

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 2 月 7 日 (07.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/10384 A1

- (51) 国際特許分類: **C12N 15/12**, 9/02 (HIROKAWA, Kozo) [JP/JP]. 黒澤恵子 (KUROSAWA, Keiko) [JP/JP]. 梶山直樹 (KAJIYAMA, Naoki) [JP/JP]; 〒278-8601 千葉県野田市野田250番地 キッコマン株式会社内 Chiba (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/06455
- (22) 国際出願日: 2001 年 7 月 26 日 (26.07.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (30) 優先権データ:
特願2000-228227 2000 年 7 月 28 日 (28.07.2000) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): キッコマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒278-8601 千葉県野田市野田250番地 Chiba (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 廣川 浩三 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENES ENCODING PROTEINS CAPABLE OF REGENERATING LUCIFERIN, RECOMBINANT DNA AND PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN CAPABLE OF REGENERATING LUCIFERIN

(54) 発明の名称: ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、組み換え体 DNA 及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法

(57) Abstract: An isolated or synthesized gene encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2; an isolated or synthesized gene encoding a protein comprising an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and being capable of regenerating luciferin; an isolated or synthesized gene encoding a protein being hybridizable with the complementary sequence of a DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NO:1 under stringent conditions and capable of regenerating luciferin; a recombinant DNA characterized by having an isolated or synthesized gene as described above inserted into a vector DNA; a transformant or a transductant containing the above recombinant DNA; and a process for producing a protein capable of regenerating luciferin characterized by comprising culturing the above transformant or transductant in a medium and collecting the protein capable of regenerating luciferin from the culture.

[続葉有]

WO 02/10384 A1



(57) 要約:

本発明は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、単離された又は合成された遺伝子、

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列)において 1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする、単離された又は合成された遺伝子、

配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする、単離された又は合成された遺伝子、

上記単離された又は合成された遺伝子をベクター DNA に挿入したことを特徴とする組み換え体 DNA、

上記組み換え体 DNA を含む形質転換体または形質導入体及び

上記の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法である。

明 細 書

ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、組み換え体DNA及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法

技術の分野

本発明は、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、組み換え体DNA及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法に関する。

技術の背景

生物発光酵素ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンは、ルシフェラーゼによる発光後オキシルシフェリンに変換される。ルシフェラーゼを用いたATP測定法は、医療や食品衛生分野で広く使われているが、基質として用いられるルシフェリンが高価であること、また、ルシフェラーゼ反応が反応後生成されるオキシルシフェリンにより阻害されることから、オキシルシフェリンの除去、またはルシフェリンへの再生がルシフェラーゼATP測定法の発展をさらに進めるものと考えられる。オキシルシフェリンをルシフェリンに再生することのできるホタル由来のタンパク質が見出されている（U.S.Pat.No.5814504）が、ホタル体内からは、微量にしか抽出できず、工業的な利用は困難であった。

ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応系に添加すれば、発光を持続させることができ、また使用するルシフェラーゼ及びルシフェリンの量を低減させることができる。

発明の開示

本発明は、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を生産する組み換え体を用い、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法を提供することを目的とする。

そこで、本発明者等は、上記目的に鑑み鋭意検討を行なった結果、甲虫類由来

のルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の単離、及び遺伝子の構造を決定し、更にルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを得ることに成功した。次いで、この組み換え体DNAを宿主細胞に含ませた形質転換体または形質導入体を培養すると、効率よくルシフェリン再生能力を有するタンパク質が生産されること等を見出し、本発明を完成した。

即ち、本願の第1の発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、単離された又は合成された遺伝子である、

本願の第2の発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする、単離された又は合成された遺伝子、

本願の第3の発明は、配列番号1に示される塩基配列からなるDNAの相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする、単離された又は合成された遺伝子である。

本願の第4の発明は、上記単離された又は合成された遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする組み換え体DNAである。

本願の第5の発明は、上記組み換え体DNAを含む形質転換体または形質導入体である。

本願の第6の発明は、上記の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法である。

なお、以下では上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質を、単に「ルシフェリン再生酵素」と略称することがある。

また、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードするDNAまたはルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードし、さらに非翻訳領域を含むDNAを、「ルシフェリン再生酵素遺伝子」と略称することがある。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子は、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を有する甲虫類より得ることができる。本発明のルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子とは、発現したときにルシフェリン再生能力活性を有するものであればすべて含まれるが、好ましくは、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子、又は配列表の配列番号 1 に示される塩基配列からなる遺伝子が挙げられる。なお、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子とは、コドンの縮重を考慮すると種々の塩基配列が包含される。即ち、このような種々の塩基配列の中から、遺伝子発現系の諸要素、例えば宿主細胞の種類等による優先コドン、転写された RNA により形成される高次構造の回避などを考慮して選択すればよい。選択された塩基配列は、自然界からクローニングされた DNA であっても、人為的に化学合成された DNA であってもよい。

本発明のルシフェリン再生酵素遺伝子を取得するためには、先ず、ヘイケボタルから以下の方法で、poly (A) + RNA を調製する。甲虫類組織からの全 RNA の抽出には、効率よく損傷の少ない RNA が得られるならば方法は制限されず、例えば、フェノール/SDS 法、グアニジンイソチオシアネート/塩化セシウム法等、公知のいずれの方法によっても可能である。こうして得た全 RNA からオリゴ (dT) 担体を用いて poly (A) + RNA を分離できる。また、全 RNA を抽出せずに poly (A) + RNA を得ることのできるキット (MPG Direct mRNA Purification Kit、CPG, INC. 社等) を使用してもよい。

次いで、poly (A) + RNA を鋳型にし、オリゴ (dT) プライマー、ランダムプライマー等を用い、逆転写酵素によって一本鎖 cDNA を合成する。更に、グブラー-ホフマン (Gubler and Hoffman) 法、オカヤマ-バーグ (Okayama-Berg) 法 (Molecular Cloning 2nd edition、Cold Spring Harbor press、1989) 等により二本鎖 cDNA を合成する。酵素遺伝子の発現量が少ない場合には、PCR を利用した cDNA ライブラリー作製キット [Capfinder

PCR cDNA Library Construction Kit (CLONTECH社)等]を用いて、PCRによってcDNAを増幅してもよい。このようにして合成したcDNAは、平滑末端化、リンカーの付加、PCRによる制限酵素サイトの付加等を行なうことにより、ファージベクター、プラスミド等のクローニングベクターにクローニングできる。

以上のようにして得られたcDNA又はcDNAライブラリーを鋳型としてPCR (polymerase chain reaction)を行なうことで、目的遺伝子の部分配列を得ることができる。このとき用いるプライマーにはルシフェリン再生酵素のアミノ酸配列のどの部分に基づいてもよいが、コドンの縮重が少なくかつ複雑な高次構造を形成しないと思われる配列を選ぶのが望ましい。なお、コドンの縮重がある場合、混合プライマー又はイノシンを含むプライマーも使用することができる。PCRにより得られた増幅産物は、370ADNAシーケンス・システム (パーキンエルマー社製)を用いた塩基配列の解析により、ルシフェリン再生酵素遺伝子の一部であるか、容易に確認することができる。増幅産物がルシフェリン再生酵素遺伝子の一部であることが確認されたら、その配列からプライマーを作成し、5'RACE 及び 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA End: PCR PROTOCOLS A Guide to Methods and Applications, ACADEMIC press INC.p28-38)を行なうことで、未知の5'末端領域及び3'末端領域を決定することができる。以上の操作により、容易に完全長のルシフェリン再生酵素遺伝子の配列を決定することができる。

なお、5'RACE、3'RACEには、例えば、5'-Full RACE Core Set(TaKaRa 社製)、3'-Full RACE Core Set (TaKaRa 社製)等を用いることができる。

また、ストリンジェントな条件のハイブリダイゼーションにより、cDNAライブラリーからルシフェリン再生酵素遺伝子をスクリーニングすることも可能である。プローブに用いるDNA断片は、ルシフェリン再生酵素のアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRによって得ることができる。得られたDNA断片はラベルしてプローブとすることができる。ラベルにはラジオアイソトープ、ビオチン等、種々のものを用いることができるが、ランダムプライミング法でラベルすることが望ましい。なお、cDNAライブラリーの作成は、例えば、STRATAGENE社のZAP Express Vector Kitを用いて行

なうことができる。DNA断片の標識と、ハイブリダイゼーションの検出は、例えば、DIG DNA 標識・検出システム（ベーリンガー・マンハイム社製）等を用いて行なうことができる。

なお、前述した“ストリンジェントな条件”とは、特異的なハイブリッドのみが選択的に形成され、シグナルが検出されるが、非特異的なハイブリッドは形成されない条件である。このような条件は、個々の生物種により若干異なるが、常法によりハイブリダイゼーションと洗いの際の塩濃度又は温度をいくつか検討するのみで容易に決定することができる。このような条件としては、例えば、ハイブリダイゼーションは、 $5\times\text{SSC}$ 、 $1.0\%(\text{W/V})$ 核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬（ベーリンガ・マンハイム社製）、 $0.1\%(\text{W/V})$ N-ラウロイルサルコシン、 $0.02\%(\text{W/V})$ SDS を用い一晚（8～16時間程度）で行なう。洗いは、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%(\text{W/V})$ SDS を用い、SSC 濃度は 0.1 倍までの範囲で、また温度は 37°C での洗浄から始めて、 65°C までの範囲で変化させ、固定された DNA 由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまでメンブレンを洗浄したうえ、プローブの検出を行う。

このような条件でハイブリダイズするような DNA は、ルシフェリン再生酵素活性を有するポリペプチドをコードしている蓋然性が高いが、ルシフェリン再生酵素活性を失うような変異を有するものも含まれる。しかし、それらについては、形質転換を行なった後に、形質転換体のルシフェリン再生酵素活性の産生能を測定することにより容易に取り除くことが可能である。

以上のような方法により、ルシフェリン再生酵素遺伝子を取得したのち、常法に従いベクター DNA に組み込む。用いるベクター DNA としては、例えば、pUC19（宝酒造社製）、pBR322（宝酒造社製）、pT7Blue（Novagen 社製）、pBluescript SK+（Stratagene 社製）、pMAL-C2（NEW England Labs 社製）等のプラスミド DNA、 λ ENBL3（Stratagene 社製）、 λ DASH II（フナコシ社製）等のバクテリオファージ DNA 等が挙げられる。得られた組み換え体 DNA を用いて、例えば、大腸菌 K-12、好ましくは大腸菌 JM109（東洋紡社製）、DH 5 α （東洋紡社製）、XL1-Blue（フナコシ社製）等を形質転換又は形質導入して夫々の形質転換体又は形質導入体を得る。宿主細胞としては、上記以外に、例え

ば、大腸菌 K-12 以外の大腸菌等の細菌、酵母、かび、放線菌、蚕、動物細胞等が用いられる。

この形質転換は、例えば、D.M.Morrison の方法 (Method in Enzymology, 68, 326-331, 1979) により行なうことができる。また、形質導入は、例えば、B.Hohn の方法 (Method in Enzymology, 68, 299-309, 1979) により行なうことができる。

上記形質転換体又は形質導入体より純化された新規な組み換え体 DNA を得るには、例えば、P.Guerry 等の方法 [J.Bacteriology, 第 116 巻、第 1064~1066 頁 (1973 年)]、D.B.Clewell の方法 [J.Bacteriology, 第 110 巻、第 667~676 頁 (1972 年)] 等により得ることができる。

更に、上記ルシフェリン再生酵素遺伝子を含有する DNA を用いて、後述の実施例 1 項目 (9) に示す 370A DNA シークエンス・システム (パーキンエルマー社製) を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の全塩基配列の解析を行ない (配列番号 1 参照)、次いで、前記塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸の一次配列を確定する。(配列番号 2 参照)

なお、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 もしくは複数、好ましくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、ルシフェリン再生能力を有するアミノ酸配列をコードするルシフェリン再生能力を有するタンパク質遺伝子は、全て本発明に含まれる。

また配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と 60% 以上、好ましくは 80% 以上の相同性を有し、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子は、全て本発明に含まれる。

そして、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、ルシフェリン再生能力を有するアミノ酸配列をコードするルシフェリン再生能力を有するタンパク質遺伝子を得るには、如何なる方法でもよく、例えば、遺伝子に点変異または欠失変異を生じさせるための周知技術である部位特定変異誘導法、遺伝子を選択的に開裂し、次いで、選択されたヌクレオチドを除去または付加し、遺伝子を連結する方法、オリゴヌクレオチド変異誘導法等が挙げられる。

上記のようにして得られたルシフェリン再生能力を有する形質転換体又は形質導入体、例えば、エッシェリシア属に属する菌株を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質を生産するには、下記のようにして行なうことができる。上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養してもよいが、なるべく液体培養法を採用して培養するのが好ましい。

また、上記微生物を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーあるいは大豆もしくは小麦麴の浸出液等の1種以上の窒素源に、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更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。

なお、培地の初発 pH は、7～9 に調整するのが適当である。また培養は、30～42℃、好ましくは 37℃前後で 6～24 時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりルシフェリン再生能力を有するタンパク質を採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。

培養物から、例えば、濾過、遠心分離等の操作により菌体を分離し、洗菌する。この菌体からルシフェリン再生酵素を採取することが好ましい。この場合、菌体をそのまま用いることもできるが、超音波破碎機、フレンチプレス、ダイナミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、リゾチーム等の細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトン X-100 等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体からルシフェリン再生酵素を採取するのが好ましい。

このようにして得られたルシフェリン再生酵素を含む菌体破碎液からルシフェリン再生酵素を単離するには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法等を適宜組み合わせて行なうのが好ましい。

ルシフェリン再生能力は、以下に示す方法により測定することができる。

(ルシフェリン再生能力測定法)

(試薬)

- A 0.1mM オキシルシフェリン
- B 0.01mM D-システイン
- C 25mM グリシルグリシン+5.4mM 硫酸マグネシウム
- D 10mM ATP (pH7.8)
- E 5mg/ml ルシフェラーゼ

(手順)

- 1 下記反応混液を調製する。
 - 0.005ml A
 - 0.010ml B
 - 0.085ml C
- 2 タンパク質溶液 0.01ml を添加し、37℃で一定時間反応させる。
- 3 反応液 0.01ml と C 0.1ml を混合する。
- 4 下記ルシフェラーゼ混液を調整する。
 - 10ml D
 - 1ml E
- 5 項目3の混合液に項目4の混液を 0.1ml 添加し、ルミノメーターで発光量を測定する。

実施例

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例 1

(1)ヘイケボタルmRNAの調製

ヘイケボタル尾部 10g を、乳鉢と乳棒で粉碎し、RNA抽出試薬 ISOGEN (和光純薬社製) 10ml に懸濁し、2700 r.p.m.で5分遠心分離することによりRNA画分を得た。これより、Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 1989) 記載の方法に従い、poly (A) + RNA 0.5mg を得た。

(2)プライマーの合成

本発明者等が別途取得した、ヘイケボタル由来のルシフェリン再生酵素 (U.S. Pat. No.5814504, Example 3) をもとにプライマーを作製することにした。まず、ヘイケボタル由来のルシフェリン再生酵素をペプチダーゼで断片化し、これを逆相クロマトグラフィーに供しピークを分取した。得られた数種のペプチドについて、ABI470A プロテインシークエンサー (パーキンエルマー製) を用いてアミノ酸配列を決定した。このようにして決定したアミノ酸配列をもとにして、HR12 (配列番号 4) 及び KN14 (配列番号 3) のプライマーを設計し、アマシヤム・ファルマシア・バイオテック株式会社のカスタム DNA 受託サービスにて合成した。

(3) RT-PCR

反応液を、以下の組成で調整し、42℃で 30 分間逆転写反応を行なった後、99℃で 5 分間変性させ、5℃で保存した。

(反応組成液)	使用量
25 mM MgCl ₂	4 μl
*10x RNA PCR バッファー	2 μl
10 mM dNTP Mixture	2 μl
40 U/ μl RNase Inhibitor	0.5 μl
5 U/ μl *AMV 逆転写酵素 XL	1 μl
2.5 pmol/ μl *oligo dT-Adaptor プライマー	1 μl
mRNA	1 μg
滅菌蒸留水	最終容量 20 μl になるよう加える。

*宝酒造社製

次いで、下記の組成で調製した反応液 80 μl を逆転写を行なったチューブに添加した。変性を 94℃で 30 秒間、アニールを 62℃で 30 秒間、伸長反応を 72℃で 1.5 分間を 1 サイクルとし、30 サイクルの反応により PCR を行なった。

(反応液組成)	使用量
20 pmol/ μl プライマー KN14 (配列番号 3)	1 μl
20 pmol/ μl プライマー HR12 (配列番号 4)	1 μl
*10×RNA PCR バッファー	8 μl

25 mM MgCl ₂	6 μl
5 U/ μl *Taq ポリメラーゼ	0.5 μl
滅菌蒸留水	63.5 μl

*宝酒造社製

PCR 終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供したところ、約 600bp の位置に目的の増幅断片と思われるバンドが確認されたので、そのバンドを切り出し GENE CLEAN II (BIO 101 社製) にて精製した。

(4) 精製した DNA 断片を 370A DNA シークエンス・システム (パーキンエルマー社製) にて塩基配列の決定及び解析を行なった。決定した塩基配列から予想されるアミノ酸配列に、(2) で得られたペプチド断片が含まれていることを確認した。

(5) 3'-RACE による下流領域の解析

先ず、上記の DNA 配列解析よりプライマーを設計し、アマシャム・ファルマシアバイオテク社の受託サービスにより合成した (HN003、配列番号 5)。これと上記の mRNA と 3'-Full RACE CoreSet (宝酒造社製) を用いて 3'-RACE を行ない、3'未知領域の増幅を行なった。反応液をアガロース電気泳動にかけ、約 400bp の DNA 断片を RecoChip (宝酒造社製) で精製抽出し、DNA シークエンサーで塩基配列の決定及び解析を行なったところ、決定した塩基配列の 5'領域に上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の配列と同じ配列を含んでいることが確認された。

(6) 5'-RACE による上流領域の解析

先ず、上記の DNA 配列解析よりプライマーを設計し、アマシャム・ファルマシアバイオテク社の受託サービスにより合成した [HR101 (配列番号 6)、HR102 (配列番号 7)、HR103 (配列番号 8)、HN104 (配列番号 9)、HN105 (配列番号 10)]。これと上記ヘイケボタル mRNA と 5'-Full RACE CoreSet (宝酒造社製) を用いて RT-PCR を行ない、5'未知領域の増幅を行なった。反応液をアガロース電気泳動にかけ、約 300bp の DNA 断片を RecoChip (宝酒造社製) で精製抽出し、DNA シークエンサーで塩基配列の決定及び解析を行なった。決定した塩基配列の 3'領域に上記ルシフェリン再生能力を有する

タンパク質をコードする遺伝子の配列と同じ配列を含むことが確認された。

(7) R T - P C R による遺伝子断片の取得

上記 3 つの塩基配列より、翻訳開始コドンと終止コドンを推定し、N 末領域と C 末領域に相当する塩基配列のプライマー DNA をアマシャム・ファルマシア・バイオテク社の受託サービスにより合成した〔porf101 (配列番号 1 1), porf102 (配列番号 1 2)〕。これらと上記ヘイケボタル mRNA により R T - P C R を行ない、反応液をアガロース電気泳動で解析した。その結果、約 900 b p のバンドが確認された。このバンドに含まれる DNA 断片を RecoChip (宝酒造社製) で精製した。精製した DNA 断片をプラスミド pT7Blue (Novagen 社製) にクローニングし、得られたプラスミドで大腸菌 JM109 を形質転換した。該形質転換株、即ち、大腸菌 JM109(pHlre)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に平成 1 2 年 7 月 2 7 日に F E R M B P - 7 2 4 8 として寄託されている。

(8) 活性の確認

大腸菌 JM109(pHlre)菌体を、75 μ g/ml のアンピシリンを含む TY 培地 (1 % バクトトリプトン、0.5 % バクトイースト・エキストラクト、0.5 % NaCl、pH7.0) 10ml にて 37°C でクレット 100 まで振とう培養した後、IPTG を終濃度 1 mM となるよう添加し、更に、4 時間培養した。この培養液を氷上で冷却下、超音波破碎器 (Ultrasonic generator, Nissei 社製) を用いて 20 秒 4 回処理した。これをエッペンドルフチューブに入れ、微量遠心機を用い、12,000r.p.m. で 10 分間遠心分離し、上清画分及び沈殿画分に分離し、上清を別のエッペンドルフチューブに移しかえた。前述した酵素活性測定法によりルシフェリン再生能力を測定したところ、ベクターのみ含む大腸菌が 0.95 kcount/ml であるのに対し、JM109(pHlre)は 8.6 kcount/ml とルシフェリン再生能力を有していた。

(9) ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の解析

大腸菌 JM109(pHlre)のルシフェリン再生能力が確認されたので、pHlre の挿入断片にルシフェリン再生酵素遺伝子が含まれていることが明らかとなった。そこで、このプラスミド DNA について 370A DNA シークエンス・システム (パーキンエルマー社製) を用いて塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列を配

列番号 1 に、また、該 DNA 配列から翻訳されると予想されるアミノ酸配列を配列番号 2 に夫々示した。ルシフェリン再生酵素遺伝子は、924bp のコーディング領域を有し、307 個のアミノ酸をコードしていた。

実施例 2

ブランクハイブリダイゼーション

ZAP Express Vector Kit (STRATAGENE 社製)を用いてヘイケボタル cDNA ライブラリーを作製した。次いで、実施例 1 (3) の RT-PCR により得られた約 600bp の増幅断片をテンプレート、HR12 (配列番号 4)、KN14 (配列番号 3) をプライマーとして、PCR によりジゴキシゲニン(DIG)ラベルされた DNA プローブを作製した。

条件は、0.2ml 容量の PCR 用チューブに滅菌蒸留水 37.75 μ l、10 $\times$ バッファー 5 μ l、プライマー DNA の 100pmol/ μ l 溶液 1 μ l $\times$ 2 種、テンプレート DNA 溶液 1 μ l、PCR DIG ミックス 10 倍濃度(ベーリンガー・マンハイム社製)4 μ l 及び ExTaq DNA ポリメラーゼ 0.25 μ l を入れ、混和した後、ミネラルオイル 20 μ l を滴下し RoboCycler Gradient 96 にセットした。1)95 $^{\circ}$ C 30 秒、2)95 $^{\circ}$ C 30 秒、3)62 $^{\circ}$ C 30 秒、4)72 $^{\circ}$ C 40 秒、2)~4)を 45 サイクル、5)72 $^{\circ}$ C 2 分のプログラムをセットし、反応を実施した。反応液よりエタノール沈殿によって増幅断片を回収し、50 μ l の TE バッファーに溶解して DIG ラベルプローブを得た。

以上により作製した、ヘイケボタル cDNA ライブラリー及び DNA プローブを用いてブランク・ハイブリダイゼーションを行なった。キットのマニュアルに従い、5 枚の寒天培地に 1 枚あたり約 5×10^3 個のブランクを形成させた。これらの寒天培地上のブランクから HyBond-N+ナイロントランスファーメンブレン(アマシャム社製)に、メンブレンの説明書に従って DNA をトランスファーした。なお、この際、非特異のシグナルを排除するために、1 枚の寒天培地につき 2 枚のメンブレンにトランスファーを行なった。

上記メンブレンについて、作成した DIG-DNA プローブ、DIG システム(ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて「DIG システムを用いてハイブリダイゼーションを行うためのユーザーガイド」37-40 頁、ベーリンガー・マンハイム社(1996)に従ってハイブリダイゼーション検出を行なった。

このスクリーニングにおいて陽性クローンの候補株を4株得た。得られた候補株について同様の二次スクリーニングを行ない、純化した陽性クローンを1株取得した。

このファージクローンについて、キットの説明書に従い、*in vitro excision* を行ない、プラスミド pHP として回収した。

このプラスミド pHP で大腸菌 JM109 を形質転換し、形質転換体からプラスミド DNA を調製し、塩基配列を解析するための試料とした。挿入 cDNA の塩基配列の解析には Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキンエルマー社製) を用いる従来公知の方で行なった。この結果、挿入 cDNA は配列表の配列番号 1 と同一の塩基配列を有することが明らかとなり、ハイケボタル由来のルシフェリン再生酵素をコードする遺伝子であることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質を効率よく生産することができるので、本発明は、産業上極めて有用である。本発明は、本願の優先権の基礎である特願 2000-228227 号に記載された内容を包含する。そして、本明細書中で引用した全ての刊行物、特許、特許出願をそのまま参考として本明細書中に取り入れるものとする。

請 求 の 範 囲

- (1) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、単離され又は合成された遺伝子。
- (2) 請求項 1 の単離され又は合成された遺伝子をベクター DNA に挿入したことを特徴とする組み換え体 DNA。
- (3) 請求項 2 記載の組み換え体 DNA を含む形質転換体または形質導入体。
- (4) 請求項 3 記載の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法。
- (5) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする、単離され又は合成された遺伝子。
- (6) 請求項 5 のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする単離され又は合成された遺伝子をベクター DNA に挿入したことを特徴とする組み換え体 DNA。
- (7) 請求項 6 記載の組み換え体 DNA を含む形質転換体または形質導入体。
- (8) 請求項 7 記載の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法。
- (9) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA の相補鎖配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする、単離され又は合成された遺伝子。
- (10) 請求項 9 記載の単離され又は合成され遺伝子をベクター DNA に挿入したことを特徴とする組み換え体 DNA。
- (11) 請求項 10 記載の組み換え体 DNA を含む形質転換体または形質導入体。
- (12) 請求項 11 記載の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法。

SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> A gene coding protein having the ability to regenerate luciferin,
recombinant DNA and process for the preparation of protein having the
ability to regenerate luciferin

<130> PH-1184-PCT

<150> JP2000-228227

<151> 2000-07-28

<160> 12

<210> 1

<211> 924

<212> DNA

<213> *Luciola lateralis*

<400> 1

```
atgtcgccag ttattgaaca gatcactgaa gtagacaatt tccaaatcgg agaggggtcca 60
cactgggata ccgaaacaca aagtttgtat tttgtggata ttctagaaaa atccatacac 120
aaatacgtac catcgacaaa acaacatact aaaatgattt tgaataaacg tccgtctttt 180
attataccaa taaaagaaac atctgatcgg tttgtcataa gtttagaacg agacatttgc 240
gttcttactt gggatgggtgt tagtgccacg ccaagtcatt tagaaacaat agttaccgtt 300
gatacgggaa tcgaaggaaa tacattcaat gatggtaaag cagatgcgtt tggcaatttg 360
tgggcaggta cattatatag taaattcgat attgaaaaac aaggtcctaa tacaggaaca 420
ttgtacagcc tgtctaataa gcagttaaga aaacatattt ctaatatctt cctatcaaat 480
ggcctagcct ggaataaaga ctcaaaaaaa ttttatttta tcgactccaa taaaagaaca 540
atagatcagt ttgattatga ttctgaaaat ttaattatat caaattgtca accattgttt 600
actctggaca aacatgggat acagggttta cctgatgccc aaacgataga tgaaaatgat 660
aatttatggg ttgctatagt tcgaggagga aaagttataa atattggtac taagcaaccc 720
gaatctttgc ttggtgttat taacatgcct gaaagtttga taacttcagt ttgttttgga 780
ggatcaaagt tggacgaact ttatgtaacg acttctggta tcaaagagta tgaaactgac 840
```

tctacaaaac tagtaaaggg tggattgtac agagttactg gattaggtgt taaaggttta 900
 cccgcacaca gattcagttct ctaa 924

<210> 2

<211> 307

<212> PRT

<213> *Luciola lateralis*

<400> 2

Met	Ser	Pro	Val	Ile	Glu	Gln	Ile	Thr	Glu	Val	Asp	Asn	Phe	Gln	Ile
1				5					10					15	
Gly	Glu	Gly	Pro	His	Trp	Asp	Thr	Glu	Thr	Gln	Ser	Leu	Tyr	Phe	Val
				20					25					30	
Asp	Ile	Leu	Glu	Lys	Ser	Ile	His	Lys	Tyr	Val	Pro	Ser	Thr	Lys	Gln
				35					40					45	
His	Thr	Lys	Met	Ile	Leu	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Phe	Ile	Ile	Pro	Ile
				50					55					60	
Lys	Glu	Thr	Ser	Asp	Arg	Phe	Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Arg	Asp	Ile	Cys
				65					70					75	
Val	Leu	Thr	Trp	Asp	Gly	Val	Ser	Ala	Thr	Pro	Ser	His	Leu	Glu	Thr
				85					90					95	
Ile	Val	Thr	Val	Asp	Thr	Gly	Ile	Glu	Gly	Asn	Thr	Phe	Asn	Asp	Gly
				100					105					110	
Lys	Ala	Asp	Ala	Phe	Gly	Asn	Leu	Trp	Ala	Gly	Thr	Leu	Tyr	Ser	Lys
				115					120					125	
Phe	Asp	Ile	Glu	Lys	Gln	Gly	Pro	Asn	Thr	Gly	Thr	Leu	Tyr	Ser	Leu
				130					135					140	
Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Arg	Lys	His	Ile	Ser	Asn	Ile	Phe	Leu	Ser	Asn
				145					150					155	
Gly	Leu	Ala	Trp	Asn	Lys	Asp	Ser	Lys	Lys	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asp	Ser
				165					170					175	

Asn Lys Arg Thr Ile Asp Gln Phe Asp Tyr Asp Ser Glu Asn Leu Ile
 180 185 190
 Ile Ser Asn Cys Gln Pro Leu Phe Thr Leu Asp Lys His Gly Ile Gln
 195 200 205
 Gly Leu Pro Asp Ala Gln Thr Ile Asp Glu Asn Asp Asn Leu Trp Val
 210 215 220
 Ala Ile Val Arg Gly Gly Lys Val Ile Asn Ile Gly Thr Lys Gln Pro
 225 230 235 240
 Glu Ser Leu Leu Gly Val Ile Asn Met Pro Glu Ser Leu Ile Thr Ser
 245 250 255
 Val Cys Phe Gly Gly Ser Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Val Thr Thr Ser
 260 265 270
 Gly Ile Lys Glu Tyr Glu Thr Asp Ser Thr Lys Leu Val Lys Gly Gly
 275 280 285
 Leu Tyr Arg Val Thr Gly Leu Gly Val Lys Gly Leu Pro Ala His Arg
 290 295 300
 Phe Ser Leu
 305

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ggn gar ggn ccn cay tgg ga 20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

crt cda tng tyt gnc crt cng g 22

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gga caa aca tgg gat aca gg 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cag gct gta caa tgt tcc tgt 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gac aaa ccg atc aga tgt ttc 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gtt gtt ttg tcg atg gta cg 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ctt ggg atg gtg tta gtg cc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

tac cgt tga tac ggg aat cg 20

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

atg tcg cca gtt att gaa cag 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

tta gag act gaa tct gtg tgc 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C12N15/12, C12N9/02

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)
Int.Cl.⁷ C12N15/12, C12N9/02

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)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5814504 A (Kikkoman Corporation), 29 September, 1998 (29.09.98), & EP 825257 A2 & JP 10-114794 A	1-12
P, Y	WO 01/25426 A1 (Kikkoman Corporation), 12 April, 2001 (12.04.2000), & JP 2001-103972 A	1-12

☐ 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 document 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 October, 2001 (24.10.01)

Date of mailing of the international search report
06 November, 2001 (06.11.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N9/02

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))

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N9/02

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

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)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/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 請求の範囲の番号
X	US 5814504 A (Kikkoman Corporation) 29.9月.1998 (29.09.98) &EP 825257 A2 &JP 10-114794 A	1-12
P, Y	WO 01/25426 A1 (Kikkoman Corporation) 12.4月.2001 (12.04.2000) &JP 2001-103972 A	1-12

☐ 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

「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矛盾するものではなく、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

24.10.01

国際調査報告の発送日

06.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号: 03-3581-1101 内線 3448