

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7175881号
(P7175881)

(45)発行日 令和4年11月21日(2022.11.21)

(24)登録日 令和4年11月11日(2022.11.11)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	9/02 (2006.01)	F I	C 1 2 N	9/02	Z N A
C 1 2 Q	1/66 (2006.01)		C 1 2 Q	1/66	
C 1 2 M	1/34 (2006.01)		C 1 2 M	1/34	E
C 1 2 N	15/53 (2006.01)		C 1 2 N	15/53	

請求項の数 13 (全38頁)

(21)出願番号 特願2019-519212(P2019-519212)
 (86)(22)出願日 平成29年10月13日(2017.10.13)
 (65)公表番号 特表2019-537434(P2019-537434
 A)
 (43)公表日 令和1年12月26日(2019.12.26)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/056571
 (87)国際公開番号 WO2018/071807
 (87)国際公開日 平成30年4月19日(2018.4.19)
 審査請求日 令和2年10月12日(2020.10.12)
 (31)優先権主張番号 62/407,815
 (32)優先日 平成28年10月13日(2016.10.13)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 前置審査

(73)特許権者 593089149
 プロメガ コーポレイション
 Promega Corporation
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
 11-5399 マディソン ウッズ ホ
 ロード 2800 番地
 (74)代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74)代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74)代理人 100123777
 弁理士 市川 さつき
 (74)代理人 100111796

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ルシフェリン分解産物による阻害剤耐性を持つ熱安定性ルシフェラーゼ

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

阻害剤耐性ルシフェラーゼであって、配列番号3のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリン及びその誘導体による阻害に対して向上した耐性を備えており、
配列番号7との少なくとも90%の配列同一性を備え、且つ、配列番号3に対して置換I240L、Y254S、C300V、T344A、及びI396Kを含む、阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

【請求項2】

阻害剤耐性ルシフェラーゼであって、配列番号3のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリン及びその誘導体による阻害に対して向上した耐性を備えており、
 配列番号5との少なくとも90%の配列同一性を備え、且つ、配列番号3に対して置換H244R、C300G、及びI396Kを含む、阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

【請求項3】

阻害剤耐性ルシフェラーゼであって、配列番号3のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリン及びその誘導体による阻害に対して向上した耐性を備えており、
 配列番号11との少なくとも90%の配列同一性を備え、且つ、配列番号3に対して置換H244W、T344A、I396K、及びC300Gを含む、阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、ルシフェリン基質

とを含む、試薬組成物。

【請求項 5】

デヒドロルシフェリンを含む混入物をさらに含み、及び／または、マグネシウムをさらに含み、及び／または、緩衝剤、消泡剤、ATPアーゼ阻害剤、L-ルシフェリン、アミノチオチミジン、酵素安定剤、界面活性剤、ATP生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、ATP抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される1種以上の追加の成分をさらに含み、及び／または、単一の液体試薬である、

請求項4に記載の試薬組成物。

10

【請求項 6】

請求項1～3のいずれか1項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、DTAB(臭化ドデシルトリメチルアンモニウム)、CTAB(セチルトリメチルアンモニウム)、塩化ベンザルコニウム、またはDDABr(臭化ベンジルジメチルドデシルアンモニウム)から選択されるカチオン性界面活性剤とを含む試薬組成物。

【請求項 7】

請求項4～6のいずれか1項に記載の試薬組成物を含むキットであって、緩衝剤、消泡剤、ATPアーゼ阻害剤、酵素安定剤、界面活性剤、ATP生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、ATP抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される1種以上の追加の成分をさらに含み、及び／または、ATPの検出アッセイまたはATPの定量アッセイを行うための使用説明書をさらに含む、キット。

20

【請求項 8】

試料にてATPを検出または定量するためのアッセイシステムであって、

(a) 請求項4～6のいずれか1項に記載の試薬組成物と

(b) ATPを含むまたはATPを含むことが疑われる試料と

を含み、前記アッセイシステムが発光の検出及び／または測定のための装置をさらに含むか、または、前記試料が細胞溶解物である、アッセイシステム。

【請求項 9】

試料にてATPを検出する方法であって、

30

(a) 請求項4～6のいずれか1項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、

(b) 発光を検出する工程と

を含み、前記試料が、細胞を含み、前記方法が、細胞を溶解して細胞溶解物を生成する工程をさらに含む、方法。

【請求項 10】

試料にてATPの量または濃度を定量する方法であって、

(a) 請求項4～6のいずれか1項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、

(b) 前記試料からの発光を定量する工程と、

(c) 前記発光を対照値と比較して前記試料における前記ATPの量または濃度を決定する工程と

40

を含む、方法。

【請求項 11】

I) 前記対照値が、既知の濃度のATPを含む対照試料によって生成される発光の別の定量から決定されるか、

II) 前記方法が、前記試料に既知の濃度のATPを添加する工程をさらに含むか、

III) 発光が複数の時点で定量されるか、または

IV) 発光がリアルタイムで定量される、

請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

試料におけるATPの検出及び／または定量のための、請求項4～6のいずれか1項に

50

記載の試薬組成物の使用。

【請求項 13】

アッセイにて請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼの見かけのシグナル安定性を向上させる方法であって、存在する前記ルシフェラーゼの 1 種以上の阻害剤と共に前記アッセイを行う工程を含み、

前記阻害剤が、デヒドロルシフェリン、オキシリシフェリン、及び L - ルシフェリンの 1 種以上から選択されるか、または、前記阻害剤耐性ルシフェラーゼが、天然野生型バージョンのルシフェラーゼと比べて見かけのシグナル安定性の向上における増大を示す、方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2016年10月13日に出願された米国仮特許出願番号 62 / 407,815 に対する優先権を主張し、同米国仮特許出願は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

【0002】

分野

本明細書で提供されるのは、阻害剤耐性ルシフェラーゼ突然変異体及びその使用方法である。特に、熱安定性であり、且つ、たとえば、デヒドロルシフェリンのようなルシフェリン分解産物による阻害に対して改善された耐性を示すルシフェラーゼ突然変異体が提供される。

20

【背景技術】

【0003】

ATP の定量的な検出は一般にルシフェラーゼ酵素（たとえば、ホタルルシフェラーゼ）とその基質（たとえば、D - ルシフェリン）とを用いて行われる。

【発明の概要】

【0004】

本明細書で提供されるのは、阻害剤耐性ルシフェラーゼ突然変異体及びその使用方法である。特に、熱安定性であり、且つ、たとえば、デヒドロルシフェリンのようなルシフェリン分解産物による阻害に対して改善された耐性を示すルシフェラーゼ突然変異体が提供される。

30

【0005】

ATP 検出のアッセイ及び試薬の安定性及び信頼性は、ルシフェラーゼを阻害し、その結果、光出力の低下を生じるルシフェリン分解産物の存在下で損なわれる。これらの分解産物はルシフェリンとルシフェラーゼが単一の液体試薬として一緒に保存される場合特に問題があり、保存可能期間の低下を生じる。デヒドロルシフェリンはルシフェリンの主要な阻害性分解産物として特定されている。

【0006】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号 3 のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリンによる阻害に対して向上した耐性を含む阻害剤耐性ルシフェラーゼである。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、デヒドロルシフェリンに曝されると活性で配列番号 3 のルシフェラーゼよりも少ない相対低下を示す。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 3 との少なくとも 70 % (たとえば、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 %) の配列同一性を含み、配列番号 3 の 240、244、254、300、344、及び / または 396 から選択される位置にて配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含む。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、少なくとも 1 つの置換は、I 240 L、H 244 R、Y 254 S、C 300 G、T 344 A、I 396 K、及び / またはそのような置換の保存的なもしくは半保存的な変異から選択される。

40

50

一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは配列番号 3 の 3 9 6 位にて配列番号 3 に対して置換を含む。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは配列番号 3 に対して I 3 9 6 K の置換またはその保存的なもしくは半保存的な変異を含む。

【 0 0 0 7 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号 1 のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリンによる阻害に対して向上した耐性を含む阻害剤耐性ルシフェラーゼである。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、デヒドロルシフェリンに曝されると、配列番号 1 のルシフェラーゼよりも少ない活性の相対低下を示す。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは配列番号 1 との少なくとも 70 % (たとえば、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 %) の配列同一性を含み、配列番号 1 の 2 4 0、2 4 4、2 5 4、3 0 0、3 4 4、及び / または 3 9 6 から選択される位置にて配列番号 1 に対して少なくとも 1 つの置換を含む。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 1 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、少なくとも 1 つの置換は、I 2 4 0 L、H 2 4 4 R、Y 2 5 4 S、C 3 0 0 G、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なもしくは半保存的な変異から選択される。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは配列番号 1 の 3 9 6 位にて配列番号 1 に対して置換を含む。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは配列番号 1 に対して I 3 9 6 K の置換またはその保存的なもしくは半保存的な変異を含む。

10

【 0 0 0 8 】

一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 5 との少なくとも 70 % (たとえば、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 %) の配列同一性を含み、且つ配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、当該置換は配列番号 3 の 2 4 4、3 0 0 及び / または 3 9 6 から選択される位置である。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、少なくとも 1 つの置換は、H 2 4 4 R、C 3 0 0 G、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なもしくは半保存的な変異から選択される。

20

【 0 0 0 9 】

一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 7 との少なくとも 70 % (たとえば、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 %) の配列同一性を含み、且つ配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、当該置換は配列番号 3 の 2 4 4、3 0 0 及び / または 3 9 6 から選択される位置である。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、少なくとも 1 つの置換は、I 2 4 0 L、Y 2 5 4 S、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なもしくは半保存的な変異から選択される。

30

【 0 0 1 0 】

一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 9 との少なくとも 70 % (たとえば、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 %) の配列同一性を含み、且つ配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、当該置換は配列番号 3 の 2 4 4、3 4 4 及び / または 3 9 6 から選択される位置である。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、少なくとも 1 つの置換は、H 2 4 4 R、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なもしくは半保存的な変異から選択される。

40

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 11 との少なくとも 70 % (たとえば、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 %) の配列同一性を含み、且つ配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、当該置換は配列番号 3 の 2 4 4、3 0 0、3 4 4 及び / または 3 9 6 から選択される位置である。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、少なくとも 1 つの置換は、H 2 4 4 R、C 3 0 0 G、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なもしくは半保存的な変異から選択される。

50

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼも配列番号 3 のルシフェラーゼもデヒドロルシフェリンに曝されていない場合、阻害剤耐性ルシフェラーゼは配列番号 3 のルシフェラーゼの生物発光活性の少なくとも 10 % (たとえば、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれ以上、またはその間の範囲) を含む。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、(i) 本明細書に記載されている阻害剤耐性ルシフェラーゼと、(ii) ルシフェリンとを含む試薬組成物である。一部の実施形態では、試薬組成物はさらに、ルシフェリンの分解産物を含む混入物を含む。一部の実施形態では、混入物はデヒドロルシフェリンである。一部の実施形態では、試薬組成物はさらにマグネシウムを含む。一部の実施形態では、試薬組成物はさらに、緩衝剤、消泡剤、ATPアーゼ阻害剤、酵素安定剤、界面活性剤、ATP生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、ATP抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤及び塩から成る群から選択される 1 以上の追加の成分を含む。一部の実施形態では、試薬組成物は単一の液体試薬である。一部の実施形態では、試薬はラセミ体のルシフェリンを含む。一部の実施形態では、試薬はデヒドロルシフェリンを含む。一部の実施形態では、ラセミ体のルシフェリン及び / またはデヒドロルシフェリンは外から試薬に加えられて、たとえば、ルシフェラーゼの見かけの安定性、試薬の全体的な安定性及び / または ATP の存在下で試薬によって生成される発光シグナルの持続時間を改善する。

10

20

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されている阻害剤耐性ルシフェラーゼとカチオン性界面活性剤とを含む試薬組成物である。一部の実施形態では、カチオン性界面活性剤はDTAB (臭化ドデシルトリメチルアンモニウム)、CTAB (セチルトリメチルアンモニウム)、塩化ベンザルコニウム、またはBDDABr (臭化ベンジルジメチルドデシルアンモニウム) である。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されている試薬組成物を含むキットである。一部の実施形態では、キットはさらに、緩衝剤、消泡剤、ATPアーゼ阻害剤、酵素安定剤、界面活性剤、ATP生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、ATP抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤及び塩から成る群から選択される 1 以上の追加の成分を含む。一部の実施形態では、キットはさらに、ATP の検出アッセイまたは定量アッセイを実施するための指示書を含む。

30

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、(a) 本明細書に記載されている試薬組成物と、(b) ATP を含むまたは含むことが疑われる試料とを含む、試料にて ATP を検出するまたは定量するためのアッセイシステムである。一部の実施形態では、アッセイシステムはさらに、発光の検出及び / または測定のための装置 (他の光検出の装置または機器が使用されてもよいが、たとえば、ルミノメーター) を含む。一部の実施形態では、試料は細胞溶解物である。

40

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、(a) 本明細書に記載されている試薬組成物を試料に加えることと、(b) 発光を検出することとを含む、試料にて ATP を検出する方法である。一部の実施形態では、試料は細胞を含み、方法はさらに細胞を溶解して細胞溶解物を生成することを含む。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、(a) 本明細書に記載されている試薬組成物を試料に加えることと、(b) 試料からの発光を定量することと、(c) 発光を対照値と比較して試料における ATP の量または濃度を決定することとを含む、試料にて

50

A T P の量または濃度を定量する方法である。一部の実施形態では、対照値は既知の濃度の A T P を含む対照試料によって生成される発光の別の定量から決定される。一部の実施形態では、方法はさらに、既知の濃度の A T P を試料に加えるステップを含む。一部の実施形態では、発光は複数の時点で定量される。一部の実施形態では、発光はリアルタイムで定量される。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、試料における A T P の検出及び／または定量のための本明細書に記載されている試薬組成物の使用である。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、存在するルシフェラーゼの 1 以上の阻害剤と共にアッセイを実施することを含む、アッセイにて本明細書に記載されている阻害剤耐性ルシフェラーゼの見かけのシグナル安定性を高める方法である。一部の実施形態では、阻害剤はデヒドロルシフェリン、オキソルシフェリン及び L - ルシフェリンの 1 以上から選択される。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは、天然野生型バージョンのルシフェラーゼと比べて見かけのシグナル安定性向の上昇を示す。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】変異形ルシフェラーゼ及び U L T R A G L O ルシフェラーゼ (Promega Corp . , Madison , WI) の相対光単位 (R L U) による測定単位としての発光を示すグラフである。

20

【図 2】変異形ルシフェラーゼ及び U L T R A G L O ルシフェラーゼ (Promega Corp . , Madison , WI) のデヒドロルシフェリンについて算出された I C 5 0 値を示すグラフである。

【図 3】変異形ルシフェラーゼ及び U L T R A G L O ルシフェラーゼ (Promega Corp . , Madison , WI) の見かけの安定性を示すグラフである。

【図 4】例となる酵素についての R L U 及び I C 5 0 を示すグラフである。

【図 5】完全試薬分解産物の存在下での例となる突然変異体の耐性及び安定性を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

30

定義

本明細書に記載されているものに類似するまたはそれらと同等である方法及び材料を本明細書に記載されている実施形態の実践及び試験で使用することができるが、一部の好まれる方法、組成物、装置及び材料が本明細書に記載されている。しかしながら、現在の材料及び方法が記載される前に、本発明は、本明細書に記載されている特定の分子、組成物、方法またはプロトコールに限定されないことが理解されるべきである。それは、それらが日常の実験及び最適化に従って変化してもよいからである。説明に使用される専門用語は特定のバージョンまたは実施形態のみを記載する目的のためのものであって、本明細書に記載されている実施形態の範囲を限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。

40

【 0 0 2 3 】

定義されない限り、本明細書で使用されている専門用語及び科学用語はすべて本発明が属する当該技術の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。しかしながら、矛盾した場合、定義を含む本明細書が優先される。従って、本明細書に記載されている実施形態の文脈では、以下の定義が適用される。

【 0 0 2 4 】

本明細書及び添付のクレームで使用されるとき、单数形態「 a 」、「 a n 」及び「 t h e 」は文脈が明瞭に指示しない限り、複数の参照を含む。従って、たとえば、「ルシフェラーゼ (a l u c i f e r a s e) 」に対する言及は、1 以上のルシフェラーゼ及び当業者に既知のその同等物に対する言及、等である。

50

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用されるとき、「向上した」という用語は、特定の特性の、参照のそれに比べた改善を指す。たとえば、ルシフェラーゼ変異形の特性（たとえば、発光、シグナル安定性、生体適合性、タンパク質の安定性（たとえば、酵素安定性）またはタンパク質の発現）を記載するのに使用される場合、「向上した」は、そのルシフェラーゼの天然野生型バージョン（たとえば、配列番号1）のような参照ルシフェラーゼと比べてその特性の改善（たとえば、1%、2%、5%、10%、20%、25%、50%、75%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、またはそれ以上、またはそれらの間の範囲）を指す。変異形ルシフェラーゼは、「向上した発光」、「向上したシグナル安定性」、「向上した酵素安定性」、「向上したタンパク質発現」等の1以上を示し得る。

10

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用されるとき、「シグナル持続時間」という用語は、たとえば、時間経過におけるシグナルの減衰の半減期、またはシグナルが一定のままである時間の長さ（たとえば、検出できる減衰の前）によって測定されるようなシグナルの持続性を指す。「シグナル安定性」という用語は、酵素（たとえば、ルシフェラーゼ）の特徴的なシグナル持続時間を指す。

【 0 0 2 7 】

「向上したシグナル安定性」は、シグナル持続時間（たとえば、参照酵素と比べた（たとえば、ルシフェリン及びATPと組み合わせたルシフェラーゼ（たとえば、配列番号1）の野生型バージョンと比べた酵素（たとえば、ルシフェリン及びATPと組み合わせたルシフェラーゼ）からのシグナル強度（たとえば、発光シグナル）の持続）の増大を指す。

20

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用されるとき、「見かけのシグナル安定性」という用語は、特定の設定の条件下（たとえば、阻害剤の存在下）での酵素（たとえば、ルシフェリン及びATPと組み合わせたルシフェラーゼ）からのシグナル（たとえば、発光）の持続を指す。「向上した見かけのシグナル安定性」は、参照条件下でのルシフェリン及びATPと組み合わせた酵素（ルシフェラーゼ）の持続と比べた特定の設定の条件下でルシフェリン及びATPと組み合わせたその同じ酵素からのシグナル（たとえば、発光シグナル）の持続の上昇を指す。たとえば、ルシフェリン及びATPと組み合わせた変異形ルシフェラーゼは、阻害剤の存在下で向上した見かけのシグナル安定性を示し得る（たとえば、ルシフェラーゼからの最初のシグナルを低下させることによって、経時的なシグナルの損失が減少する）。一部の実施形態では、ルシフェリン及びATPと組み合わせた変異形酵素は、ルシフェリン及びATPと組み合わせた参考ルシフェラーゼと比べて（たとえば、ルシフェラーゼの野生型バージョン（配列番号1）と比べて）見かけのシグナル安定性のより大きな向上を示す場合、「見かけのシグナル安定性の向上の増大」を示す。

30

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用されるとき、「保存安定性」という用語は、様々な時点で測定される場合（たとえば、終点測定）の酵素（たとえば、ルシフェリン及びATPと組み合わせたルシフェラーゼ）からのシグナル（たとえば、発光）の一貫性を指す。たとえば、保存されたルシフェラーゼ（たとえば、基質と共に水溶液で保存された）のアリコートの発光がルシフェラーゼの保存に関して様々な時点（たとえば、日、週、等）で測定され（たとえば、ルシフェリン及びATPの存在下で）、経時にさらなる一貫性（たとえば、より低いシグナル損失、減衰前のより長い持続時間、等）を生じる酵素または条件の設定が「向上した保存安定性」を示す。変異形酵素（たとえば、阻害剤耐性変異形）が野生型酵素と比べて向上した保存安定性を示し得、及び／または特定の設定の条件（たとえば、阻害剤の存在下）が参考条件と比べて向上した保存安定性を生じ得る。一部のルシフェラーゼは、ルシフェリンの存在下で保存した場合、ルシフェラーゼに対して阻害性であるルシフェリン分解産物の形成に起因して、限定された保存安定性を示す。一部の実施形態では、阻害剤耐性ルシフェラーゼは増加した保存安定性を示す。一部の実施形態では、ルシフェリン

40

50

基質及び阻害剤（たとえば、デヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、L-ルシフェリン、等）の双方を含む保存条件は、たとえば、早い時点のシグナルを減らして遅い時点のシグナルをさらに密接に反映させることによって向上した保存安定性を生じる。

【0030】

本明細書で使用されるとき、「阻害剤耐性の」及び「阻害剤に対する向上した耐性」という用語は、酵素の参照バージョン（たとえば、酵素の天然野生型バージョン）よりも阻害剤の存在下で大きな活性、または酵素活性を保持する酵素を指す。阻害剤耐性酵素は必ずしも阻害剤に対して100%耐性であるわけではない。たとえば、「阻害剤耐性ルシフェラーゼ」は、ルシフェラーゼの野生型バージョン（配列番号1）と比べた場合、ATP及びルシフェラーゼ阻害剤（たとえば、デヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、L-ルシフェリン、等）の存在下でさらに大きな（たとえば、少ない比率の損失を示す）ルシフェラーゼ活性（たとえば、ルシフェリンのオキシルシフェリンへの変換、RLU出力、等）を保持するポリペプチドである。
10

【0031】

「アミノ酸」という用語は、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸、及びアミノ酸類似体、特に指示されないかぎり、D及びLの立体異性体におけるすべてを指す（それらの構造がそのような立体異性体形態を許す場合）。

【0032】

天然のアミノ酸は、アラニン（AlaまたはA）、アルギニン（ArgまたはR）、アスパラギン（AsnまたはN）、アスパラギン酸（AspまたはD）、システイン（CysまたはC）、グルタミン（GlnまたはQ）、グルタミン酸（GluまたはE）、グリシン（GlyまたはG）、ヒスチジン（HisまたはH）、イソロイシン（IleまたはI）、ロイシン（LeuまたはL）、リシン（LysまたはK）、メチオニン（MetまたはM）、フェニルアラニン（PheまたはF）、プロリン（ProまたはP）、セリン（SerまたはS）、スレオニン（ThrまたはT）、トリプトファン（TrpまたはW）、チロシン（TyrまたはY）及びバリン（ValまたはV）を含む。
20

【0033】

非天然のアミノ酸には、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、ベータアラニン、ナフチルアラニン（「naph」）、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、3級ブチルグリシン（“tBuG”）、2,4-ジアミノイソ酪酸、デスマシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモプロリン（「hPro」または「homop」）、ヒドロキシリシン、アロヒドロキシリシン、3-ヒドロキシプロリン（「3Hyp」）、4-ヒドロキシプロリン（「4Hyp」）、イソデスマシン、アロイソロイシン、N-メチルアラニン（「MeAla」または「Nime」）、N-メチルグリシンを含むN-アルキルグリシン（「NAG」）、N-メチルイソロイシン、N-メチルベンチルグリシンを含むN-アルキルベンチルグリシン（「NAPG」）、N-メチルバリン、ナフチルアラニン、ノルバリン（「Norval」）、ノルロイシン（「Norleu」）、オクチルグリシン（「OctG」）、オルニチン（「Orn」）、ベンチルグリシン（「pG」または「PGly」）、ピペコリン酸、チオプロリン（「Thiop」または「tPro」）、ホモリシン（「hLys」）、及びホモアルギニン（「hArg」）が挙げられるが、これらに限定されない。
30
40

【0034】

「アミノ酸類似体」という用語は、C末端カルボキシ基、N末端アミノ基、及び側鎖の生物活性がある基の1以上が化学的に、可逆的にまたは不可逆的に遮断されている、またはさもなければ生物活性がある別の基に修飾されている天然のまたは非天然のアミノ酸を指す。たとえば、アスパラギン酸-（ベータメチルエステル）はアスパラギン酸のアミノ酸類似体であり、N-エチルグリシンはグリシンのアミノ酸類似体であり、またはアラニ

10

20

30

40

50

ンカルボキサミドはアラニンのアミノ酸類似体である。他のアミノ酸類似体には、メチオニンスルホキシド、メチオニンスルホン、S-(カルボキシメチル)-システイン、S-(カルボキシメチル)-システインスルホキシド及びS-(カルボキシメチル)-システインスルホンが挙げられる。

【0035】

本明細書で使用されるとき、「ペプチド」という用語は、ペプチド結合によって一緒に連結されるアミノ酸のオリゴマーから短いポリマーまでを指す。他のアミノ酸ポリマー(たとえば、タンパク質、ポリペプチド、等)とは対照的に、ペプチドは約50アミノ酸長以下である。ペプチドは、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸、アミノ酸類似体及び/または修飾されたアミノ酸を含み得る。ペプチドは天然に存在するタンパク質または非天然の(人工的な)配列の部分配列であり得る。10

【0036】

本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」という用語は50アミノ酸長を超えるペプチド結合によって一緒に連結されるアミノ酸のポリマーを指す。ポリペプチドは、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸、アミノ酸類似体及び/または修飾されたアミノ酸を含み得、天然に存在する配列、または非天然の(人工的な)配列、または天然に存在するタンパク質もしくは非天然の(人工的な)配列の部分配列であり得る。

【0037】

本明細書で使用されるとき、「人工的な」という用語は、人によって設計され、または調製され、且つ天然には存在しない組成またはシステムを指す。たとえば、人工的な配列は、自然界に存在しないアミノ酸またはヌクレオチドの配列(たとえば、天然に存在するタンパク質またはその断片との100%同一性がないポリペプチド)を指す。20

【0038】

本明細書で使用されるとき、「保存的な」アミノ酸置換は、たとえば、サイズまたは電荷のような類似の化学的特性を有する別のアミノ酸によるペプチドまたはポリペプチドにおけるアミノ酸の置換を指す。本開示の目的では、以下の8つの群のそれぞれが互いに保存的な置換であるアミノ酸を含有する：

- 1) アラニン(A)とグリシン(G)
- 2) アスパラギン酸(D)とグルタミン酸(E)
- 3) アスパラギン(N)とグルタミン(Q)
- 4) アルギニン(R)とリシン(K)
- 5) イソロイシン(I)とロイシン(L)とメチオニン(M)とバリン(V)
- 6) フェニルアラニン(F)とチロシン(Y)とトリプトファン(W)
- 7) セリン(S)とスレオニン(T)、及び
- 8) システイン(C)とメチオニン(M)。

【0039】

天然に存在する残基は、共通する側鎖の特性に基づいて、たとえば、極性正電荷(または塩基性)(ヒスチジン(H)、リシン(K)、及びアルギニン(R))、極性負電荷(または酸性)(アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E))、極性中性(セリン(S)、スレオニン(T)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q))、非極性脂肪族(アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M))、非極性芳香族(フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W))、プロリンとグリシン、ならびにシステインのようなクラスに分けられ得る。本明細書で使用されるとき、「半保存的な」アミノ酸置換は、同一クラス内の別のアミノ酸によるペプチドまたはポリペプチドにおけるアミノ酸の置換を指す。40

【0040】

一部の実施形態では、特定されない限り、保存的なまたは半保存的なアミノ酸置換は、天然の残基に類似する化学特性を有する天然に存在しないアミノ酸残基も包含し得る。これらの天然に存在しない残基は通常、生物系における合成ではなく化学的なペプチド合成によって組み込まれる。これらには、ペプチド模倣体、及びアミノ酸部分の他の反転形態

10

20

30

40

50

または逆形態が挙げられるが、それらに限定されない。本明細書の実施形態は、一部の実施形態では、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸、及び／またはアミノ酸類似体に限定され得る。

【0041】

非保存的な置換には、1つのクラスのメンバーの別のクラスのメンバーとの交換が伴い得る。

【0042】

本明細書で使用されるとき、「配列同一性」という用語は、2つのポリマー配列（たとえば、ペプチド、ポリペプチド、核酸、等）が同一の単量体サブユニットの配列組成を有する程度を指す。「配列類似性」という用語は、2つのポリマー配列（たとえば、ペプチド、ポリペプチド、核酸、等）が保存的な及び／または半保存的なアミノ酸置換によってのみ異なる程度を指す。「配列同一性パーセント」（または「配列類似性パーセント」）は、（1）最適にアラインメントした配列を比較のウインドウ（たとえば、長い方の配列の長さ、短い方の配列の長さ、特定されたウインドウ、等）にわたって比較することと、（2）同一の（類似の）単量体を含有する位置の数を決定して（たとえば、同一のアミノ酸が双方の配列に存在する、類似のアミノ酸が双方の配列に存在する）、一致した位置の数を得ることと、（3）一致した位置の数を比較ウインドウ（たとえば、長い方の配列の長さ、短い方の配列の長さ、特定されたウインドウ、等）における位置の総数で割ることと、（4）結果に100を乗じて配列同一性パーセントまたは配列類似性パーセントを得ることによって算出される。たとえば、ペプチドAとペプチドBが双方とも20アミノ酸の長さであり、1つの位置を除いて同一のアミノ酸を有するならば、ペプチドAとペプチドBは95%の配列同一性を有する。同一でない位置でのアミノ酸が同一の生物物理学的特性（たとえば、双方が酸性である）を共有するならば、ペプチドAとペプチドBは100%の配列類似性を有することになる。別の例として、ペプチドCが20アミノ酸長であり、ペプチドDが15アミノ酸長であり、ペプチドDにおける15アミノ酸のうち14がペプチドCの部分のそれらと同一であるならば、ペプチドCとペプチドDは70%の配列同一性を有するが、ペプチドDはペプチドCの最適な比較のウインドウに対して93.3%の配列同一性を有する。本明細書で「配列同一性パーセント」（または「配列類似性パーセント」）を算出する目的で、アラインメントされた配列におけるギャップはその位置でのミスマッチとして処理される。

【0043】

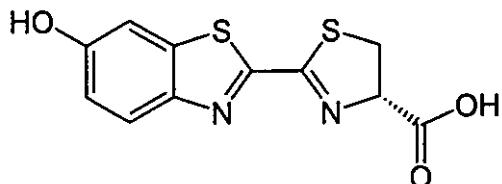
参照配列ID番号との特定の配列同一性パーセントまたは類似性（たとえば、少なくとも70%）を有するとして本明細書に記載されているいずれのポリペプチドも、その参照配列に関し、ある最大数の置換（または末端欠失）を有するとして表現され得る。たとえば、「配列番号Zと少なくともY%の配列同一性を有する」配列は、配列番号Zに関してXまでの置換を有し得、従って、「配列番号Zに関してX以下の置換を有する」として表現され得る。

【0044】

本明細書で使用されるとき、「酵素安定性」という用語は、特定の一連の条件（たとえば、温度、pH、イオン濃度、阻害剤、等）への曝露に続いて活性があるままである酵素の能力を指す。たとえば、対照酵素と比べて向上した安定性を示す酵素は、ある一連の条件への曝露の際、対照酵素よりも少ない活性の喪失を示す。

【0045】

本明細書で使用されるとき、「ルシフェリン」という用語は構造：



10

20

30

40

50

を有する化合物を指す。ルシフェリンは「L - ルシフェリン」または「D - ルシフェリン」、またはL形態及びD形態のルシフェリンのラセミ混合物として存在し得る。特定されない限り（たとえば、「L - ルシフェリン」、「ラセミルシフェリン混合物」等）、「ルシフェリン」という用語はD - 形態を指す。「ルシフェリン類」という用語は、ホタルルシフェラーゼの基質として機能する生物発光化合物（またはそのキラル姉妹）の部類をさらに広く指し、これには、たとえば、アミノルシフェリン、フルオロルシフェリン等のようなルシフェリンの天然、人工的な誘導体が含まれる。

【0046】

本明細書で使用されるとき、「ルシフェリン誘導体」という用語は、構造的にルシフェリンに関連し、類似の環構造を有し、類似の、しかし、必ずしも同一ではない置換基を有する化合物の部類を指す。ルシフェリン誘導体は通常、環構造における二重結合の存在または非存在、及び／または異なる置換基の存在（たとえば、ハロゲン基、オキソ基、アミノ基、OH基、CH₃基、CN, 等）によってルシフェリンとは異なる。一部のルシフェリン誘導体はホタルルシフェラーゼの基質であり、他はホタルルシフェラーゼの阻害剤である。

10

【0047】

本明細書で使用されるとき、「ルシフェリン反応産物」はホタルルシフェラーゼの基質ではないルシフェリン誘導体であり、ルシフェリンからのその生産が光生成反応にてルシフェラーゼ（たとえば、ホタルルシフェラーゼ）によって触媒されるものを指す。ルシフェリン反応産物の例には、オキシリルシフェリン、アミノオキシリルシフェリン、フルオロオキシリルシフェリン、等が挙げられる。

20

【0048】

本明細書で使用されるとき、「ルシフェリン分解産物」という用語はホタルルシフェラーゼの基質ではないルシフェリン誘導体であり、その生産が、通常ルシフェラーゼによって触媒されない、且つ顕著な光生成を生じない反応にてルシフェリンの化学的な分解によって発生する。ルシフェリン分解産物の例には、デヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等が挙げられる。

【0049】

「試料」という用語は最も広い意味で本明細書にて使用される。それは検体、培養物、溶解物、等を含むことが意図される。試料には、調製された溶液または混合物、及び生体試料と環境試料の双方が含まれる。生体試料は、液体または固体の形態を取り得、好適な生物学的起源（たとえば、ヒトを含む動物、微生物、等）から得ることができる。環境試料には、たとえば、表面物質、土壤、植物及び水のような環境物質が含まれる。これらの例は本発明に適用できる試料の種類を限定すると解釈されるべきではない。

30

【0050】

詳細な説明

本明細書で提供されるのは、阻害剤耐性ルシフェラーゼ及びその使用方法である。特に、熱安定性であり、且つ、たとえば、デヒドロルシフェリンのようなルシフェリン分解産物による阻害に改善された耐性を示すルシフェラーゼが提供される。

【0051】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、熱安定性である（たとえば、0を上回る保存温度（たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40またはそれらの間での範囲）で安定性である）ルシフェラーゼである。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、0を上回る温度（たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40またはそれらの間での範囲）で安定性である）ルシフェラーゼである。

40

50

35、36、37、38、39、40またはそれらの間での範囲)で1~3
65日間(たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日
間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日
間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲)保存された場合、20%未満
(たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%
、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、
またはそれらの間の範囲(たとえば、5%以下))の活性の喪失を示す。一部の実施形態
では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び/または配列番号3のルシフェラーゼ
と比べて向上した熱安定性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び/または配列
番号3のルシフェラーゼは、0 を上回る温度(たとえば、1、2、3、4、5
、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16
、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26
、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36
、37、38、39、40またはそれらの間での範囲)での1~365日間
(たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日
間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350
日間、365日間、またはそれらの間の範囲)の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼ
と比べて低下した活性を示す。
10

【0052】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、熱安定性である(たとえば、室温を
上回るインキュベート温度(たとえば、25、26、27、28、29、30
、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40
、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50
、またはそれらの間の範囲)で安定性である)ルシフェラーゼである。一部の実施形態
では、本明細書のルシフェラーゼは、1~100分間(たとえば、1分間、2分間、5分
間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分
間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分間、75分間、80分間、85分
間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの間の範囲)での室温を上回るイン
キュベート温度(たとえば、25、26、27、28、29、30、31
、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41
、42、43、44、45、46、47、48、49、50、または
それらの間の範囲)に続いて20%未満(たとえば、19%、18%、17%、16%、
15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4
%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲(たとえば、5%以下))
の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号
1及び/または配列番号3のルシフェラーゼと比べて向上した熱安定性を示す。一部の実
施形態では、配列番号1及び/または配列番号3のルシフェラーゼは、1~100分間
(たとえば、1分間、2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分
間、35分間、40分間、45分間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分
間、75分間、80分間、85分間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの
間の範囲)での室温を上回るインキュベート温度(たとえば、25、26、27、
28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、
38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、
48、49、50、またはそれらの間の範囲)に続いて本明細書のルシフェラーゼ
と比べて低下した活性を示す。
20

【0053】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン(たとえば、D-ル
シフェリン、ラセミルシフェリン混合物)及び/またはルシフェリン誘導体(たとえば、
フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、等)の存在下で保存された場合、安定である。
一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン及び/またはルシ
40

10

20

30

40

50

フェリン誘導体（たとえば、フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、等）の存在下で1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）保存した場合、20%未満（たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲（たとえば、5%以下））の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼと比べてルシフェリン及び／またはルシフェリン誘導体（たとえば、フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、等）の存在下で向上した安定性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼは、ルシフェリン及び／またはルシフェリン誘導体（たとえば、フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、等）の存在下で1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【0054】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、フルオロデヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、等）の存在下で安定である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、フルオロデヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、等）の存在下で1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）保存された場合、20%未満（たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲（たとえば、5%以下））の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼと比べてルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、フルオロデヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、等）による阻害に対して向上した耐性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、フルオロデヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、等）の存在下での1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【0055】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼはL-ルシフェリン及び／またはラセミルシフェリン混合物の存在下で安定である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、L-ルシフェリン及び／またはラセミルシフェリン混合物の存在下で1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）保存された場合、20%未満（たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲（たとえば、5%以下））の活性の喪失を示す。一部の実施形態で

10

20

30

40

50

は、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼと比べてL-ルシフェリン及び／またはラセミルシフェリン混合物による阻害に対して向上した耐性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼは、L-ルシフェリン及び／またはラセミルシフェリン混合物の存在下での1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【0056】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン（たとえば、D-ルシフェリン、ラセミルシフェリン混合物）及び／またはルシフェリン誘導体（たとえば、フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、ラセミルシフェリン等）の存在下で保存された場合、熱安定性である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン（たとえば、D-ルシフェリン、ラセミルシフェリン混合物）及び／またはルシフェリン誘導体（たとえば、フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、等）の存在下で0を上回って（たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40またはそれらの間での範囲）1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）保存された場合、20%未満（たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲（たとえば、5%以下））の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼと比べてルシフェリン（たとえば、D-ルシフェリン、ラセミルシフェリン混合物）及び／またはルシフェリン誘導体（たとえば、フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、等）の存在下で向上した熱安定性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼは、ルシフェリン（たとえば、D-ルシフェリン、ラセミルシフェリン混合物）及び／またはルシフェリン誘導体（たとえば、フルオロルシフェリン、アミノルシフェリン、等）の存在下で0を上回る（たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40またはそれらの間での範囲）1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【0057】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等）の存在下で熱安定性である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等）の存在下で0を上回って（たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40またはそれらの間での範囲）1～365日間（たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲）の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

10

20

30

40

50

1、32、33、34、35、36、37、38、39、40 またはそれらの間での範囲) 1~365日間(たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲)保存された場合、20%未満(たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲(たとえば、5%以下))の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び/または配列番号3のルシフェラーゼと比べてルシフェリン分解産物(たとえば、デヒドロルシフェリン)及び/またはルシフェリン誘導体の分解産物(たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等)の存在下で向上した熱安定性を示す。
一部の実施形態では、配列番号1及び/または配列番号3のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物(たとえば、デヒドロルシフェリン)及び/またはルシフェリン誘導体の分解産物(たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等)の存在下で0 を上回る(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 またはそれらの間での範囲)1~365日間(たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲)の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【0058】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、L-ルシフェリン及び/またはラセミルシフェリン混合物の存在下で熱安定性である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、L-ルシフェリン及び/またはラセミルシフェリン混合物の存在下で0 を上回って(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 またはそれらの間での範囲)1~365日間(たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲)保存された場合、20%未満(たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲(たとえば、5%以下))の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び/または配列番号3のルシフェラーゼと比べてL-ルシフェリン及び/またはラセミルシフェリン混合物の存在下で向上した熱安定性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び/または配列番号3のルシフェラーゼは、L-ルシフェリン及び/またはラセミルシフェリン混合物の存在下で0 を上回る(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 またはそれらの間での範囲)1~365日間(たとえば、1日間、2日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、350日間、365日間、またはそれらの間の範囲)の保存に続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

10

20

30

40

50

【0059】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼはルシフェリンの存在下でインキュベートされた場合、熱安定性である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリンの存在下で室温を上回って（たとえば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはそれらの間の範囲）1～100分間（たとえば、1分間、2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分間、75分間、80分間、85分間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの間の範囲）インキュベートされた場合、20%未満（たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲（たとえば、5%以下））の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼと比べてルシフェリンの存在下でインキュベートされた場合、向上した熱安定性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼは、ルシフェリンの存在下での室温を上回る（たとえば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはそれらの間の範囲）1～100分間（たとえば、1分間、2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分間、75分間、80分間、85分間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの間の範囲）のインキュベートに続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【0060】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等）の存在下でインキュベートされた場合、熱安定性である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等）の存在下で室温を上回って（たとえば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはそれらの間の範囲）1～100分間（たとえば、1分間、2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分間、75分間、80分間、85分間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの間の範囲）インキュベートされた場合、20%未満（たとえば、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲（たとえば、5%以下））の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等）の存在下でインキュベートされた場合、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼと比べて向上した熱安定性を示す。一部の実施形態では、配列番号1及び／または配列番号3のルシフェラーゼは、ルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン）及び／またはルシフェリン誘導体の分解産物（たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等）の存在下での室温を上回る（たとえば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38

10

20

30

40

50

、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8
 、 4 9 、 5 0 、 またはそれらの間の範囲) 1 ~ 1 0 0 分間(たとえば、1分間、2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分間、75分間、80分間、85分間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの間の範囲)のインキュベートに続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、L - ルシフェリン及び / またはラセミルシフェリン混合物の存在下でインキュベートされた場合、熱安定性である。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、L - ルシフェリン及び / またはラセミルシフェリン混合物の存在下で室温を上回って(たとえば、2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8
 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8
 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8
 、 4 9 、 5 0 、 またはそれらの間の範囲) 1 ~ 1 0 0 分間(たとえば、1分間、2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分間、75分間、80分間、85分間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの間の範囲)インキュベートされた場合、2 0 %未満(たとえば、1 9 %、1 8 %、1 7 %、1 6 %、1 5 %、1 4 %、1 3 %、1 2 %、1 1 %、1 0 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、またはそれ以下、またはそれらの間の範囲(たとえば、5 %以下))の活性の喪失を示す。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、L - ルシフェリン及び / またはラセミルシフェリン混合物の存在下でインキュベートされた場合、配列番号 1 及び / または配列番号 3 のルシフェラーゼと比べて向上した熱安定性を示す。一部の実施形態では、配列番号 1 及び / または配列番号 3 のルシフェラーゼは、L - ルシフェリン及び / またはラセミルシフェリン混合物の存在下での室温を上回る(たとえば、2 5 、 2 6
 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6
 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6
 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 5 0 、 またはそれらの間の範囲) 1 ~ 1 0 0 分間(たとえば、1分間、2分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分間、50分間、55分間、60分間、65分間、70分間、75分間、80分間、85分間、90分間、95分間、100分間、またはそれらの間の範囲)のインキュベートに続いて本明細書のルシフェラーゼと比べて低下した活性を示す。

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているルシフェラーゼは、1 以上の(たとえば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または以上、またはそれらの間の範囲)ルシフェリン分解産物、ルシフェリン反応産物、及び他の非基質(たとえば、ルシフェラーゼ(たとえば、ホタルルシフェラーゼ)の基質ではない)ルシフェリン誘導体、たとえば、デヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、L - ルシフェリン、オキソルシフェリン、フルオロオキソルシフェリン、アミノオキソルシフェリン、等による阻害に耐性である。実験が、ルシフェリン分解産物(たとえば、ルシフェリンの保存及び / またはインキュベートの結果生じる化合物)による阻害に対して改善された耐性を有するルシフェラーゼを操作する(たとえば、進化させる)ための本明細書の実施形態の開発の間に実施された。

【 0 0 6 3 】

一部の実施形態では、熱安定性の及び / または阻害剤耐性の(たとえば、デヒドロルシフェリン耐性の)ルシフェラーゼは、野生型ホタルルシフェラーゼ(配列番号 1)に対して1以上(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上、またはそれらの間の範囲)の置換を含む。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、熱安定性の及び／または阻害剤耐性の（たとえば、デヒドロルシフェリン耐性の）ルシフェラーゼは、配列番号3のルシフェラーゼに対して1以上（たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、または以上、またはそれらの間の範囲）の置換を含む。

【0065】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているルシフェラーゼは、参照ルシフェラーゼ（たとえば、天然野生型ルシフェラーゼ（たとえば、配列番号1）、向上した合成ルシフェラーゼ（配列番号3）等）に比べると、向上したシグナル安定性（たとえば、時間経過におけるシグナルの減衰の半減期によって測定されるような（たとえば、10%の増大、20%の増大、30%の増大、40%の増大、50%の増大、60%の増大、70%の増大、80%の増大、90%の増大、2倍の増大、3倍の増大、4倍の増大、5倍の増大、6倍の増大、7倍の増大、8倍の増大、9倍の増大、10倍の増大、20倍の増大、50倍の増大、100倍の増大、1000倍の増大、それ以上、またはそれらの間の範囲））を示す。

10

【0066】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているルシフェラーゼは、阻害剤の非存在下でのその安定性に比べると、阻害剤の存在下で向上した見かけのシグナル安定性（たとえば、時間経過におけるシグナルの減衰の半減期によって測定されるような（たとえば、10%の増大、20%の増大、30%の増大、40%の増大、50%の増大、60%の増大、70%の増大、80%の増大、90%の増大、2倍の増大、3倍の増大、4倍の増大、5倍の増大、6倍の増大、7倍の増大、8倍の増大、9倍の増大、10倍の増大、20倍の増大、50倍の増大、100倍の増大、1000倍の増大、それ以上、またはそれらの間の範囲））を示す。一部の実施形態では、阻害剤は、デヒドロルシフェリン（たとえば、デヒドロルシフェリン、デヒドロオキソルシフェリン、デヒドロアミノルシフェリン、デヒドロアミノオキソルシフェリン）及びL-ルシフェリンの1以上である。

20

【0067】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているルシフェラーゼは、参照ルシフェラーゼ（たとえば、天然野生型ルシフェラーゼ（たとえば、配列番号1）、向上した合成ルシフェラーゼ（配列番号3）等）の阻害剤の存在下でのシグナル安定性の向上と比べた場合、阻害剤の非存在下でのその安定性と比べると、阻害剤の存在下では、見かけのシグナル安定性の向上の増大（たとえば、時間経過におけるシグナルの減衰の半減期によって測定されるような（たとえば、10%の増大、20%の増大、30%の増大、40%の増大、50%の増大、60%の増大、70%の増大、80%の増大、90%の増大、2倍の増大、3倍の増大、4倍の増大、5倍の増大、6倍の増大、7倍の増大、8倍の増大、9倍の増大、10倍の増大、20倍の増大、50倍の増大、100倍の増大、1000倍の増大、それ以上、またはそれらの間の範囲））を示す。

30

【0068】

一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号3に対して244位のアミノ酸で置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号3に対してH244Rの置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号3に対して300位のアミノ酸で置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号3に対してC300Gの置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号3に対して396位のアミノ酸で置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号3に対してI396Kの置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号4に対して222位のヌクレオチドで置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは配列番号4に対して222位のヌクレオチドでCからTへの置換を含む。

40

【0069】

一部の実施形態では、熱安定性の及び／または阻害剤耐性（たとえば、デヒドロルシフェリン耐性）のルシフェラーゼは、配列番号5との少なくとも70%（たとえば、70%

50

、 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 1 0 0 %、 またはそれらの間の範囲)の配列同一性を含む。一部の実施形態では、熱安定性の及び/または阻害剤耐性(たとえば、デヒドロシフェリン耐性)のルシフェラーゼは、配列番号 5との少なくとも 7 0 % (たとえば、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはそれらの間の範囲)の配列類似性(たとえば、保存的なまたは半保存的な)を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 5に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 5に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の非保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 5に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の半保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 5に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の保存的な置換を含む。

【 0 0 7 0 】

一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して 2 4 0 位のアミノ酸にて置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して I 2 4 0 L の置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して 2 5 4 位のアミノ酸にて置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して Y 2 5 4 S の置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して 3 4 4 位のアミノ酸にて置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して T 3 4 4 A の置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して 3 9 6 位のアミノ酸にて置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 3に対して I 3 9 6 K の置換を含む。

【 0 0 7 1 】

一部の実施形態では、熱安定性の及び/または阻害剤耐性(たとえば、デヒドロシフェリン耐性)のルシフェラーゼは、配列番号 7との少なくとも 7 0 % (たとえば、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはそれらの間の範囲)の配列同一性を含む。一部の実施形態では、熱安定性の及び/または阻害剤耐性(たとえば、デヒドロシフェリン耐性)のルシフェラーゼは、配列番号 7との少なくとも 7 0 % (たとえば、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはそれらの間の範囲)の配列類似性(たとえば、保存的なまたは半保存的な)を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 7に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 7に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の非保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 7に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の半保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号 7に対して 1 0 0 以下(たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲)の保存的な置換を

10

20

30

40

50

含む。

【 0 0 7 2 】

一部の実施形態では、熱安定性の及び／または阻害剤耐性（たとえば、デヒドロルシフェリン耐性）のルシフェラーゼは、配列番号9との少なくとも70%（たとえば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはそれらの間の範囲）の配列同一性を含む。一部の実施形態では、熱安定性の及び／または阻害剤耐性（たとえば、デヒドロルシフェリン耐性）のルシフェラーゼは、配列番号9との少なくとも70%（たとえば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはそれらの間の範囲）の配列類似性（たとえば、保存的なまたは半保存的な）を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号9に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号9に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の非保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号9に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の半保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号9に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の保存的な置換を含む。10

【 0 0 7 3 】

一部の実施形態では、熱安定性の及び／または阻害剤耐性（たとえば、デヒドロルシフェリン耐性）のルシフェラーゼは、配列番号11との少なくとも70%（たとえば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはそれらの間の範囲）の配列同一性を含む。一部の実施形態では、熱安定性の及び／または阻害剤耐性（たとえば、デヒドロルシフェリン耐性）のルシフェラーゼは、配列番号11との少なくとも70%（たとえば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはそれらの間の範囲）の配列類似性（たとえば、保存的なまたは半保存的な）を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号11に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号11に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の非保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号11に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の半保存的な置換を含む。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、配列番号11に対して100以下（たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれらの間の範囲）の保存的な置換を含む。30

【 0 0 7 4 】

一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、たとえば、240位、244位、254位、300位、344位、及び396位から選択されるもののような、配列番号3に対するアミノ酸置換の組み合わせを含む。一部の実施形態では、本明細書のルシフェラーゼは、たとえば、I240L、H244R、Y254S、C300G、T344A、I40

10

20

30

40

50

396Kのような、配列番号3に対するアミノ酸置換、及び／またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異の組み合わせを含む。

【0075】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号3に対する少なくとも70%の配列同一性を有するが、配列番号3の240、244、254、300、344、及び／または396に対応する位置で少なくとも1つの置換を有するルシフェラーゼである。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号3に対する少なくとも70%の配列同一性を有するが、I240L、H244R、Y254S、C300G、T344A、I396Kに対応する少なくとも1つの置換、及び／またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異を有するルシフェラーゼである。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、396位での置換（たとえば、I396K置換）を含む。10

【0076】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されているポリペプチドをコードする核酸（たとえば、DNA、RNA、等）である。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されているポリペプチドをコードする核酸（たとえば、DNA、RNA、等）を含むベクターである。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されているポリペプチドを発現する細胞である。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されているポリペプチドを含む融合タンパク質である。

【0077】

一部の実施形態では、発光を測定し、それによって特定のルシフェラーゼ（またはルシフェラーゼを含む試薬組成物）の活性を決定するために、試薬組成物を試料と合わせた後、対象とする時点でルシフェラーゼ反応によって生成される相対光単位（RLU）値が測定されてもよい。一部の実施形態では、（たとえば、ルシフェラーゼの活性の安定性を判定するために）相対光出力を対照値と比較してもよい。20

【0078】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているルシフェラーゼは、ルシフェリンの分解産物（たとえば、基質としてルシフェリンを利用するATP依存性のルシフェラーゼを阻害する化合物（たとえば、デヒドロルシフェリン）、等）の存在下で向上した安定性及び／または活性を示す。一部の実施形態では、この向上した安定性は、経時的に（たとえば、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、12日間、14日間、16日間、18日間、20日間、25日間、30日間、40日間、50日間、75日間、100日間、150日間、200日間、250日間、300日間、365日間、またはそれ以上）ルシフェリン分解産物の生産を生じる条件下（たとえば、0、10超、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上）で本明細書のルシフェラーゼがルシフェリンと接触できるようにする（たとえば、一緒に保存できるようにする）。したがって、一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、ルシフェリンと本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む安定な試薬組成物である。一部の実施形態では、本明細書に記載されているルシフェラーゼと、ルシフェリンと、1以上のルシフェリン分解産物（たとえば、デヒドロルシフェリン、等）とを含む試薬組成物が提供される。30

【0079】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている（たとえば、ルシフェラーゼとルシフェリンとを含む）試薬組成物は試料におけるATPの検出を含む種々のアッセイで有用である。本明細書に記載されているルシフェラーゼの生物発光はルシフェリン及びATPの存在に依存するので、ATPを含む試料を本明細書の（たとえば、ルシフェラーゼとルシフェリンとを含む）試薬組成物と接触させると検出可能な発光を生じる。一部の実施形態では、本明細書に記載されているルシフェラーゼはルシフェリン分解産物による阻害に耐性なので、そのような試薬組成物は長い時間活性を維持し、試料における経時的なATPの定量に有用である（たとえば、試薬組成物の活性が低下しない（たとえば、他のルシフ40

10

20

30

40

50

エラーゼと比べて活性の喪失が減る)))。

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態では、ルシフェリン(及び潜在的にルシフェリン分解産物)及び本明細書に記載されているルシフェラーゼに加えて、試薬組成物はさらに、保存(たとえば、酵素安定性のための)、取り扱い(たとえば、試薬組成物の分配を円滑にするための)、及び/またはアッセイ性能のための追加の成分を含む。一部の実施形態では、試薬組成物はさらに、塩または金属イオン(たとえば。 Mg^{2+})、界面活性剤、緩衝剤、等を含む。一部の実施形態では、追加の成分は試薬組成物の一部であり、ルシフェラーゼ及びルシフェリンと同じ容器に保存される。一部の実施形態では、試薬組成物(ルシフェラーゼ及びルシフェリンを含む)はキットの一部として提供され、キットは試薬組成物とは別の容器に保存される追加の成分/試薬を含む。

10

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はアミノチオチミジン(ATT)及び本明細書に記載されているルシフェラーゼを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はデヒドロルシフェリン及び本明細書に記載されているルシフェラーゼを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はATTと、デヒドロルシフェリンと、本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はD-ルシフェリンと、ATTと、本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はD-ルシフェリンと、デヒドロルシフェリンと、本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はラセミルシフェリン混合物と本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はラセミルシフェリン混合物と本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はATTとラセミルシフェリン混合物と本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はATTとデヒドロルシフェリンとラセミルシフェリン混合物と本明細書に記載されているルシフェラーゼとを含む。前述の実施形態のいずれかでは、ルシフェリンは他のルシフェリン基質(たとえば、アミノルシフェリン、フルオロルシフェリン、等)によって置き換えられてもよく、及び/またはデヒドロルシフェリンは他のルシフェリン分解産物(たとえば、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、等)によって置き換えられてもよい。

20

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物は、ルシフェラーゼ(たとえば、阻害剤耐性ルシフェラーゼ)と、ルシフェリン(たとえば、D-ルシフェリン)と、ルシフェラーゼの1以上の阻害剤(たとえば、デヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、L-ルシフェリン、等)とを含む。一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物にルシフェラーゼの1以上の阻害剤含めることで、シグナル持続時間、見かけの酵素安定性及び/または保存安定性の1以上の向上を提供する。一部の実施形態では、阻害剤に対するルシフェラーゼの向上した耐性は、(たとえば、阻害剤耐性に起因して)アッセイ及び他の適用にて有用であるのに十分なシグナルを提供しながら、向上したシグナル持続時間、向上した見かけの酵素安定性及び/または向上した保存安定性の1以上を試薬組成物またはキットに提供する。

30

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物は、10:1~1:10の間(たとえば、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、またはそれらの間の範囲)のD-ルシフェリン(及び/またはD-ルシフェリン関連基質(

40

50

たとえば、アミノルシフェリン、フルオロルシフェリン、等)) の阻害剤(たとえば、デヒドロルシフェリン、アミノデヒドロルシフェリン、フルオロデヒドロルシフェリン、L-ルシフェリン、等)に対する比を含む。一部の実施形態では、ルシフェリン:阻害剤の比は、適切な時間スケールにわたって(たとえば、アッセイの経過(たとえば、1分間、5分間、10分間、20分間、40分間、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間以上、またはそれらの間の範囲)にわたって)、保存の経過(たとえば、1日間、2日間、4日間、6日間、8日間、10日間、15日間、20日間、30日間、40日間、60日間、80日間、100日間、150日間、200日間、300日間以上、またはそれらの間の範囲)にわたって阻害剤(たとえば、デヒドロ分解産物)の正味の利得を最少化するように選択される。一部の実施形態では、ルシフェリン:阻害剤の最適な比に影響を及ぼす条件には、ルシフェラーゼの動態及びルシフェリンの出発濃度または保存濃度が含まれる。

【0084】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物は、1以上の好適な緩衝剤を含む。希釈標準溶液用の好適なpHを維持し、且フルシフェラーゼ・ルシフェリン反応に顕著に干渉しない緩衝剤が企図される。好まれるpH範囲は、約pH4.5～約pH9.0の間(たとえば、約pH6.0～約pH8.0(たとえば、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、及びそれらの間の範囲))である。好適な緩衝液には、MES、クエン酸緩衝剤、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)、Tris-N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、ホウ酸塩が挙げられ、当業者に既知の他の緩衝剤が好適であり得る。適当な緩衝剤の選択は、pH緩衝化能及びルシフェラーゼ・ルシフェリン反応との相互作用に依存する。

【0085】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物は1以上の消泡剤を含む。消泡剤は、特に発光を定量する適用にて泡が生物発光の検出に干渉するのを防ぐために望ましい。MAZUのような消泡剤は有機系またはシリコーン系であり得る。消泡剤の選択は、ルシフェラーゼ・ルシフェリン反応に干渉することなく泡を排除するその能力に依存する。

【0086】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はマグネシウムを含む。ルシフェラーゼ・ルシフェリン反応はATPだけでなくマグネシウムイオンにも依存する。一部の実施形態では、ルシフェラーゼ活性を確保するためにマグネシウムが外から供給される。硫酸マグネシウムに加えて、たとえば、塩化マグネシウム、グルコン酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、臭化マグネシウム、炭酸マグネシウム、または試薬組成物もしくは試料にて解離してルシフェラーゼに利用可能で、ルシフェラーゼ・ルシフェリン反応に干渉しないMg²⁺を得るマグネシウム錯体のようなマグネシウムの他の塩が企図される。一部の実施形態では、マグネシウムに加えてまたはマグネシウムの代わりに、たとえば、カルシウム及びマンガンのような他のカチオンが提供される。一部の実施形態では、試料の内在性のマグネシウムがATPの存在下でルシフェラーゼ・ルシフェリンの生物発光を許すのに十分であり、そのような実施形態では、マグネシウムはキットまたは試薬組成物に含まれなくてもよい。

【0087】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物は、任意で他の機能的成分、たとえば、緩衝剤、消泡剤、酵素安定剤等を含有する溶液内で1以上のATPアーゼ阻害剤を含有する成分を含む。この成分は使用液としてまたは濃縮物として供給されてもよい。一部の実施形態では、ATPアーゼ阻害剤は、荷電基を伴った界面活性剤(たとえば、カチオン性界面活性剤(たとえば、DTAB(臭化ドデシルトリメチルアンモニウム)、塩化ベンザルコニウム、CTAB(セチルトリメチルアンモニウム)、BDDABr(臭化ベンジルジメチルドデシルアンモニウム)、等)、アニオン性界面活性剤(たとえば、デオキシコール酸塩またはSDS)または両イオン性界面活性剤(たとえば、スルホベタイン3-1

0)、等)である。そのような阻害剤は、たとえば、ルシフェラーゼがルシフェラーゼ・ルシフェリン反応にてATPを利用することができる前に、ATPアーゼがATPをアデノシン二リン酸(ADP)及びアデノシン一リン酸(AMP)に処理されるのを防止する。ATPアーゼ阻害剤はATPアーゼを直接または間接的に不活性化し得る。それらは、活性部位にてATPアーゼに結合するので基質の結合を防止てもよいし、または変性性界面活性剤によるようにATPアーゼを変性させてもよいし、またはそれらはその基質からATPアーゼを選択的に隔離してもよい。

【0088】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物はATP生成酵素の1以上の阻害剤を含有する成分を含む。一部の試料では、キナーゼのような酵素が活性であり得、ATPの連続生産を可能にする。ATP濃度は特定の時間で決定されるので、そのような酵素の活性はATP濃度の過大評価をもたらし得る。一部の実施形態では、そのようなATP生成活性に打ち消すために、本明細書のキット及び/または試薬組成物はATP生成の阻害剤を含む。有用な化合物の例には、少なくとも1mM、2mM、5mM、10mM、20mM、50mM、100mM、またはそれ以上、またはそれらの間の範囲で有用であるNaFが挙げられる。しかしながら、そのような任意の阻害剤を、それが本明細書の実施形態が有用でなくなるほどルシフェラーゼに有害に影響を与えなければ、使用してもよい。ATP生成酵素の他の阻害剤には、バナジウム酸塩、リン酸パラニトロフェニル、及びジクロロ酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0089】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物は細胞溶解剤及び/またはATP抽出剤を含む。試料が細胞を含み、細胞内ATPが検出/定量に所望される実施形態では、細胞を溶解し、及び/または細胞からATPを遊離させるための試薬が提供されてもよい。一部の実施形態では、細胞内で隔離されたATPを遊離させる、及び/または試料にて細胞を溶解するために、たとえば、非イオン性界面活性剤のような細胞溶解剤が含まれる。他の非イオン性界面活性剤(たとえば、Tritonシリーズの界面活性剤)、カチオン性、アニオン性及び両性イオン性の界面活性剤、胆汁塩、カオトロープ、及び、たとえば、オキシリシンのような細菌毒素を含む細胞膜を破壊する他の作用物質を含む任意の細胞溶解剤が企図される。或いは、細胞からのATPの抽出を可能にする作用物質(たとえば、CTAB)が企図される。細胞からのATPの抽出を可能にする作用物質には、細胞膜を透過化し、細胞内のATPが周囲に培地に滲出するのを可能にする濃度で存在するが、細胞溶解を生じるような濃度では存在しない界面活性剤が挙げられる。

【0090】

一部の実施形態では、キットまたは試薬組成物は1以上の安定剤を含む。一部の実施形態では、安定剤は、ルシフェラーゼを分解から安定化させる化合物であることができる。好適な安定剤には、タンパク質(たとえば、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、等)、界面活性剤(たとえば、THESEITのような非イオン性界面活性剤)、等が挙げられる。

【0091】

一部の実施形態では、他の作用物質が本明細書のキットまたは試薬組成物に含まれてもよい。たとえば、キットまたは試薬組成物は、ルシフェラーゼ反応から生じる発光の持続時間を増大させることが知られている物質、たとえば、補酵素A(CoA)、ジチオールスレイトールのようなチオール試薬、メルカプトエタノール、及びシグナルを延長するためのEDTAのような金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、または塩(たとえば、NaCl、KCl、Na₂SO₄、NaHCO₃、NaH₂PO₄、等)を含んでもよい。

【0092】

一部の実施形態では、試薬組成物及び/またはキットの他の成分は1以上の入れ物または容器に含有される。一部の実施形態では、試薬組成物の成分は单一の入れ物または容器の中に含有される。一部の実施形態では、キットは試薬組成物を含有する複数の入れ物または容器を含んでもよい。一部の実施形態では、キットは、試薬組成物(上記を参照のこと)以外の試薬を含有する1以上の入れ物または容器を含む。一部の実施形態では、キッ

10

20

30

40

50

トに含まれる成分及び試薬は、様々な成分の耐用期間が守られるように任意の種類の入れ物に供給され、入れ物の素材によって吸着されず、または変えられない。入れ物または容器は、好適な材料、たとえば、ガラス、たとえば、ポリカーボネート、ポリスチレン等のような有機ポリマー、セラミック、金属、または通常試薬を保持するのに採用される他の物質を含んでもよく、またはそれらから成ってもよい。好適な入れ物の例には、アンプル、ビン、薬袋、試験管、バイアル、フラスコ、ビン、注射器等が挙げられる。

【 0 0 9 3 】

一部の実施形態では、キット及び／または試薬組成物には適切な使用説明資料が提供される。使用説明書は紙または他の基材に印刷されてもよく、及び／または電子読み取り媒体、たとえば、フロッピーディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、オーディオテープ、等として供給されてもよい。詳細な仕様説明はキットと物理的に伴っていないなくてもよく、代わりに、ユーザーはキットの製造元または販売業者によって特定されたインターネットウェブサイトに向けられてもよく、または電子メールとして供給されてもよい。一部の実施形態では、使用説明書はユーザーに試薬組成物（たとえば、ルシフェラーゼとルシフェリンとを含む）を試料と組み合わせてATPを検出するまたは提供するように指示する。

10

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態では、試薬組成物は液体試薬として提供される。一部の実施形態では、単一の予め混合した液体試薬で安定なルシフェラーゼ及びルシフェリンを提供することによって、凍結乾燥した試薬を再水和することで導入される変動が排除される。他の実施形態では、試薬組成物は凍結乾燥した形態で提供される。一部の実施形態では、本明細書のキットの他の成分は1つまたは複数の液体組成物または乾燥組成物として提供されてもよい。

20

【 0 0 9 5 】

本明細書に記載されているルシフェラーゼ及び（たとえばルシフェラーゼとルシフェリンとを含む）試薬組成物は、特定の方法または適用における使用に限定されることはないが、ルシフェリンの分解産物の存在下でのその安定性及び活性に起因して、本明細書に記載されているルシフェラーゼ及び試薬組成物は試料におけるATPの検出に特に有用である。

【 0 0 9 6 】

30

ルシフェラーゼ・ルシフェリン反応はATP依存性なので、本明細書に記載されているルシフェラーゼ及び試薬組成物はATPを検出する及び／またはATPを定量するアッセイで使用される。ルシフェラーゼ・ルシフェリン反応は 10^{-16} モル以下ほどの少ないATPを含有する試料にてATPを検出することを可能にする。

【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、細胞性ATPを効果的に且つ正確に検出し、定量するのに使用される方法、組成物及びキットである。一部の実施形態では、ルシフェラーゼ及び試薬組成物は衛生状態のモニタリング等のために非細胞性試料（たとえば、水）にて表面でのATPの検出に使用される。

【 0 0 9 8 】

40

一部の実施形態では、方法は、ルシフェラーゼとルシフェリン（と潜在的にデヒドロルシフェリン）を含む単一の試薬組成物を試料（たとえば、ATPを含むまたはATPを含む可能性があると疑われる試料）に加えることと、発光を検出することとを含む。一部の実施形態では、追加の成分及び／または試薬（上記を参照のこと）が試薬組成物と共に含まれ、または別に添加される（たとえば、キナーゼ阻害剤、ATPの蓄積を防止する化合物、細胞溶解剤（たとえば、THESTITのようなポリオキシエチレン）、ATP抽出剤、マグネシウム、緩衝剤、塩、等）。一部の実施形態では、単一試薬においてルシフェラーゼ及びルシフェリンを含めることにより、ATPの検出を加速し、アッセイ及び取り扱いを簡略化し、再現性を高める。

【 0 0 9 9 】

50

全体を通して示されているように、本明細書の方法、組成物及びキットは試料におけるATP（またはルシフェラーゼ基質として機能することができるATP類似体）の定性的または定量的な検出に特に有用である。一部の実施形態では、発光が（たとえば、ルシフェラーゼとルシフェリンとを含む）試薬組成物を用いて試料で生成される単純な定性的実験はATPの存在を示す。一部の実施形態では、試料におけるATPの量が定量されるアッセイが提供される。本明細書のルシフェラーゼ、試薬組成物及び／またはキットを用いて単一の時点で、複数の時点で、またはリアルタイムでATPが検出されてもよいし（たとえば、定性的に）、及び／または定量されてもよい。

【0100】

一部の実施形態では、試料は、ATPまたは好適なATP類似体を含有するまたは含有すると疑われる何でも、たとえば、細胞溶解物、インタクトな細胞、生検、食物、飲料、水、動物、植物または無生物物体のもののような表面を拭った拭い液、等である。試料の他の例には既知のATP濃度の組成物が挙げられる。細胞または細胞溶解物は任意の生物、原核生物または真核生物に由来してもよい。真核細胞は植物、動物、真菌、昆虫等、またはそのような生物の培養された細胞に由来してもよい。これらの例は例としてのみ提供されるのであって、限定することを意図するものではない。

10

【0101】

細胞溶解物は、認識できるインタクトな細胞構造にもはや組織化されない細胞成分を含む。細胞溶解物は可溶性成分及び不溶性成分を有してもよく、そのいずれもが溶解物を使用する前に取り除かれてもよい。溶解物は、超音波処理、ホモゲナイザー、乳鉢及び乳棒、凍結融解サイクル、または細胞の物理的完全性を破壊する他の用具またはプロセスを用いた物理的破壊を含む任意の手段によって；または、たとえば、ルシフェラーゼ活性が維持されるもののような、たとえば、両性イオン及び非イオン性の界面活性剤、もしくはカチオン性界面活性剤DTABもしくはCTABのような界面活性剤による溶解によって調製されてもよい。好ましくは、細胞溶解物は、細胞が回収される時点でATP濃度の完全性が保たれるような方法で作製される。

20

【0102】

一部の実施形態では、試料にてATPを正確に検出するために、細胞性ATPを分解する酵素またはATPを生成する酵素は好ましくは阻害される、または除かれる。ATP生成酵素、たとえば、キナーゼの活性のような生成物または副産物としてATPを有するそれら酵素の阻害剤が、試薬組成物（たとえば、ルシフェラーゼとルシフェリンとを含む）に、または試薬組成物を含むキットに組み込まれてもよい。

30

【0103】

本明細書のルシフェラーゼ、試薬組成物、方法及びキットは、発光の量を定量することによって試料におけるATPの量をユーザーが定量するのを可能にする。一部の実施形態では、対象とする試料を調べるのにルシフェラーゼ及びルシフェリン（単一の組成物で）が適用される。一部の実施形態では、ルシフェラーゼ及びルシフェリン（単一の組成物で）が既知の量のATPを含有する試料（対照）に適用される。試験試料から生成されるシグナルの大きさは試料におけるATPの濃度に相関する。一部の実施形態では、未知のATP濃度の試料に由来する発光シグナルの大きさは、内部対照（既知の量のATPの試料への添加及びその後の発光を測定すること）または既知のATP濃度の幾つかの試料の発光を測定し、それらをグラフにプロットすることによって生成される外部標準曲線のいずれかによって生成されるシグナルに相関される。

40

【実施例】

【0104】

実施例1

Diversify（登録商標）PCR無作為変異誘発キット（Clonetech）と鑄型としての熱安定性ルシフェラーゼに由来するDNAとを用いて無作為突然変異体のライブラリを作り出した。突然変異体コロニーを96穴プレートに摘み取り、次いでLB培地にて約17時間増殖させた。次いで0.02%ラムノースと0.05%グルコースを

50

含有する L B 誘導培地に培養物を希釈した。次いで誘導した培養物を溶解し、2種のアッセイ試薬、すなわちルシフェリン + ATP + 界面活性剤、及びルシフェリン + ATP + 界面活性剤 + デヒドロルシフェリンでアッセイした。各突然変異体に対するRLU値の比(RLU + デヒドロルシフェリン / RLUにデヒドロルシフェリンなし)を算出し、最高の比を有する試料を選択した(図1)。突然変異体のそれぞれに由来するDNAを単離し、プールし、組換え変異誘発を行った。

【0105】

組換え変異誘発に由来するE.coliにおける厳選した突然変異体を二次スクリーニング(上記でリストにしたものと同じ手順)のために増殖させ、次いで各突然変異体を、様々な量のデヒドロルシフェリンを含有する完全な検出試薬(ルシフェリン + 界面活性剤 + ATP)と組み合わせた。次いでGloMax(登録商標)-Multi + ルミノメーター(Promega)を用いて試料を測定した。IC50値は正規化した反応回帰に対比させてGraphPad Prismログ(阻害剤)を用いて算出した(図2)。

10

【0106】

検出試薬(界面活性剤中のルシフェリン)を調製し、次いでアリコートを37℃でインキュベートした。種々の時点でアリコートを37℃から取り出し、4℃で保存した。検出試薬シリーズのそれぞれのアリコートにATPを加え、検出試薬を溶解した突然変異体ルシフェラーゼのそれぞれと組み合わせた。GloMax(登録商標)-Multi + ルミノメーター(Promega)で発光を測定した。GraphPad PrismOne位相減衰回帰を用いて見かけの安定性を算出した(図3)。

20

【0107】

実施例2

本明細書に記載されている突然変異体についてRLU及びIC50を決定するために、0.1%のプリオネックスを含有する検出試薬(1%Thesit、0.1%DTAB、0.08%CTAB、0.2%ジグルコン酸クロロヘキシジン、100mMのMES、pH6.0、5mMのMgCl₂、10mMのEGTA、4mMのクエン酸ナトリウム)にてE6、E7及びU1trAGlo酵素の2つの4mL溶液を調製し、0.25mMのラセミF-LH2またはH-LH2を酵素溶液に加えた。前に調製したラセミルシフェリン混合物を希釈剤として用いて0.5mMで出発してF-デヒドロルシフェリン及びH-デヒドロルシフェリンの3×希釈系列を調製した。次いで、各デヒドロルシフェリンの用量設定系列50uLを100nMのATP50uLと合わせた。試料を1分間インキュベートし、次いでGloMax(登録商標)-Multi + ルミノメーター(Promega)を用いて発光(RLU)を測定し、各酵素についてのIC50(図4)を測定した。

30

【0108】

実施例3

上記の組換え変異誘発で同定された突然変異体E6及びE7、ならびにU1trAGlo酵素を分解産物の存在下でその安定性についてスクリーニングした。ラセミの0.25mMのH-LH2または0.25mMのF-LH2を含有する検出試薬+0.1%プリオネックスを調製した。8本の2mLアリコートを各基質について調製し、試料を37℃でインキュベートした。種々の時点で、アリコートを4℃に移した。

40

【0109】

試料をすべてインキュベートし、移した後、500uLの各試料を96深穴プレートのウェルに3つ組で等分した。0.01mg/mLの各酵素(U1trAGlo、E6またはB7)を次いで各緩衝液アリコートに加えた。次いで各基質・酵素の溶液50uLを0.1mMのATP50uLと合わせた。試料を3分間インキュベートし、次いでGloMax(登録商標)-Multi + ルミノメーター(Promega)を用いて発光を測定した。

【0110】

実施例4

組み合わせ突然変異体によるデヒドロ-F-ルシフェリンによるF-ルシフェリン発光

50

の阻害を検討するために、突然変異体トリプル+300 (H244W, T344A, I396K, C300G) をデヒドロルシフェリンに対するその耐性についてスクリーニングした。

【0111】

精製したUltratraglo酵素及びトリプル+300ルシフェラーゼ酵素を1×TBS + 1.0% プリオネックスにおけるストックから0.01mg/mLの濃度まで連続希釈した。ラセミF-ルシフェリンを、ストックから水中で22mMまで連続希釈した。ラセミデヒドロ-F-ルシフェリンを、ストックから水中で10mMまで連続希釈し、次いで調べる濃度それについて8種の連続4倍系列希釈を行った。ATPをBrightGlo緩衝液で1mMまでまたは検出試薬緩衝液(最終的な反応目標に応じて)で1mMの濃度まで希釈した。

10

【0112】

次いで、以下の成分を平底白色96穴プレートのウェルで合わせた：緩衝液(BrightGloまたは検出試薬、0.5mMの最終濃度)で希釈されたATPの50uL、希釈したルシフェラーゼ酵素(0.05mg/mLの最終濃度)の50uL、希釈したF-ルシフェリン(1mMの最終濃度)の5uL、及び希釈したデヒドロ-F-ルシフェリン(0.006~366.97mMの最終濃度)の4uL。

【0113】

反応物を室温で3分間インキュベートし、GloMax(登録商標)-Multiluminoメーター(Promega)を用いて発光を測定した。ミカエリス・メンテンの競合阻害酵素動態モデルにデータを当て嵌めることによって非線形回帰を用いてGraphPad Prism7にてデータを解析した。

20

表1

	Ki (nM)	
	BrightGlo	検出試薬
Ultratraglo	39.9	419.7
トリプル+300	71.8	562.5

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

30

〔1〕阻害剤耐性ルシフェラーゼであって、配列番号3のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリン及びその誘導体による阻害に対して向上した耐性を備えている、阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔2〕デヒドロルシフェリンに曝された際の活性において、配列番号3のルシフェラーゼより小さな相対低下を示す、前記〔1〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔3〕配列番号3との少なくとも70%の配列同一性を含み、且つ、配列番号3の240_244、254、300、344、及び/または396から選択される位置で配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含む、前記〔1〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔3〕配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含み、前記少なくとも1つの置換がI240L、H244R、Y254S、C300G、T344A、I396K、及び/またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される、前記〔3〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

40

〔4〕配列番号3の396位にて配列番号3に対して置換を含む、前記〔3〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔5〕配列番号3に対してI396Kの置換、またはその保存的なもしくは半保存的な変異を含む、前記〔4〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔6〕配列番号5との少なくとも70%の配列同一性を含み、且つ、配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含み、前記置換が、配列番号3の244、300、及び/または396から選択される位置にある、前記〔3〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔7〕配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含み、前記少なくとも1つの置換が、

50

H 2 4 4 R、C 3 0 0 G、I 3 9 6 K、及び／またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される、前記〔6〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔8〕配列番号7との少なくとも70%の配列同一性を含み、且つ、配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含み、前記置換が、配列番号3の240、254、344、及び／または396から選択される位置にある、前記〔3〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔9〕配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含み、前記少なくとも1つの置換が、I 2 4 0 L、Y 2 5 4 S、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び／またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される、前記〔8〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔10〕阻害剤耐性ルシフェラーゼも配列番号3のルシフェラーゼもデヒドロルシフェリンに曝されていない場合、配列番号3のルシフェラーゼの少なくとも10%の生物発光活性を備える、前記〔1〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔11〕前記〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、ルシフェリン基質とを含む、試薬組成物。

〔12〕ルシフェリンの分解産物を含む混入物をさらに含む、前記〔11〕に記載の試薬組成物。

〔13〕前記混入物が、デヒドロルシフェリンである、前記〔12〕に記載の試薬組成物。

〔14〕マグネシウムをさらに含む、前記〔11〕～〔13〕のいずれか1項に記載の試薬組成物。

〔15〕緩衝剤、消泡剤、ATPアーゼ阻害剤、L-ルシフェリン、アミノチオチミジン、酵素安定剤、界面活性剤、ATP生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、ATP抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される1種以上の追加の成分をさらに含む、前記〔11〕～〔14〕のいずれか1項に記載の試薬組成物。

〔16〕単一の液体試薬である、前記〔11〕～〔15〕のいずれか1項に記載の試薬組成物。

〔17〕前記〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、カチオン性界面活性剤とを含む、試薬組成物。

〔18〕前記カチオン性界面活性剤が、DTAB(臭化ドデシルトリメチルアンモニウム)、CTAB(セチルトリメチルアンモニウム)、塩化ベンザルコニウム、またはBDDABr(臭化ベンジルジメチルドデシルアンモニウム)である、試薬組成物。

〔19〕前記〔11〕～〔16〕または〔17〕～〔18〕のいずれか1項に記載の試薬組成物を含むキット。

〔20〕緩衝剤、消泡剤、ATPアーゼ阻害剤、酵素安定剤、界面活性剤、ATP生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、ATP抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される1種以上の追加の成分をさらに含む、前記〔19〕に記載のキット。

〔21〕ATPの検出アッセイまたはATPの定量アッセイを行うための使用説明書をさらに含む、前記〔19〕または〔20〕に記載のキット。

〔22〕試料にてATPを検出または定量するためのアッセイシステムであって、(a)前記〔11〕～〔16〕または〔17〕～〔18〕のいずれか1項に記載の試薬組成物と

(b) ATPを含むまたはATPを含むことが疑われる試料とを含む、アッセイシステム。

〔23〕発光の検出及び／または測定のための装置をさらに含む、前記〔22〕に記載のアッセイシステム。

〔24〕前記試料が、細胞溶解物である、前記〔22〕に記載のアッセイシステム。

〔25〕試料にてATPを検出する方法であって、(a)前記〔11〕～〔16〕または〔17〕～〔18〕のいずれか1項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、

10

20

30

40

50

(b) 発光を検出する工程とを含む、方法。

[26] 前記試料が、細胞を含み、前記方法が、細胞を溶解して細胞溶解物を生成する工程をさらに含む、前記[25]に記載の方法。

[27] 試料にてATPの量または濃度を定量する方法であって、

(a) 前記[11]～[16]または[17]～[18]のいずれか1項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、

(b) 前記試料からの発光を定量する工程と、

(c) 前記発光を対照値と比較して前記試料における前記ATPの量または濃度を決定する工程とを含む、方法。

[28] 前記対照値が、既知の濃度のATPを含む対照試料によって生成される発光の別の定量から決定される、前記[27]に記載の方法。

[29] 前記試料に既知の濃度のATPを添加する工程をさらに含む、前記[27]に記載の方法。

[30] 発光が複数の時点で定量される、前記[27]に記載の方法。

[31] 発光がリアルタイムで定量される、前記[27]に記載の方法。

[32] 試料におけるATPの検出及び/または定量のための、前記[11]～[16]または[17]～[18]のいずれか1項に記載の試薬組成物の使用。

[33] アッセイにて前記[1]～[10]のいずれか1項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼの見かけのシグナル安定性を向上させる方法であって、存在する前記ルシフェラーゼの1種以上の阻害剤と共に前記アッセイを行う工程を含む、方法。

[34] 前記阻害剤が、デヒドロルシフェリン、オキシリシフェリン、及びL-ルシフェリンの1種以上から選択される、前記[33]に記載の方法。

[35] 前記阻害剤耐性ルシフェラーゼが、天然野生型バージョンのルシフェラーゼと比べて見かけのシグナル安定性の向上における増大を示す、前記[33]に記載の方法。

【0114】

配列

配列番号1 - 野生型ホタルルシフェラーゼ(タンパク質)

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVNITYAEYFEMS
VRLAEAMKRYGLNTNHRIIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNSMNI
SQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPIIQKIIIMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDF
VPESFDRDKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPF
HHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKY
DLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYLTETTSAILITPEGDDKPGAVGKV
VPFFEAJVVDLDTGKTLGVNQRGEGLCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIA
YWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDAGELPAAV
VVLEHGKTMTKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVFDVPKGTLGKLDARKIREILIKAKK
GGKSKL

【0115】

配列番号2 - 野生型ホタルルシフェラーゼ(ヌクレオチド)

CTGCAGAAATAACTAGGTACTAAGCCCCGTTGTGAAAAGTGGCAAACCCATAAATTG
GCAATTACAATAAAGAACGCTAAAATTGTGGTCAAACTCACAAACATTATTATATAC
ATTTAGTAGCTGATGCTTATAAAAGCAATATTTAAATCGTAACACAACAAATAAAATAA
AATTAAACGATGTGATTAAGAGCCAAAGGTCTCTAGAAAAAGGTATTTAAGCAACGG
AATTCTTGTGTTACATTCTGAATGTCGCTCGCAGTGACATTAGCATTCCGGTACTG
TTGGTAAAATGGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAGGCCGGCGCATTCTATCCTCTA
GAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATAAGCCCTGGTTCC
TGGAAACAATTGCTTTGTGAGTATTCTGCTGATTTCTGGAGTTAACGAAATGTTCT
TATGTTCTTAGACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAATACTTCG
AAATGTCCGTTGGTGGCAGAACGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGA
ATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTATGCCGGTGTGGCGCGTTATT

10

20

30

40

50

TATCGGAGTTGCAGTTGCAGCCCCGCGAACGACATTATAATGAACGTAAGCACCCCTGCC
 ATCAGACCAAAGGAAATGACGTATTTAATTTAAGGTGAATTGCTCAACAGTATGAAC
 ATTCGCAGCCTACCGTAGTGTTCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTAACGT
 GCAAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATTATCATGGATTCTAACACGGATTACC
 AGGGATTTCAGTCGATGTACACGTTCGTCACATCTCATCTACCTCCGGTTAACGAA
 TACGATTTGTACCAAGAGTCCTTGATCGTACAAAACAATTGCACTGATAATGAATT
 CTCTGGATCTACTGGGTTACCTAACGGGTGCGCCCTCCGCATAGAACTGCCTGCGTCA
 GATTCTCGCATGCCAGGTATGTCGTATAACAAGAGATTAAGTAATGTTGCTACACACAT
 TGTAGAGATCCTATTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTAAAGTGTGTTG
 TCCATTCCATCACGGTTTGGAAATGTTACTACACTCGGATATTGATATGTGGATTTC
 GAGTCGCTTAATGTATAGATTGAAGAAGAGCTGTTTACGATCCCTCAGGATTAC
 AAAATTCAAAGTCGTTGCTAGTACCAACCCATTTCATTCTCGCCAAAAGCACTCT
 GATTGACAAATACGATTTATCTAATTACACGAAATTGCTCTGGGGCGCACCTCTT
 CGAAAGAAGTCGGGAAGCGGTTGCAAAACGGTAGTTAACGCATTGCTAGTATTCA
 AGGCTCTAAACGGCGTAGCTTCATCTCAGGGATACGACAAGGATATGGCTCA
 CTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGTC
 GGTAAAGTTGTTCCATTTTGAAAGCGAAGGTTGTTGATCTGGATACCGGGAAACGCT
 GGGCGTTAACAGAGAGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCGGTTATG
 TAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCATTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGA
 GACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTCATAGTTGACCGCTTGAAGTCTT
 AATTAAATACAAAGGATATCAGGTAATGAAGATTTCATGACACACGCTACAATAC
 CTGTAGGTGGCCCCGCTGAATTGGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTCGA
 CGCGGGCGTGGCAGGTCTCCGACGATGACGCCGTGAACCTCCGCCGCGTTGTTG
 TTTGGAGCACGAAAGACGATGACGGAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTAAA
 TGAATTGTTTACGTTACTCGTACTACAATTCTTCTAGGTCAAGTAACAACCGCG
 AAAAAGTTGCGCGAGGAGTTGTTGTCAGGAAAGTACCGAAAGGTCTACCGGAA
 ACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCA
 ATTGTAAAATGTAACTGTATTCAAGCGATGACGAAATTCTAGCTATTGTAATATTATA
 TGCAAATTGATGAATGGAATTTGTAATTGTCAGTACTATTAAACGAATAA
 TAAAATCAGGTATAGGTAACAAAAA

【0116】

配列番号3 - U L T R A G L O ルシフェラーゼ(タンパク質)

MADKNILYGPFPYPLEDTAGEQMF DALSR YAAIPG CIALTNAH TKENVLYEEFLKLSC
 RLAESFKKYGLKQNDTIAVCSENSLQFFLPVIASLYLGIVAPVNDKYIERELIHS LGIVKPR
 IVFCSKNTFQKV LNVKS KLKSIETII LDNEDLGGYQCLNNFISQNSDSNLDVKKFKPYSF
 NRDDQVASIMFSSGTTGLPKGVMLTHKNIVARFSIAKDPTFGNAINPTSAILTVIPFHGF
 GMMTTLGYFTCGFRVVL MHTFEKLFLQLSQD YKVESTLLVPTLMAFLAKS ALCEKYDL
 SHLKEIASGGAPLSKEIGEMVKKRFKLN FVRQGYGLTETTSAVLITPKGDAKPGSTGKIVP
 LH AVKVVDPTTGKILGPNEPGELYFKGPMIMKGYYNNEEATKAIIDNDGWL RSGDIAYYD
 NDGHFYIVDRLKSLIKYKGYQVAPAEIEGILLQHPYIVDAGVTGIPDEAAGELPAAGVVVQ
 TGKYLNEQIVQDYVASQVSTAKWLRGGVKFLDEIPKGSTGKIDRKVLRQM LEKHTNGHH
 HHHHHH*

【0117】

配列番号4 - U L T R A G L O ルシフェラーゼ(核酸)

ATGGCTGACAAAACATCCTGTATGGTCCGGAACCGTTCTACCCACTGGAAAGATGGTAC
 CGCTGGTGAACAGATGTTGACGCATTATCTCGTTATGCAGCTATTCCGGGCTGCATAG
 CATTGACAAATGCTCATACAAAAGAAAATGTTTATATGAAGAGTTCTGAAACTGTCG
 TGTCGTTAGCGGAAAGTTTAAAAGTATGGATTAAAACAAAACGACACAATAGCGGT
 GTGTAGCGAAATAGTCTGCAATTTCCTCTGTAATTGCATCATTGTATCTTGGAA
 TAATTGTGGCACCTGTTAACGATAATACATTGAACGTGAATTAAACACAGTCTTGGT

10

20

30

40

50

ATTGTAAAACCACGCATAGTTTTGCTCCAAGAATACTTTCAAAAAGTACTGAATGT
 AAAATCTAAATTAAATCTATTGAAACTATTATTATTAATTAGACTAAATGAAGACTTAG
 GAGGTTATCAATGCCTAACAACTTATTCTAAAATTCCGATAGTAATCTGGACGTA
 AAAAAATTAAACCCTATTCTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCGTCGATTATGTTTC
 TTCTGGTACAACGGTCTGCCGAAGGGAGTCATGCTAACTCACAAGAATATTGTTGCAC
 GATTTCTATTGCAAAAGATCCTACTTTGGTAACGCAATTAAATCCCACGTCAGCAATT
 TTAACGGTAATACCTTCCACCATGGTTGGTATGATGACCACATTAGGATACTTAC
 TTGTGGATTCCGAGTTGTTCTAATGCACACGTTGAAGAAAAACTATTCTACAATCAT
 TACAAGATTATAAAGTGGAAAGTACTTACTTGTACCAACATTAAATGGCATTCTGCA
 AAAAGTGCATTAGTTGAAAAGTACGATTTATCGCACTTAAAGAAATTGCATCTGGTGG
 CGCACCTTATCAAAGAAATTGGGAGATGGTAAAAACGGTTAAATTAAACTTTG
 TCAGGCAAGGGTATGGATTAACAGAAACCACCTCGGCTGTTTAATTACACCGAAAGGT
 GACGCCAAACCGGGATCAACTGGTAAAATAGTACCATACACGCTGTTAAAGTTGTCGA
 TCCTACAACAGGAAAAATTGGGCCAAATGAACCTGGAGAATTGTATTAAAGGCC
 CGATGATAATGAAGGGTATTATAATAATGAAGAAGCTACTAAAGCAATTATTGATAAT
 GACGGATGGTTCGCTCTGGTATATTGCTTATTATGACAATGATGCCATTATAT
 TGTGGACAGGCTGAAGTCACTGATTAATATAAGGTTATCAGGTTGCACCTGCTGAA
 TTGAGGGAAACTCTTACAACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCGTTACTGGTATACCG
 GATGAAGCCCGGGCGAGCTCCAGCTGCAGGTGTTGAGTACAGACTGGAAAATATCT
 AAACGAACAAATCGTACAAGATTATGTTGCCAGTCAGTTCAACAGCCAATGGCTAC
 GTGGTGGGGTGAAATTGGATGAAATTCCAAAGGATCAACTGGAAAATTGACAGA
 AAAGTGTAAAGACAAATGTTAGAAAAACACACCAATGGCATCACCACCATCA
 TCACTAA

【0118】

配列番号5 - E6 ルシフェラーゼ突然変異体（タンパク質）

MADKNILYGPEPFYPLEDTAGEQMFDALSRYAAIPGCIALTNAHTKENVLYEFLKLSC
 RLAESFKKYGLKQNDTIAVCSENSLQFFLPVIASLYLGIVAPVNDKYIERELIHSGLIVKPR
 IVFCSKNTFQKVNVSKLKSIEIIIDLNEDLGGYQCLNNFISQNSDSNLDVKKFKPYSF
 NRDDQVASIMFSSGTTGLPKGVMLTHKNIVARFSIAKDPTFGNAINPTSAILTVIPFHGF
 GMMTTLGYFTCGFRVVLMHTFEKLFLQLSQDYLKVESTLLVPTLMAFLAKSALGEKYDL
 SHLKEIASGGAPLSKEIGEMVKRFLNKVRQGYGLTEETTSAVLITPKGDAKPGSTGKIVP
 LHAVKVVDPTTGKILGPNEPGELYFKGPMKMKGYNNNEATKAIIDNDGWLRSVDIAYY
 DNDGHFYIVDRLKSLIKYKGYQVAPAEIEGILLQHPYIVDAGVTGIPDEAAGELPAAGVVV
 QTGKYLNEQIVQDYVASQVSTAKWLRGGVKFLDEIPKGSTGKIDRKVLRQMLEKHTNGH
 HHHHHHH*

【0119】

配列番号6 - E6 ルシフェラーゼ突然変異体（核酸）

ATGGCTGACAAAACATCCTGTATGGTCCGGAACCGTTCTACCCACTGGAAAGATGGTAC
 CGCTGGTGAACAGATGTTGACGCATTATCTCGTTATGCAGCTATTCCGGCTGCATAG
 CATTGACAAATGCTCATACAAAGAAAATGTTTATATGAAGAGTTCTGAAACTGTCG
 TGTCGTTAGCGGAAAGTTTAAAAAGTATGGATAAAACAAATGACACAATAGCGGT
 GTGTAGCGAAAATAGTCTGCAATTTCCTCCTGTAATTGCATCATTGTATCTGGAA
 TAATTGTGGCACCTGTTAACGATAAACATTGAACGTGAATTAAACACAGTCTTGGT
 ATTGTAAAACCACGCATAGTTTTGCTCCAAGAATACTTTCAAAAAGTACTGAATGT
 AAAATCTAAATTAAATCTATTGAAACTATTATTATTAATTAGACTAAATGAAGACTTAG
 GAGGTTATCAATGCCTAACAACTTATTCTAAAATTCCGATAGTAATCTGGACGTA
 AAAAAATTAAACCCTATTCTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCGTCGATTATGTTTC
 TTCTGGTACAACGGTCTGCCGAAGGGAGTCATGCTAACTCACAAGAATATTGTTGCAC
 GATTTCTATTGCAAAAGATCCTACTTTGGTAACGCAATTAAATCCCACGTCAGCAATT
 TTAACGGTAATACCTTCCACCGTGGTTGGTATGATGACCACATTAGGATACTTAC

10

20

30

40

50

TTGTGGATTCCGAGTTCTAATGCACACGTTGAAGAAAAACTATTCATAATCAT
TACAAGATTATAAAAGTGGAAAGTACTTACTTGTACCAACATTAATGGCATTCTTGCA
AAAAGTGCATTAGGTGAAAAGTACGATTATCGCACTTAAAGAAATTGCATCTGGTGG
CGCACCTTATCAAAGAAATTGGGGAGATGGTAAAAACGGTTAAATTAAACTTTG
TCAGGCAAGGGTATGGATTAACAGAAACCACCTCGGCTGTTTAATTACACCGAAAGGT
GACGCCAACCGGGATCAACTGGTAAATAGTACCATACACGCTGTTAAAGTTGTCGA
TCCTACAACAGGAAAATTGGGCCAATGAACCTGGAGAATTGTATTTAAAGGCC
CGATGAAAATGAAGGGTATTATAATAATGAAGAAGCTACTAAAGCAATTATTGATAAT
GACGGATGGTTGCGCTCTGGTGTATTGCTTATTATGACAATGATGGCCATTTTATAT
TGTGGACAGGCTGAAGTCACTGATTAATATAAGGTTATCAGGTTGCACCTGCTGAAA 10
TTGAGGGAATACTCTTACAACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCTTACTGGTATACCG
GATGAAGCCGCGGGCGAGCTTCCAGCTGCAGGTGTTGAGTACAGACTGGAAAATATCT
AAACGAACAAATCGTACAAGATTATGTTGCCAGTCAGTTCAACAGCCAATGGCTAC
GTGGTGGGGTGAAATTGGATGAAATTCCAAAGGATCAACTGGAAAATTGACAGA
AAAGTGTAAAGACAAATGTTAGAAAACACACCAATGGCATCACCACCATC
TCACAT
【 0 1 2 0 】

配列番号 7 - B 7 ルシフェラーゼ突然変異体（タンパク質）

MADKNILYGPEPFYPLEDTAGEQMFDALSRYAAIPGCIALTNAHTKENVLYEFLKLSC
RLAESFKKYGLKQNDTIAVCSENSLQFFLPVIASLYLGIVAPVNDKYIERELIHSGLIVKPR 20
IVFCSKNTFQKVNVSKLSIETIIILDLNEDLGGYQCLNNFISQNSDSNLDVKFKPYSF
NRDDQVASIMFSSGTTGLPKGVMLTHKNIVARFSIAKDPTFGNAINPTSAILTVLPFHGF
GMMTTLGSFTCGFRVVLHMHTFEELFLQLSQDVKVESTLLVPTLMAFLAKSALVEKYDL
SHLKEIASGGAPLSKEIGEMVKRFLNVRQGYGLTEATSAVLITPKGDAKPGSTGKIVP
LHAVKVVDPTTGKILGPNEPGELYFKGPMKMKGYNNNEATKAIIDNDGWLRSVDIAYY
DNDGHFYIVDRLKSLIKYKGYQVAPAEIEGILLQHPIYIVDAGVTGIPDEAAGELPAAGVVV
QTGKYLNEQIVQDYVASQVSTAKWLRGGVKFLDEIPKGSTGKIDRKVLRQMLEKHTNGH
HHHHHHH*

【 0 1 2 1 】

配列番号 8 - B 7 ルシフェラーゼ突然変異体（核酸）

ATGGCTGACAAAAACATCCTGTATGGTCCGGAACCGTTCTACCCACTGGAAAGATGGTAC
CGCTGGTGAACAGATGTTGACGCATTATCTGTTATGCAGCTATTCCGGCTGCATAG
CATTGACAAATGCTCATACAAAGAAAATGTTTATATGAAGAGTTCTGAAACTGTCG
TGTCGTTAGCGAAAGTTTAAAAAGTATGGATAAAACAAACGACACAATAGCGGT
GTGTAGCGAAAATAGTCTGCAATTTCCTCCTGTAATTGCATCATTGTATCTGGAA
TAATTGTGGCACCTGTTAACGATAAAATACATTGAACGTGAATTAAACACAGTCTTGGT
ATTGTAACACCACGCATAGTTTGCTCAAGAATACTTTCAAAAGTACTGAATGT
AAAATCTAAATTAAATCTATTGAAACTATTATTATTAAGACTTAAATGAAGACTTAG
GAGGTTATCAATGCCTCAACAACTTATTCTCAAAATTCCGATAGTAATCTGGACGTA
AAAAAATTAAACCTATTCTTAAATCGAGACGATCAGGTTGCGTCGATTATGTTTC 40
TTCTGGTACAACCTGGTCTGCCGAAGGGAGTCATGCTAACTCACAAGAATATTGTTGCAC
GATTTCTATTGCAAAAGATCCTACTTTGGTAACGCAATTAAATCCCACGTCAGCAATT
TTAACGGTATTACCTTCCACCATGGTTGGTATGATGACCAACATTAGGATCCTTACT
TGTGGATTCCGAGTTCTAATGCACACGTTGAAGAAAAACTATTCTACAATCATT
ACAAGATTATAAGTGGAAAGTACTTACTTGTACCAACATTAATGGCATTCTTGCAAA
AAAGTGCATTAGTTGAAAGTACGATTATCGCACTTAAAGAAATTGCATCTGGTGGC
GCACCTTATCAAAGAAATTGGGGAGATGGTAAAAACGGTTAAATTAAACTTTGT
CAGGCAAGGGTATGGATTAACAGAAGCCACTTCGGCTGTTTAATTACACCGAAAGGTG
ACGCCAACCGGGATCAACTGGTAAATAGTACCATACACGCTGTTAAAGTTGTCGAT
CCTACACAGGAAAATTGGGCCAATGAACCTGGAGAATTGTATTTAAAGGCC 50

GATGAAAATGAAGGGTTATTATAATAATGAAGAAGCTACTAAAGCAATTATTGATAATG
 ACGGATGGTTCGCTCTGGTGATATTGCTTATTATGACAATGATGCCATTATATT
 GTGGACAGGCTGAAGTCACTGATTAATATAAAGGTTATCAGGTTGCACCTGCTGAAAT
 TGAGGAATACTCTTACACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCGTTACTGGTATACCGG
 ATGAAGCCGCGGGCGAGCTTCCAGCTGCAGGTGTTGAGTACAGACTGGAAAATATCTA
 AACGAACAAATCGTACAAGATTATGTTGCCAGTCAAGTTCAACAGCAAATGGCTACG
 TGGTGGGTTGAAATTTGGATGAAATTCCAAGGATCAACTGGAAAATGACAGAA
 AAGTGTAAAGACAAATGTTAGAAAAACACACCAATGGCATCACCATCACACCACAT
 CACTAA

【0122】

10

配列番号：9-U1traG1oトリプル突然変異体（H244W+T344A+I39
 6K）（アミノ酸）

MADKNILYGPEPFYPLEDGTAGEQMFDALSRYAAIPGCIALTNAHTKENVLYEFLKLSC
 RLAESFKKYGLKQNDTIAVCSENSLQFFLPVIASLYLGIIAPVNDKYIERELIHSGLIVKPR
 IVFCSKNTFQKVNVKSCLKSIEIIIDLNEDLGGYQCLNNFISQNSDSNLDVKKFKPYSF
 NRDDQVASIMFSSGTTGLPKGVMLTHKNIVARFSIAKDPTFGNAINPTSAILTVIPFWGF
 GMMTTLGYFTCGFRVVLMTFEKLFLQLSQDYKVESTLLVPTLMAFLAKSALVEKYDL
 SHLKEIASGGAPLSKEIGEMVKKRFKLNFRVQGYGLTEATSABLTPKGDAKPGSTGKIVP
 LHAVKVVDPTTGKILGPNEPGELYFKGPMKMKGYNNNEATKAIIDNDGWLRSQDIAYY
 DNDGHFYIVDRLKSLIKYKGYQVAPAEIEGILLQHPYIVDAGVTGIPDEAAGELPAAGVVV
 QTGKYLNEQIVQDYVASQVSTAKWLRGGVKFLDEIPKGSTGKIDRKVLRQMLEKHTNGH
 HHHHHHH

【0123】

20

配列番号10-U1traG1oトリプル突然変異体（H244W+T344A+I39
 6K）（核酸）

ATGGCTGACAAAACATCCTGTATGGTCGGAACCGTTCTACCCACTGGAAAGATGGTAC
 CGCTGGTGAACAGATGTTGACGCATTATCTCGTTATGCAGCTATTCCGGCTGCATAG
 CATTGACAAATGCTCATACAAAGAAAATGTTTATATGAAGAGTTCTGAAACTGTCG
 TGTCGTTAGCGAAAGTTTAAAAAGTATGGATTAACAAACGACACAATAGCGGT
 GTGTAGCGAAAATAGTCTGCAATTTCCTCCTGTAATTGCATCATTGTATCTTGGAA
 TAATTGTGGCACCTGTTAACGATAAAATACATTGAACGTGAATTAATACACAGTCTTGGT
 ATTGTAAAACCACGCATAGTTTGCTCCAAGAATACTTTCAAAAGTACTGAATGT
 AAAATCTAAATTAAATCTATTGAAACTATTATTATATTAGACTTAAATGAAGACTTAG
 GAGGTTATCAATGCCTCAACAACTTATTCTCAAAATTCCGATAGTAATCTGGACGTA
 AAAAATTTAAACCCATTCTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCCTGATTATGTTTC
 TTCTGGTACAACGGTCTGCCGAAGGGAGTCATGCTAACTCACAAGAATATTGTTGCAC
 GATTTCTATTGCAAAAGATCCTACTTTGGTAACGCAATTAAATCCCACGTCAATT
 TTAACGGTAATACCTTCACTGGGTTTGGTATGATGACCACTAGGATACTTAC
 TTGTGGATTCCGAGTTGTTCTAACGACACGTTGAAGAAAAACTATTCTACAATCAT
 TACAAGATTATAAAGTGGAAAGTACTTACTTGTACCAACATTAAATGGCATTTCTGCA
 AAAAGTGCATTAGTTGAAAAGTACGATTTCGCACTTAAAGAAATTGCATCTGGTGG
 CGCACCTTATCAAAGAAATTGGGAGATGGTAAAAACGGTTAAATTAAACTTTG
 TCAGGCAAGGGTATGGATTAACAGAAGCCACTTGGCTGTTTAATTACACCGAAAGGT
 GACGCCAAACCGGGATCAACTGGAAAATAGTACCACTACACGCTGTTAAAGTTGTCGA
 TCCTACAACAGGAAAAATTGGGCCAAATGAACCTGGAGAATTGTATTAAAGGCC
 CGATGAAAATGAAGGGTATTATAATAATGAAGAAGCTACTAAAGCAATTATTGATAAT
 GACGGATGGTTGCCTGGTGATATTGCTTATTATGACAATGATGCCATTAT
 TGTGGACAGGCTGAAGTCACTGATTAATATAAAGGTTATCAGGTTGCACCTGCTGAAA
 TTGAGGGAATACTCTTACACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCGTTACTGGTATACCG
 GATGAAGCCGCGGGCGAGCTTCCAGCTGCAGGTGTTGAGTACAGACTGGAAAATATCT

30

40

50

AAACGAACAAATCGTACAAGATTATGTTGCCAGTCAGTTCAACAGCCAAATGGCTAC
GTGGTGGGGTGAAATTTGGATGAAATTCCAAAGGATCAACTGGAAAAATTGACAGA
AAAGTGTAAAGACAAATGTTAGAAAACACACCAATGGCATCACCACCATCA
TCACTAA

【0124】

配列番号11-U1traG1oトリプル+300(H244W+T344A+I396
K+C300G)(アミノ酸)

MADKNILYGPEPFYPLEDTAGEQMF DALS RYAAIPGCIALTNAHTKENVLYEEFLKLSC
RLAESFKKYGLKQNDTIAVCSENSLQFFLPVIASLYLGIVAPVNDKYIERELIHS LGIVKPR
IVFC SKNTFQKV LNVKS KLKS IETII LDLN EDLGGYQCLNNF ISQNSD SDNLDVKKF KPYSF
NRDDQVASIMFSSGTTGLPKGVMLTHKNIVARFSIAKDPTFGNAINPTSAILTVIPFHWF
GMM TTLGYFTCGFRVVL MHTFEKLFLQSLQDYKVESTLLVPTLMAFLAKS ALGEKYDL
SHLKEIASGGAPLSKEIGEMVKKRFKLN FVRQGYGLTEATS AVLITPKGD AKPGSTG KIVP
LHAVKVVDPTTGKILGPNEPGELYFKGPMKMKGYYNNEEATKAIIDNDGWLRSGDIAYY
DNDGHFYIVDRLKSLIKYKGYQVAPAEIEGILLQHPYIVDAGVTGIPDEAAGELPAAGVVV
QTGKYLNEQIVQDYVASQVSTA KWLRGGVKFLDEIPKGSTG KIDRKV LRQM LEKHTNGH
HHHHHHH

10

【0125】

配列番号12-U1traG1oトリプル+300(H244W+T344A+I396
K+C300G)(核酸)

ATGGCTGACAAAACAT CCTGTATGGTCCGGAACCGTTCTACCCACTGGAAAGATGGTAC
CGCTGGTGAACAGATGTTGACGCATTATCTGTTATGCAGCTATTCCGGCTGCATAG
CATTGACAAATGCTCATACAAAAGAAAATGTTTATATGAAGAGTTCTGAA ACTGTCG
TGTCGTTAGCGAAAGTTAAAAAGTATGGATTAAAACAAAAGACACAATAGCGGT
GTGTAGCGAAAATAGTCTGCAATTTCCTCCTGTAATTGCATCATTGTATCTTGGAA
TAATTGTGGCACCTGTTAACGATAAAATACATTGAACGTGAATTAAATACACAGTCTTGGT
ATTGTAAAACCACGCATAGTTTTGCTCCAAGAATAC TTTCAAAAAGTACTGAATGT
AAAATCTAAATTAAAATCTATTGAAACTATTATTATTA GACTTAAATGAAGACTTAG
GAGGTTATCAATGCCTCAACAACTTATTCTCAAATTCGATAGTAATCTGGACGTA
AAAAAATTAAACCTATTCTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCGTCGATTATGTTTC
TTCTGGTACAACCTGGTCTGCCGAAGGGAGTCATGCTAACTCACAAGAATATTGTTGCAC
GATTTCTATTGCAAAAGATCCTACTTTGGTAA CGCAATTAAATCCCACGTCAGCAATT
TTAACGGTAATACCTTCACTGGGTTGGTATGATGACCA CATTAGGATACTTTAC
TTGTGGATTCCGAGTTGTTCTAACGACACGTTGAAGAAA ACTATTCTACAATCAT
TACAAGATTATAAAGTGGAAAGTACTTACTTGTACCAACATTAAATGGCATTCTTGCA
AAAAGTGCATTAGGTGAAAAGTACGATTATCGCACTTAAAGAAATTGCATCTGGTG
CGCACCTTATCAAAGAAATTGGGAGATGGTAAAAACGGTTAAATTAAACTTTG
TCAGGCAAGGGTATGGATTAACAGAAGCCACTTCGGCTGTTTAATTACACCGAAAGGT
GACGCCAAACCGGGATCAACTGGTAAAATAGTACCAACATTACACGCTGTTAAAGTTGTCGA
TCCTACAACAGGAAAAATTGGGCCAAATGAACCTGGAGAATTGTATTAAAGGCC
CGATGAAAATGAAGGGTATTATAATAATGAAGAAGCTACTAAAGCAATTATTGATAAT
GACGGATGGTTGCGCTCTGGT GATATTGCTTATTATGACAATGATGGCCATT TTATAT
TGTGGACAGGCTGAAGTCACTGATTAAATATAAGGTTATCAGGTTGCACCTGCTGAAA
TTGAGGGAAACTCTTACAACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCGTTACTGGTATACCG
GATGAAGCCCGGGCGAGCTCCAGCTGCAGGTGTTGAGTACAGACTGGAAAATATCT
AAACGAACAAATCGTACAAGATTATGTTGCCAGTCAGTTCAACAGCCAAATGGCTAC
GTGGTGGGGTGAAATTTGGATGAAATTCCAAAGGATCAACTGGAAAAATTGACAGA
AAAGTGTAAAGACAAATGTTAGAAAACACACCAATGGCATCACCACCATCAC
TCACTAA

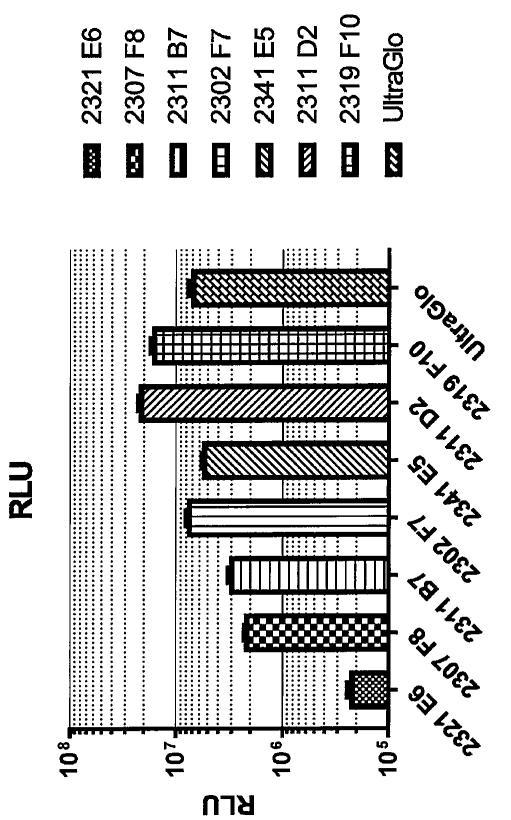
20

30

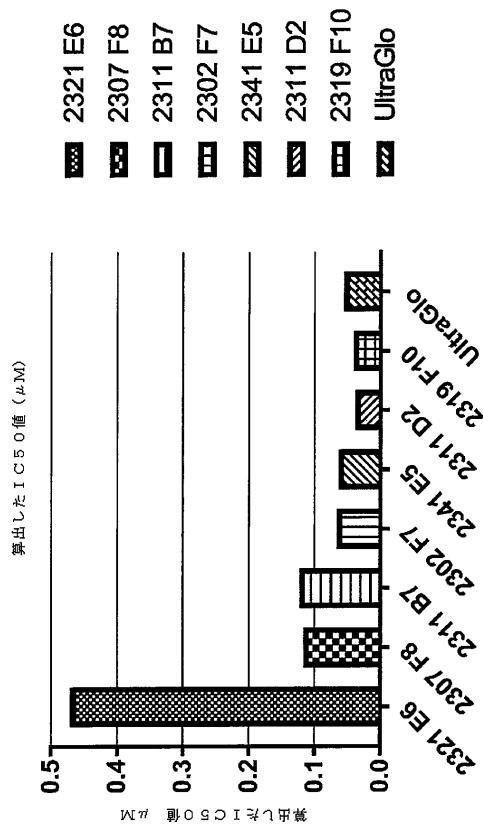
40

50

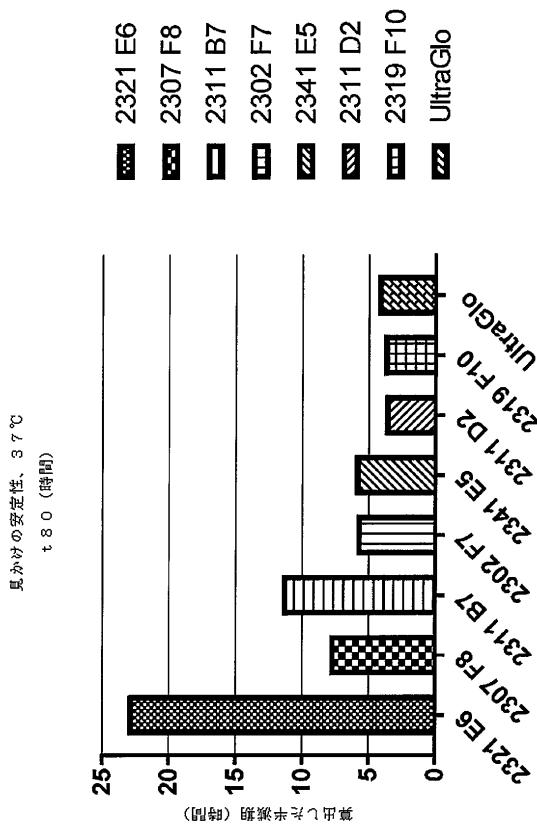
【図面】
【図 1】



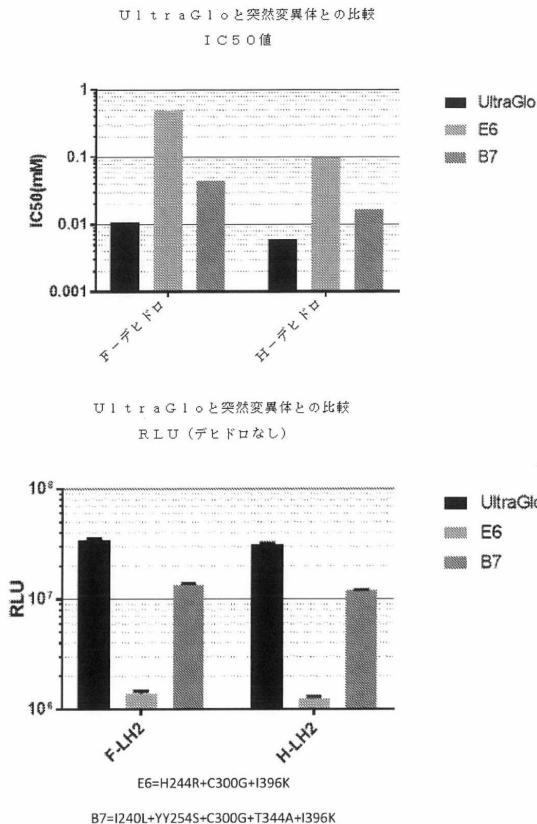
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

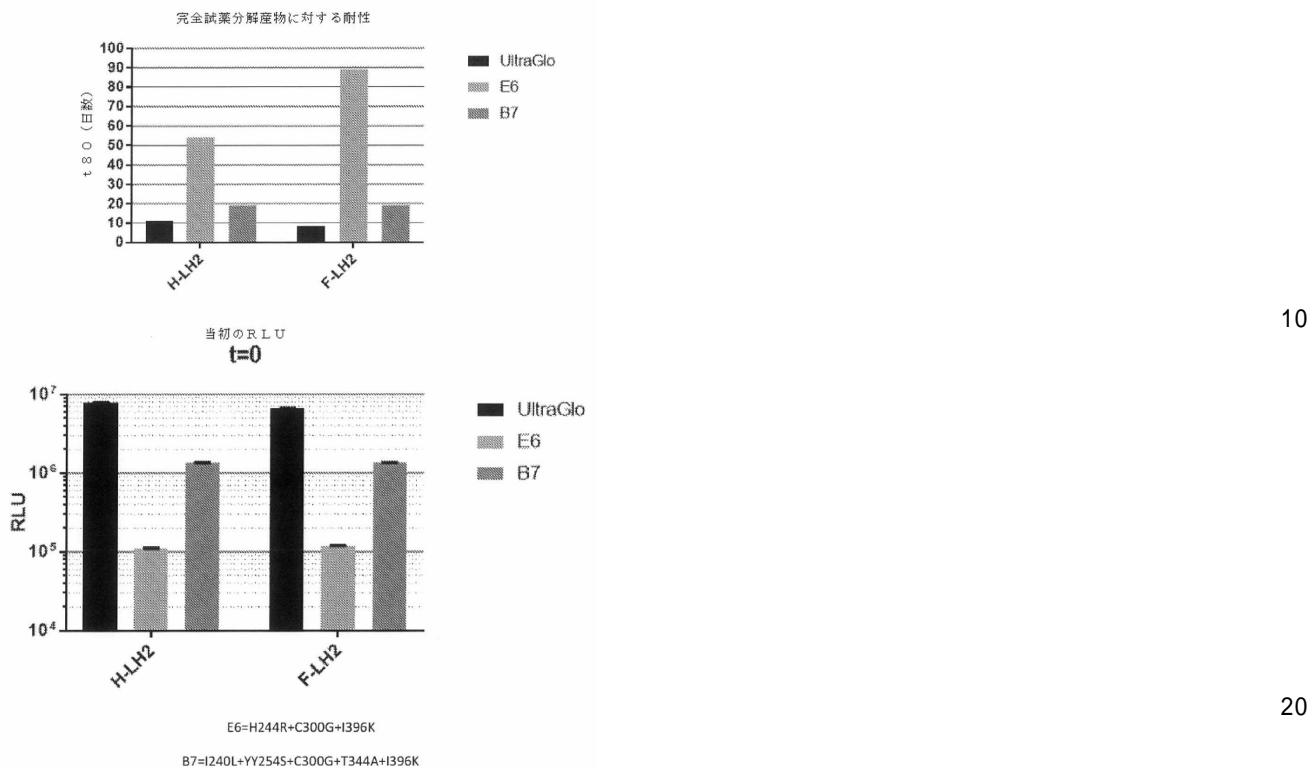
20

30

40

50

【図 5】



【配列表】

0007175881000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

弁理士 服部 博信
(74)代理人 100123766
弁理士 松田 七重
(72)発明者 シー ツェー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53711 マディソン ウッズ ホロー ロード 2800
(72)発明者 カークランド トーマス
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53711 マディソン ウッズ ホロー ロード 2800
(72)発明者 マイセンハイマー ポンチョ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53711 マディソン ウッズ ホロー ロード 2800
(72)発明者 エンセル ランス ピー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53711 マディソン ウッズ ホロー ロード 2800
(72)発明者 ホール マリー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53711 マディソン ウッズ ホロー ロード 2800
審査官 野村 英雄
(56)参考文献 特表2003-509051(JP,A)
特表2004-528024(JP,A)
特表2013-532958(JP,A)
米国特許出願公開第2016/0291000(US,A1)
特表2010-509924(JP,A)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C12N 9/00 - 9/99
C07K 1/00 - 19/00
C12Q 1/00 - 3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
PubMed