世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6
C12N 15/53, 9/02, 15/63, 1/21, C12Q 1/26

A1

(11) 国際公開番号 WO99/33997

(43) 国際公開日 1999年7月8日(08.07.99)

(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05864

(22) 国際出願日 1998年12月24日(24.12.98)

(30) 優先権データ
特願平9/361022 1997年12月26日(26.12.97) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
キッコーマン株式会社
(KIKKOMAN CORPORATION)[JP/JP]
〒278-8601 千葉県野田市野田339番地 Chiba, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
服部憲晃(HATTORI, Noriaki)[JP/JP]
村上成治(MURAKAMI, Seiji)[JP/JP]
〒278-8601 千葉県野田市野田339番地
キッコーマン株式会社内 Chiba, (JP)
(74) 代理人
弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.)
〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号
虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類
国際調査報告書
明細書とは別に規則１３の２に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示

(54)Title: LUCIFERASE AND METHOD FOR ASSAYING INTRACELLULAR ATP BY USING THE SAME

(54)発明の名称 ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法

(57) Abstract

A luciferase tolerant to surfactants; and a method for assaying intracellular ATP which comprises the first step of extracting ATP from a cell-containing sample in the presence of a surfactant, the second step of adding a luciferase-containing luminescent reagent to the ATP extract thus inducing luminescence and the third step of detecting the luminescence dose, characterized by using the luciferase tolerant to surfactants.

(57)要約

界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ、及び細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にＡＴＰを抽出する第１工程、該ＡＴＰ抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第２工程、および該発光量を検出する第３工程を含む細胞内ＡＴＰの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ＡＴＰの測定法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明　細　書

ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ＡＴＰの測定法

技術分野

この発明は、界面活性耐性を有する新規ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ＡＴＰの測定法に関する。

背景技術

食品衛生、バイオ、臨床検査、医学、超純水、環境などの分野では、試料中の細胞の有無や細胞数の計測等を目的として、細胞内ＡＴＰの測定が日常的に行なわれている。細胞内ＡＴＰの測定法においては、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とするＡＴＰ抽出試薬を添加して、細胞内ＡＴＰを細胞外に抽出した後、ルシフェラーゼを含む発光試薬を試料に添加し、生じる発光の発光量を測定する方法が一般的である。

ルシフェラーゼは、ＡＴＰおよびマグネシウムイオンの存在下で、基質であるルシフェリンの発光反応を触媒する酵素である。細胞内ＡＴＰの測定法におけるルシフェラーゼとしては、例えばホタル（ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル等）を由来とするものが用いられている。

細胞内ＡＴＰの抽出は、細胞を含む試料に、ＡＴＰ抽出試薬を添加して撹拌することにより成し遂げられる。充分な抽出能力を発現させるためには、試料と抽出試薬を混合したときの混合液に対し、界面活性剤の濃度が0.05％以上になるように添加することが望ましい。しかし、界面活性剤の濃度が0.05％以上である場合、生物発光によりATP濃度を測定する工程で酵素反応を著しく阻害するため、測定感度および精度が大きく低下する。これは、高濃度の界面活性剤によりルシフェラーゼの活性が低下することが原因であると考えられている。例えば、アメリカホタルのルシフェラーゼは、0.1％の塩化ベンザルコニウムの存在下では、その活性が約20％にまで低下する（第１表参照）。

一方、界面活性剤の濃度が低いと生物発光反応の阻害を小さくできるが、ＡＴ

Ｐの抽出効率が不十分となる。

界面活性剤による発光反応の阻害を抑制する方法として、サイクロデキストリンまたはその誘導体を使用する方法は公知である（特表平６－５０４２００号）。また、細胞を含む試料を界面活性剤と接触させて細胞内ＡＴＰを抽出し、次いでルシフェリンールシフェラーゼ生物発光反応法により該ＡＴＰを測定する方法において、ＡＴＰ抽出後の試料をサイクロデキストリンと接触させた後に生物発光反応法を適用することを特徴とする細胞内ＡＴＰの測定方法も公知である（特開平７－２０３９９５号公報）。

しかしながら、ルシフェラーゼに注目して、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制しようとした試みはなかった。

従って、発明の目的は、界面活性剤が高濃度に存在する場合でも活性が低下しない、界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼを提供することにある。また、本発明の目的は、界面活性剤を使用して細胞内ＡＴＰを抽出し、ついで該細胞内ＡＴＰをルシフェラーゼを用いる生物発光反応法により測定する方法において、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制することができ、且つ細胞内ＡＴＰの抽出効率を低下させることがない方法を提供することにある。

なお、ここでいう「抑制」とは、界面活性剤による生物発光反応の阻害を有意に低減すること、及び該阻害を完全に排除することを意味する。

発明の開示

本発明は、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼである。

上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、490位のアミノ酸、またはゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸を、グルタミン酸以外の他のアミノ酸、例えばリジンに置換したものが挙げられる。

また、上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、以下の（ａ）又は（ｂ）からなるポリペプチド

（ａ）配列番号４で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（ｂ）（ａ）のポリペプチドにおいて１若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若

しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド、あるいは

以下の（ａ）又は（ｂ）からなるポリペプチド

（ａ）配列番号６で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

（ｂ）（ａ）のポリペプチドにおいて１若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するタンパク質、

が挙げられる。

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子である。

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子を含む組換ベクターである。

さらに、本発明は上記組換ベクターを含む形質転換体である。

さらに、本発明は上記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを採取することを特徴とする該ルシフェラーゼの製造法である。

さらに、本発明は細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にＡＴＰを抽出する第１工程、該ＡＴＰ抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第２工程、および該発光量を検出する第３工程を含む細胞内ＡＴＰの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ＡＴＰの測定法である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、平成９年特許願第３６１０２２号の明細書及び／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

第１図は変異型ルシフェラーゼHIKの遺伝子の作製図を示す図であり、第２図は天然型ルシフェラーゼの発光量の経時変化を示す図であり、第３図は変異型ルシフェラーゼの塩化ベンザルコニウムに対する耐性比較を示す図であり、第４図は変異型ルシフェラーゼの塩化ベンゼトニウムに対する耐性比較を示す図である。

発明の詳細な説明

以下、本発明について詳述する。

〔界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて〕

本発明の界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて説明する。

「界面活性剤に耐性を有する」とは、次のいずれかの性質を有するものをいう。

（１）従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での初発の発光量が増大するものをいう。ここでいう「比較」とは、例えば、公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に変異を導入して本発明のルシフェラーゼを作製する場合であれば、変異導入前のルシフェラーゼの発光量と、変異導入後のルシフェラーゼの発光量との比較を意味する。

（２）従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での活性の低下が緩やかであることをいう。

（３）０．４％の界面活性剤存在下で、８５％以上の残存活性を有することをいう。

以後、「界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ」を、「界面活性剤耐性ルシフェラーゼ」と表記する。

「活性」とは、生物発光反応の触媒活性を意味する。また、本発明でいう「界面活性剤」とは、細胞内ＡＴＰの測定系に使用されうるものであればいずれでもよく、例えば、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤、ツイッターイオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤等が挙げられ、さらに具体的には、塩化ベンザルコニウムあるいは塩化ベンゼトニウム等の第４級アンモニウム塩を主成分とする試薬が挙げられる。

本発明のルシフェラーゼは、発光性生物の発光器官等から調製することにより得られる。発光性生物としては、発光性昆虫、発光性細菌等が挙げられる。発光性昆虫としては、甲虫目（cleoptera)に属するもの、例えばホタル科やコメツキムシ科の昆虫、具体的には、ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル、ヒカリコメツキムシツチボタル、鉄道虫等が挙げられる。また、本発明のルシフェラーゼは、上記の発光生物からルシフェラーゼ遺伝子をクローニングし、該遺伝子を適当なベクター－宿主系を用いて発現させることにより得ら

れる。

さらに、本発明のルシフェラーゼは、従来公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に付加、欠失、置換等の変異を導入することにより得られる。アミノ酸配列に変異を導入する方法としては、公知の遺伝子工学的手法を使用することができる。その場合、まず、上記の発光性生物を由来とするルシフェラーゼ遺伝子や既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に遺伝子工学的手法により付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築する。ついで、該変異型遺伝子を適当なベクター－宿主系に導入して組み換え微生物を作製する。さらに該組み換え微生物の中から、本発明のルシフェラーゼを生産するものをスクリーニングし、それを培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取すればよい。

以後、アミノ酸配列に変異を導入することにより得られた界面活性剤耐性ルシフェラーゼを、「変異型ルシフェラーゼ」と表記することとする。

変異型ルシフェラーゼとしては、例えば、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外のアミノ酸に置換されたルシフェラーゼが挙げられる。グルタミン酸以外のアミノ酸としては、例えば塩基性アミノ酸、具体的には、リジン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられる。「ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、確定したルシフェラーゼのアミノ酸配列をゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、ゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼの490位のアミノ酸に対応するアミノ酸を意味するものである。

なお、ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼでは、490位のアミノ酸はグルタミン酸である。また、アメリカホタルルシフェラーゼにおいて、「ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、４８７位のグルタミン酸である。

さらに具体的には、変異型ルシフェラーゼとは、配列番号１または２で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列のうちの１若しくは複数のアミノ酸が付加、

欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

〔遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法〕

以下に、遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法について説明する。

変異型ルシフェラーゼは、既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築し、該遺伝子を適当なベクター－宿主系により発現させることにより得られる。

既知のルシフェラーゼ遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、具体的には、野生型ヘイケボタルルシフェラーゼ遺伝子（特開平２－１７１１８９号公報に記載）、耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ遺伝子（特開平５－２４４９４２号公報に記載）等が挙げられる。

ｉ）ルシフェラーゼ遺伝子に変異を導入する方法としては、該遺伝子と変異原となる薬剤、具体的にはヒドロキシルアミン、亜硝酸、亜硫酸、５－ブロモウラシル等を接触させる方法を挙げることができる。この他、紫外線照射法、カセット変異法、ＰＣＲ法を用いた部位特異的変異導入法等の方法を広く用いることができる。更には、化学合成したＤＮＡをアニーリングして所望の部位に変異を有する変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築することも可能である。

ii）次いで、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を、プロモーター配列、マーカー遺伝子、複製起点等を有するベクターＤＮＡに挿入して組み換え体プラスミドを得る。ベクターＤＮＡは、宿主細胞で複製可能なものであれば如何なるものでもよく、例えば、プラスミドＤＮＡ、バクテリオファージＤＮＡ等が挙げられる。宿主細胞が大腸菌である場合のベクターＤＮＡとしては、プラスミドpUC119（宝酒造社製）、pBluescript SK+(Stratagene社製)、pMAL-C2（NEW England Labs社製）、pGEX-5X-1（ファルマシア社製）、pXa1（ベーリンガー社製）、pMA56（G.Ammerer, Meth. Enzymol., 101, 192,1983）等が使用できる。

iii)次いで、上記の組み換え体プラスミドを用いて適当な宿主細胞を形質転換又は形質導入し、変異型ルシフェラーゼの生産能を有する組み換え微生物をスクリーニングする。

宿主細胞としては、真核細胞及び原核細胞のいずれをも使用できる。真核細胞

としては動物、植物、昆虫、酵母等の細胞が、原核細胞としては大腸菌、枯草菌、放線菌等が挙げられる。動物細胞としては、CHO 、COS、HeLa細胞及びミエローマ細胞系統の細胞が、原核細胞としては、エッシェリシア属に属する微生物、例えば大腸菌JM101(ATCC 33876)、JM109（宝酒造社製）、 XL1-Blue（Stratagene社製）、HB101(ATCC33694)等が使用できる。

本発明においては、形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法（Meth. Enzymol.,68,326-331,1979）等により、形質導入は、例えば、B.Hohnの方法（Meth. Enzymol.,68,299-309,1979）等により行うことができる。

組み換え微生物より組み換え体ＤＮＡを精製する方法としては、例えば、P.Guerryの方法（J.Bacteriology,116,1064-1066,1973）、D.B.Clewellの方法（J.Bacteriology,110,667-676,1972）等を用いることができる。又、組み換え体ＤＮＡに挿入された遺伝子の塩基配列の決定は、例えば、Maxam-Gilbert 法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA,74,560-564,1977 ）、Dideoxy法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA,74,5463-5467,1977）等により行うことができる。

iv）上記の方法により得られた組み換え微生物を培地中で培養することにより、本発明の変異型ルシフェラーゼを生産することができる。

宿主細胞が大腸菌である場合、組み換え大腸菌を固体培養法で培養してもよいが、液体培養法により培養するのが好ましい。培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカーあるいは大豆もしくは小麦ふすま浸出液等の１種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸１カリウム、リン酸２カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第２鉄、硫酸第２鉄、あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の１種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。なお、培地の初発 pH は、 pH 7～9に調製するのが適当である。また培養は30～42℃、好ましくは37℃前後で3～24時間、好ましくは5～8時間、通気撹拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。

組み換え大腸菌の培養終了後、培養物より変異型ルシフェラーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。すなわち、培養物を遠心分離して菌体を得た後、リゾチーム等の酵素を用いた溶菌処理、超音波破砕処理、磨砕

処理等により菌体を破壊し、融合タンパク質を菌体外に排出させる。次いで、ろ過又は遠心分離等を用いて不溶物を除去することにより、変異型ルシフェラーゼを含有する粗酵素液を得ることができる。

本発明では、上記の粗酵素液をそのままタンパク質標品としてもよいが、通常のタンパク質精製法を用いて、更に純度を高めてもよい。具体的には、硫安塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等を、単独又は適宜組み合わせて用いることができる。

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを使用することにより、細胞内ＡＴＰの抽出工程において、界面活性剤を高濃度に添加することが可能となる。

〔本発明の細胞内ＡＴＰの測定法〕

以下に、本発明の細胞内ＡＴＰの測定法について説明する。

i）まず、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とするＡＴＰ抽出試薬を添加して、細胞内ＡＴＰを細胞外に抽出する。細胞とは、動物、植物、微生物（例えば、酵母、カビ、キノコ、細菌、放線菌、単細胞藻類、ウイルス、原生動物等）等を由来とする細胞を意味する。

試料とは、上記の細胞を含むものであれば特に限定されないが、例えば、飲食物、医薬、化粧品、海水、河川水、工業用水、下水、土壌、尿、糞便、血液、喀痰、膿汁、上記細胞の培養物等が挙げられる。また、上記の試料を、適当な溶媒（例えば、蒸留水、生理的食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）に懸濁した溶液を試料としてもよい。検体液が固形分を含む場合には、該検体液を適当な溶媒に懸濁するか、ミキサーなどでホモジナイズすれば溶液状のものと同様に扱うことができる。

また、上記溶液状の試料を、親水性または疎水性の濾過膜で濾過して細胞を捕捉した後に該濾過膜を試料としてもよい。細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、親水性濾過膜としては、例えば親水性ポリテトラフルオロエチレン、親水性ポリビニリデンフルオライド、親水性ポリアミド、アセチルセルローズ、ニトロセルローズ等を材料とするフィルム状又はシート状のものが使用できる。また、疎水性濾過膜としては、例えばＰＶＤＦ（ポリビニリデンフルオライド）、ＰＴ

ＦＥ（ポリトラフルオロエチレン）、ＰＥ（ポリエチレン）等を材料とするものが使用できる。

界面活性剤としては、例えば、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤、ツイッターイオン系界面活性剤、非イオン系性界面活性剤等が挙げられる。アニオン系界面活性剤としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、ラウリル硫酸カリウム、モノラウロイルリン酸ナトリウム、アルキルベンスルホン酸ナトリウムがあげられる。カチオン系界面活性剤としては、例えば塩化ベンザルコニウム（BAC）、塩化ベンゼトニウム（BZC）、塩化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルア　ンモニウム、塩化ミリスチルジメチルベンジルアンモニウムがあげられる。また、ツイッターイオン系界面活性剤としては、例えばTwitterg ent Detergent 3-08, 3-10, 3-12, 3-14, 3-16、Tegoがあげられる。さらに非イオン性界面活性剤、例えば、 Tween 20, 60, 80、Span 60, 80、 Triton X-45, x-100,ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテルがあげられる。

界面活性剤の濃度は、充分なATP抽出能力を発現させる濃度であればいずれでもよいが、試料とＡＴＰ抽出試薬を混合した時の混合液に対し、界面活性剤の濃度が好ましくは0.05％以上になるように添加する。

試料とＡＴＰ抽出試薬との反応条件は、室温あるいは加温しつつ接触させればよい。

ii)ＡＴＰ抽出後の試料に界面活性剤耐性ルシフェラーゼを含む生物発光試薬を添加して発光を生じさせ、生じた発光を検出する。

界面活性剤耐性ルシフェラーゼがホタル由来のものである場合、生物発光試薬とは、例えば以下の（イ）～（ハ）の成分を含む試薬である。

（イ）界面活性剤耐性ルシフェラーゼ

（ロ）ルシフェリン

（ハ）マグネシウムイオンまたは他の金属イオン

なお、発光試薬には上記の成分のほか、ｐＨ調製や保存性向上に関与する物質を添加してもよい。そのような物質としては、例えば、EDTA 2Na、ジチオスレイトール、硫酸アンモニウム、シュークロース、2-メルカプトエタノール、HEPES

、Tricine、Tris、等が挙げられる。

iii）生物発光試薬の添加により生じた光の発光量は、ルミノメーター、例えばキッコーマン社製ルミテスターK-100、アロカ社製ルミネッセンスリーダーＢＬＲ－２０１（改良型）、ベルトールド社製Lumat LB9501等により測定することができる。また、細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、生物発光画像解析システム装置、例えばＡＲＧＵＳ－５０／ＣＬ〔テーパーファイバー付：浜松ホトニクス（株）社製〕を用いて濾過膜上の輝点を撮像することにより、細胞数を測定することが可能である。

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例にそのその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例１〕　各種ホタル由来の天然型ルシフェラーゼの界面活性剤耐性

（各種ホタル由来の野生型ルシフェラーゼの調製法）

以下の方法に準じて、ゲンジおよびヘイケボタル由来のルシフェラーゼを調製した。すなわち、25mMトリス（ヒドロキシ）アミノメタン－塩酸緩衝液に、1mMエチレンジアミン４酢酸２ナトリウム及び2mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドを添加し、更に硫酸アンモニウムを10％飽和となる如く添加して得た混液（pH7.8）に、各種ホタルの尾部を添加してヒスコトロン〔（株）日音医理科器械製作所製〕を用いて破壊した。得られた溶液を12,000r.p.m.で20分間遠心分離し、上清を以下の精製工程の出発原料とした。精製は、硫酸アンモニウム塩析、ウルトロゲル（Ultrogel）ＡｃA34（ＬＫＢ社製）カラム、ヒドロキシーアパタイトＨＰＬＣ（東洋曹達工業社製、ＴＳＫgel ＨＡ－1000）カラムの工程により行い、最終的に電気泳動的に単一な標品を得た。なお、アメリカホタル由来のルシフェラーゼは市販品（Sigma社製、L-9506）を使用した。

（ルシフェラーゼの活性測定法）

ルシフェラーゼ標品を酵素希釈液（1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 1% BSA, 50 mM HEPES, (pH 7.5)）にて適宜希釈し、その100μｌに100μｌの基質溶液（1.4 mMルシフェリン, 40 mM ATP, 300 mM MgSO4.7H2O, 50 mM HEPES, (pH 7.5)）を添加した。発光量の測定は、BLR-201 Luminescence reader（アロカ社製）を用いて以下の設定条件で測定を行った。

測定レンジ：x100

表示数値：x1000

測定温度：30℃

測定時間：20秒間

この条件での測定値が1 Kcountの時の活性値を1 MLU（ﾒｶﾞﾗｲﾄﾕﾆｯﾄ）/mlとした。

（界面活性剤耐性の測定法）

各種ホタル由来ルシフェラーゼ標品を0.5 MLU/mlの濃度になるよう酵素希釈液（1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 5%グリセロール, 50 mM HEPES (pH 7.5)）を用いて調整し、酵素標品とした。

100μlの基質溶液（4 mM ATP, 0.4 mMルシフェリン, 10 mM 硫酸マグネシウム, 50 mM HEPES (pH 7.5)）に50μlの0.4%塩化ベンザルコニウム（25 mM Tricine (pH 7.75)）を添加し、さらに50μlの酵素標品を添加して、5秒撹拌した後にBerthold Lumat LB-9501にて1秒ごとに1分間の発光量を経時的に測定した。

その結果を図2に示す。図中縦軸には、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの初発発光量を100%とした際の発光量の相対比をプロットしている。

この結果において、アメリカホタルルシフェラーゼは初発の発光量が低く、また発光量が急激に減衰しているのがわかる。これはアメリカホタルルシフェラーゼの界面活性剤耐性が低いためであり、感度の低下および測定値の精度の低下を招く。これに対し、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼと比べ初発の発光量が高かった。すなわち、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼより界面活性剤耐性が優れていることが示された。さらにヘイケボタルルシフェラーゼはゲンジボタルルシフェラーゼより初発の発光量が高く、発光の減衰も緩やかであったことから、優れた耐性を示すことが明らかになった。この結果より、ルシフェラーゼの界面活性剤に対する耐性度は、起源とするホタルの種類により異なっていることが示唆された。

〔実施例2〕 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの作製

以下の方法により、ヘイケボタルを由来とする2種類の変異型ルシフェラーゼ

（「HLK」及び「HIK」と命名）を調製した。

（変異型ルシフェラーゼHLKをコードする遺伝子の作製）

PCRを用いた部位特異的変異法により、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。PCR反応の鋳型として特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Leu（プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がLeuをコードする遺伝子に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド）を使用した。なお、該プラスミドが導入された大腸菌JM101株は、大腸菌（E. coli）JM101(pHLf7-217Leu)と命名され、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-3840（寄託日：平成4年(1992)4月22日）として寄託されている。

PCR反応のプライマーとして配列番号1、2で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、またDNA polymeraseとしてのKOD dash polymerase（TOYOBO社製）を使用した。KOD dash polymerase に付属の実施例に準じてGeneAmp PCR System 9600（Perkin Elmer社製）を用い、94℃で30秒、50℃で2秒、74℃で3分のサイクルを30サイクル繰り返し、PCR反応を行った。生じたPCR産物を常法に従ってLigationを行い、環状の組み換え体プラスミドpHLfLKを得た。

pHLfLKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子のシークエンシングを行った。ダイプライマータックシークエンシングキット（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、ABI 373A DNAシークエンサー（アプライドバイオシステムズ社製）で泳動解析を行った。このようにして得られた変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号3に、また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号4に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた。

pHLfLKを導入した大腸菌JM109株を、大腸菌（E. coli）JM109(pHLfLK)と命名した（図1参照）。大腸菌（E. coli）JM109(pHLfLK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6147（寄託日：平成9年(1997)10月16日）として寄託されている。

配列番号４に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼＨＬＫと命名した。

（変異型ルシフェラーゼHIKをコードする遺伝子の作製）

特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Ile（プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がIleをコードする遺伝子に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド）を用いて変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。該プラスミドによる形質転換株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-3841（寄託日：平成４年(1992)４月22日）として寄託されている。

pHLfLKをEcoRVおよびNarIで切断し得られた約560bpの断片をアガロースゲル電気泳動により取得し、同じ制限酵素で処理したpHLf7-217Ileに挿入した。

このようにして得られた組み換え体プラスミドをpHLfIKと命名し、該プラスミドを導入した大腸菌JM109株を大腸菌（E. coli）JM109(pHLfIK)と命名した。大腸菌（E. coli）JM109(pHLfIK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6146（寄託日：平成９年(1997)10月16日）として寄託されている。

pHLfIKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号5に、また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号6に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がイソロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた（図１参照）。

配列番号６に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼＨＩＫと命名した。

〔実施例３〕　変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの調製

大腸菌（E. coli）JM109(pHLfLK)及び大腸菌（E. coli）JM109(pHLfIK)を、それぞれアンピシリンを含むＬＢ培地〔バクトトリプトン１％（W/V）、酵母エキス 0.5%（W/V）、NaCl 0.5%（W/V）、アンピシリン（50μg/ml）、1.4%（W/V）寒天〕に接種し、３７℃で１８時間培養を行なった。得られた培養液を、8000 r.p.m.で１０分間の遠心分離し、沈殿した菌体を0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH7.8）、0.1 M 硫酸アンモニウム、1 mM EDTA〕に懸濁した後、超音波破砕した。

次いで、12000 r.p.m.で１０分間遠心分離を行ない、粗酵素液を得た。得られた粗酵素液を前述した精製法により、電気泳動的に単一にまで精製した。

〔実施例４〕　変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの界面活性剤耐性

（発光の経時変化）

変異型ルシフェラーゼと公知のルシフェラーゼとの界面活性剤耐性を比較するため、前述した界面活性剤耐性の測定法に準じて発光量の経時変化を測定した。界面活性剤として、0.4 %塩化ベンザルコニウム(25mM Tricine(pH 7.75)) を使用した結果を図３に、0.8 %塩化ベンゼトニウム(25mM Tricine(pH 7.75)) を使用した結果を図４に示す。

図中「ヘイケＩ変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがIle に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ（特開平5-244942号公報）であり、「ヘイケＬ変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがLeu に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ（特開平5-244942号）である。また、「ＨＩＫ」はヘイケＩ変異体の４９０番目のGlu をLys に置換した変異体であり、実施例３で調製した変異型ルシフェラーゼＨＩＫである。「ＨＬＫ」はヘイケＬ変異体の４９０番目のGlu をLys に置換した変異体であり、実施例３で調製した変異型ルシフェラーゼＨＬＫである。

図３に示した塩化ベンザルコニウムの結果において、ＨＩＫとヘイケＩ変異体とを比較するとＨＩＫのほうが発光の減衰が穏やかであることがわかる。また、ＨＬＫとヘイケＬ変異体とを比較すると、ＨＬＫのほうが初発発光量が20％程度向上しており、また発光の減衰が穏やかであることがわかる。このことより４９０番目のアミノ酸の置換により界面活性剤耐性が向上していることが示された。

図４に示した塩化ベンゼトニウムの結果において、ＨＩＫとヘイケＩ変異体とを比較すると、ＨＩＫのほうが発光の減衰が穏やかであることがわかる。また、ＨＬＫとヘイケＬ変異体とを比較すると、ＨＬＫのほうが発光の減衰が穏やかであることがわかる。このことより４９０番目のアミノ酸の置換により界面活性剤耐性が向上していることが示された。

（発光率の比較）

発光の経時変化を測定する際に使用した酵素溶液、基質溶液および塩化ベンザ

ルコニウムを用い、実際の発光測定条件下での測定値への影響を調べた。Berthold Lumat LB-9501を用い、待ち時間5秒、測定時間3秒の測定条件で求めた発光量を第1表に示す。なお、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの発光量をコントロールとし、0.4%塩化ベンザルコニウム存在時の発光量をコントロール値で割った値を発光率（残存活性）として算出した。

第1表　各種ルシフェラーゼの発光率

ﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞの種類	発光量 (RLU)		発光率 (%)
	抽出試薬なし	抽出試薬あり	
ｱﾒﾘｶﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	452563	97790	21.6
ｹﾞﾝｼﾞﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	409406	167805	41.0
ﾍｲｹﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	425792	324724	76.3
ﾍｲｹI変異体	422269	341039	80.8
ﾍｲｹL変異体	423728	343634	81.1
HIK	386429	345159	89.3
HLK	390289	396764	101.7

アメリカボタルルシフェラーゼは発光率が21.6%と最も低く、感度が大幅に低下することが示唆された。これに対しゲンジボタルルシフェラーゼおよびヘイケボタルルシフェラーゼの発光率はそれぞれ41.0%および76.3%であり、アメリカボタルルシフェラーゼと比較し感度低下の影響が少ないことがわかる。

一方、変異型ルシフェラーゼHIKおよびHLKの発光率はそれぞれ89.3%および101.7%であり、野性型のヘイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの発光率を大きく上回った。中でもHLKの発光率はほぼ100%であり、界面活性剤の有無にかかわらず同じ発光量を得ることが出来る。すなわち界面活性剤を用いても感度低下を全く受けず、精度の高い測定が可能であることが示された。

（IC50の比較）

塩化ベンザルコニウムと各種ルシフェラーゼを10分間接触させ、活性の50%を失活させる塩化ベンザルコニウム濃度（IC50）を求めた。前述した濃度に調整したルシフェラーゼ溶液と0.01～0.1%までの塩化ベンザルコニウムを等量で混和し、10分間室温で放置した。その後、100 μl の基質溶液を添加して、Berthold Lumat LB-9501にて直ちに発光量を測定した。得られたIC50を第2表にまとめた。

第2表　各種ルシフェラーゼのＩＣ$_{50}$

ﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞの種類	IC_{50} (%)
ｱﾒﾘｶﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	0.014
ｹﾞﾝｼﾞﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	0.016
ﾍｲｹﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	0.026
ﾍｲｹI変異体	0.028
ﾍｲｹL変異体	0.028
HIK	0.032
HLK	0.035

野性型ルシフェラーゼ3種のうちアメリカホタルルシフェラーゼは最も低いIC50を示し、界面活性剤に対する耐性が最も劣っていることが示された。ヘイケボタルルシフェラーゼは野性型の中で最も高いIC50を示した。HLKおよびHIKは、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼのIC50を更に上回り、490番目のアミノ酸の置換により耐性が向上したことが示された。中でもHLKの IC50はHIKを上回り、最も界面活性剤耐性が優れていることが示唆された。

〔実施例5〕　（細胞内ATPの測定法）

次に、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを用いた細胞内ATPの測定法について説明する。

なお、従来法として、トリクロロ酢酸（TCA)により細胞内ATPを抽出し、抽出されたATP量をルシフェリンールシフェラーゼ発光反応により測定する方法（TC

A 抽出法）を採用した。TCA 抽出法はATP の抽出効率が非常に優れており、また、TCA を含む試料を１００倍に希釈した後に発光を測定するので、TCA による発光反応の阻害も生じない。しかし、この希釈操作のため、TCA 抽出法は、操作が煩雑となり、また、測定感度の低下が起こるという問題がある。

１．実験材料

（１）使用した界面活性剤

界面活性剤として、塩化ベンザルコニウム（BAC、日本薬局法のオスバン液）を使用した。上記界面活性剤を 0.25 %濃度で25mM Tricine(pH 7.75) に溶解したものを、ATP抽出用試薬とした。

（２）使用した微生物

Escherichia coli(ATCC 25922)、Staphylococcus aureus (ATCC 25923)、Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) およびEnterococcus faecalis (ATCC 29212) の4 菌種を使用した。

（３）試料の調製

従来法では、上記微生物を普通ブイヨン培地（栄研化学（株）製）で一晩３５℃で培養して得られた培養液の原液を試料とした。一方、本発明の方法では、該培養液の原液を滅菌水で100 倍希釈して得られた希釈液を試料とした。

（４）使用したルシフェラーゼ

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼとして、ＨＩＫ及びＨＬＫを使用した。また、対照として公知のルシフェラーゼ種（アメリカボタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、ヘイケボタルルシフェラーゼ、ヘイケＩ変異体、ヘイケＬ変異体）を使用した。

（５）発光試薬

各種ルシフェラーゼを、0.15 mM ルシフェリン、6 mM EDTA, 15 mM酢酸マグネシウム、0.2 mMジチオスレイトール、0.5 % BSA、25 mM HEPES(pH 7.75)の溶液に添加し、発光試薬として用いた。

添加するルシフェラーゼ量は、発光試薬100μl に等量の2×10^{-8}MのATP 標準液を添加した時の発光量が、発光試薬として「ルシフェラーゼ LU 」（ キッコーマン社製）に付属の発光試薬を用いた時と同じになるように調整した。

2．細胞内ＡＴＰの測定法について

（1）本発明の方法

試料100μlにATP抽出用試薬100μlを添加した。20秒間室温で放置した後、発光試薬100μlを添加し、直ちに発光量をBerthold社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

（2）従来法

試料100μlに等量の10％のトリクロロ酢酸溶液を加えて1分間放置した。その抽出液に 9.8 ml の25mM Tricine(pH 7.75)を添加してよく攪拌した。この試料100μlに100μl の25mM Tricine(pH 7.75)および「ルシフェール LU 」（キッコーマン社製）に付属の発光試薬100μlを添加し、直ちに発光量をBertho ld社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

3．結果

結果を第3表及び第4表に示す。また、従来法（TCA抽出法）で得られた発光量を100％とした際に、各種ルシフェラーゼを用いた発光試薬で得られた発光量の相対比も表中に示した。

第3表　細胞内ＡＴＰの測定

測定法	E.coli ATCC 25922		S.aureus ATCC 25923	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA 抽出法)	132794	(100.0)	130220	(100.0)
ｱﾒﾘｶﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	153	(0.1)	163	(0.1)
ｹﾞﾝｼﾞﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	463	(0.3)	659	(0.5)
ﾍｲｹﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	76082	(57.3)	74019	(56.8)
ﾍｲｹⅠ変異体	47655	(35.9)	50031	(38.4)
ﾍｲｹL変異体	46217	(34.8)	51243	(39.4)
HIK	97073	(73.1)	76533	(58.8)
HLK	87981	(66.3)	72182	(55.4)

第４表　細胞内ＡＴＰの測定

測定法	P.aeruginosa ATCC 27853		E.faecalis ATCC 29212	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA 抽出法)	168141	(100.0)	12427	(100.0)
ｱﾒﾘｶﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	553	(0.3)	113	(0.1)
ｹﾞﾝｼﾞﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	1503	(0.9)	163	(1.3)
ﾍｲｹﾎﾞﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ	117096	(69.6)	8132	(65.4)
ﾍｲｹⅠ変異体	80455	(47.8)	4586	(36.9)
ﾍｲｹＬ変異体	81069	(48.2)	4762	(38.3)
HIK	131134	(78.0)	7914	(63.7)
HLK	131815	(78.4)	7998	(64.4)

アメリカボタルルシフェラーゼを用いた発光試薬は全く発光せず、またゲンジボタルルシフェラーゼの場合も微弱な発光しか示さなかった。これは、ルシフェラーゼ自体が界面活性剤により失活してしまったためである。従って、これらのルシフェラーゼには、ATP抽出用試薬として本検討で用いたような高濃度の界面活性剤は使用出来ないことが示された。

一方、ヘイケボタルルシフェラーゼの場合、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼと異なり、TCA抽出法の６～７割程度の発光が認められた。ヘイケボタルルシフェラーゼは、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼより高い界面活性剤耐性を有することが示された。

耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼであるヘイケＩ変異体およびヘイケＬ変異体の場合、得られた発光量はTCA抽出法の４割前後であり、野性型のヘイケボタルルシフェラーゼの場合を大きく下回った。

ところで、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼ、すなわちＨＩＫ及びＨＬＫの場合、得られた発光量は野性型ヘイケボタルルシフェラーゼ及び耐熱性ルシフェラーゼを上回るものであった。また、この場合の発光量は、TCA抽出法の６～８割であった。

ＨＩＫ及びＨＬＫは、ヘイケＩ変異体およびヘイケＬ変異体の490位のGlu をLys に置換したものである。490位のアミノ酸への変異の導入により、界面活性剤に対する耐性が向上したものと考えられる。従って、ＨＩＫ及びＨＬＫは、本検討で用いたような高濃度のATP 抽出用試薬に対しても感度低下は少ないので、これらを用いることにより、精度の高い測定が可能であることが示された。

産業上の利用可能性

本発明にかかわる界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼは、それを用いて細胞内ＡＴＰを測定することにより界面活性剤が高濃度に存在する場合でもルシフェラーゼ活性が低下することなく細胞内ＡＴＰを測定することができる。

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

配列表フリーテキスト

配列番号１：合成ＤＮＡ

配列番号２：合成ＤＮＡ

請 求 の 範 囲

1．界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ。

2．ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外の他のアミノ酸に置換されたものである、請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。

3．グルタミン酸以外の他のアミノ酸がリジンである、請求の範囲第2項記載のルシフェラーゼ。

4．以下の（a）又は（b）からなる請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。

（a）配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）（a）のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド

5．以下の（a）又は（b）からなる請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。

（a）配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）（a）のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド

6．請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかの項記載のルシフェラーゼをコードする、ルシフェラーゼ遺伝子。

7．請求の範囲第6項記載のルシフェラーゼ遺伝子を含む組換ベクター。

8．請求の範囲第7項記載の組換ベクターを含む形質転換体。

9．請求の範囲第8項記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取することを特徴とするルシフェラーゼの製造法。

10．細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にＡＴＰを抽出する第1工程、該ＡＴＰ抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ＡＴＰの測定法において、ル

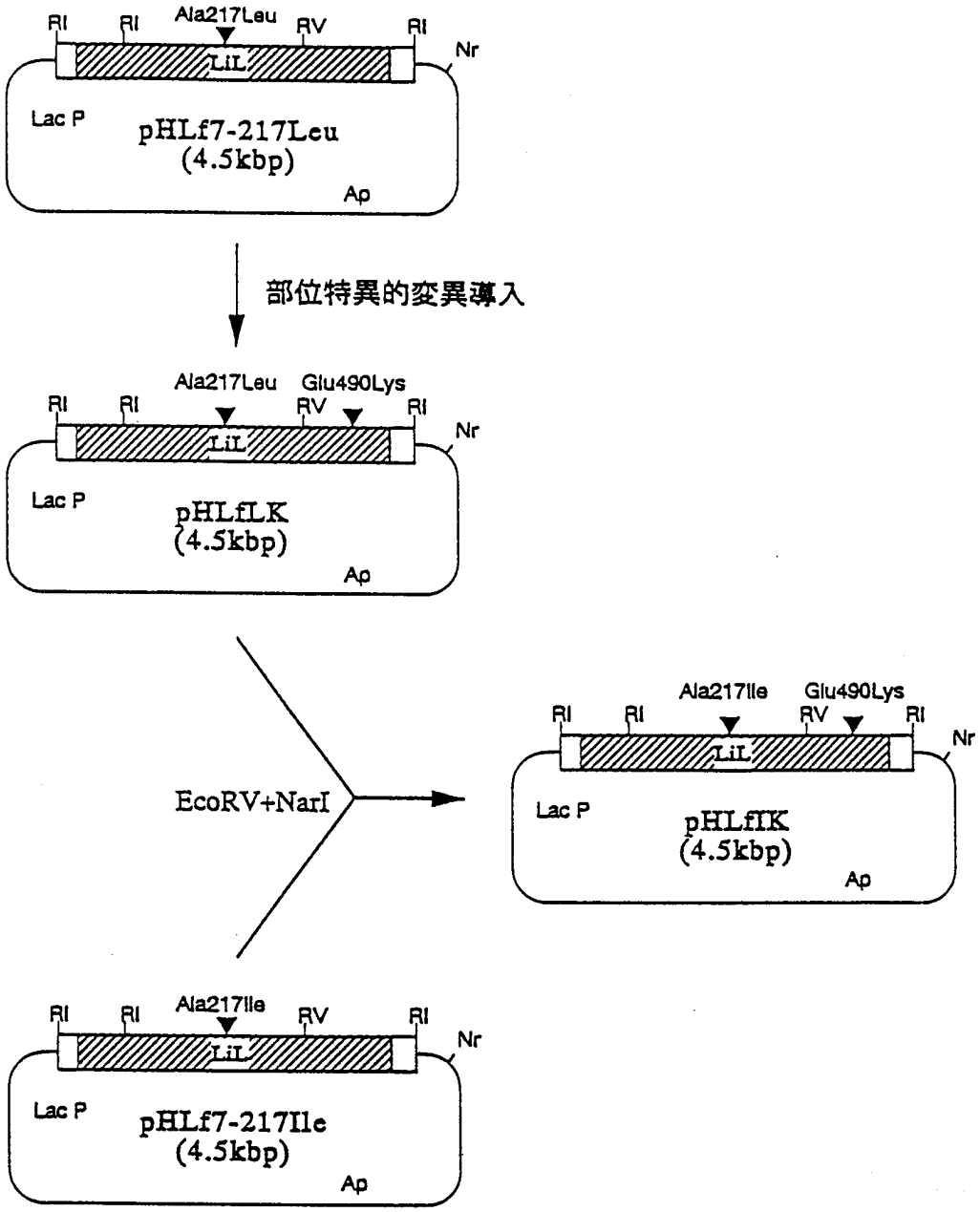
シフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ＡＴＰの測定法。

１１．界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼが請求項１乃至５のいずれかの項記載のルシフェラーゼであることを特徴とする、請求の範囲第１０項記載の細胞内　ＡＴＰの測定法。

１２．発光試薬の添加による発光が、0.01％以上の界面活性剤の存在下で行なわれる請求の範囲第１０項または第１１項に記載の細胞内ＡＴＰの測定法。

１３．界面活性剤がカチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤、ツイッターイオン系界面活性剤のいずれかである請求の範囲第１０項、第１１項または第１２項に記載の細胞内ＡＴＰの測定法。

図 1



LIL; Luciola lateralis ルシフェラーゼ cDNA、Ap; β-ラクタマーゼ遺伝子、LacP; β-ガラクトシダーゼ プロモーター、RI; EcoRI、RV; EcoRV、Nr; NarI

図 2

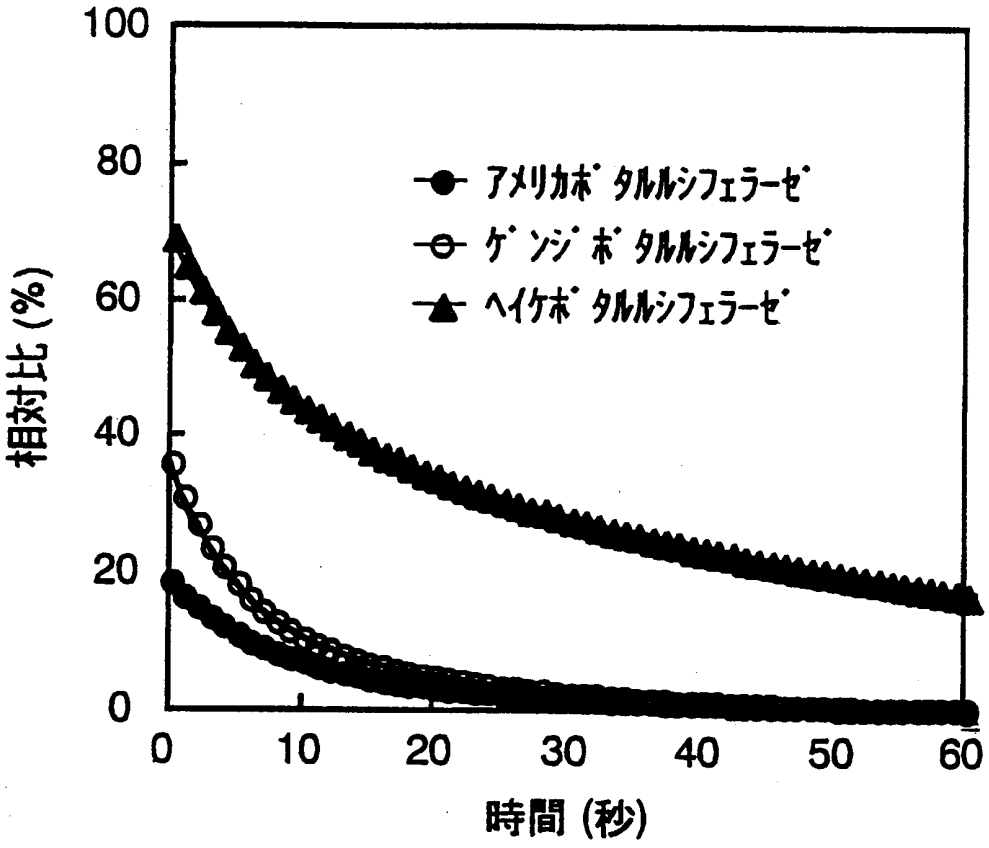

100
80
60
40
20
0
相対比 (%)
0
10
20
30
40
50
60
時間 (秒)
アメリカホ゛タルルシフェラーゼ
ケ゛ンジ゛ホ゛タルルシフェラーゼ
ヘイケホ゛タルルシフェラーゼ

図 3

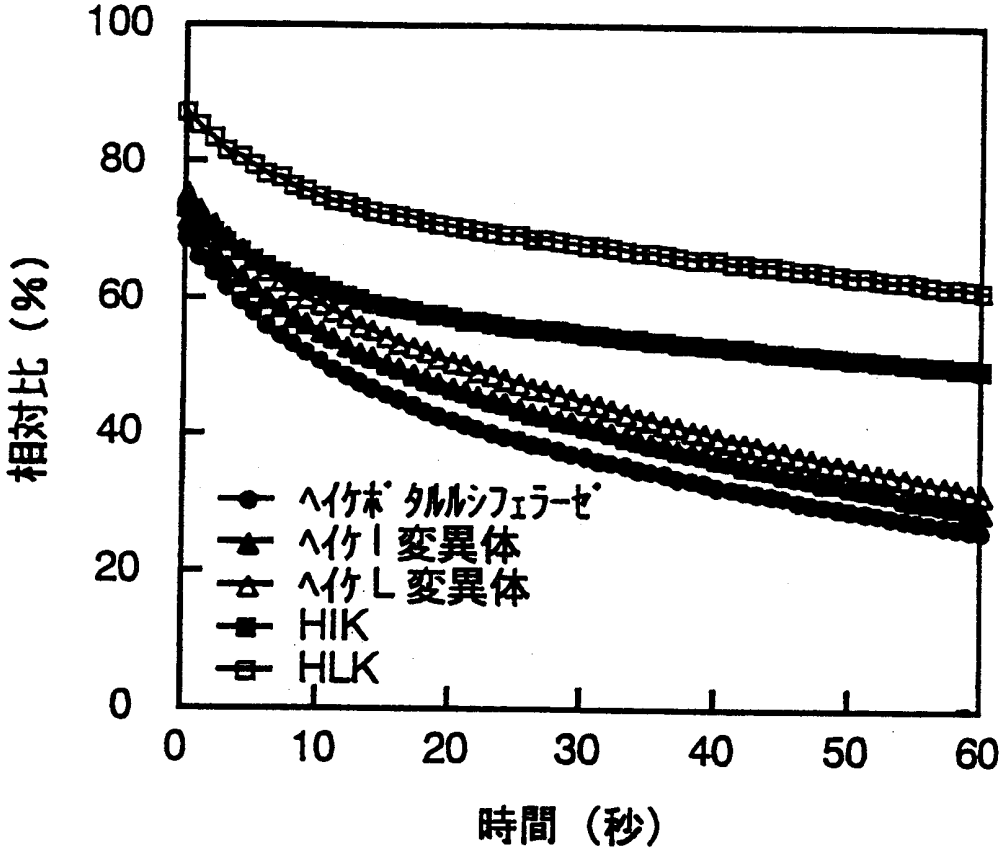
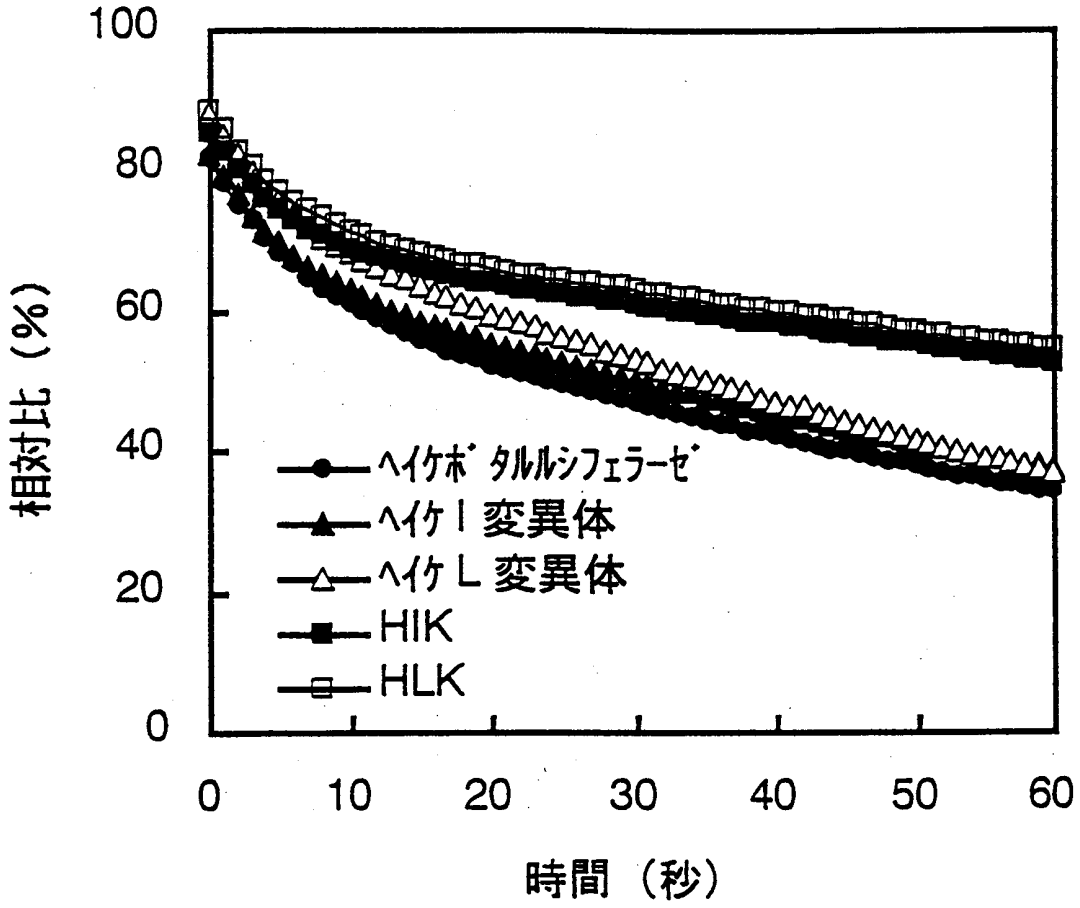

100
80
60
40
20
0
相対比（%）
0
10
20
30
40
50
60
時間（秒）
ヘイケボタルルシフェラーゼ
ヘイケI変異体
ヘイケL変異体
HIK
HLK

図 4


100
80
60
40
20
0
相対比（%）
0
10
20
30
40
50
60
時間（秒）
ヘイケボタルルシフェラーゼ
ヘイケI変異体
ヘイケL変異体
HIK
HLK

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> LUCIFERASE AND A METHOD FOR DETECTING INTRACELLULAR ATP USING THE SAME

<130> P98-0634

<140>

<141>

<150> JP97/361022

<151> 1997-12-26

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

tgttgtactt aagaaaggaa aat 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

acagctcccg gaagctcacc agc 23

<210> 3

<211> 1644

<212> DNA

<213> Luciola lateralis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1644)

<400> 3

atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca 48
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro
1 5 10 15

```
ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat   96
Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
            20                  25                  30

atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt  144
Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
        35                  40                  45

acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt  192
Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
    50                  55                  60

cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gtt gat gga aga att  240
Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
65                  70                  75                  80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc  288
Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
                85                  90                  95

ggt tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act  336
Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
            100                 105                 110

cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta  384
Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
        115                 120                 125
```

ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg 432
Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
130 135 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat 480
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145 150 155 160

aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa 528
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
165 170 175

ggt ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa 576
Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
180 185 190

caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa 624
Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
195 200 205

ggt gtg caa ctt act cat gaa aat ttg gtc act aga ttt tct cac gct 672
Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala
210 215 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta 720
Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225 230 235 240

act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc 768

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
245 250 255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa 816
Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
260 265 270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att 864
Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
275 280 285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat 912
Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
290 295 300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct 960
Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305 310 315 320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg 1008
Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
325 330 335

ggt gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att 1056
Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
340 345 350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg 1104
Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

355 360 365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg 1152
Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
370 375 380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg 1200
Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385 390 395 400

aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa 1248
Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
405 410 415

gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa 1296
Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
420 425 430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga 1344
His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
435 440 445

tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca 1392
Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
450 455 460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt 1440
Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
465 470 475 480

gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act 1488
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
485 490 495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa 1536
Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
500 505 510

cgt ttg cgt ggt ggt gtc cgt ttt gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc 1584
Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
515 520 525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca 1632
Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
530 535 540

gtt gct aag atg 1644
Val Ala Lys Met
545

<210> 4
<211> 548
<212> PRT
<213> Luciola lateralis
<400> 4
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro
1 5 10 15

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
20 25 30

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
35 40 45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
50 55 60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
65 70 75 80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
85 90 95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
100 105 110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
115 120 125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
130 135 140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln

165 170 175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
180 185 190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
195 200 205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala
210 215 220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225 230 235 240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
245 250 255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
260 265 270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
275 280 285

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
290 295 300

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305 310 315 320

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
325 330 335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
340 345 350

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val
355 360 365

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
370 375 380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385 390 395 400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
405 410 415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
420 425 430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
435 440 445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
450 455 460

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
465 470 475 480

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
485 490 495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
500 505 510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
515 520 525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
530 535 540

Val Ala Lys Met
545

<210> 5
<211> 1644
<212> DNA
<213> Luciola lateralis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1644)

<400> 5
atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca 48
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro

1 5 10 15

ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat 96
Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
20 25 30

atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt 144
Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
35 40 45

acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt 192
Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
50 55 60

cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gtt gat gga aga att 240
Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
65 70 75 80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc 288
Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
85 90 95

ggt tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act 336
Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
100 105 110

cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta 384
Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
115 120 125

ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg 432
Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
130 135 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat 480
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145 150 155 160

aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa 528
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
165 170 175

ggt ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa 576
Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
180 185 190

caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa 624
Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
195 200 205

ggt gtg caa ctt act cat gaa aat atc gtc act aga ttt tct cac gct 672
Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala
210 215 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta 720
Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225 230 235 240

act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc 768
Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
245 250 255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa 816
Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
260 265 270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att 864
Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
275 280 285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat 912
Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
290 295 300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct 960
Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305 310 315 320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg 1008
Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
325 330 335

ggt gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att 1056
Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
340 345 350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg 1104

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val
355 360 365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg 1152
Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
370 375 380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg 1200
Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385 390 395 400

aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa 1248
Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
405 410 415

gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa 1296
Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
420 425 430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga 1344
His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
435 440 445

tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca 1392
Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
450 455 460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt 1440
Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

465 470 475 480

gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act 1488
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
485 490 495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa 1536
Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
500 505 510

cgt ttg cgt ggt ggt gtc cgt ttt gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc 1584
Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
515 520 525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca 1632
Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
530 535 540

gtt gct aag atg 1644
Val Ala Lys Met
545

<210> 6
<211> 548
<212> PRT
<213> Luciola lateralis

<400> 6

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro
1 5 10 15

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
20 25 30

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
35 40 45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
50 55 60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
65 70 75 80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
85 90 95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
100 105 110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
115 120 125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
130 135 140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
165 170 175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
180 185 190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
195 200 205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala
210 215 220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225 230 235 240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
245 250 255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
260 265 270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
275 280 285

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
290 295 300

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro

305 310 315 320

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
325 330 335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
340 345 350

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val
355 360 365

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
370 375 380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385 390 395 400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
405 410 415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
420 425 430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
435 440 445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
450 455 460

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
465 470 475 480

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
485 490 495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
500 505 510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
515 520 525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
530 535 540

Val Ala Lys Met
545

国際様式　INTERNATIONAL FORM

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則7．1に従い発行される

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

寄託者　氏名（名称）　キッコーマン株式会社
取締役社長　中野　孝三郎　殿

あて名　〒278
千葉県野田市野田339番地

I．微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）	（受託番号）
大腸菌（E. coli）JM101（pHLf7-217Leu）	微工研条寄第　3840　号 （FERM BP-3840）

II．科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質

☐ 分類学上の位置

III．受領及び受託

本国際寄託当局は、平成　4年　4月22日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

IV．国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称：Agency of Industrial Science and Technology
Research Institute

所長　鈴木　修
Osamu SUZUKI, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成　4年（1992）　4月　22日

国際様式　INTERNATIONAL FORM

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PATENT PROCEDURE

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7．1に従い発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

寄託者　氏名（名称）　キッコーマン株式会社
取締役社長　中野　孝三郎　殿

あて名　〒278
千葉県野田市野田339番地

Ⅰ．微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）	（受託番号）
大腸菌（E. coli）JM101（pHLf7-21711c）	微工研条寄第　3841　号 （FERM BP-3841）

Ⅱ．科学的性質及び分類学上の位置

Ⅰ欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質

☐ 分類学上の位置

Ⅲ．受領及び受託

本国際寄託当局は、平成　4年　4月　22日（原寄託日）に受領したⅠ欄の微生物を受託する。

Ⅳ．国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名　称：　Agency of Industrial Science and Technology
National Institute of Bioscience and Human-Technology

所長　鈴木　修
Osamu SUZUKI, DIRECTOR GENERAL

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成　4年（1992）　4月　22日

国際様式　INTERNATION L FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE ... MICROORGANISMS FOR ... PURPOSES ... PATENT PROCEDURE

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約]

RECEIPT IN THE CASE
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7．1に従い発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名（名称）　キッコーマン株式会社
取締役社長　茂木　友三郎

寄託者
あ て 名　〒 278
千葉県野田市野田３３９番地

殿

1．微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）	（受託番号）
大腸菌（E. coli）JM109（pHLfIK）	FERM BP－ 6146

2．科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質
☐ 分類学上の位置

3．受領及び受託

本国際寄託当局は、平成　9 年 10 月 16 日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

4．移管請求の受領

本国際寄託当局は、　　年　　月　　日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
そして、　　年　　月　　日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5．国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称：National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所 長　大箸 信一
Dr. Shinichi Ohashi Director-General

あて名：日本国茨城県[illegible]市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成　9年（1997）10月16日

国際様式　　INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR T PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則7．1に従い発行される。

RECEIPT IN THE CASE (DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

寄託者　氏名（名称）　キッコーマン株式会社
取締役社長　茂木　友三郎　殿

あて名　〒278
千葉県野田市野田339番地

1．微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）
大腸菌（E. coli）JM109（pHLfLK）

（受託番号）
FERM BP－ 6147

2．科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質
☐ 分類学上の位置

3．受領及び受託

本国際寄託当局は、平成　9年　10月　16日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

4．移管請求の受領

本国際寄託当局は、　　年　　月　　日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
そして、　　年　　月　　日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5．国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称：National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology

所長　大箸信一

Dr. Shinichi Ohashi Director-General

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成　9年（1997）10月16日

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/05864

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[6] C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26

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[6] C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), JICST File (JOIS), GeneBank/EMBL/DDBJ (GENETYX)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 7-203995, A (Toa Electronics Ltd.), 8 August, 1995 (08. 08. 95), Full text ; Fig. 1 (Family: none)	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A (Amersham International PLC), 19 May, 1994 (19. 05. 94), Full text ; Figs. 1 to 20 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W.J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescenece and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p.97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A (Kikkoman Corp.), 24 September, 1993 (24. 09. 93), Full text ; Figs. 1, 2 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 March, 1999 (17. 03. 99)	30 March, 1999 (30. 03. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/05864

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 2-171189, A (Kikkoman Corp.), 2 July, 1990 (02. 07. 90), Full text ; Figs. 1 to 8 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, Luciola Lateralis", Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1131, 1992, p.161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, Luciola Cruciata", Gene, Vol. 77, 1988, p.265-270	1-9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９８／０５８６４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ[6]　Ｃ１２Ｎ１５／５３、Ｃ１２Ｎ９／０２、Ｃ１２Ｎ１５／６３、Ｃ１２Ｎ１／２１、Ｃ１２Ｑ１／２６

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[6]　Ｃ１２Ｎ１５／５３、Ｃ１２Ｎ９／０２、Ｃ１２Ｎ１５／６３、Ｃ１２Ｎ１／２１、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

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）

ＢＩＯＳＩＳ（ＤＩＡＬＯＧ）、ＪＩＣＳＴファイル（ＪＯＩＳ）、ＧｅｎｅＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ（ＧＥＮＥＴＹＸ）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	JP, 7-203995, A（東亜電波工業株式会社），８．８月．１９９５（０８．０８．９５）全文、第１図（ファミリーなし）	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A（アマーシャム・インターナショナル・ピーエルシー），１９．５月．１９９４（１９．０５．９４）全文、第１－２０図 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W. J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescenece and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p. 97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A（キッコーマン株式会社），２４．９月．１９９３（２４．０９．９３）全文、第１－２図 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １７．０３．９９	国際調査報告の発送日 30.03.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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） 冨士　良宏　印　４Ｂ　８８３０ 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４９

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

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	関連する請求の範囲の番号
A	JP, 2-171189, A（キッコーマン株式会社），２．７月.１９９０（０２．０７．９０）全文、第１－８図 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, Luciola Lateralis", Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1131, 1992, p. 161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, Luciola Cruciata", Gene, Vol. 77, 1988, p. 265-270	1-9