

MW, MZ, NA, RW, 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, 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)）

(57) 要約：新規な耐熱性ルシフェラーゼを提供する。以下の(a)又は(b)の変異型ルシフェラーゼ。(a) 配列番号1のアミノ酸配列からなる野生型ルシフェラーゼの変異体であって、配列番号1のアミノ酸配列における、292位のフェニルアラニン及び／又は294位のフェニルアラニンが他のアミノ酸に置換されている、前記変異体 (b) 配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼの変異体であって、その変異体のアミノ酸配列における、配列番号1のアミノ酸配列中の292位及び／又は294位に対応する部位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、前記変異体

明 細 書

発明の名称：耐熱性ルシフェラーゼ

技術分野

[0001] 本発明は、耐熱性ルシフェラーゼに関する。

背景技術

[0002] ルシフェラーゼは、発光バクテリアやホタルなどの生物発光において、発光物質が光を放つ化学反応を触媒する作用を持つ酵素であり、レポーター酵素として、真核細胞における遺伝子の発現や制御に関する研究に用いられている。

[0003] しかし、野生型ルシフェラーゼの熱安定性は30℃程度であり、40℃を超えると活性が消失し、高温での保存安定性に欠け、また、反応速度を高めるための高温反応条件下でのアッセイに使用できないという問題がある。

[0004] この問題を解消するために、種々の耐熱性菌の中から耐熱性ルシフェラーゼの探索が行われてきた（特許文献1～6）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第5951325号

特許文献2：特許第3844082号

特許文献3：特許第3048466号

特許文献4：特許第3681911号

特許文献5：特許第5090304号

特許文献6：特許第5185479号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、新規な耐熱性ルシフェラーゼを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 発明者らは、これらの問題を解決すべく、鋭意努力した結果、北米産ホタ

ルルシフェラーゼの292位及び／又は294位のアミノ酸残基を変異することにより、耐熱性が向上することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] 本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 以下の(a)又は(b)の変異型ルシフェラーゼ。

(a) 配列番号1のアミノ酸配列からなる野生型ルシフェラーゼの変異体であって、配列番号1のアミノ酸配列における、292位のフェニルアラニン及び／又は294位のフェニルアラニンが他のアミノ酸に置換されている、前記変異体

(b) 配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼの変異体であって、その変異体のアミノ酸配列における、配列番号1のアミノ酸配列中の292位及び／又は294位に対応する部位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、前記変異体

(2) 配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼが、配列番号1のアミノ酸配列における、215位のアラニン、354位のグルタミン酸及び465位のフェニルアラニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものである(1)記載の変異型ルシフェラーゼ。

(3) (1)記載の変異型ルシフェラーゼをコードするDNA。

(4) (3)記載のDNAを含有する組換えベクター。

(5) (4)記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(6) (5)記載の形質転換体を培養することを含む、変異型ルシフェラーゼの製造方法。

(7) (1)記載の変異型ルシフェラーゼを含むキット。

(8) (1)記載の変異型ルシフェラーゼを用いて、生物発光アッセイを行う方法。

(9) (1)記載の変異型ルシフェラーゼを結合した標的タンパク質と発光基質との反応により生じた発光を測定する(8)記載の方法。

(10) (1)記載の変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントとN末端フラグメントの結合により再構成されたルシフェラーゼと発光基質との反応

により生じた発光を測定する（８）記載の方法であって、前記N末端フラグメントは、配列番号１のアミノ酸配列中の292位を含む前記方法。

（１１）（１０）記載の方法に用いられる、（１）記載の変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントであって、配列番号１のアミノ酸配列中の292位を含む前記N末端フラグメント。

発明の効果

[0009] 本発明により、新規な耐熱性ルシフェラーゼが提供された。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2017 - 52502の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1-1]野生型ルシフェラーゼと各変異体ルシフェラーゼにおける加熱処理後の発光残存活性の比較。

[図1-2]野生型ルシフェラーゼと292位または294位変異体ルシフェラーゼにおける加熱処理後の発光残存活性の比較。

[図2]発光試薬に導入した野生型ルシフェラーゼと各変異体ルシフェラーゼにおける加温処理後の発光残存活性の比較（23℃の場合）。

[図3]発光試薬に導入した野生型ルシフェラーゼと各変異体ルシフェラーゼにおける加熱処理後の発光残存活性の比較（40℃の場合）。

[図4]野生型ルシフェラーゼと変異体ルシフェラーゼのタンパク質量当たりの活性比較。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

[0012] 本発明は、以下の(a)又は(b)の変異型ルシフェラーゼを提供する。

(a) 配列番号１のアミノ酸配列からなる野生型ルシフェラーゼの変異体であって、配列番号１のアミノ酸配列における、292位のフェニルアラニン及び／又は294位のフェニルアラニンが他のアミノ酸に置換されている、前記変異体

(b) 配列番号１のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼの変異体であって、その変異体のアミノ酸配列における、配列番号１の

アミノ酸配列中の292位及び／又は294位に対応する部位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、前記変異体

(a)のルシフェラーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列からなる野生型ルシフェラーゼの変異体である。この変異体は、配列番号1のアミノ酸配列における、292位のフェニルアラニン及び／又は294位のフェニルアラニンが他のアミノ酸に置換されている。配列番号1は、野生型ルシフェラーゼ（北米産ホタルルシフェラーゼ）のアミノ酸配列を示す。配列番号1のアミノ酸配列における、292位及び／又は294位のフェニルアラニンは、フェニルアラニン以外のアミノ酸に置換されているとよく、フェニルアラニン以外のアミノ酸としては、ロイシン、ロイシン以外の脂肪族アミノ酸（グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、メチオニン）、芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシン、チロキシン）、プロリンなどの疎水性アミノ酸、酢酸アミノ酸アミド族（グルタミン、アスパラギン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン）などを例示することができ、このうち、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、グルタミン、リジン、アルギニン、ヒスチジンが好ましい。フェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸が他族、特に脂肪族アミノ酸に置換されると耐熱効果が得られる傾向にある。また、グリシン、アラニン、ロイシン、メチオニン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジンは、フェニルアラニンと同様の立体構造を形成しやすいと考えられる。

[0013] (b)のルシフェラーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼの変異体である。配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼは、天然由来であっても、変異型であってもよい。

[0014] ルシフェラーゼの例としては、ホタル天然ルシフェラーゼ（具体的には、北米産ホタル天然ルシフェラーゼ、ヘイケボタル由来ルシフェラーゼ、ゲンジボタル由来ルシフェラーゼ、ヒメボタル由来ルシフェラーゼ、ヒカリコメ

ツキ由来ルシフェラーゼ、鉄道虫由来ルシフェラーゼ、ツチボタル由来ルシフェラーゼ、ウミボタル由来ルシフェラーゼ、ウミサボテン由来ルシフェラーゼ)、ホタルルシフェラーゼ以外の天然ルシフェラーゼ(具体的には、渦鞭毛藻(虫)由来ルシフェラーゼ、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ、キヨタケ由来ルシフェラーゼ、発光バクテリア由来ルシフェラーゼ、ラチア由来ルシフェラーゼ、発光ゴカイ由来ルシフェラーゼ)などの天然ルシフェラーゼ、それらの変異体などを挙げることができる。

[0015] (b)のルシフェラーゼ変異体は、そのアミノ酸配列(配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有する)における、配列番号1のアミノ酸配列中の292位及び/又は294位に対応する部位のアミノ酸が、フェニルアラニン以外のアミノ酸に置換されているとよく、フェニルアラニン以外のアミノ酸としては、ロイシン、ロイシン以外の脂肪族アミノ酸(グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、メチオニン)、芳香族アミノ酸(トリプトファン、チロシン、チロキシン)、プロリンなどの疎水性アミノ酸、酢酸アミノ酸アミド族(グルタミン、アスパラギン)、酸性アミノ酸(グルタミン酸、アスパラギン酸)、塩基性アミノ酸(リジン、アルギニン、ヒスチジン)を例示することができ、このうち、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、グルタミン、リジン、アルギニン、ヒスチジンが好ましい。フェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸が他族、特に脂肪族アミノ酸に置換されると耐熱効果が得られる傾向にある。また、グリシン、アラニン、ロイシン、メチオニン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジンは、フェニルアラニンと同様の立体構造を形成しやすいと考えられる。

配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸が置換、欠失及び/又は挿入されたものでありうる。置換、欠失及び/又は挿入されたアミノ酸の数の上限は、40個、30個、20個、10個、5個、4個、3個又は2個でありうる。

配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼとしては、配列番号1のアミノ酸配列における、215位のアラニン、354位のグルタミン酸及び465位のフェニルアラニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものを例示することができる。配列番号1のアミノ酸配列における、215位のアラニンがアラニン以外のアミノ酸に置換される場合には、脂肪族アミノ酸（グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、チロキシン）、プロリンなどの疎水性アミノ酸、酢酸アミノ酸アミド族（グルタミン、アスパラギン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン）などで置換されるとよい。配列番号1のアミノ酸配列における、354位のグルタミン酸がグルタミン酸以外のアミノ酸に置換される場合には、リシン、アルギニン、ヒスチジンなどの正電荷をもつアミノ酸、アスパラギン酸などの負電荷をもつアミノ酸などで置換されるとよい。配列番号1のアミノ酸における465位のフェニルアラニンがフェニルアラニン以外のアミノ酸に置換される場合には、脂肪族アミノ酸（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン）、芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシン、チロキシン）、プロリンなどの疎水性アミノ酸、酢酸アミノ酸アミド族（グルタミン、アスパラギン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン）などで置換されるとよい。

[0016] 本発明の範囲内にあるルシフェラーゼの変異には、以下のものが含まれる。

F292L

A215L, F292L

E354K(E354R), F292L

F465R, F292L

A215L, E354K(E354R), F292L

A215L, F465R, F292L

E354K(E354R), F465R, F292L

A215L, E354K(E354R), F465R, F292L

F294L

A215L, F294L

E354K(E354R), F294L

F465R, F294L

A215L, E354K(E354R), F294L

A215L, F465R, F294L

E354K(E354R), F465R, F294L

A215L, E354K(E354R), F465R, F294L

F292L, F294L

A215L, F292L, F294L

E354K(E354R), F292L, F294L

F465R, F292L, F294L

A215L, E354K(E354R), F292L, F294L

A215L, F465R, F292L, F294L

E354K(E354R), F465R, F292L, F294L

A215L, E354K(E354R), F465R, F292L, F294L

[0017] 本発明の変異型ルシフェラーゼは、野生型ルシフェラーゼのDNA配列をベクターに組み込んだプラスミド（テンプレートDNA）を鋳型として、変異を導入したプライマーを用いてinversePCRを行い、鋳型プラスミドを制限酵素で切断し、その後、直鎖状プラスミドであるPCR産物をセルフライゲーションにより環状化し、変異体のプラスミドDNAを生成させ、このプラスミドを宿主に形質転換し、培地で培養することにより得られる。以上の操作は、KOD-plus mutagenesis kit（東洋紡）を用いて行うことができる。

[0018] 配列番号1のアミノ酸配列からなる野生型ルシフェラーゼのDNA配列を配列番号2に示す。配列番号1のアミノ酸配列からなる野生型ルシフェラー

ぜ遺伝子およびその組換え体DNAは、北米産ホタルから公知の方法に従って調製することができる。また、プロメガ社より購入することが可能である。

[0019] 本発明は、上記の変異型ルシフェラーゼをコードするDNAも提供する。

[0020] また、本発明は、上記の変異型ルシフェラーゼをコードするDNAを含む組換えベクターも提供する。変異型ルシフェラーゼをコードするDNAを組み込む発現ベクターとしては、商業的に入手可能なものを使用することができ、例えば真核性のものではp3XFLAG-CMV-9、p3XFLAG-CMV-10、pXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL、SV40、細菌性のものではpQE70、pQE60、pQE-9、pBluescriptII KS、pTrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T、pET-11a等がある。

[0021] 発現ベクターには、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを付加してもよい。

[0022] 本発明の変異型ルシフェラーゼをコードするDNAを含む組換えベクターを宿主に導入することにより、形質転換体を得ることができる。

[0023] 宿主としては、細菌細胞（例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、枯草菌など）、真菌細胞（例えば、酵母、アスペルギルスなど）、昆虫細胞（例えば、S2細胞、Sf細胞など）、動物細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞など）、植物細胞などを例示することができる。

[0024] 組換えベクターを宿主に導入するには、リン酸カルシウム法によるもののほか、Lipofectamine、Lipofectamine2000（いずれもインビトロジェン）、GeneJuice（メルク）、Xfect（クロンテック）、FuGENE 6（ロシュ・アプライド）、HilyMax（同仁化学研究所）などの市販の遺伝子導入試薬を用いればよい。

[0025] 形質転換体を培地で培養し、培養物から本発明の変異型ルシフェラーゼを採取することができる。よって、本発明は、変異型ルシフェラーゼをコード

するDNAを含有する組換えベクターを含む形質転換体を培養することを含み、変異型ルシフェラーゼの製造方法を提供する。変異型ルシフェラーゼが培地に分泌される場合には、培地を回収し、その培地から変異型ルシフェラーゼを分離し、精製すればよい。変異型ルシフェラーゼが形質転換された細胞内に産生される場合には、その細胞を溶解し、その溶解物から変異型ルシフェラーゼを分離し、精製すればよい。

[0026] 本発明の変異型ルシフェラーゼは、ルシフェラーゼ／ルシフェリン反応を利用する生物発光アッセイに用いることができる。よって、本発明は、変異型ルシフェラーゼを用いて、生物発光アッセイを行う方法を提供する。生物発光アッセイにおいては、変異型ルシフェラーゼを結合した標的タンパク質と発光基質との反応により生じた発光を測定するとよい。発光基質は、ルシフェリン（例えば、多複素式有機酸D-（-）-2-（6'-ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル）- Δ 2-チアゾリン-4-カルボン酸）であるとよい。発光波長は562nmが適当である。

[0027] 上記アッセイを行うために、本発明の変異型ルシフェラーゼは、取扱い説明書、発光基質、その他の試薬とともにキットを構成するとよい。よって、本発明は、変異型ルシフェラーゼを含むキットも提供する。

[0028] 本発明の生物発光アッセイ法は、分割酵素アッセイであってもよい。すなわち、変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントとN末端フラグメントの結合により再構成されたルシフェラーゼと発光基質との反応により生じた発光を測定するものであってもよい。ルシフェラーゼの分割酵素アッセイについては、特許第5816412号に記載されており、それを参照するとよい。本発明は、上記の分割酵素アッセイに用いられる、変異型ルシフェラーゼのC末端又はN末端フラグメントも提供する。変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントは、そのアミノ酸配列における、配列番号1のアミノ酸配列中の292位又はそれに対応する部位を含むとよい。変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントは、そのアミノ酸配列における、配列番号1のアミノ酸配列中の399～550番目に対応する部位の連続するアミノ酸からなる配列を含むと

よく、変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントは、そのアミノ酸配列における、配列番号1のアミノ酸配列中の1～416番目に対応する部位の連続するアミノ酸からなる配列を含むとよい。上記の399～550番目に対応する部位、1～416番目に対応する部位は、それぞれ、最初のアミノ酸と最後のアミノ酸の部位が17個以下程度前後してもよい。また、C末端フラグメントとN末端フラグメントは、重複するアミノ酸配列を含んでもよい。重複するアミノ酸の数は、1～200個が好ましく、5～30個がより好ましい。

[0029] 分割酵素アッセイにおいて、ターゲットタンパク質と変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントとの融合タンパク質を細胞に発現させるとよい。例えば、ターゲットタンパク質をコードするDNAと変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントをコードするDNAを適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な細胞に導入し、適当な時間培養することにより、融合タンパク質を細胞に発現させることができる。ターゲットタンパク質をコードするDNA及び変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントをコードするDNAは、PCR等を用いる公知の方法で調製することができる。発現ベクターとしては、商業的に入手可能なものを使用することができ、例えば真核性のものではp3XFLAG-CMV-9、p3XFLAG-CMV-10、pXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL、SV40、細菌性のものではpQE70、pQE60、pQE-9、pBluescriptII KS、pTrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T、pET-11a等がある。ターゲットタンパク質をコードするDNAは、変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントをコードするDNAの上流又は下流のいずれに組み込んでもよい。また、ターゲットタンパク質をコードするDNAと変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントをコードするDNAとの間には、1～50個のヌクレオチドからなるリンカー配列を挿入してもよい。

[0030] 融合タンパク質を発現させる細胞としては、細菌細胞（例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、枯草菌など）、真菌細胞（例えば、酵母、アスペルギルスなど）、昆虫細胞（例えば、S2細胞、Sf細胞など）、動物細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293

細胞など）、植物細胞などの細胞を例示することができる。

[0031] ターゲットタンパク質をコードするDNAと変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントをコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを宿主に導入するには、リン酸カルシウム法によるもののほか、Lipofectamine、Lipofectamine2000（いずれもインビトロジェン）、GeneJuice（メルク）、Xfect（クロンテック）、FuGENE 6（ロシュ・アプライド）、HiLyMax（同仁化学研究所）などの市販の遺伝子導入試薬を用いればよい。

[0032] 変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントは、例えば、変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントをコードするDNAを組み込んだベクターをタンパク質発現用宿主（例えば、大腸菌）に導入し、適当な時間培養した後、培養物から目的のタンパク質（変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメント）を採取することができる。目的のタンパク質が培地に分泌される場合には、培地を回収し、その培地から目的のタンパク質を分離し、精製すればよい。目的のタンパク質が宿主の細胞内に産生される場合には、その細胞を溶解し、その溶解物から目的のタンパク質を分離し、精製すればよい。

[0033] 融合タンパク質を細胞に発現させた後、変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントを添加し、発光の有無若しくは発光波長の変化を検出する。例えば、融合タンパク質を発現する細胞の培養液に変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントを添加し、適当な時間静置した後、発光の有無若しくは発光波長の変化を検出するとよい。ターゲットタンパク質と変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントとの融合タンパク質を細胞に発現させた後、変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントを添加する場合には、発光基質（ルシフェリン）を加えてから、発光の有無又は発光波長の変化を検出するとよい。発光波長は562 nmが適当である。

実施例

[0034] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕

変異体ルシフェラーゼの作製

変異体ルシフェラーゼを作製するためのプラスミドは、inversePCR法 (Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120(3):621-623.) に基づき、野生型 (Wild) ルシフェラーゼをpET28aまたはpET28bベクター (メルク社製) に組み込んだプラスミド (テンプレートDNA) に対して部位特異的変異導入を行うことにより、作製した。

PCR反応は、下記の組成で反応液を調製し、95℃で2分処理後、98℃で10秒、68℃で7分のサイクルを10サイクル行った。

テンプレートDNA pET28a (pET28b)-WildLuc (50ng/ μ l)	0.5 μ l
プライマー 1 (10pmol/ μ l)	0.5 μ l
プライマー 2 (10pmol/ μ l)	0.5 μ l
2mM dNTP混合物 (TOYOBO社製)	2.5 μ l
ポリメラーゼ (TOYOBO社製)	0.5 μ l
10×緩衝液	2.5 μ l
滅菌水	18 μ l

※プライマー 1 及び 2 の塩基配列は表 1 に示す。

増幅したPCR産物は、まず、Dpn I処理により鋳型プラスミド (野生型ルシフェラーゼの配列が存在するテンプレートDNA) を消化した。その後、Dpn I処理により消化されなかったDNAをセルフライゲーションにより環状化し、変異体のプラスミドDNAを生成させた。このプラスミドDNAを大腸菌BL21 (DE3) にトランスフォーメーション (形質転換) し、50 μ g/mlカナマイシンを含むLB寒天培地に撒き、37℃で一晩培養した。塩基配列の確認は、生じたコロニーから液体培養し、プラスミドDNAを抽出した上で行った。なお、複数の改変部位を有する変異体ルシフェラーゼについては、プライマーの配列を各々の改変アミノ酸に変わるよう設計し、前記手法を繰り返すことにより作製した。

上記の方法により、変異体ルシフェラーゼM2(A215L, E354K)、M1-354R(E354R)、M1-465R(F465R)、M3-354K(A215L, E354K, F465R)、M3-354R(A215L, E354K)

4R, F465R)、M5(A215L, E354K, F465R, F292L, F294L)、M3K+292(A215L, E354K, F465R, F292L)、M3K+294(A215L, E354K, F465R, F294L)、M1-292L(F292L)、M1-294L(F294L)を作製した。

[0035] 表1 変異体作製に使用したオリゴヌクレオチドの配列

改変部位	プライマー配列 (プライマー1、2)
A215L	TTGTGCGTCAGATTCTCGCATGCCA (配列番号23) AGTTCTATGCGGAAGGGCCACACCC (配列番号24)
E354K	AAAGGGGATGATAAACC GGCGCGG (配列番号25) GGGTGTAATCAGAATAGCTGATGTAGTCTCAGTGAGCCC (配列番号26)
E354R	CGTGGGGATGATAAACC GGCGCGG (配列番号27) GGGTGTAATCAGAATAGCTGATGTAGTCTCAGTGAGCCC (配列番号28)
F292L	TTGTCATTCTTCGCCAAAAGCAC (配列番号29) TAGGGTTGGTACTAGCAACGCACT (配列番号30)
F294L	TTGTTGCCAAAAGCACTCTGAT (配列番号31) TGAAAATAGGGTTGGTACTAGCAACG (配列番号32)
F465R	CGTGACGCGGGCGTGGCAGGTCTT (配列番号33) GATGTTGGGGTGTGTGAACAATATCGATTCC (配列番号34)

[0036] [実施例2]

変異体ルシフェラーゼの耐熱性評価

各組み換えルシフェラーゼの耐熱性は、下記の手法により評価した。改変プラスミドを導入したBL21 (DE3) 細胞を50 μ g/mlカナマイシンおよび0.5mM IPTGを含むLB寒天培地に撒き、37℃で一晩培養後、1コロニー分の菌体を200 μ lの溶菌バッファーに入れ、変異体ルシフェラーゼを抽出した。なお、溶菌に使用したバッファーの組成は下記の通りである。

トリス緩衝液 (pH6.8～pH8.0、終濃度0.1～100mM)

Triton X-100 (終濃度0.001～10%)

リゾチーム (終濃度0.1mg/ml～20mg/ml)

この溶菌液を35℃～45℃で30分間加熱処理し、「ピッカジーン発光キット (東洋ビーネット社製) PGL100」を用いて、発光活性を測定した。図1-1は、各変異体ルシフェラーゼにおける加熱処理後の発光活性を示す。本図より、本発明のルシフェラーゼ変異体は野生型ルシフェラーゼに対して、約1.5～16倍の熱安定性を有していることが分かる。また、F292L、F294Lの改変部位は

、既知の改変部位およびその組み合わせにより改善された熱安定性に対して、さらなる耐熱性の向上を付与していることが分かる。特に、F292LおよびF294Lの両部位を改変した変異体「M5」ルシフェラーゼは、既存の改変部位と組み合わせることにより、野生型ルシフェラーゼとの比較において、約9倍の耐熱性から約16倍の耐熱性へと向上させた。本結果は、野生型ルシフェラーゼの耐熱性改善において、F292LとF294Lの相乗効果を示している。

図1-2は、292位または294位を単独で変異させた場合の耐熱性効果を示す。図1-1と同様の方法にて試験し、加熱処理後の発光活性を野生型と比較した。本図より、292位および294位における改変は、野生型に対して、それぞれ約3.6倍、約3.2倍の残存活性を示し、単独の変異でも耐熱性を付与することが分かる。

[0037] 〔実施例3〕

変異体ルシフェラーゼを発光試薬に導入した際の耐熱性評価

各変異体ルシフェラーゼを導入した大腸菌BL21 (DE3) を50 μ g/mlカナマイシン含有LB液体培地に植菌し、37℃で数時間振盪培養した。OD600=0.3~0.7の段階でIPTG（終濃度0.5mM）を添加し、変異体ルシフェラーゼの発現を誘導後、約5時間培養した後に遠心分離によって集菌し、実施例2と同様の溶菌バッファーを用いて大腸菌から総タンパク質を抽出した。抽出した総タンパク質からの変異体ルシフェラーゼの精製には、ニッケルを結合させたHisカラムを用いた。

この精製した変異体ルシフェラーゼを野生型ルシフェラーゼの代わりに発光試薬 “『細胞の』ATP測定試薬（東洋ビーネット社製）CA” に導入し、発光試薬へ導入した後の耐熱性を評価した。耐熱性の評価には、「室温15~30℃における安定性」および「30~50℃における加温耐性」として、23℃で24時間の加温処理、および40℃で30分間の加熱処理を行い、処理後の発光残存活性を測定した。図2は、発光試薬に導入した野生型ルシフェラーゼと各変異体ルシフェラーゼにおける加温処理（23℃）後の発光残存活性の比較データを示す。また、図3は、発光試薬に導入した野生型ルシフェラーゼと各変異体ル

シフェラーゼにおける加熱処理（40℃）後の発光残存活性の比較データを示す。本図より、本発明のルシフェラーゼ変異体は、発光試薬中に存在している場合においても、野生型ルシフェラーゼと比較して約1.6～107倍の耐熱性を有していることが分かる。特に、高温になるほど、その耐熱性効果を発揮していた。また、F292L、F294Lの改変部位は、実施例2と同様に、既知の改変部位およびその組み合わせにより改善された熱安定性に対して、さらなる耐熱性の向上を付与していることが分かる。

[0038] 〔実施例4〕

変異体ルシフェラーゼの比活性の測定

作製した変異体ルシフェラーゼと野生型ルシフェラーゼについて、タンパク質量当たりの比活性を測定した。比活性の算出には、前記発光試薬への各ルシフェラーゼの添加量と各ルシフェラーゼをSDS-PAGEによって分離した際に得られるバンド濃度を数値化した値を用いた。図4は、その結果を示す。本図より、本発明のルシフェラーゼ変異体は、野生型ルシフェラーゼに比べて比活性が約1.8倍に上昇しており、タンパク質量当たりの活性が高いことが分かる。この結果は、同タンパク質量のルシフェラーゼを用いた際に、より高い発光量として検出されることを意味する。すなわち、ルシフェラーゼ発光検出における発光感度の上昇を意味する。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0039] 本発明の変異型ルシフェラーゼは、リポーターアッセイなどに利用できる。

配列表フリーテキスト

[0040] <配列番号1>野生型ルシフェラーゼのアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII

IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITPEGDDKPGAVGKVVPFPEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 2>野生型ルシフェラーゼの DNA 配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga
61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt
121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc
181 gticggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta
241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatc
ggagtt
301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt
361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa
421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagggga
481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat
541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc

tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt caga

tctctg

661 catgccagag atcctatittt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tita

agtgtt

721 gticcattcc atcacggittt tggaaatgttt actacactcg gatatttgat atgt

ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag

gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa aagc

actctg

901 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc acct

ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaa

ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaa

ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc

gggaaa

1141 acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg

tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta

cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg

aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcagggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg

ttacaa

1381 caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt

gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtt gttt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 3>M1-292Lのアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLLSFFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITPEGDDKPGAVGKVVPPFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 4>M1-292LのDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga

61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt

121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc

181 gttcgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc

gtcgta

241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tate
ggagtt

301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt

361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa

421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagga

481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat

541 ttigtaccag agtccittga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatittt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tita
agtgtt

721 gtccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattgtcat tcttcgccaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgattttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatagc acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaa

ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaaggttg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gttt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 5> M1-294Lのアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSLFAKSTL
IDKYDLNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL

ITPEGDDKPGAVGKVVPPFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 6> M1-294L の D N A 配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga
61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt
121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc
181 gticgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta
241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatc
ggagtt
301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt
361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa
421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagga
481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat
541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga
601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt caga
ttctcg
661 catgccagag atcctatitt ttggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tttt

agtgtt

721 gtccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tgttcgccaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgatttatac taattttacac gaaattgctt ctgggggagc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggag ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gttt

gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 7> M1-354Rのアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITPRGDDKPGAVGKVVPPFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 8> M1-354RのDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga

61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt

121 gctttttacag atgcacatat cgagggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc

181 gttcgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta

241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatc
ggagtt

301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg

aacatt

361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa

421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagggga

481 tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat

541 tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatittt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tita
agtgtt

721 gtccattcc atcacgggtt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcca aagc
actctg

901 attgacaaat acgattttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggagc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg ggggaagcgg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatag acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccc gtggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggag ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg

tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ct tactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cgg
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt gtt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 9> M1-465Rのアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVL MYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTL
IDKYDL SNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLP GIRQGYGLTETTSAIL
ITPEGDDKPGAVGKVVPPFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKG YQVA
PAELESILLQHPNIRDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 1 O>M1-465RのDNA配列を示す。

```
1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga
61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctgggtcc tgga
acaatt
121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc
181 gticgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta
241 tgcagtgaag actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tate
ggagtt
301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt
361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa
421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
caggga
481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat
541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga
601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt caga
ttctcg
661 catgccagag atcctatatt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tttt
agtgtt
721 gtccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt
781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
```

gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgccaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgattttatc taattttacac gaaattgctt ctgggggcgc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg aggggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ct tactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcagggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tccgtgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gata
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt gttt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gata
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 1 1>M2のアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTL_CVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITPK_GDDKPGAVGKVVPPFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVVFDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 1 2>M2のDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga
61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt
121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc
181 gttcgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta
241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatc
ggagtt
301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt
361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa
421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac

cagggga

481 tticagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat

541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctttgtgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatittt tggcaatcaa atcattccgg atactgcat tita
agtgtt

721 gtccattcc atcacggittt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggagc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatagc acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccca aaggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggag ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg

aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cgg
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gttt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 1 3>M3-354Kのアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTL_CVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITPKGDDKPGAVGKVVPFFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIRDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 1 4>M3-354KのDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga

61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga

acaatt

121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc

181 gticgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta

241 tgcagtgaag actctcttca attctttatg ccggtgttg ggcgttatt tatc
ggagtt

301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt

361 tcgcagccta ccgtagtgtt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa

421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
caggga

481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat

541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctttgtgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatitt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tita
agtgtt

721 gticcatgcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc acct

ctttcg

961 aaagaagtcg ggggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccca aaggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcagggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tccgtgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gttt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 1 5>M3-354Rのアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN

ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV

AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII

IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTL_CVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITPR_GDDKPGAVGKVVPF EAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIRDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 1 6>M3-354RのDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga
61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt
121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc
181 gticgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta
241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tate
ggagtt
301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt
361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa
421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagga
481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat
541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc

tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctttgtgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatittt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tita
agtgtt

721 gticcattcc atcacggittt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccc gtggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagtgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tccgtgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt

gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtt gttt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcacaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 1 7>M3K+292のアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTL_CVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTL_LSFFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITP_KGDDKPGAVGKVVPFPEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIR_DAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 1 8>M3K+292のDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga

61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt

121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc

181 gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc

gtcgta

241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tate
ggagtt

301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt

361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa

421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagga

481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat

541 ttigtaccag agtccittga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctttgtgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatittt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tita
agtgtt

721 gtccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattgtcat tcttcgcca aagc
actctg

901 attgacaaat acgattttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatag acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccca aaggggatga taaa

ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaaggttg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tcgtgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt gtt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 19>M3K+294のアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTL_CVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFS_LFAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL

ITPKGDDDKPGAVGKVVPFFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIRDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKLRRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 2 O>M3K+294のDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga

61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt

121 gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc

181 gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta

241 tgcagtgaag actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatc
ggagtt

301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg
aacatt

361 tcgcagccta ccgtagtgtt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa

421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagga

481 tticagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat

541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga

601 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctttgtgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatitt ttggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tttt

agtgtt

721 gtccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tgttcgccaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggagc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccca aaggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggag ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg
tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tccgtgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gttt

gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 2 1>M5のアミノ酸配列を示す。

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVN
ITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGV
AVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVVFSKKGLQKILNVQKKLPPIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSG
STGLPKGVALPHRTL_CVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMF
TTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTL_SL_FAKSTL
IDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL
ITP_KDDKPGAVGKVVPFPEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSG
YVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVA
PAELESILLQHPNIRDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVD
YVASQVTTAKKL RGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

<配列番号 2 2>M5のDNA配列を示す。

1 atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agag
gatgga

61 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgga
acaatt

121 gctttttacag atgcacatat cgagggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaa
atgtcc

181 gticggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatc
gtcgta

241 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatc
ggagtt

301 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatg

aacatt

361 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaac
gtgcaa

421 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttac
cagggga

481 tticagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaa
tacgat

541 ttigtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcc
tctgga

601 tctactgggt tacctaagggt tgtggccctt ccgcatagaa ctttgtgcgt caga
ttctcg

661 catgccagag atcctatattt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tita
agtgtt

721 gtccattcc atcacgggtt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgt
ggattt

781 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcag
gattac

841 aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattgtcat tgttcgccaa aagc
actctg

901 attgacaaat acgattttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggagc acct
ctttcg

961 aaagaagtcg ggggaagcgggt tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatagc acaa
ggatat

1021 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccca aaggggatga taaa
ccgggc

1081 gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga tacc
gggaaa

1141 acgctgggag ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatg

tccggt

1201 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gcta
cattct

1261 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctg
aagtct

1321 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attg
ttacaa

1381 caccccaaca tccgtgacgc ggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggt
gaactt

1441 cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatc
gtggat

1501 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagttgt gttt
gtggac

1561 gaagtaccga aaggctttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatc
ctcata

1621 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa

<配列番号 2 3> 改変部位A215L用のプライマー配列（プライマー 1）の D N
A 配列を示す。

TTGTGCGTCAGATTCTCGCATGCCA

<配列番号 2 4> 改変部位A215L用のプライマー配列（プライマー 2）の D N
A 配列を示す。

AGTTCTATGCGGAAGGGCCACACCC

<配列番号 2 5> 改変部位E354K用のプライマー配列（プライマー 1）の D N
A 配列を示す。

AAAGGGGATGATAAACCGGGCGCGG

<配列番号 2 6> 改変部位E354K用のプライマー配列（プライマー 2）の D N
A 配列を示す。

GGGTGTAATCAGAATAGCTGATGTAGTCTCAGTGAGCCC

<配列番号 27> 改変部位E354R用のプライマー配列（プライマー 1）の D N A 配列を示す。

CGTGGGGATGATAAACCGGGCGC

<配列番号 28> 改変部位E354R用のプライマー配列（プライマー 2）の D N A 配列を示す。

GGGTGTAATCAGAATAGCTGATGTAGTCTCAGTGAGCCC

<配列番号 29> 改変部位F292L用のプライマー配列（プライマー 1）の D N A 配列を示す。

TTGTCATTCTTCGCCAAAAGCAC

<配列番号 30> 改変部位F292L用のプライマー配列（プライマー 2）の D N A 配列を示す。

TAGGGTTGGTACTAGCAACGCACT

<配列番号 31> 改変部位F294L用のプライマー配列（プライマー 1）の D N A 配列を示す。

TTGTTCGCCAAAAGCACTCTGAT

<配列番号 32> 改変部位F294L用のプライマー配列（プライマー 2）の D N A 配列を示す。

TGAAAATAGGGTTGGTACTAGCAACG

<配列番号 33> 改変部位F465R用のプライマー配列（プライマー 1）の D N A 配列を示す。

CGTGACGCGGGCGTGGCAGGTCTT

<配列番号 34> 改変部位F465R用のプライマー配列（プライマー 2）の D N A 配列を示す。

GATGTTGGGGTGTGTAACAATATCGATTCC

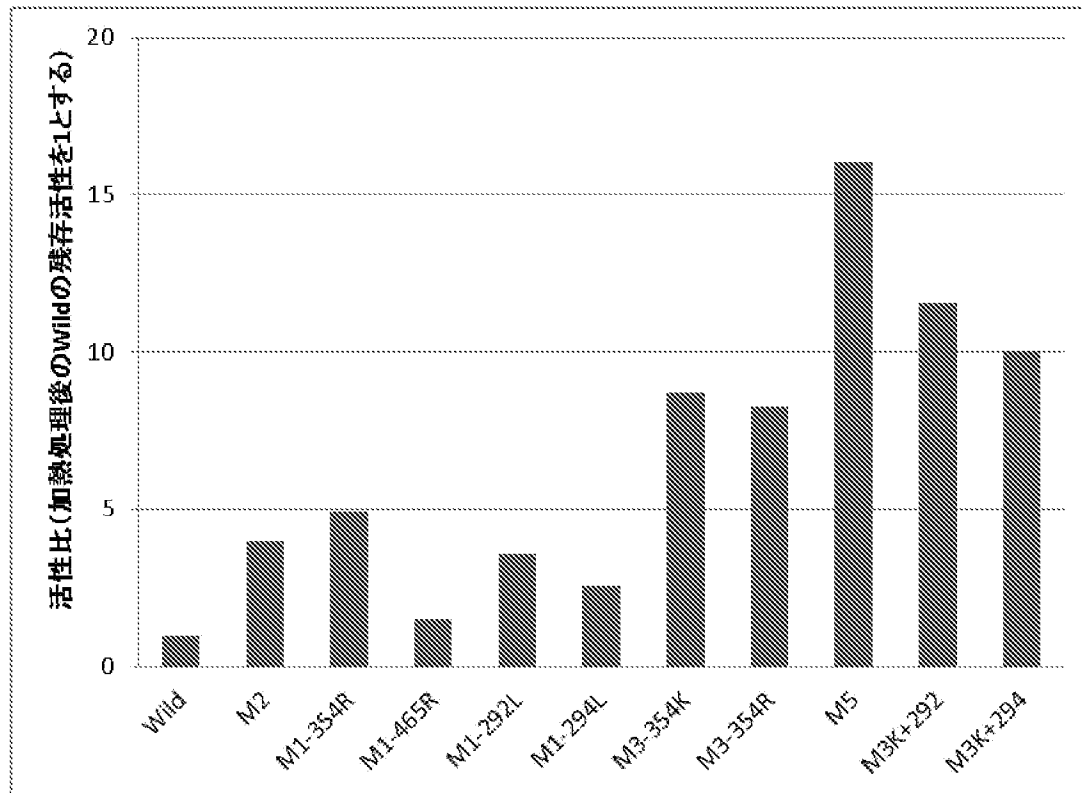
請求の範囲

- [請求項1] 以下の(a)又は(b)の変異型ルシフェラーゼ。
- (a) 配列番号1のアミノ酸配列からなる野生型ルシフェラーゼの変異体であって、配列番号1のアミノ酸配列における、292位のフェニルアラニン及び／又は294位のフェニルアラニンが他のアミノ酸に置換されている、前記変異体
- (b) 配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼの変異体であって、その変異体のアミノ酸配列における、配列番号1のアミノ酸配列中の292位及び／又は294位に対応する部位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、前記変異体
- [請求項2] 配列番号1のアミノ酸配列に対して93%以上の相同性を有するルシフェラーゼが、配列番号1のアミノ酸配列における、215位のアラニン、354位のグルタミン酸及び465位のフェニルアラニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものである請求項1記載の変異型ルシフェラーゼ。
- [請求項3] 請求項1記載の変異型ルシフェラーゼをコードするDNA。
- [請求項4] 請求項3記載のDNAを含有する組換えベクター。
- [請求項5] 請求項4記載の組換えベクターを含む形質転換体。
- [請求項6] 請求項5記載の形質転換体を培養することを含む、変異型ルシフェラーゼの製造方法。
- [請求項7] 請求項1記載の変異型ルシフェラーゼを含むキット。
- [請求項8] 請求項1記載の変異型ルシフェラーゼを用いて、生物発光アッセイを行う方法。
- [請求項9] 請求項1記載の変異型ルシフェラーゼを結合した標的タンパク質と発光基質との反応により生じた発光を測定する請求項8記載の方法。
- [請求項10] 請求項1記載の変異型ルシフェラーゼのC末端フラグメントとN末端フラグメントの結合により再構成されたルシフェラーゼと発光基質との反応により生じた発光を測定する請求項8記載の方法であって、前

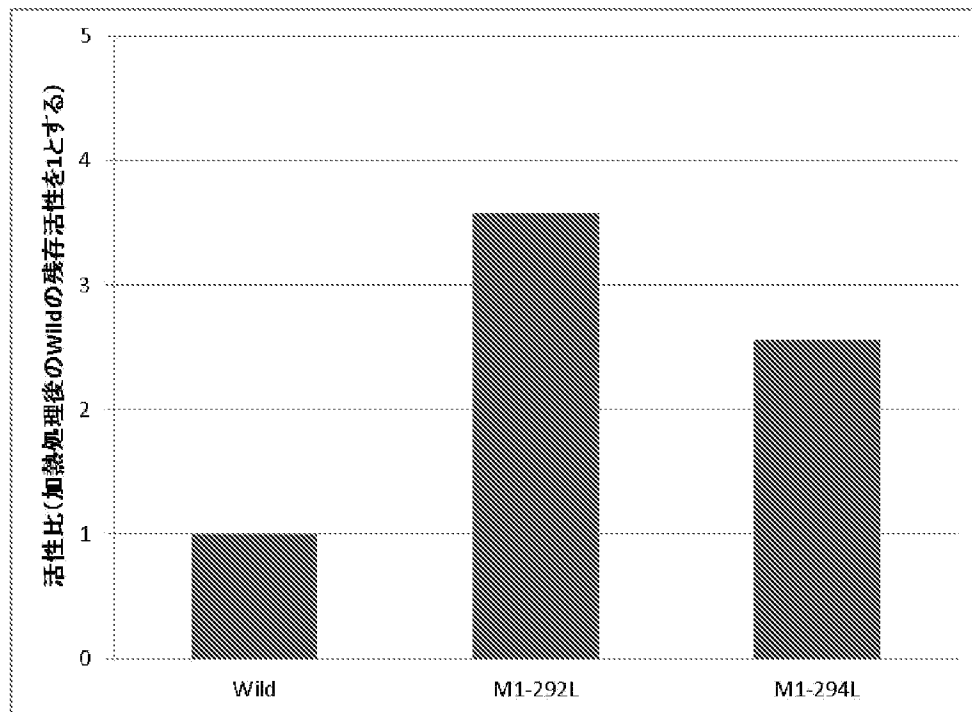
記N末端フラグメントは、配列番号1のアミノ酸配列中の292位を含む前記方法。

[請求項11] 請求項10記載の方法に用いられる、請求項1記載の変異型ルシフェラーゼのN末端フラグメントであって、配列番号1のアミノ酸配列中の292位を含む前記N末端フラグメント。

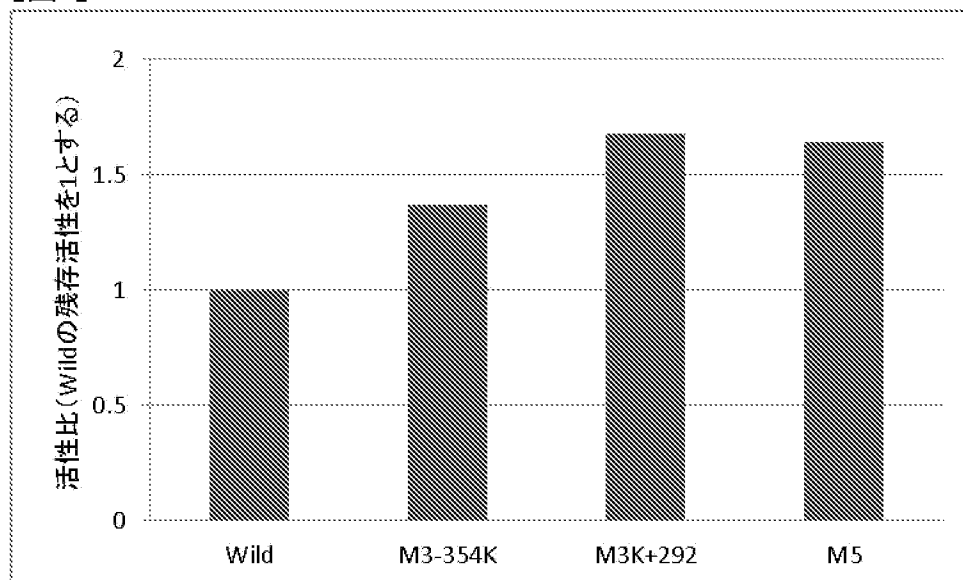
[図1-1]



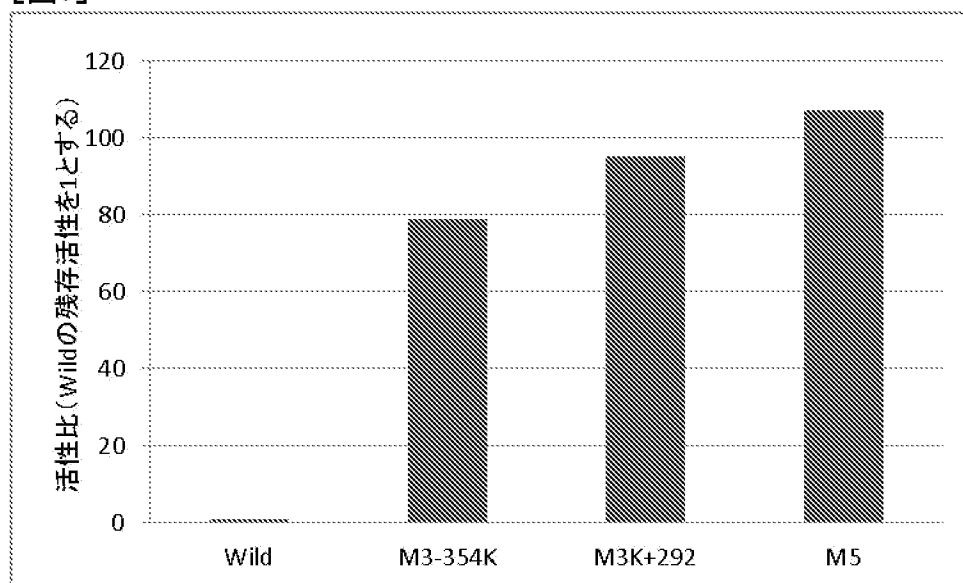
[図1-2]



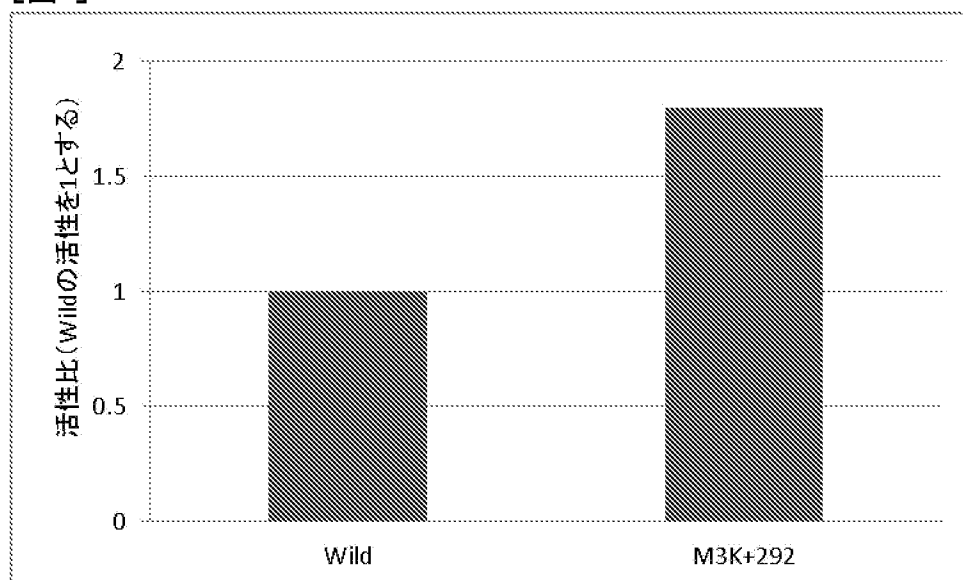
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/010060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/53 (2006.01) i, C12N1/15 (2006.01) i, C12N1/19 (2006.01) i,
C12N1/21 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12N9/02 (2006.01) i,
C12Q1/26 (2006.01) i

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. C12N15/53, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02,
C12Q1/26

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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/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	JP 2011-200146 A (TOYO B-NET CO., LTD.) 13 October 2011, claims (Family: none)	10-11
Y	JP 2010-088440 A (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 22 April 2010, claims, examples & US 6132983 A, claims, examples & WO 1995/025798 A1 & EP 1281762 A2	1-11
Y	JP 2012-205584 A (OLYMPUS CORP.) 25 October 2012, claims, examples & US 2014/0080199 A1, claims, examples & WO 2012/124822 A1 & CN 103429613 A	1-11



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

"I" 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
04 June 2018 (04.06.2018)

Date of mailing of the international search report
19 June 2018 (19.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/010060

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAW, G. H. E. et al., "Mutagenesis of sol vent-exposed amino acids in Photinus pyralis luciferase improves thermostability and pH-tolerance", Biochem. J., 2006, vol. 397, pp. 305-312, page 308, fig. 3	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/53(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i

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.Cl. C12N15/53, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12Q1/26

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/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 請求項の番号
X	JP 2011-200146 A（東洋ビーネット株式会社）2011.10.13, 特許請求の範囲（ファミリーなし）	10-11
Y		10-11
Y	JP 2010-088440 A（スリーエム イノベイティブ プロパティーズカンパニー）2010.04.22, 特許請求の範囲、実施例 & US 6132983 A, 特許請求の範囲、実施例 & WO 1995/025798 A1 & EP 1281762 A2	1-11

☑ 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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

04.06.2018

国際調査報告の発送日

19.06.2018

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）

布川 莉奈

4 B

6220

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 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
Y	JP 2012-205584 A (オリンパス株式会社) 2012. 10. 25, 特許請求の 範囲、実施例 & US 2014/0080199 A1, 特許請求の範囲、実施例 & WO 2012/124822 A1 & CN 103429613 A	1-11
Y	LAW, G.H.E. et al., Mutagenesis of solvent-exposed amino acids in Photinus pyralis luciferase improves thermostability and pH-tolerance, Biochem. J., 2006, Vol. 397, pp. 305-312, 第3 08頁F i g u r e 3	1-11