$ および $P_L$ )、大腸菌のtrp、recA、lacZ、lacI、tet、gal、trc、ara BAD(ガズマン(Guzman)ら, 1995, J. Bacteriol. 177(14):4121-4130)およびtacプロモーターが挙げられる。枯草菌プロモーターとして $\phi$ -アミラーゼ(ウルマネン(Ulmanen)ら, J. Bacteriol. 162:176-182(1985))およびバチルス属バクテリオファージプロモーター(グリクザン(Gryczan), T., バチルス属の分子生物学(The Molecular Biology Of Bacilli), Academic Press, New York(1982))が挙げられる。ストレプトマイセス属プロモーターはワード(Ward)ら, Mol. Gen. Genet. 203:468478(1986)に述べられている。原核生物プロモーターはまた、グリック(Glick), J. Ind. Microbiol. 1:277-282(1987); セナチエムプト(Cenatiemto), Y., Biochimie 68:505-516(1986); およびゴッテスマン(Gottesman), Ann. Rev. Genet. 18:415-442(1984)に概説されている。原核細胞における発現はまた、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必要とする。このようなリボソーム結合部位は、例えば、ゴールド(Gold)ら, Ann. Rev. Microbiol. 35:365404(1981)に開示されている。

10

#### 【0149】

真核細胞における本発明のポリメラーゼの発現を向上させるために、周知の真核生物プロモーターおよび真核宿主を使用することができる。ポリメラーゼの発現の向上は原核生物宿主において達成することができる。本発明との使用に適した原核生物宿主の一例は大腸菌である。

20

#### 【0150】

逆転写酵素の単離および精製

本発明の1つまたはそれ以上の酵素は、好ましくは、望ましい逆転写酵素遺伝子を含み、発現する組換え宿主を培養において増殖させること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から単離することができる。逆転写酵素の断片もまた本発明に含まれる。このような断片は、逆転写酵素活性を有する1つまたはそれ以上のタンパク質分解断片を含む。このような断片はまた、関心対象の逆転写酵素遺伝子の一部をクローニングおよび発現させることによって、フレームシフト変異を作製することによって、ならびに/または短縮型のタンパク質もしくはポリペプチドの発現のために、関心対象の遺伝子中に1つまたはそれ以上の終止コドンが付加することによって、産生され得る。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(これらは野生型の細胞もしくは生物、または組換えの細胞もしくは生物であってもよい)から精製および/または単離され得る。ある態様において、このようなポリペプチドは、それらが発現されている細胞または生物から、実質的に単離されてもよい。

30

#### 【0151】

クローニングされた逆転写酵素遺伝子を含む宿主によって同化される任意の栄養分を培養培地に添加することができる。使用される株および培養培地の組成に応じて個別的に最適な培養条件を選択すべきである。発現させようとする望ましい遺伝子を含むベクターDNAの維持を確実なものにするために、抗生物質を増殖培地に添加することもできる。培地配合物は、DSMまたはATCCカタログならびにサンプルックら, 「分子クローニング, 実験マニュアル(第2版)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1989)に記載されている。

40

#### 【0152】

本発明の逆転写酵素を生成する組換え宿主細胞は、例えば、遠心分離によって、液体培養から分離することができる。一般的に、収集された微生物細胞を適切な緩衝液に分散させ、次いで、超音波処理によって、または緩衝液溶液による酵素の抽出を可能にする他の周知の手順によって破壊することができる。超遠心分離または遠心分離によって細胞破片を除去した後に、逆転写酵素を、標準的なタンパク質精製法(例えば、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動など)によって精製することができる。精製中の逆転写酵素の存在を検出するためのアッセイは当技術分野において

50



周知であり、これらの酵素の存在を確かめるために従来の生化学的精製法の間を使用することができる。

【 0 1 5 3 】

ある態様において、本発明の逆転写酵素は、逆転写酵素の精製を容易にするためにアフィニティタグを含むように改変することができる。適切なアフィニティタグは当業者に周知であり、6ヒスチジンなどのアミノ酸反復配列、ヘマグルチニンエピトープおよびmycエピトープなどのエピトープ、ならびに逆転写酵素の簡単な精製を可能にする他のアミノ酸配列を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 5 4 】

本発明はさらに、(1)逆転写酵素に付随する1つまたはそれ以上の活性を有するタンパク質またはその断片、および(2)タグ（例えば、アフィニティタグ）を含む融合タンパク質に関する。特定の態様において、本発明は、1つまたはそれ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8など）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、耐熱性逆転写酵素）を含む。これらのタグは、例えば、逆転写酵素に付随する1つまたはそれ以上の活性を有するタンパク質またはその断片の、(1)N末端、(2)C末端、または(3)N末端とC末端の両方に位置し得る。タグはまた、内部に位置し得る（例えば、逆転写酵素に由来するアミノ酸配列の領域間に、および/またはアミノ酸側鎖に結合される）。例えば、Fergusonら、Protein Sci. 7:1636-1638 (1998) は、Escherichia coliからの、アフィニティタグ（すなわち、ヘキサヒスチジン配列）が挿入されたヘモジデリン貪食細胞レセプター、FhuAを記載する。このタグは、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーを利用する精製プロトコールにおいて機能することが示された。内部タグを有するさらなる融合タンパク質は、米国特許第6,143,524号（その全体の開示が参照として本明細書に組み入れられる）に記載される。

【 0 1 5 5 】

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変化し得るが、典型的には、

約 5 ～ 約 500, 約 5 ～ 約 100,

約 10 ～ 約 100, 約 15 ～ 約 100, 約 20 ～

約 100, 約 25 ～ 約 100, 約 30 ～ 約 100

約 35 ～ 約 100, 約 40 ～ 約 100, 約 45 ～ 約 100,

約 50 ～ 約 100, 約 55 ～ 約 100, 約 60 ～ 約 100,

約 65 ～ 約 100, 約 70 ～ 約 100, 約 75 ～ 約 100,

約 80 ～ 約 100, 約 85 ～ 約 100,

約 90 ～ 約 100, 約 95 ～ 約 100, 約 5 ～ 約 80,

約 10 ～ 約 80, 約 20 ～ 約 80, 約 30 ～ 約 80,

約 40 ～ 約 80, 約 50 ～ 約 80, 約 60 ～ 約 80,

約 70 ～ 約 80, 約 5 ～ 約 60, 約 10 ～ 約 60,

約 20 ～ 約 60, 約 30 ～ 約 60, 約 40 ～ 約 60,

約 50 ～ 約 60, 約 5 ～ 約 40,

約 10 ～ 約 40, 約 20 ～ 約 40, 約 30 ～ 約 40,

約 5 ～ 約 30, 約 10 ～ 約 30, 約 20 ～ 約 30,

約 5 ～ 約 25, 約 10 ～ 約 25, または 約 15 ～ 約 25

のアミノ酸残基長である。

## 【 0 1 5 6 】

本発明の組成物を調製するために使用されるタグは、融合タンパク質の耐熱性に寄与するものを含む。従って、これらのタグは、少なくとも部分的に、増大した耐熱性を有する特定のタンパク質（例えば、1つまたはそれ以上の逆転写酵素活性を有するタンパク質）の原因であり得る。逆転写酵素（すなわちM-MLV逆転写酵素）の耐熱性を向上させるタグの例には、以下のアミノ酸配列：SEQ ID NO:2および表3に示される配列のアミノ酸1-32に対応する

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH

および

MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH, (SEQ ID NO:3)

を有するタグが含まれるがこれらに限定されない。これらのタグの断片（好ましくは、3以上、5以上、10以上、または15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され得る。このように、本発明は、部分的には、タグを含みかつ耐熱性の向上を実証する逆転写酵素またはその断片を含む。周知の方法を使用して、当業者は、1つまたはそれ以上の上述のタグを1つまたはそれ以上の、逆転写酵素活性を有するRT酵素またはその断片に結合させ、耐熱性RT酵素またはその断片を作製し得る。適切なRT酵素には以下が含まれるがこれらに限定されない：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、細菌逆転写酵素、Tth DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ（Saiki, R.K., ら, Science 239:487-491 (1988); 米国特許第4,889,818号および4,965,188号）、Tne DNAポリメラーゼ（PCT国際公開公報第96/10640号）、Tma DNAポリメラーゼ（米国特許第5,374,553号）およびそれらの変異体、断片、改変体、または誘導体（例えば、共有に係る米国特許第5,948,614号および6,015,668号（これらはその全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照されたい）。本発明における使用のための逆転写酵素はまた、M-MLV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、RAV逆転写酵素、MAV逆転写酵素、および一般的にASLV逆転写酵素のようなレトロウイルス逆転写酵素を含む。

## 【 0 1 5 7 】

本発明の実施において使用されるタグは、任意の数の目的のために働き得、および多数のタグが本発明の逆転写酵素に1つまたはそれ以上の異なる機能を与えるために付加され得る。例えば、タグは、(1)タンパク質の内部および他のタンパク質との両方のタンパク質-タンパク質相互作用に寄与し得、(2)タンパク質を特定の精製方法に対して使用可能にし得、(3)タンパク質が組成物中に存在するか否かを同定することを可能にし；または(4)タンパク質に他の特性を与え得る。

## 【 0 1 5 8 】

本発明の実施において使用され得るタグの例には、金属結合ドメイン（例えば、ポリヒスチジンセグメント（例えば、3、4、5、6、または7個のヒスチジン領域））、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、および/もしくはFcレセプター；ならびに/または(4)補体タンパク質（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）；および検出可能ドメイン（例えば、少なくとも一部の -ガラクトシダーゼ）が含まれる。融合タンパク質は、上記に記載されたもののような1つまたはそれ以上のタグを含み得る。典型的には、1つより多くのタグを含む融合タンパク質は、逆転写酵素の一方の末端または両方の末端（N末端およびC末端）にこれらのタグを含むが、1つまたはそれ以上のタグは、末端に存在するものの代わりに、またはそれに加えて、内部に位置し得る。さらに、1つより多くのタグが、逆転写酵素の一方の末端、内部、および/または両方の末端に存在し得る。例えば、3つの連続したタグが、逆転写酵素のN末端で、末端から末端に連結され得る。本発明はさらに、上記の融合タンパク質を含む組成物および反応混合物、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

10

20

30

40

50

ー)、およびこれらの核酸分子を含む組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、本明細書の別の箇所に記載されるようなこれらの融合タンパク質を使用するための方法を含む(例えば、核酸分子を逆転写するための方法)。

#### 【0159】

融合タンパク質が組成物中に存在しているか否かを同定することを可能にするタグには、例えば、電気泳動ゲル中でタンパク質を同定するために使用され得るタグが挙げられる。多数のタグが当該分野において公知であり、これらはウェスタンブロットのために使用され得るエピトープおよび抗体結合ドメインを含む。

#### 【0160】

本発明における使用のためのタグのアミノ酸組成は変動し得る。ある態様において、タグは、生理学的pHで正電荷を有する約1%~約5%のアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、およびヒスチジン)、または生理学的pHで正電荷を有する約5%~約10%のアミノ酸、または生理学的pHで正電荷を有する約10%~約20%のアミノ酸、または生理学的pHで正電荷を有する約10%~約30%のアミノ酸、または生理学的pHで正電荷を有する約10%~約50%のアミノ酸、または生理学的pHで正電荷を有する約10%~約75%のアミノ酸、を含み得る。ある態様において、タグは、生理学的pHで負電荷を有する約1%~約5%のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸)、または生理学的pHで負電荷を有する約5%~約10%のアミノ酸、または生理学的pHで負電荷を有する約10%~約20%のアミノ酸、または生理学的pHで負電荷を有する約10%~約30%のアミノ酸、または生理学的pHで負電荷を有する約10%~約50%のアミノ酸、または生理学的pHで正電荷を有する約10%~約75%のアミノ酸、を含み得る。ある態様において、タグは、同じかまたは異なっているいてもよく、および同じ電荷または異なる電荷であってもよい、2つまたはそれ以上の連続するアミノ酸を含むアミノ酸の配列を含み得る。例えば、タグは、一連の(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、10個など)の同じかまたは異なっているいてもよい正に荷電したアミノ酸を含んでいてもよい。タグは、一連の(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、10個など)の同じかまたは異なっているいてもよい負に荷電したアミノ酸を含んでいてもよい。ある態様において、タグは、一連の(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、10個など)の同じかまたは異なっているいてもよい、二者択一的な正に荷電したおよび負に荷電したアミノ酸(例えば、正荷電、負荷電、正荷電、負荷電など)を含んでいてもよい。上記に記載した一連のアミノ酸のいずれか(例えば、正荷電、負荷電、または二者択一的荷電)は、荷電したアミノ酸間に間隔を空けて配置される1つまたはそれ以上の中性極性アミノ酸または非極性アミノ酸を含み得る。このような中性アミノ酸は一連の荷電したアミノ酸を通して均一に分布され得(例えば、荷電、中性、荷電、中性)、または一連のアミノ酸を通して不均一に分布され得(例えば、荷電、複数の中性、荷電、中性、複数の荷電など)。ある態様において、本発明のポリペプチドに結合されるタグは生理学的pHにおいて全体的な荷電を有し得る(例えば、正電荷または負電荷)。全体の電荷のサイズは異なり得、例えば、タグは正味のプラス1、2、3、4、5などを含み得、または正味のマイナス1、2、3、4、5などを有し得る。本発明はまた、1つまたはそれ以上の上記のタグ配列を含む逆転写酵素(例えば、耐熱性逆転写酵素)、このような逆転写酵素をコードするベクター、宿主細胞反応混合物、このような逆転写酵素を含む組成物および反応混合物、ならびにこのような逆転写酵素を含む容器を含むキットに関する。

#### 【0161】

ある態様において、タグ配列および逆転写酵素(RT)活性を有する配列から、タグ配列のすべてまたはその一部を除去することが望ましくあり得る。この型の態様において、切断部位(例えば、プロテアーゼ酵素についての部位)を形成する1つまたはそれ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。この切断部位は、この部位での切断が融合タンパク質からタグ配列のすべてまたはその一部を除去し得るよに配置され得る。ある態様において、切断部位は、タグ配列のすべてが切断部位を認識するプロテアーゼ酵素を用いる切断によって除去されるように、タグ配列とRT活性と有する配列との間に配置され得る。適切な切断部位の例には以下が含まれるがこれらに限定されない: 血液凝固

10

20

30

40

50

因子Xaによって認識および切断される、配列Ile-Glu-Gly-Arg (SEQ ID NO:4) を有するXa因子切断部位、およびトロンピンによって認識および切断される、配列Leu-Val-Pro-Arg (SEQ ID NO:5) を有するトロンピン切断部位。他の適切な切断部位は当業者に公知であり、本発明と組み合わせて使用され得る。

【0162】

本発明の逆転写酵素は、好ましくは約5単位/mgを超える、より好ましくは約50単位/mgを超える、さらにより好ましくは約100単位/mg、250単位/mg、500単位/mg、1000単位/mg、5000単位/mg、または10,000単位/mgを超える、最も好ましくは約15,000単位/mgを超える、約16,000単位/mgを超える、約17,000単位/mgを超える、約18,000単位/mgを超える、約19,000単位/mgを超える、および約20,000単位/mgを超える比活性（例えばRNA指向性DNAポリメラーゼ活性および/またはRNase H活性）を有する。ある態様において、本発明の逆転写酵素は、約50,000単位/mgを超える、約100,000単位/mgを超える、約150,000単位/mgを超える、約200,000単位/mgを超える、約250,000単位/mgを超える、および約300,000単位/mgを超える比活性を有してもよい。本発明の逆転写酵素の比活性の好ましい範囲は、約5単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約5単位/mg～約500,000単位/mg、約5単位/mg～約300,000単位/mgの比活性、約50単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約100単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約250単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約500単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約1000単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約5000単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約10,000単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約25,000単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約100単位/mg～約500単位/mgの比活性、約100単位/mg～約400単位/mgの比活性、および約200単位/mg～約500単位/mgの比活性を含む。比活性の他の好ましい範囲は、約200,000単位/mg～約350,000単位/mgの比活性、約225,000単位/mg～約300,000単位/mgの比活性、約250,000単位/mg～約300,000単位/mgの比活性、約200,000単位/mg～750,000単位/mgの比活性、約200,000単位/mg～約500,000単位/mgの比活性、約200,000単位/mg～約400,000単位/mgの比活性、約250,000単位/mg～約750,000単位/mgの比活性、約250,000単位/mg～約500,000単位/mgの比活性、および約250,000単位/mg～約400,000単位/mgの比活性、を含む。好ましくは、比活性の範囲の下限は、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、および80,000単位/mgから変化し得るに対して、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、および90,000単位/mgから変化し得る。比活性は、当技術分野において周知の酵素アッセイ法およびタンパク質アッセイ法を使用して決定しても良い。DNAポリメラーゼアッセイ法およびRNase Hアッセイ法は、例えば米国特許第5,244,797号および国際公開公報第98/47912号に記載される。本発明のある態様において、本発明に従って調製される耐熱性逆転写酵素の比活性は非耐熱性逆転写酵素の比活性より高くてもよい。ある態様において、耐熱性逆転写酵素の比活性は、対応する非耐熱性逆転写酵素の比活性より5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%高いか、またはそれより高くてもよい。ある好ましい態様において、本発明による耐熱性逆転写酵素の比活性は、対応する非耐熱性逆転写酵素の比活性より30%以上高くてもよい。本発明によれば、比活性は、反応に使用されるタンパク質または酵素の総量に対するタンパク質または酵素の酵素活性(単位)の尺度である。比活性の尺度は、当業者に周知の標準的な技法によって決定することができる。

【0163】

本発明の逆転写酵素は、1つまたはそれ以上の鋳型から核酸分子を作製するのに使用することができる。このような方法は、1つまたはそれ以上の核酸鋳型（例えば、mRNA、より好ましくは、mRNA分子の集団）と本発明の逆転写酵素の1つまたはそれ以上を混合する段階、および1つまたはそれ以上の核酸鋳型の全てまたは一部と相補的な1つまたはそれ以上の核酸分子を作製するのに十分な条件下で混合物をインキュベートする段階を含む。

【0164】

本発明はまた、1つまたはそれ以上の核酸分子を増幅する方法であり、以下の段階を含む方法に関する:1つまたはそれ以上の核酸鋳型と本発明の逆転写酵素の1つを混合する段階、および1つまたはそれ以上の核酸鋳型の全てまたは一部と相補的な1つまたはそれ以上の核酸分子を増幅するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階。このような増幅法は、さらに、1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼの使用を含んでもよく、標準的なRT-PCR反応と同様に使用することができる。

#### 【0165】

本発明はまた、1つまたはそれ以上の核酸分子を配列決定する方法であり、以下の段階を含む方法に関する:(a)配列決定しようとする1つまたはそれ以上の核酸分子と、1つまたはそれ以上のプライマー核酸分子、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素、1つまたはそれ以上のヌクレオチド、および1つまたはそれ以上の反応停止薬剤を混合する段階;(b)配列決定しようとする1つまたはそれ以上の核酸分子の全てまたは一部と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、混合物をインキュベートする段階;および(c)核酸分子の集団を分離して、配列決定しようとする1つまたはそれ以上の核酸分子の全てまたは一部のヌクレオチド配列を決定する段階。

#### 【0166】

本発明はまた、このような方法によって生成された核酸分子(完全長cDNA分子でもよい)、これらの核酸分子を含むベクター(特に、発現ベクター)、ならびにこれらのベクターおよび核酸分を含む宿主細胞に関する。

#### 【0167】

DNAポリメラーゼの供給源

本発明によれば様々なDNAポリメラーゼが有用である。このようなポリメラーゼとして、サームス・サーモフィリス(*Thermus thermophilus*)(Tth)DNAポリメラーゼ、サームス・アクアティカス(*Thermus aquaticus*)(Taq)DNAポリメラーゼ、サーモトガ・ネアポリタナ(*Thermotoga neapolitana*)(Tne)DNAポリメラーゼ、サーモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*)(Tma)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)(TliまたはVENT(商標))DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・コダカラエンシス(*Thermococcus kodakaraensis*)KOD1 DNAポリメラーゼ、ピロコッカス・フリオシス(*Pyrococcus furiosus*)(Pfu)DNAポリメラーゼ、ピロコッカス種GB-D(DEEPVENT(商標))DNAポリメラーゼ、ピロコッカス・ウォーシ(*Pyrococcus woosii*)(Pwo)DNAポリメラーゼ、バチルス・ステロサーモフィリラス(*Bacillus sterothermophilus*)(Bst)DNAポリメラーゼ、バチルス・カルドフィラス(*Bacillus caldophilus*)(Bca)DNAポリメラーゼ、スルホロブス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*)(Sac)DNAポリメラーゼ、サーモプラズマ・アシドフィラム(*Thermoplasma acidophilum*)(Tac)DNAポリメラーゼ、サームス・フラバス(*Thermus flavus*)(Tfl/Tub)DNAポリメラーゼ、サームス・ルーバー(*Thermus ruber*)(Tru)DNAポリメラーゼ、サームス・ Brockianus(*Thermus brockianus*)(DYNAZYME(商標))DNAポリメラーゼ、メサノバクテリウム・サーモオートロフィカム(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)(Mth)DNAポリメラーゼ、マイコバクテリウム種(*Mycobacterium spp.*)DNAポリメラーゼ(Mtb、Mlep)、ならびにその変異体、変種、および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0168】

本発明に従って使用されるDNAポリメラーゼは、核酸鋳型からDNA分子を一般的に5'から3'方向に合成することができるどの酵素でもよい。このようなポリメラーゼは中温性でも高温性でもよいが、好ましくは高温性である。中温性ポリメラーゼとしては、T5 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、クレノウフラグメントDNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼIIIなどが挙げられる。好ましいDNAポリメラーゼは、Taq、Tne、Tma、Pfu、VENT(商標)、DEEPVENT(商標)、Tth、ならびにその変異体、変種、および誘導体などの耐熱性DNAポリメラーゼである(米国特許第5,436,149号;米国特許第5,512,462号;PCT国際公開公報第92/06188号;PCT国際公開公報第92/06200号;PCT国際公開公報第96/10640号;バーンズ(Barnes), W.M., Gene 112:29-35(1992);ロウヤー(Lawyer), F.C.ら, PCR Meth. Appl. 2:275-287(1993);

ファルマン(Flaman), J.-M.ら, Nucl. Acids Res. 22(15):3259-3260(1994))。長い核酸分子(例えば、約3~5Kb長より長い核酸分子)を増幅するために、少なくとも2種類のDNAポリメラーゼ(一方は3'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠き、他方は3'エキソヌクレアーゼ活性を有する)が一般的に用いられる。米国特許第5,436,149号;米国特許第5,512,462号;バーンズ,W.M., Gene 112:29-35(1992);PCT国際公開公報第98/06736号;および1997年2月14日に出願された、権利者が同一である同時係属中の米国特許出願第08/801,720号(これらの全ての開示はその全体が本明細書に引用される)を参照のこと。3'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くDNAポリメラーゼの例として、Taq、Tne(exo<sup>-</sup>)、Tma、Pfu(exo<sup>-</sup>)、Pwo、およびTth DNAポリメラーゼ、ならびにその変異体、変種、および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼの限定しない例として、Pfu、DEEPVENT(商標)、およびTli/VENT(商標)、ならびにその変異体、変種、および誘導体が挙げられる。

10

#### 【0169】

##### 組成物および反応混合物の処方

本発明の組成物を形成するために、好ましくは、1つまたはそれ以上の逆転写酵素を緩衝塩溶液に溶解して混合する。本発明の組成物を作製するために、選択的に、1つもしくはそれ以上のDNAポリメラーゼ、および/または1つもしくはそれ以上のヌクレオチド、および/または1つもしくはそれ以上のプライマーを添加してもよい。より好ましくは、酵素は、安定な緩衝塩溶液中で作用濃度で提供される。本明細書で使用する用語「安定な」および「安定性」は、一般的に、酵素または酵素を含む組成物が約4℃の温度で約1週間、約-20℃の温度で約2~6ヶ月、および約-80℃の温度で約6ヶ月以上保存された後に、酵素組成物などの組成物が最初の酵素活性(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%を保持することを意味する。本明細書で使用する用語「作用濃度」は、特定の機能(例えば、核酸の逆転写)を果たすために溶液中に用いられる最適濃度の、または最適濃度近くの酵素濃度を意味する。

20

#### 【0170】

本発明の組成物を形成する際に用いられる水は、好ましくは、蒸留され、脱イオンされ、(0.1~0.2マイクロメートルフィルターを通して)滅菌濾過されており、DNaseおよびRNase酵素による汚染がない。このような水は、例えば、シグマケミカルカンパニー(Sigma Chemical Company)(Saint Louis, Missouri)から市販されているか、または当業者に周知の方法に従って、必要とされるように作製することができる。

30

#### 【0171】

酵素成分に加えて、本発明の組成物は、好ましくは、核酸分子(例えば、cDNA分子)の合成に必要な1つまたはそれ以上の緩衝液および補助因子を含む。本発明の組成物を形成する際の使用に特に好ましい緩衝液は、酢酸緩衝液、硫酸緩衝液、塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、または遊離酸形態のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS(登録商標))緩衝液であるが、TRIS(登録商標)と同じ適切なイオン強度およびpKaの代替緩衝液を同等の効果をもって使用することができる。緩衝塩に加えて、補助因子塩(例えば、カリウム塩(好ましくは、塩化カリウムまたは酢酸カリウム)およびマグネシウム塩(好ましくは、塩化マグネシウムまたは酢酸マグネシウム))が組成物に含まれる。保存の際の組成物および/または反応混合物の安定性の向上を保つために、組成物および/または合成反応混合物への1つまたはそれ以上の炭水化物および/または糖の添加も有利なことがある。本発明の組成物および/または合成反応混合物に添加するための好ましいこのような炭水化物または糖としては、スクロース、トレハロース、グリセロールなどが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、このような炭水化物および/または糖を、本発明の酵素組成物およびキットの作製に用いられる酵素の保存緩衝液に添加してもよい。このような炭水化物および/または糖はシグマ(St. Louis, MO)を含む多くの供給源から市販されている。

40

#### 【0172】

多くの場合、まず最初に、緩衝塩、補助因子塩、および炭水化物または糖を作用濃度で水に溶解し、酵素を添加する前に溶液のpHを調節することが好ましい。このように、pH感

50

受性酵素は、本発明の組成物の処方中に酸またはアルカリを介した不活化を受けない。

【0173】

緩衝塩溶液を処方するためには、緩衝塩(好ましくは、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS(登録商標))の塩、最も好ましくは、その塩酸塩)と十分な量の水を混合して、TRIS(登録商標)の濃度が5~150ミリモル濃度、好ましくは10~60ミリモル濃度、最も好ましくは約20~60ミリモル濃度の溶液を得る。この溶液に、マグネシウム塩(好ましくは、その塩化物または酢酸塩のいずれか)または他の二価陽イオンを、作用濃度が1~10ミリモル濃度、好ましくは1.5~8.0ミリモル濃度、最も好ましくは約3~7.5ミリモル濃度になるように添加してもよい。この溶液に、作用濃度が10~100ミリモル濃度、最も好ましくは約75ミリモル濃度になるようにカリウム塩(好ましくは、カリウムの塩化物または酢酸塩)、または他の単価陽イオン(例えばNa)も添加してよい。この溶液にジチオスレイトールなどの還元剤を、好ましくは約1~100mMの最終濃度で、より好ましくは約5~50mMまたは約7.5~20mMの濃度で、最も好ましくは約10mMの濃度で添加してもよい。本発明の組成物に含めるための炭水化物および/または糖の好ましい濃度は、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)である。少量のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)塩(例えば、ジソジウムEDTA)(好ましくは、約0.1ミリモル濃度)も添加してよいが、EDTAの含有は、本発明の組成物の機能または安定性に必須でないようだ。全ての緩衝液および塩を添加した後、全ての塩が溶解するまで、この緩衝塩溶液をよく混合し、当技術分野において周知の方法を用いて、pHを約7.4~約9.2、好ましくは約8.0~約9.0、最も好ましくは約8.4のpH値まで調節する。

【0174】

これらの緩衝塩溶液に酵素(逆転写酵素および/またはDNAポリメラーゼ)を添加して、本発明の組成物を得る。M-MLV逆転写酵素は、好ましくは、溶液中で約1,000~約50,000単位/ml、約2,000~約30,000単位/ml、約2,500~約25,000単位/ml、約3,000~約22,500単位/ml、約4,000~約20,000単位/mlの作用濃度で、最も好ましくは、約5,000~約20,000単位/mlの作用濃度で添加される。ある態様において、本発明の逆転写酵素(例えば、M-MLV逆転写酵素)は、第1鎖反応混合物(例えば、mRNA分子を逆転写酵素するための反応)および/または共役RT/PCRにおいて上記の作用濃度で加えられ得る。これらの反応のための本発明の逆転写酵素の適切な濃度は、約5,000単位/ml~約50,000単位/ml、約5,000単位/ml~約40,000単位/ml、約5,000単位/ml~約30,000単位/ml、または約5,000単位/ml~約20,000単位/mlの逆転写酵素であり得る。反応は20 $\mu$ l~50 $\mu$ lの容量で行われ得、このような反応は50単位、100単位、200単位、300単位、400単位、またはそれ以上の本発明の逆転写酵素を含み得る。当業者は、さらなる逆転写酵素の付加が、増加した酵素の消費で、第1鎖(例えば、mRNA鎖に相補的なDNA鎖)の合成の増加を可能にし得ることを理解している。当業者は、過度の実験を伴うことなく、受容可能な消費で望ましい量の産物を産生するために反応に加える本発明の逆転写酵素の量を決定し得る。

【0175】

前記の本発明の酵素を含むAMV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、およびHIV逆転写酵素は、好ましくは、溶液中で約100~約5000単位/ml、約125~約4000単位/ml、約150~約3000単位/ml、約200~約2500単位/ml、約225~約2000単位/mlの作用濃度で、最も好ましくは約50~約1000単位/mlの作用濃度で添加される。高温性DNAポリメラーゼ群(Taq、Tne、Tma、Pfu、VENT、DEEPVENT、Tth、ならびにその変異体、変種、および誘導体)の酵素は、好ましくは、溶液中で約100~約1000単位/ml、約125~約750単位/ml、約150~約700単位/ml、約200~約650単位/ml、約225~約550単位/mlの作用濃度で、最も好ましくは、約250~約500単位/mlの作用濃度で添加される。酵素は溶液に任意の順番で添加されてもよく、同時に添加されてもよい。

【0176】

本発明の組成物は、さらに、1つまたはそれ以上のヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチドは、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。本発明の組成物のdNTP成分は新たに合成される核酸の「基本要素」として働き、ポリメラーゼの働きによって新たに合成される核酸に取り込まれ、ddNTPは、本発明による配列決定方法において使用することができる。本発明の組成物における使用に適したヌクレオチドの例として、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、またはその誘導体(これらの全てが、インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA)、ニューイングランドバイオラボ(New England BioLabs)(Beverly,Massachusetts)、およびシグマケミカルカンパニー(Saint Louis,Missouri)を含む供給源から市販されている)が挙げられるが、これらに限定されない。これらのヌクレオチドは標識されなくてもよく、当技術分野において周知の方法でヌクレオチドと放射性同位体(例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、または $^{35}\text{S}$ )、ビタミン(例えば、ビオチン)、蛍光成分(例えば、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、またはフィコエリトリン)、化学発光標識(例えば、インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA)から市販されているPHOTO-GENE(商標)またはACES(商標)化学発光システムを用いる)、ジゴキシゲニンなどを結合することによって検出可能に標識されてもよい。標識ヌクレオチドはまた、例えば、インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA)またはシグマケミカルカンパニー(Saint Louis,Missouri)から商業的に入手することができる。本発明の組成物において、ヌクレオチドは、各ヌクレオチドの作用濃度が約10~4000マイクロモル濃度、約50~2000マイクロモル濃度、約100~1500マイクロモル濃度、または約200~1200マイクロモル濃度、最も好ましくは約1000マイクロモル濃度の作用濃度になるように添加される。

#### 【0177】

成分の劣化を遅らせるために、試薬組成物の保存は、好ましくは約4 で1日まで、最も好ましくは-20 で1年までである。

#### 【0178】

別の局面において、本発明の組成物および逆転写酵素は、1つまたはそれ以上の炭水化物、糖、または合成ポリマーの存在下で乾燥した形で調製および保存することができる。乾燥した組成物または逆転写酵素を調製するための好ましい炭水化物、糖、またはポリマーとして、スクロース、トレハロース、およびポリビニルピロリドン(PVP)、またはそ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、および同第5,556,771号(これらの開示は全体が本明細書に引用される)を参照のこと。このような乾燥した組成物または酵素は、本発明の組成物の酵素または成分が著しく劣化することなく様々な温度で長期間保存することができる。好ましくは、乾燥した逆転写酵素または組成物は4 または-20 で保存される。

#### 【0179】

本発明はさらに、核酸分子を逆転写させるために反応溶液、ならびにこのような反応溶液を利用する逆転写酵素方法、およびこのような方法を使用して産生される核酸分子産物を含む。多くの例において、本発明の反応溶液は、以下の成分の1つまたはそれ以上を含む：(1)1つまたはそれ以上の緩衝剤(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、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(HEPES)、酢酸、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、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(TAPS)など)、(2)1つまたはそれ以上の一価カチオン塩(例えば、NaCl、KClなど)、(3)1つまたはそれ以上の二価カチオン塩(例えば、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ など)、(4)1つまたはそれ以上の還元剤(例えば、ジチオスレイトール、-メルカプトエタノールなど)、(5)1つまたはそれ以上のイオン性また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など)、(6)1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼインヒビター(例えば、アクチノマイシンD



など)、(7)ヌクレオチド(例えば、dNTP(例えば、dGTP、dATP、dCTP、dTTPなど))、(8)逆転写および/または増幅されるRNA、(9)1つまたはそれ以上のRNaseインヒビター(例えば、RNASEOUT(商標)、Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA、カタログ番号10777-019など)、(10)逆転写酵素(例えば、本発明の逆転写酵素)、ならびに/あるいは(11)1つまたはそれ以上の希釈剤(例えば、水)。他の成分および/または構成要素(例えば、プライマー、DNAポリメラーゼなど)もまた、反応溶液中に存在し得る。

#### 【0180】

本発明の反応溶液中の緩衝剤の濃度は、使用される特定の緩衝剤を用いて変化する。典型的には、緩衝剤の作用濃度(すなわち、反応混合物中の濃度)は、約5mM～約500mM

(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, など)

である。Tris(例えば、Tris-HCl)が使用される場合、Trisの作用濃度は、典型的には、約5mM～約100mM、約5mM～約75mM、約10mM～約75mM、約10mM～約60mM、約10mM～約50mM、約25mM～約50mMなどである。

#### 【0181】

本発明の溶液の最終pHは、一般的には、本発明の反応溶液中に存在する緩衝剤によって設定および維持される。本発明の反応溶液のpHおよびそれゆえに本発明の反応混合物は、特定の用途および存在する緩衝剤とともに変化するが、しばしば約pH 5.5～約pH 9.0

10

20

30

(例えば、約 pH 6.0, 約

pH 6.5, 約 pH 7.0, 約 pH 7.1, 約 pH 7.2, 約 pH 7.3, 約 pH 7.4,

約 pH 7.5, 約 pH 7.6, 約 pH 7.7, 約 pH 7.8, 約 pH 7.9, 約

pH 8.0, 約 pH 8.1, 約 pH 8.2, 約 pH 8.3, 約 pH 8.4, 約 pH 8.5,

約 pH 8.6, 約 pH 8.7, 約 pH 8.8, 約 pH 8.9, 約 pH 9.0,

約 pH 6.0 ~ 約 pH 8.5, 約 pH 6.5 ~ 約 pH 8.5, 約

pH 7.0 ~ 約 pH 8.5, 約 pH 7.5 ~ 約 pH 8.5, 約 pH 6.0

~ 約 pH 8.0, 約 pH 6.0 ~ 約 pH 7.7, 約 pH 6.0 ~

約 pH 7.5, 約 pH 6.0 ~ 約 pH 7.0, 約 pH 7.2 ~ 約

pH 7.7, 約 pH 7.3 ~ 約 pH 7.7, 約 pH 7.4 ~ 約 pH

7.6, 約 pH 7.0 ~ 約 pH 7.4, 約 pH 7.6 ~ 約 pH 8.0,

約 pH 7.6 ~ 約 pH 8.5, 約 pH 7.7 ~ 約 pH 8.5,

約 pH 7.9 ~ 約 pH 8.5, 約 pH 8.0 ~ 約 pH 8.5, 約

pH 8.2 ~ 約 pH 8.5, 約 pH 8.3 ~ 約 pH 8.5, 約 pH 8.4

~ 約 pH 8.5, 約 pH 8.4 ~ 約 pH 9.0, 約 pH 8.5 ~

約 pH 9.0, など)

10

20

である。

【 0 1 8 2 】

示されるように、1つまたはそれ以上の一価カチオン塩（例えば、NaCl、KClなど）が本発明の反応溶液に含まれ得る。多くの例において、本発明の反応溶液中で使用される塩は、溶液中で解離して一価である少なくとも1つの種を生成する（例えば、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>など）。本発明の反応溶液に含まれる場合、塩は、しばしば、約0.5mM ~ 約500mM

(例えば、約 1 mM, 約 2 mM, 約 3 mM, 約 5 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 55 mM, 約 60 mM, 約 64 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 120 mM, 約 140 mM, 約 150 mM, 約 175 mM, 約 200 mM, 約 225 mM, 約 250 mM, 約 275 mM, 約 300 mM, 約 325 mM, 約 350 mM, 約 375 mM, 約 400 mM, 約 1 mM ~ 約 500 mM, 約 5 mM ~ 約 500 mM, 約 10 mM ~ 約 500 mM, 約 20 mM ~ 約 500 mM, 約 30 mM ~ 約 500 mM, 約 40 mM ~ 約 500 mM, 約 50 mM ~ 約 500 mM, 約 60 mM ~ 約 500 mM, 約 65 mM ~ 約 500 mM, 約 75 mM ~ 約 500 mM, 約 85 mM ~ 約 500 mM, 約 90 mM ~ 約 500 mM, 約 100 mM ~ 約 500 mM, 約 125 mM ~ 約 500 mM, 約 150 mM ~ 約 500 mM, 約 200 mM ~ 約 500 mM, 約 10 mM ~ 約 100 mM, 約 10 mM ~ 約 75 mM, 約 10 mM ~ 約 50 mM, 約 20 mM ~ 約 200 mM, 約 20 mM ~ 約 150 mM, 約 20 mM ~ 約 125 mM, 約 20 mM ~ 約 100 mM, 約 20 mM ~ 約 80 mM, 約 20 mM ~ 約 75 mM, 約 20 mM ~ 約 60 mM, 約 20 mM ~ 約 50 mM, 約 30 mM ~ 約 500 mM, 約 30 mM ~ 約 100 mM, 約 30 mM ~ 約 70 mM, 約 30 mM ~ 約 50 mM, など)

10

20

30

の、個々のまたは組み合わせた濃度のいずれかで存在する。

【 0 1 8 3 】

示されるように、1つまたはそれ以上の二価カチオン塩（例えば、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ など）が本発明の反応溶液に含まれ得る。多くの例において、本発明の反応溶液中で使用される塩は、溶液中で解離して一価である少なくとも1つの種を生成する（例えば、 $\text{Mg}^{++}$ 、 $\text{Mn}^{++}$ 、 $\text{Ca}^{++}$ など）。本発明の反応溶液に含まれる場合、塩は、しばしば、約 0.5mM ~ 約 500mM

40

(例えば、約1 mM,

2 mM, 約3 mM, 約4 mM, 約5 mM, 約6 mM, 約7 mM, 約8 mM, 約9 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55 mM, 約60 mM, 約64 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120 mM, 約140 mM, 約150 mM, 約175 mM, 約200 mM, 約225 mM, 約250 mM, 約275 mM, 約300 mM, 約325 mM, 約350 mM, 約375 mM, 約400 mM, 約1 mM ~ 約500 mM, 約5 mM ~ 約500 mM, 約10 mM ~ 約500 mM, 約20 mM ~ 約500 mM, 約30 mM ~ 約500 mM, 約40 mM ~ 約500 mM, 約50 mM ~ 約500 mM, 約60 mM ~ 約500 mM, 約65 mM ~ 約500 mM, 約75 mM ~ 約500 mM, 約85 mM ~ 約500 mM, 約90 mM ~ 約500 mM, 約100 mM ~ 約500 mM, 約125 mM ~ 約500 mM, 約150 mM ~ 約500 mM, 約200 mM ~ 約500 mM, 約10 mM ~ 約100 mM, 約10 mM ~ 約75 mM, 約10 mM ~ 約50 mM, 約20 mM ~ 約200 mM, 約20 mM ~ 約150 mM, 約20 mM ~ 約125 mM, 約20 mM ~ 約100 mM, 約20 mM ~ 約80 mM, 約20 mM ~ 約75 mM, 約20 mM ~ 約60 mM, 約20 mM ~ 約50 mM, 約30 mM ~ 約500 mM, 約30 mM ~ 約100 mM, 約30 mM ~ 約70 mM, 約30 mM ~ 約50 mM, など)

10

20

30

の、個々のまたは組み合わせた濃度のいずれかで存在する。

【0184】

本発明の反応溶液に含まれる場合、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など）は、しばしば、約0.1mM ~ 約50mM

40

(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, など)

10

20

の、個々のまたは組み合わせた濃度のいずれかで存在する。

30

【 0 1 8 5 】

本発明の反応溶液はまた、1つまたはそれ以上のイオン性また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など)を含んでもよい。本発明の反応溶液に含まれる場合、界面活性剤は、しばしば、約0.01% ~ 約5.0%

(例えば、約 0.01%, 約 0.02%, 約 0.03%, 約 0.04%, 約 0.05%, 約 0.06%, 約 0.07%, 約 0.08%, 約 0.09%, 約 0.1%, 約 0.15%, 約 0.2%, 約 0.3%, 約 0.5%, 約 0.7%, 約 0.9%, 約 1%, 約 2%, 約 3%, 約 4%, 約 5%, 約 0.01% ~ 約 5.0%, 約 0.01% ~ 約 4.0%, 約 0.01% ~ 約 3.0%, 約 0.01% ~ 約 2.0%, 約 0.01% ~ 約 1.0%, 約 0.05% ~ 約 5.0%, 約 0.05% ~ 約 3.0%, 約 0.05% ~ 約 2.0%, 約 0.05% ~ 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%, など)

10

の、個々のまたは組み合わせた濃度のいずれかで存在する。例えば、本発明の反応溶液は、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%などの濃度でTRITON X-100(商標)を含み得る。

【 0 1 8 6 】

20

本発明の反応溶液はまた、1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼインヒビター(例えば、アクチノマイシンDなど)を含んでもよい。本発明の反応溶液に含まれる場合、このようなインヒビターは、しばしば、約0.1 µg/ml ~ 約100 µg/ml

(例えば、約0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.4  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.6  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.7  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.8  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.9  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1.1  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1.3  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1.5  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1.7  $\mu\text{g/ml}$ , 約 2.0  $\mu\text{g/ml}$ , 約 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , 約 3.5  $\mu\text{g/ml}$ , 約 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , 約 7.5  $\mu\text{g/ml}$ , 約 10  $\mu\text{g/ml}$ , 約 15  $\mu\text{g/ml}$ , 約 20  $\mu\text{g/ml}$ , 約 25  $\mu\text{g/ml}$ , 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 35  $\mu\text{g/ml}$ , 約 40  $\mu\text{g/ml}$ , 約 50  $\mu\text{g/ml}$ , 約 60  $\mu\text{g/ml}$ , 約 70  $\mu\text{g/ml}$ , 約 80  $\mu\text{g/ml}$ , 約 90  $\mu\text{g/ml}$ , 約 100  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.75  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1.0  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 2.0  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 3.0  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 4.0  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 5.0  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 7.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 10  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 15  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 30  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 20  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 10  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 5  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 2  $\mu\text{g/ml}$ , 約 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 1  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 10  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 5  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 2  $\mu\text{g/ml}$ , 約 1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 100  $\mu\text{g/ml}$ , 約 10  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 100  $\mu\text{g/ml}$ , 約 20  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 100  $\mu\text{g/ml}$ , 約 40  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 100  $\mu\text{g/ml}$ , 約 30  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 80  $\mu\text{g/ml}$ , 約 30  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 70  $\mu\text{g/ml}$ , 約 40  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 60  $\mu\text{g/ml}$ , 約 40  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 70  $\mu\text{g/ml}$ , 約 40  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約 80  $\mu\text{g/ml}$ , など)

10

20

30

の、個々のまたは組み合わせた濃度のいずれかで存在する。

【 0 1 8 7 】

多くの場合において、ヌクレオチド（例えば、dNTP（例えば、dGTP、dATP、dCTP、dTTP など））が本発明の反応混合物中に存在する。典型的には、個々のヌクレオチドは約0.05 mM ~ 約50mM

(例えば、約 0.07 mM, 約 0.1 mM, 約 0.15 mM, 約 0.18 mM, 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, など )

10

20

30

の濃度で存在する。組み合わせたヌクレオチド濃度は、1種またはそれ以上のヌクレオチドが存在する場合、個々のヌクレオチドの濃度を加えることによって決定され得る。1種またはそれ以上のヌクレオチドが本発明の反応溶液中に存在する場合、個々のヌクレオチドは等モル量で存在しなくてもよい。従って、反応溶液は、例えば、1mM dGTP、1mM dATP、0.5mM dCTP、および1mM dTTPを含み得る。

#### 【 0 1 8 8 】

RNAは典型的には本発明の反応溶液中に存在する。大部分の場合において、RNAは、逆転写の直前に反応溶液に加えられる。従って、反応溶液はRNAなしで提供されてもよい。これは、典型的には、反応溶液がキットで提供される場合である。RNAは、反応溶液中に存在する場合、しばしば、1ピコグラム ~ 100  $\mu$ g/20  $\mu$ l

40



(例えば, 約 1

ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 10 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 50 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約  
 100 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 200 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 10 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ ,  
 約 500 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 800 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 1.0  
 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 5.0 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 10 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約  
 25 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 50 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 75 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ ,  
 約 100 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 150 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 250  
 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 400 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 500 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ ,  
 約 750 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$ , 約 1.0  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 5.0  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 10  
 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 20  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 30  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 40  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 50  
 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 70  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 85  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 100  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ,  
 約 10 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$  ~ 約 100  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 10 ピコグラム/20  
 $\mu\text{l}$  ~ 約 100  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 100 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$  ~ 約 100  $\mu\text{g}/20$   
 $\mu\text{l}$ , 約 1.0 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$  ~ 約 100  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 100  
 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$  ~ 約 100  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 10 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$  ~  
 約 10  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 10 ピコグラム/20  $\mu\text{l}$  ~ 約 5  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ,  
 約 100 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$  ~ 約 5  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 1  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  ~  
 約 10  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 1  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  ~ 約 5  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 100  
 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$  ~ 約 1  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 約 500 ナノグラム/20  $\mu\text{l}$  ~  
 約 5  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , など)

10

20

30

反応混合物の濃度で存在する。当業者は、異なる逆転写反応が20  $\mu\text{l}$ 以外の容量で実行されてもよいことを理解する。このような場合において、存在するRNAの総量は、使用される容量に伴って変化する。従って、上記の量はRNAの量/20  $\mu\text{l}$ の反応溶液の例として提供される。

【 0 1 8 9 】

逆転写酵素（例えば、本発明の逆転写酵素）もまた、反応溶液中に存在してもよい。存在する場合、逆転写酵素は、しばしば、約0.01 ~ 約1,000単位/逆転写酵素活性/ $\mu\text{l}$

(例えば, 約 0.01

単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.05 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.2 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.3

単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.4 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.5 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.7 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 1.0 単位/ $\mu\text{l}$ ,

約 1.5 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 2.0 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 2.5 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 5.0 単位/ $\mu\text{l}$ , 約

7.5 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 10 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 20 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 25 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 50

単位/ $\mu\text{l}$ , 約 100 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 150 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 200 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 250

単位/ $\mu\text{l}$ , 約 350 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 500 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 750 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 1,000

単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.2 単位/ $\mu\text{l}$ , ~

約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 1.0 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約

5.0 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 10 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ ,

約 20 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 50 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約

1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 100 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 200

単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 400 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ ,

約 500 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1,000 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約

300 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 200 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ ,

~ 約 100 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 50 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1

単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 10 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 5.0 単位/ $\mu\text{l}$ ,

約 0.1 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 1.0 単位/ $\mu\text{l}$ , 約 0.2 単位/ $\mu\text{l}$ , ~ 約 0.5

単位/ $\mu\text{l}$ , など)

を生じる濃度で存在する。

【0190】

本発明の反応溶液は、最終的な使用のための作用濃度に希釈される濃縮溶液（例えば、5×溶液）として調製されてもよい。5×溶液に関して、5:1希釈が、このような5×溶液を作用濃度にするために必要とされる。本発明の反応溶液は、例えば、2×、3×、5×、6×、7×、8×、9×、10×などの溶液として調製されてもよい。このような溶液の倍数濃度の1つの主要な制限は、化合物が溶液中で特定の濃度に達する場合に沈殿が発生することである。従って、濃縮反応溶液は、一般的には、種々の成分の濃度が緩衝液成分の沈殿が起こらないように十分に低いように調製される。当業者は、各溶液に受容可能である濃度の上限が特定の溶液および存在する成分に伴って変化することを理解する。

【0191】

多くの場合において、本発明の反応溶液は、滅菌形態で提供される。滅菌は、混合の前に反応溶液の個々の成分で、またはそれらが調製された後で反応溶液で実行され得る。こ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適切な手段によって実行され得る。

【0192】

核酸の標識

一般的に、本発明は、部分的には、標識された核酸分子を産生するための核酸分子の逆転写における使用のための組成物を提供する。このような組成物は、1種またはそれ以上の逆転写酵素（例えば、シングルサブユニットおよび/またはマルチサブユニットのRT）を含み得る。これらの組成物中の酵素は、好ましくは、作用濃度で存在し、RNase H活性を有するか、またはRNase H活性が低下しているか、もしくはRNase H活性が実質的に低下

10

20

30

40

50

しているか、もしくはRNase H活性を欠いているが、酵素の混合物（あるものはRNase H活性を有し、あるものはRNase H活性が実質的に低下しているか、もしくはRNase H活性を欠いている）が本発明の組成物中で使用され得る。好ましい逆転写酵素には、M-MLV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、RAV逆転写酵素、MAV逆転写酵素、およびHIV逆転写酵素または例えばのASLV逆転写酵素が含まれる。

#### 【0193】

本発明はまた、1種またはそれ以上の核酸鋳型（これは、好ましくはRNAまたはメッセンジャーRNA（mRNA）およびより好ましくはmRNA分子の集団）を、逆転写酵素活性を有する1種またはそれ以上のポリペプチドと混合する段階、およびその混合物を、1種またはそれ以上の鋳型のすべてまたはその一部に相補的な1種またはそれ以上の標識された核酸分子を作製するのに十分な条件下でインキュベートする段階を含む、1種またはそれ以上の核酸分子の逆転写のための方法に関する。1種またはそれ以上の鋳型に相補的な核酸分子を作製するために、少なくとも1種のプライマー（例えば、オリゴ(dT)プライマー）および1種またはそれ以上のヌクレオチド（その一部が好ましくは標識されており、最も好ましくは蛍光標識されている）が核酸合成のために使用される。本発明のこの局面に従う逆転写のために適切な核酸鋳型には、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含まれる。このような細胞には、正常細胞、疾患細胞、形質転換細胞、樹立細胞、前駆細胞（progenitor cell）、前駆細胞（precursor cell）、胎児細胞、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞（ヒト細胞を含む）、鳥類細胞、植物細胞など、または植物もしくは動物（例えば、ヒト、雌ウシ、ブタ、マウス、ウマ、サル、イヌ、ネコ、ラット、ウサギ、鳥類、魚類、昆虫など）から単離された組織が含まれてもよい。このような核酸分子はまた、ウイルスから単離され得る。ある態様において、本発明の方法は、標識されたヌクレオチド（例えば、蛍光標識を含むヌクレオチド）の取り込みによって核酸分子の直接的な標識を生じる。他の方法において、核酸分子は、最初に、1つまたはそれ以上の反応性官能基を含む核酸を産生するように反応性官能基を含むヌクレオチドアナログを取り込む段階によって、間接的に標識される。反応性官能基を含む核酸は、次に、核酸分子に標識を結合させるために、官能基と反応する標識を含む分子と反応され得る。この反応は、核酸分子への標識含有分子のすべてまたはその一部の共有結合を生じ得る（例えば、化学カップリング）。ある態様において、アミン修飾NTP（例えば、アミノアリル-dUTP/UTP）が逆転写の間に取り込まれる。アミノアリル-NTPは、逆転写のような酵素反応の間の未修飾NTPと同様の効率で取り込まれる。次いで、アミン官能基は、標準的な技術と使用して色素とカップリングされる。cDNAの間接的標識のためのキットは、例えば、Ambion, Inc., Austin, TXから市販されている。ある態様において、標識含有分子は、反応性官能基への非共有結合性結合であってもよい。例えば、反応性官能基はビオチン部分であり得、標識含有分子が標識された（例えば、蛍光標識された）アビジンまたはストレプトアビジン分子であってもよい。

#### 【0194】

本発明はまた、上記の方法に従って産生された標識された核酸分子を提供する。このような標識された核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよく、検出プローブとして有用である。合成の間に使用される標識されたヌクレオチドに依存して、標識された分子は1つまたは多数の標識を含んでもよい。複数の標識が使用される場合、分子は多数の同じかまたは異なる標識を含んでもよい。このように、1つのタイプまたは複数の異なる標識されたヌクレオチドが核酸分子の合成の間に使用され、標識された本発明の核酸分子を提供してもよい。従って、このように標識された核酸分子は、1つまたはそれ以上（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個など）の標識されたヌクレオチド（これは同じかまたは異なってもよい）を含む。

#### 【0195】

本発明の方法によって産生される標識された核酸分子は、(1)特定の数の標識されたヌクレオチドを含んでもよい、または(2)核酸分子中に存在するヌクレオチドの特定のパーセンテージが標識されてもよい、のいずれかである。いずれの場合においても、反応

混合液中に存在する標識されたヌクレオチドの濃度は、(1)特定の数の標識されたヌクレオチド、または(2)標識されていないヌクレオチドと比較して、特定のパーセンテージの標識ヌクレオチドを含む産物核酸分子が産生されるように、標識されていないヌクレオチドに対して調整されてもよい。特定の例において、産物核酸分子中に存在する全ヌクレオチドの、約0.1%～約20%、約0.1%～約15%、約0.1%～約10%、約0.1%～約5.0%、約0.1%～約2.5%、約0.1%～約1.5%、約0.1%～約1.0%、約0.1%～約0.5%、約2.0%～約20%、約4.0%～約20%、約0.5%～約10%、約0.5%～約5%、約0.5%～約2.0%、または約0.5%～約1.0%が標識される。当業者は、標識したヌクレオチドの実際の数、従って、標識され、集団中の個々の分子中に存在するヌクレオチドのパーセンテージが典型的には異なることを理解している。換言すれば、核酸分子の集団の異なるメンバーが、代表的には、異なる数の標識されたヌクレオチドを含み、これらは、多数の要因(例えば、反応混合物中に存在する標識されたヌクレオチド対標識されていないヌクレオチドの比率)によって変化する、各産物分子中に存在する標識されたヌクレオチドの全体の平均を有する。大部分の場合において、集団中の個々の産物核酸分子の少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%が、上記に設定した範囲に収まる標識されたヌクレオチドを含む。

10

#### 【0196】

本発明に従って、標識された産物の量は、好ましくは、当業者によって決定され得るような、合成された産物への関心対象の標識の取り込みのパーセントに基づいて測定されるが、産物の標識の量または効率を測定する他の手段が当業者によって理解される。本発明は、鋳型からの核酸分子の合成の間、好ましくは、RNAからの1種またはそれ以上のcDNAの合成の間の標識されたヌクレオチドの取り込みのパーセントを向上または増大するために提供される。本発明に従って、取り込みパーセントのこのような向上または増大は、標準的な逆転写酵素と比較して、好ましくは、約2倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約40倍以上、または約50倍以上の取り込みパーセントの増大または向上である。

20

#### 【0197】

本発明はまた、本発明に従う使用のためのキットを提供する。このようなキットは、厳重な密封でそこに1つまたはそれ以上の容器手段(例えば、バイアル、チューブ、ボトルなど)を有するキャリア手段(例えば、ボックスまたはカートン)を含む。ここでこのキットは、同じかまたは異なる容器中に、1種またはそれ以上の逆転写酵素を含む。本発明のキットはまた、同じかまたは異なる容器中に、1種またはそれ以上のDNAポリメラーゼ、1種またはそれ以上のプライマー、1種またはそれ以上の適切な緩衝液、および/あるいは1種またはそれ以上のヌクレオチド(例えば、デオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP))および好ましくは標識されたdNTP(例えば、蛍光標識されたdNTP))を含んでもよい。

30

#### 【0198】

ある態様において、本発明において使用されるRTは、2つまたはそれ以上のサブユニット(またはその誘導体、改変体、断片、または変異体)を含み、好ましくは、2つのサブユニット(例えば、二量体またはヘテロ二量体)を含む。2サブユニットの逆転写酵素は、典型的には、二量体を形成するサブユニットおよびサブユニットを有するが、サブユニット(およびこれらのサブユニットの誘導体、改変体、または変異体)の任意の形態または組み合わせが使用されてもよい。このような組み合わせには、  
、  
、  
などが含まれ得る。本発明における使用のための好ましい2サブユニットRTには、RSV RT、AMV RT、AEV RT、RAV RT、HIV RT、およびMAV RT、または他のASLV RT、またはそれらの変異体、改変体、もしくは誘導体が含まれ得る。特定の態様において、AMV RTおよび/またはRSV RTが本発明に従って使用される。好ましいシングルサブユニットRTには、M-MLV逆転写酵素が含まれる。

40

#### 【0199】

cDNA分子の生成/供給源

本発明によれば、cDNA分子(一本鎖または二本鎖)は様々な核酸鋳型分子から調製することができる。本発明において使用するための好ましい核酸分子として、一本鎖または二本

50

鎖のDNA分子および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、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、およびリボソームRNA(rRNA)分子が挙げられるが、mRNA分子が本発明の好ましい銑型である。

#### 【0200】

本発明の方法に従ってcDNA分子を調製するのに用いられる核酸分子は、当業者に公知の標準的な有機化学合成法に従って合成することにより調製することができる。より好ましくは、核酸分子は、天然の供給源(例えば、様々な細胞、組織、器官、または生物)から得ることができる。核酸分子の供給源として使用することができる細胞は、原核生物(細菌細胞(エシェリキア属、バチルス属、セラチア属、サルモネラ属、スタフィロコッカス属(*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス属(*Streptococcus*)、クロストリジウム属(*Clostridium*)、クラミジア属(*Chlamydia*)、ナイセリア属(*Neisseria*)、トレポネーマ属(*Treponema*)、マイコプラズマ属(*Mycoplasma*)、ボレリア属(*Borrelia*)、レジオネラ属(*Legionella*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、マイコバクテリウム属(*Mycobacterium*)、ヘリコバクター属(*Helicobacter*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、アグロバクテリウム属(*Agrobacterium*)、リゾビウム属(*Rhizobium*)、キサントモナス属(*Xanthomonas*)、およびストレプトマイセス属)の種が挙げられるが、これらに限定されない))でもよく、真核生物(菌類(特に、酵母)、植物、原生動物および他の寄生生物、ならびに昆虫(特に、キイロショウジョウバエ属の種の細胞)、線虫(特に、セノルハブディティス・エレガンス細胞)、および哺乳動物(特に、ヒト細胞)を含む動物を含む))でもよい。

#### 【0201】

核酸の供給源として使用することができる哺乳動物体細胞として、血液細胞(網状赤血球および白血球)、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に由来する細胞)、筋肉細胞(骨格筋、平滑筋、または心筋に由来する筋細胞および筋芽細胞を含む)、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、および骨芽細胞を含む)、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。哺乳動物生殖細胞(精母細胞および卵母細胞)もまた本発明において使用するための核酸供給源として使用することができ、同様に、前記の体細胞および生殖細胞を生じる始原細胞、前駆細胞、および幹細胞を使用することができる。哺乳動物の組織または器官(例えば、脳、腎臓、肝臓、脾臓、血液、骨髄、筋肉、神経、皮膚、尿生殖器、循環器、リンパ、胃腸管、および結合組織供給源に由来する組織または器官、ならびに哺乳動物(ヒトを含む)胚または胎児に由来する組織または器官)も核酸供給源として使用するのに適している。

#### 【0202】

前記の原核生物または真核生物の細胞、組織、および器官のどれも、正常でもよく、患部由来でもよく、形質転換されたものでもよく、株化細胞でもよく、始原細胞でもよく、前駆体でもよく、胎児に由来してもよく、胚に由来してもよい。患部細胞として、例えば、(細菌、菌類もしくは酵母、ウイルス(AIDS、HIV、HTLV、ヘルペス、肝炎などを含む)、または寄生生物によって引き起こされる)感染症、遺伝的もしくは生化学的な病理(例えば、嚢胞性繊維症、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)、または癌プロセスに関与する細胞を挙げることができる。形質転換された、または株化された動物細胞系として、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細胞などを挙げることができる。本発明において使用するための核酸供給源として適した他の細胞、細胞系、組織、器官、および生物は当業者に明らかであろう。

#### 【0203】

出発細胞、組織、器官、または他の試料が得られたら、それらから核酸分子(例えば、mRNA)を当技術分野において周知の方法によって単離することができる(例えば、マニアティス(Maniatis), T.ら, *Cell* 15:687-701(1978); オカヤマ(Okayama), H. およびバーグ(Berg), P., *Mol. Cell. Biol.* 2:161-170(1982); グブラー(Gubler), U., およびホフマン(Hoffman), B. J., *Gene* 25:263-269(1983)を参照のこと)。次いで、このように単離された核酸分子は、

本発明に従ってcDNA分子およびcDNAライブラリーを調製するのに使用することができる。

【0204】

本発明の実施において、cDNA分子またはcDNAライブラリーは、前記のように得られた1つまたはそれ以上の核酸分子(好ましくは、1つまたはそれ以上のmRNA分子(例えば、mRNA分子の集団))と本発明の逆転写酵素活性を有するポリペプチドまたは本発明の組成物の1つもしくはそれ以上を、1つまたはそれ以上のcDNA分子(一本鎖または二本鎖)を形成するための、酵素または組成物の働きによる核酸分子の逆転写に好ましい条件下で、混合することによって生成される。従って、本発明の方法は、(a)1つまたはそれ以上の核酸鋳型(好ましくは、1つまたはそれ以上のRNAまたはmRNA鋳型(例えば、mRNA分子の集団))と、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素を混合する段階、および(b)1つまたはそれ以上の鋳型の全てまたは一部と相補的な1つまたはそれ以上の核酸分子を作製するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階を含む。このような方法は、1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼ、1つまたはそれ以上のヌクレオチド、1つまたはそれ以上のプライマー、1つまたはそれ以上の緩衝液などの使用を含んでもよい。本発明は、cDNA合成法(例えば、以下の実施例に記載の方法)または当技術分野において周知の他の方法と共に使用することができる(例えば、cDNA分子またはライブラリーを生成するには、グブラー(Gubler), U. およびホフマン(Hoffman), B. J., Gene 25:263-269(1983); クラグ(Krug), M. S. およびバーガー(Berger), S. L., Meth. Enzymol. 152:316-325(1987); サンプルック(Sambrook), J. ら, 「分子クローニング: 実験マニュアル, 第2版」, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 8.60頁-8.63頁(1989); PCT国際公開公報第99/15702号; PCT国際公開公報第98/47912号; およびPCT国際公開公報第98/51699号)を参照のこと)。

10

20

【0205】

本発明を有利に使用することができる他のcDNA合成法は当業者に容易に明らかであろう。

【0206】

本発明に従ってcDNA分子またはライブラリーを入手した場合、さらなる分析または操作のために、これらのcDNAを単離することができる。詳細なcDNA精製法は、その全体が参照として本明細書に引用されるGENETRAPPER(商標)マニュアル(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad, CA))に開示されているが、当技術分野において周知である別の標準的なcDNA単離法(例えば、サンプルック(Sambrook), J. ら, 「分子クローニング: 実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第2版」, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 8.60頁-8.63頁(1989)を参照のこと)も使用することができる。

30

【0207】

本発明の他の局面において、本発明は、核酸分子を増幅および配列決定する方法において使用することができる。本発明のこの局面に従う核酸増幅法は一段階(例えば、一段階RT-PCR)反応でもよく、二段階(例えば、二段階RT-PCR)反応でもよい。本発明によれば、一段階RT-PCR型反応は1つのチューブ内で達成することができ、それによって汚染の可能性が低くなる。このような一段階反応は、(a)核酸鋳型(例えば、mRNA)と、1つまたはそれ以上の本発明の逆転写酵素および1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼを混合する段階、および(b)鋳型の全てまたは一部と相補的な核酸分子を増幅するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階を含む。このような増幅は、逆転写酵素活性単独で、またはDNAポリメラーゼ活性と組み合わせて達成することができる。二段階RT-PCR反応は2つの別々の段階で達成することができる。このような方法は、(a)核酸鋳型(例えば、mRNA)と本発明の逆転写酵素を混合する段階、(b)鋳型の全てまたは一部と相補的な核酸分子(例えば、DNA分子)を作製するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートする段階、(c)核酸分子と1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼを混合する段階、および(d)核酸分子を増幅するのに十分な条件下で、段階(c)の混合物をインキュベートする段階を含む。長い核酸分子(すなわち、約3Kb~5Kb長より長い核酸分子)を増幅するために、DNAポリメラーゼの組み合わせ(例えば、1つのDNAポリメラーゼは3'エキソヌクレアーゼ活性を有し、もう1つ

40

50

のDNAポリメラーゼは3'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に低下している)を使用してもよい。

#### 【0208】

本発明のこの局面に従う核酸配列決定法は、サイクルシーケンシング(増幅と組み合わせた配列決定)と標準的な配列決定反応の両方を含んでもよい。従って、本発明の配列決定法は、(a)配列決定しようとする核酸分子と、1つまたはそれ以上のプライマー、本発明の1つまたはそれ以上の逆転写酵素、1つまたはそれ以上のヌクレオチド、および1つまたはそれ以上の反応停止薬剤を混合する段階、(b)配列決定しようとする分子の全てまたは一部と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、混合物をインキュベートする段階、および(c)集団を分離して、配列決定しようとする分子の全てまたは一部のヌクレオチド配列を決定する段階を含む。本発明によれば、1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼ(好ましくは、耐熱性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に使用することができる。

#### 【0209】

本発明に従って使用することができる増幅法として、PCR(米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号)、鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification:SDA;米国特許第5,455,166号;欧州特許第0 684 315号)、ならびに核酸配列に基づく増幅(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification:NASBA;米国特許第5,409,818号;欧州特許第0 329 822号)、ならびにより複雑なPCRに基づく核酸フィンガープリンティング法(例えば、ランダム増幅多型DNA(Random Amplified Polymorphic DNA:RAPD)分析(ウィリアムス(Williams),J.G.K.ら,Nucl.Acids Res.18(22):6531-6535,1990)、アービトラリリープライムドPCR(Arbitrarily Primed PCR:AP-PCR;ウェルシュ(Welsh),J.およびマククレランド(McClelland),M.,Nucl.Acids Res.18(24):7213-7218,1990)、DNA増幅フィンガープリンティング(DNA Amplification Fingerprinting:DAF;カエタノ・アノレス(Caetano-Anolles)ら,Bio/Technology 9:553-557,1991)、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:DAMD;ヘアス(Heath),D.D.ら,Nucl.Acids Res.21(24):5782-5785,1993)、および増幅断片長多型(AFLP)分析(欧州特許第0 534 858号;ボス(Vos),P.ら,Nucl.Acids Res.23(21):4407-4414,1995;リン(Lin),J.J.およびクオ(Kuo),J.,FOCUS 17(2):66-70,1995))が挙げられる。本発明の組成物を使用することができる核酸配列決定法として、ジデオキシシーケンシング法(例えば、米国特許第4,962,022号および同第5,498,523号に開示される方法)が挙げられる。特に好ましい局面において、本発明は、1つまたはそれ以上のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む、核酸分子を増幅または配列決定する方法(例えば、前記のPCRに基づく任意の方法)において使用することができる。

#### 【0210】

##### キット

別の態様において、本発明は、核酸分子を逆転写もしくは増幅において使用されう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としてまとめることができる。本発明のこの局面に従うキットは、1つまたはそれ以上の容器手段(例えば、バイアル、チューブ、アンプル、瓶など)が密閉されている運搬手段(例えば、ボックス、カートン、チューブなど)を含み、ここで、第1の容器手段は、逆転写酵素活性を有する本発明の1つまたはそれ以上のポリペプチドを含む。逆転写酵素活性を有する1つを超えるポリペプチドが用いられる場合、これらのポリペプチドは、2つ以上のポリペプチドの混合物として1個の容器に入れられてもよく、別々の容器に入れられてもよい。本発明のキットはまた、(同じ容器または別々の容器に)1つもしくはそれ以上のDNAポリメラーゼ、適切な緩衝液、1つまたはそれ以上のヌクレオチド、および/または1つもしくはそれ以上のプライマーを含んでもよい。本発明のキットは、核酸(例えばベクターを含むDNA分子)の占有に対して競合する1つまたはそれ以上の宿主または細胞を含んでもよい。好ましい宿主は、大腸菌(DH5、DH5<sup>+</sup>、DH10B、HB101、Top10、および他のK-12株、ならびに大腸菌Bおよび大腸菌W株)のような化学的にコンピテントなまたは電氣的にコンピテント(electrocompetent)な

細菌を含んでもよい。

【0211】

本発明の特定の局面において、本発明のキット（例えば逆転写および増幅のキット）は、本発明の逆転写酵素活性を有する1つもしくはそれ以上のポリペプチド、核酸分子の合成に使用される1つもしくはそれ以上のヌクレオチド（これらの1つまたはそれ以上は例えば蛍光標識により標識してもよい）、および/または1つまたはそれ以上のプライマー（例えば、逆転写用オリゴ(dT))を含む1つまたはそれ以上の成分を（混合物で、または別々に）含んでもよい。このようなキット（逆転写および増幅のキットを含む）は、さらに、1つまたはそれ以上のDNAポリメラーゼを含んでもよい。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つもしくはそれ以上のポリペプチド、必要に応じて、1つもしくはそれ以上のDNAポリメラーゼ、核酸分子の配列決定に使用される1つしくはそれ以上の反応停止薬剤（例えば、ジデオキシヌクレオシド三リン酸分子）、1つしくはそれ以上のヌクレオチド、および/または1つしくはそれ以上のプライマーを含んでもよい。本発明の逆転写、増幅、および配列決定のキットに使用するのに適した、好ましい逆転写酵素活性を有するポリペプチド、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド、プライマー、および他の成分は前記のものを含む。本発明のこの局面に含まれるキットは、さらに、標準的な核酸の逆転写、増幅、または配列決定プロトコールを実施するのに必要な、さらなる試薬および化合物を含んでもよい。このような本発明の逆転写酵素活性を有するポリペプチド、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド、プライマー、およびさらなる試薬、成分、または化合物は1つまたはそれ以上の容器に含まれてもよく、このような容器に2つ以上の前記成分の混合物で含まれてもよく、本発明のキットの別々の容器に含まれてもよい。このようなキットは、さらに指示書（例えば本発明に従う核酸分子の標識に関するような、本発明の方法を実施するための指示書）を含んでもよい。

【0212】

核酸分子の使用

本発明の方法によって調製された核酸分子またはcDNAライブラリーは、例えば、クローニングおよび配列決定（すなわち、核酸分子のヌクレオチド配列の決定）によって、本発明の配列決定法によって、または当技術分野において標準である他の方法（例えば、DNA配列決定法に関する米国特許第4,962,022号および同第5,498,523号を参照のこと）によってさらに特徴付けることができる。または、これらの核酸分子は、当技術分野において周知の方法によって、産業工程において様々な材料（例えば、ハイブリダイゼーションプローブ）を製造するために使用することができる。cDNAからハイブリダイゼーションプローブが作製されると、例えば、医学分野の分野において、特定の遺伝子マーカー（例えば、癌マーカー、感染症もしくは遺伝病のマーカー、または胚発生マーカー）の存在について患者の細胞または組織を調べることができる。さらに、このようなハイブリダイゼーションプローブは、さらなる特徴付けのために、異なる細胞、組織、または生物から調製されたゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーからDNA断片を単離するのに使用することができる。

【0213】

本発明の核酸分子はまた、組換えDNA法において使用するための組成物を調製するのに使用することができる。従って、本発明は、本発明のcDNAまたは増幅された核酸分子を含む組換えベクター、組換えベクターで遺伝子操作された宿主細胞、これらのベクターおよび宿主細胞を用いて組換えポリペプチドを生成する方法、ならびにこれらの方法を用いて生成された組換えポリペプチドに関する。

【0214】

組換えベクターは、本発明のこの局面に従って、当技術分野において周知の方法を用いて、本発明の方法に従って調製されたcDNA分子または増幅された核酸分子の1つまたはそれ以上をベクターに挿入することによって生成することができる。本発明のこの局面において用いられるベクターは、例えば、ファージでもプラスミドでもよく、好ましくは、プラスミドである。関心対象のポリペプチドをコードする核酸にシス作用制御領域を含むべ



クターが好ましい。適切なトランス作用因子は宿主によって供給されてもよく、相補ベクターによって供給されてもよく、宿主への導入の際にベクター自身によって供給されてもよい。

【0215】

これに関するある好ましい態様において、ベクターは特異的発現をもたらす(従って「発現ベクター」と呼ばれる)、特異的発現は誘導性および/または細胞特異的でもよい。このようなベクターの中で、操作しやすい環境因子(例えば、温度および栄養添加物)によって誘導されるベクターが特に好ましい。

【0216】

本発明において有用な発現ベクターは、染色体、エピソーム、およびウイルスに由来するベクター(例えば、細菌プラスミドまたはバクテリオファージに由来するベクター)、およびその組み合わせに由来するベクター(例えば、コスミドおよびファージミド)を含み、好ましくは、少なくとも1つの選択マーカー(例えば、細菌宿主細胞を培養するためのテトラサイクリン耐性遺伝子またはアンピシリン耐性遺伝子)を含む。本発明のcDNAまたは増幅された核酸分子は、このような発現ベクターに挿入される前に適切なプロモーター(例えば、ファージ P<sub>L</sub>プロモーター、大腸菌 lac、trp、および tacプロモーター)に機能的に連結されるべきである。他の適切なプロモーターは当業者に周知であろう。

【0217】

本発明での使用に好ましいベクターの中には、pQE70、pQE60、pQE-9(キアゲン(Qiagen)から入手可能);pBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(ストラタジーン(Stratagene)から入手可能);pcDNA3(インビトロゲン(Invitrogen)から入手可能);pGEX、pTrxfus、pTrc99a、pET-5、pET-9、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(ファルマシア(Pharmacia)から入手可能);ならびにpSPORT1、pSPORT2、およびpSV・SPORT1(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad, CA)から入手可能)が含まれる。他の適切なベクターは当業者に容易に明らかであろう。

【0218】

本発明はまた、本発明のcDNA分子、増幅された核酸分子、または組換え体ベクターを含む組換え宿主細胞を生成する方法、ならびにこのような方法によって生成された宿主細胞を提供する。本発明に従って生成することができる代表的な宿主細胞(原核生物または真核生物)として、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、および動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい細菌宿主細胞として、大腸菌細胞(最も詳細には、市販されている大腸菌DH10B株およびStbl2株(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad, CA))、枯草菌細胞、バチルス・メガテリウム(Bacillus megaterium)細胞、ストレプトマイセス属の種の細胞、エルウィニア属の種の細胞、クレブシエラ属(Klebsiella)の種の細胞、およびネズミチフス菌細胞が挙げられる。好ましい動物宿主細胞として、昆虫細胞(最も詳細には、スポドプテラ・フルギペルダSp9およびSf21細胞ならびにトリコプルサハイファイブ細胞)、ならびに哺乳動物細胞(最も詳細には、CHO、COS、VERO、BHK、およびヒト細胞)が挙げられる。このような宿主細胞は、当業者によく知られている周知の形質転換、エレクトロポレーション、またはトランスフェクション技法によって調製することができる。

【0219】

さらに、本発明は、組換えポリペプチドを生成する方法、およびこれらの方法によって生成されたポリペプチドを提供する。本発明のこの局面によれば、組換えポリペプチドは、前記の任意の組換え宿主細胞を、組換え宿主細胞からのポリペプチドの生成およびポリペプチドの単離に好ましい条件下で培養することによって生成することができる。組換え宿主細胞を培養する方法ならびに組換え宿主細胞からポリペプチドを生成および単離する方法は当業者に周知である。

【0220】

本明細書に記載の方法および用途への他の適切な変更および適応が自明であり、本発明

10

20

30

40

50

の範囲または本発明のどの態様も逸脱することなく変更および適応が可能なことは関連技術の当業者に容易に明らかであろう。これまでに、本発明を詳細に説明したが、例示のために本明細書に含まれ、本発明を限定することが意図されない以下の実施例を参照することによって、本発明はさらに明確に理解されるだろう。

#### 【 0 2 2 1 】

##### 実施例

##### 実施例1: 逆転写酵素変異体の調製

プラスミドpBADをInvitrogen Corporation, Carlsbad, CAから入手し、M-MLV逆転写酵素のコード配列を挿入して、プラスミドpBAD-6-His-M-MLV H-(F1)を得た。プラスミドpBAD-6-His-M-MLV H-(F1)をクローニングベクターおよびPCR変異誘発の標的として使用した(図1)。pBAD-6-His-M-MLV H-(F1)は大腸菌において複製し、形質転換細胞にアンピシリン耐性を付与する。M-MLV逆転写酵素遺伝子は、アラビノースの存在によって誘導されるaraBADプロモーターから発現される。このプロモーターは、プラスミドに存在するaraC遺伝子産物によって抑制される。使用した宿主、大腸菌DH10B株はaraD変異体であり、アラビノースを代謝することができず、このため、アラビノースは、pBAD-6-His-M-MLV H-(F1)で形質転換されたDH10B細胞において無償性誘導物質となる。このプラスミドは、M-MLV逆転写酵素遺伝子のコード配列とインフレームで6ヒスチジン含有リーダー配列を含む。ヌクレオチド2598で開始しヌクレオチド4628で終了する遺伝子(Shinnick, ら, (1981) Nature 293, 543-548)を、araDプロモーターの制御下でプラスミドpBAD/HisA(Invitrogen)にクローニングした。M-MLV遺伝子を、この遺伝子を5つのセグメントに分けたいくつかの独特な制限エンドヌクレアーゼ部位を含むように、アミノ酸コードを変化させることなく、部位特異的変異誘発によってさらに改変した(図2)。このタンパク質のアミノ末端は、精製を単純化するためにHis<sub>6</sub>タグを含み、これはSEQ ID NO:2のアミノ酸1-32に対応する以下のアミノ酸

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH

を含んだ。このタンパク質のカルボキシ末端は、pRT601からのサブクローニングの結果として存在する、SEQ ID NO:2のアミノ酸711-716に対応するさらなるアミノ酸NSRLINを含んだ。さらに、M-MLV RT遺伝子を、RNase活性を除去するために変異させた(D524G、E562Q、D583N)。最終的な構築物はpBAD-HSS2(図1)と呼ばれ、この遺伝子および遺伝子産物はHis<sub>6</sub>H-RTと呼ばれた。この構築物に加えて、N末端配列を有する他の構築物が本発明において意図される。例えば、N末端配列

MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:1)

続いて表3からのM-MLV RTの残りの配列を有するタンパク質を産生するために、SEQ ID NO:6および表3のメチオニン12で開始し、メチオニン15をグリシンに変化させる変異(M15G)を含む構築物、ならびに、SEQ ID NO:6および表3のメチオニン33で開始する構築物を産生した。

#### 【 0 2 2 2 】

表3に示される、このプラスミドの配列(配列番号:1および2)に関して、ヌクレオチド1~96はリーダー配列をコードし、ヌクレオチド97~99はメチオニンをコードする。野生型M-MLV逆転写酵素は前駆体ポリタンパク質からのタンパク質分解によって得られ、従って、野生型M-MLV逆転写酵素はメチオニンから始まらないことを、当業者は理解するだろう。従って、M-MLV逆転写酵素の一番目のアミノ酸は、ヌクレオチド97~99(SEQ ID NO:2および表3のアミノ酸33)によってコードされるメチオニンの後のスレオニン(SEQ ID NO:2および表3のアミノ酸34)である。

#### 【 0 2 2 3 】

これらの実験で用いられたpBAD-6-His-M-MLV H-(F1)におけるM-MLV逆転写酵素遺伝子の配列はプラスミドpRT601の配列から得た。pRT601は、その全体が参照として本明細書に引用されるKotewicz, ら, (1988) Nuc. Acids Res. 16, 265-277, Gerard, ら, (1986) DNA

5, 271-279、米国特許第5,668,005号および同第5,017,492号に開示されている。

【 0 2 2 4 】

(表3) 配列番号: 1および2

```

1   atgggggggtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa
    m g g s h h h h h h g m a s m t g g q q

61  atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aagcatatga ccctaaatat agaagatgag
    m g r d l y d d d d k h m t l n i e d e

121 tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc taggggtccac atggctgtct
    y r l h e t s k e p d v s l g s t w l s

181 gatttttctc aggccctgggc ggaaccggg ggcattgggac tggcagttcg ccaagctcct
    d f p q a w a e t g g m g l a v r q a p

241 ctgatcatatc ttctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca taaaacaata ccccatgtca
    l i i l l k a t s t p v s i k q y p m s

301 caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac tgttggacca gggaatactg
    q e a r l g i k p h i q r l l d q g i l

361 gtaccctgcc agtccccctg gaacacgcc ctgctacccg tcaagaaacc cgggactaat
    v p c q s p w n t p l l p v k k p g t n

421 gattacaggc ctgtccaaga tctgagagag gtcaacaaac gcgtagaaga catccacccc
    d y r p v q d l r e v n k r v e d i h p

481 accgtaccca acccctacaa cctcttgagt gggctccac cgtccacca gtggtacact
    t v p n p y n l l s g l p p s h q w y t

541 gttctagact taaaagatgc ctttttctgc ctgagactcc acccgacgtc tcagcctctc
    v l d l k d a f f c l r l h p t s q p l

601 ttgccttttg aatggagaga ccagagatg ggaatctctg gccaaactaac ctggaccaga
    f a f e w r d p e m g i s g q l t w t r

661 ctcccacagg gattcaaaaa cagtccacc ctgtttgatg aggcactgcg cagagaccta
    l p q g f k n s p t l f d e a l r r d l

721 gcagacttcc ggatccagca ccagacttg atcctgctac agtacgtaga tgacttactg
    a d f r i q h p d l i l l q y v d d l l

781 ctggccgcca cttctgagct cgactgccaa caagggtactc gggccctggt acaaacccta
    l a a t s e l d c q q g t r a l l q t l

841 ggagacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaaa tttgccagaa acaggtcaag
    g d l g y r a s a k k a q i c q k q v k

901 tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga ctgaggccag aaaagagact
    y l g y l l k e g q r w l t e a r k e t

961 gtgatggggc agcctactcc gaagaccccg cggcaactaa gggagtccct agggacggca
    v m g q p t p k t p r q l r e f l g t a

1021 ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg cagccccctt gtaccctctc
    g f c r l w i p g f a e m a a p l y p l

1081 accaaaacgg ggactctggt taattggggc ccagaccaac aaaaggccta tcaagaaatc
    t k t g t l f n w g p d q q k a y q e i

1141 aagcaagctc ttctaactgc ccagccctg gggttgccag atttgactaa gccctttgaa
    k q a l l t a p a l g l p d l t k p f e

```

10

20

30

40

1201 ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc taacgcaaaa actgggacct  
       l f v d e k q g y a k g v l t q k l g p  
 1261 tggcgctcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc cagtagcagc tgggtggccc  
       w r r p v a y l s k k l d p v a a g w p  
 1321 ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa aggatgcagg caagctaacc  
       p c l r m v a a i a v l t k d a g k l t  
 1381 atgggacagc cactagtcac tctggccccc catgcagtag aggcaactagt caaacaaccc  
       m g q p l v i l a p h a v e a l v k q p  
 1441 cccgatcgat ggctttccaa cgcccggatg actcactatc aggccttgct tttggacacg  
       p d r w l s n a r m t h y q a l l l d t  
 1501 gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg ctacactgct cccactgcct  
       d r v q f g p v v a l n p a t l l p l p  
 1561 gaggaagggc tgcagcacia ctgccttgat atcctggccg aagcccacgg aacccgaccc  
       e e g l q h n c l d i l a e a h g t r p  
 1621 gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct ggtacacggg tggatccagt  
       d l t d q p l p d a d h t w y t g g s s  
 1681 ctcttgcaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga ccaccgagac cgaggtaatc  
       l l q e g q r k a g a a v t t e t e v i  
 1741 tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg ctcagctgat agcactcacc  
       w a k a l p a g t s a q r a q l i a l t  
 1801 caggccctaa ggatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt atacgaattc ccgttatgct  
       q a l r m a e g k k l n v y t n s r y a  
 1861 tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc gtgggttgct cacatcagaa  
       f a t a h i h g e i y r r r g l l t s e  
 1921 ggcaaagaga tcaaaaataa ggacgagata ttggccctac taaaagccct ctttctgccc  
       g k e i k n k d e i l a l l k a l f l p  
 1981 aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg gacacagcgc cgaggctaga  
       k r l s i i h c p g h q k g h s a e a r  
 2041 ggcaaccgga tggctgacca agcggcccgga aaggcagcca tcacagagaa tccagacacc  
       g n r m a d q a a r k a a i t e n p d t  
 2101 tctaccctcc tcatagaaaa ttcatcaccc aattcccgcct taattaatta a  
       s t l l i e n s s p n s r l i n -

10

20

30

## 【 0 2 2 5 】

表4は、使用したプラスミドを生成するためにpRT601のM-MLV逆転写酵素コード配列に導入された点変異のリストを示す。点変異の番号付けは表3に示したヌクレオチド配列に対応する。

40

## 【 0 2 2 6 】

(表4)

表3における ヌクレオチド番号	変化
411	a,c
459	g,a
462	g,c
543	g,t
546	t,a
585	c,g
588	c,g
589	a,t
590	g,c
639	a,t
642	a,c
710	a,g
801	a,c
990	t,g

表3における ヌクレオチド番号	変化
993	a,g
1446	c,t
1449	c,a
1670	a,g
1675	a,t
1676	g,c
1783	g,c
1785	a,g
1845	t,g
1846	g,a
1849	a,t
1850	g,c
1950	c,a

10

## 【0227】

M-MLV逆転写酵素のRNaseH-変異体を作製するために導入された変異は、D524G、D583N、およびE562Qである。残りの変異は、ランダムPCR変異誘発用の適切な大きさのセグメントの生成を容易にする制限酵素部位を挿入または除去するために導入された。このRNaseH-

20

## 【0228】

M-MLV逆転写酵素の配列は、この配列によってコードされるアミノ酸を変えることなく図2に模式的に示すように制限酵素切断部位を導入するように操作された。配列を5つのセグメントに分け、各セグメントを増幅できるようにオリゴヌクレオチドを設計した。これらのセグメントは、RTの5つの別々の構造的サブドメインのコード配列にほぼ一致する (Kohlstaedt, ら, (1992) Science 256, 1783-1789, Jacobo-Molina, ら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6320-6324)。セグメント1から4は、それぞれ、フィンガー、パーム、サム、およびコネクションのポリメラーゼサブドメインに対応し、セグメント5はRNase Hドメインに対応する (図2)。セグメント当たり1~2個の変異の上限カットオフを、有害な変異の蓄積を抑制するため、および活性な変異を見い出すために必要とされるスクリーニングの量を最小化するために、変異の頻度についての標的として設定した。セグメント1、2、または3における>5個の変異/セグメントの変異頻度は、野生型の活性に満たない活性を有するすべての変異で約5%の活性変異体のみを産生した。セグメント当たり1~2個の変異の使用される変異頻度で、約3分の1の変異体が活性がほとんどないか、活性を有さず、3分の1がHis<sub>6</sub> H-RT活性の50%未満の活性を有し、そして3分の1がHis<sub>6</sub> H-RT活性の100%までの活性を有した。

30

## 【0229】

セグメントを、制限酵素消化によってpBAD-6-His-M-MLV H-(F1)から調製し、ゲル精製してベクターバックボーンから分離した。各セグメントを、マンガンの存在下でPCRによってランダムに変異誘発させた。PCR条件は、0.25mM MnCl<sub>2</sub>が存在した以外は標準的な条件であり、ヌクレオチド三リン酸濃度は20 μM (各dNTP)に制限された(50mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、20 μM dGTP、20 μM dCTP、20 μM dATP、20 μM dTTP、1単位Taq DNAポリメラーゼ/100 μl反応)。PCR産物をフェノール-クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、変異セグメントを、所定のセグメントが除去されているベクターにクローニングした。

40

## 【0230】

いくつかのランダム変異誘発実験において、変異誘発PCRを、20mM Tris-HCl (pH 8.4)、50mM KCl、1.8mM MgCl<sub>2</sub>、0.3mM MnSO<sub>4</sub>、200 μM 各dCTP、dGTP、dTTP、およびdATP、なら

50

びに0.5単位のTaq DNAポリメラーゼ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を含む反応混合物中で実行した。94 で1分間の変性段階の後で、サイクルプロトコールは94 で15秒間、55 で15秒間、および72 で30秒間の20サイクルであった。増幅は、50ngの標的から5 µgの増幅産物までの100倍であった。PCRプライマーは、適切な制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含んだ。増幅されたDNAセグメントを適切な制限エンドヌクレアーゼで切断し、ゲル精製し、および対応する制限酵素で切断したゲル精製されたベクターDNAにクローニングした。変異したセグメントを含むベクターを適切な宿主細胞に形質転換してライブラリーを作製した。

#### 【0231】

ライブラリーを、変異の頻度を決定するために、少数のクローンの変異誘発したH-RT遺伝子セグメントのDNA配列決定によってサンプリングした。目的は、セグメント当たり産生される1~2個の変異PCRランダム変異誘発の割合を達成することであった。セグメント当たり2変異より多く産生されたランダム変異誘発は、大きな割合の不活性なRT変異を生じる傾向があることが見い出された。ライブラリーがこの判定基準に合致した場合、熱処理によるさらなるスクリーニングを実行して、熱処理段階後に溶解物中でH-RTよりも高いRT活性を示した変異体を同定した。最も高い見かけの耐熱性を有する変異体を、24 (活性について標準化するため) および52 ~ 58 での前処理によって、二連で再度スクリーニングして、向上した耐熱性の存在を確認した。全部で、約15,000クローンを、熱処理によって、96ウェル形式で、各セグメントについてスクリーニングし、すなわち、総計約100,000変異体をスクリーニングした。各変異セグメントの形質転換体ライブラリーを耐熱性変種についてスクリーニングした。

#### 【0232】

##### 実施例2: 耐熱性逆転写酵素のスクリーニング

本実施例では、以下の溶液を使用した。

EG/リットル: バクトトリプトン 20g、バクト酵母エキス 10g、グリセロール 2ml、NaCl 0.54g、KCl 0.194g

EG-アラビノース: EG 150ml+10mg/ml アンピシリン 1.5ml および20%(w/v) アラビノース 1.5ml (プレートにアラビノースを添加する場合)

20 × PEB-I 緩衝液: 18%(w/v) グルコース、500mM Tris-HCl (pH8.0)、200mM EDTA

キナーゼ保存緩衝液: 50%(v/v) グリセロール、20mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM KCl、5mM ME

100mg/ml リゾチーム: キナーゼ保存緩衝液に溶解して作製し、-20 で保存

2 × PLD: 20 × PEB-I 5ml、1M DTT 1ml、10%(v/v) Triton X-100 5ml、100mg/ml リゾチーム 1ml、および水 38ml

2 × PZD: 20 × PEB-I 0.5ml、1M DTT 100 µl、10%(v/v) Triton X-100 0.5ml、ザイモラーゼ (zymolase) 10 µl、水 3.9ml

10 × ポリ(C) 反応緩衝液: 500mM Tris-HCl (pH8.4)、500mM KCl、100mM MgCl<sub>2</sub>

1.25 × 反応ミックス: 10 × ポリ(C) 反応緩衝液 1ml、1M DTT 100 µl、ポリ(C)/オリゴ(dG) (ヌクレオチド中で30mM/12mM) 1ml、100mM dGTP 10 µl、水 5.87ml、および [γ-<sup>32</sup>P]dGTP (10 µCi/µl) 20 µl。

#### 【0233】

大腸菌 DH10B (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) をすべての実験において使用した。細菌液体培養物を、37 で、EG: 2%トリプトン、1%酵母抽出物、0.5%グリセロール、10mM NaCl、および1mM KCl中で増殖させた。固体培地は、LB (1%バクト-トリプトン、0.5%酵母抽出物、および86mM NaCl) +1.5%寒天であった。選択培地は100 µg/ml アンピシリンを含んだ。培養物の誘導のために、細胞を選択的EG+0.2%アラビノース中に接種し。18時間増殖させた。

#### 【0234】

変異体集団を選択寒天上にプレートした。個々の形質転換体コロニーを96ウェル培養プレートの単一のウェルに接種した。各ウェルは、120 µlのEG-Ap培地 (100 µg/ml アンピシ

10

20

30

40

50

リンを有するEG培地)を含んだ。選択寒天からのコロニーは0.2%アラビノースを含む培地中で増殖され得るが、誘導物質なしの選択培地を有する96ウェルプレートに最初に接種すること、マスタープレートを一晩増殖させること、次いで誘導物質を有する96ウェルプレートにマスタープレートのレプリカを作製し、そのプレートを一晩増殖させることが好ましい。

#### 【0235】

各ウェルからの誘導されていない培養物のアリコート(5 $\mu$ l)を、ウェル当たり120 $\mu$ lの選択培地+0.2%アラビノースを含む新しい96ウェルプレートに移した。誘導物質を含む培養物を、振盪させずに37 $^{\circ}$ Cで一晩(例えば、15-20時間)増殖させてRT産生を誘導した。次いで、各ウェルからの培養物のアリコート(5 $\mu$ l)を、室温で、ウェル当たり5 $\mu$ lの2XPLD(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 20mM EDTA, 1.8% (w/v) スクロース, 1% (v/v) Triton X-100, 10mM DTT, および2mg/ml リゾチーム)を含む別の96プレートに移した。これらの抽出物を、時折、加熱段階の前に逆転写酵素について直接的にアッセイした。抽出物の5 $\mu$ lアリコート中のRT活性の量は、アッセイの直線範囲内であった。溶解物は、室温で少なくとも1時間安定であった。

#### 【0236】

この抽出物を、例えば、ウォーターバスまたはサーモサイ클ラーを使用して、50 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ Cの範囲の温度で5または10分間加熱した。好ましくは、培養物は52 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。加熱および室温への冷却後、各ウェル中の溶解物からの5 $\mu$ lアリコート中のRT活性を、別の96ウェルプレート中の(rC) $_n$ ・(dG) $_{15}$ を用いてアッセイした。抽出物のアリコート(5~10 $\mu$ l)を1.25 $\times$  RT反応混合物と混合した。この反応物を37 $^{\circ}$ Cの水浴に10分間入れた。少量(5 $\mu$ l)の混合物を等量、荷電したナイロン膜(Genescreen+, NEN)の上にスポットした。膜を10%TCA+1%ピロリン酸ナトリウムで2回洗浄し、エタノールですすぎ、乾燥させ、ホスファースクリーン(phosphor screen)のすぐ隣に配置した。代替として、膜を4%ピロリン酸ナトリウム(pH8.0)で2回洗浄し、エタノールですすぎ、乾燥させ、次いで、ホスファースクリーンのすぐ隣に配置した。ImageQuantソフトウェア(モレキュラーデバイシーズ(Molecular Devices))を用いて、スクリーンをPosphorimagerにおいて分析することで、フィルター上に捕らえられた放射性産物を検出した。

#### 【0237】

候補は、加熱不活化段階後に大きな逆転写酵素活性(放射能)を示した場合に選択された。表現型を確認するために、これらの候補に2回目のスクリーニングを行った。2回目のスクリーニング後に耐熱性であると判断された候補を少量培養で増殖させ、耐熱性逆転写酵素活性についての3回目の試験を行った。再現可能に熱に対して耐性であった候補を配列決定し、各クローンの変異を決定した。

#### 【0238】

プラスミドDNAを、Concert High Purity Miniprep Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)を使用して、製造業者の説明書に従って、RT変異体を有する一晩大腸菌培養物から調製した。各DNAを、変異体を生成するために変異誘発されたセグメントに隣接する正方向プライマーおよび逆方向プライマーを使用して配列決定した。配列決定反応を、ABI Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kitを使用してプラスミドDNAについて特定されるように実行した。反応物をABI PRISM 377 DNA Sequencerを使用して分析した。

#### 【0239】

変異誘発されたアミノ酸についてのコドンがランダム化されている(NNKまたはNNN)、変異誘発された部位に対応するオリゴヌクレオチドを設計した。オリゴヌクレオチド部位特異的変異誘発を確立された手順で実行した。H-RT遺伝子におけるアミノ酸コード部位のすべての可能なアミノ酸での飽和を、コドン部位において配列NNK(N=A, C, GまたはTおよびK=GまたはT)を変異誘発オリゴヌクレオチドに導入することによって実行した。変異誘発部位で可能な全ての置換が行われたライブラリーを作製するために、これらのオリゴヌクレオチドを部位特異的変異誘発に使用した。このライブラリーを耐熱性逆転写酵素活

性についてスクリーニングし、最も見込みのあるクローンを配列決定した。

#### 【0240】

セグメント2(図2を参照のこと)における変異体のスクリーニングによって、1つの変異体H204Rが特定された。部位H204で変異誘発されたライブラリーのスクリーニングによって、いくつかの変異体を得られたが、M-MLV逆転写酵素より耐熱性がある唯一の変異体は別のH204R変異体であった。M-MLV逆転写酵素のH204R変異体は耐熱性が向上している。セグメント3(図2を参照のこと)における変異体のスクリーニングによって、1つの変異体T306Kが得られた。T306位置の無作為化によって耐熱性変異体を得られ、これを配列決定するとT306Rであった。M-MLV逆転写酵素のT306K変異体およびT306R変異体は両方とも耐熱性が約1.5倍向上している。

10

#### 【0241】

##### 実施例3:TdT逆転写酵素変異体

3 dNTPアッセイにおける誤伸長について逆転写酵素(RT)の忠実度変異体を調べた際に、SuperScript(商標)II逆転写酵素は、3種類および4種類のdNTPの存在下で鋳型末端を過ぎて2~3個塩基を伸長することが観察された。この非鋳型特異的伸長すなわちTdT活性は多くの変異体において低下しているが、F309NおよびT197Eなどの少数の変異体において、この活性は著しく低下しているか、または無くなっているように見える。これらの変異体は、恐らく、HIV逆転写酵素との相同性および結合した鋳型-プライマーとの結晶構造によって確かめられたように、鋳型-プライマーに近接しているか、または鋳型-プライマーと接触している。

20

#### 【0242】

##### 方法

##### 変異誘発

##### F309Nの場合:

アミノ酸位置310~311にNgoMIV制限部位のサイレント挿入を有する、変異位置F309に対応したプライマーを設計した。このプライマーは、この位置に、F309変異体のランダムライブラリーを生じるランダムNNK配列をコードしていた。式中、Nは4種類の塩基のいずれかであり、KはTまたはGである。このプライマーと、上流SstI制限部位および下流SalI制限部位での内部SUPERSRIPT(商標)II逆転写酵素プライマーを標準的なPCR反応に使用して(SUPERSRIPT(商標)II逆転写酵素鋳型10ng、2μM各プライマー、SuperMix(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA))48μl、94 15秒、55 15秒、72 30秒の20サイクル)、2つのPCR断片を得た。これらは、240塩基対のSstI-NgoMIV断片および200塩基対のNgoMIV-SalI断片であった。断片を単離し、消化し、一緒に連結し、次いで、SstIおよびSalIで切断された最初のSUPERSRIPT(商標)II逆転写酵素クローンに挿入した。結果として生じた連結産物を、Max Efficiency DH10B(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA))コンピテント細胞において形質転換して、部位F309の変異体ライブラリーを得た。次いで、選択のために、このライブラリーを一晩プレートした。

30

#### 【0243】

##### T197EおよびY133Aの場合:

40

変異体T197EおよびY133Aは、クンケル(Kunkel),T.A.ら,Methods Enzymol.204:125(1991)に記載のようにオリゴ特異的変異誘発によって作製した。簡単に述べると、SUPERSRIPT(商標)II逆転写酵素遺伝子をpBADhisA(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corp.))ベクターに挿入し、pBAD-SSIIと名付けた。このプラスミドをDH11S細胞に形質転換し、この細胞にM13K07ヘルパーファージを感染させ、このファージから一本鎖DNAを単離した。各変異:T197EおよびY133Aに対応するオリゴを設計した。各オリゴ(100μM)を、フォワード反応緩衝液(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA))を用いてT4ポリヌクレオチドキナーゼ(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA))でリン酸化した。オリゴを一本鎖pBAD-SSII DNAとアニールさせた。合成緩衝液(0.4mM dNTP、17.5mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM MgCl<sub>2</sub>、2.5mM DTT、

50



および1mM ATP)と共に、ネイティブなT7 DNAポリメラーゼ(USB)およびT4 DNAリガーゼ(インビトロゲンコーポレーション(Invitrogen Corporation)(Carlsbad,CA))を、氷上で、アニールされた反応物に添加した。反応物を37℃で30分間インキュベートし、0.5M EDTA 1 μlを添加することで終結させた。反応物をDH10B細胞で形質転換し、プレートした。コロニーをつつき、変異体を制限酵素分析によって確かめ、確認のために、ABI 377装置およびABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキットを用いて配列決定した。

#### 【0244】

活性のある逆転写酵素を含むコロニーの選択

個々の形質転換体コロニーを96ウェル培養プレートのシングルウェルに接種した。各ウェルは、0.2%アラビノースを含む培地(EG-Ap)120 μlを含んでいた。まず最初に、96ウェルプレートに誘導物質を含まない選択培地を接種し、このマスタープレートを一晚増殖させ、次いで、マスタープレートのレプリカを、誘導物質を含む96ウェルプレートに作製し、このプレートを一晚増殖させることが好ましい。培養物を振盪せずに37℃で一晩増殖させた。一晚培養物を、等量の2×PLD(1.8%グルコース、50mM Tris-HCl(pH8.0)、20mM EDTA、20mM DTT、1%Triton X-100、2mg/mLリゾチーム)と室温で混合した。抽出物10 μlを1.25×RT反応ミックス(62.5mM Tris-HCl(pH8.4)、62.5mM KCl、12.5mM MgCl<sub>2</sub>、12.5mM DTT、1.25mM dGTP、ポリC/オリゴdG(ヌクレオチド中3.75mM/1.5mM)、[<sup>32</sup>P]dGTP)40 μlと混合することで、これらの抽出物を逆転写酵素活性について直接アッセイした。この反応物を37℃の水浴に10分間入れた。反応混合物の少量のアリコート(5 μl)を、荷電したナイロン膜(Genescreen+, NEN)の上にスポットした。膜を10%TCA+1%ピロリン酸ナトリウムで2回洗浄し、エタノールですすぎ、乾燥させ、ホスファースクリーンのすぐ隣に配置した。ImageQuantソフトウェア(モレキュラーデバイシーズ)を用いて、スクリーンをPosphorimagerにおいて分析することで、フィルター上に捕らえられた放射性産物を検出した。候補は、逆転写酵素活性(放射能)を示した場合に選択された。表現型を確認するために、これらの候補に2回目のスクリーニングを行った。次いで、どのアミノ酸が検出可能な逆転写酵素活性を維持したかを確かめるために、確認された候補を配列決定した。

#### 【0245】

逆転写酵素変異体の精製

細胞ペレット1グラムにつき溶解緩衝液(40mM Tris-HCl(pH8.0)、0.1M KCl、1mM PMSF)2 mLの比で、誘導された逆転写酵素を含む細胞ペレットを懸濁した。懸濁液を氷上で超音波処理し、次いで、27,000gで30分間遠心分離した。細胞を含まない抽出物を0.45 μm シリンジフィルターに通して濾過した。緩衝液A(40mM Tris HCl(pH8.0)、10%グリセロール、0.01%Triton X-100、0.1M KCl)に溶解した5容量の5mMイミダゾールで予め平衡化された5mL Ni<sup>2+</sup>HI-TRAPカラム(ファルマシア(Pharmacia))に、1mL/分で、細胞を含まない抽出物を加えた。カラムを、緩衝液Aに溶解した10容量の5mMイミダゾールで洗浄した。緩衝液Aに溶解した20容量の5mM~1Mイミダゾールの勾配で洗浄することで、逆転写酵素を溶出させた。緩衝液B(40mM Tris-HCl(pH8.0)、10%グリセロール、0.01%Triton X-100、0.1mM EDTA、1mM DTT)に溶解した50mM KCl 10カラム体積で予め平衡化された1mL Mono-Sカラム(ファルマシア)に、1.0mL/分の流速で、逆転写酵素タンパク質を含む溶出液を加えた。カラムを、緩衝液Bに溶解した10容量の50mM KClで洗浄した。逆転写酵素を、緩衝液Bに溶解した20容量の50mM~1M KClの勾配で溶出させた。個々の画分をRT活性について分析した。ピークRT活性を含む画分を、保存緩衝液(40mM Tris-HCl(pH8.0)、50%グリセロール、0.01%Triton X-100、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.1M KCl)に対して透析した。精製された逆転写酵素は、SDS-PAGEによって判断されたように95%を超えて純粋であった。タンパク質濃度はバイオラッド(Biorad)比色キットを用いて決定した。

#### 【0246】

3 dNTPアッセイ法

手順は、プレストン(Preston), B.D.らScience 242:1168(1988)の手順に変更を加えたものであった。DNA鋳型-プライマーは、47マー鋳型

(5'-

GAGTTACAGTGTTTTTGTTCAGTCTGTAGCAGTGTGTGAATGGAA

G-3') (SEQ ID NO:6)

を、T4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端に $[^{32}\text{P}]$ 標識された18マープライマー

(5'-CTTCCATTCACACACTGC-3') (SEQ ID NO:7)

(鑄型: プライマー, 3:1) にアニールさせることで調製された。アッセイ混合物(10  $\mu\text{l}$ ) は、5nM 鑄型-プライマー、図の説明文に明記したような50nM ~ 200nMの逆転写酵素、3種類または4種類のdNTP(各250  $\mu\text{M}$ )、50mM Tris-HCl(pH8.3)、75mM KCl、3mM  $\text{MgCl}_2$ 、10mM DTTを含んでいた。反応物を37 °Cで30分間インキュベートし、40mM EDTA、99%ホルムアミド5  $\mu\text{l}$ を添加することで終結させた。95 °Cで5分間インキュベートすることで反応産物を変性させ、尿素6%ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によって分析した。

【0247】

4種類全てのdNTPを使用した3 dNTPアッセイの対照反応においてTdT活性が生じたかを確かめるために、37 °Cで30分間、様々な量の酵素(>600単位から20単位)を用いて対照反応を繰り返した。SUPERScript(商標)II, T197EおよびY133Aについては、200、100、50、および20単位を使用した。F309Nについては、646、200、50、および20単位を使用した。

【0248】

結果

本発明者らは、DNA鑄型を用いてF309N(H204R、T306K)SUPERScript(商標)II逆転写酵素(以下、F309Nと呼ぶ)の誤挿入アッセイを行った。このアッセイは、変異体とSUPERScript(商標)IIとの誤った取り込みの能力を比較するために用いられた。このアッセイは、合成DNA鑄型-プライマーおよび4種類のdNTPのうち3種類しか含まない偏ったdNTPプールを用いたプライマー伸長アッセイである。反応を図3のゲルに示す。誤挿入/誤伸長の率が低い変異体をスクリーニングするために、この手順を行っている間、SUPERScript(商標)II逆転写酵素は鑄型末端を越えて2~3個ヌクレオチドを伸長し、一部の变異は、この非鑄型特異的伸長すなわちTdT活性を低下させたか、または無くすように観察された。図4に示すように、4種類全てのdNTPの存在下で、SUPERScript(商標)II逆転写酵素および変異体F309Nはほぼ等しくプライマーを伸長することができ、SUPERScript(商標)II逆転写酵素は鑄型を越えて2ヌクレオチドを付加し、F309Nは鑄型末端を越えて何も付加しなかった。この非鑄型特異的伸長をさらに評価するために、4種類全てのdNTPを含む3 dNTP誤挿入アッセイの対照反応を、SUPERScript(商標)II、F309N、T197E、およびY133A逆転写酵素を用いて、30分間、様々な量の酵素で行った。3つの変異体は、先のスクリーニングにおいて非常に低下したレベルのTdT活性を示していた。20単位の酵素で5分は、完了させようとするプライマー伸長に十分すぎる時間であることが観察されているので、30分のインキュベーションおよび200~646単位の逆転写酵素は両方とも、完了させようとする反応に必要なものをはるかに超えていた。図4に示すように、試験した最小量での逆転写酵素反応の全てに最大単位濃度での反応と同様の伸長産物があり、このことは反応が完了したことを証明している。SUPERScript(商標)II逆転写酵素は鑄型末端を越えて2ヌクレオチドを付加し、F309NおよびT197Eは鑄型末端を越えて伸長せず、Y133Aには、鑄型末端を越えて1ヌクレオチドの少量の産物があるように見える。

【0249】

実施例4: 二重耐熱性TdT変異体

M-MLV逆転写酵素(RT)におけるアミノ酸F309位はHIV逆転写酵素におけるW266位と一列に並ぶ。この位置はサムドメインの基部にあり、鑄型-プライマーの副溝(minor groove)と相互作用する副溝結合トラクト(minor groove binding tract)の一部であると考えられる。変異H204RおよびT306Kは酵素の耐熱性を増大させることが示されている。H204R/T306KクローンにおけるF309N変異は、SUPERScript(商標)II逆転写酵素またはSUPERScript(商標

)II逆転写酵素におけるH204R/T306Kより、RNA鋳型に対するlacZフォワードアッセイ(表5)において1/2.3倍の変異頻度および3 dNTP伸長アッセイにおいて短い伸長産物を示す。両発見とも、より高い忠実度を有する酵素の請求項を裏付ける(表6)。

# 【 0 2 5 0 】

(表5) M-MLV逆転写酵素の高忠実度変異体の変異頻度

構築物	総プラーク	変異体プラーク	MF( $\times 10^{-4}$ )	
SUPERSCRIPT(商標)II	15689	87	39	
SUPERSCRIPT(商標)II (H204R, T306K)	14410	83	41	10
SUPERSCRIPT(商標)II (H204R, T306K, F309N)	11623	39	17	
SUPERSCRIPT(商標)II (H204R, T306K, F309N, V223H)	11415	39	14	

表5. SUPERSCRIPT(商標)II逆転写酵素および点変異体の変異頻度。変異頻度(MF)は、変異体プラーク(淡青色または白色)の数をプラークの総数で割ることで求めた。出発DNAのバックグラウンド変異体頻度は、最初の3つの構築物については $17 \times 10^{-4}$ であり、最後の構築物については $20 \times 10^{-4}$ であった。

# 【 0 2 5 1 】

(表6) M-MLV逆転写酵素の高忠実度変異体の誤り率

	M-MLV	SUPERSCRIPT(商標)II	F309N	V223H/F309N	
全 ER (oER)	1/17,000	1/15,000	1/34,000	1/41,000	
ミスマッチ 総 ER の割合 (%)(mER)	46 1/37,000	35 1/42,000	68 72 1/50,000	1/58,000	30
フレームシフト 総 ER の割合 (%)(rER)	46 1/37,000	60 1/25,000	21 22 1/162,000	1/188,000	
ストランドジャンプ 総 ER の割合 (%)(jER)	8 1/213,000	5 1/297,000	11 6 1/324,000	1/690,000	

# 【 0 2 5 2 】

方法

変異誘発

実施例3に記載のように標準的な部位特異的変異誘発プロトコルを用いて、V223H変異を含むプライマーを、以下の変異:H204R、T306K、F309Nを有するSUPERSCRIPT(商標)IIの一本鎖DNAにアニールさせた。V223H、H204R、T306K、およびF309Nの新たな組み合わせを確認するために、コロニーを配列決定した。

# 【 0 2 5 3 】

活性のある逆転写酵素を含むコロニーの選択

実施例3に記載のようにコロニーの選択を行った。

# 【 0 2 5 4 】

RT変異体の精製

実施例3に記載のように精製を行った。

## 【0255】

## ブランクの配列決定

lacZフォワードアッセイからのブランクを軟寒天プレートからワットマン(Whatmann)3M紙に移し、少なくとも1時間乾燥させた。次いで、ブランクを打ち抜き、ブランク/紙ディスクを、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction(パーキンエルマー(Perkin Elmer))4~8 $\mu$ l、プライマー(GAAGATCGCACTCCAGCCAGC) (SEQ ID NO:8)

1 $\mu$ l、および蒸留水(総体積20 $\mu$ lまで)を含む配列決定反応ミックスに直接加えた。96 10秒、50 5秒、60 4分の25サイクルのために、ABIサイクルシーケンシングプロトコールを使用した。紙ディスクを取り出し、反応物を沈殿させ、次いで、ローディングダイに再懸濁し、ABI377配列決定機で測定した。

## 【0256】

配列を野生型lacZ 配列と比較し、次いで、フレームシフト(1ヌクレオチドの挿入もしくは欠失)、ミスマッチ、またはストランドジャンプ(反復配列間の挿入もしくは欠失)として分類した。各クラス的全誤り率は、検出可能な部位(すなわち、変化によって表現型が変わる部位)の数(116)と(最初の一本鎖の寄与を排除するために)0.5を掛けたもので、変異頻度を割り、次いで、これに各クラスであることが観察された変異体のパーセントを掛けることによって求めた。 $ER=MF/(検出可能な部位 * 0.5) * (各クラスにおける\%)$ 。

## 【0257】

## 3 dNTPアッセイ法

実施例3に記載のように3 dNTPアッセイを行った。

## 【0258】

## 結果

本発明者らは、DNA鋳型を用いて、F309N(H204R T306K)SUPERScript(商標)II逆転写酵素(以下、F309Nと呼ぶ)およびV223H F309N(H204R T306K)(以下V223H/F309Nと呼ぶ)の誤挿入アッセイを行った。このアッセイは、変異体とSUPERScript(商標)IIとの誤って取り込む能力を比較するために用いられた。アッセイは、合成DNA鋳型-プライマーおよび4種類のdNTPのうち3種類しか含まない偏ったdNTPプールを用いたプライマー伸長アッセイである。反応を図5および図6のゲルに示す。このアッセイにおいて、高いプライマー伸長効率は低い忠実度を示す。図5および図6に示すように、4種類全てのdNTPの存在下で、SUPERScript(商標)II逆転写酵素ならびに変異体F309NおよびV223H/F309Nは、プライマー末端での非鋳型特異的ヌクレオチドの付加にいくらかの変化はあるが、ほぼ等しくプライマーを伸長することができた。しかしながら、ヌクレオチドの偏ったプールと共にインキュベートした場合、SUPERScript(商標)II逆転写酵素は、鋳型ヌクレオチドを越えてかなりの伸長を触媒することができ、このために相補的dNTPが欠除していた。このことは、誤ったヌクレオチドの使用および低い忠実度を示している。図5において、F309N(2)変異体は、3種類のdNTPの偏ったプールのそれぞれにおいてSUPERScript(商標)II逆転写酵素より短い伸長産物を示した。このことは、誤ったヌクレオチドを取り込む能力が低いこと、従って忠実度が高いことを示している。図6において、V223H/F309N変異体はdATPプールおよびdCTPプールだけで伸長された。いずれの場合でも、V223H/F309NもSUPERScript(商標)IIより短い伸長産物を有した。これは、F309NおよびV223H/F309N変異体の変異頻度がSUPERScript(商標)II逆転写酵素より低かったlacZ アッセイの結果( $17 \times 10^{-4}$ および $14 \times 10^{-4} \sim 39 \times 10^{-4}$ )と一致している。F309NはなくH204R T306K変異だけしかない逆転写酵素の変異頻度は、SUPERScript(商標)II逆転写酵素と似ていた( $41 \times 10^{-4} \sim 39 \times 10^{-4}$ )。このことは、これらの変異が忠実度に影響を及ぼさないことを示唆している。このデータは、DNAに対する誤挿入アッセイとRNAに対するlacZ アッセイとの相関関係を示し、ここで、高忠実度変異体はdNTPの偏ったプールによる伸長産物が短く、lacZ アッセイにおいて変異頻度が低かった。

## 【0259】

誤り率を決定するために、lacZ フォワードアッセイからの変異体ブラークを既知の方法を用いて配列決定した。次いで、変異を以下のカテゴリーの1つに分類した: 誤挿入事象によるミスマッチ、1つの挿入もしくは欠失の事象によるフレームシフト、または類似配列間のジャンプにより引き起こされる大きな挿入もしくは欠失によるジャンプ。次いで、以下の式:  $ER(\text{誤り率}) = MF(\text{変異頻度}) / (\text{検出可能な部位の数} \times 0.5)$  (式中、検出可能な部位の数は116である) を用いて、lacZ ペプチドをコードする核酸について全誤り率を求めた。

lacZフォワードアッセイにおいて変異された全ての塩基が、検出可能な表現型変化を生じるとは限らない。ミスマッチ、フレームシフト、およびジャンプについて特有の誤り率を求めるために、変異頻度は各変異体カテゴリーの合計のパーセントを掛けることで修正され、次いで、特有の誤り率を求めるために用いられた。以下は、SUPERScript(商標)II 逆転写酵素および高忠実度SUPERScript(商標)II H203R T306K F309N逆転写酵素アッセイからのM13mp19におけるlacZ ペプチドの配列地図である。下線は欠失を示す。「^」は、上に示した塩基A、T、C、またはGの挿入を示す。完全配列の上に示したA、T、C、またはGはミスマッチを示す。

SuperScript (商標) II によって導入された変異の地図

10

20

30

40

【 0 2 6 2 】

(表 7)

挿入	40	38%	60% フレームシフト (挿入または欠失)
欠失	23	22%	
ミスマッチ	36	35%	35% ミスマッチ
ジャンプ	5	5%	5% ジャンプ

## 【 0 2 6 3 】

(表 8)

10

全誤り率 (oER)	1/15,000	$(39 \times 10^{-4}) / (116 \times 0.5)$
ミスマッチ誤り率 (mER)	1/42,500	$(0.35 \times 39 \times 10^{-4}) / (116 \times 0.5)$
フレームシフト誤り率 (fER)	1/25,000	$(0.60 \times 39 \times 10^{-4}) / (116 \times 0.5)$
ジャンプ誤り率 (jER)	1/297,000	$(0.05 \times 39 \times 10^{-4}) / (116 \times 0.5)$

## 【 0 2 6 4 】

実施例6：変異体RTの酵素活性の分析

逆転写酵素 (RT) (例えば、レトロウイルスRT) は、そのcDNAの分析およびクローニングのための必須のツールとしてのその用途のため、およびHIVの阻害のための標的としてのその重要性のため、最も強力に研究されているDNAポリメラーゼの1つである (Skalka, A.M. およびGoff, S.P., *Reverse Transcriptase*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY (1993))。しかし、最近の研究の大部分の焦点であるHIV RT (Le Grice, S.F.J. in *Reverse Transcriptase* (Skalka, A.M. およびGoff, S.P., 編) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY, pp. 163-191, (1993)) がcDNA合成のためのツールとして広範に使用されてきたという意味において二分法が存在する。これは、HIV RTが比較的高いエラーの割合を有するからであり (Bebenek, K. およびKunkel, T. A. in *Reverse Transcriptase* (Skalka, A.M. およびGoff, S.P., 編) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY, pp. 85-102 (1993))、およびそれが長いmRNAの全長コピーをインビトロで効率的に合成しないからである。cDNAを合成するために広範に使用されるレトロウイルスRTの他の型である、M-MLV RTおよびAMV RTもまた、これらの制限に苦しめられているが、その程度は低い

20

30

(Bebenek, K. and Kunkel, T.A. in *Reverse Transcriptase* (Skalka, A.M. and Goff, S.P., eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY, pp. 85-102 (1993); Krug, M.S. and Berger, S.L. *Methods in Enzymol.* 152:316-325 (1987); Gerard, G.F. and D'Alessio, J.M. (1993) in *Methods in Molecular Biology, Vol 16: Enzymes of Molecular Biology* (Burrell, M.M., ed) pp. 73-93, Humana Press, Totowa, NJ (1993); Gerard, G.F., *et al.*, *Molecular Biotechnology* 8:61-77 (1997))

40

。ポリメラーゼ活性に加えて、レトロウイルスRTは、RNA-DNAハイブリッドにおけるRNAを分解するRNase H活性を有する (Moelling, K., *ら*, *Nature New Biology* 234:240-244 (1971))。この分解活性の存在は、部分的には、長いcDNAの効率的な合成に対する制限の原因である (Krug, M.S. およびBerger, S.L. *Methods in Enzymol.* 152:316-325 (1987), Berger, S.L., *ら*, *Biochem.* 22:2365-2372 (1983))。RTのRNase Hドメインは、mRNA指向性DNAポリメラーゼ活性を維持しながらRNase H活性を低下または除去するように変異させることができ (Kotewicz, M.L., *ら*, *Nuc. Acids Res.* 16:265-277 (1988), DeStefano, J.J., *ら*, *Biochim. Biophys. Acta* 1219:380-388 (1994))、cDNA合成の効率を改善す

50

る (Kotewicz, M.L., ら, Nuc. Acids Res. 16:265-277 (1988))。

#### 【0265】

mRNAをコピーすることに対する第2の顕著な欠点は、短縮型の産物の生成を生じるcDNA合成の間に中断するRTの傾向である (Harrison, G.P., ら, Nuc. Acids Res. 26:3433-3442 (1998), DeStefano, J.J., ら, J. Biol. Chem. 266:7423-7431 (1991))。この中断は部分的にはRNAの二次構造に起因する (Harrison, G.P., ら, Nuc. Acids Res. 26:3433-3442 (1998), Wu, W., ら, J. Virol. 70:7132-7142 (1996))。mRNAの二次構造を融解する反応温度でcDNA合成を実行することは、この問題を緩和することを助ける (Myers, T.W. および Gelfand, D.H., Biochem. 30:7661-7666 (1991))。さらに、cDNA合成を開始するためにしばしば使用されるオリゴ(dT)<sub>n</sub>プライマーは、より低い温度でmRNA中のA残基の内部ストレッチでプライムする傾向があり、3'-末端短縮型cDNA産物の合成を生じる。M-MLV RTは43℃より上ではmRNAからcDNAを効率的に合成しない (Tosh, C., ら, Acta Virol. 41:153-155 (1997))。RNase H-マイナス (H-) M-MLV RTは48℃までの高さで使用され得る。なぜなら、RNase H活性の非存在下では、mRNA鋳型-DNA産物複合体が、cDNA合成の間に熱不活性化からRTを保護する構造型に維持されるからである。

10

#### 【0266】

M-MLV RTがcDNAを合成するために使用され得る温度を上昇させる試みにおいて、本発明者らは、H-M-MLV RT遺伝子をランダムに変異させ、耐熱性変異体についてスクリーニングした。H-M-MLV RTのいくつかの耐熱性変異体を同定し、精製した酵素を特徴付けした。本発明者らは、変異が一緒に存在するときに、それらは触媒活性を変化させることなく、その固有の耐熱性を増大させることによってRT高温活性を増大させることを示した。

20

#### 【0267】

##### 実験手順

細菌株およびプラスミド。大腸菌 DH10B (Invitrogen) をすべての実験において使用した。細菌液体培養物を、37℃で、EG:2%トリプトン、1%酵母抽出物、0.5%グリセロール、10mM NaCl、および1mM KCl中で増殖させた。固体培地は、LB (1%バクト-トリプトン、0.5%酵母抽出物、および86mM NaCl) +1.5%寒天であった。選択培地は100 µg/mlアンピシリンを含んだ。培養物の誘導のために、細胞を選択的EG+0.2%アラビノース中に接種し、18時間増殖させた。

#### 【0268】

##### RNAおよびDNA

3'末端に40ヌクレオチドのポリ(A)テールを有するクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) cRNA (~900nt) を、線状化プラスミドDNAから、T7 RNAポリメラーゼランオフ転写によって合成した (D'Alessio, J.M. および Gerard, G.F., Nuc. Acids Res. 16:1999-2014 (1988))。cRNAを、オリゴ(dT)-セルロース上で選択し、ポリ(A)テールの存在を確認した。標識のために、CAT cRNAの5'末端をアルカリホスファターゼで脱リン酸化した。(rC)<sub>n</sub>、p(dT)<sub>12-18</sub>、およびp(dT)<sub>25-30</sub>はAmersham Pharmaciaから購入した。(rA)<sub>630</sub>はMilesから購入した。(dG)<sub>15</sub>および(dT)<sub>20</sub>はInvitrogenからであった。CAT cRNAポリ(A)テールの5'末端の最初の塩基から146ヌクレオチド離れたその5'末端と、ヌクレオチド679と692との間でアニールするCAT cRNAに相補的なDNA 24マーはInvitrogenからであった。PCRをプライムし、および部位特異的変異誘発を実行するためのオリゴヌクレオチドはInvitrogenからであった。

40

#### 【0269】

##### M-MLV RT遺伝子

これらの研究において使用されるM-MLV RT遺伝子はpRT601に由来した (Kotewicz, M.L., ら, Nuc. Acids Res. 16:265-277 (1988) および Gerard, G.F., DNA 5:271-279 (1986))。ヌクレオチド2598で開始しヌクレオチド4628で終結する遺伝子 (Shinnick, T.M., ら, Nature 293:543-548 (1981)) を、araDプロモーターの制御下でプラスミドpBAD/HisA (Invitrogen) にクローニングした。M-MLV遺伝子を、この遺伝子を5つのセグメントに分けたいくつかの独特な制限エンドヌクレアーゼ部位を含むように、アミノ酸コードを変化さ

50

せることなく、部位特異的変異誘発によってさらに改変した（図2A）。このタンパク質のアミノ末端は、精製を単純化するためにHis<sub>6</sub>タグを含み、これはSEQ ID NO:2のアミノ酸1-32に対応する以下のアミノ酸

**MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH**

を含んだ。このタンパク質のカルボキシ末端は、pRT601（17）からのサブクローニングの結果として存在する、さらなるアミノ酸NSRLINを含んだ。さらに、M-MLV RT遺伝子を、RNase活性を除去するために変異させた（D524G、E562Q、D583N）。最終的な構築物はpBAD-HSS2（図2B）と呼ばれ、この遺伝子および遺伝子産物はHis<sub>6</sub>H-RTと呼ばれた。

【0270】

10

DNA配列決定

プラスミドDNAを、Concert High Purity Miniprep Kit（Invitrogen）を使用して、製造業者の説明書に従って、RT変異体を有する一晚大腸菌培養物から調製した。各DNAを、変異体を生成するために変異誘発されたセグメントに隣接する正方向プライマーおよび逆方向プライマーを使用して配列決定した。配列決定反応を、ABI Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kitを使用してプラスミドDNAについて特定されるように実行した。反応物をABI PRISM 377 DNA Sequencerを使用して分析した。

【0271】

ランダム変異誘発

変異誘発PCRを、20mM Tris-HCl（pH 8.4）、50mM KCl、1.8mM MgCl<sub>2</sub>、0.3mM MnSO<sub>4</sub>、200 μM 各dCTP、dGTP、dTTP、およびdATP、ならびに0.5単位のTaq DNAポリメラーゼ（Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA）を含む反応混合物（100 μl）中で実行した。94 で1分間の変性段階の後で、サイクルプロトコールは94 で15秒間、55 で15秒間、および72 で30秒間の20サイクルであった。増幅は、50ngの標的から5 μgの増幅産物までの100倍であった。PCRプライマーは、適切な制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含んだ。増幅されたDNAセグメントを適切な制限エンドヌクレアーゼで切断し、ゲル精製し、および対応する制限酵素で切断したゲル精製されたベクターDNAにクローニングした。

【0272】

部位特異的変異誘発

オリゴヌクレオチド部位特異的変異誘発を確立された手順（Kunkel, T.A., ら, Methods Enzymol. 154:812-819 (1987), Kunkel, T.A., ら, Methods Enzymol. 204:125-139 (1991)）で実行した。H-RT遺伝子におけるアミノ酸コード部位のすべての可能なアミノ酸での飽和を、コドン部位において配列NNK（N=A,C,GまたはTおよびK=GまたはT）を変異誘発オリゴヌクレオチドに導入することによって実行した。

【0273】

DNAポリメラーゼアッセイ

RT変異体のスクリーニングの間、RT RNA指向性DNAポリメラーゼ活性を、使用される反応条件下でRTに特異的な(rC)<sub>n</sub>・(dG)<sub>15</sub>を用いてアッセイした（Gerard, G.F., ら, Biochem. 13:1632-1641 (1974)）。50mM Tris-HCl（pH 8.4）、50mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、300 μM (rC)<sub>n</sub>、120 μM (dG)<sub>15</sub>、0.01%（v/v）Triton X-100、および100 μM [γ-<sup>32</sup>P]dGTP（1,000cpm/ピコモル）を含む反応混合物（50 μl）を、96ウェルプレートのウェル中で37 で10分間インキュベートした。各ウェルからのアリコート（5 μl）をGenescreen+（NEN）フィルターにスポットし、このフィルターを4%（w/v）ピロリン酸ナトリウム（pH 8.0）で10分間、2回洗浄した。乾燥したフィルターに結合した放射能をホスホルイメージャー（Molecular Dynamics）で定量した。

【0274】

RT DNAポリメラーゼ単位活性を、(rA)<sub>630</sub>・p(dT)<sub>12-18</sub>（Houts, G.E. ら, J. Virol. 29:517-522 (1979)）を用いてアッセイした。1単位のDNAポリメラーゼ活性は、37 、10分間で酸不溶性産物に1ナノモルのデオキシヌクレオシド三リン酸を取り込むRTの量である。

【0275】

50



CAT cRNAからのcDNA合成を、50mM Tris-HCl(pH 8.4)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、10mM ジチオスレイトール(DTT)、500 μM 各dATP、dTTP、dGTP、および[<sup>32</sup>P]dCTP(300cpm/ピコモル)、1,750単位/ml RNaseインヒビター、130 μg/ml(465nM)CAT cRNA、20 μg/ml(2,300nM) p(dT)<sub>25-30</sub>、および3,250単位/ml(100nM)RTを含む反応混合物(20 μl)中で実行した。インキュベーションを、種々の温度で、60分間、個々のチューブ中で行った。反応混合物のアリコートをTCAで沈殿させて、合成されたcDNAの収量を決定し、そして残りのcDNA産物をアルカリ性1.2%アガロースゲル上でサイズ分画した(McDonnell, M.W., ら, J. Mol. Biol. 110:199-146 (1977))。

#### 【0276】

一価および二価の金属の反応最適条件を確立するために、初期反応速度を、37 °C または 50 °C での10分間のインキュベーションの間のRT濃度を制限する条件下で決定した。反応混合物(20 μl)は、50mM Tris-HCl(pH 8.4)、10mM DTT、500 μM 各dTTP、dATP、dCTP、および[<sup>3</sup>H]dGTP(100cpm/ピコモル)、10ピコモル(2.8 μg)CAT cRNA、50ピコモル DNA 24マー、0.5ピコモル RT、ならびに、1つずつ濃度が変動するKClおよびMgCl<sub>2</sub>を含んでいた。

#### 【0277】

定常状態反応速度測定。定常状態反応速度論的パラメーター $K_{m(dTTP)}$ および $k_{cat}$ を、記載されるように(Polesky, A.H., ら, J. Biol. Chem. 265:14579-14591(1990))、 $(A)_n \cdot (dT)_{30}$ を使用して決定した。 $K_{m(dTTP)}$ 値を括弧で囲んだ5つの[<sup>32</sup>P]dTTP濃度の範囲を、反応速度論的パラメーターの各々の決定のために使用した。反応における鋳型-プライマーおよび酵素の濃度は、それぞれ2 μM (プライマー末端では)および4 μMであった。反応混合物(50 μl)はまた、50mM Tris-HCl(pH 8.4)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、および10mM DTTを含み、37 °C でインキュベートした。

#### 【0278】

##### 変異体スクリーニング

変異体集団を選択寒天上にプレーティングした。個々のコロニーを96ウェルプレート中の120 μlの選択的EGに接種し、37 °C で一晩増殖させた。培養物の細胞密度は $\sim 10^9$ cfu/mlであった。各ウェルからの培養物のアリコートを、ウェル当たり120 μlの選択培地+0.2%アラビノースを含む新しい96ウェルプレートに移した。このプレートを37 °C で20時間インキュベートしてRTの発現を誘導した。次いで、各ウェルからの培養物のアリコート(5 μl)を、ウェル当たり5 μlの2XPLD(50mM Tris-HCl(pH 8.0)、20mM EDTA、1.8%(w/v)スクロース、1%(v/v) Triton X-100、10mM DTT、および2mg/ml リゾチーム)を含む別の96ウェルプレートに移した。サーモサイクラー中で種々の温度(52 ~ 58 °C)で5 ~ 10分間の加熱および室温への冷却後、各ウェル中の溶解物からの5 μlアリコートを、上記のような別の96ウェルプレート中の $(rC)_n \cdot (dG)_{15}$ を用いてアッセイした。抽出物の5 μlアリコート中のRT活性の量は、アッセイの直線範囲にあった。溶解物は少なくとも1時間の間室温で安定であった。

#### 【0279】

##### RTの精製

全ての操作を4 °Cで行った。pBAD-HSS2または誘導体を有する誘導された大腸菌細胞(5g)を10mL緩衝液(20mM Tris-HCl(pH8.0)、100mM KCl、および1mM PMSF)中に懸濁し、破壊のために超音波処理した。20,000 × gで30分間の遠心分離による清澄化後、RTを、5mlのNi<sup>2+</sup>で荷電されたキレートSephacroseカラムおよびMono S HR 5/5カラム(Amersham Pharmacia)上での連続的なクロマトグラフィーによって精製した。いくつかの場合において、RTを第3のカラム(TosoHaasからのAF-ヘパリン-650)で分画して、痕跡のRNase夾雑物を除去した。精製されたRTを、保存緩衝液(40mM Tris-HCl(pH8.0)、100mM KCl、0.01%(v/v)Triton X-100、0.1mM EDTA、1mM DTT、および50% v/v グリセロール)に対して透析し、-20 °Cで保存した。この手順によって精製されたRTは、SDS-PAGEによって判断されるように>90%均一であり、検出可能な夾雑したDNAエンドヌクレアーゼ、DNAエキソヌクレアーゼ、およびRNAエンドヌクレアーゼを含まなかった。

#### 【0280】

抽出物中のRTの熱不活性化プロフィール

すでに記載したようにPLDにおいて調製した細胞抽出物をサーモサイクラー中の96ウェルプレート中で加熱し、そこでは温度の勾配が行にわたって存在するが、各列では温度は同じである。25 ~ 56 までの範囲の温度で、RT活性をすでに記載した $(rC)_n \cdot (dG)_{15}$ を用いてアッセイした。

#### 【0281】

半減期の測定

混合物(20  $\mu$ l)を、50 または55 で、サーモサイクラー中の0.5mlチューブ中で様々な時間の間インキュベートし、これは50mM Tris-HCl(pH8.4)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、0.1%(v/v)Triton X-100、および3-7  $\mu$ g/ml精製RTを含んでいた。インキュベーションを、チューブを氷中に配置することによって停止した。アリコート(5  $\mu$ l)を、 $(rA)_{630} \cdot p(dT)_{12-18}$ を用いて残存活性についてアッセイした。

#### 【0282】

フィルター結合によるK<sub>D</sub>の測定

ニトロセルロースフィルター結合アッセイ(Bailey, J.M., Anal. Biochem. 93:204-206 (1979), Strauss, H.S., ら, Gene 13:75-87 (1981))を使用して、CAT cRNA  $\cdot (dT)_{20}$  についてのRTの核酸結合定数(K<sub>D</sub>)を測定した。脱リン酸化したCAT cRNAを[ -<sup>32</sup>P]ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼ(Boehringer)を用いて5'で標識した。オリゴ(dT)<sub>20</sub>を、10 mM Tris-HCl(pH 7.5)および80mM KClを含む緩衝液中で、ポリ(A)テイルCAT cRNAに65 で5分間アニールさせ、続いて氷上で冷却した。結合緩衝液(50mM Tris-HCl, pH8.4、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、および10mM DTT)、0.05nM <sup>32</sup>P標識CAT cRNA、1nM(dT)<sub>20</sub>、および1~50nM RTを含む反応混合物(100  $\mu$ l)を、23 で5分間インキュベートした。インキュベーション後、この混合物を、結合緩衝液に浸漬したニトロセルロースフィルター(Millipore, HA 0.45 mm)を通して濾過し、次いで結合緩衝液で洗浄した。K<sub>D</sub>は、標識したCAT cRNAの50%が結合する酵素濃度に等しい。この分析の方法が有効であるためには、反応におけるCAT cRNA濃度は、全体の酵素濃度が遊離の結合していない酵素の濃度に近接するように、実質的にK<sub>D</sub>より下でなくてはならない。

#### 【0283】

結果

ランダム変異誘発によって生成された変異

PCRプライマーを、M-MLV His<sub>6</sub> H-RT遺伝子の5つのセグメント各々を増幅するように、および適切な制限エンドヌクレアーゼを含むように設計した。各セグメントを、PCR変異誘発(実験手順)によってランダムに変異誘発させ、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて消化し、そしてH-RT遺伝子における対応するセグメントを変異誘発したセグメントで置換するようなやり方で、同様に消化したpBAD-HSS2プラスミドにクローニングした(図2B)。ライブラリーを、少数のクローンの変異誘発させたH-RT遺伝子セグメントのDNA配列決定によってサンプリングし、変異の頻度を決定した。目的は、セグメント当たり生産される1~2個の変異PCRランダム変異誘発の割合を達成することであった。本発明者らは、セグメント当たり2変異より多く生産されたランダム変異誘発が、大きな割合の不活性なRT変異を生じる傾向があることを見い出した。ライブラリーがこの判定基準に合致した場合、熱処理によるさらなるスクリーニングを実行して、熱処理段階後に溶解物中でH-RTよりも高いRT活性を示した変異体を同定した(実験手順; 図7A)。最も高い見かけの耐熱性を有する変異体を、24 (活性について標準化するため)および52 ~ 58 での前処理によって、二連で再度スクリーニングして、向上した耐熱性の存在を確認した(図7B)。全部で、約15,000クローンを、熱処理によって、96ウェル形式で、各セグメントについてスクリーニングし、すなわち、総計約100,000変異体をスクリーニングした。

#### 【0284】

2つの変異体がH-RTよりも高い耐熱性を有するRTを産生したことが見い出された。これらの遺伝子のDNA配列決定は、これらが、セグメント2におけるH204Rおよびセグメント3におけるT306Rであることを明らかにした。RT耐熱性に影響を与えるアミノ酸の位置を同定

したので、本発明者らは、選択された特定の変異アミノ酸が耐熱性の最大の可能な増大を与えたか否かを確立することを望んだ。H-RT遺伝子における2つの部位は、独立して部位特異的変異誘発に供せられ、そこでは配列NNKが、変異誘発オリゴヌクレオチド中で存在するコドンの代わりに置換された(実験手順)。これらのライブラリーの各々から84のメンバーが耐熱性変異体についてスクリーニングされた。結果は、T306KおよびT306RがT306において最も耐熱性の改変体であり、T306Kがいくぶんより耐熱性であり、およびH204RがH204において最も耐熱性の改変体であることを示した。

#### 【0285】

逐次的な部位特異的変異誘発によって1つのクローン中で変異を組み合わせた。熱処理した抽出物のアッセイは、二重変異体His<sub>6</sub> H- H204R T306K RTが任意の変異体単独よりも耐熱性であり、およびHis<sub>6</sub> H-RTよりもはるかに耐熱性であることを示した(図8)。

#### 【0286】

開始点としてH204RおよびT306Kを含んだプラスミドpBAD-HSS2を利用して、RT遺伝子セグメント1から5を再度ランダムに変異誘発させ、ライブラリーを、His<sub>6</sub> H- H204R T306K RTをより耐熱性にするさらなる変異についてスクリーニングした。粗抽出物中でRT二重変異体の耐熱性を増大させる1つのさらなる変異、セグメント3におけるM289Lを同定した。

#### 【0287】

単一の部位特異的変異からの変異

His<sub>6</sub> H- T306K RTを、H- RTの忠実度の研究の一部として部位特異的変異誘発によってF309位でF309Nに変異させた。F309N変異は、粗抽出物中でHis<sub>6</sub> H- T306K RTの耐熱性を増大させた。

#### 【0288】

精製した変異RTの耐熱性

夾雑物の非存在下でのそれらの固有の耐熱性を確立するために、およびそれらの酵素的特性を特徴付けるために、多数のRT変異体をほぼ均一まで精製した(実験手順)。4つの位置の各々におけるHis<sub>6</sub> H- RTの単一の変異体の精製型の固有の耐熱性を確立し、開始酵素のそれと比較した。変異T306K、M289L、またはF309NはHis<sub>6</sub> H- RTの半減期を、50 で8分から10分間と13分間の間まで少量増大させた(表9)。

#### 【0289】

(表9) 50 における精製RT変異体の半減期

酵素	50 °Cにおける半減期(分) <sup>a</sup>
H- RT (SUPERSCRIPT(商標) II)	3.2 ± 0.2
His <sub>6</sub> H- RT	8 ± 1.2 (1.6 ± 0.3) <sup>b</sup>
His <sub>6</sub> H- H204R RT	43 ± 9
His <sub>6</sub> H- T306K RT	10 ± 0.4
His <sub>6</sub> H- F309N RT	13 ± 3
His <sub>6</sub> H- M289L RT	13 ± 1
His <sub>6</sub> H- H204R T306K RT	78 ± 8
H- H204R T306K F309N RT	30
His <sub>6</sub> H- H204R T306K F309N RT	105 ± 11
His <sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309N RT	240 ± 10 (8.1 ± 0.3)

<sup>a</sup>2回または3回の測定の平均 ± 標準偏差

<sup>b</sup>55 における半減期は()内に示す

#### 【0290】

最大の効果を有する単一の変異はH204Rであり、これは50 における半減期を5倍増大さ

せた(表9)。しかし、変異を組み合わせることは、耐熱性に対しては最低でもポジティブは相加的効果を有した。H204RおよびT306Kを組み合わせることは、50 における半減期を10倍増大させ、そしてM289LおよびF309Nをこれらの2つの変異と組み合わせることは、50 における半減期をさらに3倍、240分間に増大させた(開始酵素の半減期と比較して30倍の増加;表9)。

#### 【0291】

His<sub>6</sub> H- RTおよびそのすべての変異体の半減期は、50 と比較して55 で低下した(表9)。四重変異体について50 で観察された固有の半減期の相対的増大の強度は55 で部分的に維持された(表9)。55 で1.6分間のHis<sub>6</sub> H- RTの半減期が、H204R M289L T306K F309Nによって8.1分間まで5倍増大した(表9)。

#### 【0292】

N末端タグの存在は、試験されたRTの耐熱性を増大するように見られた。N末端タグを有しない(SUPERSCRIPT(商標)II)の、同じ点変異を有しかつSEQ ID NO:2(His<sub>6</sub> H- RT)のアミノ酸1-32に対応する配列

**MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH**

を有するN末端タグを有するRTとの比較は、タグの存在がRTの耐熱性を増大させることを示す。タグの存在は、50 におけるRTの半減期を、2.5倍の因数で増大させた(3.2分間から8分間まで)。タグを有するかまたは有しない、三重変異体H204R T306K F309Nの比較は、50 における酵素の半減期の3.5倍の因数での増大(30分間から105分間まで)を示した。このように、本発明は、RTのN末端に付加された1つまたはそれ以上のアミノ酸を含む増大された耐熱性を有するRTを意図する。さらに、本発明は、RTのC末端に付加された1つまたはそれ以上のアミノ酸を含む向上された耐熱性を有するRTを意図する。

#### 【0293】

精製された変異体RTの酵素的特徴付け

精製されたRT変異体の多数の触媒特性を、RTにおける4つすべての点変異の導入がそのDNA合成活性を変化させるか否かを確認するために比較した。1つを例外として、特徴付けられた耐熱性変異体のすべてが、開始のHis<sub>6</sub> H- RTのそれよりも高いRNA指向性DNAポリメラーゼ比活性を有したが、1.5倍の因数以内であった(表10)。

#### 【0294】

(表10) 精製したRT変異体のRNA指向性DNAポリメラーゼ比活性

酵素	DNA ポリメラーゼ比活性 (単位/μg)
His <sub>6</sub> H- RT	281 (1.0) <sup>a</sup>
His <sub>6</sub> H- H204R RT	325 (1.16)
His <sub>6</sub> H- T306K RT	402 (1.43)
His <sub>6</sub> H- F309N RT	257 (0.91)
His <sub>6</sub> H- M289L RT	339 (1.21)
His <sub>6</sub> H- H204R T306K RT	385 (1.37)
His <sub>6</sub> H- H204R T306K F309N RT	391(1.39)
His <sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309N RT	410 (1.46)

<sup>a</sup>His<sub>6</sub> H- RTの比活性を1.0に設定した比活性の比率

#### 【0295】

His<sub>6</sub> H- F309N RTはわずかに減少したDNAポリメラーゼ比活性を有した(表10)。His<sub>6</sub> H- RTおよびHis<sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309Nの触媒効率( $k_{cat}/K_m$ )は、互いに2の因数内であり、それらのヌクレオチド基質についてのK<sub>m</sub>は同様であった(表11)。

#### 【0296】

(表11) 精製したRT変異体の触媒定数<sup>a</sup>

酵素	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{sec}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$
His <sub>6</sub> H- RT	390 ± 98	45 ± 18	0.115
His <sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309N RT	274 ± 92	46 ± 11	0.17

<sup>a</sup>3回の測定の平均 ± 標準偏差

【 0 2 9 7 】

His<sub>6</sub> H- RTおよびHis<sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309N RTの一価および二価の金属イオン最適条件を測定した。酵素に対して過剰のCAT cRNA・DNA 24マーを鋳型-プライマーとして使用した(実験手順)。最適条件は同じであった: His<sub>6</sub> H- RTおよびHis<sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309Nについて37 で、ならびに四重点変異について50 で、75mM KClおよび3mM MgCl<sub>2</sub>。まとめると、これらの結果は、H- RTの耐熱性を実質的に増大した4つの同定された変異が、感知されるほどそのDNAポリメラーゼ触媒活性能力に影響を与えなかったことを示す。

【 0 2 9 8 】

鋳型-プライマーの存在下で、50 におけるM-MLV H- RTの半減期は、核酸の非存在下での半減期と比較して、3から4までの因数で増大する。これは、溶液中で未結合である場合よりも鋳型-プライマーに結合した場合に、熱不活性化に対してより耐性である酵素の結果である。鋳型-プライマーについてのRTのアフィニティーに影響を与える変異は、それがcDNA合成に関与するときに、RTの見かけの耐熱性に影響を与える。それゆえに、CAT cRNA・(dT)<sub>20</sub>についてのHis<sub>6</sub> H- RTおよびその変異体のアフィニティー( $K_D$ )を測定した(表12)。

【 0 2 9 9 】

(表12) 精製したRT変異体の核酸解離定数

酵素	$K_D$ (nM) <sup>a,b</sup>
His <sub>6</sub> H- RT	8 ± 0.5
His <sub>6</sub> H- H204R RT	35 ± 0.5
His <sub>6</sub> H- T306K RT	6.6 ± 0.4
His <sub>6</sub> H- F309N RT	28 ± 2.5
His <sub>6</sub> H- M289L RT	4.7 ± 0.7
His <sub>6</sub> H- H204R T306K RT	6.1 ± 1.5
His <sub>6</sub> H- H204R T306K F309N RT	7.3 ± 2.4
His <sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309N RT	11 ± 1.0

<sup>a</sup>2回または3回の測定の平均 ± 標準偏差

<sup>b</sup>核酸はCAT cRNA・(dT)<sub>20</sub>

【 0 3 0 0 】

His<sub>6</sub> H- RT四重変異体の $K_D$ は8nMから11nMまでいくぶん増大し、このことは、核酸結合アフィニティーは、4つの変異により一緒に、わずかに低下した。興味深いことに、2つの点変異H204RおよびF309Nは、単独で存在した場合に、His<sub>6</sub> H- RTの結合アフィニティーをより減少させ、それぞれ35および28の $K_D$ を有した。結合に対するこれらの変異の効果は、変異T306Kによって見た目には相殺された( $K_D$ =6.6nM)。なぜなら三重変異体H204R T306K F309Nは7.3nMの $K_D$ を有したからである。本発明者らは、His<sub>6</sub> H- RTの三重変異体(H204R T306K F309N)または四重変異体がcDNA合成に関与する際に、His<sub>6</sub> H- RTと比較して見かけの観察された耐熱性のいかなる増大も、鋳型-プライマーへのより強固な結合による保護の増大には起因しないと結論付けた。

【 0 3 0 1 】

より高いRT耐熱性の実用的意味

本研究において選択されたH-RT変異によって付与された耐熱性の増大の実用的な影響を

評価するために、本発明者らは、40から55 の間でいくつかの変異体が全長CAT cDNAを合成する能力を測定した(表13)。

【0302】

(表13) 精製されたRT変異体によるCAT cRNAからの全長cDNAの高温における合成<sup>a</sup>

酵素	各温度において合成された全長産物の量 (ng)				
	40°C	45°C	50°C	52.5°C	55°C
His <sub>6</sub> H- RT	517	523	229	40	2
His <sub>6</sub> H- H204R RT	521	446	146	36	17
His <sub>6</sub> H- T306K RT	456	512	338	122	28
His <sub>6</sub> H- H204R T306K RT	664	528	330	202	43
His <sub>6</sub> H- H204R T306K F309N RT	488	556	396	209	53
His <sub>6</sub> H- H204R M289L T306K F309N RT	540	547	539	376	120

<sup>a</sup>cDNA合成反応混合物(上記に記載)は9.3ピコモル(2.6 μg)のCAT cRNAを含んだ。全長産物の量は、乾燥させたアルカリ性1.2%アガロースゲルからの各全長バンドのサイズに対応する領域を切断すること、およびそれをシンチレーションカウンターで計数することによって確定した。反応混合物は2ピコモルのRTを含み、これを示された温度で60分間インキュベートした。1回の実験の結果を示す。同様の結果が他の1回の実験で得られた。

【0303】

鋳型-プライマーに対するRTの量は、これらの反応において限定されていた。限定的なRTの存在下では、温度が増加するにつれて全長cDNA合成を達成することの失敗が、cDNA合成条件下での酵素の熱不活性化の指標である。1つを例外として、50 より上の温度において、特定のRT変異体によって合成された全長CAT cDNAの量(表13)は、50 における酵素の耐熱性(半減期)(表9)と良好に相関した。1つの例外は変異体H204Rである。これは、50 において5倍より長い半減期を有するのにもかかわらず、50 および52.5 においてHis<sub>6</sub> H- RTよりも少ない全長cDNAを産生した。このことは、おそらく、H- RTよりも弱い、CAT cRNA・DNAに対するH204Rの結合に起因し、これが鋳型-プライマーによる熱保護を減少させる。試験したすべてのRTが40 と比較して45 での活性を維持していたが、四重変異体を例外として、全てのRTが50 以上でより少ないCAT cDNAを合成した。His<sub>6</sub> H- RT四重変異体は50 において完全に活性であり、55 ではHis<sub>6</sub> H- RTよりも60倍多い全長CAT cDNAを合成した。これは、40 において両方の酵素によって合成される量の22%であった。

【0304】

本発明のモデルは、望ましい特徴、例えば、望ましいレベルの耐熱性を有するようにポリペプチドを操作するために使用され得る。ポリペプチドの核酸配列はセグメントに再分割されてもよく、そのセグメントは、例えば、PCRランダム変異誘発を使用して個々に変異誘発されてもよい。次いで、個々のセグメントは再アセンブルされ、および望ましい活性についてスクリーニングされる変異されたポリペプチドを発現するように使用されてもよい。上記の実施例は、むしろ大きなRT遺伝子(2154塩基)がランダム変異誘発(Leung, ら, (1989) Technique 1, 11-15. Cadwell, ら, (1992) PCR Methods and Applications 2, 28-33)によってセグメント中でランダムに変異される本発明の実施態様を提供する。機能的または構造的なドメインが知られている場合、関心対象のポリペプチドの配列を、関心対象のポリペプチドのこのようなドメインに対応する断片に再分割することが望ましいかもしれない。上記の実施態様において、セグメントは、RTの5つの別々の構造的サブドメインのコード配列にほぼ対応する(Kohlstaedt, ら, (1992) Science 256, 1783-1789. Jacobo-Molina, ら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6320-6324)。セグメント1から4は、それぞれ、フィンガー、パーム、サム、およびコネクションのポリメラーゼサブドメインに対応し、セグメント5はRNase Hドメインに対応する(図2A)。

## 【0305】

本発明の材料および方法を使用して、当業者は、所望のレベルの耐熱性を有する改変したRT酵素を構築することができる。上記に提示した実施例において、H- M-MLV RTの操作温度は、45 より少なくとも10 上まで増加された。この標的温度は妥協として選択された：RNA二次構造を減少させることを補助するために十分に高く、かつRNA分解を避けるために十分に低い。Mg<sup>++</sup>によって触媒される化学的RNA分解の速度は、cDNA合成反応条件下で、温度を55より上で60 まで増加させると劇的に増加するが、特定の場合（例えば、顕著な二次構造を有するRNA）においては55 よりも高い温度、例えば、約60 、または約65 、または約70 で逆転写反応を行うことが所望され得る。上記の方法を使用して、適切なRTが日常的な実験を使用して構築され得る。

10

## 【0306】

変異誘発反応のための反応条件は、各セグメントにおける所望の数の変異を導入するように調製され得る。本研究において、セグメント当たり1~2個の変異の上限カットオフを、有害な変異の蓄積を抑制するため(Lehmann, ら, (2001) Current Opinion in Biotechnology 12, 371-375)、および活性な変異を見い出すために必要とされるスクリーニングの量を最小化するために、変異の頻度についての標的として設定した。当業者は、例えば、Mn<sup>2+</sup>濃度、pH、塩濃度などを調整することによって、条件がより高い変異頻度を誘導するために調製され得ることを理解する。セグメント1、2、または3において>5変異/セグメントの変異頻度は、約5%のみの活性変異体を産生し、すべての変異体が野生型よりも低い活性を有した。セグメント当たり1~2個の変異の使用される変異頻度で、約3分の1の変異体が活性がほとんどないか、活性を有さず、3分の1がHis<sub>6</sub> H-RT活性の50%未満の活性を有し、そして3分の1がHis<sub>6</sub> H-RT活性の100%までの活性を有した。

20

## 【0307】

変異した配列から産生されたポリペプチドは所望活性についてスクリーニングされる。このポリペプチドは粗抽出物、部分精製された抽出物、または精製されたポリペプチド調製物からスクリーニングされ得る。上記の実施例において、変異体の粗抽出物は、RT活性に特異的な鑄型-プライマーを用いて96ウェルプレート形式でスクリーニングされた(Gerald, ら, (1974) Biochim. 13, 1632-1641)。大腸菌細胞抽出物を産生するために使用する手順は、細胞を溶解するよりはむしろ透過させ、細胞マトリックスの外側にタンパク質および小さなRNAを放出するが、DNAを内側に保持する。これは、代表的なサンプリング、および細胞懸濁液の外因性鑄型-プライマーを用いるアッセイを実行可能にした。このアッセイのシグナル対ノイズ比は、変異細胞から出発して識別するために少なくとも2倍の活性の違いが必要とされるようなものであった。当業者は、他のスクリーニング方法が、例えば、関心対象の変異ポリペプチド(例えば、RT)を最初に精製することによって、活性レベルのより小さな変化の検出を可能にすることを認識している。

30

## 【0308】

このアプローチを利用して、2つの変異がセグメント3(サム)において発見され、および1つの変異がセグメント2(フィンガー)において発見された。部位特異的変異誘発と組み合わせた合理的配列相同性アプローチを使用して、フィンガーサブドメイン中に位置する第4の変異を同定した。発見された少数の変異ならびにセグメント1および4において変異を同定することの失敗は、おそらくランダム変異誘発アプローチおよびスクリーニングの両方の限界に起因した。ランダム変異誘発に課せられたセグメント当たり1~2変異の変異頻度カットオフは、変異集団において利用可能な変異の空間を制限した。アッセイが活性の2倍よりも小さな違いを検出することは不可能であることは、おそらく多くの活性変異体およびわずかに活性の耐熱性変異体を検出不可能にした。野生型M-MLV RTのRNase Hドメインはすでにポリメラーゼドメインよりも実質的に耐熱性であるので(Verma, I. (1975) J. Virol. 15, 843-854)、セグメント5において導入された安定化変異が、より耐熱性のポリメラーゼ活性についてのスクリーニングにおいて得られる可能性は低かった。

40

## 【0309】

使用されたアプローチを用いて見い出された変異の限られた数にも関わらず、同定され

50

たものは、RT耐熱性に有意なポジティブな影響を有した。His<sub>6</sub> H-M-MLV H204R M289L T306K F309N RTの耐熱性は、50 °Cにおいて30倍増大した。RT操作温度は70 ~ 55 °Cに増大した。4つの変異のうちの3つはRTの半減期を1.2から1.6倍に増大させ、第4の変異は、5倍の増大を与えた。タンパク質安定化における十分に確立された操作原理は、複数の変異によって得られる全体の安定化は、個々の変異の効果の合計であることであり、各変異が他の変異と独立してその効果を発揮すると仮定している (Wells, J.A. (1990) *Biochem. J.* 269, 85-95)。4つの変異の耐熱性効果は相加的であるらしいが、変異間の協同的相互作用に起因する耐熱性の増大へのさらなる寄与は除外することができない。

#### 【0310】

それによってこれらの4つの変異がM-MLV RTの耐熱性および鋳型-プライマー結合アフィニティーに影響を与えるメカニズムの議論は、3次元構造フレームワークを必要とする。M-MLV RTパームサブドメインにおけるH204Rでの変異の場合において、これは容易に達成される。なぜなら、M-MLV RTのフィンガー-パーム断片の構造は公知だからである (Georgiadis, ら, (1995) *Structure* 3, 879-892)。サムに位置するT306KおよびF309Nについては、本発明者らは、HIV RTから取られた3次元構造データに頼らなくてはならない (Kohlstaedt, ら, Jacobo-Molina, ら, Ding, ら, (1998) *J. Mol. Biol.* 284, 1095-1111およびHuang, ら, (1998) *Science* 282, 1669-1675)。幸運にも、HIV RTのサムサブドメインのこの領域 (T253 ~ P272) およびM-MLV RTの対応する領域 (T296 ~ P315) において、アミノ酸配列が合理的によく保存されている。M-MLV RTは、HIV RT ヘリックスHの構造に類似して、この領域中に ヘリックスを有することが予測され得る (Kohlstaedt, ら, Jacobo-Molina, ら, Kneller, ら, (1990) *J. Mol. Biol.* 214, 171-182, およびRost, B. (1996) *Methods Enzymol.* 266, 525-539)。

#### 【0311】

同時に、4つのRTアミノ酸変化は、この酵素のDNA合成触媒活性を有意に変化させることなく、これらの安定化効果を発揮した、しかし、2つの変異、H204RおよびF309Nは鋳型-プライマーへのRT結合を有意に低下された (表12)。M-MLV RT H204Rは、β-シート10-11 (β10-β11) のすぐ下のパームサブドメインの背側の長い β-ヘリックスH (βH) の中央に位置する (図9, Georgiadis, ら, 前出)。β-シート10-11は、鋳型-プライマーと接触するパームの内部の残基222から225までにM-MLV RTポリメラーゼ触媒部位 (YVDD) を含む (Georgiadis, ら, 前出)。H204Rの変化は、βHおよび β10-β11中のその近傍のアミノ酸残基のパッキングに直接的に影響を与え得、従って、β10-β11が鋳型-プライマーと相互作用するやり方に影響を与える。あるいは、その効果は、H204を含む β-ヘリックスおよびY222を含む β-シートが単一の短いターンによって分離されているので、ポリペプチドバックボーンに沿って翻訳され得る (図9)。上記に議論したように、M-MLV RTおよびHIV RTのアミノ酸相同性比較に基づいて、およびHIV RTの結晶構造から

(Kohlstaedt, *et al.*,

*supra*, Jacobo-Molina, *et al.*, *supra*, Ding, *et al.*, *supra*, Huang, *et al.*, *supra*,

Kneller, *et al.*, *supra*, Rost, Bebenek, *et al.*, (1997) *Nature Structural Biology*

4, 194-197, and Beard, *et al.*, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 30435-30442)

M-MLV RTにおけるF309はRTサムサブドメインの β-ヘリックスにおける小さな溝の結合トラックの一部であることが予測され得る。HIV RTにおいて、この構造は、鋳型-プライマーへのRT結合に有意に寄与する (Bebenek, ら, 前出)。M-MLV RTにおける309位の芳香族性フェニルアラニンが、HIV RTにおけるトリプトファン266に対応する (Bebenek, ら, 前出)。HIV RT W266の広範なアミノ酸置換研究は、この位置での任意の置換が鋳型-プライマーについてのRTの結合アフィニティーを減少させることを示す (Beard, ら, 前出)。本発明者らは、M-MLV RT F309のアスパラギンへの変化が、推定のM-MLV RTの小さな溝の結合トラックの構造に影響を与え、鋳型-プライマーについての結合アフィニティーの減少を生じると仮定する。興味深いことに、T306Kは、H204RまたはH204RおよびF309Nによって一緒



に產生された結合アフィニティーの減少を補償することができ、元々のレベルまで鋳型-プライマー結合アフィニティーを回復した(表12)。再度、この領域中のアミノ酸相同性に基づいて、M-MLV RTにおけるT306が、小さな溝の結合トラックを含むHIV RTの $\alpha$ -ヘリックスにおける263位のリジンに対応する。二本鎖DNAと複合体形成したHIV RTの結晶構造は、K263がDNAプライマーのn-2リン酸を接触することを示す(Ding, ら, 前出、Huang, ら, 前出)。306位のフェニルアラニンの代わりに正に荷電したリジンのM-MLV RTへの導入は、H204RおよびF309Nの結合の減少を補償し、これはおそらく、n-2プライマーリン酸の位置でのRT結合を向上させることによる。

#### 【 0 3 1 2 】

H204Rは、最高の個別のH- M-MLV RTに対する耐熱性効果を有した。204位においてヒスチジンが、パームサブドメインの下面の $\alpha$ -ヘリックス Hにおいてより高度に荷電したアルギニンで置換された(Georgiadis, ら, 前出)。M-MLV RTのフィンガー-パーム断片の3次元構造モデルの精査(Georgiadis, ら, 前出)は、この置換がアルギニンを適切な距離に配置し、 $\alpha$ -ヘリックス HにおけるE201と塩橋を形成するか、または $\alpha$ -シート6と $\alpha$ -ヘリックス Eとの間のループにおけるT128と水素結合を形成することを示す(図9)。いずれの事象もRT分子を安定化することを補助する(Kumar, ら, (2001) Cell. Mol. Life Sci. 58, 1216-1233)。

#### 【 0 3 1 3 】

306位でのスレオニンからリジンへの変異は、おそらく、ポリペプチドバックボーンを安定化することへの静電的寄与をなすことによってM-MLV RTの耐熱性に寄与する。すべての可能なアミノ酸でのこの部位の飽和は、アルギニンまたはリジンのみがM-MLV RT耐熱性を増大させることを示した。これらのアミノ酸の両方は、残基306を含む推定の $\alpha$ -ヘリックスに接続するループにおいて、主鎖のカルボニル基およびアミノ酸側鎖への水素結合を可能にし得る。

#### 【 0 3 1 4 】

それによってF309NがM-MLV RT耐熱性を増大させるメカニズムについての予測は、鋳型-プライマー結合におけるその提案される役割によって複雑化される(上記の議論を参照のこと)。M-MLV RTの309位はまた、すべての可能なアミノ酸変化を用いる飽和によって試験された。セリンおよびアスパラギンのみが耐熱性を増大させた。露出した疎水性フェニルアラニンの代わりに荷電したアミノ酸での置換は、他のタンパク質ファミリーにおいては中等温度好性ファミリーの代表から好熱性ファミリーの代表への移行において観察されるアミノ酸変化によく相関しており(Kumar, ら, 前出、Cambillau, ら, (2000) J. Biol. Chem. 275, 32383-32386)、これは、ポリメラーゼ活性を低下または除去した。露出した疎水性アミノ酸の代わりに極性アミノ酸での置換との耐熱性の増大の相関は、はるかに低い頻度でタンパク質ファミリーにおいて観察されており(Kumar, ら, 前出、Cambillau, ら, 前出)、その結果、309位におけるF Nの安定化効果についての構造的な基礎は不明である。

#### 【 0 3 1 5 】

M-MLV RT M289の領域におけるHIV RTとM-MLV RTとの間の3次元構造情報および合理的な配列相同性の両方が存在しないため、M-MLV RT耐熱性に対するM289Lの寄与についての構造的基礎を予測することは困難である。一般的な傾向として、耐熱性タンパク質は、それらの中等温度好性の対応物よりも多くのおよびより大きな疎水性アミノ酸を有し、これらはタンパク質コアから水をより良好に排除することができる(Cambillau, ら, 前出)。289位におけるM Lが、分岐していないメチオニンを $\alpha$ -分岐したロイシンで置換することによってより良好な疎水性パッキングを可能にすることを通じて、M-MLV RT耐熱性を増大させる可能性がある(Cambillau, ら, 前出)。

#### 【 0 3 1 6 】

タンパク質の耐熱性を増大させる変異を同定することに焦点を当てた他の研究の結果と一致して(Arnold, ら, (2001) Trends in Biochemical Sciences 26, 100-106)、本研究において同定された変異はおそらくRT表面に存在し、触媒活性に影響を与えることなく

10

20

30

40

50

耐熱性に影響を与える。2つの安定化アミノ酸、T306およびF309の場合、これらはおそらく、鋳型-プライマーと接触するタンパク質表面に存在し、結合に対するそれらの効果が相殺されるようなやり方でこれらは結合する。

#### 【0317】

本発明は、所望の特性を含むポリペプチドを操作するための材料および方法を提供する。例として、M-MLV RT遺伝子が酵素の耐熱性を増大するように変異された。この研究の目的は、M-MLV RTが、RTの固有の耐熱性を増大させることによって、48 から約55 、約60

まででcDNA合成を効率的に触媒する温度を増大させることである。レトロウイルスRTを55 から60 で使用する能力は、cDNA合成の開始の効率と特異性の両方を増大させる。使用された変異誘発およびスクリーニングのアプローチを用いて、M-MLV RTの操作温度の限界を少なくとも約55 まで増加させる変異が同定された。作製されたこれらの変異は50 における半減期として測定された固有の耐熱性を劇的に増大させ(約30倍)、これは55 において部分的に維持された(半減期の5倍の増加)。すでに同定した4つの変異で強力に構築され得る代替的なアプローチが存在する。例えば、標的変異頻度は、H-M-MLV RT四重変異ポリメラーゼドメインのいくつかの大きなセグメントのランダム変異誘発の間にはるかに高く(5-10変異/セグメント)設定され得、はるかに小さな活性変異体の割合であるが、はるかに広い変異スペクトルを与える。次いで、この様式で生成されたいくつかのライブラリーが組換えによってシャッフルされ得(Stemmer, W.P.C. (1994) Nature 370, 389-391)、これは、有害な変異を除外する傾向がある(Lehmann, ら, 前出)。より高感度に作製された96ウェルDNAポリメラーゼ活性スクリーニングおよびスクリーニングされる変異の数を増加させるためにウェル当たり複数の変異をアッセイするために使用されるサンプリング手順と組み合わせ、このようなアプローチは、M-MLV RTの耐熱性をさらに増大させるさらなる変異を産生するはずである。

#### 【0318】

実施例7: SUPERScript(商標)III RTの操作、耐熱性、cDNA合成

モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLV)RNase H- マイナス(H-) 逆転写酵素(RT)についての遺伝子(SUPERScript(商標)IIとしても知られる)をランダムに編誘発させ、変異体を耐熱性の増大についてスクリーニングした。一緒にM-MLV H- RTの50 における半減期を35倍増加させ、RT cDNA合成操作温度を42 から55まで上昇させた4つの変異を同定した。耐熱性の増大はM-MLV H- RTの固有の耐熱性を増加させることによって、酵素のDNAポリメラーゼ触媒活性を減少させることなく達成した。

#### 【0319】

逆転写酵素(RT、例えば、レトロウイルスRT)は、cDNAの合成およびクローニングのための必須のツールである。cDNAを合成するために広範に使用されるレトロウイルスRTの型は、M-MLV RTおよびAMV RTである。ポリメラーゼ活性に加えて、レトロウイルスRTは、RNA-DNAハイブリッドにおけるRNAを分解するRNase H活性を有する(Moelling, ら, (1971) Nature New Biology 234, 240-244)。この分解性活性の存在は、部分的には、長いcDNAの効率的な合成に対する制限の原因である(Krug and Berger (1987) Methods in Enzymol. 152, 316-325; Berger, ら, (1983) Biochem. 22, 2365-2372)。RTのRNase Hドメインは、mRNA指向性DNAポリメラーゼ活性を維持しながら、RNase H活性を低下または除去するように変異させることが可能であり(Kotewicz, ら, (1988) Nuc. Acids Res. 16, 265-277; DeStefano, ら, (1994) Biochim. Biophys. Acta 1219, 380-388)、cDNA合成の効率を改善する(Kotewicz, ら, 前出)。これは、SUPERScript(商標)IIおよびThermoScriptにおいて行われた。

#### 【0320】

mRNAをコピーすることに対する第2の顕著な欠点は、短縮型の産物の生成を生じるcDNA合成の間に中断するRTの傾向である(Harrison, ら, (1998) Nuc. Acids Res. 26:3433-3442, DeStefano, ら, (1991) J. Biol. Chem. 266:7423-7431)。この中断は部分的にはRNAの二次構造に起因する(Harrison, ら, 前出, Wu, ら, (1996) J. Virol. 70, 7132-7142)。mRNAの二次構造を融解する反応温度でcDNA合成を実行することは、この問題を緩和

することを助ける (MyersおよびGelfand, (1991) Biochem. 30, 7661-7666)。さらに、cDNA合成を開始するためにしばしば使用されるオリゴ(dT)<sub>n</sub>プライマーは、より低い温度でmRNA中のA残基の内部ストレッチでプライムする傾向があり、3'-末端短縮型cDNA産物の合成を生じる。M-MLV RTは43より上ではmRNAからcDNAを効率的に合成しない (Tosh, ら, (1997) Acta Virol. 41, 153-155)。

#### 【0321】

SUPERSCRIPT(商標)II RTがcDNAを合成するために使用され得る温度を上昇させる試みにおいて、本発明者らは、SUPERSCRIPT(商標)II RT遺伝子をランダムに変異させ、耐熱性変異体についてスクリーニングした。SUPERSCRIPT(商標)II RTのいくつかの耐熱性変異体を同定し、精製した酵素を特徴付けした。本発明者らは、変異が一緒に存在するときに、それらは触媒活性を変化させることなく、その固有の耐熱性を増大させることによってRT高温活性を増大させることを示した。

10

#### 【0322】

SUPERSCRIPT(商標)III RT精製：

SUPERSCRIPT(商標)III RT遺伝子はSUPERSCRIPT(商標)II RTに由来した。SUPERSCRIPT(商標)II RTに存在する3つのRNase H変異に加えて、4つの変異を、耐熱性を増大させるためのN末端への改変とともに含められた。この遺伝子を、araDプロモーターの制御下で、プラスミドpBAD(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)にクローニングした。精製されたタンパク質は78kDaの見かけの分子量を有する。このプラスミドを大腸菌 DH10B(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)に形質転換し、細胞および種ストックをEG(2%トリプトン、1%酵母抽出物、0.5%グリセロール、10mM NaCl、および1mM KCl)中で1.0のO.D.まで増殖させ、60% S.O.B./40%グリセロール中で-80で凍結させた。

20

#### 【0323】

精製のために、凍結した種ストックからのスタブを使用して500mlのスターター培養に接種した。R&Dプレップのために使用した培地は、100 µg/mlアンピシリンを補充したEGまたはCircleGrow(Bio101)のいずれかであった。スターター培養を37で一晩インキュベートし、これを使用して10リッターEG+Amp培地に接種した。培養を37で、1.0のOD<sub>600</sub>まで(3-4時間)培養し、0.2%アラビノースで誘導し、そしてインキュベーションをさらに3時間継続した。細胞を、4で5,000g、20分間の遠心分離によってペレット化した、上清を除去し、細胞を-80で凍結させるか、または処理するかのいずれかであった。

30

#### 【0324】

SUPERSCRIPT(商標)IIIの精製を、第3のカラムとしてヘパリンアガロースの代わりにAF-ヘパリン650Mレジン(TosoHaas)を使用することを例外として、SUPERSCRIPT(商標)IIと同様に、かつ以下に概説するように精製した。すべての緩衝液はオートクレーブされなくてはならず、およびカラムはRNase汚染を妨害するために徹底的に洗浄されなければならない。他に示されない限り、手順は4で行う。

#### 【0325】

精製方法A

50グラムの細胞を100mlの緩衝液A (細胞ペレット1グラムにつき2ml : 20mM Tris-HCl(pH 7.5)、25mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、1.3mM PMSF) に溶解し、均質になるまで4で攪拌する。さらに0.78mlの0.1M PMSFを加え、十分に混合した(5分間)。6枚重ねのチーズクロスを通して株細胞を濾す。1容量の緩衝液Aであらかじめ平衡化した(ガウリン(gaulin)中での泡および粒子を避けるため)ガウリンを通して、4-6で、8000psiで試料を濾過する。反復し、試料を>80%溶解についてチェックする。細胞の体積を測定し、溶解物に0.053容量の5M NaClを加えた。混合されるまで4で攪拌する。0.111容量の5%ポリミンP(pH 7.9)を、混合しながら30分間にわたって加え、次いで、さらに30分間混合する。18,100 g、60分間、4で遠心分離し、上清を保持する。266g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を、上清に攪拌しながら30分間にわたって加え、さらに30分間混合する。18,100 g、60分間、4で遠心分離し、上清を保持する。もともとのペレット重量1gあたり0.52mlで(26ml)、1時間、攪拌しながら、ペレットを緩衝液B(20mM Tris-HCl(pH 7.5)、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.

40

50

01% NOG、5% グリセロール)にペレットを再懸濁する。

【 0 3 2 6 】

G-25 Fカラム(AP-Biotech、270ml レジン体積)を緩衝液Bで平衡化し、次いで試料をロードした。2カラム体積の緩衝液Bを用いて、3.3ml/分の流速で、6ml/チューブの分画容量で、カラムを洗浄し、および試料を溶出させた。画分をUV吸収および明瞭な琥珀色に基づいてプールした。沈殿が形成した場合、そのプールを18,100gで30分間、4 で遠心分離した。

【 0 3 2 7 】

この画分プールを、1.0ml/分の流速で緩衝液Bであらかじめ平衡化したP-11カラム(Whatman: 2× サイクル、25ml レジン体積)にロードした。このカラムを10カラム体積の緩衝液C (20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)で洗浄し、12カラム体積の100から500mMのNaCl 勾配(緩衝液Cおよび0から100%の緩衝液D: 20mM Tris-HCl pH 7.5、500mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)を用いて、1.6ml/分の流速および4mlの分画容量で溶出させた。画分は、 $OD_{280} > 50\%$  ピーク高さまたは $> 50\%$  ピークRT活性のいずれかによってプールした。次いで、画分プールを、1容量の緩衝液E(20mM Tris-HCl pH 7.5、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)で希釈した。

【 0 3 2 8 】

次いで、希釈したプールを、緩衝液F(20mM Tris-HCl pH 7.5、160mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)で、0.7ml/分の流速であらかじめ平衡化したAF -ヘパリン650Mカラム(TosoHaas、12.5ml レジン体積)にロードした。

【 0 3 2 9 】

このカラムを10カラム体積の緩衝液F(20mM Tris-HCl pH 7.5、160mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)で洗浄し、10カラム体積の160から700mMのNaCl 勾配(緩衝液Fおよび0から100%の緩衝液G: 20mM Tris-HCl pH 7.5、700mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)を用いて、0.5ml/分の流速および2mlの分画容量で溶出させた。画分は、 $OD_{280} > 50\%$  ピーク高さまたは $> 50\%$  ピークRT活性のいずれかによってプールした。次いで、画分プールを、3容量の緩衝液H(20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.03% NP-40、5% グリセロール)で希釈した。

【 0 3 3 0 】

次いで、希釈したプールを、緩衝液I(20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)で、1.2ml/分の流速であらかじめ平衡化したSP Sepharose HPカラム(Ap Biotech、12.5ml レジン体積)にロードした。このカラムを10カラム体積の緩衝液I(20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、5% グリセロール)で洗浄し、10カラム体積の100から280mMのNaCl 勾配(緩衝液Iおよび0から40%の緩衝液G)を用いて、0.6ml/分の流速および2mlの分画容量で溶出させた。画分は、 $OD_{280} > 50\%$  ピーク高さまたは $> 50\%$  ピークRT活性のいずれかによってプールした。

【 0 3 3 1 】

SepharoseカラムからのRT含有画分を、20容量の緩衝液J(20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、50% グリセロール)に対して4 で一晩透析した。

【 0 3 3 2 】

精製方法B

100グラムの細胞を80mlの透過化処理緩衝液(500mM Bis-Tris, pH 7.0(4 )/50mM EDTA/5mM DTT)に懸濁した。(注記: DTTは別個の成分として加えることができ、従って、加える水の量は調整される) 79.6mlの $H_2O$ を加え、細胞懸濁物を、オーバーヘッドスターラーを用いて、~700rpmで、Heidolphミキサーを用いて、または6+でStirPakミキサーを用いて、3ブレードのミキサーシャフトを使用して攪拌する。懸濁物を、ミキサーを停止させること、およびクランプを探しながら懸濁物をゆっくりとガラスピーカーに注ぐことによって、それが均質であることを確認するためにチェックする。一旦完全に混合されたら、

10

20

30

40

50

80mlの25% Triton X-100/10%デオキシコール酸(室温で)を、激しく攪拌しながら(上記のように)加える。400ulの100mM PMSFを加え、懸濁物を混合しながら4 で30分間放置する。60mlの2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え、混合をさらに15分間、4 で継続する。ここで試料を取ることができ、濾過段階に進むことができる。

体積:

細胞	100 ml
緩衝液	80 ml
H <sub>2</sub> O	79.6 ml
界面活性剤	80 ml
PMSF	0.400 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60 ml
<hr/>	
	400 ml

10

### 【0333】

濾過

細胞スラリーを循環ベッセルに注ぎ、1.5L/分/ft<sup>2</sup>の流速で、1.0mm管腔を有する0.2um Spectrum混合エステルセファロース中空繊維フィルターを通して確立する。抽出を、4-6 で、5-10psiのTMPを維持しながら、7容量の100mM TRIS, pH 8.0/300mM 硫酸アンモニウム/10mM EDTA/1mM DTT/10% グリセロール(v/v)を用いて実行する。

20

### 【0334】

一旦濾液が収集されたら、50psiの最大入口圧力で、AG/Tech 30,000 MWCO中空繊維を使用する2段階目の濾過を開始する(すべての操作を4-6 で冷却する)。一旦7容量の抽出物をすべて収集し、溶液を600mlに濃縮し、5容量の100mM Tris, pH 8.0/100mM NaCl/10mM EDTA/1mM DTTに対してダイアフィルトレーションを行う。

### 【0335】

ダイアフィルトレーションの保持物を収集し、事前に平衡化した50mlのDEAEセルロースを加える。この懸濁物を4 で15分間穏やかに混合する。得られる溶液をCUNO 30 SPデブスフィルターを通しての濾過によって清澄化する。

30

### 【0336】

クロマトグラフィー

上記の溶液を、事前に平衡化した120mlカラムのMacrorep High S(20mM Tris, pH 8.0/150mM NaCl/10%グリセロール/1mM EDTA/1mM DTT/0.01% Triton X-100)にアプライする。このカラムを10体積の平衡化緩衝液で洗浄し、平衡化緩衝液から800mM NaClを含む同じ緩衝液までの直線状勾配で溶出させる。50画分を収集し、主要なuvピークをプールの。

### 【0337】

プール画分を、事前に平衡化したセラミックハイドロキシアパタイトの120mlカラム(20mM Kpi, pH 7.0/100mM KCl/10%グリセロール/1mM DTT/0.01% Triton X-100)に20cm/hでアプライする。溶出はこの同じ緩衝液を用いて行い、10ml画分を収集する。uvピークをプールし、等量の可溶性緩衝液(100mM Tris, pH7.5/300mM NaCl/0.2mM EDTA/30% グリセロール/1mM DTT)を加える。

40

### 【0338】

プール画分を、事前に平衡化したEM COO-の16mlカラム(20mM Tris, pH 7.5/100mM NaCl/0.1mM EDTA/20%グリセロール/1mM DTT/0.01% Triton X-100)に20cm/hでアプライする。このカラムを2カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄する。溶出は平衡化緩衝液から200mM NaClを含む同じ緩衝液までの直線状勾配を用いて行う。uvピークをプールし、20容量の20mM Tris, pH7.5/100mM NaCl/0.1mM//1mM DTT/0.01% Triton X-100/50% グリセロールに対して透析する。

50

## 【0339】

## DNAポリメラーゼアッセイ

RT DNAポリメラーゼ単位活性を $(rA)_{630} \cdot p(dT)_{12-18}$ を用いてアッセイした。1単位のDNAポリメラーゼ活性は、1ナノモルのデオキシヌクレオシド三リン酸を37℃、10分間で酸不溶性産物に取り込むRTの量である。比活性はタンパク質濃度で単位/ $\mu$ lを除算することによって決定され、単位/mgが得られる。

## 【0340】

CAT cRNAからのcDNA合成を、50mM Tris-HCl(pH 8.4)、75mM KCl、3mM  $MgCl_2$ 、10mM ジチオスレイトール(DTT)、500  $\mu$ M 各dATP、dTTP、dGTP、および $[^{-32}P]$ dCTP(300cpm/ピコモル)、1,750単位/ml RNaseインヒビター、130  $\mu$ g/ml(465nM)CAT cRNA、20  $\mu$ g/ml(2,300nM)  $p(dT)_{25-30}$ 、および3,250単位/ml(100nM)RTを含む反応混合物(20  $\mu$ l)中で実行した。インキュベーションは種々の温度で60分間、個々のチューブであった。反応混合液のアリコートをTCAで沈殿させ、合成されたcDNAの収率を決定し、残りのcDNA産物をアルカリ性1.2%アガロースゲルで分画した。一価および二価の金属の反応最適濃度を確立するために、37℃または50℃での10分間のインキュベーションの間、RT濃度を制限する条件下で、反応の初速度を測定した。反応混合液(20  $\mu$ l)は、50mM Tris-HCl(pH 8.4)、10mM DTT、500  $\mu$ M 各dTTP、dATP、dCTP、および $[^3H]$ dGTP(100cpm/ピコモル)、10ピコモル(2.8  $\mu$ g)CAT cRNA、50ピコモル DNA 24マー、0.5ピコモル RT、ならびに1度に1つの濃度を変化させたKClおよび $MgCl_2$ 。

## 【0341】

## 半減期測定：

混合液(20  $\mu$ l)を、種々の時間、サーモサイクラー中の0.5mlチューブ中で50℃または55℃でインキュベートし、これは50mM Tris-HCl(pH 8.4)、75mM KCl、3mM  $MgCl_2$ 、10mM DTT、0.1%(v/v) Triton X-100、および3-7  $\mu$ g/ml精製RTを含んだ。インキュベーションを、チューブを氷上に配置することによって停止した。アリコート(5  $\mu$ l)を、残渣の活性について $(rA)_{630} \cdot p(dT)_{12-18}$ を用いてアッセイした。

## 【0342】

フィルター結合による $K_D$ の測定：

ニトロセルロースフィルター結合アッセイを使用して、CAT cRNA  $\cdot (dT)_{20}$ についてのRTの核酸結合定数( $K_D$ )を決定した。脱リン酸化したCAT cRNAを5'末端で $[^{-32}P]$ ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼ(Boehringer)を用いて標識した。オリゴ $(dT)_{20}$ を、10mM Tris-HCl, pH 7.5、および80mM KClを含む緩衝液中で、65℃、5分間、ポリ(A)テールCAT cRNAにアニールさせ、次に氷上で冷却した。結合緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 8.4、75mM KCl、3mM  $MgCl_2$ 、10mM DTT)、0.05nM  $^{32}P$ -標識CAT cRNA、1nM $(dT)_{20}$ 、および1~50nM RTを含む反応混合液(100  $\mu$ l)を23℃で5分間インキュベートした。インキュベーション後、混合液を結合緩衝液に浸漬させたニトロセルロースフィルター(Millipore, HA 0.45mm)を通して濾過し、次いでこれを結合緩衝液で洗浄した。 $K_D$ は、50%の標識されたCAT cRNAが結合する酵素濃度に等しい。この分析の方法が有効であるためには、反応におけるCAT cRNA濃度は、全体の酵素濃度が遊離の結合していない酵素の濃度に近接するように、実質的に $K_D$ より下でなくてはならない。

## 【0343】

## LacZ忠実度測定：

忠実度測定を、Boyer, J.C. ら, (Methods in Enzymology, Vol 275, p 523-537)からの改変lacZギャップ手順を使用して実行した。手短に述べると、ヌクレオチド-112と-113(ここで+1位はlacZ遺伝子の最初の転写されるヌクレオチドである)の間のT7 RNAポリメラーゼについてのプロモーターを含む改変pUC19プラスミドを使用した。このプラスミドをFspIで線状化し、T7 RNAポリメラーゼによる転写は、344ヌクレオチドの転写物を産生する。このRNAを鋳型として使用して、所望の条件下でのcDNA合成(200単位のSUPERScript(商標)III RTまたは15単位のAMV H+ RT、これらのそれぞれの緩衝液中で)を、15マーDNAプライマーから開始した。熱変性後、RNAを消化させ、過剰のcDNAを相補的一本鎖ギャッ

10

20

30

40

50

プを含む環状DNA基質とのハイブリダイゼーションのために使用した。この基質を、適切な緩衝液中でPvuIおよびPvuIIを用いてM13mp19 RFを切断すること、および大きな線状断片を単離することによって作製した。次いで、この断片を変性させ、そして2倍過剰の一本鎖M13mp19のみに再アニーリングさせた。得られるDNA産物は、コンピテントDH12S細胞に移され、X-galおよびIPTGを含むLBインジケータプレートにプレーティングされ、そしてプラークが着色について計数される。変異の頻度を、変異プラークの数(明るい青色または白色)を全体の数で除算することにより決定した。酵素の変異頻度は、開始DNAの変異頻度を差し引きすることによって補正する。誤り率を、変異頻度を既知の検出可能な部位の数(116)で除算すること、次いで、マイナス鎖の発現の確率(50%)で除算することによって決定する。

10

#### 【 0 3 4 4 】

rpsL忠実度アッセイ：

忠実度アッセイを、rpsL変異体を示すストレプトマイシン耐性に基づいて実行した(Fuji i, ら, (1999) J Mol Biol. 289(4):835-50)。手短に述べると、アンピシリン(Ap<sup>r</sup>)遺伝子および(rpsL)遺伝子を含むpMOL 21プラスミドDNA(4kb)を、rpsL遺伝子の下流のT7プロモーター配列の挿入によって改変した。このプラスミドを、ScaIで線状化し、この鑄型を、rpsL遺伝子を含む1.4kb RNAのインビトロ転写のために使用した。所望のRTおよび反応条件を使用する第1鎖cDNA反応を実行し、続いて、polI、RNase Hおよびリガーゼを使用して第2鎖合成を行った。次いで、この二本鎖DNAをHindIIIおよびEcoRIで切断し、もとのpMOL 21プラスミドに再度クローニングし、そしてMF101コンピテント細胞に形質転換した。細胞をアンピシリンプレート上にプレーティングし、形質転換細胞の総数を測定した。細胞をアンピシリンおよびストレプトマイシンプレートにプレーティングし、rpsL変異体の総数を測定した。変異頻度を、変異の総数を形質転換細胞の総数で除算することによって決定した。誤り率を、変異頻度を130(rpsLの表現型変化を引き起こすアミノ酸の数)で除算すること、および鑄型を倍化させることによって決定した。加えて、rpsLを、鑄型の偏りを除外するために変異しやすい配列を変化させることによってさらに改変した。

20

#### 【 0 3 4 5 】

TDT活性：

鑄型-プライマーを、47マー鑄型(RNAまたはDNAのいずれか)：

GAGTTACAGTGTTTTTGTTCAGTCTGTAGCAGTGTGTGAATGG

30

AAG -3' (SEQ ID NO:6)

をT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端で[<sup>32</sup>P]標識した18マーDNAプライマー  
(5'-GAACAAAAACACTGTAAGTC-3' (SEQ ID NO:10))

にアニーリングさせることによって調製した(鑄型:プライマー=3:1)。アッセイ混合液(10 μl)は、5nM 鑄型-プライマー、200単位の各SUPERSCRIP(T(商標)IIまたはSUPERSCRIP(T(商標)III、図の説明文に記載されるように、4種すべてのdNTP、すべてなし、またはdCTP、dATP、dTTP、dGTP(各250μM)、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTTを含んだ。反応を種々の温度で、10分間または60分間インキュベートし、5 μlの40mM EDTA、99%ホルムアミドの添加により停止させた。反応産物を95 °Cで5分間インキュベートすることによって変性させ、尿素6%ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動によって分析した。

40

#### 【 0 3 4 6 】

半減期の測定：

混合液(20 μl)を種々の時間、サーモサイクラー中の0.5mlチューブ中で、50 °C、55 °C、または60 °Cでインキュベートし、この混合液は、1×第1鎖緩衝液(50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、3mM MgCl<sub>2</sub>(総計6mM)、0.5mM dTTP、0.05%(v/v)NP-40、[メチル-<sup>3</sup>H]dTTP(20 μCi/ml)、および5 μl RTを含んだ。インキュベーションを、チューブを氷上に配置することによって停止させた。アリコート(5 μl)を、5mM ポリ(A)/

50

3mM オリゴ(dT)<sub>25</sub>を用いて残渣の単位活性についてアッセイした。1単位のRT DNAポリメラーゼ活性は、酸不溶性産物に37℃、10分間で1nmolのデオキシヌクレオシド三リン酸を取り込むRTの量である。

【0347】

全長DNAプロファイリング：

SUPERSCRIP(T商標)IIIによるcRNAからのcDNA合成を、1×第1鎖緩衝液(50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>)、10mM ジチオスレオトル(DTT)、500 μM 各dATP、dTTP、dGTP、およびdCTP、[γ-<sup>32</sup>P]dCTP(300cpm/ピコモル)、2単位/μl RNaseOUT、異なる量のRNA、および0.5 μg オリゴ(dT)<sub>25</sub>を含む反応混合液(20 μl)中で実行した。混合物を種々の温度で2分間あらかじめ加温した。加温後、200または400単位のSUPERSCRIP(T商標)II 1 RTを加える。混合物を、個々のチューブ中で、さらに50分間、同じ温度でインキュベートした。反応を、10 μlの0.5M EDTAを加えることによって停止させた。反応混合物のアリコート(5 μl)をTCAで沈殿させ、合成したcDNAの収率を決定し、そして残りのcDNA産物をアルカリ性1.2%アガロースゲル上でサイズ分画した(McDonell, ら, J. Mol. Biol. 110, 199-146, 1977)。他のベンダーからのRTについては、各々を製造業者の示唆に従ってアッセイした。

10

【0348】

結果および考察

ポリペプチドの表示。他に示されない場合には、以下の表示が本発明の種々のポリペプチドを記載するために使用される。SUPERSCRIP(T商標)IIは、開始コドンとして付加されたメチオニンを有し、RNase H活性を低下させる3つの点変異を有するM-MLV逆転写酵素である。EFNは、N末端6ヒスチジンタグ配列

20

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH

(SEQ ID NO:2および表3のアミノ酸1-32)を伴うSUPERSCRIP(T商標)II配列を有し、およびSUPERSCRIP(T商標)II配列のH204R、T306K、およびF309NであるEFN変異を含むポリペプチドを示す。タグ化されたHisなしEFNは、タグ配列

MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:3)

およびEFN変異を含み、タグなしEFNはEFN変異を含む。SUPERSCRIP(T商標)IIIは、LEFNとも呼ばれてもよく、SUPERSCRIP(T商標)II配列およびN末端タグ配列

30

MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:11)

およびSUPERSCRIP(T商標)II配列のH204R、M289L、T306K、およびF309NであるLEFN変異を有する。Hisタグ化LEFNは、N末端6ヒスチジンタグ配列

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH

(SEQ ID NO:2および表3のアミノ酸1-32)を有するポリペプチドを示し、LEFN変異を含む。

【0349】

精製：

40

タンパク質は十分に発現され、毒性でないようである。種々のレベルのアラビノース誘導を使用して、0.2%が最適であるが2.0%とは大きく異ならなかった。3時間より長い誘導時間を行うことができるが、より長いインキュベーション時間にわたって生成される70kDa産物が存在する。N末端ヒスチジンタグ化クローンが精製されたときにこのタンパク質もまた同時精製される、C末端が除去されたプロテアーゼ消化産物が存在するようである。

【0350】

精製プロトコールは、本質的に、SUPERSCRIP(T商標)IIおよびSUPERSCRIP(T商標)III酵素について使用されたものと同じであり、精製の過程でほぼ同じに振る舞う。SUPERSCRIP(T商標)IIIは、沈殿の問題を伴うことなく、透析後に2,000-4,000単位/μlの濃度で調製され得る。

50



## 【0351】

忠実度：

初期の結果は、rpsLまたはlacZ のいずれかを使用して、SUPERScript(商標)IIおよびSUPERScript(商標)IIIの間で違いが示されなかった。RTは、ヌクレオチドのホモ多量体ランにおいて配列依存的な変異のホットスポットを有し、主にAまたはTのランである、これらのランにおける大部分の一般的な変異は、鋳型またはプライマーのブリーディングおよび重複との再アニーリングによって引き起こされる。得られるフレームシフト変異は、通常、遺伝子産物の早すぎる終止を生じる。改変されたEFNポリペプチド(これは、H204R、T306K、およびF309N変異を含む)は、SUPERScript(商標)IIおよびMMLV H+と比較して改善されたフレームシフトの誤り率を有した。実験は、SUPERScript(商標)III(これは、H204R、T306K、およびF309N変異に加えて、M289L変異を含む)もまた、この改善を有する。

10

## 【0352】

比活性：

SUPERScript(商標)IIIの比活性はSUPERScript(商標)IIよりも約25%高い。RT DNAポリメラーゼ単位活性は37 で  $(rA)_{630} \cdot p(dT)_{12-18}$  を用いてアッセイされ、タンパク質濃度はBradfordアッセイによって決定された。表14は、37 で10分間、 $(rA)_{630} \cdot p(dT)_{12-18}$  使用したSUPERScript(商標)IIおよびSUPERScript(商標)IIIのRNA指向性DNAポリメラーゼ比活性を示す。

## 【0353】

(表14)

20

酵素	DNA ポリメラーゼ比活性 (単位/mg)
SUPERScript(商標)II	330,000
SUPERScript(商標)III	410,000

## 【0354】

一価-および二価-金属反応最適濃度：

プライミングしたCAT RNAを基質として使用して、 $Mg^{2+}$ およびKCl最適濃度を決定し、これは図10Aおよび10Bにおいて示される。SUPERScript(商標)III RTについてのDNAポリメラーゼアッセイを、37 または50 で、10分間、種々の $Mg^{2+}$ (図10A)またはKCl(図10B)の下で実行した。37 におけるSUPERScript(商標)IIを比較のために含める。 $Mg^{2+}$ 最適濃度は37 および50 の両方で3mMである。しかし、50 では2-5mMのより広い作用範囲であり、これらの間では大きな違いはないようである。KClについては、最適濃度は両方の温度で75mMであるが、作用範囲は25mMから125mMまでの範囲であり、これらの間では大きな違いはない。再度、より高い温度においては、より広いハイブリダイゼーションに可能である(25-200mM)。SUPERScript(商標)IIとSUPERScript(商標)IIIとの間で最適濃度の違いは存在しないので、SUPERScript(商標)IIからの5×第1鎖緩衝液を、SUPERScript(商標)IIIの反応緩衝液として使用し得る。

30

## 【0355】

TdT活性：

40

TdTまたは3'プライマーへの非鋳型指向性ヌクレオチド付加は、RTを含む多くのポリメラーゼの周知の特性である(Chen, D., ら, Biotechniques 2001; 30(3):574-582)。DNA鋳型を使用して(図11A)、SUPERScript(商標)IIは、転写物の末端に1-3の付加的ヌクレオチドを付加する。しかし、SUPERScript(商標)IIIはTdTが非常に低下しており、DNA鋳型ではいかなる検出可能なヌクレオチドも付加しない。RNA鋳型では(図11B)、SUPERScript(商標)IIは、10分後に69%がプライマー伸長され1-2塩基を付加し、1時間後では90%がプライマー伸長され1-2塩基を付加した。SUPERScript(商標)IIIはRNA鋳型に対してはある程度のTdT活性を有するが、図11Bに示されるように、10分後では約14%の伸長、45 で1時間後では50%伸長に減少した。TdT活性は、SUPERScript(商標)IIおよびIIIの両方で、強力に好むdATPの付加に偏っており、dGTP、dCTP、およびdTTPと続く。TdT活性は温度および時間依存

50

性である。SUPERScript(商標)IIIについての最適温度は45 から50 であるのに対して、SUPERScript(商標)IIは45 である(図11)。任意のRTにおいてさらにTdT活性を最小化するために、伸長時間を短くするか、または温度を低くしなくてはならない。

【0356】

忠実度アッセイ：

忠実度アッセイの結果を表15および表16に示す。

【0357】

(表15) rpsL忠実度アッセイ

RT	温度	野生型 <i>rpsL</i>	変異型 <i>rpsL</i>
SUPERScript(商標)III	45°C	$3.9 \times 10^{-4}$	$3.4 \times 10^{-5}$
SUPERScript(商標)II	45°C	$3.5 \times 10^{-4}$	$3.1 \times 10^{-5}$
MMLV H+	37°C	$3.9 \times 10^{-4}$	NA

10

【0358】

(表16) lacZ 忠実度アッセイ

RT	温度	誤り率
SUPERScript(商標)III	45°C	$2.9 \times 10^{-5}$
	50°C	$2.7 \times 10^{-5}$
	55°C	$1.8 \times 10^{-5}$
SUPERScript(商標)II	45°C	$2.9 \times 10^{-5}$
MMLV H+	45°C	$4.8 \times 10^{-5}$

20

【0359】

忠実度アッセイは、SUPERScript(商標)III、SUPERScript(商標)II、およびMMLV RNase H+RTについてであった。rpsLアッセイは、WT rpsL遺伝子またはrpsL遺伝子のいずれかを  
用いて行い、変異ホットスポットは除去された。wt rpsL DNA断片を対照として使用して、  
自発的な変異を観察した。誤り率は約 $10^{-6}$ から $10^{-7}$ である。lacZ アッセイを、対照と  
して使用するギャップDNA開始基質を用いて行い、 $2.2 \times 10^{-5}$ のバックグラウンド誤り率で  
あった。

30

【0360】

精製された変異体RTの耐熱性：

Mg<sup>2+</sup>によって触媒される化学的RNA分解の速度は、cDNA合成反応条件下で温度が55 から  
60 より上に上昇するときに劇的に増大する。M-MLV、SUPERScript(商標)II、およびSU  
PERScript(商標)IIIの半減期を、高温において測定した。RT酵素を、最初に0.05%のNP-40  
存在下で1×第1鎖緩衝液中で0.2-0.5単位/μlまで希釈した。界面活性剤の非存在下で希  
釈される場合、RT活性は、インキュベーションなしで90%より高くまで低下する(データ示  
さず)。図12A、12B、および12C、ならびに表17は、種々の濃度でのM-MLV、SUPERScript(  
商標)II、およびSUPERScript(商標)IIIを示す。RT半減期を、0.05%のNP-40存在下で1×  
第1鎖緩衝液中で検出した。混合物(20 μl)を種々の時間で、サーモサイクラー中の0.5mlチ  
ューブ中で、50 、55 、または60 においてインキュベートし、およびこれは、1×第1  
鎖緩衝液(50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>)、10mM DTT、3mM MgCl<sub>2</sub> (総計  
6mM)、0.5mM dTTP、0.05%(v/v)NP-40、[メチル-<sup>3</sup>H]dTTP(20 μCi/ml)、および5 μl RTを  
含んだ。インキュベーションを、チューブを氷上に配置することによって停止させた。ア  
リコート(5 μl)を、5mM ポリ(A)/3mM オリゴ(dT)<sub>25</sub>を用いて残渣の単位についてアッセイ  
した。50 におけるSUPERScript(商標)IIIの半減期は220分間であり、SUPERScript(商標)  
IIのそれよりも約35倍長かった。55 におけるSUPERScript(商標)IIIの半減期は24分間  
であり、SUPERScript(商標)IIのそれよりも~10倍長かった。

40

50

## 【 0 3 6 1 】

(表 1 7 ) 50 、 55 、 および 60 における RT 半減期の要約

	M-MLV (分)	SUPERSCRIPT(商標)II (分)	SUPERSCRIPT(商標)II (分)
50°C	ND	6.1	220
55°C	1.5	2.2	24
60°C	0.6	ND	2.5

## 【 0 3 6 2 】

10

RT の全長 cDNA プロファイリング :

RT の DNA ポリメラーゼ活性の有用な高温を判断するための実際の方法は、種々の長さの cRNA の混合物から RT によって合成される全長 cDNA 産物の量に対する、反応温度を増加させることの効果の評価である。標識された全長 cDNA 産物はアルカリ性アガロースゲル上で分離および定量され得る。反応温度が上昇するにつれて全長 cDNA 産物は消失し、これは、より長い cRNA に由来するものから出発して、識別できる任意の長さの全長産物が合成されないところに温度が達するまでである。比較として、本発明者らは、Clontech の PowerScript RT、Stratagene の StrataScript RT、Promega の ImProm II RT、および SUPERSCRIPT(商標)II (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA、カタログ番号 18064022) を含めた。SUPERSCRIPT(商標)III のみが 50 において明瞭な 9.5kb 全長産物を産生することができ、SUPERSCRIPT(商標)II は非常にかすかな 9.5kb バンドを得ることができた。

20

## 【 0 3 6 3 】

異なる企業からの RT を比較するために、同じ単位数の RT を比較のために使用した。PowerScript RT は ~ 350 単位 /  $\mu$ l、StrataScript RT は 50 単位 /  $\mu$ l、ImProm II は 50 単位 /  $\mu$ l である。SUPERSCRIPT(商標)II、SUPERSCRIPT(商標)III、および PowerScript RT は RT 希釈緩衝液で 50 単位 /  $\mu$ l に希釈した。100 単位 (2  $\mu$ l) の RT 酵素を使用した。生成された全長産物の量を決定し、種々の長さの鋳型について表 17 および表 18 に示す。SUPERSCRIPT(商標)III RT は、他の RT と比較して、50 および 55 における改善された性能を示す。

## 【 0 3 6 4 】

(表 1 7 ) 種々の RT によって産生された全長 cDNA の比較

30

温度	RT	全 cDNA	全長cDNAの量	
		Pmol	7.5 kb (ng)	2.4 kb (ng)
45°C	PowerScript	293	75	64
	StrataScript	199	47	35
	ImProm II	256	41	44
	SUPERSCRIPT(商標)III	345	99	72
	SUPERSCRIPT(商標)II	300	100	59
50°C	PowerScript	180	54	31
	StrataScript	9	<2	<2
	ImProm II	42	<2	<2
	SUPERSCRIPT(商標)III	323	97	68
	SUPERSCRIPT(商標)II	170	46	22
55°C	PowerScript	5	<2	<2
	StrataScript	5	<2	<2
	ImProm II	3	<2	<2
	SUPERSCRIPT(商標)III	37	3	22
	SUPERSCRIPT(商標)II	3	<2	<2

10

20

## 【 0 3 6 5 】

全長産物の量は、乾燥させた1.2%アルカリ性アガロースゲルにおける各全長バンドのサイズに対応する領域を切断すること、およびシンチレーションカウンター中で計数することによって確立した。>2ngの量の全長産物のみが、ゲルオートラジオグラフで識別できるバンドとして見られることができた。cDNA合成反応を、20  $\mu$ l中で、2.4kbを0.25  $\mu$ g、7.5 kb cRNAを0.5mg、および0.1  $\mu$ gのオリゴ(dT)<sub>25</sub>を用いて実行した。提供される場合、それら自体のキットからの緩衝液および他の成分、および0.1  $\mu$ lの  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-dCTP(10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l)を使用した。すべての反応は「ホットスタート」であった。「ホットスタート」反応において、酵素が加えられる前に、チューブが室温で2分間インキュベートされた。2  $\mu$ lのRT(50u/ $\mu$ l)を加え、45 または50 または55 で50分間インキュベートした。反応を、10  $\mu$ lの0.5M EDTAを加えることによって停止させた。エタノール沈殿後、産物を1.2%アガロースゲルにロードした。乾燥させたゲルをフィルムに対して1時間露出させた。

30

## 【 0 3 6 6 】

(表 1 8) 種々のRTによって産生された全長cDNAの比較

RT	温度 (°C)	全長cDNA の量 (ng)	
		9.5 kb	7.5 kb
SUPERScript(商標) III	45	19	54
	50	26	78
	55	13	53
StratScript	45	4	10
	50	0	0
	55	0	0
ImProm II	45	3	9
	50	0	0
	55	0	0
OmniScript	45	0	0
	50	0	0
	55	0	0
PowerScript	45	19	38
	50	3	25
	55	0	0
M-MLV	45	10	39
	50	0	3
	55	0	0
ThermoScript	45	16	38
	50	29	56
	55	3	13

## 【 0 3 6 7 】

cDNA合成反応混合液は、9.5kb(1.1 μg)および7.5kb(0.8 μg)cRNAを含んだ。cDNA合成反応を、20 μlで、20 μgのHeLa総RNA、および0.5 μgのオリゴ(dT)<sub>25</sub>を用いて実行した。提供される場合、それら自体のキットからの緩衝液および他の成分、ならびに0.1 μlの <sup>-3</sup>2P-dCTP(10 μCi/μl)を使用した。すべての反応は「ホットスタート」であり、1 μlのRTを加え、45 または55 で50分間インキュベートした。400または200単位のSUPERScript(商標)IIIを比較のために使用した。反応を、10 μlの0.5M EDTAを加えることによって停止させた。エタノール沈殿後、産物を1.2%アガロースゲルにロードした。乾燥させたゲルをフィルムに対して1時間露出させた。

## 【 0 3 6 8 】

代替的な手順において、種々の供給源からのRTを比較するために、HeLa総RNAからのcDNA合成の比較を実行した。55 においてSUPERScript(商標)IIIによって合成されたcDNAサイズは0.5-10kbであった。cDNA合成反応を、20 μlで、20 μgのHeLa総RNA、および0.5 μgのオリゴ(dT)<sub>25</sub>を用いて実行した。提供される場合、それら自体のキットからの緩衝液および他の成分、ならびに0.1 μlの <sup>-3</sup>2P-dCTP(10 μCi/μl)を使用した。すべての反応は「ホットスタート」であり、1 μlのRTを加え、45 または55 で50分間インキュベートした。400または200単位のSUPERScript(商標)IIIを比較のために使用した。反応を、10 μlの0.5M EDTAを加えることによって停止させた。総cDNA合成は、5 μl混合物のTCA-沈殿によって得られた。混合物の残りのエタノール沈殿後、産物を1.2%アガロースゲルにロードした。乾燥させたゲルをフィルムに対して1時間露出させた。

## 【 0 3 6 9 】

各反応を各ベンダーの推奨に従って実行した、これらの実験において、本発明者らは、RTとともに提供された緩衝液を使用した。DTT、RNaseインヒビター、dNTPは推奨される濃度で使用され、提供される場合、そのキットからであった。さもなくば、Invitrogen製試薬を使用した。1 μlのRTをこれらの競合試験において使用した。表18は、9.5kbおよび7.5 kbのcRNAを使用する場合の結果を示す。図13は、ポリ(A)テールRNAラダーを使用する、cDNAプロファイリングのための競合的試験の結果を示す。cDNA合成反応を、20 μlで、2 μg

のRNAラダー、および0.5 µgのオリゴ(dT)<sub>25</sub>を用いて実行した。提供される場合、それら自体のキットからの緩衝液および他の成分、ならびに0.1 µlの <sup>-32</sup>P-dCTP(10 µCi/µl)を使用した。すべての反応は「ホットスタート」であり、1 µlのRTを加え、45 または50 または55 で50分間インキュベートした。400または200単位のSUPERScript(商標)IIIを比較のために使用した。反応を、10 µlの0.5M EDTAを加えることによって停止させた。エタノール沈殿後、産物を1.2%アガロースゲルにロードした。乾燥させたゲルをフィルムに対して1時間露出させた。

【0370】

実施例8：RT-PCR適用

RT-PCRは、RNAの検出、遺伝子発現、プロファイリング、遺伝子定量、および全長遺伝子のクローニングのような適用において有効なツールとなっている。M-MLV RTのRNase H マイナス変異体、SUPERScript(商標)II RTは、RT選択とした広範に受け入れられている。なぜなら、これはM-MLV RTよりも高いcDNA収量および長い標的能力を生じることがすでに証明されているからである。

【0371】

最近、本発明者らは新しい世代のRT-SUPERScript(商標)III(商標)RTを操作した。SUPERScript(商標)II RTの最初の特徴のすべてに加えて、これは55 までの高温RT能力を提供し、これはSUPERScript(商標)II RTよりも約5 以上高い。50 におけるSUPERScript(商標)II RTおよびSUPERScript(商標)III RTの酵素半減期はそれぞれ6分間および220分間である。効率的な全長cDNA合成活性は、SUPERScript(商標)IIIを用いると55 のRT温度においてでさえ現れる。高収率およびより特異的なRT-PCR産物もまた、高いRT温度においてこの酵素によって生じた。SUPERScript(商標)IIIは、難しいRNA標的(例えば、高GCおよび二次構造鋳型)のための効率的なcDNA合成のためのツールを提供する。

【0372】

この酵素はまた、感度および長い標的についてRT-PCRのために最適化されてきた。本発明者らは、SUPERScript(商標)III RTが1pgまで少ない開始HeLa RNAを増幅できること、および12.3kbの長さまでの標的を増幅できることを実証した。この酵素は、付随する緩衝液および条件を用いて使用された場合に、MMLV誘導体逆転写酵素の性能よりも高い性能を提供する。

【0373】

材料および方法

キット成分：SUPERScript(商標)III RT(200U/µl)、5×第1鎖緩衝液、0.1M DTT。

【0374】

SUPERScript(商標)III RT=H204R、M298L、T306K、およびF309N変異およびLEFN RTと呼ばれ得る。

【0375】

5×第1鎖緩衝液：250mM Tris-HCl(pH 8.3)、375mM 塩化カリウム、および15mM 塩化マグネシウム。

【0376】

SUPERScript(商標)III RT保存緩衝液：20mM Tris-HCl, pH 7.5、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.01% NP-40、50% (v/v) グリセロール。

【0377】

RNA：全HeLa RNAおよび全ラット脳RNAをTRIzol(登録商標)試薬を使用して単離した。

【0378】

ゲル電気泳動：RT-PCR産物(10 µl)を、0.4 µg/mlの臭化エチジウムを含む0.5×TBE中で0.8%~1.5%(w/v)アガロースゲル上で電気泳動によって分析した。

【0379】

RT-PCR手順：RT-PCRのための第1鎖cDNA合成：20 µl反応容量を、10pg-5 µgの総RNAまたは10pg-500ngのmRNAのために使用し得る。以下の成分をヌクレアーゼフリー微量遠心チューブに加える：1 µl オリゴ(dT)<sub>20</sub>(500 µg/ml)、10pgから5 µgの総RNA、1 µlの10mM dNTP

ミックス(10mM各dATP、dTTP、dGTP、およびdCTP、中性pH)、および12 µlまでの滅菌蒸留水。代替的には、50-250ngのランダムプライマーまたは2ピコモルの遺伝子特異的プライマーが使用され得る。ランダムプライマーの使用は、50 インキュベーションの前に25、10分間のインキュベーションを必要とする。

#### 【0380】

混合物を65 °Cで5分間加熱し、次いで氷上に配置する。短い遠心分離によってチューブの中身を収集し、そして以下を加える：4 µlの5×第1鎖緩衝液、2 µlの0.1M DTT、1 µlのRNaseOUT組換えリボヌクレアーゼインヒビター(40単位/µl、50ng未満の開始RNAを使用する場合、RNaseインヒビター(例えば、RNaseOUT、Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA、カタログ番号10777019)の付加は必須である)。

10

#### 【0381】

チューブの成分を穏やかに混合し、50 °Cで2分間インキュベートする。1 µl(200-400単位)のSUPERScript(商標)III RTを加え、穏やかに上下にピペティングすることによって混合する。50 °Cで50分間インキュベートする(cDNA合成はオリゴ(dT)<sub>20</sub>または遺伝子特異的プライマーについては42 °C-60 °Cで実行され得る)。70 °Cで15分間加熱することによって反応を不活性化する。ここでcDNAをPCRにおける増幅のための鋳型として使用することができ、または使用まで-20 °Cで保存することができる。しかし、いくつかのPCR標的(これらは>1kb)の増幅は、cDNAに相補的なRNAの除去を必要とし得る。cDNAに相補的なRNAを除去するために、1 µl(2単位)の大腸菌 RNase Hを加え、37 °Cで20分間インキュベートする。

20

#### 【0382】

RT-PCRの最適化

以下の実験のために、EFN(His-タグ)、EFN(タグなし)、LEFN(His-タグ)、またはLEFN(タグ、Hisなし)を、LEFN(タグ、Hisなし)のための最適条件を探す際に使用した。これらの4つの逆転写酵素は、それらの耐熱性プロフィールが異なる。SUPERScript(商標)IIIの改変バージョンEFNは、変異H204R、T306K、およびF309Nを含む。LEFN(さもなくばSUPERScript(商標)III RTとして知られている)は、変異H204R、T306K、およびF309Nに加えて、M289L変異を含む。

#### 【0383】

他に注記されない限り、代表的には、2.5 µM オリゴ(dT)<sub>20</sub>(SUPERScript(商標)II RTについては500ngオリゴ(dT)<sub>12-18</sub>)、0.5mM dNTP、1×第1鎖緩衝液、10mM DTT、および40単位のRNaseOUTを使用して、20 µl RT反応を行った。「ホットスタート」反応においては、酵素を加える前に2分間、反応温度でインキュベートした。cDNA合成後、反応物を、2単位のRNase Hで37 °C、20分間処理した。

30

#### 【0384】

RT-PCRにおけるこれらのRTの評価のために、標準的な50 µl PCR反応を実行した。<4kbを増幅するために設計されたプライマーセットについては、PCR反応は、0.2 µMプライマー、200 µM各dNTP、1×PCR緩衝液、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、2 µlのcDNA反応物、および2単位のPLATINUM(登録商標)Taq DNAポリメラーゼからなった。>4kbを増幅するために設計されたプライマーセットについては、PCR反応は、0.2 µMプライマー、200 µM各dNTP、1×高忠実度PCR緩衝液、2mM MgSO<sub>4</sub>、2 µlのcDNA反応物、および1単位のPLATINUM(登録商標)Taq DNAポリメラーゼ高忠実度からなった。94 °C 2分間のインキュベーション後、増幅は、35から40サイクルの、94 °C 15 s、55 °C 30 s、および68 °C 1分間/kbであった。10 µlのPCR反応物を、0.4 µg/ml EtBrを含むアガロースゲル上で分析した。PCRにおいて使用したプライマーを表19に示す。

40

#### 【0385】

cDNA合成緩衝液：50または200単位のSUPERScript(商標)II RTまたはEFN(His-タグ)を用いる反応を、SUPERScript(商標)II RTの試薬系(スタンドアロン)、RT-PCRのためのSUPERScript(商標)II第1鎖合成系、およびThermoScript RT-PCR系を使用してアセンブルした。各条件は以下の通りである：

50

1) SUPERScript(商標)II RTスタンドアロン : 50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM dNTP

2) RT-PCRのためのSUPERScript(商標)II第1鎖合成系 : 20mM Tris-HCl (pH 8.4)、50mM KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM dNTP

3) ThermoScript RT-PCR系 : 50mM Tris-酢酸 (pH 8.4)、75mM 酢酸カリウム、8mM 酢酸マグネシウム、1mM dNTP

1pgから100ngの出発総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、45 °で50分間、その後85 °で5分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、 $\alpha$ -アクチン353bp、BF2.4kb、Pol 6.8kb、またはAPC 8.5kbプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた(表19を参照されたい)。

#### 【 0 3 8 6 】

塩化マグネシウムは、0.5mMおよび1mMの濃度のdNTPと同時に、1~10mMの最終反応濃度でcDNA合成緩衝液中で滴定した。これらの緩衝液を、45 °で50分間、続いて85 °で5分間、1pg、100ng、または5 µgの総HeLa RNAおよび50単位または200単位のEFN(His-tag)を用いて実行された20 µl RT反応中で使用した。2 µlの得られるcDNAを、 $\alpha$ -アクチン353bpまたはPol 6.8kb標的を含む50 µlのPCR反応に加えた(加える前に5 µg cDNA試料を100倍希釈した)。

#### 【 0 3 8 7 】

pH 8.0、8.4、8.8、および8.3のTris-HClを含む5×第1鎖緩衝液を、より高温の反応温度で機能する酵素のための最適pHを決定するために調製した。100ng~500ngの総HeLa RNAおよび200単位のSUPERScript(商標)IIまたは400単位のLEFN(His-タグ)を含む20 µl RT反応を、50 ~60 °で50分間(ホットスタート)、続いて70 °で15分間、これらの異なる緩衝液を使用した実行した。2 µlの得られるcDNAを、BF2.4kbまたはPol 6.8kbプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

#### 【 0 3 8 8 】

RT反応温度 : SUPERScript(商標)II RT(50単位)、EFN(His-タグ)(50および200単位)、およびThermoScript RT(15単位)を42 °から60 °までのRT反応において比較した。1pg~100ngの出発総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて85 °、5分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、 $\alpha$ -アクチン353bp、TSC5.3kb、またはPol 6.8kbプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

#### 【 0 3 8 9 】

SUPERScript(商標)II RTおよびEFN(タグなし)を、45 °および50 °でのRT反応において200単位で比較した。1ng~1 µgの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70 °、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、2.4kb~9.3kbのプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

#### 【 0 3 9 0 】

SUPERScript(商標)II RT、EFN(His-タグ)、およびEFN(タグなし)を、45 °~55 °でのRT反応において200単位で比較した。1pg~100ngの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70 °、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、 $\alpha$ -アクチン353bpまたはPol 6.8kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

#### 【 0 3 9 1 】

SUPERScript(商標)II RT、EFN(His-タグ)、EFN(タグなし)、およびLEFN(His-タグ)を、45 °~55 °でのRT反応において200単位で比較した。1pg~1 µgの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70 °、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、 $\alpha$ -アクチン353bpまたはPol 6.8kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

#### 【 0 3 9 2 】

SUPERScript(商標)II RT、EFN(His-タグ)、EFN(タグなし)、およびLEFN(His-タグ)を、オリゴ(dT)の代わりに遺伝子特異的プライマー(CBP 1.6kb)を用いて45 °~55 °でのRT反応において200単位で比較した。1ngまたは10ngの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所

10

20

30

40

50



定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70℃、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、CPB1.6kbのプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

【0393】

SUPERSCRIP(T(商標)II RT、EFN(タグなし)、EFN(His-タグ)、およびLEFN(His-タグ)を、45℃～60℃でのRT反応において200および400単位で比較した。500ngの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70℃、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、BF2.4kbまたはPoI 6.8kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

【0394】

SUPERSCRIP(T(商標)II RT、EFN(His-タグ)、LEFN(His-タグ)、およびLEFN(タグ、Hisなし)を、45℃～60℃でのRT反応において200および400単位で比較した。500ngの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70℃、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、BF2.4kbまたはPoI 6.8kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

10

【0395】

RT酵素濃度：0.1pg～1 µgの出発総HeLa RNAおよび25単位～250単位のEFN(His-タグ)を含む20 µl RT反応を、45℃で50分間、続いて85℃、5分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、 $\alpha$ -アクチン353bp、CBP1.6kb、TSC5.3kb、PoI 6.8kb、またはAPC8.5kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

【0396】

20

SUPERSCRIP(T(商標)II RTおよびLEFN(His-タグ)を、50℃～60℃でのRT反応において200および400単位で比較した。10ng～1 µgの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70℃、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、BF2.4kbまたはPoI 6.8kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

【0397】

SUPERSCRIP(T(商標)II RTおよびLEFN(His-タグ)を、50℃～60℃でのRT反応(0.05% Triton X-100を含むかまたは含まない)において200単位および400単位で比較した。500ngの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、所定の温度で50分間(ホットスタート)、続いて70℃、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、BF2.4kbまたはPoI 6.8kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。Tritonは反応の収率を改善せず、実際には収率をわずかに低下させた。

30

【0398】

LEFN(タグ、Hisなし)を、感度に対する効果を決定するために、50、200、および400単位で比較した。0.1pg～100pgの総HeLa RNAを含む20 µl RT反応を、50℃で、ホットスタートとコールドスタートの両方の条件下で、続いて70℃、15分間実行した。2 µlの得られるcDNAを、 $\alpha$ -アクチン 353bpまたはGAPDH 532bpの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた。

【0399】

85℃、5分間および70℃、15分間の不活性化段階の比較

SUPERSCRIP(T(商標)II RTおよびEFN(タグなし)を、70℃、15分間または85℃、5分間の任意の不活性化段階を有するRT反応において比較した。1pg～100ngの出発総HeLa RNAおよび200単位のRTを含む20 µl RT反応を、45℃で50分間、続いて不活性化段階の一方で行った。2 µlの得られるcDNAを  $\alpha$ -アクチン353bp、CBP1.6kb、PoI 3.5kb、TSC5.3kb、またはPoI 6.8kbの任意のプライマーセットを含む50 µlのPCR反応に加えた(図21)。

40

【0400】

オリゴ(dT)<sub>20</sub>、ランダムヘキサマー、および遺伝子特異的プライマー(GSP)を用いるプライミング

EFN(タグなし)およびSUPERSCRIP(T(商標)II RTを、2.5 µM オリゴ(dT)<sub>20</sub>、50ngランダムヘキサマー、または0.1 µM GSPを含むRT反応において使用した。1ng～1 µgの出発総HeLa RNAおよび200単位のRTを含む20 µl RT反応を、45℃で50分間、続いて70℃で15分間で実行

50

した。2  $\mu$  lの得られるcDNAを、CBP1.6kb、TSC5.3kb、またはAPC8.5kbの任意のプライマーセットを含む50  $\mu$  lのPCR反応に加えた。

#### 【0401】

種々の供給源からの逆転写酵素の比較

LEFN(タグ、Hisなし)をClontechのPowerScript(商標) RT、StratageneのStrataScript(商標) RT、QiagenのSensiScript(商標)RT、QiagenのOmniScript(商標) RT、およびPromegaのImProm-II(商標) RT Systemと比較した。0.1pg ~ 1  $\mu$  gの出発総HeLa RNAまたは1  $\mu$  gのラット脳RNAを含むRT反応を、各供給業者によって推奨された手順および条件を使用して、各々の逆転写酵素を使用して、二連で行った。10%のcDNA反応物を、 $\beta$ -アクチン353bp、GAPDH 532bp、CBP 1.6kb、BF 2.4bp、VIN 4.6kb、FIB 9.4kb、またはダイニン 12.3kbの任意のプライマーセットを含む50  $\mu$  lのPCR反応に加えた。

10

#### 【0402】

(表19) プライマーリスト

##### ヒト $\beta$ -アクチン - 353 bp

センス GCTCGTCGTCGACAACGGCTC (SEQ ID NO:12)  
アンチセンス CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC (SEQ ID NO:13)

##### ヒトGAPDH - 532 bp

センス GTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTT (SEQ ID NO:14)  
アンチセンス CACAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT (SEQ ID NO:15)

20

##### ヒトCap結合タンパク質 (CBP) - 1.6 kb

センス ATGGCGATCGTCGAACCGGA (SEQ ID NO:16)  
アンチセンス CACTGTCTTAATATGAATGGGACCTACTGAG (SEQ ID NO:17)

##### ヒトB-因子プロパージン(BF) - 2.4 kb

センス GAGCCAAGCAGACAAGCAAAGCAAGC (SEQ ID NO:18)  
アンチセンス TGTTTAAATTCAATCCCACGCCCTGT (SEQ ID NO:19)

##### ヒトDNAポリメラーゼ $\epsilon$ (Pol $\epsilon$ ) - 3.5 kb

センス AAGGCTGGCGGATTACTGCC (SEQ ID NO:20)  
アンチセンス GATGCTGCTGGTGATGTACTC (SEQ ID NO:21)

30

##### ヒトビンキュリン(VIN) - 4.6 kb

センス GAGGAGGGCGAGGTGGACGGC (SEQ ID NO:22)  
アンチセンス GAACTAACACACAGCGATGGGTGGGAA (SEQ ID NO:23)

ヒト結節硬化症 **2 (TSC-2) – 5.3 kb**

センス GGAGTTTATCATCACCGCGGAAATACTGAGAG (SEQ ID NO:24)

アンチセンス TATTTCACTGACAGGCAATACCGTCCAAGG (SEQ ID NO:25)

ヒトDNAポリメラーゼ  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) - 6.8 kb

センス CGCCAAATTTCTCCCCTGAA (SEQ ID NO:26)

アンチセンス CCGTAGTGCTGGGCAATGTTC (SEQ ID NO:27)

10

## ヒト腺腫様多発結腸ポリープ (APC) - 8.5 kb

センス GCTGCAGCTTCATATGATCAGTTGTTA (SEQ ID NO:28)

アンチセンス AATGGCGCTTAGGACTTTGG (SEQ ID NO:29)

## ヒトフィブリリン (FIB) - 9.4 kb

センス TGGAGGCTGGGAACGTGAAGGAAA (SEQ ID NO:30)

アンチセンス ACAGGAATGACCGAGGGTAATCTTGGC (SEQ ID NO:31)

ラットダイニン **12.3 kb**

センス GCGGCGCTGGAGGAGAA (SEQ ID NO:32)

アンチセンス AGGTGGCGGCTCAAACACAAAG (SEQ ID NO:33)

20

**H-線維芽細胞増殖因子 11 (FGF)-240 bp; 変性温度 97 °C, アニール温度 60 °C**

センス (f1-60)- CGGGTGGTAACTGGCTGCTGTGGA (SEQ ID NO:34)

アンチセンス TGGAGGCTGGGAACGTGAAGGAAA (SEQ ID NO:35)

アンチセンス (r2-299)- GCGGACCTCCCGCTTCTGCCGGA (SEQ ID NO:36)

**H-シスタチオニン- $\beta$ -合成酵素 (CBS 2.4)-2390 bp; アニール温度 64 °C**

センス (f2-71)- CCAAGTAAAACAGCATCGGAACACCAGG (SEQ ID NO:37)

アンチセンス (r2-2460)- AAAGTCGATCAGCAGTTGCCAGGGG (SEQ ID NO:38)

30

**H-トポイソメラーゼ I (TOP3.2)-3162 bp; アニール温度 60 °C**

センス (f2-80)- CCCACAGTCACCGCCGCTTACCT (SEQ ID NO:39)

アンチセンス (r1-3241)- CTTTCATCCCTCCCAACCCCAATCT (SEQ ID NO:40)

**H-ビンキュリン (VIN4.6)- 4641 bp; アニール温度 66 °C**

センス (f1-132)- GAGGAGGGCGAGGTGGACGGC (SEQ ID NO:41)

アンチセンス (r2-4772)- GAACTAACACACAGCGATGGGTGGGAA (SEQ ID NO:42)

40

**H-PolE (PolE 6.8)-6800 bp; アニール温度 60 °C**

センス- CGCCAAATTTCTCCCCTGAA (SEQ ID NO:43)

アンチセンス- CCGTAGTGCTGGGCAATGTTC (SEQ ID NO:44)

**H- $\beta$ -アクチン ( $\beta$ act353)- 353 bp; アニール温度 55 °C**

センス- 5' GCTCGTCGTCGACAACGGCTC (SEQ ID NO:45)

アンチセンス- ACCACATGATCTGGGTCATCTTCTC (SEQ ID NO:46)

50

## 【0403】

SUPERSCRIPT(商標)IIに対するSUPERSCRIPT(商標)IIIの比較

SUPERSCRIPT(商標)IIに対するSUPERSCRIPT(商標)IIIの比較を、以下のアッセイを使用して行った。総HeLa RNA(1 µg)を1pmolの遺伝子特異的プライマー(アンチセンスプライマー、表19)と合わせ、65 °Cで5分間ハイブリダイズさせた。200単位の各酵素を用いる転写を、42 °C、50 °C、または55 °Cで50分間実行した。酵素調製物の比較のための逆転写を、1pg、10pg、100ng、または1 µgの、HeLa細胞からの総RNAを使用して、50pmolのオリゴ(dT)<sub>20</sub>を用いて、55 °C、50分間実行した。反応成分は、0.5mM dNTP、0.01M DTT、40単位のRNase OUT(商標)、50mM Tris-KCl(pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>を含んだ。逆転写後、70 °C、15分間のインキュベーションにより酵素を熱不活性化した。2単位のRNase Hとの37 °C、20分間のインキュベーション後、20 µl反応物のうちの2 µlを、Platinum Taq hi-fidelityを使用してPCRにより増幅した。増幅反応は、60mM Tris-SO<sub>4</sub>(pH 8.9)、18mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>、2mM MgSO<sub>4</sub>、0.2mM 各dNTP、0.2 µM各プライマー(表19)、および1単位のPlatinum Taq-high fidelityを含んだ。増幅を、最初の94 °C、2分間の変性段階、続いて以下の段階：94 °C、15秒間、X °C、30秒間、68 °C、1分間/kbの35サイクルによって実行した。ここで、Xは表19に列挙されたプライマーセットのアニーリング温度を示す(55 °C-66 °C)。高いG/C含量産物を、以下のサイクルに従って増幅した：開始時の94 °C、2分間の変性段階、続いて以下の段階：97 °C、15秒間、60 °C、30秒間、68 °C、1分間の35サイクル。反応物を5 µlの10×Blue Juice(登録商標)と合わせ、各反応物の20%(11 µl)を、0.5 µg/mlの臭化エチジウムで染色された0.8%または1.5%のアガロースゲルを通して電気泳動した。

10

20

## 【0404】

結果

RT-PCR最適化：

cDNA合成緩衝液

SUPERSCRIPT(商標)III RTを、SUPERSCRIPT(商標)II RTスタンドアロン条件とともに使用した。これらの条件は、第1鎖合成において、SUPERSCRIPT(商標)III RTについて最適であることがわかった。RT-PCRにおける性能の違いは、SUPERSCRIPT(商標)III RTを用いて、SUPERSCRIPT(商標)II RTスタンドアロン、RT-PCRのためのSUPERSCRIPT(商標)II第1鎖合成系、またはThermoScript RT-PCR系の反応条件を使用して、 $\alpha$ -アクチン353bp標的またはより大きな標的を使用して、見られなかった。

30

## 【0405】

SUPERSCRIPT(商標)III RTのために、3mMのマグネシウム濃度が選択され、これはこの最小濃度がRT反応においては必要とされるからであり、SUPERSCRIPT(商標)II RTスタンドアロンを用いて見出しされるのと同じ濃度であった。0.5mM dNTPを用いると、最適性能は、3mM~7mMのマグネシウム濃度、1pg、100ng、および5 µgの、両方の低いRNA濃度を用いて見られた。

## 【0406】

5×第1鎖緩衝液のpHは8.3に保持され、これは、SUPERSCRIPT(商標)II RT緩衝液において見出しされるpHであり、高温において異なるpHとはほとんど違いが見られなかった(図14)。

40

## 【0407】

RT反応温度

200単位のLEFN(SUPERSCRIPT(商標)III RT)は、50 °Cまでは産物の減少をほとんど示さなかった。この温度は、SUPERSCRIPT(商標)II RT(50単位)の能力よりも5 °C高く、ThermoScript RT(15単位)のそれよりも5 °C低かった。結果は、低レベルのRNAおよび $\alpha$ -アクチン353bpプライマーセットと、より高レベルのRNAおよびTSC 5.3kb プライマーセットの両方を用いたときと類似であった。

## 【0408】

His-タグがRTの一部である場合、わずかに高い耐熱性が見られる。10~1000ngの総HeLa RNAおよび200単位のSUPERSCRIPT(商標)IIまたはLEFN RTを含むRT反応を、45 °C~55 °Cで5

50

0分間、ホットスタート反応において実行した。次いで、2  $\mu$ lの得られるcDNA産物を、PoI 6.8kbプライマーセットを含む50  $\mu$ lのPCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml 臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。 -アクチン353bpプライマーセットを用いると、200単位のEFN(His-タグ)、EFN(タグなし)、およびLEFN(His-タグ)の間では大きな違いは見られず、55 まで3つすべてが産物を示した。しかし、PoI 6.8kb標的を用いると、産物はまた、55 まで3つすべての変異体で見られたが、例外的にEFN(タグなし)は、His-タグを有する変異体のいずれかよりもこの温度では少ない産物を示した。

#### 【0409】

同じ温度プロフィールはオリゴ(dT)<sub>20</sub>を用いて見い出され、およびHis-タグの利点はまた、遺伝子特異的プライマーを用いても見られた。1~10ngの総HeLa RNA、および200単位のSUPERSSCRIPT(商標)II、EFN、またはLEFN RTを含むRT反応を、45 ~65 で50分間、ホットスタート反応において実行した。次いで、2  $\mu$ lの得られるcDNAを、CBP 1.6kbプライマーセットを含む50  $\mu$ l PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml 臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。RT反応において遺伝子特異的プライマーを使用すると、200単位のEFN(His-タグ)、EFN(タグなし)、およびLEFN(His-タグ)はすべてなおCBP 1.6kb産物を55 まで示したが、EFN(タグなし)は55 で他よりもわずかに少ない産物を示した。

#### 【0410】

His-タグによって提供される安定性を利用するために、タグマイナス6 $\times$ Hisを有するLEFNを設計した。500ngの総HeLa RNAおよび200または400単位のSUPERSSCRIPT(商標)II、EFN、またはLEFN RTを含むRT反応を、45 ~65 で50分間、ホットスタート反応において実行した。次いで、2  $\mu$ lの得られるcDNAを、BF 2.4kbプライマーセットを含む50  $\mu$ l PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml 臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。EFN(His-タグ)およびLEFN(His-タグ)の両方と比較したときに、変異体ではほとんど違いが見られず、産物は、BF 2.4kbプライマーセットを用いて、3つすべてについて60 まで示された(図15)。

#### 【0411】

RT酵素濃度

EFN(His-タグ)の単位を25単位~250単位で比較する実験は、 -アクチン 353プライマーセットまたはより長い標的を用いる感度の両方で見た場合に、全体の範囲にわたって性能のわずかな違いを示した。0.1~1000ngの総HeLa RNAおよび25~250単位のEFNを含むRT反応を、45 で50分間、ホットスタート反応において実行した。次いで、2  $\mu$ lの得られるcDNAを、 -アクチン 353bp、CBP 1.6kb、TSC 5.3kb、PoI 6.8kb、またはAPC 8.5kbプライマーセットを含む50  $\mu$ l PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml 臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。

#### 【0412】

LEFN(タグ、Hisなし)の200および400単位は、低濃度のRNAを用いると、50単位よりもわずかに良好な性能を示した。0.1~100pgの総HeLa RNAおよび50~400単位のLEFN RTを含むRT反応を、50 で50分間、ホットスタート反応において実行した。次いで、2  $\mu$ lの得られるcDNAを、 -アクチン 353bpプライマー(示さず)、またはGAPDH 532プライマーセットを含む50  $\mu$ l PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml 臭化エチジウムを含む1.5%アガロースゲル上で泳動した。 -アクチン 353bp(データ示さず)、およびGAPDH 532bp(図16)を用いるホットスタート条件下で、RT単位が高くなるほど、わずかにより多くのPCR産物が産生された。

#### 【0413】

オリゴ(dT)<sub>20</sub>、ランダムヘキサマー、および遺伝子特異的プライマー(GSP)を用いるプライミング

SUPERSSCRIPT(商標)III RTを、RT反応が異なるプライミング方法を用いて実行された場合に、SUPERSSCRIPT(商標)II RTと同様に実行した。オリゴ(dT)は、最も明瞭な産物および

10

20

30

40

50

最高の特異的な産出を生じ、GSPは非特異的な産物で高いレベルを有し(55 のRT温度で)、ランダムヘキサマーは高い特異性を有したが低収率であった。

#### 【0414】

種々の供給源からの逆転写酵素の比較

-アクチン353bpプライマーセットを使用すると、SUPERSCRIP(T(商標)IIIは再度1pgまで少ない開始HeLa RNAを検出することができた。1~100pgの総HeLa RNAを含むRT反応を、各プロトコールに特定される試薬および条件を使用して各RTを用いて実行した。次いで、2μlの得られるcDNAを、-アクチン 353bpプライマーセットを含む50μl PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml臭化エチジウムを含む1.5%アガロースゲル上で泳動した。ImProm II RTおよびSensiScriptもまた、1pgまで少ない量を検出することができたが、StrataScriptおよびOmniScriptは10pgまで少ない量を検出することができたのみで、PowerScriptは100pgの開始HeLa RNAでさえ検出することができなかった。

10

#### 【0415】

より大きな標的およびより高濃度の総HeLa RNAを用いると、SUPERSCRIP(T(商標)III RT(LEFNタグ、Hisなし)は、RT-PCR産物の収率および長さに関連して、多くのコンペティターよりも有意に良好に実行される。10~1000ngの総HeLa RNAを含むRT反応を、各プロトコールに特定される試薬および条件を使用して各RTを用いて実行した。次いで、2μlの得られるcDNAを、CBP 1.6kb、BF 2.4kb、VIN 4.6kb、または9.4kbのプライマーセットを含む50μl PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。CLONTECHのPowerScriptのみが、総HeLa RNAが1000ngであった場合に産物を示し、特定の産物の収率はSUPERSCRIP(T(商標)III RTほど高くなかった。QiagenのSensiScriptおよびOmniScriptは、より小さな標的(CBP 1.6kbおよびBF 2.4kb)を用いると十分な産物収率を示したが、より長い標的を検出することはできなかった。StratageneのStrataScriptは、すべての標的を検出することができたが、SUPERSCRIP(T(商標)III RTよりも低い収率であった。PromegaのImProm II RT Systemは、SUPERSCRIP(T(商標)III RTに類似した性能を示したが、最も長い標的(FIB 9.4kb)を用いて高い収率を有さなかった。

20

#### 【0416】

より低い出発総HeLa RNA濃度を用いるさらなる反応は同様のパターンを示した。10~100ngの総HeLa RNAを含むRT反応を、各プロトコールに特定される試薬および条件を使用して各RTを用いて実行した。次いで、2μlの得られるcDNAを、CBP 1.6kb、BF 2.4kb、VIN 4.6kb、または9.4kbのプライマーセットを含む50μl PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4mg/ml臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。CLONTECHのPowerScriptは、100ng以下の総HeLa RNA用いるといかなる標的をも検出することができなかった。QiagenのSensiScriptはこのより低い濃度のRNAを用いてVIN 4.6kb標的を検出することができた。ここで、以前に1μgの出発総HeLa RNAを用いて、この標的を検出することができなかった。PromegaのImProm-IIは、より低いRNAの濃度を用いて、SUPERSCRIP(T(商標)III RTと同様に実行しなかった。SUPERSCRIP(T(商標)III RTは、100ng出発総HeLa RNAを用いてFIB 9.4kb標的を検出することができた唯一のRTであった。

30

#### 【0417】

RT-PCR分析

42、50、または55におけるホットスタートRT-PCR増幅におけるSUPERSCRIP(T(商標)IIおよびSUPERSCRIP(T(商標)IIIの性能を比較し、その結果は、図17、SUPERSCRIP(T(商標)II(パネルA)またはSUPERSCRIP(T(商標)III(パネルB)に示される。レーン(二連で)1、4、7、および10は42で逆転写された産物である。レーン2、5、8、および11は、50で逆転写された産物である。レーン3、6、9、および12は、55で転写された産物である。レーン1-3はFGFからの遺伝子特異的プライミングによって逆転写されたRNAの結果であり、レーン4-6はCBS 2.4、レーン7-9はTOP 3.2、レーン10-12はVIN 4.6である。矢印は、240bp、2390bp、3162bp、および4641bpの予測される産物サイズを示す。SUPERSCRIP(T(商標)IIは50でより強固に転写するのに対して、SUPERSCRIP(T(商標)IIIは55で最も良好に転写

40

50

する。遺伝子特異的プライミングのため、および/またはRNA鋳型から二次構造を取り除くためにより高いアニーリング温度を必要とするいくつかの適用のための55℃における増幅は、本発明のポリペプチドを用いて実行され得る。これは、遺伝子特異的プライマーを用いる逆転写の間の非特異的プライミングの減少、および/または抵抗性の鋳型逆転写の増加を可能にする。

#### 【0418】

SUPERSCRIPT(商標)III RT: 2つの異なる精製技術

SUPERSCRIPT(商標)IIIは2つの異なる精製技術によって精製した(上記参照)。手短に述べると、方法AはSUPERSCRIPT(商標)IIのために使用される精製技術に類似し、方法Bは、高純度調製を生じる、細胞細片を減少させるための膜透過プロトコルおよび濾過プロトコルの使用によって方法Aとは異なる。RT-PCRを、方法Aまたは方法Bによって精製した200単位のSUPERSCRIPT(商標)IIIを使用して実行した。RT-PCRを、*Pol* 6.8kbプライマーおよび *-act* 353bpプライマーを使用して実行した。産物収率および品質を両方の精製方法について比較した。これらの方法は同様の結果を生じ、いずれもSUPERSCRIPT(商標)IIの精製のために実行可能な方法である。

#### 【0419】

最適SUPERSCRIPT(商標)III酵素濃度

0.1pg ~ 1000ngの総HeLa RNAおよび25 ~ 250単位のSUPERSCRIPT(商標)II、EFN、またはLEFN RTを含むRT反応を、45℃で50分間(ホットスタート)実行した。次いで、2μlの得られるcDNAを、*-アクチン* 353bp、*CBP* 1.6kb、*TSC* 5.3kb、*Pol* 6.8kb、または*APC* 8.5 kbのプライマーセットを含む50μl PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4μg/ml臭化エチジウムを含む0.8%または1.5%アガロースゲル上で泳動した。25単位 ~ 250単位のSUPERSCRIPT(商標)III RTでは有意な違いが得られなかった(図18)。しかし、より多い量のSUPERSCRIPT(商標)III RT(400単位)は、高いRT温度においてより高いRT-PCR産物収率を示す(55℃、図19)。図19において、10 ~ 1000ngの総HeLa RNAおよび200もしくは400単位のSUPERSCRIPT(商標)IIまたはLEFN RTを含むRT反応は、50 ~ 60℃において50分間実行した(ホットスタート)。次いで、2μlの得られるcDNAを、*Pol* 6.8kbプライマーセットを含む50μl PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4μg/ml臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。SUPERSCRIPT(商標)II RTとは異なり、SUPERSCRIPT(商標)IIIの増加量(400単位まで)は引き続きPCR増幅を阻害しなかった(図20)。図20において、0.1 ~ 100pgの総HeLa RNAおよび50 ~ 800単位のLEFN RTを含むRT反応は、50℃において50分間ホットスタート条件で実行した(オリゴ(dT)<sub>20</sub>)。次いで、2μlの得られるcDNAを、*GADPH* 532bpプライマーセットを含む50μl PCR反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を、0.4μg/ml臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル上で泳動した。

#### 【0420】

SUPERSCRIPT(商標)III RTを、酵素がRT活性を実行し得る温度を増大するように操作した。この酵素は、感度、収率、および標的の長さについてRT-PCRのために最適化した。この最適化した系を用いて、SUPERSCRIPT(商標)III RTが、1pgまで少ない出発総HeLa RNAを用いてmRNA標的を検出すること、および12.3kbまでのサイズの標的から高収率でcDNAを産生することができることを実証した。これは、55℃までの高い温度で機能し、かつ広範な種々の標的を検出する能力を有する。この酵素の性能は市販の他のRTよりも優れており、最適化された緩衝液およびRTプロトコルは高感度でありかつ強固なRNA検出系を提供する。

#### 【0421】

実施例9: 標識された核酸分子を調製するための本発明のポリペプチドの使用

本発明のポリペプチドは、種々の鋳型(例えば、総RNA、mRNAなど)から標識された核酸を調製するために使用され得る。ポリAテールRNA鋳型を使用する直接的標識のために、適切な反応条件は、約1μg ~ 約1000μg、約1μg ~ 約500μg、約1μg ~ 約250μg、約1μg ~ 約100μg、約10μg ~ 約1000μg、約10μg ~ 約500μg、約10μg ~ 約250μg、または約10μg ~ 約100μgのRNAを含み得る。

## 【 0 4 2 2 】

RNAは適切なプライマー(例えば、オリゴdTプライマーまたは遺伝子特異的プライマー)と混合され得る。混合後、鋳型プライマー混合物は、適切な温度でインキュベートされ得(例えば、オリゴ(dT)<sub>25</sub>プライマーについて70 )、および適切な時間の間インキュベートされ得(例えば、5分間)。当業者は、日常的な実験を使用して、任意の鋳型プライマー対についてのインキュベーションの時間および温度を容易に決定し得る。次いで、この混合物は氷上で冷却され得、残りの反応成分が加えられる。

## 【 0 4 2 3 】

反応混合物および/または溶液中に、個別にまたは組み合わせてのいずれかで提供され得る適切な反応成分には以下が挙げられる：緩衝剤、還元剤、その少なくとも1種が標識(例えば、蛍光標識)を含んでいてもよい1種またはそれ以上のヌクレオチド、1種またはそれ以上の本発明のポリペプチド、および適切な希釈剤(例えば、H<sub>2</sub>O)。適切な反応混合物は、4 μl 5×第1鎖緩衝液、2 μl 0.1M DTT、1 μl 10mM dNTP、2 μl 1mM 蛍光dNTP、2 μl SUPERScript(商標)III(200u/μl)、RNAを含むアリコート、および20 μlまでのdH<sub>2</sub>Oを組み合わせることによって調製され得る。本発明のこの局面に伴って使用され得る、さらなる反応混合物および/または溶液ならびにその成分は、本明細書の他の箇所に記載される。本発明の混合物は、適切な温度、例えば、

約 42°C ～ 約

60°C, 約 45°C ～ 約 60°C, 約 48°C ～ 約 60°C,

約 50°C ～ 約 60°C, 約 52°C ～ 約 60°C, 約 55°C

～ 約 60°C, 約 42°C ～ 約 55°C, 約 45°C ～ 約

55°C, 約 45°C ～ 約 50°C, 約 45°C ～ 約 48°C,

約 48°C ～ 約 60°C, 約 48°C ～ 約 55°C, 約 48°C

～ 約 52°C, 約 50°C ～ 約 60°C, 約 50°C ～ 約

55°C, または 約 50°C ～ 約 52°C

でインキュベートされ得る。この混合物は、十分な標識の取り込みが見られるまで、例えば、

約 5 分

～ 約 24 時間 , 約 10 分 ～ 約 24 時間 , 約 30

分 ～ 約 24 時間 , 約 1 時間 ～ 約 24 時間 , 約 2

時間 ～ 約 24 時間 , 約 4 時間 ～ 約 24 時間 , 約 8

時間 ～ 約 24 時間 , 約 30 分 ～ 約 16 時間 , 約

30 分 ～ 約 8 時間 , 約 30 分 ～ 約 4 時間 ,

約 30 分 ～ 約 2 時間 , 約 30 分 ～ 約 1 時間 ,

約 1 時間 ～ 約 4 時間 , または 約 1 時間 ～ 約 2 時間

インキュベートされ得る。

## 【 0 4 2 4 】

反応は、例えば、適切な停止剤(例えば、20 μl 反応中、5 μl の0.5M EDTA)の付加によって停止され得る。生じる標識された核酸は、任意の標準的な技術(例えば、SNAPカラムを使用するカラム精製、Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)を使用して精製され得る。

## 【 0 4 2 5 】



本発明の方法によって産生された標識された核酸は、種々の目的のために、例えば、標的配列(これはアレイ上に存在し得る)を検出するために使用され得る。典型的には、本発明の標識された核酸は、1つまたはそれ以上の標的配列(例えば、マイクロアレイ)にハイブリダイズされ得る。

#### 【0426】

ある態様において、本発明のポリペプチドは、間接的標識によって標識される核酸を調製するために使用され得る。例えば、修飾ヌクレオチド(例えば、アミノアシルヌクレオチド)が、本発明のポリペプチドを使用して核酸分子に取り込まれ得る。次いで、この修飾されたヌクレオチドを含む核酸分子が、検出可能部分(例えば、蛍光部分、放射性部分など)を含む反応性分子と反応され得る。次いで、反応性分子のすべてまたは一部および検出可能部分が、核酸分子に結合される。

10

#### 【0427】

間接的標識のための適切な反応条件は、上記に列挙されているものである。例えば、RNA(例えば、5-50  $\mu$ g)が適切なプライマー(例えば、ポリAテールRNAのためのオリゴ(dT)<sub>25</sub>)と混合され、混合され、および例えば、70 °Cで5分間インキュベートされ、次いで氷上で冷却され得る。プライマー:鋳型混合物にさらなる反応成分が加えられ得る。例えば、30  $\mu$ l 反応容量では、適切な成分は以下を含み得る: 6  $\mu$ l 5 $\times$ 第1鎖緩衝液、1.5  $\mu$ l 0.1M DTT、1  $\mu$ l RNaseOUT(40u/ $\mu$ l)、1.5  $\mu$ l 10mM dNTP混合液(10mM dATP、10mM dCTP、10mM dGTP、4mM dTTP、および6mM アミノアシル-dUTPを含む)、2  $\mu$ l SUPERScript(商標)III(200u/ $\mu$ l)、X  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O(総量30  $\mu$ lまで)。この混合物は、例えば上記に記載されたもののよう

20

#### 【0428】

エタノール沈殿後、修飾されたヌクレオチドを含む核酸は、検出可能部分を含む反応性分子を核酸にカップリングさせるのに適切な緩衝液中に再懸濁され得る。例えば、核酸は、5  $\mu$ lカップリング緩衝液(例えば、0.1M ホウ酸ナトリウム、pH 8.5)中で再懸濁され得る。反応性分子(例えば、色素および反応性官能基を含む分子)が加えられ得る(例えば、5  $\mu$ l モノ官能性Cy3またはCy5色素(APBより、カタログ番号PA23001およびPA25001))。反応性分子が色素である場合、この色素は任意の適切な溶媒(例えば、DMSO)に懸濁され得る。1つの態様において、1パックのCyDyeが45  $\mu$ l DMSOに再懸濁され、上記のように使用された。反応は、適切な時間の長さおよび適切な温度で、例えば、室温で1時間、インキュベートされ得る。色素が光感受性である場合、インキュベーションは好ましくは暗所で実行される。カップリング反応は、5  $\mu$ lの4M ヒドロキシルアミンのような試薬の付加によって停止される。次いで、標識された核酸が精製される(例えば、SNAPカラム、Invitrogen Corporation, Carlsbad, CAを使用して)。

30

#### 【0429】

標識された核酸(直接的標識によって調製されたかまたは間接的標識によって調製されたかに関わらない)は、1種またはそれ以上の標的配列(これは、適切な形態、例えば、マイクロアレイ中にあり得る)にハイブリダイズされ得る。標識された核酸は変性される(例えば、95 °Cで2分間加熱することによって)。変性された、標識された核酸は、適切な緩衝液中で標的核酸を接触される。例えば、マイクロアレイスライドは、標識された核酸を含む(例えば、~1  $\mu$ gの色素標識プローブ)ハイブリダイゼーション緩衝液(例えば、25%ホルムアミド、5 $\times$ SSC、50mM MES pH 6.5、0.1% SDS)中に配置され得る。マイクロアレイは、適切な時間、適切な温度で、例えば、42 °Cで16時間、インキュベートされ得る。次いで、マイクロアレイは、1回以上洗浄され得、例えば、ハイブリダイゼーション溶液が除去され得、マイクロアレイが洗浄液I(5 $\times$ SSC、0.2% SDS)で洗浄され、次に洗浄液II(1 $\times$ SSC、

40

50

0.2% SDS)で42℃、5分間洗浄され、次に洗浄液III(0.1×SSC)で2分間洗浄される。マイクロアレイは、例えば、マイクロアレイを600rpm、5分間スピン乾燥することによって乾燥され得る。

【0430】

ハイブリダイズされたマイクロアレイは、当該分野において公知の任意の技術を使用して分析され得る。

【0431】

本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、本発明が属する技術分野の当業者のレベルを示すものであり、これらは、あたかも各々の個別の刊行物、特許、または特許出願が具体的にかつ個別に参照として本明細書に組み入れられることが示されるような程度まで、参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0432】

(図1) プラスミドpBAD-6-His-M-MLVH-(F1)の地図である。

(図2) 図2Aは、変異を生じさせるのに用いられる遺伝子セグメントを作製するのに用いられる制限酵素切断部位の位置を示す、M-MLV逆転写酵素のコード配列の線形図である。図2Bは、逆転写酵素遺伝子の残りの部分のコード配列への変異誘発させたPCR断片の挿入を示す模式図である。

(図3) (1)SUPERScript(商標)II逆転写酵素および(2)F309Nを用いた伸長アッセイの、走査して読み込まれたリン酸画像(phosphoimage)である。4種類全てのヌクレオチドを用いた伸長反応から分かるように、同じ単位の逆転写酵素によって、47マーDNA鋳型(5nM)とアニールした $[^{32}\text{P}]$ 標識18マープライマーを37℃で30分間伸長させた。6%ゲル電気泳動を変性することによって、伸長反応を分析した。P,伸長されなかったプライマー。

(図4) SUPERScript(商標)II逆転写酵素ならびに変異体F309N、T197E、およびY133AのTdT伸長アッセイを示す、走査して読み込まれたリン酸画像である。47マーDNA鋳型(5nM)とアニールした $[^{32}\text{P}]$ 標識18マープライマーを、単位が減少する逆転写酵素(レーン(1)64単位、レーン(2)200単位、レーン(3)50単位、およびレーン(4)20単位)と4種類全てのヌクレオチドを用いて37℃で30分間伸長させた(以下の実施例3の方法の項を参照のこと)。6%ゲル電気泳動を変性することによって、伸長反応を分析した。このアッセイでは、47ヌクレオチド鋳型を通り過ぎた伸長は、非鋳型特異的付加すなわちTdT活性とみなされる。P,伸長されなかったプライマー。

(図5) DNA鋳型を用いた(1)SUPERScript(商標)II逆転写酵素および(2)F309N逆転写酵素変異体タンパク質の誤挿入アッセイを示す、走査して読み込まれたリン酸画像である。4種類全てのヌクレオチドを用いた伸長反応に示されるように、47マーDNA鋳型(5nM)とアニールさせた $[^{32}\text{P}]$ 標識18マープライマーを、同じ単位の逆転写酵素タンパク質によって37℃で30分間伸長させた。伸長反応を、3種類だけの相補的dNTPの存在下でも(dCTPなし、dATPなし、TTPなし、およびdGTPなし)行った。6%ゲル電気泳動を変性することによって、伸長反応を分析した。このアッセイでは、3種類だけのヌクレオチドを用いた高効率の終結プライマー伸長は、アッセイされたSUPERScript(商標)II逆転写酵素の低い忠実度を反映している。P,伸長されなかったプライマー。

(図6) DNA鋳型を用いた(1)SUPERScript(商標)II逆転写酵素ならびに(2)変異体タンパク質T197A/F309N逆転写酵素および(3)V223H/F309Nの誤挿入アッセイを示す、走査して読み込まれたホスホイメージである。4種類全てのヌクレオチドを用いた伸長反応に示されるように、47マーDNA鋳型(5nM)とアニールさせた $[^{32}\text{P}]$ 標識18マープライマーを、同じ単位の逆転写酵素タンパク質によって37℃で30分間伸長させた。3種類だけの相補的dNTPの存在下でも(dATPなしおよびdCTPなし)伸長反応を行った。6%ゲル電気泳動を変性することによって、伸長反応を分析した。このアッセイでは、3種類だけのヌクレオチドを用いた高効率の終結プライマー伸長は、アッセイされたSUPERScript(商標)II逆転写酵素の低い忠実度を反映している。P,伸長されなかったプライマー。

(図7) 図7A~7Cは、耐熱性RT変異体のスクリーニングから得られた代表的な結果で

ある。変異体の溶解物を96ウェルプレート形式でRT活性についてアッセイした。<sup>32</sup>P-標識されたDNA産物をメンブレン上にトラップし、存在する放射能の量をホスホルイメージャーを用いて定量した。図7Aは、4枚の96ウェルプレートにおけるRT変異体の最初のスクリーニングの結果を示す。溶解物の熱前処理は58℃で10分間であった。58℃での熱処理後に大部分の活性を保持したRT変異体を選択し、溶解物を再度スクリーニングし、結果を図7Bに示す。二連のスクリーニングを、熱前処理なし(図7B、上のパネル)および58℃での熱前処理あり(図7B、下のパネル)で実行した。粗抽出物中で熱不活性化に対して最も高い耐性を有するRT変異体をニッケルアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、再度RT活性に対してスクリーニングし、結果を図7Cに示す。37℃での熱処理後の結果を図7Cの上段の行に、53℃での熱処理後の結果を図7Cの中段の行に、および58℃での熱処理後の結果を図7Cの下段の行に示す。

10

(図8)粗抽出物中でのHis<sub>6</sub>-H-RTおよびHis<sub>6</sub>-H-H204R T306K RTの熱不活性化プロフィールの比較である。粗抽出物を、5分間、96ウェルプレート中で熱処理に供した。熱処理の温度は、最も右のウェルが熱処理されていない以外は、左から右にかけて増加する。

(図9)本発明の方法によって同定されたいくつかのアミノ酸の部位を示す、M-MLV RTのアミノ酸193から232の結晶構造のリボンダイアグラムである。ヘリックスH中のM-MLV RTの204位においてヒスチジンの代わりに置換されたアルギニンの、E201またはT128との潜在的な相互作用。10と11との間のターンにおける触媒部位アミノ酸D224およびD225もまた示す。この三次元構造はGeorgiadisら、(1995)Structure 3, 879-892から引用される。このように、本発明はまた、ヘリックスH領域を含む種々の領域における1つまたはそれ以上の変異または改変を有する逆転写酵素を含む。

20

(図10)図10Aおよび10Bは、Mg<sup>2+</sup>濃度(図10A)またはKCl濃度(図10B)の関数としての逆転写酵素活性のグラフである。SUPERScript(商標)III(SuIII)RTについてのDNAポリメラーゼアッセイを、種々の濃度のA)Mg<sup>2+</sup>またはB)KClで、37℃または50℃で10分間実行した。37℃でのSUPERScript(商標)II(SuII)を比較のために含めた。

(図11)図11Aおよび11Bは、種々の温度におけるDNA(図11A)またはRNA(図11B)上での標識されたDNAプライマーの伸長によるTdT活性測定のアートラジオグラムである。Tは鋳型のみ、(-)と記したレーンはT-Pプラス酵素、dNTPなしである。SUPERScript(商標)IIIはより耐熱性であるので、そのTdT活性は50℃においてSUPERScript(商標)IIよりも高いようである。

30

(図12)図12A、12B、および12Cは、インキュベーション時間の関数としてのRT活性のグラフである。図12Aは50℃において得られたデータを示し、図12Bは55℃において得られたデータを示し、および図12Cは60℃において得られたデータを示す。

(図13)45℃、50℃、および55℃において種々の市販の逆転写酵素の逆転写酵素活性を比較するアートラジオグラムである。SUPERScript(商標)IIIはSSIIIと称し、SUPERScript(商標)IIはSSIIと称される。

(図14)第1の鎖の緩衝液の評価の結果を示す臭化エチジウム染色ゲルの写真である。pH 8.0から8.8までの第1鎖緩衝液を用いるRT反応を500ngの全HeLa RNAおよび200単位のSUPERScript(商標)II(SSII)または400単位のSUPERScript(商標)III(LEFN RT、これは、N末端タグ配列=

40

MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:3)

および以下の点変異、H204R、T306K、M289L、およびF309Nを含む)を用いて実行した。次いで、得られるcDNAの2μlを、BF 2.4kbまたはPol 6.8kbプライマーセットを含む50μlプライマー反応に加えた。次いで、得られるPCR産物を0.4mg/ml臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲルで泳動した。

(図15)種々の逆転写酵素を用いる逆転写反応に対する温度の効果の評価の結果を示す臭化エチジウム染色ゲルの写真である。SUPERScript(商標)II(SSII)を、Hisタグ化EFN逆転写酵素(Hisタグ配列=

**MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH**

、SEQ ID NO:2および表3のアミノ酸1-32、EFN変異はH204R、T306K、およびF309N)、Hisタグ化LEFN逆転写酵素(同じHisタグ配列、LEFN変異はH204R、T306K、M289L、およびF309N)、ならびにSUPERScript(商標)III(これはタグ化された、His LEFNがない逆転写酵素(タグ配列=

**MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:3)**

)、LEFN変異はH204R、T306K、M289L、およびF309N)と比較した。

(図16) タグ配列=

10

**MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:1)**

およびLEFN変異(これはH204R、T306K、M289L、およびF309Nである)を含むLEFNと称されるSUPERScript(商標)IIIとの逆転写反応に対する逆転写酵素濃度の効果の評価の結果を示す臭化エチジウム染色ゲルの写真である。

(図17) SUPERScript(商標)II(パネルA)またはSUPERScript(商標)III(パネルB)によるホットスタートRT-PCR増幅の結果を示す臭化エチジウム染色ゲルの写真である。レーン(二連で)1、4、7、および10は42 で逆転写された産物である。レーン2、5、8、および11は、50 で逆転写された産物である。レーン3、6、9、および12は、55 で転写された産物である。レーン1-3はFGFからの遺伝子特異的プライミングによって逆転写されたRNAの結果であり、レーン4-6はCBS 2.4、レーン7-9はTOP 3.2、レーン10-12はVIN 4.6である。矢印は、240bp、2390bp、3162bp、および4641bpの予測される産物サイズを示す。SUPERScript(商標)IIIは、タグ配列=

20

**MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:3)**

およびLEFN変異(これはH204R、T306K、M289L、およびF309Nである)を含む。

(図18) 種々のプライマーセットを用いて、反应当たり25単位から250単位まで量を変化させたSUPERScript(商標)IIIを用いて実行したRT-PCRの結果である。

(図19) 第1鎖反応において200単位または400単位を使用するRT-PCRにおけるSUPERScript(商標)II(SSII)およびHisタグ化LEFN RTの比較である。Hisタグ化LEFNはHisタグ配列=

30

**MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKH**

、SEQ ID NO:2および表3のアミノ酸1-32、ならびにLEFN変異(これはH204R、T306K、M289L、およびF309Nである)を有する。

(図20) 第1鎖反応における種々の量のRTを用いるRT-PCRにおけるSUPERScript(商標)III(LEFN RT)の使用である。SUPERScript(商標)IIIはタグ配列=

**MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:3)**

およびLEFN変異(これはH204R、T306K、M289L、およびF309Nである)を含む。

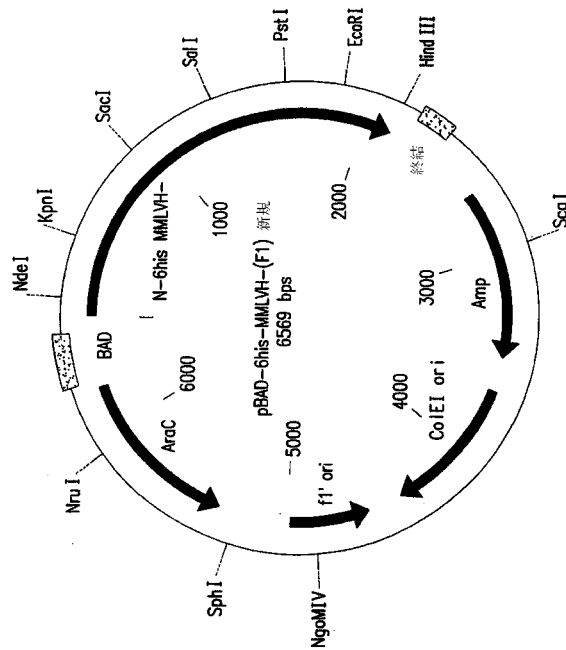
40

(図21) 本発明のポリペプチドを使用するRT-PCR反応における種々のプライマーの比較の結果である。EFNはタグ配列=

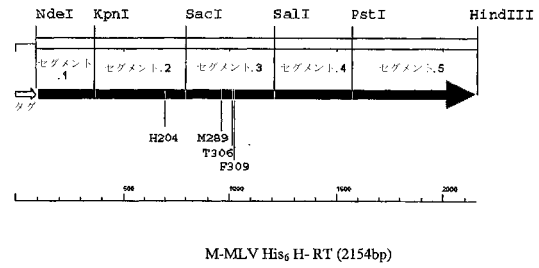
**MASGTGGQQMGRDLYDDDDKH (SEQ ID NO:3)**

およびEFN変異(これはH204R、T306K、およびF309Nである)を含む。

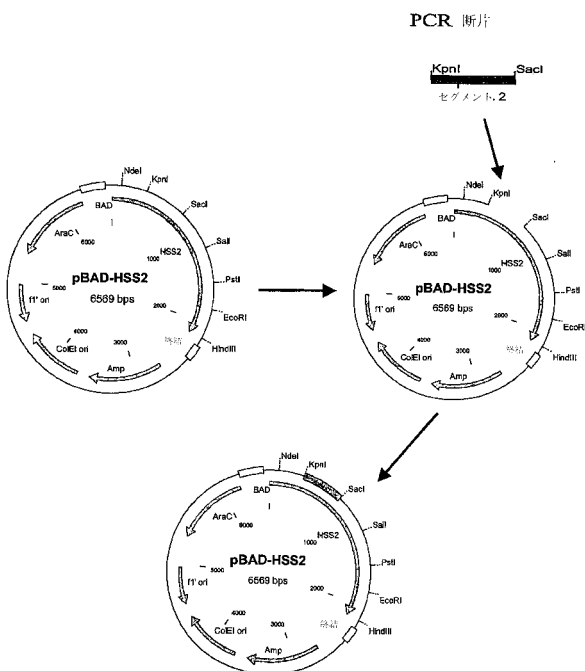
【図 1】



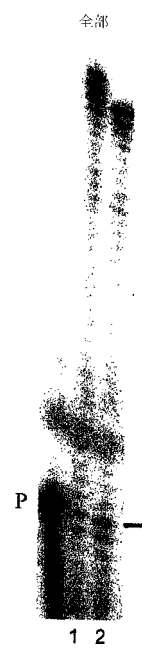
【図 2 A】



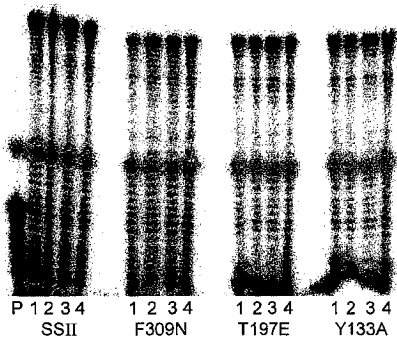
【図 2 B】



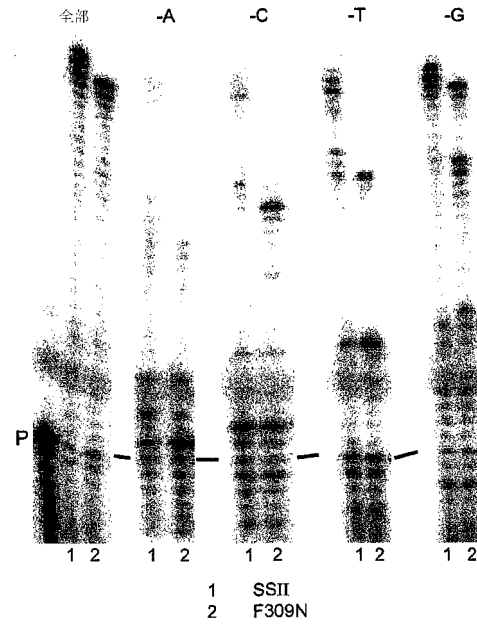
【図 3】



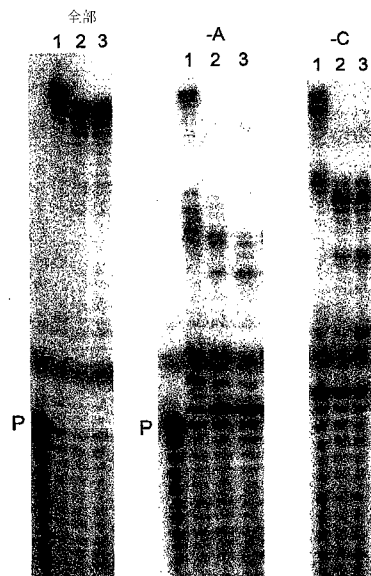
【図 4】



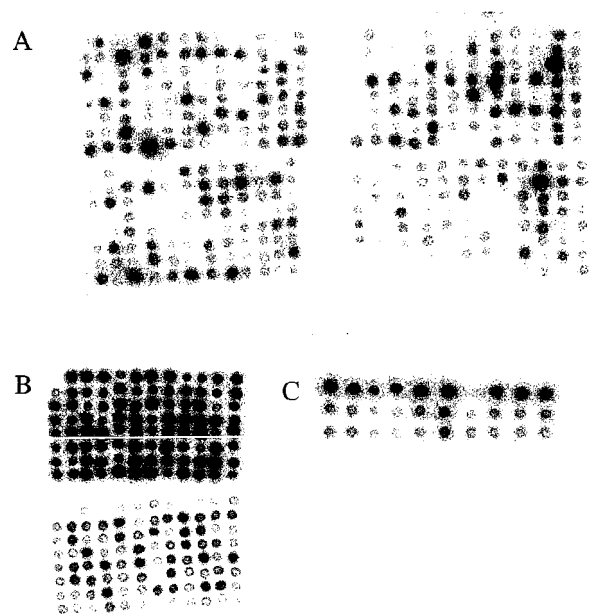
【図 5】



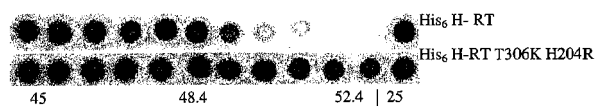
【図 6】



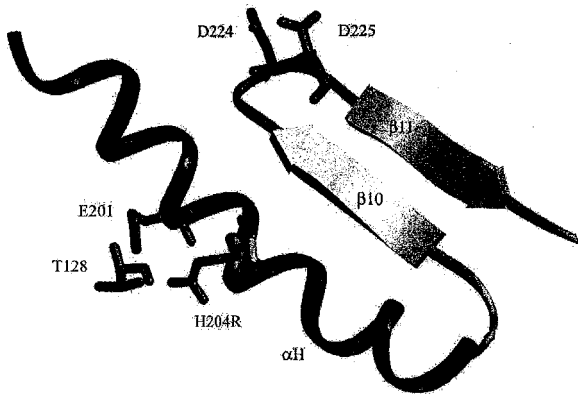
【図 7】



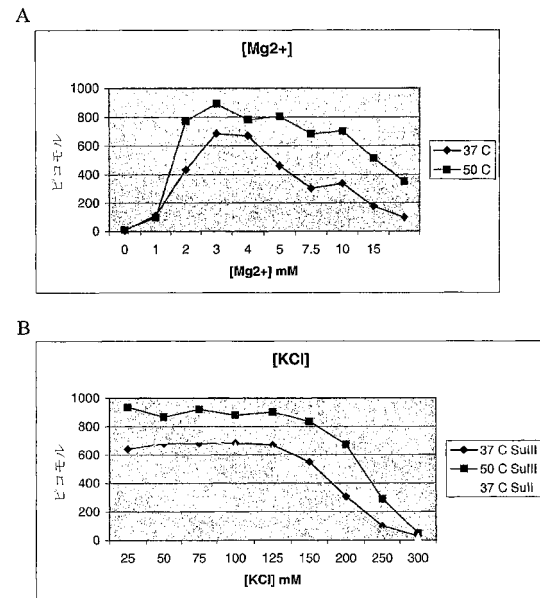
【図 8】



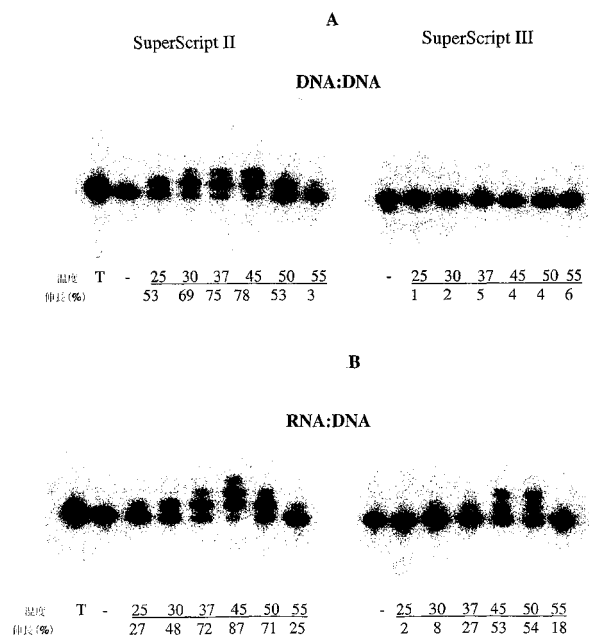
【図 9】



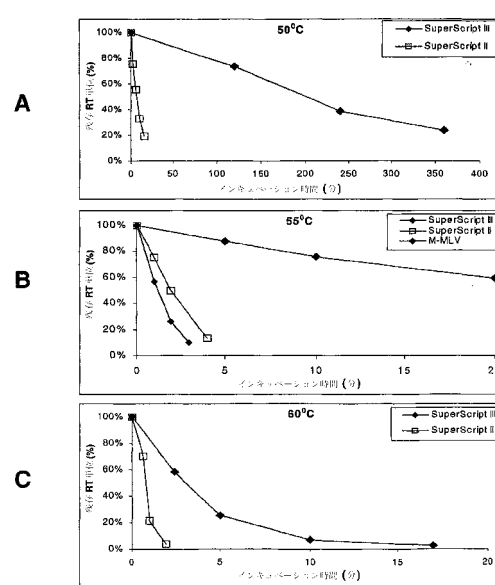
【図 10】



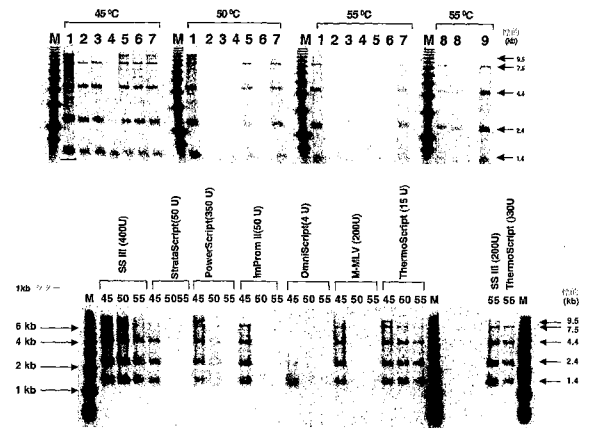
【図 11】



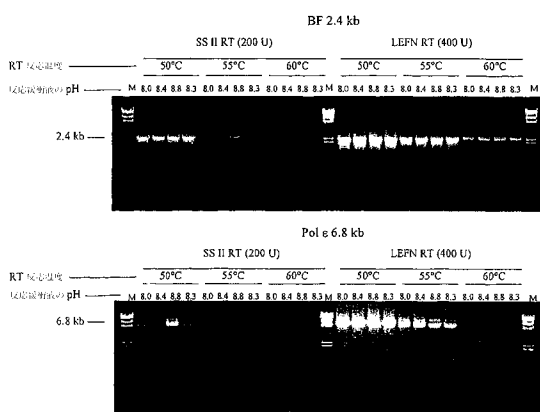
【図 12】



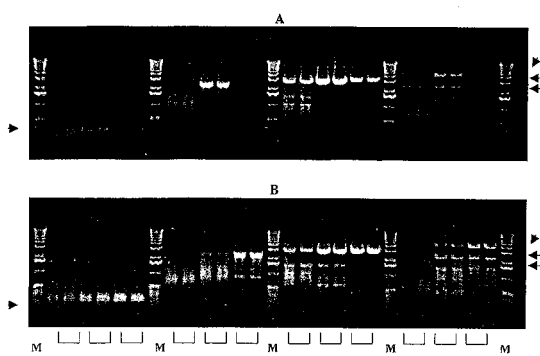
【図 13】



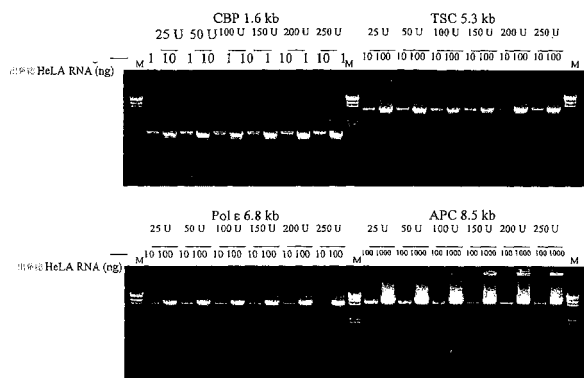
【図 14】



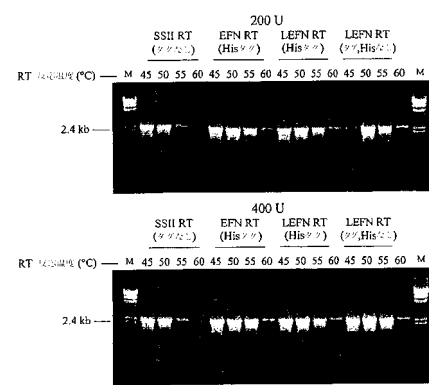
【図 17】



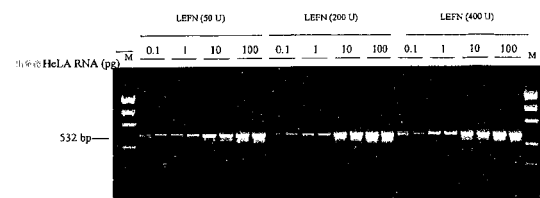
【図 18】



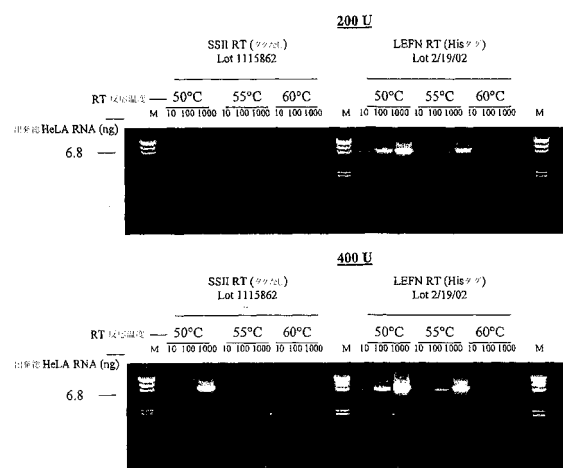
【図 15】



【図 16】

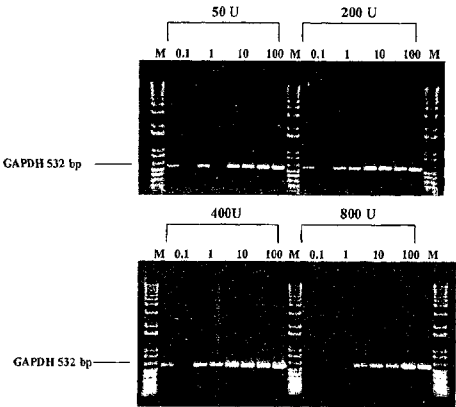


【図 19】

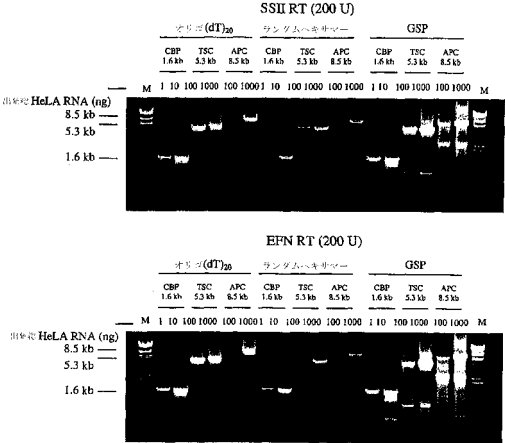




【図 20】



【図 21】



【配列表】

0004634799000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 リー ジュン イー .  
アメリカ合衆国 メリーランド州 ノース ポトマック ソフト ウィンド ドライブ 14716
- (72)発明者 スミス マイケル ディー .  
アメリカ合衆国 メリーランド州 ロックビル シッパーズ レーン 14005
- (72)発明者 ダリウォール グルシャン  
アメリカ合衆国 メリーランド州 ポトマック メイブルクレスト レーン 10612
- (72)発明者 ジェラルド ガリー エフ .  
アメリカ合衆国 メリーランド州 フレデリック ウィリアム ドライブ 8393
- (72)発明者 ローゼンタール キム  
アメリカ合衆国 メリーランド州 レイトンズビル ロング コーナー ロード 25525

審査官 横田 倫子

- (56)参考文献 国際公開第01/092500(WO, A1)  
国際公開第01/068895(WO, A1)  
米国特許第05244797(US, A)  
国際公開第98/047912(WO, A1)  
生物物理, 36[3] (1996) p.144-148  
Adv Protein Chem., 48 (1996) p.377-435  
GenBank Acession No. AAB31929 (22-AUG-2000) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?765158:OLD04:554499>)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
BIOSIS/WPI(DIALOG)