

メタゲノムを利用した新規 DNA 合成酵素の創製

Protein Engineering of DNA Polymerase by using Genetic Resources from Metagenomes

石野 良純*, 山上 健, 松川 博昭, 鬼塚 尚子, 鍋 健吾, 興梠 聖哉
YOSHIZUMI ISHINO, TAKESHI YAMAGAMI, HIROAKI MATSUKAWA, NAOKO ONIZUKA, KENGO NABE and SEIYA KOUROKI

九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門, 生物資源環境科学府遺伝子資源工学専攻

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

* TEL: 092-642-4217 FAX: 092-642-3051

* E-mail: ishino@agr.kyushu-u.ac.jp

Department of Genetic Resources Technology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

キーワード: キメラ酵素, 極限環境微生物, 遺伝子工学, PCR

Key words: chimera enzyme, extremophile, genetic engineering, PCR

(原稿受付 2007年10月18日/原稿受理 2007年10月21日)

1. はじめに

本稿は第13回日本生物工学会におけるシンポジウム「メタゲノム研究と環境バイオテクノロジー」での講演内容をまとめたものである。我々の研究の中心はDNA複製と組換え修復の分子機構解析であり, 基礎分子生物学的研究によって発見し, 生化学的解析によってその性質が明らかとなったDNA関連酵素を, 遺伝子工学に適用して既存の技術の改良や新規技術開発に繋げていくという研究方針をとっている。DNA複製, 修復などの生命現象の過程では多くのDNA関連酵素, 蛋白質因子が働いている。人類はこのようなゲノム安定性の維持と遺伝情報伝達の過程がどのような分子機構によって進むのかを理解しようとして, 多くの酵素を発見し, それを利用して組換えDNA実験技術を開発した。遺伝子工学実験に不可欠なのは, DNA鎖を切ったり, 繋げたり, 合成したりする酵素であり, 現在ではこれらの活性をもった多くの酵素が市販されていて, 何時でも購入して利用できることの便利さ故に, 遺伝子工学的手法は世界中に普及するまでになっている。このような現状で遺伝子工学技術に利用可能な種々の酵素について, 研究することの意義は大きい。新規遺伝子工学用酵素を開発する方法はいろいろ考えられるが, 本稿では, 特に環境メタゲノムを有用遺伝子資源と捕らえ, それを有効に活用することによって効率のよいタンパク質工学による新規酵素の創製について述べる。

2. 遺伝子工学酵素としてのDNAポリメラーゼ

DNAポリメラーゼは, 試験管の中で鋳型となるDNA鎖に添って新しくDNA鎖を合成することができる酵素であり, その反応には鋳型DNAの他にプライマーとな

る短いデオキシオリゴヌクレオチドと4種のデオキシモノヌクレオチド3リン酸(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)があれば, 新しくDNA鎖が合成される。その性質によって, DNAポリメラーゼは塩基配列決定やPCRをはじめとする数多くの操作に利用され, 言わば遺伝子工学酵素の花形選手である。そのため, 多くのメーカーは競って, より優れた酵素製品の開発に力を入れている。ジデオキシ塩基配列解析法が開発された当初は, 大腸菌DNAポリメラーゼI Klenow酵素が利用されていたが, PCRの出現とともに耐熱性のDNAポリメラーゼに主役の座を奪われ, 現在では塩基配列解析にも耐熱性DNAポリメラーゼを利用したサイクルシークエンス法が普及している。すなわち, 世は耐熱性DNAポリメラーゼの時代であり, 常温生物由来の酵素は応用という意味では影が薄くなっている。

耐熱性の酵素を得るために通常は, 好熱性微生物, 超好熱性微生物がよい資源となる。DNAポリメラーゼの場合も, 例えばPCRで有名になったTaqポリメラーゼはイエローストーン国立公園の温泉中に生息する*Thermus aquaticus* Y11という好熱性真正細菌から単離された¹⁾。PCRが普及して以来, 耐熱性のDNAポリメラーゼは注目を浴びるようになり, 我々も好熱性細菌に興味を持ち始めた。まだ1989年のことである。好熱性細菌の中でも特に80°C以上を増殖至適温度とするものは超好熱性と呼ばれる。超好熱性細菌はアーキア(古細菌)という第3の生物に属する生物ドメインに属するものが多く, 従来の真正細菌とは区別されている。特に90°C以上でも生育できるものは殆どがアーキアである。我々は, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrodictium occultum*, *Aeropyrum pernix*などの超好熱性アーキア(表1)からDNAポリメラーゼを単離, 同定し, その酵素的な特性を解析しながら, 応用性について検討してきた²⁻⁸⁾。

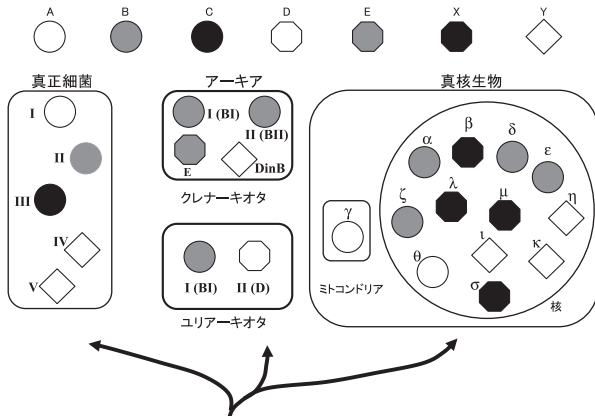


図1. 細胞中に存在する DNA ポリメラーゼの分布

三つの生物ドメイン（真正細菌、真核生物、アーキア）に存在する DNA ポリメラーゼをファミリー毎に形を変えて示した。一つの細胞内には複数の DNA ポリメラーゼが存在し、その存在様式は各生物ドメインによって異なる。アーキアでは 2 種のサブドメイン（クレナーキオタ、ユリアーキオタ）で存在する DNA ポリメラーゼの種類が明らかに異なる。

DNA ポリメラーゼは、初めは酵素としての性質の類似性や多様性から分類分けされはじめたが、遺伝子クローニング技術の普及以降は遺伝子配列の解析によって得られる推定アミノ酸配列データが蓄積し、その類似性から分類されるようになった。その結果、現時点でファミリー A, B, C, D, E, X, Y という 7 つのグループに分けられている (図 1)⁹⁻¹²⁾。DNA 鎖合成という基本的な活性はすべてに共通であるが、DNA 鎖の合成様式や付随する活性などのより詳細な性質について見ると、同じファミリーの酵素は、よりよく類似した性質を有している。上記ファミリー分けで見た場合に、現在市販されて実用的に利用されているのはファミリー A と B に属するものばかりである。塩基配列決定法には、ジデオキシヌクレオチドの基質としての認識性に依存してファミリー A がもっとも適しており、シークエンスキットとして市販されているのは全てファミリー A の酵素であり、特に真正好熱細菌由来のものが使われている。一方、PCR にはファミリー A, B 両方の酵素が用いられており、PCR の使用目的に応じて使い分けられている。ファミリー B の酵素として製品化されているのは、超好熱性アーキア由来のものである。ファミリー B の酵素はジデオキシヌクレオチドの取込みが悪いためにシークエンシングには適さないが、鋳型鎖の配列に従って DNA 鎖合成を行う時の正確性に関わる 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を有しており、この活性を有しない *Taq* ポリメラーゼなどのファミリー A 酵素よりも増幅時の間違いが少ない。より正確な PCR を行いたい時にはファミリー B の酵素がより適している。ファミリー A 酵素は正確性が低いかわりに DNA 合成効率がよいので、兎に角目的の DNA 断片を増幅することが目的の場合にはまずこちらの酵素を用いればよい^{13,14)}。その後、ファミリー A, B の酵素を混合して PCR に利用することで、両者の優れた性質が発揮されることを期待した方法が開発され¹⁵⁾、*Taq* ポリメラーゼを用いた標準 PCR と比較

して、より正確により長鎖の DNA を増幅する LA-PCR (Long and Accurate PCR) と呼ばれるようになった。現在の PCR 酵素市場は、この LA-PCR 用酵素が中心で、それぞれの研究者が目的や経済性を考えてファミリー A 酵素、ファミリー B 酵素を使い分けている^{13,14)}。

PCR は世界中に普及し、日常的に利用されている遺伝子解析技術ではあるが、それ故に、利用者はさらに便利で使い易く、信頼性のある酵素を求めている。すなわち、目的の DNA 断片を「より早く、より長く、より正確に、より効率良く」増幅することができる酵素が望まれている。

3. 新規有用酵素の開発

新しい酵素を遺伝子工学用酵素として開発していく場合にとり得る方法として、自然環境下で生息する生物から優れた新規酵素（またはその遺伝子）を探索する（スクリーニング）か、もしくはタンパク質工学の手法を用いて、既存の酵素を部位特異的に改変して新規酵素を創製するという戦略が考えられる。前者の場合、直接酵素を単離してその性質を調べていくには、その生物の細胞を培養して増殖させなければならない。耐熱性酵素の開発を考えた時に対象となるのは好熱性の生物であるから、通常は微生物ということになる。現在人工的に培養が可能な微生物は地球全体に生息する微生物のうち 1% にも満たないと言われている。まだ知られていない微生物の中には、人類の生活にとって大変有用な性質を持った酵素を有しているものが存在するかも知れない。それらの酵素を調べていくためには、材料を得るための微生物培養技術が必要である。また一方で、近年の遺伝子工学技術を利用して、既知のタンパク質のアミノ酸配列を自在に変換して、人工タンパク質を創製するタンパク質工学が発展してきた。この手法にとって重要なのは、対象としている酵素蛋白質のどの部分をどのように改変していけば目的の活性を改良することができるか、また新規活性を付加することができるかというデザイン作業である。このような計画をたてるためには、その酵素タンパク質の構造と機能に関する詳細な情報の蓄積が必要である。もちろん、その酵素遺伝子に対してランダムに変異を導入して、変異体タンパク質の集団を調製し、その中からより有用な活性を選択していく方法もある。

我々は、天然酵素のスクリーニングとタンパク質工学の両方の利点を組み合わせた戦略によって、優れた性質を有する新規 DNA ポリメラーゼの創製を目指している。それは、自然界に生息する未同定の微生物の遺伝子を利用して、それを既存の DNA ポリメラーゼ遺伝子と部分的に入れ換えるという手法である (図 2)。自然界に存在する未同定の微生物の遺伝子を利用する場合に、好熱菌の存在を期待して温泉地区の高温土壌試料を採取し、そこから個々の微生物を単離することなく DNA を調製してくる。すなわち、このメタゲノム DNA が有用な遺伝子資源となる。

温泉土壌メタゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により DNA ポリメラーゼ遺伝子領域を含む DNA 断片の増幅を試みる。前述のように DNA ポリメラーゼはアミノ酸配列の類似性によって分類分けされ、同じファミ

リーなら共通の配列モチーフが存在する。例えば、*Taq* ポリメラーゼが属するファミリー A の酵素には、特によく保存された領域が 4 箇所存在する。この部分のモチーフ配列を利用して、PCR 用のプライマーを設計することができる¹⁶⁾。メタゲノムの場合、全ゲノム DNA を完全な形で得るのはむずかしいので、調製されたゲノム DNA が切断されていることを考えれば、あまり長い領域の増幅は避けたほうがいい。さらに重要な情報は、DNA ポリメラーゼのヌクレオチド重合反応において基質の認識や活性中心となる部分が酵素蛋白質のどの部分に相当するかということである。すなわち、DNA ポリメラーゼにとってエンジンとも言うべき部分をコードする遺伝子領域をメタゲノムから得られる新規遺伝子で置き換えることによって、既存の DNA ポリメラーゼとは

性質の異なった酵素が創製される確率が上がることが期待されるのである。

4. キメラ DNA ポリメラーゼの創製

我々は上記のことを総合して戦略を立て、日本各地の温泉土壌試料から調製した DNA を遺伝子資源として用いて、PCR を行って新規 DNA ポリメラーゼ遺伝子断片を獲得しようと考えた。図 3 に示すような 2 種類の縮重プライマーをデザインした。このプライマーセットを用いて日本国内 6 カ所の温泉地から採取した土壌試料約 200 種を鋳型にそれぞれ PCR 反応を行った。その結果、40 試料からファミリー A に属する DNA ポリメラーゼ遺伝子断片と予想される約 600 塩基対の増幅 DNA 断片を得た。その一部を図 4 に示す。増幅 DNA 断片にはできるだけ多くの異なる遺伝子が混ざっていることを期待した。これらの DNA 断片をアガロースゲルから切り出し、それをプラスミドベクターに組み込み、クローン化した。得られたクローンからランダムに選択して塩基配列を決定したところ、解読されたそれぞれの配列にコードされ得るアミノ酸配列は、相同性の比較から、各種生物の DNA ポリメラーゼ配列が最も類似する配列としてリストアップされてきたので、これらは DNA ポリメラーゼ遺伝子断片であると推定されたが、現在のデータベースに登録されている配列と完全に一致するものは殆どなく、多くの新規遺伝子を取得できた。これまでの結果を集計すると、増幅 DNA 断片が確認された 40 試料から、それぞれ増幅 DNA をクローニングし、20 クローンずつを塩基配列解析した結果、合計 189 個の異なったアミノ酸配列を得た。これらはファミリー A の酵素遺伝子なので、*Taq* DNA ポリメラーゼを基にしてキメラ遺伝子を作成することにした。そこでま

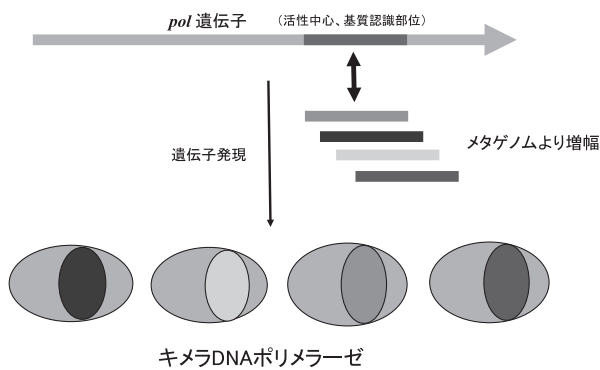


図 2. 新規 DNA ポリメラーゼの創製戦略
メタゲノムを遺伝子資源として利用して、DNA ポリメラーゼの活性中心や基質認識部位を含む領域に対応する遺伝子部分を PCR で増殖し、既存の DNA ポリメラーゼのエンジン部分の遺伝子と部分的に入れ換えることによって、新規 DNA ポリメラーゼを創製する。

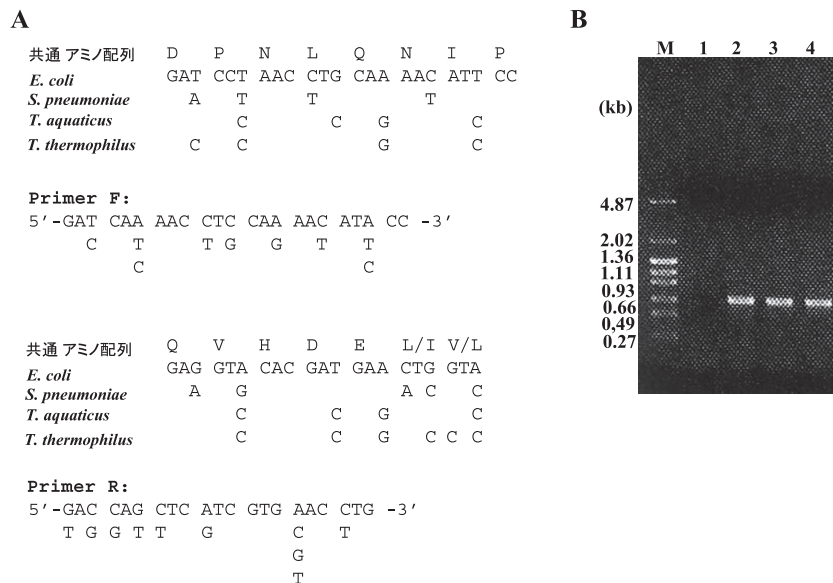


図 3. PCR によるファミリー A DNA ポリメラーゼ遺伝子断片の増幅
ファミリー A に属する DNA ポリメラーゼには パネル A に示した保存配列が存在するので、その配列をもとに縮重プライマーを設計することができる¹⁶⁾。このプライマーセットを用いて、真正細菌ゲノム DNA を鋳型としてすると、DNA ポリメラーゼ遺伝子断片を増幅することができる。パネル B にその一例を示す。レーン 1: no DNA, レーン 2: *Bacillus caldotenax*, レーン 3: *Bacillus caldolyticus*, レーン 4: *E. coli*

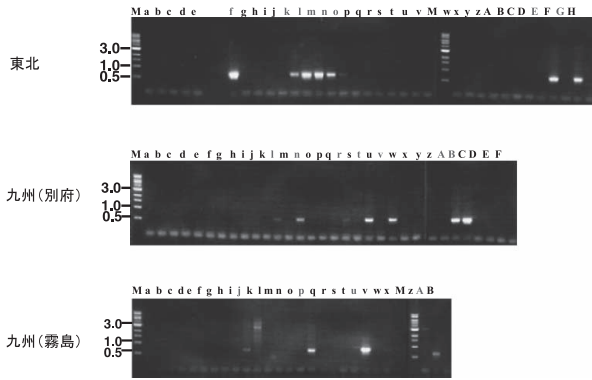


図4. 温泉土壌試料からの DNA ポリメラーゼ遺伝子の検出
日本各地の温泉土壌から抽出したメタゲノム DNA を鋳型にしてファミリー A DNA ポリメラーゼ遺伝子断片の増幅を試みた一例を示す。東北地区（鬼首，河原毛温泉など）や九州地区（別府，霧島温泉）の温泉土壌から抽出した DNA を用いて PCR を行った後，反応液を 1% アガロースゲル電気泳動で分析した。いくつかの試料からは予想される 600 塩基対の大きさの DNA 断片が増幅されていることが確認された。各レーンそれぞれ異なる試料からの PCR 反応液を泳動したもので，予想される大きさの DNA 断片が検出されたレーンはグレーで示している。レーン M はサイズマーカー DNA を泳動している。

ず，発現ベクター上の *Taq* ポリメラーゼ遺伝子¹⁶⁾を細工して，入れ換えたい部分の 5' 末端，3' 末端に，出来るだけアミノ酸配列の変化が起こらないように考慮して，メタゲノムから遺伝子断片を増幅した時に用いたプライマー配列の中に設けておいた制限酵素認識配列 (*BspI* と *BglII*) と同じ配列を部位特異的変異導入した。この操作のためには 2 アミノ酸の置換が避けられなかったが，同族アミノ酸の置換 (Leu-Val が Ile-Leu に代わる) であるので，便宜上野生型と見なし，*Taq'* と表すことにした。このようにして，制限酵素と DNA リガーゼによる切り貼りだけで，カセット的にメタゲノム断片を *Taq'* DNA ポリメラーゼ遺伝子と部分置換する手順を確立した (図 5)。得られたキメラ遺伝子は *Taq* および *Taq'* DNA ポリメラーゼと同様に大腸菌で発現させ，同様の操作手順により高純度で精製できた (図 6)。

5. キメラ酵素の性能評価

上記のような手法により調製したキメラ *Taq* DNA ポリメラーゼ酵素を用いて，DNA 鎖合成活性を，³H-TTP を含んだヌクレオチドの取り込みアッセイ法により測定した。DNA 鎖中に取り込まれた放射活性の値を基に，単位時間あたりに DNA ポリメラーゼがヌクレオチドを取り込んで DNA 鎖を合成する比活性 (unit) を計算し，その値を比較することによって，酵素間での相対的な比較ができる。多少の強弱のばらつきはあるものの，得られたキメラ *Taq* ポリメラーゼは野生型の酵素と比較して同様な比活性を示した (図 7)。そこで，次にこれらの酵素について，unit を揃えて，単位時間あたりの DNA 鎖伸長能を詳細に調べることにした。すなわち，野生型の *Taq* DNA ポリメラーゼよりも鎖伸長能がより優れた酵素が創製されることを期待した。方法は，約

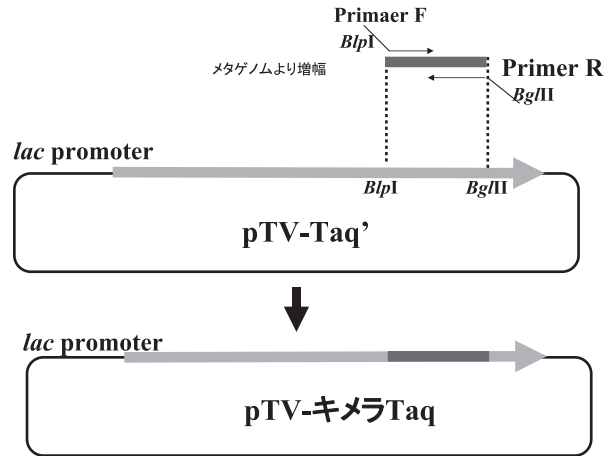


図5. キメラ *Taq* DNA ポリメラーゼの発現プラスミド構築法
大腸菌での発現ベクターである pTV118N に *Taq* ポリメラーゼ遺伝子が組み込まれた発現ベクターを調製した¹⁶⁾。この遺伝子上に部位特異的変異導入法により *BspI*, *BglII* の認識配列を作り，これらの制限酵素でエンジン部分を切り出せる様にしておき，同じ制限酵素認識配列を含んだ縮重プライマーでメタゲノムから増やしてクローニングした遺伝子断片で順次入れ替える。こうして作製したキメラ *Taq* ポリメラーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ，産生された酵素を精製する。

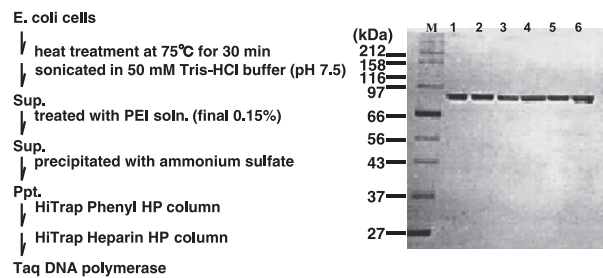


図6. キメラ *Taq* DNA ポリメラーゼの精製
大腸菌で発現させた各種キメラ *Taq* DNA ポリメラーゼは野生型酵素と同様の手順で，SDS-PAGE 上での単一バンドにまで精製することができる。レーン 1: *Taq* ポリメラーゼ，レーン 2: *Taq'* ポリメラーゼ，レーン 3-6: 各種キメラ *Taq* DNA ポリメラーゼ (キメラ A, B, C, D) を泳動している。レーン M はサイズマーカー蛋白質を泳動したものである。ゲルは泳動後クローマシーにより染色した。

7000 鎖長の環状一本鎖 DNA を鋳型として，一カ所に貼付けたプライマーが単位時間あたりどのくらい鎖長を伸ばすことができるかを測定するものである。その結果，図 7 に示すように，キメラ酵素の中に *Taq* DNA ポリメラーゼよりも優れた伸長性を示すものが得られた。このような酵素が PCR 用酵素として実際に有用かどうかについては，そのための種々の確認実験をしていかなければならないが，DNA ポリメラーゼの基本的な性能が優れたものであることは，有用酵素の開発のためには必須の条件である。

6. おわりに

我々は，耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子探索にとっ

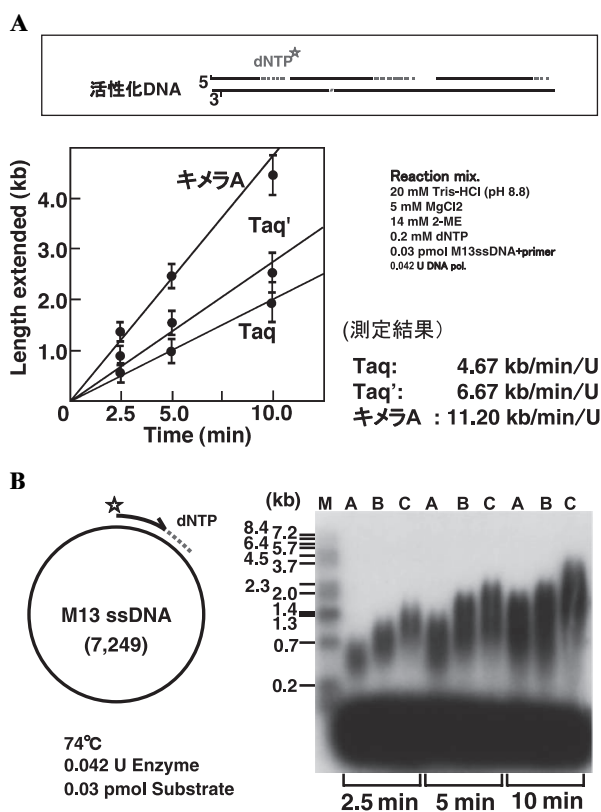


図7. キメラ *Taq* DNA ポリメラーゼの活性測定
 精製した酵素を正確に定量し、活性化 DNA を用いて単位量あたりのヌクレオチド取り込み活性を測定してユニット数を求めた。*Taq*, *Taq'* およびキメラ酵素の一つを例に示している (パネル A)。次にプライマー (5' 末端を ³²P で標識してある) が一カ所に張り付いた鋳型 DNA を用いて各酵素の DNA 鎖合成活性の伸長能を調べた。反応液をアルカリアガロースゲル電気泳動で分析し、オートラジオグラフィによって反応産物を検出した (パネル B)。レーン A : *Taq* ポリメラーゼ, レーン B : *Taq'* ポリメラーゼ, レーン C, キメラ A ポリメラーゼ。

て、温泉土壌中のメタゲノムが極めて有用な遺伝子資源と考え、日本各地の温泉土壌から微生物を培養せずにゲノム DNA を直接分取して、その中に確かに多くの未同定な DNA ポリメラーゼ遺伝子が存在することを確かめた。その中から実用的に優れた酵素遺伝子を選択する方法として、遺伝子全長を単離するのではなく、エンジン部分に相当する領域だけを既存の酵素遺伝子の対応する部分と入れ替えるという戦略をとっている。この方法で、実際に活性のあるキメラ酵素が多く得られたことで、この方法が有効であることが示された。また、温泉土壌にはまだまだ未知の微生物が多く存在し、それらが有用な遺伝子資源であることも実証できた。メタゲノムをこのような手法で利用して新規酵素を創製した例は、我々が初めてであろうと思う。メタゲノムを利用した有用酵素開発の手法として我々の戦略が実用的であることを示すためには、実際に既存の酵素よりも優れた性能を有する酵素の創製を実現しなければならないが、少なくとも実験室レベルでは、既存の *Taq* ポリメラーゼよりも優れた PCR パフォーマンスを示す酵素が創製できている (Yamagami et al., 未発表)。また、本稿ではファミリー

A の DNA ポリメラーゼについて行った実験のみを紹介したが、我々はファミリー B についても同様の手法でキメラ酵素の作成を進めており、同じように活性のある新規酵素が創製され得ることを確認できている (Matsukawa et al., 未発表)。ファミリー B のキメラ酵素からは、特に高い正確性を維持したまま、伸長性にも優れた新規 DNA ポリメラーゼの開発が期待される。この手法による新規酵素の創製は人工進化学で行なわれているランダム変異導入法と一見同じように思えるが、天然の遺伝子断片を増幅して使用するという点で、自然の進化を利用した方法として、より理にかなった変異導入が期待できるのではないかと我々は考えており、今後の応用微生物学、酵素学研究の有効な実験手法の一つとして発展させられることを願っている。さらに、本手法によって創製されたキメラ酵素の性質を調べ、野生型酵素のそれと比較して記録していくことによって、DNA ポリメラーゼの構造と機能に関する詳細なデータベースを構築することができる。このデータの蓄積によって、DNA ポリメラーゼによる酵素反応の理解にも貢献できると考えている。

謝 辞

本研究は NEDO 知的基盤創製・利用技術研究開発事業 (平成 14-16 年) の中で開始したものから継続的に発展させているものです。NEDO および「土壌中微生物の遺伝子資源の効率的探索・解析技術の開発」プロジェクトの河原林裕代表 (産総研) をはじめプロジェクトメンバーの方々に感謝申し上げます。

文 献

- Chien, A, D.B. Edgar, and J.M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extremophile *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. 127: 1550-1557.
- Uemori T., Y. Ishino, H. Toh, K. Asada, and I. Kato. 1993. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. Nucleic Acids Res. 21: 259-265.
- Uemori, T., Y. Ishino, H. Doi, and I. Kato. 1995. The hyperthermophilic archaeon *Pyrodicticum occultum* has two α -like DNA polymerases. J. Bacteriol. 177: 2164-2177.
- Imamura, M., T. Uemori, I. Kato, and Y. Ishino. 1995. A non- α -like DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Biol. Pharm. Bull. 18: 1647-1652.
- Uemori, T., Y. Sato, I. Kato, H. Doi, and Y. Ishino. 1997. A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. Gene cloning, expression, and characterization. Genes Cells 2: 499-512.
- Ishino, Y., K. Komori, I.K. Cann, and Y. Koga. 1998. A novel DNA polymerase family found in Archaea. J. Bacteriol. 180: 2232-2236.
- Cann, I.K., S. Ishino, N. Nomura, Y. Sako, and Y. Ishino. 1999. Two family B DNA polymerases in *Aeropyrum pernix*, an obligate aerobic hyperthermophilic crenarchaeote. J. Bacteriol. 181: 5984-5992.
- Komori, K., and Y. Ishino. 2000. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3'→5' exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I. Protein Engineering 13: 41-47.
- Braithwaite, D.K., and J. Ito. 1993. Compilation, alignment,

- and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 21: 787–802.
- 10) Cann, I.K.O., and Y. Ishino. 1999. Archaeal DNA replication: Identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics* 152: 1249–1267.
 - 11) Lipps, G., S. Rother, C. Hart, and G. Krauss. 2003. A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.* 22: 2516–2525.
 - 12) Ohmori, H., E.C. Friedberg, R.P. Fuchs, M.F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. Kunkel, C.W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G.C. Walker, Z. Wang, and R. Woodgate. 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Mol. Cell* 8: 7–8.
 - 13) 石野良純. 1996. 耐熱性 DNA ポリメラーゼと PCR. 蛋白質核酸酵素. 41: 429–436.
 - 14) 石野良純. 1999. 耐熱性 DNA ポリメラーゼ, pp. 182–188. In *PCR Tips*. 秀潤社.
 - 15) Barnes, W.M. 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2216–2220.
 - 16) Uemori, T., Y. Ishino, K. Fujita, K. Asada, and I. Kato. 1993. Cloning of the DNA polymerase gene of *Bacillus caldotenax* and characterization of the gene product. *J. Biochem. (Tokyo)* 113: 401–410.