

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年10月3日(03.10.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/204498 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/57 (2006.01) C12N 9/48 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/012572

(22) 国際出願日: 2024年3月28日(28.03.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-055736 2023年3月30日(30.03.2023) JP

(71) 出願人: キッコーマン株式会社(KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 Chiba (JP).

(72) 発明者: 一柳 悠子 (ICHIYANAGI Yuko); 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 石川 隼也 (ISHIKAWA Junya); 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 一柳 敦 (ICHIYANAGI Atsushi); 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズMORITOWER 32階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN

(54) 発明の名称: 組換えタンパク質

(57) Abstract: The present disclosure addresses the problem of providing means capable of detecting endotoxin. The present disclosure also addresses the problem of providing an endotoxin detection reagent having thermostability. The present disclosure provides a recombinant Factor C protein having a predetermined amino acid substitution, a polynucleotide coding the recombinant Factor C protein, an endotoxin detection reagent containing the recombinant Factor C protein, and a method for producing the recombinant Factor C protein, the polynucleotide, and the endotoxin detection reagent.

(57) 要約: 本開示は、エンドトキシンを検出することのできる手段を提供することを課題とする。また、本開示は、熱安定性を有するエンドトキシン検出試薬を提供することを課題とする。本開示は所定のアミノ酸置換を有する組換えFactor Cタンパク質、これをコードするポリヌクレオチド、これを含むエンドトキシン検出試薬、及びこれらの製造方法を提供する。



WO 2024/204498 A1

明 細 書

発明の名称：組換えタンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、組換えタンパク質に関する。より詳細には、本発明は、例えばエンドトキシンを測定するための組換えタンパク質に関する。

背景技術

[0002] エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁を構成するリポ多糖である。エンドトキシンは非常に安定な物質であるため、医薬品や医療機器、透析液等の製造、使用工程で混入すると、除去することや失活させることは困難である。エンドトキシンは代表的な発熱物質であり、エンドトキシンが混入した物質を投与されることにより血中にごく微量（ngオーダーやpgオーダー）でも混入すると、投与された人や動物に発熱を引き起こす他、敗血症に伴う血管内血液凝固等、極めて致死率の高い疾患の原因となることが知られている。そのため注射剤、医療機器、バイオ医薬品、再生医療製品、透析用剤等の分野では、製品がエンドトキシンを含まない状態（ピロジェンフリー）であることが重要であり、エンドトキシン汚染の有無を迅速かつ正確に測定する技術に対する市場のニーズが存在する。

[0003] エンドトキシンの測定方法としては、現在、リムルス試験が主流となっている。リムルス試験とは、カプトガニ血球抽出物（Limulus Amebocyte Lysate、以下LALとも言う）がエンドトキシンと反応する現象に基づいた試験法であり、ゲル化法、比濁法、比色法、蛍光法といった手法が知られている（例えば、特許文献1、2を参照）。LALを使用した測定用試薬はLAL試薬、ライセート試薬、リムルス試薬などと表現され、これらはいずれも同義である。

[0004] LALを利用してエンドトキシンを測定するための原理は、図1の模式図に示す通りである。エンドトキシンにより、酵素前駆体であるFactor Cが活性化Factor Cに変換される。活性化Factor Cは加水分解酵素として作用し、酵素前駆体であるFactor Bを活性化Factor

or Bへと変換する。活性化Factor Bも加水分解酵素であり、凝固酵素前駆体（プロクロッティングエンザイム）を活性化された凝固酵素（クロッティングエンザイム）に変換する。凝固酵素は加水分解酵素である。この加水分解活性を利用して、ペプチドー標識体等の合成基質を加水分解し、生成物又は消失物を比濁法、発色基質法、蛍光基質法、発光基質法等により測定する方法がある。

[0005] カブトガニの属としては、リムルス（*Limulus*）属、タキプレウス（*Tachypleus*）属、及びカルシノスコルピウス（*Carcinoscorpius*）属が挙げられる。種としては、リムルス・ポリフェムス（*Limulus polyphemus*）、タキプレウス・トリデンタツス（*Tachypleus tridentatus*）、タキプレウス・ギガス（*Tachypleus gigas*）、及びカルシノスコルピウス・ロツンディカウダ（*Carcinoscorpius rotundicauda*）が挙げられる。カブトガニ血球抽出物は有限の生物資源である。一方でLAL試薬に対する需要は増大しており、LAL試薬の供給源をカブトガニ血球抽出物に依存し続けることは持続可能性の観点からも望ましいとはいえない。

[0006] 特許文献3はリムルス由来の組換えタンパク質及びこれをコードするDNAを記載している。特許文献4～11は組換えタンパク質を記載している。

[0007] 非特許文献1は、カブトガニを保存することを目的とした、エンドトキシン検出用カブトガニ血球抽出物の合成的代替物である組換えFactor Cを解説している。組換えFactor Cは市販されているが、非特許文献1の著者らは、LAL試薬から組換えFactor Cへの切り替えが進んでいないことの理由として、開示されている組換えFactor Cが排他的な特許によって保護され、製薬業界がエンドトキシン検出試薬を単一のサプライヤーに依存することに消極的であったことを指摘している。したがって、既に組換えFactor Cが知られているからといって、他の選択肢が不必要ということはない。

[0008] 環境負荷が低く、安定した供給が可能な、エンドトキシン検出試薬が必要とされている。また、熱安定性を有するエンドトキシン検出試薬が必要とされている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第1995/014931号パンフレット

特許文献2：特開2009-150903号公報

特許文献3：国際公開第2018/074498号パンフレット(特許第6927993号)

特許文献4：米国特許第5,712,144号明細書

特許文献5：米国特許第5,716,834号明細書

特許文献6：米国特許第5,858,706号明細書

特許文献7：米国特許第5,985,590号明細書

特許文献8：米国特許第6,645,724号明細書

特許文献9：国際公開第2008/004674号

特許文献10：特表2014-510898号公報

特許文献11：国際公開第2014/092079号パンフレット

非特許文献

[0010] 非特許文献1：PLoS Biol. 2018 Oct; 16(10): e2006607.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 特定の実施形態において本開示は、従来の問題点を少なくとも部分的に解決する、熱安定性を有する組換えFactor Cタンパク質を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、前記課題解決のために鋭意研究を重ねた結果、一例として、配列番号3のアミノ酸配列を有する野生型Factor Cに所定の変異

を導入することより、驚くべきことにFactor Cの熱安定性が向上することを見出し、これらを一実施形態として包含する本発明を完成した。

[0013] 本開示は、以下の実施形態を包含する。

[1] 改変前のFactor Cタンパク質が、配列番号3と95%以上のアミノ酸配列同一性を有し、

改変後のFactor Cタンパク質が、配列番号3の
F191位に対応する位置のLeuへの置換、
F423位に対応する位置のLeuへの置換、
F558位に対応する位置のLeuへの置換、
F670位に対応する位置のTry若しくはLeuへの置換、
F828位に対応する位置のLeuへの置換、
L971位に対応する位置のAla若しくはValへの置換、
A974位に対応する位置のLeuへの置換、及び／又は
G1004位に対応する位置のSer若しくはThrへの置換を有し、
改変前のFactor Cタンパク質と比較して、改変後のFactor Cタンパク質の熱安定性が向上している、改変Factor Cタンパク質。

[0014] [2] 実施形態1に記載のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

[0015] [3] 実施形態1に記載のタンパク質を含む、エンドトキシン検出試薬。

[0016] [4] 実施形態2に記載のポリヌクレオチドを含む細胞。

[0017] [5] 実施形態4に記載の細胞を培養すること、及び、実施形態1に記載のFactor Cタンパク質を取得することを含む、Factor Cタンパク質の製造方法。

[0018] [6] 実施形態4に記載の細胞を培養すること、及び、実施形態1に記載のFactor Cタンパク質を取得することを含む、エンドトキシン検出試薬の製造方法。

[0019] [7] 実施形態1に記載のタンパク質又は実施形態3に記載の試薬を、試料と接触させる工程、及びエンドトキシンを検出する工程を含む、エンドトキ

シン検出方法。

[0020] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2023-055736号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0021] 本発明の効果として、カプトガニ血球抽出物に依存することなく、加水分解酵素を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]LALを用いたエンドトキシン測定法の原理に関する模式図。

発明を実施するための形態

[0023] ある実施形態において、本開示は、配列番号3と95%以上、95.5%以上、96%以上、96.5%以上、97%以上、97.5%以上、98%以上、98.5%以上、99%以上、又は99.5%以上のアミノ酸配列同一性を有し、所定のアミノ酸置換を有する、熱安定性が向上した組換えFactor Cタンパク質を提供する。

[0024] ある実施形態において、本開示は、配列番号3に所定のアミノ酸置換を導入し、かつ当該所定の位置以外の位置において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有する、組換えFactor Cタンパク質を提供する。本明細書において、アミノ酸の置換、欠失又は付加についての「1又は数個」とは、1から20個、例えば1から19個、1から18個、1から17個、1から16個、1から15個、1から14個、1から13個、1から12個、1から11個、1から10個、1から9個、1から8個、1から7個、1から6個、1から5個、1から4個、1から3個、例えば1個又は2個であり得る。

[0025] (基準配列)

本明細書では、特に断らない限り、配列番号3を基準配列として、配列の各位置を規定する。配列番号3は、リムルス・ポリフェムス(Limulus polyphemus)由来の野生型Factor Cタンパク質である。

- [0026] 本明細書において、「野生型」とは、同種集団内において自然界に最も多く存在する形質をいう。
- [0027] 本明細書において、アミノ酸位置の対応関係は、例えば、既成のアミノ酸の相同性解析用ソフト、例えば、GENETYX（GENETYX社製）等を用いて、各種Factor Cのアミノ酸配列を比較することにより、容易に特定することができる。例えば、配列番号3のアミノ酸配列の位置Xに対応するFactor Cのアミノ酸位置は、該Factor Cのアミノ酸配列を配列番号3のアミノ酸配列とアラインメントすることによって特定することができる。
- [0028] ある実施形態において、配列番号3のFactor Cに変異を人為的に導入し得る。これは、組換えFactor Cをコードする遺伝子の配列に変異を人為的に導入することによりなされ得る。
- [0029] 変異は、何らかの特定の効果を意図して人為的に導入されたものでもよく、ランダムに、又は非人為的に導入されたものでもよい。特定の効果を意図して導入される変異としては、例えば、Factor Cの発現量を増強するための配列の付加、欠失や改変、Factor Cタンパク質の精製効率を向上させるための配列の付加、欠失や改変等の他、Factor Cタンパク質に実用上好ましい特性を付与する各種の変異も含まれ得る。
- [0030] 本明細書において、アミノ酸配列及び遺伝子配列の同一性は、GENETYX（GENETYX社製）のマキシマムマッチングやサーチホモロジー等のプログラム、又はCLUSTAL Wのマルチプルアラインメント、BLASTによるペアワイズアラインメント等のプログラムにより計算することができる。アミノ酸配列同一性を計算するために、2以上のFactor Cをアラインメントしたときに、該2以上のFactor Cにおいて同一であるアミノ酸の位置を調べることができる。こうした情報を基に、アミノ酸配列中の同一領域を決定できる。ここで2以上のアミノ酸配列について、同一性%とは、アミノ酸配列を対象としたBLAST（BLASTP）等を利用して2以上のアミノ酸配列のアラインメントを行った際に、アラインメ

ント可能であった領域の総アミノ酸数を分母とし、そのうち同一のアミノ酸によって占められる位置の数を分子としたときのパーセンテージをいう。故に、通常、2以上のアミノ酸配列に同一性が全く見られない領域がある場合、例えばC末端に同一性が全く見られない付加配列が一方のアミノ酸配列にある場合、当該同一性のない領域はアラインメント不可能であるため、同一性%の算出には利用されない。

[0031] また、2以上のFactor Cにおいて類似であるアミノ酸の位置を調べることもできる。例えばCLUSTALWを用いて複数のアミノ酸配列をアラインメントすることができ、この場合、アルゴリズムとしてBlosom62を使用し、複数のアミノ酸配列をアラインメントしたときに類似(similar)と判断されるアミノ酸を類似アミノ酸と呼ぶことがある。本開示の変異体において、アミノ酸置換はこのような類似アミノ酸の間の置換によるものであり得る。こうしたアラインメントにより、複数のアミノ酸配列について、アミノ酸配列が同一である領域及び類似アミノ酸によって占められる位置を調べることができる。こうした情報を基に、アミノ酸配列中の相同性領域(高度保存領域ともいう)を決定できる。

[0032] (ハイスループットスクリーニング)

Factor Cはさらに、機能性の組換えFactor C変異体を取得するためにハイスループットスクリーニングに供することができる。例えば変異導入したFactor C遺伝子を有する形質転換又は形質導入株のライブラリーを作製し、これをマイクロタイタープレートに基づくハイスループットスクリーニングに供してもよく、又は液滴型マイクロ流体に基づく超ハイスループットスクリーニングに供してもよい。例としてはバリエーションをコードする変異遺伝子のコンビナトリアルライブラリーを構築し、次いでファージディスプレイ(例えばChem. Rev. 105 (11): 4056-72, 2005)、イーストディスプレイ(例えばComb Chem High Throughput Screen. 2008;11(2): 127-34)、バクテリアルディスプレイ(例えばCurr Opin Struct Biol 17: 474-80, 2007)等を用いて、変異Factor Cの大きな集団をスクリ

ーニングする方法が挙げられる。またAgresti et al, "Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution" Proceedings of the National Academy of Sciences 107 (9): 4004-4009 (Mar, 2010)を参照のこと。Factor Cバリエーションのスクリーニングに使用しうる超ハイスループットスクリーニング手法についての同文献の記載を参照により本明細書に組み入れる。例えばエラープローンPCR法によりライブラリーを構築することができる。また飽和突然変異誘発を用いて、本明細書に記載の領域や位置又はそれらに対応する領域や位置を標的として変異導入しライブラリーを構築してもよい。ライブラリーを用いて電気コンピテントEBY-100細胞等の適当な細胞を形質転換し、約一千万通りの変異体を取得しうる。該ライブラリーで形質転換した酵母細胞を次いでセルソーティングに供しうる。標準ソフトリトグラフィー法を用いて作製したポリジメトキシルシロキサン(PDMS)マイクロ流体デバイスを用いてもよい。フローフォーカスデバイスを用いて単分散の液滴を形成することができる。個別の変異体を含有する形成された液滴を適当なソーティングデバイスに供しうる。細胞を選別する際にはFactor C活性の有無を利用しうる。これには例えば上記のFactor Cが作用すると吸光度が変化する反応液を用いてもよい。例えば96ウェルプレート、192ウェルプレート、384ウェルプレート、9600ウェルプレート等及びプレートリーダーを用いて吸光度の変化を測定してもよい。吸光系の代わりに発光系、発色系、又は蛍光系を用いて検出を行ってもよい。変異導入と選別は複数回反復してもよい。ここでいう変異は、アミノ酸の置換、挿入、欠失、及び／又は付加を包含する。

[0033] 例えば、配列番号3等のFactor Cに1～10の変異を導入し、活性を確認し得る。次いで、活性を有することが確認された組換えFactor C変異体から出発し、さらに1～10の変異を導入し、それらの活性を確認し得る。一連のハイスループットスクリーニング（例えば約一千万通りの変異体を取得しスクリーニングする上記の手法）を2ラウンド以上、5ラウンド以上、10ラウンド以上、15ラウンド以上、20ラウンド以上、3

0ラウンド以上、40ラウンド以上例えば50ラウンド以上反復しうる。各ラウンドで1変異以上、5変異以上、例えば10変異以上を導入するハイスループットスクリーニングを例えば10ラウンド反復することにより、出発Factor Cから見て、10変異以上、50変異以上、例えば100以上の変異が導入され、なおかつ活性を有する変異体を迅速に取得し得る。また20ラウンド反復することにより、出発Factor Cから見て20変異以上、100変異以上、例えば200以上の変異が導入され、なおかつ活性を有する変異体を迅速に取得し得る。30ラウンド、40ラウンド、50ラウンドについても同様である。かかる作業は自動装置やルーチンなプロセスの繰り返しにより行い得る。

- [0034] 変異は、Factor Cの全長アミノ酸配列のうち、第1番目のアミノ酸～最後のアミノ酸のいずれか1以上の位置に導入し得る。ただし、活性中心、基質認識部位、エンドトキシン認識部位及びこれらの近傍等の酵素の機能に重要な領域は除く。Factor Cは広く産業利用されており、当業者はその活性中心、基質認識部位、及びエンドトキシン認識部位を含む酵素の機能に重要な領域を熟知している。特定の実施形態では、例えばFactor Cの全長配列のうち、まず、第1～10位の部分に1又は複数の変異を導入し得る。次いで、活性を有することが確認された組換えFactor C変異体から出発し、さらに第11～20位に1又は複数の変異を導入し、活性を確認し得る。これをn回繰り返し得る ($n \leq 102$)。例えば102回目に第1011～1020位に1又は複数の変異を導入し得る。途中、酵素の機能に重要な領域や改変を意図しない領域は適宜、飛ばしてもよい。例えば配列番号3の967位又はこれに対応する位置等は飛ばすことができる。これにより、酵素の機能に重要な領域を除き、全長配列中のいずれの位置にも任意の変異を導入することができ、また、例えば配列番号3と比較して、5以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上、60以上、70以上、80以上、90以上、100以上、110以上、120以上、130以上、140以上、150以上、160以上、170以上、180

以上、190以上、例えば200以上の変異を有し、活性を有する組換えFactor C変異体を迅速に取得し得る。ある実施形態において、Factor Cの活性を消失させる変異は導入しない。ある実施形態において、配列番号3の967位、810位、866位、26位、61位、62位、及び63位に対応する位置は変異させない。ある実施形態において、配列番号3の1～25位を欠失させ得る。

[0035] 変異はランダムに導入してもよく、又は、合理的設計により導入してもよい。ある実施形態において、合理的設計により導入する変異、又はランダムに導入される変異は保存的アミノ酸置換であり得る。保存的アミノ酸置換は、置換前のアミノ酸と置換後のアミノ酸とが類似する化学的特性を有するアミノ酸置換を含む(例えば、Stryerら、Biochemistry、第5版、2002、44～49頁)。例えば保存的アミノ酸置換は、(i)塩基性アミノ酸の、異なる種類の塩基性アミノ酸との置換；(ii)酸性アミノ酸の、異なる種類の酸性アミノ酸との置換；(iii)芳香族アミノ酸の、異なる種類の芳香族アミノ酸との置換；(iv)非極性脂肪族アミノ酸の、異なる種類の非極性脂肪族アミノ酸との置換；及び(v)極性非荷電アミノ酸の、異なる種類の極性非荷電アミノ酸との置換からなる群から選択され得る。塩基性アミノ酸は、例えばアルギニン、ヒスチジン、及びリシンから選択され得る。酸性アミノ酸は、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸であり得る。芳香族アミノ酸は、例えばフェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンから選択され得る。非極性脂肪族アミノ酸は、例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、メチオニン、プロリン、およびイソロイシンから選択され得る。極性非荷電アミノ酸は、例えばセリン、トレオニン、システイン、アスパラギン及びグルタミンから選択され得る。保存的アミノ酸置換は、置換前のアミノ酸残基と置換後のアミノ酸残基とで化学的特性が類似すること、また、保存的アミノ酸置換が行われた位置は、タンパク質の三次構造において同じ位置に存在することから、当該保存的アミノ酸置換を有するバリエーションは三次構造が維持され、活性を有する蓋然性が高い。

[0036] ある実施形態において、合理的設計により導入する変異、又はランダムに導入される変異は、機能的に類似するアミノ酸での置換を含む。機能的に類似するアミノ酸の表は、当技術分野において広く知られている。ある実施形態において、機能的に類似するアミノ酸での置換では、置換前のアミノ酸と置換後のアミノ酸とが、以下に特定されるアミノ酸分類のいずれかに該当し得る：

- 1) グリシン(G)、アラニン(A)；
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；
- 4) アルギニン(N)、リシン(K)、ヒスチジン(H)；
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、バリン(V)、プロリン(P)；
- 6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；
- 7) セリン(S)、トレオニン(T)；および
- 8) システイン(C)、メチオニン(M)。

[0037] 保存的アミノ酸置換とは対照的に、非保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸の、上で概略された保存的置換(i)～(v)に該当しない任意のアミノ酸での置換である。ある実施形態において、アミノ酸置換は非保存的アミノ酸置換であり得る。この場合、例えば当該非保存的アミノ酸置換を導入する前後でプロテアーゼ活性が維持されるか確認し得る。活性が確認されれば、当該非保存的アミノ酸置換を採用し得る。

[0038] ある実施形態において、アミノ酸置換は、類似アミノ酸への置換（類似性置換）であり得る。本明細書において類似アミノ酸への置換は、特に断らない限り、ClustalWソフトウェア及びBlosom62アルゴリズムにおいて使用されているアミノ酸置換マトリックスにおいて、正の値又は中立の値（ゼロ）と評価されるアミノ酸への置換をいう（例えば、S. Henikoff and J. G. Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 10915-10919, 1992、特にその図2、及び、Thompson, Nucleic Acid Research, 1994, Vol. 22, No. 22, pp. 4673-4680を参照のこと）。同マトリクス表は、500以上の関連タンパ

ク質の約2000ブロックのアライメントされた配列セグメントから生成されたものである。また、単一マトリクスから出発しても、タンパク質群のサブセットを用いても、反復適用によりほぼ同じセットのスコアに至る。そのため、同置換マトリクスは汎用性があると考えられている。これは、相同性を有する配列が進化的に関連していることを利用した、最も広く用いられているアプローチである。そのため、あるFactor Cに類似性置換を導入したバリエーションは活性を有する蓋然性が高い。

[0039] ある実施形態において、保存的アミノ酸置換、又は機能的に類似するアミノ酸での置換は、酵素の活性中心、基質認識部位、補酵素認識モチーフ及びこれらの近傍等の酵素の機能に重要な領域に存在せず、したがって、酵素の活性に有意に影響しない。別の実施形態では、保存的アミノ酸置換、又は機能的に類似するアミノ酸での置換は、酵素の活性中心、基質認識部位、補酵素認識モチーフ及びこれらの近傍等に存在するが、酵素の活性に実質的に影響しない。

[0040] 組換えFactor Cは、アミノ酸置換前の配列と比較してアミノ酸の欠失を含み得る。典型的な実施形態において、アミノ酸欠失は酵素の機能に重要な領域に存在せず、したがって、酵素の活性に有意に影響しない。ある実施形態において、欠失は1～2アミノ酸の短い欠失であり得る。ある実施形態において、あるFactor Cのアミノ酸配列を他のFactor Cのアミノ酸配列と比較し、一方の配列においてアミノ酸が欠失している場合、当該欠失を他のFactor Cに導入し得る。両方のFactor Cが活性を示すため、このような欠失は酵素の活性に有意に影響しない可能性が高い。

[0041] アミノ酸欠失の例を挙げる。例えば配列番号3を他の由来のFactor Cとアライメントすると、配列番号3の433位もしくは434位に対応する位置は、当該他の由来のFactor Cでは欠失している。そのため、配列番号3から433位もしくは434位を欠失させても、酵素の活性に有意に影響しない可能性が高いと考えられる。

- [0042] 組換え Factor C はまた、変異前の配列と比較して追加のアミノ酸が挿入されるものを含み得る。典型的な実施形態において、アミノ酸挿入は活性中心、基質認識部位、補酵素認識モチーフ及びこれらの近傍等の酵素の機能に重要な領域に存在せず、したがって、酵素の活性に有意に影響しない。ある実施形態において、挿入は1～4アミノ酸であり得る。ある実施形態において、ある Factor C のアミノ酸配列を他の Factor C のアミノ酸配列と比較し、一方の配列においてアミノ酸が挿入されている場合、当該挿入アミノ酸を他の Factor C に導入し得る。両方の Factor C が活性を示すため、このような挿入は酵素の活性に有意に影響しない可能性が高い。
- [0043] 組換え Factor C はまた、変異前の配列と比較して追加のアミノ酸が付加されるものを含み得る。典型的な実施形態において、アミノ酸付加は、Factor C のN末端又はC末端に行われ、酵素の活性に有意に影響しない。ある実施形態において、付加は1～6アミノ酸、1～5アミノ酸、例えば1～4アミノ酸であり得る。付加の例として、Factor C の精製を補助するためのヒスチジン残基の短いストレッチ(例えば2～6のヒスチジン残基)が挙げられるが、これに限らない。また、付加の例として、Factor C の発現を補助するためのシグナルペプチドの付加が挙げられるが、これに限らない。シグナルペプチドとしては公知のシグナル配列又はその機能的同等物が挙げられる。
- [0044] Factor C への変異導入は、 α ヘリックス構造や、 β シート構造などの二次構造や構造モチーフが破壊されないように行い得る。二次構造の領域は、例えば二次構造予測アルゴリズムにより特定し得る。予測アルゴリズムとしては、例えばNetSurfP - 2.0が挙げられるがこれに限らない。ネスト(nest)、ニッチ(niche)等の他の構造モチーフについても同様である。Factor C は、N末端からC末端にかけて、EGF様ドメイン、3つのSushiドメイン、1つのLCCLドメイン及び1つのC型レクチンドメイン、2つのさらなるSushiドメイン、及びトリプシンドメインを有す

る。Factor Cへの変異導入は、これらのドメインや高次構造を破壊しないように行い得る。

[0045] 特に断らない限り、Factor Cの活性に必須のアミノ酸残基又はアミノ酸配列モチーフは置換しない。特定の実施形態では、これらの位置について、保存的アミノ酸置換又は類似性置換を行うことができるが、ただし、置換を行ったあとのバリエーションについて活性を確認する。特に断らない限り、Factor Cの活性に必須のアミノ酸残基の前後の位置にアミノ酸の欠失又は挿入を行わない。Factor Cの活性に必須のアミノ酸残基の前後の位置とは、当該活性に必須のアミノ酸残基よりも1つ若しくは2つN末端側の位置、又は1つ若しくは2つC末端側の位置をいう。特定の実施形態では、Factor Cの活性に必須のアミノ酸残基の前後の位置にアミノ酸の欠失又は挿入を行うことができるが、この場合、置換を行ったあとのバリエーションについて活性を確認する。バリエーションが活性を有するか否かは、例えばハイスループットスクリーニングによりルーチンに確認し得る。

[0046] Factor Cは、セリン、ヒスチジン、及びアスパラギン酸（又はグルタミン酸）からなる触媒三残基を有する。配列番号3では、967位のセリン、810位のヒスチジン、及び866位のアスパラギン酸が触媒三残基を構成する。Factor Cはアミノ末端のアミノ酸がエンドトキシン認識に関与する。配列番号3では、1位のアルギニンがエンドトキシン認識に関与する。Factor Cはエンドトキシンを認識するモチーフであるアルギニン-トリプトファン-アルギニンモチーフ（RWR）を有する。配列番号3では、61位のアルギニン、62位のトリプトファン、及び63位のアルギニンがエンドトキシンを認識するモチーフを構成する。本開示において、特に断らない限り、これらの位置は変異させない。特定の実施形態においては、これらの位置を変異させることができるが、その場合は、変異後のバリエーションについて活性を確認する。特定の実施形態においては、アミノ末端のアミノ酸はリジンまたはアルギニンであれば良い。アルギニン-トリプトファン-アルギニンモチーフ（RWR）の、アルギニンの一方又は両方をリジンに

置換しても良く、トリプトファンをチロシン又はフェニルアラニンに置換しても良い。なお、Factor Cの1～25位は、成熟タンパクでは除去されており、シグナル配列と考えられており、Factor Cの生産過程で切り離される。配列番号3では、1位のメチオニンから25位のセリンまでがシグナル配列を構成する。

[0047] ある実施形態において、本開示の組換えFactor Cは、Factor C活性を有する。Factor C活性の有無は、例えば実施例に記載の方法に従って、測定することができる。

[0048] (ポリヌクレオチド)

ある実施形態において、本開示は、組換えFactor Cをコードするポリヌクレオチド（以下、「組換えFactor C遺伝子」ともいう）を提供する。ポリヌクレオチドの配列は、組換えFactor Cのアミノ酸配列に基づいて容易に定めることができる。例えば、配列番号3のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドとして、配列番号4のポリヌクレオチドが挙げられるがこれに限らない。

[0049] ある実施形態において、組換えFactor Cをコードするポリヌクレオチドは、例えば、

(i) 配列番号4のヌクレオチド配列に対して全長で85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、より好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有し、活性なFactor Cをコードするヌクレオチド配列、

(ii) 配列番号4のヌクレオチド配列において、1又は数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加され、活性なFactor Cをコードするヌクレオチド配列、或いは

(iii) 配列番号4からなる群から選択されるヌクレオチド配列、を含み得る。

[0050] これらのFactor Cをコードするヌクレオチドを得るには、通常一

般的に用いられている遺伝子のクローニング方法が用いられる。例えば、Factor C生産能を有するカブトガニの組織又は細胞から常法により、染色体DNA又はmRNAを抽出することができる。さらにmRNAを鋳型としてcDNAを合成することができる。このようにして得られた染色体DNA又はcDNAを用いて、染色体DNA又はcDNAのライブラリーを作製することができる。

[0051] 次いで、上記Factor Cのアミノ酸配列に基づき、適当なプローブDNAを合成して、これを用いて染色体DNA又はcDNAのライブラリーからFactor Cをコードするポリヌクレオチドを選抜する方法、又は、上記アミノ酸配列に基づき、適当なプライマーDNAを作製して、5' RACE法や3' RACE法などの適当なポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction、PCR法）により、Factor Cをコードする目的のヌクレオチド断片を含むDNAを増幅させ、これらのDNA断片を連結させて、目的のFactor Cをコードするヌクレオチドの全長を含むDNAを得ることができる。

[0052] Factor Cをコードするヌクレオチド配列が既知の場合には、該ヌクレオチド配列を人工的に合成してもよい。このような人工遺伝子合成サービスは、例えば、Integrated DNA Technologies社から提供されている。

[0053] (Factor C遺伝子の作製方法)

Factor C遺伝子の変異処理は、企図する変異形態に応じた、公知の任意の方法で行うことができる。すなわち、Factor C遺伝子又は当該遺伝子の組み込まれた組換え体DNAと変異原となる薬剤とを接触、作用させる方法；紫外線照射法；遺伝子工学的手法；又は蛋白質工学的手法を駆使する方法等を広く用いることができる。

[0054] 上記変異処理に用いられる変異原となる薬剤としては、例えば、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、亜硝酸、亜硫酸、ヒドラジン、蟻酸、若しくは5-ブロモウラシル等を挙げるこ

ができる。

[0055] この接触、作用の諸条件は、用いる薬剤の種類等に応じた条件を採ることが可能であり、現実にも所望の変異をFactor C遺伝子において惹起することができる限り特に限定されない。通常、好ましくは0.5～12Mの上記薬剤濃度において、20～80℃の反応温度下で10分間以上、好ましくは10～180分間接触、作用させることで、所望の変異を惹起可能である。紫外線照射を行う場合においても、上記の通り常法に従い行うことができる。

[0056] 蛋白質工学的手法を駆使する方法としては、一般的に、Site-Specific Mutagenesisとして知られる手法を用いることができる。

[0057] なお、上記遺伝子改変法の他に、有機合成法または酵素合成法により、直接所望の改変Factor C遺伝子を合成することもできる。

[0058] Factor C遺伝子の塩基配列は、例えばマルチキャピラリーDNA解析システムApplied Biosystems 3730xl DNAアナライザ（Thermo Fisher Scientific社製）により確認し得る。

[0059] （ベクター、宿主細胞）

ある実施形態において、本開示は、上記ポリヌクレオチドを含むベクターに関する。これらのFactor C遺伝子は、常法に従って各種ベクターに連結されていることが、取扱い上好ましい。ベクターとしてはプラスミドが挙げられるが、それ以外の、例えば、バクテリオファージ、コスミド等の当業者に公知の任意のベクターを用いることができる。ベクターの種類は宿主細胞に応じて選択することができ、具体的には、例えばpET16-b又はpKK223-3等が好ましい。

[0060] ある実施形態において、本開示は、上記ポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、限定されないが、大腸菌や枯草菌等の細菌、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）、及び植物細胞等であり、好ましくは大腸菌等の細菌細胞である。

[0061] （形質転換及び形質導入）

上述のように得られたFactor C遺伝子を、常法により、バクテリオファージ、コスミド、又は原核細胞若しくは真核細胞の形質転換に用いられるプラスミド等のベクターに組み込み、各々のベクターに対応する宿主を常法により、形質転換することができる。例えば、宿主として、エッシャーシア属に属する微生物、例えば得られた組換え体DNAを用いて、例えば、大腸菌K-12株、又は大腸菌B株、好ましくは大腸菌JM109株、大腸菌DH5 α 株、大腸菌BL21株、大腸菌BL21(DE3)株等を形質転換又はそれらに形質導入してそれぞれの菌株を得ることができる。こうした宿主細胞に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主細胞がエッシャーヒア・コリーに属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行う方法などを採用することができる。更にエレクトロポレーション法を用いても良い。なおFactor C遺伝子は、発現宿主に応じてコドン最適化されたものであり得る。

[0062] (組換えFactor Cの生産方法)

ある実施形態において、本開示は、上記宿主細胞を培養する工程を含む、組換えFactor Cの生産方法に関する。培養は各種公知の方法で行うことができ、固体培養法でもよいが、好ましくは液体培養法により培養する。

[0063] 産生方法は、上記宿主細胞を、組換えFactor Cタンパク質を発現しうる条件下で培養する工程、及び任意に培養物又は培養液から組換えFactor Cを単離する工程を含んでよい。ここで組換えFactor Cタンパク質を発現しうる条件とは、Factor C遺伝子が転写、翻訳され、当該遺伝子によりコードされるポリペプチドが産生されることをいう。

[0064] また、上記宿主細胞を培養する培地としては、例えば酵母若しくは真菌などの真核細胞を用いる場合、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー又は大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄又は

硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、さらに必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

[0065] 宿主細胞として哺乳動物細胞を用いる場合は、哺乳動物細胞の培養に通常用いられる培地、例えばDMEM培地（Sigma社）、RPMI1640培地（Sigma社）、E xpiCH0(商標)TM Expression Medium（Thermo Fisher Scientific）などを使用し得る。哺乳動物細胞の培養は、例えば、35℃～38℃、例えば36℃～38℃にて、5%～8%CO₂供給下で、静置培養又は浮遊培養などにより行うことができる。

[0066] 宿主細胞として昆虫細胞を用いる場合は、昆虫細胞の培養に通常用いられる培地、例えばSf-900(商標)培地（Thermo Fisher社）、Sf-900(商標)II培地（Thermo Fisher社）、Sf-900(商標)III培地（Thermo Fisher社）、Gibco(商標)TC-100 昆虫培地（Thermo Fisher社）、シュナイダー昆虫培地（シグマアルドリッチ社）、グレース昆虫培地（シグマアルドリッチ社）、TNM-FH昆虫培地（シグマアルドリッチ社）、Express Five(商標)SFM培地（Thermo Fisher社）などを使用し得る。昆虫細胞としては、組換えタンパク質の発現に通常用いられるもの、例えばIPLB-Sf9、IPLB-Sf21、IPLB-SF+、High-Five(商標)、Schneider S2、BmN等が挙げられるがこれに限らない。公知の細胞株、例えばカイコ(*Bombyx mori*)、ヨトウガ(*Mamestra brassicae*)、ツマジロクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)、イラクサギンウワバ(*Trichoplusia ni*)、及びキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)由来の細胞株、例えばDrosophila胚由来細胞株やカイコ胚由来細胞株を使用してもよい。

[0067] 昆虫細胞の培養条件は特に制限されず、昆虫細胞の培養に通常用いられる条件を用いることができる。また、通常用いられる条件を適宜、改変してもよい。培養は、例えば、25～30℃、例えば26～29℃、例えば27℃～28℃にて、振とう培養又は静置培養により行うことができる。

[0068] 昆虫細胞を宿主としてタンパク質を発現する手法は特に制限されず、組換えタンパク質の発現に通常用いられる手法を利用し得る。例えば、目的タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだウイルスを昆虫細胞に感染させ得る

。昆虫細胞の形質転換に用いるウイルスとしては、公知のウイルス、例えばバキュロウイルス (Baculovirus)、例えば核多角体病ウイルス (Nucleopolyhedrovirus; NPV)、例えば A c N P V (Autographa californica NPV)、B m N P V (Bombix mori NPV) が挙げられる。ウイルスへの核酸の導入は常法により行うことができ、例えば、トランスファーベクターを用いた相同的組換えによりウイルスに核酸を導入し得る。トランスファーベクターとしては、pPSC8 (プロテインサイエンス (Protein Sciences) 社)、pVL1393 (ファーマンジェン (Pharmingen) 社)、pFastBac (インビトロジェン (Invitrogen) 社) が挙げられる。また、目的タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだベクターを昆虫細胞に導入し、宿主の染色体上に当該遺伝子を組み込むことで組換えタンパク質を発現させ得る。ベクターとしては、任意の公知の昆虫ベクター、例えば pAc シリーズ、pVL シリーズ、pIZ シリーズ、pIZ/V5-His ベクター (Thermo Fisher 社) や、pIZT/V5-His (Thermo Fisher 社) が挙げられるがこれに限らない。

[0069] 宿主として酵母又は真菌などの真核細胞を用いる場合は、培地の初発 pH は、pH 7～9 に調整するのが適当である。酵母又は真菌などの真核細胞を用いる場合、培養は、20～42℃の培養温度、好ましくは25～37℃前後の培養温度で4～24時間、さらに好ましくは25～37℃前後の培養温度で8～16時間、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施するのが好ましい。酵母としては、チゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、ピキア (Pichia) 属、カンジダ (Candida) 属などに属する酵母が挙げられる。真菌としては、アスペルギルス (Aspergillus) 属やトリコデルマ (Tricoderma) 属が挙げられる。植物細胞としては、アグロバクテリウム (Agrobacterium) を用いて形質転換した植物細胞が挙げられる。哺乳動物細胞としては、CHO、HEK293等が挙げられる。

[0070] 培養終了後、該培養物より Factor C を採取するには、通常の酵素採取手段を用いて得ることができる。酵母又は真菌などの真核細胞を用いる場合、例えば、常法により菌体を、超音波破壊処理、磨砕処理等するか、又

はリゾチーム等の溶菌酵素を用いて本酵素を抽出するか、又はトルエン等の存在下で振盪若しくは放置して溶菌を行わせ、本酵素を菌体外に排出させることができる。そして、この溶液を濾過、遠心分離等して固形部分を除去し、必要によりストレプトマイシン硫酸塩、プロタミン硫酸塩、若しくは硫酸マンガン等により核酸を除去したのち、これに硫安、アルコール、アセトン等を添加して分画し、沈澱物を採取し、Factor Cの粗酵素を得ることができる。哺乳動物細胞又は昆虫細胞を用いる場合、培養液、培養上清、又は例えば常法により細胞を破碎して細胞破碎抽出物を取得し、場合により核酸を除去してもよく、場合により硫酸アンモニウム沈殿等の沈殿操作を行ってもよく、これによりFactor Cの粗酵素を得ることができる。

[0071] 上記Factor Cの粗酵素からさらにFactor C精製酵素を得るには、例えば、セファデックス、スーパーデックス若しくはウルトロゲル等を用いるゲル濾過法、イオン交換性担体、疎水性担体、ヒドロキシアパタイトを用いる吸着溶出法、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法、蔗糖密度勾配遠心法等の沈降法、アフィニティクロマトグラフィー法、分子ふるい膜若しくは中空糸膜等を用いる分画法等を適宜選択し、又はこれらを組み合わせて実施することにより、精製されたFactor C酵素を得ることができる。このようにして、所望のFactor Cを得ることができる。Factor Cは、糖鎖切断処理を行ってもよく、又は行わずにそのまま使用してもよい。

[0072] 生産されたFactor Cは本明細書に記載のエンドトキシン検出試薬、又はエンドトキシンを検出するための方法において使用することができる。生産されたFactor Cの耐熱性が相対的に高いものであれば、そのような酵素は相対的に保存性が向上し、流通や保存面においても、従来のFactor Cよりも優れた検出試薬、検出キットを作製することに寄与し得る。

[0073] (エンドトキシン検出試薬)

ある実施形態において本開示は、組換えFactor Cを含む、エンドトキシン検出試薬を提供する。エンドトキシン検出試薬は、組換えFact

or Cに加えて、緩衝剤、安定化剤、合成基質等、従来の試薬に通常含まれる他の成分を含み得る。試薬の形態は特に限定されず、例えば、凍結乾燥された粉末、液状試薬等の形態が挙げられる。

[0074] 試料にエンドトキシンが含まれると、これによりFactor Cが活性化Factor Cに変換される。活性化Factor Cは、標識されたペプチド基質を加水分解することができる。加水分解された標識を、比濁法、発色基質法、蛍光基質法、発光基質法等により検出し得る。これにより試料中のエンドトキシンを検出し得る。

[0075] エンドトキシンは、用いるFactor Cにより基質として認識されるものであればどのようなものでもよく、天然のもの又は化学合成されたものでもよい。また任意の公知のエンドトキシン誘導体を用いることもできる。

[0076] ある実施形態において本開示は、エンドトキシン検出キットを提供する。エンドトキシン検出キットは、エンドトキシン検出試薬、及び場合により使用説明書、標準物質、シリンジ、針、検体からのサンプリング器具等を含み得る。

[0077] (エンドトキシンを検出するための方法)

ある実施形態において、本開示は、組換えFactor Cを使用することを含む、エンドトキシンを検出する方法に関する。この方法は、試料を組換えFactor Cと接触させる工程、及び、合成基質から生成する標識体を検出する工程を含み得る。

[0078] ある実施形態において、配列番号3の配列を有する組換えFactor Cは、アミノ酸置換を有し得る。アミノ酸を置換し得る位置としては、配列番号3の423位、558位、670位、971位、191位、828位、974位、及び1004位に対応する位置が挙げられるが、これに限らない。

[0079] ある実施形態において、組換えFactor Cは、以下のアミノ酸置換を有し得るが、置換アミノ酸はこれに限らない。下記の変異のいずれか1つを有する変異体を便宜上、一重変異体Monということがある。

[0080] [表1]

置換位置 (基準配列: 配列番号 3)	置換後のアミノ酸
F191	L
F423	L
F558	L
F670	Y, L
F828	L
L971	A, V
A974	L
G1004	S, T

[0081] (多重変異体)

ある実施形態において、組換えFactor Cは、上記のアミノ酸置換を2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、例えば8有し得る。

[0082] ある実施形態において、組換えFactor Cは、以下のアミノ酸置換を有し得る。括弧の中はいずれのアミノ酸でもよいことを意味する。例えば、「L971(A, V)」は、配列番号3の971位に対応する位置が、Alaでも、Valでもよいことを意味する。

[二重変異体Doubly]

F191L/F423L、F191L/F558L、F191L/F670(Y, L)、F191L/F828L、F191L/L971(A, V)、F191L/A974L、F191L/G1004(S, T)、F423L/F558L、F423L/F670(Y, L)、F423L/F828L、F423L/L971(A, V)、F423L/A974L、F423L/G1004(S, T)、F558L/F670(Y, L)、F558L/F828L、F558L/L971(A, V)、F558L/A974L、F558L/G1004(S, T)、F670(Y, L)/F828L、F670(Y, L)/L971(A, V)、F670(Y, L)/A974L、F670(Y, L)/G1004(S, T)、F828L/L971(A, V)、F828L/A974L、F828L/G1004(S, T)、L971(A, V)/A974L、L971(A, V)/G1004(S, T)、A974L/G1004(S, T)。

[三重変異体Triply]

F191L/F423L/F558L、F191L/F423L/F670(Y, L)、F191L/F423L/F828L、F191L/F4

23L/L971(A, V)、F191L/F423L/A974L、F191L/F423L/G1004(S, T)、F423L/F558L/F670(Y, L)、F423L/F558L/F828L、F423L/F558L/L971(A, V)、F423L/F558L/A974L、F423L/F558L/G1004(S, T)、F558L/F670(Y, L)/F828L、F558L/F670(Y, L)/L971(A, V)、F558L/F670(Y, L)/A974L、F558L/F670(Y, L)/G1004(S, T)、F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)、F670(Y, L)/F828L/A974L、F670(Y, L)/F828L/G1004(S, T)、F828L/L971(A, V)/A974L、F828L/L971(A, V)/G1004(S, T)、L971(A, V)/A974L/G1004(S, T)。

[四重変異体 Q u a]

F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)、F191L/F423L/F558L/F828L、F191L/F423L/F558L/L971(A, V)、F191L/F423L/F558L/A974L、F191L/F423L/F558L/G1004(S, T)、F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L、F423L/F558L/F670(Y, L)/L971(A, V)、F423L/F558L/F670(Y, L)/A974L、F423L/F558L/F670(Y, L)/G1004(S, T)、F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)、F558L/F670(Y, L)/F828L/A974L、F558L/F670(Y, L)/F828L/G1004(S, T)、F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/A974L、F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/G1004(S, T)、F828L/L971(A, V)/A974L/G1004(S, T)。

[五重変異体 P e n]

F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L、F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)/L971(A, V)、F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)/A974L、F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)/G1004(S, T)、F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)、F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/A974L、F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/G1004(S, T)、F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/A974L、F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/G1004(S, T)、F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/A974L/G1004(S, T)。

[六重変異体 H e x]

F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)、F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/A974L、F191L/F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/G1004(S, T)、F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/A974L、F423L/F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/G1004(S, T)、F558L/F670(Y, L)/F828L/L971(A, V)/A974L/G1004(S, T)。

[七重変異体H e p]

F191L/F423L/F558L/F670(Y,L)/F828L/L971(A,V)/A974L、F191L/F423L/F558L/F670(Y,L)/F828L/L971(A,V)/G1004(S,T)、F423L/F558L/F670(Y,L)/F828L/L971(A,V)/A974L/G1004(S,T)。

[八重変異体O c t]

F191L/F423L/F558L/F670(Y,L)/F828L/L971(A,V)/A974L/G1004(S,T)。

[0083] 上記の変異体の集まりを便宜上、集合S-1とする。

[数1]

S-1={Mon, Dou, Tri, Qua, Pen, Hex, Hep, Oct}

[0084] ある実施形態において、組換えFactor Cは、以下のアミノ酸置換を有し得る。括弧の中はいずれのアミノ酸でもよいことを意味する。

[一重変異体M o n - 2]

F423(L)、Y425(F)、Y606(F)、Y834(F)、Y843(K)、A877(R)、T915(R)、K956(E)、R978(E)、S1014(D)。

[二重変異体D o u - 2]

F423(L)/Y425(F)、F423(L)/Y834(F)、F423(L)/Y843(K)、F423(L)/A877(R)、F423(L)/T915(R)、F423(L)/K956(E)、F423(L)/R978(E)、F423(L)/S1014(D)、Y425(F)/Y834(F)、Y425(F)/Y843(K)、Y425(F)/A877(R)、Y425(F)/T915(R)、Y425(F)/K956(E)、Y425(F)/R978(E)、Y425(F)/S1014(D)、Y834(F)/Y843(K)、Y834(F)/A877(R)、Y834(F)/T915(R)、Y834(F)/K956(E)、Y834(F)/R978(E)、Y834(F)/S1014(D)、Y843(K)/A877(R)、Y843(K)/T915(R)、Y843(K)/K956(E)、Y843(K)/R978(E)、Y843(K)/S1014(D)、A877(R)/T915(R)、A877(R)/K956(E)、A877(R)/R978(E)、A877(R)/S1014(D)、T915(R)/K956(E)、T915(R)/R978(E)、T915(R)/S1014(D)、K956(E)/R978(E)、K956(E)/S1014(D)、R978(E)/S1014(D)。

[三重変異体T r i - 2]

F423(L)/Y425(F)/Y834(F)、F423(L)/Y425(F)/Y843(K)、F423(L)/Y425(F)/A877(R)、F423(L)/Y425(F)/T915(R)、F423(L)/Y425(F)/K956(E)、F423(L)/Y425(F)/R978(E)、F423(L)/Y425(F)/S1014(D)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)、Y425(F)

)/Y834(F)/A877(R)、Y425(F)/Y834(F)/T915(R)、Y425(F)/Y834(F)/K956(E)、Y425(F)/Y834(F)/R978(E)、Y425(F)/Y834(F)/S1014(D)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)、Y834(F)/Y843(K)/T915(R)、Y834(F)/Y843(K)/K956(E)、Y834(F)/Y843(K)/R978(E)、Y834(F)/Y843(K)/S1014(D)、Y843(K)/A877(R)/T915(R)、Y843(K)/A877(R)/K956(E)、Y843(K)/A877(R)/R978(E)、Y843(K)/A877(R)/S1014(D)、A877(R)/T915(R)/K956(E)、A877(R)/T915(R)/R978(E)、A877(R)/T915(R)/S1014(D)、T915(R)/K956(E)/R978(E)、T915(R)/K956(E)/S1014(D)、K956(E)/R978(E)/S1014(D)。

[四重変異体 Q u a - 2]

F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/A877(R)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/T915(R)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/K956(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/R978(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/S1014(D)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/T915(R)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/K956(E)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/R978(E)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/S1014(D)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/K956(E)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/R978(E)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/S1014(D)、Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)、Y843(K)/A877(R)/T915(R)/R978(E)、Y843(K)/A877(R)/T915(R)/S1014(D)、A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)、A877(R)/T915(R)/K956(E)/S1014(D)、T915(R)/K956(E)/R978(E)/S1014(D)。

[五重変異体 P e n - 2]

F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/T915(R)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/K956(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/R978(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/S1014(D)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/K956(E)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/R978(E)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/S1014(D)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/R978(E)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)

)/S1014(D)、Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)、Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/S1014(D)、A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)/S1014(D)。

[六重変異体 H e x - 2]

F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/K956(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/R978(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/S1014(D)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/R978(E)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/S1014(D)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/S1014(D)、Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)/S1014(D)。

[七重変異体 H e p - 2]

F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/R978(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/S1014(D)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/S1014(D)、Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)/S1014(D)。

[八重変異体 O c t - 2]

F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)、F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/S1014(D)、Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)/S1014(D)。

[九重変異体 N o n - 2]

F423(L)/Y425(F)/Y834(F)/Y843(K)/A877(R)/T915(R)/K956(E)/R978(E)/S1014(D)。

[0085] 上記の変異体の集まりを便宜上、集合 S - 2 とする。

[数 2]

S-2 = {Mon-2, Dou-2, Tri-2, Qua-2, Pen-2, Hex-2, Hep-2, Oct-2, Non-2}

[0086] ある実施形態において、組換え F a c t o r C は、集合 S - 1 と S - 2

の任意の組み合わせの変異を有し得る。このような変異体を便宜上、集合S-3とする。ある実施形態において、組換えFactor C変異体は、集合S-1、S-2、又はS-3に含まれる組換えFactor C変異体から出発して、1以上の復帰変異を有し得る（ただし復帰変異の数は、導入したアミノ酸置換の数を超えない）。復帰変異とは、あるアミノ酸置換を導入した位置に変異を導入し、当該アミノ酸置換前のアミノ酸に復帰させる変異をいう。このような復帰変異体の集まりを便宜上、集合S-4とする。

[0087] 集合S-1、S-2、S-3、又はS-4に含まれる組換えFactor C変異体は、変異前の組換えFactor Cと比較して、熱安定性が向上しているものであり得る。これを本明細書において熱安定性向上型変異体ということがある。集合S-1、S-2、S-3、又はS-4に含まれる組換えFactor C変異体は有限であり、当業者であれば、ルーチンな確認作業によりその熱安定性を確認し得る。ある実施形態において、本開示は、集合S-1、S-2、S-3、又はS-4に含まれる変異を有し、配列番号3と80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、例えば95%以上、95.5%以上、96%以上、96.5%以上、97%以上、97.5%以上、98%以上、98.5%以上、99%以上、若しくは99.5%以上のアミノ酸配列同一性を有する、組換えFactor Cタンパク質変異体を提供する。

[0088] 本明細書において、「熱安定性」は、例えば、Factor Cを所定の温度で所定の時間の熱処理を行った時の残存活性を指標に評価することができる。具体的には、Factor Cの熱安定性は、Factor Cを高温条件下、例えば、30～56℃、35～55℃、40～50℃、例えば42～48℃、例えば45～48℃の温度下で、一定時間、例えば5～120分、10～60分、例えば15～30分熱処理後の活性残存率を比較することにより評価することができる。

[0089] Factor Cの残存活性は、上述の高温条件で作用させる前のFactor C活性を1としたときの、熱処理後の活性である。例えば、熱処理

後の残存活性が半減した場合は、熱処理前の活性 1 に対して熱処理後の残存活性は 0.5 となる。Factor C の活性残存率は、上述の高温条件で作用させる前の Factor C 活性に対する熱処理後の活性の比で算出する。本明細書において熱安定性改善とは、Factor C 変異体を上記条件で作用させた際の活性残存率が、本開示の変異（集合 S-1、S-2、S-3 又は S-4 に含まれる変異）を導入する前の Factor C に対して 1.01 倍以上、1.02 倍以上、1.05 倍以上、1.1 倍以上、1.2 倍以上、1.3 倍以上、1.4 倍以上、1.5 倍以上、1.6 倍以上、1.7 倍以上、1.8 倍以上、1.9 倍以上、又は 2 倍以上の改善を示す場合を言う。別の言い方をすれば、本明細書において熱安定性改善とは、Factor C 変異体を上記条件で作用させた際の活性残存率が、本開示の変異を導入する前の Factor C の活性残存率に対して 1% 以上、2% 以上、5% 以上、10% 以上、20% 以上、30% 以上、40% 以上、50% 以上、60% 以上、70% 以上、80% 以上、90% 以上、又は 100% 以上の改善を示す場合を言う。

[0090] ある実施形態において、Factor C は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し得る：

(i) 配列番号 3 と比較して、95% 以上、95.5%、96% 以上、96.5%、97% 以上、97.5%、98% 以上、98.5%、99% 以上、又は 99.5% 以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列、

(ii) 配列番号 3 のアミノ酸配列、又は

(iii) 前記 (i) 若しくは (ii) のアミノ酸配列について、さらに集合 S-1、S-2、S-3 又は S-4 に含まれる変異を 1 以上有するアミノ酸配列、例えば配列番号 3 の、F191 位に対応する位置の Leu への置換、

F423 位に対応する位置の Leu への置換、

F558 位に対応する位置の Leu への置換、

F670 位に対応する位置の Trp 若しくは Leu への置換、

F 8 2 8 位に対応する位置の L e u への置換、
L 9 7 1 位に対応する位置の A l a 若しくは V a l への置換、
A 9 7 4 位に対応する位置の L e u への置換、及び／又は
G 1 0 0 4 位に対応する位置の S e r 若しくは T h r への置換、
を有するアミノ酸配列。

[0091] ある実施形態において、本開示は、熱処理前の活性を 1 0 0 % として、4 8 °C、3 0 分の熱処理後の残存活性が 4 4 % よりも大きい、例えば 4 6 % 以上、例えば 4 7 % 以上、例えば 5 0 % 以上、例えば 5 5 % 以上、例えば 7 8 % 以上、例えば 1 0 7 % 以上、例えば 1 1 1 % 以上、例えば 1 1 6 % 以上、例えば 1 2 3 % 以上である F a c t o r C を提供する。ある実施形態において、本開示はこのような F a c t o r C を含む、エンドトキシン検出試薬を提供する。ある実施形態において、本開示は、該 F a c t o r C 又は試薬を、試料と接触させる工程、及びエンドトキシンを検出する工程を含む、エンドトキシン検出方法を提供する。

[0092] 本開示の組換え F a c t o r C から、野生型配列そのものは除かれる。また、本開示の組換え F a c t o r C から、天然物は除かれる。ある実施形態において、本開示の出願後、又は公開後に明らかとなった野生型配列や天然物も除かれる。

[0093] 本開示により、カプトガニ血球抽出物に依存することなく、加水分解酵素を得ることができる。また、本開示により、カプトガニ血球抽出物に依存することなく、エンドトキシンを検出し得る。また、本開示により、従来の組換え F a c t o r C とは異なる、代替手段が実現される。

[0094] (実施例)

本開示の F a c t o r C を以下の実施例によりさらに例証する。但し、これはあくまで例証目的であり、本開示はこれに何ら限定されるものではない。

[0095] [実施例 1]

(1) F a c t o r C 発現用プラスミドベクターの構築

(1-1) ベクター断片の構築

ベクターは pI Z T / V 5 - H i s (I n v i t r o g e n 製) を使用し、その 1 n g を K O D O n e P C R M a s t e r M i x (東洋紡製) 2 5 μ L、5 μ M フォワードプライマー (配列番号 1) 1. 5 μ L、5 μ M リバースプライマー (配列番号 2) 1. 5 μ L と混合し、超純水で 5 0 μ L にメスアップして P C R に供した。P C R 条件は、9 8 ° C 1 0 秒、5 5 ° C 5 秒、6 8 ° C 2 0 秒を 1 サイクルとし、このサイクルを 2 5 回繰り返すことにより断片を増幅した。

[0096] 得られた P C R 産物に、制限酵素 D p n I (N e w E n g l a n d B i o l a b s 製) を 2 μ L 添加して 3 7 ° C で 1 時間インキュベートし、反応産物を N u c l e o S p i n G e l a n d P C R C l e a n - u p (M a c h e r e y - N a g e l 製) を用いて精製し、これをベクター断片とした。

[0097] (1-2) pI Z T / V 5 ベクターと F a c t o r C 遺伝子の連結

F C (配列番号 3) のアミノ酸配列をコードする塩基配列 (配列番号 4) に対し、ベクターと相同な配列を O R F の上流 (配列番号 5) と下流 (配列番号 6) に付加したものも I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s 社に合成委託した。

[0098] このインサート断片を 5 0 n g / μ L となるように超純水で溶解し、その 1. 5 μ L を、(1-1) で得られた 1 0 0 n g / μ L ベクター断片 1 μ L、5 × I n - F u s i o n S n a p A s s e m b l y M a s t e r M i x (C l o n t e c h 製) 2 μ L と混合し、超純水にて 1 0 μ L にメスアップした後に 5 0 ° C で 1 5 分反応させた。得られた I n - F u s i o n 反応物 5 μ L を、E C O S (商標) C o m p e t e n t E. c o l i J M 1 0 9 (ニッポン・ジーン製) 5 0 μ L を形質転換し、2 5 μ g / m L Z e o c i n 添加 L B 寒天培地に撒いて 3 7 ° C で一晩インキュベートし、形質転換体を得た。

[0099] 得られたコロニーを 2 5 μ g / m L Z e o c i n 添加 L B 液体培地 2.

5 mLに植菌し、37℃200 rpmで一晩増殖後、Fast Gene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス製）を用いてプラスミドを調製し、ファスマック社のDNAシーケンス解析を利用して塩基配列を解読し、Factor C発現用プラスミドベクター（pIZT/V5-LpFC）が構築できたことを確認した。配列が確認できたコロニーを、5 mLの25 µg/mL Zeocin添加2TY培地に植菌し、37℃200 rpmで一晩増殖後NucleoBond（登録商標）Xtra Midi EF（Macherey-Nagel製）を用いて、エンドトキシンフリーのプラスミドを調製した。

[0100] (2) Factor Cの組換え生産

(2-1) 昆虫細胞Sf9の培養

昆虫細胞はSf9 cells in Sf-900（商標）III SFM（Thermo Fisher Scientific製）を用いて、一連の操作は安全キャビネット内で行った。予め250℃で2時間乾熱した125 mLの三角フラスコにSf-900（商標）III SFM（Thermo Fisher Scientific製）を25 mL添加し、28℃のインキュベーターに静置した。Sf9の凍結バイアルを37℃の湯浴につけて、僅かに氷が残る程度まで素早く融解し、70%エタノールでバイアル表面を殺菌した後に、穏やかに混ぜて全量を上述の三角フラスコに移した。フラスコのキャップを緩め、28℃、125 rpmで回転振とう培養した。

[0101] 3日後に細胞培養液を一部サンプリングし、4%トリパンブルー溶液と1:1で混合し、Countess（商標）Automated Cell Counter（Thermo Fisher Scientific製）を使用して細胞数とviabilityを計測し、 $3 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ cell/mLであれば、 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ cell/mLとなるように、細胞を継代した。細胞継代は、本実施例の実施期間中、3～4日に一度定期的に実施した。

[0102] (2-2) 一過性トランスフェクション

トランスフェクションには、継代3回以上、viability 90%を満たしたSf9を用いた。培養中のSf9をサンプリングし、 4.1×10^5 cells/mLとなるように、室温に戻したSf9 cells in Sf-900(商標) III SFM (Thermo Fisher Scientific製)を加えて希釈した。それを6ウェルのセルカルチャープレート(Corning製)に2mLずつ滴下して、左右交互に穏やかに揺らし、細胞の分布を均一にした。

[0103] 「(1) Factor C発現用プラスミドベクターの構築」で得られたエンドトキシンフリーのプラスミドを $1.4 \mu\text{g}$ の滅菌済のチューブに分注し、それにSf-900(商標) III SFM (Thermo Fisher Scientific製)を $100 \mu\text{L}$ 添加して15~25分間静置した。その際、プラスミド未添加のSf9を、ネガティブコントロールとして同時に調製した。

[0104] 次に、1つのサンプルにつき、Cellfectin(商標) II Reagent (Thermo Fisher Scientific製)が $12 \mu\text{L}$ 、Sf9 cells in Sf-900(商標) III SFMが $150 \mu\text{L}$ となるように両者を混合し、15分間静置した。なお、Cellfectin(商標) II Reagentは使用前に転倒混和にてよく混ぜて使用した。各時間静置したプラスミドとCellfectin(商標) II Reagentを混合し、細胞の入った各ウェルに振りかけるように添加し、左右交互に穏やかに揺らして、 28°C にて96時間静置培養した。培養終了後、蛍光顕微鏡BZ-X810(キーエンス製)を用いてトランスフェクション効率を確認し、上清をサンプリングした。上清をシリンジフィルターDISMIC 13CP020AS(アドバンテック東洋製)でろ過し、LpFC培養上清液とした。

[0105] (2-3) Factor Cの活性評価

LpFCを一過性発現させたSf9の培養上清液 $10 \mu\text{L}$ を、 $50 \mu\text{L}$ エンドトキシン溶液(10 EU/mL)、 $40 \mu\text{L}$ 50 mM Tris-H

C I (pH 8.0)、50 μ L 大塚蒸留水（大塚製薬工場製）とNunc（商標）F96 MicroWell（商標）黒色プレート（Thermo Fisher Scientific製）内で混合し、37℃で10分間加温した。その後、蛍光基質を50 μ L 添加して、37℃に設定した蛍光プレートリーダーinfinite 200（TECAN製）にて5分毎に60分間測定した。測定条件は、励起波長380nm、蛍光波長440nm、Gain 80とした。

[0106] X軸に測定時間、Y軸に蛍光値をとり、SLOPE関数により算出した値を「エンドトキシン依存性活性」として以下の評価に用いた。対照として、エンドトキシンの代わりに大塚蒸留水を添加したものも同時に試験し、この際の活性を「エンドトキシン非依存性活性」とし、これが顕著に高いサンプルは、以後の試験から除外した。エンドトキシン標準品は、Control Standard Endotoxin (CSE)、10ng/vial（CAPE COD製）を、大塚蒸留水にて10EU/mLに調製したもの、蛍光基質は、Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-MCA（ペプチド研究所製）をCultureSure（登録商標）DMSO（富士フィルム和光純薬製）を用いて溶解後、大塚蒸留水にて0.25mMに調製したものをそれぞれ用いた。使用試薬はすべてエンドトキシンフリーまたはバイオテクノロジーグレードとした。

[0107] (3) 組換え発現Factor Cの活性評価

LpFCを一過性発現させたSf9の培養上清液50 μ Lと、100mM Bis-Tris (pH 6.0) 50 μ LをPCRチューブ内で混合し、30分間静置した。その後、Factor C溶液について、上述の方法に従ってエンドトキシン依存性活性を求めた。その結果、エンドトキシンを検出することができた。

[0108] [実施例2]

変異型Factor C発現用プラスミドベクターの構築

次に、LpFCに基づき、種々の変異体の構築を試みた。

[0109] 具体的には p l Z T / V 5 - L p F C を 4 0 n g / μ L となるように超純水で希釈し、その 0. 5 μ L を K O D One P C R M a s t e r M i x 1 0 μ L、5 μ M F w プライマー 1. 2 μ L、5 μ M F w プライマー 1. 2 μ L と混合し、超純水で 2 0 μ L にメスアップして P C R に供した。P C R に使用した鋳型プラスミドベクター、F w プライマーおよび R v プライマーを以下の表に示した。P C R 条件は、9 8 $^{\circ}$ C 1 0 秒、5 5 $^{\circ}$ C 5 秒、6 8 $^{\circ}$ C 3 5 秒を 1 サイクルとし、このサイクルを 1 5 回繰り返すことにより断片を増幅した。

[0110] [表2]

酵素名	変異前 酵素	アミノ酸 置換	鋳型プラスミド ベクター	Fw プライマー	Rv プライマー
LpFC-1	LpFC	F191L	plZT/V5-LpFC	配列番号 7	配列番号 8
LpFC-2	LpFC	F423L	plZT/V5-LpFC	配列番号 9	配列番号 10
LpFC-3	LpFC	F558L	plZT/V5-LpFC	配列番号 11	配列番号 12
LpFC-4	LpFC	F670Y	plZT/V5-LpFC	配列番号 13	配列番号 14
LpFC-5	LpFC	F670L	plZT/V5-LpFC	配列番号 15	配列番号 14
LpFC-6	LpFC	F828L	plZT/V5-LpFC	配列番号 16	配列番号 17
LpFC-7	LpFC	L971A	plZT/V5-LpFC	配列番号 18	配列番号 19
LpFC-8	LpFC	L971V	plZT/V5-LpFC	配列番号 20	配列番号 19
LpFC-9	LpFC	A974L	plZT/V5-LpFC	配列番号 21	配列番号 22
LpFC-10	LpFC	G1004S	plZT/V5-LpFC	配列番号 23	配列番号 24
LpFC-11	LpFC	G1004T	plZT/V5-LpFC	配列番号 25	配列番号 24

[0111] 得られた P C R 産物について、実施例 1 と同じ手順にて、形質転換体を得し、エンドトキシンフリーの変異型 L p F C 発現用プラスミドベクターを調製した。

[0112] 得られた変異型 L p F C 発現用プラスミドベクターを使用し、実施例 1 と同様の手順で、昆虫細胞を培養し、一過性トランスフェクションを行い、変異型 L p F C 培養上清液を取得した。活性評価も実施例 1 に記載の手順にて

行った。

[0113] (4) Factor Cの熱安定性評価

LpFC若しくはLpFC変異体を一過性発現させたSf9の培養上清液50 μ Lと、100mM Bis-Tris (pH6.0) 50 μ LをPCRチューブ内で混合し、48℃に設定したT100(商標) Thermal Cycler (Bio-Rad) にセットして、30分間静置した。熱処理後の各Factor C溶液について、上述の方法に従ってエンドトキシン依存性活性を求めた。熱処理実施サンプルの活性を、未処理サンプルの活性で除し、100を乗した値を熱安定性とした。LpFCおよびその変異体の熱安定性を以下の表に示す。

[0114] [表3]

酵素名	アミノ酸置換	熱安定性(%)
LpFC	なし	44
LpFC-1	F191L	55
LpFC-2	F423L	55
LpFC-3	F558L	47
LpFC-4	F670Y	50
LpFC-5	F670L	55
LpFC-6	F828L	111
LpFC-7	L971A	78
LpFC-8	L971V	116
LpFC-9	A974L	46
LpFC-10	G1004S	123
LpFC-11	G1004T	107

[0115] LpFC変異体について、驚くべきことに、導入したアミノ酸置換は熱安定性向上に寄与することが確認された。特に971位のロイシンをアラニンやバリンに置換した場合には、高い安定性を示した。828位のフェニルア

ラニンをロイシンに置換した場合、及び1004位のグリシンをセリン又はトレオニンに置換した場合も高い安定性を示した。

[0116] 本発明者らは、類縁のFactor Cにこれらのアミノ酸置換を多重的に導入したところ累積的に熱安定性が向上することを確認した。したがってこれらのアミノ酸置換は、多重的に導入した場合、累積的に組換えFactor Cの熱安定性向上に寄与すると合理的に考えられる。

産業上の利用可能性

[0117] 本開示の組換えタンパク質は、プロテアーゼとして種々の用途に使用し得る。例えば、本開示の組換えタンパク質は、エンドトキシン測定やエンドトキシン検出に使用し得るがこれに限らない。

[0118] 本明細書においては、特許出願、学術文献、及び製造業者の使用説明書を含む文書が引用されている。これらの文書の開示は、本発明の特許性に関連するとはみなされないが、その全内容を参照により本明細書に組み入れることとする。より詳細には、全ての参照文書を、各々の文書が参照により組み入れられると具体的かつ個別に示されている場合と同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。

[0119] 配列の簡単な説明

配列番号1～2：p1ZT/V5断片増幅用プライマー

配列番号3：LpFCのアミノ酸配列

配列番号4：LpFC遺伝子の塩基配列

配列番号5：開始コドン上流に付加した相同配列

配列番号6：終止コドン下流に付加した相同配列

配列番号7～25：LpFC変異導入用プライマー

[0120] 配列 (Sequences)

配列番号1 フォワードプライマー

tctagagggcccgcggttcgaagg

[0121] 配列番号2 リバースプライマー

ggtagccaagcttttaaattcgaacag

[0122] 配列番号 3 L p F C のアミノ酸配列

MVLASFLVSGLVLLGLLAQQMHPVQSRGVDLGLCDDTRFECKCGDPGYVFNVPAKQCTYFYRWRPYCKPC
DKLEAKDVC PKYKRCQE CRAGLDSCVSCPPN KYGTWCSGECQCKNGGICDQRTGACTCRDRYEGVHCEI
LQGCPLLQSDPQVQEVKNPPNDPQTIDYSCSPGFKLKGVARITCLPNGQWSSFPPKCIRECSMVSSLEH
GKVNSPSADLIEGATLRFSCDSPYYLIGQETLTCQNGQWSGQIPQCQKL VFCPDLDPVSHAEHQVKIG
LEQKYGFQPGTEVTYTCTGNYFLMGLDTLKCNPDGWSWGTQPSCKVADREVNCD SKAVDFLDDVGEP
VRIHCPAGCSL TAGTVWGTAIYHELSSVCRAAIHAGKVPNSGGAVHVNNGPYSDFLASDLNGIKSDEL
KSLAQSF RFDYVSSSTAGRKSGCPDGWFEIEENC VYVTSKQRAWERAQGVCTNMAARLAVLDKDVIPSS
LTETLRGKGLATTWIGLHRLDADNHFIWELMDRSSVALNDSLTFWAPGEPGNETNCVYLDIQDQLQPVW
KTKSCFQPSSFVCMMDLSDKNKAKCKDPGLENGHAKLHGQSIDGFYAGSSVRYSCEVLHYLSGTETVS
CTSNGTWSAPKPRCIKVITCQTPPVPSYGSVDIKPPSRTNSISRVGSPFLRLPRLPLPLARAAGPPPKP
RSAPPSTVDLSSKVKLPEGHYRVGSQAIYTCESRYELLGSQGRRCDSNGKWSGRPASCIPVCGRSDSP
RSPFIVNGNSTEIGQWPWQAGISRWLADHNMWFLQCGGALLNEKWIITAHCVTYSATAEIIDPSQFKF
YLGKYYRDDSKDDDYVQVREAIEIHVNP NYDPGNLNF DIALIQLKTSVALTTRVQPICLPTDLTTRENL
KEGALAVVTGWGLNENNTYSEMIQQA VLPVVAASTCEQGYQDSGLPLTVTENMFCAGYKQGRYDACSGD
SGGPLVFADDSRTDRRWVLEGIVSWGSPNGCGKSNQYGGFTKVN VFLSWIRQFI

[0123] 配列番号 4 L p F C 遺伝子の塩基配列

atggtgctggctagcttccctgggtgctctggactgggtgctgggactgctggctcagcaaatgcaccctgtg
cagtcctcgtgggtgctgacctgggattgtgctgacgacactcgtttcgagtgcaagtgcggcgacccccgt
tacgtgttcaacgtgccagctaagcagtgacctacttctaccgttggcgccccctactgcaagccctgc
gacaagttggaagctaaggacgtgtgccccaaagtacaagcgttgccaagagtgccgtgctggcctggac
tcctgtgtttcttgccctcctaacaaatacggcacctgggtgctctggcgagtgccagtgcaagaacggt
ggatatctgcgaccagcgtaccggtgcttgcaacttgccgtgatcggttacgaggggtgccactgcgagatc
ctgcaaggttgccctctgctgacgtctgacctcaggtgcaagaagtgaagaacctccaaacgacct
cagaccatcgactactcttgctctcccggtttcaagctgaaggggtgcgctcgatatcacttgccctgcct
aacggccagtggtctagcttcccacctaagtgcatccgcgagtgctccatgggtgtcctcactcgagcac
ggcaaagtgaactctccctccgctgacctgatcgaggggtgctaccttgaggttctcctgcgactccccct
tactacctgatcggtcaagagactctgacctgccaaggcaacggacagtgaggcggtcaaatccctcag

tgccaaaagctgggtgttctgccccgacttggaccccggtgtctcacgctgaacaccaagtgaagatcggc
ctcgagcagaagtacggacagttccctcagggcaccgaagtgacctacacctgtaccggcaactacttc
ctgatgggcctcgacacctgaagtgaacctgacgggttcttggagcggctactcagccctcctgctg
aaagtggctgaccgtgaagtgaactgacgactctaaggctgtggacttccctggacgacgtgggagagcct
gtgctgtattcactgtcctgctgggtgtccttgaccgctgggtactgtttggggcaccgctatctaccac
gagctgtcctctgtgtgcccgcgtgctattcacgctggaaagggtgccaactccggtgggtgtgtgcac
gtgggtcaacaacgggtccctactccgacttccctcgcttccgacctgaacgggtatcaagtccgacgagctg
aagtccttggtcagtccttccgittcgactacgtgtcctcctccaccgctggacgcaagtctgggtgt
cctgacggatgggttcgagatcgaagagaactgctgtacgtgacctccaagcagagagcttgggaacgc
gctcaaggcgtgtgcaccaatatggctgtcgtctggctgtgtggaacaaggacgtgatcccttccagc
ctgactgagactctgctggaagggtcgtaccacctggatcggactgcaccgtttggacgtgac
aaccacttcatctgggagctgatggaccgttccctccgtggctctgaacgactctctgactttctgggct
cctggcgagcctggcaacgagactaactgctgtacctggacatccaggaccagctgcagcccggtgtgg
aaaactaagtcctgttccagccatcctccttctgtgtgcatgatggacctgtccgacaagaacaaggct
aagtgaaggacccccggctcctctcgagaacgggtcacgctaagctgcacggccagtccatcgacggtttc
tacgctgggttccctctgtgctgactcctgctgaggtgtgtgactacctgtccggaaccgagactgtgtcc
tgcacctccaacggaacttggagcgcacctaaagcctcgttgcatcaaagtgatcacctgtcagaccct
ccagtgcccttccctacgggttccgtggacatcaagccaccttctcgtaccaactccatctctcgtgtgggt
tctcccttccctgctgtgctcgttctgcttctgcttctggctagagctgtgttccacctcctaagcca
cggttccgctcctccatctaccgtggacttgtcctccaaagtgaagctgcccaggggcccactaccgtgtc
gggttcccaggctatctacacttgcgagtcctgctactacgaactgctgggttctcagggctcgtcgttgc
gactcaaattggcaagtggagtggtcgtcccgttcttgcacctctgtgtgctgctgttctgactccct
cggttctcctttcatcgtgaacggcaactccaccgagatcggccaatggccttggcaagctgggtatctcc
agatggctggctgaccacaacatgtgggttcttgcagtgccgtggcgctctgtgaacgagaagtggatc
atcaccgctgtctactgctgacctactccgctaccgctgagatcatcgacccctctcagttcaagttc
tacctgggcaagtactaccgtgacgactccaaggacgacgactacgtccaagtgcgagaggctatcgag
atccacgtgaaccctaactacgacccccggcaacctgaacttcgatatcgctctgatccagctcaagacc
tctgtcgtcttgaccaccagggtgcagcctatctgcttgcctaccgacctgaccactcgcgagaacctg

aaagaggggtgctctcgctgctgacggatggggactcaacgagaacaacacctactctgagatgac
cagcagggccgtgctgccagtggtggctgcttctacttgcgagcagggttaccaggactccggactgcct
ctgactgtgaccgaaaacatgttctgctgctggttacaagcagggccgttacgacgcttgctcaggcgat
tctggtgggtcccttgggtgttcgctgacgactctcgctactgatcgctcggttgggtgctcgagggtatcg
tcctgggggttctcctaacgggttgcggcaagtccaaccagtacggtgggtttaccaaagtcaacgtgttc
ctgtcctggatccgtcagttcatctga

[0124] 配列番号 5 開始コドン上流に付加した相同配列

ctgttcgaatttaaagcttggtaccgat

配列番号 6 終止コドン下流に付加した相同配列

tctagagggcccgcggttcga

配列番号 7 L p F C F 1 9 1 L 変異導入用 F w プライマー

cagtgggtctagcctccacctaagtgcatc

配列番号 8 L p F C F 1 9 1 L 変異導入用 R v プライマー

gctagaccactggccgtaggcaggcaagt

配列番号 9 L p F C F 4 2 3 L 変異導入用 F w プライマー

cagtccttccgtctcgactacgtgtcctcc

[0125] 配列番号 1 0 L p F C F 4 2 3 L 変異導入用 R v プライマー

acggaaggactgagccagggaattcagctc

配列番号 1 1 L p F C F 5 5 8 L 変異導入用 F w プライマー

actaagtcctgcctccagccatcctccttc

配列番号 1 2 L p F C F 5 5 8 L 変異導入用 R v プライマー

gcaggacttagttttccacacgggctgcag

配列番号 1 3 L p F C F 6 7 0 Y 変異導入用 F w プライマー

gtgggttctccctacctgctctgcctcgt

配列番号 1 4 L p F C F 6 7 0 Y、F 6 7 0 L 変異導入用 R v プライマ

ー

gggagaacccacacgagagatggagtgggt

配列番号 1 5 L p F C F 6 7 0 L 変異導入用 F w プライマー

gtgggttctccccctcctgcgtctgcctcgt

配列番号 16 L p F C F 8 2 8 L 変異導入用 F w プライマー

tctcagttcaagctctacctgggcaagtac

配列番号 17 L p F C F 8 2 8 L 変異導入用 R v プライマー

cttgaactgagaggggtcgatgatctcagc

配列番号 18 L p F C L 9 7 1 A 変異導入用 F w プライマー

tctggtggtcccgcggtgttcgctgacgac

配列番号 19 L p F C L 9 7 1 A、L 9 7 1 V 変異導入用 R v プライマー

gggaccaccagaatcgctgagcaagcgtc

[0126] 配列番号 20 L p F C L 9 7 1 V 変異導入用 F w プライマー

tctggtggtcccggtggtgttcgctgacgac

配列番号 21 L p F C A 9 7 4 L 変異導入用 F w プライマー

cccctggtgttcttagacgactctcgctact

配列番号 22 L p F C A 9 7 4 L 変異導入用 R v プライマー

gaacaccaggggaccaccagaatcgctga

配列番号 23 L p F C G 1 0 0 4 S 変異導入用 F w プライマー

tccaaccagtactctggtttttaccaaagtc

配列番号 24 L p F C G 1 0 0 4 S、G 1 0 0 4 T 変異導入用 R v プライマー

gtactggttggtgacttgccgcaaccgtagg

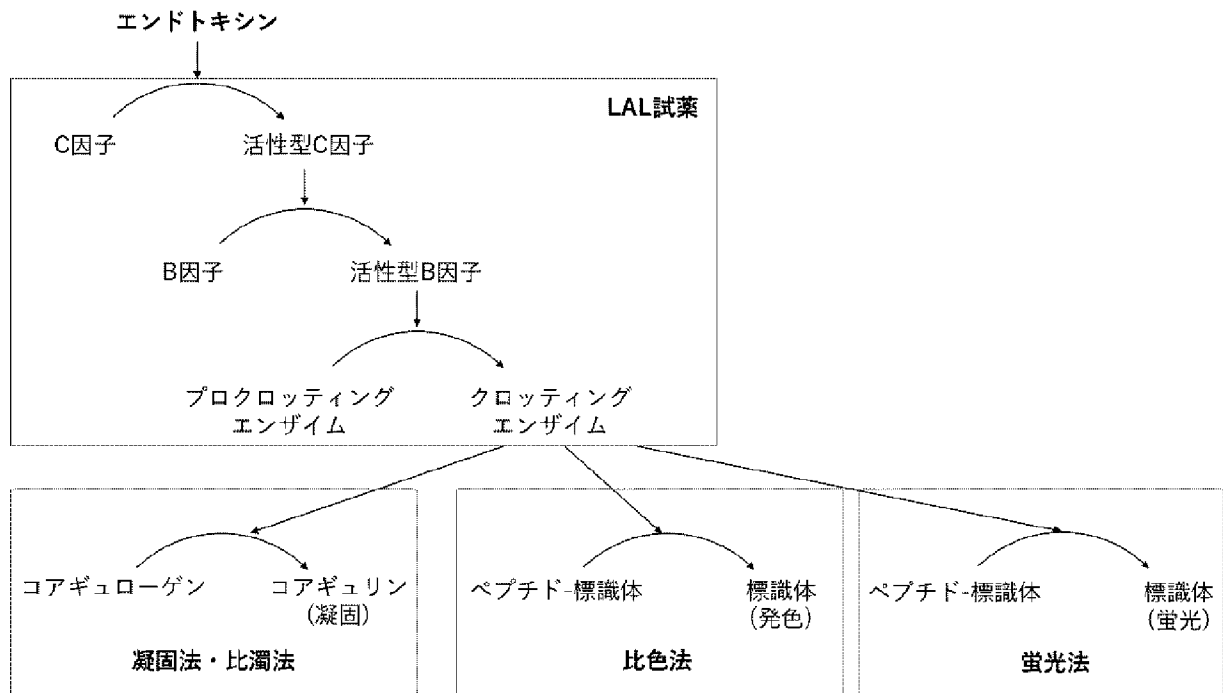
配列番号 25 L p F C G 1 0 0 4 T 変異導入用 F w プライマー

tccaaccagtacactggtttttaccaaagtc

請求の範囲

- [請求項1] 改変前のFactor Cタンパク質が、配列番号3と95%以上のアミノ酸配列同一性を有し、
- 改変後のFactor Cタンパク質が、配列番号3の
- F191位に対応する位置のLeuへの置換、
- F423位に対応する位置のLeuへの置換、
- F558位に対応する位置のLeuへの置換、
- F670位に対応する位置のTry若しくはLeuへの置換、
- F828位に対応する位置のLeuへの置換、
- L971位に対応する位置のAla若しくはValへの置換、
- A974位に対応する位置のLeuへの置換、及び／又は
- G1004位に対応する位置のSer若しくはThrへの置換を有し、
- 改変前のFactor Cタンパク質と比較して、改変後のFactor Cタンパク質の熱安定性が向上している、改変Factor Cタンパク質。
- [請求項2] 請求項1に記載のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。
- [請求項3] 請求項1に記載のタンパク質を含む、エンドトキシン検出試薬。
- [請求項4] 請求項2に記載のポリヌクレオチドを含む細胞。
- [請求項5] 請求項4に記載の細胞を培養すること、及び、請求項1に記載のFactor Cタンパク質を取得することを含む、Factor Cタンパク質の製造方法。
- [請求項6] 請求項4に記載の細胞を培養すること、及び、請求項1に記載のFactor Cタンパク質を取得することを含む、エンドトキシン検出試薬の製造方法。
- [請求項7] 請求項1に記載のタンパク質又は請求項3に記載の試薬を、試料と接触させる工程、及びエンドトキシンを検出する工程を含む、エンドトキシン検出方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/012572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/57</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/15</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/19</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/48</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/02</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/37</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/53</i> (2006.01)i FI: C12N15/57; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10 ZNA; C12N9/48; C12P21/02 A; C12Q1/37; G01N33/53 V 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) C12N15/57; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/48; C12P21/02; C12Q1/37; G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)GenBank/EMBL/DDBJ/ GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/159771 A1 (SEIKAGAKU CORPORATION) 07 September 2018 (2018-09-07) claims, paragraph [0105], reference example 4, example 3, reference example 8, example 6	1-7
A	WO 2018/074498 A1 (SEIKAGAKU CORPORATION) 26 April 2018 (2018-04-26) claims, paragraph [0173], examples	1-7
A	MALONEY, Tom et al. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. PLOS Biology. 12 October 2018, vol. 16, no. 10, e2006607, DOI: 10.1371/journal.pbio.2006607 abstract, p. 3, 3rd paragraph to p. 6, 3rd paragraph	1-7
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 27 May 2024		Date of mailing of the international search report 04 June 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/012572

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/012572

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2018/159771	A1	07 September 2018	US 2021/0363564 A1	
				claims, paragraphs [0176]-	
				[0181], reference example 4,	
				example 3, reference example	
				8, example 6	
-----	-----	-----	-----	JP 18-159771 A1	
				EP 3591049 A1	
				CN 110366592 A	

WO	2018/074498	A1	26 April 2018	US 2019/0241629 A1	
				claims, paragraph [0347],	
				examples	
				JP 18-74498 A1	
				EP 3530670 A1	
-----	-----	-----	-----	CN 109689681 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 15/57(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i;
C12N 5/10(2006.01)i; C12N 9/48(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; C12Q 1/37(2006.01)i;
G01N 33/53(2006.01)i
FI: C12N15/57; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10 ZNA; C12N9/48; C12P21/02 A; C12Q1/37; G01N33/53
V

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N15/57; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/48; C12P21/02; C12Q1/37; G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年
日本国公開実用新案公報1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580（JDreamIII）; CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS（STN）GenBank/EMBL/DDBJ/
GeneSeq; UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2018/159771 A1（生化学工業株式会社）07.09.2018（2018-09-07） 特許請求の範囲、[0105]、参考例4及び実施例3、参考例8及び実施例6	1-7
A	WO 2018/074498 A1（生化学工業株式会社）26.04.2018（2018-04-26） 特許請求の範囲、[0173]、実施例	1-7
A	MALONEY, Tom et al., Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection, PLOS Biology, 2018.10.12, Vol. 16, No. 10, e2006607, DOI: 10.1371/journal.pbio.2006607 要約、第3頁第3段落～第6頁第3段落	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
27.05.2024

国際調査報告の発送日
04.06.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

田中 晴絵 4B 2666

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/012572

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2018/159771	A1	07.09.2018	US	2021/0363564	A1	
				特許請求の範囲、[0176]～[0181]、参考例4及び実施例3、参考例8及び実施例6			
				JP	18-159771	A1	
				EP	3591049	A1	
				CN	110366592	A	

WO	2018/074498	A1	26.04.2018	US	2019/0241629	A1	
				特許請求の範囲、[0347]、実施例			
				JP	18-74498	A1	
				EP	3530670	A1	
				CN	109689681	A	
