

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-516993

(P2021-516993A)

(43) 公表日 令和3年7月15日 (2021.7.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/52 (2006.01)	C 1 2 N 9/52 Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844 Z	
C 1 2 N 15/57 (2006.01)	C 1 2 N 15/57	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2020-570641 (P2020-570641)	(71) 出願人	520342356
(86) (22) 出願日	平成31年3月7日 (2019.3.7)		アークティックザイムズ エイエス
(85) 翻訳文提出日	令和2年10月28日 (2020.10.28)		ARCTIC ZYMES AS
(86) 国際出願番号	PCT/EP2019/055724		ノルウェー王国 9019 トロムソ,
(87) 国際公開番号	W02019/170809		シケフスヴァイエン 23
(87) 国際公開日	令和1年9月12日 (2019.9.12)	(74) 代理人	110001070
(31) 優先権主張番号	1803654.1		特許業務法人 S S I N P A T
(32) 優先日	平成30年3月7日 (2018.3.7)	(72) 発明者	ストリバーニー, ベルント ケテルセン
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		ノルウェー王国 9103 クヴァルヤ,
			ミルスニパ 11
		(72) 発明者	ペデルセン, カトリーネ
			ノルウェー王国 9024 トマショルド
			, メルクルヴェーゲン 11

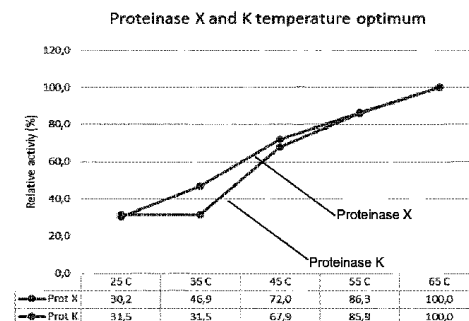
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 易熱性プロテイナーゼ

(57) 【要約】

本発明は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む組成物であって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、i) 前記組成物中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又はii) 前記組成物中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、組成物を提供する。こうした条件下で、プロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片は、誘導的に易熱性である。本発明は、更に、1以上のポリペプチド及びプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む試料であって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又はii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、試料を提供する。本発明は、更に、こうしたプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の不活性化を含む方法を提供する。前記方法は、試料を加熱して前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性な断片を不活性化するステップを含み、i) 前記試料中の遊離カルシ

Figure 1:



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む組成物であって、前記プロテイナーゼが配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を含み、

i) 前記組成物中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約 80 μ M である、又は

i i) 前記組成物中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20 mM である、
組成物。

【請求項 2】

好ましくは前記組成物が体積 $\leq$ 200 μ l である、1 以上のポリペプチドを含む試料に適用するための溶液である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

1 以上のポリペプチド及びプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む試料であって、前記プロテイナーゼが配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を含み、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約 80 μ M である、又は

i i) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20 mM である、
試料。

【請求項 4】

試料中のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化する方法であって、前記プロテイナーゼが配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を含み、前記方法が、前記試料を加熱して前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性な断片を不活性化するステップを含み、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約 80 μ M である、又は

i i) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20 mM である、
方法。

【請求項 5】

試料中のポリペプチドを消化する方法であって、

a) 前記試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 前記試料中のポリペプチドの少なくとも部分的消化を可能にする条件下で前記試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 前記試料を加熱して前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ

を含み、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約 80 μ M である、又は

i i) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20 mM である、
方法。

【請求項 6】

目的の生体分子を試料から単離又は精製する方法であって、前記試料が 1 以上の混入ポリペプチドを含み、前記方法が、

a) 前記試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 前記試料中のポリペプチドの少なくとも部分的消化を可能にする条件下で前記試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 前記試料を加熱して前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ

を含み、

10

20

30

40

50

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMであり、

d) 前記目的の生体分子を前記試料から任意で除去するステップを含む方法。

【請求項7】

目的の生体分子を1以上のペプチド結合を介してそれに結合した第2の分子から遊離させる方法であって、

a) 前記試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 前記ペプチド結合の1以上の消化によって前記目的の生体分子の遊離を可能にする条件下で前記試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 前記試料を加熱して前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ

を含み、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMであり、

前記目的の生体分子を前記試料から任意で除去するステップを含む方法。

【請求項8】

i) 前記組成物又は試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、

ii) 前記組成物又は試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、

請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物、試料又は方法。

【請求項9】

i) 前記組成物又は試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記組成物又は試料がEDTAを本質的に含まない、好ましくはカルシウムキレート剤を本質的に含まない、又は

ii) 前記組成物又は試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、

請求項1から8のいずれか一項に記載の組成物、試料又は方法。

【請求項10】

i) 前記組成物又は試料中の遊離カルシウム濃度が1～80 μ Mである、及び／又は

ii) 前記組成物又は試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、

請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物、試料又は方法。

【請求項11】

i) 前記組成物又は試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約35 μ Mである、及び／又は

ii) 前記組成物又は試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約40 mMである、

請求項1から10のいずれか一項に記載の組成物、試料又は方法。

【請求項12】

前記試料のpHが6.5～9.5、好ましくは7.5～8.5である、請求項1から11のいずれか一項に記載の組成物、試料又は方法。

【請求項13】

前記加熱ステップが前記試料を約53～約67℃の温度で加熱するステップを含む、請求項4から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記加熱ステップが前記試料を約53～約58℃の温度で好ましくは約45～約75分間加熱することを含む、請求項4から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約10 μ Mである、又は前記試料中の一価塩濃度が少なくとも約75 mMである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

10

20

30

40

50

前記加熱ステップが前記試料を約 63～約 67℃の温度で好ましくは最大約 10 分間加熱することを含む、請求項 4 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約 65 μ M である、又は前記試料中の一価塩濃度が少なくとも約 25 mM である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記加熱ステップが前記試料を約 58～約 63℃の温度で好ましくは約 2～約 40 分間加熱することを含む、請求項 4 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記加熱ステップが、前記試料を

i) 約 5～15 分間、好ましくは、ここで、前記試料中の遊離カルシウム濃度は $\leq$ 約 10 μ M である、若しくは前記試料中の一価塩濃度は少なくとも約 75 mM である、又は

ii) 約 10～20 分間、好ましくは、ここで、前記試料中の遊離カルシウム濃度は $\leq$ 約 35 μ M である、若しくは前記試料中の一価塩濃度は少なくとも約 50 mM である、又は

iii) 約 20～40 分間、好ましくは、ここで、前記試料中の遊離カルシウム濃度は $\leq$ 約 65 μ M である、若しくは前記試料中の一価塩濃度は少なくとも約 25 mM である、加熱することを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記加熱ステップが前記試料を約 65～約 70℃の温度で最大約 5 分間加熱することを含む、請求項 4 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記加熱ステップ後の前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の残存プロテイナーゼ活性が対照に対して $\leq$ 約 25%、好ましくは $\leq$ 約 10%であり、前記残存活性が以下の分析ステップ、すなわち、

i) 1000 μ l 又は 250 μ l キュベット中で

10～50 mU/mL 熱処理プロテイナーゼ、1 mM 基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA、 $\leq$ 15 mM NaCl、0.1 mM Tris-HCl pH 8、10 mM CaCl₂ 及び任意で 1% DMSO をインキュベーションするステップ、

ii) 410 nm ($\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) における吸光度の増加を分光光度計を用いて温度 $\leq$ 40℃で 2 分間測定することによって 4-ニトロアニリンへの前記基質の切断を分析するステップ、ここで、1 単位は 1 分間あたり 1 μ mol の 4-ニトロアニリンを選択された温度で生成する酵素の量と定義される、

iii) ステップ ii) で認められた活性を、熱処理されなかったがその他の点では前記熱処理プロテイナーゼと同じ条件下で維持された同じ量の同じプロテイナーゼで認められた活性と、同じ分析によって比較するステップ

によって測定される、請求項 4 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 4 から 21 のいずれか一項に記載の方法であって、前記試料が、

a) ヌクレアーゼ、DNA 又は RNA ポリメラーゼ、逆転写酵素、DNA 又は RNA リガーゼ、メチラーゼ、トランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、グアニリルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、トランスボザーゼ、キナーゼ、ヘリカーゼ、制限酵素及びグリコシラーゼからなる群から選択される 1 以上の更なる酵素、

b) 1 以上の核酸分子、ここで、前記方法は、前記試料を加熱して前記プロテイナーゼを不活性化する前記ステップに続いて、以下のステップ、すなわち、

i) 前記 1 以上の核酸分子のヌクレアーゼ媒介消化、

ii) 前記 1 以上の核酸分子のリン酸化若しくは脱リン酸化、又は

iii) 前記 1 以上の核酸分子の連結

を、

前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに、含む、

10

20

30

40

50

c) 前記試料は、1以上のRNA分子を含み、前記方法は、前記試料を加熱して前記プロテイナーゼを不活性化する前記ステップに続いて、前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに、逆転写のステップを含む、

d) 1以上のDNA分子、ここで、前記方法は、前記試料を加熱して前記プロテイナーゼを不活性化する前記ステップに続いて、前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに、核酸重合、好ましくは増幅のステップを含む、又は

e) 1以上のウイルス粒子又は細胞、好ましくは細菌細胞、ここで、前記方法は、前記試料を加熱して前記プロテイナーゼを不活性化する前記ステップに続いて、前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに、細胞溶解のステップを含む、

を含む方法。

【請求項23】

i) 請求項1、2及び8から12のいずれか一項に記載の組成物、及び

ii) 第2の酵素を含む第2の組成物、好ましくは、前記第2の酵素は、ヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、DNAリガーゼ、RNAリガーゼ、メチラーゼ、トランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、グアニリルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、トランスボザーゼ、キナーゼ、ヘリカーゼ、制限酵素及びグリコシラーゼからなる群から選択される、

を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、誘導可能な易熱性を有するプロテイナーゼを含む組成物、及び特に核酸の単離における、その使用に関する。

【背景技術】

【0002】

プロテイナーゼ（ペプチダーゼ、プロテアーゼ及びタンパク質分解酵素とも称する）は、タンパク質中のペプチド結合を加水分解することができる。プロテイナーゼは、産業、バイオテクノロジー及び分子生物学研究技術における広範なプロセスに広く使用される。例えば、プロテイナーゼは、核酸精製中の不要なタンパク質の消化、組換え抗体断片の調製、プロテオミクスにおけるペプチド配列決定、及びタンパク質のタンパク質分解消化に使用される。

【0003】

核酸を試料から首尾よく抽出するために、細胞壁／膜の溶解が必要である。様々な物理的又は化学的方法を採用することができ、それらはプロテアーゼの添加によって強化することができる。次いで、洗浄剤若しくは界面活性剤の適用によって、又は低張液中の浸透圧融解によって、膜脂質が除去される。次いで、プロテイナーゼを用いた試料からのタンパク質の除去が最良の手法と考えられる。プロテイナーゼは、試料中に存在する混入、すなわち不要な、タンパク質、ポリペプチド及びペプチドをペプチド結合の加水分解によって消化する。試料中に存在する可能性があり、核酸を分解する可能性があるヌクレアーゼ及び他の酵素もプロテイナーゼは分解する。

【0004】

タンパク質の除去は、増幅反応（例えば、PCR及びRT-PCR）のための核酸試料の調製における核酸精製中に特に重要である。細胞においては、核酸は、一般に、タンパク質に結合して存在する。例えば、真核細胞中のゲノムDNAはヒストンに結合し、それによってクロマチン中へDNAが密にパッケージングされ得る。PCRなどの多数の分子生物学技術は、裸のDNA、すなわちヒストンに結合していないDNAを必要とする。というのは、クロマチン中のDNAの密なパッケージングは、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼなどのDNAと相互作用する酵素が核酸に接近するのを抑制するからである。

【0005】

10

20

30

40

50

核酸精製は、時間、コスト及び試料の損失を伴う多段階プロセスである。試料の損失は、試料中の核酸の開始量が少ないとき、例えば、数百以下の細胞から、例えば細い針で吸引された生検材料又は液体生検材料から単離されたときに特に望ましくない。

【0006】

核酸精製において最も一般的に使用されるタンパク質分解酵素は、プロテイナーゼ K (EC 3. 4. 21. 64) である。この酵素は、真菌 *Engyodontium album* (以前は *Tritirachium album*) の抽出物中で最初に発見された。プロテイナーゼ K は、芳香族、脂肪族又は疎水性アミノ酸残基のカルボキシル側におけるペプチド結合の切断を触媒する非特異的セリンエンドペプチダーゼである。プロテイナーゼ K の広範な特異性のために、試料中の不要なタンパク質の消化においてプロテイナーゼ K は有用となり得る。プロテイナーゼ K は、さらに、試料中に存在する核酸を分解し得るヌクレアーゼを急速に不活性化する。プロテイナーゼ K は、SDS 及び尿素、EDTA などのキレート剤、スルフヒドリル試薬、トリプシン阻害剤及びキモトリプシン阻害剤など、他のタンパク質を変性させる DNA 抽出プロセスに使用される化学物質の存在下で活性である。プロテイナーゼ K は、50~65℃の範囲、一般に約 55℃で最適活性を有する。

10

【0007】

プロテイナーゼ K が試料の精製に使用されるときには、下流のタンパク質／酵素、例えば、ポリメラーゼ及び逆転写酵素の添加の前にプロテイナーゼ K を不活性化又は除去する必要がある。こうした不活性化又は除去なしでは、プロテイナーゼは、その非特異的活性のために下流のタンパク質／酵素を分解する。

20

【0008】

プロテイナーゼ K は、例えばフェノール抽出又は CsCl 等密度超遠心によって、試料から除去することができる。あるいは、試料量を増加させ、それによってその中のプロテイナーゼ K 活性を弱めることができる。しかし、酵素を試料から物理的に除去する行為は、混入のリスク及び所望の生成物を失うリスクがある。希釈は、ほとんどの場合には理想的でなく、特に試料サイズが小さいときにはそうである。

【0009】

プロテイナーゼ K の不活性化の手順は様々であるが、一般には高温への加熱を含む。しかし、多くの場合において、プロテイナーゼを不活性化するのに必要な熱は、試料中の 1 以上の所望の生成物の分解をもたらす。プロテイナーゼ K の不活性化の手順は、時には試薬と組み合わせて、75℃への 5 分間の加熱 (BioRad 手順)、95℃への 10 分間の加熱 (New England Biolabs 手順)、70℃への 15 分間の加熱 (Qiagen 手順) を含む。こうした高温の使用は、目的の試料には比較的苛酷である。

30

【0010】

したがって、特に核酸精製手順中に、試料から所望の材料を失わずにワークフローを短縮することができ、過酷なプロテイナーゼ不活性化条件を伴わない、別のタンパク質分解法が必要とされている。

【0011】

プロテイナーゼ X (「セラチアペプチダーゼ」及び「SPRK」とも称する) は、セラチア種から単離されたプロテイナーゼ K 様プロテイナーゼである。プロテイナーゼ X の研究 (非特許文献 1) は、それが、プロテイナーゼ K のように、高い熱安定性を有することを確認し、更に、プロテイナーゼ X が実際にプロテイナーゼ K (55℃) より高い最適温度 (70℃) を有することも確認した。Larsen らは、プロテイナーゼ X が 50℃で 30 分間加熱後に十分な酵素活性を保持し、様々な濃度の SDS (試料からの核酸の単離に一般に使用される界面活性剤) の存在下で 50℃に加熱後にプロテイナーゼ K よりもはるかに高い活性を保持することを示した。Larsen らの教示によれば、プロテイナーゼ X は、低温適応生物から単離された酵素の典型的な易熱性の特徴を示さない。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

50

【0012】

【非特許文献1】Larsen et al., (2006) FEBS Journal 273: 47-60

【発明の概要】

【発明の効果】

【0013】

本発明者らは、驚くべきことに、プロテイナーゼXの易熱性が、遊離カルシウムイオン濃度の低い組成物中にプロテイナーゼが存在するときに誘導されることを初めて明らかにした。本発明者らは、プロテイナーゼに結合し、その安定性及び構造に寄与し得るカルシウムイオンを、例えばEDTAを用いて、除去する必要がないことを確認した。それどころか、組成物中の遊離カルシウムイオン濃度の単なる欠如又は低さは、驚くべきことに、プロテイナーゼXの易熱性を誘導するのに十分である。本発明者らは、驚くべきことに、プロテイナーゼXの易熱性が、特定の一個塩濃度を有する組成物中にプロテイナーゼが存在するときに誘導されることも初めて明らかにした。

10

【0014】

こうした誘導可能な易熱性は予想外であり、分子生物学用途に使用される標準プロテイナーゼであるプロテイナーゼKでは認められない。本発明者らの知見によって、広範な分子生物学用途において誘導可能な易熱性を有するプロテイナーゼXの有利な使用が可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

ここで、本発明を以下の図面を参照して非限定的実施例によって説明する。

【0016】

【図1】様々な温度におけるプロテイナーゼX及びKのプロテイナーゼ活性を示す図である。活性は、標準分析条件下で10 mM遊離カルシウムを用いて65℃で認められた最大活性に対する%活性として示される。

【図2】分析緩衝液中の0 μ M、5 μ M又は10 mM遊離カルシウムを用いた様々な温度におけるプロテイナーゼXの活性を示す図である。結果は、各温度における、10 mM遊離カルシウムである標準分析条件に対する相対(%)を示す。

【図3】分析緩衝液中の0 μ M、5 μ M又は10 mM遊離カルシウムを用いた様々な温度におけるプロテイナーゼKの活性を示す図である。結果は、各温度における、10 mM遊離カルシウムである標準分析条件に対する相対(%)を示す。

30

【図4】様々な遊離カルシウム濃度の存在下で60℃で15及び30分間加熱後のプロテイナーゼXの不活性化の程度を示す図である。活性は、対照(氷上で維持、加熱ステップなし)に対する、%残存活性として示される。

【図5】様々な遊離カルシウム濃度の存在下で60℃で15及び30分間加熱後のプロテイナーゼKの不活性化の程度を示す図である。活性は、対照(氷上で維持、加熱ステップなし)に対する、%残存活性として示される。

【図6】様々な遊離カルシウム濃度の存在下で60℃で15及び30分間加熱後のプロテイナーゼX及びプロテイナーゼKの不活性化の程度を示す図である。活性は、熱処理なしで氷上で維持された(10 mM CaCl_2 を含む)同じ緩衝液中の同じプロテイナーゼで認められた最大活性に対する%活性として示される。

40

【図7】プロテイナーゼX及びプロテイナーゼKの易熱性プロファイルに対するNaCl濃度の効果を示す図である。遊離カルシウムの非存在下及び50 mM又は300 mM NaClの存在下で指示温度における30分間のインキュベーション。活性は、熱処理なしで氷上で維持された(10 mM CaCl_2 を含む)同じ緩衝液中の同じプロテイナーゼで認められた最大活性に対する%活性として示される。

【図8】様々な濃度のNaClの存在下で50及び60℃におけるプロテイナーゼXの不活性化を示す図である。活性は、熱処理なしで氷上で維持された(0 M NaCl、0.03 mM CaCl_2 を含む)同じ緩衝液中のプロテイナーゼXで認められた最大活性に

50

対する%活性として示される。

【図9】様々な濃度のNaClの存在下で60℃におけるプロテイナーゼXの不活性化を示す図である。活性は、熱処理なしで氷上で維持された(0M NaCl、30μM CaCl₂を含む)同じ緩衝液中のプロテイナーゼXで認められた最大活性に対する%活性として示される。

【発明を実施するための形態】

【0017】

したがって、一態様においては、本発明は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む組成物を提供する。前記プロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、

i) 前記組成物中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80μMである、又は

ii) 前記組成物中の一価塩濃度が $\geq$ 約20mMである。

【0018】

好ましくは、前記組成物中の遊離カルシウム濃度は $\leq$ 約80μMであり、前記組成物中の一価塩濃度は $\geq$ 約20mMである。

【0019】

本発明は、配列番号1の配列を含むプロテイナーゼ、及び配列番号1と少なくとも約70%同一である配列を含むプロテイナーゼに関する。配列番号1と少なくとも約70%同一である配列を含むプロテイナーゼを「配列番号1の変異体」、「変異プロテイナーゼ」又は単に「変異体」と本明細書では称する。定義上、本発明の配列番号1の変異体も本発明に係るプロテイナーゼであり、すなわちそれらはプロテイナーゼ活性を有する。本発明のプロテイナーゼという本明細書の表記は、配列番号1のプロテイナーゼ及び本明細書に記載の本発明の変異体を表す。本明細書のどこでもプロテイナーゼ(又は変異プロテイナーゼ)という表記は、別段の記載がない限り、酵素的に活性なその断片も表す。

【0020】

好ましくは、組成物は、溶液、好ましくは水溶液である。本明細書では「溶液」という用語は、1以上の副成分(溶質)が主成分(溶媒)内に均一に分布した液体混合物を意味する。一般に、溶液の副成分(溶質)は、主成分(溶媒)に可溶である。しかし、本明細書では「溶液」という用語は、副成分(溶質)が主成分(溶媒)に可溶でない混合物も含む。すなわち、本明細書では「溶液」という用語は、主成分が液相であり、副成分が液相に不溶である粒子を含む混合物、すなわち分散物も包含する。好ましくは、主成分、すなわち溶媒、すなわち液相は、水である。好ましくは、溶液は水を含む。本発明の溶液は、少なくとも本発明のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を副成分として含む。

【0021】

好ましい一実施形態においては、本発明の溶液は、1以上のポリペプチドを含む試料に適用される試薬である。こうした試薬は、前記試薬中のプロテイナーゼが試料中に存在する前記1以上のポリペプチドを消化するために試料に適用される。好ましくは、試料は、複数のポリペプチドを含む。この実施形態においては、溶液は、好ましくは、本発明のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含み、更なる酵素を含まない。

【0022】

好ましくは、組成物は緩衝剤も含む。適切な緩衝剤は当該技術分野でよく知られており、任意のこうした緩衝剤を使用することができる。適切な緩衝剤及びそれらの意図された目的でその含まれる範囲を確認することは当業者の能力の範囲内であろう。好ましくは、緩衝剤は、緩衝範囲がpH6.5~9.5、好ましくはpH6.8~9.2、より好ましくはpH7~9、より好ましくはpH7.5~8.5、より好ましくは約pH8である。好ましくは、緩衝剤はTris又はHEPESである。好ましくは、緩衝剤は、1~250mM、より好ましくは10~200mM、より好ましくは20~150mM、より好ましくは25~100mMの濃度で組成物中に存在する。

【0023】

存在する場合、好ましくは、Tris-HClは、25~200mM、より好ましくは

10

20

30

40

50

50～150 mM、より好ましくは約100 mMの濃度で存在する。存在する場合、好ましくは、HEPESは、5～50 mM、より好ましくは10～40 mM、より好ましくは20～30 mM、より好ましくは約25 mMの濃度で存在する。

【0024】

好ましくは、本発明の組成物及び試料は、pHが6.5～9.5、好ましくは6.8～9.2、より好ましくは7～9、より好ましくは7.5～8.5、より好ましくは約8.0である。

【0025】

本発明の組成物及び試料は、更にDMSOを含むことができる。存在する場合、好ましくは、DMSOは、0.1～5% w/w、より好ましくは0.5～2.5% DMSO、より好ましくは約1% DMSOの濃度で存在する。

10

【0026】

「試料」という用語は、本発明のプロテイナーゼ以外の1以上のポリペプチドを含む任意の組成物を指す。

【0027】

更なる一態様においては、本発明は、1以上のポリペプチド及びプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む試料を提供する。前記プロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである。

20

【0028】

好ましくは、前記試料中の遊離カルシウム濃度は $\leq$ 約80 μ Mであり、前記試料中の一価塩濃度は $\geq$ 約20 mMである。

【0029】

本明細書に記載のプロテイナーゼ又は酵素的に活性な断片を含まない試料は、本発明の態様ではない。「本発明の試料」という本明細書の表記は、本明細書に記載のプロテイナーゼ又は酵素的に活性な断片を本当に含む試料のみを表す。

【0030】

「試料」の好ましい任意選択の特徴及び実施形態の以下の考察は、本発明の試料と、本発明の一部ではないが、本発明の一組成物を適用することができる試料である試料の両方に当てはまる。

30

【0031】

本発明のプロテイナーゼは、混入、すなわち不要な、ポリペプチドを含む試料からの目的の生体分子の精製、すなわち単離、すなわち抽出の方法に有用である。したがって、好ましい一実施形態においては、試料は、1以上の混入ポリペプチド及び1以上の目的の生体分子を含む。本明細書では「混入ポリペプチド」という用語は、「不要なポリペプチド」と同義であり、本発明のプロテイナーゼ及び目的の任意のポリペプチド以外の試料中の任意のポリペプチドを指す。すなわち、混入ポリペプチドは、1以上の目的の生体分子を精製又は修飾するために、本発明のプロテイナーゼによって消化されるものである。

【0032】

本発明のプロテイナーゼは、目的の生体分子を、1以上のペプチド結合を介してそれに結合した分子、好ましくはポリペプチドから、前記ペプチド結合の1以上を加水分解することによって遊離させる方法にも有用である。したがって、好ましい一実施形態においては、試料は、1以上のペプチド結合を介して、分子、好ましくはポリペプチドに結合した目的の生体分子を含む。1以上のペプチド結合は、本発明のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片によって切断することができる。

40

【0033】

本明細書では「目的の生体分子」という用語は、1以上の混入ポリペプチドも含む試料中の任意の生体分子を指し、前記試料からの前記生体分子の精製が望まれ、又は1以上のペプチド結合を介してそれに結合した分子からの前記生体分子の遊離が望まれる。好まし

50

くは、目的の生体分子は、核酸分子、好ましくはDNA又はRNA分子である。あるいは、目的の生体分子は、それ自体がポリペプチドである。目的の生体分子は、本発明に有用であるプロテイナーゼでも酵素的に活性なその断片でもない。

【0034】

好ましくは、試料は細胞性物質を含む。好ましくは、試料はクルードな細胞抽出物を含む。好ましくは、試料は部分精製細胞抽出物を含む。好ましくは、試料は細胞集団を含む。前記試料中の細胞は、インタクトでも溶解されていてもよく、好ましくは溶解されていてもよい。好ましくは、試料は、組織試料又は1以上の体液を含む。好ましくは、試料は細針生検材料である。好ましくは、試料は封入ウイルスを含む。プロテイナーゼは、ウイルスのタンパク質カプセル中のRNA/DNAを遊離させて同定、定量化及び／又は増幅するために、該タンパク質カプセルの消化に使用することができる。

10

【0035】

好ましくは、本発明の試料は体積が $\geq 10 \mu\text{l}$ である。好ましくは、本発明の試料は体積が $\leq 1000 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 500 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 300 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 250 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 200 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 150 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 100 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 75 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 50 \mu\text{l}$ である。あるいは、試料はマイクロ流体試料である。好ましくは、本発明のマイクロ流体試料は体積が $\geq 0.01 \mu\text{l}$ である。好ましくは、本発明のマイクロ流体試料は体積が $\leq 10 \mu\text{l}$ 、好ましくは $\leq 5 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 1 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.5 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.1 \mu\text{l}$ である。

20

【0036】

本明細書では「ポリペプチド」という用語は、本発明のプロテイナーゼによって加水分解され得る、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、オリゴペプチド及びトリペプチド、すなわち、ペプチド結合を介して連結された3以上のアミノ酸を含む任意の分子を指す。プロテイナーゼXは、3アミノ酸長と短いペプチドを加水分解することが知られている。「タンパク質」、「ポリペプチド」及び「ペプチド」という用語は、本明細書では区別なく使用され、各々の使用は、タンパク質、ポリペプチド及びペプチドのいずれでもすべてを指すことが明確に意図される。したがって、本明細書に記載の試料中に存在するポリペプチドは、本発明のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の基質である。プロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片は、それ自体がポリペプチドであることは明白である。しかし、本明細書では「ポリペプチド」という用語は、本発明に有用であるプロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片を明確に除外する。

30

【0037】

「消化する」、「加水分解する」、「分解する」及び「切断する」という用語は、本明細書では区別なく使用され、試料中のポリペプチド内のペプチド結合の加水分解を指す。消化は、部分消化でも完全消化でもよい。本発明に有用であるプロテイナーゼは、非特異的であり、十分な時間が与えられると、酵素機能を可能にする条件下で試料中のタンパク質を完全に消化する。

【0038】

本発明の組成物及び試料は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含み、前記プロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含む。

40

【0039】

配列番号1のアミノ酸配列は、以下のとおりである。

ADQPSPTWIGIDRIDQRNLPLDNNYHTDYDGSQVTAFFVIDTGVLNTHNEFGGRASSGYDFIDNDYDATDCNGHGHVAG
TIGGSTYGVAKNVNVVGVRLNCSGSGSNSGVIAGINWVKNNASGPAVANMSLGGASQATDDAVNAAVAAGITFVVAAG
NDNSNACNYSARAADAITVGSTTSNDSRSSFSNYGTCLDIYAPGSSITSSWYTSNSATNTISGTSMAVPHVAGVAAALYL
DENPNLSPAQVTNLLKTRATADKVTDAKTGSPNKLFLSLANDD

【0040】

配列番号1のプロテイナーゼは、Larsen et al., (2006) FEBS

50

Journal 273:47-60に記載のように、ノルウェーの北部で単離された海洋セラチア種に由来するプロテイナーゼXのアミノ酸配列に基づく。プロテイナーゼXは、プロテイナーゼK様プロテイナーゼ[E. C. 3. 4. 21]である。「プロテイナーゼX」、「プロテアーゼX」、「Prot X」、「PRX」、「ペプチダーゼX」、「セラチアペプチダーゼ」及び「SPRK」という用語は、本明細書では区別なく使用される。好ましくは、本発明のプロテイナーゼは、*Serratia proteamaculans*に由来する。プロテイナーゼXは、セリンペプチダーゼである。

【0041】

プロテイナーゼXをコードする遺伝子は、1890の塩基対（配列番号2）を有し、629のアミノ酸（65.5 kDa、配列番号3）の前駆体タンパク質をコードする。

10

【0042】

配列番号2：

atgcataagaaacatttaatagcagtcgcagtcgcaacgggacttgcttacttccctgttaacgctaataacacaa
gcgactatggtaaatgtcccacaatctaaagccatcaaagatacttacatcggttgattcaataccccaagtgttcttaa
tctaagtaataacaacaccatagctgaattcgcggttcaacaagccgagagtttagtcaatcaatatgatgtcagagtga
tgaanaactttggcaatgtgctcaacgggtgtactcatcaatgccagtgcccaacaagttaaagcactgcttaaagatcca
aacgtgaagtacgtagaacaagatcaagtgtatgtcagtaacgcccatgatggaagccaatgcggaccaaccgagtcggac
ctggggcatagacagaatcgatcaacgcaacttgccattggataacaactaccacacggattacgatggatctgggtgtga
ccgctttgttattgatactgggggtgcttaatacacacaatgagtttggcgccgcgcaagcagtggttatgactttatc
gataatgattacgatgcgactgactgtaacgggtcatggtacccatgtggcggggacgattggcggtcaacctacgggtgt
cgcgaaaaacgtcaatgtgggtggcggtcagagtgcttaactgttcagggttctggcagtaactctggcgtgattgcaggga
taaactgggtgaaaaacaatgcttctggccccgctgtcggaacatgagtttagggggcggcgcctcccaagccacggat
gatgccgtcaatgccgctgttgccgcagggatcaccttcgtcgtcgcagccggcaatgacaatagtaatgcctgtaatta
ttcacctgctcggtccgcagatgccatcactgtcggttcaaccaccagtaacgattcccgtcgagtttttctaactacg
ggacttgccttgatatctatgcgccccggttcgagcataacttcctcttggtataacctcaaattcggcgactaataccatt
agtggcacctcaatggcttcccccatgtggcaggcgctcgcgccattatacttagatgaaaatcctaacctctccccgc
acaggtgactaaacttactcaagacgcgcgccactgcggacaaagtacagatgctaagacaggctcacccaataagttac
tgttttacttgcaaacgatgatggaggctgtggcaacgattgccagttgacgagactcagctgcaaaaataatgtgggt
attgcgatcagtgaggccacaggttcagcgacttattactatatcgatgtccccgcaaatgcagcaagtttaggcacaa
cctcgcggggggctctggcgatgcggatatattatgtgagccaaggacaaaaaccgactacgaccagctatcaatgccgcc
cataatcaaaaatggcaacaatgagagctgtaatttactgcacctacggcggtcggttggtacgtgatggttcaaggctat
agcaattatgccaacgccagctgacagctagctacaacctcaatggcgcggaatgtaccgatgcgaactgcttaag
caatggcggtacccgtcacgaatttaagcggcagaacgggaactgaagccctgtataaaatcgctcgctccctgcgaatagcc
aactcagtatattaccaccagtgggcggtggtgacgtggatctgtatgtcaaagcagggactgtcccaacgaccaccagc
tatgattgtcgtccctataaaaacggtaacaatgaaagctgttcaatcacctgactcaagcgggaacttaccatgtgat
gttacgtggttatgctaattactcgagcgttcagctgagtgcaagctactag

20

30

【0043】

配列番号3：

MHKKHLIAVAVATGLAYFPVNAHEYQATMVNVPQSKAIKDTYIVVFNTPSVLNLSNNNTIAEFAVQQAESLVNQYDVR
VMKNFGNVLNGLINASAQQVKALLKDPNVKYVEQDQVMSVTPMMEANADQPSPTWIDRIDQRNLPDNNYHTDYDGS
VTAFFVIDTGVLNTHNEFGGRASSGYDFIDNDYDATDCNGHGTHVAGTIGGSTYGVAKNVNVVGVRLNCSGSGSNSGVIA
GINVWKNNASGPVAVNMSLGGASQATDDAVNAVAAGITFVVAAGNDNSNACNYSAPARAADAITVGSTTSNDSRSSFSN
YGTCLDIYAPGSSITSSWYTSNSATNTISGTSMASPHVAGVAALYLDENPNLSPAQVTNLLKTRATADKVTDAKTGSPNK
LLFSLANDDDGGCGNDPVDLQNNVGIAISGATGSATYIIYIDVPANAASLGINLAGGSGDADIYVSQGQKPTTTSYQC
RPYQNGNNECNFTAPTAGRWYVMVQGYSNYANAQLTASYNLNGGNCCTDANCLSNVGPVTNLSGRTGTEALYKIVVPAN
SQLSITTSGGTGDVDLYVKAGTVPTTTSYDCRPYKNGNNECSITVTQAGTYHVMRLGYANYSSVQLSASY

40

【0044】

配列番号3のプロテイナーゼは、126残基のN末端プレプロ配列、278残基の触媒ドメイン、及び合わせて225残基からなる2つのC末端ドメイン（反復配列）からなる。

50

【0045】

前記酵素は、以下の配列番号4の配列を有する385アミノ酸、約40.2kDaの活性ペプチダーゼとして *Pichia pastoris* 中で組換え発現される。

NEYQATMVNPQSKAIKDTYIVVFNTPSVLNLSNNNTIAEFAVQQAESLVNQYDVRVMKNFNGVNLNGVLINASAQQVK
ALLKDPNVKYVEQDQVMSVTPMMEANADQPSPTWIGIDRIDQRNLPLDNNYHTDYDGSQVTAFFVIDTGVLNTHNEFGGRAS
SGYDFIDNDYDATDCNGHGHVAGTIGGSTYGVAKNVNVVGVRLNCSGSGSNSGVIAGINWVKNNASGPAVANMSLGGG
ASQATDDAVNAAVAAGITFVVAAGNDNSNACNYSARAADAITVGSTTSNDSRSSFSNYGTCLDIYAPGSSITSSWYTSN
SATNTISGTSMA SPHVAGVAALYLDENPNLSPAQVTNLLKTRATADKVTDAKTGSPNKLLFSLANDD

【0046】

配列番号4の発現プロテイナーゼは、第1のC末端ドメインの最初の3残基以外の両方のC末端ドメインを除外し、配列番号3のN末端プレプロドメインの最初の22残基を除外する。この形のタンパク質は精製することができる。

10

【0047】

大腸菌でのプロテイナーゼXの組換え発現は、Larsen et al., (2006) *FEBS Journal* 273:47-60に記載されている。

【0048】

発現に続いて、前記酵素は、自己分解によって成熟した、約34kDa、281残基の成熟タンパク質に転化される。該タンパク質は、触媒ドメイン及び3つのC末端アミノ酸残基を含み、十分な触媒活性を保持する（配列番号1）。

【0049】

20

配列番号4の残基1~104は、配列番号3の残基23~126に対応する。配列番号1の残基1~281は、配列番号4の残基105~385に対応し、配列番号3の残基127~407に対応する。

【0050】

したがって、本発明の各々及びすべての態様及び実施形態においては、プロテイナーゼは、配列番号1、配列番号3又は配列番号4、好ましくは配列番号1のアミノ酸配列を含むことができる。配列番号3及び4は、配列番号1のプロテイナーゼの前駆体／未熟型である。当業者は、配列番号3又は4のプロテイナーゼの使用又は存在が、更なる自己分解プロセッシングのために、配列番号1のプロテイナーゼの使用又は存在をもたらすことを理解されたい。簡略のため、本明細書のどこでも配列番号1という表記は、配列番号3及び／又は配列番号4も表すことが明確に意図される。

30

【0051】

本発明の組成物及び試料は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含み、前記プロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0052】

「少なくとも約70%」とは、配列相同性が少なくとも69%、69.5%又は69.9%であり得ることを意味する。

【0053】

好ましい実施形態においては、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1と少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%又は少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、85%、90%又は95%、例えば、少なくとも98%、99%又は99.5%同一であるアミノ酸配列を含む、又はからなる。

40

【0054】

本発明に係る配列相同性割合は、広く利用可能なアルゴリズムのいずれかによって、例えば、ClustalW2 Multiple Sequence Alignment プログラム (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2>) を用い、初期設定パラメータ (DNA Gap Open Penalty=15.0; DNA Gap Extension Penalty=6.66; DNA Matrix=Identity; Protein Gap Open Penalty=1

50

0.0; Protein Gap Extension Penalty=0.2; Protein matrix=Gonnet; Protein/DNA ENDGAP=-1; Protein/DNA GAPDIST=4)を用いて計算することができる。

【0055】

相同性割合は、好ましくは、上記配列番号1と変異体配列の整列後に配列番号1のN末端Ala残基(残基1)とC末端Asp残基(残基281)の間で決定される。

【0056】

配列番号1の変異体は、前記配列番号の1以上のアミノ酸が保存的置換を受けた、又は前記1以上のアミノ酸の修飾バージョン若しくは天然ではないアミノ酸、例えば、前記1以上のアミノ酸のD異性体で置換された、アミノ酸配列を含む。好ましくは、こうした置換及び修飾は、本発明のエキソヌクレアーゼの修飾体が未修飾体と同じ酵素及び不活性化特性を有する点でサイレントな置換及び修飾である。

【0057】

一部の実施形態においては、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1と比較して単一又は複数のアミノ酸変化(付加、置換、挿入又は欠失)を有するアミノ酸配列を含む(又はからなる)。こうした配列は、好ましくは、最大10、例えば、1、2、4、4、5、6、7、8、9又は10のみ、好ましくは最大5、例えば、1、2、3、4又は5のみ、好ましくは1、2又は3、より好ましくは1又は2の改変されたアミノ酸を含むことができる。好ましくは、改変の数は、上記配列番号1と変異体配列の整列後に配列番号1のN末端Ala残基(残基1)とC末端Asp残基(残基281)の間で決定される。

【0058】

好ましくは、改変は、本発明の改変されたプロテイナーゼが不変型と同じ酵素及び不活性化特性を有する点でサイレントな改変である。置換は、保存又は非保存アミノ酸によるものとすることができる。好ましくは、前記改変は保存的アミノ酸置換である。前記改変は、配列番号1の1以上のアミノ酸の修飾バージョンによる置換、又は天然ではないアミノ酸、例えば、アミノ酸のD異性体による置換とすることができる。

【0059】

配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むプロテイナーゼは、冷水ニッチで見られる原核生物から得ることができる。「原核生物」とは、細胞核のない任意の生物、すなわち、細菌及び古細菌の領域由来の任意の生物を意味する。好ましくは、前記生物は細菌である。好ましくは、前記生物は、真核生物、例えば、分類学的な動物界、植物界、真菌界又は原生生物界に分類される生物ではない。より好ましくは、前記生物は、シュワネラ属、ハロモナス属、ビブリオ属、シクロモナス属、モリテラ属及びセラチア属、好ましくはセラチア属から選択される。

【0060】

一部の実施形態においては、本発明の組成物及び試料は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含み、前記プロテイナーゼは、配列番号3若しくは4のアミノ酸配列又は配列番号3若しくは4と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含む。配列番号1に言及した本明細書の別の所の部分は、必要な変更を加えて配列番号3及び配列番号4にも当てはまる。

【0061】

好ましくは、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1、3若しくは4のアミノ酸配列からなる、又は配列番号1、3若しくは4と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列からなる。

【0062】

好ましくは、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1、3又は4のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態においては、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1、3又は4のアミノ酸配列からなる。

【0063】

好ましくは、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列からなる、又は配

10

20

30

40

50

列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列からなる。

【0064】

好ましくは、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態においては、本発明のプロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列からなる。

【0065】

本発明のプロテイナーゼは、配列番号1又は配列番号4の配列の更なるアミノ酸N末端又はC末端を含むことができる。好ましくは、こうした更なるアミノ酸は、配列番号3の629アミノ酸配列内の配列番号1の配列のN又はC末端に見られるそれぞれの位置のアミノ酸と同一である。好ましくは、プロテイナーゼは、配列番号1又は配列番号4の配列の1～50、より好ましくは1～40、より好ましくは1～30、より好ましくは1～20、より好ましくは1～10、すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のアミノ酸N末端及び／又はC末端を含み、好ましくは、前記N及び／又はC末端アミノ酸は、配列番号3の配列内の配列番号1又は配列番号4の配列のN及び／又はC末端に見られるそれぞれのアミノ酸と同一である。

【0066】

本発明の溶液又は試料中に存在するプロテイナーゼは、修飾体、例えば、それらが直接的に又はペプチドリinker配列を介して間接的に、N末端及び／又はC末端において更なるペプチドに結合した融合タンパク質の形とすることができる。好ましくは、追加のN末端ペプチドは、及びリinker配列が存在する場合は合わせて、配列1～50、より好ましくは1～40、より好ましくは1～30、より好ましくは1～20、より好ましくは1～10、すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10アミノ酸長を含む。好ましくは、追加のC末端ペプチドは、及びリinker配列が存在する場合は合わせて、配列1～50、より好ましくは1～40、より好ましくは1～30、より好ましくは1～20、より好ましくは1～10、すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10アミノ酸長を含む。

【0067】

したがって、一実施形態においては、本発明は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む組成物を提供する。前記プロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、

i) 前記組成物中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、又は

ii) 前記組成物中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMであり、

前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片は、更に、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列のN末端である更なるペプチド配列及び／又はC末端である更なるペプチド配列を含む。

【0068】

更なる1又は複数のペプチド配列は、プロテイナーゼの分泌、単離、可溶化及び／又は精製若しくは同定のプロセス、又はプロテイナーゼを固体支持体につなぎ留めるのに有用であり得る。適切なペプチド配列は当該技術分野でよく知られており、任意のこうした配列を使用することができる。適切なN及びC末端配列としては、例えば、好ましくは1～20、より好ましくは5～15、より好ましくは6、7、8、9、10、11又は12のヒスチジン残基、最も好ましくは6又は12のヒスチジン残基を含む、ヒスチジントグが挙げられる。

【0069】

したがって、本発明のプロテイナーゼは、修飾プロテイナーゼとすることができる。更なる修飾としては、ポリペプチドの利用可能な原子への小さい化学基、例えば、N及びC末端又はポリペプチド内の非必須アミノ酸残基のR基への保護基の導入が挙げられる。別の実施形態においては、本発明のプロテイナーゼは、固体支持体、例えば、粒子、ペレット、ビーズ、シート、ゲル、フィルター、メンブレン、繊維、キャピラリー、チップ、マイクロタイターストリップ、スライド、チューブ、プレート、ウェルなどから選択される固体支持体上に固定化して提供することができる。好ましくは、支持体は磁性（好ましく

は常磁性又は超常磁性)であり、例えば、磁性粒子、例えば、磁気ビーズ及びペレットである。更なる修飾体としては、発明のプロテイナーゼの二量体又は三量体が挙げられる。こうした実体は、それらのモノマー組成が均一でも不均一でもよい。

【0070】

好ましくは、こうした修飾は、本発明のプロテイナーゼの修飾体が未修飾体と同じ酵素特性及び不活性化特性を有する点でサイレントな修飾である。

【0071】

本発明のプロテイナーゼ及び変異プロテイナーゼの酵素的に活性な断片も提供される。酵素的に活性な断片は、プロテイナーゼ活性を有する断片である。酵素的に活性な断片は、配列番号1の配列の少なくとも225、好ましくは少なくとも235、好ましくは少なくとも250、より好ましくは少なくとも260、少なくとも270、少なくとも271、272、273又は274、より好ましくは少なくとも275、276、277、278、279又は280のアミノ酸を含むことができる。

10

【0072】

好ましくは、本発明の酵素的に活性な断片は、配列番号1の配列の5以下のアミノ酸、好ましくは4、3、2又は1以下のアミノ酸のN末端ランケーションを含む。その代わりに、又はそれに加えて、本発明の酵素的に活性な断片は、好ましくは、配列番号1の配列の30以下のアミノ酸、好ましくは29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1以下のアミノ酸のC末端ランケーションを含む。

20

【0073】

別の見方をすれば、本発明の酵素断片の長さは、好ましくは、配列番号1の長さ又は配列番号1と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列の長さの少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%である。

【0074】

本発明の酵素断片は、それ自体、配列番号1の対応する部分と好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%若しくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95% (例えば、少なくとも98%、99%又は99.5%)、又は100%同一である。相同性割合を決定する方法については上記した。

30

【0075】

本願を通して、本発明のプロテイナーゼという表記は、別段の記載がない限り、酵素的に活性なその断片も表す。

【0076】

プロテイナーゼ(ペプチダーゼ又はプロテアーゼとも称する)は、タンパク質分解、すなわちペプチド結合の加水分解によってタンパク質異化を行う酵素である。したがって、本発明に係るプロテイナーゼは、プロテイナーゼ活性、すなわちプロテアーゼ活性、すなわちペプチダーゼ活性を有する酵素である。本発明の変異体及び酵素的に活性な断片もプロテイナーゼ活性を有する。

【0077】

配列番号1の変異体又は修飾体である本発明のプロテイナーゼは、配列番号1のプロテイナーゼのプロテイナーゼ活性の少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは少なくとも100%を示す。

40

【0078】

本発明の酵素的に活性な断片は、配列番号1のプロテイナーゼのプロテイナーゼ活性の少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは少なくとも100%を示す。

【0079】

50

プロテイナーゼ活性を分析する適切な分析は当該技術分野で知られており、任意のこうした分析を特定のポリペプチドのプロテイナーゼ活性の測定に使用することができる。したがって、こうした分析を用いて、本発明のプロテイナーゼ、変異プロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片のプロテイナーゼ活性を測定することができる。

【0080】

好ましい分析は、分光光度計で検出可能な生成物への基質の酵素切断、好ましくは、 410 nm ($\epsilon = 8800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) における吸光度の増加を測定することによって分析することができる4-ニトロアニリンへの $\text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$ の切断の分析を含む。こうした吸光度を生じ、検出するのに適切な基質及び装置を特定することは当業者の能力の範囲内である。好ましくは、吸光度は、分光光度計又はマイクロプレートリーダーを用いて検出される。多数の分光光度計が、体積 $1000\text{ }\mu\text{ l}$ のキュベットを利用する。多数のマイクロプレートリーダーが体積 $250\text{ }\mu\text{ l}$ のウェルを利用する。

10

【0081】

当業者は、それらの目的に適切なインキュベーション温度及び分析時間も容易に決定することができる。当業者は、分析を行う温度を本発明のプロテイナーゼの不活性化をもたらさない温度、例えば、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 未満、好ましくは $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ とすべきであることを知っているであろう。適切な分析時間は、 $30\text{ 秒}\sim 5\text{ 分間}$ 、例えば、 2 分間 とすることができる。

【0082】

当業者は、分析に含まれる酵素の適切な濃度が、使用する分光光度計の検出範囲に依存することも知っているであろう。当業者は、当該分光光度計で検出することができる濃度、及び分析試料内の酵素活性レベルにするために、希釈ステップが分析を行う前に必要になり得ることを知っているであろう。 $10\sim 50\text{ mU/mL}$ 、好ましくは $13\sim 26\text{ mU/mL}$ の活性を使用することができ、これは、本実施例に使用される配列番号1のプロテイナーゼXの場合、 $0.2\sim 0.4\text{ }\mu\text{ g/mL}$ に等しい。

20

【0083】

当業者は、分析混合物の残りをそれらの意図された目的で容易に処方することができるであろう。分析混合物は、本明細書の別の所で記述する pH 緩衝剤、好ましくは Tris-HCl 、 $\text{pH } 8$ を含むことができる。

【0084】

分析混合物は、好ましくは、プロテイナーゼを更に不活性化し得る低カルシウム条件が回避されるように過剰のカルシウムを含む（例えば、 $\geq 2\text{ mM}$ 、好ましくは約 10 mM ）。 NaCl は、塩によって誘導されるプロテイナーゼの易熱性が誘導されないように、低濃度で存在し得る（例えば、 $\leq 15\text{ mM}$ ）。また、当業者は、必要に応じて、成分の必要濃度を供給するために、溶液を容易に希釈することができる。

30

【0085】

別の成分、例えば、 DMSO を所望のとおり反応混合物に添加することができ、又は別の成分、例えば、 DMSO がワークフローのより早い段階で添加されたために存在することができ、活性分析に許容することができる。

【0086】

プロテイナーゼ活性を測定する好ましい分析は、（本明細書の実施例に使用される）分析Aである。分析Aは、 $1000\text{ }\mu\text{ l}$ 又は $250\text{ }\mu\text{ l}$ キュベット中で

40

13 又は 26 mU/mL プロテイナーゼ（本実施例に使用される配列番号1のプロテイナーゼX 0.2 又は $0.4\text{ }\mu\text{ g}$ に相当）

1 mM 基質 $\text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$

$\leq 15\text{ mM}$ NaCl （例えば、 12 mM NaCl 又は 4 mM NaCl ）

0.1 mM Tris-HCl $\text{pH } 8$ 、

10 mM CaCl_2 、及び

1% DMSO （任意）

をインキュベーションすること、及び

50

410nm ($\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) における吸光度の増加を分光光度計 (例えば、Ultrospec 2000、Pharmacia Biotec、Sweden) を用いて 25℃又は 37℃で 2 分間測定することによって 4-ニトロアニリンへの基質の切断を分析することを含む。1 単位は、温度 40℃未満、好ましくは 25℃又は 37℃で 1 分間あたり 1 μmol の 4-ニトロアニリンを生成する酵素の量と定義される。

【0087】

プロテイナーゼ活性を測定するために、当業者は別法を直接考え出すことができる。

【0088】

任意の適切な分析を使用して、本発明のプロテイナーゼの酵素的に活性な断片、変異体又は修飾体の相対活性を配列番号 1 のプロテイナーゼの活性と比較して測定することができる。当業者は、配列番号 1 のプロテイナーゼの活性を評価するのに使用されるのと同じ技術及び条件が、断片、変異体又は修飾体の活性を評価するのにも使用されるべきであることをよく知っているであろう。好ましくは、使用する分析は上記分析 A である。

【0089】

上記の好ましい分析 A によれば、プロテイナーゼ X は比活性が約 65 U/mg (65.2 U/mg) である。好ましくは、本発明の変異体、酵素断片及び修飾体は比活性が上記分析 A で測定して 40~100 U/mg、より好ましくは 50~80 U/mg、より好ましくは 60~70 U/mg、より好ましくは 62.5~67.5 U/mg、好ましくは約 65 U/mg 又は 65.2 U/mg である。好ましくは、本発明の変異プロテイナーゼ及び酵素断片は、上記分析 A で測定して配列番号 1 のプロテイナーゼ X と同じ比活性を有する。

【0090】

本発明の組成物及び試料は、好ましくは $\leq 80 \mu\text{M}$ 遊離カルシウムを含む。本明細書では「遊離カルシウム」という用語は、本発明の組成物及び試料中で遊離した、すなわち結合していない、カルシウムイオン、すなわち本発明の組成物及び試料中に存在する任意のタンパク質又は他の成分に結合していないカルシウムイオン、すなわち自由になったカルシウムをもっぱら指す。本発明の組成物及び溶液中のカルシウム濃度という全体を通した表記は、遊離カルシウム濃度を表す。

【0091】

プロテイナーゼ X (配列番号 1) は、残基 Asp11、Asp14、Gln15、Asp21 及び Asn23 によって形成されるカルシウム結合部位を含む。Ca²⁺ イオンは、Asp11、Asp14 及び Asp21 の側鎖のカルボキシル酸素原子、Gln15 のアミド酸素原子、並びに Asp11 及び Asn23 のカルボニル酸素原子に配位する。この結合カルシウムイオンは、正しいタンパク質折り畳みに必要である。したがって、本発明に有用であるプロテイナーゼは、天然には、この結合カルシウムイオンを含む。結合カルシウムイオンは、本発明に有用であるプロテイナーゼが組換え産生される場合にも存在する。プロテイナーゼの産生に使用されるどんな環境もカルシウムを必然的に含む。これは、結合イオンが折り畳まれたプロテイナーゼ構造中に存在することを意味する。こうした結合カルシウムイオンは、本明細書で使用する用語の「遊離カルシウム」ではない。

【0092】

本発明の組成物又は試料を調製する当業者は、溶液又は試料に入れる適切な溶質及び溶媒を単に選択することによって必要なカルシウム濃度を直接確実に得ることができる。多量のカルシウム非含有緩衝液に対する透析、例えば 500~10000、好ましくは 5000 容量のカルシウム非含有緩衝液に対する透析によって、遊離カルシウムを溶液から除去することは、当業者の能力の範囲内である。適切な緩衝液は、当業者に明らかであり、好ましくは、本明細書の別の所で記述する緩衝液、例えば、10mM Tris-HCl、pH 7~9 であろう。好ましくは、前記緩衝液は更にグリセロールを含む。

【0093】

任意の所与の溶液又は試料中の遊離カルシウム濃度も、当業者が容易に測定することができる。カルシウムを測定する標準方法は、当該技術分野でよく知られており、例えば、

E D T A の標準溶液を用いた滴定が挙げられる。

【0094】

結合カルシウムイオンは、強いカルシウムキレート剤、例えば、E D T A の適用によって、プロテイナーゼから除去することができる。しかし、多数の目的生体分子をE D T A に暴露することは望ましくない。さらに、E D T A は、多数の核酸関連酵素（例えば、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ）に必要である Mg^{2+} イオンに結合する。こうした酵素は、プロテイナーゼを用いた試料調製に続く分子生物学技術に使用され、E D T A の存在はこの状況で特に問題になる。E D T A は、後続の下流のステップにおいて遊離 Mg^{2+} 濃度に関する不確実性を持ち込み、望ましくない。 Mg^{2+} は、酵素機能に必要であるが、過剰であるとR N A 分解を引き起こす。ポリペプチドを消化するどんな方法でも、試薬を含み、その後

10

【0095】

本発明者らは、驚くべきことに、単に遊離カルシウムの非存在が本発明のプロテイナーゼにおいて易熱性を誘導するのに十分であることを見いだした。本発明者らは、驚くべきことに、プロテイナーゼXの易熱性が、遊離カルシウムイオン濃度の低い環境中にプロテイナーゼが存在するときに誘導されることを初めて明らかにした。本発明者らは、プロテイナーゼに結合し、その安定性及び構造に寄与し得るカルシウムイオンを、例えばE D T A を用いて、除去する必要があることを確認した。それどころか、遊離カルシウムイオン濃度を低くするだけで、驚くべきことに、酵素に易熱性を誘導するのに十分である。こうした誘導可能な性質は予想外であり、実施例で示すように、分子生物学用途に使用される標準プロテイナーゼであるプロテイナーゼKでは認められない。

20

【0096】

したがって、好ましくは、本発明のプロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片は、それに結合したカルシウムイオンを含む。換言すれば、好ましくは、本発明の組成物及び試料は、プロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片をそれらの天然のカルシウム結合状態で含む。このシナリオでは、カルシウムはタンパク質の「補因子」と考えることができ、したがって、プロテイナーゼは、本発明の組成物及び試料中でそれらの「ホロ酵素型」である。ホロ酵素は、アポ酵素とその補因子（この場合はカルシウム）の組合せによって形成される生化学的に活性な酵素である。

30

【0097】

したがって、好ましくは、本発明の組成物及び試料は、E D T A を本質的に含まず、好ましくはE D T A を含まず、より好ましくはどんなカルシウムキレート剤も含まない。好ましくは、本発明の溶液及び試料中に存在するプロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片は、どの時点でもE D T A に暴露されず、より好ましくはどんなカルシウムキレート剤にも暴露されない。

【0098】

別の見方をすれば、本発明は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む組成物であって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、

40

i) 前記組成物中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記組成物がE D T A を本質的に含まない、好ましくはカルシウムキレート剤を本質的に含まない、又は

i i) 前記組成物中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、組成物を提供する。

【0099】

別の見方をすれば、本発明は、1以上のポリペプチド及びプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む試料であって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記試料がE D T A を本質的に含まない、好ましくはカルシウムキレート剤を本質的に含まない、又は

50

i i) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、
試料を提供する。

【0100】

別の見方をすれば、本発明は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を含む組成物であって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、

i) 前記組成物中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記組成物がEDTAを本質的に含まない、好ましくはカルシウムキレート剤を本質的に含まない、又は

i i) 前記組成物中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMであり、

前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片が、更に、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列に対してN末端である更なるペプチド配列及び／又はC末端である更なるペプチド配列を含む、
組成物を提供する。

【0101】

本明細書の別の所で記述する好ましい任意選択の特徴及び実施形態は、必要な変更を加えて、本発明の「別の見方をされた」態様にも当てはまる。特に、本明細書の別の所で開示する「遊離カルシウム」濃度は、EDTAを本質的に含まない、より好ましくはどんなカルシウムキレート剤も本質的に含まない、本発明の別の見方をされた組成物及び試料中の（「遊離カルシウム」と定義されない）カルシウムの好ましい濃度である。同じことが、「遊離カルシウム」ではなく「カルシウム」の濃度に言及し、本発明の方法の試料又は組成物がEDTAを本質的に含まないことを明示する以下の本発明の方法にも当てはまる。

【0102】

好ましくは、本発明のすべての態様の組成物及び試料は、EDTA及びEGTAを本質的に含まず、より好ましくは、結合カルシウムをプロテイナーゼX構造から除去可能なカルシウムキレート剤を本質的に含まず、より好ましくは、カルシウムキレート剤を本質的に含まない。

【0103】

例えばEDTA又は遊離カルシウムを、「本質的に含まない」とは、組成物及び試料が本質においてEDTA又は遊離カルシウムを含まないことを意味するが、それらがEDTA又は遊離カルシウムを完全に欠く厳密な要件が存在することを意味するものではない。例えば、本発明の組成物又は試料の調製に使用される市販品又は貯蔵液中の少量のEDTA又は遊離カルシウムの存在のために、EDTA又は遊離カルシウムの存在を防止するステップが取られた後でも僅少レベルのEDTA又は遊離カルシウムの可能性が存在する。詳細な検査によっていくらかのEDTAの存在が明らかになり得るものの、それは、意図された目的では存在しないとみなすことができるような少量で存在し、すなわち、EDTAの非存在下で生じるようなレベル又は程度と比較して、遊離カルシウムレベル又は本発明のプロテイナーゼに結合するカルシウムの程度を実質的に変えるレベルでは存在しない。

【0104】

カルシウムキレート剤に関連した「本質的に含まない」とは、試料中のプロテイナーゼX濃度とカルシウムキレート剤、例えば、EDTA又はEGTAの濃度の比が少なくとも10:1、より好ましくは少なくとも100:1、より好ましくは少なくとも1000:1であることを意味する。試料が1を超えるカルシウムキレート剤を含む場合、これらの比は、試料中のプロテイナーゼX濃度とカルシウムキレート剤全濃度の比である。

【0105】

詳細な検査によっていくらかの遊離カルシウムの存在が明らかになり得るものの、それは、意図された目的では存在しないとみなすことができるような少量で存在し、すなわち、遊離カルシウムの非存在下で生じるようなレベル又は程度と比較して、本発明のプロテイナーゼの易熱性を実質的に変えるレベルでは存在しない。

【0106】

好ましくは、本発明の組成物及び試料は、EDTAを完全に含まず、より好ましくは、結合カルシウムをプロテイナーゼX構造から除去可能なカルシウムキレート剤を含まず、より好ましくは、カルシウムキレート剤を含まない。

【0107】

好ましくは、本発明の組成物及び試料は、遊離カルシウムを完全に含まない、すなわち遊離カルシウムを含まない。

【0108】

本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約80 μ M、好ましくは $\leq$ 約65 μ M、より好ましくは $\leq$ 約40 μ M、より好ましくは $\leq$ 約35 μ M、 $\leq$ 約32 μ M又は $\leq$ 約30 μ M、より好ましくは $\leq$ 約25 μ M又は $\leq$ 約20 μ M、より好ましくは $\leq$ 約16 μ M又は $\leq$ 約15 μ M、より好ましくは $\leq$ 約10 μ M、より好ましくは $\leq$ 約8 μ M又は $\leq$ 約5 μ M、より好ましくは $\leq$ 約2.5 μ Mである。「 $\leq$ 約X」という用語は、「0～X mM」と同じである。好ましくは、本発明の組成物及び試料は、遊離カルシウムを含まない。

10

【0109】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、少なくとも約1 μ Mである。すなわち、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは約1～約80 μ M、より好ましくは約1～約65 μ M、好ましくは約1～約40 μ M、好ましくは約1～約35 μ M、好ましくは約1～約32 μ M、好ましくは約1～約30 μ M、好ましくは約1～約25 μ M、好ましくは約1～約20 μ M、好ましくは約1～約16 μ M、好ましくは約1～約15 μ M、好ましくは約1～約10 μ M、好ましくは約1～約8 μ M、好ましくは約1～約5 μ M、好ましくは約1～約2.5 μ Mである。

20

【0110】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、少なくとも約2 μ Mである。すなわち、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは約2～約80 μ M、より好ましくは約2～約65 μ M、好ましくは約2～約40 μ M、好ましくは約2～約35 μ M、好ましくは約2～約32 μ M、好ましくは約2～約30 μ M、好ましくは約2～約25 μ M、好ましくは約2～約20 μ M、好ましくは約2～約16 μ M、好ましくは約2～約15 μ M、好ましくは約2～約10 μ M、好ましくは約2～約8 μ M、好ましくは約2～約5 μ M、好ましくは約2～約2.5 μ Mである。

30

【0111】

好ましくは、本発明の組成物及び試料は、遊離カルシウムを本質的に含まない、より好ましくは遊離カルシウムを含まない。「本質的に含まない」という用語については、本明細書の別の所で定義するとおりである。

【0112】

特に好ましくは、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、 $\leq$ 約35 μ M、 $\leq$ 約32 μ M、好ましくは $\leq$ 約16 μ M、好ましくは $\leq$ 約10 μ Mである。特に好ましくは、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、少なくとも約1 μ M、好ましくは少なくとも約2 μ Mである。すなわち、特に好ましくは、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、約1～約35 μ M、好ましくは約1～約32 μ M、好ましくは約2～約35 μ M、好ましくは約2～約32 μ M、好ましくは約1～約16 μ M、好ましくは約2～約16 μ M、好ましくは約1～約10 μ M、好ましくは約2～約10 μ Mである。

40

【0113】

上述したように、好ましくは、本発明の組成物及び試料は、好ましくはこうした濃度の遊離カルシウムを含み、EDTAを本質的に含まず、好ましくはカルシウムキレート剤を本質的に含まない。

【0114】

好ましくは、本発明の組成物中のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の濃度は

50

、 $0.1\text{ mg/ml} \sim 20\text{ mg/ml}$ 、より好ましくは $0.5\text{ mg/ml} \sim 10\text{ mg/ml}$ 、最も好ましくは $2\text{ mg/ml} \sim 5\text{ mg/ml}$ である。

【0115】

上記好ましい分析Aを用いて、本発明者らは、プロテイナーゼXの比活性が約 65 U/mg であることを確認した。好ましくは、本発明の組成物中のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の活性は、上記分析Aによって測定して、 $0.0015\text{ U/}\mu\text{l} \sim 0.30\text{ U/}\mu\text{l}$ 、より好ましくは $0.008\text{ U/}\mu\text{l} \sim 0.15\text{ U/}\mu\text{l}$ 、最も好ましくは約 $0.03\text{ U/}\mu\text{l} \sim 0.08\text{ U/}\mu\text{l}$ である。

【0116】

好ましくは、本発明の試料中のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の濃度は、 $0.001\text{ mg/ml} \sim 5\text{ mg/ml}$ 、より好ましくは $0.05\text{ mg/ml} \sim 0.5\text{ mg/ml}$ 、最も好ましくは $0.015\text{ mg/ml} \sim 0.1\text{ mg/ml}$ である。

【0117】

好ましくは、本発明の試料中のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の活性は、上記分析Aによって測定して、 $0.07\text{ U/ml} \sim 325\text{ U/ml}$ 、より好ましくは $3.25\text{ U/ml} \sim 32.5\text{ U/ml}$ 、最も好ましくは $1.0\text{ U/}\mu\text{l} \sim 6.5\text{ U/ml}$ である。

【0118】

任意で、本発明の組成物又は試料は、抗体、一本鎖DNA結合タンパク質（SSB）及び酵素からなる群から選択される1以上の更なる機能タンパク質を含む。

【0119】

好ましくは、前記更なる酵素は、ヌクレアーゼ（好ましくは、デオキシリボヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、Bal31ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ又はS1ヌクレアーゼ）、ポリメラーゼ（好ましくは、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼ）、逆転写酵素、トランスポザーゼ、リガーゼ、（好ましくは、DNAリガーゼ又はRNAリガーゼ）、メチラーゼ、ポリヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、グアニルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ（好ましくはアルカリホスファターゼ、好ましくは易熱性アルカリホスファターゼ、より好ましくはエビアルカリホスファターゼ）、キナーゼ、ヘリカーゼ、制限酵素及びグリコシラーゼからなる群から選択される。組成物又は試料は、好ましくは、こうした更なる酵素の組合せを含む。

【0120】

好ましくは、組成物又は試料は、DNAポリメラーゼ又は逆転写酵素を含む。溶液又は試料が細胞又は細胞性物質を含む場合、それらは、好ましくは、外因性酵素である、すなわち、試料内の細胞でも試料中の細胞性物質が由来する細胞でも発現されない、こうした更なる酵素を含む。換言すれば、更なる酵素は、試料中の細胞又は細胞性物質によって供給されるのではなく、試料に適用される。これらの実施形態においては、内因的に産生される酵素の追加的存在は除外されない。

【0121】

本発明の組成物及び試料は、好ましくは、一価塩、好ましくは一価無機塩を含む。「塩」と「一価塩」という用語は、全体を通して同義で使用される。一価塩は、一価対イオンを含む塩である。二価塩は、対イオンの少なくとも1つが二価である塩、例えば MgCl_2 である。無機塩は、対イオンのどれも炭素を含まない塩である。好ましくは、塩は、ナトリウム塩又はカリウム塩、より好ましくはナトリウム塩である。好ましくは、塩は、塩化ナトリウム（ NaCl ）又は塩化カリウム（ KCl ）、最も好ましくは塩化ナトリウムである。

【0122】

別の見方をすれば、本発明の組成物及び試料は、好ましくは一価対イオンを含む。好ましくは、本発明の組成物及び試料は、一価カチオン及び好ましくは一価アニオンも含む。好ましくは、一価イオンは無機である。好ましくは、カチオンは、ナトリウムイオン又は

10

20

30

40

50

カリウムイオン、好ましくはナトリウムイオンである。好ましくは、組成物及び試料は、ナトリウム及び塩化物イオン又はカリウム及び塩化物イオン、最も好ましくはナトリウム及び塩化物イオンを含む。本明細書に開示される一価塩の好ましい濃度は、本質的に、一価対イオンの好ましい濃度であり、その逆も同様である。

【0123】

実施例に示すように、本発明者らは、一価塩濃度の増加がプロテイナーゼXの易熱性を誘導するのに対して、一価塩濃度の増加がプロテイナーゼKを安定化して熱不活化することを初めて示した。この結果は、特に驚くべきことである。配列番号1のプロテイナーゼXは、塩水生物から得られ、したがって、通常、高塩分条件に耐えると予想される。それに対して、プロテイナーゼKは、非海洋性供給源、真菌 *Engyodontium album* (以前は *Tritirachium album*) から得られ、高塩分条件によって安定化されるとは予想されない。

10

【0124】

一価塩を含む本発明の試料及び組成物においては、好ましくは、組成物及び試料はpHが6.5~9.5、好ましくは6.8~9.2、より好ましくは7~9、より好ましくは7.5~8.5、より好ましくは約8.0である。

【0125】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、 $\geq$ 約20mM、好ましくは $\geq$ 約25mM、より好ましくは $\geq$ 約30mM、より好ましくは $\geq$ 約40mM、より好ましくは $\geq$ 約50mM、より好ましくは $\geq$ 約75mM、より好ましくは $\geq$ 約100mM、より好ましくは $\geq$ 約125mM、より好ましくは $\geq$ 約150mM、より好ましくは $\geq$ 約175mMである。任意で、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、 $\geq$ 約200mM、 $\geq$ 約250mM、 $\geq$ 約300mM、 $\geq$ 約400mM又は $\geq$ 500mMである。

20

【0126】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、 $\leq$ 約1M、好ましくは $\leq$ 約500mM、好ましくは $\leq$ 約350mMである。本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、好ましくは約20mM~約1M、好ましくは約20~約500mM、好ましくは約20~約400mM、好ましくは約20~約350mM、好ましくは約30~約350mM、好ましくは約40~約350mM、好ましくは約50~約350mM、好ましくは約75~約350mM、好ましくは約100~約350mM、好ましくは約125~約350mM、好ましくは約150~約350mM、好ましくは約175~約350mMである。任意で、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約200~約350mM、又は約300~約350mMである。

30

【0127】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、 $\leq$ 約500mM、好ましくは $\leq$ 約400mM、好ましくは $\leq$ 約300mM、好ましくは $\leq$ 約250mM、好ましくは $\leq$ 約200mM、好ましくは $\leq$ 約175mM、好ましくは $\leq$ 約150mMである。

【0128】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約20~約300mM、好ましくは約30~約300mM、好ましくは約40~約300mM、好ましくは約50~約300mM、好ましくは約75~約300mM、好ましくは約100~約300mM、好ましくは約125~約300mM、好ましくは約150~約300mM、好ましくは約175~約300mMである。任意で、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約200~約300mMである。

40

【0129】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約20~約250mM、好ましくは約30~約250mM、好ましくは約40~約250mM、好ましくは約50~約250mM、好ましくは約75~約250mM、好ましくは約100~約250mM、好ましくは約125~約250mM、好ましくは約150~約250mM、好ましくは約175~約250mMである。任意で、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約20

50

0～約250mMである。

【0130】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約20～約200mM、好ましくは約30～約200mM、好ましくは約40～約200mM、好ましくは約50～約200mM、好ましくは約75～約200mM、好ましくは約100～約200mM、好ましくは約125～約200mM、好ましくは約150～約200mM、好ましくは約175～約200mMである。

【0131】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約20～約175mM、好ましくは約30～約175mM、好ましくは約40～約175mM、好ましくは約50～約175mM、好ましくは約75～約175mM、好ましくは約100～約175mM、好ましくは約125～約175mM、好ましくは約150～約175mMである。

10

【0132】

好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約20～約150mM、好ましくは約30～約150mM、好ましくは約40～約150mM、好ましくは約50～約150mM、好ましくは約75～約150mM、好ましくは約100～約150mM、好ましくは約125～約150mMである。

【0133】

特に好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約20～約175mM、好ましくは約20～約150mM、好ましくは約50～約150mMである。特に好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約30～約175mM、好ましくは約30～約150mMである。特に好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約40～約175mM、好ましくは約40～約150mM、好ましくは約40～約150mMである。

20

【0134】

好ましくは、本発明の組成物及び試料は、本明細書の別の所で定義する遊離カルシウム濃度及び一価塩濃度を含む。これによって、本明細書に開示される任意のカルシウム濃度値又は範囲と本発明のすべての態様及び実施形態に関して本明細書に開示される任意の一価塩濃度値又は範囲との組合せが明示される。好ましくは、一価塩はNaCl又はKCl、好ましくはNaClである。

30

【0135】

最高遊離カルシウム濃度と最低一価塩濃度の好ましい組合せを以下に示す。

【0136】

【表 1 - 1】

#	最高遊離 C a ²⁺ 濃度	最低塩濃度 との組合せ
1	約 80μM	約 20mM
2	約 80μM	約 25mM
3	約 80μM	約 50mM
4	約 80μM	約 75mM
5	約 80μM	約 100mM
6	約 80μM	約 125mM
7	約 80μM	約 150mM
8	約 80μM	約 200mM
9	約 80μM	約 300mM
10	約 80μM	約 400mM
11	約 80μM	約 500mM
23	約 40μM	約 20mM
24	約 40μM	約 25mM
25	約 40μM	約 50mM
26	約 40μM	約 75mM
27	約 40μM	約 100mM
28	約 40μM	約 125mM
29	約 40μM	約 150mM
30	約 40μM	約 200mM
31	約 40μM	約 300mM
32	約 40μM	約 400mM
33	約 40μM	約 500mM

#	最高遊離 C a ²⁺ 濃度	最低塩濃度 との組合せ
12	約 65μM	約 20mM
13	約 65μM	約 25mM
14	約 65μM	約 50mM
15	約 65μM	約 75mM
16	約 65μM	約 100mM
17	約 65μM	約 125mM
18	約 65μM	約 150mM
19	約 65μM	約 200mM
20	約 65μM	約 300mM
21	約 65μM	約 400mM
22	約 65μM	約 500mM
34	約 35μM	約 20mM
35	約 35μM	約 25mM
36	約 35μM	約 50mM
37	約 35μM	約 75mM
38	約 35μM	約 100mM
39	約 35μM	約 125mM
40	約 35μM	約 150mM
41	約 35μM	約 200mM
42	約 35μM	約 300mM
43	約 35μM	約 400mM
44	約 35μM	約 500mM

10

20

30

40

【表 1 - 2】

45	約 32μM	約 20mM
46	約 32μM	約 25mM
47	約 32μM	約 50mM
48	約 32μM	約 75mM
49	約 32μM	約 100mM
50	約 32μM	約 125mM
51	約 32μM	約 150mM
52	約 32μM	約 200mM
53	約 32μM	約 300mM
54	約 32μM	約 400mM
55	約 32μM	約 500mM
67	約 25μM	約 20mM
68	約 25μM	約 25mM
69	約 25μM	約 50mM
70	約 25μM	約 75mM
71	約 25μM	約 100mM
72	約 25μM	約 125mM
73	約 25μM	約 150mM
74	約 25μM	約 200mM
75	約 25μM	約 300mM
76	約 25μM	約 400mM
77	約 25μM	約 500mM

56	約 30μM	約 20mM
57	約 30μM	約 25mM
58	約 30μM	約 50mM
59	約 30μM	約 75mM
60	約 30μM	約 100mM
61	約 30μM	約 125mM
62	約 30μM	約 150mM
63	約 30μM	約 200mM
64	約 30μM	約 300mM
65	約 30μM	約 400mM
66	約 30μM	約 500mM
78	約 20μM	約 20mM
79	約 20μM	約 25mM
80	約 20μM	約 50mM
81	約 20μM	約 75mM
82	約 20μM	約 100mM
83	約 20μM	約 125mM
84	約 20μM	約 150mM
85	約 20μM	約 200mM
86	約 20μM	約 300mM
87	約 20μM	約 400mM
88	約 20μM	約 500mM

10

20

30

40

【表 1 - 3】

89	約 16 μ M	約 20mM	100	約 15 μ M	約 20mM
90	約 16 μ M	約 25mM	101	約 15 μ M	約 25mM
91	約 16 μ M	約 50mM	102	約 15 μ M	約 50mM
92	約 16 μ M	約 75mM	103	約 15 μ M	約 75mM
93	約 16 μ M	約 100mM	104	約 15 μ M	約 100mM
94	約 16 μ M	約 125mM	105	約 15 μ M	約 125mM
95	約 16 μ M	約 150mM	106	約 15 μ M	約 150mM
96	約 16 μ M	約 200mM	107	約 15 μ M	約 200mM
97	約 16 μ M	約 300mM	108	約 15 μ M	約 300mM
98	約 16 μ M	約 400mM	109	約 15 μ M	約 400mM
99	約 16 μ M	約 500mM	110	約 15 μ M	約 500mM
111	約 10 μ M	約 20mM	122	約 8 μ M	約 20mM
112	約 10 μ M	約 25mM	123	約 8 μ M	約 25mM
113	約 10 μ M	約 50mM	124	約 8 μ M	約 50mM
114	約 10 μ M	約 75mM	125	約 8 μ M	約 75mM
115	約 10 μ M	約 100mM	126	約 8 μ M	約 100mM
116	約 10 μ M	約 125mM	127	約 8 μ M	約 125mM
117	約 10 μ M	約 150mM	128	約 8 μ M	約 150mM
118	約 10 μ M	約 200mM	129	約 8 μ M	約 200mM
119	約 10 μ M	約 300mM	130	約 8 μ M	約 300mM
120	約 10 μ M	約 400mM	131	約 8 μ M	約 400mM
121	約 10 μ M	約 500mM	132	約 8 μ M	約 500mM

10

20

30

40

【表 1 - 4】

133	約 5 μ M	約 20mM	144	約 2. 5 μ M	約 20mM
134	約 5 μ M	約 25mM	145	約 2. 5 μ M	約 25mM
135	約 5 μ M	約 50mM	146	約 2. 5 μ M	約 50mM
136	約 5 μ M	約 75mM	147	約 2. 5 μ M	約 75mM
137	約 5 μ M	約 100mM	148	約 2. 5 μ M	約 100mM
138	約 5 μ M	約 125mM	149	約 2. 5 μ M	約 125mM
139	約 5 μ M	約 150mM	150	約 2. 5 μ M	約 150mM
140	約 5 μ M	約 200mM	151	約 2. 5 μ M	約 200mM
141	約 5 μ M	約 300mM	152	約 2. 5 μ M	約 300mM
142	約 5 μ M	約 400mM	153	約 2. 5 μ M	約 400mM
143	約 5 μ M	約 500mM	154	約 2. 5 μ M	約 500mM

10

20

【 0 1 3 7 】

さらに、好ましくは、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、少なくとも約 1 μ M、より好ましくは少なくとも約 2 μ Mである。さらに、好ましくは、本発明の組成物及び試料中の一価塩濃度は、約 5 0 0 mM以下、好ましくは約 4 0 0 mM以下、好ましくは約 3 5 0 mM以下、好ましくは 3 0 0 mM以下、好ましくは約 2 5 0 mM以下、好ましくは約 2 0 0 mM以下、好ましくは約 1 7 5 mM以下、好ましくは約 1 5 0 mM以下である。

30

【 0 1 3 8 】

最高遊離カルシウム濃度と一価塩濃度の好ましい組合せを以下に示す。

【 0 1 3 9 】

【表 2】

#	最高遊離 Ca ²⁺ 濃度	塩濃度	#	最高遊離 Ca ²⁺ 濃度	塩濃度
155	約 80μM	約 20～約 175mM	183	約 20μM	約 20～約 175mM
156	約 80μM	約 20～約 150mM	184	約 20μM	約 20～約 150mM
157	約 80μM	約 50～約 175mM	185	約 20μM	約 50～約 175mM
158	約 80μM	約 50～約 150mM	186	約 20μM	約 50～約 150mM
159	約 65μM	約 20～約 175mM	187	約 16μM	約 20～約 175mM
160	約 65μM	約 20～約 150mM	188	約 16μM	約 20～約 150mM
161	約 65μM	約 50～約 175mM	189	約 16μM	約 50～約 175mM
162	約 65μM	約 50～約 150mM	190	約 16μM	約 50～約 150mM
163	約 40μM	約 20～約 175mM	191	約 15μM	約 20～約 175mM
164	約 40μM	約 20～約 150mM	192	約 15μM	約 20～約 150mM
165	約 40μM	約 50～約 175mM	193	約 15μM	約 50～約 175mM
166	約 40μM	約 50～約 150mM	194	約 15μM	約 50～約 150mM
167	約 35μM	約 20～約 175mM	195	約 10μM	約 20～約 175mM
168	約 35μM	約 20～約 150mM	196	約 10μM	約 20～約 150mM
169	約 35μM	約 50～約 175mM	197	約 10μM	約 50～約 175mM
170	約 35μM	約 50～約 150mM	198	約 10μM	約 50～約 150mM
171	約 32μM	約 20～約 175mM	199	約 8μM	約 20～約 175mM
172	約 32μM	約 20～約 150mM	200	約 8μM	約 20～約 150mM
173	約 32μM	約 50～約 175mM	201	約 8μM	約 50～約 175mM
174	約 32μM	約 50～約 150mM	202	約 8μM	約 50～約 150mM
175	約 30μM	約 20～約 175mM	203	約 5μM	約 20～約 175mM
176	約 30μM	約 20～約 150mM	204	約 5μM	約 20～約 150mM
177	約 30μM	約 50～約 175mM	205	約 5μM	約 50～約 175mM
178	約 30μM	約 50～約 150mM	206	約 5μM	約 50～約 150mM
179	約 25μM	約 20～約 175mM	207	約 2.5μM	約 20～約 175mM
180	約 25μM	約 20～約 150mM	208	約 2.5μM	約 20～約 150mM
181	約 25μM	約 50～約 175mM	209	約 2.5μM	約 50～約 175mM
182	約 25μM	約 50～約 150mM	210	約 2.5μM	約 50～約 150mM

10

20

30

40

【0140】

遊離カルシウム濃度と一価塩濃度の好ましい組合せを以下に示す。

【0141】

【表 3】

#	最高遊離 Ca ²⁺ 濃度	塩濃度
211	約 1～約 80μM	約 20～約 175mM
212	約 1～約 80μM	約 20～約 150mM
213	約 1～約 80μM	約 50～約 175mM
214	約 1～約 80μM	約 50～約 150mM
215	約 1～約 65μM	約 20～約 175mM
216	約 1～約 65μM	約 20～約 150mM
217	約 1～約 65μM	約 50～約 175mM
218	約 1～約 65μM	約 50～約 150mM
219	約 1～約 40μM	約 20～約 175mM
220	約 1～約 40μM	約 20～約 150mM
221	約 1～約 40μM	約 50～約 175mM
222	約 1～約 40μM	約 50～約 150mM
223	約 1～約 35μM	約 20～約 175mM
224	約 1～約 35μM	約 20～約 150mM
225	約 1～約 35μM	約 50～約 175mM
226	約 1～約 35μM	約 50～約 150mM
227	約 1～約 32μM	約 20～約 175mM
228	約 1～約 32μM	約 20～約 150mM
229	約 1～約 32μM	約 50～約 175mM
230	約 1～約 32μM	約 50～約 150mM
231	約 1～約 30μM	約 20～約 175mM
232	約 1～約 30μM	約 20～約 150mM
233	約 1～約 30μM	約 50～約 175mM
234	約 1～約 30μM	約 50～約 150mM
235	約 1～約 25μM	約 20～約 175mM
236	約 1～約 25μM	約 20～約 150mM
237	約 1～約 25μM	約 50～約 175mM
238	約 1～約 25μM	約 50～約 150mM

#	最高遊離 Ca ²⁺ 濃度	塩濃度
239	約 1～約 20μM	約 20～約 175mM
240	約 1～約 20μM	約 20～約 150mM
241	約 1～約 20μM	約 50～約 175mM
242	約 1～約 20μM	約 50～約 150mM
243	約 1～約 16μM	約 20～約 175mM
244	約 1～約 16μM	約 20～約 150mM
245	約 1～約 16μM	約 50～約 175mM
246	約 1～約 16μM	約 50～約 150mM
247	約 1～約 15μM	約 20～約 175mM
248	約 1～約 15μM	約 20～約 150mM
249	約 1～約 15μM	約 50～約 175mM
250	約 1～約 15μM	約 50～約 150mM
251	約 1～約 10μM	約 20～約 175mM
252	約 1～約 10μM	約 20～約 150mM
253	約 1～約 10μM	約 50～約 175mM
254	約 1～約 10μM	約 50～約 150mM
255	約 1～約 8μM	約 20～約 175mM
256	約 1～約 8μM	約 20～約 150mM
257	約 1～約 8μM	約 50～約 175mM
258	約 1～約 8μM	約 50～約 150mM
259	約 1～約 5μM	約 20～約 175mM
260	約 1～約 5μM	約 20～約 150mM
261	約 1～約 5μM	約 50～約 175mM
262	約 1～約 5μM	約 50～約 150mM
263	約 1～約 2.5μM	約 20～約 175mM
264	約 1～約 2.5μM	約 20～約 150mM
265	約 1～約 2.5μM	約 50～約 175mM
266	約 1～約 2.5μM	約 50～約 150mM

10

20

30

40

【 0 1 4 2 】

遊離カルシウム濃度と一価塩濃度の好ましい組合せを以下に示す。

【 0 1 4 3 】

【表 4】

#	最高遊離 Ca ²⁺ 濃度	塩濃度
267	約 2～約 80μM	約 20～約 175mM
268	約 2～約 80μM	約 20～約 150mM
269	約 2～約 80μM	約 50～約 175mM
270	約 2～約 80μM	約 50～約 150mM
271	約 2～約 65μM	約 20～約 175mM
272	約 2～約 65μM	約 20～約 150mM
273	約 2～約 65μM	約 50～約 175mM
274	約 2～約 65μM	約 50～約 150mM
275	約 2～約 40μM	約 20～約 175mM
276	約 2～約 40μM	約 20～約 150mM
277	約 2～約 40μM	約 50～約 175mM
278	約 2～約 40μM	約 50～約 150mM
279	約 2～約 35μM	約 20～約 175mM
280	約 2～約 35μM	約 20～約 150mM
281	約 2～約 35μM	約 50～約 175mM
282	約 2～約 35μM	約 50～約 150mM
283	約 2～約 32μM	約 20～約 175mM
284	約 2～約 32μM	約 20～約 150mM
285	約 2～約 32μM	約 50～約 175mM
286	約 2～約 32μM	約 50～約 150mM
287	約 2～約 30μM	約 20～約 175mM
288	約 2～約 30μM	約 20～約 150mM
289	約 2～約 30μM	約 50～約 175mM
290	約 2～約 30μM	約 50～約 150mM
291	約 2～約 25μM	約 20～約 175mM
292	約 2～約 25μM	約 20～約 150mM
293	約 2～約 25μM	約 50～約 175mM
294	約 2～約 25μM	約 50～約 150mM

#	最高遊離 Ca ²⁺ 濃度	塩濃度
295	約 2～約 20μM	約 20～約 175mM
296	約 2～約 20μM	約 20～約 150mM
297	約 2～約 20μM	約 50～約 175mM
298	約 2～約 20μM	約 50～約 150mM
299	約 2～約 16μM	約 20～約 175mM
300	約 2～約 16μM	約 20～約 150mM
301	約 2～約 16μM	約 50～約 175mM
302	約 2～約 16μM	約 50～約 150mM
303	約 2～約 15μM	約 20～約 175mM
304	約 2～約 15μM	約 20～約 150mM
305	約 2～約 15μM	約 50～約 175mM
306	約 2～約 15μM	約 50～約 150mM
307	約 2～約 10μM	約 20～約 175mM
308	約 2～約 10μM	約 20～約 150mM
309	約 2～約 10μM	約 50～約 175mM
310	約 2～約 10μM	約 50～約 150mM
311	約 2～約 8μM	約 20～約 175mM
312	約 2～約 8μM	約 20～約 150mM
313	約 2～約 8μM	約 50～約 175mM
314	約 2～約 8μM	約 50～約 150mM
315	約 2～約 5μM	約 20～約 175mM
316	約 2～約 5μM	約 20～約 150mM
317	約 2～約 5μM	約 50～約 175mM
318	約 2～約 5μM	約 50～約 150mM
319	約 2～約 2.5μM	約 20～約 175mM
320	約 2～約 2.5μM	約 20～約 150mM
321	約 2～約 2.5μM	約 50～約 175mM
322	約 2～約 2.5μM	約 50～約 150mM

10

20

30

40

【0144】

特に好ましくは、本発明の組成物及び試料中の遊離カルシウム濃度は、 $\leq$ 約 5 μ M、好ましくは $\leq$ 約 2 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 1 μ M、最も好ましくは約 0 mMである。特に好ましくは、組成物及び試料中の一価塩濃度は、20～125 mM、好ましくは20～100 mM、最も好ましくは20～50 mMである。特に好ましくは、組成物及び試料中の一価塩濃度は、30～125 mM、好ましくは30～100 mM、最も好ましくは30～

50

50 mMである。

【0145】

本発明の組成物及び試料は、特に穏和な条件下で不活性化することができるプロテイナーゼを含む。したがって、組成物は、他の酵素のその後の使用又は事前の使用を含む、様々な分子生物学方法において有利な有用性を有する。こうした方法を以下に更に詳細に考察する。すなわち、更なる一態様は、

i) 本発明の組成物及び

ii) 第2の酵素を含む第2の組成物を含むキットを提供する。

【0146】

第2の酵素は、本発明のプロテイナーゼではない。任意で、前記キットは、複数の酵素を含む複数の溶液を含む。すなわち、それは、第3の酵素を含む第3の溶液、任意で、第4の酵素を含む第4の溶液などを含む。本発明のキット中に存在する各溶液は、好ましくは、その各々が本発明のプロテイナーゼではない異なる酵素を含む。好ましくは、第2の後続の溶液中の酵素は、ヌクレアーゼ（好ましくは、デオキシリボヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、Bal31ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ又はS1ヌクレアーゼ）、ポリメラーゼ（好ましくは、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼ）、逆転写酵素、リガーゼ、（好ましくは、DNAリガーゼ又はRNAリガーゼ）、メチラーゼ、トランスフェラーゼ（好ましくは、ポリヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ）、トポイソメラーゼ、グアニルトランスフェラーゼ、プロテイナーゼX以外のプロテイナーゼ、及びホスファターゼ又はそれらの組合せからなる群から独立に選択される。

【0147】

好ましくは、本発明のキットは、本発明の組成物、及びDNAポリメラーゼ又は逆転写酵素を含む第2の組成物を含む。

【0148】

本発明の組成物及び試料は、特に穏和な熱処理ステップによって不活性化することができるプロテイナーゼを含む。したがって、組成物は、試料中の1以上のポリペプチドを消化するために試料へのプロテイナーゼの適用が必要である、又は望ましいが、存在する1以上の生体分子の構造又は機能に有害な影響を及ぼさないようにすることも望ましい、様々な分子生物学方法に有利な有用性を有する。標準プロテイナーゼの使用は、i) 存在する目的生体分子を損傷させ得るかなりの期間の高温を使用した不活性化、又はii) ワークフロー、時間及びコストを増加させ、目的生体分子の損失若しくは損傷をもたらし得る、プロテイナーゼの除去／希釈を必要とする。本組成物は、こうした望ましくないプロセッシングステップを必要としない方法を可能にする。

【0149】

本発明は、以下で考察する方法を提供する。本発明の組成物、試料及びキットに関する上記定義並びに好ましい任意選択の特徴及び実施形態は、必要な変更を加えて、本発明の任意のすべての方法に当てはまる。本発明のすべての方法に関連して、ポリペプチド、試料、プロテイナーゼ、酵素的に活性な断片、遊離カルシウム、遊離カルシウム濃度、一価塩及び一価塩濃度については、本明細書の別の所で記述する。特に、上で開示した特徴、並びに遊離カルシウム（又はカルシウム）、一価塩及びそれらの組合せの濃度のいずれも本発明の方法に有用であり、すなわち、好ましくは、本発明の方法において接触又は処理される試料は、本明細書の別の所で開示するように、ある濃度の遊離カルシウム、一価塩又はそれらの任意の組合せを含む。

【0150】

したがって、本発明の方法において接触される「試料」という用語は、1以上のポリペプチドを含む任意の組成物を指す。好ましくは、試料は細胞性物質を含む。好ましくは、試料はクルードな細胞抽出物を含む。好ましくは、試料は部分精製細胞抽出物を含む。好ましくは、試料は細胞集団を含む。前記試料中の細胞は、インタクトでも溶解されていて

10

20

30

40

50

もよく、好ましくは溶解されていてもよい。好ましくは、試料は、組織試料又は1以上の体液を含む。好ましくは、試料は細針生検材料である。好ましくは、試料は封入ウイルスを含む。プロテイナーゼは、ウイルスのタンパク質カプセル中のRNA/DNAを遊離させて同定、定量化及び／又は増幅するために、該タンパク質カプセルの消化に使用することができる。

【0151】

好ましくは、試料は体積が $\geq 10 \mu\text{l}$ である。好ましくは、試料は体積が $\leq 1000 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 500 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 300 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 250 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 200 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 150 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 100 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 75 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 50 \mu\text{l}$ である。あるいは、試料はマイクロ流体試料である。好ましくは、マイクロ流体試料は体積が $\geq 0.01 \mu\text{l}$ である。好ましくは、マイクロ流体試料は体積が $\leq 10 \mu\text{l}$ 、好ましくは $\leq 5 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 1 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.5 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.1 \mu\text{l}$ である。

10

【0152】

本明細書のどこでもプロテイナーゼという表記は、別段の記載がない限り、酵素的に活性なその断片も表す。

【0153】

本発明のすべての方法においては、好ましくは、試料は、EDTA、好ましくはどんなカルシウムキレート剤も本質的に含まない。この用語の意味については、本明細書の別の所で定義するとおりである。試料は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触した後に、EDTA、好ましくはどんなカルシウムキレート剤も本質的に含まない。

20

【0154】

したがって、更なる一態様においては、試料中のポリペプチドを消化する方法を提供する。前記方法は、試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップを含み、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約 $80 \mu\text{M}$ である、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20mM である。

【0155】

別の見方をすれば、本発明は、試料中のポリペプチドを消化する方法であって、前記方法が、試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップを含み、

30

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約 $80 \mu\text{M}$ であり、前記試料がEDTAを本質的に含まない、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20mM である、方法を提供する。

【0156】

本発明のすべての方法、特に試料が一価塩を含む方法においては、好ましくは、試料はpHが $6.5 \sim 9.5$ 、好ましくは $6.8 \sim 9.2$ 、より好ましくは $7 \sim 9$ 、より好ましくは $7.5 \sim 8.5$ 、より好ましくは約 8.0 である。本発明者らは、本発明のプロテイナーゼが中性及び中性に近いpHを含めた穏和な条件下で不活性化され得ることを初めて確認した。

40

【0157】

好ましくは、試料中の遊離カルシウム（又はカルシウム）濃度は約 $80 \mu\text{M}$ 以下であり、かつ、前記試料中の一価塩濃度は少なくとも約 20mM である。好ましくは、前記試料中の一価塩濃度は、少なくとも約 30mM 、より好ましくは少なくとも約 40mM 、より好ましくは少なくとも約 50mM である。

【0158】

50

「消化する」、「加水分解する」、「分解する」及び「切断する」という用語は、本明細書では区別なく使用され、試料中のポリペプチド内のペプチド結合の加水分解を指す。消化は、部分消化でも完全消化でもよい。本発明に有用であるプロテイナーゼは、非特異的であり、十分な時間が与えられると、酵素機能を可能にする条件下で試料中のタンパク質を完全に消化する。

【0159】

「接触させる」／「接触」、「に適用する」／「適用」及び「に添加する」／「添加」という用語は、それらの通常の意味を有し、本明細書では区別なく使用される。

【0160】

本発明の方法においては、好ましくは、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片は、上記した本発明の一組成物の形で提供される。

10

【0161】

好ましくは、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を $0.001\text{ mg/ml} \sim 5\text{ mg/ml}$ 、より好ましくは $0.05\text{ mg/ml} \sim 0.5\text{ mg/ml}$ 、最も好ましくは $0.015\text{ mg/ml} \sim 0.1\text{ mg/ml}$ の濃度で前記試料に添加する。これらの濃度は、試料中のプロテイナーゼ濃度である。

【0162】

好ましくは、試料に適用された後の、すなわち試料中の、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の活性は、上記分析Aによって測定して、 $0.07\text{ U/ml} \sim 325\text{ U/ml}$ 、より好ましくは $3.25\text{ U/ml} \sim 32.5\text{ U/ml}$ 、最も好ましくは $1.0\text{ U/}\mu\text{l} \sim 6.5\text{ U/ml}$ である。

20

【0163】

したがって、本発明のプロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片は、試料中のポリペプチドを分解するのに使用される。特に、方法は、試料中に存在するポリペプチドの少なくとも一部の消化を可能にする条件下で試料を本発明のプロテイナーゼと接触させることを含む。したがって、好ましくは、試料がプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触した後に、方法は、更に、「消化ステップ」、すなわち試料中のポリペプチドの消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップを含む。必要な消化の量は、方法を実施する人の目的及び意図に依存し、必要な消化の量を達成する適切な条件は、当業者が容易に決定することができる。

30

【0164】

好ましくは、消化ステップは、温度 $4 \sim 65^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $20 \sim 55^\circ\text{C}$ 、最も好ましくは $30 \sim 55^\circ\text{C}$ で試料を加熱することを含む。好ましくは、インキュベーションステップは、継続時間が1秒～45分間、より好ましくは30秒～30分間、より好ましくは1～15分間、より好ましくは1～10分間、更により好ましくは1～5分間である。これらの範囲の上限の温度を使用する場合、インキュベーションの継続時間は、これらの範囲の下限とすることができ、その逆も同様である。当業者は、1又は2秒の極めて短いインキュベーションが、マイクロ流体試料を用いて行われる方法、及び試料中に存在する基質の量が少ない別の方法の場合には十分であることを知っている。

【0165】

40

好ましくは、上記方法は、後続の「不活性化ステップ」、すなわち、試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップを含む。こうした不活性化ステップは、試料をプロテイナーゼと接触させるステップの後、及び試料中のポリペプチドの消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップの後に行われる。

【0166】

消化及び不活性化のこれらのステップは、一般にインキュベーションであり、本明細書、特に実施例に記載されている。pH並びに（遊離）カルシウム、一価塩及びEDTA濃度に関する上記特徴及び実施形態は、不活性化ステップが行われる時点の試料における条件である。

50

【0167】

したがって、更なる一態様においては、試料中のポリペプチドを消化する方法であって、前記方法が、

a) 試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 試料中のポリペプチドの少なくとも部分的消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ、ここで、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、
ステップを含む方法を提供する。

10

【0168】

別の見方をすれば、上記方法のステップc)は、

c) 試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化すること、
ここで、

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記試料がEDTAを本質的に含まない、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、
を含む。

20

【0169】

好ましくは、前記試料中の遊離カルシウム（又はカルシウム）濃度は約80 μ M以下であり、かつ、前記試料中の一価塩濃度は少なくとも約20 mMである。好ましくは、一価塩は、一価無機塩、好ましくはナトリウム塩又はカリウム塩、より好ましくは塩化カリウム又は塩化ナトリウム、最も好ましくは塩化ナトリウムである。消化ステップb)については、上述したとおりである。

【0170】

上述したように、消化は部分消化でも完全消化でもよい。本発明に有用であるプロテイナーゼは、非特異的であり、十分な時間が与えられると、酵素機能を可能にする条件下で試料中のタンパク質を完全に消化する。

30

【0171】

ここで、「試料中のポリペプチドを消化する」とは、試料中の完全長ポリペプチド量がある程度まで減少することを意味する。タンパク質消化の程度は、幾つかの周知の分析によって直接分析することができる。適切な分析をそれらの意図された目的で設計することは、当業者の能力の範囲内であろう。例えば、試料中の酵素の残存活性をタンパク質分解の尺度として使用することができる。例えば質量分析法によって測定することができる、プロテオームプロファイルの変化を使用して、試料におけるポリペプチド分解の程度を測定することもできる。タンパク質分解の程度を可視化する単純な分析は、SDS Page 及びクーマシーブルーなどのタンパク質染色色素又は他の視覚的なレポーター分子を用いた染色を行うことである。インタクトなタンパク質は、ゲルに沿ってバンドとして表示され、バンドはタンパク質分解の増加と共にシャープでなくなる。分解の程度は、ソフトウェアに基づく画像解析によって定量化することができる。

40

【0172】

好ましくは、プロテイナーゼを添加した試料は、細胞性物質を含む。好ましくは、試料はクルードな細胞抽出物を含む。好ましくは、試料は部分精製細胞抽出物を含む。好ましくは、試料は細胞集団を含む。前記試料中の細胞は、インタクトでも溶解されていてもよく、好ましくは溶解されていてもよい。好ましくは、試料は、組織試料又は1以上の体液を含む。好ましくは、試料は、約1 $\times$ 10³～約1 $\times$ 10⁶の細胞を含む。好ましい一実施形態においては、試料は、1 $\times$ 10³～1 $\times$ 10⁶の細胞、好ましくは1 $\times$ 10³～1 $\times$ 10⁶の細胞、

50

好ましくは1～100の細胞を含む。好ましい一実施形態においては、試料は単細胞を含む。別の好ましい実施形態においては、試料は、100～1,000,000の細胞、好ましくは100～10,000の細胞、好ましくは100～1000の細胞を含む。好ましくは、試料は細針又は液体生検材料である。プロテイナーゼは、細胞性物質の溶解に使用することができる。

【0173】

本発明のプロテイナーゼを使用して、試料中に存在する任意のポリペプチドを消化することができる。好ましくは、試料中のポリペプチドとしては、本明細書の別の所で記述するものなど、カプシド若しくは足場タンパク質、DNA若しくはRNA結合タンパク質、及び／又はDNA若しくはRNAに作用する酵素が挙げられる。

10

【0174】

更なる一態様においては、本発明は、試料中のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化する方法を提供する。前記プロテイナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、前記方法は、試料を加熱して前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性な断片を不活性化するステップを含み、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである。

【0175】

別の見方をすれば、本発明は、試料中のプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化する方法であって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含み、前記方法が、試料を加熱して前記プロテイナーゼ又は酵素的に活性な断片を不活性化するステップを含み、

20

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記試料がEDTAを本質的に含まない、好ましくはカルシウムキレート剤を本質的に含まない、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、
方法を提供する。

【0176】

本発明の方法のすべてにおいては、好ましくは、前記試料中の遊離カルシウム（又はカルシウム）濃度が約80 μ M以下であり、かつ、前記試料中の一価塩濃度が少なくとも約20 mMである。好ましくは、一価塩は、一価無機塩、好ましくはナトリウム塩又はカリウム塩、より好ましくは塩化カリウム又は塩化ナトリウム、最も好ましくは塩化ナトリウムである。

30

【0177】

上述したように、本発明の方法においては、本明細書の別の所で記述する遊離カルシウム（又はカルシウム）及び一価塩濃度は、不活性化ステップの開始時の試料中濃度である。好ましくは、濃度は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片との接触後の試料中濃度でもある。本発明の方法においては、好ましくは、プロテイナーゼは、例えば、精製、抽出又は遠心分離によって、試料から除去されず、好ましくは、試料中のプロテイナーゼ濃度は、不活性化ステップ前又はステップ中に希釈されない。

【0178】

40

本発明は、本明細書に記載のプロテイナーゼが、遊離カルシウム及び／又は一価塩のある濃度が与えられると、穏和な条件下で易熱性になるという驚くべき知見に基づく。したがって、これらの条件は、本発明の方法の不活性化ステップ中に存在する必要がある。当業者は、試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させると、試料の体積が増加し、したがってその中の遊離カルシウム及び一価塩濃度が減少し得ることを容易に理解するであろう。使用中、好ましくは、本発明の組成物は、試料の体積を大きく変えない小さい体積を有する。同様に、本発明のプロテイナーゼは、本発明によれば、溶液中の遊離カルシウム濃度が約80 μ Mを超え、及び／又は一価塩濃度が約20 mM未満であるが、それが添加される試料中の遊離カルシウム及び／又は一価塩の体積及び濃度は、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片が適用された生成試料が約80 μ M以下の遊離カ

50

ルシウム濃度及び少なくとも約 20 mM の一価塩濃度を含むような溶液中で提供することができる。。

【0179】

好ましくは、本発明の方法における前記不活性化ステップは、前記試料中の前記プロテイナーゼの活性を、前記不活性化ステップが行われる前の試料中のプロテイナーゼの活性に対して少なくとも 75 %、より好ましくは少なくとも 80 % 又は少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 減少させることを含む。別の見方をすれば、好ましくは、前記不活性化ステップは、25 % 未満、より好ましくは 20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、2 % 未満、1 % 未満の残存プロテイナーゼ活性をもたらす。好ましくは、プロテイナーゼは完全に不活性化され、すなわち、好ましくは、検出可能なプロテイナーゼ活性が残らない。

10

【0180】

熱処理プロテイナーゼを含む溶液が温度 40 °C 未満に戻っても、本発明のプロテイナーゼは活性を取り戻さず、すなわち、残存活性がほとんどなく、具体的には、10 % 未満、好ましくは 5 %、2 %、1 %、0.5 % 又は 0.1 % 未満であり、最も好ましくは検出可能なプロテイナーゼ活性が残らない。したがって、本明細書で言う不活性化は不可逆である。

【0181】

上述したように、プロテイナーゼ活性を測定する適切な分析は、当該技術分野で既知である。したがって、こうした分析を使用して、熱処理を受けない同じプロテイナーゼのプロテイナーゼ活性と比較して、熱処理によって不活性化を受けたプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片のプロテイナーゼ活性を測定することができ、それによって、残存活性、又は不活性化ステップによって達成される不活性化の程度を求めることができる。任意のプロテイナーゼ活性分析を使用して、未処理プロテイナーゼに対する熱処理プロテイナーゼの相対活性を求めることができる。同じ熱処理及び未処理プロテイナーゼは、同一条件下で維持すべきであり、同一手順で分析すべきであることを当業者はよく知っているであろう。好ましくは、使用される分析は上記分析 A であり、好ましくは、未処理プロテイナーゼは、プロテイナーゼ活性が測定されるまで氷上で維持される。残存活性の更に好ましい分析は、実施例に開示したものである。

20

30

【0182】

したがって、本発明の方法の不活性化ステップ後の残存活性、すなわち、本発明の方法の不活性化ステップによって達成される不活性化の程度は、不活性化ステップを受けたプロテイナーゼのプロテイナーゼ活性を適切なプロテイナーゼ分析を用いて適切な条件下で測定し、それをこうした不活性化ステップを受けなかった同じプロテイナーゼの活性と比較することによって、当業者が容易に測定することができる。活性は、同じ分析を用いて同じ条件下で測定される。好ましくは、使用される分析は上記分析 A であり、又は本実施例に使用される分析のいずれか一つである。好ましくは、未処理プロテイナーゼは、プロテイナーゼ活性が測定されるまで氷上で維持される。

【0183】

不活性化の程度は、未処理プロテイナーゼの活性に対する不活性化率又は残存活性率として表すことができる。

40

【0184】

試料中の遊離カルシウム濃度が約 80 μ M 以下であり、及び／又は試料中の一価塩濃度が少なくとも約 20 mM であるため、試料中のプロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片を穏和な加熱条件で不活性化することができる。

【0185】

試料を所望の温度に所望の時間、例えば、熱ブロック、マイクロ波、ジュール加熱装置、レーザー加熱装置又は水浴を使用して、加熱することは当業者の能力の範囲内であろう。

50

【0186】

本方法の不活性化ステップ中に試料を加熱する温度、すなわち、プロテイナーゼを暴露する温度を不活性化温度と称する。好ましくは、前記不活性化温度は、 $\leq$ 約70℃、好ましくは $\leq$ 約67℃、好ましくは $\leq$ 約65℃、好ましくは $\leq$ 約64℃、好ましくは $\leq$ 約63℃、好ましくは $\leq$ 約62℃、好ましくは $\leq$ 約61℃、好ましくは $\leq$ 約60℃、好ましくは $\leq$ 約58℃である。

【0187】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約50～約67℃、好ましくは約50～約65℃、好ましくは約50～約64℃、好ましくは約50～約63℃、好ましくは約50～約62℃、好ましくは約50～約61℃、好ましくは約50～約60℃、好ましくは約50～約58℃に加熱することを含む。

10

【0188】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約53～約67℃、好ましくは約53～約65℃、好ましくは約53～約64℃、好ましくは約53～約63℃、好ましくは約53～約62℃、好ましくは約53～約61℃、好ましくは約53～約60℃、好ましくは約53～約58℃に加熱することを含む。

【0189】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約55～約67℃、好ましくは約55～約65℃、好ましくは約55～約64℃、好ましくは約55～約63℃、好ましくは約55～約62℃、好ましくは約55～約61℃、好ましくは約55～約60℃に加熱することを含む。

20

【0190】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約56～約67℃、好ましくは約56～約65℃、好ましくは約56～約64℃、好ましくは約56～約63℃、好ましくは約56～約62℃、好ましくは約56～約61℃、好ましくは約56～約60℃に加熱することを含む。

【0191】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約57～約67℃、好ましくは約57～約65℃、好ましくは約57～約64℃、好ましくは約57～約63℃、好ましくは約57～約62℃、好ましくは約57～約61℃、好ましくは約57～約60℃に加熱することを含む。

30

【0192】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約58～約67℃、好ましくは約58～約65℃、好ましくは約58～約64℃、好ましくは約58～約63℃、好ましくは約58～約62℃、好ましくは約58～約61℃、好ましくは約58～約60℃に加熱することを含む。

【0193】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約59～約67℃、好ましくは約59～約65℃、好ましくは約59～約64℃、好ましくは約59～約63℃、好ましくは約59～約62℃、好ましくは約59～約61℃、好ましくは約59～約60℃に加熱することを含む。

40

【0194】

好ましくは、前記不活性化ステップは、プロテイナーゼを含む試料を温度約55℃～約65℃、好ましくは約60℃～約65℃、より好ましくは約55℃～約60℃に加熱することを含む。

【0195】

特に好ましくは、前記不活性化ステップは、約53℃～約60℃、より好ましくは約53℃～約58℃、より好ましくは約55℃で加熱することを含む。

【0196】

特に好ましくは、前記不活性化ステップは、約58℃～約67℃、より好ましくは約5

50

8℃～約63℃、より好ましくは約60℃で加熱することを含む。

【0197】

特に好ましくは、前記不活性化ステップは、約60～約67℃、より好ましくは約63～約67℃、より好ましくは約65℃で加熱することを含む。

【0198】

好ましくは、不活性化ステップは、試料を上記温度のいずれか一つで「保持時間」と呼ばれる時間加熱することを含む。必要な保持時間は、使用する不活性化温度、試料中の遊離カルシウム及び一価塩濃度、並びに必要な不活性化の程度に依存する。本願の教示を考慮して、当業者は、それら特定の目的のための保持時間を選択することができるであろう。

10

【0199】

好ましくは、保持時間は、≤約75分間、好ましくは≤約60分間、好ましくは≤約55分間、好ましくは≤約50分間、好ましくは≤約45分間、好ましくは≤約40分間、好ましくは≤約35分間、好ましくは≤約30分間、好ましくは≤約25分間、好ましくは≤約20分間、好ましくは≤約15分間、好ましくは≤約10分間、好ましくは≤約5分間、好ましくは≤約2分間である。

【0200】

好ましくは、保持時間は、少なくとも約1分間、好ましくは少なくとも約2分間、好ましくは少なくとも約5分間、好ましくは少なくとも約10分間、好ましくは少なくとも約15分間、好ましくは少なくとも約20分間、好ましくは少なくとも約25分間、好ましくは少なくとも約30分間、好ましくは少なくとも約35分間、好ましくは少なくとも約40分間、好ましくは少なくとも約45分間、好ましくは少なくとも約50分間、好ましくは少なくとも約60分間である。

20

【0201】

好ましくは、保持時間は、約2～約75分間、好ましくは約2～約60分間、好ましくは約2～約55分間、好ましくは約2～約50分間、好ましくは約2～約45分間、好ましくは約2～約40分間、好ましくは約2～約35分間、好ましくは約2～約30分間、好ましくは約2～約25分間、好ましくは約2～約20分間、好ましくは約2～約15分間、好ましくは約2～約10分間、好ましくは約2～約5分間である。

【0202】

好ましくは、保持時間は、約5～約75分間、好ましくは約5～約60分間、好ましくは約5～約55分間、好ましくは約5～約50分間、好ましくは約5～約45分間、好ましくは約5～約40分間、好ましくは約5～約35分間、好ましくは約5～約30分間、好ましくは約5～約25分間、好ましくは約5～約20分間、好ましくは約5～約15分間、好ましくは約5～約10分間である。

30

【0203】

好ましくは、保持時間は、約10～約75分間、好ましくは約10～約60分間、好ましくは約10～約55分間、好ましくは約10～約50分間、好ましくは約10～約45分間、好ましくは約10～約40分間、好ましくは約10～約35分間、好ましくは約10～約30分間、好ましくは約10～約25分間、好ましくは約10～約20分間、好ましくは約10～約15分間である。

40

【0204】

好ましくは、保持時間は、約15～約75分間、好ましくは約15～約60分間、好ましくは約15～約55分間、好ましくは約15～約50分間、好ましくは約15～約45分間、好ましくは約15～約40分間、好ましくは約15～約35分間、好ましくは約15～約30分間、好ましくは約15～約25分間、好ましくは約15～約20分間である。

【0205】

好ましくは、保持時間は、約20～約75分間、好ましくは約20～約60分間、好ましくは約20～約55分間、好ましくは約20～約50分間、好ましくは約20～約45

50

分間、好ましくは約 20～約 40 分間、好ましくは約 20～約 35 分間、好ましくは約 20～約 30 分間、好ましくは約 20～約 25 分間である。

【0206】

好ましくは、保持時間は、約 25～約 75 分間、好ましくは約 25～約 60 分間、好ましくは約 25～約 55 分間、好ましくは約 25～約 50 分間、好ましくは約 25～約 45 分間、好ましくは約 25～約 40 分間、好ましくは約 25～約 35 分間、好ましくは約 25～約 30 分間である。

【0207】

好ましくは、保持時間は、約 30～約 75 分間、好ましくは約 30～約 60 分間、好ましくは約 30～約 55 分間、好ましくは約 30～約 50 分間、好ましくは約 30～約 45 分間、好ましくは約 30～約 40 分間、好ましくは約 30～約 35 分間である。

10

【0208】

好ましくは、保持時間は、約 35～約 75 分間、好ましくは約 35～約 60 分間、好ましくは約 35～約 55 分間、好ましくは約 35～約 50 分間、好ましくは約 35～約 45 分間、好ましくは約 35～約 40 分間である。

【0209】

好ましくは、保持時間は、約 40～約 75 分間、好ましくは約 40～約 60 分間、好ましくは約 40～約 55 分間、好ましくは約 40～約 50 分間、好ましくは約 40～約 45 分間である。

【0210】

20

好ましくは、保持時間は、約 45～約 75 分間、好ましくは約 45～約 60 分間、好ましくは約 45～約 55 分間、好ましくは約 45～約 50 分間である。

【0211】

好ましくは、保持時間は、約 50～約 75 分間、好ましくは約 50～約 60 分間、好ましくは約 50～約 55 分間である。

【0212】

好ましくは、保持時間は、約 55～約 75 分間、好ましくは約 55～約 60 分間である。

【0213】

好ましくは、保持時間は、約 5 分間～約 40 分間、好ましくは約 10～約 35 分間、好ましくは約 15～約 30 分間である。特に好ましくは、保持時間は、約 5～約 15 分間、又は約 10～約 20 分間、又は約 20～約 40 分間、好ましくは約 25～約 35 分間である。

30

【0214】

上記保持時間は、体積 $\leq 1000\mu\text{l}$ 、好ましくは $\leq 500\mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 300\mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 250\mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 200\mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 150\mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 100\mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 75\mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 50\mu\text{l}$ である試料に特に適切である。

【0215】

当業者は、加熱温度と保持時間の一方の調節を他方を調節することによって補償できることを知っている。例えば、不活性化温度の上昇によって、保持時間を短縮できる可能性がある。逆に、保持時間の延長によってより低い不活性化温度を使用できる可能性がある。

40

【0216】

さらに、当業者は、存在するプロテイナーゼの量が少ないとき、例えば、マイクロ流体試料の場合には、十分な不活性化が極めて短い時間枠で、例えば、1～30秒、好ましくは1～20秒、好ましくは1～10秒、好ましくは1～5秒、潜在的には1又は2秒のみのうちにでも起こり得ることを知っている。上記不活性化温度のいずれもこれらの短い保持時間で使用することができる。こうした短い保持時間が有効であるためには、不活性化されるプロテイナーゼを含む試料は、好ましくは、体積が $\leq 10\mu\text{l}$ 、好ましくは $\leq 5\mu$

50

1、より好ましくは $\leq 1 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.5 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.1 \mu\text{l}$ である。

【0217】

不活性化ステップを含む本発明の方法においては、上記不活性化温度のいずれかを上記保持時間のいずれかと組み合わせることができる。本明細書の別の所で開示する不活性化温度と保持時間の任意のすべての組合せが明確に開示される。

【0218】

好ましくは、不活性化ステップは、温度約 53°C ～約 67°C 、好ましくは約 55°C ～約 65°C 、好ましくは約 55 ～約 63°C で保持時間約 2 ～約 75 分間、好ましくは約 5 ～約 40 分間、より好ましくは約 10 ～約 30 分間、例えば、約 10 、約 15 又は約 30 分間の加熱を含む。

10

【0219】

好ましくは、不活性化ステップは、温度約 55 ～約 60°C で保持時間約 2 ～約 75 分間、好ましくは約 5 ～約 40 分間、より好ましくは約 10 ～約 30 分間、例えば、約 10 、約 15 又は約 30 分間の加熱を含む。

【0220】

好ましくは、不活性化ステップは、温度約 60 ～約 65°C で保持時間約 2 ～約 75 分間、好ましくは約 5 ～約 40 分間、より好ましくは約 10 ～約 20 分間、例えば、約 10 又は約 15 分間の加熱を含む。

【0221】

20

本発明の好ましい不活性化ステップは、以下のとおりである。

【0222】

A) 約 53 ～約 58°C 、好ましくは約 55°C で約 45 ～約 75 分間、より好ましくは約 45 ～約 60 分間、より好ましくは約 60 分間の加熱。

こうした実施形態においては、試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約 $10 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq$ 約 $8 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq 5 \mu\text{M}$ であり、より好ましくは、試料は遊離カルシウムを含まない。

【0223】

その代わりに、又はそれに加えて、こうした実施形態においては、試料中の一価塩濃度は、好ましくは少なくとも約 50mM 、より好ましくは少なくとも約 75mM 、より好ましくは少なくとも約 100mM 又は少なくとも約 150mM である。

30

【0224】

B) 約 58 ～約 63°C 、好ましくは約 60°C で下記B1～B4のいずれか一つに記載の以下の時間の加熱。

B1) 約 2 ～約 40 分間、より好ましくは約 5 ～約 30 分間。

こうした実施形態においては、試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約 $80 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq$ 約 $65 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq$ 約 $35 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq$ 約 $20 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq$ 約 $10 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq$ 約 $5 \mu\text{M}$ である。

【0225】

その代わりに、又はそれに加えて、こうした実施形態においては、試料中の一価塩濃度は、好ましくは少なくとも約 20mM 、より好ましくは少なくとも約 25mM 、より好ましくは少なくとも約 30mM 、より好ましくは少なくとも約 40mM 、より好ましくは少なくとも約 50mM 、より好ましくは少なくとも約 75mM 、より好ましくは少なくとも約 100mM 、より好ましくは少なくとも約 150mM である。

40

【0226】

B2) 約 5 ～約 15 分間、より好ましくは約 10 分間。

こうした実施形態においては、試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約 $10 \mu\text{M}$ 、 $\leq$ 約 $8 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq$ 約 $5 \mu\text{M}$ であり、より好ましくは、試料は遊離カルシウムを含まない。

【0227】

50

その代わりに、又はそれに加えて、こうした実施形態においては、試料中の一価塩濃度は、好ましくは少なくとも約 75 mM、より好ましくは少なくとも約 100 mM、より好ましくは少なくとも約 150 mM である。

【0228】

B3) 約 10～約 20 分間、より好ましくは約 15 分間。

こうした実施形態においては、試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約 35 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 16 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 8 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 5 μ M であり、より好ましくは、試料は遊離カルシウムを含まない。

【0229】

その代わりに、又はそれに加えて、こうした実施形態においては、試料中の一価塩濃度は、好ましくは少なくとも約 50 mM、より好ましくは少なくとも約 75 mM、より好ましくは少なくとも約 100 mM、より好ましくは少なくとも約 150 mM である。

【0230】

B4) 約 20～40 分間、より好ましくは約 30 分間。

こうした実施形態においては、試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約 80 μ M、 $\leq$ 約 65 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 35 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 30 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 16 μ M である。

【0231】

その代わりに、又はそれに加えて、こうした実施形態においては、試料中の一価塩濃度は、好ましくは少なくとも約 25 mM、より好ましくは少なくとも約 30 mM、より好ましくは少なくとも約 40 mM、より好ましくは少なくとも約 50 mM、より好ましくは少なくとも約 75 mM、より好ましくは少なくとも約 100 mM である。

【0232】

好ましくは、こうした実施形態においては、一価塩濃度が 100 mM 以下である場合、カルシウム濃度は 30 μ M 以下である。好ましくは、一価塩濃度が 75 mM 以下である場合、カルシウム濃度は 20 μ M 以下である。好ましくは、一価塩濃度が 50 mM 以下である場合、カルシウム濃度は 10 μ M 以下である。

【0233】

C) 約 63～約 67 $^{\circ}$ C、好ましくは約 65 $^{\circ}$ C で最大約 15 分間、より好ましくは最大約 10 分間、より好ましくは最大約 5 分間加熱。

こうした実施形態においては、試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約 80 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 65 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 35 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 20 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 10 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 5 μ M である。

【0234】

その代わりに、又はそれに加えて、こうした実施形態においては、試料中の一価塩濃度は、好ましくは少なくとも約 20 mM、より好ましくは少なくとも約 25 mM、より好ましくは少なくとも約 30 mM、より好ましくは少なくとも約 40 mM、より好ましくは少なくとも約 50 mM、より好ましくは少なくとも約 75 mM、より好ましくは少なくとも約 100 mM である。

【0235】

本発明者らによって確認された易熱性に対する遊離カルシウム依存的及び一価塩依存的な効果も、本発明のプロテイナーゼ及び酵素的に活性なその断片の不活性化を高温で驚くほど短時間で可能にする。したがって、別の好ましい一実施形態においては、不活性化ステップは、以下を含む。

【0236】

D) 約 65～約 70 $^{\circ}$ C、好ましくは約 67～約 70 $^{\circ}$ C、より好ましくは約 67 $^{\circ}$ C 又は約 70 で最大約 5 分間、より好ましくは最大約 2 分間の加熱。

こうした実施形態においては、試料中の遊離カルシウム濃度は、好ましくは $\leq$ 約 80 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 65 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 35 μ M、より好ましくは $\leq$ 約 20 μ M である。

【0237】

その代わりに、又はそれに加えて、こうした実施形態においては、試料中の一価塩濃度は、好ましくは少なくとも約20 mM、より好ましくは少なくとも約25 mM、より好ましくは少なくとも約30 mM、より好ましくは少なくとも約40 mM、より好ましくは少なくとも約50 mM、より好ましくは少なくとも約75 mM、より好ましくは少なくとも約100 mMである。

【0238】

最も好ましくは、加熱／不活性化ステップc)は、試料を温度55～60℃で15～30分間加熱することを含む。

【0239】

パラメータである加熱時間、加熱温度、遊離カルシウム濃度及び一価塩濃度の1つの調節は、その他の1つ以上の調節によって補償できることを当業者は容易に理解できる。

【0240】

しかし、非常に重要なことに、本発明によれば、最高遊離カルシウム濃度は80 μMである。有利な穏和な条件下で、特に不活性化温度53～67℃及び保持時間2～75分間、好ましくは5～60分間、より好ましくは10～40分間、好ましくは15～30分間で、プロテイナーゼの実質的な不活性化（75%不活性化）が達成され得る程度に本発明のプロテイナーゼの易熱性が誘導されるのは、この遊離カルシウム濃度以下である。

【0241】

同様に、本発明によれば、最低一価塩濃度は20 mMである。有利な穏和な条件下で、特に不活性化温度53～67℃及び保持時間2～75分間、好ましくは5～60分間、より好ましくは10～40分間、好ましくは15～30分間で、プロテイナーゼの実質的な不活性化（75%不活性化）が達成され得る程度に本発明のプロテイナーゼの易熱性が誘導されるのは、この一価塩濃度以上である。

【0242】

上述したように、当該分野で使用される標準プロテイナーゼの典型的な不活性化手順は、はるかに過酷な条件、例えば、75℃で5分間の加熱（BioRad手順）、95℃で10分間の加熱（New England Biolabs手順）、70℃で15分間の加熱（Qiagen手順）を必要とする。

【0243】

本発明の方法においては、好ましくは、試料は、それがプロテイナーゼと接触する時点で、EDTAを本質的に含まず、より好ましくはEDTAを含まず、より好ましくはどんなカルシウムキレート剤も含まない。別の見方をすれば、好ましくは、プロテイナーゼが適用される試料は、EDTAを本質的に含まず、より好ましくはEDTAを含まず、好ましくはどんなカルシウムキレート剤も含まない。好ましくは、本発明の方法は、プロテイナーゼの添加後にEDTA、好ましくは任意のカルシウムキレート剤を試料に適用するステップを含まない。試料は、ワークフロー初期のある時点で、又はその調製中に、カルシウムキレート剤と接触した可能性があるが、その場合、カルシウムキレート剤は、プロテイナーゼ適用前に除去されていなければならない。カルシウムキレート剤は、本明細書の別の所で記述するとおりであり、試料をプロテイナーゼと接触させる前にそれらを試料から除去することは当業者の能力の範囲内である。

【0244】

上述したように、本発明のすべての方法、特に試料が一価塩を含む方法においては、好ましくは、試料はpHが6.5～9.5、好ましくは6.8～9.2、より好ましくは7～9、より好ましくは7.5～8.5、より好ましくは約8.0である。本発明者らは、本発明のプロテイナーゼが中性及び中性に近いpHを含めた穏和な条件下で不活性化され得ることを初めて確認した。したがって、好ましくは、方法は、更に、不活性化ステップ前に試料のpHを6.5～9.5、好ましくは6.8～9.2、より好ましくは7～9、より好ましくは7.5～8.5、より好ましくは約8.0に調節するステップを含む。試料のpHを調節するステップは当業者によく知られており、任意のこうしたステップを本

10

20

30

40

50

発明の方法に使用することができる。

【0245】

好ましくは、プロテイナーゼを添加する試料は体積が $\geq 10 \mu\text{l}$ である。好ましくは、試料は体積が $\leq 1000 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 500 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 300 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 250 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 200 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 150 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 100 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 75 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 50 \mu\text{l}$ である。あるいは、試料はマイクロ流体試料である。好ましくは、マイクロ流体試料は体積が $\geq 0.01 \mu\text{l}$ である。好ましくは、マイクロ流体試料は体積が $\leq 10 \mu\text{l}$ 、好ましくは $\leq 5 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 1 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.5 \mu\text{l}$ 、より好ましくは $\leq 0.1 \mu\text{l}$ である。

10

【0246】

好ましくは、プロテイナーゼ又は酵素的に活性な断片を添加する試料は、目的の生体分子及び1以上の混入、すなわち不要な、ポリペプチドを含む。

【0247】

したがって、更なる一態様においては、本発明は、目的の生体分子を試料から単離又は精製する方法を提供する。前記試料は、1以上の混入ポリペプチドを含み、前記方法は、

a) 試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 試料中のポリペプチドの少なくとも部分的消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ、ここで、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約 $80 \mu\text{M}$ である、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20mM である、及び

d) 目的の生体分子を試料から任意で除去するステップを含む。

20

【0248】

別の見方をすれば、上記方法のステップc)は、以下を含む。

【0249】

試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ、ここで、

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約 $80 \mu\text{M}$ であり、前記試料がEDTAを本質的に含まない、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約 20mM である。

30

【0250】

好ましくは、「目的の生体分子」は、核酸分子、好ましくはDNA又はRNA分子である。好ましくは、目的の生体分子は、それ自体がポリペプチドである。目的の生体分子は、プロテイナーゼでも酵素的に活性なその断片でもない。

【0251】

本発明のプロテイナーゼは、同定、定量化及び／又は増幅のためにウイルスのタンパク質カプセル中のRNA/DNAを遊離させるために、該タンパク質カプセルを消化するのに使用することができる。したがって、好ましくは、生体試料は1以上の封入ウイルスを含み、目的の生体分子は前記ウイルスの核酸分子、好ましくはRNA又はDNAであり、混入ポリペプチドは前記ウイルスタンパク質カプセルのものであり、ステップb)は、前記1又は複数のウイルスのタンパク質カプセルの少なくとも部分的消化、すなわち前記核酸分子を前記カプセルから遊離させるのに十分な消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションすることを含む。

40

【0252】

好ましくは、試料はクロマチンを含み、目的の生体分子は結合ヒストンを含まないDN

50

Aであり、混入タンパク質はそれに結合したヒストンであり、ステップb)は、試料中のヒストンの少なくとも部分的消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションすることを含む。

【0253】

好ましくは、試料は、核の増幅反応、例えば、PCR反応の産物であり、又は産物を含み、DNA結合ポリメラーゼを含み、目的の生体分子は結合ポリメラーゼを含まないDNAであり、混入タンパク質は結合ポリメラーゼであり、ステップb)は、試料中のポリメラーゼの少なくとも部分的消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションすることを含む。増幅方法としては、PCR及びその変形、3SR、SDA、LAR又はLCR及びLAMP並びにそれらの変形が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0254】

「核酸増幅反応」という用語は、核酸の標的配列又はその相補配列のコピー数を増加させる任意のインビトロ手段を指す。

【0255】

「核酸増幅反応の産物」は、したがって、当該反応の最終増幅ステップから直接得られる成分の本質的にすべてを含むと考えられる。他の成分を添加することができ、又は成分のいくつかは何らかの修飾若しくはプロセッシングを受け得るが、本質的に成分のどれも、又は少なくとも核酸成分のどれも、除去されない。好ましくは、核酸増幅反応の産物は、最終増幅ステップの直接産物である。しかし、核酸増幅反応の産物は、取り込まれないNTPの脱リン酸化を起こす処理、例えば、本発明のプロテイナーゼによる処理前にアルカリホスファターゼ、好ましくは易熱性アルカリホスファターゼ、例えば、易熱性エビアルカリホスファターゼ(SAP)による処理を受けることが好ましい場合もある。有利な組換えSAPは、Arcticzymes(商標)ASから入手可能である。

20

【0256】

好ましくは、前記試料中の目的の生体分子は、1以上のペプチド結合を介して分子、好ましくはポリペプチドに結合する。更なる一態様においては、本発明は、したがって、目的の生体分子を、1以上のペプチド結合を介してそれに結合した分子、好ましくはポリペプチドから遊離させる方法を提供する。前記方法は、

a) 試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

30

b) 1以上のペプチド結合の消化によって目的の生体分子の遊離を可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ、ここで、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、及び

d) 目的の生体分子を試料から任意で除去するステップ

を含む。

【0257】

40

別の見方をすれば、上記方法のステップc)は、試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップを含み、

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記試料がEDTAを本質的に含まない、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである。

【0258】

好ましくは、目的の生体分子はポリペプチド又はタンパク質であり、それが結合する分子は、ポリペプチドシグナル配列又は融合タグ、好ましくはhisタグ(例えば、ヘキサヒスチジンタグ)、FLAGタグ、マルトース結合タンパク質(MBP)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン(TRX)、低分子ユビキチン様修飾

50

因子 (SUMO)、ユビキチン (Ub) 又は緑色蛍光タンパク質 (GFP) である。

【0259】

更なる一態様においては、本発明は、目的のペプチドを前駆体ポリペプチドから生成する方法を提供する。前記方法は、

a) ポリペプチドをプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 目的のペプチドを遊離させるために、前駆体ポリペプチドの消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップ、

c) 試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ、ここで

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、及び

d) 目的の生体分子を試料から任意で除去するステップを含む。

【0260】

別の見方をすれば、上記方法のステップc)は、試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップを含み、

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記試料がEDTAを本質的に含まない、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである。

【0261】

プロテイナーゼは、1以上の細胞を組織内の別の細胞から、又はそれらが付着した基質から、細胞外基質タンパク質の消化によって分離するのにも使用される。更なる一態様においては、本発明は、1以上の細胞を組織内の別の細胞から、又は前記1以上の細胞が付着した基質から分離する方法を提供する。前記方法は、

a) 1以上の細胞をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 1以上の細胞の遊離を1以上の細胞外基質タンパク質の消化によって可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ、ここで、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、及び

d) 目的の生体分子を試料から任意で除去するステップを含む。

【0262】

別の見方をすれば、上記方法のステップc)は、試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップを含み、

i) 前記試料中のカルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mであり、前記試料がEDTAを本質的に含まない、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである。

【0263】

好ましくは、試料は、ポリペプチドを含むポリアクリルアミドゲルであり、又は該ポリアクリルアミドゲルを含み、前記ポリペプチドの消化が質量分析法による分析のための小断片の作製に要求される。したがって、本発明は、好ましくは質量分析のために、タンパク質断片試料を調製する方法を提供する。前記方法は、

a) 1以上のポリペプチドを含む試料をプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片と接触させるステップであって、前記プロテイナーゼが配列番号1のアミノ酸配列又は配列

10

20

30

40

50

番号1と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含むステップ、

b) 試料中のポリペプチドの少なくとも部分的消化を可能にする条件下で試料をインキュベーションするステップ、及び

c) 試料を加熱してプロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を不活性化するステップ、ここで、

i) 前記試料中の遊離カルシウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は

ii) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである、及び

d) 目的の生体分子を試料から任意で除去するステップを含む。

【0264】

好ましくは、試料は、1以上のポリペプチドを含むポリアクリルアミドゲルである。

【0265】

好ましくは、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片を添加する試料は、1以上の更なる酵素を含む。好ましくは、前記更なる酵素は、ヌクレアーゼ（好ましくは、デオキシリボヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、Bal31ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ又はS1ヌクレアーゼ）、ポリメラーゼ（好ましくは、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼ）、逆転写酵素、リガーゼ、（好ましくは、DNAリガーゼ又はRNAリガーゼ）、メチラーゼ、トランスフェラーゼ（好ましくは、ポリヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ）、トポイソメラーゼ、グアニルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ（好ましくは、アルカリホスファターゼ、好ましくは、易熱性アルカリホスファターゼ、より好ましくは、エビアルカリホスファターゼ）、キナーゼ、ヘリカーゼ、制限酵素及びグリコシラーゼからなる群から選択される。試料は、好ましくは、こうした更なる酵素の組合せを含む。好ましくは、試料は、DNAポリメラーゼ又は逆転写酵素を含む。好ましくは、こうした酵素は外因性酵素であり、すなわち、試料内の細胞でも試料中の細胞性物質が由来する細胞でも発現されない。本発明の方法は、こうした追加の酵素によって許容され得る有利な穏和なプロテイナーゼ不活性化条件を提供し、したがって、こうした酵素がプロテイナーゼ不活性化ステップ中に存在することができ、それによって後続のワークフローを単純化することができる。

【0266】

上述したように、当該分野で現在使用される標準プロテイナーゼであるプロテイナーゼKは、試料中の酵素又は目的の生体分子を損傷させ得る高温での不活性化を必要とした。プロテイナーゼKの不活性化が高温加熱なしで要求される場合、プロテイナーゼを試料から除去するか、又は酵素の濃度をかなり希釈しなければならない。こうした除去又は希釈ステップは、ワークフローを延長し、コストを増加させ、試料中の材料の損失又は損傷をもたらす得る。それらは、小さい試料サイズを処理するときに特に不適である。

【0267】

好ましくは、プロテイナーゼを添加する試料は体積が $\leq$ 1000 μ l、より好ましくは $\leq$ 500 μ l、より好ましくは $\leq$ 300 μ l、より好ましくは $\leq$ 250 μ l、より好ましくは $\leq$ 200 μ l、より好ましくは $\leq$ 150 μ l、より好ましくは $\leq$ 100 μ l、より好ましくは $\leq$ 75 μ l、より好ましくは $\leq$ 50 μ lである。あるいは、試料はマイクロ流体試料である。好ましくは、マイクロ流体試料は体積が $\geq$ 0.01 μ lである。好ましくは、マイクロ流体試料は体積が $\leq$ 10 μ l、好ましくは $\leq$ 5 μ l、より好ましくは $\leq$ 1 μ l、より好ましくは $\leq$ 0.5 μ l、より好ましくは $\leq$ 0.1 μ lである。

【0268】

したがって、好ましくは、上記方法のいずれかは、不活性化ステップに続いて、基質の酵素触媒作用を含むステップを含み、前記後続ステップは、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに行われる。

【0269】

「事前の除去なしに」とは、プロテイナーゼが試料から、例えば、精製、抽出又は遠心分離によって、物理的に除去されないことを意味する。

10

20

30

40

50

【0270】

「事前の希釈なし」とは、試料中のプロテイナーゼ濃度がさほど希釈されない、すなわち、希釈によって実質的に不活性化されないことを意味する。実質的に不活性化の定義については、本明細書の別の所で記述する。好ましくは、試料中のプロテイナーゼ濃度は、4倍を超えて、より好ましくは3倍を超えて、より好ましくは2倍を超えて希釈されない。

【0271】

好ましくは、試料は1以上の核酸分子を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに核酸分子のヌクレアーゼ媒介消化のステップを含む。

10

【0272】

好ましくは、試料は1以上の核酸分子を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに核酸分子のリン酸化又は脱リン酸化のステップを含む。

【0273】

好ましくは、試料は1以上の核酸分子を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに核酸分子の連結のステップを含む。

【0274】

好ましくは、試料は1以上のRNA分子を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに逆転写のステップを含む。

20

【0275】

好ましくは、試料は1以上の核酸分子を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに核酸重合のステップを含む。

【0276】

好ましくは、試料は1以上の核酸分子を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに核酸増幅のステップを含む。

30

【0277】

好ましくは、試料は1以上の核酸分子を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしにナノポア配列決定のステップを含む。

【0278】

好ましくは、試料は1以上のウイルス粒子又は細胞、好ましくは細菌細胞を含み、方法は、不活性化ステップに続いて、プロテイナーゼ又は酵素的に活性なその断片の事前の除去又は希釈なしに細胞溶解のステップを含む。

【実施例】

【0279】

40

実施例1：プロテイナーゼ比活性

すべての実施例において、プロテイナーゼKをThermo Fischerから購入し（prod. No. E00491、28.9 kDa）、プロテイナーゼXをArctic Zymesにおいて*Pichia pastoris*の組換えによって生成させた（バッチ1602-1、配列番号1）。

【0280】

2つのプロテイナーゼの比活性（U/mgプロテイナーゼ）を測定するために、溶液中のプロテイナーゼ濃度をまずNanoDropによって測定した。NanoDropは、波長280nmにおける吸光度を測定してタンパク質濃度を定量化する分光光度手法である。

50

【0281】

プロテイナーゼKは、濃度14.3mg/mlで存在することが確認された。10,000倍希釈原液(1.43μg/ml)を続いて使用した。プロテイナーゼXは、濃度9.2mg/mlで存在することが確認された。1,000倍希釈原液(9.2μg/ml)を続いて使用した。

【0282】

プロテイナーゼX及びKの活性(U/ml)を標準動力学的ペプチドベース分析によって測定した。1000μlキュベットに

0.4μg/mlプロテイナーゼX又は0.06μg/mlプロテイナーゼK

1mM基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

12mM NaCl、0.1M Tris-HCl pH8、10mM CaCl₂、

1%DMSO

を総体積1000μlで供給した。

【0283】

4-ニトロアニリンへの基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NAの酵素切断を410nm(EM8.8)における吸光度の増加をUV分光光度計(Ultrospec 2000、Pharmacia Biotech、スウェーデン)を用いて25℃で2分間測定することによって分析した。1分間あたり1μmolの4-ニトロアニリンを25℃で生成する酵素の量を1単位と定義する。

【0284】

以下の比活性を測定した(表1)。

【0285】

【表5】

表1: プロテイナーゼX及びKの比活性

	U/ml	mg/ml	比活性
プロテイナーゼX	~600	9.2	~65(U/mg)
プロテイナーゼK	~5700	14.3	~400(U/mg)

【0286】

異なる業者からのプロテイナーゼKのバイアルを用いて結果を確認した(Sigma、O4850、400U/mgまで測定)。

【0287】

実施例2: プロテイナーゼ活性に対する遊離カルシウム濃度の効果

プロテイナーゼX及びKの活性を様々な温度で標準ペプチドベース分析によって測定した。1.5mlキュベットに

0.37μg/mlプロテイナーゼX又は0.06μg/mlプロテイナーゼK(24mU/mlプロテイナーゼに相当)

1mM基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

12mM NaCl、0.1M Tris-HCl、pH8.0、10mM CaCl₂、

2、

1%DMSO

を総体積1000μlで供給した。

【0288】

キュベットを指示温度で分析の間インキュベーションした。4-ニトロアニリンへの基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NAの酵素切断を410nm(EM8.8)における吸光度の増加を経時的に30秒間1.5mLセミマイクロキュベット(Brand、ドイツ)中でUV分光光度計(Ultrospec 2000、Pharmacia Biotech、スウェーデン)を用いて測定することによって分析した。

【0289】

10

20

30

40

50

65℃で観察された最大活性に対する%相対活性として活性を計算した。65℃を超える測定は技術的に不可能であった。先行技術の教示によれば、プロテイナーゼXとKの両方に最適な温度は65～70℃である。

【0290】

図1に示すように、2つのプロテイナーゼは、10mMカルシウムの存在下で類似した温度-活性プロファイルを有する。

【0291】

プロテイナーゼX及びKの温度-活性プロファイルを低カルシウム（5μM）及びカルシウム非含有（0μM）条件下でも測定した。また、24mU/mLプロテイナーゼ（0.37μg/mLプロテイナーゼX又は0.06μg/mLプロテイナーゼKに相当）を1mM基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAと一緒に指示温度で緩衝液（0.1M Tris-HCl、pH8.0、0mM/0.005mM/10mM CaCl₂、1%DMSO、12mM NaCl）中で総体積1000μlでインキュベーションした。

【0292】

4-ニトロアニリンへの基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Naの酵素切断を410nm（EM8.8）における吸光度の増加を経時的に30秒間UV分光光度計を用いて測定することによって分析した。

【0293】

10mM CaCl₂の存在下で65℃で観察された活性に対する%相対活性として活性を計算した（表2）。65℃で観察された活性は、観察された最大活性であった。

【0294】

【表6】

表2：10mMカルシウム及び65℃における活性に対するプロテイナーゼX及びKの活性（%）

	Prot X					Prot K				
温度 (°C)	25	35	45	55	65	25	35	45	55	65
0mM Ca	29.7	47.0	65.1	81.8	82.6	29.4	29.4	64.1	78.0	90.1
0.005mM Ca	29.1	43.8	64.6	80.3	88.7	30.8	30.8	66.8	82.3	94.2
10mM Ca	30.2	46.9	72.0	86.3	100.0	31.5	31.5	67.9	85.9	100.0

【0295】

各カルシウム濃度において、両方のプロテイナーゼの温度プロファイルは類似しており、最大活性が65℃で観察された。カルシウム濃度の減少によってプロテイナーゼ活性が幾つかの温度でほんの少し減少したように見えた。10mMカルシウムを用いて各特定の温度において達成された活性と比較して活性を考えると、2つのプロテイナーゼの活性プロファイルは異なった。結果を表3及び4並びに図2及び3に示す。これらは、様々な温度におけるプロテイナーゼ活性に対するカルシウム依存的な効果を強調するものである。

【0296】

【表7】

表3：表示温度における10mMカルシウムを用いた活性に対するプロテイナーゼXの活性

	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
0mM Ca	98.2	100.0	90.4	94.8	82.6
0.005mM Ca	96.2	93.4	89.7	93.1	88.7
10mM Ca	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

【0297】

【表8】

表4：表示温度における10mMカルシウムを用いた活性に対するプロテイナーゼKの活性

	25℃	35℃	45℃	55℃	65℃
0mM Ca	93.4	93.4	94.4	90.7	90.1
0.005mM Ca	97.6	97.6	98.4	95.8	94.2
10mM Ca	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

10

【0298】

図2及び表3によれば、プロテイナーゼXでは、低カルシウム濃度又はカルシウムの非存在が55℃及び45℃における活性のいくらかの損失（最大減少<10%）をもたらし、25℃又は35℃において認識できる活性の低下はない。約20%の活性低下が65℃でカルシウムの非存在下で認められ、約10%の低下が65℃で低カルシウム（0.005mM）で認められた。

【0299】

それに対して、図3及び表4によれば、各温度におけるプロテイナーゼKの活性は、カルシウム条件によってほとんど影響されなかった。すなわち、高カルシウム濃度の存在下であろうと、低カルシウム濃度であろうと、又はカルシウムの非存在下であろうと、温度増加と共にほんのわずかな活性変化しか認められなかった。

20

【0300】

まとめると、データは、低カルシウム濃度がプロテイナーゼXの熱失活をプロテイナーゼKよりも大きく誘導し得ることを示唆している。

【0301】

実施例3：プロテイナーゼのCa²⁺依存的な誘導可能である易熱性
プロテイナーゼX及びKのカルシウム依存的易熱性を更に調べた。

【0302】

熱処理ステップ：

プロテイナーゼを60℃で15又は30分間PCRサーモサイクラー（Veriti、Applied Biosystems）中で多様な濃度の遊離カルシウムを含む緩衝液中でインキュベーションした。緩衝液は、

30

0.1mg/mlプロテイナーゼX（6.5U/mlプロテイナーゼX初期活性に相当）又は0.014mg/mlプロテイナーゼK（5.6U/mlプロテイナーゼK初期活性に相当）

0.025M Tris-HCl、pH8、300mM NaCl、
CaCl₂（1mM/0.25mM/0.125mM/0.063mM/0.031mM/0.016mM/0.008mM/0mM）
を体積50μlで含む。

【0303】

不活性化後に試料を氷上に戻した。対照として用いた試料を全体を通して氷上で維持した。

40

【0304】

残存活性の分析

熱処理ステップ後、試料を0.025M Tris-HCl、pH8、300mM NaClで1:10希釈した。希釈ステップを行って、試料中の酵素活性U/mlを低下させて、それらを反応分析で検出可能な範囲にした。

【0305】

プロテイナーゼの残存活性を以下のように評価した。

【0306】

50

0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテイナーゼ X 又は 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテイナーゼ K (それぞれ 26 及び 24 mU/ml 初期活性に相当) を 1 mM 基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA と一緒に 37°C で標準反応緩衝液 (0.1 M Tris-HCl、pH 8.0、10 mM CaCl_2 、1% DMSO、12 mM NaCl) 中で総体積 250 μl でインキュベーションした。

【0307】

4-ニトロアニリンへの基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na の酵素切断を 405 nm (EM8.8) における吸光度の増加を経時的に 10 分間、多モードプレートリーダー (Synergy H1、BioTek、USA) を用いて 1 秒ごとにシグナルを検出して測定することによって分析した。

10

【0308】

結果を図 4 及び 5 に示す。対照試料 (加熱ステップを経ない氷上で維持された同じプロテイナーゼ及び緩衝液) に対する残存活性率として活性を示す。

【0309】

図 5 に示すように、遊離カルシウム濃度の減少は、プロテイナーゼ K の熱失活に影響せず、プロテイナーゼ K は、60°C でインキュベーションしたすべての試料において遊離 Ca^{2+} 濃度とは無関係に約 40% 活性を失う。プロテイナーゼ K の実質的な不活性化 ($\geq 75\%$) は、どの条件下でも達成されなかった。

【0310】

それに対して、図 4 に示すように、遊離カルシウム濃度の減少は、プロテイナーゼ X の易熱性の増加をもたらした。実質的な不活性化 ($\geq 75\%$ 、すなわち 25% 未満の残存活性) は、60°C で遊離カルシウム濃度 $\leq 0.063 \text{ mM}$ で 30 分間の加熱、また、60°C で遊離カルシウム濃度 $\leq 0.016 \text{ mM}$ で 15 分間の加熱によって行われた。 $\geq 90\%$ の不活性化が好ましく、これは、プロテイナーゼ X では 60°C で遊離カルシウム濃度 $\leq 0.031 \text{ mM}$ で 30 分間、又は遊離カルシウムの非存在下で 15 の加熱によって行われた。

20

【0311】

したがって、プロテイナーゼ X が低カルシウム濃度の存在下で誘導的に易熱性であるのに対して、プロテイナーゼ K の易熱性はカルシウム濃度によって影響されない。

【0312】

この相違は更に図 6 で示される。図 6 は、60°C で 15/30 分間様々なカルシウム濃度で加熱後の 2 つのプロテイナーゼの不活性化プロファイルである。

30

【0313】

実施例 4：プロテイナーゼの遊離カルシウム依存的な不活性化プロファイル

プロテイナーゼ X 及び K の不活性化に対する異なる熱処理ステップの効果を評価した。以下の実験においては、5 μM の遊離カルシウム上限を使用し、熱失活ステップをある範囲の温度及び加熱時間で行った。

【0314】

熱処理ステップ：

プロテイナーゼを様々な温度 (45°C、50°C、55°C、60°C、65°C 及び 70°C) で様々な時間 (2、5、10、15、30、60 分間)、多様な遊離カルシウム濃度 (CaCl_2 、0 μM 、2.5 μM 又は 5 μM) を含む緩衝液中でインキュベーションした。緩衝液は、更に、0.1 mg/ml (6.5 U/ml 初期活性) プロテイナーゼ X 又は 0.016 mg/ml (6.4 U/ml 初期活性) プロテイナーゼ K、25 mM HEPES、pH 8、100 mM NaCl、総体積 50 μl を含んだ。

40

【0315】

プロテイナーゼ K を使用前に Ca を含まない貯蔵緩衝液に対して透析して、その中の遊離カルシウムを除去した。不活性化後に試料を氷上に戻した。対照として用いた試料を全体を通して氷上で維持した。

【0316】

残存活性の分析

50

熱処理ステップ後、試料を 50 mM HEPES、pH 8、100 mM NaCl で 1 : 20 希釈した。希釈ステップを行って、試料中の酵素活性 U/ml を低下させて、それらを反応分析で検出可能な範囲にした。

【0317】

プロテイナーゼの残存活性を以下のように評価した。

【0318】

0.2 μ g/ml プロテイナーゼ X 又は 0.03 μ g/ml プロテイナーゼ K（それぞれ 13 mU 及び 12 mU 初期活性に相当）を 1 mM 基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA と一緒に 37 °C で標準反応緩衝液（0.1 M Tris-HCl、pH 8.0、10 mM CaCl₂、1% DMSO、4 mM NaCl）中で総体積 250 μ l でインキュベーションした。

【0319】

4-ニトロアニリンへの基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na の酵素切断を 405 nm（EM8.8）における吸光度の増加を経時的に 10 分間、多モードプレートリーダー（Synergy H1、BioTek、USA）を用いて 11 秒ごとにシグナルを検出して測定することによって分析した。氷上で維持された以外は試験試料と同一である対照試料と残存活性を比較する。

【0320】

結果を表 5～7 に示す。

【0321】

【表 9】

表 5：残存活性（パーセント）：プロテイナーゼ X、0 μ M CaCl₂

	不活性化 温度	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
不活性化時間	2 min	110.7	107.6	98.4	83.8	42.1	<u>6.7</u>
	5 min	101.6	83.8	80.4	46.3	<u>8.3</u>	<u>1.6</u>
	10 min	95.9	76.2	63.6	<u>23.3</u>	<u>1.8</u>	<u>1.5</u>
	15 min	94.0	78.2	49.7	<u>11.3</u>	<u>1.2</u>	<u>1.0</u>
	30 min	88.2	70.8	29.7	<u>2.4</u>	<u>1.0</u>	<u>1.0</u>
	60 min	71.1	49.3	<u>11.2</u>	<u>0.7</u>	<u>1.1</u>	<u>0.9</u>
	氷	100.0					
半減期 [min]		—	60	15	5	< 2	< 2
75%不活性化 [min]				< 60	< 10	< 5	< 2
90%不活性化 [min]				60	15	< 5	< 2

【0322】

上記データによれば、遊離カルシウムの非存在下で、プロテイナーゼ X の $\geq$ 約 75% 不活性化は、

- 少なくとも 70 °C で加熱時に 2 分以内に、
- 少なくとも 65 °C で加熱時に 5 分以内に、
- 少なくとも 60 °C で加熱時に 10 分以内に、及び
- 少なくとも 55 °C で加熱時に 60 分以内に

達成される。

【0323】

- プロテイナーゼ X の $\geq$ 約 90% 不活性化は、
- 少なくとも 70 °C で加熱時に 2 分以内に、
- 少なくとも 65 °C で加熱時に 5 分以内に、

少なくとも 60℃ で加熱時に 15 分以内に、及び
 少なくとも 55℃ で加熱時に 60 分以内に
 達成される。

【0324】

【表10】

表6：残存活性：プロテイナーゼX、 $2.5 \mu\text{M}$ CaCl_2

	不活性化 温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
不活性化時間	2 min	吸光度検出の問題					
	5 min	117.0	107.8	83.3	55.7	<u>14.1</u>	<u>1.5</u>
	10 min	97.5	94.2	58.5	29.3	<u>2.3</u>	<u>1.2</u>
	15 min	108.4	83.8	59.8	<u>17.9</u>	<u>1.3</u>	<u>1.2</u>
	30 min	98.7	76.5	37.6	<u>4.1</u>	<u>0.8</u>	<u>0.9</u>
	60 min	81.2	62.9	<u>15.9</u>	<u>1.6</u>	<u>0.4</u>	<u>0.8</u>
	氷	100.0					
半減期 [min]		—	> 60	< 30	5	< 5	< 5
75%不活性化 [min]		—	—	< 60	< 15	< 5	< 5
90%不活性化 [min]				60	< 30	< 10	< 5

10

20

【0325】

上記データによれば、遊離カルシウム濃度 $2.5 \mu\text{M}$ 未満で、プロテイナーゼXの $\geq$ 約75%不活性化は、

少なくとも 70℃ で加熱時に 5 分以内に、
 少なくとも 65℃ で加熱時に 5 分以内に、
 少なくとも 60℃ で加熱時に 15 分以内に、及び
 少なくとも 55℃ で加熱時に 60 分以内に
 達成される。

【0326】

プロテイナーゼXの $\geq$ 約90%不活性化は、
 少なくとも 70℃ で加熱時に 5 分以内に、
 少なくとも 65℃ で加熱時に 10 分以内に、及び
 少なくとも 60℃ で加熱時に 30 分以内に
 達成される。

【0327】

30

【表 1 1】

表 7：残存活性：プロテイナーゼ X、 $5 \mu\text{M}$ CaCl_2

	不活性化 温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
不活性化時間	2 min	吸光度検出の問題					
	5 min	119.3	100.7	93.2	59.9	<u>17.0</u>	<u>1.2</u>
	10 min	104.7	86.3	90.8	37.1	<u>3.2</u>	<u>0.6</u>
	15 min	90.5	81.3	71.8	<u>21.9</u>	<u>1.3</u>	<u>0.9</u>
	30 min	104.1	66.1	46.5	<u>5.6</u>	<u>1.0</u>	<u>0.2</u>
	60 min	96.3	60.9	<u>21.8</u>	<u>0.9</u>	<u>1.0</u>	<u>1.1</u>
	氷	100.0					
半減期 [min]		—	> 60	30	< 10	< 2	< 5
75%不活性化 [min]		—	—	< 60	< 15	< 5	< 5
90%不活性化 [min]				> 60	< 30	< 10	< 5

10

【0328】

上記データによれば、遊離カルシウム濃度 $5 \mu\text{M}$ 未満で、プロテイナーゼ X の $\geq$ 約 75 % 不活性化は、

- 少なくとも 70℃で加熱時に 5 分以内に、
- 少なくとも 65℃で加熱時に 5 分以内に、
- 少なくとも 60℃で加熱時に 15 分以内に、及び
- 少なくとも 55℃で加熱時に 60 分以内に

達成される。

【0329】

- プロテイナーゼ X の $\geq$ 約 90 % 不活性化は、
- 少なくとも 70℃で加熱時に 5 分以内に、
- 少なくとも 65℃で加熱時に 10 分以内に、及び
- 少なくとも 60℃で加熱時に 30 分以内に

達成される。

30

【0330】

すなわち、遊離カルシウム濃度 $\leq 5 \mu\text{M}$ では、70℃におけるインキュベーションはプロテイナーゼ X の ≥ 95 % 不活性化を 5 分以内に達成し、65℃におけるインキュベーションはプロテイナーゼ X の ≥ 95 % 不活性化を 10 分以内に（遊離カルシウムの非存在下で 5 分以内に）達成した。

【0331】

2. 5 と $5 \mu\text{M}$ の両方の遊離カルシウムの存在下では、60℃におけるインキュベーションはプロテイナーゼ X の ≥ 90 % 不活性化を 30 分以内に（遊離カルシウムの非存在下で 15 分以内に）達成した。

40

【0332】

≥ 55 ℃で 60 分間のインキュベーションは、 $5 \mu\text{M}$ 遊離カルシウムの存在下でプロテイナーゼ X の 80 % 不活性化、 $\leq 2.5 \mu\text{M}$ 遊離カルシウムの存在下で 85 % 不活性化、及び遊離カルシウムの非存在下で約 90 % 不活性化を達成した。

【0333】

比較のためにプロテイナーゼ K を用いて同じ検討を行った。結果を下表 8～10 に示す。

【0334】

【表 1 2】

表 8：残存活性：プロテイナーゼ K、 $0 \mu M$ $CaCl_2$

	不活性化 温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
不活性化時間	2 min	77.8	61.0	108.5	86.3	47.6	<u>8.4</u>
	5 min	92.6	76.1	92.1	68.4	31.0	<u>0.2</u>
	10 min	96.8	86.1	87.7	55.6	<u>8.5</u>	<u>0.1</u>
	15 min	83.1	88.1	80.8	42.9	<u>2.7</u>	<u>-0.1</u>
	30 min	85.9	90.0	61.0	<u>15.9</u>	<u>0.3</u>	<u>-0.1</u>
	60 min	84.0	61.4	<u>19.6</u>	<u>1.7</u>	<u>0.2</u>	<u>0.1</u>
	氷	100					
半減期 [min]		-	> 60	< 60	10	2	< 2
75%不活性化 [min]		-	-	< 60	< 30	< 10	< 2
90%不活性化 [min]				> 60	< 60	< 10	< 2

10

【0 3 3 5】

上記データによれば、遊離カルシウムの非存在下で、プロテイナーゼ K の $\geq$ 約 75% 不活性化は、

20

少なくとも 70℃ で加熱時に 2 分以内に、

少なくとも 65℃ で加熱時に 10 分以内に (Prot X では 5 分以内に)、

少なくとも 60℃ で加熱時に 30 分以内に (Prot X では 10 分以内に)、

少なくとも 55℃ で加熱時に 60 分以内に (Prot X よりも少ない不活性化)

達成される。

【0 3 3 6】

プロテイナーゼ K の $\geq$ 約 90% 不活性化は、

少なくとも 70℃ で加熱時に 2 分以内に、

少なくとも 65℃ で加熱時に 10 分以内に (Prot X では 5 分以内に)、及び

少なくとも 60℃ で加熱時に 60 分以内に (Prot X では 15 分以内に)

30

達成される。

【0 3 3 7】

【表 1 3】

表 9：残存活性：プロテイナーゼ K、 $2.5 \mu M$ $CaCl_2$

	不活性化 温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
不活性化時間	5 min	102.1	101.7	100.0	76.3	40.1	<u>0.4</u>
	10 min	96.2	97.3	86.2	60.3	<u>14.3</u>	<u>3.3</u>
	15 min	100.9	94.3	78.4	45.3	<u>4.7</u>	<u>0.2</u>
	30 min	94.5	80.9	53.7	<u>16.9</u>	<u>0.6</u>	<u>0.3</u>
	60 min	79.8	61.5	<u>18.4</u>	<u>1.9</u>	<u>0.3</u>	<u>0.3</u>
	氷	100					
半減期 [min]		-	> 60	30	< 15	< 5	< 5
75%不活性化 [min]		-	-	< 60	< 30	< 10	< 5
90%不活性化 [min]				> 60	< 60	< 15	< 5

40

【0 3 3 8】

50

上記データによれば、遊離カルシウム濃度 2.5 μ M 未満 で、プロテイナーゼ K の $\geq$ 約 75 % 不活性化は、

少なくとも 70 °C で加熱時に 5 分以内に、

少なくとも 65 °C で加熱時に 10 分以内に (Prot X では 5 分以内に)、

少なくとも 60 °C で加熱時に 30 分以内に (Prot X では 15 分以内に)、及び

少なくとも 55 °C で加熱時に 60 分以内に (Prot X よりも少ない不活性化)

達成される。

【0339】

プロテイナーゼ K の $\geq$ 約 90 % 不活性化は、

少なくとも 70 °C で加熱時に 5 分以内に、

少なくとも 65 °C で加熱時に 15 分以内に (Prot X では 10 分以内に)、及び

少なくとも 60 °C で加熱時に 60 分以内に (Prot X では 30 分以内に)

達成される。

【0340】

【表14】

表10：残存活性：プロテイナーゼ K、5 μ M CaCl₂

	不活性化 温度	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
不 活 性 化 時 間	5 min	112.4	102.7	106.4	95.9	55.9	<u>0.7</u>
	10 min	110.5	99.9	99.5	65.4	<u>13.2</u>	<u>0.5</u>
	15 min	106.1	103.5	97.6	60.0	<u>8.9</u>	<u>0.0</u>
	30 min	94.5	92.4	65.3	<u>22.3</u>	<u>1.0</u>	<u>0.2</u>
	60 min	84.8	58.5	<u>19.8</u>	<u>2.5</u>	<u>0.0</u>	<u>-0.2</u>
	氷	100					
半減期 [min]		—	> 60	< 60	< 30	5	< 5
75 % 不活性化 [min]		—	—	< 60	< 30	< 10	< 5
90 % 不活性化 [min]				> 60	< 60	< 15	< 5

【0341】

上記データによれば、遊離カルシウム濃度 5 μ M 未満 で、プロテイナーゼ K の $\geq$ 約 75 % 不活性化は、

少なくとも 70 °C で加熱時に 5 分以内に、

少なくとも 65 °C で加熱時に 10 分以内に (Prot X では 5 分以内に)、

少なくとも 60 °C で加熱時に 30 分以内に (Prot X では 15 分以内に)、及び

少なくとも 55 °C で加熱時に 60 分以内に

達成される。

【0342】

プロテイナーゼ K の $\geq$ 約 90 % 不活性化は、以下の加熱ステップによって、

少なくとも 70 °C で加熱時に 5 分以内に、

少なくとも 65 °C で加熱時に 15 分以内に (Prot X では 10 分以内に)、及び

少なくとも 60 °C で加熱時に 60 分以内に (Prot X では 30 分以内に)

達成される。

【0343】

したがって、結果の示すところによれば、すべての遊離カルシウム濃度において、同程度の不活性化を所与の温度で達成するのに必要な加熱時間は、プロテイナーゼ X がプロテイナーゼ K よりもかなり短い。別の見方をすれば、試験した加熱時間及び温度の大部分において、プロテイナーゼ K よりもプロテイナーゼ X の不活性化が大きい。これは、プロテイナーゼ X の観察された易熱性が低カルシウム濃度で誘導されるためであり、これはプロ

テイナーゼKでは観察されない。

【0344】

したがって、熱処理によって不活性化されるプロテイナーゼKの能力に対するカルシウムの効果は、プロテイナーゼXに対する効果よりもかなり目立たない。

【0345】

実施例5：プロテイナーゼの一価塩依存的な誘導可能である易熱性

プロテイナーゼX及びKの易熱性に対するNaClの効果を判定するために、両方のプロテイナーゼの不活性化プロファイルを様々な温度でi) 50mM（低塩分条件）又はii) 300mM NaCl（高塩分条件）を含む溶液中で測定した。

【0346】

熱処理ステップ：

プロテイナーゼを様々な温度（45℃、50℃、55℃、60℃、65℃及び70℃）で30分間、50mM又は300mM NaClを含む緩衝液中でインキュベーションした。緩衝液は、0.1mg/mlプロテイナーゼ（6.5U/mlプロテイナーゼX又は40U/mlプロテイナーゼKに相当）、25mM HEPES、pH8、0μM CaCl₂を体積50μlで含んだ。

【0347】

不活性化後に試料を氷上に戻した。対照として用いた試料を全体を通して氷上で維持した。

【0348】

残存活性の分析

熱処理ステップ後、プロテイナーゼX又はプロテイナーゼKの試料を50mM HEPES、pH8、300mM NaClでそれぞれ1:10又は1:100希釈した。プロテイナーゼの残存活性を以下のように評価した。

【0349】

0.4μg/mlプロテイナーゼX（26mU/mlの初期活性に相当）又は0.04μg/mlプロテイナーゼK（16mU/mlの初期活性に相当）を1mM基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAと一緒に37℃で標準反応緩衝液（0.1M Tris-HCl、pH8.0、10mM CaCl₂、1%DMSO、12mM NaCl）中で総体積250μlでインキュベーションした。

【0350】

4-ニトロアニリンへの基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Naの酵素切断を405nm（EM8.8）における吸光度の増加を経時的に10分間、多モードプレートリーダー（Synergy H1、BioTek、USA）を用いて11秒ごとにシグナルを検出して測定することによって分析した。氷上で維持された以外は試験試料と同一である対照試料と残存活性を比較する。

【0351】

図7に示すように、NaCl濃度の増加は、Prot Xの易熱性に対してProt Kとは逆の効果を有する。高いNaCl濃度はプロテイナーゼKを高温で安定化するのに対して、高いNaCl濃度はプロテイナーゼXの易熱性を誘導する。

【0352】

この結果は、特に驚くべきことである。配列番号1のプロテイナーゼXは、塩水生物から得られ、したがって、通常、高塩分条件に耐えると予想される。それに対して、Prot Kは、非海洋性供給源、真菌Engyodontium album（以前はTritirachium album）から得られ、高塩分条件によって安定化されることは予想されない。

【0353】

実施例6：プロテイナーゼの一価塩依存的な易熱性プロファイル

プロテイナーゼXの易熱性に対するNaClの効果をもっと検討するために、実施例5よりも広範なNaCl濃度を評価した。

10

20

30

40

50

【0354】

熱処理ステップ：

プロテイナーゼXを50℃又は60℃で15又は30分間、0、50、150、300又は600mM NaClを含む緩衝液中でインキュベーションした。緩衝液は、0.1mg/mlプロテイナーゼX（6.5U/mlに相当）、25mM HEPES、pH8、0.03mM CaCl₂を体積50μlで含んだ。

【0355】

不活性化後に試料を氷上に戻した。対照として用いた試料を全体を通して氷上で維持した。

【0356】

残存活性の分析

熱処理ステップ後、試料を50mM HEPES、pH8、300mM NaClで1:10希釈した。プロテイナーゼの残存活性を以下のように評価した。

【0357】

0.4μg/mlプロテイナーゼX（26mU/ml初期活性に相当）を1mM基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAと一緒に37℃で標準反応緩衝液（0.1M Tris-HCl、pH8.0、10mM CaCl₂、1%DMSO、12mM NaCl）中で総体積250μlでインキュベーションした。

【0358】

4-ニトロアニリンへの基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Naの酵素切断を405nm（EM8.8）における吸光度の増加を経時的に10分間、多モードプレートリーダー（Synergy H1、BioTek、USA）を用いて11秒ごとにシグナルを検出して測定することによって分析した。氷上で維持された以外は試験試料と同一である対照試料と残存活性を比較する。

【0359】

結果を図8及び表11に示す。

【0360】

【表15】

表11：プロテイナーゼXの易熱性に対するNaCl依存的な効果

不活性化温度		50℃		60℃		氷
不活性化時間		15 min	30 min	15 min	30 min	30 min
NaCl 濃度	600mM	79.5	66.1	<u>2.9</u>	<u>0.4</u>	82.3
	300mM	94.2	67.8	<u>17.6</u>	<u>2.9</u>	84.0
	150mM	97.0	72.3	32.9	<u>15.9</u>	86.5
	50mM	101.0	64.2	50.3	38.7	81.7
	0mM	115.7	94.9	86.2	67.9	100

【0361】

上記データによれば、NaCl濃度 ≥ 150 mMにおいて、プロテイナーゼXの $\geq$ 約80%不活性化が60℃で30分以内の加熱によって達成される。

【0362】

やはり上記データによれば、NaCl濃度 ≥ 300 mMにおいて、プロテイナーゼXの $\geq$ 約95%不活性化が60℃で30分以内の加熱によって達成され、プロテイナーゼXの $\geq$ 約80%不活性化が60℃で150分以内の加熱によって達成される。

【0363】

NaCl濃度（x軸）対60℃で30/15分加熱後の残存活性（y軸）のプロットである図9によれば、実質的な不活性化（ $\geq 75\%$ ）がNaCl濃度少なくとも約210mMでは60℃で15分の加熱で、NaCl濃度少なくとも約100mMでは30分の加熱

10

20

30

40

50

で達成される。

【0364】

実施例 7：プロテイナーゼの易熱性に対する遊離カルシウム濃度と一価塩濃度の併用効果

上記検討によれば、i) 遊離カルシウム濃度の低下又は ii) NaCl 濃度の上昇は、プロテイナーゼ X の易熱性をプロテイナーゼ K よりも大きく誘導する。これらの条件の併用効果が続けて検討した。

【0365】

熱処理ステップ：

プロテイナーゼ X 及び K を 60℃ で 30 分間、様々な濃度の NaCl (0、25、50、75、100、125 mM) 及び遊離カルシウム (0、5、10、20 及び 20 μ M CaCl_2) を含む緩衝液中でインキュベーションした。緩衝液は、6.5 U/ml プロテイナーゼ X 又は 6.4 U/ml プロテイナーゼ K (0.1 mg/ml プロテイナーゼ X 又は 0.016 mg/ml プロテイナーゼ K に相当)、25 mM HEPES、pH 8 を体積 50 μ l で含んだ。

10

【0366】

プロテイナーゼ K を使用前に Ca を含まない貯蔵緩衝液に対して透析して、その中の遊離カルシウムを除去した。

【0367】

不活性化後に試料を氷上に戻した。対照として用いた試料を全体を通して氷上で維持した。

20

【0368】

残存活性の分析

熱処理ステップ後、試料を 50 mM HEPES、pH 8、100 mM NaCl で 1 : 20 希釈した。プロテイナーゼの残存活性を以下のように評価した。

【0369】

0.2 μ g/ml プロテイナーゼ X (13 mU/ml 初期活性に相当) 又は 0.03 μ g/ml プロテイナーゼ K (12 mU/ml 初期活性に相当) を 1 mM 基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA と一緒に 37℃ で標準反応緩衝液 (0.1 M Tris-HCl、pH 8.0、10 mM CaCl_2 、1% DMSO、4 mM NaCl) 中で総体積 250 μ l でインキュベーションした。

30

【0370】

4-ニトロアニリンへの基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA の酵素切断を 405 nm (EM8.8) における吸光度の増加を経時的に 10 分間、多モードプレートリーダー (Synergy H1、BioTek、USA) を用いて 11 秒ごとにシグナルを検出して測定することによって分析した。氷上で維持された以外は試験試料と同一である対照試料と残存活性を比較する。

【0371】

結果を表 12 及び 13 に示す。

【0372】

40

【表 1 6】

表 1 2 : プロテイナーゼ X 易熱性に対する CaCl_2 と NaCl の併用効果

NaCl	CaCl_2				
	0 μM	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM
0mM	35.0	51.3	43.4	59.0	54.9
25mM	<u>20.0</u>	31.3	35.0	42.2	44.2
50mM	<u>12.2</u>	<u>20.5</u>	<u>22.4</u>	32.3	39.7
75mM	<u>4.8</u>	<u>12.6</u>	<u>15.5</u>	<u>25.0</u>	32.6
100mM	<u>2.8</u>	<u>8.0</u>	<u>10.8</u>	<u>19.2</u>	<u>22.8</u>
125mM	<u>1.9</u>	<u>4.5</u>	<u>6.6</u>	<u>13.3</u>	<u>16.8</u>

10

【0 3 7 3】

20

実質的な不活性化 ($\geq 75\%$) をすべての遊離カルシウム濃度で $\geq 100\text{mM}$ NaCl の存在下で達成した。

【0 3 7 4】

さらに、実質的な不活性化 ($\geq$ 約 75%) を最高遊離カルシウム濃度 $20\mu\text{M}$ で少なくとも 75mM NaCl の存在下で達成した。

【0 3 7 5】

さらに、実質的な不活性化 ($\geq$ 約 75%) を最高遊離カルシウム濃度 $10\mu\text{M}$ で少なくとも 50mM NaCl の存在下で達成した。

【0 3 7 6】

さらに、実質的な不活性化 ($\geq$ 約 75%) を最高遊離カルシウム濃度 $5\mu\text{M}$ で少なくとも 50mM NaCl の存在下で達成した。

30

【0 3 7 7】

さらに、実質的な不活性化 ($\geq$ 約 75%) を遊離カルシウムの非存在下かつ少なくとも 25mM NaCl の存在下で達成した。

【0 3 7 8】

優れた不活性化 ($\geq$ 約 90%) を最高遊離カルシウム濃度 $20\mu\text{M}$ で少なくとも 125mM NaCl の存在下で達成した。

【0 3 7 9】

優れた不活性化 ($\geq$ 約 90%) を最高遊離カルシウム濃度 $10\mu\text{M}$ で少なくとも 100mM NaCl の存在下で達成した。

40

【0 3 8 0】

優れた不活性化 ($\geq$ 約 90%) を最高遊離カルシウム濃度 $5\mu\text{M}$ で少なくとも 75mM NaCl の存在下で達成した。

【0 3 8 1】

遊離カルシウムの非存在下で、優れた不活性化 ($\geq$ 約 90%) を少なくとも 50mM NaCl の存在下で達成した。

【0 3 8 2】

【表 1 7】

表 1 3 : プロテイナーゼK易熱性に対するCaCl₂とNaClの併用効果

NaCl	CaCl ₂				
	0μM	5μM	10μM	20μM	30μM
0mM	<u>2.3</u>	<u>5.7</u>	<u>6.4</u>	<u>8.9</u>	<u>8.4</u>
25mM	<u>4.8</u>	<u>8.4</u>	<u>9.4</u>	<u>11.0</u>	<u>10.7</u>
50mM	<u>10.4</u>	<u>13.6</u>	<u>15.5</u>	<u>20.6</u>	<u>15.5</u>
75mM	<u>14.1</u>	<u>22.9</u>	23.7	28.3	27.2
100mM	<u>20.2</u>	24.8	31.3	36.9	34.0
125mM	31.6	36.5	42.6	44.8	43.7

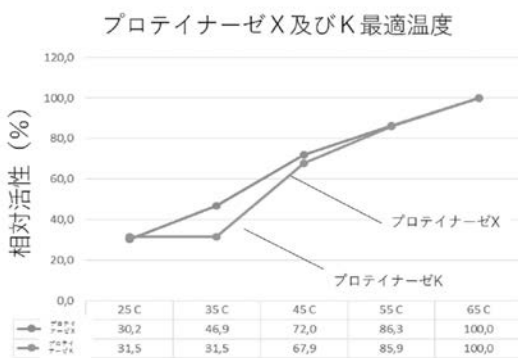
10

【0383】

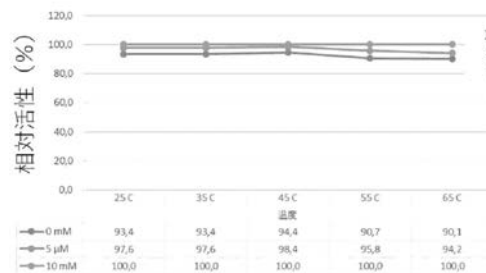
20

結果によれば、プロテイナーゼKは、プロテイナーゼXとは極めて異なる易熱性プロファイルを有する。プロテイナーゼKは、低塩分条件下で次第に易熱性になり、高塩分条件下で安定化され、カルシウム濃度によってほとんど影響されない。他方、プロテイナーゼXは、高塩分条件及び低遊離カルシウム条件下で次第に易熱性になる。

【図 1】

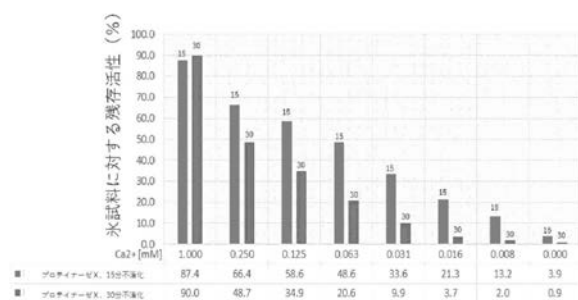
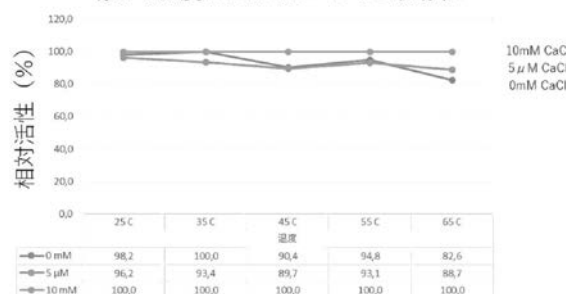


【図 3】

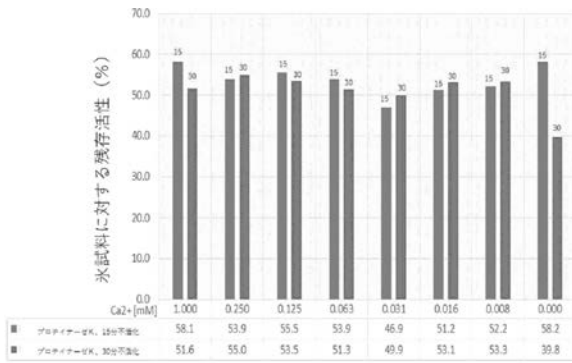
プロテイナーゼK、
様々な温度におけるカルシウム依存性

【図 4】

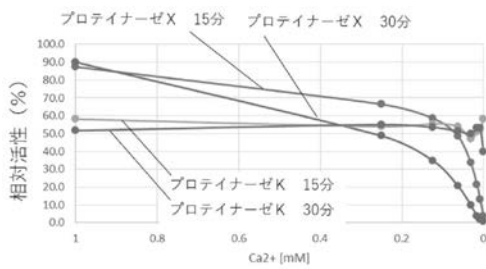
【図 2】

プロテイナーゼX、
様々な温度におけるカルシウム依存性

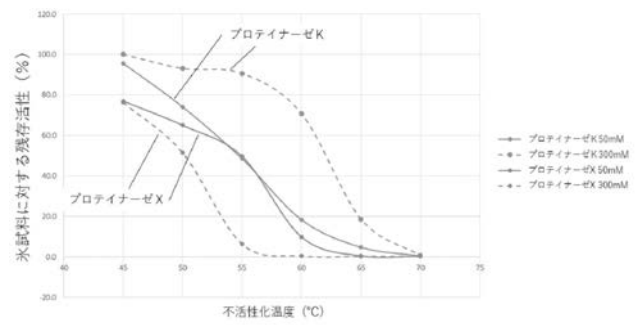
【図 5】



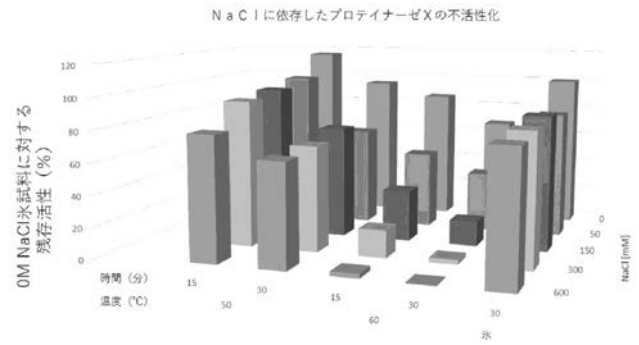
【図 6】



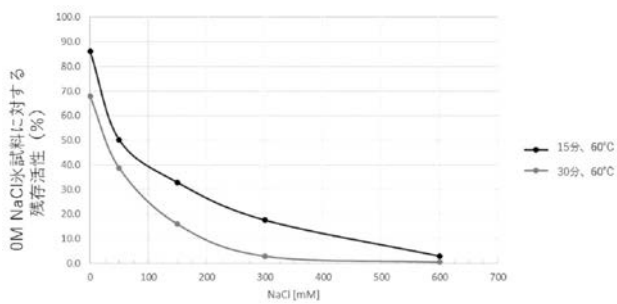
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2021516993000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/055724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/52
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LARSEN ATLE NORALF ET AL: "Characterization of a recombinantly expressed proteinase K-like enzyme from a psychrotrophic Serratia sp.", FEBS JOURNAL, vol. 273, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 47-60, XP002790725,	1-3,23
A	Table 2, page 53, 2. column, 2.paragraph; the whole document	4-22
Y	----- DE 10 2005 028295 A1 (HENKEL KGAA [DE]) 16 November 2006 (2006-11-16) paragraphs [0010], [0047], [0068]; claim 31 -/--	1-23

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2019

Date of mailing of the international search report

02/05/2019

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Voigt-Ritzer, Heike

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/055724

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& DATABASE Geneseq [Online] 11 January 2007 (2007-01-11), "Shewanella hydrolase/protease SEQ ID NO 2.", XP002790730, retrieved from EBI accession no. GSP:AEM02826 Database accession no. AEM02826 sequence -----	
Y	WO 2017/006266 A1 (DENOVO GENOMICS INC [CA]) 12 January 2017 (2017-01-12) paragraphs [0002], [0004], [0005], [0152], [0153], [0154] -----	1-23
A	EIJSINK V G H ET AL: "The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease", PROTEIN SCIENCE, vol. 20, no. 8, August 2011 (2011-08), pages 1346-1355, XP055582119, abstract; figure 4 page 1348, column 2, paragraph 1 -----	1-23
Y	MORAN ALISON J ET AL: "Heat-labile proteases in molecular biology applications", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 197, no. 1, 1 April 2001 (2001-04-01) , pages 59-63, XP002790727, ISSN: 0378-1097 abstract the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/055724

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 102005028295 A1	16-11-2006	NONE	

WO 2017006266 A1	12-01-2017	CA 3028612 A1	12-01-2017
		US 2018201916 A1	19-07-2018
		WO 2017006266 A1	12-01-2017

フロントページの続き

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

(72)発明者 ヘンリクセン, ヨルン レミ
ノルウェー王国 9105 クヴァルヤ, アイドハウグスティエン 7

(72)発明者 レインズ, オラフ
ノルウェー王国 9007 トロムソ, クベルドロヴェーゲン 12

(72)発明者 ローレンツェン, マリット スジョー
ノルウェー王国 9023 クロケルブダーレン, スカイタースティエン 3ビー

Fターム(参考) 4B050 CC03 DD02 KK02 LL03 LL10

4B063 QA20 QQ36 QQ42 QQ52 QR16 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25
QX01

【要約の続き】

ウム濃度が $\leq$ 約80 μ Mである、又は i i) 前記試料中の一価塩濃度が $\geq$ 約20 mMである。